

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ-ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ Α. ΠΑΠΑΔΑΚΗΣ
ΙΑΤΡΟΣ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΟΛΟΓΟΣ

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΧΗΜΕΙΟΚΙΝΗΣ ΤΕΚΚ (THYMUS-EXPRESSED
CHEMOKINE)/CCL25 ΚΑΙ ΤΟΥ ΧΗΜΕΙΟΪΠΟΔΟΧΕΑ CCR9 ΣΤΗΝ
ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ΤΟΥ CROHN ΣΤΟ ΛΕΠΤΟ ΕΝΤΕΡΟ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2004

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΧΗΜΕΙΟΚΙΝΗΣ ΤΕΚΚ
(THYMUS-EXPRESSED CHEMOKINE)/CCL25
ΚΑΙ ΤΟΥ ΧΗΜΕΙΟΪΠΟΔΟΧΕΑ CCR9 ΣΤΗΝ
ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ΤΟΥ CROHN ΣΤΟ
ΛΕΠΤΟ ΕΝΤΕΡΟ**

Κ.Α. Παπαδάκης
Ηράκλειο 2004

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΗΛΙΑΣ ΚΟΥΡΟΥΜΑΛΗΣ

ΜΕΛΗ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

ΓΙΩΡΓΟΣ ΣΑΜΩΝΗΣ

ΓΙΩΡΓΟΣ ΚΟΛΙΟΣ

Στην σύζυγο μου, Μαρία

Στους γονείς μου
Στους δασκάλους μου

III. ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ολοκληρώνοντας την Διδακτορική Διατριβή μου θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Καθηγητές κ. Η. Κουρούμαλη και Γ. Σαμώνη για την υποστήριξη τους καθόλη την διάρκεια της παρούσας μελέτης καθώς επίσης και τα μέλη της επταμελούς επιτροπής για την αξιολόγηση της διατριβής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή S.R. Targan του Πανεπιστημίου της Καλιφόρνια και του νοσοκομείου Cedars-Sinai για την συμβολή του στην πραγματοποίηση αυτής της μελέτης με την απεριόριστη τεχνική και οικονομική υποστήριξη του. Τα μέλη του Εργαστηρίου Φλεγμονωδών Νόσων του Εντέρου του νοσοκομείου Cedars-Sinai, μεταξύ των οποίων τους Dr. John Prehn, Rivkah Gonsky, τον Richard Deem, και Carol Landers τους ευχαριστώ θερμά για τις συμβουλές τους και την βοήθεια τους κατά την διάρκεια του σχεδιασμού και εκτέλεσης των πειραμάτων. Τους τεχνικούς Cristine Nguyen, και Jackie Zhu για την απομόνωση εντερικών λεμφοκυττάρων, και Patricia Lin για την ανάλυση λεμφοκυττάρων με κυτταρομετρία ροής, την Sofia Moreno και τον Daocheng Zhu για την ολοκλήρωση μερικών πειραμάτων που περιγράφονται στην παρούσα διατριβή. Ευχαριστώ θερμά την Dr Y. Yang και Sheena Lin για την στατιστική ανάλυση των δεδομένων.

Τις θερμές μου ευχαριστίες στον Dr Warren Strober και Dr Ivan Fuss του Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας των Η.Π.Α. για την πρόσκληση τους να παρουσιάσω τα δεδομένα της Διδακτορικής Διατριβής στο Ετήσιο Συνέδριο της Ανοσολογίας του Αμερικανικού Συνδέσμου της Ανοσολογίας και στο Συνέδριο Keystone.

Επίσης ευχαριστώ θερμά την οργάνωση της νόσου του Crohn και κολίτιδας των Η.Π.Α. (CCFA) για την οικονομική υποστήριξη που μου παρείχαν για την ολοκλήρωση αυτής της διατριβής.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την απεριόριστη συμπαράσταση τους κατά την διάρκεια εκπόνησης της παρούσας Διατριβής.

IV. ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	III
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	IV
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ.....	V
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	VI
ABSTRACT.....	VII

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΙΣ ΝΟΣΟΙ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΟΥ

1.1 Εισαγωγή	20
1.2 Επιδημιολογία και Παθογένεια	20
1.3 Παθολογική Ανατομία	24
1.4 Ανοσολογικές Μελέτες (Κυτταροκίνες)	25
1.4.1 Φλεγμονώδεις Κυτταροκίνες	26
1.4.2 Κυτταροκίνες τύπου 1	30
1.4.3 Κυτταροκίνες τύπου 2	33

2. ΧΗΜΕΙΟΚΙΝΕΣ ΚΑΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΧΗΜΕΙΟΚΙΝΩΝ

2.1 Εισαγωγή	37
2.2 Χημειούποδοχείς τύπου CX3C	45
2.3 Χημειούποδοχείς τύπου CC	48
2.4 Χημειούποδοχείς τύπου CX3C	54
2.5 Χημειούποδοχείς τύπου XC	55
2.6 Χημειοκίνες και IΦΕΝ	55

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΥΠΟΘΕΣΗ	63
2. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	63
2.1 Ασθενείς	63
2.2 Υλικό	63
2.3 Αντισώματα και Αντιδραστήρια	64
2.4 Απομόνωση μονοκυττάρων από το περιφερικό αίμα	64
2.5 Απομόνωση μονοκυττάρων από τον εντερικό βλεννογόνο	65
2.6 Απομόνωση μονοκυττάρων από μεσεντερικούς λεμφαδένες	65
2.7 Κυτταρομετρία ροής (Flow cytometry)	66

2.8 Εξαγωγή RNA και αλυσωτή αντίδραση της Πολυμεράσης	66
2.9 Αποτύπωμα Northern	67
2.10 Ανοσοϊστοχημεία	68
2.11 Χημειοτακτικές μελέτες	68
2.12 Ανάλυση κυτταροκινών με ενδοκυτταρική χρώση	69
2.13 Ανάλυση κυτταροκινών με την μέθοδο ELISA	69
2.14 Πειραματικές μελέτες σε επιθηλιακές κυτταρικές σειρές	69
2.15 Μελέτη της απόπτωσης εντερικών T λεμφοκυττάρων	70
2.16 Ανάλυση της παραγωγής αντισωμάτων	70
2.17 Στατιστική ανάλυση των δεδομένων	70
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	71
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	97
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	107
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	108

V. ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Όνομα

Κωνσταντίνος Αντωνίου Παπαδάκης

Διεύθυνση Εργασίας

Κέντρο Φλεγμονωδών Νόσων του Εντέρου Cedars Sinai
8700 Beverly Blvd., D-4063
Los Angeles, California 90048
Τηλ. (310) 423-7725
Fax. (310) 423-0224

Διεύθυνση Οικίας

3767 Mentone Avenue # 102
Los Angeles, California 90034
Τηλ. (310) 559-5153

Ημερ/νία γέννησης

14 Νοεμβρίου 1967

Τόπος γέννησης

Ηράκλειο, Κρήτη, Ελλάδα

Υπηκοότητα

Είδος βίζας

Ελληνική

Οικογ. Κατάσταση

Ο1

Αριθμός Κοιν.Ασφαλ. (ΗΠΑ)

Έγγαμος

Εκπαίδευση

636-34-1266

1993

Πτυχίο Ιατρικής, Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Κρήτης

Μεταδιδακτορική εκπαίδευση

1993-1994

Μεταπτυχιακός Συνεργάτης-Ερευνητής, Τμήμα Ιατρικών
Ειδικοτήτων, Τομέας Λοιμωδών Νόσων, Πανεπιστήμιο του
Τέξας, M.D. Anderson Αντικαρκινικό Κέντρο, Χιούστον, Τέξας.

1994-1995

Ειδικευόμενος Παθολογίας, Πανεπιστήμιο του Τέξας-Κέντρο
Επιστημών Υγείας, Χιούστον, Τέξας

1995-1997

Ειδικευόμενος Παθολογίας, Πανεπιστήμιο του Τέξας – Κέντρο
Επιστημών Υγείας, Χιούστον, Τέξας

1997-2000 Συνεργάτης (Ειδικευόμενος) Γαστρεντερολογίας, Ιατρικό Κέντρο Cedars-Sinai, Πανεπιστήμιο της Καλιφόρνια στο Λος Άντζελες, Κοινό Πρόγραμμα Εκπαίδευσης στην Γαστρεντερολογία.

Άδειες Άσκησης Επαγγέλματος

1997 ως σήμερα Άδεια Άσκησης της Ιατρικής, Καλιφόρνια, A061776

Πιστοποιήσεις

1993-1994 Πιστοποίηση Εξετάσεων για άσκηση της Ιατρικής στις Η.Π.Α (Steps 1-3)

1998 Πιστοποίηση Ειδικότητας Παθολογίας, Αμερικανικό Συμβούλιο Εσωτερικής Παθολογίας

2002 Πιστοποίηση Ειδικότητας Γαστρεντερολογίας, Αμερικανικό Συμβούλιο Εσωτερικής Παθολογίας

Τρέχουσες θέσεις

Ερευνητής ιατρός, Τμήμα Ιατρικής, Τομέας Γαστρεντερολογίας, Κέντρο Φλεγμονωδών του Εντέρου, Ιατρικό Κέντρο Cedars-Sinai (2000-σήμερα)

Επίκουρος Καθηγητής, Σχολή Ιατρικής Πανεπιστημίου της Καλιφόρνια στο Λος Άντζελες (UCLA) (1-1-2002 ως σήμερα)

Επαγγελματικές Δραστηριότητες

2000 – σήμερα Μέλος στο Ίδρυμα Crohn's Colitis of America με την ιδιότητα του ιατρού.

2000 – σήμερα Μέλος του Αμερικανικού Συλλόγου Ανοσολογίας (American Association of Immunologists)

2000 – σήμερα Μέλος του Αμερικανικού Συλλόγου Γαστρεντερολογίας (American Gastroenterological Association)

Συνεργάτης επιστημονικών περιοδικών (Κριτικός)

2000- σήμερα Γαστρεντερολογία (Gastroenterology)

2001- Αμερικανικό Περιοδικό Γαστρεντερολογίας (American Journal of Gastroenterology)

2001- Φλεγμονώδη Εντερικά Νοσήματα (Inflammatory Bowel Diseases)

2001- Κυτταρική Ανοσολογία (Cellular Immunology)

2001-	Ασθένειες του Πεπτικού και του Ήπατος (Digestive and Liver Diseases)
2003-	Αμερικανικό Περιοδικό Φυσιολογίας (American Journal of Physiology)
2003-	Κλινική Γαστρεντερολογία και Ηπατολογία (Clinical Gastroenterology and Hepatology)

Τιμητικές Διακρίσεις και Βραβεία/Αποφάσεις/Απονομές

1994	Αμερικανική Ένωση Μικροβιολογίας, Αποζημίωση Ταξιδιωτικών Εξόδων για Ειδικό Συνέδριο
2000	Αμερικανικός Σύλλογος Γαστρεντερολογίας (American Gastroenterological Association)
2001	AGA/GRG Εργαστήριο Ακαδημαϊκών Δεξιοτήτων, «Εκπαίδευση και Ακαδημαϊκές Ευκαιρίες για το Νεώτερο Διδακτικό Προσωπικό Γαστρεντερολογίας», Singer Island, FL
2002	Τιμητική διάκριση REGAL (R esearch E xcellence in G I and L iver), χορηγήθηκε από το Πανεπιστήμιο του Κάνσας, Διευθυντής: Καθηγητής Prateek Sharma, MD

Ερευνητικές Χορηγίες και Υποτροφίες

Ιαν. 2002 – Δεκ. 2004	Crohn's and Colitis Foundation of America Βραβείο Career Development <i>«Ο ρόλος της Θυμο-εκφραζόμενης Χημοκίνης (TECK) και του υποδοχέα CCR9 στην Τοπική Ειδίκευση του Ανοσοποιητικού Συστήματος του Εντέρου και στην Παθογένεση της Νόσου του Crohn στο Λεπτό Έντερο».</i> Ποσό: \$137.000 Συμμετοχή: 80%
Απρ. 2004- Μαρτ. 2006	Broad Medical Research Foundation, <i>«Φαινοτυπικά και Λειτουργικά χαρακτηριστικά των CCR9⁺ Τ Λεμφοκυττάρων στην νόσο του Crohn του Λεπτού Εντέρου».</i> Ποσό: \$194,000 Συμμετοχή: 30%
Αυγ 2003-Ιούλ. 2008	Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας των ΗΠΑ, Συν-Ερευνητής: Κωνσταντίνος Παπαδάκης Ερευνητής: Stephan R. Targan, <i>«ΙΦΕΝ: Ο ρόλος του TNF-α στην παθογένεια της νόσου του Crohn».</i> Ποσό: \$1,250,000 Συμμετοχή: 20%

Διαλέξεις και Παρουσιάσεις

Παπαδάκης, Κ.Α. «Κλινικό φάσμα λοιμώξεων οφειλόμενων στην *Stenotrophomonas maltophilia*». Εις: “*Stenotrophomonas maltophilia*: Ένα αναδυόμενο νοσοκομειακό παθογόνο με μοναδικές κλινικές εκδηλώσεις και πρότυπα ευπάθειας» (Convener: Vartivarian S.E.) 36^ο Ενδοεπιστημονικό Συνέδριο στους Αντιμικροβιακούς Παράγοντες και στην Χημειοθεραπεία (ICAAC). New Orleans, Louisiana. Αμερικανική Ένωση Μικροβιολογίας (9/1996).

Παπαδάκης, Κ.Α. Ιατρικές Στρατηγικές στην Θεραπεία των Φλεγμονωδών νόσων του Εντέρου: CCFA Los Angeles Chapter, Los Angeles (30/6/2001)

Παπαδάκης, Κ.Α. «Θεραπείες βασιζόμενες στον παράγοντα Αντι-TNF για την Νόσο του Crohn», Honolulu (4/2001)

Παπαδάκης, Κ.Α. «Φαρμακευτική Θεραπεία της Ελκώδους Κολίτιδος». Διάλεξη στους Ειδικευόμενους Γαστρεντερολογίας του UCLA / Σειρά Διαλέξεων στις Φλεγμονώδεις νόσους του Εντέρου, Los Angeles (11/2001)

Παπαδάκης, Κ.Α. «Χημειοκίνες και υποδοχείς χημειοκινών στη φλεγμονή του εντερικού βλεννογόνου», Διάλεξη στους Ειδικευόμενους Γαστρεντερολογίας του UCLA, Los Angeles (3/2001).

Παπαδάκης, Κ.Α. «Ίκτερος», Παρουσίαση περιστατικών/διάγνωση στους Φοιτητές της Ιατρικής Σχολής του UCLA / Ιατρικό Κέντρο Cedars-Sinai, Los Angeles (4/2001, 12/2001).

Παπαδάκης, Κ.Α. «Τοπική Έκφραση της Θυμο-εκφραζόμενης Χημοκίνης (TECK) και του CCR9 υποδοχέα της στο Λεπτό Έντερο: Ενδείξεις αυξημένης επανακυκλοφορίας των λεμφοκυττάρων CCR9+ στη Νόσο του Crohn του Λεπτού Εντέρου. Πρώτη Ετήσια Ημερίδα στους Ανοσογενετικούς Μηχανισμούς Εντερικής Φλεγμονής: Ο Ρόλος των κυτοκινών και χημοκινών, 2-3 Μαρτίου 2001, University of Virginia Health System, Charlottesville, VA.

Παπαδάκης, Κ.Α. «Τρέχουσες εξελίξεις στην παθογένεση και θεραπεία της Φλεγμονώδους Νόσου του Εντέρου», Διάλεξη Γαστρεντερολογίας (Grand Rounds), Columbia University College of Physicians & Surgeons, New York, NY (4/3/2002).

Δημοσιεύσεις / Βιβλιογραφία

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ

Ερευνητικές Εργασίες – Δημοσιευμένες μετά από κριτική επιστημόνων

1. Vartivarian S.E., **Papadakis K. A.**, Palacios J. A., Manning J. T., and E.J. Anaissie : “ Mucocutaneous and soft tissue infections caused by *Xanthomonas maltophilia*: A new spectrum. Annals of Internal Medicine 1994; 121: 969-73.

2. **Papadakis K. A.**, Vartivarian S.E., Vassilaki M.E., and E.J. Anaissie: “ *Stenotrophomonas maltophilia*: An unusual cause of biliary sepsis” Clinical Infectious Diseases 1995;21:1032-4.

3. **Papadakis K. A.**, Vassilaki M. E., Anaissie E. J., and S.E. Vartivarian: “ Septic prepatellar bursitis caused by *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia*” Clinical Infectious Diseases 1996;22:388-9.
4. Vartivarian S. E., **Papadakis, K. A.**, and E. J. Anaissie: “ *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* urinary tract infection: A disease that is usually severe and complicated” Archives of Internal Medicine 1996;156:433-5.
5. Muder R. R., Harris A. P., Muller S., Edmond M., Chow J. W., **Papadakis K.**, Wagener M. W., Bodey G. P., and J. M. Steckelberg: “ Bacteremia due to *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* : A prospective multicenter study of 91 episodes” Clinical Infectious Diseases 1996;22:508-12.
6. Anaissie EJ, Vartivarian SE, Abi-Said D, Uzun O, Pinczowski H, Kontoyiannis DP, Khoury P, **Papadakis K**, Gardner A, Raad II, Gilbreath J and G. P. Bodey: “ Fluconazole versus amphotericin B in the treatment of hematogenous candidiasis: A matched cohort study” American Journal of Medicine 1996;101:170-6.
7. **Papadakis K. A.**, Vartivarian S. E., Vassilaki M. E., and E.J. Anaissie : “ *Stenotrophomonas maltophilia* meningitis: Report of two cases and review of the literature” Journal of Neurosurgery 1997;87:106-8.
8. **Papadakis K.A.**, Sriram PM, and C.M. Smythe: “ Acute epididymo-orchitis due to *Pseudomonas aeruginosa*” European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases 1997;16:476-7.
9. Siddique I., **Papadakis K. A.**, Weber D, and G. Gloor: “ Reccurent bleeding from a duodenal plasmacytoma treated successfully with embolization of the gastroduodenal artery.” American Journal of Gastroenterology 1999;94:1691-2.
10. Vasiliauskas EA, Kam LY, Abreu-Martin M, Hassard PV, **Papadakis K.A.**, Yang H, Zeldis JB, and S.R. Targan. An Open-Label Pilot Study of Low-Dose Thalidomide in Chronically Active, Steroid-Dependent Crohn's Disease. Gastroenterology 1999;117:1278-1287.
11. **Papadakis K.A.**, and Targan S.R: “Tumor Necrosis Factor: biology and therapeutic inhibitors”. Gastroenterology 2000;119:1148-1157 (peer-reviewed).
12. Vartivarian SE, Anaissie EJ, Kiwan EN, **Papadakis K.A.** “The clinical spectrum of *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* respiratory infection” Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine. 2000;21:349-355.
13. **Papadakis K.A.**, Prehn J, Nelson V, Cheng L, Binder S.W, Ponath P.D, Andrew D.P, and Targan S.R: “The role of thymus-expressed chemokine and its receptor CCR9 on lymphocytes in

the regional specialization of the mucosal immune system” The Journal of Immunology 2000;165:5069-5076.

14. **Papadakis K.A.**, Prehn J, Moreno, S, Kouroumalis, E.A., Nelson V, Cheng L, Binder S.W, Ponath P.D, Andrew D.P, and Targan S.R. “C-C Chemokine receptor 9-positive lymphocytes and Thymus-Expressed Chemokine Distinguish Small Bowel from Colonic Crohn’s disease”. Gastroenterology 2001;121:246-254.

15. **Papadakis K.A.**, Tung J.K., Binder S.W., Kam L.Y., Abreu M.T., Targan S.R., and Vasiliauskas E.A. Outcome of Cytomegalovirus (CMV) Infections in Patients with Inflammatory Bowel Disease. American Journal of Gastroenterology 2001;96:2137-2142.

16. Abreu MT, Taylor KD, Lin YC, Hang T, Gaiennie J, Vasiliauskas EA, Kam LY, Rojany M, **Papadakis K.A.**, Rotter JI, Targan SR, Yang H. “Mutations in NOD2 are associated with fibrostenosing disease in patients with Crohn’s disease”. Gastroenterology 2002;123:679-688.

17. **Papadakis K.A.**, Rosenbloom B, Targan SR. “Anti-CD20 chimeric monoclonal antibody (Rituximab) for the treatment of immune-mediated thrombocytopenia associated with Crohn’s disease”. Gastroenterology 2003;124:583.

18. **Papadakis KA**, Landers C, Moreno ST, Hodge MR, Targan SR. “CC Chemokine receptor 9 expression defines a subset of PBL with mucosal T cell phenotype and Th1 or Tr1 cytokine profile” The Journal of Immunology 2003;171: 159-165.

19. **Papadakis KA**, Treyzon L, Abreu MT, Targan SR, Vasiliauskas EA. “Infliximab for the treatment of medically refractory indeterminate colitis”. Alimentary Pharmacology and Therapeutics 2003;18:741-747.

20. Dubinsky MC, Vasiliauskas EA, Singh H, Abreu MT, **Papadakis KA**, Tran T, Martin P, Vierling JM, Geller SA, Targan SR, Poordad FF. “6-Thioguanine can cause serious liver injury in Inflammatory Bowel Disease Patients”. Gastroenterology 2003;125:298-303.

21. **Papadakis KA**, Prehn JL, Landers C, Han Q, Luo X, Cha SC, Wei P, Targan SR. “TL1A synergizes with IL-12 and IL-18 to enhance IFN- γ production in human T and NK cells”. The Journal of Immunology 2004;172:7002-7007.

Κεφάλαια σε Βιβλία

1. **Papadakis K. A.**, Abreu, M.T. Systemic manifestations of Inflammatory Bowel Disease, Chapter 12, p235-250. In *Targan SR, Shanahan F, Karp, LC eds. Inflammatory Bowel Disease: From Bench to Bedside.*

2. **Papadakis K. A.** Indeterminate Colitis. In *Encyclopedia of Gastroenterology*, Johnson LR, Alpers D, Barrett KE, Carethers JM Editors. 2003 (in press).

Ανασκοπήσεις

1. **Papadakis K.A.**, and Targan S.R: "Current theories on the causes of inflammatory bowel disease". Gastroenterology Clinics of North America 1999; 28:283-295.
2. **Papadakis K.A.**, and Targan S.R: " Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease". Annual Review of Medicine 2000;51:289-298.
3. **Papadakis K.A.**, and Targan S.R: "Serologic testing in inflammatory bowel disease: Their value in indeterminate colitis". Current Gastroenterol Reports 1999;1:482-485.
4. **Papadakis K. A.**, and Targan S.R. " The role of chemokines and chemokine receptors in mucosal inflammation". Inflammatory Bowel Diseases. 2000;6:303-313.
5. Tabibzadeh, S, and **Papadakis K. A.** Diagosis and misdiagnosis of Inflammatory Bowel Disease. Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America 2002;12:433-49.
6. **Papadakis K.A.** Chemokines in Inflammatory Bowel Disease. Cuurent Allergy and Asthma Reports 2004, 4: 83-89.

Ειδικό Σχόλιο

1. **Papadakis K.A.** Optimizing the therapeutic potential of azathioprine/6-mercaptopurine in the treatment of Inflammatory Bowel Disease. J Clin Gastroenterol 2003;36:379-81.

Περιλήψεις

1. Varivarian S. E., **Papadakis K. A.**, Anaissie E. J., Palacios J. A., and J. T. Manning: "Mucocutaneous and soft tissue infections caused by *Xanthomonas maltophilia* in cancer patients". 34th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), abstr J9. Orlando, FL. October 1994, American Society for Microbiology.
2. **Papadakis K. A.**, Vartivarian S. E., Anaissie E. J., and G. Samonis: " *Xanthomonas maltophilia* bacteremia in cancer patients: an analysis of 44 episodes". The 32nd Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America (IDSA), abstr # 149. Orlando, FL. October 1994. Clinical Infectious Diseases 1994;19: 588)
3. **Papadakis K. A.**, Vartivarian S. E., and E. J. Anaissie: " The spectrum of *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* respiratory infections". The 34th Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America (IDSA), abstr #330. New Orleans, LA. September 1996. Clinical Infectious Diseases 1996;23: 921

4. Vasiliauskas EA, Kam LY, Abreu-Martin MT, **Papadakis KA**, Zeldis JB, Targan SR. “An open-label, stepwise dose-escalating pilot study to evaluate the safety, tolerance, and efficacy of low-dose thalidomide in the treatment of chronically-active, steroid-dependent Crohn’s disease (CD). Gastroenterology 1998;116:G3637.
5. Pimentel M, Tabibzadeh S, Kirit-Kiriak V, **Papadakis K**, Vasiliauskas EA, Kam L, Targan S, Lin HC: “Prolonged prodrome of gastrointestinal symptoms is associated with Crohn’s disease but not ulcerative colitis” Gastroenterology 1999;116:G3453.
6. **Papadakis K.A.** , Prehn J, Targan SR: “ Alterations in expression and regulation of the chemokine receptor CXCR3 in LPL from normal compared to inflammatory bowel disease mucosa. American Gastroenterological Association (AGA)/Digestive Disease Week, May 21-24, 2000, San Diego CA (DDW poster of distinction). Gastroenterology 118;1883, 2000
7. **Papadakis K.A.** , Prehn J, Andrew DP, Ponath PD, Targan SR: “Regional expression of Thymus-expressed Chemokine (TECK) and its receptor CCR9 in the Small bowel: Evidence for enhanced recirculation of CCR9+ lymphocytes in Small bowel Crohn’s disease”. Selected for oral presentation at the DDW, May 21-24, 2000, San Diego, CA by the AGA, and for oral and poster presentation at the American Association of Immunologists/Clinical Immunological Society (AAI/CIS) Joint Annual Meeting, May 12-16, Seattle, WA. Gastroenterology 118;3626, 2000
8. Sachmechian, A., Vasiliauskas, E., Abreu, M. T., Binder, S., **Papadakis, K.**, Thomas, S. Targan, S.R., Kam, L.Y. “Malignancy Following RemicadeTherapy: Incidence and Characteristics”. Abstract. Gastroenterology 120;5:A3144, 2001
9. Kantorovich V, Vasiliauskas E, Gruntmanis U, **Papadakis K**, Zehnder D, Abreu M, Targan SR, Hewison M, Adams JS. “High 1,25-(OH)₂D levels in patients with active Crohn’s disease are caused by local overexpression of 1-alpha hydroxylase in macrophages”. Journal of Bone and Mineral Research 16:S227, Suppl 1, 2001
10. **Papadakis KA**, Moreno ST, Targan SR. “Interferon- γ induces the expression of the chemokine TECK in Caco-2 but not HT-29 Intestinal Epithelial Cells”. In Keystone Symposia: Microbial-Epithelial-Lymphocyte Interactions in Mucosal Immunity (F1), Session 1, Poster 104, April 6, 2002, Breckenridge, Colorado.
11. Lo SK, Fisher HA, Tabibzadeh S, **Papadakis KA**, Dea S. “Evaluation of bleeding of undetermined origin by wireless endoscopy”. American Gastroenterological Association (AGA)/Digestive Disease Week, May 19-22, 2002, San Francisco, CA. Gastroenterology 122;P-177, M1959, 2002
12. Lo SK, **Papadakis KA**, Dea S, Fisher HA. “Inter-observer variability in the interpretation of wireless endoscopy images”. American Gastroenterological Association (AGA)/Digestive Disease Week, May 19-22, 2002, San Francisco, CA. Gastroenterology 122;P-177, M1963, 2002

13. Lo SK, Fisher HA, Tabibzadeh S, **Papadakis KA**, Dea S, Deleon, V, Daniels, J. “Utility of Wireless capsule Endoscopy in a community-based open access referral center”. American Gastroenterological Association (AGA)/Digestive Disease Week, May 19-22, 2002, San Francisco, CA. Gastroenterology 122;P-177, M1964, 2002
14. Lo SK, Fisher HA, **Papadakis KA**, Dea S, Ofman, J, Tabibzadeh S. “Potential savings in resource utilization by performing Wireless Endoscopy in patients with bleeding of undetermined origin”. American Gastroenterological Association (AGA)/Digestive Disease Week, May 19-22, 2002, San Francisco, CA. Gastroenterology 122;P-178, M1983, 2002
15. Abreu MT, Taylor KD, Lin YC, Hang T, Gaiennie J, Vasiliauskas EA, Kam LY, Rojany M, **Papadakis KA**, Rotter JI, Targan SR, Yang H. Mutations in NOD2 are associated with fibrostenosing disease in patients with Crohn’s disease (CD). American Gastroenterological Association (AGA)/Digestive Disease Week, May 19-22, 2002, San Francisco, CA. Gastroenterology 122;A-29, 246, 2002 (oral presentation)
16. **Papadakis KA**, Moreno ST, Landers C, Hodge MR, Targan SR. Evidence for CD4+CCR9+ peripheral blood lymphocytes as circulating mucosal T helper-1 effector cells. American Gastroenterological Association (AGA)/Digestive Disease Week, May 19-22, 2002, San Francisco, CA. Gastroenterology 122;A-31, 256, 2002 (oral presentation)
17. Mow WS, Abreu MT, **Papadakis KA**, Targan SR, Vasiliauskas EA. High incidence of anergy limits the usefulness of PPD screening for tuberculosis (TB) prior to Remicade[®] in Inflammatory Bowel Disease (IBD). American Gastroenterological Association (AGA)/Digestive Disease Week, May 19-22, 2002, San Francisco, CA. Gastroenterology 122;A-100, 774, 2002 (oral presentation)
18. Mow WS, Lo SK, Abreu MT, Targan SR, **Papadakis KA**, Vasiliauskas EA. Video capsule enteroscopy can be useful in the diagnosis and management of Inflammatory Boel Disease (IBD). American Gastroenterological Association (AGA)/Digestive Disease Week, May 19-22, 2002, San Francisco, CA. Gastroenterology 122;A-218, S1385, 2002
19. **Papadakis KA**, Moreno ST, Targan SR. Interferon- γ induces the expression of the chemokine TECK in Caco-2 but not HT-29 Intestinal epithelial cells. American Gastroenterological Association (AGA)/Digestive Disease Week, May 19-22, 2002, San Francisco, CA. Gastroenterology 122;A-530, W913, 2002
20. **Papadakis KA**, Abreu MT, Targan SR, Vasiliauskas EA. Is Infliximab effective for the treatment of Indeterminate Colitis? American Gastroenterological Association (AGA)/Digestive Disease Week, May 19-22, 2002, San Francisco, CA. Gastroenterology 122;A-616, W1356, 2002
21. **Papadakis KA**, Landers C, Moreno ST, Hodge MR, Targan SR. “Evidence that CD4+CCR9+ peripheral blood T cells are circulating mucosal lymphocytes with both Th-1

effector and Tr-1 regulatory cytokine profile. Society for Mucosal Immunology, 11th International Congress of Mucosal Immunology, June 16-20, 2002, Orlando, Florida, USA. (abstract presentation).

22. Mow W, Vasiliauskas EA, Lin YC, Fleshner PR, **Papadakis K**, Taylor KD, Landers CJ, Rotter JI, Abreu MT, Yang H, Targan SR. Antibodies against the Crohn's Disease (CD)-associated bacterial sequence I2 (anti-I2) are an independent marker of fibrostenosing CD. American Gastroenterological Association (AGA)/Digestive Disease Week, 2003, Orlando, FL. Gastroenterology 2003;124: 26.

23. Dubinsky M, Vasiliauskas E, Singh H, Tran T, **Papadakis K**, Abreu M, Martin P, Vierling J, Geller S, Targan S, Poordad F. 6-Thioguanine (6-TG) may cause serious liver injury in inflammatory bowel disease (IBD) patients. American Gastroenterological Association (AGA)/Digestive Disease Week, 2003, Orlando, FL. Gastroenterology 2003;124: 67.

24. **Papadakis KA**, Landers C, Hodge M, Targan SR. CD4+CCR9+ PBL contain differentiated T regulatory 1 (Tr1) cells and subset that provides B cell help for immunoglobulin production. American Gastroenterological Association (AGA)/Digestive Disease Week, 2003, Orlando, FL. Gastroenterology 2003;124: S1095.

25. Hui T, Fleshner RP, Landers CJ, Gaiennie J, Abreu M, Vasiliauskas EA, **Papadakis KA**, Lin YC, Huiying Y, Targan SR. The presence or absence of serologic responses in indeterminate colitis (IC) patients before ileal pouch-anal anastomosis (IPAA) may determine those at risk for persistent pouch inflammation. American Gastroenterological Association (AGA)/Digestive Disease Week, 2003, Orlando, FL. Gastroenterology 2003;124: S1308.

26. Lo SK, Zaidel O, Tabibzadeh S, **Papadakis KA**, Treyzon L, Kimble J, Vasiliauskas EA. Utility of wireless capsule enteroscopy (WCE) and IBD serology in re-classifying indeterminate colitis (IC). American Gastroenterological Association (AGA)/Digestive Disease Week, 2003, Orlando, FL. Gastroenterology 2003;124: S1310.

27. Tabibzadeh S, Zaidel O, Papadakis K, Vasiliauskas E, Kimble J, Treyzon L, Lo SK. Utility of wireless capsule enteroscopy (WCE) versus serology in the evaluation of SB Crohn's disease. American Gastroenterological Association (AGA)/Digestive Disease Week, 2003, Orlando, FL. Gastroenterology 2003;124: M1889.

28. Tabibzadeh S, Kimble J, Zaidel O, Papadakis KA, Vasiliauskas EA, Treyzon L, Lo SK. Distribution of SB erosions or ulcerations in patients presenting for wireless capsule enteroscopy (WCE). American Gastroenterological Association (AGA)/Digestive Disease Week, 2003, Orlando, FL. Gastroenterology 2003;124: M1890.

VI. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι χημειοκίνες και οι υποδοχείς τους έχουν αναγνωρισθεί ως σημαντικοί ρυθμιστές στην κυκλοφορία των λευκοκυττάρων σε λοιμώξεις και φλεγμονώδεις εστίες. Τουλάχιστον 40 χημειοκίνες και 19 χημειοϋποδοχείς έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα στον άνθρωπο. Η συνδυαστική έκφραση των χημειοϋποδοχέων στην κυτταρική επιφάνεια των λευκοκυττάρων τα καταστέλλει ικανά να ανταποκριθούν σε χημειοτακτικά σήματα και επιτρέπει επιλεκτικότητα και ειδικότητα στο είδος των λευκοκυττάρων που προσελκύονται κατά την διάρκεια μίας ανοσολογικής αντίδρασης. Οι ομοιοστατικές χημειοκίνες συμβάλλουν στην συνεχή μετακίνηση των λεμφοκυττάρων στα λεμφικά όργανα αλλά και σε διάφορα ανατομικά τμήματα των λεμφικών οργάνων και στους περιφερικούς ιστούς. Οι φλεγμονώδεις χημειοκίνες, σε αντίθεση, συμβάλλουν στην προσέλκυση ανοσοκυττάρων σε φλεγμονώδεις εστίες. Μερικές ομοιοστατικές χημειοκίνες και οι υποδοχείς τους συμβάλλουν στην οργάνωση και τμηματοποίηση της τοπικής ανοσίας σε διάφορα περιφερικά όργανα. Παραδείγματα αποτελούν η συσχέτιση της CTACK/CCL27 και του υποδοχέα CCR10 και της TECK/CCL25 και του υποδοχέα CCR9 με ανοσολογικές αντιδράσεις του δέρματος και του λεπτού εντέρου, αντίστοιχα.

Μελετήσαμε τον ρόλο της χημειοκίνης TECK/CCL25 και του υποδοχέα CCR9 στην ανοσολογία του εντέρου και τον πιθανό ρόλο που διαδραματίζουν στην παθογένεια της νόσου του Crohn στο λεπτό έντερο. Η έκφραση της χημειοκίνης TECK/CCL25 μελετήθηκε με ανοσοϊστοχημεία σε φυσιολογικούς εντερικούς ιστούς και την συγκρίναμε με την έκφραση της σε φλεγμονώδη ιστό του λεπτού και παχέως εντέρου. Αναλύσαμε επίσης την έκφραση του υποδοχέα CCR9 σε T λεμφοκύτταρα στους εντερικούς ιστούς σε υγιείς μάρτυρες και σε ασθενείς με φλεγμονώδη εντεροπάθεια του λεπτού και παχέως εντέρου. Τέλος μελετήσαμε τον φαινότυπο και τα λειτουργικά χαρακτηριστικά του μικρού ποσοστού των T λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος που εκφράζουν τον υποδοχέα CCR9 σε υγιείς μάρτυρες.

Τα **αποτελέσματα** έδειξαν ότι η χημειοκίνη TECK/CCL25 εκφράζεται επιλεκτικά στο λεπτό έντερο και η παραγωγή της αυξάνεται στην νόσο του Crohn του λεπτού αλλά όχι του παχέως εντέρου. Η χημειοκίνη TECK/CCL25 προσελκύει λεμφοκύτταρα του λεπτού αλλά όχι του παχέως εντέρου μέσω επίδρασης της με τον χημειοϋποδοχέα CCR9. Τα T λεμφοκύτταρα που εκφράζουν τον CCR9 εντοπίζονται επιλεκτικά στον βλεννογόνο του λεπτού εντέρου και η συχνότητα τους αυξάνεται στο περιφερικό αίμα ασθενών με νόσο του Crohn στο λεπτό έντερο και σε ασθενείς με κοιλιοκάκη. Το μικρό ποσοστό των T λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος σε υγιείς μάρτυρες που εκφράζουν τον υποδοχέα CCR9 έχουν χαρακτηριστικά ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων, παράγουν κυτταροκίνες βοηθητικών κυττάρων τύπου 1 και ρυθμιστικών κυττάρων τύπου 1 και επίσης συμβάλλουν στην έκκριση ανοσοσφαιρινών, συμπεριλαμβανομένου της τάξης IgA, από B λεμφοκύτταρα και συνεπώς έχουν χαρακτηριστικά εντερικών T λεμφοκυττάρων.

Συμπερασματικά, η χημειοκίνη TECK/CCL25 και ο υποδοχέας της CCR9 αποτελούν χαρακτηριστικά του ανοσολογικού συστήματος του λεπτού εντέρου. Οι αλλαγές στην έκφραση της

TECK/CCL25 και του CCR9 στην νόσο του Crohn στο λεπτό έντερο δηλώνει ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου.

VII. ABSTRACT

Chemokines and their receptors have emerged as critical regulators of leukocyte trafficking during infection and inflammation. At least 40 chemokines and 19 chemokine receptors have been described in humans. The combinatorial expression of chemokine receptors on the cell surface of leukocytes provides cues to migratory signals through chemokine gradients, which provide high selectivity and specificity in the type and activation state of the recruited cells. Several homeostatic chemokines function as regulators of basal lymphocyte trafficking to or within lymphoid organs and in peripheral tissues, whereas the inflammatory ones are involved in the recruitment of immune cells to the site of inflammation. Some constitutively expressed chemokines and their receptors are involved in the organization and compartmentalization of immune responses to distinct anatomic locations. Examples include the association of the CTACK/CCL27 and its receptor CCR10 and TECK/CCL25 and its receptor CCR9 with skin and small intestinal mucosal immune responses, respectively.

We **studied** the role of TECK/CCL25 and its receptor CCR9 in mucosal immunity and its possible role in the pathogenesis of human small intestinal Crohn's disease (CD). Expression patterns of TECK/CCL25 were analyzed by immunohistochemistry in normal mucosal tissues and compared with that in inflamed small and large intestine. The expression patterns of CCR9 in T lymphocytes in mucosal lymphoid tissues and peripheral blood were analyzed in normal controls and patients with small intestinal or colonic inflammation. Finally the phenotypic and functional characteristics of the small number of CCR9⁺ T lymphocytes from peripheral blood of healthy normal donors were analyzed.

Our **results** showed that TECK/CCL25 is selectively expressed in the small intestine but not colon and its expression is increased in small intestinal but not colonic CD. TECK/CCL25 chemoattracts small intestinal, but not colonic, lymphocytes through the chemokine receptor CCR9. CCR9⁺ T lymphocytes are preferentially localized to the small intestinal immune compartment and their percentage is increased in the peripheral circulation of patients with small intestinal inflammatory diseases, such as CD and celiac disease. The small percentage of CCR9⁺ T lymphocytes isolated from the peripheral blood of healthy donors have an activated phenotype, a T helper 1 (Th1) and T regulatory 1 (Tr1) cytokine profile and provide B cell help for immunoglobulin, including IgA, production, and hence have mucosal T cell characteristics.

In **conclusion**, the chemokine TECK/CCL25 and its receptor CCR9 characterize the small intestinal immune compartment. Alterations of TECK/CCL25 and CCR9 expression in small intestinal CD imply an important role of this chemokine ligand/receptor pair in the pathogenesis of small intestinal CD.

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΙΣ ΝΟΣΟΙ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΟΥ

1.1 Εισαγωγή

Η ελκώδης κολίτιδα και η νόσος του Crohn αποτελούν τις δύο κύριες μορφές των ιδιοπαθών φλεγμονωδών εντεροπαθειών (ΙΦΕΝ), η αιτιολογία των οποίων παραμένει άγνωστη.¹ Οι νόσοι αυτοί εμφανίζονται κυρίως σε άτομα νεαρής ηλικίας. Περίπου 15 έως 20 % των περιστατικών παρουσιάζονται σε άτομα ηλικίας κάτω των 16 χρόνων. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι υπάρχει ευρεία γεωγραφική κατανομή στην συχνότητα των νόσων αυτών μεταξύ βορείου και νοτίου ημισφαιρίου, ειδικά όσον αφορά την νόσο του Crohn. Για παράδειγμα η συχνότητα της νόσου του Crohn είναι 10-20 φορές συχνότερη στην Σκανδιναβία από ότι είναι στην Ελλάδα.²

Η αιτιολογία των ΙΦΕΝ παραμένει άγνωστη αλλά διάφοροι περιβαλλοντικοί και γενετικοί παράγοντες έχουν ενοχοποιηθεί στην παθογένεια των νόσων αυτών. Το αποτέλεσμα των επιδράσεων διαφόρων περιβαλλοντικών παραγόντων, γενετικού υποστρώματος και βακτηριακών αντιγόνων του εντερικού αυλού οδηγούν σε αυξημένη ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος του εντέρου με αποτέλεσμα την ανάπτυξη χρόνιας φλεγμονής.³ Η πιο επικρατούσα υπόθεση όσον αφορά την παθογένεια των νόσων αυτών υποστηρίζει ότι οφείλεται στην ανάπτυξη ανοσολογικής αντίδρασης σε βακτηριακά αντιγόνα του εντερικού αυλού που σε φυσιολογικές καταστάσεις οδηγούν είτε σε ανοσολογική άγνοια ή καταστολή.¹ Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται από πειραματικά δεδομένα σε ζωϊκά μοντέλα εντερικής φλεγμονοπάθειας όπου η έλλειψη της βακτηριδιακής χλωρίδας από τον εντερικό αυλό δεν προκαλεί φλεγμονώδη εντεροπάθεια.

1.2 Επιδημιολογία και Παθογένεια

Επιδημιολογία

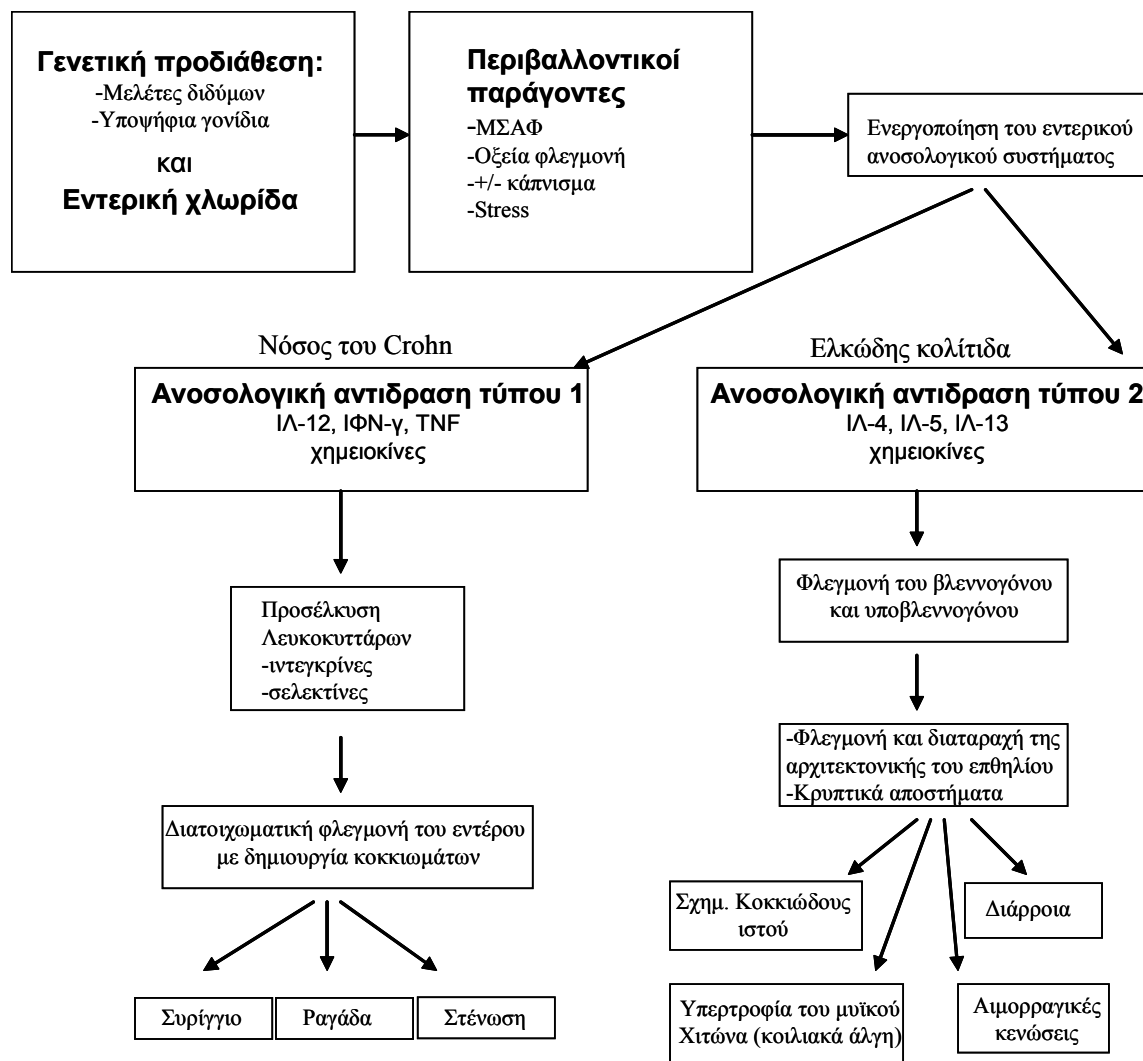
Περίπου 1-2 εκατομμύρια άτομα στις ΗΠΑ πάσχουν από ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις εντεροπάθειες (ΙΦΕΝ). Η επίπτωση της νόσου του Crohn είναι περίπου 3.6-8.8 και της ελκώδης

κολίτιδας 3-15 ανά 100,000 άτομα.⁴ Σε αντίθεση με την ελκώδη κολίτιδα, η νόσος του Crohn είναι ελαφρά πιά συχνή σε γυναίκες. Υπάρχει μία διφασική κατανομή στην συχνότητα των ΙΦΕΝ στον γενικό πληθυσμό. Οι περισσότερες περιπτώσεις παρουσιάζονται σε άτομα ηλικίας 15 έως 40 ετών. Μία δεύτερη αιχμή στην συχνότητα της νόσου παρατηρείται σε άτομα ηλικίας μεγαλύτερα των 60 ετών.⁴ Οι ΙΦΕΝ μπορούν να προσβάλλουν άτομα από όλες τις φυλές και εθνικότητες. Ο μεγαλύτερος επιπολασμός των ΙΦΕΝ παρατηρείται στην Βόρεια Αμερική και στην Ευρώπη. Οι ΙΦΕΝ επίσης παρουσιάζονται συχνότερα σε άτομα της καυκάσιας από ότι σε άτομα της μαύρης ή Ασιατικής φυλής της Αμερικής. Η υψηλότερη συχνότητα των νόσων αυτών παρατηρείται σε Ασκενάζι Εβραίους της Ευρώπης και της Αμερικής. Επίσης έχει παρατηρηθεί αυξημένη συχνότητα των ΙΦΕΝ στο βόρειο ημισφαίριο από ότι στην περιοχή του ισημερινού.⁴

Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι τις τελευταίες δεκαετίες η συχνότητα των ΙΦΕΝ έχει αυξηθεί σε άτομα της Ασιατικής και Μαύρης φυλής της Αμερικής. Η συχνότητα της ελκώδης κολίτιδας για παράδειγμα στην πόλη της Σεούλ, Νότια Κορέα, έχει αυξηθεί 10 φορές σε σχέση με την συχνότητα της στην δεκαετία του 80. Επίσης άτομα από την Νότια Ασία που μετοικίζουν σε αναπτυγμένες χώρες παρουσιάζουν υψηλότερο κίνδυνο να αναπτύξουν ΙΦΕΝ. Μία μελέτη σε παιδιά στην Νοτιοανατολική ΗΠΑ έδειξε ότι η συχνότητα της νόσου του Crohn και της ελκώδης κολίτιδας βρέθηκε η ίδια μεταξύ ατόμων της Μαύρης και Λευκής φυλής.⁴ Αυτές οι μελέτες δηλώνουν ότι υπάρχει δυναμική κατανομή των νόσων αυτών μεταξύ διαφορετικών φυλών και εθνικοτήτων και υποδηλώνουν τον σημαντικό ρόλο διαφόρων περιβαλλοντικών παραγόντων στην ανάπτυξη της νόσου του Crohn και της ελκώδης κολίτιδας.

Παθογένεια

Η παθογένεια των ΙΦΕΝ θεωρείται πολυπαραγοντική.^{1,3} Υποστηρίζεται ότι μετά από διάσπαση του γαστροεντερικού βλεννογόνιου φραγμού σε άτομα με γενετική προδιάθεση, τα αντιγόνα του εντερικού αυλού προκαλούν συνεχή ενεργοποίηση του εντερικού ανοσοποιητικού συστήματος που οδηγεί σε ιστική βλάβη και στην ανάπτυξη κλινικών συμπτωμάτων. Στην εικόνα 1 παρουσιάζεται μία σχηματική άποψη της παθογένειας της νόσου του Crohn και της ελκώδης κολίτιδας.



Εικόνα 1. Συνοπτική θεώρηση της παθογένειας των ΙΦΕΝ. ΜΣΑΦ= μη-στεροειδή αντι-φλεγμονώδη, IL=ιντερλευκίνη, IFN=ιντερφερόνη, TNF= παράγοντας νέκρωσης των όγκων.

Γενετική προδιάθεση

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει την ύπαρξη γενετικής προδιάθεσης στην ανάπτυξη των ΙΦΕΝ. Για παράδειγμα, συγγενείς πρώτου βαθμού ασθενών με ΙΦΕΝ παρουσιάζουν 4-20 φορές αυξημένο κίνδυνο για την ανάπτυξη της νόσου.⁵ Επίσης οικογενειακά μέλοι ασθενών με νόσο του Crohn που επίσης έχουν την νόσο, παρουσιάζουν συχνά παρόμοια κλινικά χαρακτηριστικά ενδεικτικό ύπαρξης κοινών γενετικών και πιθανόν περιβαλλοντικών παραγόντων στην παθογένεια της νόσου.⁶ Μελέτες επίσης έχουν δείξει ότι η συχνότητα της νόσου είναι αυξημένη, κυρίως όσον αφορά την νόσο του Crohn, μεταξύ μονοζυγωτικών από ότι διζυγωτικών διδύμων.⁷ Παρόλα αυτά η πλειοψηφία των ασθενών με ΙΦΕΝ δεν έχουν οικογενειακό ιστορικό της νόσου.

Υποστηρίζεται ότι η γενετική προδιάθεση για την ανάπτυξη των νόσων αυτών είναι πολυγονική. Διάφορες χρωμοσωμιακές περιοχές έχουν βρεθεί να σχετίζονται με την ανάπτυξη των ΙΦΕΝ.⁸ Η περιοχή IBD1 στο χρωμόσωμα 16 (16q12) έχει συσχετισθεί με την νόσο του Crohn.⁹ Επίσης η ανάπτυξη της νόσου σε νεαρή ηλικία και η παρουσία περιπρωκτικής νόσου έχουν συσχετισθεί με συγκεκριμένη περιοχή στο χρωμόσωμα 5 (5q31).¹⁰ Η περιοχή στο χρωμόσωμα 16 έχει διευκρινιστεί ότι οφείλεται στο γονίδιο CARD15 (γνωστό επίσης ως NOD2).^{11, 12} Η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί το γονίδιο CARD15 εκφράζεται σε μονοκύτταρα/μακροφάγα και σε κύτταρα του Paneth στο λεπτό έντερο.¹³ Διάφορες μεταλλάξεις στο γονίδιο CARD15 σχετίζονται με την ανάπτυξη της νόσου του Crohn αλλά οι τρεις κύριες είναι οι R702W, G908R and 1007fsinsC.^{11, 12} Οι μεταλλάξεις αυτές παραδόξως προκαλούν ανεπαρκή ενεργοποίηση του παράγοντα NF-kB στα μακροφάγα.¹¹ Ο παράγοντας NF-kB διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση διαφόρων φλεγμονωδών παραγόντων σε κύτταρα όπως κυτταροκινών και χημειοκινών. Ενώ κανείς θα περίμενε ότι μία τέτοια ελλειμματική ενεργοποίηση του παράγοντα NF-kB θα οδηγούσε σε ελλειμματική ενεργοποίηση του ανοσολογικού συστήματος του εντέρου, ομοζυγωτικά άτομα με αυτές τις μεταλλάξεις έχουν 20-40 φορές αυξημένο κίνδυνο να αναπτύξουν νόσο του Crohn.¹¹ Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι το γονίδιο CARD15/NOD2 αναγνωρίζει το διπεπτίδιο muramyl (το μόριο της πεπτιδογλυκάνης που βρίσκεται σε πολλά βακτήρια) και ενεργοποιεί τον παράγοντα NF-kB.¹⁴ Είναι λοιπόν πιθανόν ότι η ανικανότητα των μακροφάγων να ανταποκριθούν αποτελεσματικά σε αυτή την ουσία μπορεί δευτερογενώς να οδηγήσει σε απρόσκοπη ενεργοποίηση του εντερικού ανοσολογικού συστήματος και στην ανάπτυξη χρόνιας φλεγμονής. Μία δεύτερη υπόθεση υποστηρίζει ότι τα κύτταρα του Paneth στο λεπτό έντερο που εκφράζουν την μεταλλαγμένη πρωτεΐνη NOD2 αδυνατούν να ανταποκριθούν επαρκώς σε βακτηριδιακή άμυνα λόγω αυτών των μεταλλάξεων με αποτέλεσμα την ανάπτυξη χρόνιας φλεγμονής.¹³ Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των μεταλλάξεων στο γονίδιο CARD15/NOD2 και της συχνής εντόπισης της νόσου στο τελικό ιλέο.¹³

Εντερικά Αντιγόνα

Μελέτες σε διάφορα ζωϊκά μοντέλα κολίτιδας έχουν αποδείξει ότι η εντερική χλωρίδα αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την ανάπτυξη της νόσου. Για παράδειγμα ποντικοί με γενετική ευπάθεια που μεγαλώνουν σε στείρο περιβάλλον δεν αναπτύσσουν κολίτιδα ενώ επανεισαγωγή

της εντερικής χλωρίδας οδηγεί σε ενεργοποίηση του εντερικού ανοσολογικού συστήματος και στην ανάπτυξη φλεγμονής.¹⁵ Είναι επίσης γνωστό ότι η νόσος του Crohn συνήθως υποτροποιάζει μετά από χειρουργική εκτομή και εντερική αναστόμωση σε 85 με 90% των περιπτώσεων. Αυτό οφείλεται στην παρουσία εντερικής χλωρίδας καθώς μετά από τοπική εντερική εκτομή με αναστόμωση και κεντρική παρακαμπτική ιλεοστομία η νόσος παραμένει συνήθως σε ύφεση.¹⁶

Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Περιβαλλοντικοί παράγοντες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση των ΙΦΕΝ σε άτομα με γενετική ευπάθεια. Οι περιβαλλοντικοί αυτοί παράγοντες πιστεύεται ότι επηρεάζουν την εντερική χλωρίδα ή προκαλούν βλάβη στον βλεννογόνο εντερικό φραγμό. Για παράδειγμα η χορήγηση αντιβιοτικών, οξείας λοίμωξης ή η χορήγηση μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων, που επηρεάζουν την διαπερατότητα του εντερικού βλεννογόνου, μπορεί να προκαλέσει εντερική φλεγμονή σε άτομα με γενετική ευπάθεια.¹⁷ Το κάπνισμα, που έχει αρνητική επίδραση στην νόσο του Crohn, προκαλεί αλλαγές στην αιματική ροή και επηρεάζει την έκκριση βλέννης και συνεπώς μπορεί να αλλοιώσει την διαπερατότητα του βλεννογόνου φραγμού.¹⁸ Σε αντίθεση το κάπνισμα επηρεάζει θετικά την ελκώδη κολίτιδα καθώς φαίνεται ότι προστατεύει τα άτομα από εξάρσεις της νόσου. Συμπερασματικά όλα αυτοί οι περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορεί να επηρεάσουν την ενεργοποίηση του εντερικού ανοσολογικού συστήματος έναντι αντιγόνων της εντερικής χλωρίδας και συνεπώς να προδιαθέσουν στην ανάπτυξη των ΙΦΕΝ.

1.3 Παθολογική Ανατομία

Τα χαρακτηριστικά της εντερικής φλεγμονής είναι διαφορετικά στην νόσο του Crohn από ότι στην ελκώδη κολίτιδα. Για παράδειγμα στην νόσο του Crohn η φλεγμονή χαρακτηρίζεται από τμηματικές αλλοιώσεις στο έντερο ενώ στην ελκώδη κολίτιδα η φλεγμονή είναι συνεχής και διάχυτη.¹⁹⁻²¹ Η νόσος του Crohn μπορεί να επηρεάσει κάθε τμήμα του γαστροεντερικού συστήματος ενώ η ελκώδης κολίτιδα επηρεάζει μόνο το ορθό και το παχύ έντερο. Στην νόσο του Crohn μπορεί να παρατηρηθούν στοματικές και περιπρωκτικές φλεγμονώδεις αλλοιώσεις αλλά συνήθως προσβάλλεται ο ιλεός και το παχύ έντερο.^{19, 20} Στην ελκώδη κολίτιδα μπορεί να βρεθεί

τοπική φλεγμονή στο τυφλό και σπανιότερα η λεγόμενη “backwash” ιλειτίδα. Ενδοσκοπικά η εντερική φλεγμονή στην νόσο του Crohn χαρακτηρίζεται από αφθοειδή και γραμμικά έλκη, που μπορούν να επεκταθούν δίνοντας την εικόνα «πλακόστρωτου» και σπάνια χαρακτηρίζεται από φλεγμονώδης πολύποδες.^{19, 21} Στην ελκώδη κολίτιδα παρατηρείται ερυθρότητα, ευθρυπτότητα, εξαφάνιση των αγγείων του βλεννογόνου και συχνή παρουσία φλεγμονωδών πολύποδων. Ιστολογικά η νόσος του Crohn χαρακτηρίζεται από διατοίχωματική φλεγμονή και την συχνή ύπαρξη κοκκιομάτων. Η φλεγμονώδεις διήθηση χαρακτηρίζεται από την παρουσία λεμφοκυττάρων και μονοκύτταρων/μακροφάγων.¹⁹ Στην ελκώδη κολίτιδα παρατηρείται οξεία και χρόνια φλεγμονή με διήθηση του βλεννογόνου από λεμφοκύτταρα, ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηνα και εοσινόφιλα λευκοκύτταρα και συχνά παρατηρούνται κρυπτίτιδα και κρυπτικά αποστήματα.¹⁹ Η διήθηση των διάφορων φλεγμονωδών κυττάρων στον εντερικό βλεννογόνο πιστεύεται ότι οφείλεται στην παραγωγή τοπικά χημειοτακτικών παραγόντων (χημειοκινών) όπως θα περιγραφεί στην συνέχεια.

1.4 Ανασολογικές μελέτες (Κυτταροκίνες)

Οι κυταροκίνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια των φλεγμονωδών νόσων του εντέρου καθώς η χορήγηση θεραπευτικών σχημάτων που απενεργοποιούν συγκεκριμένες κυτταροκίνες, για παράδειγμα τον παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF), έχει αποδειχθεί αρκετά αποτελεσματική στη θεραπεία της νόσου του Crohn.²²

Προκειμένου να διατηρηθεί η ομοιοστασία στο έντερο, το ανοσολογικό σύστημα του εντέρου διατηρεί μία λεπτή ισορροπία μεταξύ φλεγμονωδών και αντι-φλεγμονωδών κυτταροκινών. Για παράδειγμα κατά την διάρκεια εντερικής λοίμωξης από παθογόνα βακτήρια μονοκύτταρα και δενδριτικά κύτταρα του εντερικού βλεννογόνου παράγουν φλεγμονώδεις κυτταροκίνες που έχουν σημαντική επίδραση στην φυσιολογία του εντέρου. Οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως η ιντερλευκίνη (IL)-1, IL-6, και TNF ενεργοποιούν εντερικά επιθηλιακά κύτταρα και μακροφάγα προκειμένου να παράγουν χημειοκίνες, οι οποίες οδηγούν στην χημειοταξία, προσκόληση στα ενδοθηλιακά κύτταρα και διαπίδηση λευκοκυττάρων στο διάμεσο ιστό.²³ Άλλες φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως η IL-12 και IL-18 που παράγονται κυρίως από μακροφάγα ενεργοποιούν ενδοεπιθηλιακά και υποβλεννογόνια T λεμφοκύτταρα τα οποία εν συνεχεία παράγουν κυτταροκίνες του τύπου 1 όπως IL-2, ιντερφερόνη-γ, και λυμφοτοξίνη, που

παιρεταιίρω αυξάνουν την φλεγμονώδη αντίδραση στο έντερο και προκαλούν επιθηλιακές αλλοιώσεις.²⁴

Οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες στον φυσιολογικό εντερικό ιστό βρίσκονται σε ισορροπία με μία σειρά αντι-φλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως για παράδειγμα την ΙΛ-10, ΙΛ-4, ΙΛ-13 και τον μεταπλαστικό αυξητικό παράγοντα (TGF-β) που παράγονται από διάφορα κύτταρα του εντέρου συμπεριλαμβανομένων των μακροφάγων, βοηθητικών Τ λεμφοκυττάρων τύπου 2, και ρυθμιστικών Τ λεμφοκυττάρων τύπου 1.²⁵ Άλλες αντι-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως για παράδειγμα ο ανταγωνιστής του υποδοχέα της ΙΛ-1 (ΙΛ-1ra) και η ΙΛ-11 που παράγονται κυρίως από μακροφάγα και εντερικά επιθηλιακά κύτταρα, εξισορροπούν την επίδραση των φλεγμονωδών κυτταροκινών.^{26, 27}

Οι ασθενείς με φλεγμονώδη εντεροπάθεια, για λόγους που δεν είναι προς το παρόν κατανοητοί, δεν μπορούν να διατηρήσουν ομοιοστατική ισορροπία μεταξύ φλεγμονωδών και αντι-φλεγμονωδών κυτταροκινών στους εντερικούς ιστούς με αποτέλεσμα την ανάπτυξη χρόνιας φλεγμονής.²⁸ Στην συνέχεια θα αναπτύξουμε συνοπτικά τις διάφορες κυτταροκίνες και τον ρόλο που διαδραματίζουν στην παθογένεια των ΙΦΕΝ.

1.4.1 Φλεγμονώδεις κυτταροκίνες

Διάφορες κυτταροκίνες που παράγονται από μονοκύτταρα και δένδριτικά κύτταρα όπως η ΙΛ-12, ΙΛ-18 και ο TNF οδηγούν στην διαφοροποίηση επικουρικών CD4⁺ Τ λεμφοκυττάρων τύπου 1 που παράγουν ΙΛ-2, ιντερφερόνη-γ, και λυμφοτοξίνη (LT-α). Υπερπαραγωγή αυτών των κυτταροκινών από βοηθητικά CD4⁺ Τ λεμφοκύτταρα αποτελεί χαρακτηριστικό ανοσολογικό εύρημα σε ασθενείς με νόσο του Crohn.²⁹

Παράγοντας νέκρωσης των όγκων (Tumor necrosis factor)

Ο TNF παράγεται από μονοκύτταρα/μακροφάγα μετά την ενεργοποίησή τους με διάφορους βακτηριδιακούς παράγοντες όπως λιποπολυσακχαρίδη και πεπτιδογλυκάνη. Ο TNF επιδρά με δύο κυτταρικούς υποδοχείς, τύπου I (TNFR1) και τύπου II (TNFR2) που εκφράζονται σε διάφορα κύτταρα.³⁰ Η επίδραση του TNF στο έντερο παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της φλεγμονής, καθώς προκαλεί την παραγωγή και έκκριση χημειοκινών από επιθηλιακά κύτταρα, διασπά τον εντερικό φραγμό και προκαλεί απόπτωση των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων.^{23, 31} Επιπρόσθετα, ο TNF ενεργοποιεί τα ενδοθηλιακά κύτταρα και οδηγεί στην

παραγωγή κυτταροκινών, χημειοκινών, και ιντεγκρινών που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην προσέλκυση και διαπίδηση φλεγμονωδών κυττάρων στον εντερικό βλεννογόνο.³²

Διάφορες μελέτες σε ζωϊκά μοντέλα ΙΦΕΝ έχουν δείξει ότι ο TNF διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της φλεγμονής στο έντερο και ειδικότερα στην νόσο του Crohn. Για παράδειγμα, απενεργοποίηση του TNF με ειδικό αντίσωμα ή με γενετική εξάλλειψη του γονιδίου οδηγεί σε πίο ήπια μορφή φλεγμονής σε ζωϊκά μοντέλα κολίτιδας.³³ Η πιο πειστική ένδειξη για τον ρόλο του TNF στην παθογένεια των ΙΦΕΝ, και ειδικότερα στην νόσο του Crohn, φαίνεται από το γεγονός ότι η εξάλλειψη από το μυϊκό γονιδίωμα 69 νουκλεοτιδίων από την 3' ρυθμιστική δομή του γονιδίου του TNF, που περιέχει αλληλουχίες αδενίνης/ουρακίλης (AU), οδηγεί στην ανάπτυξη ιλεο-κολίτιδας με χαρακτηρισικά παρόμοια με αυτά της νόσου του Crohn.³⁴ Η εξάλλειψη αυτής της ρυθμιστικής αλληλουχίας οδηγεί σε υπερπαραγωγή του TNF, ως αποτέλεσμα της αυξημένης σταθερότητας του TNF mRNA, και αυξημένα επίπεδα του TNF με τελικό αποτέλεσμα την ανάπτυξη ιλεο-κολίτιδας και αρθρίτιδας.³⁴ Μελέτες σε αυτό το ζωϊκό μοντέλο της νόσου του Crohn, έδειξαν ότι η φλεγμονώδη εντεροπάθεια προκαλείται από Τ λεμφοκύτταρα και εξαρτάται από την παρουσία των δύο υποδοχέων του TNF, TNFRI και TNFRII.³⁵ Υπερπαραγωγή του TNF από μακροφάγα είναι επαρκής να προκαλέσει τον φαινότυπο αυτό και ότι η ΙΛ-12 p40, που αποτελεί μέρος της ΙΛ-12 και της ΙΛ-23, παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της νόσου.³⁵ Πρόσφατες μελέτες έχουν επίσης δείξει ότι η νόσος οφείλεται στην ενεργοποίηση CD8⁺ κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων, ενώ τα βοηθητικά CD4⁺ Τ λεμφοκύτταρα έχουν προστατευτικό ρόλο. Επίσης η ιντερφερόνη-γ, που παράγεται από κυτταροτοξικά και βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα τύπου 1, παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου.³⁵

Μελέτες σε ασθενείς με νόσο του Crohn ή ελκώδη κολίτιδα έχουν δείξει αμφιλεγόμενα αποτελέσματα όσον αφορά τα επίπεδα του TNF που παράγονται κατά την διάρκεια της φλεγμονής. Αν και μερικές μελέτες έδειξαν αυξημένη παραγωγή του TNF, στην συστηματική κυκλοφορία, στο εντερικό ιστό ή στα κόπρανα ασθενών με ΙΦΕΝ, άλλες μελέτες ήταν αρνητικές.³⁶⁻³⁸ Παρόλα αυτά η δραματική ανταπόκριση των ασθενών με νόσο του Crohn στην χορήγηση ενός μονοκλωνικού αντισώματος έναντι του TNF (infliximab, Remicade®, Malvern, PA) αποδεικνύει ότι η συμβολή του στην παθογένεια της νόσου του Crohn είναι αναμφισβήτητη²². Τέλος ο ρόλος του TNF στην παθογένεια της ελκώδους κολίτιδας είναι

λιγότερο κατανοητός αλλά πρόσφατα δεδομένα έδειξαν ότι η θεραπεία με infliximab σε ασθενείς με ανθεκτική νόσο στα κορτικοστεροειδή δεν είναι αποτελεσματική.³⁹ Από τα δεδομένα αυτά συμπεραίνεται ότι ο TNF διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου του Crohn και λιγότερο ή καθόλου στην παθογένεια της ελκώδους κολίτιδας.

Ιντερλευκίνη-12

Η ιντερλευκίνη (ΙΛ)-12 παράγεται από μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην διαφοροποίηση των Τ λεμφοκυττάρων.⁴⁰ Κατά την διάρκεια χρόνιας εντερικής φλεγμονής η υπερπαραγωγή της ΙΛ-12 οδηγεί σε αυξημένη έκκριση τύπου 1 κυτταροκινών, κυρίως ΙΦΝ-γ.²⁴ Η ΙΛ-12 επιδρά με ειδικό κυτταρικό υποδοχέα, που αποτελείται από δύο υποομάδες την β1 και β2. Η παραγωγή της υποομάδας β2 ρυθμίζεται στενά και συμβάλλει στην ρύθμιση της βιολογικής δράσης της ΙΛ-12.⁴⁰ Η ΙΛ-12 παράγεται σε ανταπόκριση μικροβιακών παραγόντων και επίσης μετά από επαφή δενδριτικών κυττάρων με ενεργοποιημένα CD4⁺ Τ λεμφοκύτταρα μέσω της αλληλεπίδρασης CD40-CD40L μεταξύ των δύο κυττάρων.⁴¹ Πρόσφατα δεδομένα επίσης υποστηρίζουν ότι κυτταροτοξικά CD8⁺ Τ λεμφοκύτταρα συμβάλλουν στην ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων μέσω της παραγωγής TNF και ΙΦΝ-γ.⁴² Καθώς η ΙΛ-12 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην διαφοροποίηση των βοηθητικών Τ λεμφοκυττάρων τύπου 1, που είναι χαρακτηριστικό εύρημα της νόσου του Crohn, η ΙΛ-12 μπορεί να θεωρηθεί ως θεραπευτικός στόχος. Διάφοροι ερευνητές έχουν μελετήσει την παραγωγή της ΙΛ-12 στις ΙΦΕΝ. Πράγματι βρέθηκε ότι η παραγωγή της ΙΛ-12 από μονοκύτταρα του εντερικού βλεννογόνου είναι αυξημένη στην νόσο του Crohn αλλά όχι στην ελκώδη κολίτιδα ή σε φυσιολογικό έντερο.⁴³

Διάφορες μελέτες σε ζωϊκά μοντελα κολίτιδας, που χαρακτηρίζονται από την παρουσία βοηθητικών τύπου 1 Τ λεμφοκυττάρων, έχουν δείξει τον σημαντικό ρόλο της ΙΛ-12 στην παθογένεια της φλεγμονής. Για παράδειγμα χορήγηση αντισώματος που απενεργοποιεί την βιολογική δράση της ΙΛ-12 οδηγεί σε δραματική βελτίωση της κολίτιδας που προκαλείται από την χημική ουσία TNBS τόσο κλινικά όσο και ιστοπαθολογικά.⁴⁴ Επιπρόσθετα τα επίπεδα της ΙΦΝ-γ μετά από τέτοια θεραπεία μειώνονται δραματικά και τα βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα οδηγούνται σε αποτοξικό θάνατο στο βλεννογόνο του εντέρου και στον σπλήνα.⁴⁵ Παρόμοια

θεραπευτικά αποτελέσματα έχουν επίσης δειχθεί σε δύο άλλα ζωϊκά μοντέλα κολίτιδας.^{46,47} Σε αντίθεση η χορήγηση αντισωμάτων έναντι της ΙΛ-12 δεν έχει καμμία θεραπευτική επίδραση σε ζωϊκά μοντέλα κολίτιδας που προκαλούνται από βοηθητικά τύπου 2 Τ λεμφοκύτταρα. Ένα ζωϊκό μοντέλο για παράδειγμα που έχει μελετηθεί είναι η κολίτιδα που αναπτύσσεται σε ποντικό μετά την ενδοκολονική χορήγηση της χημικής ουσίας οξαζολόνης.⁴⁸ Η χορήγηση θεραπείας έναντι της ΙΛ-12 όχι μόνο δεν είναι αποτελεσματική αλλά επίσης οδηγεί σε επιδείνωση της νόσου.

Αυτά τα δεδομένα υποστηρίζουν την άποψη ότι η ΙΛ-12 παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου του Crohn αλλά όχι της ελκώδους κολίτιδας και συνεπώς η χορήγηση αντισωμάτων έναντι της κυτταροκίνης αυτής μπορεί να έχει θεραπευτικό αποτέλεσμα στην νόσο του Crohn. Παρόλα αυτά, καινούργια δεδομένα δεικνύουν ότι μια άλλη κυτταροκίνη, η ΙΛ-23 πιθανότατα να παίζει καθοριστικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου καθώς διάφορα ζωϊκά μοντέλα με φλεγμονή τύπου 1, όπως η εκγεφαλομυελίτιδα, προκαλούνται λόγω υπερπαραγωγής της ΙΛ-23 και όχι της ΙΛ-12.^{49,50} Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η χορήγηση αντισωμάτων έναντι της ΙΛ-12 κατευθύνεται και αδρανοποιεί την πρωτεΐνη p40 που αποτελεί μέρος τόσο της κυτταροκίνης ΙΛ-12 (p40/p35) όσο και της ΙΛ-23 (p40/p19).⁵¹ Επιπρόσθετα η γενετική εξάλειψη του γονιδίου p40, οδηγεί σε απενεργοποίηση τόσο της ΙΛ-12 όσο και της ΙΛ-23. Συνεπώς η άποψη ότι η ΙΛ-12 συμβάλλει στην φλεγμονή στην νόσο του Crohn και σε ζωϊκά μοντέλα κολίτιδας και ιλείτιδας χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση όπως επίσης και ο ρόλος της ΙΛ-23 στην παθογένεια της νόσου.

Ιντερλευκίνη-18

Η ΙΛ-18 απομονώθηκε αρχικά ως παράγοντας που προκαλεί την έκκριση της ΙΦΝ-γ σε ποντίκια που υποβλήθηκαν σε λοίμωξη με το βακτηρίδιο *Propionibacterium acnes* και επίσης χορηγήθηκαν μικρή δόση λιποπολυσακχαρίτη. Συνεπώς αρχικά ο παράγοντας αυτός ονομάστηκε παράγοντας έκκρισης της ΙΦΝ-γ (INF-γ-inducing factor) και αργότερα μετονομάστηκε σε ΙΛ-18.⁵² Η ΙΛ-18 σχετίζεται με την ΙΛ-1, και μπορεί να προκαλέσει την έκκριση του TNF, της ΙΛ-1β, και διαφόρων CXC και CC χημειοκινών από κύτταρα του περιφερικού αίματος.⁵³ Η ΙΛ-18 παράγεται κυρίως από μακροφάγα αλλά και από κερατινοκύτταρα και άλλα επιθηλιοειδή κύτταρα.⁵⁴ Επίσης έχει υποστηριχθεί ότι διαδραματίζει

σημαντικό ρόλο σε ανοσολογικές αντιδράσεις του τύπου 1. Πράγματι, η ΙΛ-18 βρέθηκε ότι μπορεί να ενεργοποιήσει CD3⁺ και CD4⁺ Τ λεμφοκύτταρα καθώς επίσης και φονικά λεμφοκύτταρα (Natural Killer/NK cells) να παράγουν TNF που στην συνέχεια προκαλεί την έκκριση της ΙΛ-1β και της ΙΛ-8 από τα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος.⁵³

Η ΙΛ-18 βρέθηκε ότι παράγεται σε αυξημένη ποσότητα στο έντερο σε ασθενείς με νόσο του Crohn, αλλά όχι σε αρρώστους με ελκώδη κολίτιδα.^{54, 55} Η κύρια κυτταρική πηγή παραγωγής της ΙΛ-18 στο έντερο των ασθενών με νόσο του Crohn αποτελούν τα επιθηλιακά κύτταρα, ιστιοκύτταρα, και δενδριτικά κύτταρα.⁵⁴ Επίσης πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι υποδοχείς της ΙΛ-18 εκφράζονται σε μονοκύτταρα του εντερικού βλεννογόνου και η χορήγηση της ΙΛ-18 οδηγεί σε αυξημένη ενεργοποίηση των εντερικών λεμφοκυττάρων σε ασθενείς με νόσο του Crohn σε συνδυασμό με την ΙΛ-12.⁵⁶ Επιπρόσθετα, ποντικοί του γενετικού τύπου BALB/c αναπτύσσουν σημαντική φλεγμονή στο ΛΕ μετά από την χορήγηση ΙΛ-18 και ΙΛ-12.⁵⁷ Συνεπώς τα αποτελέσματα αυτά συνηγορούν στην υπόθεση ότι η ΙΛ-18 πιθανότατα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου του Crohn.

Ιντερλευκίνη-23

Η ΙΛ-23 έχει πρόσφατα περιγραφεί ως παράγοντας που προκαλεί έκκριση της ΙΦΝ-γ από Τ λεμφοκύτταρα μνημονικού τύπου. Αποτελείται από δύο υποομάδες την ΙΛ-12p40 (που αποτελεί και μέρος της ΙΛ-12) και την p19 που συνδυάζονται μεταξύ τους για να σχηματίσουν την κυτταροκίνη ΙΛ-23 (p40/p19).⁵¹ Ο υποδοχέας της ΙΛ-23 εκφράζεται κυρίως σε Τ λεμφοκύτταρα μνημονικού τύπου και αποτελείται από δύο αλυσίδες την ΙΛ-12β1 και την ΙΛ-23R. Η ΙΛ-23 ενεργοποιεί τους παράγοντες STAT-3, STAT-4, και STAT-5 μέσω ενεργοποίησης του παράγοντα Jak2.⁵¹ Η ρόλος της ΙΛ-23 στην φλεγμονή έχει πρόσφατα δειχθεί καθώς η υπερπαραγωγή της σε μυσ οδηγεί σε διάχυτη φλεγμονή και πρόωρο θάνατο.⁵⁸ Η σημασία αυτής της κυτταροκίνης στην παθογένεια της νόσου του Crohn βρίσκεται υπό μελέτη.

1.4.2 Κυτταροκίνες τύπου 1

Οι κυτταροκίνες τύπου 1, συμπεριλαμβανομένου της ΙΛ-2, ΙΦΝ-γ, και λυμφοτοξίνης (LT), παράγονται από βοηθητικά CD4⁺ Τ λεμφοκύτταρα και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην χρόνια φλεγμονή συμπεριλαμβανομένου και της νόσου του Crohn.

ΙΛ-2

Η ΙΛ-2 αποτελεί την τυπική κυτταροκίνη τύπου 1 και μεταξύ άλλων προκαλεί τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των Τ λεμφοκυττάρων. Η ΙΛ-2 προστατεύει τα εντερικά λεμφοκύτταρα από αποπτωτικό θάνατο,⁵⁹ και επιδρά με τον κυτταρικό υποδοχέα της ΙΛ-2 που αποτελείται από τις αλυσίδες α και βγ. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου εκφράζουν υποδοχείς για την ΙΛ-2.⁶⁰ Η ΙΛ-2 μπορεί να αποκαταστήσει την ακεραιότητα του εντερικού φραγμού σε in vitro καλλιέργεια εντερικών επιθηλιακών κυττάρων.⁶¹

Είναι παράδοξο το γεγονός ότι η απώλεια του γονιδίου της ΙΛ-2 σε ποντίκια οδηγεί στην ανάπτυξη κολίτιδας που προκαλείται από βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα του τύπου TCRαβ⁺. Τα κύτταρα αυτά συσσωρεύονται στο παχύ έντερο σε μεγάλο βαθμό πριν από την ανάπτυξη μακροσκοπικής φλεγμονής.⁶² Τα ποντίκια αυτά επίσης παρουσιάζουν αυξημένη παραγωγή της ΙΛ-1, της ΙΛ-6, και του TNF, καθώς επίσης ενεργοποίηση του παράγοντα NF-kB.⁶³ Έχει επίσης δειχθεί πρόσφατα ότι η έλλειψη της ΙΛ-2 οδηγεί σε ανεπάρκεια παραγωγής ρυθμιστικών Τ λεμφοκυττάρων που μπορεί να ενοχοποιηθεί στην ανάπτυξη της κολίτιδας.⁶⁴

Η παραγωγή της ΙΛ-2 έχει προηγουμένως μελετηθεί στην ελκώδη κολίτιδα και στην νόσο του Crohn με αντικρουόμενα αποτελέσματα. Μελέτες σε εντερικές βιοψίες έδειξαν αυξημένη παραγωγή της ΙΛ-2 στην νόσο του Crohn σε εστίες ενεργούς φλεγμονής. Σε αντίθεση η ΙΛ-2 δεν βρέθηκε αυξημένη στην ελκώδη κολίτιδα.^{65, 66} Η παραγωγή της ΙΛ-2 από λεμφοκύτταρα του εντερικού βλεννογόνου είναι λιγότερο κατανοητή καθώς μερικές μελέτες έδειξαν αυξημένη ενώ άλλες έδειξαν ελατωμένη παραγωγή της στην νόσο του Crohn.^{29, 67, 68} Διάφορα φάρμακα που χρησιμοποιούνται στην θεραπεία των ΙΦΕΝ, όπως για παράδειγμα η κυκλοσπορίνη και η σουλφασαλαζίνη, μπορεί να επηρεάσουν την παραγωγή της ΙΛ-2. Επίσης είναι ενδιαφέρον ότι η χορήγηση πρωτεΐνης που αποτελείται από την ΙΛ-2 και την ανοσοσφαιρίνη IgG2b, έχει θεραπευτικό αποτέλεσμα στο μοντέλο κολίτιδας που προκαλείται από την χορήγηση TNBS σε ποντίκια.⁶⁹

IΦN-γ

Η IΦN-γ είναι η τυπική κυτταροκίνη τύπου 1 που παράγεται από βοηθητικά και κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα αλλά και από μη-T λεμφοκύτταρα όπως φονικά λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα και δενδριτικά κύτταρα.⁷⁰ Η IΦN-γ έχει επίδραση σε πάμπολλα κύτταρα στον οργανισμό όπως για παράδειγμα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου, μονοκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα και λεμφοκύτταρα.⁷⁰ Για παράδειγμα η IΦN-γ μπορεί να προκαλέσει αλλοιώσεις στον εντερικό φραγμό με το να διασπά τις κυτταρικές συνδέσεις και συμβάλλει στην επιθηλιακή διύθηση με πολυμορφοπύρηννα λευκοκυττάρια.⁷¹ Η IΦN-γ προκαλεί την έκκριση διαφόρων χημειοκινών από τα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα και τα μονοκύτταρα.^{72, 73}

Τα σχετικά επίπεδα της IΦN-γ και της IL-4 (η οποία θα συζητηθεί στη συνέχεια) έχουν χρησιμοποιηθεί για να καθορίσουν τον τύπο της εντερικής φλεγμονής σε ζωικά μοντέλα κολίτιδας. Για παράδειγμα η αυξημένη παραγωγή IΦN-γ από T λεμφοκύτταρα του εντερικού βλεννογόνου είναι χαρακτηριστικό ανοσολογικής αντίδρασης τύπου 1 και παρατηρείται σε διάφορα μυϊκά μοντέλα των IΦEN.⁷⁴⁻⁷⁶ Σε αντίθεση η υπερπαραγωγή της IL-4 είναι χαρακτηριστικό διαφόρων μυϊκών μοντέλων ανοσολογικής αντίδρασης τύπου 2, όπως για παράδειγμα το μοντέλο κολίτιδας που προκαλείται από την οξαζολόνη και η κολίτιδα που αναπτύσσεται σε ποντίκια με γενετική εξάλειψη του γονιδίου TCRα.^{48, 77} Επίσης δύο πρόσφατα ζωικά μοντέλα ιλείτιδας που προσομοιάζουν με την νόσο του Crohn στον άνθρωπο είναι τα μοντέλα SAMP1/Yit και TNF^{ΔARE} που χαρακτηρίζονται από την αυξημένη παραγωγή IΦN-γ από τα εντερικά T λεμφοκύτταρα.^{35, 78} Σε διάφορα ζωικά μοντέλα έχει δειχθεί ότι η IΦN-γ παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της φλεγμονώδους εντεροπάθειας. Για παράδειγμα η χορήγηση αντισωμάτων έναντι της IΦN-γ σε ποντίκια που έχουν έλλειψη της IL-10 τους προστατεύει από την ανάπτυξη κολίτιδας σε νεαρή ηλικία αλλά δεν έχει καμιά επίδραση εάν χορηγηθεί κατά την διάρκεια εγκατεστημένης φλεγμονής.⁴⁶ Σε αντίθεση η IΦN-γ δεν φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της κολίτιδας που αναπτύσσεται σε ποντίκια που έχουν έλλειψη του γονιδίου TCRα, που όπως αναφέρθηκε προηγουμένως έχει χαρακτηριστικά ανοσολογικής αντίδρασης τύπου 2.⁷⁹

Διάφορες μελέτες στον άνθρωπο έχουν δείξει ότι η IΦN-γ ανιχνεύεται σε αυξημένη ποσότητα στον εντερικό βλεννογόνο ασθενών με νόσο του Crohn, αλλά όχι σε ασθενείς με

ελκώδη κολίτιδα.^{29, 66} Παρόμοια αποτελέσματα έχουν δείξει μελέτες σε T λεμφοκύτταρα που απομονώθηκαν από τον εντερικό βλεννογόνο ασθενών με νόσο του Crohn.⁸⁰ Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι η παραγωγή κυτταροκινών στον εντερικό βλεννογόνο διαφέρει στα αρχικά σε σύγκριση με προχωρημένα στάδια της νόσου του Crohn. Για παράδειγμα στα αρχικά στάδια της νόσου παρατηρείται αυξημένη παραγωγή κυτταροκινών τύπου 2 όπως IL-4, ενώ σε προχωρημένα στάδια υπάρχει μία στροφή προς την παραγωγή κυτταροκινών τύπου 1 όπως IFN- γ .⁸¹ Μελέτες με την χορήγηση μονοκλωνικών αντισωμάτων που αδρανοποιούν την βιολογική δράση της IFN- γ σε ασθενείς με νόσο του Crohn βρίσκονται σε εξέλιξη.

Λυμφοτοξίνη (Lymphotoxin)

Η λυμφοτοξίνη αποτελεί τυπική κυτταροκίνη τύπου 1 και εντάσσεται στην οικογένεια της κυτταροκίνης TNF (TNF superfamily). Η κυτταροκίνη αυτή συμβάλλει στην οργανογένεση των λεμφικών οργάνων και παράγεται σε τριμερή μορφή είτε συνδεδεμένη στην κυτταρική μεμβράνη είτε ως πρωτεΐνη που εκκρίνεται από το κύτταρο.⁸² Η μεμβρανική μορφή της προτεΐνης αποτελείται από δύο υποομάδες την α και β (LT- $\alpha\beta$) ενώ αυτή που εκκρίνεται σχηματίζεται από τρεις υποομάδες α (LT- α_3). Η παραγωγή της LT- $\alpha\beta$ αυξάνεται στην κυτταρική επιφάνεια των βοηθητικών T λεμφοκυττάρων, ειδικά σε βοηθητικά T λεμφοκύτταρα τύπου 1, μετά από την ενεργοποίησή τους. Η IL-4 και άλλες κυτταροκίνες τύπου 2 ελατώνουν την έκφραση και της LT- $\alpha\beta$ αλλά και της LT- α_3 .⁸³ Η LT- α_3 συνδέεται και με τους δύο υποδοχείς του TNF, TNFR1 και TNFR2, ενώ η LT- $\alpha\beta$ χρησιμοποιεί τον δικό της υποδοχέα για να επιτελέσει την βιολογική της δράση (LT- β υποδοχέα). Μελέτες σε ποντίκια έδειξαν ότι η LT- α_3 επαυξάνει τις ανοσολογικές αντιδράσεις τύπου 1, εν μέρει λόγω αυξημένης παραγωγής χημειοκινών από ενδοθηλιακά κύτταρα.⁸⁴ Επίσης σε δύο ζωϊκά μοντέλα κολίτιδας βρέθηκε ότι η χορήγηση πρωτεϊνών που μπλοκάρουν την αλληλεπίδραση μεταξύ LT- $\alpha\beta$ και του υποδοχέα της LT- β βελτιώνουν τα κλινικά χαρακτηριστικά της κολίτιδας.⁸⁵

1.4.3 Κυτταροκίνες τύπου 2

IL-4, IL-5 και IL-13

Η IL-4 αποτελεί τυπική κυτταροκίνη τύπου 2 και έχει πάμπολλες βιολογικές επιδράσεις στον εντερικό βλεννογόνο συχνά σε συνεργασία με την IL-10 και την IL-13. Η IL-4 και η IL-13, για παράδειγμα, αυξάνουν την παραγωγή χημειοκινών όπως IL-8, RANTES και MCP-1 από

επιθηλιακές κυτταρικές σειρές και καταστέλλουν την παραγωγή της συνθάσης του νιτρικού οξέως σε φλεγμονώδεις εστίες του εντέρου σε ανταπόκριση διαφόρων φλεγμονωδών κυτταροκινών.^{73, 86, 87} Η ΙΛ-4 και η ΙΛ13 σε συνεργασία με την ΙΛ-10 καταστέλλουν την έκκριση της λυσοσωμιακών ενζύμων από τα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος και του εντερικού βλεννογόνου.⁸⁸ Και οι τρεις αυτές κυτταροκίνες καταστέλλουν την έκκριση φλεγμονωδών κυτταροκινών από μονοκύτταρα του εντερικού βλεννογόνου.⁸⁹ Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι τα μονοκύτταρα των ασθενών με ΙΦΕΝ ανταποκρίνονται λιγότερο στην ανοσοκατασταλτική δράση της ΙΛ-4 και της ΙΛ-13 από ότι τα μονοκύτταρα από φυσιολογικούς δότες.^{89, 90}

Έχουν παρατηρηθεί σημαντικές διαφορές στην παραγωγή της ΙΛ-4 σε ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα και νόσο του Crohn. Γενικά βρέθηκε ότι η παραγωγή του mRNA της ΙΛ-4 από εντερικά μονοκύτταρα είναι ελλειπτική σε ασθενείς με ΙΦΕΝ από ότι σε φυσιολογικούς δότες.^{29, 91} Παιρευαίρω μελέτες έχουν δείξει ότι στην ελκώδη κολίτιδα τα επίπεδα της ΙΛ-4 είναι παρόμοια με αυτά που βρίσκονται σε φυσιολογικό εντερικό βλεννογόνο, ενώ τα επίπεδα της στην νόσο του Crohn είναι ελλειπτικά.⁹² Σε αντίθεση η παραγωγή της ΙΛ-5 από τα βοηθητικά CD4⁺ Τ λεμφοκύτταρα του εντέρου βρέθηκε αυξημένη σε ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα σε σχέση με τα επίπεδα της κυτταροκίνης αυτής σε ασθενείς με νόσο του Crohn.²⁹ Πρόσφατα δεδομένα επίσης έχουν δείξει ότι η ΙΛ-13 παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της φλεγμονής σε ορισμένα ζωικά μοντέλα ελκώδους κολίτιδας καθώς η απενεργοποίηση της οδήγησε σε δραματική βελτίωση της φλεγμονής.⁹³

ΙΛ-10

Η ΙΛ-10 έχει σημαντικές αντι-φλεγμονώδεις δράσεις και παίζει σημαντικό ρόλο στην ομοιοστασία του εντέρου. Η ΙΛ-10 μπορεί να καταστείλλει την παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών από μακροφάγα, δονδριτικά κύτταρα, Τ λεμφοκύτταρα και φονικά λεμφοκύτταρα (NK cells).⁹⁴ Η ΙΛ-10 επίσης καταστέλλει την παραγωγή διαφόρων κυτταροκινών και χημειοκινών από τα εντερικά μακροφάγα που προκαλείται υπό την επίδραση διαφόρων φλεγμονωδών κυτταροκινών.⁹⁵ Η ΙΛ-10 επιπρόσθετα καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό και την ενεργοποίηση των εντερικών CD8⁺ Τ λεμφοκυττάρων και την έκκριση κυτταροκινών τύπου 1 όπως ΙΛ-2, ΙΦΝ-γ και TNF, ενώ παράλληλα αυξάνει την κυτταροτοξικότητα αυτών των κυττάρων σε συνδυασμό με την ΙΛ-2.⁹⁶

Παρότι η ΙΛ-10 έχει χαρακτηριστεί ως κυτταροκίνη τύπου 2, πρόσφατα δεδομένα έχουν δείξει ότι προάγει την διαφοροποίηση ρυθμιστικών Τ λεμφοκυττάρων (T-regulatory 1/Tr1) που παράγουν ΙΛ-10.⁹⁷ Τα λεμφοκύτταρα αυτά έχουν μοναδικές ιδιότητες καθώς πολλαπλασιάζονται ανεπαρκώς σε καλλιέργεια, παράγουν αυξημένες ποσότητες ΙΛ-10 ενώ δεν παράγουν ΙΛ-2 ή ΙΛ-4. Σε ζωικά μοντέλα ΙΦΕΝ τα κύτταρα αυτά συμβάλλουν στην καταστολή της φλεγμονής όπως έχει δείξει στην περίπτωση της πειραματικής κολίτιδας που προκαλείται από την μεταφορά CD45RB^{hi} Τ λεμφοκυττάρων σε ανοσοκατασταλμένα (SCID ή RAG^{-/-}) ποντίκια.⁹⁷ Επίσης η εντερική φλεγμονή που αναπτύσσεται στα ποντίκια αυτά με την μεταφορά των CD45RB^{hi} Τ λεμφοκυττάρων μπορεί να κατασταλεί εάν συγχρόνως χορηγηθούν με CD45RB^{lo} Τ λεμφοκύτταρα. Η προστατευτική δράση των CD45RB^{lo} Τ λεμφοκυττάρων σε αυτό το ζωικό μοντέλο κολίτιδας εξαρτάται από την παραγωγή της ΙΛ-10 καθώς η προστατευτική δράση των λεμφοκυττάρων αυτών δεν παρατηρείται εάν προέρχονται από ποντίκια που δεν παράγουν ΙΛ-10 ή εάν ταυτοχρόνως χορηγηθεί αντίσωμα έναντι του υποδοχέα της ΙΛ-10.⁹⁸ Συνεπώς τα δεδομένα αυτά συνηγορούν στον σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει η ΙΛ-10 στην διατήρηση της ανοσολογικής ομοιοστασίας στο έντερο και στην καταστολή ανεπιθήμιτων ανοσολογικών αντιδράσεων. Ο σημαντικός ρόλος της ΙΛ-10 επίσης φαίνεται από τον δραματικό φαινότυπο που παρατηρείται σε ποντίκια με έλλειψη της κυτταροκίνης αυτής. Η έλλειψη της ΙΛ-10 οδηγεί σε χρόνια εντεροκολίτιδα που χαρακτηρίζεται από αυξημένη παραγωγή κυτταροκινών τύπου 1 όπως ΙΦΝ-γ και TNF.⁹⁹ Η κολίτιδα αναπτύσσεται αρχικά στο τυφλό και στο ανιόν κόλο από την ηλικία των 3 εβδομάδων. Αργότερα η φλεγμονή επεκτείνεται σε όλο το παχύ έντερο και στον ιλεό. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι τα ποντίκια αυτά αναπτύσσουν επίσης καρκίνο του παχέως εντέρου περίπου στην ηλικία των 60 εβδομάδων.¹⁰⁰

Η ανάπτυξη κολίτιδας σε ποντίκια με έλλειψη της ΙΛ-10 εξαρτάται από διάφορους γενετικούς, ανοσολογικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Το γενετικό υπόστρωμα επηρεάζει την ανάπτυξη της κολίτιδας και οι φλεγμονώδεις αλλοιώσεις που αναπτύσσονται στο παχύ έντερο χαρακτηρίζονται από αυξημένο αριθμό μακροφάγων, Β-λεμφοκυττάρων, πλασματοκυττάρων, και CD4⁺TCR^{αβ+} Τ λεμφοκυττάρων.¹⁰⁰ Η παραγωγή του mRNA των κυτταροκινών IL-1, IL-6, TNF, TGF-β, LT-β, και ΙΦΝ-γ αυξάνονται 10-35 φορές στον εντερικό βλεννογόνο των ποντικών με έλλειψη ΙΛ-10 από ότι σε φυσιολογικά ποντίκια. Επίσης η έκφραση συγκολλητικών μορίων, όπως για παράδειγμα ICAM-1, VCAM-1, και MAdCAM-1,

τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης αυξάνονται 5-23 φορές.¹⁰¹ Η χορήγηση αντισωμάτων έναντι της ΙΛ-12 προστατεύει νεαρά ποντίκια με έλλειψη της ΙΛ-10 από την ανάπτυξη κολίτιδας και βελτιώνει σημαντικά την φλεγμονή σε ενήλικα ποντίκια.⁴⁶ Σε αντίθεση η χορήγηση αντισωμάτων κατά της ΙΦΝ-γ δεν έχει καμμία επίδραση σε προχωρημένα στάδια της φλεγμονής. Η ανάπτυξη της κολίτιδας σε αυτό το μοντέλο εξαρτάται από την παρουσία Τ λεμφοκυττάρων καθώς ενδοεπιθηλιακά και βλεννογόνια Τ λεμφοκύτταρα μπορούν να προκαλέσουν κολίτιδα όταν μεταφερθούν σε ανοσοκατασταλμένα ποντίκια με έλλειψη του γονιδίου RAG-2.¹⁰² Ο σημαντικός ρόλος των εντερικών βακτηριδίων στην ανάπτυξη της κολίτιδας σε αυτό το μοντέλο δεν μπορεί να παραβλεφθεί καθώς ποντίκια που μεγαλώνουν σε στείρο περιβάλλον δεν αναπτύσσουν κολίτιδα δείχνοντας έτσι τον σημαντικό ρόλο της εντερικής χλωρίδας στην ανάπτυξη της εντερικής φλεγμονής.¹⁵

Στον άνθρωπο, η ΙΛ-10 παράγεται στον εντερικό βλεννογόνο υπό φυσιολογικές συνθήκες. Η παραγωγή της όμως τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης αυξάνεται σε περιοχές του εντέρου με φλεγμονή σε ασθενείς με ΙΦΕΝ σε σχέση με περιοχές του εντέρου που είναι ανεπηρέαστες ή σε φυσιολογικό βλεννογόνο.^{103, 104} Η παραγωγή της ΙΛ-10 σε ΙΦΕΝ εντοπίζεται κυρίως στον υποβλεννογόνο ιστό, κυρίως σε μακροφάγα, ενώ η παραγωγή της από εντερικά επιθηλιακά κύτταρα είναι παρόμοια σε ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα ή νόσο του Crohn.¹⁰⁵ Η παραγωγή της ΙΛ-10 σε ασθενείς με ΙΦΕΝ υποδυκνείει ότι η παραγωγή της ή η αντι-φλεγμονώδη δράση της δεν είναι επαρκής να καταστείλλει την φλεγμονή.

Διάφορες μελέτες έχουν δημοσιευθεί που έχουν εξετάσει την θεραπευτική δράση της κυτταροκίνης αυτής στην θεραπεία των ΙΦΕΝ, κυρίως στην νόσο του Crohn. Δυστυχώς τα θεραπευτικά αποτελέσματα της ΙΛ-10 στην νόσο του Crohn ήταν κατά πλειοψηφία απογοητευτικά.^{106, 107}

2. ΧΗΜΕΙΟΚΙΝΕΣ ΚΑΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΧΗΜΕΙΟΚΙΝΩΝ

2.1 Εισαγωγή

Οι χημειοκίνες (χημειοτακτικές κυτταροκίνες) αποτελούν μία ομάδα μικρών πεπτιδίων (μεγέθους 8-14 kDa) που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλές βιολογικές διεργασίες συμπεριλαμβανομένου της αγγιογένεσης, φλεγμονής, ανοσίας, και στην βιολογία του καρκίνου όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.



Εικόνα 2.Βιολογικές δράσεις των χημειοκινών.

Η ανακάλυψη της χημειοκίνης ΙΛ-8 (CXCL8, Πίνακας 1), που συμβάλλει στην προσέλκυση των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων, αποτέλεσε σημαντικό σταθμό στην ανοσολογία καθώς η ΙΛ-8 αποτελεί την πρώτη χημειοκίνη που βρέθηκε ότι επιδρά ειδικά σε λευκοκύτταρα.^{108, 109} Επίσης η ανακάλυψη της χημειοκίνης ΙΛ-8 συνέβαλλε σημαντικά στην ανακάλυψη άλλων χημειοκινών εκ των οποίων η MCP-1(CCL2), RANTES (CCL5), και εοταξίνη (eotaxin/CCL11) αποτελούν τις πρώτες χημειοκίνες που βρέθηκε ότι επιδρούν ειδικά σε μονοκύτταρα, Τ λεμφοκύτταρα, και εοσινόφιλα λευκοκύτταρα, αντίστοιχα.¹¹⁰⁻¹¹² Περίπου 50 χημειοκίνες έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα. Η πρωτοφανής ανακάλυψη πληθώρας χημειοκινών οδήγησε αρχικά σε σύγχυση όσον αφορά την ονομασία τους και συνεπώς αρκετές προσπάθειες ερευνητών οδήγησε τελικά στην συστηματική ταξινόμηση τους όπως φαίνεται στον Πίνακα 1.

Ταξινόμηση των Χημειοκινών

Οι χημειοκίνες μπορούν να ταξινομηθούν σε 4 κύριες ομάδες με βάση την δομή τους, συγκεκριμένα τον αριθμό και την απόσταση των κυστεϊνών στην αλληλουχία αμινοξέων της πρωτεΐνης.¹¹³ Οι ομάδες αυτές φέρουν τις ονομασίες CXC, CC, C, και CX₃C, που έχουν χρησιμοποιηθεί στην συστηματική ταξινόμηση τους (Πίνακας 1). Παλαιότερη ταξινόμηση έχει χρησιμοποιήσει τις Ελληνικές ονομασίες α , β , γ , και δ , αντίστοιχα. Οι χημειοκίνες του τύπου CXC, CC, και CX₃C περιέχουν 4 κυστεΐνες στην αλληλουχία των αμινοξέων της πρωτεΐνης, ενώ οι C χημειοκίνες περιέχουν μόνο δύο που αντιστοιχούν στις κυστεΐνες 2 και 4. Ένας περιορισμένος αριθμός των CC χημειοκινών έχουν 6 κυστεΐνες στην δομή της πρωτεΐνης. Οι χημειοκίνες του τύπου CXC και CX₃C διαχωρίζονται από την παρουσία ενός (CXC) ή τριών αμινοξέων (CX₃C) μεταξύ της πρώτης και δεύτερης κυστεΐνης, ενώ στις CC χημειοκίνες οι δύο πρώτες κυστεΐνες βρίσκονται η μία δίπλα στην άλλη. Πολλές χημειοκίνες κατατάσσονται στις ομάδες CC και CXC. Οι δύο άλλες ομάδες, C και CX₃C συμπεριλαμβάνουν μόνο μία χημειοκίνη, την λυμφοτακτίνη α και β (lymphotactin) και την φρακταλκίνη (fractalkine), αντίστοιχα.¹¹³

Οι CXC χημειοκίνες έχουν παιρεταίρω ταξινομηθεί σε ELR⁺ ή ELR⁻ ανάλογα με την παρουσία ή όχι της εξής αλληλουχίας των αμινοξέων στην δομή της πρωτεΐνης: γλουταμικό οξύ-λευκίνη-αργινίνη (ELR). Η σημασία της ταξινόμησης αυτής έχει να κάνει με την ικανότητα των ELR⁺ χημειοκινών, σε αντίθεση με τις ELR⁻ χημειοκίνες, να προσελκύουν ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα.¹¹⁴ Μία άλλη λειτουργική ταξινόμηση των χημειοκινών τις διαχωρίζει σε φλεγμονώδεις ή ομοιοστατικές. Για παράδειγμα οι φλεγμονώδεις χημειοκίνες παράγονται στους περιφερικούς ιστούς υπό την επίδραση φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως την IL-1 και τον TNF και κατά συνέπεια συμβάλλουν στην ανάπτυξη της πρωτογενούς και της επίκτητης ανοσίας.¹¹⁵ Παραδείγματα φλεγμονωδών χημειοκινών αποτελούν οι CXCL8 (IL-8), οι CXCL9-11 (Mig, IP-10, I-TAC), και οι CCL3-5 (MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES) μεταξύ άλλων. Οι ομοιοστατικές χημειοκίνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανοσολογική επιτήρηση καθώς συμβάλλουν στην συνεχή κυκλοφορία των λεμφοκυττάρων και δενδριτικών κυττάρων στα περιφερικά όργανα και στους λεμφαδένες.

Παραδείγματα ομοιοστατικών χημειοκινών αποτελούν οι CXCL12-14 (SDF-1 α , BCA, BRAK), η CCL20 (MIP-3 α), και η CCL25 (TECK) μεταξύ άλλων. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι

μερικές χημειοκίνες παράγονται υπό φυσιολογικές συνθήκες σε περιφερικά όργανα και συνεπώς κατατάσσονται ως ομοιοστατικές αλλά κάτω από ορισμένες φλεγμονώδεις καταστάσεις η παραγωγή τους μπορεί να αυξηθεί και συνεπώς μπορούν να ταξινομηθούν ως μεικτές χημειοκίνες. Κλασσικό παράδειγμα αποτελεί η χημειοκίνη BCA-1/CXCL13 που συνδέεται με τον υποδοχέα CXCR5 και συμβάλλει στην προσέλκυση των Β λεμφοκυττάρων.¹¹⁶ Η χημειοκίνη αυτή παράγεται στο στομάχι σε φυσιολογικές συνθήκες και η έκφραση της αυξάνεται δραματικά σε λοίμωξη από το βακτηρίδιο *Helicobacter pylori*.¹¹⁷ Επίσης η αυξημένη παραγωγή της έχει ενοχοποιηθεί στην παθογένεια του λεμφώματος τύπου MALT στο στομάχι.¹¹⁷ Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις φλεγμονώδεις χημειοκίνες τυπικά βρίσκονται σε δύο μεγάλες ομάδες στα χρωμοσώματα 4 (CXC) και 17 (CC), ενώ τα γονίδια που κωδικοποιούν τις ομοιοστατικές χημειοκίνες βρίσκονται διάσπαρτα ή σε μικρές ομάδες στα χρωμοσώματα 1, 2, 5, 7, 9, 10, και 16.

Πίνακας 1. Οι διάφορες χημειοκίνες ταξινομημένες κατά ομάδες.

Οικογένεια τύπου C

Συστηματικ ή Ονομασία	SCY	Ανθρώπινη Πρωτεΐνη	Άλλη Ονομασία	Μυϊκή Πρωτεΐνη	Άλλη Ονομασία	Υποδοχέας
XCL1	SCYC1/ 2	Lptn	SCM-1, ATAC	Lptn		XCR1
XCL2	SCYC1/ 2	SCM-1β				XCR1

Οικογένεια τύπου CX₃C

Συστηματικ ή Ονομασία	SCY	Ανθρώπινη Πρωτεΐνη	Άλλη Ονομασία	Μυϊκή Πρωτεΐνη	Άλλη Ονομασία	Υποδοχέας
CX3CL1		Fractalkine	ABCD-3	Neurotactin		CX3CR1

Οικογένεια τύπου CC

Συστηματικ ή Ονομασία	SCY	Ανθρώπινη Πρωτεΐνη	Άλλη Ονομασία	Μυϊκή Πρωτεΐνη	Άλλη Ονομασία	Υποδοχέας
CCL1	SCYA1	I-309		TCA-3	P500, I-309	CCR8
CCL2	SCYA2	MCP-1	MCAF, LDGF, GDCF, TDCF, SMC-CF, HC11, TSG8	JE?*		CCR2
CCL3	SCYA3	MIP-1α	LD78a, LD78b, GOS19, Pat464	MIP-1a	GOS19, LD78a	CCR1, CCR5
CCL4	SCYA4	MIP-1β	pAT744, ACT- 2, G-26, HC21, H400, MAD-5, LAG-1	MIP-1β	pAT744, ACT- 2, G-26, HC21, MAD-5, LAG-1	CCR5
CCL5	SCYA5	RANTES		RANTES		CCR1, CCR3, CCR5
CCL6	SCYA6			C10	MRP-1	
CCL7	SCYA7	MCP-3	NC28, FIC, MARC	MARC	NC28, FIC	CCR1, CCR2, CCR3
CCL8	SCYA8	MCP-2	HC-14	MCP-2?		CCR3

CCL9/10	SCYA9/10			MIP-1 γ	MRP-2, CCF18, C10- like	
CCL11	SCYA11	Eotaxin		Eotaxin		CCR3
CCL12	SCYA12			MCP-5*		CCR2
CCL13	SCYA13	MCP-4	Ckb10, NCC-1			CCR2, CCR3
CCL14	SCYA14	HCC-1	MCIF, Ck β 1, NCC-2, HCC-3			CCR1
CCL15	SCYA15	MIP-1 δ , Lkn- 1	CC-2, MIP-5, HCC-2, CCF- 18, NCC-3			CCR1, CCR3
CCL16	SCYA16	HCC-4	LEC, ILINK, NCC-4, LEC, LMC, Ck β 12			CCR1
CCL17	SCYA17	TARC	Dendrokine, ABCD-2	TARC	Dendrokine, ABCD-2	CCR4, CCR8
CCL18	SCYA18	PARC	DC-CK1, AMAC-1, MIP- 4, Dctactin			
CCL19	SCYA19	MIP-3 β	ELC, Exodus- 3, Ckb11	MIP-3 β	ELC, Exodus- 3, Ckb11	CCR7
CCL20	SCYA20	MIP-3 α	LARC, Exodus-1, Mexikine, ST38, Ck β 4	MIP-3 α	LARC, Exodus-1, Mexikine, ST38, Ck β 4	CCR6
CCL21	SCYA21	6Ckine	Exodus-2, SLC, TCA4, Ck β 9	6Ckine	Exodus-2, SLC, TCA4, Ck β 9	CCR7
CCL22	SCYA22	MDC	STCP-1, DCtactin β , ABCD-1, DC/B-CK	MDC	ABCD-1, DCtactin β , STCP-1, DC/B-CK	CCR4
CCL23	SCYA23	MPIF-1, Ck β 8-1	Ck β 8, MIP-3			CCR1
CCL24	SCYA24	Eotaxin-2,	MPIF-2, Ck β 6	Eotaxin-2	MPIF-2, Ck β 6	CCR3
CCL25	SCYA25	TECK		TECK		CCR9
CCL26	SCYA26	Eotaxin-3	Finetaxin, TMkine, IMAC			CCR3
CCL27	SCYA27	CTACK	ILC, PESKY, Eskine	CTACK	ALP, ILC, Eskine, PESKY	CCR10

					skinkine	
CCL28	SCYA28					CCR10

Οικογένεια τύπου **CXC**

Συστηματική ή Ονομασία	SCY	Ανθρώπινη Πρωτεΐνη	Άλλη Ονομασία	Μυϊκή Πρωτεΐνη	Άλλη Ονομασία	Υποδοχέας
CXCL1	SCYB1	GRO α	MGSA- α , GRO-1, NAP-3			CXCR2>CXCR1
CXCL2	SCYB2	GRO β	MGSA- β , MIP-2 α , GRO-2	MIP-2?		CXCR2>CXCR1
CXCL3	SCYB3	GRO γ	MGSA- γ , MIP-2 β , GRO-3			CXCR2>CXCR1
CXCL4	SCYB4	PF4		PF4		
CXCL5	SCYB5	ENA-78	AMCF-II	LIX?		CXCR2, CXCR1
CXCL6	SCYB6	GCP-2	CK α 3			CXCR1, CXCR2
CXCL7	SCYB7	NAP-2	MDGF			CXCR2
CXCL8	SCYB8	IL-8	NCF, NAP-1, MDNCF, LUCT, AMCF-1, MONAP			CXCR1, CXCR2
CXCL 9	SCYB9	MIG		MIG		CXCR3
CXCL10	SCYB10	IP-10		CRG-2	IP-10	CXCR3
CXCL11	SCYB11/9B	I-TAC	b-R1, H174, IP-9	I-TAC		CXCR3
CXCL12	SCYB12	SDF-1 α /b	PBSF, hIRH, TLSR- α / β , TPAR1	SDF-1	PBSF, TLSR- α , TPAR1	CXCR4
CXCL13	SCYB13	BLC/BCA-1	CXC-X, BLR1L, Angie	BLC/BCA-1	CXC-X, BLR1L, Angie	CXCR5
CXCL14	SCYB14	BRAK	CXC-X3, Bolekine, NJAC	BRAK, BMAC	CXC-X3, Bolekine, NJAC	
CXCL15	SCYB15		CINC-2 β -like	Lungkine	Weche	

Βιβλιογραφία: Zlotnick, A and Yoshie O. (2000) *Immunity* **12**:121.

Χημειούποδοχείς

Οι χημειοκίνες επιδρούν σε κύτταρα μέσω χημειοτακτικών υποδοχέων που εντοπίζονται στην κυτταρική επιφάνεια, έχουν επταμερή διαμεμβρανική δομή και μεταβιβάζουν ενδοκυτταρικές πληροφορίες μέσω προτεϊνών του τύπου G. Μέχρι σήμερα 19 ανθρώπινες πρωτεΐνες έχουν ταυτοποιηθεί ως χημειούποδοχείς και έχουν ταξινομηθεί με βάση την τύπο της χημειοκίνης (CXC, CC, C, CX₃C) που συνδέουν σε CXCR1, 2, 3, 4, 5, και 6 (συνδέονται με CXC χημειοκίνες); CCR1 έως και CCR11 (συνδέονται με CC χημειοκίνες); XCR1 (συνδέεται με την C χημειοκίνη λυμφοτακτίνη, Lptn); και CX₃CR1 (συνδέεται με την CX₃C χημειοκίνη φρακτακτίνη) (Πίνακας 1). Ως ομοιοστατικοί χημειούποδοχείς θεωρούνται οι CXCR4, CXCR5, CCR4, CCR7, και CCR9 ενώ ως φλεγμονώδεις χημειούποδοχείς θεωρούνται οι CXCR1, CXCR2, CXCR3, CCR1, CCR2, CCR3, CCR5, και CCR6.

Συνολικά οι χημειούποδοχείς αποτελούν ένα μεγάλο τμήμα των κυτταρικών υποδοχέων της ομάδας της ροδοψίνης που έχουν χαρακτηριστική επταμεμβρανική δομή. Επιπρόσθετα, οι πρωτεΐνες D6 και Duffy είναι επταμερής διαμεμβρανικοί υποδοχείς που συνδέονται με χημειοκίνες αλλά αδυνατούν να μεταβιβάσουν ενδοκυτταρικές πληροφορίες και συνεπώς δεν συγκαταλλέγονται στην συστηματική ταξινόμηση των χημειούποδοχέων.^{118, 119} Κοινά χαρακτηριστικά μεταξύ των χημειούποδοχέων αποτελούν η κοινή δομή τους (25-80% ομοιότητα στην αλληλουχία αμινοξέων), η έκφραση τους κυρίως σε λευκοκύτταρα, και η μεταβίβαση ενδοκυτταρικών πληροφοριών μέσω προτεϊνών τύπου G (Gi) όταν επιδρούν με τις αντίστοιχες χημειοκίνες.¹²⁰

Οι βιολογικές διεργασίες που χαρακτηρίζουν τους χημειούποδοχείς είναι η χημειοταξία των λευκοκυττάρων και κατά συνέπεια συμβάλλουν στις ανοσολογικές αντιδράσεις τόσο της πρωτογενούς όσο και της επίκτητης ανοσίας.¹²⁰ Ο κάθε χημειούποδοχέας έχει ειδικότητα για συγκεκριμένες χημειοκίνες και λευκοκύτταρα, αλλά υπάρχει αρκετή ανομοιογένεια καθώς αρκετές χημειοκίνες συνδέονται με περισσότερο από ένα υποδοχέα και αρκετοί χημειούποδοχείς συνδέουν περισσότερες από μία χημειοκίνες. Οι φλεγμονώδεις χημειοκίνες (αυτές που εντοπίζονται κυρίως στο χρωμόσωμα 4 και 17) έχουν την μεγαλύτερη ανομοιογένεια όσον αφορά την σύνδεση τους με τους χημειούποδοχείς. Υπάρχει ένας μικρότερος αριθμός ομοιοστατικών χημειοκινών; αυτές που βρίσκονται στο ίδιο χρωμόσωμα συνήθως συνδέονται με τον ίδιο υποδοχέα, όπως για παράδειγμα οι χημειοκίνες MDC και TARC που συνδέονται με τον

υποδοχέα CCR4, και οι ELC και SLC που συνδέονται με τον υποδοχέα CCR7.¹²¹⁻¹²⁴ Αρκετές χημειοκίνες έχουν περιγραφεί που έχουν σχέση ένα προς ένα με τον υποδοχέα που συνδέουν. Παραδείγματα αποτελούν τα ζεύγη χημειοκίνης/χημειοϋποδοχέα SDF-1/CXCR4, TECK ή CCL25/CCR9, BCA-1/CXCR5, LARC ή CCL20/CCR6, λυμφοτακτίνη/XCR1, και φρακταλκίνη/CX3CR1.^{116, 125-129} Είναι αξιοσημείωτο ότι μερικοί χημειοϋποδοχείς με ειδικότητα για την ίδια χημειοκίνη μπορεί να εκφράζονται στο ίδιο κύτταρο και διαφορετικές χημειοκίνες επιδρώντας σε διαφορετικούς κυτταρικούς υποδοχείς μπορούν να έχουν το ίδιο βιολογικό αποτέλεσμα.¹³⁰ Επιπρόσθετα αρκετοί χημειοϋποδοχείς εκφράζονται όχι μόνο σε λευκοκύτταρα αλλά και σε ενδοθηλιακά κύτταρα, νευρώνες, επιθηλιακά κύτταρα, και μικρογλία στον εγκέφαλο.¹³¹ Υπάρχει συνεπώς αρκετό ενδιαφέρον στην κατανόηση του ρόλου των χημειοϋποδοχέων στους ιστούς αυτούς και σε διάφορες παθολογικές διεργασίες. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση των χημειοϋποδοχέων σε κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος συμβάλλουν σημαντικά στην ενορχήστρωση μίας ανοσολογικής αντίδρασης.¹¹³ Για παράδειγμα, η κινητοποίηση των δενδριτικών κυττάρων και των λεμφοκυττάρων κατά την διάρκεια μίας ανοσολογικής αντίδρασης δεν είναι τυχαία αλλά έχει να κάνει με την αλλαγή της έκφρασης χημειοϋποδοχέων στα συγκεκριμένα κύτταρα.^{132, 133} Αυτές οι αλλαγές συμβάλλουν ώστε να μεγιστοποιηθεί η πιθανότητα διακυτταρικής επικοινωνίας και η κατάλληλη κυτταρική τοποθέτηση στην περιφέρεια και στα δευτερογενή λεμφικά όργανα για την ανάπτυξη μίας επικοδομιτικής ανοσολογικής αντίδρασης. Τα T λεμφοκύτταρα και τα δενδριτικά κύτταρα υπόκεινται σε δραματικές αλλαγές στην έκφραση των χημειοϋποδοχέων τους ανάλογα με τον τύπο του T λεμφοκυττάρου για παράδειγμα εάν είναι ανενεργά ή μνημονικού τύπου και εάν τα δενδριτικά κύτταρα είναι ανώριμα ή ώριμα. Για παράδειγμα, μετά την ενεργοποίηση τους naïve T λεμφοκύτταρα ελατώνουν την έκφραση των χημειοϋποδοχέων για τις ομοιοστατικές χημειοκίνες όπως CXCR4, CCR7 και εκφράζουν υποδοχείς για τις φλεγμονώδεις χημειοκίνες όπως CCR3, CCR5 και CXCR3.¹³³ Σε αντίθεση τα ανώριμα δενδριτικά κύτταρα εκφράζουν υποδοχείς για τις φλεγμονώδεις χημειοκίνες και συνεπώς προσελκύονται σε φλεγμονώδεις ιστούς για να αποκτήσουν συγκεκριμένα αντιγόνα και συνεπώς να μπορέσουν να ενεργοποιήσουν T λεμφοκύτταρα. Η ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων σε φλεγμονώδεις εστίες οδηγεί στην έκφραση του χημειοϋποδοχέα CCR7 που συμβάλλει δραματικά στην μετακίνηση αυτών των κυττάρων σε δευτερογενή λεμφικά όργανα προκειμένου

να ενεργοποιήσουν T λεμφοκύτταρα και να ξεκινήσουν μία ανοσολογική αντίδραση.¹³² Επιπρόσθετα T λεμφοκύτταρα του τύπου 1 και τύπου 2 έχουν βρεθεί ότι εκφράζουν διαφορετικούς χημειούποδοχείς. Για παράδειγμα οι χημειούποδοχείς CXCR3 και CCR5 εκφράζονται κυρίως σε T λεμφοκύτταρα τύπου 1 και οι CCR3, CCR4, και CCR8 σε T λεμφοκύτταρα τύπου 2.¹³⁴ Επίσης μνημονικά T λεμφοκύτταρα που εκφράζουν συγκεκριμένους χημειούποδοχείς έχουν τροπισμό για συγκεκριμένα περιφερικά όργανα, όπως για παράδειγμα ο χημειούποδοχείς CCR10 και CCR4 που συμβάλλουν στην προσέλκυση των κυττάρων που εκφράζουν αυτούς τους υποδοχείς στο δέρμα.^{135, 136}

2.2 Χημειούποδοχείς τύπου CXC

CXCR1 και CXCR2

Οι χημειούποδοχείς CXCR1 και CXCR2 αποτελούν τους πρώτους χημειούποδοχείς που ανακαλύφθηκαν. Είναι οι μόνοι υποδοχείς που συνδέουν χημειοκίνες του τύπου ELR, συμπεριλαμβανομένου και της ΙΛ-8, η οποία συνδέει και τους δύο υποδοχείς με παρόμοια υψηλή χημική συγγένεια. Επίσης αποτελούν τους κύριους υποδοχείς που εκφράζονται σε ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα και αποτελούν τυπικούς υποδοχείς για φλεγμονώδεις χημειοκίνες. Φαίνεται ότι οι χημειούποδοχείς αυτοί συμβάλλουν σε οξείες φλεγμονώδεις αντιδράσεις και στην πρωτογενή ανοσία άν και έχει υποστηριχτεί ότι μπορεί επίσης να συμβάλλουν στην προσέλκυση των μονοκυττάρων μακροφάγων σε αθηροσκληρωτικές πλάκες.¹³⁷ Η αλληλουχία των δύο υποδοχέων σε επίπεδο αμινοξέων είναι πανομοιότυπη κατά 78%. Οι υποδοχείς αυτοί έχουν βρεθεί ότι εκφράζονται επιπρόσθετα σε ενεργοποιημένα εοσινόφιλα και βασεόφιλα λευκοκύτταρα, T λεμφοκύτταρα, μαστοκύτταρα και δενδριτικά κύτταρα αλλά ο λειτουργικός τους ρόλος σε αυτούς τους τύπους των κυττάρων δεν έχει διευκρινισθεί.¹³⁸ Ο υποδοχέας CXCR1 έχει μεγάλη εξιδίκευση για την ΙΛ-8, ενώ ο CXCR2 συνδέει ΙΛ-8 και άλλες ELR⁺ χημειοκίνες, όπως GRO-α, NAP-2 και ENA-78 με παρόμοια χημική συγγένεια.¹³⁹⁻¹⁴¹

Ο ρόλος της χημειοκίνης ΙΛ-8 και των ELR⁺ χημειοκινών έχει μελετηθεί εκτεταμένα αλλά ο ρόλος των CXCR1 και CXCR2 υποδοχέων είναι λιγότερο κατανοητός. Οι χημειοκίνες MIP-2 και KC στον ποντικό, είναι ομόλογες της ανθρώπινης χημειοκίνης GRO-α και συνδέονται ειδικά με τον υποδοχέα CXCR2.^{142, 143} Ποντικοί με γενετική απάλλειψη του CXCR2 αδυνατούν να κινητοποιήσουν ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα σε ένα χημικό μοντέλο

περιτονίτιδας και τα κύτταρα αυτά επίσης αδυνατούν να μετακινηθούν σε χημειοτακτικά σήματα προς τις χημειοκίνες KC ή MIP-2.¹⁴⁴ Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν την άποψη ότι ο CXCR2 είναι ο κύριος υποδοχέας για αυτές τις χημειοκίνες στα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηνια λευκοκύτταρα. Παραδόξως όμως τα ποντίκια με έλλειψη του CXCR2 έχουν μαζική ανάπτυξη των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων και Β λεμφοκυττάρων στο αιματοποιητικό τους σύστημα, που μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι ο υποδοχέας αυτός συμβάλλει αρνητικά στην ρύθμιση της αιματοποίησης.¹⁴⁵ Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι τα ζωικά μοντέλα που έχουν περιγραφεί είναι ανεπαρκή για την κατανόηση του ρόλου της ΙΛ-8 σε ανθρώπινες νόσους, καθώς δεν υπάρχει η ανάλογη της ΙΛ-8 χημειοκίνη και ο αντίστοιχος χημειοϋποδοχέας του CXCR1 στα ποντίκια. Οι χημειοϋποδοχείς CXCR1 και CXCR2 έχουν περιγραφεί να διαδραματίζουν διαφορετικό λειτουργικό ρόλο στα ανθρώπινα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηνια λευκοκύτταρα *in vitro*. Για παράδειγμα η ΙΛ-8 μέσω του υποδοχέα CXCR1 προκαλεί χημειοταξία, παραγωγή υπεροξειδίου, και ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης D σε ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα.^{146, 147} Οι χημειοκίνες NAP-2 και GRO-α σε μικρές συγκεντρώσεις προκαλούν χημειοταξία μέσω του υποδοχέα CXCR2.¹⁴⁸ Ενεργοποίηση και των δύο υποδοχέων οδηγεί σε κινητοποίηση ασβεστίου και αποκοκιοποίηση των κυττάρων. Παρόλες τις ενδείξεις ότι η ΙΛ-8 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην οξεία φλεγμονή απόδειξη αυτής της υπόθεσης καθώς επίσης και του διαφορετικού ρόλου των υποδοχέων CXCR1 και CXCR2 στον άνθρωπο παραμένει αιγματοκή.

CXCR3

Ο CXCR3 αποτελεί τον πρώτο υποδοχέα που περιγράφηκε ότι η παραγωγή του αυξάνεται δραματικά σε Τ λεμφοκύτταρα μετά από την ενεργοποίησή τους.¹⁴⁹ Η αλληλουχία αμινοξέων στην πρωτεΐνη του υποδοχέα είναι ίδια κατά 30% με αυτήν των υποδοχέων CXCR1 και CXCR2. Ο CXCR3 συνδέει τρεις φλεγμονώδεις, τύπου ELR⁻, CXC χημειοκίνες με μεγάλη συγγένεια. Οι χημειοκίνες αυτές είναι οι I-TAC/CXCL11, Mig/CXCL9 και IP-10/CXCL10 που προσελκύουν ενεργοποιημένα Τ λεμφοκύτταρα.¹⁵⁰ Η χημική συγγένεια με την οποία οι χημειοκίνες αυτές συνδέονται με τον υποδοχέα CXCR3 είναι I-TAC/CXCL11 > Mig/CXCL9 ~ IP-10/CXCL10. Ο χημειοϋποδοχέας CXCR3 εκφράζεται σε ένα ποσοστό των Τ λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος, Β λεμφοκύτταρα, και φονικά λεμφοκύτταρα (NK cells).¹⁵¹ Τα Τ λεμφοκύτταρα του

περιφερικού αίματος προσελκύνονται από την χημειοκίνη Mig/CXCL9 και λιγότερο αποτελεσματικά από την χημειοκίνη IP-10/CXCL10. Παρόλα αυτά ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων οδηγεί σε δραματική αύξηση του υποδοχέα CXCR3 και της χημειοταξίας τους προς όλες τις CXCR3 χημειοκίνες.¹⁵² Επίσης η έκφραση του υποδοχέα CXCR3 σε T λεμφοκύτταρα *in vitro* έχει συσχετισθεί με την παραγωγή IFN- γ και συνεπώς χαρακτηρίζει T λεμφοκύτταρα τύπου 1.¹³⁴ Παρόλα αυτά η έκφραση αυτού του υποδοχέα *in vivo* δεν έχει απόλυτα συσχετισθεί με ανοσολογικές αντιδράσεις τύπου 1, καθώς η έκφραση του έχει περιγραφεί ότι είναι αυξημένη στην ελκώδη κολίτιδα (ανοσολογική αντίδραση τύπου 2), στην ρευματοειδή αρθρίτιδα και στην σκλήρυνση κατά πλάκας (ανοσολογική αντίδραση τύπου 1).^{153,}
¹⁵⁴ Τα T λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος που εκφράζουν τον υποδοχέα CXCR3 είναι κυρίως λεμφοκύτταρα μνημονικού τύπου (CD45RO⁺) και παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση της ιντεγκρίνης β 1. Ο CXCR3 επίσης εκφράζεται σε κακοήγη Β λεμφοκύτταρα σε ασθενείς με χρόνια λεμφογενή λευχαιμία. Ο βιολογικός ρόλος του υποδοχέα αυτού δεν έχει απόλυτα διευκρινιστεί, αλλά σε ζωικά μοντέλα IFEN έχει βρεθεί ότι η χορήγηση αντισωμάτων έναντι της χημειοκίνης IP-10/CXCL10 έχει θεραπευτικό αποτέλεσμα.^{155, 156}

CXCR4

Ο CXCR4 είναι ο πρώτος χημειοϋποδοχέας που βρέθηκε να αποτελεί συν-υποδοχέα της λοίμωξης από τον ανθρώπινο ανοσοκατασταλτικό ιό (HIV).¹⁵⁷ Ο υποδοχέας αυτός εκφράζεται σε πάμπολλους κυτταρικούς τύπους, συμπεριλαμβανομένων των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων, μονοκυττάρων, T λεμφοκυττάρων, B λεμφοκυττάρων, προγονικών κυττάρων του περιφερικού αίματος και μυελού των οστών, δενδριτικών κυττάρων, κυττάρων του Langerhans, και θυμοκυττάρων.¹⁵⁸⁻¹⁶⁰ Ο υποδοχέας CXCR4 επίσης εκφράζεται σε αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, νευρώνες του κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος, μικρογλία και αστροκύτταρα.¹⁶¹ Σε T λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος ο υποδοχέας CXCR4 εκφράζεται κυρίως σε κύτταρα τύπου CD45RA⁺, και η έκφραση του αυξάνεται μετά από ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων με φυτοαιμαγλουτινίνη και ΙΑ-2.¹⁶² Ο υποδοχέας CXCR4 συνδέει την χημειοκίνη SDF-1 η οποία προκαλεί την κινητοποίηση ασβεστίου και την χημειοταξία κυττάρων που εκφράζουν τον υποδοχέα αυτό.¹⁶³ Η απώλεια της χημειοκίνης ή του υποδοχέα από το γονιδίωμα του ποντικού οδηγεί σε θάνατο στην περινεογενική περίοδο της ζωής. Οι ποντικοί αυτοί παρουσιάζουν ελλείματα στο καρδιακό κοιλιακό τοίχωμα, ανεπαρκή

αγγειογένεση στο γαστροεντερικό σύστημα και στην ανάπτυξη της παρεγκεφαλίδας, ανώμαλη μυελοποίηση, και ανεπαρκή Β λεμφοποίηση.^{164, 165} Ο χημειούποδοχέας CXCR4 όπως αναφέρθηκε προηγουμένως διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της ανοσοανεπάρκειας από τον ανθρώπινο ανοσοκατασταλτικό ιό.

CXCR5

Ο CXCR5 είναι ο πρώτος χημειούποδοχέας που βρέθηκε να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των λεμφικών οργάνων. Η έλλειψη αυτού του υποδοχέα οδηγεί σε σημαντική διαταραχή στην κινητοποίηση και τοπογραφία των Β λεμφοκυττάρων.¹⁶⁶ Οι ποντικοί με εξάλειψη του γονιδίου του CXCR5 έχουν υποπλαστικές πλάκες του Peyer, έλλειψη του βουβωνικών λεμφαδένων, και παρουσιάζουν ανωμαλίες στα πρωτοπαθή και βλαστικά λεμφοζύδια στον σπλήνα.¹⁶⁶ Παρόλα αυτά τα επίπεδα ανοσοσφαιρινών σε ποντίκια με έλλειψη του υποδοχέα CXCR5 είναι φυσιολογικά. Ο υποδοχέας CXCR5 βρέθηκε με κυτταρομετρία ροής ότι εκφράζεται από ένα μικρό ποσοστό των CD4⁺ και CD8⁺ Τ λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος τα οποία έχουν χαρακτηριστικά Τ λεμφοκυττάρων μνημονικού τύπου.¹⁶⁶ Σε αντίθεση τα περισσότερα Τ λεμφοκύτταρα στα δευτερογενή λεμφικά όργανα εκφράζουν τον υποδοχέα αυτό. Ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων μέσω του υποδοχέα TCR οδηγεί σε αύξηση του CXCR5 στην κυτταρική επιφάνεια ενώ η ΙΛ-2 έχει το αντίθετο αποτέλεσμα.¹³³ Η χημειοκίνη που επιδρά με τον CXCR5 είναι η BCA-1/CXCL13, μία ομοιοστατική χημειοκίνη που παράγεται σε δευτερογενή λεμφικά όργανα και συμβάλλει στην προσέλκυση των Β λεμφοκυττάρων.^{116, 167} Υποστηρίζεται ότι η έκφραση του υποδοχέα CXCR5 σε ενεργοποιημένα Τ λεμφοκύτταρα συμβάλλει στην προσέλκυση τους σε δευτερογενή λεμφικά όργανα και επίδραση τους με Β λεμφοκύτταρα. Η επαφή των Β λεμφοκυττάρων με ενεργοποιημένα Τ λεμφοκύτταρα πιστεύεται ότι είναι σημαντική στην παραγωγή αντισωμάτων έναντι θυμοεξαρτώμενων αντιγόνων.

2.3 Χημειούποδοχείς τύπου CC

CCR1

Ο υποδοχέας CCR1 είναι ο πρώτος χημειούποδοχέας του τύπου CC που ανακαλύφθηκε. Ο υποδοχέας εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 3p21 μαζί με τους υποδοχείς CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR8, CCR9, XCR1, και CX3CR1.¹⁶⁸ Ο υποδοχέας εκφράζεται στα περισσότερα CD4⁺,

CD8⁺, και CD16⁺ λεμφοκύτταρα. Στο περιφερικό αίμα τα T λεμφοκύτταρα μνημονικού τύπου εκφράζουν τον υποδοχέα CCR1 σε υψηλότερα ποσοστά.¹⁶⁹ Διάφορες φλεγμονώδεις χημειοκίνες συνδέουν τον υποδοχέα CCR1, μεταξύ των οποίων η MIP-1α/CCL3, RANTES/CCL5, MCP-2/CCL8, MCP-3/CCL7, leukotactin/MIP-5, MIP-1/CCL23 και HCC-1/CCL14 (Πίνακας 1).¹¹³

Η επίδραση των ανωτέρων χημειοκινών με τον υποδοχέα CCR1 οδηγεί στην κινητοποίηση ασβεστίου και χημειοταξία των κυττάρων που τον εκφράζουν. Διάφορες μοριακές παραλλαγές της χημειοκίνης RANTES/CCL5, όπως η Met-RANTES και η amino-oxypentane (AOP)-RANTES, έχουν αναπτυχθεί και βρέθηκαν ότι λειτουργούν ως ανταγωνιστές του υποδοχέα CCR1.^{170, 171} Αυτές οι ουσίες όμως δεν αποτελούν ειδικούς αναστολείς του CCR1 καθώς επίσης αναστέλλουν και τους υποδοχείς CCR3 και CCR5. Ο CCR1 είναι ο κύριος υποδοχέας σε ποντικό που συμβάλλει στην χημειοταξία των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων και την κινητοποίηση προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων.¹⁷² Η χημειοκίνη MIP-1α/CCL3 μέσω του CCR1 προκαλεί αναστολή της αιμοποίησης. Σύμφωνα με τον ρόλο του CCR1 στην κινητοποίηση των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων, η έλλειψη του υποδοχέα σε ποντικό οδηγεί σε πύο ήπια μορφή πνευμονίτιδας σε ένα μοντέλο παγκρεατίτιδας-κυψελίτιδας αλλά σε αυξημένη θνησιμότητα από λοίμωξη με τον μύκητα *Aspergillus fumigatus*, όπου η παρουσία ουδετερόφιλων είναι σημαντική για τον έλεγχο της λοίμωξης.^{172, 173} Αξίζει να σημειωθεί η διαφορά στην βιολογία του υποδοχέα CCR1 μεταξύ ποντικού και ανθρώπου καθώς στον άνθρωπο οι αγωνιστές του CCR1, όπως οι χημειοκίνες MIP-1α/CCL3 και RANTES/CCL5, έχουν μικρή χημειοτακτική επίδραση σε ανθρώπινα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηνια λευκοκύτταρα. Ο υποδοχέας CCR1 επίσης συμβάλλει στον σχηματισμό κοκκιωμάτων και την παραγωγή τύπου 1 και τύπου 2 κυτταροκινών κατά την διάρκεια λοίμωξης από το παράσιτο *Schistosoma* στον πνεύμονα.¹⁷² Παραδόξως σε μοντέλο νεφροτοξικής νεφρίτιδας η απώλεια του CCR1 οδήγησε σε έξαρση της νόσου που χαρακτηρίζεται από αυξημένη διήθηση του οργάνου από μονοκύτταρα/μακροφάγα, βοηθητικά CD4⁺ και κυτταροτοξικά CD8⁺ T λεμφοκύτταρα.¹⁷⁴ Σε αντίθεση η απώλεια του CCR1 εμπόδισε την οξεία και χρόνια απόρριψη καρδιακού μοσχεύματος σε μοντέλα ποντικού.¹⁷⁵ Συμπερασματικά ο υποδοχέας CCR1 συμβάλλει σε φλεγμονώδεις διεργασίες, θετικά ή αρνητικά, ανάλογα με το ζωικό μοντέλο της νόσου. Επίσης ποντικοί με έλλειψη της χημειοκίνης MIP-1α/CCL3 προστατεύονται από μυοκαρδίτιδα που προκαλείται από τον ιό coxsackie και

κυψελίτιδα που προκαλείται από τον ιό της influenza A, και τέλος από οξεία πειραματική εγκεφαλομυελίτιδα σε ζωϊκό μοντέλο σκλήρυνσης κατά πλάκα.^{176, 177}

CCR2

Ο CCR2 αποτελεί τον υποδοχέα των χημειοκινών MCP-1/CCL2, MCP-3/CCL7, και MCP-4/CCL13 (Πίνακας 1). Παράγεται σε δύο μορφές τον CCR2a και CCR2b, η τελευταία αποτελεί την κυρίαρχη μορφή του υποδοχέα.¹⁷⁸ Η έκφραση του CCR2 εντοπίζεται κυρίως σε μονοκύτταρα, δενδριτικά κύτταρα, φονικά λεμφοκύτταρα (NK cells) και ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα και μερικά B λεμφοκύτταρα.¹⁷⁹ Ποντικοί με έλλειψη του υποδοχέα CCR2 αναπτύσσονται φυσιολογικά αλλά αδυνατούν να προσελκύσουν μακροφάγα σε πειραματικό μοντέλο περιτονίτιδας και να ανταποκριθούν αποτελεσματικά σε λοίμωξη με το παθογόνο βακτήριο *Listeria monocytogenes*.¹⁸⁰ Η έλλειψη επίσης του υποδοχέα CCR2 σε ποντικό οδηγεί σε ελλειπώδη σχηματισμό αθηροσκληρωτικών πλακών σε ζωϊκό μοντέλο της νόσου.¹⁸¹ Ο υποδοχέας έχει επίσης προταθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην πειραματική εγκεφαλομυελίτιδα και επίσης στην παθογένεια της λοίμωξης από τον ιό HIV στον άνθρωπο.¹⁸²

CCR3

Ο υποδοχέας αυτός εκφράζεται σε εοσινόφιλα αλλά και σε βασεόφιλα λευκοκύτταρα, και μαστοκύτταρα και συνδέει διάφορες χημειοκίνες όπως την eotaxin/CCL11, eotaxin-2/CCL24, και eotaxin-3/CCL26.¹⁸³ Ο CCR3 επίσης εκφράζεται σε ένα μικρό ποσοστό T λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος που έχουν τα χαρακτηριστικά βοηθητικών T λεμφοκυττάρων τύπου 2.¹⁸⁴ Συνεπώς η κατανομή του CCR3 στους διάφορους κυτταρικούς τύπους που περιγράφηκε προηγουμένως συνηγορούν στην άποψη ότι συμβάλλει στην παθογένεια αλλεργικών νόσων που χαρακτηρίζονται από ανοσολογικές αντιδράσεις τύπου 2 (IL-4, IL-5, και IL-13) όπως για παράδειγμα το άσθμα.¹⁸⁵ Παρόλα αυτά σε ζωϊκά μοντέλα αλλεργικών αντιδράσεων ο ρόλος του υποδοχέα αυτού δεν έχει απόλυτα διευκρινιστεί. Ο υποδοχέας CCR3 επίσης έχει προταθεί να παίζει κάποιο ρόλο στην παθογένεια της λοίμωξης από τον ανθρώπινο ανοσοκατασταλτικό ιό (HIV).¹⁸⁶

CCR4

Ο υποδοχέας CCR4 συνδέει τις χημειοκίνες TARC/CCL17 και MDC/CCL22. Έχει βρεθεί ότι εκφράζεται σε βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα τύπου 2 και δένδριτικά κύτταρα.¹³⁴ Ο χημειοϋποδοχέας αυτός συμβάλλει στην κινητοποίηση ενεργοποιημένων Τ λεμφοκυττάρων και δένδριτικών κυττάρων και πιθανότατα στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των θυμοκυττάρων.¹⁸⁷ Ο υποδοχέας αυτός επίσης συμβάλλει στην προσέλκυση ενεργοποιημένων Τ λεμφοκυττάρων στο δέρμα.¹³⁵

CCR5

Ο υποδοχέας CCR5 αποτελεί έναν από τους κύριους συν-υποδοχείς της λοίμωξης από τον ανθρώπινο ανοσοκατασταλτικό ιό (HIV).^{186, 188} Ο υποδοχέας αυτός εκφράζεται σε ανώριμα δένδριτικά κύτταρα, αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα που εκφράζουν το αντιγόνο CD34, και σε ενεργοποιημένα Τ λεμφοκύτταρα μνημονικού τύπου που έχουν χαρακτηριστικά βοηθητικών Τ λεμφοκυττάρων τύπου 1.^{160, 189} Σε Τ λεμφοκύτταρα η έκφραση του υποδοχέα αυξάνεται με παρατεταμένη ενεργοποίηση τους με ΙΑ-2 και άλλα μιτογόνα ερεθίσματα.¹⁶⁰ Ο CCR5 επίσης εκφράζεται τόσο σε CD4⁺ όσο και σε CD8⁺ θυμοκύτταρα και σε διάφορους άλλου τύπου κυττάρων όπως νευρώνες, αστροκύτταρα, ενδοθηλιακά και επιθηλιακά κύτταρα, λυϊκά μυοκύτταρα των αγγείων, και ινοβλάστες.^{158, 159} Η λειτουργική σημασία της έκφρασης του CCR5 σε αυτά τα κύτταρα δεν έχει διευκρινιστεί. Ο υποδοχέας CCR5 συνδέει διάφορες χημειοκίνες όπως MIP-1α/CCL3, RANTES/CCL5, και MIP-1β/CCL4 αλλά καμμία δεν είναι απόλυτα ειδική για τον CCR5 (Πίνακας 1). Διάφοροι αναστολείς του υποδοχέα CCR5 έχουν αναπτυχθεί όπως μονοκλωνικά αντισώματα, παραλλαγές της χημειοκίνης RANTES/CCL5, όπως met-RANTES και AOP-RANTES, που λειτουργούν ως ανταγωνιστές του υποδοχέα.^{170, 171} Οι ουσίες αυτές βρέθηκε να έχουν θεραπευτική δράση σε ζωικά μοντέλα κολίτιδας.¹⁹⁰ Επιπρόσθετα η έλλειψη του υποδοχέα CCR5 σε ποντικό έχει προστατευτική δράση από την κολίτιδα που αναπτύσσεται μετά από χορήγηση DSS.¹⁹¹ Η λειτουργικότητα του υποδοχέα CCR5 αναστέλλεται σε άτομα που φέρουν την μετάλλαξη CCR5Δ32, που δεν περιέχει 32 ζεύγη βάσεων στην νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου και κωδικοποιεί μία κολοβή μη λειτουργική πρωτεΐνη.¹⁹² Η συχνότητα της ομοζυγοτίας για το γονίδιο CCR5Δ32 είναι περίπου 1% των καυκάσιων της Βορείου Αμερικής που είναι κατά τα άλλα υγιείς και επίσης παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε λοίμωξη από τον ανθρώπινο ανοσοκατασταλτικό ιό (HIV).¹⁹³

Η συχνότητα της μετάλλαξης αυτής έχει επίσης μελετηθεί σε ασθενείς με ΙΦΕΝ αλλά δεν βρέθηκε αυξημένη ή ελλατωμένη σε σχέση με υγιείς μάρτυρες.¹⁹⁴

CCR6

Ο CCR6 είναι ο μοναδικός υποδοχέας της χημειοκίνης MIP-3α/CCL20 που προσελκύει T λεμφοκύτταρα μνημονικού τύπου και ανώριμα δενδριτικά κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα αυτό.¹²⁷ Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του υποδοχέα CCR6 είναι ότι βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6q27 που είναι έξω από την συνήθη θέση των CCR υποδοχέων στο χρωμόσωμα 3p.¹⁹⁵ Έχει υποστηριχθεί ότι ο υποδοχέας αυτός παίζει σημαντικό ρόλο στην κινητοποίηση των T λεμφοκυττάρων και δενδριτικών κυττάρων στα δευτερογενή λεμφικά όργανα. Η χημειοκίνη MIP-3α/CCL20 είναι μία ομοιοστατική χημειοκίνη που συμβάλλει στην συνεχή κινητοποίηση των δενδριτικών κυττάρων τύπου Langerhans στο δέρμα.¹⁹⁶ Το mRNA του υποδοχέα CCR6 ανιχνεύεται στα δευτερογενή λεμφικά όργανα όπως τον σπλήνα, τους λεμφαδένες, και την σκωληκοειδή απόφυση.¹⁹⁷ Επίσης ο υποδοχέας εκφράζεται σε CD4⁺ και CD8⁺ T λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος με χαρακτηριστικά μνημονικών λεμφοκυττάρων και σε B λεμφοκύτταρα, αλλά όχι σε μονοκύτταρα ή ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα.¹⁹⁸ Ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων οδηγεί σε ελάτωση της έκφρασης του υποδοχέα CCR6 στην κυτταρική επιφάνεια.¹³³ Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι η ανθρώπινη αντι-βακτηριδιακή ουσία β-defensin (HBD2) που παράγεται από επιθηλιακά κύτταρα σε εστίες λοιμώξεως προσελκύει μνημονικά T λεμφοκύτταρα και δενδριτικά κύτταρα μέσω του υποδοχέα CCR6 υποδηλώνοντας μία συσχέτιση μεταξύ της πρωτογενούς και επίκτητης ανοσίας με τον χημειοϋποδοχέα αυτό¹⁹⁹.

CCR7

Ο CCR7 είναι ένας σημαντικός υποδοχέας που συμβάλλει όχι μόνο στην ομοιοστατική κινητοποίηση και διαπύδηση των B, T λεμφοκυττάρων και δενδριτικών κυττάρων μέσω του ενδοθηλίου στους λεμφικούς ιστούς αλλά και στην οργανωμένη αλληλεπίδραση τους στα δευτερογενή λεμφικά όργανα για την αποτελεσματική ανάπτυξη και εξέλιξη μιας ανοσολογικής αντίδρασης. Πράγματι η σημασία αυτού του υποδοχέα φαίνεται από το γεγονός ότι σε ποντίκι με έλλειψη του υποδοχέα CCR7 παρατηρείται αποδιοργάνωση των δευτερογενών λεμφικών

οργάνων και σημαντική καθυστέρηση στην ανάπτυξη αντισωμάτων και στην κυτταρική ανοσία σε θυμοεξαρτώμενα αντιγόνα.²⁰⁰ Το γονίδιο του υποδοχέα CCR7 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17q12-21.2 και συνεπώς βρίσκεται έξω από την υπόλοιπη ομάδα των CCR υποδοχέων που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 3p21.²⁰¹ Οι χημειοκίνες που συνδέονται με τον υποδοχέα CCR7 είναι οι ELC/CCL19 και SLC/CCL21(Πίνακας 1).^{123, 124, 202, 203} Και οι δύο ομοιοστατικές χημειοκίνες εκφράζονται στην T κυτταρική ζώνη των δευτερογενών λεμφικών οργάνων και στους βλεννογόνιους λεμφικούς ιστούς (MALT). Η χημειοκίνη SLC/CCL21 παράγεται από δενδριτικά κύτταρα (interdigitating dendritic cells) και από ενδοθηλιακά κύτταρα στα δευτερογενή λεμφικά όργανα και από λεμφαγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα σε διάφορους ιστούς.²⁰² Σε ποντικό η έλλειψη της χημειοκίνης SLC/CCL21 (*plt* mice) οδηγεί σε αδυναμία των T λεμφοκυττάρων που εκφράζουν τον υποδοχέα CCR7 να κινητοποιηθούν στους λεμφαδένες και τον σπλήνα καθώς επίσης και αδυναμία των ώριμων δενδριτικών κυττάρων του δέρματος να κινητοποιηθούν προς την T κυτταρική ζώνη στον σπλήνα και στους λεμφαδένες.²⁰⁴ Ο φαινότυπος του ποντικού με έλλειψη του υποδοχέα CCR7 είναι παρόμοιος με αυτόν που περιγράφηκε προηγουμένως σε ποντίκια με την μετάλλαξη *plt*.²⁰⁰ Η έκφραση του υποδοχέα CCR7 σε περιφερικά T λεμφοκύτταρα τα διαχωρίζει σε διάφορους λειτουργικούς τύπους όσον αφορά την παραγωγή κυτταροκινών και την χημειοτακτική ικανότητα τους προς λεμφικούς ιστούς ή περιφερικά όργανα.²⁰⁵

CCR8

Ο υποδοχέας αυτός εκφράζεται σε υψηλά ποσοστά σε θυμοκύτταρα και βοηθητικά T λεμφοκύτταρα τύπου 2.²⁰⁶ Επίσης το mRNA του υποδοχέα CCR8 παράγεται στον εγκέφαλο, στον σπλήνα, στους λεμφαδένες, και σε μονοκύτταρα.^{206, 207} Η χημειοκίνη I-309/CCL1 αλλά και ιογενής χημειοκίνες όπως vMIP-I και vMIP-II συνδέονται με τον CCR8.^{206, 207} Ο βιολογικός ρόλος της χημειοκίνης I-309/CCL1 και του CCR8 δεν έχουν απόλυτα διευκρινιστεί.

CCR9

Ο υποδοχέας CCR9 κλωνοποιήθηκε και ονομάστηκε αρχικά GPR9.6. Αργότερα επωνομάστηκε σε CCR9 όταν ανακαλύφθηκε ότι ο υποδοχέας αυτός συνδέει ειδικά την χημειοκίνη TECK/CCL25.^{126, 208} Ο υποδοχέας CCR9 εκφράζεται σε θυμοκύτταρα και σε λεμφοκύτταρα του

λεπτού εντέρου.²⁰⁸ Καθώς η χημειοκίνη TECK/CCL25 και ο υποδοχέας CCR9 εκφράζονται στον θύμο αδένα υποστηρίζεται ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανοσολογία του οργάνου.²⁰⁹ Παρόλα αυτά η έλλειψη του υποδοχέα CCR9 σε ποντικό δεν οδηγεί σε αξιοσημείωτες αλλαγές στην θυμοποίηση.²¹⁰ Η λεπτομερής ανάλυση του ρόλου της χημειοκίνης TECK/CCL25 και του υποδοχέα CCR9 στην ανοσολογία του λεπτού εντέρου και στην παθογένεια της νόσου του Crohn εξετάστηκε στην παρούσα διατριβή.

CCR10

Ο CCR10 (GPR2) εκφράζεται σε T λεμφοκύτταρα που έχουν την ικανότητα να εντοπίζονται στο δέρμα καθώς η χημειοκίνη που συνδέει τον υποδοχέα αυτό, CTACK/CCL27, εκφράζεται αποκλειστικά στο δέρμα.¹³⁶ Πρόσφατα ο υποδοχέας CCR10 βρέθηκε ότι εκφράζεται σε B λεμφοκύτταρα και πλασματοκύτταρα στους βλεννογόνιους λεμφικούς ιστούς και μία άλλη χημειοκίνη MEC/CCL28 επίσης βρέθηκε ότι συνδέει τον υποδοχέα αυτό.²¹¹ Η MEC/CCL28 εκφράζεται στους βλεννογόνιους ιστούς του εντέρου, στον πνεύμονα και στην αμυγδαλή.²¹¹ Η έκφραση της MEC/CCL28 σε αυτούς τους ιστούς μπορεί να ερμηνεύσει την ικανότητα των B λεμφοκυττάρων που εκφράζουν τον υποδοχέα CCR10 να εντοπίζονται σε διάσπαρτες περιοχές του λεγόμενου κοινού βλεννογόνιου ανοσολογικού συστήματος.²¹¹

2.4 Χημειοϋποδοχείς τύπου CX3C

CX3CR1

Ο CX3CR1 έχει την μοναδική ικανότητα να λειτουργεί ως χημειοϋποδοχέας της φρακταλκίνης (fractalkine/CX3CL1) και συγχρόνως ως προσκολλητικό μόριο μεταξύ των κυττάρων.¹²⁹ Ο υποδοχέας έχει ομοιότητες νουκλεοτιδικής αλληλουχίας με τους υποδοχείς τύπου CCR και το γονίδιο του βρίσκεται στην ίδια χρωμοσωμιακή περιοχή (3p21). Το mRNA του CX3CR1 εκφράζεται κυρίως στον εγκέφαλο αλλά πρακτικά σε όλους τους ιστούς του σώματος.²¹² Η φρακταλκίνη εκφράζεται είτε ως μεμβρανική πρωτεΐνη στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών, επιθηλιακών κυττάρων και νευρώνων είτε εκκρίνεται ως πρωτεΐνη. Και οι δύο μορφές της χημειοκίνης έχουν την ικανότητα να προσελκύουν κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα CX3CR1.²¹³ Ο CX3CR1 εκφράζεται κυρίως σε ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα, μονοκύτταρα, φονικά λεμφοκύτταρα (NK cells), και T λεμφοκύτταρα.^{129, 213} Έχει επίσης

υποστηριχθεί ότι ο CX3CR1 μπορεί να συμβάλλει στην παθογένεια της λοίμωξης από τον HIV καθώς μπορεί να λειτουργήσει ως συν-υποδοχέας για την είσοδο ορισμένων στελεχών του ιού στα κύτταρα.²¹⁴

2.5 Χημειούποδοχείς τύπου XC

XCRI

Ο XCRI, προηγουμένως γνωστός ως GPR5, αποτελεί τον υποδοχέα της χημειοκίνης λυμφοτακτίνη (lymphotactin/XCL1) και εκφράζεται κυρίως σε T λεμφοκύτταρα.¹²⁸ Ο βιολογικός ρόλος του υποδοχέα αυτού και της χημειοκίνης της δεν έχουν απόλυτα διευκρινιστεί.

2.6 Χημειοκίνες και ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις Εντεροπάθειες (ΙΦΕΝ)

Όπως περιγράφηκε προηγουμένως οι χημειοκίνες συμβάλλουν στην μετακίνηση διαφόρων λευκοκυτταρικών τύπων στους περιφερικούς ιστούς και λεμφικά όργανα και συνεπώς έχουν ενοχοποιηθεί στην παθογένεια των ΙΦΕΝ.²¹⁵

Ένα από τα ιστολογικά χαρακτηριστικά της εντερικής φλεγμονής που παρατηρείται τόσο στην ελκώδη κολίτιδα όσο και στην νόσο του Crohn είναι η διήθηση του εντερικού βλεννογόνου με φλεγμονώδη κύτταρα. Τα φλεγμονώδη κύτταρα αποτελούνται από ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα, μονοκύτταρα/μακροφάγα, λεμφοκύτταρα, εοσινόφιλα λευκοκύτταρα, και μαστοκύτταρα.^{19, 215, 216} Η μετακίνηση των φλεγμονωδών αυτών κυττάρων στον εντερικό βλεννογόνο απαιτεί αρχικά την διακυτταρική επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων αυτών και του ενδοθηλίου του εντερικού βλεννογόνου και εν συνεχεία με άλλα κύτταρα του διάμεσου ιστού και τα επιθηλιακά κύτταρα. Η επικοινωνία αυτή συντονίζεται μέσω της παραγωγής κυτταροκινών, συναπτικών πρωτεϊνών στο αγγειακό δίκτυο και χημειοκινών.^{217, 218} Οι χημειοκίνες διαδραματίζουν σημαντικότατο ρόλο στην εντερική φλεγμονή καθώς συμβάλλουν στην ενεργοποίηση των μορίων της ιντεγκρίνης (integrin) στα λευκοκύτταρα οδηγώντας έτσι σε ακινητοποίηση τους στο ενδοθήλιο και στην συνέχεια μετακίνηση τους στον διάμεσο ιστό.²¹⁷ Είναι γνωστό για παράδειγμα ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα του εντέρου από ασθενείς με ΙΦΕΝ έχουν μεγαλύτερη ικανότητα να συνδέουν λευκοκύτταρα από ότι ενδοθηλιακά κύτταρα του φυσιολογικού εντέρου.²¹⁹ Η ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών αυτών κυττάρων σε ασθενείς με ΙΦΕΝ έχει να κάνει με την παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως την ΙΛ-1 και τον TNF-α και του CD40L σε ενεργοποιημένα αιμοπετάλια.²²⁰ Πρόσφατες

μελέτες έχουν δείξει για παράδειγμα ότι τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια μέσω του CD40L αυξάνουν την παραγωγή των συναπτικών πρωτεϊνών ICAM-1, VCAM-1 και επίσης την παραγωγή της χημειοκίνης CXCL8/IL-8 από ενδοθηλιακά κύτταρα του εντέρου.²²⁰ Επίσης σε μεικτές καλλιέργειες αιμοπεταλίων και ενδοθηλιακών κυττάρων βρέθηκε αυξημένη παραγωγή της χημειοκίνης CCL5/RANTES που συνέβαλλε στην προσκόλληση των T λεμφοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι η αυξημένη παραγωγή της χημειοκίνης CCL5/RANTES προήλθε αποκλειστικά από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια.²²⁰

Παραγωγή Ομοιοστατικών χημειοκινών στον εντερικό βλεννογόνο

Διάφορες χημειοκίνες παράγονται στον εντερικό βλεννογόνο σε φυσιολογικές συνθήκες, κυρίως από επιθηλιακά κύτταρα και άλλες εντοπίζονται σε λεμφικές δομές του εντέρου όπως οι πλάκες του Peyer (Peyer's patches/PPs). Χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιων χημειοκινών αποτελούν οι ELC/CCL19 και SLC/CCL21, που παράγονται στα δευτερογενή λεμφικά όργανα, συμπεριλαμβανομένου και τις πλάκες του Peyer, και συνδέονται με τον υποδοχέα CCR7 που εκφράζεται σε ανενεργοποίητα T λεμφοκύτταρα και στα λεγόμενα T λεμφοκύτταρα με κεντρική μνήμη (central memory T cells, T_{CM}).^{202, 203} Τα T λεμφοκύτταρα σε ποντίκια με γενετική εξάλειψη των γονιδίων για τις χημειοκίνες CCL19 και CCL21 ή του υποδοχέα CCR7 αδυνατούν να εισέλθουν στους λεμφαδένες, PPs, και στον σπλήνα δείχνοντας έτσι τον σημαντικό ρόλο αυτών των χημειοκινών στην μετακίνηση των ανενεργωποίητων T λεμφοκυττάρων στα δευτερογενή λεμφικά όργανα για την έναρξη μίας ανοσολογικής αντίδρασης.²²¹ Η χημειοκίνη CXCL13/BCA-1 συνδέεται με τον υποδοχέα CXCR5, ο οποίος εκφράζεται σε B λεμφοκύτταρα και σε ένα μικρό ποσοστό T λεμφοκυττάρων που φέρουν τον χαρακτηρισμό “λεμφοζιδιακά βοηθητικά T λεμφοκύτταρα” (follicular T helper cells/T_{FH}). Η χημειοκίνη CXCL13/BCA-1 παράγεται στις πλάκες του Peyer και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό αυτών των δομών, όπως επίσης και των λεμφοζιδίων στους λεμφαδένες και στον σπλήνα.²²² Η χημειοκίνη CXCL13 συμβάλλει στον σχηματισμό αυτών των δομών με το να προσελκύει B λεμφοκύτταρα που στην συνέχεια παράγουν λυμφοτοξίνη α/β που διαδραματίζει σημαντικότατο ρόλο στον σχηματισμό αυτών των δομών.²²² Επίσης έχει βρεθεί ότι η χημειοκίνη CXCL13/BCA-1 παράγεται στο φυσιολογικό παχύ έντερο καθώς επίσης και σε λεμφικές δομές του παχέως εντέρου στην ελκώδη κολίτιδα.²²³

Μία άλλη χημειοκίνη του τύπου CC, η CCL20/MIP-3α, παράγεται από επιθηλιακά κύτταρα που βρίσκονται πάνω από τις πλάκες του Peyer, από εντερικά επιθηλιακά κύτταρα και στην σκωληκοειδή απόφυση και επίσης στις φλεγμονώδεις αμυγδαλές.²²⁴ Η χημειοκίνη αυτή επιδρά με τον υποδοχέα CCR6 (Πίνακας 1) που εκφράζεται σε ανώριμα δενδριτικά κύτταρα, T λεμφοκύτταρα μνημονικού τύπου και B λεμφοκύτταρα.¹⁹⁸ Μελέτες έχουν δείξει ότι η χημειοκίνη αυτή προσελκύει μυελοειδή δενδριτικά κύτταρα και T λεμφοκύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα CCR6.^{196, 225, 226} Ποντικοί με έλλειψη του γονιδίου για τον υποδοχέα αυτό έχουν ατροφικές πλάκες του Peyer, αλλοιώσεις στην τοπολογία των δενδριτικών κυττάρων που εκφράζουν τους υποδοχείς CD11b και CD11c και επίσης παρουσιάζουν αυξημένο αριθμό ενδοεπιθηλιακών λεμφοκυττάρων στο λεπτό έντερο.²²⁵ Οι ποντικοί αυτοί παρουσιάζουν ελλατωμένη έκκριση ανοσοσφαιρινών σε ανταπόκριση εντερικών αντιγόνων και στον εντεροϊό rotavirus.²²⁵ Τα δεδομένα αυτά δεικνύουν ότι ο υποδοχέας CCR6 και η χημειοκίνη CCL20/MIP-3α διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις ανοσολογικές αντιδράσεις του εντέρου. Παρότι η χημειοκίνη CCL20/MIP-3α θεωρείται ομοιοστατική η παραγωγή της αυξάνεται στις φλεγμονώδεις εντεροπάθειες, τόσο στην νόσο του Crohn όσο και στην ελκώδη κολίτιδα.²²⁷ Η παραγωγή της τόσο στο φυσιολογικό παχύ έντερο όσο και στις ΙΦΕΝ εντοπίζεται στα επιθηλιακά κύτταρα των εντερικών κρυπτών και λαχνών. Επιπρόσθετα εντερικές κυτταρικές σειρές παράγουν CCL20/MIP-3α όταν ενεργοποιηθούν με φλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως ΙΛ-1 ή με τον βακτηριδιακό παράγοντα flagellin αλλά όχι με μη παθογόνα βακτήρια του εντέρου.²²⁷ ²²⁸ Πιθανότατα η χημειοκίνη αυτή παίζει σημαντικό ρόλο στις ΙΦΕΝ και στις εντερικές λοιμώξεις μέσω της ικανότητας της να προσελκύει ανώριμα δενδριτικά κύτταρα και μνημονικά T λεμφοκύτταρα στον εντερικό βλεννογόνο.²²⁷ Πράγματι πρόσφατα δεδομένα σε πειραματική εντεροκολίτιδα έδειξαν ότι η έλλειψη του χημειοϋποδοχέα CCR6 προστατεύει από οξεία φλεγμονή στο παχύ έντερο ενώ έχει προστατευτικό ρόλο σε χρόνια φλεγμονή.²²⁹ Καθώς όλα τα T λεμφοκύτταρα που εντοπίζονται στον εντερικό βλεννογόνο, τόσο τα ενδοεπιθηλιακά όσο και τα βλεννογόνια, εκφράζουν τους χημειοϋποδοχείς CCR2, CCR5, CXCR3, και CXCR4 οι χημειοκίνες που επιδρούν με αυτούς τους υποδοχείς εκφράζονται στο έντερο σε φυσιολογικές συνθήκες. Οι χημειοκίνες αυτές είναι οι CCL2/MCP-1, CCL7/MCP-3 (για τον υποδοχέα CCR2), CCL5/RANTES (για τον υποδοχέα CCR5), CXCL10/IP-10 (για τον υποδοχέα CXCR3), και CXCL12/SDF-1 (για τον υποδοχέα CXCR4).^{215, 230-233}

Η χημειοκίνη φρακταλκίνη, CX3CL1/fractalkine, που συνδέεται με τον υποδοχέα CX3CR1, παράγεται από επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου και ενδοθηλιακά κύτταρα του λεπτού εντέρου και η παραγωγή της αυξάνεται στον φλεγμονώδη ιστό στην νόσο του Crohn.²³³ Η υποδοχέας της φρακταλκίνης εκφράζεται σε CD8⁺ ενδοεπιθηλιακά T λεμφοκύτταρα, φονικά λεμφοκύτταρα, και σε μονοκύτταρα που εκφράζουν το αντιγόνο CD16.²³³ Συνεπώς η φρακταλκίνη παίζει σημαντικό ρόλο στην προσέλκυση και ακινητοποίηση των ενδοεπιθηλιακών T λεμφοκυττάρων και των μονοκυτταρων/μακροφάγων στο έντερο σε φυσιολογικές και πιθανότατα κατά την διάρκεια φλεγμονωδών διεργασιών. Μία άλλη μελέτη έδειξε ότι η διαμεμβρανική μορφή της φρακταλκίνης εκφράζεται σε επιθηλιακά κύτταρα του δέρματος, στις αμυγδαλές, και στο παχύ έντερο.²³⁴ Σε αυτή την μελέτη πάντως δεν βρέθηκε αυξημένη έκφραση της χημειοκίνης σε ενδοθηλιακά κύτταρα του φυσιολογικού παχέως εντέρου ή σε φλεγμονώδεις εστίες σε ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα και νόσο του Crohn.²³⁴ Συνεπώς ο ρόλος της φρακταλκίνης στην παθογένεια των ΙΦΕΝ παραμένει αδιευκρίνιστη.

Η CXCL14/BRAK είναι μια άλλη ομοιοστατική χημειοκίνη που παράγεται από διάφορα επιθηλιακά κύτταρα συμβεριλαμβανομένων των βασικών κερατινοκυττάρων και ινοβλαστών του δέρματος. Η χημειοκίνη αυτή δεν παράγεται από επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου αλλά αποκλειστικά από μακροφάγα του εντερικού βλεννογόνου και η παραγωγή της δεν φαίνεται να αυξάνεται στην νόσο του Crohn.²³⁵ Η CXCL14/BRAK είναι ειδική στην προσέλκυση των μονοκυττάρων που έχουν ενεργοποιηθεί με την προσταγλαδίνη E2.²³⁵ Άλλες χημειοκίνες που παράγονται στο έντερο και πιθανότατα συμβάλλουν στην προσέλκυση των μονοκυττάρων αποτελούν η CCL2/MCP-1 και η CCL5/RANTES. Και οι δύο χημειοκίνες παράγονται σε αυξημένη ποσότητα σε ασθενείς με ΙΦΕΝ.^{231, 236-238}

Μία από τις πιο πρόσφατες θεωρίες για την μετακίνηση των πλασματοκυττάρων που παράγουν την ανοσοσφαιρίνη IgA σε διάσπαρτα όργανα του λεγόμενου “κοινού βλεννογόνιου ανοσολογικού συστήματος” έχει να κάνει με την χημειοκίνη CCL28/MEC και τον υποδοχέα CCR10.²¹¹ Η χημειοκίνη CCL28/MEC παράγεται από επιθηλιακά κύτταρα του λεπτού και παχέως εντέρου αλλά και από επιθηλιακά κύτταρα σε άλλους βλεννογόνιους ιστούς όπως για παράδειγμα την τραχεία, τους σιαλογόνους αδένες, και τον μαστικό αδένά.²¹¹ Κύτταρα που παράγουν την ανοσοσφαιρίνη IgA, συμβεριλαμβανομένων και αυτών του περιφερικού αίματος, εκφράζουν τον υποδοχέα CCR10. Ουσιαστικά όλα τα πλασματοκύτταρα που παράγουν IgA

στους σιαλογόνους αδένες, λεπτό και παχύ έντερο, σκωληκοειδή απόφυση, και αμυγδαλές εκφράζουν επίσης τον χημειούποδοχέα CCR10.²¹¹ Επιπρόσθετα η χημειοκίνη CCL28/MEC προσελκύει πλασματοκύτταρα που παράγουν IgA μέσω του υποδοχέα CCR10. Συνεπώς η χημειοκίνη CCL28/MEC μέσω της επίδρασης της με τον υποδοχέα CCR10 συμβάλλει στην κινητοποίηση των IgA⁺ πλασματοκυττάρων σε διάφορα όργανα του ανοσολογικού συστήματος που χαρακτηρίζονται από αυξημένη παραγωγή της ανοσοσφαιρίνης IgA. Επίσης αυτό το σύστημα της χημειοκίνης και του υποδοχέα της μπορεί να ερμηνεύσει την διάσπαρτη μετακίνηση των πλασματοκυττάρων που παράγουν IgA μετά από τοπική ανοσοποίηση.²¹¹

Παραγωγή Φλεγμονωδών χημειοκινών στον εντερικό βλεννογόνο

Η παραγωγή διαφόρων φλεγμονωδών χημειοκινών έχει μελετηθεί στις ΙΦΕΝ. Για παράδειγμα η παραγωγή της χημειοκίνης CXCL8/IL-8, που επιδρά με τους υποδοχείς CXCR1 και CXCR2, αυξάνεται τόσο στην ελκώδη κολίτιδα όσο και στην νόσο του Crohn.²³⁹⁻²⁴¹ Η αυξημένη παραγωγή της χημειοκίνης CXCL8/IL-8 πιθανότατα μπορεί να εξηγήσει μία από τις πιο χαρακτηριστικές ιστολογικές αλλοιώσεις των ΙΦΕΝ και κυρίως της ελκώδους κολίτιδας; την κρυπτίτιδα (φλεγμονή των κρυπτών), και τα κρυπτικά αποστήματα που χαρακτηρίζονται από την παρουσία ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων στις κρύπτες του παχέως εντέρου και τον εντερικό αυλό, αντίστοιχα. Η IL-8 παράγεται από ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα, μακροφάγα, και επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου και τα επίπεδα παραγωγής της συσχετίζονται με την σοβαρότητα της φλεγμονής.²³⁹⁻²⁴¹ Επίσης η παραγωγή της χημειοκίνης CXCL5/ENA-78 έχει μελετηθεί στις ΙΦΕΝ. Η παραγωγή του mRNA και της πρωτεΐνης της χημειοκίνης CXCL5 εντοπίζεται στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου στην ελκώδη κολίτιδα και νόσο του Crohn αλλά τα επίπεδα της σχετίζονται αντιστρόφως με την σοβαρότητα της φλεγμονής.²⁴² Σε αντίθεση τα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα του παχέως εντέρου δεν παράγουν mRNA της χημειοκίνης CXCL5 ενώ μόνο ένα μικρό ποσοστό των κυττάρων παράγουν την πρωτεΐνη.²⁴² Η CXCL5 προκαλεί χημειοταξία και ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων μέσω του υποδοχέα CXCR2 και πιθανότατα να συμβάλλουν στην οξεία φλεγμονή των ΙΦΕΝ.

Η χημειοκίνη CCL2/MCP-1, που προκαλεί χημειοταξία των μακροφάγων, ανώριμων δένδριτικών κυττάρων, φονικών λεμφοκυττάρων, και μερικών T λεμφοκυττάρων, παράγεται από επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου σε φυσιολογικές συνθήκες ενώ η παραγωγή της αυξάνεται σε

φλεγμονώδεις διεργασίες του εντέρου, συμπεριλαμβανομένου της ελκώδους κολίτιδας, νόσου του Crohn και εκκολπωματίτιδας.²³¹ Η αυξημένη παραγωγή της CCL2/MCP-1 στις ΙΦΕΝ εντοπίζεται σε ενδοθηλιακά κύτταρα και μονοκύτταρα του εντερικού βλεννογόνου.²³¹ Συνεπώς η χημειοκίνη αυτή πιθανότατα να συμβάλλει στην κινητοποίηση μακροφάγων, δενδριτικών κυττάρων, και ενεργοποιημένων Τ λεμφοκυττάρων στον εντερικό βλεννογόνο κατά την διάρκεια της φλεγμονής. Μία άλλη μελέτη έδειξε αυξημένο ποσοστό κυττάρων που παράγουν τις χημειοκίνες CXCL8/ΙΛ-8, CXCL10/IP-10, CCL2/MCP-1, και CCL7/MCP-3 στον εντερικό βλεννογόνο ασθενών με ελκώδη κολίτιδα.^{238, 243} Η χημειοκίνη CCL11/εοταξίνη παράγεται στο φυσιολογικό λεπτό και παχύ έντερο και μέσω του υποδοχέα CCR3 προσελκύει εοσινόφιλα και βασεόφιλα λευκοκύτταρα. Η ομοιοστατική παραγωγή αυτής της χημειοκίνης μπορεί να ερμηνεύσει την παρουσία εοσινόφιλων λευκοκυττάρων στο έντερο σε φυσιολογικές συνθήκες.²⁴⁴ Η παραγωγή της εοταξίνης αυξάνεται στις ΙΦΕΝ τόσο στην ελκώδη κολίτιδα όσο και στην νόσο του Crohn. Επιπλέον η παραγωγή της αυξάνεται σε καλλιέργειες επιθηλιακών και ενδοθηλιακών κυττάρων υπό την επίδραση φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως της ΙΛ-1, ΙΦΝ-γ, και TNF-α.²⁴⁴ Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι ένα ποσοστό μνημονικών Τ λεμφοκυττάρων τύπου 2 που εκφράζουν τον υποδοχέα CCR3 εντοπίζονται στον βλεννογόνο ασθενών με ελκώδη κολίτιδα σε περιοχές που περιέχουν άφθονα εοσινόφιλα λευκοκύτταρα. Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν την άποψη ότι η εοταξίνη συμβάλλει όχι μόνο στην κινητοποίηση των εοσινόφιλων λευκοκυττάρων αλλά και των μνημονικών Τ λεμφοκυττάρων τύπου 2 κατά την διάρκεια της εντερικής φλεγμονής στην ελκώδη κολίτιδα.

Τα Τ λεμφοκύτταρα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια των ΙΦΕΝ και επίσης σε ζωικά μοντέλα εντεροκολίτιδας.²⁴⁵ Η κατανόηση συνεπώς των μηχανισμών που συμβάλλουν στην κινητοποίηση αυτών των κυττάρων στον εντερικό βλεννογόνο σε φυσιολογικές συνθήκες και κατά την διάρκεια φλεγμονωδών διεργασιών είναι σημαντική. Τα Τ λεμφοκύτταρα εκφράζουν μία σειρά από χημειοϋποδοχείς ανάλογα με το στάδιο διαφοροποίησης και ενεργοποίησης τους. Για παράδειγμα τα Τ λεμφοκύτταρα τύπου 1 εκφράζουν τους υποδοχείς CXCR3, CCR5 και CXCR6, ενώ τα Τ λεμφοκύτταρα τύπου 2 εκφράζουν τους υποδοχείς CCR3, CCR4 και CCR8. Συνεπώς οι χημειοκίνες που επιδρούν με αυτούς τους υποδοχείς παίζουν σημαντικό ρόλο στην προσέλκυση Τ λεμφοκυττάρων τύπου 1 ή τύπου 2 κατά την διάρκεια της φλεγμονής. Η χημειοκίνη CXCL10/IP-10, που προσελκύει ενεργοποιημένα Τ λεμφοκύτταρα

μέσω του υποδοχέα CXCR3, παράγεται στο φυσιολογικό εντερικό βλεννογόνο και πιθανόν συμβάλλει στην ομοιοστατική κυκλοφορία των T λεμφοκυττάρων καθώς τα περισσότερα T λεμφοκύτταρα του λεπτού και παχέως εντέρου σε φυσιολογικές συνθήκες εκφράζουν τον υποδοχέα CXCR3.²⁴⁶ Η παραγωγή της CXCL10/IP-10 αυξάνεται στις ΙΦΕΝ^{238, 247} ενώ η παραγωγή των άλλων χημειοκινών που επιδρούν με τον υποδοχέα CXCR3 όπως οι CXCL9/Mig και CXCL11/I-TAC δεν έχουν ακόμα μελετηθεί. Οι χημειοκίνες CXCL9/Mig και CXCL10/IP-10 προκαλούν άμεση ακινητοποίηση των T λεμφοκυττάρων που έχουν ενεργοποιηθεί με ΙΑ-2 και διαπύδηση τους μέσω των ενδοθηλιακών κυττάρων σε in vitro κυτταρικές καλλιέργειες. Ανοσοϊστοχημικές μελέτες έχουν δείξει ότι >80% των λεμφοκυττάρων σε φλεγμονώδη εντερικό ιστό ασθενών με ελκώδη κολίτιδα εκφράζουν τον υποδοχέα CXCR3.¹⁵¹ Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι οι χημειοκίνες CXCL9/Mig, CXCL10/IP-10 και CXCL11/I-TAC με τον υποδοχέα τους CXCR3 μπορούν να συμβάλλουν στις φλεγμονώδεις διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στις ΙΦΕΝ. Μία πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η παραγωγή του χημειοϋποδοχέα CXCR3 δεν εντοπίζεται μόνο σε T λεμφοκύτταρα αλλά και σε ενδοθηλιακά κύτταρα στον εντερικό βλεννογόνο σε ασθενείς με νόσο του Crohn.²⁴⁸ Επιπλέον οι χημειοκίνες CXCL9/Mig, CXCL10/IP-10 και CXCL11/I-TAC είχαν αγγειοστατική επίδραση σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα η οποία είναι αναστρέψιμη μετά από χορήγηση αντισωμάτων έναντι του υποδοχέα CXCR3.²⁴⁸ Η παραγωγή της χημειοκίνης CXCL10/IP-10 έχει βρεθεί ότι αυξάνεται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις που χαρακτηρίζονται από αυξημένη παραγωγή κυτταροκινών τύπου 1, όπως η ψωρίαση, σαρκοειδωση, σκλήρυνση κατά πλάκας και αθηροσκληρωτική νόσο. Σε ζωικό μοντέλο οξείας κολίτιδας πρόσφατα δεδομένα έδειξαν ότι η απενεργοποίηση της χημειοκίνης CXCL10 οδήγησε σε αυξημένη μακροζωία των κυττάρων των εντερικών κρυπών χωρίς να έχει καμία επίδραση στην κυτταρική διήθηση φλεγμονωδών κυττάρων στον εντερικό βλεννογόνο.¹⁵⁵ Ως αποτέλεσμα τα ποντίκια αυτά εμφάνισαν λιγότερα εντερικά έλκη μετά από την χορήγηση της ουσίας DSS.¹⁵⁵ Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι μερικές χημειοκίνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε φλεγμονώδεις εντερικές διεργασίες όπως ιστική αποκατάσταση και όχι μόνο μέσω της προσέλκυσης φλεγμονωδών κυττάρων. Μία άλλη μελέτη έδειξε ότι η έλλειψη των χημειοϋποδοχέων CCR2 και CCR5 προστατεύει τα ποντίκια που φέρουν αυτές τις γονιδιακές ελλείψεις από εντερικές συμφύσεις και βλεννογόνια έλκη που προκαλούνται από την ουσία DSS.¹⁹¹ Επίσης τα ποντίκια με έλλειψη του υποδοχέα CCR5 και

ανάπτυξη κολίτιδας από την ουσία DSS, παρουσιάζουν μία στροφή από την παραγωγή κυτταροκινών τύπου 1 σε τύπου 2 στον εντερικό βλεννογόνο και παρουσιάζουν αυξημένη διήθηση στο παχύ έντερο από $CD4^+$ και $NK1.1^+$ T λεμφοκύτταρα, συγκριτικά με φυσιολογικά ποντίκια ή με αυτά που έχουν έλλειψη του υποδοχέα CCR2.¹⁹¹ Συνεπώς ο χημειούποδοχέας CCR5 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην προαγωγή ανοσολογικών αντιδράσεων τύπου 1 στον έντερο.

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΥΠΟΘΕΣΗ

Η χημειοκίνη, TECK (Thymus-expressed chemokine)/CCL25, ανακαλύφθηκε το 1997 όταν κλωνοποιήθηκε από βιβλιοθήκη cDNA του εμβρυϊκού λεπτού εντέρου.²⁰⁹ Επιπρόσθετα με την έκφραση της στο ΛΕ, η TECK/CCL25 παράγεται από επιθηλιακά κύτταρα του θύμου αδένου, και πιθανότατα να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανοσολογία του οργάνου.²⁰⁹ Αρχικές μελέτες έδειξαν ότι η χημειοκίνη TECK/CCL25 προσελκύει λεμφοκύτταρα του θύμου αδένου, μονοκύτταρα, δενδριτικά κύτταρα, αλλά δεν προσελκύει λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος.²⁰⁹ Στην συνέχεια βρέθηκε ότι η χημειοκίνη TECK/CCL25 συνδέεται ειδικά με τον υποδοχέα GPR9.6, που τώρα έχει μετονομαστεί σε CCR9.^{126, 208} Καθώς η χημειοκίνη TECK/CCL25 παράγεται στο λεπτό έντερο και προσελκύει T λεμφοκύτταρα που φέρουν τον υποδοχέα CCR9, υποθέσαμε ότι η TECK/CCL25 και ο CCR9 διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανοσολογία του ΛΕ καθώς επίσης και σε φλεγμονώδεις διεργασίες του οργάνου, όπως η νόσος του Crohn και η κοιλιοκάκη. Συνεπώς ο στόχος των πειραμάτων που περιγράφονται στην παρούσα διατριβή ήταν να εξετάσουν τον πιθανό ρόλο της χημειοκίνης TECK/CCL25 και του χημειοϋποδοχέα CCR9 στην ανοσολογία του λεπτού εντέρου και στην παθογένεια της νόσου του Crohn στο λεπτό έντερο.

2. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Ασθενείς

Δείγματα αίματος ελήφθησαν από ασθενείς με νόσο του Crohn, κοιλιοκάκη, και ελκώδη κολίτιδα καθώς και από υγιείς μάρτυρες για την ανάλυση του φαινότυπου των περιφερικών T λεμφοκυττάρων.

2.2 Υλικό

Οι πειραματικές μελέτες που περιγράφονται στην παρούσα εργασία εφαρμόστηκαν σε μονοκύτταρα που απομονώθηκαν από ιστοτεμάχια εκτομής λεπτού και παχέως εντέρου ασθενών με νόσο του Crohn και ελκώδη κολίτιδα. Για σύγκριση, μελετήθηκαν μονοκύτταρα που απομονώθηκαν από εντερικό ιστό (λεπτό ή παχύ έντερο) ασθενών που υποβλήθηκαν σε εκτομή του εντέρου λόγω καρκίνου. Στην περίπτωση αυτή, μόνο ο εντερικός ιστός που βρίσκεται τουλάχιστον 10 εκατοστά από τα όρια του καρκίνου χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των

λεμφοκυττάρων. Σε μερικές περιπτώσεις φυσιολογικό λεπτό έντερο που προήλθε από το δεύτερο στάδιο ιλεο-πρωκτικής αναστόμωσης για χειρουργική θεραπεία ελκώδης κολίτιδας χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των λεμφοκυττάρων.

2.3 Αντισώματα και Αντιδραστήρια

Τα αντισώματα έναντι των κυτταρικών αντιγόνων CD3, CD4, CD8, CD19, CD56, και HLA-DR προμηθεύτηκαν από την εταιρία Caltag (South San Francisco, CA). Τα αντισώματα έναντι των αντιγόνων CD25, CD69, CD95, β_7 ιντεγκρίνη, CD40L, OX-40, CTLA-4, CD27, CD71, CD62L, και CD45RO προμηθεύτηκαν από την εταιρία BD PharMingen (San Diego, CA). Τα παραπάνω αντισώματα είναι συνδεδεμένα με τις χρωστικές FITC, PE ή TC για την ανάλυση των λεμφοκυττάρων με κυτταρομετρία ροής. Τα αντισώματα για την ενδοκυτταρική χρώση κυτταροκινών έναντι της ιντερφερόνης- γ , IL-4, και IL-10 προμηθεύτηκαν από την εταιρία BD PharMingen και το αντίσωμα έναντι της IL-2 από την εταιρία Caltag. Η χημειοκίνη TECK/CCL25 προμηθεύτηκε από την εταιρία PeproTech (Rocky Hill, NJ). Τα αντισώματα έναντι του χημειοποδογέα CCR9, 3C3 ισότυπος IgG2b, και GPR9.6 ήταν από την εταιρία Millennium Pharmaceuticals (Cambridge, MA). Το αντίσωμα έναντι της ανθρώπινης TECK/CCL25 (hTECK, κλώνος LS202 5A9, ισότυπος IgG1) δημιουργήθηκε μετά από ενδοπεριτοναϊκή ανοσοποίηση ποντικών τύπου BALB/c με 10 μ g TECK/CCL25 σε CFA, IFA, και τελικά PBS κάθε 3 εβδομάδες. Κυτταρικά υβριδώματα δημιουργήθηκαν εν συνεχεία με τα κύτταρα μυελώματος SP2/0 και εξετάστηκαν εάν αντιδρούν με την hTECK με την μέθοδο ELISA. Τα θετικά κυτταρικά υβριδώματα απομονώθηκαν και επιλέχθηκαν με κλωνοποίηση. Από 20 συνολικά αντισώματα έναντι της hTECK, μόνο 2 βρέθηκαν να αντιδρούν με θετική χρώση σε ιστούς του θύμου αδένου όπου η χημειοκίνη παράγεται σε μεγάλη ποσότητα.

2.4 Απομόνωση μονοκυττάρων από το περιφερικό αίμα

Η διαδικασία απομόνωσης μονοκυττάρων από το περιφερικό αίμα πραγματοποιήθηκε ως εξής: ασθενείς και φυσιολογικοί δότες υποβλήθηκαν σε φλεβική παρακέντηση και 10 έως 240 ml ολικού αίματος συλλέχθηκε σε ηπαρινισμένη σύριγγα. Στη συνέχεια το αίμα τοποθετήθηκε σε σωλήνα τύπου Falcon χωρητικότητας 15 ή 50 ml που περιείχε 5 ή 15 ml Ficoll-Hypaque και υποβλήθηκε σε φυγοκέντρηση με συχνότητα 2800 rpm για 20 λεπτά. Το μεσαίο στρώμα μετά την φυγοκέντρηση που περιέχει μονοκύτταρα αναρωφήθηκε προσεκτικά και ξεπλύθηκε με

διάλυμα Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) και στη συνέχεια καλλιεργήθηκε σε κυτταρικό διάλυμα RPMI 1640 που περιείχε 10% FCS και αντιβιοτικά.

2.5 Απομόνωση μονοκυττάρων από τον εντερικό βλεννογόνο

Η απομόνωση των μονοκυττάρων του εντέρου έγινε ως εξής: Τα χειρουργικά δείγματα του εντέρου ξεπλύθηκαν με διάλυμα HBSS και ο βλεννογόνος απομονώθηκε από τον υποκείμενο εντερικό ιστό. Εν συνεχεία η λωρίδα του βλεννογόνου τοποθετήθηκε σε κινούμενο υδρόλουτρο (37°C, 100 rpm) που περιείχε διάλυμα HBSS χωρίς μαγνήσιο ή ασβέστιο αλλά με 1 mmol/L EDTA, 50 µg/mL γενταμικίνη, 100 U/mL πενικιλίνη, 100 µg/mL στρεπτομικίνη, και 50 µg/mL αμφοτερικίνη B. Το διάλυμα ανανεωνόταν κάθε 30 λεπτά έως ότου δεν περιείχε επιθηλιακά κύτταρα. Στην συνέχεια ο βλεννογόνος διασπάστηκε σε μικρά τεμάχια μεγέθους 1-2 mm που τοποθετήθηκαν σε διάλυμα που περιείχε 0.5 mg/ml κολλαγενάση B (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), 1 mg/ml υαλουρονιδάση (Sigma, ST Louis, MO), και 0.1 mg/ml Dnase I (Sigma) σε κινούμενο υδρόλουτρο (37°C, 100 rpm). Το υπερκείμενο διάλυμα στην συνέχεια τοποθετήθηκε σε νάυλον πλέγμα (Spectrum Laboratory Products, Houston, TX) με πόρους μεγέθους 110-µm και φυγοκεντρήθηκε σε 500g για 5 λεπτά. Τα κύτταρα που απομονώθηκαν με αυτή την τεχνική τοποθετήθηκαν σε διάλυμα 15 ml και στην συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν σε 30g για 5 λεπτά. Τα κύτταρα στο υπερκείμενο διάλυμα μετά την φυγοκέντρηση συλλέχθηκαν προσεκτικά και φυγοκεντρήθηκαν σε 1500 rpm για 5 λεπτά με Ficoll-Hyrague. Το μεσαίο στρώμα μετά την φυγοκέντρηση που περιέχει εντερικά μονοκύτταρα αναρωφήθηκε προσεκτικά και ξεπλύθηκε με διάλυμα HBSS και στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε κυτταρικό διάλυμα RPMI 1640 που περιείχε 10% FCS και αντιβιοτικά.

2.6 Απομόνωση μονοκυττάρων από τους μεσεντερικούς λεμφαδένες

Η απομόνωση των μονοκυττάρων από μεσεντερικούς λεμφαδένες έγινε με μηχανική διάσπαση των λεμφαδένων και εν συνεχεία καλλιέργεια των μονοκυττάρων σε διάλυμα RPMI 1640 που περιείχε 10% FCS.

2.7 Κυτταρομετρία ροής (Flow cytometry)

Τα μονοκύτταρα που απομονώθηκαν από το περιφερικό αίμα, το παχύ ή λεπτό έντερο και τους μεσεντερικούς λεμφαδένες καλλιεργήθηκαν αρχικά σε διάλυμα RPMI 1640 ή χρησιμοποιήθηκαν αμέσως για την χρώση κυτταρικών αντιγόνων συμπεριλαμβανομένου του χημειούποδοχέα CCR9. 2.5 με 5.0×10^5 κύτταρα ξεπλύθηκαν σε διάλυμα PBS, που περιείχε 0.1% BSA (bovine serum albumin) και 0.1% azide (διάλυμα χρώσης). Στην συνέχεια τα κύτταρα τοποθετήθηκαν για 15 λεπτά σε διάλυμα χρώσης που περιείχε 10% ανθρώπινο ορό (human Ab serum), ούτως ώστε να εμποδίσει την μη ειδική χρώση κυτταρικών αντιγόνων. Στην συνέχεια το αντίσωμα 3C3 (anti-CCR9) τοποθετήθηκε στο διάλυμα χρώσης με τα κύτταρα για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C. Στην συνέχεια τα κύτταρα ξεπλύθηκαν ξανά και το δευτερογενές αντίσωμα για την ανίχνευση του CCR9 αντιγόνου τοποθετήθηκε στο διάλυμα χρώσης με τα κύτταρα για άλλα 30 λεπτά. Τα κύτταρα ξεπλύθηκαν ξανά και τοποθετήθηκαν σε διάλυμα χρώσης που περιείχε μυϊκή ανοσοσφαιρίνη γ (mouse IgG) για 15 λεπτά. Αντισώματα συνδεδεμένα με χρωστικές έναντι άλλων κυτταρικών αντιγόνων τοποθετήθηκαν στο διάλυμα χρώσης με τα κύτταρα για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C. Τελικά τα κύτταρα ξεπλύθηκαν ξανά σε διάλυμα χρώσης και στην συνέχεια σταθεροποιήθηκαν με 2% διάλυμα παραφορμαλδεύδης σε PBS (Phosphate Buffer Saline). Στη συνέχεια η χρώση των κυττάρων αναλύθηκε με κυτταρομετρία ροής (FACS, Becton Dickinson, Mountain View, CA) για την έκφραση του χημειούποδοχέα CCR9 και άλλων κυτταρικών αντιγόνων. Το ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν το αντιγόνο ή συνδυασμό αντιγόνων υπό εξέταση καθώς και η κυτταρική πυκνότητα (mean fluorescence intensity, MFI) των αντιγόνων αυτών αναλύθηκαν με το ειδικό πρόγραμμα Lysis II ή Cellquest (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA).

2.8 Εξαγωγή RNA και Αλυσωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης

Ολικό RNA απομονώθηκε από ιστούς ή από απομονωμένα επιθηλιακά κύτταρα ή μονοκύτταρα του λεπτού εντέρου και παχέως εντέρου χρησιμοποιώντας ειδική τεχνική της εταιρίας Qiagen (Valencia, CA). Συνολικά 1 μg του RNA και ολιγονουκλεοτίδια θυμιδίνης (oligo dT) χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή συμπληρωματικού DNA (cDNA) με την μέθοδο της θερμοευαίσθητης RT-PCR της εταιρίας Life Technologies (Grand Island, NY). Δύο μl του cDNA από την παραπάνω αντίδραση αναμίχθηκαν με 10 mM dNTP, 50 mM γλωριούχο μαγνήσιο, 5 μονάδες θερμοανθεκτικής Platinum *Taq* πολυμεράσης του DNA, και 10 μM ζεύγη

εκκινητών για την χημειοκίνη TECK/CCL25 και χρησιμοποιήθηκαν στην συνέχεια για την αλυσωτή αντίδραση της πολυμεράσης.

Τα ζεύγη εκκινητών (primers) που χρησιμοποιήθηκαν για την χημειοκίνη TECK/CCL25 και το γονίδιο G3PDH ήταν τα παρακάτω:

TECK/CCL25

(sense) 5'-TCGAAGAAGCTTATGAACCTGTGGCTCCTG-3'

(antisense) 5'-AAGAAGTCTAGATCACAGTCCTGAATTAGC-3'

G3PDH

(sense) 5'-TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT-3'

(antisense) 5'-CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC-3'

Οι συνθήκες της αντίδρασης της πολυμεράσης ήταν ως εξής: Αρχικά έγινε θερμική αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 2 λεπτά και ακολούθησαν 35 κύκλοι σε 95°C (αποδιάταξη για 30 δευτερόλεπτα), 55°C (υβριδισμός των εκκινητών για 30 δευτερόλεπτα) και 72°C (πολυμερισμός για 1 λεπτό). Τα προϊόντα της αντίδρασης της πολυμεράσης εν συνεχεία αναμίχθηκαν με βρωμιούχο εθίδιο (ethidium bromide) και αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1.5% και φωτογραφήθηκαν.

2.9 Αποτύπωμα Northern

Η ανάλυση του χημειοποδοχέα CCR9 σε επίπεδο RNA έγινε με την τεχνική Αποτύπωμα Northern. Ολικό RNA απομονώθηκε από εντερικά μονοκύτταρα που προήλθαν από φλεγμονώδη ή φυσιολογικό ιστό του λεπτού ή παχέως εντέρου χρησιμοποιώντας την τεχνική RNeasy της εταιρίας Qiagen (Valencia, CA). Δείγματα 5 μg του RNA που απομονώθηκε διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης-φορμαλδεύδης 1% και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νάυλον (Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Στην συνέχεια το RNA ακινητοποιήθηκε στην μεμβράνη με υπεριώδη ακτινοβολία. Προηγουμένως ένα συμπληρωματικό κομμάτι DNA του

χημειούποδοχέα CCR9 υποβλήθηκε σε σήμανση με α -³²P ραδιοσημασμένο dATP και χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης για την ανίχνευση του CCR9 στο δείγμα του RNA μετά από υβριδισμό της μεμβράνης σε 65°C για 2 ώρες. Τελικά η μεμβράνη ξεπλύθηκε με διάλυμα 0.1X SSC, 0.1% SDS στους 65°C και τοποθετήθηκε σε φίλμ για 3 μέρες στους -80°C.

2.10 Ανοσοϊστοχημεία της χημειοκίνης TECK/CCL25 σε εντερικούς ιστούς

Η ανίχνευση της χημειοκίνης TECC/CCL25 σε επίπεδο πρωτεΐνης στο λεπτό ή παχύ έντερο έγινε με ανοσοϊστοχημεία. Ως θετικό δείγμα χρώσης της χημειοκίνης TECC/CCL25 χρησιμοποιήθηκε ιστός από τον θύμο αδένα (Εικόνες 4 και 17). Συνοπτικά μονιμοποιημένος ιστός του εντέρου ή θύμου αδένα μεγέθους 6 μm απο-παραφινοποιήθηκε και επώαστηκε σε κιτρικό διάλυμα οξύτητας (pH) 6. Στην συνέχεια οι κυτταρικοί ιστοί αντέδρασαν με ειδικό αντίσωμα έναντι της χημειοκίνης TECK/CCL25 (κλώνος LS202 5A9, IgG1) ή με μη ειδικό αντίσωμα του ίδιου ισότυπου (IgG1), και στην συνέχεια με δευτερογενές αντίσωμα (goat antimouse Ab, DAKO, Carpinteria, CA) σε πυκνότητα 1:20. Τα ιστοτεμάχια στην συνέχεια επώασθηκαν με PAP (peroxidase anti-peroxidase), (DAKO) σε πυκνότητα 1:100. Εν συνεχεία τα ιστοτεμάχια ξεπλύθηκαν και τα δείγματα επώασθηκαν με την χρωστική ουσία τετραχρωρική 3,3'-διαμινοβενζιδίνη (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) από την εταιρία DAKO. Τελικά τα δείγματα χρώστηκαν επιπλέον με αιματοξυλίνη (Fisher Scientific Co., Tustin, CA) και μελετήθηκαν στο μικροσκόπιο.

2.11 Χημειοτακτικές μελέτες

Η χημειοταξία των λεμφοκυττάρων μελετήθηκε χρησιμοποιώντας ειδική χημειοτακτική συσκευή με 48 θήκες που προμηθεύτηκε από την εταιρία Neuroprobe (Cabin John, MD). Συγκεκριμένα η χημειοκίνη TECK/CCL25 τοποθετήθηκε σε διάλυμα RPMI 1640 που περιείχε HEPES ρυθμιστικό διάλυμα και 1% BSA και τοποθετήθηκε στην χαμηλότερη θήκη της συσκευής. Εν συνεχεία τοποθετήθηκε μεμβράνη πολυκαρβονίτη με οπές διαμέτρου 3-μm και τα κύτταρα (10^5) τοποθετήθηκαν στις ανώτερες θήκες της συσκευής. Η συσκευή τοποθετήθηκε στους 37°C για 120 λεπτά και τα κύτταρα που μετακινήθηκαν μέσω των οπών στις χαμηλότερες θήκες μετρήθηκαν με κυτταρομετρία ροής. Ένας συγκεκριμένος αριθμός φθορίζων μικροσφαιριδίων μεγέθους 3.2 μm (PharMingen) τοποθετήθηκε σε κάθε δείγμα ούτως ώστε να

καθοριστεί με ακρίβεια ο αριθμός των κυττάρων που μετακινήθηκαν σε ανταπόκριση προς την χημειοκίνη.

2.12 Ανάλυση κυτταροκινών με ενδοκυτταρική χρώση

Τα μονοκύτταρα του λεπτού εντέρου χρώστηκαν με αντισώματα έναντι του CD3 και CCR9 και διαχωρίστηκαν με κυτταρομετρία ροή σε CCR9⁺ και CCR9⁻ T λεμφοκύτταρα. Στη συνέχεια τα διαχωρισμένα λεμφοκύτταρα ενεργοποιήθηκαν με PMA και ιονομυκίνη για 4 ώρες στους 37°C. Τις τελευταίες 2 ώρες του πειράματος τοποθετήθηκε στο κυτταρικό διάλυμα Brefeldin A (10 µg/ml) ούτως ώστε να εμποδίσει την έκκριση των κυτταροκινών από τα κύτταρα. Στην συνέχεια τα κύτταρα ξεπλύθηκαν σε διάλυμα PBS/BSA/Azide και σταθεροποιήθηκαν με διάλυμα παραφορμαλδεΰδης 4% και τοποθετήθηκαν σε διάλυμα saponin. Στην συνέχεια τα κύτταρα χρώστηκαν με αντισώματα έναντι της IFN-γ, IL-4, IL-2, ή IL-10 που ήταν συνδεδεμένα με τις χρωστικές FITC και PE. Το ποσοστό των κυττάρων που παράγουν την κάθε κυτταροκίνη αναλύθηκε στην συνέχεια με κυτταρομετρία ροής.

2.13 Ανάλυση κυτταροκινών με την μέθοδο ELISA

Η ανίχνευση παραγωγής κυτταροκινών, συγκεκριμένα IFN-γ και IL-10, από CCR9⁺ T λεμφοκύτταρα έγινε με την μέθοδο ELISA χρησιμοποιώντας ζεύγη αντισωμάτων ειδικών για την IFN-γ και IL-10.

2.14 Πειραματικές μελέτες σε επιθηλιακές κυτταρικές σειρές

Η ανάλυση έκφρασης της χημειοκίνης TECK/CCL25 εξετάστηκε επίσης στις επιθηλιακές κυτταρικές σειρές του εντέρου Caco2, HT-29, και T84. Οι κυτταρικές αυτές σειρές προμηθεύτηκαν από την Dr. M. T. Abreu και προήλθαν αρχικά από την εταιρία ATCC (American Tissue Type Collection). Η κάθε κυτταρική σειρά καλλιεργήθηκε σε κατάλληλο διάλυμα. Διάφορες κυτταροκίνες τοποθετήθηκαν στο διάλυμα για 24 ώρες, και κυτταρικό RNA απομονώθηκε όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Στην συνέχεια η ανάλυση του mRNA της χημειοκίνης TECK/CCL25 εξετάστηκε με την αλυσωτή αντίδραση της πολυμεράσης όπως περιγράφηκε προηγουμένως.

2.15 Μελέτη απόπτωσης των εντερικών T λεμφοκυττάρων

Μονοκύτταρα από φυσιολογικό λεπτό έντερο χρώστηκαν με τα αντισώματα CD3-APC και CCR9-FITC και στην συνέχεια τα CD3⁺CCR9⁺ και CD3⁺CCR9⁻ διαχωρίστηκαν με κυτταρομετρία ροής. Στην συνέχεια ο κάθε κυτταρικός τύπος καλλιεργήθηκε σε διάλυμα RPMI

1640 με IL-2 (10 IU/ml) ή φυτοαιμαγλουτινίνη (PHA, 2 µg/ml) για 24 ώρες και χρώστηκε με annexin V-PE και 7AAD. Τα αποπτωτικά (annexin V-PE+/7AAD-) και νεκρά (annexin V-PE+/7AAD+) κύτταρα αναλύθηκαν σε κάθε κυτταρικό τύπο με κυτταρομετρία ροής.

2.16 Ανάλυση της παραγωγής αντισωμάτων

Για την ανάλυση της παραγωγής αντισωμάτων, Β λεμφοκύτταρα (CD19⁺) του περιφερικού αίματος καλλιεργήθηκαν με διαχωρισμένα CD4⁺CCR9⁺ και CD4⁺CCR9⁻ Τ λεμφοκύτταρα μνημονικού τύπου από τον ίδιο δότη για 11 μέρες σε διάλυμα RPMI 1640 χωρίς ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων. Το κυτταρικό διάλυμα στην συνέχεια αναλύθηκε για το περιεχόμενο τους σε ανοσοσφαιρίνες τύπου IgM, IgG, και IgA με την μέθοδο ELISA χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα. Ως θετικό δείγμα χρησιμοποιήθηκαν Β λεμφοκύτταρα που ενεργοποιήθηκαν με την ουσία Pokweed mitogen (PWM, 5 µg/ml) για το ίδιο χρονικό διάστημα.

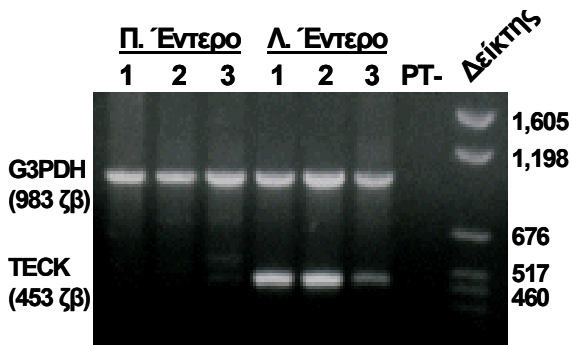
2.17 Στατιστική Ανάλυση των δεδομένων

Διαφορές στην έκφραση των κυτταρικών αντιγόνων μεταξύ των CCR9⁺ και CCR9⁻ Τ λεμφοκυττάρων συγκρίθηκαν με την δοκιμασία paired *t* test. Οι διαφορές στην έκφραση του χημειούποδοχέα CCR9 μεταξύ Τ λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος, λεπτού και παχέως εντέρου αναλύθηκαν με την δοκιμασία Student's *t* test. Κάθε τιμή του $p < 0.05$ θεωρήθηκε ως στατιστικά σημαντική.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η χημειοκίνη TECK/CCL25 παράγεται επιλεκτικά από κύτταρα του λεπτού εντέρου και θύμου αδένα.

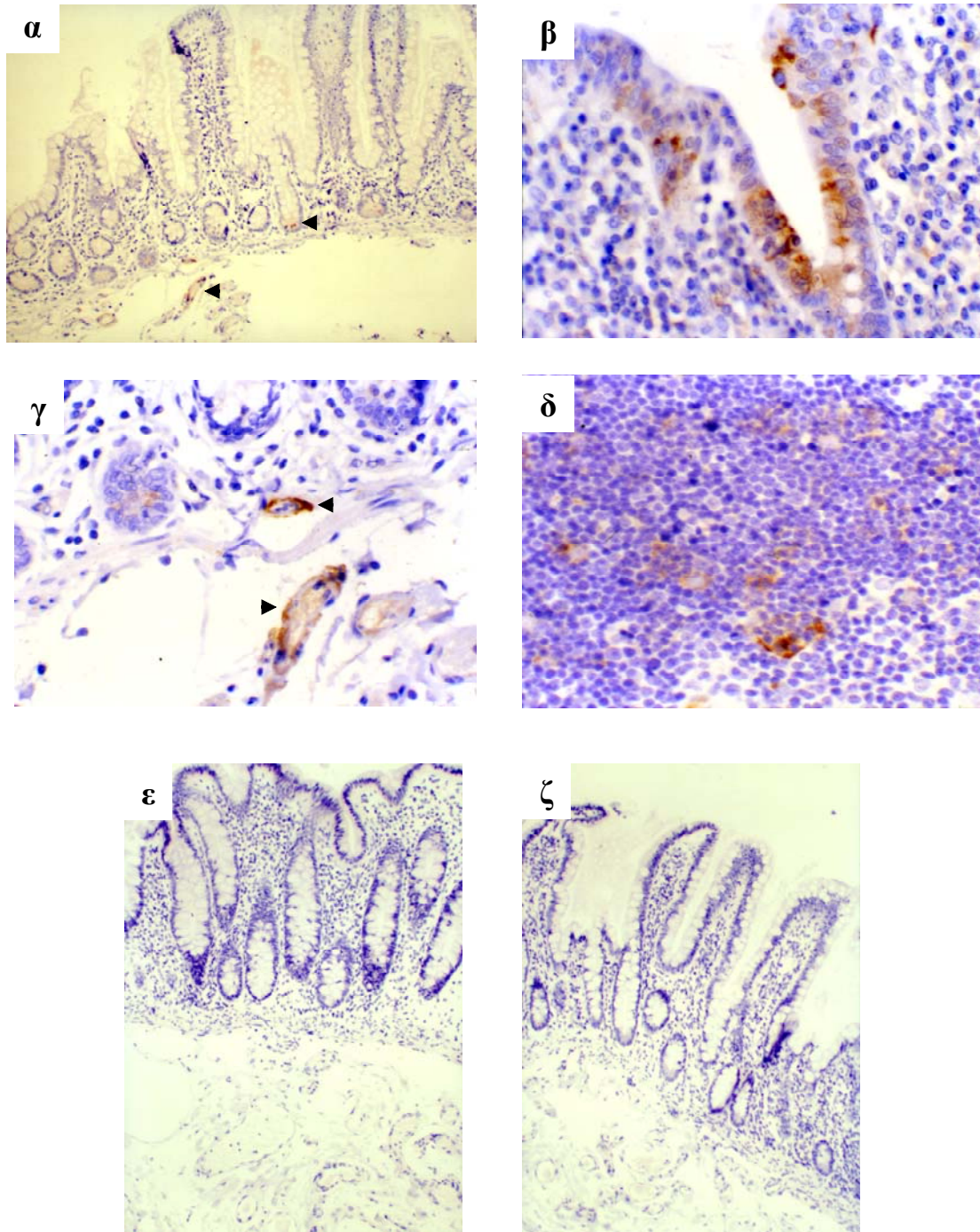
Πρόσφατα δεδομένα έχουν δείξει ότι η χημειοκίνη TECK/CCL25 παράγεται στο λεπτό έντερο και στον θύμο αδένα και συνδέεται ειδικά με τον υποδοχέα CCR9.^{126, 209} Συνεπώς, μελετήσαμε λεπτομερικά την έκφραση της χημειοκίνης TECK/CCL25 στο λεπτό και παχύ έντερο. Η ανάλυση της έκφρασης της χημειοκίνης σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης έγινε με τον συνδυασμό αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης και ανοσοϊστοχημείας.



Εικόνα 3. RT-PCR της χημειοκίνης TECK/CCL25 σε ιστούς και κύτταρα του λεπτού και παχέως εντέρου. RNA απομονώθηκε από ολικό βλεννογόνο (1), επιθηλιακά κύτταρα (2), και μονοκύτταρα (3) του λεπτού και παχέως εντέρου και εν συνεχεία υποβλήθηκε σε RT-PCR με εκκινητές ειδικούς για G3PDH και την χημειοκίνη TECK όπως περιγράφηκε στο τμήμα Υλικό και Μέθοδοι.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 3, το mRNA της χημειοκίνης TECK/CCL25 μπορεί να ανιχνευτεί σε RNA που απομονώθηκε από ολικό ιστό, ή επιθηλιακά κύτταρα και μονοκύτταρα του λεπτού εντέρου. Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης ανέδειξε προϊόν 453 ζευγών βάσεων που αντιστοιχεί στο mRNA της χημειοκίνης TECK/CCL25. Σε αντίθεση TECK/CCL25

mRNA δεν ανιχνεύτηκε σε RNA που απομονώθηκε από ολικό ιστό ή μεμονωμένα επιθηλιακά κύτταρα και μονοκύτταρα του παχέως εντέρου (Εικόνα 3). Εν συνεχεία αναλύσαμε την έκφραση της χημειοκίνης σε επίπεδο πρωτεΐνης στο λεπτό και παχύ έντερο με ανοσοϊστοχημεία. Όπως φαίνεται στην εικόνα 4, ανιχνεύτηκε χρώση έναντι της πρωτεΐνης TECK/CCL25 στο λεπτό έντερο χρησιμοποιώντας ειδικό αντίσωμα που αντιδρά με την πρωτεΐνη. Σε συμφωνία με τα πειραματικά δεδομένα της έκφρασης της TECK/CCL25 σε επίπεδο mRNA δεν παρατηρήθηκε χρώση με το συγκεκριμένο αντίσωμα σε ιστό του παχέως εντέρου. Λεπτομερής ανάλυση της χρώσης του λεπτού εντέρου έδειξε ότι η χημειοκίνη TECK/CCL25 παράγεται από επιθηλιακά κύτταρα των κρυπτών του λεπτού εντέρου, από μερικά μονοκύτταρα του βλεννογόνου και από ενδοθηλιακά κύτταρα (Εικόνα 4). Η χρώση της χημειοκίνης TECK/CCL25 ήταν ειδική, καθώς η χρώση του λεπτού εντέρου με μη ειδικό αντίσωμα ήταν αρνητική.

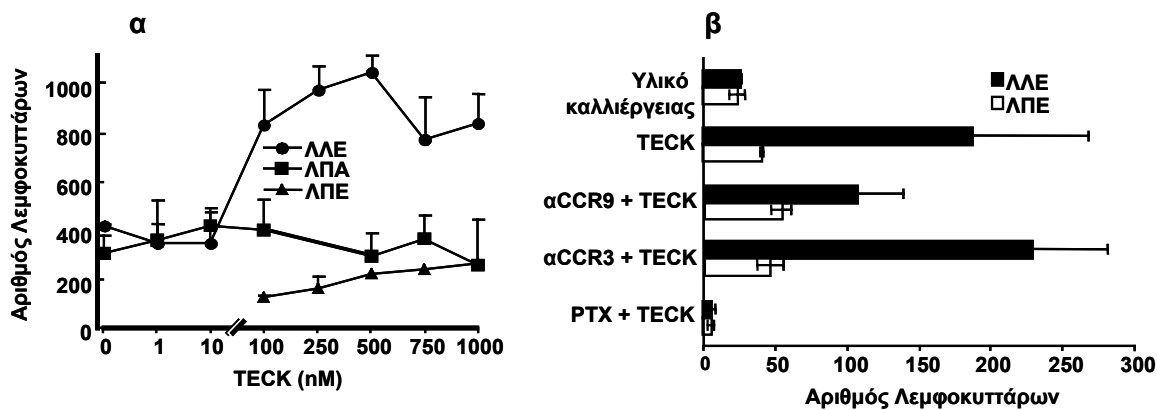


Εικόνα 4. Ανάλυση έκφρασης της χημειοκίνης TECK/CCL25 με ανοσοϊστοχημεία σε φυσιολογικό λεπτό, παχύ έντερο και θύμο αδένα.

(α) Λεπτό έντερο, X 40, (β) Λεπτό έντερο, X 400, (γ) Λεπτό έντερο, X 400, (δ) Θύμος αδένας, X 400 (Θετική χρώση)
 (ε) Παχύ έντερο, X 40, (ζ) Λεπτό έντερο, X 40 (Αρνητική χρώση).

Ανάλυση της χημειοταξίας λεμφοκυττάρων του λεπτού, παχέως εντέρου και περιφερικού αίματος στην χημειοκίνη TECK/CCL25.

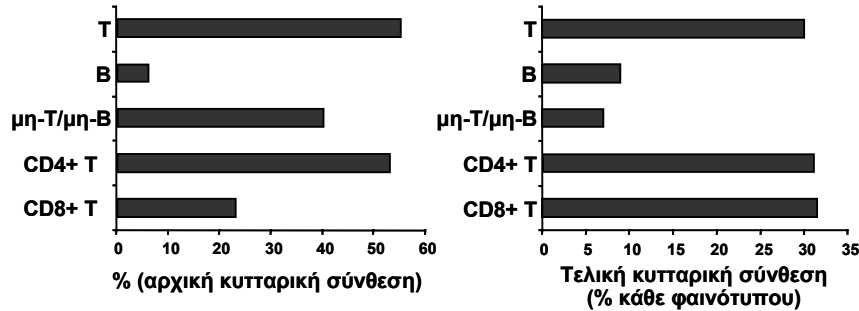
Πρόσφατα δεδομένα έχουν δείξει ότι η χημειοκίνη TECK/CCL25 συνδέεται ειδικά με τον υποδοχέα CCR9 και προκαλεί την κινητοποίηση ενδοκυτταρικού Ca^{2+} και την χημειοταξία των κυττάρων που εκφράζουν τον υποδοχέα CCR9. Συνεπώς, μελετήσαμε την χημειοτακτική επίδραση της TECK/CCL25 σε λεμφοκύτταρα που απομονώθηκαν από το λεπτό έντερο, παχύ έντερο και περιφερικό αίμα, όπως περιγράφηκε στο μέρος *Υλικό και Μέθοδοι*. Όπως φαίνεται στην εικόνα 5, η χημειοκίνη TECK/CCL25 προσελκύει λεμφοκύτταρα του λεπτού αλλά όχι του παχέως εντέρου ή του περιφερικού αίματος.



Εικόνα 5. Η χημειοκίνη TECK/CCL25 προσελκύει λεμφοκύτταρα του λεπτού εντέρου. (α) Λεμφοκύτταρα λεπτού εντέρου (ΛΛΕ), παχέως εντέρου (ΛΠΕ), και περιφερικού αίματος (ΛΠΑ) υποβλήθηκαν σε χημειοταξία προς την χημειοκίνη TECK/CCL25 όπως έχει περιγραφεί. (β) Η προσέλκυση των λεμφοκυττάρων του λεπτού εντέρου προς την χημειοκίνη TECK γίνεται μέσω του υποδοχέα CCR9.

Η αποτελεσματικότερη συγκέντρωση της χημειοκίνης TECK/CCL25 όσον αφορά την χημειοταξία των λεμφοκυττάρων του λεπτού εντέρου (ΛΛΕ) κυμαίνεται μεταξύ 250-500 nM (Εικόνα 5α). Η χημειοτακτική δράση της TECK/CCL25 στα ΛΛΕ επιτελείται αποκλειστικά μέσω του υποδοχέα CCR9, καθώς η προσθήκη του ειδικού αντισώματος 3C3 (anti-CCR9) στα ΛΛΕ, που εμποδίζει την σύνδεση της χημειοκίνης TECK/CCL25 με τον υποδοχέα CCR9, πριν την εκτέλεση του πειράματος ελατώνει σημαντικά ή καταργεί την χημειοταξία των ΛΛΕ προς την TECK/CCL25. Σε αντίθεση, η προσθήκη αντισώματος που αντιδρά με τον υποδοχέα CCR3, δεν έχει καμία επίδραση στην χημειοτακτική δράση της TECK/CCL25 στα ΛΛΕ (Εικόνα 5β). Επίσης η προσθήκη τοξίνης του pertussis (PTX) σε ΛΛΕ για 1 ώρα πριν την ανάλυση της χημειοταξίας έδειξε παντελής αναστολή της χημειοτακτικής δράσης της TECK/CCL25 στα ΛΛΕ, υποδηλώνοντας ότι η χημειοτακτική δράση της επιτελείται μέσω ενεργοποίησης

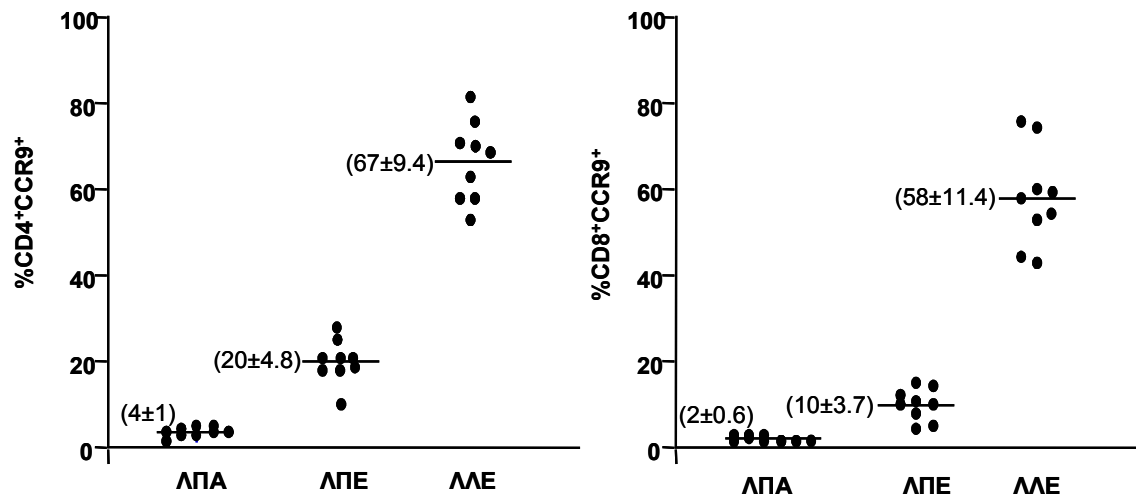
μεταβιβαστικών προτεινών του τύπου Gαί. Στη συνέχεια αναλύσαμε το είδος των ΛΛΕ πού υπόκεινται σε χημειοταξία υπό την επίδραση της TECK/CCL25. Όπως φαίνεται στην εικόνα 6, η TECK/CCL25 προσελκύει αποκλειστικά T λεμφοκύτταρα, τόσο CD4⁺ (βοηθητικά) όσο και CD8⁺ (κυτταροτοξικά) λεμφοκύτταρα, ενώ αδυνατεί να προσελκύσει B λεμφοκύτταρα ή μη-T/μη-B λεμφοκύτταρα.



Εικόνα 6. Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των κυττάρων του λεπτού εντέρου που προσελκύνονται από την χημειοκίνη TECK/CCL25. T=T λεμφοκύτταρα, B=B λεμφοκύτταρα

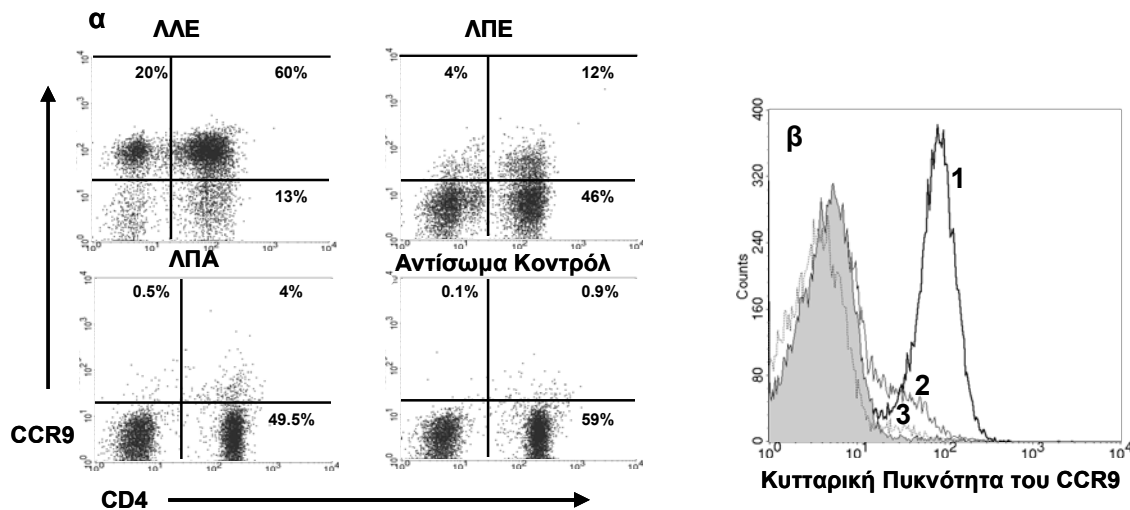
Ανάλυση της έκφρασης του χημειοϋποδοχέα CCR9 σε λεμφοκύτταρα του λεπτού εντέρου, παχέως εντέρου και περιφερικού αίματος.

Καθώς η χημειοκίνη TECK/CCL25 εκφράζεται επιλεκτικά στο λεπτό έντερο και προσελκύει T λεμφοκύτταρα του ΛΕ μέσω του υποδοχέα CCR9, υποθέσαμε ότι η χημειοκίνη TECK/CCL25 συμβάλλει στην επιλεκτική προσέλκυση των T λεμφοκυττάρων πού εκφράζουν τον υποδοχέα CCR9 στο ΛΕ. Συνεπώς αναλύσαμε την έκφραση του υποδοχέα CCR9 σε λεμφοκύτταρα του ΛΕ, ΠΕ, και ΠΑ με κυτταρομετρία ροής.



Εικόνα 7. Ανάλυση της έκφρασης του χημειοϋποδοχέα CCR9 σε T λεμφοκύτταρα του λεπτού εντέρου (ΛΜΕ), παχέως εντέρου (ΛΠΕ), και περιφερικού αίματος (ΛΠΑ). Ο χημειοϋποδοχέας εκφράζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στα ΛΜΕ από ότι στα ΛΠΑ ή ΛΠΑ τόσο στα βοηθητικά (CD4⁺) όσο και στα κυτταροτοξικά (CD8⁺) T λεμφοκύτταρα.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 7 και 8, τα CCR9⁺ T λεμφοκύτταρα εντοπίζονται σε μεγαλύτερο ποσοστό στο λεπτό από ότι στο παχύ έντερο, τόσο μεταξύ των CD4⁺ (βοηθητικών) όσο και μεταξύ των CD8⁺ (κυτταροτοξικών) λεμφοκυττάρων. Σε αντίθεση, ένα πολύ μικρό ποσοστό των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος εκφράζουν τον υποδοχέα CCR9. Το ποσοστό των CCR9⁺ λεμφοκυττάρων στο λεπτό έντερο κυμαίνεται μεταξύ 57.6% και 76.4% των συνολικών CD4⁺ T λεμφοκυττάρων σε σχέση με 15.2% και 24.8% των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων που απομονώθηκαν από το παχύ έντερο. Σε αντίθεση μόνο ένα 3% με 5% των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος εκφράζουν τον υποδοχέα CCR9. Παρόμοιες διαφορές στην έκφραση του υποδοχέα CCR9 διαπιστώθηκαν και στα CD8⁺ (κυτταροτοξικά) λεμφοκύτταρα μεταξύ λεπτού, παχέως εντέρου και περιφερικού αίματος (Εικόνα 7).



Εικόνα 8
 (α) Χαρακτηριστικό παράδειγμα κυτταρομετρίας ροής σε λεμφοκύτταρα του λεπτού (ΛΛΕ), παχέως εντέρου (ΛΠΕ), και περιφερικού αίματος (ΛΠΑ). (β) Κυτταρική πυκνότητα του υποδοχέα CCR9 σε λεμφοκύτταρα λεπτού εντέρου (1), παχέως εντέρου (2), και περιφερικού αίματος (3). Η σκιασμένη περιοχή αντιπροσωπεύει χρώση με μη ειδικό αντίσωμα για σύγκριση.

Συγκεκριμένα, το ποσοστό των CD4⁺ λεμφοκυττάρων που εκφράζουν τον υποδοχέα CCR9 ήταν 58 ± 11.4 % σε ΛΛΕ, 10 ± 3.7% σε ΛΠΕ, και μόνο 2 ± 0.6% σε ΛΠΑ (Εικόνα 7). Όχι μόνο το ποσοστό των T λεμφοκυττάρων που εκφράζουν τον υποδοχέα CCR9 είναι αυξημένο στο λεπτό έντερο, αλλά και η κυτταρική πυκνότητα του υποδοχέα σε αυτά τα κύτταρα είναι αυξημένη όπως φαίνεται στην Εικόνα 8β και στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2. Κυτταρική πυκνότητα του χημειούποδοχέα CCR9 σε διάφορους τύπους T λεμφοκυττάρων.

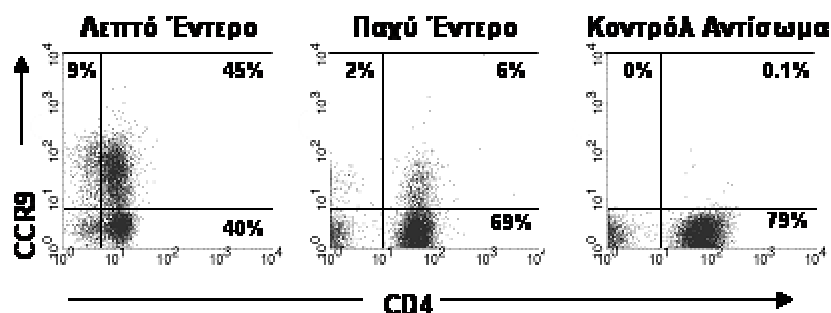
Τύπος Λεμφοκυττάρων	CD3 ⁺ CD4 ⁺ Μέση τιμή (εύρος)*	CD3 ⁺ CD8 ⁺ Μέση τιμή (εύρος) **
ΛΛΕ (αρ.δειγμάτων=9)	81 (45-133)	76,3 (44-127)
ΛΠΕ (αρ.δειγμάτων=9)	37 (24-60)	33 (19-54)
ΛΠΑ (αρ.δειγμάτων=9)	32 (20-42)	23,4 (15-30)

ΛΛΕ=Λεμφοκύτταρα λεπτού εντέρου, ΛΠΕ=Λεμφοκύτταρα παχέως εντέρου, ΛΠΑ=Λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος.

* ΛΛΕ έναντι ΛΠΕ, p=0.01; ΛΛΕ έναντι ΛΠΑ, p<0.002; ΛΠΕ έναντι ΛΠΑ, p=0.2

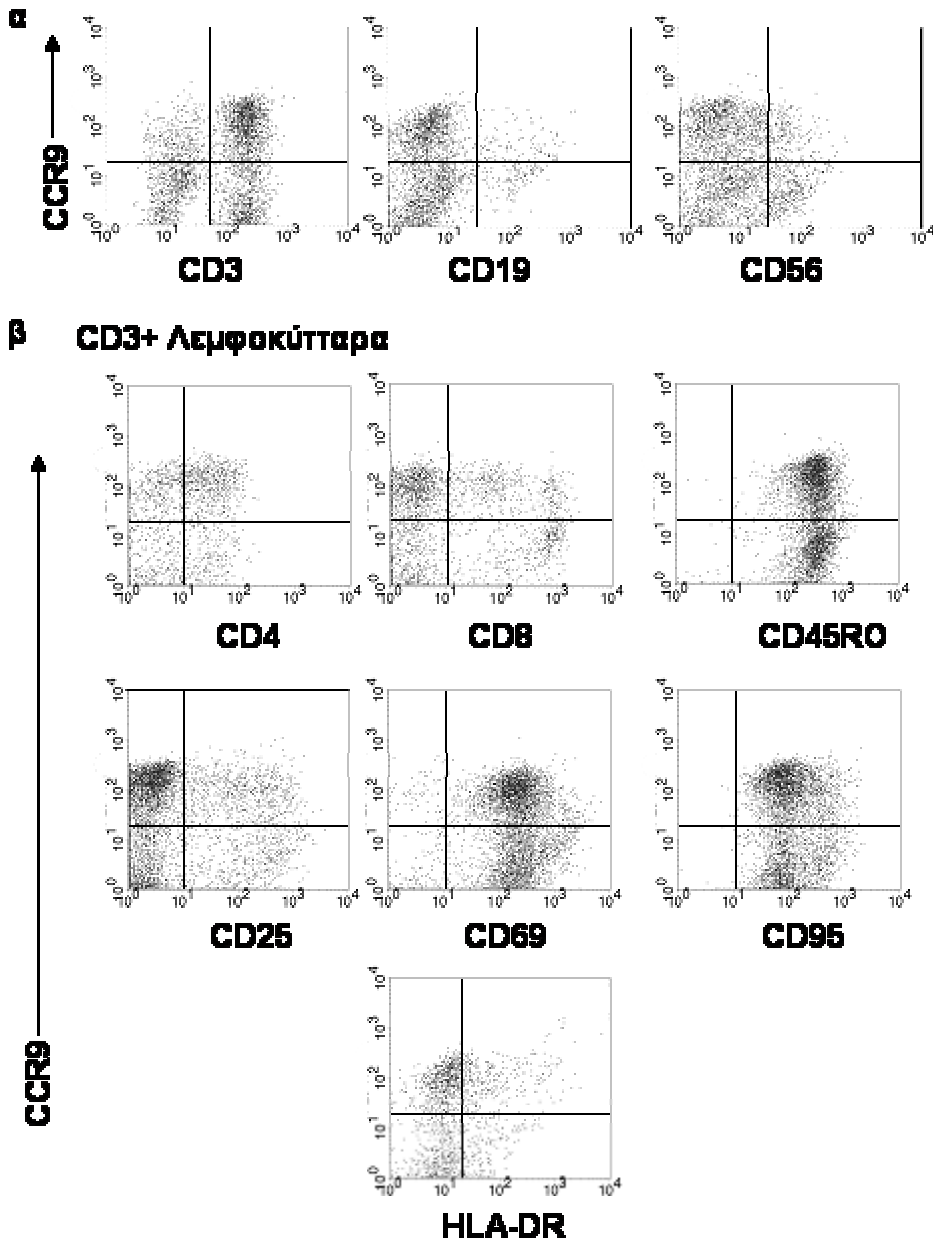
** ΛΛΕ έναντι ΛΠΕ, p<0.0001; ΛΛΕ έναντι ΛΠΑ, p<0.0001; ΛΠΕ έναντι ΛΠΑ, p=0.03

Επίσης το ποσοστό των CCR9⁺ T λεμφοκυττάρων βρέθηκε αυξημένο και στους μεσεντερικούς λεμφαδένες του λεπτού εντέρου σε σχέση με αυτούς του παχέως εντέρου (Εικόνα 9).



Εικόνα 9. Ανάλυση της έκφρασης του χημειούποδοχέα CCR9 σε T λεμφοκύτταρα από μεσεντερικούς λεμφαδένες λεπτού και παχέως εντέρου.

Περαιτέρω χαρακτηρισμός του φαινότυπου των ΛΛΕ έδειξε ότι ο υποδοχέας CCR9 εκφράζεται κυρίως σε T λεμφοκύτταρα αλλά και σε κάποιο ποσοστό B λεμφοκυττάρων και φονικών (NK) λεμφοκυττάρων (Εικόνα 10). Επίσης ο φαινότυπος των CCR9⁺ T λεμφοκυττάρων του λεπτού εντέρου έδειξε ότι τα λεμφοκύτταρα αυτά εκφράζουν τα αντιγόνα ενεργοποίησης CD69, CD95 και είναι κυρίως λεμφοκύτταρα μνημονικού τύπου. Επίσης ένα ποσοστό των κυττάρων αυτών εκφράζουν τα αντιγόνα CD25 και HLA-DR (Εικόνα 10).



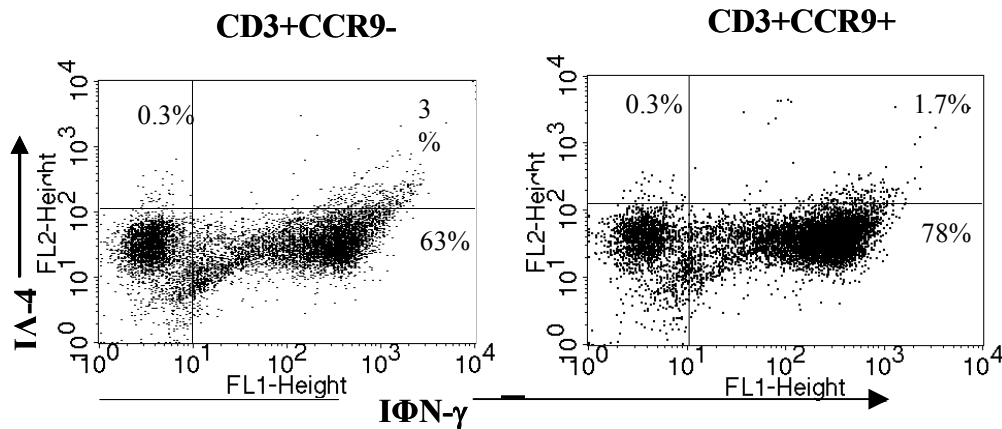
Εικόνα 10. Φαινοτυπική ανάλυση των μονοκυττάρων (α) και των CD3⁺ Τ λεμφοκυττάρων (β) του λεπτού εντέρου.

Τα δεδομένα αυτά δηλώνουν ότι τα λεμφοκύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα CCR9 εντοπίζονται επιλεκτικά στο λεπτό έντερο. Η έκφραση της χημειοκίνης TECK/CCL25 στο λεπτό έντερο, της χημειοτακτικής δράσης της σε ΛΛΕ και ο εντοπισμός των CCR9⁺ Τ λεμφοκυττάρων στο ΛΕ, υποδεικνύουν ότι η χημειοκίνη TECK/CCL25 και ο υποδοχέας CCR9, συμβάλλουν στην τοπική οργάνωση του ανοσολογικού συστήματος του λεπτού εντέρου και συνεπώς μπορεί

να διαχωρίσουν τις ανοσολογικές αντιδράσεις του λεπτού και παχέως εντέρου όσον αφορά τα Τ λεμφοκύτταρα.

Ανάλυση των κυτταροκινών που παράγονται από CCR9⁺ και CCR9⁻ Τ λεμφοκύτταρα του Λεπτού Εντέρου.

Καθώς διάφοροι χημειούποδοχείς εκφράζονται σε βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα τύπου 1 (CCR5, CXCR3) ή τύπου 2 (CCR3, CCR4, CCR8), αναλύσαμε την παραγωγή κυτταροκινών τύπου 1 (IFN- γ) και τύπου 2 (IL-4) σε λεμφοκύτταρα του ΛΕ που εκφράζουν τον χημειούποδοχέα CCR9 προκειμένου να κατανοήσουμε αν η έκφραση του υποδοχέα αυτού καθορίζει συγκεκριμένους τύπους Τ λεμφοκυττάρων. Τα λεμφοκύτταρα που απομονώθηκαν από το ΛΕ διαχωρίστηκαν με βάση την έκφραση του χημειούποδοχέα CCR9 σε CD3⁺CCR9⁺ και CD3⁺CCR9⁻ με κυτταρομετρία ροής. Ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων έγινε όπως περιγράφηκε στο τμήμα *Υλικό και Μέθοδοι* και εν συνεχεία χρώστηκαν για την ανάλυση της ενδοκυτταρικής έκφρασης της IFN- γ και της IL-4.

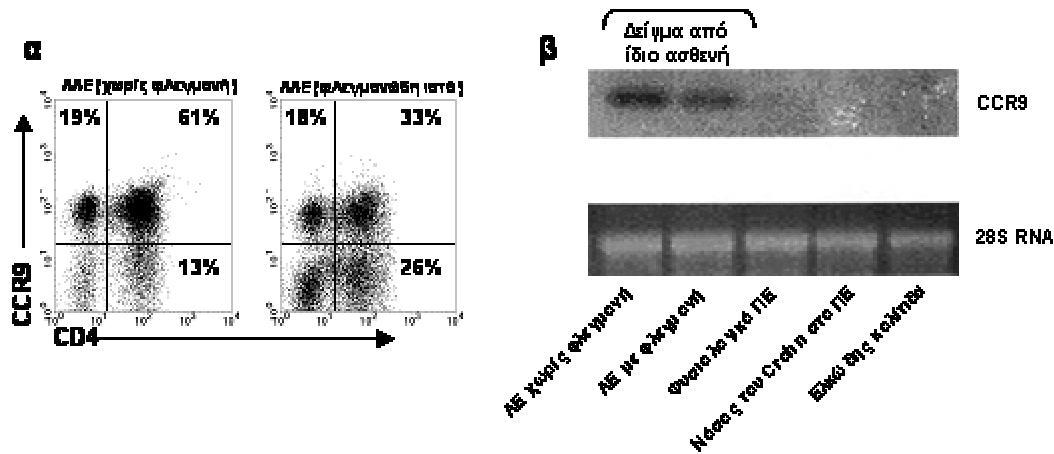


Εικόνα 11. Παραγωγή κυτταροκινών τύπου 1 (IFN- γ) και τύπου 2 (IL-4) από CCR9⁺ και CCR9⁻ Τ λεμφοκύτταρα του λεπτού εντέρου.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 11, τόσο τα CCR9⁺ όσο και τα CCR9⁻ Τ λεμφοκύτταρα του ΛΕ παράγουν IFN- γ , ενώ ένα πολύ μικρό ποσοστό παράγουν IL-4. Τα δεδομένα, όσον αφορά την παραγωγή τύπου 1 και τύπου 2 κυτταροκινών από τα CCR9⁺ και CCR9⁻ Τ λεμφοκύτταρα του ΛΕ, δείχνουν ότι η έκφραση του χημειούποδοχέα CCR9 δεν σχετίζεται με την παραγωγή κυτταροκινών τύπου 1 ή τύπου 2, αλλά συγκεκριμένα με την ικανότητα αυτών των κυττάρων να εντοπίζονται επιλεκτικά στο ΛΕ.

Ανάλυση της έκφρασης του χημειούποδοχέα CCR9 σε λεμφοκύτταρα φυσιολογικού και φλεγμονώδη ιστού του λεπτού εντέρου.

Η νόσος του Crohn είναι μία χρόνια, υποτροπιάζουσα, φλεγμονώδη εντεροπάθεια που μπορεί να προσβάλλει κάθε τμήμα του γαστροεντερικού σωλήνα, αλλά κυρίως εντοπίζεται στον ιλεό και στο παχύ έντερο. Σε συγκεκριμένες περιπτώσεις η νόσος προσβάλλει μόνο το ΛΕ ή το ΠΕ. Καθώς η χημειοκίνη TECK/CCL25 και ο υποδοχέας της CCR9 συμβάλλουν στις ανοσολογικές αντιδράσεις του ΛΕ, υποθέσαμε ότι πιθανότατα να συμβάλλουν και στις φλεγμονώδεις αντιδράσεις στην νόσο του Crohn στο ΛΕ. Αρχικά αναλύσαμε την έκφραση του χημειούποδοχέα CCR9 στα λεμφοκύτταρα που απομονώθηκαν από το ΛΕ σε ασθενείς με εντοπισμένη νόσο του Crohn στο ΛΕ. Προκειμένου να αποφύγουμε διακυμάνσεις στην έκφραση του υποδοχέα CCR9 μεταξύ διαφορετικών δοτών (βλέπε εικόνα 7), αναλύσαμε την έκφραση του υποδοχέα σε χειρουργικά δείγματα που απομονώθηκαν από φλεγμονώδεις και φυσιολογικούς ιστούς από τον ίδιο δότη. Το ποσοστό των T λεμφοκυττάρων, τόσο των CD4⁺ όσο και των CD4⁻ (πιθανότατα CD8⁺), που εκφράζουν τον υποδοχέα CCR9 είναι μικρότερο σε φλεγμονώδη από ότι σε φυσιολογικό ιστό του ΛΕ (Εικόνα 12α). Παρόμοια αποτελέσματα, όσον αφορά την έκφραση του υποδοχέα CCR9, βρέθηκαν όταν αναλύσαμε το mRNA του CCR9 από φλεγμονώδη ιστό του ΛΕ (Εικόνα 12β). Όπως φαίνεται στην εικόνα 12β, το CCR9 mRNA δεν εκφράζεται στο φυσιολογικό ΠΕ, ούτε στο ΠΕ των ασθενών με νόσο του Crohn ή ελκώδη κολίτιδα.

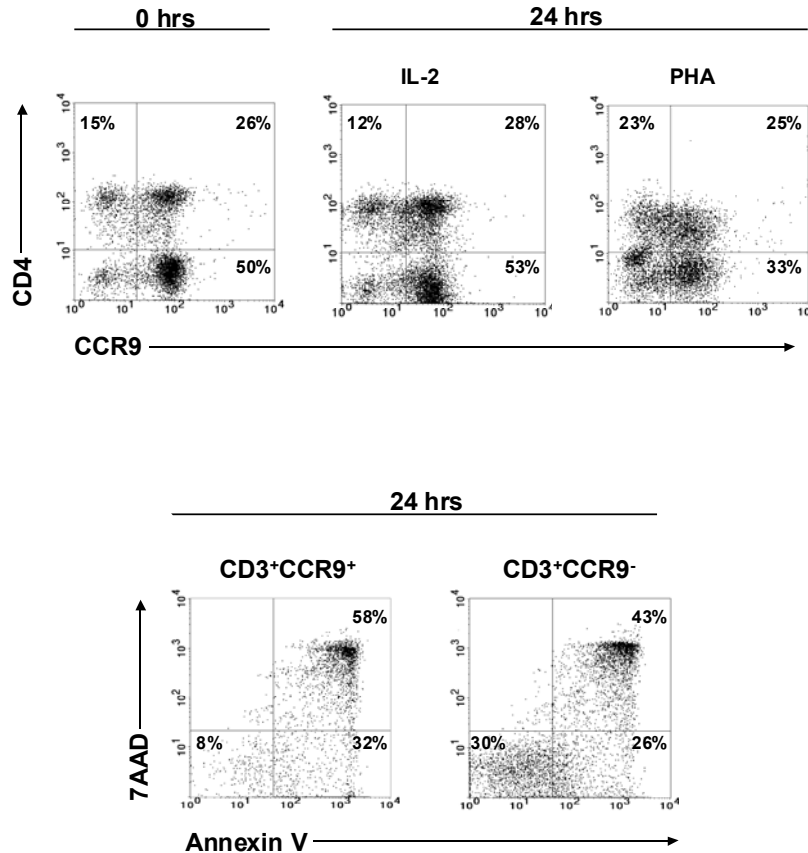


Εικόνα 12. Ανάλυση της έκφρασης του υποδοχέα CCR9 σε επίπεδο πρωτεΐνης (α) και mRNA (β). Η ανάλυση έκφρασης του υποδοχέα έγινε με κυτταρομετρία ροής (α) ή με αποτύπωμα Northern (β) σε εντερικούς ιστούς με φλεγμονώδεις αλλοιώσεις ή χωρίς φλεγμονή. ΛΕ= Λεμφοκύτταρα Λεπτού Εντέρου, ΛΕ= Λεπτό Έντερο, ΠΕ= Παχύ Έντερο.

Τα δεδομένα αυτά δηλώνουν ότι οι αλλαγές στην έκφραση του χημειούποδοχέα CCR9 τόσο σε επίπεδο πρωτεΐνης όσο και σε επίπεδο mRNA είναι ειδικά για την νόσο του Crohn στο ΛΕ.

Προκειμένου να κατανοήσουμε περισσότερο τον μηχανισμό ή τους μηχανισμούς που συμβάλλουν στην αλλαγή της έκφρασης του CCR9 στους φλεγμονώδεις ιστούς του ΛΕ, αναλύσαμε πειρατικά την ρύθμιση της έκφρασης του CCR9 σε T λεμφοκύτταρα που απομονώθηκαν από φυσιολογικό ΛΕ. Συγκεκριμένα υποθέσαμε ότι ενεργοποίηση των CCR9⁺ T λεμφοκυττάρων *in vivo*, συμβάλλει στις παρατηρούμενες αλλαγές στην έκφραση του υποδοχέα κατά την διάρκεια της φλεγμονής. Η καλλιέργεια των λεμφοκυττάρων του ΛΕ σε υλικό καλλιέργειας μόνο ή σε ιντερλευκίνη-2 για 24 ώρες δεν άλλαξε σημαντικά την έκφραση του CCR9. Σε αντίθεση, η ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων με φυτοαιμαγλουτινίνη (PHA) για 24 ώρες ελάττωσε σημαντικά την έκφραση του υποδοχέα (Εικόνα 13).

Παράλληλα αναλύσαμε την πιθανότητα ότι τα T λεμφοκύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα CCR9 υπόκεινται σε απόπτωση μετά από την ενεργοποίησή τους *in vitro*. Όπως φαίνεται στην εικόνα 13, η ενεργοποίηση των CCR9⁺ T λεμφοκυττάρων του ΛΕ με φυτοαιμαγλουτινίνη (PHA) για 24 ώρες, οδηγεί σε απόπτωση περισσότερων CCR9⁺ από ότι CCR9⁻ T λεμφοκυττάρων. Στο συγκεκριμένο πείραμα έως και 90% των CCR9⁺ T λεμφοκυττάρων του ΛΕ είναι νεκρά (annexin V⁺/7AAD⁺) ή υπόκεινται σε απόπτωση (annexin V⁺/7AAD⁻) σε σχέση με 69% των CCR9⁻ T λεμφοκυττάρων, 24 ώρες μετά από ενεργοποίησή τους με φυτοαιμαγλουτινίνη (Εικόνα 13). Τα δεδομένα αυτά συμβάλλουν στην κατανόηση της αλλαγής έκφρασης του CCR9 σε T λεμφοκύτταρα που απομονώθηκαν από φλεγμονώδη εντερικό ιστό στην νόσο του Crohn.

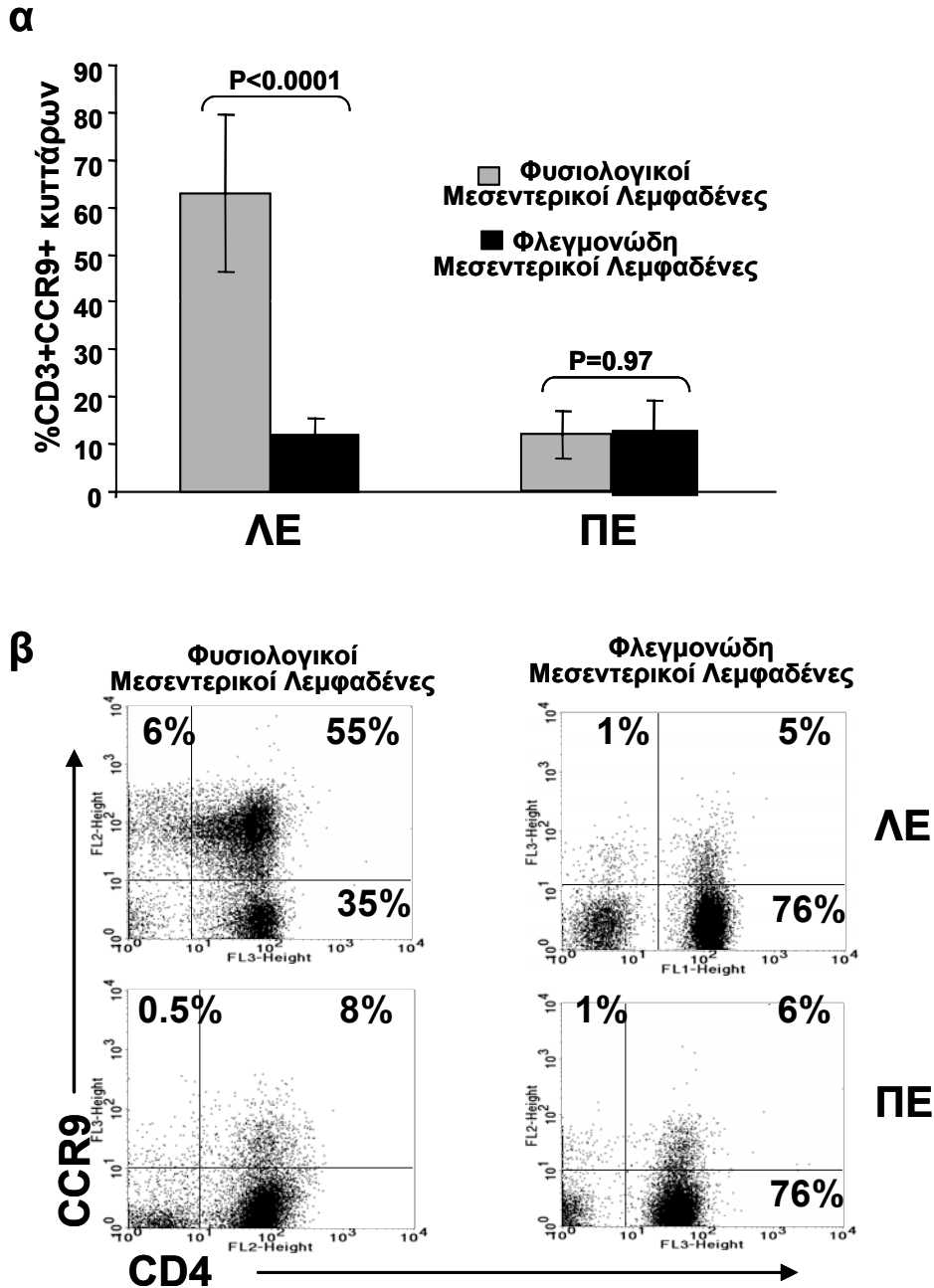


Εικόνα 13. Ανάλυση της έκφρασης του υποδοχέα CCR9 και της απόπτωσης των CCR9⁺ έναντι των CCR9⁻ T λεμφοκυττάρων του Λεπτού Εντέρου μετά από επώαση τους με IL-2 ή φυτοαιμαγλουτινίνη (PHA) για 24 ώρες.

Ανάλυση της έκφρασης του χημειούποδοχέα CCR9 σε λεμφοκύτταρα από φυσιολογικούς και φλεγμονώδεις μεσεντερικούς λεμφαδένες του λεπτού και παχέως εντέρου.

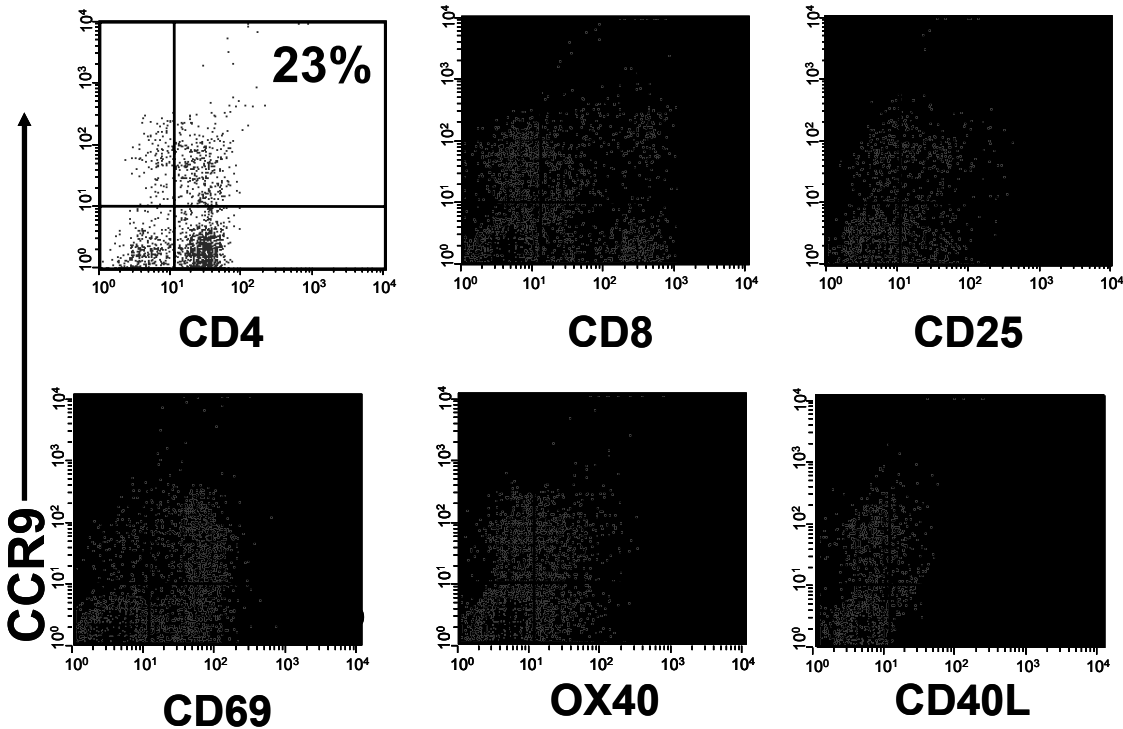
Καθώς η αρχική ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων στο έντερο θεωρείται ότι λαμβάνει χώρα στους μεσεντερικούς λεμφαδένες και στις πλάκες του Peyer, αναλύσαμε την έκφραση του υποδοχέα CCR9 σε φυσιολογικούς και φλεγμονώδεις μεσεντερικούς λεμφαδένες του λεπτού και παχέως εντέρου. Όπως φαίνεται στην εικόνα 14, τα CCR9⁺ T λεμφοκύτταρα εμπλουτίζονται στους μεσεντερικούς λεμφαδένες του ΛΕ, ενώ ένα μικρό ποσοστό των T λεμφοκυττάρων στους λεμφαδένες του ΠΕ εκφράζουν CCR9. Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι η ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων στους μεσεντερικούς λεμφαδένες του ΛΕ, αλλά όχι του ΠΕ, προκαλεί την έκφραση του χημειούποδοχέα CCR9. Στην συνέχεια αναλύσαμε την έκφραση του CCR9 σε T λεμφοκύτταρα που απομονώθηκαν από φλεγμονώδεις μεσεντερικούς λεμφαδένες του ΛΕ ή ΠΕ

σε ασθενείς με νόσο του Crohn. Σε μερικούς δότες βρέθηκε χαμηλή έκφραση του CCR9 σε T λεμφοκύτταρα που απομονώθηκαν από φλεγμονώδεις μεσεντερικούς λεμφαδένες του ΛΕ, ενώ η έκφραση του CCR9 ήταν παρόμοια σε T λεμφοκύτταρα που απομονώθηκαν από φυσιολογικούς ή φλεγμονώδεις λεμφαδένες του παχέως εντέρου (Εικόνα 14).



Εικόνα 14. Έκφραση του υποδοχέα CCR9 σε μεσεντερικούς λεμφαδένες του λεπτού εντέρου (ΛΕ) και παχέως εντέρου (ΠΕ).

Προκειμένου να κατανοήσουμε περισσότερο τις αλλαγές έκφρασης του χημειούποδοχέα CCR9 στους μεσεντερικούς λεμφαδένες του ΛΕ κατά την διάρκεια της φλεγμονής, αναλύσαμε τον φαινότυπο των CCR9⁺ T λεμφοκυττάρων με κυτταρομετρία ροής. Όπως φαίνεται στην εικόνα 15, τα CCR9⁺ T λεμφοκύτταρα από φλεγμονώδεις μεσεντερικούς λεμφαδένες του ΛΕ έχουν χαρακτηριστικά ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων, καθώς εκφράζουν δείκτες ενεργοποίησης όπως CD25, CD69 και δείκτες συνενεργοποίησης όπως CD40L, και OX-40.



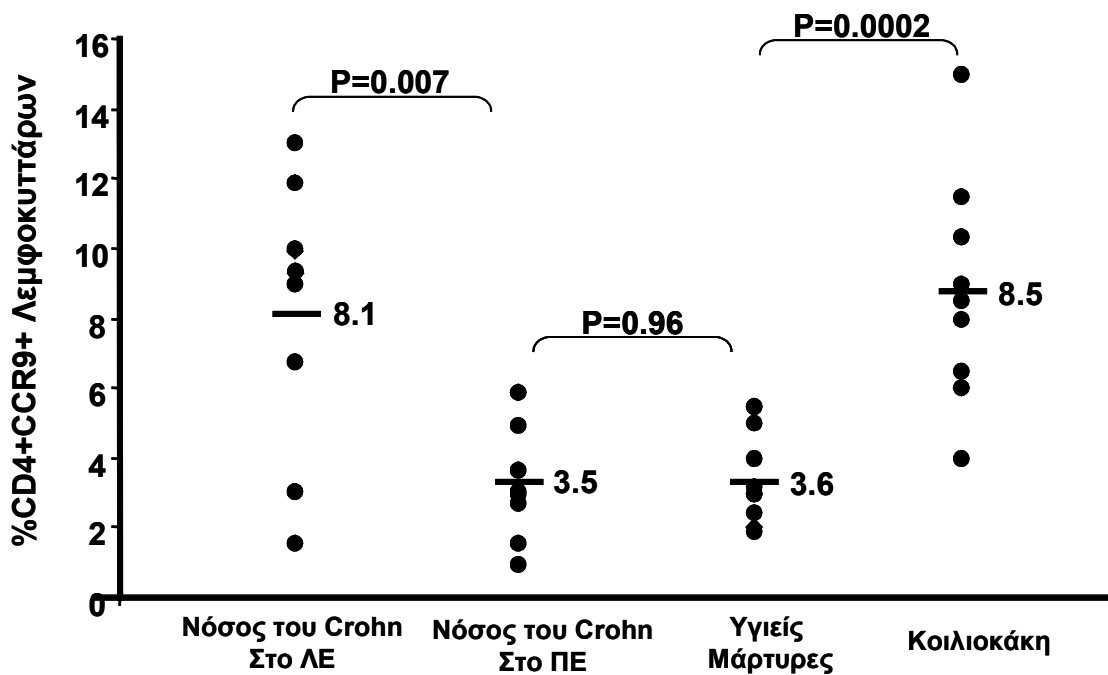
Εικόνα 15. Ανάλυση του κυτταρικού φαινότυπου των CCR9⁺ T λεμφοκυττάρων από μεσεντερικούς λεμφαδένες στην νόσο του Crohn.

Τα δεδομένα αυτά δεικνύουν ότι ο χημειούποδοχέας CCR9 εκφράζεται επιλεκτικά κατά την ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων στους μεσεντερικούς λεμφαδένες του ΛΕ. Πρόσφατες μελέτες σε ποντίκια έδειξαν ότι η ενεργοποίηση των CD8⁺ T λεμφοκυττάρων από δενδριτικά κύτταρα των μεσεντερικών λεμφαδένων ή των πλακών του Peyer οδηγεί στην έκφραση του CCR9 η οποία αυξάνεται περαιτέρω με την παρουσία βακτηριδιακών παραγόντων.^{249, 250} Το χαμηλό ποσοστό των T λεμφοκυττάρων που εκφράζουν CCR9 σε μερικούς ασθενείς με νόσο του Crohn, υποδηλώνει ότι τα ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα

CCR9 κινητοποιούνται από τους μεσεντερικούς λεμφαδένες και μέσω του θωρακικού πόρου και του περιφερικού αίματος συγκεντρώνονται επιλεκτικά στο βλεννογόνο του ΛΕ.

Ανάλυση της έκφρασης του χημειούποδοχέα CCR9 σε λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος σε ασθενείς με νόσο του Crohn στο ΛΕ, ΠΕ και φυσιολογικούς δότες.

Η πιθανή κινητοποίηση των CCR9⁺ T λεμφοκυττάρων από τους μεσεντερικούς λεμφαδένες κατά την διάρκεια της φλεγμονώδους αντίδρασης στην νόσο του Crohn στο ΛΕ, πιθανότατα να μπορεί να ανιχνευτεί στο ΠΑ των ασθενών. Συνεπώς αναλύσαμε την έκφραση του CCR9 σε T λεμφοκύτταρα του ΠΑ από ασθενείς με νόσο του Crohn στο ΛΕ και την συγκρίναμε με την έκφραση του υποδοχέα σε T λεμφοκύτταρα από ασθενείς που έχουν περιορισμένη νόσο του Crohn στο ΠΕ.



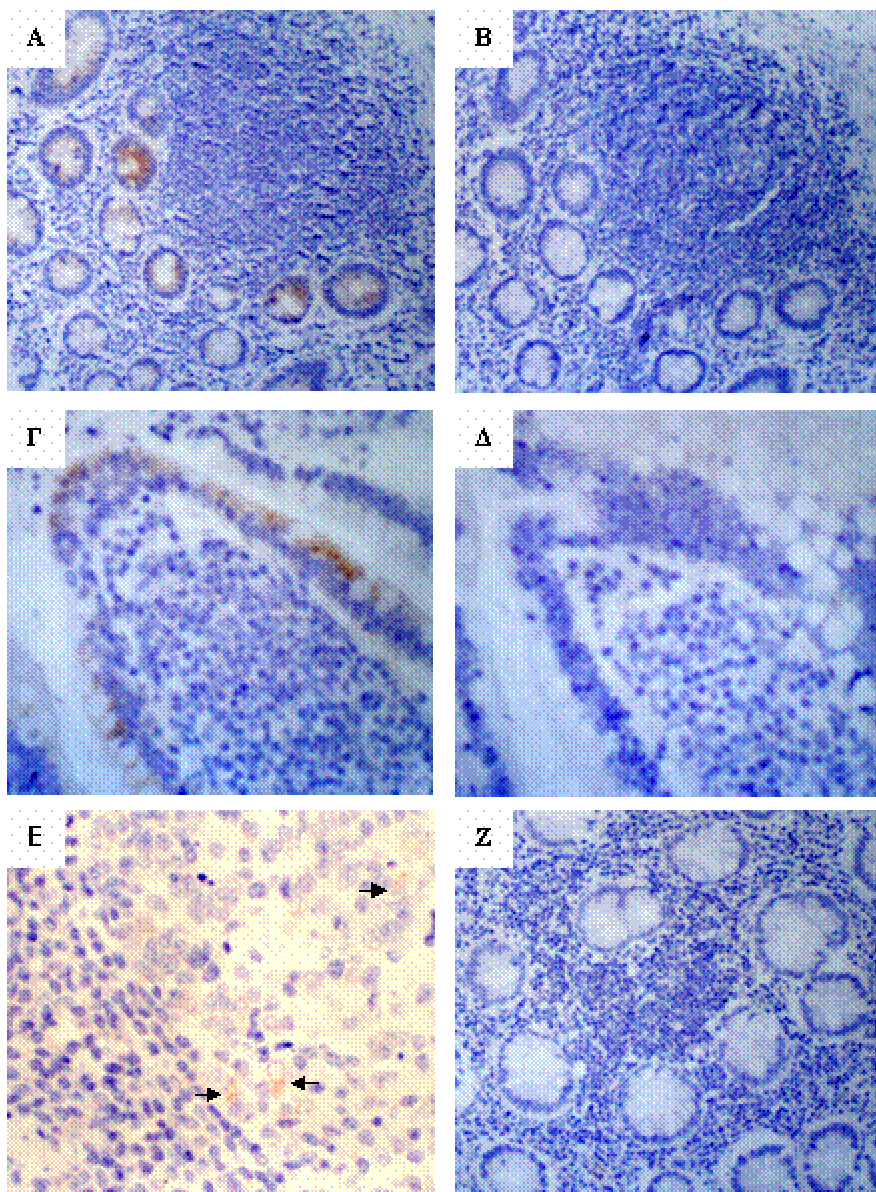
Εικόνα 16. Ανάλυση της έκφρασης του υποδοχέα CCR9 σε βοηθητικά CD4⁺ T λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος ασθενών με νόσο του Crohn, κοιλιοκάκη και υγιείς μάρτυρες. ΛΕ=Λεπτό Έντερο, ΠΕ=Παχύ Έντερο

Όπως φαίνεται στην εικόνα 16, το ποσοστό των CCR9⁺CD4⁺ T λεμφοκυττάρων βρέθηκε αυξημένο σε ασθενείς με νόσο του Crohn στο ΛΕ. Το ποσοστό αυτό κυμαίνεται μεταξύ 1.6%

και 13% (μέση τιμή, 8.1%). Σε αντίθεση το ποσοστό των CCR9⁺CD4⁺ T λεμφοκυττάρων σε ασθενείς με περιορισμένη νόσο του Crohn στο ΠΕ (1% -6%, μέση τιμή 3.5%) είναι παρόμοιο με το ποσοστό σε φυσιολογικούς δότες (2%-5.5%, μέση τιμή, 3.6%). Προκειμένου να κατανοήσουμε αν η αυξημένη συχνότητα των CCR9⁺CD4⁺ T λεμφοκυττάρων σε ασθενείς με περιορισμένη νόσο του Crohn στο ΛΕ, είναι ειδική για αυτή την νόσο ή αν παρατηρείται σε άλλες εντεροπάθειες, αναλύσαμε την έκφραση του CCR9 σε T λεμφοκύτταρα του ΠΑ από ασθενείς με κοιλιοκάκη, μια άλλη φλεγμονώδη εντεροπάθεια που εντοπίζεται αποκλειστικά στο ΛΕ. Το ποσοστό των CCR9⁺CD4⁺ T λεμφοκυττάρων βρέθηκε αυξημένο στο ΠΑ των ασθενών με κοιλιοκάκη (διακύμανση, 4% με 15%, μέση τιμή 8.5%) (Εικόνα 16). Συνεπώς, η αυξημένη συχνότητα των CCR9⁺CD4⁺ T λεμφοκυττάρων στο ΠΑ είναι χαρακτηριστικό των φλεγμονωδών εντεροπαθειών του ΛΕ.

Η έκφραση της χημειοκίνης TECK/CCL25 αυξάνεται επιλεκτικά στους φλεγμονώδεις ιστούς του ΛΕ.

Καθώς η χημειοκίνη TECK/CCL25 παράγεται επιλεκτικά στο ΛΕ, μελετήσαμε την έκφραση της κατά την διάρκεια της φλεγμονής του ΛΕ και ΠΕ σε ασθενείς με νόσο του Crohn (Εικόνα 17).

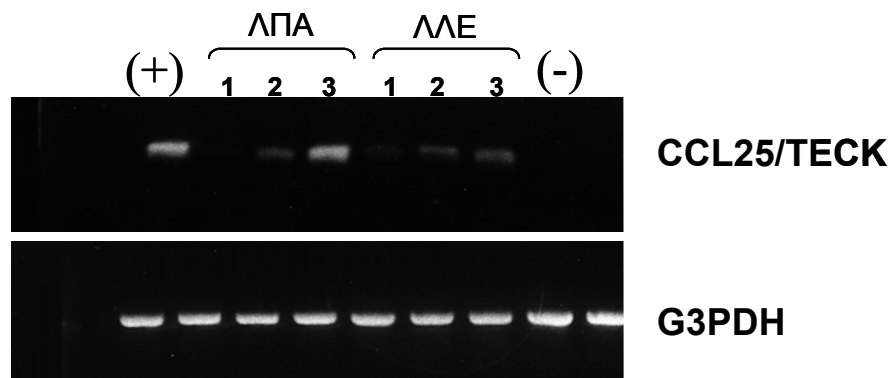


Εικόνα 17. Ανάλυση της χημειοκίνης TECK/CCL25 σε νόσο του Crohn του ΛΕ (Α-Δ) και ΠΕ (Ζ). Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ιστός από θύμο αδένα (Ε).

Με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους βρέθηκε ότι η έκφραση της TECK/CCL25 αυξάνεται επιλεκτικά σε φλεγμονώδεις εστίες του λεπτού εντέρου. Η αυξημένη έκφραση της χημειοκίνης από επιθηλιακά κύτταρα του ΛΕ παρατηρήθηκε κυρίως σε εστίες με λεμφοκυτταρικές διηθήσεις (Εικόνα 17, Α και Γ), ενώ η χρώση με μή ειδικό αντίσωμα ήταν αρνητική (Εικόνα 17, Β και Δ). Η χρώση φλεγμονώδη ιστού του ΠΕ ήταν αρνητική (Εικόνα 17Ζ). Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν ότι η χημειοκίνη TECK/CCL25 συμβάλλει όχι μόνο στην προσέλκυση των CCR9⁺ Τ λεμφοκυττάρων στο ΛΕ σε φυσιολογικές συνθήκες αλλά πιθανότατα να συμβάλλει

και στην προσέλκυση των Τ λεμφοκυττάρων στο ΛΕ κατά την διάρκεια της φλεγμονής. Εναλλακτικά η έκφραση της στα επιθηλιακά κύτταρα του ΛΕ μπορεί να αυξάνεται υπό την επίδραση κυτταροκινών που παράγονται από τα ενεργοποιημένα Τ λεμφοκύτταρα στην εστία της φλεγμονής. Προκειμένου να αναλύσουμε την δεύτερη πιθανότητα μελετήσαμε την έκφραση της χημοκίνης TECK/CCL25 σε διάφορες εντερικές κυτταρικές σειρές.

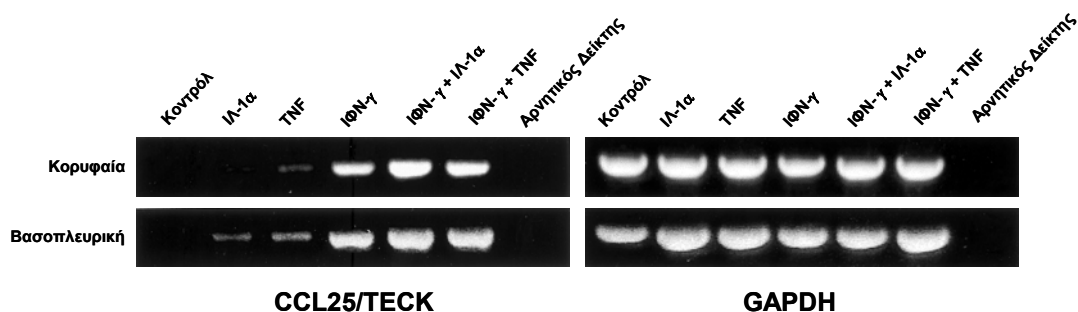
Μελέτη της έκφρασης της χημειοκίνης TECK/CCL25 σε εντερικές κυτταρικές σειρές Caco2, HT-29, και T84. Η ανάλυση της έκφρασης της χημειοκίνης TECK/CCL25 σε επίπεδο mRNA σε εντερικά επιθηλιακά κύτταρα, Caco2, HT-29 και T-84, μελετήθηκε με την αλυσωτή αντίδραση της πολυμεράσης. Η κυτταρική σειρά Caco2, παρουσιάζει χαρακτηριστικά διαφοροποιημένων εντεροκυττάρων και συνεπώς μελετήθηκε σε λεπτομέρεια. Όπως φαίνεται στην εικόνα 18, η καλλιέργεια των κυττάρων Caco2 με λεμφοκύτταρα, που απομονώθηκαν από το περιφερικό αίμα ή το λεπτό έντερο, δεν οδηγούν στην παραγωγή TECK/CCL25 mRNA από τα επιθηλιακά κύτταρα παρά μόνον αν τα λεμφοκύτταρα έχουν προηγουμένως ενεργοποιηθεί (είτε με PMA/ιονομυκίνη ή με αντισώματα έναντι των αντιγόνων CD2 και CD28).



Εικόνα 18. Ανάλυση της έκφρασης της χημειοκίνης TECK/CCL25 στην εντερική επιθηλιακή σειρά Caco2. Τα επιθηλιακά κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θήκες και στην βάση τους τοποθετήθηκαν λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος (ΛΠΑ) ή λεμφοκύτταρα του λεπτού εντέρου (ΛΜΕ) χωρίς ενεργοποίηση (1) ή μετά από ενεργοποίηση με PMA και ιονομυκίνη (2) και αντισώματα έναντι των αντιγόνων CD2 και CD28.

Συνεπώς κυτταρικοί παραγοντες, όπως κυτταροκίνες που εκκρίνονται από τα ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα πιθανότατα συμβάλλουν στην παραγωγή του mRNA της TECK/CCL25 από τα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα Caco2. Προκειμένου να μελετήσουμε αυτή την πιθανότητα αναλύσαμε την επίδραση διαφόρων κυτταροκινών στην παραγωγή του mRNA της

TECK/CCL25 στα επιθηλιακά κύτταρα Caco2. Από τις κυτταροκίνες που μελετήθηκαν (IL-1α, IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, TNFα, TGF-β, IFN-γ) μόνο η IFN-γ προκαλεί την παραγωγή της χημειοκίνης TECK/CCL25 σε επίπεδο mRNA, ενώ οι κυτταροκίνες IL-1α και TNFα ήταν λιγότερο αποτελεσματικές στην κυτταρική σειρά Caco2, ενώ δεν έχουν καμία επίδραση στις σειρές HT-29 και T84 (δεν φαίνεται).



Εικόνα 19. Ανίχνευση της χημειοκίνης CCL25/TECK mRNA στην εντερική επιθηλιακή σειρά Caco2.

Παρά την χρήση διαφόρων τεχνικών δεν μπορέσαμε να ανιχνεύσουμε την πρωτεΐνη της TECK/CCL25 στην κυτταρική σειρά Caco2 ακόμα και μετά από την χορήγηση IFN-γ. Παρόλα αυτά η αυξημένη παραγωγή της χημειοκίνης TECK/CCL25 στο λεπτό έντερο πιθανόν να οφείλεται στην παραγωγή κυτταροκινών από ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα που διηθούν τον βλεννογόνο του εντέρου. Εν συνεχεία η αυξημένη παραγωγή της TECK/CCL25 στο λεπτό έντερο μπορεί να συμβάλλει περαιτέρω στην προσέλκυση ενεργοποιημένων CCR9⁺ T λεμφοκυττάρων.

Ανάλυση του κυτταρικού φαινότυπου και των λειτουργικών χαρακτηριστικών των CCR9⁺ T λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα φυσιολογικών δοτών.

Καθώς τα CCR9⁺ T λεμφοκύτταρα προσελκύονται κυρίως στο ΛΕ και η ενεργοποίησή τους πιθανότατα λαμβάνει χώρα στις πλάκες του Peyer και τους μεσεντερικούς λεμφαδένες του ΛΕ, υποθέσαμε ότι το μικρό ποσοστό των CCR9⁺ T λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα μπορεί να αντιπροσωπεύει εντερικά T λεμφοκύτταρα που εντοπίζονται παροδικά στο περιφερικό αίμα. Αναλύσαμε λοιπόν την έκφραση διαφόρων δεικτών ενεργοποίησης στην επιφάνεια των CCR9⁺ T λεμφοκυττάρων και την συγκρίναμε με αυτή των CCR9⁻ T λεμφοκυττάρων σε φυσιολογικούς

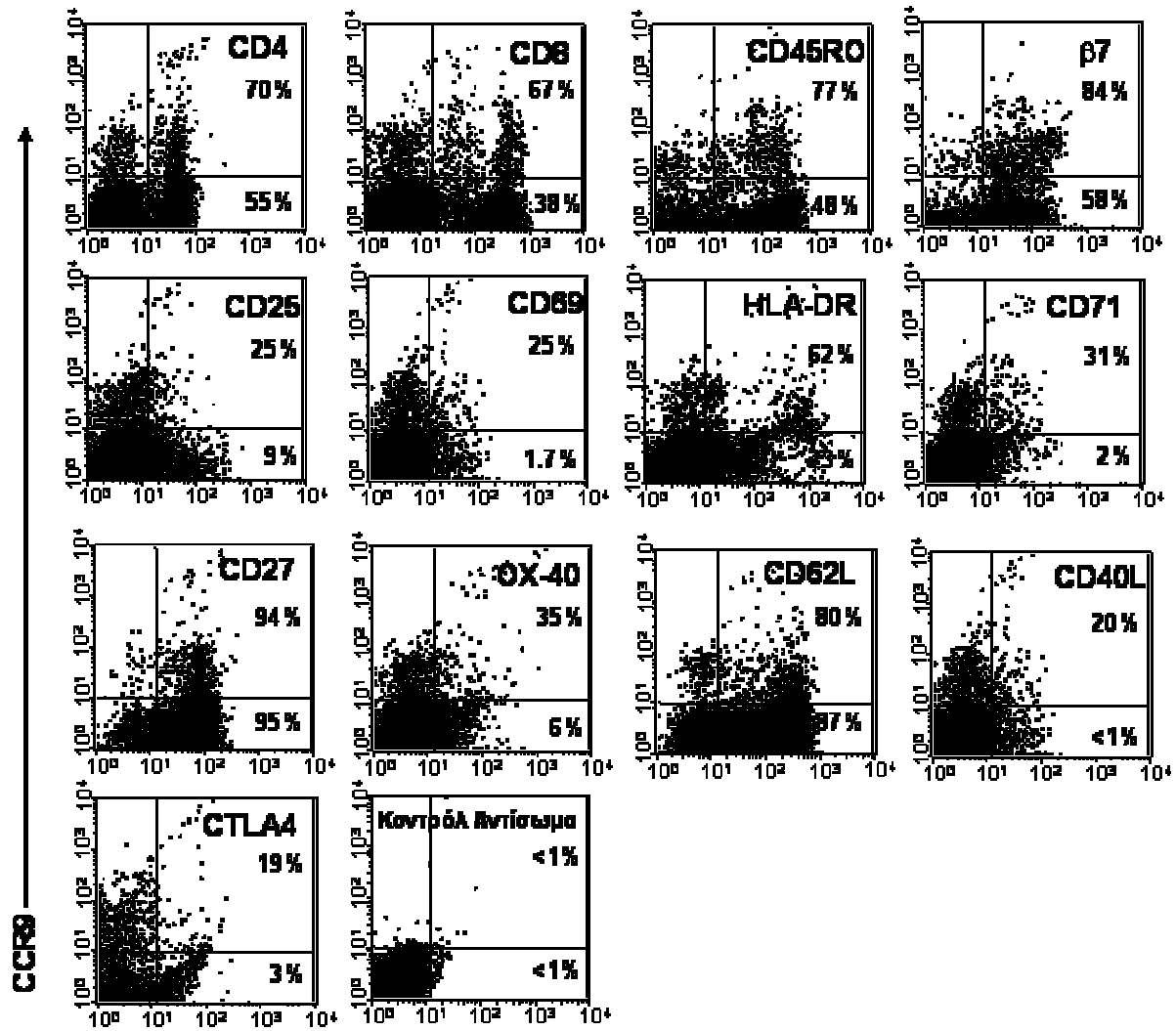
δότες. Όπως φαίνεται στην εικόνα 20 και στον πίνακα 3, τα T λεμφοκύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα CCR9, έχουν χαρακτηριστικά ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων καθώς εκφράζουν στην επιφάνεια τους δείκτες ενεργοποίησης όπως CD25, CD69, CD71, HLA-DR, CD40L, OX-40, CTLA-4. Συγκριτικά ποσοστά των CCR9⁺ και CCR9⁻ T λεμφοκυττάρων που εκφράζουν κάθε δείκτη ενεργοποίησης φαίνεται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3. Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των CCR9⁺ και CCR9⁻ T λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος.

Κυτταρικός δείκτης	CCR9 ⁺ T (% ± SD)	CCR9 ⁻ T (% ± SD)
CD4	76±9	65±10*
CD8	49±11	29±9**
CD25	26±7	9±2**
CD69	17±6	1.5±1**
CD71	25±9	3±3**
HLA-DR	48±16	18±6**
OX-40 (CD134)	28±11	6±5**
CD40L (CD154)	15±7	1±1.8**
CTLA-4 (CD152)	16±11	2±1.5
CD27	92±5	91±6
CD62L	78±4	88±4*
CD45RO	68±11	45±8***
β7 integrin	73±11	50±6**

Τα λεμφοκύτταρα που απομονώθηκαν από το περιφερικό αίμα υγιών μαρτύρων χρώστηκαν με αντισώματα έναντι του υποδοχέα CCR9 και κυτταρικών αντιγόνων όπως φαίνεται στον πίνακα.

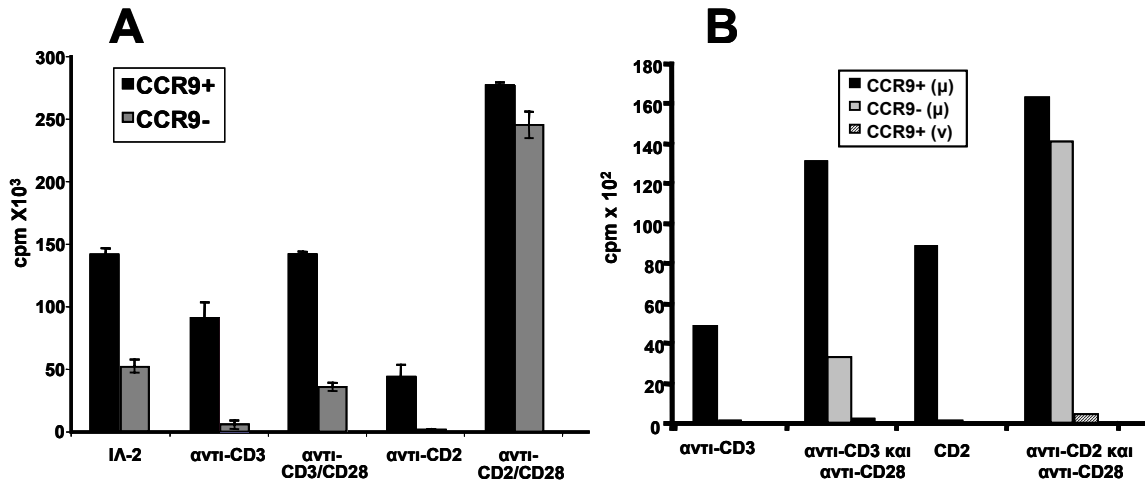
*, p<0.001, **, p<0.01, ***, p<0.05 μεταξύ του μέσου ποσοστού έκφρασης του δείκτη μεταξύ CCR9⁺ και CCR9⁻ T λεμφοκυττάρων.



Εικόνα 20. Χαρακτηριστικό παράδειγμα κυτταρικού φαινότυπου των CCR9⁺ και CCR9⁻ T λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος από υγιή μάρτυρα.

Βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην έκφραση των δεικτών CD25, CD69, CD71, HLA-DR, CD40L, και OX-40 μεταξύ CCR9⁺ και CCR9⁻ T λεμφοκυττάρων (Πίνακας 3). Ένα μεγαλύτερο ποσοστό των CCR9⁺ T λεμφοκυττάρων εκφράζουν τον δείκτη CD45RO, ενώ ένα μικρότερο ποσοστό εκφράζουν το δείκτη CD62L από ότι τα CCR9⁻ T λεμφοκύτταρα. Παρότι ο δείκτης CTLA-4, που θεωρείται αρνητικός ενεργοποιητής των T λεμφοκυττάρων, εκφράζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό των CCR9⁺, από ότι των CCR9⁻ T λεμφοκυττάρων, η διαφορά αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Στην συνέχεια αναλύσαμε την ενεργοποίηση των CCR9⁺ και CCR9⁻ CD4⁺ T λεμφοκυττάρων με την ιντερλευκίνη 2 (IL-2), και τα αντισώματα έναντι του CD3, CD2 μεμονομένα ή σε συνδυασμό με αντισώματα έναντι του CD28. Βρέθηκε ότι τα CCR9⁺ T

λεμφοκύτταρα πολλαπλασιάζονται πολύ περισσότερο από ότι τα CCR9⁻ T λεμφοκύτταρα όταν ενεργοποιηθούν με IL-2, OKT3, CD2 ή με τον συνδυασμό των αντισωμάτων OKT3 και CD28 (Εικόνα 21).



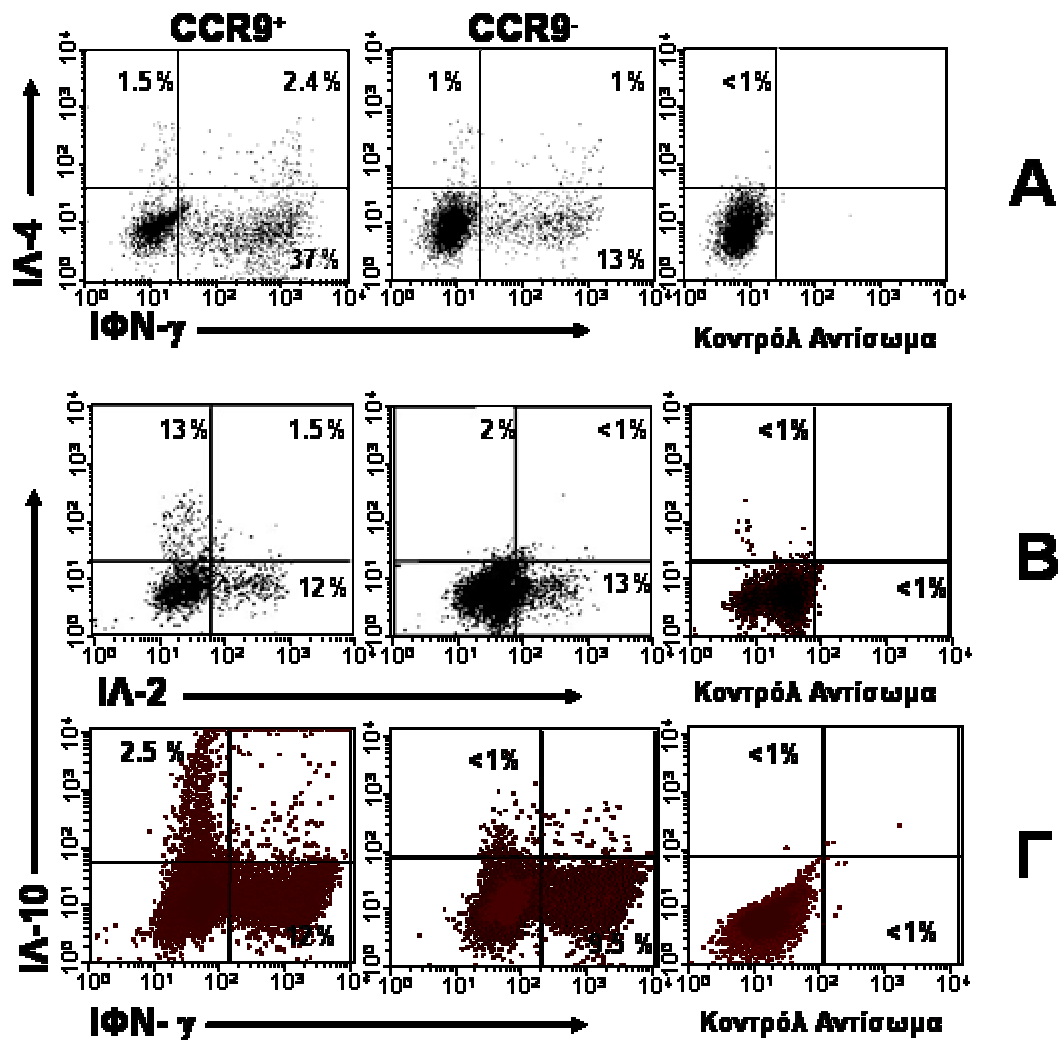
Εικόνα 21. Πολλαπλασιασμός των CCR9⁺ και CCR9⁻ T λεμφοκυττάρων στην IL-2 και τα αντισώματα έναντι του CD3 ή CD2 χωρίς ή με αντίσωμα έναντι του CD28. Στην εικόνα A διακρίνεται ο πολλαπλασιασμός ολικών CD4⁺ T λεμφοκυττάρων ενώ στην εικόνα B φαίνεται ο πολλαπλασιασμός των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων μνημονικού τύπου (CD4⁺CD45RO⁺). μ= μνημονικά λεμφοκύτταρα, ν=παίνα λεμφοκύτταρα.

Και οι δύο κατηγορίες λεμφοκυττάρων πολλαπλασιάζονται αποτελεσματικά όταν ενεργοποιηθούν με τα αντισώματα έναντι του CD2 και CD28 (Εικόνα 21). Καθώς τα CCR9⁺ T λεμφοκύτταρα περιέχουν μεγαλύτερο ποσοστό κυττάρων με φαινότυπο μνήμης από ότι τα CCR9⁻ T λεμφοκύτταρα (Εικόνα 20 και Πίνακας 3), αναλύσαμε εάν αυτή η διαφορά μπορεί να εξηγήσει την διαφορετική ανταπόκριση των δύο λεμφοκυτταρικών τύπων στην ενεργοποίησή τους με αντισώματα έναντι του CD2 αντιγόνου. Συνεπώς συγκρίναμε την ανταπόκριση των CCR9⁺CD4⁺CD45RO⁺ και CCR9⁻CD4⁺CD45RO⁺ T λεμφοκυττάρων σε αντίσωμα έναντι του CD2 μεμονομένα ή σε συνδυασμό με αντίσωμα έναντι του CD28. Αν και οι δύο λεμφοκυτταρικοί τύποι ανταποκρίνονται όταν ενεργοποιηθούν με τον συνδυασμό των δύο αντισωμάτων, μόνο τα CCR9⁺CD4⁺CD45RO⁺ T λεμφοκύτταρα πολλαπλασιάζονται όταν ενεργοποιηθούν μόνο με το αντίσωμα έναντι του CD2 (Εικόνα 21B).

Το γεγονός ότι τα εντερικά T λεμφοκύτταρα, καθώς και άλλα ιστικά T λεμφοκύτταρα, ανταποκρίνονται όταν ενεργοποιηθούν με αντισώματα έναντι του CD2 αντιγόνου, συμπεραίνεται ότι το μικρό ποσοστό των CCR9⁺ T λεμφοκυττάρων με φαινότυπο μνήμης στο περιφερικό αίμα από υγιείς μάρτυρες έχουν λειτουργικά χαρακτηριστικά εντερικών T λεμφοκυττάρων. Αυτή η υπόθεση ενισχύεται σημαντικά από το γεγονός ότι τα CCR9⁺ T

λεμφοκύτταρα εκφράζουν δείκτες ενεργοποίησης (CD69, CD71) όπως τα εντερικά T λεμφοκύτταρα και το ποσοστό τους αυξάνεται σε φλεγμονώδεις νόσους του ΛΕ όπως η κοιλιοκάκη και η νόσος του Crohn. Σε αντίθεση, όπως περιγράφηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο, το ποσοστό των CCR9⁺ T λεμφοκυττάρων δεν αυξάνεται στο περιφερικό αίμα ασθενών με νόσο του Crohn που είναι περιορισμένη στο ΠΕ.

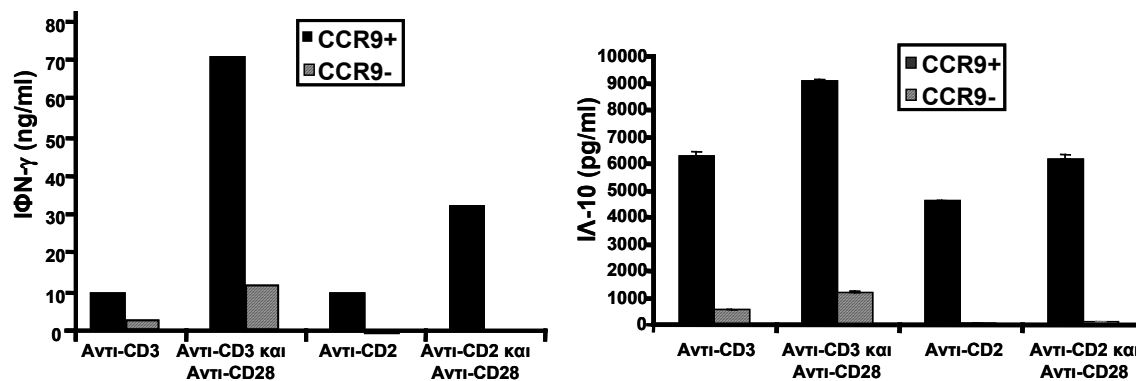
Στην συνέχεια αναλύσαμε την παραγωγή κυτταροκινών από τα CCR9⁺ και CCR9⁻CD4⁺ T λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος που απομονώθηκαν από υγιείς μάρτυρες. Αρχικά αναλύσαμε την παραγωγή της ΙΦΝ-γ και της ΙΛ-4 που θεωρούνται τυπικές κυτταροκίνες που παράγονται από βοηθητικά T λεμφοκύτταρα τύπου 1 και τύπου 2, αντίστοιχα. Τα CCR9⁺CD4⁺ T λεμφοκύτταρα περιέχουν μεγαλύτερο ποσοστό βοηθητικών T λεμφοκυττάρων τύπου 1 από ότι τα CCR9⁻CD4⁺ T λεμφοκύτταρα, ενώ το ποσοστό των βοηθητικών T λεμφοκυττάρων τύπου 2 είναι παρόμοιο μεταξύ των δύο λεμφοκυτταρικών τύπων (Εικόνα 22).



Εικόνα 22. Παραγωγή κυτταροκινών από CCR9⁺ και CCR9⁻ CD4⁺ T λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος. Τα CCR9⁺CD4⁺ T λεμφοκύτταρα παράγουν κυτταροκίνες που έχουν χαρακτηριστικά βοηθητικών τύπου 1 και ρυθμιστικών τύπου 1 κυττάρων.

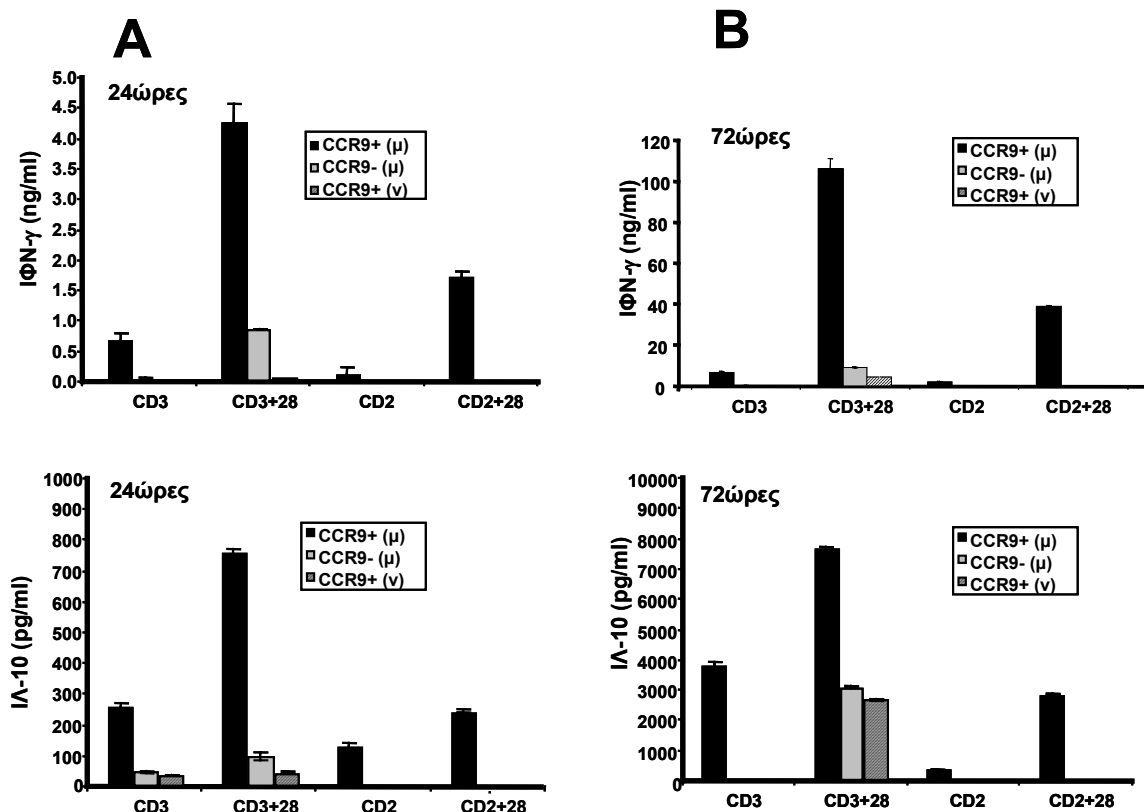
Στη συνέχεια αναλύσαμε το ποσοστό των λεμφοκυττάρων που παράγουν IL-2, και IL-10. Ενώ το ποσοστό των κυττάρων που παράγουν IL-2 είναι παρόμοιο μεταξύ των CCR9⁺ και CCR9⁻CD4⁺ T λεμφοκυττάρων, τα κύτταρα που παράγουν IL-10 βρίσκονται αποκλειστικά μεταξύ των CCR9⁺CD4⁺ T λεμφοκυττάρων (Εικόνα 22B και Γ). Η IL-10 παράγεται από μερικά T λεμφοκύτταρα που έχουν χαρακτηριστεί ως ρυθμιστικά κύτταρα τύπου 1 (T-regulatory 1 ή Tr1) και διαδραματίζουν σημαντικό θεραπευτικό ρόλο σε ζωικά μοντέλα φλεγμονώδους εντεροπάθειας. Η σύγχρονη χρώση των CCR9⁺CD4⁺ T λεμφοκυττάρων με αντισώματα έναντι της IFN- γ και της IL-10 έδειξε ότι κάθε κυτταροκίνη παράγεται από διαφορετικά CCR9⁺CD4⁺ T λεμφοκύτταρα (Εικόνα 22Γ). Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε την παραγωγή των

κυτταροκινών ΙΦΝ-γ και ΙΛ-10 από τα CCR9⁺CD4⁺ T λεμφοκύτταρα αναλύσαμε την παραγωγή τους με την μέθοδο ELISA όπως περιγράφηκε στο τμήμα Υλικό και Μέθοδοι. Η ενεργοποίηση των CCR9⁺CD4⁺ T λεμφοκυττάρων με τα αντισώματα OKT3 ± CD28 για 24 ώρες οδήγησε σε παραγωγή υψηλών επιπέδων ΙΦΝ-γ και ΙΛ-10 σε σχέση με τα CCR9⁻CD4⁺ T λεμφοκύτταρα (Εικόνα 23).



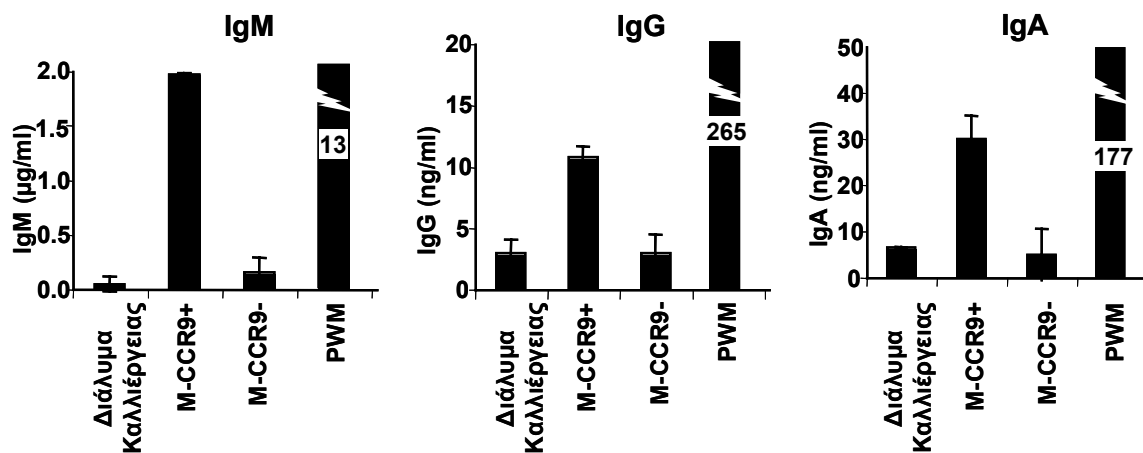
Εικόνα 23. Ανάλυση της παραγωγής ΙΦΝ-γ και ΙΛ-10 από CCR9⁺ και CCR9⁻ T λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος από υγιείς μάρτυρες.

Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν με ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων με αντισώματα έναντι του CD2 και CD28 (Εικόνα 23). Η παραγωγή ΙΦΝ-γ και ΙΛ-10 παρατηρήθηκε κυρίως σε CCR9⁺CD4⁺ T λεμφοκύτταρα με φαινότυπο μνήμης (CD45RO⁺) (Εικόνα 24).



Εικόνα 24. Ανάλυση της παραγωγής IFN-γ και IL-10 με την μέθοδο ELISA σε CCR9⁺ και CCR9⁻ T λεμφοκύτταρα. Η παραγωγή κυτταροκινών από κάθε κυτταρικό τύπο αναλύθηκε σε διάλυμα καλλιέργειας 24 ή 72 ώρες μετά την ενεργοποίησή τους. μ= μνημονικού τύπου T λεμφοκύτταρα, ν=παίβε T λεμφοκύτταρα.

Συνεπώς τα CCR9⁺CD4⁺ T λεμφοκύτταρα που βρίσκονται στο περιφερικό αίμα έχουν χαρακτηριστικά Th1 και Tr1 λεμφοκυττάρων. Η παραγωγή IL-10 και η έκφραση του δείκτη ενεργοποίησης CD40L σε CCR9⁺ T λεμφοκύτταρα υποδεικνύουν ότι τα λεμφοκύτταρα αυτά μπορεί να συμβάλλουν επίσης στην ενεργοποίηση των B λεμφοκυττάρων. Πράγματι, το αντιγόνο CD40L συμβάλλει στην αλλαγή του ισότυπου της ανοσοσφαιρίνης που παράγεται από ενεργοποιημένα B λεμφοκύτταρα. Επίσης η IL-10 συμβάλλει σημαντικά στην έκκριση των ανασφαιρινών από τα B λεμφοκύτταρα. Προκειμένου να μελετήσουμε την επίδραση των CCR9⁺ T λεμφοκυττάρων στα B λεμφοκύτταρα, απομονώσαμε κάθε κυτταρικό τύπο από το περιφερικό αίμα από υγιείς μάρτυρες και καλλιιεργήθηκαν σε σχέση 1:1 για 11 μέρες όπως περιγράφηκε στο μέρος Υλικό και Μέθοδοι.



Εικόνα 25. Μεικτή καλλιέργεια των CCR9⁺ T λεμφοκυττάρων με B Λεμφοκύτταρα οδηγεί στην παραγωγή ανοσοσφαιρινών τύπου IgM, IgG, και IgA. M=μνημονικά λεμφοκύτταρα

Όπως φαίνεται στην εικόνα 25, η καλλιέργεια των CCR9⁺ T λεμφοκυττάρων με B λεμφοκύτταρα οδήγησε σε παραγωγή ανασφαιρινών του τύπου μ, γ και α χωρίς την προηγούμενη ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων ή την προσθήκη κυτταροκινών στο διάλυμα καλλιέργειας. Σε αντίθεση η καλλιέργεια των CCR9⁻ T λεμφοκυττάρων με B λεμφοκύτταρα δεν οδήγησε σε παραγωγή ανασφαιρινών (Εικόνα 25). Συμπερασματικά τα CCR9⁺ T λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος έχουν φαινοτυπικά χαρακτηριστικά και παραγωγή κυτταροκινών παρόμοια με αυτών των εντερικών T λεμφοκυττάρων.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Είναι γνωστό ότι τα μνημονικά T λεμφοκύτταρα που παράγονται μετά από ανοσοποίηση στο έντερο, έχουν την ικανότητα να εισέλθουν στο εντερικό τοίχωμα και στους λεμφικούς ιστούς του οργάνου μετά από παροδική εμφάνιση τους στο περιφερικό αίμα.^{251, 252} Η ικανότητα τους αυτή έχει να κάνει με την έκφραση στην κυτταρική επιφάνεια τους της ιντεγκρίνης $\alpha_4\beta_7$ που επιδρά επιλεκτικά με την MAdCAM-1 (mucosal addressin cell adhesion molecule-1) που εκφράζεται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων στις πλάκες του Peyer, τους μεσεντερικούς λεμφαδένες, και τα μετατριχοϊδικά αγγεία του εντερικού βλεννογόνου.²⁵³ Η επίδραση μεταξύ της $\alpha_4\beta_7$ και MAdCAM-1 παίζει σημαντικότερο ρόλο στην κινητοποίηση αυτών των λεμφοκυττάρων στους εντερικούς ιστούς.²⁵³ Πράγματι, ποντικοί με γενετική έλλειψη του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη β_7 έχουν υποπλαστικούς εντερικούς λεμφικούς ιστούς και σημαντική ελάτωση των $CD4^+$ και $CD8^+$ T λεμφοκυττάρων και πλασματοκυττάρων στον εντερικό βλεννογόνο.²⁵⁴ Προηγούμενες μελέτες και τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι ο χημειούποδοχέας CCR9 εκφράζεται επιλεκτικά σε θυμοκύτταρα και σε ένα μικρό ποσοστό των T λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος που εκφράζουν την ιντεγκρίνη $\alpha_4\beta_7$.²⁰⁸ Συνεπώς $CCR9^+$ T λεμφοκύτταρα έχουν την ικανότητα να εντοπίζονται στους εντερικούς ιστούς μετά από την έξοδο τους από το περιφερικό αίμα. Όπως φαίνεται όμως από τις Εικόνες 7, 8 και 9, τα εντερικά T λεμφοκύτταρα, τόσο τα βοηθητικά $CD4^+$ όσο και τα κυτταροτοξικά $CD8^+$ T λεμφοκύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα CCR9, εντοπίζονται κυρίως στους εντερικούς ιστούς του λεπτού εντέρου, τόσο στον βλεννογόνο όσο και στους μεσεντερικούς λεμφαδένες. Σε αντίθεση ένα πολύ μικρό ποσοστό των $CCR9^+$ T λεμφοκυττάρων εντοπίζεται στο παχύ έντερο και στους μεσεντερικούς λεμφαδένες του οργάνου. Η φαινοτυπική ανάλυση των λεμφοκυττάρων του βλεννογόνου του λεπτού εντέρου έδειξε ότι ο χημειούποδοχέας CCR9 εκφράζεται κυρίως σε $CD3^+$ T λεμφοκύτταρα, αλλά και σε ένα ποσοστό B λεμφοκυττάρων και επίσης φονικών λεμφοκυττάρων (NK cells). Μία προηγούμενη μελέτη έδειξε ότι ο χημειούποδοχέας CCR9 εκφράζεται επίσης σε μερικά B λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος.²⁰⁸ Η ανάλυση του φαινότυπου των $CCR9^+$ T λεμφοκυττάρων του λεπτού εντέρου όπως φαίνεται στην εικόνα 10, έδειξε ότι ουσιαστικά όλα τα λεμφοκύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα αυτό επίσης εκφράζουν τον μνημονικό δείκτη CD45RO, τον δείκτη

ενεργοποίησης CD69 και επίσης το αντιγόνο CD95 (Fas). Επίσης ένα ποσοστό των CCR9⁺ T λεμφοκυττάρων του λεπτού εντέρου εκφράζουν τους δείκτες ενεργοποίησης CD25 και HLA-DR.

Με ποιό μηχανισμό λοιπόν τα CCR9⁺ T λεμφοκύτταρα εντοπίζονται στους εντερικούς ιστούς, και ειδικά στον εντερικό βλεννογόνο του λεπτού εντέρου? Ο μηχανισμός αυτός μπορεί να οφείλεται στην επιλεκτική παραγωγή της χημειοκίνης TECK/CCL25 στο λεπτό έντερο που συνδέει ειδικά τον CCR9. Όπως φαίνεται στις Εικόνες 3 και 4, η παραγωγή της TECK/CCL25, τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης, εντοπίζεται αποκλειστικά στο λεπτό έντερο. Η ανοσοϊστοχημική ανάλυση της έκφρασης της TECK/CCL25 στο λεπτό έντερο έδειξε ότι παράγεται από επιθηλιακά κύτταρα των εντερικών κρυπτών αλλά και από κάποια μονοκύτταρα του εντερικού βλεννογόνου που έχουν χαρακτηριστικά δενδριτικών κυττάρων. Καθώς οι χημειοτακτικές μελέτες έδειξαν ότι η TECK/CCL25 προσελκύει T λεμφοκύτταρα του λεπτού εντέρου μέσω επίδρασης του με τον χημειοϋποδοχέα CCR9 (Εικόνα 5), η επιλεκτική παραγωγή της TECK/CCL25 στο λεπτό έντερο πιθανότατα συμβάλλει στην προσέλκυση αυτών των λεμφοκυττάρων στον εντερικό βλεννογόνο του οργάνου. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ανοσοϊστοχημική ανάλυση έδειξε ότι η χημειοκίνη TECK/CCL25 επίσης παράγεται από ενδοθηλιακά κύτταρα του λεπτού εντέρου όπως φαίνεται στην Εικόνα 4γ. Οι χημειοκίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση των ιντεγκρινών σε λευκοκύτταρα και στην προσκόλληση των λευκοκυττάρων στο ενδοθηλιακό τοίχωμα.^{135, 255} Συνεπώς η χημειοκίνη TECK/CCL25 μπορεί να έχει παρόμοια δράση σε T λεμφοκύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα CCR9. Για παράδειγμα η επίδραση της TECK/CCL25 στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων του λεπτού εντέρου με CCR9⁺ T λεμφοκύτταρα μπορεί να ενεργοποιήσει την ιντεγκρίνη α₄β₇ και να οδηγήσει στην ακινητοποίηση τους μέσω της επίδρασης της με την MAdCAM-1 και εν συνεχεία την διαπύδηση των λεμφοκυττάρων αυτών στο βλεννογόνο του λεπτού εντέρου. Πρόσφατα δεδομένα σε ποντίκια έχουν δείξει ότι ο CCR9 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην προσκόλληση των λεμφοκυττάρων του ΛΕ σε ενδοθηλιακά κύτταρα *in vivo*, καθώς η απευαισθητοποίηση του υποδοχέα CCR9, που μπορεί να επιτευχθεί με προηγούμενη καλλιέργεια των CCR9⁺ T λεμφοκυττάρων με την χημειοκίνη TECK/CCL25, αναστέλλει την προσκόλληση των T λεμφοκυττάρων στο λεπτό αλλά όχι στο παχύ έντερο.²⁵⁶ Είναι επίσης πιθανό ότι η χημειοκίνη TECK/CCL25 συμβάλλει στην κατακράτηση των CCR9⁺

T λεμφοκυττάρων στον εντερικό βλεννογόνο και την κινητοποίηση των ενδοεπιθηλιακών T λεμφοκυττάρων στο εντερικό επιθήλιο. Πράγματι σε αντίθεση με το παχύ έντερο, τα περισσότερα ενδοεπιθηλιακά T λεμφοκύτταρα του λεπτού εντέρου εκφράζουν τον υποδοχέα CCR9.²⁵⁷ Πρόσφατα δεδομένα σε ποντικό έχουν δείξει ότι η χορήγηση αντισωμάτων έναντι της χημειοκίνης TECK/CCL25 εμποδίζει την κινητοποίηση των CD8⁺ T λεμφοκυττάρων στο εντερικό επιθήλιο το λεπτού εντέρου μετά από εντερική ανοσοποίηση.²⁵⁸ Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν με την ανοσοποίηση ποντικών με γενετική έλλειψη του CCR9.²⁴⁹ Τα δεδομένα αυτά συνεπώς υποστηρίζουν την άποψη ότι η χημειοκίνη TECK/CCL25 συμβάλλει στην προσέλκυση των CCR9⁺ T λεμφοκυττάρων στο βλεννογόνο του λεπτού εντέρου. Παρόμοια τμηματοποίηση των ανοσολογικών αντιδράσεων έχουν περιγραφεί σε άλλα περιφερικά όργανα, όπως για παράδειγμα το δέρμα, όπου η επιλεκτική παραγωγή της χημειοκίνης CTAK/CCL27 συμβάλλει στην προσέλκυση των T λεμφοκυττάρων που εκφράζουν τον χημειοϋποδοχέα CCR10.¹³⁶

Ο μικρός αριθμός των λεμφοκυττάρων του παχέως εντέρου που εκφράζουν τον υποδοχέα CCR9 πιθανότατα προσελκύνονται στο βλεννογόνο του οργάνου υπό την επίδραση άλλων χημειοκινών καθώς η χημειοκίνη TECK/CCL25 δεν παράγεται στο παχύ έντερο. Τα λειτουργικά χαρακτηριστικά των CCR9⁺ T λεμφοκυττάρων του παχέως εντέρου δεν είναι προς το παρόν γνωστά. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η μυϊκή TECK/CCL25 (mCCL25), παράγεται από επιθηλιακά κύτταρα του λεπτού εντέρου και θύμου αδένου.²⁵⁹ Η κατανομή της παραγωγής της στο λεπτό έντερο τουλάχιστον σε επίπεδο mRNA διαφέρει από αυτήν της ανθρώπινης χημειοκίνης. Το mRNA της mCCL25 εντοπίζεται κυρίως σε επιθηλιακά κύτταρα των εντερικών λαχνών, η έκφραση της ξεκινά περίπου στο ύψος της μεταβολής κρυπτών και λαχνών του βλεννογόνου αυξάνεται σε μέγιστο επίπεδο κατά το ένα τρίτο του μέρους των λαχνών και εν συνεχεία η παραγωγή της ελατώνεται.²⁵⁹ Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι η παραγωγή της mCCL25 επίσης εντοπίζεται στα επιθηλιακά κύτταρα των πλακών του Peyer.²⁵⁹

Η ανάλυση κυτταροκινών τύπου 1 και τύπου 2 από τα T λεμφοκύτταρα του λεπτού εντέρου έδειξε ότι τόσο τα CCR9⁺ όσο και τα CCR9⁻ T λεμφοκύτταρα παράγουν IFN-γ και IL-4 και συνεπώς η έκφραση του υποδοχέα CCR9 δεν διαχωρίζει T λεμφοκύτταρα με χαρακτηριστικά κυτταροκινών τύπου 1 ή τύπου 2. Για παράδειγμα άλλοι χημειοϋποδοχείς όπως οι CXCR3 και CCR5 εκφράζονται από βοηθητικά T λεμφοκύτταρα τύπου 1 που παράγουν IFN-

γ, ενώ οι χημειούποδοχείς CCR3, CCR4, και CCR8 χαρακτηρίζουν βοηθητικά T λεμφοκύτταρα τύπου 2 που παράγουν ΙΛ-4.^{134, 189} Συνεπώς ο χημειούποδοχέας CCR9 αποτελεί αποκλειστικά δείκτη λεμφοκυττάρων που έχουν την ιδιότητα να εντοπίζονται στον βλεννογόνο του λεπτού εντέρου.

Έχει προηγουμένως υποστηριχτεί ότι η έκφραση της ιντεγκρίνης α₄β₇ σε T λεμφοκύτταρα τα διαχωρίζει σε αυτά που συμβάλλουν σε ανοσολογικές διεργασίες του εντερικού βλεννογόνου (α₄β₇⁺) σε σχέση με αυτών άλλων οργάνων για παράδειγμα του δέρματος που είναι α₄β₇⁻ αλλά εκφράζουν την ιντεγκρίνη CLA (cutaneous lymphocyte antigen).^{251, 260} Πράγματι η ανοσολογική αντίδραση έναντι εντερικών αντιγόνων όπως στην περίπτωση της λοιμώξεως με εντεροϊό εντοπίζεται σε λεμφοκύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα α₄β₇⁺ ενώ έναντι αλλεργιογόνων του δέρματος τα T λεμφοκύτταρα εκφράζουν την ιντεγκρίνη CLA.²⁶¹ Η ταυτόχρονη έκφραση του υποδοχέα CCR9 και της ιντεγκρίνης α₄β₇⁺ σε εντερικά μνημονικά T λεμφοκύτταρα μπορεί πειραματικά να τα διαχωρίσει σε αυτά τα λεμφοκύτταρα με ειδικότητα έναντι αντιγόνων που προκαλούν ανοσολογική αντίδραση στους λεμφικούς ιστούς του λεπτού εντέρου. Συλλεκτικά, η επιλεκτική έκφραση της χημειοκίνης TECK/CCL25 στο λεπτό, η χημειοτακτική επίδραση της σε λεμφοκύτταρα του λεπτού εντέρου και ο εντοπισμός των CCR9⁺ T λεμφοκυττάρων σχεδόν αποκλειστικά στο λεπτό έντερο συνηγορούν στην άποψη ότι το σύστημα της χημειοκίνης TECK/CCL25 και του υποδοχέα CCR9 αποτελεί έναν μηχανισμό για τον διαχωρισμό των ανοσολογικών αντιδράσεων του λεπτού από αυτές του παχέως εντέρου.²⁶²

Ο χημειούποδοχέας CCR9 συνεπώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για τα T λεμφοκύτταρα που λαμβάνουν μέρος σε ανοσολογικές διεργασίες του λεπτού εντέρου. Συνεπώς η T κυτταρική ανοσία που χαρακτηρίζει το λεπτό έντερο μπορεί να διαχωριστεί από αυτή του παχέως εντέρου με βάση την έκφραση του υποδοχέα CCR9 και πιθανότατα τα CCR9⁺ T λεμφοκύτταρα ενοχοποιούνται στην παθογένεια διαφόρων ανοσολογικών παθήσεων του λεπτού εντέρου. Συνεπώς αναλύσαμε την έκφραση του υποδοχέα CCR9 και της χημειοκίνης TECK/CCL25 στην νόσο του Crohn. Τα αποτελέσματα της έκφρασης της χημειοκίνης TECK/CCL25 σε εντερικούς ιστούς από ασθενείς με νόσο του Crohn έδειξε ότι η παραγωγή της αυξάνεται επιλεκτικά στους φλεγμονώδεις ιστούς του λεπτού εντέρου συγκριτικά με το φυσιολογικό έντερο. Η χημειοκίνη δεν ανιχνεύτηκε σε φλεγμονώδη ιστό του παχέως εντέρου σε

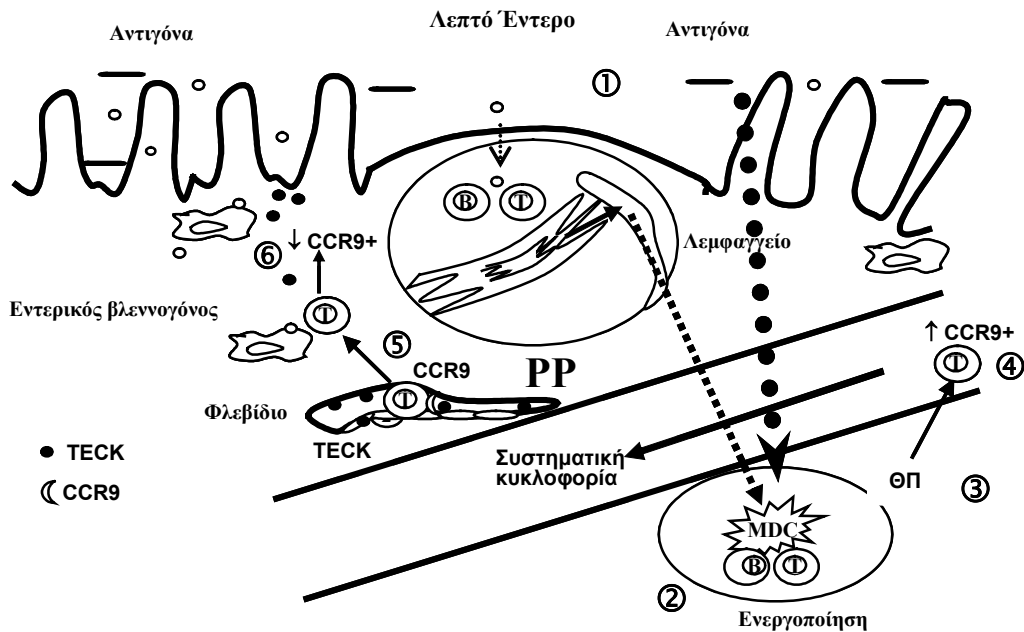
ασθενείς με νόσο του Crohn υποδηλώνοντας ότι η παραγωγή της κατά την διάρκεια της φλεγμονής αυξάνεται επιλεκτικά στο λεπτό έντερο. Συνεπώς η αυξημένη παραγωγή της χημειοκίνης TECK/CCL25 κατά την διάρκεια της εντερικής φλεγμονής μπορεί να συμβάλλει στην προσέλκυση των T λεμφοκυττάρων που εκφράζουν τον υποδοχέα CCR9. Αυτή η υπόθεση υποστηρίζεται από το γεγονός ότι η έκφραση της στο λεπτό έντερο σχετίζεται με περιοχές πυκνής διήθησης του βλεννογόνου από λεμφοκύτταρα. Τα ερεθίσματα που οδηγούν σε αυξημένη παραγωγή της χημειοκίνης από τα εντεροκύτταρα του λεπτού εντέρου στην νόσο του Crohn πιθανότατα έχει να κάνει με την έκκριση κυτταροκινών από τα ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα στις εστίες της φλεγμονής. Πράγματι πειράματα με εντερικές κυτταρικές σειρές *in vitro* έδειξαν ότι οι κυτταροκίνη ΙΦΝ-γ είτε μόνη της ή σε συνδυασμό με την ΙΑ-1 και τον TNF-α αυξάνει την παραγωγή του mRNA της χημειοκίνης TECK/CCL25 (Εικόνα 19). Δυστυχώς δεν μπορέσαμε να ανιχνεύσουμε την χημειοκίνη σε επίπεδο πρωτεΐνης ούτε στο κυτταρικό διάλυμα αλλά ούτε σε ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες των εντεροκυττάρων. Τα πειραματικά δεδομένα της αυξημένης συχνότητας των CCR9⁺ T λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα των ασθενών με νόσο του Crohn στο λεπτό έντερο ή κοιλιοκάκη υποδεικνύουν ότι τα CCR9⁺ T λεμφοκύτταρα ενεργοποιούνται ειδικά σε ανοσολογικές αντιδράσεις του λεπτού εντέρου καθώς η συχνότητα αυτών των λεμφοκυττάρων δεν βρέθηκε αυξημένη στο περιφερικό αίμα των ασθενών με εντοπισμένη νόσο του Crohn στο παχύ έντερο. Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι η παθογένεια της νόσου του Crohn είναι ετερογενής και τουλάχιστον ανοσολογικά η νόσος του Crohn του λεπτού εντέρου μπορεί να διαχωριστούν με βάση το σύστημα της χημειοκίνης TECK/CCL25 και του υποδοχέα CCR9 από την νόσο του Crohn που εντοπίζεται αποκλειστικά στο παχύ έντερο. Το γεγονός αυτό μπορεί κανείς να εκμεταλλευτεί θεραπευτικά, όπως για παράδειγμα η χρησιμοποίηση ειδικού αναστολέα του χημειοϋποδοχέα CCR9 για την θεραπεία της νόσου του Crohn του λεπτού εντέρου.

Είναι άγνωστο για πιά λόγο ένα 25% των ασθενών με νόσο του Crohn στο λεπτό έντερο δεν παρουσιάζει αυξημένη συχνότητα αυτών των λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα. Πιθανόν αυτό να οφείλεται σε περιορισμένη έκταση της νόσου ή σε χορήγηση φαρμάκων ή τέλος μπορεί να οφείλεται ότι η νόσος σε αυτές τις περιπτώσεις είναι ανενεργός. Τα πειραματικά δεδομένα της χαμηλότερης έκφρασης του χημειοϋποδοχέα CCR9 στο λεπτό έντερο σε ασθενείς με νόσο του Crohn ήταν απροσδόκητα καθώς η έκφραση του CCR9 σε λεμφοκύτταρα του περιφερικού

αίματος βρέθηκε αυξημένη σε αυτούς τους ασθενείς. Είναι γνωστό ότι τα T λεμφοκύτταρα που απομονώνονται από φλεγμονώδεις εντερικούς ιστούς στην νόσο του Crohn είναι ενεργοποιημένα και συνεπώς η ελλειπωμένη έκφραση του υποδοχέα CCR9 σε T λεμφοκύτταρα του λεπτού εντέρου μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός της ενεργοποίησης αυτών των κυττάρων *in vivo*.²⁶³ Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται από το γεγονός ότι η ενεργοποίηση των CCR9⁺ T λεμφοκυττάρων *in vitro* με φυτοαιμαγλουτινίνη αλλά όχι με την IL-2 οδηγεί σε ελλειπωμένη έκφραση του CCR9 (Εικόνα 13). Μία άλλη πιθανότητα για αυτή την παρατήρηση είναι ότι τα T λεμφοκύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα CCR9 είναι πιο ευαίσθητα σε αποδοτικό θάνατο μετά από ενεργοποίηση τους από ότι τα T λεμφοκύτταρα που δεν εκφράζουν τον υποδοχέα αυτό (Εικόνα 13) ή ακόμα ότι η αυξημένη παραγωγή της χημειοκίνης TECK/CCL25 στους φλεγμονώδεις ιστούς εμποδίζει την χρώση του υποδοχέα CCR9 με το αντίσωμα 3C3 μετά την απομόνωση των λεμφοκυττάρων.

Παρά το γεγονός ότι η TECK/CCL25 έχει χαρακτηριστεί ως ομοιοστατική χημειοκίνη, η παραγωγή της αυξάνεται στην νόσο του Crohn του λεπτού εντέρου και συνεπώς μπορεί για αυτό το λόγο να ταξινομηθεί ως φλεγμονώδη χημειοκίνη. Παρόμοια χαρακτηριστικά έχουν παρατηρηθεί για διάφορες άλλες ομοιοστατικές χημειοκίνες, όπως για παράδειγμα την BCA-1/CXCL13, που ενώ εκφράζεται σε φυσιολογικούς ιστούς, η παραγωγή της αυξάνεται για παράδειγμα στην γαστρίτιδα που προκαλείται από το Ελικοβακτηρίδιο και πιθανόν να συμβάλλει στην παραγωγή του λεμφώματος τύπου MALT.¹¹⁷ Παρόμοια αύξηση της παραγωγής της ομοιοστατικής χημειοκίνης SLC/CCL21 έχει παρατηρηθεί σε άλλες φλεγμονώδεις νόσους όπως για παράδειγμα την ρευματοειδή αρθρίτιδα²⁶⁴.

Η αυξημένη συχνότητα των CCR9⁺ T λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα των ασθενών με νόσο του Crohn στο λεπτό έντερο ή κοιλιοκάκη δηλώνουν ότι η ενεργοποίησή τους λαμβάνει χώρα στους λεμφικούς ιστούς του λεπτού εντέρου, πιθανότατα στους μεσεντερικούς λεμφαδένες και στις πλάκες του Peyer και ότι παροδικά ανιχνεύονται στο περιφερικό αίμα πριν την τελική έξοδο τους στον εντερικό βλεννογόνο του λεπτού εντέρου (Εικόνα 26).



Εικόνα 26. Υποθετική ενεργοποίηση των $CCR9^+$ T λεμφοκυττάρων στους λεμφικούς ιστούς του λεπτού εντέρου και κινητοποίησή τους μέσω της συστηματικής κυκλοφορίας στον βλεννογόνο του λεπτού εντέρου. ΘΠ= Θωρακικός Πόρος, PP= Πλάκες του Peyer. (1) Αντιγόνα από τον εντερικό αυλό προσλαμβάνονται από δένδριτικά κύτταρα που στην συνέχεια (2) ενεργοποιούν T λεμφοκύτταρα στους μεσεντερικούς λεμφαδένες. Αυτή η ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων οδηγεί στην έκφραση του CCR9. (3) Τα $CCR9^+$ T λεμφοκύτταρα κινητοποιούνται μέσω του ΘΠ και (4) του περιφερικού αίματος στον βλεννογόνο του λεπτού εντέρου. (5) Επιδράσεις μεταξύ TECK/CCL25 και $CCR9^+$ T λεμφοκύτταρα στα ενδοθηλιακά κύτταρα του λεπτού εντέρου οδηγεί στην ακινητοποίηση και πιθανότατα στην διαπύδση τους στον βλεννογόνο και στο επιθηλιακό τοίχωμα. (6) Διάφοροι τοπικοί παράγοντες στο βλεννογόνο του εντέρου μπορεί να οδηγήσει σε ελάττωση της έκφρασης του CCR9.

Τα χαρακτηριστικά της ενεργοποίησης των T λεμφοκυττάρων στις πλάκες του Peyer και τους μεσεντερικούς λεμφαδένες και εν συνεχεία της κυκλοφορίας τους μέσω του θωρακικού πόρου στο περιφερικό αίμα και τελικά την έξοδο τους στο εντερικό βλεννογόνο και επιθήλιο έχουν περιγραφεί σε μυϊκά μοντέλα εντερικής ανοσοποίησης με μοντέλα αντιγόνα, όπως για παράδειγμα την οβαλβουμίνη.^{265, 266} Παρόμοια ενεργοποίηση και κινητοποίηση των εντερικών λεμφοκυττάρων πιστεύεται ότι ισχύει και στον άνθρωπο. Συνεπώς θα μπορούσε κανείς να υποθέσει ότι το μικρό ποσοστό των $CCR9^+$ T λεμφοκυττάρων που εντοπίζεται στο περιφερικό αίμα των υγιών μαρτύρων αποτελεί ένα “παράθυρο παρατήρησης” των λεμφοκυττάρων που έχουν ενεργοποιηθεί στους εντερικούς ιστούς σε φυσιολογικές συνθήκες έναντι εντερικών αντιγόνων όπως για παράδειγμα πρωτεϊνών της τροφής. Η φαινοτυπική και λειτουργική ανάλυση αυτών των κυττάρων στους υγιείς μάρτυρες έδειξε ότι τα λεμφοκύτταρα αυτά έχουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά. Ο φαινότυπος των κυττάρων αυτών δείχνει ότι είναι ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα καθώς εκφράζουν τους κυτταρικούς δείκτες CD25, CD69, CD71, OX-40, CD-

40L, και HLA-DR, πολλαπλασιάζονται έντονα όταν ενεργοποιηθούν με αντισώματα έναντι του αντιγόνου CD2, που αποτελεί τυπικό χαρακτηριστικό των εντερικών T λεμφοκυττάρων, και τέλος παράγουν τις κυτταροκίνες ΙΦΝ-γ και ΙΛ-10. Ένα ακόμα σημαντικό λειτουργικό χαρακτηριστικό αυτών των λεμφοκυττάρων είναι ότι προκαλούν την παραγωγή και έκκριση αντισωμάτων του τύπου μ, γ, και α από Β λεμφοκύτταρα χωρίς την προηγούμενη ενεργοποίηση τους ή την προσθήκη κυτταροκινών. Συνεπώς τα λειτουργικά χαρακτηριστικά των CCR9⁺ T λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος αντικατοπτρίζουν αυτά των εντερικών T λεμφοκυττάρων. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι τα CCR9⁺ T λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος από υγιείς μάρτυρες παράγουν μεγάλες ποσότητες τόσο ΙΦΝ-γ όσο και ΙΛ-10 και συνεπώς έχουν χαρακτηριστικά βοηθητικών τύπου 1 (Th1) και ρυθμιστικών τύπου 1 (Tr1) T λεμφοκυττάρων. Η ταυτόχρονη ενδοκυτταρική χρώση με αντισώματα έναντι της ΙΦΝ-γ και ΙΛ-10 έδειξε ότι τα CCR9⁺ T λεμφοκύτταρα που παράγουν αυτές τις κυτταροκίνες είναι διαφορετικά. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι τα CCR9⁺ T λεμφοκύτταρα είναι ετερογενή από την άποψη της παραγωγής κυτταροκινών και πιθανόν να διαδραματίζουν διαφορετικούς ρόλους στην εντερική ανοσία. Για παράδειγμα τα ρυθμιστικού τύπου 1 (Tr1) CCR9⁺ T λεμφοκύτταρα πιθανόν να παίζουν σημαντικό ρόλο στην εντερική ομοιοστασία με την αποφυγή της ανάπτυξης παθολογικών ανοσολογικών αντιδράσεων σε τροφικά ή μη παθογόνα βακτηριδιακά αντιγόνα. Απο την άλλη μεριά η ύπαρξη CCR9⁺ T λεμφοκυττάρων που παράγουν μεγάλες ποσότητες ΙΦΝ-γ (Th1) μπορεί να συμβάλλει στην ανάπτυξη αποτελεσματικής ανοσίας έναντι παθογόνων βακτηριδίων ή ιών. Δεν είναι ακόμα κατανοητό πως αυτή η λεπτή ισορροπία μεταξύ ρυθμιστικών και βοηθητικών τύπου 1 ανοσολογικών αντιδράσεων διατηρείται στο έντερο ούτως ώστε να αποφευχθεί η ανάπτυξη χρόνιας φλεγμονώδους εντεροπάθειας. Είναι πιθανόν ότι διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των ρυθμιστικών και βοηθητικών τύπου 1 CCR9⁺ T λεμφοκυττάρων μπορεί να παρατηρηθεί σε ασθενείς με νόσο του Crohn στο λεπτό έντερο. Παιρетаίρω μελέτες χρειάζονται προκειμένου να αναλυθεί η παραγωγή κυτταροκινών από τα CCR9⁺ T λεμφοκύτταρα σε ασθενείς με νόσο του Crohn του λεπτού εντέρου και να συγκριθεί με αυτή των ασθενών με νόσο του Crohn στο παχύ έντερο.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η δημιουργία ρυθμιστικών τύπου 1 T λεμφοκυττάρων έχει περιγραφεί *in vitro* με διάφορες μεθόδους.^{97, 267} Για παράδειγμα η διαφοροποίηση των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων υπό την επίρεια της ΙΛ-10 οδηγεί στην παραγωγή ρυθμιστικών τύπου 1

λεμφοκυττάρων που παράγουν αυξημένη ποσότητα ΙΛ-10, μικρής ποσότητας ΙΛ-2 αλλά όχι ΙΛ-4.⁹⁷ Τα ρυθμιστικά αυτά Τ λεμφοκύτταρα έχουν την ιδιότητα να καταστρίβουν την ανοσολογική αντίδραση σε συγκεκριμένα αντιγόνα και να θεραπεύσουν πειραματική κολίτιδα.⁹⁷ Η ανάπτυξη ρυθμιστικών τύπου 1 Τ λεμφοκυττάρων *in vitro* έχει επίσης περιγραφεί μετά από την διαφοροποίηση τους με ανώριμα δενδριτικά κύτταρα ή με αντισώματα έναντι του κυτταρικού αντιγόνου CD2 ή CD46 υπό την παρουσία της κυτταροκίνης ΙΛ-2.²⁶⁸⁻²⁷¹ Επίσης η παρουσία στο κυτταρικό διάλυμα δεξαμεθαζόνης, βιταμίνης D3 και αντισωμάτων που απενεργοποιούν την ΙΛ-4 και την ΙΛ-12 (οι δύο αυτές κυτταροκίνες οδηγούν στην διαφοροποίηση τύπου 2 και τύπου 1 βοηθητικών Τ λεμφοκυττάρων, αντίστοιχα), οδηγούν στην διαφοροποίηση των CD4⁺ Τ λεμφοκυττάρων σε ρυθμιστικά τύπου 1 λεμφοκύτταρα.²⁶⁷ Είναι πιθανό ότι στο λεπτό έντερο το ποσοστό των CCR9⁺ Τ λεμφοκυττάρων με χαρακτηριστικά ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων μπορεί να αναπτύσσεται μετά από ενεργοποίηση τους από ανώριμα δενδριτικά κύτταρα και ενεργοποίηση τους μέσω του αντιγόνου CD2 ή CD46. Είναι για παράδειγμα γνωστό ότι σε ποντίκια τα δενδριτικά κύτταρα από τις πλάκες του Peyer έχουν την μοναδική ικανότητα όχι μόνο να οδηγούν στην διαφοροποίηση ρυθμιστικών τύπου 1 και βοηθητικών τύπου 2 Τ λεμφοκυττάρων αλλά και στην διατήρηση της χημειοτακτικής ικανότητας των Τ λεμφοκυττάρων προς την TECK/CCL25 με την έκφραση του χημειούποδοχέα CCR9.^{249, 272} Έτσι τα Τ λεμφοκύτταρα που διαφοροποιούνται υπό την παρουσία δενδριτικών κυττάρων από τις πλάκες του Peyer, έχουν την ικανότητα να εισέλθουν στον εντερικό βλεννογόνο και επιθήλιο του λεπτού, αλλά όχι του παχέως, εντέρου υπό την επίδραση της χημειοκίνης TECK/CCL25 όπως περιγράφηκε προηγουμένως.²⁵⁰

Ένα σημαντικό λειτουργικό χαρακτηριστικό των CCR9⁺ Τ λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος είναι η ικανότητα τους να προκαλούν την έκκριση ανοσοσφαιρινών από τα Β λεμφοκύτταρα σε μεικτή *in vitro* καλλιέργεια. Η ικανότητα τους αυτή πιθανόν να σχετίζεται με την έκφραση στην κυτταρική επιφάνεια τους του αντιγόνου CD40L και την έκκριση της κυτταροκίνης ΙΛ-10. Τα βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα έχουν την ικανότητα να υποστηρίζουν την παραγωγή ανοσοσφαιρινών μέσω του αντιγόνου CD40L που αυξάνεται στην κυτταρική επιφάνεια τους μετά από ενεργοποίηση τους. Επίσης διάφορες κυτταροκίνες συμπεριλαμβανομένου της ΙΛ-10, της ΙΛ-6, της ΙΛ-15, και του TGF-β συμμετέχουν στην παραγωγή και την έκκριση ανοσοσφαιρινών της τάξης γ και α από Β λεμφοκύτταρα.^{273, 274} Το γεγονός ότι τα CCR9⁺ Τ

λεμφοκύτταρα έχουν βοηθητική ικανότητα στην έκκριση ανοσοφαιρινών από τα B λεμφοκύτταρα χωρίς την προηγούμενη ενεργοποίηση τους ή την χορήγηση εξωγενών κυτταροκινών μπορεί να οφείλεται στην ικανότητα τους να ανταποκρίνονται σε ενεργοποίηση μέσω του αντιγόνου CD2. Για παράδειγμα έχειδειχθεί ότι τα B λεμφοκύτταρα μπορεί να ενεργοποιήσουν T λεμφοκύτταρα μέσω επιδράσεων των αντιγόνων LFA-3/CD2 ή LFA-1/ICAM-1.²⁷⁵ Η αλληλεπίδραση αυτή σε μεικτή καλλιέργεια B λεμφοκυττάρων με CCR9⁺ T λεμφοκυττάρων μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη έκφραση του CD40L και έκκριση της IL-10 που στην συνέχεια ενεργοποιούν τα B λεμφοκύτταρα για να παράγουν ανοσοσφαιρίνες. Παιρεταίρω μελέτες χρειάζονται για να κατανοηθεί ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο τα CCR9⁺ T λεμφοκύτταρα βοηθούν στην έκκριση αντισωμάτων από τα B λεμφοκύτταρα.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1) Η χημειοκίνη TECK/CCL25 εκφράζεται επιλεκτικά στο λεπτό έντερο και ο υποδοχέας της CCR9 εκφράζεται σε T λεμφοκύτταρα με χαρακτηριστική τάση να προσελκύνονται στον εντερικό βλεννογόνο του λεπτού εντέρου.

Η επιλεκτική παραγωγή της χημειοκίνης TECK/CCL25 στο λεπτό έντερο και τα αποτελέσματα των χημειοτακτικών μελετών έδειξαν ότι η TECK/CCL25 συμβάλλει στην προσέλκυση των T λεμφοκυττάρων που εκφράζουν τον υποδοχέα CCR9 στο λεπτό έντερο. Η υπόθεση αυτή έχει αποδειχθεί πρόσφατα με πειραματικά δεδομένα στον ποντικό. Συνεπώς η χημειοκίνη TECK/CCL25 και ο υποδοχέας CCR9 χαρακτηρίζουν το λεπτό έντερο όσον αφορά την χημειοτακτική προσέλκυση και τμηματοποίηση των ανοσολογικών αντιδράσεων του οργάνου και του διαχωρισμού του από τις ανοσολογικές αντιδράσεις του παχέως εντέρου.

2) Οι αλλαγές στην έκφραση της χημειοκίνης TECK/CCL25 και του υποδοχέα CCR9 υποδηλώνουν την συμμετοχή τους στην παθογένεια της νόσου του Crohn στο λεπτό έντερο. Η αυξημένη παραγωγή της χημειοκίνης TECK/CCL25 στους φλεγμονώδεις ιστούς του λεπτού εντέρου στην νόσο του Crohn και η αυξημένη συχνότητα των CCR9⁺ T λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα των ασθενών με νόσο του Crohn του λεπτού εντέρου ή με κοιλιοκάκη υποδηλώνουν την συμμετοχή τους στην παθογένεια των φλεγμονοδών νόσων του λεπτού εντέρου.

3) Τα CCR9⁺ T λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος από υγιείς μάρτυρες έχουν χαρακτηριστικά εντερικών T λεμφοκυττάρων.

Τα λειτουργικά χαρακτηριστικά και ο φαινότυπος του μικρού ποσοστού των CCR9⁺ T λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα από υγιείς μάρτυρες δείχνει ότι τα λεμφοκύτταρα αυτά έχουν χαρακτηριστικά εντερικών λεμφοκυττάρων τα οποία παράγονται συνεχώς στους εντερικούς λεμφικούς ιστούς και παροδικά εντοπίζονται στην κυκλοφορία του αίματος.

VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998; 115:182-205.
2. Keighley MR, Stockbrugger RW. Inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2003; 18 Suppl 3:66-70.
3. Papadakis KA, Targan SR. Current theories on the causes of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology Clinics of North America* 1999; 28:283-96.
4. Loftus EV, Jr., Sandborn WJ. Epidemiology of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology Clinics of North America* 2002; 31:1-20.
5. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease.[see comment]. *New England Journal of Medicine* 2002; 347:417-29.
6. Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sorensen IA, Binder V. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *New England Journal of Medicine* 1991; 324:84-8.
7. Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G, Floderus-Myrhed B. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut* 1988; 29:990-6.
8. Bonen DK, Cho JH. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2003; 124:521-36.
9. Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, et al. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16.[see comment]. *Nature* 1996; 379:821-3.
10. Armuzzi A, Ahmad T, Ling KL, et al. Genotype-phenotype analysis of the Crohn's disease susceptibility haplotype on chromosome 5q31. *Gut* 2003; 52:1133-9.
11. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease.[see comment]. *Nature* 2001; 411:603-6.
12. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease.[see comment]. *Nature* 2001; 411:599-603.
13. Lala S, Ogura Y, Osborne C, et al. Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells. *Gastroenterology* 2003; 125:47-57.
14. Girardin SE, Boneca IG, Viala J, et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278:8869-72.
15. Sellon RK, Tonkonogy S, Schultz M, et al. Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infection & Immunity* 1998; 66:5224-31.
16. D'Haens GR, Geboes K, Peeters M, Baert F, Penninckx F, Rutgeerts P. Early lesions of recurrent Crohn's disease caused by infusion of intestinal contents in excluded ileum.[see comment]. *Gastroenterology* 1998; 114:262-7.
17. Evans JM, McMahon AD, Murray FE, McDevitt DG, MacDonald TM. Non-steroidal anti-inflammatory drugs are associated with emergency admission to hospital for colitis due to inflammatory bowel disease.[see comment]. *Gut* 1997; 40:619-22.
18. Lindberg E, Tysk C, Andersson K, Jarnerot G. Smoking and inflammatory bowel disease. A case control study. *Gut* 1988; 29:352-7.
19. Kirsner JB, Shorter RG. Recent developments in "nonspecific" inflammatory bowel disease (first of two parts). *New England Journal of Medicine* 1982; 306:775-85.
20. Ament ME. Inflammatory disease of the colon: ulcerative colitis and Crohn's colitis. *Journal of Pediatrics* 1975; 86:322-34.
21. Kleer CG, Appelman HD. Surgical pathology of Crohn's disease. *Surgical Clinics of North America* 2001; 81:13-30.
22. Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJ, et al. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *New England Journal of Medicine* 1997; 337:1029-35.
23. Papadakis KA, Targan SR. Tumor necrosis factor: biology and therapeutic inhibitors. *Gastroenterology* 2000; 119:1148-57.

24. Monteleone G, MacDonald TT, Wathen NC, Pallone F, Pender SL. Enhancing Lamina propria Th1 cell responses with interleukin 12 produces severe tissue injury.[see comment]. *Gastroenterology* 1999; 117:1069-77.
25. Papadakis KA, Prehn J, Nelson V, et al. The role of thymus-expressed chemokine and its receptor CCR9 on lymphocytes in the regional specialization of the mucosal immune system. *Journal of Immunology* 2000; 165:5069-76.
26. Casini-Raggi V, Kam L, Chong YJ, Fiocchi C, Pizarro TT, Cominelli F. Mucosal imbalance of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. A novel mechanism of chronic intestinal inflammation. *Journal of Immunology* 1995; 154:2434-40.
27. Orazi A, Du X, Yang Z, Kashai M, Williams DA. Interleukin-11 prevents apoptosis and accelerates recovery of small intestinal mucosa in mice treated with combined chemotherapy and radiation. *Laboratory Investigation* 1996; 75:33-42.
28. Papadakis KA, Targan SR. Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Annual Review of Medicine* 2000; 51:289-98.
29. Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, et al. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *Journal of Immunology* 1996; 157:1261-70.
30. Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *New England Journal of Medicine* 1996; 334:1717-25.
31. Marini M, Bamias G, Rivera-Nieves J, et al. TNF-alpha neutralization ameliorates the severity of murine Crohn's-like ileitis by abrogation of intestinal epithelial cell apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003; 100:8366-71.
32. Pizarro TT, Arseneau KO, Cominelli F. Lessons from genetically engineered animal models XI. Novel mouse models to study pathogenic mechanisms of Crohn's disease. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal & Liver Physiology* 2000; 278:G665-9.
33. Neurath MF, Fuss I, Pasparakis M, et al. Predominant pathogenic role of tumor necrosis factor in experimental colitis in mice. *European Journal of Immunology* 1997; 27:1743-50.
34. Kontoyiannis D, Pasparakis M, Pizarro TT, Cominelli F, Kollias G. Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies. *Immunity* 1999; 10:387-98.
35. Kontoyiannis D, Boulougouris G, Manoloukos M, et al. Genetic dissection of the cellular pathways and signaling mechanisms in modeled tumor necrosis factor-induced Crohn's-like inflammatory bowel disease. *Journal of Experimental Medicine* 2002; 196:1563-74.
36. Braegger CP, Nicholls S, Murch SH, Stephens S, MacDonald TT. Tumour necrosis factor alpha in stool as a marker of intestinal inflammation.[see comment]. *Lancet* 1992; 339:89-91.
37. Dionne S, Hiscott J, D'Agata I, Duhaime A, Seidman EG. Quantitative PCR analysis of TNF-alpha and IL-1 beta mRNA levels in pediatric IBD mucosal biopsies. *Digestive Diseases & Sciences* 1997; 42:1557-66.
38. Saiki T, Mitsuyama K, Toyonaga A, Ishida H, Tanikawa K. Detection of pro- and anti-inflammatory cytokines in stools of patients with inflammatory bowel disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1998; 33:616-22.
39. Probert CS, Hearing SD, Schreiber S, et al. Infliximab in moderately severe glucocorticoid resistant ulcerative colitis: a randomised controlled trial. *Gut* 2003; 52:998-1002.
40. Gately MK, Renzetti LM, Magram J, et al. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annual Review of Immunology* 1998; 16:495-521.
41. Stuber E, Strober W, Neurath M. Blocking the CD40L-CD40 interaction in vivo specifically prevents the priming of T helper 1 cells through the inhibition of interleukin 12 secretion. *Journal of Experimental Medicine* 1996; 183:693-8.
42. Mailliard RB, Egawa S, Cai Q, et al. Complementary dendritic cell-activating function of CD8+ and CD4+ T cells: helper role of CD8+ T cells in the development of T helper type 1 responses. *Journal of Experimental Medicine* 2002; 195:473-83.
43. Monteleone G, Biancone L, Marasco R, et al. Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's disease intestinal lamina propria mononuclear cells. *Gastroenterology* 1997; 112:1169-78.

44. Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Stuber E, Strober W. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *Journal of Experimental Medicine* 1995; 182:1281-90.
45. Fuss IJ, Marth T, Neurath MF, Pearlstein GR, Jain A, Strober W. Anti-interleukin 12 treatment regulates apoptosis of Th1 T cells in experimental colitis in mice.[see comment]. *Gastroenterology* 1999; 117:1078-88.
46. Davidson NJ, Hudak SA, Lesley RE, Menon S, Leach MW, Rennick DM. IL-12, but not IFN-gamma, plays a major role in sustaining the chronic phase of colitis in IL-10-deficient mice. *Journal of Immunology* 1998; 161:3143-9.
47. Simpson SJ, Shah S, Comiskey M, et al. T cell-mediated pathology in two models of experimental colitis depends predominantly on the interleukin 12/Signal transducer and activator of transcription (Stat)-4 pathway, but is not conditional on interferon gamma expression by T cells. *Journal of Experimental Medicine* 1998; 187:1225-34.
48. Boirivant M, Fuss IJ, Chu A, Strober W. Oxazolone colitis: A murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4. *Journal of Experimental Medicine* 1998; 188:1929-39.
49. Becher B, Durell BG, Noelle RJ. IL-23 produced by CNS-resident cells controls T cell encephalitogenicity during the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Clinical Investigation* 2003; 112:1186-91.
50. Zhang GX, Gran B, Yu S, et al. Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in IL-12 receptor-beta 2-deficient mice: IL-12 responsiveness is not required in the pathogenesis of inflammatory demyelination in the central nervous system. *Journal of Immunology* 2003; 170:2153-60.
51. Oppmann B, Lesley R, Blom B, et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 2000; 13:715-25.
52. Dao T, Ohashi K, Kayano T, Kurimoto M, Okamura H. Interferon-gamma-inducing factor, a novel cytokine, enhances Fas ligand-mediated cytotoxicity of murine T helper 1 cells. *Cellular Immunology* 1996; 173:230-5.
53. Puren AJ, Fantuzzi G, Gu Y, Su MS, Dinarello CA. Interleukin-18 (IFN-gamma-inducing factor) induces IL-8 and IL-1beta via TNFalpha production from non-CD14+ human blood mononuclear cells. *Journal of Clinical Investigation* 1998; 101:711-21.
54. Pizarro TT, Michie MH, Bentz M, et al. IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells. *Journal of Immunology* 1999; 162:6829-35.
55. Monteleone G, Trapasso F, Parrello T, et al. Bioactive IL-18 expression is up-regulated in Crohn's disease. *Journal of Immunology* 1999; 163:143-7.
56. Okazawa A, Kanai T, Watanabe M, et al. Th1-mediated intestinal inflammation in Crohn's disease may be induced by activation of lamina propria lymphocytes through synergistic stimulation of interleukin-12 and interleukin-18 without T cell receptor engagement. *American Journal of Gastroenterology* 2002; 97:3108-17.
57. Chikano S, Sawada K, Shimoyama T, et al. IL-18 and IL-12 induce intestinal inflammation and fatty liver in mice in an IFN-gamma dependent manner.[see comment]. *Gut* 2000; 47:779-86.
58. Wiekowski MT, Leach MW, Evans EW, et al. Ubiquitous transgenic expression of the IL-23 subunit p19 induces multiorgan inflammation, runting, infertility, and premature death. *Journal of Immunology* 2001; 166:7563-70.
59. Boirivant M, Pica R, DeMaria R, Testi R, Pallone F, Strober W. Stimulated human lamina propria T cells manifest enhanced Fas-mediated apoptosis. *Journal of Clinical Investigation* 1996; 98:2616-22.
60. Ciacci C, Mahida YR, Dignass A, Koizumi M, Podolsky DK. Functional interleukin-2 receptors on intestinal epithelial cells. *Journal of Clinical Investigation* 1993; 92:527-32.
61. Dignass AU, Podolsky DK. Interleukin 2 modulates intestinal epithelial cell function in vitro. *Experimental Cell Research* 1996; 225:422-9.
62. Ma A, Datta M, Margosian E, Chen J, Horak I. T cells, but not B cells, are required for bowel inflammation in interleukin 2-deficient mice. *Journal of Experimental Medicine* 1995; 182:1567-72.

63. Yang F, de Villiers WJ, Lee EY, McClain CJ, Varilek GW. Increased nuclear factor-kappaB activation in colitis of interleukin-2-deficient mice. *Journal of Laboratory & Clinical Medicine* 1999; 134:378-85.
64. Schimpl A, Berberich I, Kneitz B, et al. IL-2 and autoimmune disease. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2002; 13:369-78.
65. Mullin GE, Lazenby AJ, Harris ML, Bayless TM, James SP. Increased interleukin-2 messenger RNA in the intestinal mucosal lesions of Crohn's disease but not ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1992; 102:1620-7.
66. Breese E, Braegger CP, Corrigan CJ, Walker-Smith JA, MacDonald TT. Interleukin-2- and interferon-gamma-secreting T cells in normal and diseased human intestinal mucosa. *Immunology* 1993; 78:127-31.
67. Shinoda M, Haruta J, Tanimoto M, et al. Lamina propria mononuclear cells express and respond to interleukin-2 differently in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Internal Medicine* 1996; 35:679-85.
68. Gurbindo C, Sabbah S, Menezes J, Justinich C, Marchand R, Seidman EG. Interleukin-2 production in pediatric inflammatory bowel disease: evidence for dissimilar mononuclear cell function in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition* 1993; 17:247-54.
69. Stallmach A, Wittig B, Giese T, et al. Protection of trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis by an interleukin 2-IgG2b fusion protein in mice. *Gastroenterology* 1999; 117:866-76.
70. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annual Review of Immunology* 1997; 15:749-95.
71. Youakim A, Ahdieh M. Interferon-gamma decreases barrier function in T84 cells by reducing ZO-1 levels and disrupting apical actin. *American Journal of Physiology* 1999; 276:G1279-88.
72. Warhurst AC, Hopkins SJ, Warhurst G. Interferon gamma induces differential upregulation of alpha and beta chemokine secretion in colonic epithelial cell lines. *Gut* 1998; 42:208-13.
73. Kolios G, Wright KL, Jordan NJ, Leithead JB, Robertson DA, Westwick J. C-X-C and C-C chemokine expression and secretion by the human colonic epithelial cell line, HT-29: differential effect of T lymphocyte-derived cytokines. *European Journal of Immunology* 1999; 29:530-6.
74. Bregenholt S, Reimann J, Claesson MH. Proliferation and apoptosis of lamina propria CD4+ T cells from scid mice with inflammatory bowel disease. *European Journal of Immunology* 1998; 28:3655-63.
75. Hornquist CE, Lu X, Rogers-Fani PM, et al. G(alpha)i2-deficient mice with colitis exhibit a local increase in memory CD4+ T cells and proinflammatory Th1-type cytokines. *Journal of Immunology* 1997; 158:1068-77.
76. Rennick DM, Fort MM, Davidson NJ. Studies with IL-10-/- mice: an overview. *Journal of Leukocyte Biology* 1997; 61:389-96.
77. Iijima H, Takahashi I, Kishi D, et al. Alteration of interleukin 4 production results in the inhibition of T helper type 2 cell-dominated inflammatory bowel disease in T cell receptor alpha chain-deficient mice. *Journal of Experimental Medicine* 1999; 190:607-15.
78. Kosiewicz MM, Nast CC, Krishnan A, et al. Th1-type responses mediate spontaneous ileitis in a novel murine model of Crohn's disease.[see comment]. *Journal of Clinical Investigation* 2001; 107:695-702.
79. Mizoguchi A, Mizoguchi E, Bhan AK. The critical role of interleukin 4 but not interferon gamma in the pathogenesis of colitis in T-cell receptor alpha mutant mice. *Gastroenterology* 1999; 116:320-6.
80. Noguchi M, Hiwatashi N, Liu Z, Toyota T. Enhanced interferon-gamma production and B7-2 expression in isolated intestinal mononuclear cells from patients with Crohn's disease. *Journal of Gastroenterology* 1995; 30 Suppl 8:52-5.
81. Desreumaux P, Brandt E, Gambiez L, et al. Distinct cytokine patterns in early and chronic ileal lesions of Crohn's disease. *Gastroenterology* 1997; 113:118-26.
82. Neumann B, Luz A, Pfeffer K, Holzmann B. Defective Peyer's patch organogenesis in mice lacking the 55-kD receptor for tumor necrosis factor. *Journal of Experimental Medicine* 1996; 184:259-64.

83. Gramaglia I, Mauri DN, Miner KT, Ware CF, Croft M. Lymphotoxin alphabeta is expressed on recently activated naive and Th1-like CD4 cells but is down-regulated by IL-4 during Th2 differentiation. *Journal of Immunology* 1999; 162:1333-8.
84. Cuff CA, Schwartz J, Bergman CM, Russell KS, Bender JR, Ruddle NH. Lymphotoxin alpha3 induces chemokines and adhesion molecules: insight into the role of LT alpha in inflammation and lymphoid organ development. *Journal of Immunology* 1998; 161:6853-60.
85. Mackay F, Browning JL, Lawton P, et al. Both the lymphotoxin and tumor necrosis factor pathways are involved in experimental murine models of colitis. *Gastroenterology* 1998; 115:1464-75.
86. Kolios G, Robertson DA, Jordan NJ, et al. Interleukin-8 production by the human colon epithelial cell line HT-29: modulation by interleukin-13. *British Journal of Pharmacology* 1996; 119:351-9.
87. Kolios G, Rooney N, Murphy CT, Robertson DA, Westwick J. Expression of inducible nitric oxide synthase activity in human colon epithelial cells: modulation by T lymphocyte derived cytokines. *Gut* 1998; 43:56-63.
88. Luger N, Kucharzik T, Stein H, et al. IL-10 synergizes with IL-4 and IL-13 in inhibiting lysosomal enzyme secretion by human monocytes and lamina propria mononuclear cells from patients with inflammatory bowel disease. *Digestive Diseases & Sciences* 1998; 43:706-14.
89. Kucharzik T, Luger N, Weigelt H, Adolf M, Domschke W, Stoll R. Immunoregulatory properties of IL-13 in patients with inflammatory bowel disease; comparison with IL-4 and IL-10. *Clinical & Experimental Immunology* 1996; 104:483-90.
90. Schreiber S, Heinig T, Panzer U, et al. Impaired response of activated mononuclear phagocytes to interleukin 4 in inflammatory bowel disease.[see comment]. *Gastroenterology* 1995; 108:21-33.
91. West GA, Matsuura T, Levine AD, Klein JS, Fiocchi C. Interleukin 4 in inflammatory bowel disease and mucosal immune reactivity. *Gastroenterology* 1996; 110:1683-95.
92. Nielsen OH, Koppen T, Rudiger N, Horn T, Eriksen J, Kirman I. Involvement of interleukin-4 and -10 in inflammatory bowel disease. *Digestive Diseases & Sciences* 1996; 41:1786-93.
93. Heller F, Fuss IJ, Nieuwenhuis EE, Blumberg RS, Strober W. Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells. *Immunity* 2002; 17:629-38.
94. Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annual Review of Immunology* 1993; 11:165-90.
95. de Vries JE. Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of interleukin 10. *Annals of Medicine* 1995; 27:537-41.
96. Ebert EC. IL-10 enhances IL-2-induced proliferation and cytotoxicity by human intestinal lymphocytes. *Clinical & Experimental Immunology* 2000; 119:426-32.
97. Groux H, O'Garra A, Bigler M, et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997; 389:737-42.
98. Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *Journal of Experimental Medicine* 1999; 190:995-1004.
99. Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis.[see comment]. *Cell* 1993; 75:263-74.
100. Berg DJ, Davidson N, Kuhn R, et al. Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. *Journal of Clinical Investigation* 1996; 98:1010-20.
101. Kawachi S, Cockrell A, Laroux FS, et al. Role of inducible nitric oxide synthase in the regulation of VCAM-1 expression in gut inflammation. *American Journal of Physiology* 1999; 277:G572-6.
102. Davidson NJ, Leach MW, Fort MM, et al. T helper cell 1-type CD4+ T cells, but not B cells, mediate colitis in interleukin 10-deficient mice. *Journal of Experimental Medicine* 1996; 184:241-51.
103. Murata Y, Ishiguro Y, Itoh J, Munakata A, Yoshida Y. The role of proinflammatory and immunoregulatory cytokines in the pathogenesis of ulcerative colitis. *Journal of Gastroenterology* 1995; 30 Suppl 8:56-60.

104. Niessner M, Volk BA. Altered Th1/Th2 cytokine profiles in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease as assessed by quantitative reversed transcribed polymerase chain reaction (RT-PCR). *Clinical & Experimental Immunology* 1995; 101:428-35.
105. Autschbach F, Braunstein J, Helmke B, et al. In situ expression of interleukin-10 in noninflamed human gut and in inflammatory bowel disease. *American Journal of Pathology* 1998; 153:121-30.
106. Schreiber S, Fedorak RN, Nielsen OH, et al. Safety and efficacy of recombinant human interleukin 10 in chronic active Crohn's disease. Crohn's Disease IL-10 Cooperative Study Group.[see comment]. *Gastroenterology* 2000; 119:1461-72.
107. Fedorak RN, Gangl A, Elson CO, et al. Recombinant human interleukin 10 in the treatment of patients with mild to moderately active Crohn's disease. The Interleukin 10 Inflammatory Bowel Disease Cooperative Study Group.[see comment]. *Gastroenterology* 2000; 119:1473-82.
108. Walz A, Peveri P, Aschauer H, Baggiolini M. Purification and amino acid sequencing of NAF, a novel neutrophil-activating factor produced by monocytes. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 1987; 149:755-61.
109. Yoshimura T, Matsushima K, Tanaka S, et al. Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1987; 84:9233-7.
110. Matsushima K, Larsen CG, DuBois GC, Oppenheim JJ. Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line. *Journal of Experimental Medicine* 1989; 169:1485-90.
111. Schall TJ, Bacon K, Toy KJ, Goeddel DV. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* 1990; 347:669-71.
112. Jose PJ, Griffiths-Johnson DA, Collins PD, et al. Eotaxin: a potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation. *Journal of Experimental Medicine* 1994; 179:881-7.
113. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000; 12:121-7.
114. Hebert CA, Vitangcol RV, Baker JB. Scanning mutagenesis of interleukin-8 identifies a cluster of residues required for receptor binding. *Journal of Biological Chemistry* 1991; 266:18989-94.
115. Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *New England Journal of Medicine* 1998; 338:436-45.
116. Gunn MD, Ngo VN, Ansel KM, Eklund EH, Cyster JG, Williams LT. A B-cell-homing chemokine made in lymphoid follicles activates Burkitt's lymphoma receptor-1. *Nature* 1998; 391:799-803.
117. Mazzucchelli L, Blaser A, Kappeler A, et al. BCA-1 is highly expressed in Helicobacter pylori-induced mucosa-associated lymphoid tissue and gastric lymphoma.[see comment]. *Journal of Clinical Investigation* 1999; 104:R49-54.
118. Horuk R. The interleukin-8-receptor family: from chemokines to malaria. *Immunology Today* 1994; 15:169-74.
119. Nibbs RJ, Wylie SM, Pragnell IB, Graham GJ. Cloning and characterization of a novel murine beta chemokine receptor, D6. Comparison to three other related macrophage inflammatory protein-1alpha receptors, CCR-1, CCR-3, and CCR-5. *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272:12495-504.
120. Foxman EF, Campbell JJ, Butcher EC. Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis. *Journal of Cell Biology* 1997; 139:1349-60.
121. Imai T, Baba M, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Yoshie O. The T cell-directed CC chemokine TARC is a highly specific biological ligand for CC chemokine receptor 4. *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272:15036-42.
122. Imai T, Chantry D, Raport CJ, et al. Macrophage-derived chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor 4. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273:1764-8.
123. Yoshida R, Nagira M, Kitaura M, Imagawa N, Imai T, Yoshie O. Secondary lymphoid-tissue chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor CCR7. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273:7118-22.

124. Campbell JJ, Bowman EP, Murphy K, et al. 6-C-kine (SLC), a lymphocyte adhesion-triggering chemokine expressed by high endothelium, is an agonist for the MIP-3beta receptor CCR7. *Journal of Cell Biology* 1998; 141:1053-9.
125. Bleul CC, Farzan M, Choe H, et al. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 1996; 382:829-33.
126. Zaballos A, Gutierrez J, Varona R, Ardavin C, Marquez G. Cutting edge: identification of the orphan chemokine receptor GPR-9-6 as CCR9, the receptor for the chemokine TECK. *Journal of Immunology* 1999; 162:5671-5.
127. Baba M, Imai T, Nishimura M, et al. Identification of CCR6, the specific receptor for a novel lymphocyte-directed CC chemokine LARC. *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272:14893-8.
128. Yoshida T, Imai T, Kakizaki M, Nishimura M, Takagi S, Yoshie O. Identification of single C motif-1/lymphotactin receptor XCR1. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273:16551-4.
129. Imai T, Hieshima K, Haskell C, et al. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell* 1997; 91:521-30.
130. Morohashi H, Miyawaki T, Nomura H, et al. Expression of both types of human interleukin-8 receptors on mature neutrophils, monocytes, and natural killer cells. *Journal of Leukocyte Biology* 1995; 57:180-7.
131. Horuk R, Martin AW, Wang Z, et al. Expression of chemokine receptors by subsets of neurons in the central nervous system. *Journal of Immunology* 1997; 158:2882-90.
132. Sozzani S, Allavena P, D'Amico G, et al. Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *Journal of Immunology* 1998; 161:1083-6.
133. Sallusto F, Kremmer E, Palermo B, et al. Switch in chemokine receptor expression upon TCR stimulation reveals novel homing potential for recently activated T cells. *European Journal of Immunology* 1999; 29:2037-45.
134. Sallusto F, Lenig D, Mackay CR, Lanzavecchia A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine* 1998; 187:875-83.
135. Campbell JJ, Haraldsen G, Pan J, et al. The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells. *Nature* 1999; 400:776-80.
136. Homey B, Alenius H, Muller A, et al. CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation.[comment]. *Nature Medicine* 2002; 8:157-65.
137. Boisvert WA, Santiago R, Curtiss LK, Terkeltaub RA. A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR-2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor-deficient mice. *Journal of Clinical Investigation* 1998; 101:353-63.
138. Chuntharapai A, Lee J, Hebert CA, Kim KJ. Monoclonal antibodies detect different distribution patterns of IL-8 receptor A and IL-8 receptor B on human peripheral blood leukocytes. *Journal of Immunology* 1994; 153:5682-8.
139. Lee J, Horuk R, Rice GC, Bennett GL, Camerato T, Wood WI. Characterization of two high affinity human interleukin-8 receptors. *Journal of Biological Chemistry* 1992; 267:16283-7.
140. Loetscher P, Seitz M, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B. Both interleukin-8 receptors independently mediate chemotaxis. Jurkat cells transfected with IL-8R1 or IL-8R2 migrate in response to IL-8, GRO alpha and NAP-2. *FEBS Letters* 1994; 341:187-92.
141. Ahuja SK, Murphy PM. The CXC chemokines growth-regulated oncogene (GRO) alpha, GRObeta, GROgamma, neutrophil-activating peptide-2, and epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide-78 are potent agonists for the type B, but not the type A, human interleukin-8 receptor. *Journal of Biological Chemistry* 1996; 271:20545-50.
142. Lee J, Cacalano G, Camerato T, Toy K, Moore MW, Wood WI. Chemokine binding and activities mediated by the mouse IL-8 receptor. *Journal of Immunology* 1995; 155:2158-64.
143. Bozic CR, Gerard NP, von Uexkull-Guldenband C, et al. The murine interleukin 8 type B receptor homologue and its ligands. Expression and biological characterization. *Journal of Biological Chemistry* 1994; 269:29355-8.
144. Cacalano G, Lee J, Kikly K, et al. Neutrophil and B cell expansion in mice that lack the murine IL-8 receptor homolog.[see comment][erratum appears in *Science* 1995 Oct 20;270(5235):365]. *Science* 1994; 265:682-4.

145. Broxmeyer HE, Cooper S, Cacalano G, Hague NL, Bailish E, Moore MW. Involvement of Interleukin (IL) 8 receptor in negative regulation of myeloid progenitor cells in vivo: evidence from mice lacking the murine IL-8 receptor homologue. *Journal of Experimental Medicine* 1996; 184:1825-32.
146. Hammond ME, Lapointe GR, Feucht PH, et al. IL-8 induces neutrophil chemotaxis predominantly via type I IL-8 receptors. *Journal of Immunology* 1995; 155:1428-33.
147. Jones SA, Wolf M, Qin S, Mackay CR, Baggiolini M. Different functions for the interleukin 8 receptors (IL-8R) of human neutrophil leukocytes: NADPH oxidase and phospholipase D are activated through IL-8R1 but not IL-8R2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996; 93:6682-6.
148. Ludwig A, Petersen F, Zahn S, et al. The CXC-chemokine neutrophil-activating peptide-2 induces two distinct optima of neutrophil chemotaxis by differential interaction with interleukin-8 receptors CXCR-1 and CXCR-2. *Blood* 1997; 90:4588-97.
149. Loetscher M, Gerber B, Loetscher P, et al. Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes.[see comment]. *Journal of Experimental Medicine* 1996; 184:963-9.
150. Loetscher M, Loetscher P, Brass N, Meese E, Moser B. Lymphocyte-specific chemokine receptor CXCR3: regulation, chemokine binding and gene localization. *European Journal of Immunology* 1998; 28:3696-705.
151. Qin S, Rottman JB, Myers P, et al. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *Journal of Clinical Investigation* 1998; 101:746-54.
152. Rabin RL, Park MK, Liao F, Swofford R, Stephany D, Farber JM. Chemokine receptor responses on T cells are achieved through regulation of both receptor expression and signaling. *Journal of Immunology* 1999; 162:3840-50.
153. Annunziato F, Cosmi L, Galli G, et al. Assessment of chemokine receptor expression by human Th1 and Th2 cells in vitro and in vivo. *Journal of Leukocyte Biology* 1999; 65:691-9.
154. Trentin L, Agostini C, Facco M, et al. The chemokine receptor CXCR3 is expressed on malignant B cells and mediates chemotaxis. *Journal of Clinical Investigation* 1999; 104:115-21.
155. Sasaki S, Yoneyama H, Suzuki K, et al. Blockade of CXCL10 protects mice from acute colitis and enhances crypt cell survival. *European Journal of Immunology* 2002; 32:3197-205.
156. Singh UP, Singh S, Taub DD, Lillard JW. Inhibition of IFN-gamma-inducible protein-10 abrogates colitis in IL10-/- mice. *Journal of Immunology* 2003; 171:1401-1406.
157. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor.[see comment]. *Science* 1996; 272:872-7.
158. Zaitseva M, Blauvelt A, Lee S, et al. Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection.[see comment]. *Nature Medicine* 1997; 3:1369-75.
159. Zaitseva MB, Lee S, Rabin RL, et al. CXCR4 and CCR5 on human thymocytes: biological function and role in HIV-1 infection. *Journal of Immunology* 1998; 161:3103-13.
160. Bleul CC, Wu L, Hoxie JA, Springer TA, Mackay CR. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes.[see comment]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997; 94:1925-30.
161. Hesselgesser J, Halks-Miller M, DelVecchio V, et al. CD4-independent association between HIV-1 gp120 and CXCR4: functional chemokine receptors are expressed in human neurons. *Current Biology* 1997; 7:112-21.
162. Loetscher M, Amara A, Oberlin E, et al. TYMSTR, a putative chemokine receptor selectively expressed in activated T cells, exhibits HIV-1 coreceptor function. *Current Biology* 1997; 7:652-60.
163. Amara A, Gall SL, Schwartz O, et al. HIV coreceptor downregulation as antiviral principle: SDF-1alpha-dependent internalization of the chemokine receptor CXCR4 contributes to inhibition of HIV replication. *Journal of Experimental Medicine* 1997; 186:139-46.
164. Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, et al. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract.[see comment]. *Nature* 1998; 393:591-4.

165. Ma Q, Jones D, Borghesani PR, et al. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998; 95:9448-53.
166. Forster R, Mattis AE, Kremmer E, Wolf E, Brem G, Lipp M. A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. *Cell* 1996; 87:1037-47.
167. Legler DF, Loetscher M, Roos RS, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B. B cell-attracting chemokine 1, a human CXC chemokine expressed in lymphoid tissues, selectively attracts B lymphocytes via BLR1/CXCR5. *Journal of Experimental Medicine* 1998; 187:655-60.
168. Samson M, Soularue P, Vassart G, Parmentier M. The genes encoding the human CC-chemokine receptors CC-CKR1 to CC-CKR5 (CMKBR1-CMKBR5) are clustered in the p21.3-p24 region of chromosome 3. *Genomics* 1996; 36:522-6.
169. Su SB, Mukaida N, Wang J, Nomura H, Matsushima K. Preparation of specific polyclonal antibodies to a C-C chemokine receptor, CCR1, and determination of CCR1 expression on various types of leukocytes. *Journal of Leukocyte Biology* 1996; 60:658-66.
170. Proudfoot AE, Power CA, Hoogewerf AJ, et al. Extension of recombinant human RANTES by the retention of the initiating methionine produces a potent antagonist. *Journal of Biological Chemistry* 1996; 271:2599-603.
171. Simmons G, Clapham PR, Picard L, et al. Potent inhibition of HIV-1 infectivity in macrophages and lymphocytes by a novel CCR5 antagonist. *Science* 1997; 276:276-9.
172. Gao JL, Wynn TA, Chang Y, et al. Impaired host defense, hematopoiesis, granulomatous inflammation and type 1-type 2 cytokine balance in mice lacking CC chemokine receptor 1. *Journal of Experimental Medicine* 1997; 185:1959-68.
173. Gerard C, Frossard JL, Bhatia M, et al. Targeted disruption of the beta-chemokine receptor CCR1 protects against pancreatitis-associated lung injury. *Journal of Clinical Investigation* 1997; 100:2022-7.
174. Topham PS, Csizmadia V, Soler D, et al. Lack of chemokine receptor CCR1 enhances Th1 responses and glomerular injury during nephrotoxic nephritis. *Journal of Clinical Investigation* 1999; 104:1549-57.
175. Gao W, Topham PS, King JA, et al. Targeting of the chemokine receptor CCR1 suppresses development of acute and chronic cardiac allograft rejection. *Journal of Clinical Investigation* 2000; 105:35-44.
176. Cook DN, Beck MA, Coffman TM, et al. Requirement of MIP-1 alpha for an inflammatory response to viral infection. *Science* 1995; 269:1583-5.
177. Kennedy KJ, Strieter RM, Kunkel SL, Lukacs NW, Karpus WJ. Acute and relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis are regulated by differential expression of the CC chemokines macrophage inflammatory protein-1alpha and monocyte chemoattractant protein-1. *Journal of Neuroimmunology* 1998; 92:98-108.
178. Charo IF, Myers SJ, Herman A, Franci C, Connolly AJ, Coughlin SR. Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994; 91:2752-6.
179. Frade JM, Mellado M, del Real G, Gutierrez-Ramos JC, Lind P, Martinez AC. Characterization of the CCR2 chemokine receptor: functional CCR2 receptor expression in B cells. *Journal of Immunology* 1997; 159:5576-84.
180. Boring L, Gosling J, Chensue SW, et al. Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. *Journal of Clinical Investigation* 1997; 100:2552-61.
181. Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 1998; 394:894-7.
182. Smith MW, Dean M, Carrington M, et al. Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression. Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC), ALIVE Study. *Science* 1997; 277:959-65.

183. Heath H, Qin S, Rao P, et al. Chemokine receptor usage by human eosinophils. The importance of CCR3 demonstrated using an antagonistic monoclonal antibody. *Journal of Clinical Investigation* 1997; 99:178-84.
184. Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science* 1997; 277:2005-7.
185. Yang Y, Loy J, Ryseck RP, Carrasco D, Bravo R. Antigen-induced eosinophilic lung inflammation develops in mice deficient in chemokine eotaxin. *Blood* 1998; 92:3912-23.
186. Choe H, Farzan M, Sun Y, et al. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 1996; 85:1135-48.
187. Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Mantovani A. The role of chemokines in the regulation of dendritic cell trafficking. *Journal of Leukocyte Biology* 1999; 66:1-9.
188. Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, et al. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 1996; 272:1955-8.
189. Loetscher P, Uguccioni M, Bordoli L, et al. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* 1998; 391:344-5.
190. Ajuebor MN, Hogaboam CM, Kunkel SL, Proudfoot AE, Wallace JL. The chemokine RANTES is a crucial mediator of the progression from acute to chronic colitis in the rat. *Journal of Immunology* 2001; 166:552-8.
191. Andres PG, Beck PL, Mizoguchi E, et al. Mice with a selective deletion of the CC chemokine receptors 5 or 2 are protected from dextran sodium sulfate-mediated colitis: lack of CC chemokine receptor 5 expression results in a NK1.1+ lymphocyte-associated Th2-type immune response in the intestine. *Journal of Immunology* 2000; 164:6303-12.
192. Benkirane M, Jin DY, Chun RF, Koup RA, Jeang KT. Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by ccr5delta32. *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272:30603-6.
193. McDermott DH, Zimmerman PA, Guignard F, Kleeberger CA, Leitman SF, Murphy PM. CCR5 promoter polymorphism and HIV-1 disease progression. Multicenter AIDS Cohort Study (MACS). *Lancet* 1998; 352:866-70.
194. Rector A, Vermeire S, Thoelen I, et al. Analysis of the CC chemokine receptor 5 (CCR5) delta-32 polymorphism in inflammatory bowel disease. *Human Genetics* 2001; 108:190-3.
195. Liao F, Lee HH, Farber JM. Cloning of STRL22, a new human gene encoding a G-protein-coupled receptor related to chemokine receptors and located on chromosome 6q27. *Genomics* 1997; 40:175-80.
196. Charbonnier AS, Kohrgruber N, Kriehuber E, Stingl G, Rot A, Maurer D. Macrophage inflammatory protein 3alpha is involved in the constitutive trafficking of epidermal langerhans cells. *Journal of Experimental Medicine* 1999; 190:1755-68.
197. Yang D, Howard OM, Chen Q, Oppenheim JJ. Cutting edge: immature dendritic cells generated from monocytes in the presence of TGF-beta 1 express functional C-C chemokine receptor 6. *Journal of Immunology* 1999; 163:1737-41.
198. Liao F, Rabin RL, Smith CS, Sharma G, Nutman TB, Farber JM. CC-chemokine receptor 6 is expressed on diverse memory subsets of T cells and determines responsiveness to macrophage inflammatory protein 3 alpha. *Journal of Immunology* 1999; 162:186-94.
199. Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, et al. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6.[see comment]. *Science* 1999; 286:525-8.
200. Forster R, Schubel A, Breitfeld D, et al. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 1999; 99:23-33.
201. Schweickart VL, Raport CJ, Godiska R, et al. Cloning of human and mouse EBI1, a lymphoid-specific G-protein-coupled receptor encoded on human chromosome 17q12-q21.2. *Genomics* 1994; 23:643-50.
202. Willimann K, Legler DF, Loetscher M, et al. The chemokine SLC is expressed in T cell areas of lymph nodes and mucosal lymphoid tissues and attracts activated T cells via CCR7. *European Journal of Immunology* 1998; 28:2025-34.
203. Yoshida R, Imai T, Hieshima K, et al. Molecular cloning of a novel human CC chemokine EBI1-ligand chemokine that is a specific functional ligand for EBI1, CCR7. *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272:13803-9.

204. Gunn MD, Kyuwa S, Tam C, et al. Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization.[see comment]. *Journal of Experimental Medicine* 1999; 189:451-60.
205. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions.[see comment]. *Nature* 1999; 401:708-12.
206. Tiffany HL, Lautens LL, Gao JL, et al. Identification of CCR8: a human monocyte and thymus receptor for the CC chemokine I-309. *Journal of Experimental Medicine* 1997; 186:165-70.
207. Roos RS, Loetscher M, Legler DF, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B. Identification of CCR8, the receptor for the human CC chemokine I-309. *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272:17251-4.
208. Zabel BA, Agace WW, Campbell JJ, et al. Human G protein-coupled receptor GPR-9-6/CC chemokine receptor 9 is selectively expressed on intestinal homing T lymphocytes, mucosal lymphocytes, and thymocytes and is required for thymus-expressed chemokine-mediated chemotaxis. *Journal of Experimental Medicine* 1999; 190:1241-56.
209. Vicari AP, Figueroa DJ, Hedrick JA, et al. TECK: a novel CC chemokine specifically expressed by thymic dendritic cells and potentially involved in T cell development. *Immunity* 1997; 7:291-301.
210. Wurbel MA, Malissen M, Guy-Grand D, et al. Mice lacking the CCR9 CC-chemokine receptor show a mild impairment of early T- and B-cell development and a reduction in T-cell receptor gamma delta(+) gut intraepithelial lymphocytes. *Blood* 2001; 98:2626-32.
211. Kunkel EJ, Kim CH, Lazarus NH, et al. CCR10 expression is a common feature of circulating and mucosal epithelial tissue IgA Ab-secreting cells. *Journal of Clinical Investigation* 2003; 111:1001-10.
212. Harrison JK, Barber CM, Lynch KR. cDNA cloning of a G-protein-coupled receptor expressed in rat spinal cord and brain related to chemokine receptors. *Neuroscience Letters* 1994; 169:85-9.
213. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 1997; 385:640-4.
214. Combadiere C, Salzwedel K, Smith ED, Tiffany HL, Berger EA, Murphy PM. Identification of CX3CR1. A chemotactic receptor for the human CX3C chemokine fractalkine and a fusion coreceptor for HIV-1. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273:23799-804.
215. Papadakis KA. Chemokines in inflammatory bowel disease. *Current Allergy & Asthma Reports* 2004; 4:83-9.
216. Kirsner JB, Shorter RG. Recent developments in nonspecific inflammatory bowel disease (second of two parts). *New England Journal of Medicine* 1982; 306:837-48.
217. Bargatze RF, Jutila MA, Butcher EC. Distinct roles of L-selectin and integrins alpha 4 beta 7 and LFA-1 in lymphocyte homing to Peyer's patch-HEV in situ: the multistep model confirmed and refined. *Immunity* 1995; 3:99-108.
218. Bowman EP, Kuklin NA, Youngman KR, et al. The intestinal chemokine thymus-expressed chemokine (CCL25) attracts IgA antibody-secreting cells.[comment]. *Journal of Experimental Medicine* 2002; 195:269-75.
219. Binion DG, West GA, Ina K, Ziats NP, Emancipator SN, Fiocchi C. Enhanced leukocyte binding by intestinal microvascular endothelial cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1997; 112:1895-907.
220. Danese S, de la Motte C, Sturm A, et al. Platelets trigger a CD40-dependent inflammatory response in the microvasculature of inflammatory bowel disease patients. *Gastroenterology* 2003; 124:1249-64.
221. Moser B, Loetscher P. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nature Immunology* 2001; 2:123-8.
222. Ansel KM, Ngo VN, Hyman PL, et al. A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature* 2000; 406:309-14.
223. Carlsen HS, Baekkevold ES, Johansen FE, Haraldsen G, Brandtzaeg P. B cell attracting chemokine 1 (CXCL13) and its receptor CXCR5 are expressed in normal and aberrant gut associated lymphoid tissue. *Gut* 2002; 51:364-71.

224. Tanaka Y, Imai T, Baba M, et al. Selective expression of liver and activation-regulated chemokine (LARC) in intestinal epithelium in mice and humans. *European Journal of Immunology* 1999; 29:633-42.
225. Cook DN, Prosser DM, Forster R, et al. CCR6 mediates dendritic cell localization, lymphocyte homeostasis, and immune responses in mucosal tissue. *Immunity* 2000; 12:495-503.
226. Iwasaki A, Kelsall BL. Localization of distinct Peyer's patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-3alpha, MIP-3beta, and secondary lymphoid organ chemokine. *Journal of Experimental Medicine* 2000; 191:1381-94.
227. Kwon JH, Keates S, Bassani L, Mayer LF, Keates AC. Colonic epithelial cells are a major site of macrophage inflammatory protein 3alpha (MIP-3alpha) production in normal colon and inflammatory bowel disease. *Gut* 2002; 51:818-26.
228. Sierra F, Dubois B, Coste A, Kaiserlian D, Kraehenbuhl JP, Sirard JC. Flagellin stimulation of intestinal epithelial cells triggers CCL20-mediated migration of dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001; 98:13722-7.
229. Varona R, Cadenas V, Flores J, Martinez AC, Marquez G. CCR6 has a non-redundant role in the development of inflammatory bowel disease. *European Journal of Immunology* 2003; 33:2937-46.
230. Agace WW, Amara A, Roberts AI, et al. Constitutive expression of stromal derived factor-1 by mucosal epithelia and its role in HIV transmission and propagation. *Current Biology* 2000; 10:325-8.
231. Reinecker HC, Loh EY, Ringler DJ, Mehta A, Rombeau JL, MacDermott RP. Monocyte-chemoattractant protein 1 gene expression in intestinal epithelial cells and inflammatory bowel disease mucosa. *Gastroenterology* 1995; 108:40-50.
232. MacDermott RP, Sanderson IR, Reinecker HC. The central role of chemokines (chemotactic cytokines) in the immunopathogenesis of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases* 1998; 4:54-67.
233. Muehlhoefer A, Saubermann LJ, Gu X, et al. Fractalkine is an epithelial and endothelial cell-derived chemoattractant for intraepithelial lymphocytes in the small intestinal mucosa. *Journal of Immunology* 2000; 164:3368-76.
234. Lucas AD, Chadwick N, Warren BF, et al. The transmembrane form of the CX3CL1 chemokine fractalkine is expressed predominantly by epithelial cells in vivo. *American Journal of Pathology* 2001; 158:855-66.
235. Kurth I, Willmann K, Schaerli P, Hunziker T, Clark-Lewis I, Moser B. Monocyte selectivity and tissue localization suggests a role for breast and kidney-expressed chemokine (BRAK) in macrophage development. *Journal of Experimental Medicine* 2001; 194:855-61.
236. Grimm MC, Elsbury SK, Pavli P, Doe WF. Enhanced expression and production of monocyte chemoattractant protein-1 in inflammatory bowel disease mucosa. *Journal of Leukocyte Biology* 1996; 59:804-12.
237. Mazzucchelli L, Hauser C, Zraggen K, et al. Differential in situ expression of the genes encoding the chemokines MCP-1 and RANTES in human inflammatory bowel disease. *Journal of Pathology* 1996; 178:201-6.
238. Uguccioni M, Gionchetti P, Robbiani DF, et al. Increased expression of IP-10, IL-8, MCP-1, and MCP-3 in ulcerative colitis. *American Journal of Pathology* 1999; 155:331-6.
239. Grimm MC, Elsbury SK, Pavli P, Doe WF. Interleukin 8: cells of origin in inflammatory bowel disease. *Gut* 1996; 38:90-8.
240. Keshavarzian A, Fusunyan RD, Jacyno M, Winship D, MacDermott RP, Sanderson IR. Increased interleukin-8 (IL-8) in rectal dialysate from patients with ulcerative colitis: evidence for a biological role for IL-8 in inflammation of the colon. *American Journal of Gastroenterology* 1999; 94:704-12.
241. Daig R, Andus T, Aschenbrenner E, Falk W, Scholmerich J, Gross V. Increased interleukin 8 expression in the colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1996; 38:216-22.
242. Z'Graggen K, Walz A, Mazzucchelli L, Strieter RM, Mueller C. The C-X-C chemokine ENA-78 is preferentially expressed in intestinal epithelium in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1997; 113:808-16.

243. Wedemeyer J, Lorentz A, Goke M, et al. Enhanced production of monocyte chemotactic protein 3 in inflammatory bowel disease mucosa.[comment]. *Gut* 1999; 44:629-35.
244. Garcia-Zepeda EA, Rothenberg ME, Ownbey RT, Celestin J, Leder P, Luster AD. Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophil cells and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia. *Nature Medicine* 1996; 2:449-56.
245. Strober W, Fuss IJ, Blumberg RS. The immunology of mucosal models of inflammation. *Annual Review of Immunology* 2002; 20:495-549.
246. Agace WW, Roberts AI, Wu L, Greineder C, Ebert EC, Parker CM. Human intestinal lamina propria and intraepithelial lymphocytes express receptors specific for chemokines induced by inflammation. *European Journal of Immunology* 2000; 30:819-26.
247. Grimm M, Doe W. Chemokines in inflammatory bowel disease mucosa:expression of RANTES, macrophage inflammatory protein (MIP)-1, and interferon-inducible protein 10 by macrophages, lymphocytes, endothelial cells, and granulomas. *Inflammatory Bowel Diseases* 1996; 2:88-96.
248. Romagnani P, Annunziato F, Lasagni L, et al. Cell cycle-dependent expression of CXC chemokine receptor 3 by endothelial cells mediates angiostatic activity. *Journal of Clinical Investigation* 2001; 107:53-63.
249. Johansson-Lindbom B, Svensson M, Wurbel MA, Malissen B, Marquez G, Agace W. Selective generation of gut tropic T cells in gut-associated lymphoid tissue (GALT): requirement for GALT dendritic cells and adjuvant. *Journal of Experimental Medicine* 2003; 198:963-9.
250. Mora JR, Bono MR, Manjunath N, et al. Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells. *Nature* 2003; 424:88-93.
251. Campbell DJ, Butcher EC. Rapid acquisition of tissue-specific homing phenotypes by CD4(+) T cells activated in cutaneous or mucosal lymphoid tissues. *Journal of Experimental Medicine* 2002; 195:135-41.
252. Kunkel EJ, Butcher EC. Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes. *Immunity* 2002; 16:1-4.
253. Briskin M, Winsor-Hines D, Shyjan A, et al. Human mucosal addressin cell adhesion molecule-1 is preferentially expressed in intestinal tract and associated lymphoid tissue. *American Journal of Pathology* 1997; 151:97-110.
254. Wagner N, Lohler J, Kunkel EJ, et al. Critical role for beta7 integrins in formation of the gut-associated lymphoid tissue. *Nature* 1996; 382:366-70.
255. Campbell JJ, Hedrick J, Zlotnik A, Siani MA, Thompson DA, Butcher EC. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science* 1998; 279:381-4.
256. Hosoe N, Miura S, Watanabe C, et al. Demonstration of functional role of TECK/CCL25 in T lymphocyte-endothelium interaction in inflamed and uninfamed intestinal mucosa. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal & Liver Physiology* 2004; 286:G458-66.
257. Kunkel EJ, Campbell JJ, Haraldsen G, et al. Lymphocyte CC chemokine receptor 9 and epithelial thymus-expressed chemokine (TECK) expression distinguish the small intestinal immune compartment: Epithelial expression of tissue-specific chemokines as an organizing principle in regional immunity. *Journal of Experimental Medicine* 2000; 192:761-8.
258. Svensson M, Marsal J, Ericsson A, et al. CCL25 mediates the localization of recently activated CD8alpha-beta(+) lymphocytes to the small-intestinal mucosa.[comment]. *Journal of Clinical Investigation* 2002; 110:1113-21.
259. Wurbel MA, Philippe JM, Nguyen C, et al. The chemokine TECK is expressed by thymic and intestinal epithelial cells and attracts double- and single-positive thymocytes expressing the TECK receptor CCR9. *Eur J Immunol* 2000; 30:262-271.
260. Kantele A, Kantele JM, Savilahti E, et al. Homing potentials of circulating lymphocytes in humans depend on the site of activation: oral, but not parenteral, typhoid vaccination induces circulating antibody-secreting cells that all bear homing receptors directing them to the gut. *Journal of Immunology* 1997; 158:574-9.
261. Rott LS, Rose JR, Bass D, Williams MB, Greenberg HB, Butcher EC. Expression of mucosal homing receptor alpha4beta7 by circulating CD4+ cells with memory for intestinal rotavirus. *Journal of Clinical Investigation* 1997; 100:1204-8.
262. Campbell DJ, Butcher EC. Intestinal attraction: CCL25 functions in effector lymphocyte recruitment to the small intestine. *J Clin Invest* 2002; 110:1079-81.

263. Schreiber S, MacDermott RP, Raedler A, Pinnau R, Bertovich MJ, Nash GS. Increased activation of isolated intestinal lamina propria mononuclear cells in inflammatory bowel disease [see comments]. *Gastroenterology* 1991; 101:1020-30.
264. Weninger W, Carlsen HS, Goodarzi M, et al. Naive T cell recruitment to nonlymphoid tissues: a role for endothelium-expressed CC chemokine ligand 21 in autoimmune disease and lymphoid neogenesis. *Journal of Immunology* 2003; 170:4638-48.
265. Guy-Grand D, Griscelli C, Vassalli P. The mouse gut T lymphocyte, a novel type of T cell. Nature, origin, and traffic in mice in normal and graft-versus-host conditions. *Journal of Experimental Medicine* 1978; 148:1661-77.
266. Guy-Grand D, Azogui O, Celli S, et al. Extrathymic T cell lymphopoiesis: ontogeny and contribution to gut intraepithelial lymphocytes in athymic and euthymic mice. *Journal of Experimental Medicine* 2003; 197:333-41.
267. Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A, et al. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *Journal of Experimental Medicine* 2002; 195:603-16.
268. Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine* 2000; 192:1213-22.
269. Wakkach A, Cottrez F, Groux H. Differentiation of regulatory T cells 1 is induced by CD2 costimulation. *Journal of Immunology* 2001; 167:3107-13.
270. Levings MK, Sangregorio R, Galbiati F, Squadrone S, de Waal Malefyt R, Roncarolo MG. IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. *Journal of Immunology* 2001; 166:5530-9.
271. Kemper C, Chan AC, Green JM, Brett KA, Murphy KM, Atkinson JP. Activation of human CD4+ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype. *Nature* 2003; 421:388-92.
272. Jump RL, Levine AD. Murine Peyer's patches favor development of an IL-10-secreting, regulatory T cell population. *Journal of Immunology* 2002; 168:6113-9.
273. Kim CH, Rott LS, Clark-Lewis I, Campbell DJ, Wu L, Butcher EC. Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells. *Journal of Experimental Medicine* 2001; 193:1373-81.
274. Schaerli P, Willmann K, Lang AB, Lipp M, Loetscher P, Moser B. CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. [see comments.]. *Journal of Experimental Medicine* 2000; 192:1553-62.
275. Hirokawa M, Gray JD, Takahashi T, Horwitz DA. Human resting B lymphocytes can serve as accessory cells for anti-CD2-induced T cell activation. *Journal of Immunology* 1992; 149:1859-66.