

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕ ΤΙΤΛΟ:

**Η αλληλεπίδραση λεμφοκυττάρων και κολονικών
επιθηλιακών κυττάρων στην Φλεγμονώδη Έντεροπάθεια.
Ο ρόλος των χημειοκινών.**

Πηνελόπη Ι. Μανούσου

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2010

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΗΛΙΑΣ ΚΟΥΡΟΥΜΑΛΗΣ
ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΠΑΠΑΔΑΚΗΣ
ΙΩΑΝΝΗΣ ΚΟΥΤΡΟΥΜΠΑΚΗΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΚΟΛΙΟΣ
ΗΛΙΑΣ ΚΟΥΡΟΥΜΑΛΗΣ
ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΠΑΠΑΔΑΚΗΣ
ΙΩΑΝΝΗΣ ΚΟΥΤΡΟΥΜΠΑΚΗΣ
ΙΩΑΝΝΗΣ ΜΟΥΖΑΣ
ΕΛΕΝΗ ΠΑΠΑΔΑΚΗ
ΚΥΡΙΑΚΗ ΘΕΡΜΟΥ

ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

Πρόλογος

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γαστρεντερολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης. Τη βίωσα ως ένα υπέροχο ταξίδι στον κόσμο του εργαστηρίου, στην κατανόηση της μοριακής βάσης των νοσημάτων, στα πειράματα, στα ευρήματα, στη γνώση, στο άγνωστο μέχρι τότε για μένα Πανεπιστήμιο της Κρήτης. Η κατάληξη του ταξιδιού αυτού είχε ως αποτέλεσμα να αλλάξει παντελώς ο τρόπος σκέψης μου στην ιατρική, ο τρόπος προσέγγισης των νοσημάτων, και να αγαπήσω το εργαστήριο, την έρευνα, και το Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Όλα αυτά δε θα τα γνώριζα ποτέ χωρίς τη παρέμβαση του Αναπληρωτή Καθηγητή κύριου Γιώργου Κολιού στη ζωή μου. Αποφοιτώντας από το Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, είχα την τύχη να τον γνωρίσω και να με πείσει να μετακομίσω στη Κρήτη για να ασχοληθώ με κάτι άγνωστο και ιδιαίτερα πολύπλοκο μέχρι τότε για μένα. Ο κύριος Κολιός, μέντοράς μου στη Γαστρεντερολογία, είναι για μένα ένας πολύτιμος καθοδηγητής, επιστήμονας και φίλος. Η παρούσα μελέτη είναι δικό του έργο και δε θα είχε ολοκληρωθεί χωρίς την κριτική και ουσιαστική επίβλεψή του. Τον ευχαριστώ για τις γνώσεις που μου παρείχε, την εξοικείωσή μου με τις τεχνικές του εργαστηρίου, την επίλυση των προβλημάτων που προέκυπταν. Κυρίως όμως τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και γιατί άλλαξε την πορεία της ζωής μου και μου δίδαξε πως να αντιμετωπίζω τα προβλήματα με κριτική σκέψη.

Φυσικά, τίποτα δε θα μπορούσε να ολοκληρωθεί χωρίς την ηθική και υλική υποστήριξη του καθηγητή μου κύριου Ηλία Κουρούμαλη. Η καθοδήγησή του ήταν και είναι πολύτιμη, η εμπιστοσύνη που μου έδειξε ήταν συγκινητική για μένα, η συμπαράσταση του αμέριστη. Οι ευκαιρίες που μου έδωσε καθ' όλη τη διάρκεια της παραμονής μου στην Κρήτη αλλά και μετά αναδεικνύουν το ηθικό του ανάστημα ως καθηγητή και ανθρώπου. Για να βρεθώ ξανά στο εργαστήριο και να δουλέψω ξανά με τον κύριο Κουρούμαλη παραιτήθηκα από την άσκηση παθολογίας με κίνδυνο να βρεθώ χωρίς ειδικότητα. Δεν το μετάνιωσα ποτέ και με χαρά θα το ξανάκανα χωρίς δισταγμό. Στο πρόσωπό του βρήκα έναν πολύτιμο δάσκαλο και καθοδηγητή.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να αναφερθώ και στον Αναπληρωτή Καθηγητή κύριο Κωνσταντίνο Παπαδάκη ο οποίος με ευγένεια και διακριτικότητα δέχτηκε να φέρει σε πέρας ως επιβλέπων τη διατριβή αυτή.

Καταλυτική υπήρξε και η συμβολή του Επίκουρου Καθηγητή κύριου Ιωάννη Κουτρομπάκη στη συλλογή των δειγμάτων και στην παροχή κλινικών πληροφοριών για τους ασθενείς που μελετήθηκαν. Τον ευχαριστώ για την υπομονή του να μου εξηγήσει τη θεραπεία των ασθενών με φλεγμονώδη εντεροπάθεια και τον τρόπο προσέγγισης των ασθενών αυτών.

Κατά την παραμονή μου στην Κρήτη, είχα την τύχη να γνωρίσω τον κύριο Ιωάννη Μουζά. Οι συζητήσεις μαζί του ήταν ανεκτίμητες. Μου συμπαραστάθηκε και με στήριξε ηθικά λίγο πριν αναχωρήσω για Αγγλία και όταν όλα μου φαίνονταν αδύνατα.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στην κυρία Ελένη Παπαδάκη, η οποία μου άνοιξε τις πόρτες του εργαστηρίου της και με βοήθησε υλικά και ουσιαστικά στην ολοκλήρωση της μελέτης αυτής. Την ευχαριστώ κυρίως για την παρουσία της στο χώρο του εργαστηρίου κατά τις βραδυνές ώρες δουλείας. Η υλική και ηθική συμπαράσταση που μου παρείχε είναι ανεκτίμητη.

Και φυσικά δε θα μπορούσα να μην αναφερθώ στην κυρία Κυριακή Θερμού, το εργαστήριο της οποίας με φιλοξένησε αρκετές φορές και με βοήθησε στην εκτέλεση των πειραμάτων μου, παρέχοντάς μου τα απαραίτητα υλικά και τις σωστές λύσεις.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τους συνοδοιπόρους μου και έκτοτε πολύτιμους φίλους μου σε αυτό το υπέροχο ταξίδι, την Κατερίνα Πυροβολάκη, τον Γιάννη Δρυγιαννάκη, τον Λεωνίδα Μπουρίκα. Τους ευχαριστώ για την υποδειγματική συνεργασία, τη σκληρή δουλειά, την ανεκτίμητη βοήθεια και συμπαράσταση. Φυσικά δε θα μπορούσα να παραβλέψω και τη βοήθεια όσων μου στάθηκαν στα πρώτα μου βήματα στο εργαστήριο, Βασίλη Βαλάτα, Κώστα Ξυδάκη, Γιώργο Νότα. Ευχαριστώ επίσης όλους τους γιατρούς της Γαστρεντερολογικής κλινικής για την βοήθειά τους στη συλλογή των δειγμάτων και την ηθική συμπαράσταση.

Τη διατριβή αυτή θα ήθελα να αφιερώσω στους γονείς μου Γιάννη και Κατερίνα οι οποίοι πάντα είναι στο πλάι μου όσο ανατρεπτικές και αν τους φαίνονται οι αποφάσεις μου. Επίσης θα ήθελα να την αφιερώσω στο γιο μου Γιάννη και στο σύζυγό μου Άρη ο οποίος με στηρίζει με υπομονή και αγάπη όλα αυτά τα χρόνια.

Περιεχόμενα

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	11
1.1	ΝΟΣΟΣ CROHN ΚΑΙ ΕΛΚΩΔΗΣ ΚΟΛΙΤΙΔΑ
	12
A. Γενικά	12
B. Διάγνωση	12
Γ. Επιδημιολογία	14
Δ. Αιτιοπαθογένεια	16
Δ1. Αιτιοπαθογένεια: Γενετική	17
Δ2. Αιτιοπαθογένεια: Περιβάλλον	17
Δ3. Αιτιοπαθογένεια: Ανοσολογική απόκριση	19
Δ3α. Αιτιοπαθογένεια: Ανοσολογική απόκριση: Συγγενής ανοσία	19
Δ3β. Αιτιοπαθογένεια: Ανοσολογική απόκριση: Επίκτητη ανοσία	20
Δ3γ. Αιτιοπαθογένεια: Ανοσολογική απόκριση: Th1, Th2 και Th17 κύτταρα	20
Δ3δ. Αιτιοπαθογένεια: Ανοσολογική απόκριση: Ενίσχυση και ρύθμιση	24
Δ4. Αιτιοπαθογένεια: Επιθήλιο	25
1.2. ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ ΚΑΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΟΥΣ	28
α. Γενικά	28
β. Οι υποδοχείς των κυτταροκινών	33
β1. Μεμβρανικοί υποδοχείς κυτταροκινών.	33
β2. Οι διαλυτοί υποδοχείς των κυτταροκινών	34
γ. Ενδοκυττάρια μεταβίβαση σήματος των κυτταροκινών.	37
δ. Η δράση των κυτταροκινών στις ΙΦΕΝ	40

	7
ε. Προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες στις ΙΦΕΝ	41
ε1. TNF-α	41
ε2. IL-1	43
ε3. IFN-γ	44
ε3. IL-18	46
ε4. IL-17 και Th17 κύτταρα	46
στ. Αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες στις ΙΦΕΝ	47
στ1. IL-10	47
στ2. IL-4 και TGF-β	48
στ3. IL-13	48
ζ. Νεότερες κυτταροκίνες εμπλεκόμενες στις ΙΦΕΝ	49
1.3. ΧΗΜΕΙΟΚΙΝΕΣ ΚΑΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΧΗΜΕΙΟΚΙΝΩΝ	51
α. Γενικά	51
β. Κατηγορίες χημειοκινών – με βάση τη δομή τους	54
β1. CXC χημειοκίνες	57
β2. Ομάδα χημειοκινών προσδένοντες με CXCR3 τον υποδοχέα	57
β3. Έκφραση των CXCL9, 10 και 11 χημειοκινών στις ΙΦΕΝ	59
β4. CC χημειοκίνες	61
β5. CCR3 συνδεόμενες χημειοκίνες και ΙΦΕΝ	61
β6. C και CX3C χημειοκίνες	62
γ. Κατηγορίες χημειοκινών – λειτουργική διαίρεση	62
δ. Υποδοχείς χημειοκινών	63
ε. Σύνδεση υποδοχέα - χημειοκίνης	66
στ. Μετάδοση του σήματος	67

	8
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	69
Σκεπτικό της μελέτης	70
3. ΑΣΘΕΝΕΙΣ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	71
Ασθενείς, υλικά και μέθοδοι	72
3.1 Ασθενείς	72
3.1.1.Απομόνωση λεμφοκυττάρων από το περιφερικό αίμα ασθενών και υγιών μαρτύρων	74
3.1.2.Μέτρηση λεμφομονοπύρηνων περιφερικού αίματος	75
3.2 Μέθοδοι	75
3.2.1. Απομόνωση CD3+ κυττάρων με ανοσομαγνητικό διαχωρισμό	75
3.2.2.Ανοσοφαινοτυπική ανάλυση CD3 T λεμφοκυττάρων.	76
3.2.3.Βιοψίες κολονικού επιθηλίου και ομογενοποίηση ιστού	77
3.2.4.Απομόνωση RNA	78
A. Κατακρήμνιση DNA και πρωτεϊνών	78
B. RNA extraction	78
Γ. Μέτρηση καθαρότητας RNA	79
Δ. Επίδραση με DNAση	79
3.2.5.Ανάστροφη μεταγραφή	80
3.2.6.Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)	80
3.2.7.Παρασκευή gel αгарόζης	81
3.3. Κυτταροκαλλιέργειες	86
3.3.1.Ανακαλλιέργεια κυττάρων και επιδράσεις	87

	9
3.4. Υλικά	89
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	90
4.1 Αποτελέσματα CXC χημειοκινών	91
4.1.1 CXCR3- συνδεδεμένες χημειοκίνες(313)	92
4.1.1.1 Έκφραση των CXCR3 συνδεδεμένων χημειοκινών σε βιοψίες κολονικού επιθηλίου	92
4.1.1.2 Ανίχνευση έκφρασης CXCR3 συνδεδεμένων χημειοκινών στον ορό ασθενών με ELISA	95
4.1.1.3 Έκφραση του CXCR3 mRNA σε ανοσομαγνητικά διαχωρισθέντα CD3+ περιφερικά λεμφοκύτταρα	96
4.1.1.4 Κυτταρομετρία ροής CXCR3	98
4.1.1.5 Παραγωγή CXCR3 συνδεδεμένων χημειοκινών in vitro	100
α. Έκφραση σε επίπεδο mRNA	100
β. Έκφραση σε επίπεδο πρωτεΐνης	103
4.1.1.6 Έκφραση CXCR3 υποδοχέα σε Jurkat κύτταρα	105
4.2 Αποτελέσματα CC χημειοκινών	106
4.2.1. CCR3- συνδεδεμένες χημειοκίνες	107
4.2.1.1. Έκφραση των CCR3 συνδεδεμένων χημειοκινών σε βιοψίες κολονικού επιθηλίου	107
4.2.1.2. Ανίχνευση έκφρασης CCR3 συνδεδεμένων χημειοκινών στον ορό ασθενών με ELISA	109
4.2.1.3 Έκφραση του CCR3 mRNA σε βιοψίες κολονικού επιθηλίου.	111
4.2.1.4 Κυτταρομετρία ροής CCR3	112
4.2.1.5. Παραγωγή CCR3 συνδεδεμένων χημειοκινών in vitro	114
α. Έκφραση σε επίπεδο mRNA	114
β. Έκφραση σε επίπεδο πρωτεΐνης	117
4.2.2. CCR8- συνδεδεμένη χημειοκίνη	120

	10
4.2.2.1. Έκφραση της CCR8 συνδεδεμένης χημειοκίνης CCL1 σε βιοψίες κολονικού επιθηλίου	120
4.2.2.2. Έκφραση του mRNA του CCR8 υποδοχέα σε βιοψίες κολονικού επιθηλίου και σε ανοσομαγνητικά διαχωρισθέντα CD3+ λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος	121
4.2.2.3 Κυτταρομετρία ροής CCR8	124
4.2.2.4. Παραγωγή CCL1 χημειοκίνης in vitro	125
Έκφραση σε επίπεδο mRNA	125
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	126
5.1. CXC χημειοκίνες	127
5.1.1. CXCR3 συνδεδεμένες χημειοκίνες	127
5.2. CC χημειοκίνες	128
5.2.1. CCR3 συνδεδεμένες χημειοκίνες	128
5.2.2. CCR8 συνδεδεμένη χημειοκίνες	129
6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	131
6.1 Συζήτηση	132
7. ΠΕΡΙΛΗΨΗ/ ABSTRACT	141
7.1 Abstract	142
7.2 Περίληψη	144
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	147

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Νόσος Crohn και Ελκώδης Κολίτιδα

A. Γενικά

Η νόσος Crohn και η Ελκώδης Κολίτιδα είναι χρόνια υποτροπιάζοντα νοσήματα του γαστρεντερικού συστήματος, ανοσολογικής αρχής και αγνώστου αιτιολογίας τα οποία καθορίστηκαν εμπειρικά με βάση κλινικά, παθολογοανατομικά, ενδοσκοπικά και ακτινολογικά ευρήματα (1). Αποτελούν τις δύο κύριες μορφές των ιδιοπαθών φλεγμονωδών εντεροπαθειών (ΙΦΕΝ).

Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν βιολογικοί δείκτες χαρακτηριστικοί των ΙΦΕΝ. Συνεπώς η διάγνωση της Ελκώδους Κολίτιδας και Νόσου Crohn βασίζεται σε κλινικά συμπτώματα, ενδοσκοπικά και παθολογοανατομικά ευρήματα (2). Η ποικιλία των συμπτωμάτων, οι διαφορές στη συχνότητα εμφάνισής τους, και η έλλειψη τυπικών ενδοσκοπικών ευρημάτων στα αρχικά στάδια μπορούν να καθυστερήσουν τη διάγνωση από 6 μήνες έως 1 χρόνο (3).

Κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου Crohn είναι η ύπουλη έναρξη, διαλείπουσα πυρετική κίνηση, διαρροϊκές κενώσεις και το κοιλιακό άλγος, η απώλεια βάρους. Οι ασθενείς με Ελκώδη Κολίτιδα παρουσιάζουν κοιλιακό άλγος, αιματηρές και βλεννώδεις κενώσεις (4). Συνέπειες της νόσου Crohn είναι φλεγμονή, ελκώδη συρίγγια, ή και αποστήματα σε οποιοδήποτε σημείο του γαστρεντερικού σωλήνα, με συνηθέστερη εμφάνιση στην ειλεοκολική συμβολή. Ενδοσκοπική εξέταση ασθενών με Ελκώδη Κολίτιδα αποκαλύπτει ότι η φλεγμονή περιορίζεται στο παχύ έντερο με πιο συχνά σημεία εμφάνισης στο ανιόν, σιγμοειδές και ορθό (5).

B. Διάγνωση

Στην κλινική πράξη, μεταξύ των δύο κύριων μορφών ΙΦΕΝ, μπορεί να γίνει διαφοροδιάγνωση με βάση τα κλασσικά παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά τους τα οποία παρουσιάζονται στον **πίνακα 1**.

Πίνακας 1. Παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά Ελκώδους Κολίτιδας και Νόσου Crohn. Πηγή: Yantiss et al (6)

Χαρακτηριστικά	Ελκώδης Κολίτιδα	Νόσος Crohn
Κατανομή νόσου	Διάχυτη και συνεχής	Τμηματική
Προσβολή ορθού	Πάντοτε (ενήλικες)	Σποραδικά
Σοβαρότητα νόσου	Χειρότερη περιφερικά	Ανομοιογενής/ ποικίλη
Προσβολή ειλεού	Σποραδικά	Συχνά
Διήθηση νόσου	Επιφανειακά (βλεννογόνο)	Διατοιχωματικά
Λεμφαδενική συμμετοχή	Σπάνια, σχετιζόμενη με έλκη	Σε οποιαδήποτε εντόπιση
Ραγάδες	Σπάνιες, επιφανειακές (σε οξεία προσβολή)	Βαθείς, σε οποιαδήποτε προσβαλλόμενο σημείο
Εκκολπώματα και συρίγγια	Απόντα	Παρόντα
Κοκκιώματα	Σχετιζόμενα με διαρριγμένες κρύπτες	Μη σχετιζόμενα με κρύπτες

Παρόλο αυτά ορισμένοι ασθενείς παρουσιάζουν αλληλοεπικάλυψη παθολογοανατομικών χαρακτηριστικών μεταξύ νόσου Crohn και Ελκώδους Κολίτιδας σε σημείο που καθιστά δύσκολη τη σαφή διάκριση μεταξύ των δύο μορφών και οδηγεί στην ‘προσωρινή’ διάγνωση της ακαθόριστης κολίτιδας. Επιπλέον κάποιες άλλες νόσοι όπως η κολλαγονική και η λεμφοκυτταρική κολίτιδα ή ακόμη η εκκολπωματίτιδα δύναται να παρουσιάσουν χαρακτηριστικά Crohn ή Ελκώδους Κολίτιδας κατά την πορεία τους προκαλώντας διαγνωστική σύγχυση (6).

Αυτό που επιπλέκει ακόμη περισσότερο τη διάγνωση είναι η παραλλαγή ή ακόμη και απουσία των ‘κλασσικών’ μορφολογικών χαρακτηριστικών της Ελκώδους Κολίτιδας η οποία δύναται να παρουσιάσει κατά τόπους προσβολή, φλεγμονώδεις αλλοιώσεις του τελικού ειλεού (backwash’ ileitis), αφθώδη έλκη ή και εξωεντερικές εκδηλώσεις οδηγώντας σε διαγνωστική σύγχυση τους παθολογοανατόμους και θέτοντας την πιθανότητα της αδιευκρίνιστης κολίτιδας (indeterminate colitis) (7; 8).

Παρομοίως, περίπου 50% των ασθενών με Νόσο Crohn παρουσιάζουν νόσο στο παχύ έντερο και 20% παρουσιάζουν κολίτιδα χωρίς συμμετοχή του ανώτερου πεπτικού ή του τελικού ειλεού. Επιπλέον τυπικά χαρακτηριστικά της Νόσου Crohn όπως η διατοιχωματική φλεγμονή, οι στενώσεις και ο σχηματισμός συριγγίων

απαντώνται λιγότερο συχνά όταν προσβάλλεται το παχύ έντερο με αποτέλεσμα η Νόσος Crohn να μιμείται την Ελκώδη Κολίτιδα ακόμη και ως πανκολίτιδα (9; 10).

Γ. Επιδημιολογία

Οι ΙΦΕΝ παρουσιάζονται χαρακτηριστικά στη 2^η και 3^η δεκαετία της ζωής, όπου και εξελίσσονται σε χρόνιες και υποτροπιάζουσες νόσους στην πλειοψηφία των ασθενών. Η Ελκώδης Κολίτιδα μπορεί να εμφανιστεί σε όλες τις ηλικίες με τα υψηλότερα ποσοστά εμφάνισης μεταξύ 15-25 ετών (11). Ακολουθεί μια δεύτερη αιχμή της νόσου κατά την ηλικία των 35 ετών ιδιαίτερα στις γυναίκες. Η Νόσος Crohn φαίνεται να παρουσιάζει διφασική κατανομή, με πρώτη εκδήλωση στην ηλικία των 20 ετών και δεύτερη αιχμή μεταξύ 50-70 ετών. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η Νόσος Crohn απαντάται συχνότερα σε νέους ασθενείς. Έρευνα από ένα κέντρο έδειξε ότι το 74% νοσούντων από Νόσο Crohn ήταν κάτω των 30 ετών με πιο συχνή ηλικία εμφάνισης μεταξύ 15-30 ετών (3) .

Όσον αφορά τη συχνότητα των ΙΦΕΝ μεταξύ των δύο φύλων, παρατηρείται μια ελαφρά υπεροχή της Ελκώδους Κολίτιδας στους άνδρες, ενώ η Νόσος Crohn επικρατεί στο γυναικείο φύλο. Οι διαφορές όμως αυτές δεν επαναλαμβάνονται σε όλα τα κέντρα μελέτης των ΙΦΕΝ. Έτσι, ενώ στις ΗΠΑ οι γυναίκες υπερέχουν των ανδρών, στην Κίνα περισσότεροι άνδρες πάσχουν από Νόσο Crohn (12). Ακόμη και στην Ελκώδη Κολίτιδα μια πρόσφατη μελέτη δεν παρουσιάζει διαφορές μεταξύ των δύο φύλων(5).

Η γεωγραφική κατανομή των δυο νόσων είναι αξιοσημείωτη. Εμφανίζονται σε παγκόσμια κλίμακα και παρουσιάζουν απόκλιση στη συχνότητα εμφάνισης τους από βόρα σε νότο, τόσο στην Ευρώπη (13) όσο και στην Αμερική (14). Τα ποσοστά των νοσούντων από ΙΦΕΝ είναι υψηλότερα στη Βόρεια Αμερική και Βόρεια και Δυτική Ευρώπη, αισθητά χαμηλότερα στη νότια Αφρική, Αυστραλία, νότια και κεντρική Ευρώπη, ενώ είναι σχεδόν σπάνια στην Ασία και Αφρική (15).

Ένα άλλο ενδιαφέρον στοιχείο είναι ότι η αναλογία μεταξύ Ελκώδους Κολίτιδας και νόσου Crohn συνεχώς μειώνεται από 5/1 σε 2/1 αντίστοιχα (13). Η υψηλότερη αναλογία νοσούντων 9,2/100.000 κατοίκους καταγράφηκε στη βόρεια Γαλλία και στην Ολλανδία(13). Μια πρόσφατη έρευνα παρουσιάζει τον μεγαλύτερο αριθμό νοσούντων (8-66/100.000) στην Ουαλία, Νέα Ζηλανδία, Καναδά, Σκωτία, Γαλλία,

Ολλανδία και στις Σκανδιναβικές χώρες(12). Τα χαμηλότερα ποσοστά της νόσου 0,9/100.000 παρουσιάζονται στη βορειοδυτική Ελλάδα (13). Σε αναπτυσσόμενες χώρες όπου οι ΙΦΕΝ αναφέρονταν σπάνια, ήδη άρχισαν να περιγράφονται συνεχώς αυξανόμενα κρούσματα από 0.2-3/100.000 κατοίκους. Τέτοιες χώρες είναι οι Βραζιλία, Κίνα, Κορέα, Μάλτα, Σλοβακία (3; 12).

Στις ΗΠΑ και στην Ευρώπη, υπολογίζεται ότι θα νοσήσουν 1,4 και 2,2 εκατομμύρια άνθρωποι αντίστοιχα. Η συχνότητα των ΙΦΕΝ και ιδιαίτερα της νόσου Crohn αυξήθηκε περίπου δέκα φορές στις ΗΠΑ και στην Ευρώπη τα τελευταία πενήντα χρόνια (16; 17). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι σε αρκετές γεωγραφικές ζώνες με χαμηλό επιπολασμό των νοσημάτων αυτών, παρατηρείται ολοένα και αυξημένη επίπτωση ιδιαίτερα της νόσου Crohn τις τελευταίες δύο δεκαετίες. Είναι δύσκολο να αποφανθούμε αν η αύξηση αυτή είναι όντως αύξηση των περιστατικών ή οφείλεται στην ανάπτυξη καλύτερων διαγνωστικών μεθόδων και αυξημένης ευαισθησίας στα επιμέρους κέντρα (3).

Τα ευρήματα αυτά σε συνδυασμό με το γεγονός ότι αναδεικνύεται ως η πιο συχνή νόσος σε βιομηχανικές περιοχές της Ασίας (18) υποδηλώνουν την συμμετοχή και περιβαλλοντικών παραγόντων στην αιτιοπαθογένεια των ΙΦΕΝ, και μια αυξανόμενη ευαισθησία στη νόσο που σχετίζεται με το 'δυτικό' αστικοποιημένο τρόπο ζωής.

Η φυλετική επίδραση στην εκδήλωση των ΙΦΕΝ είναι πλέον αποδεκτή. Οι πληθυσμοί των μαύρων νοσούν λιγότερο από τα λευκά φύλα στην ίδια χώρα, ενώ ο εβραϊκός πληθυσμός παρουσιάζει τα υψηλότερα ποσοστά νοσούντων. Μελέτες σε μετανάστες αποδεικνύουν ότι ο επιπολασμός της νόσου είναι όντως υψηλότερος στην καυκάσια φυλή. Στον αντίποδα αυτής της άποψης βρίσκονται μελέτες οι οποίες έλαβαν υπόψιν διαφορετικούς πληθυσμούς οι οποίοι διάγουν έναν παρόμοιο 'δυτικό' τρόπο ζωής. Το συμπέρασμα ήταν ότι η συχνότητα των ΙΦΕΝ δεν διέφερε στατιστικά μεταξύ μαύρων και λευκών φύλων (19). Το γεγονός αυτό δε βρίσκει εφαρμογή στους Εβραίους όπου ο επιπολασμός της νόσου είναι όντως υψηλότερος σε σχέση με μη Εβραϊκά φύλα σε οποιοδήποτε σημείο του πλανήτη και αν μελετήθηκαν (20).

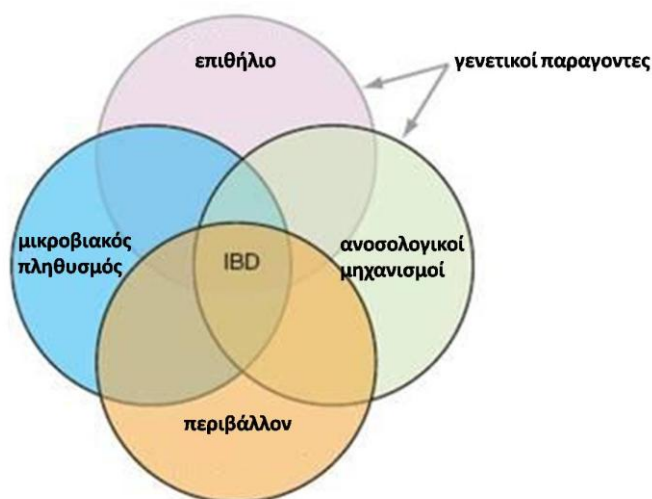
Η οικογενής προδιάθεση είναι επίσης αποδεκτή. Πρώτου βαθμού συγγενείς νοσούντων από ΙΦΕΝ παρουσιάζουν τουλάχιστον πενταπλάσιο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Ο κληρονομικός χαρακτήρας φαίνεται να υπερέχει στη Νόσο Crohn έναντι της Ελκώδους Κολίτιδας (21).

Δ. Αιτιοπαθογένεια

Η αιτιοπαθογένεια των αυτοάνοσων φλεγμονωδών νοσημάτων και ιδιαίτερα των ΙΦΕΝ μελετήθηκε εκτενώς τις τελευταίες δεκαετίες αλλά μόλις πρόσφατα εκτιμήθηκαν κοινοί παθογενετικοί μηχανισμοί και η αλληλεπίδραση μεταξύ γενετικών παραγόντων, του περιβάλλοντος και της ανοσολογικής απόκρισης (22). Νέα ευρήματα υποδεικνύουν ότι στην αιτιοπαθογένεια των ΙΦΕΝ εμπλέκονται πιο πολύπλοκοι μηχανισμοί από ότι γίνονταν λόγος στο παρελθόν. Για παράδειγμα, ο ρόλος ενός και μόνο μορίου στην αιτιοπαθογένεια της νόσου, σαφώς διαφέρει ανάλογα το κύτταρο στόχος στο οποίο δρα, τη φάση της νόσου, το μικροπεριβάλλον (23). Συνεπώς, η βιολογία των ΙΦΕΝ στηρίζεται στην αλληλεπίδραση των μικροβιακών παραγόντων, της ανοσολογικής απόκρισης και των επιθηλιακών κυττάρων τροποποιημένα προς ή μακριά από την εκδήλωση της νόσου ανάλογα την επίδραση γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων (**εικόνα 1**).

Εικόνα 1

Η φλεγμονή του βλεννογόνου εξαρτάται από την αλληλεπίδραση του τοπικού μικροβιακού πληθυσμού με το εντερικό επιθήλιο και την τοπική ανοσολογική απόκριση. Το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης αυτής μπορεί να τροποποιηθεί προς την εμφάνιση ή όχι της νόσου από την επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων και του γενετικού υποστρώματος. Πηγή Braun et.al. (24).



Δ1. Αιτιοπαθογένεια: Γενετική

Συσχέτιση των ΙΦΕΝ με νέους γονιδιακούς τόπους αναγνωρίζονται συνεχώς. Αποτελεί πλέον γνώση ότι η γενετική προδιάθεση στη Νόσο του Crohn είναι ισχυρότερη από ότι στην Ελκώδη Κολίτιδα (25), ότι πρόκειται για νοσήματα που ελέγχονται πιθανόν από πολλούς επιτόπους, αντανακλώντας εν μέρει και την ετερογένεια στην εμφάνιση της νόσου (26) και ότι τα περισσότερα γονίδια που έχουν αναγνωριστεί σχετίζονται με ελλείμματα στη φυσική ανοσία και στη λειτουργία του φραγμού του επιθηλίου (27-30).

Έχοντας μια μετάλλαξη σε ένα γονίδιο ευαισθησίας (όπως το CARD15/NOD2) δε σημαίνει αναγκαία και την εκδήλωση της νόσου. Πράγματι, σε ορισμένες πληθυσμιακές ομάδες η μετάλλαξη στο CARD15 ανευρίσκεται στο 20% των υγιών μαρτύρων (31). Ως εκ τούτου, η ύπαρξη μιας μετάλλαξης δε μπορεί να προβλέψει την εκδήλωση ή όχι της νόσου. Πάραυτα, οι μεταλλάξεις σχετίζονται με νεότερη ηλικία έναρξης της νόσου και με πιο επιθετικό φαινότυπο (32). Το ίδιο ισχύει και για ορισμένες από τις νεώτερες περιγραφείσες μεταλλάξεις όπως των γονιδίων της IL23R και ATG16L (29). Η IL23R εμπλέκεται στο μονοπάτι της φλεγμονής της IL12/23, και θεωρείται ότι εμπλέκονται στην αιτιοπαθογένεια της Νόσου Crohn. Η ATG16L εμπλέκεται στη διαδικασία της αυτοφαγίας, όπου τα κύτταρα υπό συνθήκες πίεσης ενεργοποιούν ενδοκυττάριας διαδικασίες με σκοπό τον κυτταρικό θάνατο. Υποστηρίζεται, ότι η διαδικασία αυτή προλαμβάνει τη φλεγμονή που σχετίζεται με τον κυτταρικό θάνατο και παρόλο που δεν είναι πλήρως κατανοητές οι συνέπειες των μεταλλάξεων στο γονίδιο ATG16L, θεωρείται ότι προάγει την φλεγμονή (29).

Η μετάλλαξη στο γονίδιο NOD2/CARD15 ή στο OCTNI/II μπορεί να επηρεάσει την ικανότητα του ξενιστή να εξαλείψει το πληθυσμό των βακτηριδίων που επιτίθενται στον ξενιστή. Τυχόν αποτυχία στον περιορισμό των βακτηρίων αυτών θα είχε ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση φλεγμονωδών διαδικασιών αλλά κυρίως τη συνεχή παρουσία και αδιάκοπη ενεργοποίηση αντιγόνων που ευθύνονται για την επίκτητη ανοσία του ξενιστή(33).

Δ2. Αιτιοπαθογένεια: Περιβάλλον

Κατά συνέπεια, οι γενετικές μεταλλάξεις από μόνες τους δεν είναι ικανές να εξηγήσουν την εκδήλωση των ΙΦΕΝ. Μελέτες σε μονοζυγώτες διδύμους,

αναδεικνύουν το ποσοστό αντιστοιχίας για την εκδήλωση νόσου σε 40–60% (34; 34). Εφόσον το ποσοστό αυτό δεν είναι 100%, εύλογα συμπεραίνουμε ότι οι περιβαλλοντικοί παράγοντες εμπλέκονται στην εκδήλωση νόσου. Αρκετοί από αυτούς τους παράγοντες έχουν αναγνωριστεί ως σήμερα με κοινό χαρακτηριστικό τους ότι κανένας από μόνος του δεν είναι ικανός να πυροδοτήσει την εκδήλωση της νόσου (22).

Πάραυτα, κλινικές παρατηρήσεις έδειξαν ότι παράγοντες οι οποίοι είναι ικανοί να σπάσουν τον εντερικό φραγμό μπορούν και να ενεργοποιήσουν την έναρξη φλεγμονής. Σε αυτούς περιλαμβάνονται μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα, αντιβιοτικά, ιογενείς και βακτηριακές λοιμώξεις. Το κάπνισμα από την άλλη ενώ αποτελεί γνωστό παράγοντα κινδύνου για τη Νόσο Crohn, δρα προστατευτικά στην περίπτωση της Ελκώδους Κολίτιδας. Επιπλέον, ενώ η διατροφή και το άγχος δε μπορούν να σχετιστούν άμεσα με την εκδήλωση των ΙΦΕΝ, εκτιμάται ότι η διατροφή ή κάποια στοιχεία αυτής (πχ. τα μέταλλα) μπορούν να τροποποιήσουν τη λειτουργία της εντερικής χλωρίδας. Οι εκδηλώσεις άγχους από την άλλη, μπορούν να τροποποιήσουν την ανοσολογική απόκριση, χωρίς δυστυχώς να γνωρίζουμε τη συμβολή του καθώς δε μπορούμε να μετρήσουμε ποσοτικά τον παράγοντα αυτόν (35).

Η μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου αποτελεί ένα μοναδικό και λίαν σημαντικό περιβαλλοντικό παράγοντα που εμπλέκεται στην αιτιοπαθογένεια των ΙΦΕΝ. Ο άνθρωπος αποικίζεται από πλήθος μικροοργανισμών κυρίως στις εκτεθειμένες επιφάνειες του σώματός του. Ο γαστρεντερικός σωλήνας αποικίζεται με περισσότερους από 10^{14} μικροοργανισμούς και περισσότερα από 1000 είδη (36; 37), τα περισσότερα από αυτά στο παχύ έντερο. Ο βιόκοσμος αυτός εμπλέκεται σε πολλές φυσιολογικές λειτουργίες των θηλαστικών συμπεριλαμβανομένων της ανάπτυξης και διαφοροποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος τόσο σε τοπικό όσο και σε συστηματικό επίπεδο (38). Στο γαστρεντερικό σύστημα, η επίκτητη ανοσία η οποία σχετίζεται με τα TCRαβ ενδοεπιθηλιακά λεμφοκύτταρα (39), τα ρυθμιστικά T κύτταρα (Tregs) (40) και τα Th17 κύτταρα (41), καθορίζεται από συγκεκριμένα βακτήρια, χωρίς βέβαια αυτό να μπορεί να εξηγηθεί με απλούς κανόνες. Πρόσφατες μελέτες προσπάθησαν να καθορίσουν διαφορές στην εντερική χλωρίδα μεταξύ ασθενών με ΙΦΕΝ και υγιών μαρτύρων. Μελέτη της αλληλουχίας του ριβοσωμιακού RNA αποκάλυψαν διαφορές μεταξύ ασθενών με Νόσο Crohn και Ελκώδη Κολίτιδα και υγιών μαρτύρων(42). Οι ασθενείς αυτοί χαρακτηρίζονταν από έλλειψη κάποιων

κοινών βακτηρίων του εντέρου με έως και 10 φορές μικρότερο βακτηριακό φορτίο από τους υγιείς μάρτυρες (42). Άγνωστο παραμένει εάν αυτή η δυσβίωση σχετίζεται με συγκεκριμένους γονότυπους που επάγουν τη φλεγμονή ή είναι απότοκοι της φλεγμονής του εντερικού επιθηλίου. Επιπλέον οι διαφορές μεταξύ βακτηρίων δεν ανιχνεύτηκαν σε όλους τους ασθενείς με ΙΦΕΝ που μελετήθηκαν.

Εν' κατακλείδι, διαφορετικά υποσύνολα πληθυσμών με ΙΦΕΝ εκφράζουν διαφορετικές γενετικές μεταλλάξεις. Θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η επίδραση διαφορετικών περιβαλλοντικών παραγόντων πυροδοτούν την έναρξη νόσου σε ασθενείς με διαφορετικά γενετικά υποστρώματα. Για παράδειγμα, η "τύπου 1 Νόσο Crohn" μπορεί να είναι το αποτέλεσμα μιας βακτηριακής λοίμωξης σε ασθενή με μια μετάλλαξη NOD2/CARD15, ενώ η "τύπου της 2 Νόσο Crohn" μπορεί να είναι το αποτέλεσμα της επίδρασης του καπνίσματος σε έναν ασθενή με μια παραλλαγή ATG16L (22).

Δ3. Αιτιοπαθογένεια: Ανοσολογική απόκριση

Υπάρχουν δύο μορφές ανοσολογικής απάντησης: Η συγγενής και η επίκτητη ανοσία. Η συγγενής ανοσία είναι η πιο πρωτόγονη μορφή ανοσίας η οποία στερείται ειδικότητα και μνήμη έναντι των παθογόνων οργανισμών. Είναι υπεύθυνη για την έγκαιρη ανοσολογική απόκριση όπου η εξάλειψη των παθογόνων εισβολέων είναι κρίσιμη για την επιβίωση του ξενιστή. Η επίκτητη ανοσία καλείται να καλύψει την αδυναμία της συγγενούς να αντεπεξέλθει σε περίπτωση επαναμόλυνσης καθώς και σε μεγάλα φορτία παθογόνων εισβολέων. Χαρακτηρίζεται από ειδικότητα και μνήμη και ρυθμίζεται κυρίως μέσω Β και Τ λεμφοκυττάρων τα οποία εκφράζουν υποδοχείς αντιγόνων επιφανείας (43). Οι κυτταροκίνες που παράγονται από τα Τ λεμφοκύτταρα ως απόκριση στη λοίμωξη, ενορχηστρώνουν μια οργανωμένη ανοσολογική απόκριση με σκοπό την εξάλειψη των παθογόνων εισβολέων αλλά και τη δημιουργία κυττάρων μνήμης προς το ίδιο παθογόνο.

Δ3α. Αιτιοπαθογένεια: Ανοσολογική απόκριση: Συγγενής ανοσία

Νεότερες μελέτες απέδειξαν ότι τυχόν ελλείμματα της συγγενούς ανοσίας μπορεί να έχουν σοβαρές συνέπειες στο ξενιστή επηρεάζοντας και την επίκτητη

ανοσία. Η συγγενής ανοσία προετοιμάζει το έδαφος για την επίκτητη ανοσία. Στο γαστρεντερικό σωλήνα περιλαμβάνει τον επιθηλιακό φραγμό, και τα μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα και ουδετερόφιλα του χορίου. Ασθενείς με γενετικές ανωμαλίες επί της συγγενούς ανοσίας (όπως η χρόνια κοκκιωματώδη νόσο) παρουσιάζουν αυξημένα ποσοστά ΙΦΕΝ (44). Στηριζόμενοι σε αυτά τα ευρήματα αναπτύχθηκαν θεραπευτικοί παράγοντες κατά των ΙΦΕΝ οι οποίοι ενισχύουν τη συγγενή ανοσία όπως ο GM-CSF (45).

Δ3β. Αιτιοπαθογένεια: Ανοσολογική απόκριση: Επίκτητη ανοσία

Παρά την αυξανόμενη εκτίμηση για το ρόλο της συγγενούς ανοσίας στη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης στο έντερο, η επίκτητη ανοσία, και ειδικά οι Τ λεμφοκυτταρικοί πληθυσμοί, συσχετίζεται άμεσα με την αιτιοπαθογένεια των ΙΦΕΝ (46; 47). Τα ενεργοποιημένα Τ λεμφοκύτταρα, εκκρίνουν κυτταροκίνες, επηρεάζοντας και αλληλεπιδρώντας με όλους τους άλλους κυτταρικούς πληθυσμούς στο τοπικό μικροπεριβάλλον (μακροφάγα, δενδριτικά, ουδετερόφιλα, επιθηλιακά, κύτταρα του ενδοθηλίου). Μελέτες σε ανθρώπους αλλά και σε ποντίκια έχουν αναγνωρίσει ότι είναι διαφορετικοί οι Τ κυτταρικοί πληθυσμοί που εμπλέκονται στη Νόσο Crohn από αυτούς της Ελκώδους Κολίτιδας. Επιπρόσθετα, ακόμη και στον ίδιο ασθενή με Νόσο Crohn δύναται να παρατηρηθούν αλλαγές των Τ κυτταρικών πληθυσμών καθώς η νόσος εξελίσσεται (48).

Δ3γ. Αιτιοπαθογένεια: Ανοσολογική απόκριση: Th1, Th2 και Th17 κύτταρα

Τα Τ λεμφοκύτταρα χωρίζονται σε υποπληθυσμούς ανάλογα με το προφίλ των κυτταροκινών που εκκρίνουν (εικόνα 2). Ο αριθμός αυτών των κυτταροκινών μεγαλώνει χρόνο με το χρόνο ενώ η δράση μερικών από αυτές παρουσιάζει αλληλοεπικάλυψη (εικόνα 2). Αυτό που οφείλει να λαμβάνει υπόψιν του κάθε ερευνητής είναι ότι η ανοσολογική απόκριση παρουσιάζει 'πλαστικότητα', αλλάζοντας συνεχώς με τις αλλαγές του περιβάλλοντος. Και η ελάχιστη αλλαγή στο χρονικό πλαίσιο, στο ποσό ή στη σύνθεση των εκκρινόμενων κυτταροκινών μπορεί να έχει μεγάλες επιπτώσεις στη ανοσολογική απόκριση (22).

Η Th1 ανοσολογική απάντηση διεγείρεται ως απόκριση σε ενδοκυττάρια παθογόνα (ιοί, μυκοβακτήρια). Η συντονισμένη ανοσία έχει ως στόχο την ακινητοποίηση του εισβολέα (π.χ., με τη δημιουργία κοκκιώματος) και την έκκριση παραγόντων που προάγουν την ενδοκυττάρια καταστροφή του (IFN γ , TNF α), ή ακόμη και την επαγωγή της διαφοροποίησης των κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων. Το κυριότερο χαρακτηριστικό της Th1 ανοσολογικής απάντησης είναι ο σχηματισμός κοκκιωμάτων όπως αυτών που παρατηρούμε στη Νόσο Crohn (49). Η ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων γίνεται παρουσία αντιγόνων από τα αντιγόνο-παρουσιαστικά κύτταρα (δενδριτικά, μακροφάγα ή B κύτταρα). Τα κύτταρα αυτά εκκρίνουν IL-12 με αποτέλεσμα την προαγωγή της έκκρισης προφλεγμονωδών κυτταροκινών (IFN γ , TNF α και IL1) από τα T κύτταρα (50). Οι κυτταροκίνες αυτές δρώντας σε τοπικό επίπεδο, προάγουν τον ενδοκυττάριο θάνατο των παθογόνων εισβολέων, ενισχύουν τη μετανάστευση άλλων φλεγμονωδών κυττάρων στο σημείο της φλεγμονής, και προάγουν την έκκριση χημειοκινών, προκαλώντας την τοπική ιστική καταστροφή. Με αυτόν τον τρόπο η Th1 ανοσολογική απόκριση περιορίζει τη φλεγμονή σε τοπικό επίπεδο και δημιουργεί ένα μικροπεριβάλλον αφιλόξενο για τα παθογόνα.

Πάραυτα, στα πλαίσια της Th1 ενεργοποίησης, το μονοπάτι της ανοσολογικής απόκρισης παρουσιάζει παρεκκλίσεις. Η IL12, αποτελούμενη από δύο αλυσίδες – τις p40 και p35, ανήκει σε μια ευρύτερη οικογένεια διαφορετικών κυτταροκινών (51). Η IL12p40 χρησιμοποιείται και από μια άλλη προ-φλεγμονώδη κυτταροκίνη, την IL23 (p40/p19 ετεροδιμερές), η οποία εμπλέκεται στην ενεργοποίηση ενός διαφορετικού πληθυσμού T-κυττάρων, των Th17. Αναστολή (blocking) της IL12, έχει ως αποτέλεσμα την ταυτόχρονη αναστολή της Th1 ανοσολογικής απάντησης, εμποδίζοντας την έκκριση του καταρράκτη κυτταροκινών. Εν τούτοις, στο ενδεχόμενο αυτό, άλλοι κυτταρικοί πληθυσμοί, όπως τα NK κύτταρα και τα μακροφάγα, έχουν τη δυνατότητα παραγωγής των Th1 κυτταροκινών, TNF α και IFN γ , ανεξάρτητα από την παρουσία ή όχι IL-12 (51).

Ο Th17 κυτταρικός πληθυσμός, ο οποίος περιγράφηκε πρόσφατα (52), παράγει IL17 και IL22, οι οποίες ως προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες είναι ικανές να προάγουν την τοπική ιστική καταστροφή (εικόνα 2). Τα Th17 λεμφοκύτταρα ενεργοποιούνται από το συνδυασμό της IL6 με τον TGF- β (μέσω ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα ROR γ t (53) και προάγουν την περαιτέρω διαφοροποίησή τους σε ώριμα Th17, ικανά για παραγωγή IL23. Καθώς η IL23 μοιράζεται την υπό-ομάδα p40 με την IL12, είναι προφανές ότι αντισώματα κατά της p40 θα είχαν ως

αποτέλεσμα αναστολή της λειτουργίας και των δύο κυτταροκινών (IL12 και IL23). Σε φλεγμαίνοντα βλεννογόνο ασθενών με Νόσο Crohn, έχουν ανιχνευτεί αυξημένα επίπεδα των κυτταροκινών IL17 και IL22, υποδηλώνοντας ότι οι κυτταροκίνες αυτές μπορεί να εμπλέκονται στην αιτιοπαθογένεια της νόσου(54) (55). Πράγματι, επιλεκτική αναστολή της IL-23 και όχι της IL-12 σε πειραματόζωα, είχε ως αποτέλεσμα τον έλεγχο της φλεγμονής του βλεννογόνου. Η παρατηρούμενη αυτή μετατόπιση στην ανοσολογική απάντηση από τον Th1 στον Th17 κυτταρικό πληθυσμό, ενισχύεται και από το γεγονός ότι ασθενείς με Νόσο Crohn δεν ανταποκρίνονται σε αγωγή με αντί-IFN γ .

Ένας τρίτος κυτταρικός πληθυσμός εμπλεκόμενος στην ανοσολογική απόκριση είναι τα Th2 λεμφοκύτταρα. Τα κύτταρα αυτά εκκρίνουν IL-4, IL-5, και IL-13 (56). Τα Th2 κύτταρα προάγουν την ατοπία μέσω επαγωγής της IgE και ενεργοποίησης ηωσινοφίλων και μαστοκυττάρων. Αρχικά υπήρχε η αντίληψη ότι η Ελκώδης Κολίτιδα ήταν αποτέλεσμα της Th2 ανοσολογικής απάντησης. Το δόγμα αυτό αμφισβητήθηκε μετά την παρατήρηση ότι σε ιστούς ασθενών με Ελκώδη Κολίτιδα δεν ανιχνεύονταν IL4 και επιπλέον υπήρχαν αυξημένα επίπεδα τόσο IL-13 όσο και IFN- γ (57). Μια άλλη ομάδα ερευνητών υποστήριξε ότι η IL-13 στους φλεγμαίνοντες ιστούς των ασθενών αυτών παράγεται από τα NK- κύτταρα (48), και στρέφεται εναντίον των επιθηλιακών κυττάρων με στόχο τη δυσλειτουργία του επιθηλίου (56). Τα ευρήματα αυτά θα μπορούσαν εν μέρει να εξηγήσουν και την επιφανειακή προσβολή του επιθηλίου στην Ελκώδη Κολίτιδα σε αντίθεση με τη Νόσο του Crohn. Επιπρόσθετα, το γεγονός ότι το infliximab (χμιαρικό μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του TNFa) παρουσιάζει μερική δράση και σε ασθενείς με Ελκώδη Κολίτιδα, υποδηλώνει ότι η νόσος δεν είναι αποτέλεσμα αποκλειστικά της Th2 ανοσολογικής απόκρισης (58).

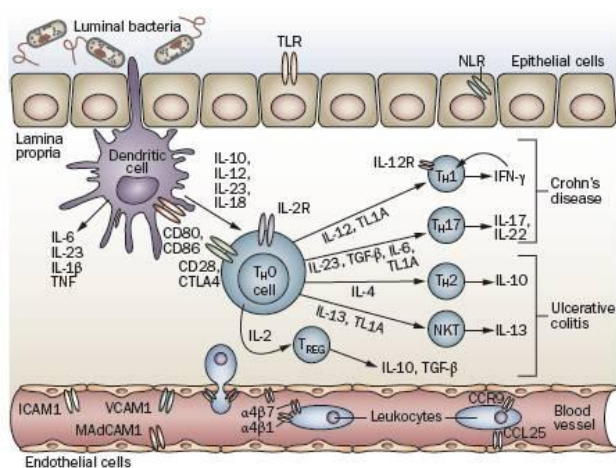
Οι διαφορετικοί υποπληθυσμοί T βοηθητικών κυττάρων που περιγράφηκαν, δε μπορούν να χαρακτηριστούν από αποκλειστικότητα στην ανοσολογική απάντηση που εκλύουν τα διάφορα ερεθίσματα. Αντίθετα το κύριο γνώρισμα τους είναι η 'πλαστικότητα' στην ανοσολογική απόκριση. Για παράδειγμα, τα Th17 λεμφοκύτταρα είναι ικανά να παράγουν IL-17 και IFN- γ (59), ενώ έχουν περιγραφεί T λεμφοκύτταρα τα οποία παράγουν IL-10 και IFN- γ (60). Παρομοίως, ανάλογα με τις συνθήκες του μικροπεριβάλλοντος, διαφορετικά κύτταρα δράσης μεταναστεύουν στον φλεγμαίνοντα ιστό. Για παράδειγμα, CCR9+ CD4+ T λεμφοκύτταρα μεταναστεύουν προς τα επιθηλιακά κύτταρα του λεπτού εντέρου που εκφράζουν την

CCL25 (TECK) χημειοκίνη (61; 62), ενώ CXCR3+ T κύτταρα μεταναστεύουν προς το κολονικό επιθήλιο ασθενών που εκφράζουν της CXCR3 συνδεδεμένες χημειοκίνες (63). Με βάση τα παραπάνω, η ταξινόμηση των υποπληθυσμών των T κυττάρων με βάση την έκκριση κυτταροκινών δε μπορεί να θεωρηθεί απόλυτα σωστή.

Εικόνα 2

Η εκδήλωση της Νόσου Crohn και της Ελκώδους Κολίτιδας είναι αποτέλεσμα ενός καταρράκτη αντιδράσεων ανοσολογικής φύσης. Η αλληλεπίδραση ξενιστή με τον παθογόνο εισβολέα στην επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων εμπλέκει τη συγγενή ανοσία – μέσω των NOD-like και toll-like υποδοχέων - αλλά και την επίκτητη ανοσία στην έναρξη των φλεγμονωδών αντιδράσεων. Ακολουθεί η αλληλεπίδραση των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων με τα ‘αδιέγερτα’ T κύτταρα. Η ενεργοποίηση των κυττάρων αυτών τα οδηγεί μέσω της δράσης προφλεγμονωδών κυτταροκινών σε διαφοροποίηση προς Th1, Th2, Th17, και NK κύτταρα. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυκλοφορούντων λευκοκυττάρων και των παραγόμενων κυτταροκινών έχουν ως αποτέλεσμα τη μετανάστευση λεμφοκυττάρων προς το χόριο μέσω των υποδοχέων των ενδοθηλιακών κυττάρων.

Πηγή: Melmed and Targan 2010 (64)



Δ3δ. Αιτιοπαθογένεια: Ανοσολογική απόκριση: Ενίσχυση και ρύθμιση

Το τελευταίο αλλά ίσως πιο κρίσιμο βήμα προς τη φλεγμονή του εντερικού βλεννογόνου στους ασθενείς με ΙΦΕΝ είναι η ρύθμιση της απάντησης του ανοσοποιητικού συστήματος(65). Η ισορροπία του γαστρεντερικού συστήματος χαρακτηρίζεται από την καταστολή της ανοσολογικής απόκρισης σε αντίθεση με τα υπόλοιπα συστήματα. Υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν παρατηρείται αντίδραση του ανοσοποιητικού προς την εντερική χλωρίδα ή προς αντιγόνα των τροφών. Για την καταστολή του τόνου του ανοσοποιητικού στο βλεννογόνο του εντέρου, υπεύθυνα είναι τα ρυθμιστικά κύτταρα. Τα ρυθμιστικά αυτά κύτταρα μπορεί να είναι Τ ή Β κύτταρα, δενδριτικά, μακροφάγα ή ΝΚ κύτταρα, αλλά αυτά που έχουν τραβήξει την προσοχή των ερευνητών είναι τα ρυθμιστικά Τ κύτταρα (66; 67). Έχουν αναγνωριστεί πολλά είδη Τ ρυθμιστικών κυττάρων (Tregs) και μάλιστα βρίσκονται σε αφθονία στο γαστρεντερικό σωλήνα. Διαφορετικοί CD4+ Tregs υποπληθυσμοί έχουν εμπλακεί στην καταστολή της ανοσολογικής απόκρισης. Για παράδειγμα τα Tr1 κύτταρα εκκρίνουν IL10 (68), μια κυτταροκίνη με δυναμικά ανοσοκατασταλτική δράση, η οποία θα μπορούσε να είναι εν μέρει υπεύθυνη για την καταστολή του ανοσοποιητικού. Ποντίκια με ανεπάρκεια της IL10 αναπτύσσουν φλεγμονώδη νόσο του εντέρου παρόμοια με τη Νόσο του Crohn (69). Ένας άλλος υποπληθυσμός, τα Th3 ρυθμιστικά κύτταρα παράγουν TGF-β, η οποία ως ανοσοκατασταλτική κυτταροκίνη προάγει την παραγωγή IgA, και καταστέλλει την ενεργοποίηση των Τ και Β κυττάρων(70).

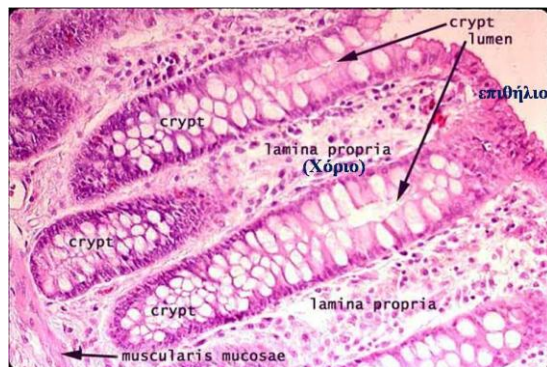
Ο περισσότερο μελετημένος πληθυσμός ρυθμιστικών κυττάρων είναι τα CD4+25+Tregs (66; 67). Πρόκειται για ρυθμιστικά κύτταρα που ανήκουν στην συστηματική απόκριση και χρειάζονται τον μεταγραφικό παράγοντα FoxP3 προκειμένου να ενεργοποιηθούν. Η απουσία FoxP3 στον άνθρωπο (ΙΡΕΧ σύνδρομο) (71) οδηγεί σε αυτοάνοσης αρχής ενδοκρिनοπάθειες, σε ανοσοανεπάρκεια, καθώς και αυτοάνοση εντεροπάθεια (εντοπισμένη στο λεπτό έντερο). Πειραματικά μοντέλα κολίτιδας σε ποντίκια αναδεικνύουν τον κύριο ρόλο των Tregs στην επαγωγή της φλεγμονής του εντέρου. Ο ρόλος τους όμως σε ασθενείς με ΙΦΕΝ παραμένει ασαφής. Οι ασθενείς με ΙΦΕΝ φαίνεται να έχουν σχετικά μειωμένο αριθμό Tregs στο αίμα και στο παχύ έντερο. Ωστόσο, τα κύτταρα αυτά είναι λειτουργικά *in vitro*(72). Τέλος και τα CD8+ κύτταρα αποτελούν ρυθμιστικά κύτταρα για το γαστρεντερικό σύστημα. Έχουν περιγραφεί διάφοροι υποπληθυσμοί CD8+ Tregs όπως τα TrE κύτταρα τα οποία δεν ανιχνεύονται σε ασθενείς με ΙΦΕΝ (73; 74).

Δ4. Αιτιοπαθογένεια: Επιθήλιο

Ο βλεννογόνος του πάχους εντέρου αποτελεί την εσώτατη στιβάδα του παχέος εντέρου. Συμπεριλαμβάνει το κολονικό επιθήλιο, το οποίο καλύπτει την επιφάνεια απορρόφησης και τις κρύπτες, και το χόριο (εικόνα 3). Το κολονικό επιθήλιο αποτελείται από τα κολονικά επιθηλιακά κύτταρα, τα ενδοκρινικά επιθηλιακά κύτταρα και τα καλκοειδή βλεννοπαραγωγά κύτταρα. Ενδοεπιθηλιακά κύτταρα μεταναστεύουν μέσω του επιθηλίου στο χόριο. Η κύρια λειτουργία του επιθηλίου είναι η απορρόφηση θρεπτικών συστατικών, νερού και ηλεκτρολυτών. Τις τελευταίες δεκαετίες ανακαλύφθηκε και μια πλειάδα άλλων λειτουργιών του επιθηλίου, όπως η μεταφορά μακρομορίων, ο ρόλος του φραγμού, οι εκκριτικές λειτουργίες και κυρίως ο ρόλος του σε ανοσολογικούς μηχανισμούς

Εικόνα 3

Ο βλεννογόνος του παχέος εντέρου.



Η μεγάλη επιφάνεια του εντερικού βλεννογόνου εκτίθεται συνεχώς σε εκατομμύρια δυνητικά παθογόνων αντιγόνων από το περιβάλλον. Προκειμένου να ανταποκριθεί στις λειτουργίες του, έχει αναπτύξει ένα μοναδικό ανοσολογικό σύστημα το οποίο ελέγχει την ισορροπία μεταξύ ανταπόκρισης ή μη στα ερεθίσματα (ανοχή).

Αποτελείται από ένα ολοκληρωμένο δίκτυο που περιλαμβάνει κύτταρα του λεμφικού συστήματος αλλά και αντισώματα, χημειοκίνες και κυτταροκίνες. Τα αντιγόνοπαρουσιαστικά κύτταρα όπως μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα, και τα T

λεμφοκύτταρα με την έκκριση κυτταροκινών διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην ανορχήστρωση της ανοσολογικής απάντησης(75) (76).

Ειδικότερα, οι κυτταροκίνες οι οποίες παράγονται από τους T-κυτταρικούς υποπληθυσμούς και η μεταγραφική ρύθμιση της διαφοροποίησης των T κυττάρων φαίνεται να είναι θεμελιώδους σημασίας για την ανοσολογική απόκριση του βλεννογόνου. Η λεπτομερή κατανόηση της διαφοροποίησης των T κυττάρων και του ρόλου των παραγόμενων κυτταροκινών είναι απαραίτητη για τη κατανόηση της ανοσολογικής αντίδρασης του βλεννογόνου τόσο σε υγιείς όσο και σε ασθενείς με ΙΦΕΝ (77).

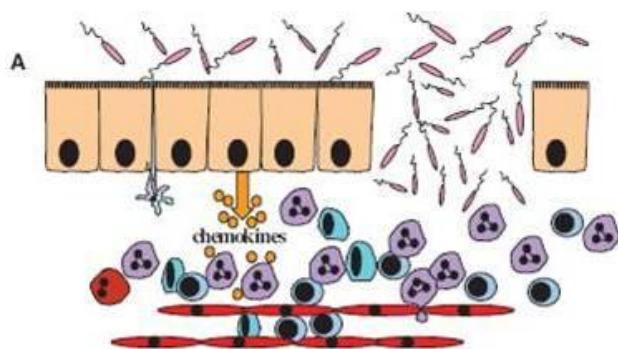
Επιπλέον, ο ρόλος των χημειοκινών και των υποδοχέων τους στην ανοσολογική ρύθμιση του βλεννογόνου του εντέρου, μελετήθηκε σε μοντέλα πειραματόζωων. Ποντίκια με έλλειψη CCR5 υποδοχέα εμφανίστηκαν ανθεκτικά στη επαγωγή κολίτιδας μέσω προσθήκης του θεικού νατρίου δεξτράνης (DSS) στο πόσιμο νερό (78). Εναλλακτικά χρήση αντισωμάτων εναντίον του CCR2 υποδοχέα ή εναντίον του συνδυασμού CCR5 και CXCR3, είχε ως αποτέλεσμα μειωμένο επιπολασμό κολίτιδας στα ίδια ποντίκια(78). Η προστασία αυτή του βλεννογόνου από την επαγόμενη με DSS κολίτιδα οφείλονταν στην κατάργηση της μετανάστευσης των λευκοκυττάρων προς των εντερικό βλεννογόνο λόγω του φαρμακολογικού αποκλεισμού των υποδοχέων χημειοκινών CCR2, CCR5 και CXCR3 (79). Η ευρεία έκφραση αυτών των υποδοχέων από τα μονοκύτταρα και T λεμφοκύτταρα, των οποίων ο ρόλος είναι γνωστός στην παθογένεση των ΙΦΕΝ, είχε ως αποτέλεσμα την άρση της μετανάστευσης των κυττάρων αυτών του ανοσοποιητικού προς το βλεννογόνο. Η θεωρία αυτή, ενισχύθηκε περαιτέρω μετά από πρόσφατες μελέτες σε πειραματικά μοντέλα φλεγμονής στις οποίες η παρουσία T λεμφοκυττάρων στο έντερο επιδείνωνε υπάρχοντες ανωμαλίες του επιθηλιακού φραγμού με συνέπεια την επιδείνωση της φλεγμονής (80; 81).

Και ενώ αρκετές μελέτες εμπλέκουν την αλληλεπίδραση των επιθηλιακών κυττάρων μέσω της έκφρασης των χημειοκινών με τα κυκλοφορούντα T λεμφοκύτταρα και την μετανάστευσή τους προς το βλεννογόνο ασθενών με ΙΦΕΝ, η έκφραση και λειτουργία των χημειοκινών αυτών έχει μελετηθεί ελάχιστα ως σήμερα (82). Έκφραση των υποδοχέων χημειοκινών από τα επιθηλιακά κύτταρα του λεπτού και παχέος εντέρου παρατηρήθηκε σε συνδυασμό με την παραγωγή χημειοκινών από τα εν λόγω κύτταρα (83; 84). Οι αρχικές αυτές μελέτες απέδωσαν περιορισμένο λειτουργικό ρόλο στους υποδοχείς χημειοκινών - μέσω της αλληλεπίδρασης με

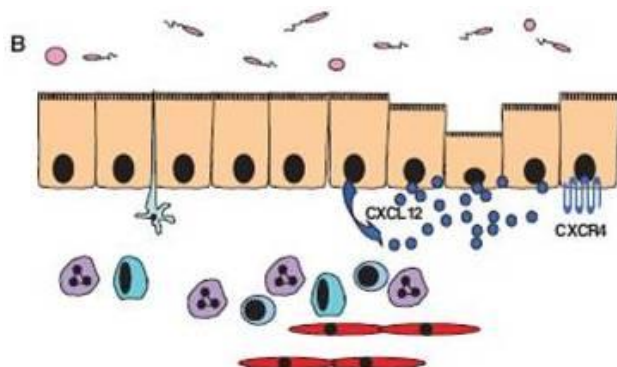
πρόσθετες χημεικίνες ή μέσω της έκφρασης προσκολλητικών μορίων - για την τροποποίηση της ανοσολογικής απάντησης των επιθηλιακών κυττάρων σε καταστάσεις φλεγμονής (83) (84). Πρόσφατα όμως στοιχεία από διάφορα ερευνητικά κέντρα προσδίδουν έναν ουσιώδη ρόλο στη πρόσδεση υποδοχέων - χημειοκινών όσον αφορά τη διατήρηση ή αποκατάσταση του επιθηλιακού φραγμού υπό συνθήκες φλεγμονής (85-87) (**Εικόνα 4**).

Εικόνα 4

A. Ρύθμιση της κυκλοφορίας και μετανάστευσης κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος μέσω των χημειοκινών σε ασθενείς με ΙΦΕΝ. Η αυξημένη παραγωγή και έκφραση χημειοκινών από τα επιθηλιακά κύτταρα του βλεννογόνου του εντέρου κατευθύνει τα κυκλοφορούντα λεμφοκύτταρα προς το βλεννογόνο. Πηγή Zimmerman 2008(82)



B. Η μη επαγόμενη χημειοκίνη CXCL12, η οποία παράγεται από τα επιθηλιακά κύτταρα του εντερικού βλεννογόνου, δύναται να ενεργοποιήσει σε καλλιέργειες κυττάρων τη διαδικασία της επούλωσης του βλεννογόνου μέσω μετανάστευσης επιθηλιακών κυττάρων. Πηγή Zimmerman 2008(82)



1.2. ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ ΚΑΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΟΥΣ

α. Γενικά

Στο γενικό όρο κυτταροκίνες, περιλαμβάνεται μια μεγάλη ομάδα ανόμοιων μεταξύ τους διαλυτών πρωτεϊνών και πεπτιδίων που έχουν την ιδιότητα να δρουν σαν χυμικοί ρυθμιστές ακόμη και σε απειροελάχιστες συγκεντρώσεις (nanomolar). Μεσολαβούν σε σημαντικά κυτταρικά και συστηματικά φαινόμενα όπως στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση, την κυτταρική διαφοροποίηση, την ανοσολογική απόκριση, τη φλεγμονή, τη λοίμωξη, τη σήψη και την επούλωση των ιστών. Οι κυτταροκίνες ρυθμίζουν την έναρξη, την ένταση και διάρκεια αυτών των κυτταρικών φαινομένων, οπότε η παραγωγή και δράση τους δεν μπορεί να είναι διαρκής ή να ακολουθεί συγκεκριμένο πρότυπο, αλλά είναι παροδική και επαγομένη συνήθως από τη παρουσία εξωτερικού ερεθίσματος. Οι μη-μεταφραζόμενες 3' περιοχές του mRNA πολλών κυτταροκινών είναι πλούσιες σε αλληλουχίες AU, οι οποίες εξυπηρετούν τη γρήγορη αποδόμηση του mRNA των κυτταροκινών και σχετίζονται με το μικρό χρόνο ημίσειας ζωής του (88; 89).

Μέχρι σήμερα πάνω από 100 διαφορετικές κυτταροκίνες έχουν αναγνωρισθεί (90). Εκτός από τις χημειοκίνες, η οικογένεια των κυτταροκινών περιλαμβάνει και τις ιντερλευκίνες (IL), παράγοντες νέκρωσης των όγκων (TNF), ιντερφερόνες (IFN), παράγοντες διέγερσης αποικιών (CSF), νευρικούς αυξητικούς παράγοντες (NGF), και αυξητικούς παράγοντες μετατροπής (TGF) (πίνακας 1).

Πίνακας 1. Οι κυριότερες ομάδες κυτταροκινών και τυπικά παραδείγματα

Ομάδα	Τυπικά παραδείγματα
Ιντερλευκίνες	IL-1α, IL-1β, IL-2 έως IL-26
Χημειοκίνες	IL-8, MCP, MIP-1, RANTES, EOTAXINS, MIG, IP-10, ITAC
Παράγοντες νέκρωσης του όγκου	TNFα και TNFβ
Ιντερφερόνες	IFNα, IFNβ, IFNγ
Αυξητικοί παράγοντες	G-CSF, M-CSF, GM-CSF, SCF
Άλλες κυτταροκίνες	VEGF, FGF, HGF, TGFβ

Οι απόψεις της επιστημονικής κοινότητας για το αν οι κυτταροκίνες και οι ορμόνες αποτελούν ξεχωριστές κατηγορίες χημικών ουσιών, παραμένουν μέχρι σήμερα συγκρουόμενες. Οι ανατομικές και δομικές διαφορές που θεωρούσαμε παλαιότερα ότι τις διαχώριζαν, αμβλύνονται όσο περισσότερα μαθαίνουμε για τις ουσίες αυτές. Ίσως μια διαφορά μεταξύ των δύο μορίων είναι η ευρεία κατανομή των κυττάρων παραγωγής για τις κυτταροκίνες σε αντίθεση με τα β κύτταρα των αδένων που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή των ορμονών. Κατ'ουσίαν όλα τα κύτταρα που φέρουν πυρήνα, αλλά κυρίως τα ενδοθηλιακά, επιθηλιακά και μακροφάγα έχουν την δυνατότητα παραγωγής κυτταροκινών IL-1, IL-6, and TNF-α (91).

Η δράση των κυτταροκινών σε ένα συγκεκριμένο κυτταρικό πληθυσμό, εξαρτάται από την συγκεκριμένη κυτταροκίνη, τη συγκέντρωσή της, την παρουσία και συγκέντρωση του υποδοχέα της στην κυτταρική επιφάνεια, και το είδος του καταρράκτη αντιδράσεων που θα ενεργοποιηθούν κατόπιν της σύνδεσης κυτταροκίνης – υποδοχέα. Τα δύο τελευταία γεγονότα εξαρτώνται από το είδος του κυττάρου – στόχου.

Ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα των κυτταροκινών είναι ο 'πλεονασμός', το γεγονός δηλαδή πολλές κυτταροκίνες να μοιράζονται την ίδια λειτουργία. Αυτές μπορεί να περιλαμβάνουν την αύξηση ή μείωση της έκφρασης και μεταγραφής γονιδίων, με αποτέλεσμα την επιπλέον παραγωγή κυτταροκινών ή και την παραγωγή των αντίστοιχων υποδοχέων τους. Άλλο χαρακτηριστικό των κυτταροκινών είναι η

έκκριση μιας συγκεκριμένης κυτταροκίνης από διαφορετικούς τύπους κυττάρων ή και η δράση μιας συγκεκριμένης κυτταροκίνης σε διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς. Το φαινόμενο αυτό καλείται πλειοτροπισμός (**πίνακας 2**).

Πίνακας 2. Οι κυριότερες προφλεγμονώδεις (2α) και αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (2β). Πηγές:(92-96) και www.copewithcytokines.de

2α

Κυτταροκίνη	Παραγωγή	Κύτταρα στόχος	Λειτουργία
IL-1α IL-1β	Μονοκύτταρα μακροφάγα B κύτταρα Δενδρική	βοηθητικά T κύτταρα	co-stimulation
		B κύτταρα	Ωρίμανση και διαφοροποίηση
		NK κύτταρα	Ενεργοποίηση Φλεγμονή, ανπδράσεις οξείας φάσης
IL-2	βοηθητικά T1 κύτταρα	Ενεργοποιημένα T και B κύτταρα, NK κύτταρα	αύξηση, πολλαπλασιασμός, ενεργοποίηση
IL-6	Μονοκύτταρα μακροφάγα βοηθητικά T2 κύτταρα Κύτταρα στρώματος βοηθητικά T17 κύτταρα	ενεργοποιημένα B κύτταρα	διαφοροποίηση σε πλασματοκύτταρα
		πλασματοκύτταρα	Έκκριση αντισωμάτων
		αρχέγονα κύτταρα	Διαφοροποίηση
		διάφορα	Αντιδράσεις οξείας φάσης
IL-12	Μακροφάγα και B κύτταρα	ενεργοποιημένα κυτταροτοξικά T κύτταρα	διαφοροποίηση σε κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα(σε συνδιασμό με IL-2)
		NK κύτταρα	Ενεργοποίηση
IL-17A-F	βοηθητικά T17 κύτταρα	Ποικίλοι κυτταρικοί πληθυσμοί	Μετανάστευση T-κυττάρων προς περιφερικούς ιστούς (συνέργεια NF-κΒ) Επαγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως TNF-α, IL-6, και IL-1β
IL-23	Δενδρική κύτταρα και ενεργοποιημένα μακροφάγα	T κύτταρα μνήμης Μακροφάγα	Παραγωγή IFN-γ Ενεργοποίηση του παράγοντα STAT3 προς παραγωγή IL-17 Διαφοροποίηση CD4+ προς βοηθητικά T17 κύτταρα
IFN-α	Λευκοκύτταρα	διάφορα	Αναστολή ιικού πολλαπλασιασμού έκφραση MHC I
IFN-β	Ινοβλάστες	διάφορα	Αναστολή ιικού πολλαπλασιασμού έκφραση MHC I
IFN-γ	βοηθητικά T1 κύτταρα κυτταροτοξικά T και NK κύτταρα	διάφορα	Αναστολή ιικού πολλαπλασιασμού
		μακροφάγα	Έκφραση MHC
		ενεργοποιημένα B κύτταρα	Μετατροπή Ig σε Ig _{2a}
		βοηθητικά T2 κύτταρα	Αναστολή πολλαπλασιασμού
TNFα	Μακροφάγα, μαστοκύτταρα και NK κύτταρα βοηθητικά T17 κύτταρα	μακροφάγα	Αντιμετώπιση παθογόνων
		κύτταρα όγκου	Έκφραση κυτταροκινών
TNF-β	βοηθητικά T1 και κυτταροτοξικά T-κύτταρα	Κύτταρα όγκου	Κυτταρικός θάνατος
		Φαγοκύτταρα	Φαγοκυττάρωση, παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου
		Κύτταρα όγκου	Κυτταρικός θάνατος

2β

Κυτταροκίνη	Παραγωγή	Κύτταρα στόχος	Λειτουργία
IL-3	βοηθητικά T κύτταρα NK κύτταρα	Αρχέγονα κύτταρα	αύξηση και διαφοροποίηση
		Βλαστικά κύτταρα	αύξηση και απελευθέρωση ισταμίνης
IL-4	βοηθητικά T2 κύτταρα	Ενεργοποιημένα B κύτταρα	πολλαπλασιασμός και διαφοροποίηση σύνδεση IgG ₁ και IgE
		μακροφάγα	MHC Class II
		T κύτταρα	Πολλαπλασιασμός
IL-5	βοηθητικά T2 κύτταρα	ενεργοποιημένα B κύτταρα	πολλαπλασιασμός και διαφοροποίηση σύνθεση IgA
IL-7	Κύτταρα μυελού και θύμου	αρχέγονα κύτταρα	διαφοροποίηση σε προγονικά B και T κύτταρα
IL-8	Μακροφάγα και ενδοθηλιακά κύτταρα	ουδετερόφιλα	Χημειοταξία
IL-10	βοηθητικά T2 κύτταρα	μακροφάγα	Μείωση παραγωγής κυτταροκινών
		B κύτταρα	Ενεργοποίηση
IL-13	βοηθητικά T2 κύτταρα	Μακροφάγα, β-κύτταρα, μονοκύτταρα	Αναστολή ενεργοποίησης προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Ρυθμιστής της φλεγμονώδους απόκρισης
TGF-β	T κύτταρα και μονοκύτταρα	μονοκύτταρα, μακροφάγα	Χημειοταξία
		ενεργοποιημένα μακροφάγα	Σύνθεση IL-1
		ενεργοποιημένα B κύτταρα	Σύνθεση IgA
		διάφορα	Αναστολή πολλαπλασιασμού

Οι κυτταροκίνες συχνά παράγονται ως έναν καταρράκτη αντιδράσεων, καθώς ένα μόριο της ομάδας αυτής μπορεί να διεγείρει το κύτταρο – στόχο με τελικό αποτέλεσμα την επιπλέον παραγωγή άλλων κυτταροκινών. Δηλαδή, κυτταροκίνες, παραγόμενες από διαφορετικούς τύπους κυττάρων δημιουργούν πολύπλοκα δίκτυα αλληλεπιδράσεων μεταξύ των κυττάρων αυτών, που συνθέτουν τους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς στα διάφορα κυτταρικά φαινόμενα. Στα δίκτυα αυτά, μια κυτταροκίνη μπορεί να επάγει ή να αναστέλλει την παραγωγή και έκφραση μιας άλλης κυτταροκίνης ή ενός υποδοχέα κυτταροκίνης στα παρακείμενα κύτταρα, δημιουργώντας τελικά ένα καταρράκτη αλληλεπιδράσεων. Επιπρόσθετα, έχουν τη δυνατότητα συνεργικής αλλά και ανταγωνιστικής δράσης.

Η γενίκευση των λειτουργιών είναι αδύνατη για τις κυτταροκίνες. Πάραυτα, ρυθμίζουν τη λειτουργική απόκριση διαφόρων κυττάρων και ιστών με αυτοκρινή,

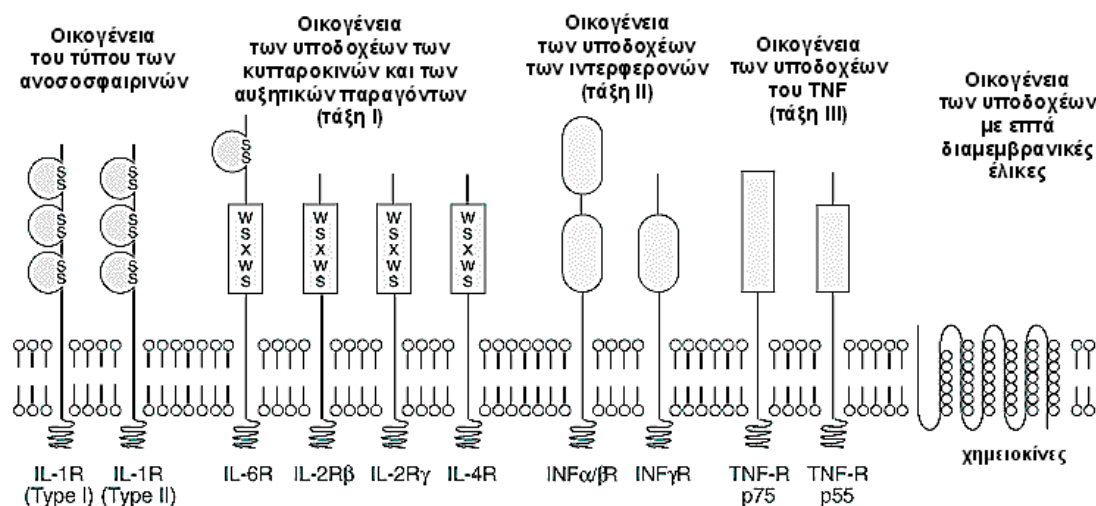
παρακρινή και ενδοκρινή τρόπο (97). Οι κυτταροκίνες είναι ισχυρά μόρια και μπορεί να δράσουν σε ιδιαίτερα μικρές συγκεντρώσεις ($10^{-15}M$), συνδεόμενες με ειδικούς υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων. Η σύνδεση της κυτταροκίνης με τον υποδοχέα ενεργοποιεί ενδοκυττάριας οδούς μεταβίβασης του σήματος και ρυθμίζει τη δράση των κυτταροκινών (88).

β. Οι υποδοχείς των κυτταροκινών

β1. Μεμβρανικοί υποδοχείς κυτταροκινών.

Οι υποδοχείς των κυτταροκινών μπορεί να ταξινομηθούν σε πέντε μεγάλες οικογένειες, με βάση τις δομικές ομοιότητες των εξωκυττάριας τμημάτων τους (εικόνα 1) (43).

Εικόνα 1. Οι οικογένειες των υποδοχέων των κυτταροκινών



Στην οικογένεια των υποδοχέων του τύπου των ανοσοσφαιρινών ανήκουν πολλοί υποδοχείς των κυτταροκινών, που διακρίνονται περαιτέρω σε δύο τύπους. Στον τύπο I περιλαμβάνονται οι υποδοχείς του M-CSF και του SCF που στο ενδοκυττάρια τμήμα τους περιέχουν υπομονάδα με δράση κινάσης της τυροσίνης, και στον τύπο II περιλαμβάνονται υποδοχείς όπως αυτός της IL-1 και του TGF, όπου η ενεργοποίησή τους σχετίζεται με τη δράση κινασών της σερίνης-θρεονίνης. Στην οικογένεια των υποδοχέων των κυτταροκινών και των αυξητικών παραγόντων τάξης I, το χαρακτηριστικό του εξωκυττάριας τμήματος είναι ότι όλοι περιέχουν δύο κοινές περιοχές. Η πρώτη περιοχή είναι πλούσια σε κυστεΐνη και εντοπίζεται στο αμινοτελικό άκρο του μορίου. Η δεύτερη κοινή περιοχή κοντά στη διαμεμβρανική περιοχή

του μορίου και απαρτίζεται από την αλληλουχία αμινοξέων τρυπτοφάνη-σερίνη-X-τρυπτοφάνη-σερίνη (WSXSW). Αυτή η οικογένεια μπορεί να διακριθεί περαιτέρω σε υποοικογένειες με βάση κοινές υπομονάδες του υποδοχέα, που συχνά παίζουν κεντρικό ρόλο στη μεταβίβαση του σήματος από τον υποδοχέα. Η υποοικογένεια που περιέχει ζεύγος μορίων της γλυκοπρωτεΐνης 130 (gp130) περιλαμβάνει τις κυτταροκίνες IL-6, IL-11, ογκοστατίνη M (oncostatin M, OSM) (98; 99). Μια άλλη υποοικογένεια χαρακτηρίζεται από κοινή β αλυσίδα (βc) και περιλαμβάνει τους υποδοχείς των IL-3, IL-5 και GM-CSF. Μια κοινή γ αλυσίδα (γc) χαρακτηρίζει τους υποδοχείς των IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 και IL-15. Ο υποδοχέας της IL-2 παρουσιάζει την ιδιαιτερότητα να αποτελείται από τρεις αλυσίδες: μια α αλυσίδα (CD25) που περιλαμβάνει τη θέση σύνδεσης με την κυτταροκίνη, μια β και μια γ αλυσίδα που συμμετέχουν στην ενδοκυττάρια μεταβίβαση σήματος (89).

Η οικογένεια των υποδοχέων των ιντερφερονών (τάξης II) περιλαμβάνει τους υποδοχείς για τις ιντερφερόνες α, β και γ, οι οποίοι έχουν μια παρόμοια περιοχή 210 αμινοξέων με επαναλαμβανόμενα ζεύγη κυστεΐνης στο αμινο- και καρβόξυ- τελικό άκρο του μορίου. Οι οικογένεια των υποδοχέων του TNF (τάξης III) αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνη και περιλαμβάνει τους υποδοχείς p55 και p75 του TNF (TNFR1 και TNFR2 αντίστοιχα). Οι υποδοχείς με επτά διαμεμβρανικές έλικες περιλαμβάνουν τους υποδοχείς των χημειοκινών, τους αδρενεργικούς υποδοχείς και τους υποδοχείς της ροδοψίνης στον αμφιβληστροειδή.

Γενικά, η παρόμοια δομή των υποδοχέων σε κάθε οικογένεια εξηγεί εν μέρει και τις παρόμοιες βιολογικές δράσεις που εμφανίζουν οι αντίστοιχες κυτταροκίνες(88; 89).

β2. Οι διαλυτοί υποδοχείς των κυτταροκινών

Εκτός από τους μεμβρανικούς υποδοχείς των κυτταροκινών έχει βρεθεί ότι παράγονται και εκκρίνονται στην κυκλοφορία του αίματος ή στον εξωκυττάριο χώρο διαλυτοί υποδοχείς, οι οποίοι συνήθως αντιστοιχούν σε εξωκυττάρια τμήματα των αντίστοιχων μεμβρανικών υποδοχέων και μπορούν να τροποποιήσουν σημαντικά, με διάφορους μηχανισμούς, τη βιολογική δράση της κυτταροκίνης-συνδέτη τους(100). Η παραγωγή των διαλυτών υποδοχέων συνήθως ελέγχεται αντίστοιχα με την παραγωγή και έκφραση των μεμβρανικών υποδοχέων.

Πιστεύεται ότι οι διαλυτοί υποδοχείς των κυτταροκινών παράγονται με δύο μηχανισμούς, οι οποίοι εμφανίζουν ιδιαιτερότητες και τροποποιήσεις, ανάλογα με την κυτταροκίνη. Ο πρώτος μηχανισμός αφορά στη δράση πρωτεολυτικών ενζύμων πάνω στο εξωκυττάριο τμήμα του αντίστοιχου μεμβρανικού υποδοχέα, οπότε αποσπάται μια υπομονάδα και απελευθερώνεται ως διαλυτός υποδοχέας στην κυκλοφορία του αίματος ή στον εξωκυττάριο χώρο. Ο μηχανισμός αυτός έχει αποδειχτεί στη δημιουργία των διαλυτών υποδοχέων των TNF, IL-1, IL-2, M-CSF και PDGF(101).

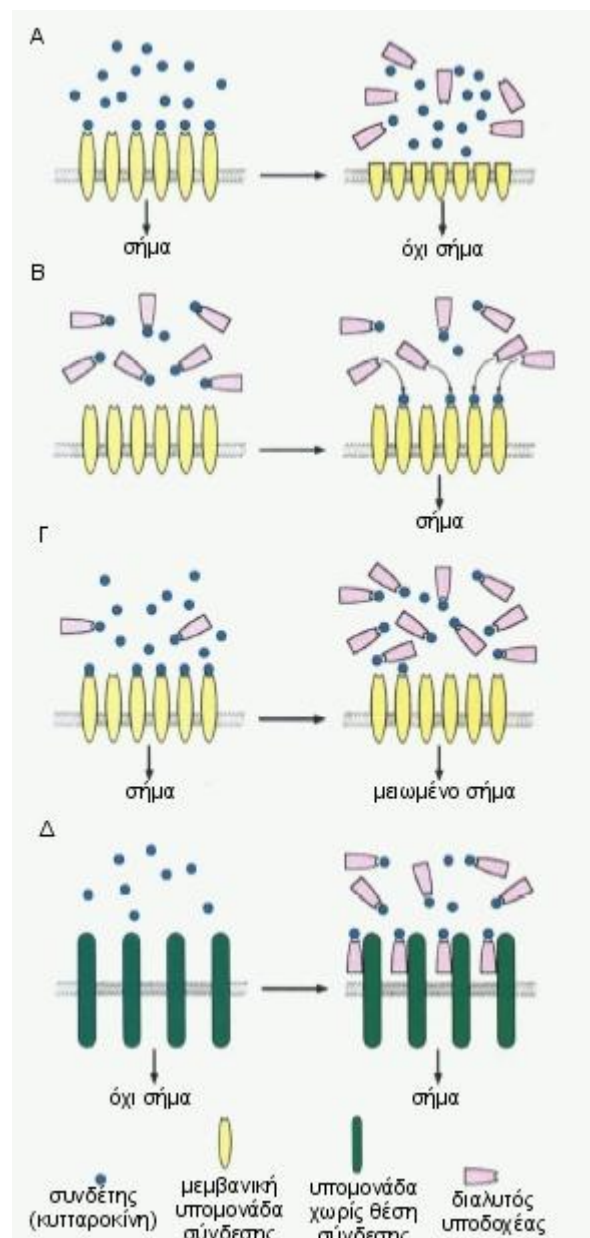
Ο δεύτερος μηχανισμός είναι το εναλλακτικό μάτισμα του mRNA των υποδοχέων, όπου παραλείπεται η έκφραση ορισμένων εξονίων, που συνήθως αντιστοιχούν στην περιοχή σύνδεσης του εξωκυττάριου τμήματος του υποδοχέα με την κυτταρική μεμβράνη. Έτσι το πρωτεϊνικό προϊόν εκκρίνεται ως διαλυτός υποδοχέας. Ο μηχανισμός αυτός έχει αποδειχτεί για τους διαλυτούς υποδοχείς των GM-CSF, G-CSF, IL-4, IL-5, IL-7, IL-9, Fas, IFN α και για τον διαλυτό υποδοχέα της ερυθροποιητίνης(102-105). Για μερικούς υποδοχείς, όπως ο c-Kit και ο υποδοχέας της IL-6, ο μηχανισμός παραγωγής του αντίστοιχου διαλυτού υποδοχέα είναι σύνθετος και περιλαμβάνει εναλλακτικό μάτισμα του mRNA και πρωτεολυτική δράση πάνω στο παραγόμενο μόριο(106) (107-109). Ανεξάρτητα με ποιο μηχανισμό παράγεται ένας διαλυτός υποδοχέας, η παραγωγή του ελέγχεται πολύ στενά, δεδομένου ότι τροποποιούν σημαντικά τη δράση των κυτταροκινών.

Αρχικά είχε θεωρηθεί ότι οι διαλυτοί υποδοχείς δρουν ανασταλτικά, μειώνοντας τη σύνδεση της κυτταροκίνης με τους μεμβρανικούς υποδοχείς. Αυτό ισχύει σε μερικές περιπτώσεις, όπως για τον διαλυτό υποδοχέα του M-CSF - ο οποίος παράγεται με πρωτεόλυση του μεμβρανικού υποδοχέα από μια πρωτεάση που επάγει η ενεργοποιημένη πρωτεϊνική κινάση C - και για τον διαλυτό υποδοχέα p75 του TNF, που επίσης παράγεται με πρωτεόλυση του μεμβρανικού υποδοχέα (110).

Αυτοί οι διαλυτοί υποδοχείς μειώνουν την ευαισθησία του κυτάρου στην αντίστοιχη κυτταροκίνη, δεδομένου ότι το υπολειπόμενο μεμβρανικό τμήμα δεν μπορεί να δεσμεύσει την κυτταροκίνη (Σχήμα 2). Οι διαλυτοί υποδοχείς συνήθως έχουν περισσότερο σύνθετο ρόλο στη δράση των κυτταροκινών. Σύμφωνα με ένα δεύτερο μοντέλο, ο διαλυτός υποδοχέας μπορεί να δεσμεύει την κυτταροκίνη από την κυκλοφορία ή τον εξωκυττάριο χώρο, προστατεύοντάς τη από την αποδόμηση ή την κάθαρσή.

Εικόνα 2. Οι διάφοροι μηχανισμοί δράσης των διαλυτών υποδοχέων κυτταροκινών

Έτσι, αν και ο διαλυτός υποδοχέας δεν εμπλέκεται άμεσα στο μηχανισμό μεταβίβασης σήματος, ενισχύει τη δράση της κυτταροκίνης ρυθμίζοντας τη διαθεσιμότητά της. Για παράδειγμα, η δεσμευτική πρωτεΐνη της αυξητικής ορμόνης, που αποτελεί μέρος του εξωκυττάριου τμήματος του υποδοχέα, δεσμεύει περίπου το 15% της ορμόνης και μειώνει το ρυθμό κάθαρσης κατά 10 φορές, αυξάνοντας έτσι τη συνολική ημίσεια ζωής της (Σχήμα 2B)(111).



Ο περισσότερο κατανοητός μηχανισμός δράσης των διαλυτών υποδοχέων είναι ο ανταγωνισμός με τον αντίστοιχο μεμβρανικό στη σύνδεση με την κυτταροκίνη. Η ικανότητα του διαλυτού υποδοχέα να ανταγωνίζεται τον μεμβρανικό εξαρτάται από τη συγγένεια σύνδεσης με την κυτταροκίνη και τη συγκέντρωσή του. Τυπικό παράδειγμα αποτελεί ο διαλυτός υποδοχέας του EGF, όπου η κυτταροκίνη συνδέεται με την ίδια συγγένεια με τους δύο υποδοχείς, οπότε η αναστολή της δράσης της κυτταροκίνης είναι αντίστροφα εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση του διαλυτού υποδοχέα. Ανασταλτική δράση εμφανίζουν ακόμη οι διαλυτοί υποδοχείς των IL-1, IL-4 και TNF, αν και οι βιολογικές δράσεις τους είναι περισσότερο σύνθετες (101) (112).

Το σύμπλεγμα IL-6/sIL-6R μπορεί να διεγείρει κύτταρα που φέρουν μόνο την υπομονάδα gp130 στην επιφάνειά τους και όχι τον πλήρη υποδοχέα, ενισχύοντας έτσι τις βιολογικές δράσεις της IL-6 (113) (114). Κατά συνέπεια, όταν μελετάται η δράση της IL-6 πρέπει να λαμβάνεται ταυτόχρονα υπόψη η παρουσία και η συμμετοχή του sIL-6R.

γ. Ενδοκυττάρια μεταβίβαση σήματος των κυτταροκινών.

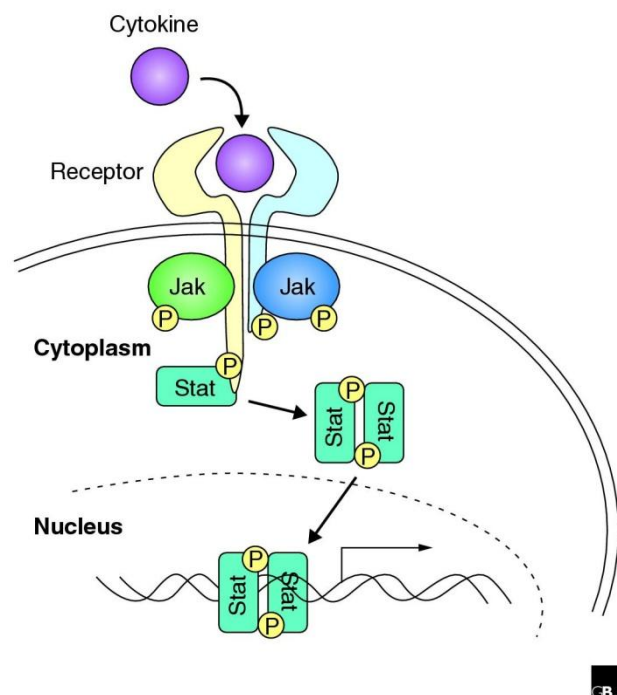
Η ενδοκυττάρια μεταβίβαση σήματος των κυτταροκινών στηρίζεται σε ένα καταρράκτη αντιδράσεων φωσφορυλίωσης διαφόρων πρωτεϊνών, που τελικά οδηγεί στην ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι μεταφέρονται στον πυρήνα του κυττάρου και ρυθμίζουν τη μεταγραφή των εξαρτώμενων από αυτούς γονιδίων. Το ενδοκυττάριο τμήμα των υποδοχέων ορισμένων κυτταροκινών, όπως αυτών της οικογένειας των ανοσοσφαιρινών, εμφανίζει το ίδιο δράση κινάσης, μετά από τη σύνδεση της κυτταροκίνης που επιφέρει το διμερισμό τους. Το ενδοκυττάριο τμήμα αυτοφωσφορυλιώνεται και στη συνέχεια, μέσω των πρωτεϊνών Grb2 (growth factor receptor bound protein) και Sos (son of sevenless), φωσφορυλιώνει τον παράγοντα Ras. Ο ενεργοποιημένος παράγοντας Ras κατόπιν μπορεί να ενεργοποιήσει σύνθετους καταρράκτες αντιδράσεων, στους οποίους μετέχουν οι MAPK (Mitogen-activated protein kinases) κινάσες με τελικό αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μεγάλου αριθμού μεταγραφικών παραγόντων, που μεταφερόμενοι στον πυρήνα του κυττάρου, επάγουν τη μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται σε σημαντικές βιολογικές λειτουργίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η απόπτωση και η διαφοροποίηση (115).

Όμως, οι υποδοχείς των περισσότερων κυτταροκινών δεν περιέχουν από μόνοι τους περιοχές στο ενδοκυττάριο τμήμα τους με δράση κινάσης της τυροσίνης. Τη δράση αυτή

ασκούν τα μέλη μιας οικογένειας κινασών της τυροσίνης, που σχετίζονται με το ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα, οι JAK κινάσες (Janus activated Kinases). Έχουν περιγραφεί τέσσερις JAK κινάσες, οι JAK1, JAK2, JAK3 και Tyk2 (115; 116). Όταν ο υποδοχέας δεν είναι συνδεδεμένος με την κυτταροκίνη στο ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα βρίσκεται ένα ζεύγος JAK κινασών που δεν μπορεί να έρθει σε επαφή και δεν είναι ενεργοποιημένο. Η σύνδεση της κυτταροκίνης με τον υποδοχέα δίνει τη δυνατότητα επαφής των δύο JAK μορίων, με συνέπεια την αλληλοφωσφορυλίωση του ενός μορίου από το άλλο και στη συνέχεια τη φωσφορυλίωση των πλούσιων περιοχών σε τυροσίνη του ενδοκυτταρίου τμήματος του υποδοχέα και προσέλκυση των παραγόντων STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) (**εικόνα 3**).

Εικόνα 3. Αναπαράσταση της ενδοκυττάριας μεταβίβασης σήματος.

Όταν ο υποδοχέας δεν είναι συνδεδεμένος με την κυτταροκίνη στο ενδοκυττάριο τμήμα του βρίσκεται ένα ζεύγος JAK κινασών που δεν μπορεί να έρθει σε επαφή και δεν είναι ενεργοποιημένο. Η σύνδεση της κυτταροκίνης με τον υποδοχέα δίνει τη δυνατότητα επαφής των δύο JAK μορίων, με συνέπεια την αλληλοφωσφορυλίωση του ενός μορίου από το άλλο και στη συνέχεια τη φωσφορυλίωση των πλούσιων περιοχών σε τυροσίνη του ενδοκυττάριου τμήματος του υποδοχέα και προσέλκυση των παραγόντων STAT



Ανάλογα με τον υποδοχέα προσελκύνονται διαφορετικά μόρια της οικογένειας των παραγόντων STAT και δεσμεύονται στις φωσφορυλιωμένες περιοχές του ενδοκυττάριου τμήματος. Εκεί, θα υποστούν φωσφορυλίωση από τις JAK κινάσες, οπότε αποδεσμεύονται από τον υποδοχέα, δημιουργούν ενεργοποιημένα διμερή και μεταφέρονται στον πυρήνα όπου αναγνωρίζουν ειδικές ρυθμιστικές περιοχές, ανάλογα με το γονίδιο-στόχος και επάγουν τη μεταγραφή του. Η επιλεκτική συσχέτιση συγκεκριμένων JAK κινασών με συγκεκριμένους υποδοχείς κυτταροκινών, καθώς και η φωσφορυλίωση συγκεκριμένων μελών της STAT οικογένειας από συγκεκριμένες JAK κινάσες, πετυχαίνει την απαιτούμενη ειδικότητα στη μεταγραφή των γονιδίων, που αντιπροσωπεύει την ειδική βιολογική δράση της κάθε κυτταροκίνης ξεχωριστά, παρόλο που ο μηχανισμός μεταβίβασης σήματος είναι ο ίδιος (115; 116).

Σε ορισμένους υποδοχείς, όπως της IL-2 και της IFN γ , οι JAK κινάσες μπορεί να ενεργοποιήσουν και την οικογένεια των src κινασών, οι οποίες με τη σειρά τους ενεργοποιούν τον καταρράκτη της Ras πρωτεΐνης, ή καταρράκτες άλλων κινασών, όπως της phosphatidylinositol-3 (PI-3-K) κινάσης (88). Ακόμη, οι ενεργοποιημένοι υποδοχείς της

gp130 υποοικογένειας μπορούν να προσελκύσουν την πρωτεΐνη Shc, η οποία συνδέεται με το σύμπλεγμα Grb2-Sos και ενεργοποιούν την πρωτεΐνη Ras, που με τη σειρά της ενεργοποιεί τον καταρράκτη των MAPK κινασών.

δ. Η δράση των κυτταροκινών στις ΙΦΕΝ

Οι κυτταροκίνες κατέχουν πρωτεύοντα ρόλο στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος του γαστρεντερικού και εμπλέκονται στη διαταραχή της καλούμενης 'φυσιολογικής φλεγμονής' του εντέρου (117). Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, ο εντερικός βλεννογόνος λειτουργεί μέσα σε μια λεπτή ισορροπία όπου η παραγωγή κυτταροκινών από φλεγμονώδεις κυτταρικούς πληθυσμούς και τα μονοπάτια που ενεργοποιούνται από την παραγωγή αυτή ελέγχονται από περίπλοκους μηχανισμούς ανατροφοδότησης και από ρυθμιστικούς T κυτταρικούς πληθυσμούς(118). Στις ΙΦΕΝ η φυσική ανοσία συντηρείται από ενεργοποιημένα μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα με την έκκριση κυτταροκινών. Οι κυτταροκίνες αυτές ρυθμίζουν τη φλεγμονώδη απάντηση στη Νόσο Crohn και στην Ελκώδη Κολίτιδα. Προκαλούν τη διέγερση T κυτταρικών πληθυσμών και οδηγούν στην επίκτητη ανοσολογική απόκριση. Επιπλέον οι ΙΦΕΝ διακρίνονται και από δυσλειτουργία των T κυτταρικών πληθυσμών και διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ ρυθμιστικών T κυττάρων και βοηθητικών Th1, Th2 και των πρόσφατα αναγνωρισμένων Th17 κυτταρικών πληθυσμών (119) (120).

Η αλληλεπίδραση αυτή μεταξύ κυτταρικών πληθυσμών συντονίζεται από έναν αριθμό κυτταροκινών οι οποίες λειτουργικά θα μπορούσαν να διαιρεθούν σε προφλεγμονώδεις και αντιφλεγμονώδεις ή ανοσοκατασταλτικές (121). Σύμφωνα με άλλους συγγραφείς υπάρχει και μια τρίτη ομάδα, οι ανοσοτροποποιητικές κυτταροκίνες όπως οι IL-12 και 18 των οποίων κύρια λειτουργία είναι η τροποποίηση της δράσης των προφλεγμονωδών κυτταροκινών αλλά και άλλων μορίων – μεσολαβητών της φλεγμονής (97). Οι κυτταροκίνες ρυθμίζουν πολλές κοινές φλεγμονώδεις αποκρίσεις στη Νόσο Crohn και Ελκώδη Κολίτιδα όπως η παραγωγή φλεγμονωδών μεσολαβητών - μονοξειδίου του αζώτου, ενεργών ριζών οξυγόνου, λευκοτριενών και προσταγλανδινών - η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα (NF-κB) και η αναστολή της απόπτωσης (122-124). Η ενεργοποίηση του NF-κB διεγείρει τα μακροφάγα, πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα αλλά

και λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς προς παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως οι IL-1, 6 και TNF- α (122).

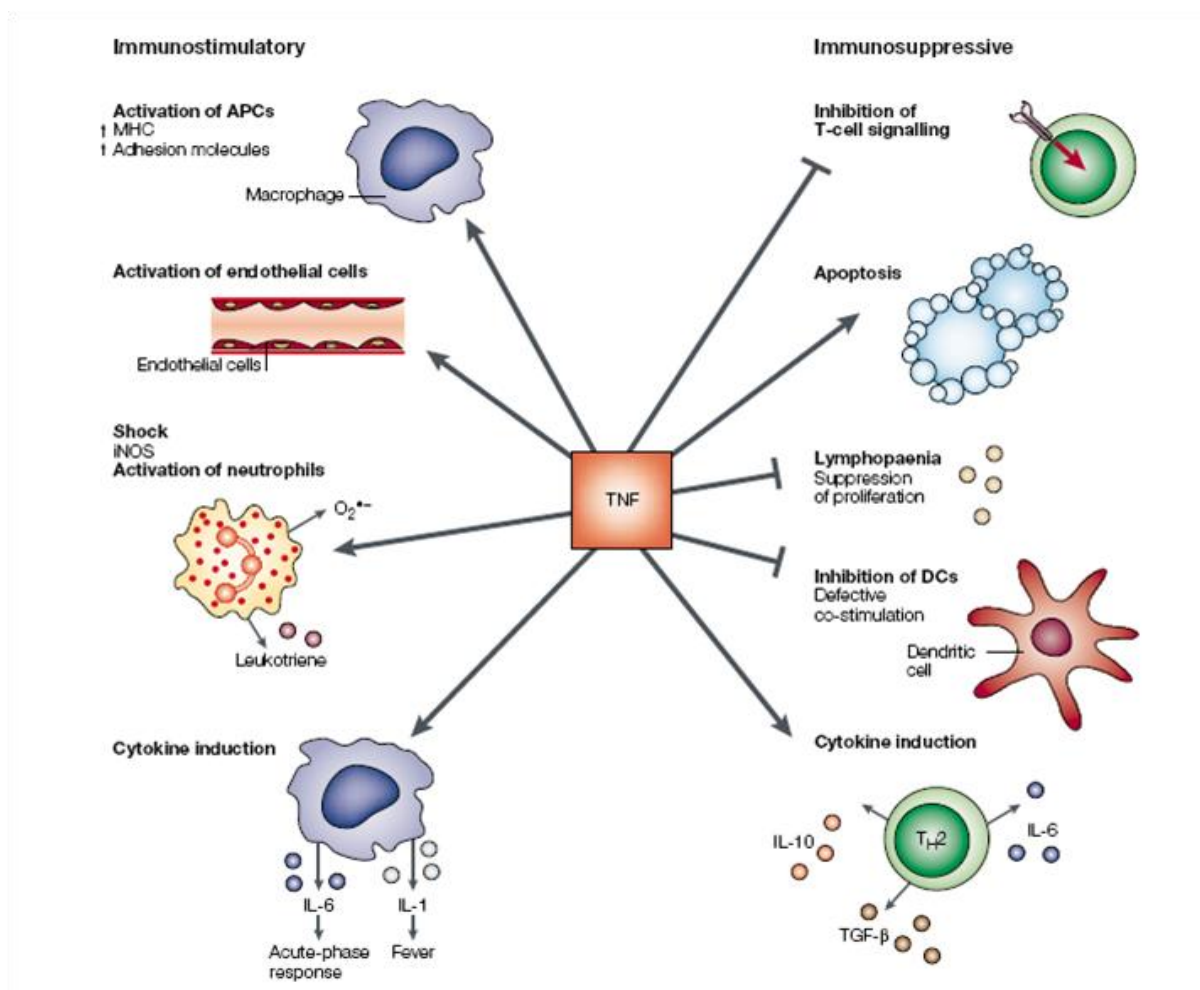
Στις ΙΦΕΝ, η ανοσολογική απόκριση χαρακτηρίζεται από δραματική ανισορροπία μεταξύ παραγωγής κυτταροκινών και ρυθμιστικών μηχανισμών. Αυτή η διαταραχή μέχρι πρόσφατα πίστευαν ότι αντιπροσώπευε μια Th1 ή Th2 πόλωση, όπου η Νόσος Crohn θεωρούνταν μια πρότυπος Th1 διαταραχή (με παραγωγή TNF- α , IL-12 και IFN- γ), και η Ελκώδης Κολίτιδα μια Th2 απόκριση με επικράτηση της IL-5 (125). Εντούτοις, το σενάριο αυτό της πόλωσης είχε αμφισβητηθεί από άλλες μελέτες που αποδείκνυαν την ύπαρξη τόσο Th1 παραγόμενων κυτταροκινών στην Ελκώδη Κολίτιδα όσο και Th2 απαντήσεων στη Νόσο Crohn (126; 127). Κυρίως όμως η ανακάλυψη των Th17 λεμφοκυττάρων και η ενεργός συμμετοχή τους στις φλεγμονώδεις αντιδράσεις του γαστρεντερικού συστήματος μέσω των IL-23 και 17 (128) οδηγεί στην κατάργηση το σενάριο της Th1/Th2 πόλωσης.

ε. Προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες στις ΙΦΕΝ

ε1. TNF- α

Τα λεμφοκύτταρα και αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα ρυθμίζουν τη φλεγμονώδη απόκριση σε ασθενείς με ΙΦΕΝ κυρίως μέσω παραγωγής TNF- α . Πρόκειται για μια κυτταροκίνη 17 KD που παράγεται κατά κύριο λόγο από μακροφάγα, μονοκύτταρα και διαφοροποιημένους T κυτταρικούς πληθυσμούς. Ασκεί προφλεγμονώδη δράση κυρίως μέσω παραγωγής IL1 β και IL6. Ευθύνεται κυρίως επαγωγή της έκφρασης προσκολλητικών μορίων, πολλαπλασιασμό μυοϊνοβλαστών, αναστολή της απόπτωσης και πυροδότηση κυτταροτοξικών αντιδράσεων οξείας φάσης (129; 130). Πάραυτα σε άλλες περιπτώσεις ο TNF δύναται να ελέγξει την ανοσολογική απόκριση μέσω ποικίλων μηχανισμών, όπως η αναστολή της μετάδοσης του σήματος των υποδοχέων των T κυττάρων, η προαγωγή της απόπτωσης των λεμφοειδικών T κυττάρων, η αναστολή των δενδριτικών κυττάρων ή ακόμη και η επαγωγή αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών (**εικόνα 4**) (131).

Εικόνα 4. Σύνοψη της ανοσοκατασταλτικής δράσης του TNF. Εκτός από διέγερση του ανοσοποιητικού μπορεί να προκαλέσει και ικανή καταστολή του. Πηγή: (131).



Συντομογραφίες: APCs, αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα; iNOS, επαγόμενη συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου; MHC, μείζων σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας, O_2^{*-} , υπεροξειδίο; TGF- β , transforming growth factor- β .

Σε ασθενείς με ΙΦΕΝ, έχει αποδειχτεί έκφραση του TNF- α από τα μακροφάγα του κολονικού ιστού (132) και επιπλέον τα επίπεδα του TNF- α στον ορό των ασθενών αυτών αντανακλούν την ενεργότητα της νόσου (133). Ο TNF α συνδέεται με τους διαλυτούς

υποδοχείς TNF-R1 και -R2 των οποίων τα επίπεδα επίσης σχετίζονται με την δραστηριότητα της νόσου σε ασθενείς με ΙΦΕΝ. Ο TNF-R1 έχει προταθεί σα δείκτης ενεργότητας της νόσου σε ασθενείς με Νόσο Crohn κυρίως. Ομοίως τα επίπεδα του TNF-R2 αυξάνονται περισσότερο σε ασθενείς με Νόσο Crohn σε σχέση με ασθενείς με Ελκώδη Κολίτιδα (134). Συγγενής προς τον TNF- α , κυτταροκίνη είναι ο παράγοντας TNF-like 1 α (TL1 α), του οποίου η κύρια λειτουργία είναι η έκκριση IFN- γ μέσω του υποδοχέα του death receptor 3 (DR3). Σε βιοψίες εντέρου ασθενών με ΙΦΕΝ παρατηρήθηκαν υψηλά ποσοστά κυττάρων με έκφραση TL1 α και υποδοχείς επιφανείας DR3 (135).

ε2. IL-1

Μια εξίσου σημαντική κυτταροκίνη που εμπλέκεται στην αιτιοπαθογένεια των ΙΦΕΝ είναι η ιντερλευκίνη 1 (IL-1). Διακρίνουμε τις IL-1 α και IL-1 β . Αμφότερες παράγονται από ποικίλους κυτταρικούς πληθυσμούς. Τόσο η IL-1 όσο και η συγγενής IL-18 είναι καταρχήν προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, ελέγχοντας την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την φλεγμονή και τις αυτοάνοσες αντιδράσεις. Για την IL-1 (IL-1 α και IL-1 β) η κύρια λειτουργία της είναι η ενεργοποίηση της κυκλοξυγενάσης 2(COX-2), της φωσφολιπάσης A τύπου 2, και της επαγομένης μορφής του μονοξειδίου του αζώτου (iNOS). Αυτές οι αντιδράσεις συντελούν στην απελευθέρωση μεγάλων ποσοτήτων προσταγλανδίνης E2 (PGE2), παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων και μονοξειδίου του αζώτου (NO) από τα κύτταρα αποδέκτες της IL-1. Ένα άλλο επίσης σημαντικό μέλος της οικογένειας των IL-1, είναι η IL-18, η οποία παίζει επίσης καθοριστικό ρόλο στην αιτιοπαθογένεια των αυτοάνοσων νοσημάτων μέσω της ικανότητάς της να προάγει την επαγωγή της IFN- γ , ιδιαίτερα όταν συνδυάζεται με την IL-12 ή την IL-15.

Τόσο η IL-1 όσο και η IL-18 επάγουν την έκφραση των προσκολλητικών μορίων, όπως το ενδοκυττάριο προσκολλητικό μόριο 1 (ICAM-1) στα μεσεγχυματικά κύτταρα, και τον παράγοντα προσκόλλησης των αγγείων 1 (VCAM-1) στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Το γεγονός αυτό προάγει τη διήθηση του εξωαγγειακού χώρου με φλεγμονώδη και κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Οι IL-1 και IL-18 κατέχουν επιπλέον ιδιότητες παραγόντων αγγειογένεσης μέσω της επαγωγής της έκφρασης του αυξητικού παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου (VEGF) (136). Το σύστημα της IL-1 ρυθμίζεται σε μεγάλο βαθμό από τον ανταγωνιστή του υποδοχέα της IL-1 (IL-1Ra), ο οποίος ήδη χορηγείται στην κλινική πράξη με κύρια δράση την πρόσδεση και απενεργοποίηση της IL-18. Οι υψηλές συγκεντρώσεις του IL-1Ra στον ορό ασθενών με ΙΦΕΝ πιθανόν αποτελούν ένδειξη ότι ο IL-1Ra συμμετέχει στους μηχανισμούς ελέγχου της φλεγμονής και στις ΙΦΕΝ (137). Πολλοί υποστηρίζουν ότι η

αλληλεπίδραση μεταξύ IL-1 και IL-1Ra πιθανόν να αποτελεί έναν από τους μηχανισμούς διατήρησης της κατάστασης της ‘χρόνιας φλεγμονής του εντέρου (138). Μελέτες του ανθρώπινου γονιδιώματος έχουν πρόσφατα αποκαλύψει και άλλα μέλη της οικογένειας της IL-1. Τα νέα αυτά μέλη φαίνεται πως ασκούν κυρίως ανταγωνιστική δράση προς την IL-1.

Παρόλο που η IL-1 και ο TNF-α παρουσιάζουν πολλές κοινές βιολογικές δράσεις, έχουν και σαφείς διαφορές. Η βασικότερη είναι ότι ο υποδοχέας του TNF επάγει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο σε αντίθεση με τον υποδοχέα της IL-1. Σε αντίθεση η IL-1 αποτελεί παράγοντα αύξησης του αιμοποιητικού συστήματος, μια ικανότητα την οποία χάνει υπό την παρουσία του TNF (136).

ε3. IFN-γ

Οι ιντερφερόνες (IFNs) αρχικά ανακαλύφθηκαν ως παράγοντες που παρεμβαίνουν στον ιικό πολλαπλασιασμό (139). Ταξινομούνται σε ιντερφερόνες τύπου I και II ανάλογα με την ειδικότητα του υποδοχέα και την ομολογία των αμινοξέων στο μόριό τους.

Στις ιντερφερόνες τύπου I περιλαμβάνονται διάφοροι υπότυποι της IFN-α (14-20), η IFN-β, IFN-ω και IFN-τ οι οποίες είναι δομικά όμοιες και συνδέονται στον ίδιο υποδοχέα (IFNAR, ο οποίος περιέχει τις IFNAR1 και IFNAR2 αλύσους). Οι τύπου I IFN εκκρίνονται σε μικρό βαθμό από όλους σχεδόν τους τύπους κυττάρων, Τα κύτταρα της αιμοποιητικής σειράς πάραυτα αποτελούν τις κύριες πηγές παραγωγής των IFN-α και IFN-ω, ενώ οι μυοινοβλαστες της IFN-α (140). Υπό κατάλληλες συνθήκες η IFN-β παράγεται και από τα μακροφάγα κύτταρα, ενώ η έκθεση σε ιούς αποτελεί το κυριότερο ερέθισμα για την παραγωγή των IFN-α και β (141).

Στις IFN τύπου II ανήκει η IFN-γ αποκλειστικά. Δεν συνδέεται δομικά με τις τύπου I IFNs, προσδέεται σε διαφορετικό υποδοχέα και κωδικοποιείται από διαφορετικό χρωμοσωμικό επίτοπο. Αρχικά υποστηρίζονταν ότι τα CD4+ Th1 λεμφοκύτταρα, τα κυτταροτοξικά CD8 λεμφοκύτταρα και τα NK κύτταρα ήταν οι μοναδικές πηγές παραγωγής IFN-γ (140). Έχει πλέον αποδειχτεί ότι και άλλοι κυτταρικοί πληθυσμοί όπως τα B κύτταρα και τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα - μονοκύτταρα, μακροφάγα, δενδριτικά - δύναται να εκκρίνουν IFN-γ (142-145). Η παραγωγή αυτή IFN-γ από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα πιθανόν να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αυτο-ενεργοποίηση των κυττάρων αυτών καθώς και των παρακείμενων κυτταρικών πληθυσμών. Η παραγωγή IFN-γ από τα NK

κύτταρα αποτελεί ένα από τα πρώτα στάδια για την ενεργοποίηση της άμυνας του ξενιστή. Επιπλέον η παραγωγή IFN- γ από τα T λεμφοκύτταρα εμπλέκεται στην ενίσχυση της adaptive immunity (146).

Η παραγωγή IFN- γ ελέγχεται από κυτταροκίνες – κυρίως τις IL-12 και 18 – οι οποίες εκκρίνονται από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Η έκκριση αυτή των κυτταροκινών, εμπλέκει την IFN- γ και στην innate immune response (147). Η αναγνώριση των παθογόνων από τα μακροφάγα επάγει την παραγωγή IL-12 και χημειοκινών, οι οποίες με τη σειρά τους προσελκύουν NK κύτταρα στους φλεγμαίνοντες ιστούς. Τα NK κύτταρα υπό την επίδραση IL-12 προάγουν την έκκριση IFN- γ (148). Πληθυσμοί μακροφάγων, υπό την επίδραση IL-12 και IL-18 επάγουν περαιτέρω την έκκριση IFN- γ . Αρνητικοί ρυθμιστές της παραγωγής IFN- γ αποτελούν οι IL-4, IL-10, ο TGF- β και τα γλυκοκορτικοειδή (149; 150).

Η IFN- γ ανήκει στις διαλυτές κυτταροκίνες και παράγεται από τα Th1 και κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα, τα δενδριτικά και τα NK κύτταρα. Κατέχει ανοσορυθμιστικές, αντί-ογκογόνες και αντιϊικές ιδιότητες (151). Δύναται να επηρεάσει τη μεταγραφή έως και 30 γονιδίων προκαλώντας με αυτόν τον τρόπο την παραγωγή ποικίλων κυτταρολογικών αποκρίσεων όπως την επαγωγή της αντιγονοπαρουσιαστικής ικανότητας των μακροφάγων, την αύξηση της δραστηριότητας των λυσοσωμάτων στα μακροφάγα, την καταστολή των Th2 κυττάρων. Άλλες δράσεις της IFN- γ περιλαμβάνουν την αύξηση της συγκολλητικής ικανότητας των λευκοκυττάρων και την επαγωγή της δράσης των NK κυττάρων. Η ενεργοποίηση και δράση της IFN- γ πραγματοποιείται μέσω των υποδοχέων της IFNGR1 και IFNGR2 οι οποίοι ενεργοποιούν την οδό των JAK-STAT (Janus Kinases and Signal Transducers and Activators of Transcription) ενδοκυττάρων κινασών. Μέσω της σύνδεσης με τον υποδοχέα της η IFN- γ ενεργοποιεί τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και προάγει τη διαφοροποίηση των Th1 λεμφοκυττάρων μέσω αύξησης του μεταγραφικού παράγοντα T-bet.

Η IFN- γ αν και καθορίζει την διαφοροποίηση προς Th1, μπορεί να επιδείξει και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες υπό ορισμένες συνθήκες (152). Ως πιθανός μηχανισμός της ανοσοκατασταλτικής δράσης της IFN- γ έχει προταθεί η επαγωγή μελών της οικογένειας των SOCS (Suppressors of Cytokine Signalling) τα οποία δρουν ως κλασσικοί αναδραστικοί αναστολείς μέσω της πρόσδεσής τους σε υποδοχείς κυτταροκινών και σε μέλη της οδού των JAK-STAT (feedback inhibitors) (153). Ιδιαίτερης σημασίας για την ανοσοτροποποιητική

δράση της IFN- γ φαίνεται να είναι το γονίδιο SOCS1, όπως αποδεικνύεται από πειράματα σε knockout SOCS1 ποντίκια (153).

Η IFN- γ όπως και άλλες κυτταροκίνες φαίνεται ότι μπορεί να ασκήσει τόσο αντιφλεγμονώδη όσο και προφλεγμονώδη δράση ανάλογα με τον κυτταρικό πληθυσμό (πχ. ανοσοκατασταλτική δράση σε λεμφικά κύτταρα ή κύτταρα της μυελικής σειράς), τις συνθήκες in vivo ή το πειραματικό μοντέλο που χρησιμοποιείται (131).

ε3. IL-18

Η IL-18 παράγεται από τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου και ομοιάζει με την οικογένεια των IL-1 ως προς δομή, τις οδούς μεταβίβασης του σήματος, τη σύνδεση με τον υποδοχέα αλλά και τις προφλεγμονώδεις ιδιότητές της(154). Πρόσφατες έρευνες προτείνουν ότι η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ IL-18 και του φυσικού αναστολέα της IL-18 BP (binding protein) συνεισφέρει στην αιτιοπαθογένεια των ΙΦΕΝ (155). Και ενώ έχει αναφερθεί επαγωγή της IL-18 τοπικά σε χρόνιες βλάβες ασθενών με Νόσο Crohn σε σύγκριση με περιοχές με φυσιολογικό μακροσκοπικά βλεννογόνο(156), υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι η επαγωγή αυτή δε συναντάται σε όλους τους πάσχοντες από Νόσο Crohn(157).

Πειραματικές μελέτες έδειξαν επαγωγή του πολλαπλασιασμού λεμφοκυττάρων απομονωμένων από βλεννογόνο ασθενών με Νόσο Crohn κατόπιν επίδρασης ανασυνδιασμένης IL-18 (158). Παρά τα ευρήματα αυτά, είναι γενικά αποδεκτό ότι η στροφή των λεμφοκυττάρων προς παραγωγή Th1 χημειοκινών οφείλεται σε συνεργική δράση της IL-12 με την IL-18 (159). Η συνεργική αυτή δράση που έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή των Th1 λεμφοκυττάρων στον εντερικό βλεννογόνο ασθενών με Νόσο Crohn, πιθανόν να προκαλείται από αύξηση του υποδοχέα της IL-18 από την IL-12 (160).

ε4. IL-17 και Th17 κύτταρα

Πρόσφατα αναγνωρίστηκε ο ρόλος του Th17 κυτταρικού πληθυσμού στις φλεγμονώδεις αποκρίσεις μέσω παραγωγής IL-17(161). Επιπρόσθετα άλλα 5 μέλη κατατάχθηκαν στην ομάδα αυτή με τις ονομασίες IL-17B έως F. Η IL-17 παράγεται αποκλειστικά από τα Th17 κύτταρα(162). Η παραγωγή αυτή εξαρτάται από την ενεργοποίηση του STAT 3 η οποία πυροδοτείται από την IL-23(163).

Γενικά η IL-17 επάγει την μετανάστευση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος σε περιφερικούς ιστούς. Για την μετανάστευση αυτή απαιτείται η ενεργοποίηση του NF-κΒ που πυροδοτείται από την σύνδεση IL-17 με τον υποδοχέα της(164). Μια άλλη λειτουργία της IL-17 είναι η επαγωγή πολλών προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως οι TNF-α, IL-6, IL-1β, ενισχύοντας με αυτόν τον τρόπο τις φλεγμονώδεις διαδικασίες(96). Ο TNF-α και η IL-6 παραγόμενες επίσης από τα Th17 κύτταρα όχι μόνο ενισχύουν την ανάπτυξη των Th17 αλλά δρουν και συνεργικά στην παραγωγή μεσολαβητών της φλεγμονής(165).

Στον άνθρωπο οι IL-1, IL-6 και IL-23 προάγουν τη διαφοροποίηση των CD4+ κυττάρων σε Th17, χωρίς απαραίτητα την παρουσία TGF-β1(166). Τόσο η IL-17 όσο και τα Th17 κύτταρα ανευρίσκονται αυξημένα στον ορό και στο έντερο ασθενών με ΙΦΕΝ ενώ η IL-17 δεν ανιχνεύεται σε ασθενείς με μη ενεργό νόσο ή σε ασθενείς με άλλες μορφές κολίτιδας(54).

στ. Αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες στις ΙΦΕΝ

στ1. IL-10

Η IL-10 είναι αντιφλεγμονώδη κυτταροκίνη με ιδιότητες αναστολής τόσο της παρουσίασης αντιγόνων όσο και της επακόλουθης απελευθέρωσης κυτταροκινών. Αναστέλλει την έκφραση των Th1 κυτταροκινών και των MHC τάξης II αντιγόνων. Βοηθάει στην επιβίωση των β κυττάρων και ενισχύει τον πολλαπλασιασμό και την παραγωγή αντιγόνων από τα β κύτταρα. Η IL-10 δύναται επίσης να αναστείλει την δραστηριότητα του NF-κΒ. Παράγεται κυρίως από τα μονοκύτταρα και σε μικρότερο βαθμό από τα λεμφοκύτταρα. Ο ρόλος της IL-10 και οι δυνητικά θεραπευτικές ιδιότητες που κατέχει έχουν μελετηθεί αναλυτικά σε knockout για το γονίδιο της IL-10 ποντίκια, τα οποία αναπτύσσουν χρόνια φλεγμονή του ειλεού και του παχέος εντέρου(167). Αναστολή της δράσης της IL-10 σε ποντίκια έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή IFN-γ και IL-12(168).

Σε ασθενείς με Ελκώδη Κολίτιδα, έχουν αναφερθεί αυξημένα επίπεδα mRNA σε απομονωμένα από το κολονικό επιθήλιο λεμφοκύτταρα αλλά και κύτταρα θετικά για την IL-10 (169). Επιπλέον, πρόσφατα περιγράφηκε παραγωγή IL-10 από ρυθμιστικά τ-κύτταρα, γεγονός που την εμπλέκει στην αιτιοπαθογένεια των ΙΦΕΝ (170). Παραγωγή IL-10 όμως παρατηρείται και από ρυθμιστικά β λεμφοκύτταρα τόσο σε πειραματικά μοντέλα ΙΦΕΝ όσο

και σε νοσούντες από ΙΦΕΝ(171; 172). Έρευνες έδειξαν ότι τα β ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα συμμετέχουν εν μέρει στην καταστολή της φλεγμονής του εντέρου ασθενών με ΙΦΕΝ μέσω μηχανισμών που περιλαμβάνουν παραγωγή IL-10 και TGF-β1(171) .

στ2. IL-4 και TGF-β

Η IL-4 αποτελεί διεγερτικό μόριο των β και τ κυττάρων με γνωστή ανοσοκατασταλτική δράση στο γαστρεντερικό σύστημα. Ενισχύει την παραγωγή συγκεκριμένων τύπων ανοσοσφαιρινών και τις κυτταροτοξικές ιδιότητες των λεμφοκυττάρων και μονοκυττάρων. Πειράματα σε ποντίκια με ανεπάρκεια του υποδοχέα της α αλυσού των τ κυττάρων (TCR-/-), παρουσίασαν μείωση του mRNA των Th2 κυτταροκινών και αύξηση του mRNA της IFN-γ στο έντερο, κατόπιν επίδρασης μονοκλωνικών αντισωμάτων αντι-IL-4. Τα ευρήματα αυτά οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η IL-4 κατέχει σημαντικό ρόλο στη στροφή των Th2 λεμφοκυττάρων προς Th1 ανοσολογική απόκριση. Κατά παρόμοιο τρόπο, μια άλλη μελέτη έδειξε ότι η ανάπτυξη κολίτιδας σε TCR-/- ποντίκια σχετίζεται με την παρουσία IL-4 και λιγότερο της IFN-γ. Επίσης, μελέτες σε ασθενείς με ενεργό Νόσο Crohn και Ελκώδη Κολίτιδα παρουσίασαν σημαντική μείωση της παραγωγής VEGF από τα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος κατόπιν χορήγησης IL-4(173).

Ο TGF-β είναι μια ανασταλτική κυτταροκίνη, της οποίας η μειωμένη δραστηριότητα θεωρείται υπεύθυνη για την ανάπτυξη αυτοάνοσων διαταραχών συμπεριλαμβανομένων και των ΙΦΕΝ (174). Σε ασθενείς με Ελκώδη Κολίτιδα έχει παρατηρηθεί αυξημένη παραγωγή TGF-β από μονοκύτταρα της βασικής μεμβράνης σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες ή ακόμη και ασθενείς με Νόσο Crohn, γεγονός που αποδεικνύει ότι τουλάχιστον σε τοπικό επίπεδο ο TGF-β παρουσιάζει προφλεγμονώδη δράση(175). Στον αντίποδα, υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι ο TGF-β σε συνδυασμό με τον παράγοντα αύξησης των ινοβλαστών και τους insulin like και epidermal growth factor, προστατεύει τον ξενιστή, επουλώνοντας βλάβες του εντερικού βλεννογόνου(176).

στ3. IL-13

Πρόκειται για άλλη μια αντί-φλεγμονώδη κυτταροκίνη παραγόμενη από τα T λεμφοκύτταρα και τα μονοκύτταρα/ μακροφάγα (177; 178). Μειώνει την έκφραση μιας ποικιλίας προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως η IL-1, IL-8, TNF-α, and INF-γ

παραγόμενες από τα β-λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα ή και κακοήθη κύτταρα(179; 180). Επιπρόσθετα, επάγει τον ανταγωνιστή του υποδοχέα της IL-1 (IL-1ra), διεγείρει τα MHC class II μόρια(179) και αναστέλλει την επαγομένη μορφή του μονοξειδίου του αζώτου (iNOS)(181), καθώς και τις χημειοτακτικές ιδιότητες των IL-8 και IL-10(182). Άλλες δράσεις της IL-13 είναι η προσέλκυση μονοκυττάρων, η επαγωγή της έκφρασης πολλών προσκολλητικών μορίων(183), και η διέγερση μονοκυττάρων προς παραγωγή κυτταροκινών κατόπιν επαφής με βακτήρια(184).

Η Ελκώδης Κολίτιδα χαρακτηρίζεται από Th2 ανοσολογική απόκριση όπου τον κύριο ρόλο κατέχει η IL-13 παραγόμενη από τα NK κύτταρα(48). Επίσης, τα μονοπύρρηνα κύτταρα της βασικής μεμβράνης ασθενών με Ελκώδη Κολίτιδα εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες IL-13 και IL-5, δηλαδή Th2 κυτταροκινών. Η ίδια ερευνητική ομάδα περιέγραψε την ύπαρξη NK δεικτών (CD161) στα κύτταρα αυτά της βασικής μεμβράνης που φέρουν IL-13 και IL-5, γεγονός που υποδηλώνει ότι πρόκειται για NK κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά in vitro επιδεικνύουν κυτταροτοξική δράση προς τα HT-29 κολονικά επιθηλιακά κύτταρα(48).

Έχει περιγραφεί η ύπαρξη IL-13 σε κολονικό ιστό ασθενών με ΙΦΕΝ, με τις συγκεντρώσεις IL-13 σε βιοψίες από φλεγμένων κολονικό επιθήλιο, να είναι χαμηλότερες σε ασθενείς με Ελκώδη Κολίτιδα σε σύγκριση με φυσιολογικούς μάρτυρες ή ασθενείς με Νόσο Crohn. Όσο μεγαλύτερη η ενεργότητα νόσου στην Ελκώδη Κολίτιδα τόσο πιο χαμηλές συγκεντρώσεις IL-13 παρατηρήθηκαν, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι εξάρσεις της νόσου συνοδεύονται είτε με ενεργό ρύθμιση είτε με αναστολή της παραγωγής της IL-13(185). Πρόσφατα περιγράφηκε ότι η IL-13 προκαλεί βλάβες του επιθηλιακού φραγμού με επαγωγή της απόπτωσης των επιθηλιακών κυττάρων των στενών συνδέσεων και επίδραση στην ταχύτητα αποκατάστασης των βλαβών(56).

ζ. Νεότερες κυτταροκίνες εμπλεκόμενες στις ΙΦΕΝ

Η IL-21 και IL-22 εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία πολλών φλεγμονωδών και αυτοάνοσων νοσημάτων όπως το άσθμα, ο ΣΕΛ, η ρευματοειδής αρθρίτιδα και πιθανόν και οι ΙΦΕΝ. Η δράση της IL-21 εντοπίζεται κυρίως στο εντερικό επιθήλιο όπου διατηρεί την Th1 πόλωση μέσω επαγωγής της παραγόμενης IFN-γ(186). Επιπλέον ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των NK κυττάρων(187). Έκφρασή της έχει ανεβρεθεί στα T- και B-κύτταρα όπως και σε ινοβλάστες στους οποίους ενεργοποιεί την παραγωγή μέταλλο-πρωτεάσης 1, τροφοδοτώντας έναν καταρράκτη αντιδράσεων που οδηγεί σε ενεργοποίηση του παράγοντα STAT-3 στα T-κύτταρα(188). Επιπρόσθετα όπως οι IL-6 και IL-23

συμμετέχει στην διαφοροποίηση των T σε Th17 κύτταρα(189). Η έκφραση της IL-21 επάγεται σε ασθενείς με ΙΦΕΝ, με σαφή υπεροχή στους ασθενείς με Νόσο Crohn έναντι αυτών με Ελκώδη Κολίτιδα(190).

Η IL-22, μέλος της υποοικογένειας της IL-10, συνδέεται στην επιφάνεια των κυττάρων στόχων μέσω του συμπλέγματος των υποδοχέων της που αποτελούνται από 2 αλυσίδες της τάξης II των υποδοχέων κυτταροκινών, IL-22R1 και IL-10R2(191). Η κύρια πηγή της IL-22 είναι τα NK κύτταρα και τα ενεργοποιημένα T- και B- λεμφοκύτταρα(192). Πρόσφατα ανακαλύφθηκε ότι τα Th17 επίσης κατέχουν κύριο ρόλο στην παραγωγή IL-22(193). Η κυτταροκίνη αυτή κατέχει προφλεγμονώδεις ιδιότητες και ανευρίσκεται αυξημένη τόσο στον ορό όσο και σε φλεγμαίνοντες ιστούς ασθενών με Νόσο Crohn(194; 195). Πάραυτα, οι ίδια ερευνητική ομάδα ανέδειξε και έναν προστατευτικό ρόλο για την IL-22 σε ένα μοντέλο Ελκώδης Κολίτιδας ποντικών υποστηρίζοντας ότι δύναται να μετριάσει τη φλεγμονή του εντέρου μέσω επαγωγής της παραγωγής βλέννης από τα καλυκοειδή κύτταρα(195).

Πρόσφατα βρέθηκε ότι η υψηλή έκφραση της IL-22 στον ορό ασθενών Νόσο Crohn σχετίζεται άμεσα με την ενεργότητα νόσου και αποτελεί καλύτερο δείκτη από την IL-6 και τον TNF-α. Μεταλλαγές στον γονότυπο του υποδοχέα IL23R σχετίζονταν άμεσα με τα επίπεδα της IL-22 στον ορό, επιδεικνύοντας για πρώτη φορά ένα μοντέλο σύνδεσης της γενετικής προδιάθεσης για Νόσο Crohn με τη λειτουργία των Th17 κυττάρων(194).

1.3. Χημειοκίνες και υποδοχείς χημειοκινών

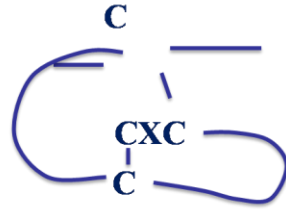
α. Γενικά

Οι χημειοκίνες είναι βασικές πρωτεΐνες αποτελούμενες από 70 έως 125 αμινοξέα με Μοριακό Βάρος 6 έως 14 KD (196). Αποτελούν μια πολυλειτουργική οικογένεια κυτταροκινών (ΧΗΜΕΙΟτακτικές κυτταροΚΙΝΕΣ), με κύριο ρόλο την προσέλκυση κυκλοφορούντων λευκοκυττάρων σε χώρους φλεγμονής ή τραύματος. Οι χημειοκίνες, όπως και οι κυτταροκίνες, είναι αγγελιοφόρες πρωτεΐνες με κύριο ρόλο την χημική επικοινωνία μεταξύ κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Οι χημειοκίνες κατέχουν τόσο χημειοτακτικές ιδιότητες όσο και ιδιότητες κυτταροκινών, δηλαδή τη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης και την ενορχήστρωση της αλληλεπίδρασης των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος (197). Εκτός από τη χημειοταξία κυττάρων, οι χημειοκίνες κατέχουν και άλλες ιδιότητες όπως άμεση αντιμικροβιακή δράση σε 17 από αυτές ή ακόμη και αντιϊική δράση με τη δημιουργία μικροπόρων στο φάκελο του ιού (198; 199).

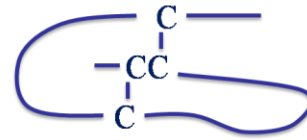
Πιθανότατα κατάγονται από πρωτεΐνες που υπηρετούσαν απαραίτητες ενδοκυττάρειες λειτουργίες (200) κατόπιν διπλασιασμού ή/και μεταλλάξεων του γονιδιώματός τους (201). Μέχρι σήμερα στον άνθρωπο έχουν ταυτοποιηθεί 50 χημειοκίνες και 20 υποδοχείς χημειοκινών. Δομικά χωρίζονται σε τέσσερις ομάδες ανάλογα με τον αριθμό των αμινοξέων μεταξύ των δύο πρώτων κυστεϊνών, τις C, CC, CXC και CX3C (202) (**εικόνα 1**) Παρά τη χαμηλή συγγένεια που παρουσιάζουν οι χημειοκίνες ως προς την αλληλουχία αμινοξέων (203), η τεταρτοταγής δομή τους παρουσιάζει εντυπωσιακή ομοιότητα (204; 205) (**εικόνα 2**). Η δομή τους περιλαμβάνει τέσσερις κυστεΐνες οι οποίες ενώνονται μεταξύ τους με δύο δισουλφιδικούς δεσμούς, μεταξύ πρώτης και τρίτης και δεύτερης με τέταρτη κυστεΐνης. Η τελική δομή στο χώρο περιλαμβάνει τρεις β-πτυχωτές αλυσίδες. Κάθε χημειοκίνη έχει να επιδείξει ένα αμινοτελικό άκρο 6-10 αμινοξέων που λειτουργεί ως περιοχή σηματοδότησης και μια καρβοξυ-τελική α έλικα στο άλλο άκρο. Το αμινικό άκρο ακολουθείται από μια μεγάλη αναδίπλωση (N-loop), μια έλικα με διάφορες θέσεις πρόσδεσης σε κάθε χημειοκίνη, και μια β-πτυχωτή επιφάνεια που καταλήγει στο καρβοξυτελικό άκρο. Η όλη δομή στο χώρο σταθεροποιείται με δισουλφιδικούς δεσμούς. Οι περισσότερες χημειοκίνες ασκούν τη δράση τους κατόπιν της έκκρισής τους από τα κύτταρα. Πάραυτα υπάρχουν χημειοκίνες όπως η fractalkine, οι οποίες εκφράζονται στην κυτταρική επιφάνεια και δρουν εκεί (206).

Εικόνα 1. Γραφική αναπαράσταση των τεσσάρων ομάδων χημειοκινών όπου C υποδηλώνει τις κυστείνες.

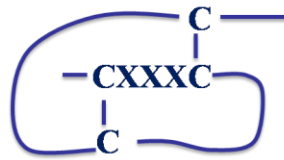
CXC



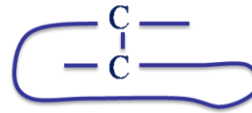
CC



CXXXXC



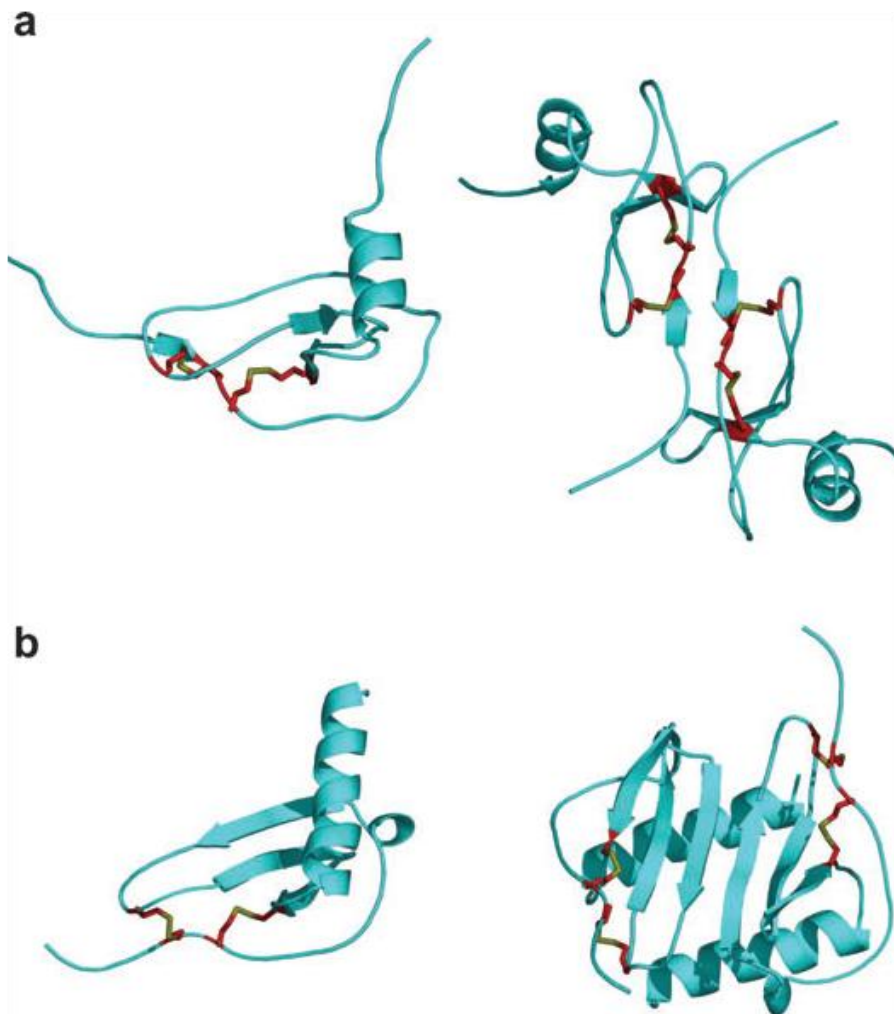
C



Εικόνα 2. Η δομή των χημειοκινών.

Διαγραμματική δομή ως μονομερή (αριστερά) και διμερή (δεξιά) των (a) CC χημειοκινών με το παράδειγμα της CCL2 και (b) των CXC χημειοκινών και συγκεκριμένα της CXCL8.

Οι δισουλφιδικοί δεσμοί φαίνονται με πράσινο και κόκκινο χρώμα. Διακρίνεται η ομοιότητα στην τεταρτοταγή δομή των δύο χημειοκινών, όπως και οι διαφορές μεταξύ CXC και CC χημειοκινών ως διμερή. Πηγή:(205)



Έχουν ταυτοποιηθεί δύο περιοχές σε κάθε χημειοκίνη υπεύθυνες για την αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα τους: η πρώτη είναι μια εκτεθειμένη αναδίπλωση στην

κυρίως δομή του μορίου μεταξύ 2^{ης} και 3^{ης} κυστεΐνης, η οποία πιστεύεται ότι χαρακτηρίζεται για τη χαμηλή συγγένεια σύνδεσης χημειοκίνης – υποδοχέα. Η δεύτερη περιοχή βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο του μορίου πριν την πρώτη κυστεΐνη. Χαρακτηρίζεται από μεγάλη μεταβλητότητα στο χώρο και ο κύριος ρόλος της είναι η αναγνώριση του υποδοχέα κατά τη σύνδεση του με τη συγκεκριμένη χημειοκίνη. Επιπλέον, ο αριθμός των αμινοξέων της περιοχής αυτής τα οποία θα συνδεθούν με τον υποδοχέα, καθορίζει και τη δυναμικότητα της σύνδεσης, δηλαδή αν πρόκειται για υψηλής συγγένειας δεσμό και αν ο υποδοχέας αυτός θα ασκήσει αγωνιστική ή ανταγωνιστική δράση (204). Πρόκειται για χημειοτακτικά πεπτίδια με παρόμοια χημική δομή, όπως ακριβώς και οι υποδοχείς τους (202).

β. Κατηγορίες χημειοκινών – με βάση τη δομή τους

Οι χημειοκίνες δομικά χωρίζονται σε τέσσερις ομάδες ανάλογα με τον αριθμό των αμινοξέων μεταξύ των δύο πρώτων κυστεϊνών, τις C, CC, CXC και CX3C (202). Η lymphotactin (C ομάδα) είναι η μόνη γνωστή ως σήμερα χημειοκίνη η οποία δεν περιέχει κανένα αμινοξύ μεταξύ των δύο πρώτων κυστεϊνών (207). Οι χημειοκίνες που συναντώνται στα θηλαστικά παρατίθενται στον **πίνακα 1**.

Πίνακας 1α και 1β. Δομική και λειτουργική κατάταξη των χημειοκινών. Παρατίθενται επίσης οι υποδοχείς τους και τα κύτταρα που τις εκφράζουν (Πηγές: (208-211))

Ομάδα	Ονομασία	Παλαιότερη ονομασία	Υποδοχέας	Τρόπος έκφρασης	Θέση έκφρασης
CXC					
ELR+	CXCL1	GRO α	CXCR2	Επαγώμενη	Ουδετερόφιλα, ενδοθηλιακά
	CXCL2	GRO β	CXCR2	Επαγώμενη	Ουδετερόφιλα, ενδοθηλιακά
	CXCL3	GRO γ	CXCR2	Επαγώμενη	Ουδετερόφιλα, ενδοθηλιακά
	CXCL5	ENA-78	CXCR2	Επαγώμενη	Ουδετερόφιλα, ενδοθηλιακά
	CXCL6	GCP-2	CXCR1,2	Επαγώμενη	Ουδετερόφιλα, ενδοθηλιακά
	CXCL7	NAP-2	CXCR2	Επαγώμενη	Ουδετερόφιλα, ενδοθηλιακά
	CXCL8	IL-8	CXCR1,2	Επαγώμενη	Βασεόφιλα, ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα, ενδοθηλιακά
ELR-	CXCL4	PF-4	CXCR3B, 3A	Επαγώμενη	Ινοβλάστες, ενδοθηλιακά
	CXCL4L1	PF4-var	CXCR3B, 3A	Επαγώμενη	Άγνωστο
	CXCL9	Mig	CXCR3A,3B	Επαγώμενη	Th1, NK κύτταρα
	CXCL10	IP-10	CXCR3, 3B	Επαγώμενη	Th1, NK κύτταρα
	CXCL11	ITAC	CXCR3,7,3B	Επαγώμενη	Th1, NK κύτταρα
	CXCL12	SDF1	CXCR4	Ομοιοσταπική	Th1, NK κύτταρα
	CXCL13	BCA-1	CXCR3,5	Ομοιοσταπική	B κύτταρα και CD4 + κύτταρα
	CXCL14	BRAK	Άγνωστος	Ομοιοσταπική	Μονοκύτταρα, άωρα δένδρπικά, NK κύτταρα
	CXCL16	SR-PSOX	CXCR6	Ομοιοσταπική	CD8+ και κλάσμα CD4+ κυττάρων, NK κύτταρα

Ομάδα/υπο-ομάδα	Ονομασία	Παλαιότερη ονομασία	Υποδοχέας	Τρόπος έκφρασης	Θέση έκφρασης
CC					
	CCL1	I-309	CCR8	Επαγόμενη	Μονοκύτταρα, T και B κύτταρα
	CCL2	MCP-1	CCR2	Επαγόμενη	Μονοκύτταρα, T και άωρα δενδρική κύτταρα
	CCL3	MIP-1α	CCR1,5	Επαγόμενη	Μονοκύτταρα, μακροφάγα, NK, Th1, Th2, άωρα δενδρική
	CCL4	MIP-1β	CCR5,8,1,3	Επαγόμενη	Μονοκύτταρα, μακροφάγα, Th1 και άωρα δενδρική
	CCL5	RANTES	CCR5,1,2	Επαγόμενη	Μονοκύτταρα, μακροφάγα, ηωσινόφιλα, NK, Th1 και άωρα δενδρική κύτταρα
	CCL7	MCP3	CCR3	Επαγόμενη	Μονοκύτταρα, μακροφάγα, NK, T και άωρα δενδρική
	CCL8	MCP2	CCR3	Επαγόμενη	Ηωσινόφιλα, βασεόφιλα, μαστοκύτταρα, Th2 κύτταρα
	CCL11	Eotaxin	CCR3	Επαγόμενη	Ηωσινόφιλα, βασεόφιλα, μαστοκύτταρα, Th2 κύτταρα
	CCL13	MCP-4	CCR2,3	Επαγόμενη	Μονοκύτταρα, T, NK, άωρα δενδρική, ηωσινόφιλα, βασεόφιλα, μαστοκύτταρα, Th2
	CCL14	HCC-1	CCR1	Άγνωστη	Μονοκύτταρα, μακροφάγα NK και T κύτταρα
	CCL15	HCC-2	CCR1,3	Άγνωστη	Μονοκύτταρα, μακροφάγα, NK, T κύτταρα, ηωσινόφιλα, βασεόφιλα, μαστοκύτταρα, Th2
	CCL16	HCC-4	CCR1	Άγνωστη	Μονοκύτταρα, μακροφάγα, NK και T κύτταρα
	CCL17	TARC	CCR4	Αμφότερος	Th2 κύτταρα, μακροφάγα
	CCL18	PARC	Άγνωστος	Ομοιοστατική	T κύτταρα
	CCL19	MIP-3β/ELC	CCR7	Ομοιοστατική	T, B και ώριμα δενδρική
	CCL20	MIP-3α/LARC	CCR6	Αμφότερος	T, B και άωρα δενδρική
	CCL21	SLC	CCR7	Ομοιοστατική	T, B και ώριμα δενδρική
	CCL22	MDC	CCR4	Αμφότερος	Th2 κύτταρα, μακροφάγα
	CCL23	MPIF1	CCR1	Άγνωστη	Μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα
	CCL24	Eotaxin-2	CCR3	Επαγόμενη	ηωσινόφιλα., βασεόφιλα, μαστοκύτταρα, Th2 κύτταρα
	CCL25	TECK	CCR9	Ομοιοστατική	T και κύτταρα του θύμου αδένα
	CCL26	Eotaxin-3	CCR3	Επαγόμενη	ηωσινόφιλα., βασεόφιλα, μαστοκύτταρα, Th2 κύτταρα
	CCL27	CTACK	CCR10	Ομοιοστατική	T, μονοκύτταρα, B και άωρα δενδρική
	CCL28	MEC	CCR10, CCR3	Ομοιοστατική	T κύτταρα
XC					
	CL1	Lymphotactin 1	XCR1	Επαγόμενη	T και NK κύτταρα
	CL2	Lymphotactin 2	XCR1	Επαγόμενη	T και NK κύτταρα
CX3C					
	CX3CL1	Fractalkine	CX3CR1	Αμφότερος	T κύτταρα, μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα

β1. CXC χημειοκίνες

Η CXC ομάδα των χημειοκινών περιέχει 16 μέλη και χωρίζεται περαιτέρω σε δύο υποομάδες ανάλογα με την παρουσία ή όχι του μοτίβου γλουταμικό οξύ-λευκίνη-αργινίνη (ELR) στο μόριό τους. Στις φέροντες την αλληλουχία χημειοκίνες (ELR+) υπάγονται οι CXCL1, 2, 3, 5, 6, 7, 8 και 15. Εμπλέκονται ειδικά στην προσέλκυση ουδετερόφιλων που εκφράζουν τους υποδοχείς CXCR1 και CXCR2 (212). Οι ELR+ χημειοκίνες παράγονται από διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς κυρίως κάτω από την επίδραση προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Ο κύριος ρόλος των χημειοκινών αυτών είναι η προαγωγή της προσκόλλησης των ουδετερόφιλων στα ενδοθηλιακά κύτταρα και η επακόλουθη μετανάστευσή τους προς περιοχές με υψηλή συγκέντρωση χημειοκινών. Ένας άλλος ρόλος των χημειοκινών αυτών είναι η αγγειογένεση και η χημειοταξία ενδοθηλιακών κυττάρων (213). Επιπρόσθετα η CXCL8 έχει αποδειχτεί ότι προκαλεί χημειοταξία βασεόφιλων και διεγερμένων από κυτταροκίνες ηωσινόφιλων ή περιφερικών T λεμφοκυττάρων (214-216). Οι CXCL1, 2 και 3 χημειοκίνες, λειτουργικά συγγενείς μεταξύ τους, επιπλέον της προσέλκυσης ουδετερόφιλων, εμπλέκονται στην χημειοταξία βασεόφιλων, ηωσινόφιλων, μονοκυττάρων, λείων μυϊκών κυττάρων και λεμφοκυττάρων, γεγονός που τους προσδίδει δυναμικό ρόλο στον καταρράκτη της οξείας φλεγμονής (217).

Οι ELR- χημειοκίνες περιλαμβάνουν τις CXCL4, 9, 10, 11, 12, 13, 14 και 16. Οι χημειοκίνες αυτές κατέχουν χημειοτακτικές ιδιότητες προς τα μονοκύτταρα και τους λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς (218). Η ομάδα αυτή χαρακτηρίζεται από ποικίλες δράσεις όπως η αγγειοστατική. Οι CXCL9, 10 και 11 συνδέονται με τον CXCR3 υποδοχέα προκαλώντας χημειοταξία T λεμφοκυττάρων και μονοκυττάρων. Οι CXCL9 και 10 κατέχουν επίσης και αγγειοστατική δράση (219; 220). Αντίθετα, η CXCL12 είναι η μόνη χημειοκίνη της ομάδας αυτής που προάγει την αγγειογένεση *in vivo* (221). Είναι χημειοτακτική για μια πληθώρα διαφορετικών κυτταρικών πληθυσμών μέσω του CXCR4 υποδοχέα (222). Η CXCL13 είναι μια ομοιοστατική χημειοκίνη της κατηγορίας αυτής η οποία εμπλέκεται στην προσέλκυση B κυττάρων που συμμετέχουν στην ανάπτυξη του λεμφικού ιστού (223).

β2. Ομάδα χημειοκινών προσδένοντες με CXCR3 τον υποδοχέα

Ο CXCR3 υποδοχέας εκφράζεται στα επιθηλιακά κύτταρα, στα ενδοθηλιακά και στα κύτταρα του λεμφικού ιστού (224). Οι συνδετικές χημειοκίνες του CXCR3, CXCL9, 10 και 11 διακρίνονται από 40% ομοιότητα στην αλληλουχία αμινοξέων. Και οι τρεις επάγονται

από την IFN γ (219; 225; 226). Η CXCL10 χαρακτηρίζεται από υψηλότερη παραγωγή από τα λεία μυϊκά κύτταρα σε σχέση με τις CXCL9 και 11 οι οποίες παράγονται κυρίως από τα επιθηλιακά και τα μονοκύτταρα (227). Υπό την επήρεια κατάλληλων ερεθισμάτων, ενδοθηλιακά, επιθηλιακά, κύτταρα του νευρικού και λεμφικού ιστού, παράγουν CXCL9, 10 και 11 με σκοπό την ενεργοποίηση και στρατολόγηση CXCR3+ κυττάρων (225; 228; 229). Κατά κύριο λόγο προσελκύουν ενεργοποιημένα Th1 λεμφοκύτταρα που εκφράζουν τον CXCR3 υποδοχέα (230). Οι CXCL9 και 10 χημειοκίνες προάγουν ταχύτητα την σύνδεση των ενεργοποιημένων T λεμφοκυττάρων, μέσω ιντεγκρίνης, στα κύτταρα που τις εκφράζουν. Το φαινόμενο αυτό δεν παρατηρείται σε μη ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα (229; 231; 232). Επίσης, παρουσιάζουν ανταγωνιστική δράση με την CCL11 χημειοκίνη ως προς την πρόσδεση σε CCR3+ κύτταρα με σκοπό την αναστολή της μετανάστευσής τους. Με αυτόν τον τρόπο ενισχύεται η πόλωση των Th1 προς τα Th2 κύτταρα (233). Επιπλέον οι CXCL9-11 δύναται να προκαλέσουν χημειοταξία NK κυττάρων, να ενισχύσουν τις κυτταρολυτικές ιδιότητές τους (234) ή ακόμη να ενεργοποιήσουν πληθυσμούς δενδριτικών κυττάρων (235).

Δεν έχει εξακριβωθεί ακόμη γιατί οι τρεις αυτές χημειοκίνες συνδέονται με τον ίδιο υποδοχέα. Η CXCL11 παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια σύνδεσης στα διαφοροποιημένα μονοκύτταρα (236) και ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα (237), ενισχύοντας με αυτόν τον τρόπο την προσωρινή κινητοποίηση του ενδοκυττάρου ασβεστίου στα κύτταρα αυτά (219). Η CXCL11 επίσης κατέχει σημαντικό ρόλο στην μετανάστευση CXCR3+ λεμφοκυττάρων διαμέσου των ενδοθηλιακών κυττάρων (238). Η ικανότητα σύνδεσης των τριών χημειοκινών με τον CXCR3 υποδοχέα και η επακόλουθη επαγωγή χημειοταξίας παρουσιάζει την εξής σειρά: CXCL11>CXCL9=CXCL10. Οι CXCL9-11 χημειοκίνες έχουν επίσης την ικανότητα να παρουσιάζουν διαφόρου βαθμού απευαισθητοποίηση του ερεθίσματος της αύξησης του ενδοκυττάρου ασβεστίου ώστε να μπορεί να επαναληφθεί το αρχικό ερέθισμα: η ιεραρχία σε αυτό το φαινόμενο της επαναλαμβανόμενης απευαισθητοποίησης είναι CXCL11>CXCL9>CXCL10 (239).

Μελέτη της δομής των τριών χημειοκινών αποκαλύπτουν ότι τόσο το αμινοτελικό όσο και το καρβοξυτελικό άκρο – απαραίτητα για την σύνδεση με τον υποδοχέα – της CXCL11 διαφέρουν από τις αντίστοιχες περιοχές των δύο άλλων χημειοκινών (240). Επιπλέον το καρβοξυτελικό άκρο της CXCL10 παρουσιάζει υψηλότερη συγγένεια σύνδεσης με τις γλυκοζάμινογλυκάνες της επιφάνειας των επιθηλιακών και ενδοθηλιακών κυττάρων σε σχέση με τις CXCL9 και 11 (225; 241). Πιθανόν το γεγονός αυτό – της πιο σταθερής

σύνδεσης της CXCL10 – να συνεπάγεται μεγαλύτερη επαγωγή της χημειοταξίας των T κυττάρων.

Πρόσφατα περιγράφηκε η ύπαρξη ενός νέου υποδοχέα που προέρχεται από διαφορετική σύνδεση των βάσεων του CXCR3 γονιδίου και ονομάστηκε CXCR3B. Το διαφορετικό αυτό πάντρεμα των βάσεων πραγματοποιείται από την ίδια περιοχή με αυτή που προκύπτει ο CXCR3 υποδοχέας (που μετονομάστηκε σε CXCR3A), σε συνδυασμό με άλλη μια θέση που βρίσκεται στο ιντρόνιο του CXCR3. Μετάφραση του CXCR3B mRNA έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός υποδοχέα 416 αμινοξέων ο οποίος περιέχει ένα μεγαλύτερο μήκους αμινοτελικό άκρο διαφορετικό κατά 52 αμινοξέα από τον CXCR3A υποδοχέα (242). Ο CXCR3B εκφράζεται κυρίως σε ενδοθηλιακά κύτταρα και ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα. Επιπλέον της σύνδεσης του με τις τρεις χημειοκίνες CXCL9, 10 και 11 συνδέεται και με την CXCL4, μια χημειοκίνη με αγγειοστατική κυρίως δράση. Ο CXCR3B προκαλεί κυρίως αποπτωτικά ερεθίσματα επί των ενδοθηλιακών κυττάρων ως απάντηση της έκφρασης της CXCL4. Η τελευταία δεν έχει αποδειχτεί να προκαλεί χημειοταξία όταν εκφράζεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα (242).

Πρόσφατα περιγράφηκαν αντίθετες δράσεις των CXCL10 και CXCL4 χημειοκινών στην παραγωγή Th1 και Th2 κυτταροκινών. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι η CXCL4 ασκεί ανασταλτική δράση τόσο στον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων όσο και στην παραγωγή IFN- γ από ενεργοποιημένα T κύτταρα. Οι συγγραφείς αυτής της μελέτης προτείνουν ως πιθανή εξήγηση αυτού του φαινομένου την διαφορετική αλληλεπίδραση των CXCL10 και 4 χημειοκινών με τους CXCR3A και B υποδοχείς αντίστοιχα, και την έναρξη, κατά συνέπεια, ξεχωριστών μονοπατιών μετάδοσης του σήματος (243).

β3. Έκφραση των CXCL9, 10 και 11 χημειοκινών στις ΙΦΕΝ

Έχουν παρατηρηθεί αυξημένα CXCR3+ κύτταρα από CD4+CXCR3+ T λεμφοκύτταρα στη βασική μεμβράνη ασθενών με ΙΦΕΝ (244). Έχει επίσης υποστηριχθεί ότι η CXCL10 αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων του λεπτού εντέρου και ασκεί έλεγχο και στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων των κρυπών σε ασθενείς με οξεία κρίση κολίτιδας (245).

Η Νόσος Crohn χαρακτηρίζεται από διήθηση Th1 κυττάρων τα οποία παράγουν Th1 κυτταροκίνες στο βλεννογόνο του εντέρου (246). Όπως ήδη αναφέρθηκε CD4+CXCR3+ λεμφοκύτταρα ανευρίσκονται αυξημένα σε ασθενείς με Νόσος Crohn σε σχέση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες (244). Έχει αποδειχθεί επίσης έκφραση του υποδοχέα CXCR3 στην

πλειοψηφία των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων της βασικής μεμβράνης και σε ομάδα των T λεμφοκυττάρων των μεσεντέριων λεμφαδένων ασθενών με Νόσο Crohn αλλά και Ελκώδη Κολίτιδα (247). Οι ίδιοι ερευνητές καταδεικνύουν ως πιθανότερη θέση διαφοροποίησης των CXCR3⁺ CD4 T λεμφοκυττάρων τους μεσεντέριους λεμφαδένες. Το φαινόμενο αυτό λαμβάνει χώρα πριν την πόλωση τους προς Th1 λεμφοκύτταρα.

Επιπλέον η CXCL10 επάγεται σε ασθενείς με Ελκώδη Κολίτιδα (248; 249) (250) ενώ σε ιστούς ασθενών με Νόσο Crohn παρατηρήθηκε έκφραση CXCL9 και CXCR3 (244; 251) (247).

Τα παρατηρούμενα υψηλά επίπεδα CXCL9, 10 και 11 σε ασθενείς με ΙΦΕΝ συνοδεύονται και με δομικές αλλαγές του εντερικού επιθηλίου. Παθολογοανατομική εκτίμηση του εντέρου των ασθενών αυτών έδειξε πολλαπλές μικρές λεμφοκυτταρικές διηθήσεις της βασικής μεμβράνης του παχέος εντέρου. Παρόντα ήταν επίσης στο βλεννογόνο και υποβλεννογόνο χιτώνα και πολυπύρρηνα επιθηλιακά κύτταρα καθώς και επιμηκυσμένα κύτταρα αδένων (239). Χρώση κρυτοτόμων του παχέος εντέρου ασθενών με Νόσο Crohn με αντισώματα κατά των CXCL9, 10 και 11, αποκάλυψε σημαντικά αυξημένη έκφραση της CXCL11>CXCL10>CXCL9. Λαμβάνοντας υπόψιν ότι η CXCR3 προκαλεί χημειοταξία στα CXCR3⁺ κύτταρα ακόμη και σε συγκέντρωση 10 φορές μικρότερη των άλλων δύο χημειοκινών (252), θα μπορούσαμε να συμπεράνουμε ότι η CXCL11 είναι 10 φορές πιο αποτελεσματική στην ενεργοποίηση και προσέλκυση των CXCR3⁺ κυττάρων.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός της μείωσης ή και εσωτερικοποίησης του CXCR3 στα T λεμφοκύτταρα, όταν αλληλεπιδρά με ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα που εκφράζουν την CXCL11 χημειοκίνη (253). Η εσωτερικοποίηση αυτή του υποδοχέα, ίσως εξηγεί την παρατηρούμενη χαμηλή έκφραση του CXCR3 σε απομονωμένα λεμφοκύτταρα από τον βλεννογόνο παχέος εντέρου ασθενών με Ελκώδη Κολίτιδα παρά την υψηλή έκφραση του CXCR3 mRNA σε λεμφοκύτταρα της βασικής μεμβράνης (247).

Και ενώ οι CXCL9, 10 και 11 χημειοκίνες και ο CXCR3 υποδοχέας τους ανευρίσκονται αυξημένοι σε ασθενείς με ΙΦΕΝ παραμένει άγνωστη η τυχόν συμμετοχή τους στην πορεία και σοβαρότητα της νόσου καθώς και στην ευαισθησία προς τα συγκεκριμένα νοσήματα.

β4. CC χημειοκίνες

Ο κύριος στόχος των CC χημειοκινών είναι τα μονοκύτταρα και κατ' επέκταση οι προ-φλεγμονώδεις ή και ομοιοστατικοί μηχανισμοί. Γενικά οι CC χημειοκίνες περιέχουν 4 κυστείνες στο μόριό τους, αν και κάποια μέλη της ομάδας αυτής περιέχουν 6 κυστείνες: CCL1, 15, 21, 23, 28 (254). Ανάλογα με τη λειτουργία τους ή και την ομοιότητα στην αλληλουχία των αμινοξέων, οι CC χημειοκίνες μπορούν να διακριθούν περαιτέρω σε αυτές που συμμετέχουν σε αλλεργικές αντιδράσεις, σε προφλεγμονώδεις, σε αυτές που εμπλέκονται στην ανάπτυξη και στις ομοιοστατικές.

Στις CC χημειοκίνες που σχετίζονται με αλλεργικές εκδηλώσεις υπάγονται οι CCL1, 2, 7, 8, 11, 13, 24 και 26. Προκαλούν χημειοταξία ηωσινόφιλων και βασεόφιλων κυττάρων και επιπλέον διαθέτουν τη δυνατότητα έκλυσης ισταμίνης (255). Οι χημειοκίνες CCL11, 24 και CCL26 προσδέονται επιλεκτικά στον CCR3 υποδοχέα (256; 257). Μελέτες αποδεικνύουν ότι ο CCR3 υποδοχέας κατέχει σημαντικό ρόλο και στην χημειοταξία των Th2 λεμφοκυττάρων σε φλεγμαίνοντες ιστούς (258).

Στις προφλεγμονώδεις CC χημειοκίνες ανήκουν οι CCL3, 4, 5, 6 και 18. Κατέχουν ποικίλες ιδιότητες όπως χημειοταξία μονοκυττάρων, μακροφάγων, ηωσινοφίλων, NK κυττάρων, άωρων δενδριτικών, Th1 και Th2 λεμφοκυττάρων (259; 260).

β5. CCR3 συνδεδεμένες χημειοκίνες και IΦEN

Έκφραση του CCR3 υποδοχέα έχει περιγραφεί σε κυκλοφορούντα CD3+ λεμφοκύτταρα ασθενών με Ελκώδη Κολίτιδα (261). Επιπλέον, στο βλεννογόνο του ορθού ασθενών με Ελκώδη Κολίτιδα βρέθηκαν CCR3+ λεμφοκύτταρα (262). Σε αντίθεση με τις μελέτες αυτές, άλλοι ερευνητές περιέγραψαν ότι τα CCR3+ λεμφοκύτταρα αποτελούν ποσοστό μικρότερο του 1% των κυκλοφορούντων CD4+ κυττάρων (263).

Όσον αφορά τις CXCL11, 24 και 26, έχουν περιγραφεί αυξημένα επίπεδα τόσο στον ορό όσο και στους φλεγμαίνοντες ιστούς ασθενών με IΦEN (264-266). Πάραυτα, υπάρχει διαφωνία για το αν τα επίπεδα των χημειοκινών αυτών σχετίζονται με την ενεργότητα της νόσου και για το αν μεταβάλλονται από τη θεραπεία (265; 266).

β6. C και CX3C χημειοκίνες

Η οικογένεια των CC χημειοκινών περιλαμβάνει δύο μέλη όμοια δομικά και λειτουργικά μεταξύ τους. Πρόκειται για τις XCL1 και XCL2 χημειοκίνες που διαφέρουν μεταξύ τους στο 7^ο και 8^ο αμινοξύ (267). Προκαλούν χημειοταξία λεμφοκυττάρων αλλά δεν εμπλέκονται – με βάση τις μέχρι σήμερα μελέτες – σε χημειοταξία ουδετερόφιλων ή μονοκυττάρων. Δρουν μέσω σύνδεσης με τον XCR1 υποδοχέα (207).

Η CX3C1 χημειοκίνη είναι το μόνο γνωστό μέλος της CX3C οικογένειας. Η ιδιαιτερότητα της χημειοκίνης αυτής είναι ότι συνδέεται με την μεμβράνη των κυττάρων που την εκφράζουν μέσω ενός βλεννώδους μίσχου ενωμένου με διαμεμβρανικές και κυτταροπλασματικές δομές. Η συνδεδεμένη αυτή μορφή επάγεται σε ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα προάγοντας τη σύνδεσή τους με λευκοκύτταρα. Αργότερα περιγράφηκε και μια διαλυτή μορφή της CX3C1 η οποία κατέχει χημειοτακτικές ιδιότητες για τα T λεμφοκύτταρα και τα μονοκύτταρα (268).

γ. Κατηγορίες χημειοκινών – λειτουργική διαίρεση

Χαρακτηριστικά οι χημειοκίνες δύνανται να εκφραστούν με δύο τρόπους. Είτε ιδιοσυστατικά – μη επαγόμενες ή ομοιοστατικές χημειοκίνες – όπως αυτές που συμμετέχουν σε ομοιοστατικούς μηχανισμούς πχ BCA-1 και TECK, είτε επαγόμενες κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες και κατόπιν της επίδρασης των φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως οι TNFα, LPS, IL-1α. Οι κυτταροκίνες που επάγουν τις χημειοκίνες της κατηγορίας αυτής παράγονται από τα βοηθητικά T1 (Th1) ή T2 (Th2) λεμφοκύτταρα. Τα Th1 είναι υπεύθυνα για την παραγωγή κυτταροκινών όπως οι IFNγ, IL12, IL1, TNFα και άλλες προκαλώντας φλεγμονώδεις απαντήσεις μέσω αλληλεπίδρασης με μακροφάγα, ουδετερόφιλα και Th1 λεμφοκύτταρα. Τα Th2 λεμφοκύτταρα παράγουν μεταξύ άλλων IL4, IL10, IL13 προκαλώντας ενεργοποίηση Th2 λεμφοκυττάρων, ηωσινόφιλων και βασεόφιλων κυττάρων (269; 270) (πίνακας 2). Μόνο ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα δύναται να ανταποκριθούν στο ερέθισμα των φλεγμονωδών χημειοκινών καθώς σε ‘naïve’ κύτταρα δεν παρατηρείται έκφραση υποδοχέων χημειοκινών (271). Έχει όμως αποδειχτεί ότι κατόπιν ενεργοποίησης τα T λεμφοκύτταρα αποκτούν διαφορετικούς υποδοχείς χημειοκινών καθώς μετατρέπονται σε κύτταρα μνήμης ή δραστικά T λεμφοκύτταρα.

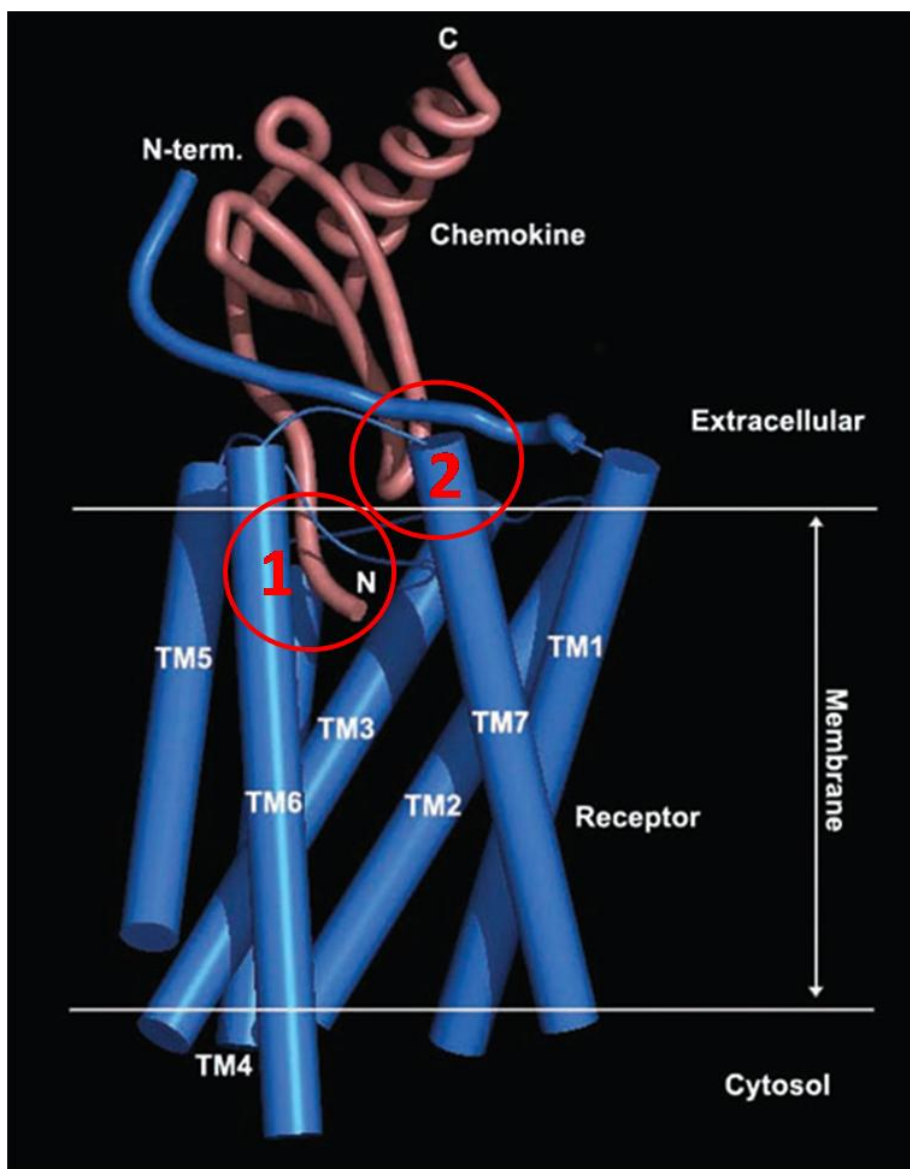
δ. Υποδοχείς χημειοκινών

Οι χημειοτακτικές ιδιότητες των χημειοκινών περιγράφηκαν πρώτη φορά κατόπιν της παρατήρησης ότι η IL-8 μπορεί να προκαλέσει χημειοταξία ουδετερόφιλων (272). Σύντομα αποδείχτηκε ότι η ενεργοποίηση ορισμένων συζευγμένων με πρωτεΐνη G υποδοχέων ήταν απαραίτητη προκειμένου οι χημειοκίνες να ασκήσουν την χημειοτακτική δράση τους (273; 274).

Οι υποδοχείς χημειοκινών – συζευγμένοι με G πρωτεΐνη – δρουν ως υποδοχείς επιφανείας υπεύθυνοι για τη μετάδοση ενδογενών σημάτων. Κοινά χαρακτηριστικά τους αποτελούν οι 7 έλικες, το όξινο αμινοτελικό άκρο τους και μια αλληλουχία 10 αμινοξέων που βρίσκεται στην 2^η ενδοκυττάρια αναδίπλωση (202). Ειδικότερα, αποτελούνται από μια αμινοτελική εξωκυττάρια περιοχή, 7 διαμεμβρανικές υδρόφοβες α έλικες (7TM) οι οποίες χωρίζονται μεταξύ τους με σπειροειδείς περιοχές ποικίλου μεγέθους και ένα ενδοκυττάριο καρβοξυτελικό άκρο (275). Η διαμεμβρανική περιοχή αποτελείται από 340-370 αμινοξέα με 20-80% ομοιότητα μεταξύ των διάφορων υποδοχέων (275).

Η θέση δέσμευσης των χημειοκινών επί του υποδοχέα τους είναι πολύπλοκη και πιθανόν περιλαμβάνει αρκετές μη παρακείμενες περιοχές συμπεριλαμβανομένου και του αμινοτελικού άκρου (202). Επιπλέον, η λειτουργική δομή των υποδοχέων ακόμη μελετάται, παρόλο που τουλάχιστον για κάποιους από αυτούς πιστεύεται ότι δρουν ως ομοδιμερή (276). Μέχρι σήμερα δεν έχουμε διαλευκάνει την πλήρη δομή κανενός υποδοχέα χημειοκινών (277). Οι μοναδικοί συνδεδεμένοι με πρωτεΐνη G υποδοχείς που γνωρίζουμε την τριτοταγή δομή τους είναι η βόειος ροδοψίνη και ο β2 αδρενεργικός υποδοχέας στον άνθρωπο (277; 278) (εικόνα 3).

Εικόνα 3. Υποθετικό μοντέλο της σύνδεσης χημειοκίνης (ροζ) – υποδοχέα (μπλε). Απεικονίζονται δύο πιθανές θέσεις σύνδεσης: (1) την αλληλεπίδραση της αμινοτελικής περιοχής της χημειοκίνης με ελικοειδή δέσμη του υποδοχέα και (2) την αλληλεπίδραση κάποιας κεντρικής περιοχής της χημειοκίνης με τις εξωκυττάρειες αναδιπλώσεις του υποδοχέα.



Καταχρηστικά, οι υποδοχείς χημειοκινών θα μπορούσαν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες ανάλογα με τον τρόπο έκφρασής τους. Αυτούς που εκφράζονται αποκλειστικά σε μια συγκεκριμένη κατηγορία λευκοκυττάρων όπως ο CXCR3 που εκφράζεται σε κύτταρα της λεμφικής σειράς αποκλειστικά (279), και σε αυτούς που παρουσιάζουν ευρύτερη έκφραση σε περισσότερους του ενός τύπου κυττάρων, όπως ο CXCR4 που εκφράζεται σε T και B λεμφοκύτταρα, ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα, και κυκλοφορούντα δενδριτικά (202). Ο

CCR3 παρουσιάζει ένα ιδιαίτερο μοντέλο έκφρασης. Συναντάται σε ηωσινόφιλα, βασεόφιλα, μαστοκύτταρα, Th2 λεμφοκύτταρα και κάποιους πληθυσμούς δένδριτικών κυττάρων (280) δηλαδή σε όλους τους γνωστούς μέχρι σήμερα κυτταρικούς πληθυσμούς που εμπλέκονται στην έναρξη και διατήρηση μιας αλλεργικής αντίδρασης.

Η έκφραση των υποδοχέων των χημειοκινών ρυθμίζεται από διάφορα φλεγμονώδη ερεθίσματα όπως οι κυτταροκίνες που παράγονται από τα Th1 ή Th2 λεμφοκύτταρα (271). Πάραυτα, δε μπορεί να καθοριστεί κάποιο μοντέλο επαγωγής ή μείωσης της έκφρασης ενός υποδοχέα από ένα συγκεκριμένο ερέθισμα. Για παράδειγμα, η IFN α μπορεί να προκαλέσει επαγωγή ή μείωση της έκφρασης του CXCR3 και του CCR3 ανάλογα με την πόλωση των T λεμφοκυττάρων (281). Επιπλέον η ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων μπορεί να τροποποιήσει την έκφραση συγκεκριμένων υποδοχέων. Έτσι, τα ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα δύναται να σηματοδοτήσουν την μείωση της έκφρασης των CCR3, CCR1, CCR7, την επαγωγή της έκφρασης του CCR8 και CXCR5 και τη μείωση ή επαγωγή του CXCR3 ανάλογα με τη διαμόρφωση των πειραματικών συνθηκών (271; 282). Κατά συνέπεια, η ρύθμιση της έκφρασης των υποδοχέων των χημειοκινών μπορεί να προκαλέσει διαφορετικά πρότυπα κυκλοφορούντων λευκοκυττάρων ανάλογα με τις δεδομένες συνθήκες τη δεδομένη χρονική στιγμή.

Η επιλεκτική σύνδεση με την οποία μια χημειοκίνη συνδέεται με έναν συγκεκριμένο υποδοχέα παρουσιάζει μεγάλη ποικιλία. Συγκεκριμένες χημειοκίνες συνδέονται με έναν και μόνο υποδοχέα και αντίστροφα, όπως για παράδειγμα ο CXCR5 με την BCA-1 (283), ο CCR9 με τον TECK (284), ο CXCR6 με την CXCL16 (285). Διαφορετικό πρότυπο σύνδεσης παρουσιάζουν κάποιοι υποδοχείς που συνδέονται με δύο ή και περισσότερες διαφορετικές χημειοκίνες, όπως ο CXCR3 (219; 231). Κάποιοι άλλοι υποδοχείς ή και χημειοκίνες παρουσιάζουν πιο ετερόκλητες συνδέσεις, πχ ο CCR3 με τις Eotaxin 1, 2, 3, MCP-2, MCP-3, MCP-4 και RANTES (286), ή με τη σειρά του ο RANTES με τους υποδοχείς CCR1, 3 και 5 (202). Γενικά, οι χημειοκίνες ή οι υποδοχείς που εμπλέκονται σε φλεγμονώδεις διαδικασίες και ενεργοποίηση κυττάρων – στόχων παρουσιάζουν μια πληθώρα ή και αλληλοεπικάλυψη μορίων σύνδεσης, ενώ όσες χημειοκίνες ή υποδοχείς συμμετέχουν σε ομοιοστατικούς μηχανισμούς μάλλον παρουσιάζουν πιο αποκλειστική αλληλεπίδραση με συγκεκριμένους υποδοχείς ή χημειοκίνες αντίστοιχα (287).

Υποδοχείς χημειοκινών, εκτός από τα λευκά αιμοσφαίρια συναντάμε και στα ενδοθηλιακά και επιθηλιακά κύτταρα (288) όπου η βιολογική λειτουργία τους μελετάται μέχρι σήμερα.

ε. Σύνδεση υποδοχέα - χημειοκίνης

Τα αποτελέσματα της σύνδεσης υποδοχέα – χημειοκίνης έχουν μελετηθεί αναλυτικά *in vivo* και *in vitro* (289). Το κυριότερο επακόλουθο της σύνδεσης αυτής είναι η προσέλκυση χημειοτακτικά των κυττάρων που εκφράζουν το συγκεκριμένο υποδοχέα προς τις περιοχές με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση της χημειοκίνης – συνδέτη (287). Η πλειοψηφία των χημειοκινών εκκρίνονται από τα κύτταρα φορείς και για να προκαλέσουν χημειοταξία *in vivo* πρέπει να ακινητοποιηθούν στην επιφάνεια των κυττάρων ή στην εξωκυττάρια ουσία μέσω αλληλεπίδρασης με αρνητικά φορτισμένες γλυκοζοαμινογλυκάνες. Συγκεκριμένες χημειοκίνες έχουν τη δυνατότητα σύνδεσης με διαφορετικούς τύπους και διαφορετικής χημικής συγγένειας γλυκοζοαμινογλυκάνες (290). Ο τύπος αυτός των γλυκοζοαμινογλυκανών διαφέρει ανάλογα με τον κυτταρικό πληθυσμό, την περιοχή του οργανισμού και το βαθμό της φλεγμονής. Κατά συνέπεια η επιλεκτική κινητοποίηση μιας χημειοκίνης σε μια συγκεκριμένη θέση πιθανόν να αποτελεί έναν από τους ρυθμιστικούς μηχανισμούς που καθορίζουν τη δράση της συγκεκριμένης χημειοκίνης στο συγκεκριμένο ιστό και στη συγκεκριμένη φλεγμονώδη κατάσταση. Επιπλέον στις γλυκοζοαμινογλυκάνες λαμβάνει χώρα και ο ολιγομερισμός των χημειοκινών παρέχοντας με αυτόν τον τρόπο έναν επιπλέον ρυθμιστικό μηχανισμό σταδιακής δράσης του συστήματος των χημειοκινών (291).

Οι χημειοκίνες ενεργοποιούν μια – εξαρτώμενη από την ιντεργκρίνη – σταθερή προσκόλληση των χημειοτακτικών κυττάρων με την επιφάνεια στόχο, το οποίο είναι ένα κύριο βήμα για την μετανάστευση των κυττάρων προς τις φλεγμαίνουσες περιοχές (292). Η IL-8 και η MCP-1 μπορούν να ενεργοποιήσουν μέσω $\beta 2$ ιντεργκρίνης την προσκόλληση μονοκυττάρων σε κύτταρα που εκφράζουν το ενδοκυττάριο μόριο σύνδεσης 1 (ICAM-1). Άλλες χημειοκίνες όπως οι RANTES, SDF-1, MIP-1, TARC και Eotaxin εμπλέκονται στη προσκόλληση λεμφοκυττάρων στο μόριο ICAM-1.

Η σύνδεση του υποδοχέα – χημειοκίνης μπορεί να ρυθμίσει και την έκφραση των MAP κινασών (293), της πρωτεϊνικής κινάσης B (294) και άλλων μεταγραφικών παραγόντων. Στη μετάδοση του σήματος μετά τη σύνδεση χημειοκίνης – υποδοχέα ενεργό

ρόλο παίζουν και οι PI3K (phosphatidylinositol -3OH kinases) (295; 296), οι οποίες εμπλέκονται στον καταρράκτη των αντιδράσεων που οδηγούν σε χημειοταξία (297).

Η ομόλογη απευαισθητοποίηση του υποδοχέα λαμβάνει χώρα όταν κατά τη σύνδεση του με τη χημειοκίνη, φωσφορυλιώνεται από μια κινάση συζευγμένη με έναν G πρωτεϊνικό υποδοχέα (298; 299). Σαν συνέπεια ο υποδοχέας ενδοκυτταρώνεται. Είναι πιθανόν μέσω του μηχανισμού αυτού να ελέγχεται η διάρκεια της χημειοταξίας και προσέλκυσης των λευκών αιμοσφαιρίων (300).

στ. Μετάδοση του σήματος

Η πλειοψηφία των γεγονότων που άπτονται της μετάδοσης του σήματος, επάγονται από τη σύνδεση του υποδοχέα με τις χημειοκίνες. Με εξαίρεση την απευαισθητοποίηση του υποδοχέα, η επαγωγή του σήματος εξαρτάται από τη σύζευξη με τις G πρωτεΐνες (301). Ο καταρράκτης της σύζευξης των G πρωτεϊνών και η σύνδεση του υποδοχέα ενεργοποιεί πολυάριθμους ενδοκυττάριους μηχανισμούς όπως την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε παροδική αύξηση του ελεύθερου στο κυτταρόπλασμα ασβεστίου – μέσω ενεργοποίησης των ενδοκυττάριων αποθηκών – και ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής C κινάσης. Τα γεγονότα αυτά οδηγούν σε αποκοκκίωση ουδετερόφιλων και παραγωγή υπεροξειδίων (297).

Η ικανότητα ενός υποδοχέα να πυροδοτήσει την έναρξη του ενδοκυττάριου καταρράκτη αντιδράσεων μετά τη σύνδεση με τη χημειοκίνη εξαρτάται τουλάχιστον κατά ένα μέρος από την παρουσία της αλληλουχίας Asp-Arg-Tyr στην δεύτερη ενδοκυττάρια καμπί της δομής του υποδοχέα (302). Η σύνδεση της χημειοκίνης με τον υποδοχέα προκαλεί την εκδήλωση μιας προσαρμοστικής αλλαγής της 7TM περιοχής, και η οποία αλλαγή επιτρέπει στον υποδοχέα να ενωθεί με τις G-πρωτεΐνες. Με αυτόν τον τρόπο ξεκινάει ο καταρράκτης των εξωκυττάριων αντιδράσεων (278).

Πολλά από τα μονοπάτια μετάδοσης του σήματος που ενεργοποιούνται μετά τη σύνδεση της χημειοκίνης με τον υποδοχέα της είναι επίσης παρόμοια (286; 289). Πάραυτα, ο ειδικός τρόπος σύνδεσης των υποδοχέων με κάθε χημειοκίνη χαρακτηρίζεται από μεγάλη λειτουργική ποικιλότητα και επιτρέπει στις χημειοκίνες να παίρνουν μέρος σε τόσο ανόμοιους μεταξύ τους μηχανισμούς όπως η οργανογένεση (303), η αιμοποίηση (196), η επικοινωνία μεταξύ νευρώνων (304) και η ρύθμιση της κυκλοφορίας των λευκών

αιμοσφαιρίων (305). Μερικές χημειοκίνες εμπλέκονται στην καταπολέμηση συγκεκριμένων λοιμώξεων (202). Αντίθετα, κάποιοι μικροοργανισμοί δύνανται να εκμεταλλευτούν το σύστημα των χημειοκινών – υποδοχέων τους προς όφελος της επιβίωσής τους στον ξενιστή όπως ο HIV-1 (306) και η ομάδα των ερπητοϊών (269). Επιπλέον, διαταραχή του συστήματος χημειοκινών – υποδοχέων τους εμπλέκονται σε αρκετά αυτοάνοσα νοσήματα (307) όπως και στην καρκινογένεση. Άλλες δράσεις των χημειοκινών – πιο ειδικές για συγκεκριμένα μέλη της ομάδας – περιλαμβάνουν αλλαγές του σχήματος των κυττάρων πχ των ουδετερόφιλων, την έκταση ελασματοποδίων κατά τη διάρκεια αναδόμησης του κυτταροσκελετού, την απελευθέρωση ελευθέρων ριζών οξυγόνου, ισταμίνης ή και κυτταροτοξικών πρωτεϊνών από ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα και βασεόφιλα αντίστοιχα (286).

2. Σκοπός της μελέτης

Σκεπτικό της μελέτης

Η αιτιοπαθογένεια των ΙΦΕΝ περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση κατάλληλων αντιγόνων και την έκλυση της ανοσολογικής απάντησης με τη συμμετοχή των επιθηλιακών κυττάρων, τροποποιημένη προς ή μακριά από την εκδήλωση της νόσου ανάλογα με την επίδραση γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Η μελέτη αυτή επικεντρώνεται στο ρόλο του επιθηλίου σε μια προσπάθεια κατανόησης της ανοσολογικής αντίδρασης του βλεννογόνου σε ασθενείς με ΙΦΕΝ.

Ειδικότερα, ασχοληθήκαμε με τις κυτταροκίνες οι οποίες παράγονται από τους T-κυτταρικούς πληθυσμούς και θεωρείται ότι είναι θεμελιώδους σημασίας για την ανοσολογική απόκριση του βλεννογόνου (77). Επιπλέον μελετήσαμε την έκφραση και λειτουργία των χημειοκινών που παράγονται από τα επιθηλιακά κύτταρα του βλεννογόνου. Έκφραση των υποδοχέων χημειοκινών από τα επιθηλιακά κύτταρα του λεπτού και παχέος εντέρου έχει ήδη παρατηρηθεί σε συνδυασμό με την παραγωγή χημειοκινών από τα εν λόγω κύτταρα (83; 84). Πάραυτα, ενώ αρκετές μελέτες εμπλέκουν την αλληλεπίδραση των επιθηλιακών κυττάρων μέσω της έκφρασης των χημειοκινών με τα κυκλοφορούντα T λεμφοκύτταρα και την μετανάστευσή τους προς το βλεννογόνο ασθενών με ΙΦΕΝ, η έκφραση και λειτουργία των χημειοκινών αυτών έχει μελετηθεί ελάχιστα ως σήμερα (82).

Συνοψίζοντας, σκοπός της μελέτης αυτής είναι να απαντήσει τα κάτωθι ερωτήματα:

Να καθορισθεί το φάσμα των χημειοκινών και των υποδοχέων τους που εκφράζονται από τα κολονικά επιθηλιακά κύτταρα σε ασθενείς με Φλεγμονώδη Εντεροπάθεια και να συγκριθούν με φυσιολογικούς μάρτυρες.

Να καθορισθεί το φάσμα των χημειοκινών και των υποδοχέων τους που εκφράζονται από T λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος στους ανωτέρω ασθενείς.

Να μελετηθούν οι παράγοντες που επηρεάζουν την έκφραση και παραγωγή χημειοκινών και των υποδοχέων τους από κολονικά επιθηλιακά κύτταρα.

Να μελετηθεί η επίδραση των ανοσορρυθμιστικών κυτταροκινών που παράγονται από τα T λεμφοκύτταρα στην παραγωγή και έκφραση χημειοκινών από τα κολονικά επιθηλιακά κύτταρα.

3. Ασθενείς, υλικά και μέθοδοι

Ασθενείς, υλικά και μέθοδοι

3.1 Ασθενείς

Χρησιμοποιήθηκαν πολλαπλές βιοψίες κολονικού βλεννογόνου από 22 ασθενείς με Ελκώδη Κολίτιδα, 20 ασθενείς με Νόσο Crohn και 20 φυσιολογικούς μάρτυρες που υποβλήθηκαν σε ενδοσκοπικό έλεγχο στο Ενδοσκοπικό Τμήμα της Γαστρεντερολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης. Από τους ίδιους ασθενείς και φυσιολογικούς μάρτυρες συλλέξαμε ορό και μονοκύτταρα περιφερικού αίματος (PBMC) για περαιτέρω μελέτες. Ασθενείς με ΙΦΕΝ συμπεριλήφθησαν στη μελέτη μόνο εφόσον πληρούσαν καθιερωμένα κριτήρια διάγνωσης της νόσου (308). Η ενεργότητα της νόσου σε ασθενείς με Νόσο Crohn εκτιμήθηκε με το δείκτη ενεργότητας νόσου (CD activity index score)(309) (πίνακας 1), σε ασθενείς δε με Ελκώδη Κολίτιδα με τον κλινικό δείκτη ενεργότητας της κολίτιδας (clinical colitis activity index)(310). Η ενεργότητα νόσου και στις δύο ομάδες ασθενών εκτιμήθηκε κατά τη λήψη των βιοψιών. Τα χαρακτηριστικά των ασθενών συνοψίζονται στον πίνακα 2. Οι 20 υγιείς μάρτυρες που μελετήθηκαν δεν παρουσίαζαν διαφορές στην κατανομή ηλικίας και φύλου σε σχέση με τους ασθενείς με ΙΦΕΝ (μέση ηλικία 38.5 έτη). Οι φυσιολογικοί μάρτυρες υποβλήθηκαν σε κολονοσκόπηση για ενδείξεις όπως κοιλιακό άλγος και δυσκοιλιότητα, και συμπεριλήφθησαν στη μελέτη μόνο αν οι βιοψίες βλεννογόνου ήταν φυσιολογικές ιστολογικά. Η επιτροπή δεοντολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου ενέκρινε τη μελέτη, και έδωσαν συγκατάθεση όλοι οι ασθενείς που συμμετείχαν σύμφωνα με τη διακήρυξη του Ελσίνκι.

Πίνακας 1

Υπολογισμός ενεργότητας νόσου σε ασθενείς με Νόσο Crohn (CDAI score)

Κλινικοεργαστηριακές παράμετροι		βαρύτητα	
Αριθμός μαλακών κενώσεων κάθε μέρα για 1 εβδομάδα		Χ 2	
Κοιλιακό άλγος (κλίμακα 0 – 3) κάθε μέρα για 1 εβδομάδα		Χ 5	
Γενική κατάσταση (κλίμακα 0 – 4) κάθε μέρα για 1 εβδομάδα		Χ 7	
Επιπλοκές νόσου	Αρθραλγίες ή αρθρίτιδα	+1	Χ 20
	Ιριδίτιδα ή ραγοειδίτιδα	+1	
	Γαγγραινώδες πυόδερμα , αφθώδη έλκη, οζώδες ερύθημα	+1	
	Ραγάδες, συρρίγγια ή αποστήματα στο ορθό	+1	
	Συρρίγγια (εκτός από το ορθό	+1	
	Θερμοκρασία > 37.8 °C την τελευταία εβδομάδα	+1	
Χρήση αντιδιαρροικών φαρμακών (ή οπιοειδών)		Χ 30	
Παρουσία ψηλαφητής μάζας στην κοιλιά (0 απύουσα, 2 αμφίβολο, 5 παρούσα		Χ 10	
Απόκλιση αιματοκρίτη από τις φυσιολογικές τιμές (47% για άνδρες, 42% για γυναίκες)		Χ 6	
Ποσοστιαία απόκλιση από το σύνηθες σωματικό βάρος		Χ 1	

Η νόσος θεωρείται σε ύφεση αν ο δείκτης ενεργότητας νόσου είναι μικρότερος από 150.

Έξαρση της νόσου έχουμε σε CDAI score μεγαλύτερο από 400 (309)

Πίνακας 2

Χαρακτηριστικά των ασθενών με Νόσο Crohn και Ελκώδη Κολίτιδα που συμπεριλάβαμε στην μελέτη.

	Ulcerative Colitis	Crohn's Disease
Number (n)	22	20
Gender (male)	15	7
First Diagnosis	6	6
Active (mean disease activity)	16 (7.8)	16 (243)
Exacerbation of colitis	14	14
Mean Disease Duration (years)	7	7.1
Disease Localization		
Left sided colitis	16	
Pancolitis	6	
Colon		14
Colon + Ileum		6
Treatment		
None	6	6
Topical steroids	10	6
Oral steroids	4	8
5-ASA	6	8
Azathioprine	6	3
Infliximab (anti-TNF)	2	7

3.1.1. Απομόνωση λεμφοκυττάρων από το περιφερικό αίμα ασθενών και υγιών μαρτύρων

Προκειμένου να ληφθεί ο πληθυσμός αναφοράς, τα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος, το δείγμα επιστοιβάζονταν σε Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich) και προχωρούσαμε σε φυγοκέντρηση για 30 λεπτά σε 400g σε θερμοκρασία δωματίου. Το Histopaque-1077 λόγω πυκνότητας (1.077gr/cm³), προκαλεί καθίζηση των ερυθροκυττάρων και κοκκιοκυττάρων στον πυθμένα του σωληναρίου ενώ τα λεμφομονοπύρηννα (λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα και σπάνια δενδριτικά) βρίσκονται μεταξύ Histopaque-1077 και πλάσματος. Στο επόμενο βήμα, η στοιβάδα των λεμφομονοπύρηννων συλλέχθηκε με πιπέτα Pauster και επαναδιαλύθηκε σε 20 ml θρεπτικού υλικού IMDM 340.

3.1.2. Μέτρηση λεμφομονοπύρηνων περιφερικού αίματος

Προκειμένου να μετρήσουμε τον πληθυσμό των λεμφομονοπύρηνων που απομονώθηκαν, 15μl αναμιγνύονταν με την ίδια ποσότητα χρωστικής Trypan Blue. Κατόπιν 10 μl από το μίγμα εισάγονταν σε πλάκα Neubauer. Μετά από αναμονή 5 λεπτών, προσδιορίζονταν σε οπτικό μικροσκόπιο ο αριθμός των κυττάρων που περιέχονταν στο κεντρικό τετράγωνο της πλάκας Neubauer. Με τη μέθοδο αυτή εκτιμούνται και η βιωσιμότητα των κυττάρων που απομονώθηκαν καθώς με μπλε χρώμα βάφονταν τα νεκρά και αποπτωτικά κύτταρα. Με πολλαπλασιασμό των μετρούμενων κυττάρων από την πλάκα Neubauer επί 2 και επί 10^4 προέκυπτε η συγκέντρωση των κυττάρων στο μετρούμενο δείγμα καθώς το εμβαδόν του κεντρικού τετραγώνου της πλάκας Neubauer είναι 1mm^2 και το βάθος κάτω από την καλυπτρίδα 1 mm.

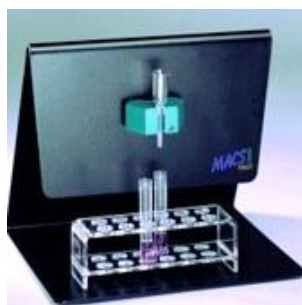
3.2 Μέθοδοι

3.2.1. Απομόνωση CD3+ κυττάρων με ανοσομαγνητικό διαχωρισμό

Προκειμένου να ληφθεί κεκαθαρισμένος πληθυσμός CD3+ κυττάρων από τα απομονωμένα λεμφομονοπύρηνια προχωρήσαμε σε ανοσομαγνητικό διαχωρισμό (MACS isolate on kit, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch, Gladbach, Germany) (εικόνα 1). Η μέθοδος έχει ως εξής: 10^7 απομονωμένα λεμφομονοπύρηνια επωάζονταν για 45 λεπτά σε πάγο με διάλυμα ειδικών μικροσφαιριδίων (100μl) με μαγνητικές ιδιότητες (microbeads). Τα σφαιρίδια αυτά ήταν συνδεδεμένα με αντι-CD3+ μονοκλωνικό αντίσωμα. Για να αποφύγουμε την μη ειδική πρόσδεση, μέσω Fc-υποδοχέα κύτταρα, αντι-CD3+ σφαιριδίων στην επιφάνεια των κυττάρων, το δείγμα μας επωάζονταν για 10 λεπτά με 100μl διαλύματος ανθρώπινης IgG, πριν την έναρξη της διαδικασίας του ανοσομαγνητικού διαχωρισμού. Μετά την επώαση με τα μαγνητικά σφαιρίδια τα κύτταρα πλένονταν με διάλυμα PBS/EDTA 2mM (Phosphate buffered saline), φυγοκεντρούνταν στις 1600 στροφές (rpm) για 5 λεπτά και απορρίπτονταν το υπερκείμενο του διαλύματος. Το εναιώρημα των κυττάρων που απέμεινε φέρονταν στη στήλη διαχωρισμού η οποία βρισκόταν προσαρμοσμένη σε μόνιμο μαγνητικό πεδίο του συστήματος διαχωρισμού (separator). Η στήλη πριν την έναρξη της διαδικασίας πλένονταν με PBS/EDTA 2mM. Τα σεσημασμένα με CD3+ microbeads κύτταρα συγκρατούνταν στη στήλη λόγω του μαγνητικού πεδίου, ενώ τα CD3- κύτταρα περνούσαν διαμέσου αυτής. Στο επόμενο βήμα η στήλη πλένονταν 3 φορές με 500 μl διαλύματος PBS/EDTA 2mM και απομακρύνονταν από το σύστημα διαχωρισμού προκειμένου να

τοποθετηθούν σε στείρο σωληνάριο. Ακολουθούσε νέα έκπλυση της στήλης με 1000μl διαλύματος PBS/EDTA και με τη βοήθεια κατάλληλου εμβόλου ακολουθούσε έκλουση των εναπομείναντων CD3⁺ στο στείρο σωληνάριο. Η καθαρότητα του πληθυσμού που απομονώνονταν προσδιορίζονταν με κυτταρομετρία ροής με στόχο καθαρότητα πληθυσμού μεγαλύτερη από 95%. Ένα μέρος αυτών των CD3⁺ κυττάρων υποβάλλονταν σε κυτταρομετρία ροής και ο υπόλοιπος πληθυσμός τοποθετούνταν σε Trizol προς απομόνωση RNA.

Εικόνα 1. MiniMacs separator



3.2.2. Ανοσοφαινοτυπική ανάλυση CD3 T λεμφοκυττάρων.

Για την εκτίμηση της έκφρασης των μορίων CCR3 και CXCR3 στο κλάσμα των CD3⁺ λεμφοκυττάρων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Αναλυτικότερα, 10⁵ ανοσομαγνητικά διαχωρισθέντα CD3⁺ επωάζονταν αρχικά με 40μl γ-HAG για 10 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η γ-HAG προσδέεται στους Fc υποδοχείς των κυττάρων μειώνει την πιθανότητα μη-ειδικού φθορισμού. Εν συνεχεία τα κύτταρα σημαίνονταν με συζευγμένο με φυκοερυθρίνη (phycoerythrin, PE) αντι-CD3 μονοκλωνικό αντίσωμα (Mab) (QBEND-10; Immunotech, Marseille, France) και είτε με συζευγμένο με ισοθειοκυανική φλουοροσκεΐνη (fluorescein isothiocyanate, FITC) αντι-CCR3 (clone 61828.111, R&D Systems Inc.), είτε με συζευγμένο με σύμπλοκο φυκοερυθρίνης-Cy5 (phycoerythrin-Cy5, PE-Cy5) αντι-CXCR3 (Clone 1C6; BD Pharmingen, San Diego, CA, USA. Συζευγμένα με PE- και FITC IgG ισοτυπικά controls χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικά controls. Μετά από 30-45 λεπτά επώαση στον πάγο, τα κύτταρα πλένονταν 2 φορές με διάλυμα PBS/ 1% FCS (Fetal Calf Serum, Gibco)/ 0.05% θειικό αζίδιο και εν συνεχεία μονιμοποιούνταν σε 200μ L διαλύματος 2% paraformaldehyde (Sigma). Τα δείγματα αναλύονταν σε Epics Elite κυτταρομετρητή ροής (Coulter, Miami FL) εντός 30 λεπτών από

τη μονιμοποίησή τους. Η ανάλυση έγινε επί 50,000 κυττάρων (events) και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστό CCR3⁺ και CXCR3⁺ κυττάρων στα CD3⁺ κύτταρα.

Για την εκτίμηση της ενδοκυττάριας έκφρασης του CXCR3 χρησιμοποιήθηκε το IntraPrep intracellular staining kit (Beckman Coulter), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αναλυτικότερα, 10⁵ ανοσομαγνητικά διαχωρισθέντα CD3⁺ επώαζονταν με 100μl από το αντιδραστήριο 1 (fixation) για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως προστίθενταν 4ml PBS/ 1% FCS (Fetal Calf Serum, Gibco)/ 0.05% θειικό αζίδιο και τα κύτταρα φυγοκεντρούνταν για 5 min στις 300 x g σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Μετά την απόρριψη του υπερκειμένου και την ανασύσταση του δείγματος προσθέτονταν 100μl του αντιδραστήριου 2 (permeabilization) και ακολουθούσε επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 15 min. Εν συνεχεία τα κύτταρα σημαίνονταν με αντι-CD3 μονοκλωνικό αντίσωμα (Mab) (QBEND-10; Immunotech, Marseille, France) και με συζευγμένο με σύμπλοκο φυκοερυθρίνης-Cy5 (phycoerythrin-Cy5, PE-Cy5) αντι-CXCR3 (Clone 1C6; BD Pharmingen, San Diego, CA, USA. Συζευγμένα με PE- και FITC IgG ισοτυπικά controls χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικά controls. Μετά από 30-45 λεπτά επώαση στον πάγο, τα κύτταρα πλένονταν 2 φορές με διάλυμα PBS/ 1% FCS (Fetal Calf Serum, Gibco)/ 0.05% θειικό αζίδιο και ακολούθως μονιμοποιούνταν σε 200μ L διαλύματος 2% paraformaldehyde (Sigma). Τα δείγματα αναλύονταν σε Epics Elite κυτταρομετρητή ροής (Coulter, Miami FL) εντός 30 λεπτών από τη μονιμοποίησή τους. Η ανάλυση έγινε επί 50,000 κυττάρων (events) και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστό CCR3⁺ και CXCR3⁺ κυττάρων στα CD3⁺ κύτταρα.

3.2.3.Βιοψίες κολονικού επιθηλίου και ομογενοποίηση ιστού

Μετά τη λήψη των βιοψιών κολονικού επιθηλίου ασθενών και υγιών μαρτύρων έγινε άμεση ψύξη του ιστού με τοποθέτηση του σε υγρό άζωτο. Κατόπιν ο ιστός αποθηκεύονταν σε ψυγεία των -80°C έως ότου προχωρούσαμε στην επεξεργασία του, διάστημα που δεν υπερέβαινε τις 2 εβδομάδες. Ακολουθούσε ομογενοποίηση του ιστού προς απομόνωση RNA και πρωτεϊνών. Η μέθοδος έχει ως εξής: Η φυγόκεντρος τοποθετείται στους 4 °C και η όλη διαδικασία πραγματοποιούνταν μέσα στη hood, σε πάγο και με χρήση αποστειρωμένων υλικών (tips, pastettes, eppendorfs). Φέρνουμε το δείγμα από τους -80°C στον πάγο. Τοποθετούμε τον ιστό στον ομογενοποιητή μαζί με 1ml TRIzol®. Ομογενοποιούμε με απαλές κινήσεις και στη συνέχεια ανακατεύουμε μερικά λεπτά με παστέτα. Μεταφέρουμε το περιεχόμενο σε αποστειρωμένο μικροσωληνάριο (eppendorf) και φυγοκεντρούμε στα 12000

g για 10 min στους 4 βαθμούς. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο σημειωμένο eppendorf. Το δείγμα παραμένει για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και αποθηκεύεται στους -80°C .

Στην περίπτωση που προβαίναμε σε απομόνωση πρωτεΐνης από τις βιοψίες κολονικού επιθηλίου, ο ιστός ομογενοποιούνταν με 2ml LYSIS BUFFER (960 μl LYSIS BUFFER και 40 μl Protein Inhibitor). Κατόπιν με παστέτα μεταφέρονταν το ομογενοποίημα σε 2 eppendorf. Το επόμενο βήμα ήταν vortex και φυγοκέντρηση στα 1700g, 7min, 4°C . Το υπερκείμενο μεταφέρονταν σε νέα eppendorf, τα οποία αποθηκεύονταν στους -80°C .

3.2.4.Απομόνωση RNA

Το δείγμα μεταφέρονταν από τους -80°C σε θερμοκρασία δωματίου για να ξεπαγώσει. Η όλη διαδικασία πραγματοποιούνταν σε RNASE free περιοχή. Για την απομόνωση RNA ακολουθήσαμε τα εξής βήματα:

A. Κατακρήμιση DNA και πρωτεϊνών

Στο ομογενοποιημένο δείγμα τοποθετούμε 0.2 ml χλωροφόρμιο. Η διαδικασία γίνεται σε hood με ανοιχτό τον απορροφητήρα γιατί το χλωροφόρμιο είναι πτητικό. Αναδεύουμε με Vortex για 15sec και αφήνουμε το δείγμα για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια φυγοκεντρούμε στις 12000g, για 15 λεπτά, σε ψυχωμένη φυγόκεντρο (4°C). Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης το DNA και οι πρωτεΐνες κατακρημνίζονται στο μικροσωληνάριο με τη φαινόλη, ενώ το RNA παραμένει διαλυμένο στο χλωροφόρμιο, σχηματίζοντας μια άχρωμη υπερκείμενη στοιβάδα η οποία και μεταφέρεται σε νέο (RNase-Free) μικροσωληνάριο. Προσθέτουμε 0,5 ml ισοπροπανόλη για κάθε 1 ml trizol και αναδεύουμε (Vortex) για 15 sec.

B. RNA extraction

Ακολουθεί φυγοκέντριση σε 12000g για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C , μετά από την οποία είναι ορατός ο σχηματισμός ιζήματος (πελέτας) στον πυθμένα του eppendorf. Το υπερκείμενο απομακρύνεται προσεκτικά παρακολουθώντας πάντα την πελέτα η οποία πρέπει να μην αναρροφηθεί. Ακολουθεί έκπλυση με 1ml (4°C) αιθανόλης 75% (κ.ο.) σε RNase Free H_2O . Σε αυτό το στάδιο το δείγμα το οποίο πλέον θεωρείται RNA, μπορεί να αποθηκευτεί στους -80°C ή να προχωρήσουμε χωρίς διακοπή στο επόμενο βήμα. Το επόμενο βήμα είναι η επαναδιάλυση της πελέτας με ισχυρή ανάδευση και η φυγοκέντρηση σε 7500g, για 5 min στους 4°C . Η διαδικασία επαναλαμβάνεται με αφαίρεση του

υπερκείμενου, προσθήκη 1ml αιθανόλης και φυγοκέντρηση 7500g, 5 min, 4°C. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε πάλι 1ml αιθανόλης αφήνοντας την πελέτα να στεγνώσει μέσα στην hood για 1 ώρα εκτός πάγου. Τέλος, επαναδιαλύουμε την πελέτα με RNase free νερό ανάλογα με το μέγεθός της (Για τα Caco-2 κύτταρα 40 μl, για τα HT-29 κύτταρα 50 μl, 20μl για τους ιστούς) και αναδεύουμε στη φυγόκεντρο ώστε να επαναφέρουμε το RNA στον πυθμένα του eppendorf.

Γ. Μέτρηση καθαρότητας RNA

Ακολουθεί η μέτρηση καθαρότητας του RNA στο δείγμα με τη χρήση φωτόμετρου το οποίο έχει ρυθμιστεί να μετρά σε δύο μήκη κύματος τα 260 και 280nm δίνοντάς μας το λόγο τους. Ο λόγος αυτός προσδιορίζει την περιεκτικότητα του δείγματος σε RNA (260nm) και πρωτεΐνης (280nm). Ιδανική τιμή θεωρείται ο λόγος 2. Από το δείγμα διαλύονται 2 μl RNA σε 0.1M NaOH. Η απορρόφηση του δείγματος μετράται και το αποτέλεσμα αντιστοιχίζεται στον ακόλουθο μαθηματικό τύπο υπολογισμού του βάρους του RNA:

$$\text{RNA } (\mu\text{g}) = A_{260\text{nm}} \times \Phi \times V$$

Όπου:

$A_{260\text{nm}}$ η απορρόφηση του δείγματος στα 260nm

Φ ο συντελεστής αραίωσης ο οποίος είναι 500 (2μl δείγματος σε 1000μl NaOH)]

V ο όγκος του εναπομείναντος διαλύματος RNA σε ml

Δ. Επίδραση με DNAση

Ακολουθεί η επεξεργασία με DNase για την αποδόμηση του DNA που εμπεριέχεται στο δείγμα. Η μέθοδος αυξάνει περαιτέρω την αξιοπιστία των πειραμάτων μας. Πάραυτα οι primers που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματά μας επιλέγηκαν ώστε να πιάνουν μόνο RNA. Σε προσημειωμένα microtubes όγκου 200μl (microeppendorfs), 2 για κάθε δείγμα με την ένδειξη (+) και (-) τα οποία αντιστοιχούν σε προσθήκη ή όχι μεταγραφάσης, εισάγεται όγκος δείγματος που αντιστοιχεί σε 1μg RNA και συμπληρώνεται με RNase Free H₂O έως τα 8μl τελικού όγκου. Σε κάθε δείγμα προστίθενται αρχικά 1μl 10xDNAse I Reaction Buffer και έπειτα 1μl DNase. Τα δείγματα αφήνονται για 15 – 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα προστίθεται επιπλέον 1μl από το διάλυμα 25mM EDTA το οποίο σταματάει την αντίδραση. Ακολουθεί τοποθέτηση των microeppendorfs στο μηχάνημα της PCR οπού υφίστανται θερμική επεξεργασία για 10 λεπτά στους 65°C και τελική θερμοκρασία 4°C. Μετά τη λήξη της θερμικής επεξεργασίας τους τα δείγματα τοποθετούνται σε πάγο (4°C). Ακολουθεί το επόμενο βήμα που είναι η RT (ανάστροφη μεταγραφή).

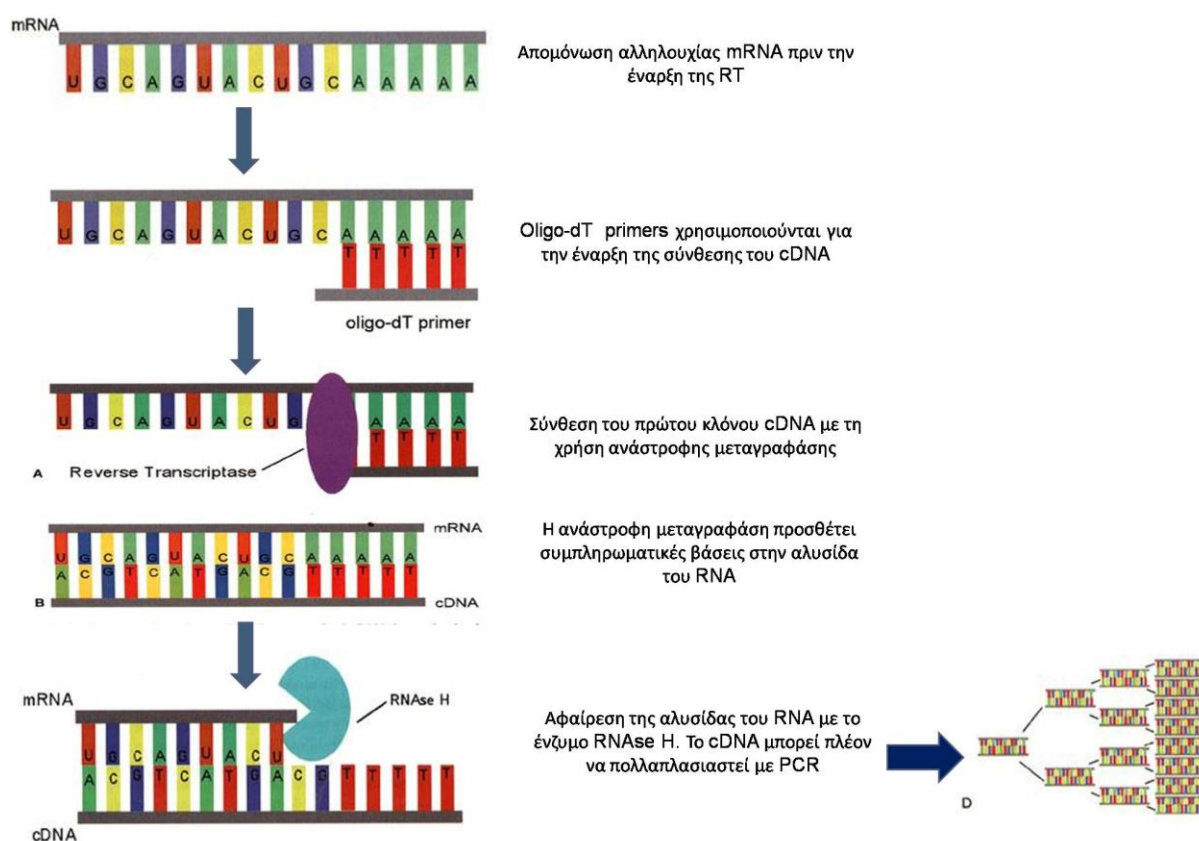
3.2.5. Ανάστροφη μεταγραφή

Σε κάθε δείγμα προσθέτουμε 2μl ολιγονουκλεοτιδίου με 12 έως 18 μόρια Θυμίνης (Pd(T)₁₂₋₁₈) το οποίο βοηθά στην έναρξη της διαδικασίας ανάστροφης μεταγραφής (reverse transcription). Τα μείγματα επανατοποθετούνται στο μηχάνημα της PCR και θερμαίνονται στους 70°C για 10 λεπτά, χρόνος μετά τον οποίον επανατοποθετούνται σε πάγο (4°C). Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνουμε το ξεδίπλωμα των αλύσεων του RNA. Ακολουθεί προσθήκη σε κάθε δείγμα 4μl 5x RT-buffer, 1μl DTT, 1μl dNTPs και 1μl RNAsin. Στα δείγματα με την ένδειξη (+) προστίθεται 1μl ενζύμου superscript (reverse transcriptase), ενώ στα δείγματα (-) προστίθεται ίσος όγκος RNase Free H₂O, ελέγχοντας πιθανή επιμόλυνση των δειγμάτων με DNA. Τα δείγματα τοποθετούνται στο μηχάνημα της PCR και ξεκινά η διαδικασία της ανάστροφης μεταγραφής σε θερμοκρασία 42°C για 60 min, έπειτα στους 95°C για 5 min και τέλος στους 4°C, έως την έναρξη της multiplex PCR. Η ανάστροφη μεταγραφή έχει τελειώσει και τα δείγματα cDNA πλέον μπορούν να φυλαχτούν στους -20°C ή στους -80°C.

3.2.6. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Το επόμενο βήμα είναι ο πολλαπλασιασμός του υπάρχοντος cDNA με σκοπό να μπορέσουμε να ανιχνεύσουμε τα γονίδια που μελετάμε με την προϋπόθεση ότι εκφράζονται στον συγκεκριμένο ιστό. Για τη διαδικασία αυτήν φτιάχνουμε ένα μείγμα σε ποσότητα (v+2) όπου v ο αριθμός των υπό μελέτη δειγμάτων μας από τα εξής υλικά: RNase free water 15.9 μl X (v+2), PCR buffer 10X 2.5 μl X (v+2), Forward primer 2.5 μl X (v+2), Reverse primer 2.5 μl X (v+2), DNTPS (Mg⁺²) 0.5 μl X (v+2), Expand polymerase (taq) 0.125 μl X(v+2) με τελικό όγκο 24 μl/tube. Το μείγμα μοιράζεται σε νέα microependorfs σε καθένα εκ των οποίων προστίθεται 1 μl δείγματος (+) ή (-) ή Control cDNA σε θερμοκρασία 4°C (τελικός όγκος 25 μl). Στο μηχάνημα της PCR επιλέγουμε κύκλους και θερμοκρασία ανάλογα με την θερμοκρασία τήξης (annealing temperature) των primers (μέσος όρος αν πρόκειται για multiplex PCR). Ακολουθεί συντήρηση των προϊόντων στους 4°C ως την ανίχνευσή τους σε πήκτωμα (gel) αγαρόζης.

Εικόνα 2. Σχηματική αναπαράσταση RT-PCR



3.2.7. Παρασκευή gel αγαρόζης

Παρασκευάζεται 2% (κ.β.) gel αγαρόζης σε 0,5x TBE (2g αγαρόζης σε 100ml). Το TBE 0.5X παρασκευάζεται από stock TBE 5 X (1lt) που αποτελείται από 1lt water for injection, 54g Tris Base 27.5gr Boric Acid και 20ml EDTA 0.5M, pH=8. Το μείγμα τοποθετείται σε φούρνο μικροκυμάτων για να επιτευχθεί η ομοιογενής διάλυσή του και προ της έγχυσης στο ειδικό δοχείο πήξεως (με χτένι)(gel casting unit) και εφόσον έχει κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθενται 40μl διαλύματος ethidium bromide (1mg/ml). Μετά την πήξη του, αφαιρείται από το πήκτωμα το χτένι, έχοντας σχηματίσει βοθρία / θέσεις όπου θα εισέλθουν τα δείγματα προς διερεύνηση, και το σύστημα τοποθετείται στη συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης. Παράλληλα, ετοιμάζεται DNA ladder (100bp) ως εξής: 1μl από το stock διάλυμα 100bp ladder (Gibco) με 7μl 1 x TBE και 3μl διαλύματος ανάμειξης δείγματος (μπλε χρωστική).

Σε καθένα εκ των προϊόντων της Multiplex PCR προστίθεται διάλυμα ανάμειξης δείγματος σε αναλογία 5:1 και 10μl από το καθένα εισέρχεται στο βοθρίο που έχει σχηματιστεί από το χτένι στο πήκτωμα της αγαρόζης. Το gel ηλεκτροφορείται σε 0.5x TBE στα 100V για 90 min. Η ανίχνευση των δεσμών γονιδιακού σήματος (bands) είναι εφικτή υπό υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Σε αυτό το σημείο το πήκτωμα φωτογραφίζεται ηλεκτρονικά και οι δέσμες συγκρίνονται με τη βοήθεια του DNA ladder. Κατόπιν ανίχνευσης των προϊόντων της Multiplex PCR σε gel αγαρόζης, η έκφραση των γονιδίων ποσοτικοποιήθηκε σε μονάδες οπτικής πυκνότητας με την χρήση συστήματος ψηφιακής φωτογράφισης (Gel-doc 2000™, BioRad, Hercules, CA, USA) και ανάλυσης (Quantiscan™, Biosoft, Cambridge, UK) – ο λόγος της έκφρασης του γονιδίου προς την έκφραση του GAPDH. Οι αλληλουχίες των primers που χρησιμοποιήθηκαν για τις multiplex RT-PCR παρουσιάζονται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3. Αλληλουχίες των primers που χρησιμοποιήθηκαν στις RT-PCR

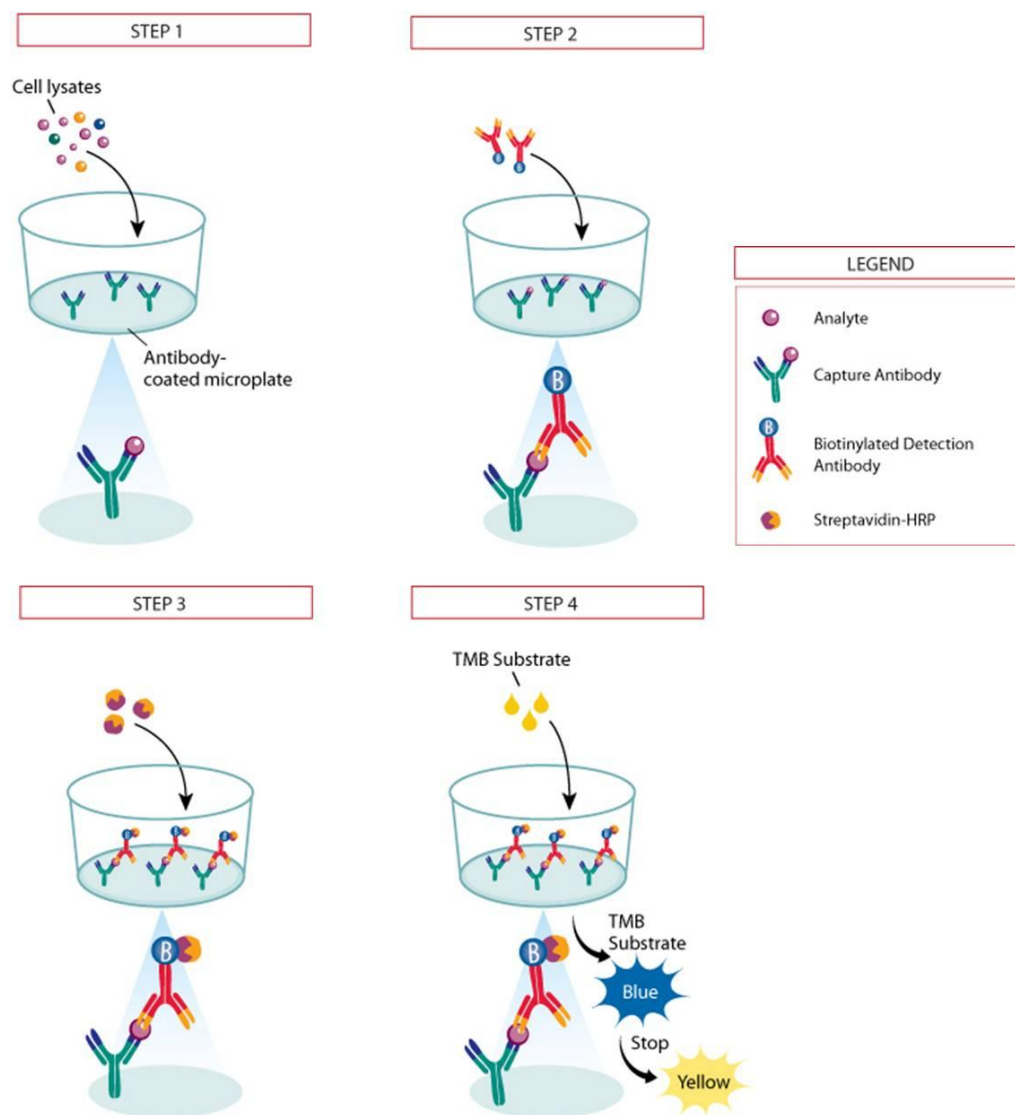
Gene	Primers	Product size
CCL1	Sense: 5'-GGAAGATGTGGACAGCAAGAGC-3' Antisense: 5'-TGTAGGGCTGGTAGTTTTCGG-3'	309 bp
CCR8	Sense: 5'-AGCTCTCCCTAGGCATTTGT-3' Antisense: 5'-ATCAGGTTGGTGCTCATTGT-3'	293 bp
CCL11	Sense: 5'-CCCAACCACCTGCCTGCTTTAACCTG-3' Antisense: 5'-TGGCTTTGGAGTTGGAGATTTTGG-3'	208 bp
CCL24	Sense: 5'-GGAGTGGGTCCAGAGGTACA-3' Antisense: 5'-TTAGCAGGTGGTTTGGTTGC-3'	124 bp
CCL26	Sense: 5'-GCCTGATTTGCAGCATCATGATGG-3' Antisense: 5'-CGGATGACAATTCAGCTGAGTCAC-3'	320 bp
CCR3	Sense: 5'-TGGCGGTGTTTTTCATTTTC-3' Antisense: 5'-CCGGCTCTGCTGTGGAT-3'	315 bp
GAPDH	Sense: 5'-CAACGGATTTGGTCGTATTG-3' Antisense: 5'-GATGACAAGCTTCCC GTTCT-3'	184 bp
CXCL9	Sense: 5'-CTCTTTCCTGGCTACTCCAT-3' Antisense: 5'-TCTCGGTGGCTATCTTGTTA-3'	354 bp
CXCL10	Sense: 5'-CTGAAAGCAGTTAGCAAGGA-3' Antisense: 5'-TATTTGAAGCAGGGTCAGAA-3'	330 bp
CXCL11	Sense: 5'-TTTCAGATGCCCTTTTCCAG-3' Antisense: 5'-CAAACATGAGTGTGAAGGGC-3'	322 bp
CXCR3 (Full size)	Sense: 5'-CTCCACCTAGCTGTAGCAGA-3' Antisense: 5'-AGGAAGATGAAGTCTGGGAG-3'	293 bp
CXCR3 (Full size)	Sense: 5'-CCAAGTGCTAAATGACGCCG-3' Antisense: 5'-CAAAGGCCACCACGACCACCACCA-3'	770 bp
CXCR3 (Spliced variant)	Sense: 5'-CCAAGTGCTAAATGACGCCG-3' Antisense: 5'-CTCCCGGAACCTTGACCCCTGTG-3'	622 bp
CXCL14	Sense: 5'-GAAAAACCTCAGAAGGGAAA-3' Antisense: 5'-AATGAAATGTGTCCACCAAG-3'	390 bp
CCL17	Sense: 5'-TGGCAAACCTGCCATCATTTA-3' Antisense: 5'-AACTAGCAGTCAGGAATTTGCC-3'	178 bp
CCR4	Sense: 5'-GAAGAAGAACAAGGCGGTGAAGAT-3' Antisense: 5'-ATGGTGGACTGCGTGTAAGATGAG-3'	351 bp
CCL25	Sense: 5'-GGATGCTCGAAATAAGGTTT Antisense: 5'-CGGTTTTATCGGAGAAAGAT	245 bp
CCR9	Sense: 5'-AGGGGTCTTCTCTGAGGTGC-3' Antisense: 5'-TCAAGAGCCAATCAACAGCC-3'	210 bp

3.2.8.Ανοσοενζυματική μέθοδος ELISA

Προκειμένου να μελετήσουμε την παραγωγή χημειοκινών από τον ορό ασθενών και υγιών μαρτύρων καθώς και από τα υπερκείμενα κυτταροκαλλιέργειών χρησιμοποιήσαμε εμπορικά διαθέσιμες ανοσοενζυματικές μεθόδους ELISA (DuoSet ELISA Development kit) σύμφωνα με τις οδηγίες της παρασκευάστριας εταιρείας (R&D systems, Mineapolis, USA). Πρόκειται για μια οικονομική λύση αντί των έτοιμων kit ELISA, η οποία δίνει τη δυνατότητα ελέγχου περισσότερων από 288 (96 microplates x3) δειγμάτων. Περιληπτικά, η μέθοδος έχει ως εξής (εικόνα 4):

Εικόνα 4

Στην εικόνα παρουσιάζονται τα στάδια της μεθόδου.



Capture Antibody: αντίσωμα δεσμευμένο στα μικροβοθρία, Analyte: πρωτεΐνη στόχος ανίχνευσης, Biotinylated Detection Antibody: πολυκλωνικό αντίσωμα που στρέφεται έναντι

της πρωτεΐνης αντίδρασης, streptavidin-HRP: αντίσωμα συνδεδεμένο με ένζυμο HRP, TMB(Tetramethylbenzidine) Substrate: υπόστρωμα ενζύμου

Σε βοθρία πλάκας ELISA 96 θέσεων, στον πυθμένα των οποίων υπήρχε σταθερά προσκολλημένο μονοκλωνικό αντίσωμα για τις υπό μελέτη χημειοκίνες, προστέθηκαν τα υπό εξέταση υπερκείμενα και πρότυπα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης των χημειοκινών. Πιο συγκεκριμένα στα μικροβοθρία της πρότυπης καμπύλης και των δειγμάτων προστέθηκαν 100 και 80 μl διαλύτη (sample diluent) αντίστοιχα, όπως επίσης και 100 μl διαλύματος γνωστής συγκέντρωσης των χημειοκινών και 80 μl των υπό εξέταση δειγμάτων. Η πλάκα καλύφθηκε με αυτοκόλλητη ταινία, ανακινήθηκε ελαφρά για την ανάμειξη των δειγμάτων και τοποθετήθηκε σε οριζόντιο αναδευτήρα (shaker) στις 100 rpm. Ακολούθησε επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, οπότε οι υπό εξέταση χημειοκίνες προσδέθηκαν στο αντίσωμα που βρίσκονταν στον πυθμένα του βοθρίου.

Στο επόμενο στάδιο αναρροφήθηκε το περιεχόμενο των μικροβοθρίων και προστέθηκαν 400 μl διαλύματος πλύσης (wash buffer PBS 1% Tween 20) με τη βοήθεια ειδικού μηχανήματος. Η διαδικασία αναρρόφησης προσθήκης wash buffer επαναλήφθηκε άλλες δύο φορές. Ακολούθως στα βοθρία προστέθηκαν 150 μl πολυκλωνικού αντισώματος έναντι των χημειοκινών, το οποίο ήταν συνδεδεμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση (HRP, horseradish peroxidase). Η πλάκα καλύφθηκε με αυτοκόλλητη ταινία, ανακινήθηκε ελαφρά για την ανάμειξη των δειγμάτων και τοποθετήθηκε σε οριζόντιο αναδευτήρα (shaker) στις 100 rpm. Κατά τη διάρκεια της 2ωρης επώασης που ακολούθησε, το σύμπλεγμα αντισώματος-ενζύμου συνδέθηκε στο προσκολλημένο .

Μετά την ολοκλήρωση της επώασης έγινε αναρρόφηση του περιεχομένου των μικροβοθρίων και πλύσιμο με 400 μl διαλύματος πλύσης (wash buffer PBS 1% Tween 20) με τη βοήθεια ειδικού μηχανήματος. Η διαδικασία αναρρόφησης προσθήκης wash buffer επαναλήφθηκε άλλες δύο φορές. Στα βοθρία προστέθηκαν 100 μl διαλύματος TMB substrate solution το οποίο αποτελείται από το υπόστρωμα του ενζύμου (hydrogen peroxide) μαζί με χρωμογόνο (tetramethylbenzidine) που οξειδώνονταν κατά τη διάρκεια της αντίδρασης δημιουργώντας μπλε χρώμα.

Η αντίδραση διακόπηκε μετά από 10 λεπτά με την προσθήκη 100 μl stop solution, (phosphoric acid 1M) γεγονός που προκάλεσε την αλλαγή του χρώματος από μπλε σε κίτρινο. Η ένταση του κίτρινου χρώματος ήταν ευθέως ανάλογη με το ποσό του ενζύμου που ήταν συνδεδεμένο στο αντίσωμα, το οποίο με τη σειρά του ήταν ευθέως ανάλογο με το ποσό της χημειοκίνης στα υπό εξέταση υπερκείμενα, ή στο πρότυπο διάλυμα.

Στη συνέχεια μετρήθηκε άμεσα η οπτική απορρόφηση σε κάθε ένα βοθρίο σε φωτόμετρο. Η μέτρηση έγινε σε μήκος κύματος 450 nm με διόρθωση στα 610 nm και σχεδιάστηκε η καμπύλη αναφοράς, με βάση τις τιμές απορρόφησης των πρότυπων διαλυμάτων. Η συγκέντρωση των χημειοκινών στα υπό εξέταση δείγματα προσδιορίστηκε εισάγοντας τις απορροφήσεις στην εξίσωση της καμπύλης αναφοράς. Με τη μέθοδο αυτή μετρήθηκαν οι ακόλουθες χημειοκίνες: CXCL11/I-TAC (Catalog Number: DY672), CXCL9/MIG (Catalog Number: DY392), CXCL10/IP-10 (Catalog Number: DY266), CCL11/Eotaxin (Catalog Number: DY320), CCL24/Eotaxin-2 (Catalog Number: DY343), CCL26/Eotaxin-3 (Catalog Number: DY346).

3.3. Κυτταροκαλλιέργειες

Για τα *in vitro* πειράματά μας έγιναν επιδράσεις στις ανθρώπινες καρκινικές κολονικές κυτταρικές σειρές HT-29 και Caco-2 αγορασμένες από την European Collection of Cell Cultures (ECACC, Porton Down, Wiltshire UK). Οι κυτταροσειρές αυτές διατηρούνται σε συνεχή καλλιέργεια στο Εργαστήριο Γαστρεντερολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Τα κύτταρα HT-29 αποτελούν επιθηλιακά κύτταρα του παχέος εντέρου τα οποία παράγουν IgA, και το καρκινοεμβρικό αντιγόνο (CEA). Έχουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά με τα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα του παχέος εντέρου παρά το γεγονός ότι προέρχονται από αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου grade II. Τα Caco-2 κύτταρα προέρχονται επίσης από αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου, πάραυτα υπό συγκεκριμένες συνθήκες καλλιέργειας πολώνονται και εμφανίζουν μορφολογικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά εντεροκυττάρων λεπτού εντέρου (311). Ένα δεύτερο χαρακτηριστικό των κυττάρων αυτών είναι η διαφοροποίησή τους στα διάφορα εργαστήρια που καλλιεργούνται, γεγονός που καθιστά δύσκολη τη σύγκριση αποτελεσμάτων με αυτά άλλων ερευνητικών ομάδων (312).

Τα κύτταρα HT-29 όσο και τα Caco-2 καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό, McCoy's για τα HT-29 και MEM-a για τα Caco-2, εμπλουτισμένο με 100 U/ml Penicillin/Streptomycin (5ml- 100U/ml /100μg/ml), 0.5 μg/ml fungizone (0,5ml- 2,5mg/ml) και 10% FBS στους 37⁰ C και ατμόσφαιρα CO₂ 5%. Αλλαγή θρεπτικού υλικού γίνεται ανά 3 ημέρες. Για την έκλυση των κυτταρικών καλλιεργειών χρησιμοποιήθηκε (HANKS) HBSS (500ml) με ή χωρίς Ca⁺⁺/ Mg⁺⁺ (1X) + 4.65 ml Sodium Bicarbonate (7,5%) + 2 ml HEPES 1M + Streptomycin/Penicillin (5ml -100U/ml / 100μg/ml) + Fungizone (0,5ml- 2,5mg/ml).

Επιπλέον προκειμένου να μελετήσουμε την έκφραση των υποδοχέων χημειοκινών από τα T λεμφοκύτταρα, χρησιμοποιήσαμε την αθανατοποιημένη λευχαιμική σειρά T λεμφοκυττάρων, Jurkat (χορηγεία εργαστηρίου αιματολογίας).

Τα κύτταρα διατηρούνται επί μακρόν σε υγρό άζωτο και αποψύχονται προκειμένου να καλλιεργηθούν. Τα κύτταρα από τους -80°C μεταφέρονται εντός hood και για 1 min παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια μεταφέρονται στο υδατόλουτρο για 2-3 min μέχρι να ξεπαγώσουν. Στη hood προσθέτουμε 1 ml θρεπτικού υλικού. Ακολουθεί ανάδευση των κυττάρων τα οποία μεταφέρονται σε falcon με 20 ml κατάλληλου θρεπτικού. Στη συνέχεια φυγοκεντρούμε για 7 λεπτά, σε 160 g ,θερμοκρασία δωματίου. Ετοιμάζουμε 2 (ή περισσότερες) φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας (75 cm^2) με 10ml θρεπτικού υλικού στις οποίες αναγράφω την ημερομηνία, το όνομα του ερευνητή, το είδος των κυττάρων και το νούμερο του passage (γενιάς). Μετά την φυγοκέντρηση τα κύτταρα καθιζάνουν στον πυθμένα του falcon, οπότε απορρίπτουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 6 ml θρεπτικού υλικού. Ακολουθεί μηχανική ανάδευση των κυττάρων και μεταφορά τους στον επωαστήρα. Η εκτίμηση της ανάπτυξης των κυττάρων γίνονταν με παρατήρησή τους σε ανάστροφο στερεομικροσκόπιο.

3.3.1. Ανακαλλιέργεια κυττάρων και επιδράσεις

Η ανακαλλιέργεια πραγματοποιείται όταν τα κύτταρα παρουσιάζουν πληρότητα στην επιφάνεια της φλάσκας τουλάχιστον 90%. Όταν τηρούν αυτή τη συνθήκη τα κύτταρα αποσύρονται από τον επωαστήρα και αφαιρείται το θρεπτικό μέσο. Αφού τα κύτταρα ξεπλυθούν με διάλυμα HANKS χωρίς ασβέστιο και μαγνήσιο, προστίθενται 3ml διαλύματος 1x Τρυψίνης/EDTA (Gibco BRL) και μετά από επώασή για 5 λεπτά στους 37°C , τα κύτταρα αποκολλώνται από τον πάτο της φλάσκας. Τα κύτταρα ξεπλένονται από την φλάσκα με θρεπτικό υλικό με ορό το οποίο ταυτόχρονα απενεργοποιεί την τρυψίνη και φυγοκεντρούνται στα 150g για 7-10 λεπτά στους 25°C . Το υπερκείμενο απορρίπτεται και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 10ml θρεπτικού υλικού. Ο αριθμός των ζώντων κυττάρων προσδιοριζόταν με την βοήθεια μικροσκοπίου ορατού φωτός (μεγέθυνση 40X) και η μέτρησή των κυττάρων γινόταν πάνω σε ειδική πλάκα-κυτταρομετρητή Neubauer (Chemocytometer-Neubauer, Hauser Scientific) με την χρήση Trypan-blue για την αναγνώριση των νεκρών κυττάρων.

Και για τις δύο κολονικές κυτταροσειρές χρησιμοποιήθηκαν αρχικές συγκεντρώσεις $2-3 \times 10^4/\text{cm}^2$ σε πλάκες 6 βοθρίων (six well plates) και καλλιεργήθηκαν σε 37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO_2 , σε καλλιεργητικό κλίβανο, μέχρι συνολικής επικάλυψης του κάθε

βοθρίου από τα κύτταρα ώστε να δημιουργείται ένα συνεχές στρώμα επιθηλιακών κυττάρων. Προκειμένου να μελετηθεί η έκφραση και παραγωγή χημειοκινών στα κύτταρα, 24 ώρες πριν την επίδραση απομακρύναμε το θρεπτικό υλικό και προσθέσαμε νέο χωρίς FBS. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάναμε αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στο κάθε πλήρες κυττάρων βοθρίο και ακολουθούσε επίδραση με κυτταροκίνες (100 µg/ml) για 48 ώρες. Τα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιιεργειών συλλέγονταν για μέτρηση πρωτεΐνης με ELISA, ενώ τα κύτταρα συλλέγονταν με TRIzol® για απομόνωση του RNA (RNA extraction). Οι διεγέρσεις των κυτταρικών επιθηλιακών σειρών απεικονίζονται στην εικόνα 5.

Εικόνα 5. Επίδρασεις διαφόρων κυτταροκινών σε κύτταροσειρές προκειμένου να μελετηθεί η επίδρασή τους στην παραγωγή χημειοκινών

CONTROL	IL1α+TNFα+IFNγ (cytomix)	LPS
IL4	IL10	IL13

IL1α+TNFα+IFNγ +IL4	IL1α+TNFα+IFNγ +IL10	IL1α+TNFα+IFNγ +IL13
LPS +IL4	LPS +IL10	LPS +IL13

Συλλογή κυττάρων και υπερκείμενων έγιναν στις 2h, 4h, 6h, 12h, 24h και 48hrs για τα HT-29 και Caco-2 κύτταρα.

Control	IL1α+TNFα+IFNγ	IFNγ
IL1α	TNFα	HT-29 υπερκείμενο διεγερμένα με cytomix

Στην κυτταρική σειρά Jurkat έγινε συλλογή υπερκείμενου και κυττάρων στις 12 και 24 h.

3.4. Υλικά

Το TRIzol, τα ολιγονουκλεοτίδια -Oligo (dT) 12–18 primers, η Superscript II, τα RT buffers και τα dNTPs αγοράστηκαν από την Gibco BRL Life Technologies. Η RNAsin αγοράστηκε από την Promega (Southampton, UK). Τα PCR buffers, η DNase και η expand polymerase αγοράστηκαν από την Roche Molecular Biochemicals (Lewes, Sussex, UK). Τα ολιγονουκλεοτίδια (primers) που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από την εταιρεία Invitrogen. Η RNase αγοράστηκε από την Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Τα καλλιεργητικά υλικά αγοράστηκαν από την Gibco BRL Life Technologies (Paisley, UK) και τα πλαστικά που χρησιμοποιήθηκαν και την Nalge Nunc (Hereford, UK). Το Trizol[®] από τη Gibco BRL (Paisley, UK) όπως και το HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) with / without Ca²⁺, Mg²⁺ και η Penicillin / Streptomycin και το Fetal Bovine Serum (FBS). Τα τρυβλία καλλιεργείας αγοράστηκαν από τη Nalge Nunc (Rochester, New York, USA) και οι πιπέττες καλλιεργείας από τη Corning-Costar (Acton, USA). Στήλες για τον ανοσομαγνητικό διαχωρισμό αγοράστηκαν από τη Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch, Gladbach, Germany), αντισώματα για την κυτταρομετρία ροής από τη QBEND-10; Immunotech, Marseille, France προκειμένου για anti-CD3⁺, από την , R&D Systems προκειμένου για αντι-CCR3 (clone 61828.111, R&D Systems Inc.), και αντι-CXCR3 (Clone 1C6; BD Pharmingen, San Diego, CA). Για τις ELISA, τα DUO SET ELISA kits αγοράστηκαν από τη R&D systems, (Mineapolis, USA) για τις ακόλουθες χημειοκίνες: CXCL11/I-TAC (Catalog Number: DY672), CXCL9/MIG (Catalog Number: DY392), CXCL10/IP-10 (Catalog Number: DY266), CCL11/Eotaxin (Catalog Number: DY320), CCL24/Eotaxin-2 (Catalog Number: DY343), CCL26/Eotaxin-3 (Catalog Number: DY346). Ανθρώπινη ανασυνδιασμένη (rHu) IL-1α (specificity 5 X 10⁷ U/mg), TNF-α (specificity 6 X 10⁷ U/mg) αγοράστηκαν από την R&D Systems (Abingdon, UK). Η rHu IFN-γ (specificity > 2 X 10⁷ U/mg) από τη Roche Diagnostics (Lewes, UK), η rHu IL-4 (specificity > 5 X 10⁶ U/mg), η rHuIL-10 (specificity > 5 X 10⁶ U/mg), και η rHuIL-13 (specificity > 1 X 10⁶ U/mg) από τη Chemicon International (Temecula, CA, USA).

4. Αποτελέσματα

4.1 Αποτελέσματα CXC χημειοκινών

Κατά τη μελέτη των CXC χημειοκινών επικεντρωθήκαμε σε αυτές που εκφράζονται από τα NK και T κύτταρα (πίνακας 1).

Πίνακας 1. Μελετήσαμε τις συνδεόμενες με τον CXCR3 υποδοχέα (CXCL9, 10 και 11) χημειοκίνες.

Ομάδα	Ονομασία	Παλαιότερη ονομασία	Υποδοχέας	Τρόπος έκφρασης	Θέση έκφρασης
CXC					
ELR+	CXCL1	GRO α	CXCR2	Επαγώμενη	Ουδετερόφιλα, ενδοθηλιακά
	CXCL2	GRO β	CXCR2	Επαγώμενη	Ουδετερόφιλα, ενδοθηλιακά
	CXCL3	GRO γ	CXCR2	Επαγώμενη	Ουδετερόφιλα, ενδοθηλιακά
	CXCL5	ENA-78	CXCR2	Επαγώμενη	Ουδετερόφιλα, ενδοθηλιακά
	CXCL6	GCP-2	CXCR1,2	Επαγώμενη	Ουδετερόφιλα, ενδοθηλιακά
	CXCL7	NAP-2	CXCR2	Επαγώμενη	Ουδετερόφιλα, ενδοθηλιακά
	CXCL8	IL-8	CXCR1,2	Επαγώμενη	Βασεόφιλα, ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα, ενδοθηλιακά
ELR-	CXCL4	PF-4	CXCR3B, 3A	Επαγώμενη	Ινοβλάστες, ενδοθηλιακά
	CXCL4L1	PF4-var	CXCR3B, 3A	Επαγώμενη	Άγνωστο
	CXCL9	Mig	CXCR3A,3B	Επαγώμενη	Th1, NK κύτταρα
	CXCL10	IP-10	CXCR3, 3B	Επαγώμενη	Th1, NK κύτταρα
	CXCL11	ITAC	CXCR3,7,3B	Επαγώμενη	Th1, NK κύτταρα
	CXCL12	SDF1	CXCR4	Ομοιοσταπική	Th1, NK κύτταρα
	CXCL13	BCA-1	CXCR3,5	Ομοιοσταπική	B κύτταρα και CD4 + κύτταρα
	CXCL14	BRAK	Άγνωστος	Ομοιοσταπική	Μονοκύτταρα, άωρα δένδρπικά, NK κύτταρα
	CXCL16	SR-PSOX	CXCR6	Ομοιοσταπική	CD8+ και κλάσμα CD4+ κυττάρων, NK κύτταρα

4.1.1 CXCR3- συνδεδεμένες χημειοκίνες(313)

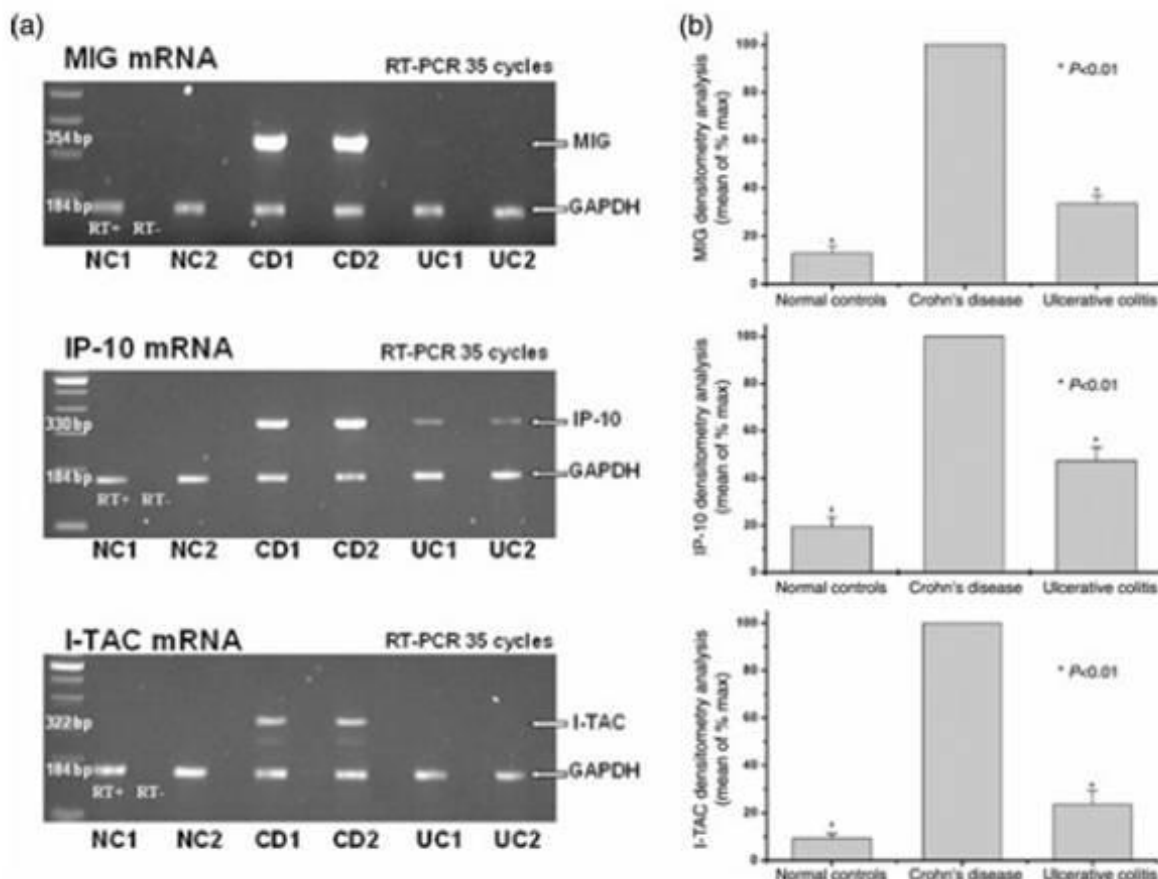
4.1.1.1 Έκφραση των CXCR3 συνδεδεμένων χημειοκινών σε βιοψίες κολονικού επιθηλίου

Μετρήθηκε η έκφραση mRNA των χημειοκινών που συνδέονται με τον CXCR3 υποδοχέα σε βιοψίες παχέος εντέρου των ασθενών αυτών με RT-PCR. Παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της έκφρασης των MIG (CXCL9) και I-TAC (CXCL11) mRNAs στο 85% (17/20) και 75% (15/20) αντίστοιχα των ασθενών με Νόσο Crohn σε αντίθεση με την έκφραση που παρατηρήθηκε σε ασθενείς με Ελκώδη Κολίτιδα όπου ήταν 18% (4/22) και 32% (7/22) αντίστοιχα, και σε υγιείς μάρτυρες όπου τα ποσοστά έκφρασης ήταν 10% (2/20) και για τις δύο χημειοκίνες (**εικόνα 1**). Όσον αφορά την IP-10 (CXCL10) χημειοκίνη, παρουσιάστηκε έκφραση mRNA στο 65% των ασθενών με Νόσο Crohn (13/20), στο 41% αυτών με Ελκώδη Κολίτιδα (9/22) και στο 30% των υγιών μαρτύρων (6/20). Ανάλυση της πυκνότητας του σήματος της RT-PCR αποκάλυψε στατιστικά σημαντική διαφορά του mRNA των MIG, IP-10, και ITAC χημειοκινών στους ασθενείς με Νόσο Crohn σε σύγκριση με αυτούς με Ελκώδη Κολίτιδα και τους υγιείς μάρτυρες. Η έκφραση του mRNA των τριών χημειοκινών ήταν ανεξάρτητη από την ενεργότητα της νόσου, το βαθμό φλεγμονής του κολονικού επιθηλίου και τη θεραπεία (**πίνακας 2**).

Πίνακας 2. Οι διαφορές στην έκφραση του mRNA και της πρωτεΐνης των CXCR3 συνδεδεμένων χημειοκινών και του CXCR3 υποδοχέα δεν ήταν στατιστικά σημαντικές μεταξύ ασθενών που ελάμβαναν ή όχι θεραπεία.

		Crohn's disease			Ulcerative colitis		
		Treated <i>n</i> = 14	Untreated <i>n</i> = 6	Total <i>n</i> = 20	Treated <i>n</i> = 16	Untreated <i>n</i> = 6	Total <i>n</i> = 22
CXCR3	mRNA TV	11/14 78.6%	5/6 83.3%	16/20 80%	8/16 50%	5/6 83%	13/22 60%
	mRNA FS	3/14 21%	1/6 16%	4/20 20%	9/16 56%	5/6 83%	14/22 64%
	Flow cytometry	36.4 ± 12	41.5 ± 10	38 ± 15	26 ± 7	33 ± 6	29 ± 7
CXCL9	mRNA	12/14 86%	5/6 83%	17/20 85%	3/16 19%	1/6 17%	4/22 18%
	Protein	390 ± 22	329 ± 17	368 ± 15	200 ± 14	263 ± 31	232 ± 19
CXCL10	mRNA	10/14 71%	3/6 50%	13/20 65%	5/16 31%	4/6 66%	9/22 41%
	Protein	35 ± 3	36 ± 2	36 ± 2.5	38 ± 3	32 ± 1	35 ± 1.5
CXCL11	mRNA	10/14 71%	5/6 83%	15/20 75%	5/16 31%	2/6 33%	7/22 32%
	Protein	44 ± 10	49 ± 6	46.4 ± 8	21 ± 3	23 ± 1	22 ± 3

Εικόνα 1. Έκφραση του mRNA των τριών CXCR3 συνδεόμενων χημειοκινών σε βιοψίες παχέος εντέρου ασθενών με Νόσο Crohn(CD), Ελκώδη Κολίτιδα(UC) και φυσιολογικών μαρτύρων(NC).



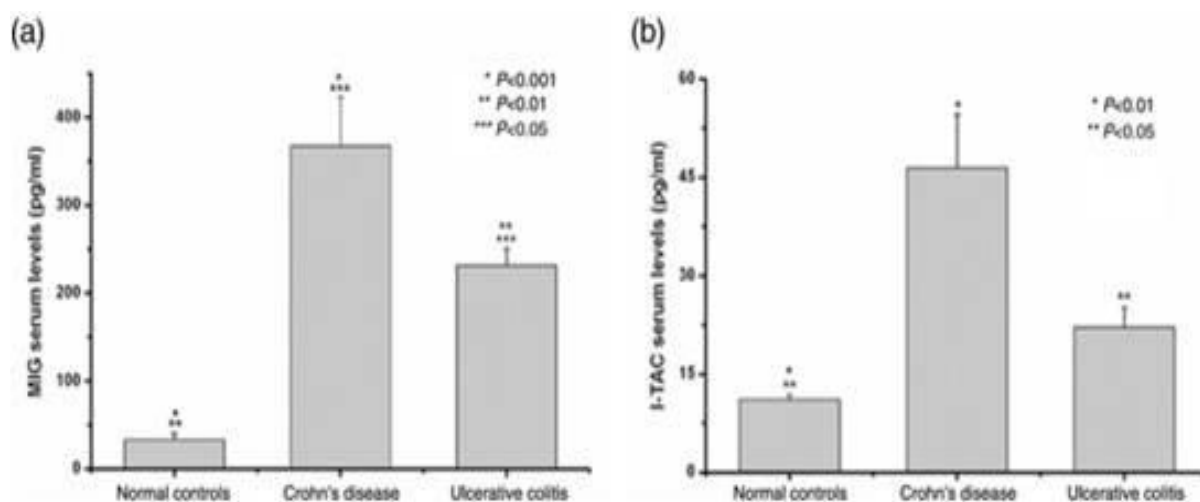
(a) Η εικόνα είναι αντιπροσωπευτική δύο ημιποσοτικών PCR για κάθε ασθενή και κάθε χημειοκίνη(MIG, IP-10, I-TAC) χρησιμοποιώντας για σύγκριση το γονίδιο GAPDH σε 20 ασθενείς με Νόσο Crohn, 22 με Ελκώδη Κολίτιδα και 20 υγιείς μάρτυρες.

(b) Πυκνομετρική ανάλυση των αποτελεσμάτων της ημιποσοτικής PCR για την έκφραση των γονιδίων MIG, IP-10, I-TAC στο κολονικό επιθήλιο ασθενών και υγιών μαρτύρων. Οι μετρήσεις έχουν εκφρασθεί ως ο λόγος της φωταύγειας των χημειοκινών προς αυτή του γονιδίου αναφοράς (GAPDH). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο μέσος όρος \pm στατιστικό σφάλμα (% της μέγιστης έκφρασης), και είναι ενδεικτικά του συνόλου των μετρήσεων. Η στατιστική σημαντικότητα συμβολίζεται ως * για $p < 0.01$. Συνθήκες PCR: 35 κύκλοι, 56°C, 58°C, 54°C για MIG, IP-10 και I-TAC αντίστοιχα και αναλογία γονιδίων 1/1, 1/3, 2/3 για GAPDH/MIG, GAPDH/IP-10, GAPDH/I-TAC αντίστοιχα.

4.1.1.2 Ανίχνευση έκφρασης CXCR3 συνδεδεμένων χημειοκινών στον ορό ασθενών με ELISA

Τα επίπεδα των τριών CXC χημειοκινών μετρήθηκαν στον ορό των παραπάνω ασθενών με ELISA. Τα επίπεδα των χημειοκινών MIG και I-TAC, ακολούθησαν το ίδιο μοτίβο έκφρασης με το mRNA στο κολονικό επιθήλιο. Η πρωτεΐνη MIG βρέθηκε σημαντικά αυξημένη σε ασθενείς με Νόσο Crohn και Ελκώδη Κολίτιδα (367.84 pg/mL, n=20 και 231.85 pg/mL, n=22 αντίστοιχα) σε σχέση με τους μάρτυρες (33.3pg/mL, n=20). Τα αποτελέσματα αυτά ήταν στατιστικά σημαντικά μεταξύ και των τριών ομάδων μελέτης. Παρομοίως και η I-TAC πρωτεΐνη ήταν αυξημένη σε ασθενείς με Νόσο Crohn, και Ελκώδη Κολίτιδα (46.38pg/ mL, n=20 and 22.09pg/mL, n=22, respectively), σε σχέση με τους μάρτυρες (11.06pg/mL, n=20). Στην περίπτωση της I-TAC η διαφορά μεταξύ Νόσου Crohn και Ελκώδους Κολίτιδας δεν ήταν σημαντική. Όσον αφορά την IP-10 πρωτεΐνη, δεν υπήρχε σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών ομάδων που μελετήθηκαν (εικόνα 2).

Εικόνα 2. Επίπεδα χημειοκινών στον ορό ασθενών με Νόσο Crohn, Ελκώδη Κολίτιδα και φυσιολογικών μαρτύρων.



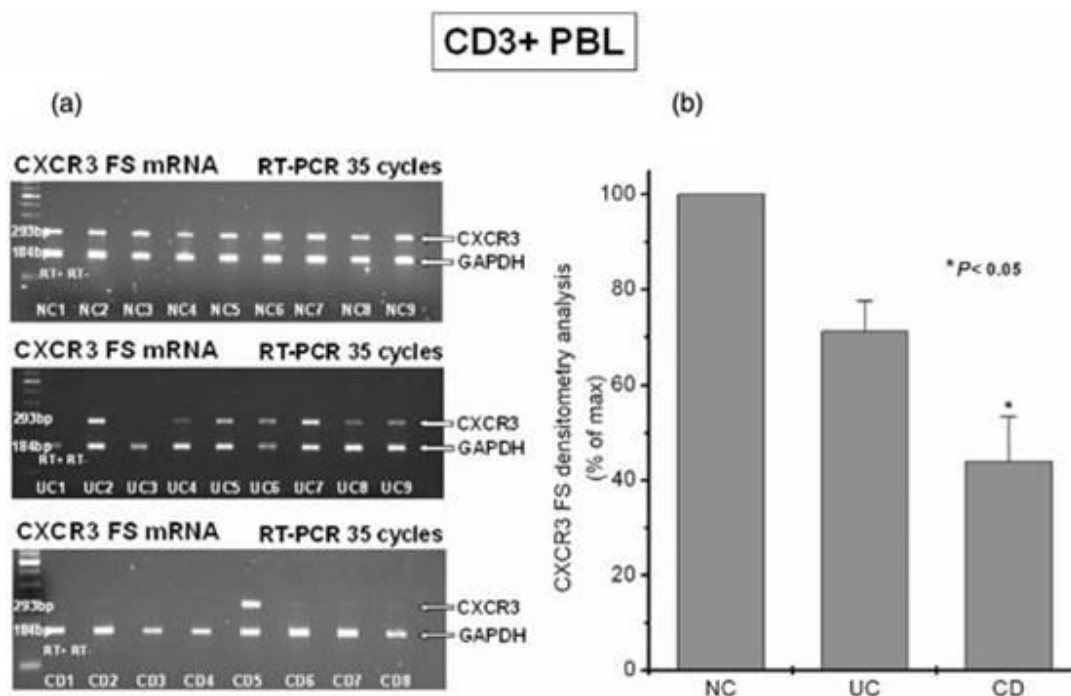
Τα ραβδογράμματα αντιπροσωπεύουν το μέσος όρο της έκφρασης των MIG και I-TAC χημειοκινών ±στατιστικό σφάλμα των ασθενών που εξετάστηκαν (22 ελκώδη κολίτιδα, 20 νόσο Crohn, 20 φυσιολογικοί μάρτυρες). Δεν ανιχνεύτηκε έκφραση της IP-10 χημειοκίνης.

4.1.1.3 Έκφραση του CXCR3 mRNA σε ανοσομαγνητικά διαχωρισθέντα CD3+ περιφερικά λεμφοκύτταρα

Στα CD3+ λεμφοκύτταρα από αίμα των ασθενών με Ελκώδη Κολίτιδα (n=22), Νόσο Crohn (n=20) και υγιών μαρτύρων (n=22), εξετάσαμε την έκφραση του CXCR3 υποδοχέα χημειοκινών με RT-PCR.

Πρόσφατα περιγράφηκε η ύπαρξη ενός νέου υποδοχέα που προέρχεται από διαφορετική σύνδεση των βάσεων του CXCR3 γονιδίου και ονομάστηκε CXCR3B. Το διαφορετικό αυτό πάντρεμα των βάσεων πραγματοποιείται από την ίδια περιοχή με αυτή που προκύπτει ο CXCR3 υποδοχέας (που μετονομάστηκε σε CXCR3A), σε συνδυασμό με άλλη μια θέση που βρίσκεται στο ιντρόνιο του CXCR3. Το mRNA του CXCR3A βρέθηκε σημαντικά αυξημένο στα CD3+ λεμφοκύτταρα ασθενών με Ελκώδη Κολίτιδα(14/22, 64%) καθώς και σε υγιείς μάρτυρες (13/20, 67%) σε σύγκριση με ασθενείς με Νόσο Crohn (4/20, 20%). Αντίθετα, ασθενείς με Νόσο Crohn εξέφραζαν το mRNA του CXCR3B (16/20, 80%), σε μεγαλύτερο βαθμό από τους ασθενείς με Ελκώδη Κολίτιδα (13/22, 60%) και υγιείς μάρτυρες (13/22, 60%) (εικόνα 3 και εικόνα 4).

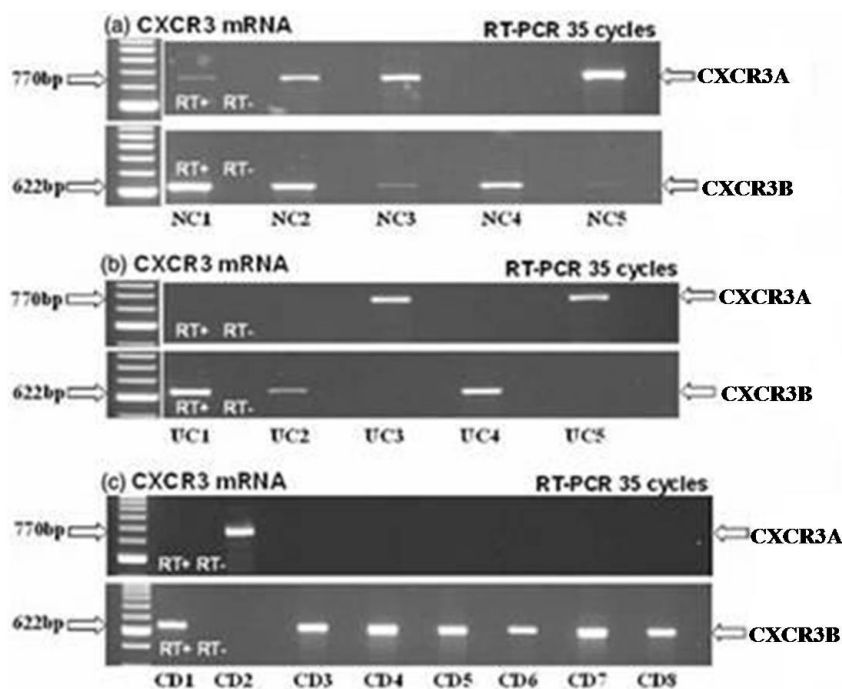
Εικόνα 3. Έκφραση του mRNA του CXCR3A υποδοχέα σε ανοσομαγνητικά διαχωρισθέντα CD3+ περιφερικά λεμφοκύτταρα ασθενών με Νόσο Crohn(CD), Ελκώδη Κολίτιδα(UC) και φυσιολογικών μαρτύρων(NC).



(a) Η εικόνα παρουσιάζει την έκφραση mRNA του CXCR3A σε CD3+ περιφερικά λεμφοκύτταρα 9 ασθενών με Ελκώδη Κολίτιδα, 9 υγιών μάρτυρες και 8 ασθενών με Crohn από το σύνολο των ασθενών που εξετάσαμε (20 με Νόσο Crohn, 22 με Ελκώδη Κολίτιδα και 20 υγιείς μάρτυρες)

(b) Πυκνομετρική ανάλυση των αποτελεσμάτων της ημιποσοτικής PCR για την έκφραση του CXCR3A γονιδίου σε απομονωμένα CD3+ λεμφοκύτταρα ασθενών και υγιών μαρτύρων. Οι μετρήσεις έχουν εκφραστεί ως ο λόγος της φωταύγειας του υποδοχέα προς αυτή του γονιδίου αναφοράς (GAPDH). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο μέσος όρος \pm στατιστικό σφάλμα (% της μέγιστης έκφρασης), και είναι ενδεικτικά του συνόλου των μετρήσεων. Η στατιστική σημαντικότητα συμβολίζεται ως * για $p < 0.05$. Συνθήκες PCR: 35 κύκλοι, 60 °C, και αναλογία γονιδίων $\frac{1}{2}$ (GAPDH/CXCR3A).

Εικόνα 4. Έκφραση του mRNA του CXCR3A και B υποδοχέα σε ανοσομαγνητικά διαχωρισθέντα CD3+ περιφερικά λεμφοκύτταρα ασθενών με Νόσο Crohn(CD), Ελκώδη Κολίτιδα(UC) και φυσιολογικών μαρτύρων(NC).



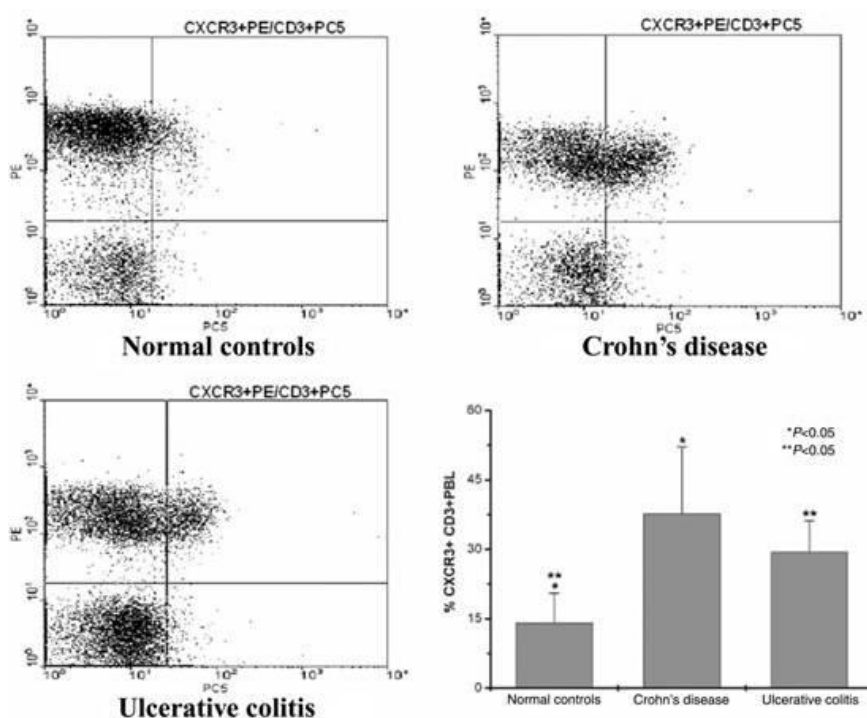
Η εικόνα παρουσιάζει αντιπροσωπευτικά δείγματα της έκφρασης mRNA του CXCR3A και CXCR3B σε CD3+ περιφερικά λεμφοκύτταρα ασθενών με Ελκώδη Κολίτιδα(b), υγιών μάρτυρες(a) και ασθενών με Crohn(c) από το σύνολο των ασθενών που εξετάσαμε (20 με Νόσο Crohn, 22 με Ελκώδη Κολίτιδα και 20 υγιείς μάρτυρες). Χαρακτηριστικό γνώρισμα των δειγμάτων αυτών είναι ότι σε ασθενείς με Νόσο Crohn και Ελκώδη Κολίτιδα δε συνυπάρχει έκφραση των δυο γονιδίων στον ίδιο ασθενή.

4.1.1.4 Κυτταρομετρία ροής CXCR3

Έλεγχος της έκφρασης του CXCR3 στα CD3+ ανοσομαγνητικά διαχωρισθέντα περιφερικά λεμφοκύτταρα έγινε και με κυτταρομετρία ροής. Το ποσοστό των CD3+CXCR3+ κυττάρων υγιών μαρτύρων, ασθενών με Νόσο Crohn και Ελκώδη Κολίτιδα ήταν $14.1\% \pm 6.5\%$, $37.7\% \pm 14.5\%$, και $29.4\% \pm 6.8\%$, αντίστοιχα, ποσοστά στατιστικά σημαντικά μεταξύ υγιών μαρτύρων και ασθενών με Νόσο Crohn ($p < 0.05$), και μεταξύ υγιών μαρτύρων και ασθενών με Ελκώδη Κολίτιδα ($p < 0.05$) (εικόνα 5). Επιπλέον

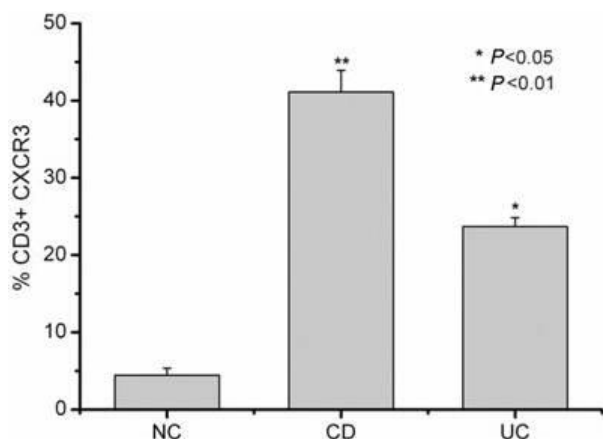
πραγματοποιήθηκε ενδοκυττάρια χρώση για τον CXCR3 υποδοχέα στα CD3+ λεμφοκύτταρα. Τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν $4.4\% \pm 1.3\%$, $41.1\% \pm 4.9\%$ και $22.7\% \pm 1.6\%$ για υγιείς μάρτυρες, ασθενείς με Νόσο Crohn και Ελκώδη Κολίτιδα αντίστοιχα ακολουθώντας το ίδιο μοτίβο με την εξωκυττάρια χρώση (εικόνα 6).

Εικόνα 5. Στικτογράμματα κυτταρομετρίας ροής σε ανοσομαγνητικά διαχωρισθέντα CD3 περιφερικά κύτταρα για την έκφραση των CXCR3+ CD3+ κυττάρων.



Στικτογράμματα κυτταρομετρίας ροής που απεικονίζουν την έκφραση των μορίων CD3 και CXCR3 σε φυσιολογικούς μάρτυρες, ασθενείς με Νόσο Crohn και Ελκώδη Κολίτιδα. Τα ραβδογράμματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο της έκφρασης των CXCR3+CD3+ κυττάρων \pm στατιστικό σφάλμα των ασθενών που εξετάστηκαν (22 ελκώδη κολίτιδα, 20 νόσο Crohn, 20 φυσιολογικοί μάρτυρες). Η στατιστική σημαντικότητα συμβολίζεται ως * για $p < 0.05$.

Εικόνα 6. Ενδοκυττάρια χρώση CXCR3 υποδοχέα σε CD3+ κύτταρα



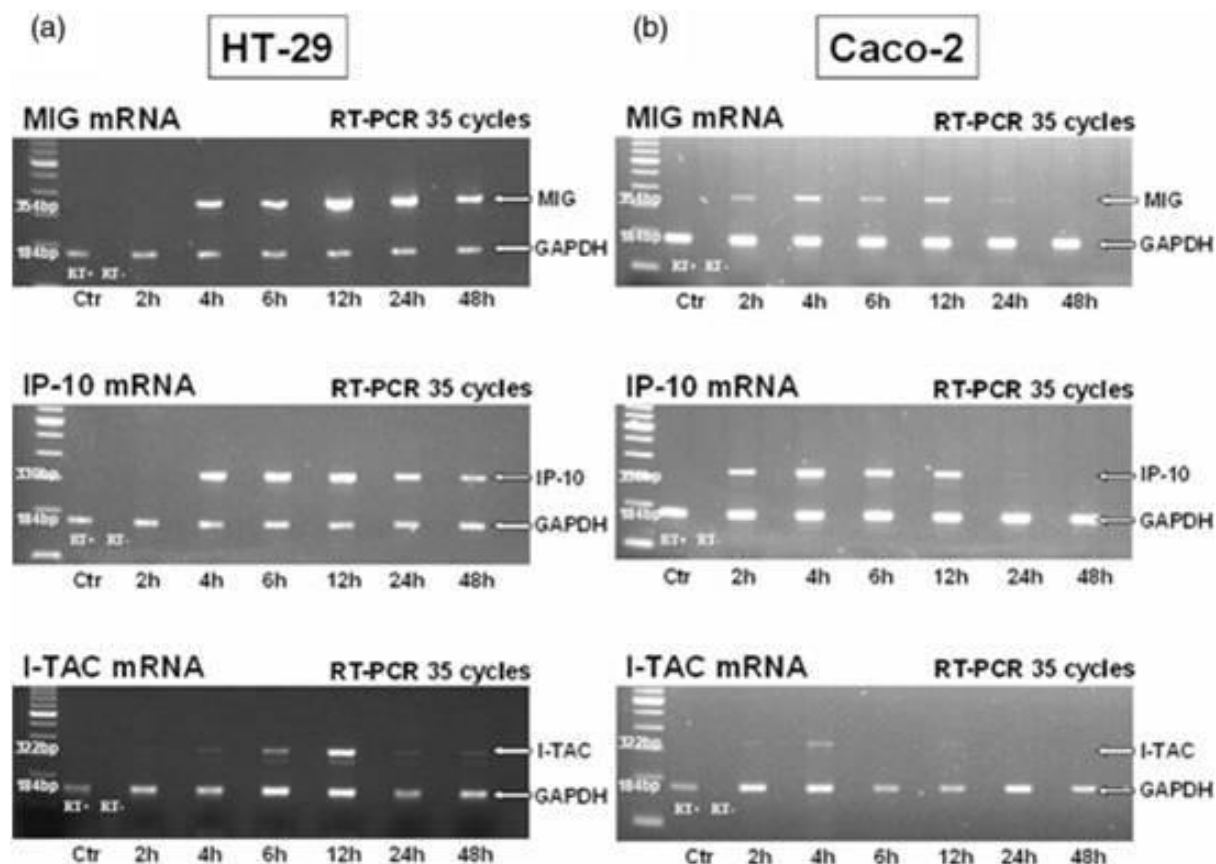
Τα ραβδογράμματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο της έκφρασης ενδοκυττάρια των CXCR3+CD3+ κυττάρων±στατιστικό σφάλμα των ασθενών που εξετάστηκαν (22 ελκώδη κολίτιδα, 20 νόσο Crohn, 20 φυσιολογικοί μάρτυρες).

4.1.1.5 Παραγωγή CXCR3 συνδεόμενων χημειοκινών in vitro

α. Έκφραση σε επίπεδο mRNA

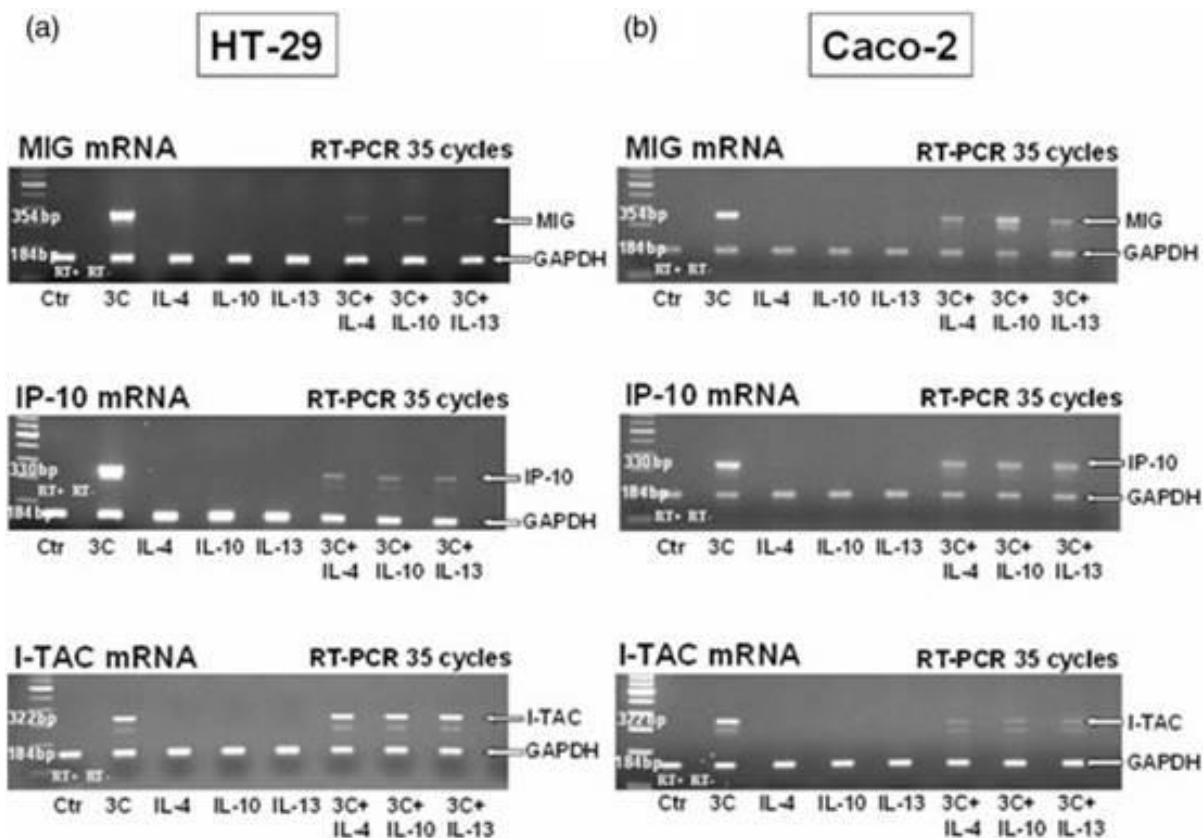
Προκειμένου να διευκρινιστεί ο ρόλος των επιθηλιακών κυττάρων στην παραγωγή των CXCR3- συνδεόμενων χημειοκινών, προχωρήσαμε σε in vitro πειράματα με HT-29 και Caco-2 κολονικά επιθηλιακά κύτταρα. Αδιέγερτα τα κύτταρα δεν εξέφραζαν καμία από τις χημειοκίνες που μελετήσαμε. Διέγερση με Th1 κυτταροκίνες - IL-1α(10ng/mL), TNF-α(50ng/mL) και IFN-γ(300U/mL)(228) - προκαλούσε εξαρτώμενη από το χρόνο επαγωγή του mRNA των τριών χημειοκινών MIG, IP-10 και I-TAC και στις δύο κυτταρικές σειρές (**εικόνα 7**). Για να μελετήσουμε την επίδραση των αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών στην επαγωγή που προκαλούσαν οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, προσθέσαμε IL-4(10 ng/mL), IL-10(10 ng/mL), και IL-13(10 ng/ mL), 1 ώρα πριν την επίδραση των Th1 κυτταροκινών και μελετήσαμε την έκφραση των χημειοκινών μετά από 12 ώρες. Η παρουσία των αντιφλεγμονωδών χημειοκινών, προκαλούσε μείωση της έκφρασης του mRNA των MIG, IP-10 και I-TAC και στις δύο κυτταρικές σειρές (**εικόνα 8**).

Εικόνα 7. Επίδραση των Th1 κυτταροκινών στην έκφραση mRNA των τριών CXCR3 συνδεόμενων χημειοκινών σε δύο επιθηλιακές κυτταρικές σειρές.



Επίδραση των Th1 κυτταροκινών (IL-1 α , TNF- α και IFN- γ) στην έκφραση mRNA των τριών CXCR3 συνδεόμενων χημειοκινών σε δύο επιθηλιακές κυτταρικές σειρές (HT-29 αριστερά και Caco-2 δεξιά). Η εικόνα είναι αντιπροσωπευτική τριών ημιποσοτικών PCR χρησιμοποιώντας για σύγκριση το γονίδιο GAPDH. Ο λόγος της φωταύγειας των δύο γονιδίων χρησιμοποιήθηκε για την ημιποσοτική εκτίμηση του mRNA των τριών χημειοκινών. Στα HT-29 κύτταρα το μέγιστο της έκφρασης των CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10) και CXCL11 (I-TAC) εμφανίστηκε στις 12 ώρες μετά την επίδραση ενώ στα Caco-2 κύτταρα στις 4 ώρες.

Εικόνα 8. Επίδραση των αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών στην επαγόμενη από τις Th1 κυτταροκίνες έκφραση του mRNA των τριών CXCR3 συνδεδεμένων χημειοκινών.

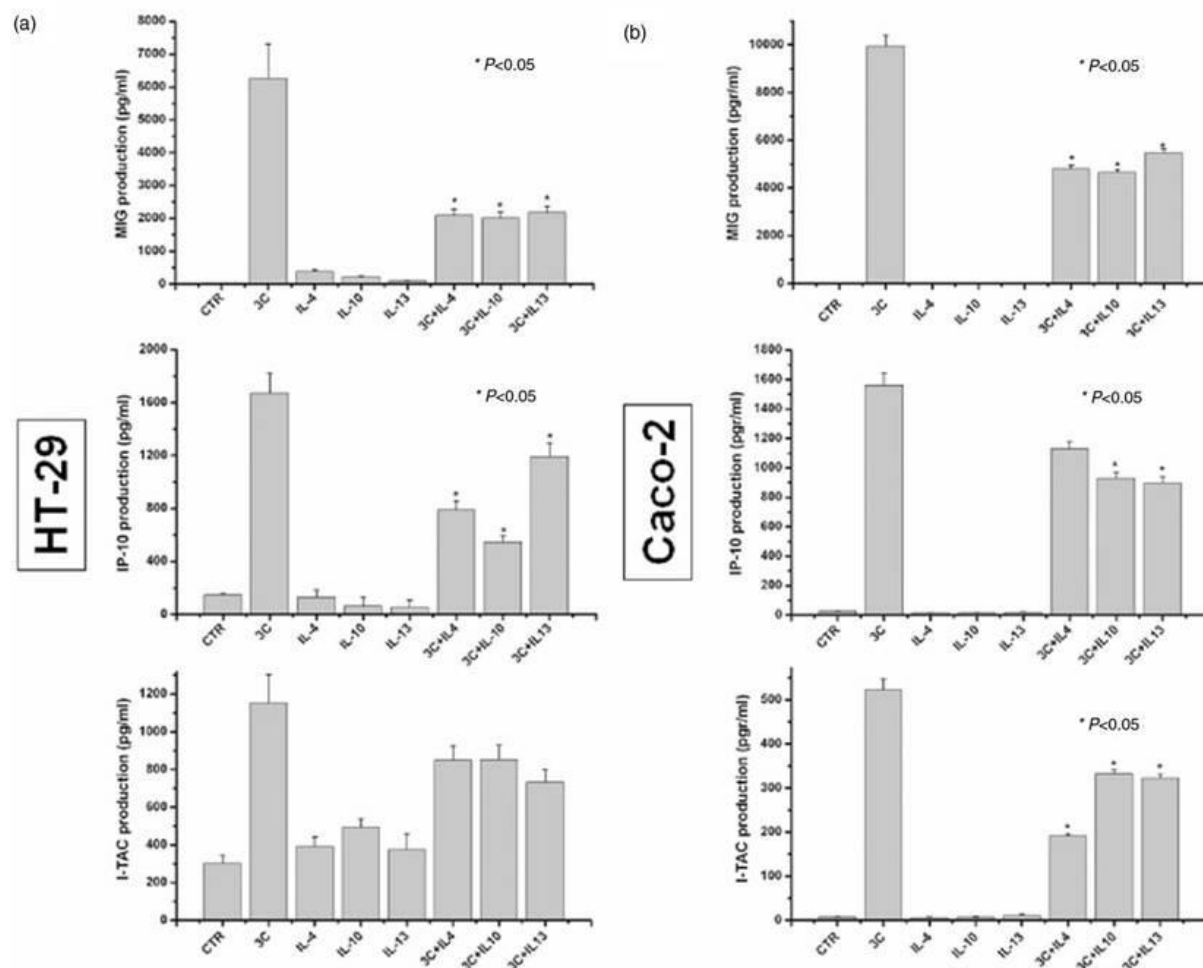


Επίδραση των αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-4, IL-10, IL-13) στην επαγόμενη από τις Th1 κυτταροκίνες (IL-1 α , TNF- α και IFN- γ) έκφραση mRNA των τριών CXCR3 συνδεδεμένων χημειοκινών σε δύο επιθηλιακές κυτταρικές σειρές (HT-29 αριστερά και Caco-2 δεξιά). Οι διεγέρσεις πραγματοποιήθηκαν στο μέγιστο της έκφρασης του mRNA των τριών χημειοκινών για κάθε κυτταροσειρά (12h για τα HT-29 και 4h για τα Caco-2). Η εικόνα είναι αντιπροσωπευτική τριών ημιποσοτικών PCR χρησιμοποιώντας για σύγκριση το γονίδιο GAPDH. Ο λόγος της φωταύγειας των δύο γονιδίων χρησιμοποιήθηκε για την ημιποσοτική εκτίμηση του mRNA των τριών χημειοκινών. Η παρουσία των αντιφλεγμονωδών χημειοκινών, προκαλούσε μείωση της έκφρασης του mRNA των MIG, IP-10 και I-TAC και στις δύο κυτταρικές σειρές.

β. Έκφραση σε επίπεδο πρωτεΐνης

Η παρατηρούμενη αυτή επαγωγή και ρύθμιση της έκφρασης του mRNA των CXCR3 συνδεδεμένων χημειοκινών, επιβεβαιώθηκε και σε επίπεδο πρωτεΐνης. Αδιέγερτα κύτταρα δεν παρουσίαζαν παρά μόλις ανιχνεύσιμα ποσά χημειοκινών. Μετά από επίδραση προφλεγμονωδών κυτταροκινών στα HT-29 κύτταρα παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των παραγόμενων MIG (6258.97 ± 602.27 pg/mL, n=12), IP-10 (1670.63 ± 87.68 pg/mL, n=12), και I-TAC (1151.81 ± 87.06 pg/mL, n=12), πρωτεϊνών, 24 ώρες μετά από τη διέγερση. Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα και στα CACO-2 κύτταρα με παραγωγή MIG (9944.21 ± 454.30 pg/mL, n=12), IP-10 (1559.73 ± 85.73 pg/mL, n=12), και I-TAC (523.17 ± 24.08 pg/mL, n=12). Επίδραση των αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών IL-4, IL-10 και IL-13 προκάλούσε σημαντική μείωση των επαγόμενων από τις Th1 κυτταροκίνες MIG, IP-10 και I-TAC πρωτεϊνών και στις δύο κυτταρικές σειρές με εξαίρεση την I-TAC χημειοκίνη στα HT-29 κύτταρα η οποία δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική μείωση. Επίδραση των αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών από μόνη τους, δεν προκάλούσε καμία αλλαγή στην παραγωγή των χημειοκινών MIG, IP-10 ή I-TAC(εικόνα 9).

Εικόνα 9. Μείωση της επαγόμενης, από τις Th1 κυτταροκίνες, πρωτεΐνης των CXCR3 συνδεόμενων χημειοκινών μετά από την επίδραση των αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών.

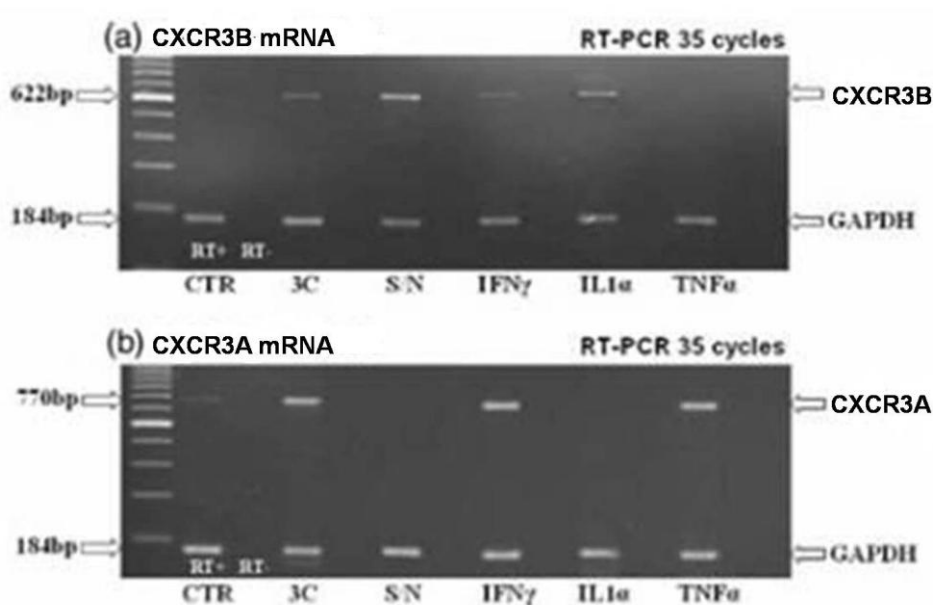


Τα ραβδογράμματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο της έκφρασης±στατιστικό σφάλμα έξι μετρήσεων σε κάθε κυτταρική σειρά για κάθε χημειοκίνη. Η στατιστική σημαντικότητα συμβολίζεται ως * για $p < 0.05$.

4.1.1.6 Έκφραση CXCR3 υποδοχέα σε Jurkat κύτταρα

Προκειμένου να μελετήσουμε τις συνθήκες επαγωγής του CXCR3 mRNA στα περιφερικά λεμφοκύτταρα, προχωρήσαμε σε επίδραση προφλεγμονωδών κυτταροκινών σε T λευχαιμική κυτταροσειρά (Jurkat T-cells). Επίσης έγινε επίδραση με υπερκείμενο κυττάρων HT-29 κατόπιν διέγερσης με το συνδυασμό IL-1 α + TNF- α + IFN- γ για 24 ώρες. Αδιέγεργα κύτταρα παρουσίαζαν ελάχιστη έκφραση του CXCR3A mRNA. Μετά από επίδραση IFN- γ ή του συνδυασμού των Th1 κυτταροκινών, τα κύτταρα Jurkat παρουσίαζαν επαγωγή των CXCR3A και CXCR3B mRNAs. Επίδραση IL-1 α προκαλούσε επαγωγή μόνο του CXCR3B mRNA, ενώ επίδραση TNF- α είχε ως αποτέλεσμα επαγωγή του CXCR3A. Τέλος η επίδραση με υπερκείμενο HT-29 κυττάρων προκαλούσε επαγωγή του CXCR3B mRNA (εικόνα 10).

Εικόνα 10. Επίδραση των Th1 κυτταροκινών, του συνδυασμού τους και υπερκείμενου διεγερθέντων HT-29 κυττάρων στην έκφραση mRNA των CXCR3A και B υποδοχέα στη Jurkat T λευχαιμική σειρά.



Η εικόνα είναι αντιπροσωπευτική τριών ημιποσοτικών PCR χρησιμοποιώντας για σύγκριση το γονίδιο GAPDH. Ο λόγος της φωταύγειας των δύο γονιδίων χρησιμοποιήθηκε για την ημιποσοτική εκτίμηση του mRNA των CXCR3A και B υποδοχέων. Παρατηρείται η διαφορετική συμπεριφορά της έκφρασης του mRNA των CXCR3A και B στις Th1 κυτταροκίνες.

4.2 Αποτελέσματα CC χημειοκινών

Κατά τη μελέτη των CC χημειοκινών επικεντρωθήκαμε επίσης σε αυτές που εκφράζονται από τα NK και T κύτταρα (πίνακας 3).

Πίνακας 3. Μελετήσαμε τις συνδεδεμένες με τον CCR3 υποδοχές (CXCL11, 24 και 26) χημειοκίνες, καθώς και την CCL1 – συνδεδεμένη με τον CCR8 υποδοχέα και την CCL25 με τον CCR9 υποδοχέα.

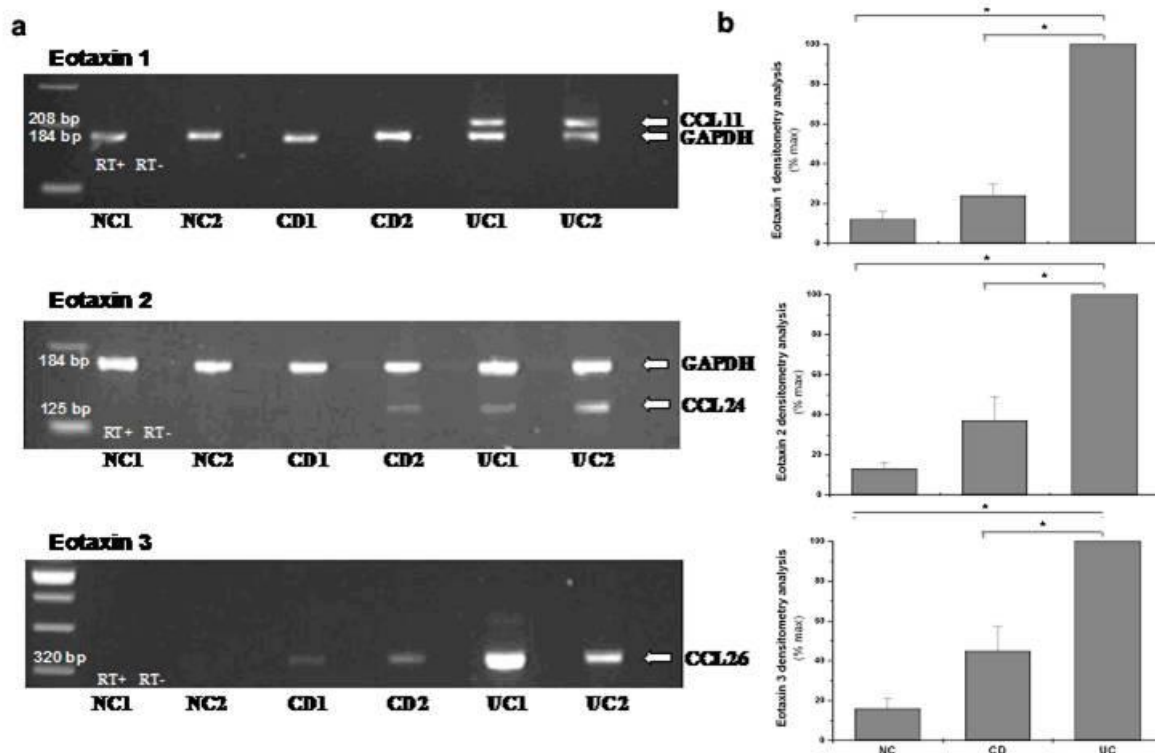
Ομάδα/υπο-ομάδα	Ονομασία	Παλαιότερη ονομασία	Υποδοχέας	Τρόπος έκφρασης	Θέση έκφρασης
CC					
	CCL1	I-309	CCR8	Επαγόμενη	Μονοκύτταρα, T και B κύτταρα
	CCL2	MCP-1	CCR2	Επαγόμενη	Μονοκύτταρα, T και άωρα δενδρική κύτταρα
	CCL3	MIP-1 α	CCR1,5	Επαγόμενη	Μονοκύτταρα, μακροφάγα, NK, Th1, Th2, άωρα δενδρική
	CCL4	MIP-1 β	CCR5,8,1,3	Επαγόμενη	Μονοκύτταρα, μακροφάγα, Th1 και άωρα δενδρική
	CCL5	RANTES	CCR5,1,2	Επαγόμενη	Μονοκύτταρα, μακροφάγα, ηωσινόφιλα, NK, Th1 και άωρα δενδρική κύτταρα
	CCL7	MCP3	CCR3	Επαγόμενη	Μονοκύτταρα, μακροφάγα, NK, T και άωρα δενδρική
	CCL8	MCP2	CCR3	Επαγόμενη	Ηωσινόφιλα, βασεόφιλα, μαστοκύτταρα, Th2 κύτταρα
	CCL11	Eotaxin	CCR3	Επαγόμενη	Ηωσινόφιλα, βασεόφιλα, μαστοκύτταρα, Th2 κύτταρα
	CCL13	MCP-4	CCR2,3	Επαγόμενη	Μονοκύτταρα, T, NK, άωρα δενδρική, ηωσινόφιλα, βασεόφιλα, μαστοκύτταρα, Th2
	CCL14	HCC-1	CCR1	Άγνωστη	Μονοκύτταρα, μακροφάγα NK και T κύτταρα
	CCL15	HCC-2	CCR1,3	Άγνωστη	Μονοκύτταρα, μακροφάγα, NK, T κύτταρα, ηωσινόφιλα, βασεόφιλα, μαστοκύτταρα, Th2
	CCL16	HCC-4	CCR1	Άγνωστη	Μονοκύτταρα, μακροφάγα, NK και T κύτταρα
	CCL17	TARC	CCR4	Επαγόμενη/ Ομοιοστατική	Th2 κύτταρα, μακροφάγα
	CCL18	PARC	Άγνωστος	Ομοιοστατική	T κύτταρα
	CCL19	MIP-3 β /ELC	CCR7	Ομοιοστατική	T, B και ώριμα δενδρική
	CCL20	MIP-3 α /LARC	CCR6	Επαγόμενη/ Ομοιοστατική	T, B και άωρα δενδρική
	CCL21	SLC	CCR7	Ομοιοστατική	T, B και ώριμα δενδρική
	CCL22	MDC	CCR4	Επαγόμενη/ Ομοιοστατική	Th2 κύτταρα, μακροφάγα
	CCL23	MPIF1	CCR1	Άγνωστη	Μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα
	CCL24	Eotaxin-2	CCR3	Επαγόμενη	ηωσινόφιλα., βασεόφιλα, μαστοκύτταρα, Th2 κύτταρα
	CCL25	TECK	CCR9	Ομοιοστατική	Κύτταρα του θύμου αδένος και T κύτταρα
	CCL26	Eotaxin-3	CCR3	Επαγόμενη	ηωσινόφιλα., βασεόφιλα, μαστοκύτταρα, Th2 κύτταρα
	CCL27	CTACK	CCR10	Ομοιοστατική	T, μονοκύτταρα, B και άωρα δενδρική
	CCL28	MEC	CCR10, CCR3	Ομοιοστατική	T κύτταρα

4.2.1. CCR3- συνδεόμενες χημειοκίνες

4.2.1.1. Έκφραση των CCR3 συνδεόμενων χημειοκινών σε βιοψίες κολονικού επιθηλίου

Σε βιοψίες παχέος εντέρου από 22 ασθενείς με Ελκώδη Κολίτιδα, 20 με Νόσο Crohn και 20 υγιείς μάρτυρες ανιχνεύτηκε η έκφραση mRNA των CCR3 συνδεόμενων χημειοκινών – CCL11 (eotaxin), CCL24 (eotaxin 2) και CCL26 (eotaxin 3) - με RT-PCR. Παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση και των τριών χημειοκινών σε φλεγμαίνοντες ιστούς ασθενών με Ελκώδη Κολίτιδα. Συγκεκριμένα για την CCL11/Eotaxin-1, έκφραση mRNA παρατηρήθηκε σε 18/22 ασθενείς με Ελκώδη Κολίτιδα, 8/20 με Νόσο Crohn και 1/20 υγιείς μάρτυρες. Το mRNA της CCL24/Eotaxin-2 ανιχνεύτηκε σε 17/22 ασθενείς με Ελκώδη Κολίτιδα, 12/20 με Νόσο Crohn και 1/20 υγιείς μάρτυρες. Αντίστοιχα για το mRNA της CCL26/Eotaxin-3, η έκφραση ήταν 16/22, 12/20 και 2/20 αντίστοιχα. Η διαφορά στην έκφραση του mRNA των τριών χημειοκινών δεν ήταν στατιστικά σημαντική μεταξύ ασθενών με διαφορετική ενεργότητα της νόσου, διαφορετικό βαθμό φλεγμονής του κολονικού επιθηλίου και διαφορετική θεραπεία (εικόνα 11α και β).

Εικόνα 11. Έκφραση του mRNA των τριών CCR3 συνδεόμενων χημειοκινών σε βιοψίες παχέος εντέρου ασθενών με Νόσο Crohn(CD), Ελκώδη Κολίτιδα(UC) και φυσιολογικών μαρτύρων(NC).



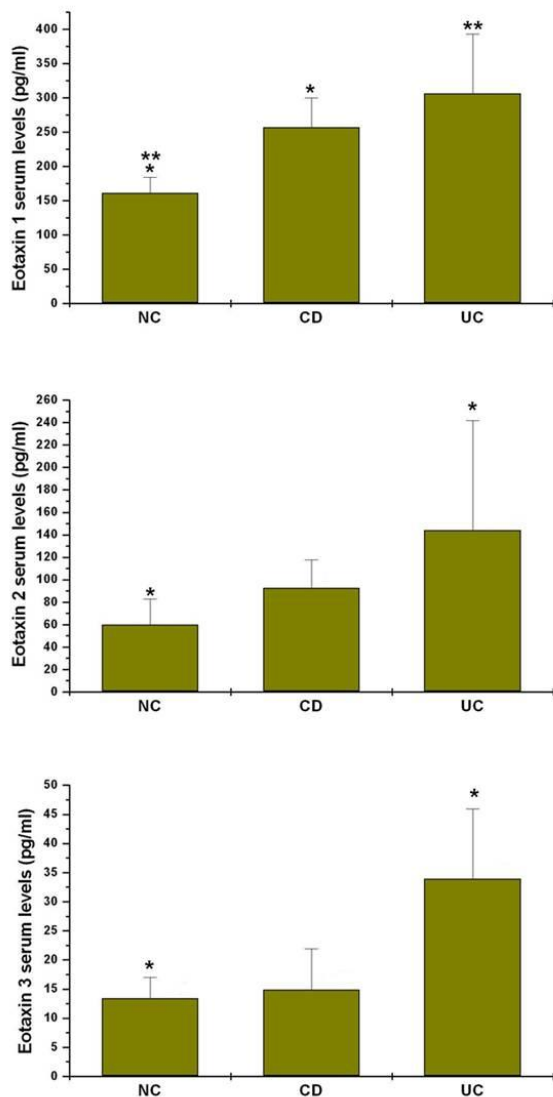
(a) Η εικόνα είναι αντιπροσωπευτική δύο ημιποσοτικών PCR για κάθε ασθενή και κάθε χημειοκίνη (eotaxin 1 και eotaxin 2) χρησιμοποιώντας για σύγκριση το γονίδιο GAPDH σε 20 ασθενείς με Νόσο Crohn, 22 με Ελκώδη Κολίτιδα και 20 υγιείς μάρτυρες. Για την eotaxin 3 δεν καταφέραμε να τη συνδυάσουμε με το GAPDH, και παρουσιάζεται ως απλή PCR.

(b) Πυκνομετρική ανάλυση των αποτελεσμάτων της ημιποσοτικής PCR για την έκφραση των γονιδίων eotaxin 1 και 2 στο κολονικό επιθήλιο ασθενών και υγιών μαρτύρων. Οι μετρήσεις έχουν εκφραστεί ως ο λόγος της φωταύγειας των χημειοκινών προς αυτή του γονιδίου αναφοράς (GAPDH). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο μέσος όρος \pm στατιστικό σφάλμα (% της μέγιστης έκφρασης), και είναι ενδεικτικά του συνόλου των μετρήσεων. Η στατιστική σημαντικότητα συμβολίζεται ως * για $p < 0.01$. Συνθήκες PCR: 35 κύκλοι, 54°C, 51°C, 60°C για eotaxin 1, 2 και 3 αντίστοιχα και αναλογία γονιδίων 1/4 και 1/8 για GAPDH/eotaxin 1 και GAPDH/eotaxin 2 αντίστοιχα.

4.2.1.2. Ανίχνευση έκφρασης CCR3 συνδεδεμένων χημειοκινών στον ορό ασθενών με ELISA

Τα επίπεδα των χημειοκινών που συνδέονται με τον CCR3 υποδοχέα, CCL11/Eotaxin-1, CCL24/Eotaxin-2 και CCL26/Eotaxin-3 μετρήθηκαν στον ορό των ασθενών αυτών με ELISA. Αυξημένα επίπεδα CCL11/Eotaxin-1 βρέθηκαν τόσο σε ασθενείς με Ελκώδη Κολίτιδα (n=22, 306±87 pg/ml) όσο και σε αυτούς με Νόσο Crohn (n=20, 257 ±43 pg/ml) σε σχέση με φυσιολογικούς μάρτυρες (n=20, 161±23 pg/ml) ($p<0.05$). Η CCL24/Eotaxin-2 ανιχνεύτηκε αυξημένη σε ασθενείς με Ελκώδη Κολίτιδα (144 ± 98 pg/ml), και λιγότερο σε Νόσο Crohn (92.6 ± 25 pg/ml) και φυσιολογικούς μάρτυρες (59.7 ± 23 pg/ml) ($p<0.05$ και $p>0.05$ αντίστοιχα). Παρομοίως και η CCL26/Eotaxin-3 ανιχνεύτηκε σημαντικά αυξημένη σε ασθενείς με Ελκώδη Κολίτιδα (33.9 ± 12 pg/ml) σε σχέση με φυσιολογικούς μάρτυρες (13.4 ± 3.6 pg/ml) ($p=0.002$) αλλά και ασθενείς με Νόσο Crohn (14.9±7pg/ml). Συνολικά και οι τρεις χημειοκίνες που συνδέονται στον CCR3 υποδοχέα βρέθηκαν αυξημένες στον ορό ασθενών με Ελκώδη Κολίτιδα (**εικόνα 12**).

Εικόνα 12. Επίπεδα χημειοκινών στον όρο ασθενών με Νόσο Crohn, Ελκώδη Κολίτιδα και φυσιολογικών μαρτύρων.

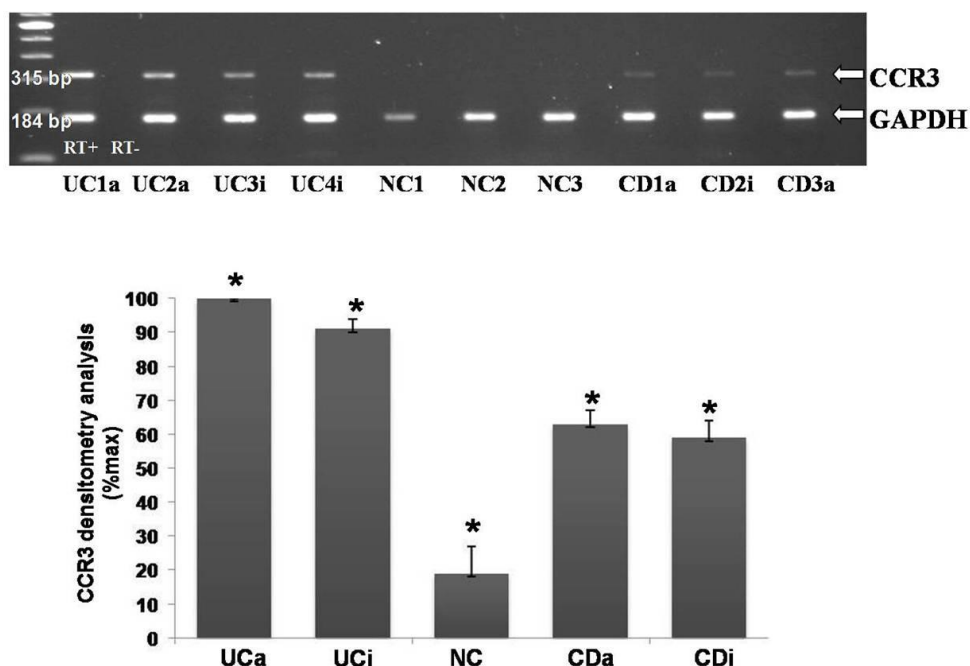


Τα ραβδογράμματα αντιπροσωπεύουν το μέσος όρο της έκφρασης σε επίπεδο πρωτεΐνης \pm στατιστικό σφάλμα των ασθενών που εξετάστηκαν (22 ελκώδη κολίτιδα, 20 νόσο Crohn, 20 φυσιολογικοί μάρτυρες). Η στατιστική σημαντικότητα συμβολίζεται ως * για $p < 0.05$.

4.2.1.3 Έκφραση του CCR3 mRNA σε βιοψίες κολονικού επιθηλίου.

Σε βιοψίες εντέρου των ασθενών αυτών μελετήθηκε και η έκφραση του CCR3 σε επίπεδο mRNA με RT-PCR. Η έκφραση του CCR3 mRNA ήταν ελάχιστη στους φυσιολογικούς μάρτυρες 20% (4/20), ενώ το 65% των ασθενών με Νόσο Crohn και το 95% αυτών με Ελκώδη Κολίτιδα εξέφραζαν CCR3 mRNA. Η έκφραση αυτή παρουσιάζονταν ανεξάρτητα από την ενεργότητα της νόσου και το βαθμό φλεγμονής του κολονικού βλεννογόνου (εικόνα 13).

Εικόνα 13. Έκφραση του mRNA του CCR3 υποδοχέα σε βιοψίες παχέος εντέρου ασθενών με Νόσο Crohn(CD), Ελκώδη Κολίτιδα(UC) και φυσιολογικών μαρτύρων(NC).



(a) Η εικόνα είναι αντιπροσωπευτική δύο ημιποσοτικών PCR για κάθε ασθενή και χρησιμοποιώντας για σύγκριση το γονίδιο GAPDH σε 20 ασθενείς με Νόσο Crohn (a=active, ενεργός νόσος; i=inactive, νόσος σε ηρεμία), 22 με Ελκώδη Κολίτιδα (a=active, ενεργός νόσος; i=inactive, νόσος σε ηρεμία), και 20 υγιείς μάρτυρες.

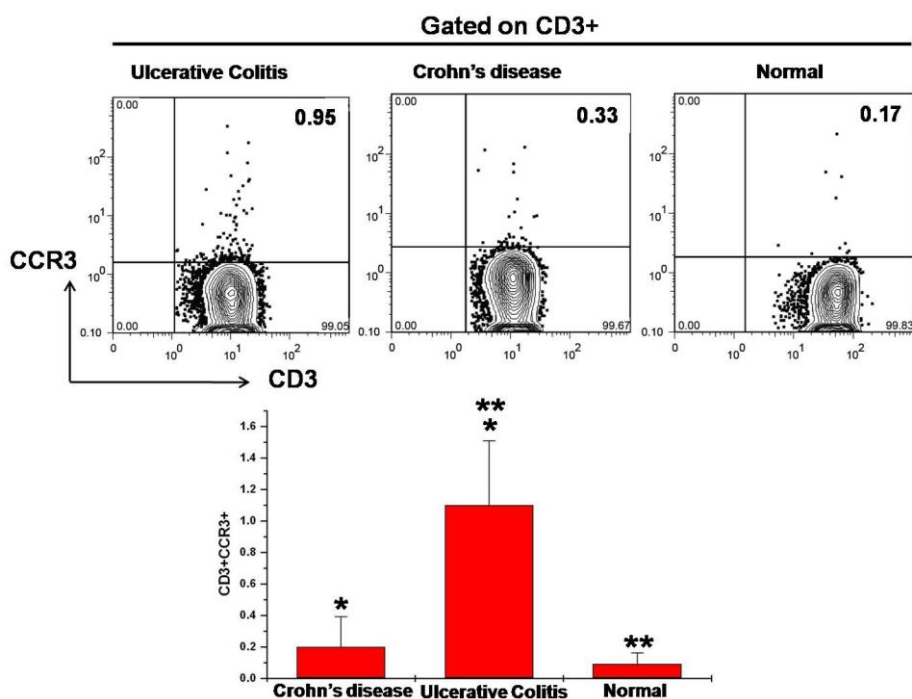
(b) Πυκνομετρική ανάλυση των αποτελεσμάτων των ημιποσοτικών PCR για την έκφραση του CCR3 στο κολονικό επιθήλιο ασθενών και υγιών μαρτύρων. Οι μετρήσεις

έχουν εκφρασθεί ως ο λόγος της φωταύγειας του υποδοχέα προς αυτή του γονιδίου αναφοράς (GAPDH). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο μέσος όρος \pm στατιστικό σφάλμα (% της μέγιστης έκφρασης), και είναι ενδεικτικά του συνόλου των μετρήσεων. Η στατιστική σημαντικότητα συμβολίζεται ως * για $p < 0.01$. Συνθήκες PCR: 37 κύκλοι, 62°C και αναλογία γονιδίων 2/3 GAPDH/CCR3.

4.2.1.4 Κυτταρομετρία ροής CCR3

Ανοσομαγνητικά διαχωρισθέντα CD3+ T λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος απομονώθηκαν από 22 ασθενείς με Ελκώδη Κολίτιδα, 20 με Νόσο Crohn και 20 υγιείς μάρτυρες και πραγματοποιήθηκε κυτταρομετρία ροής για CD3+ CCR3+ κύτταρα. Η κυτταρομετρία ροής ανέδειξε έκφραση του υποδοχέα CCR3 κυρίως σε ασθενείς με Ελκώδη Κολίτιδα ($1.10 \pm 0.4\%$), λιγότερο σε Νόσο Crohn ($0.2 \pm 0.19\%$) και σχεδόν καθόλου σε υγιείς μάρτυρες ($0.09 \pm 0.07\%$) (**εικόνα 14**). Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν μια αύξηση των CD3+CCR3+ λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος σε ασθενείς με Ελκώδη Κολίτιδα που θα μπορούσαν να αντιπροσωπεύουν ενεργοποιημένα κυκλοφορούντα T λεμφοκύτταρα τα οποία μεταναστεύουν προς το κολονικό επιθήλιο.

Εικόνα 14. Στικτογράμματα κυτταρομετρίας ροής σε ανοσομαγνητικά διαχωρισθέντα CD3 περιφερικά κύτταρα για την έκφραση των διπλοθετικών CCR3+CD3+ κυττάρων.



Στικτογράμματα κυτταρομετρίας ροής που απεικονίζουν την έκφραση των μορίων CD3 και CCR3 σε φυσιολογικούς μάρτυρες (n=20), ασθενείς με Νόσο Crohn (n=20) και Ελκώδη Κολίτιδα (n=22). Τα ραβδογράμματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο της έκφρασης των CCR3+CD3+ κυττάρων±στατιστικό σφάλμα των ασθενών που εξετάστηκαν. Η στατιστική σημαντικότητα συμβολίζεται ως * για p<0.05.

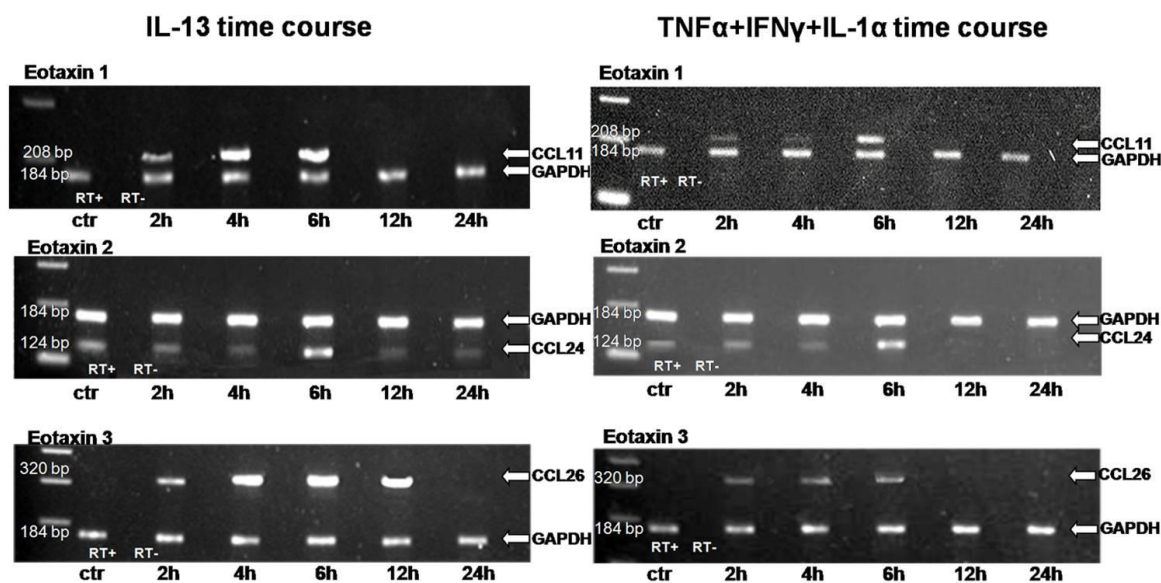
4.2.1.5. Παραγωγή CCR3 συνδεδεμένων χημειοκινών in vitro

α. Έκφραση σε επίπεδο mRNA

Προκειμένου να διερευνήσουμε τη συμμετοχή των επιθηλιακών κυττάρων μελετήσαμε in vitro στις HT-29 και Caco-2 κυτταρικές σειρές την έκφραση mRNA και την παραγωγή των χημειοκινών που συνδέονται με τον CCR3 υποδοχέα μετά από επίδραση κυτταροκινών. Αρχικά οι δύο κυτταρικές σειρές επώαστηκαν για διαφορετικό χρονικό διάστημα μετά την επίδραση διαφόρων κυτταροκινών προκειμένου να ερευνηθεί η μέγιστη έκφραση των χημειοκινών CCL11/Eotaxin-1, CCL24/Eotaxin-2, και CCL26/Eotaxin-3. Οι Th1 κυτταροκίνες (IL-1 α , TNF- α , IFN- γ) προκαλούσαν ελάχιστη επαγωγή στην έκφραση mRNA των 3 χημειοκινών. Αντίθετα οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (IL-4, IL-10, IL-13) προκάλεσαν σημαντική αύξηση της έκφρασης του mRNA των ησταζινών παρουσιάζοντας μέγιστη έκφραση τις 6 ώρες (**εικόνα 15** και **εικόνα 16**). Βασιζόμενοι στα αποτελέσματα αυτά μελετήσαμε την επίδραση του συνδυασμού προ- και αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών στην έκφραση του mRNA των ησταζινών.

Αδιέγερτα τα κύτταρα εξέφραζαν αδρά μόνο την CL24/Eotaxin-2. Επίδραση του συνδυασμού των Th1 κυτταροκινών είχε ως αποτέλεσμα σημαντική αύξηση του mRNA της CCL26/Eotaxin-3 και στις δύο κυτταρικές σειρές καθώς και των χημειοκινών CCL11/Eotaxin-1 και CCL24/Eotaxin-2 σε μικρότερο βαθμό. Επίδραση με το συνδυασμό των προφλεγμονωδών κυτταροκινών προκάλεσε σημαντική επαγωγή mRNA και των τριών χημειοκινών, CCL11/Eotaxin-1, CCL24/Eotaxin-2 και CCL26/Eotaxin-3 και στις δύο κυτταρικές σειρές.

Εικόνα 15. Επίδραση των Th1 κυτταροκινών και της αντιφλεγμονώδους IL-13 στην έκφραση mRNA των τριών CCR3 συνδεόμενων χημειοκινών στην HT-29 κυτταρική σειρά.

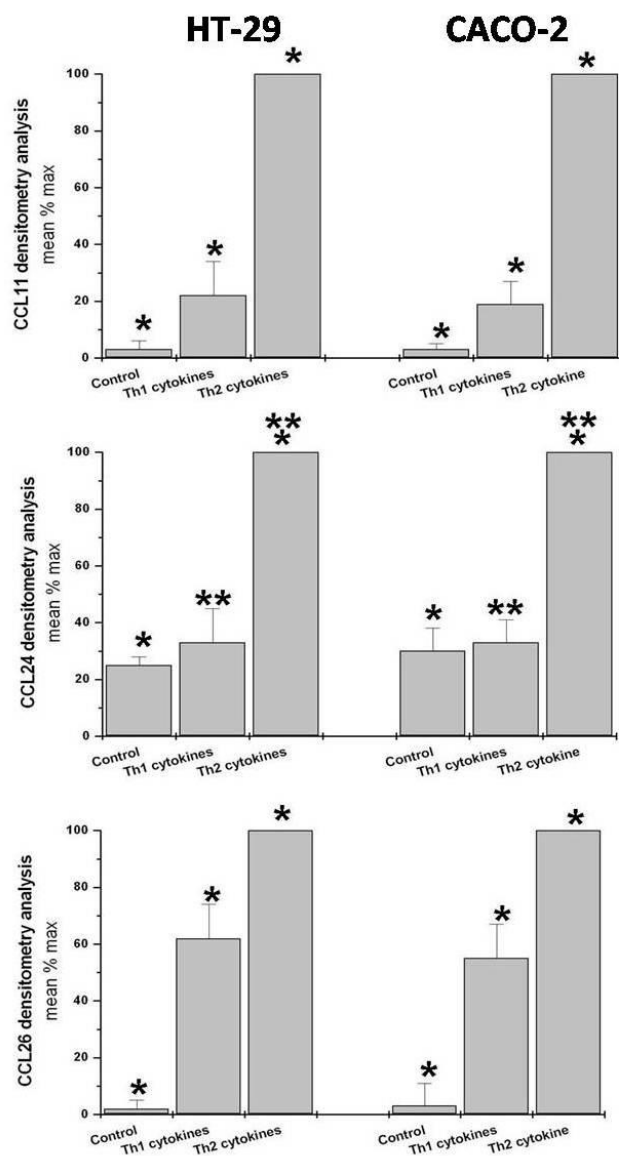


Η εικόνα είναι αντιπροσωπευτική τριών ημιποσοτικών PCR για κάθε χημειοκίνη (eotaxin 1, 2 και 3) χρησιμοποιώντας για σύγκριση το γονίδιο GAPDH στα HT-29 κύτταρα.

Στο δεξιό panel παρουσιάζεται αντιπροσωπευτικά η διέγερση με την IL-13 από τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες. Τα αποτελέσματα για της IL-4 και IL-10 είναι παρόμοια και στις 2 κυτταρικές σειρές και παρουσιάζονται με μορφή ραβδογραμμάτων παρακάτω.

Στο αριστερό panel παρουσιάζεται αντιπροσωπευτικά η διέγερση με το συνδυασμό των Th1 κυτταροκινών (IL-1α και TNF-α και IFN-γ) ο οποίος ήταν πιο αποτελεσματικός στην επαγωγή της έκφρασης των 3 χημειοκινών από κάθε μια Th1 κυτταροκίνη ξεχωριστά. Τα αποτελέσματα των διαφορετικών διεγέρσεων παρουσιάζονται σε επίπεδο πρωτεΐνης.

Εικόνα 16. Επίδραση των προφλεγμονωδών Th1 και αντιφλεγμονωδών Th2 κυτταροκινών στην έκφραση mRNA των τριών CCR3 συνδεόμενων χημειοκινών στις HT-29 και Caco-2 κυτταρικές σειρές.

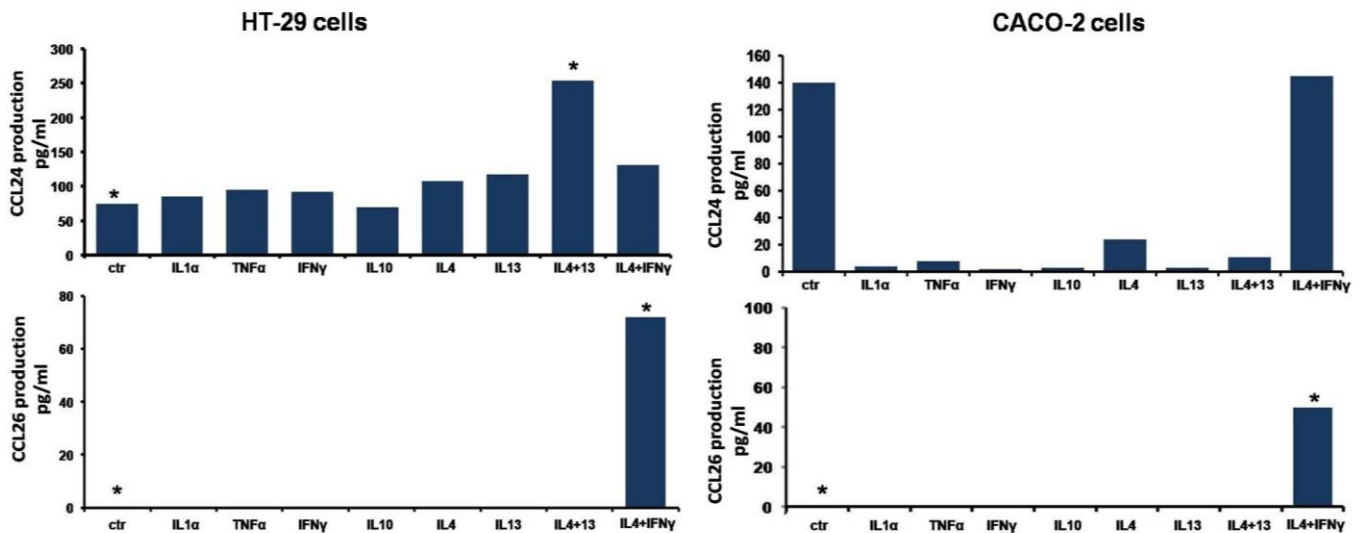


Πυκνομετρική ανάλυση των αποτελεσμάτων τριών ημιποσοτικών PCR για την έκφραση των γονιδίων των χημειοκινών σε επιθηλιακές κυτταροσειρές. Οι μετρήσεις έχουν εκφρασθεί ως ο λόγος της φωταύγειας των χημειοκινών προς αυτή του γονιδίου αναφοράς (GAPDH). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο μέσος όρος \pm στατιστικό σφάλμα (% της μέγιστης έκφρασης), και είναι ενδεικτικά του συνόλου των μετρήσεων. Η στατιστική σημαντικότητα συμβολίζεται ως * για $p < 0.05$.

β. Έκφραση σε επίπεδο πρωτεΐνης

Η παρατηρούμενη αυτή επαγωγή και ρύθμιση της έκφρασης του mRNA των CCR3 συνδεδεμένων χημειοκινών, επιβεβαιώθηκε και σε επίπεδο πρωτεΐνης στις κολονικές επιθηλιακές κυτταροσειρές. Σε επίπεδο πρωτεΐνης, μετρήθηκε η παραγωγή των τριών ηοταξινών στα υπερκείμενα HT-29 και Caco-2 κυτταρικών πληθυσμών 24 ώρες μετά την επίδραση συνδυασμού προ- και αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών. Ο συνδυασμός των Th1 και Th2 κυτταροκινών επιλέχθηκε γιατί παρουσίαζε τη μέγιστη παραγωγή χημειοκινών σε σύγκριση με κάθε κυτταροκίνη ξεχωριστά ή με το συνδυασμό Th1 με Th2 κυτταροκινών (**εικόνα 17**). Δεν παρατηρήθηκε παραγωγή CCL11/Eotaxin-1 σε αδιέγερτα HT-29 και κύτταρα. Παρατηρήθηκε ήπια αύξηση της CCL11 πρωτεΐνης μετά από διέγερση και των δύο κυτταρικών σειρών με Th1 κυτταροκίνες ($p < 0.05$), και ακόμη μεγαλύτερη αύξηση μετά από επίδραση συνδυασμού Th2 κυτταροκινών ($p < 0.001$). Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα και με την CCL24/Eotaxin-2 πρωτεΐνη. Όσον αφορά την CCL26/Eotaxin-3 παρατηρήθηκε παραγωγή της πρωτεΐνης μόνο κατόπιν επίδρασης των αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών (**εικόνα 18**).

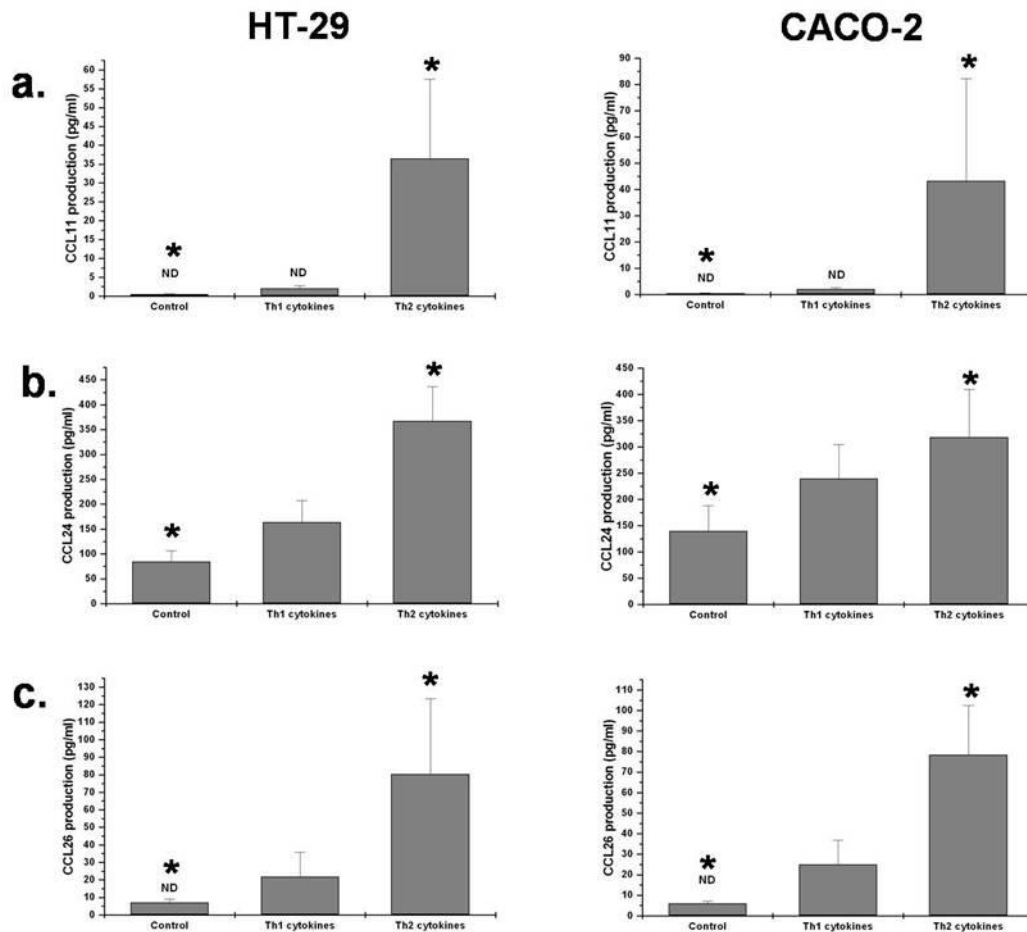
Εικόνα 17. Παραγωγή των CCR3 συνδεδεμένων χημειοκινών μετά την επίδραση προ- και αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών και διαφόρων συνδυασμών τους σε δύο κολονικές επιθηλιακές κυτταροσειρές.



Τα ραβδογράμματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο της έκφρασης±στατιστικό σφάλμα τριών μετρήσεων σε κάθε κυτταρική σειρά για κάθε χημειοκίνη. Η στατιστική σημαντικότητα συμβολίζεται ως * για $p < 0.05$.

Δεν παρατηρήθηκε παραγωγή CCL11/Eotaxin-1 με αυτούς τους συνδυασμούς κυτταροκινών. Ο συνδυασμός IL4 με IFN-γ προκαλούσε επαγωγή της CCL24/ eotaxin2 (130pg/ml στα HT-29 και 145pg/ml στα CACO2 κύτταρα) καθώς και της CCL26/eotaxin3 (72pg/ml στα HT-29 και 50pg/ml στα CACO2).

Εικόνα 18. Οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες σε συνδυασμό επάγουν την παραγωγή των CCR3 συνδεόμενων χημειοκινών σε δύο κολονικές επιθηλιακές κυτταροσειρές.



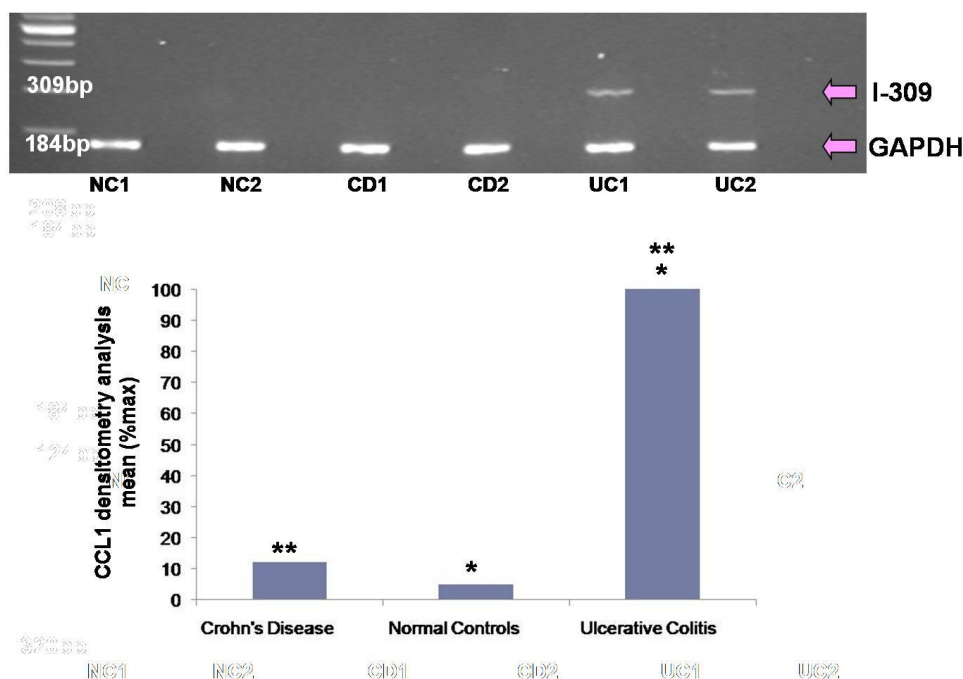
Τα ραβδογράμματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο της έκφρασης \pm στατιστικό σφάλμα έξι μετρήσεων σε κάθε κυτταρική σειρά για κάθε χημειοκίνη. Η στατιστική σημαντικότητα συμβολίζεται ως * για $p < 0.05$.

4.2.2. CCR8- συνδεόμενη χημειοκίνη

4.2.2.1. Έκφραση της CCR8 συνδεόμενης χημειοκίνης CCL1 σε βιοψίες κολονικού επιθηλίου

Σε βιοψίες παχέος εντέρου από 22 ασθενείς με Ελκώδη Κολίτιδα, 20 με Νόσο Crohn και 20 υγιείς μάρτυρες ανιχνεύτηκε η έκφραση mRNA της CCR8 συνδεόμενης χημειοκίνης CCL1 (I-309) με RT-PCR. Παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της I-309 χημειοκίνης σε φλεγμαίνοντες ιστούς ασθενών με Ελκώδη Κολίτιδα. Συγκεκριμένα έκφραση mRNA παρατηρήθηκε σε 18/22 ασθενείς με Ελκώδη Κολίτιδα, 1/20 με Νόσο Crohn και 1/20 υγιείς μάρτυρες (εικόνα 19).

Εικόνα 19. Έκφραση του mRNA της CCL1 (I-309) χημειοκίνης σε βιοψίες παχέος εντέρου ασθενών με Νόσο Crohn(CD), Ελκώδη Κολίτιδα(UC) και φυσιολογικών μαρτύρων(NC).



(a) Η εικόνα είναι αντιπροσωπευτική δύο ημιποσοτικών PCR για κάθε ασθενή χρησιμοποιώντας για σύγκριση το γονίδιο GAPDH σε 20 ασθενείς με Νόσο Crohn, 22 με Ελκώδη Κολίτιδα και 20 υγιείς μάρτυρες.

(b) Πυκνομετρική ανάλυση των αποτελεσμάτων της ημιποσοτικής PCR για την έκφραση του γονιδίου της I-309 στο κολονικό επιθήλιο ασθενών και υγιών μαρτύρων. Οι

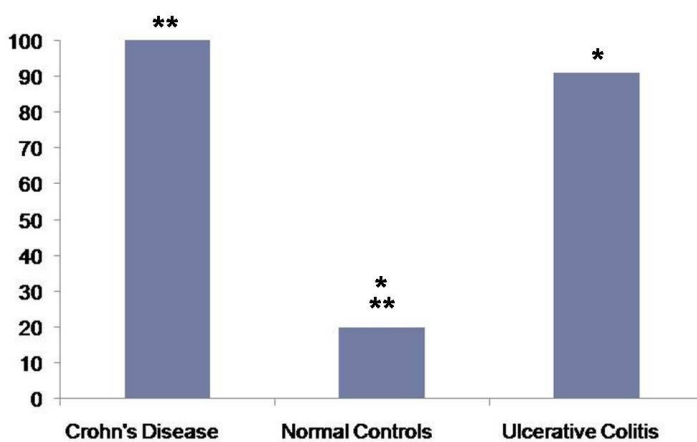
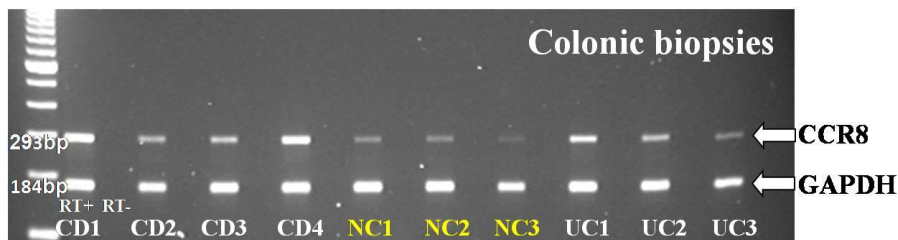
μετρήσεις έχουν εκφρασθεί ως ο λόγος της φωταύγειας των χημειοκινών προς αυτή του γονιδίου αναφοράς (GAPDH). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο μέσος όρος \pm στατιστικό σφάλμα (% της μέγιστης έκφρασης). Η στατιστική σημαντικότητα συμβολίζεται ως * για $p < 0.01$. Συνθήκες PCR: 35 κύκλοι, 58.5°C και αναλογία γονιδίων 1/7 για GAPDH/CCL1.

4.2.2.2. Έκφραση του mRNA του CCR8 υποδοχέα σε βιοψίες κολονικού επιθηλίου και σε ανοσομαγνητικά διαχωρισθέντα CD3+ λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος

Σε βιοψίες εντέρου 20 φυσιολογικών μαρτύρων, 20 ασθενών με Νόσο Crohn και 20 με Ελκώδη Κολίτιδα μελετήθηκε η έκφραση του CCR8 υποδοχέα σε επίπεδο mRNA με RT-PCR. Η έκφραση του CCR8 mRNA ήταν ελάχιστη στους φυσιολογικούς μάρτυρες (4/20), ενώ το 95% των ασθενών με Νόσο Crohn και το 88% αυτών με Ελκώδη Κολίτιδα εξέφραζαν CCR8 mRNA (**εικόνα 20**).

Επιπλέον η έκφραση του CCR8 υποδοχέα σε επίπεδο mRNA μελετήθηκε και σε ανοσομαγνητικά διαχωρισθέντα CD3+ περιφερικά λεμφοκύτταρα από τους ίδιους ασθενείς. Είναι αξιοσημείωτο ότι το CCR8 mRNA εκφράζονταν σε όλους τους φυσιολογικούς μάρτυρες, λιγότερο σε ασθενείς με Νόσο Crohn και ακόμη λιγότερο σε ασθενείς με Ελκώδη Κολίτιδα. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε έκφραση σε 20/20 φυσιολογικούς μάρτυρες, 17/20 ασθενείς με Νόσο Crohn και 10/22 ασθενείς με Ελκώδη Κολίτιδα (**εικόνα 21**).

Εικόνα 20. Έκφραση του mRNA του CCR8 υποδοχέα σε βιοψίες παχέος εντέρου ασθενών με Νόσο Crohn(CD), Ελκώδη Κολίτιδα(UC) και φυσιολογικών μαρτύρων(NC).

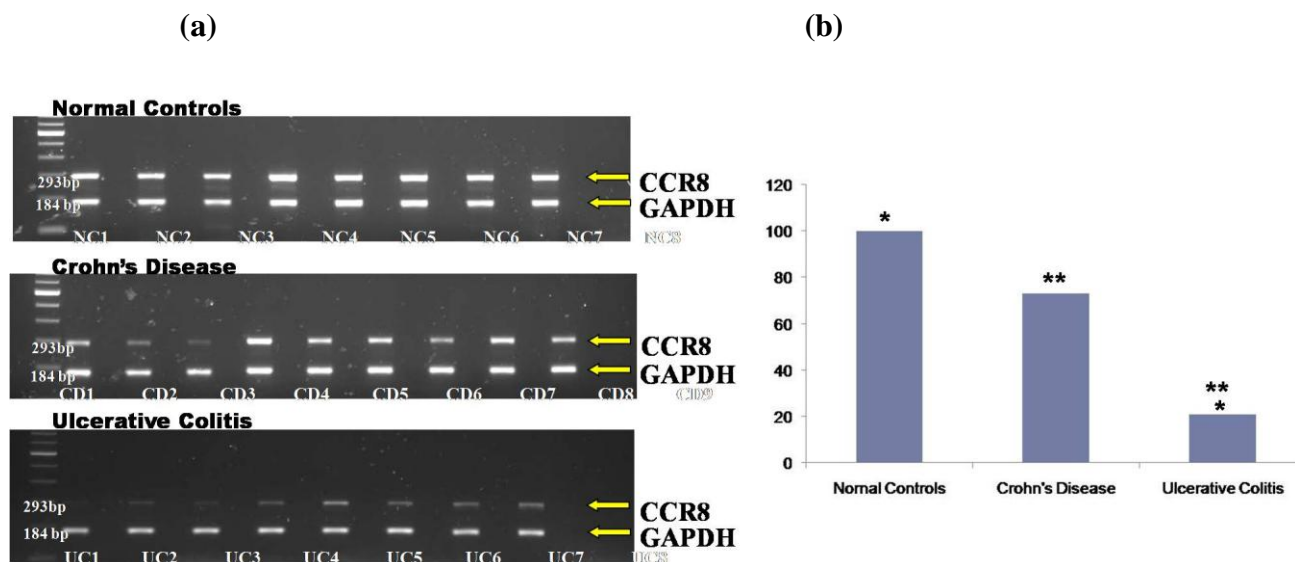


(a) Η εικόνα είναι αντιπροσωπευτική μιας ημιποσοτικής PCR για κάθε ασθενή χρησιμοποιώντας για σύγκριση το γονίδιο GAPDH σε 20 ασθενείς με Νόσο Crohn (CD), 22 με Ελκώδη Κολίτιδα (UC), και 20 υγιείς μάρτυρες (NC).

(b) Πυκνομετρική ανάλυση των αποτελεσμάτων των ημιποσοτικών PCR για την έκφραση του CCR8 στο κολονικό επιθήλιο ασθενών και υγιών μαρτύρων. Οι μετρήσεις έχουν εκφραστεί ως ο λόγος της φωταύγειας του υποδοχέα προς αυτή του γονιδίου αναφοράς (GAPDH). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο μέσος όρος \pm στατιστικό σφάλμα (% της μέγιστης έκφρασης).

* $p < 0.01$. Συνθήκες PCR: 35 κύκλοι, 57°C και αναλογία γονιδίων 1/5 GAPDH/CCR8.

Εικόνα 21. Έκφραση του mRNA του CCR8 υποδοχέα σε ανοσομαγνητικά διαχωρισθέντα CD3+ περιφερικά λεμφοκύτταρα ασθενών με Νόσο Crohn(CD), Ελκώδη Κολίτιδα(UC) και φυσιολογικών μαρτύρων(NC).



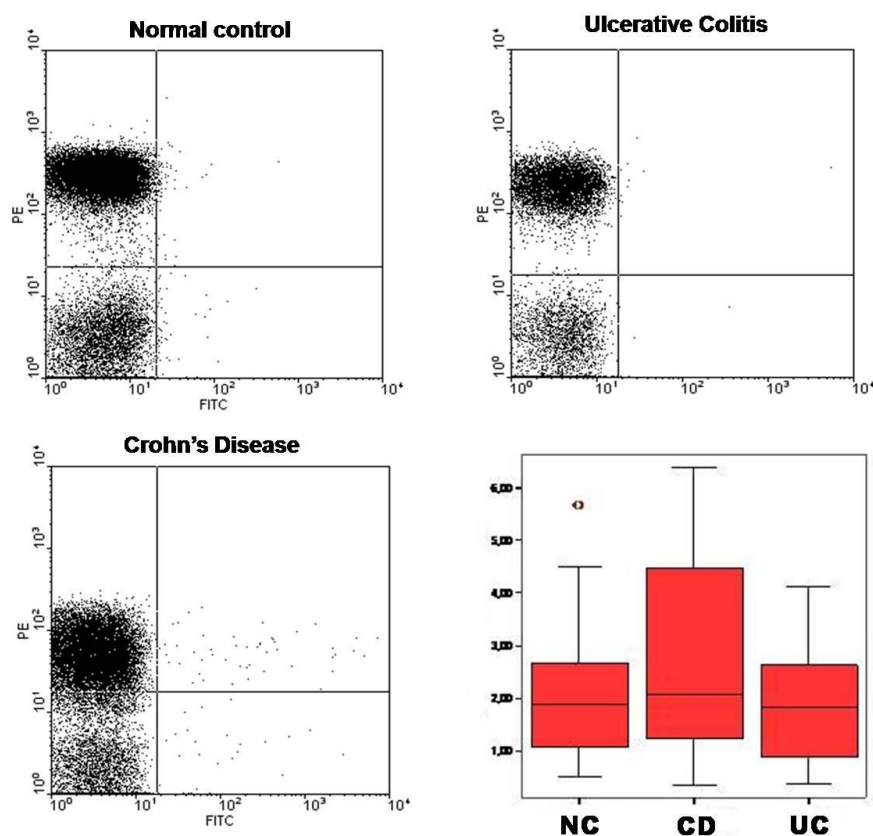
(a) Η εικόνα είναι αντιπροσωπευτική μιας ημιποσοτικής PCR για κάθε ασθενή χρησιμοποιώντας για σύγκριση το γονίδιο GAPDH σε 20 ασθενείς με Νόσο Crohn (CD), 22 με Ελκώδη Κολίτιδα (UC), και 20 υγιείς μάρτυρες (NC). Συνθήκες PCR: 35 κύκλοι, 57°C και αναλογία γονιδίων 1/2 GAPDH/CCR8.

(b) Πυκνομετρική ανάλυση των αποτελεσμάτων των ημιποσοτικών PCR για την έκφραση του CCR8 σε ανοσομαγνητικά διαχωρισθέντα CD3+ λεμφοκύτταρα. Οι μετρήσεις έχουν εκφραστεί ως ο λόγος της φωταύγειας του υποδοχέα προς αυτή του γονιδίου αναφοράς (GAPDH). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο μέσος όρος \pm στατιστικό σφάλμα (% της μέγιστης έκφρασης).

4.2.2.3 Κυτταρομετρία ροής CCR8

Το επόμενο βήμα ήταν η κυτταρομετρία ροής για CD3+CCR8+ κύτταρα σε ανοσομαγνητικά διαχωρισθέντα CD3+ T λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος που απομονώθηκαν από τους 22 ασθενείς με Ελκώδη Κολίτιδα, 20 με Νόσο Crohn και 20 υγιείς μάρτυρες και. Η κυτταρομετρία ροής ανέδειξε έκφραση του υποδοχέα CCR8 χωρίς σημαντικές διαφορές σε ασθενείς με Νόσο Crohn 2.76% (0.35 – 6.38%) και λιγότερο σε υγιείς μάρτυρες 2.2% (0.51 – 5.65%), και ασθενείς με Ελκώδη Κολίτιδα 1.95% (0.40 – 4.12%) (εικόνα 22).

Εικόνα 22. Στικτογράμματα κυτταρομετρίας ροής σε ανοσομαγνητικά διαχωρισθέντα CD3 περιφερικά κύτταρα για την έκφραση των διπλοθετικών CCR8+CD3+ κυττάρων.



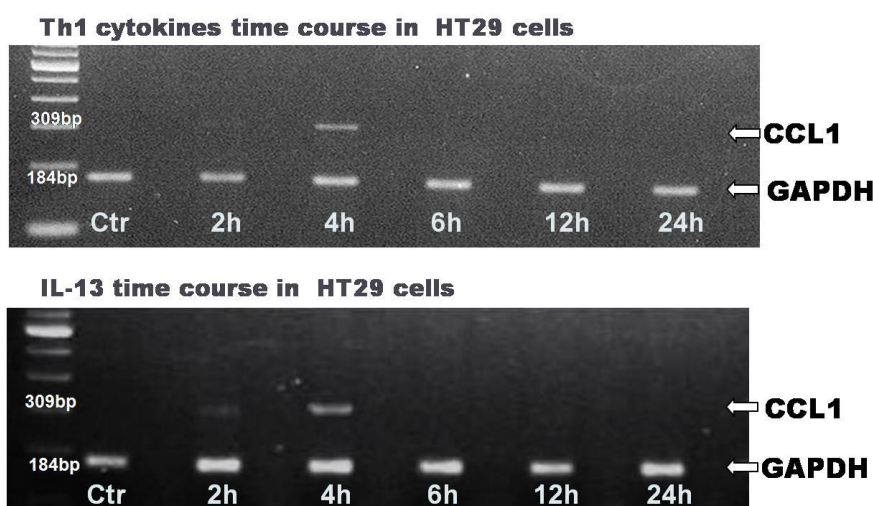
Τα ραβδογράμματα αντιπροσωπεύουν το μέσος όρο της έκφρασης των CCR8+CD3+ κυττάρων ± στατιστικό σφάλμα των ασθενών που εξετάστηκαν.

4.2.2.4. Παραγωγή CCL1 χημειοκίνης in vitro

Έκφραση σε επίπεδο mRNA

Προκειμένου να διερευνήσουμε τη συμμετοχή των επιθηλιακών κυττάρων μελετήσαμε in vitro στα HT-29 την έκφραση mRNA της CCL1 (I-309) χημειοκίνης μετά από επίδραση κυτταροκινών. Οι Th1 κυτταροκίνες (IL-1 α , TNF- α , IFN- γ) προκαλούσαν επαγωγή στην έκφραση mRNA της CCL1 4h μετά την επίδραση. Όμως, παρομοίως επίδραση με την προφλεγμονώδη κυτταροκίνη IL-13 προκαλούσε αύξηση της έκφρασης του mRNA 4h μετά την επίδραση (εικόνα 23).

Εικόνα 23. Επίδραση των Th1 κυτταροκινών και της αντιφλεγμονώδους IL-13 στην έκφραση mRNA της CCL1 (I-309) χημειοκίνης στην HT-29 κυτταρική σειρά.



Επίδραση των Th1 κυτταροκινών (IL-1 α , TNF- α και IFN- γ) (άνω) και της IL-13 (κάτω panel) στην έκφραση mRNA της CCL1 (I-309) χημειοκίνης στα HT-29 κύτταρα. Η εικόνα είναι αντιπροσωπευτική τριών ημιποσοτικών PCR χρησιμοποιώντας για σύγκριση το γονίδιο GAPDH. Ο λόγος της φωταύγειας των δύο γονιδίων χρησιμοποιήθηκε για την ημιποσοτική εκτίμηση του mRNA των τριών χημειοκινών.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

5.1. CXC χημειοκίνες

5.1.1. CXCR3 συνδεδεμένες χημειοκίνες

Τα mRNA των τριών CXCR3 συνδεδεμένων χημειοκινών (MIG, IP-10 και ITAC) ανευρίσκονται αυξημένα σε βιοψίες παχέος εντέρου ασθενών με Νόσο Crohn (CD).

Παρομοίως ανευρίσκονται αυξημένα τα επίπεδα των MIG και ITAC χημειοκινών στον ορό των ασθενών με Νόσο Crohn και λιγότερο με Ελκώδη Κολίτιδα σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες.

Προκειμένου να διευκρινιστεί ο ρόλος των επιθηλιακών κυττάρων στην παραγωγή αυτή των CXCR3- συνδεδεμένων χημειοκινών, προχωρήσαμε σε *in vitro* πειράματα με HT-29 και Caco-2 κολονικά επιθηλιακά κύτταρα. Αδιέγερτα τα κύτταρα δεν εξέφραζαν καμία από τις χημειοκίνες που μελετήσαμε. Διέγερση με συνδυασμό Th1 κυτταροκινών - IL-1α, TNF-α και IFN-γ - προκαλούσε εξαρτώμενη από το χρόνο επαγωγή του mRNA των τριών χημειοκινών MIG, IP-10 και I-TAC και στις δύο κυτταρικές σειρές. Επίδραση των Th2 αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-4, IL-10, IL-13) στην επαγόμενη από τις Th1 κυτταροκίνες (IL-1α, TNF-α και IFN-γ) έκφραση του mRNA των τριών CXCR3 συνδεδεμένων χημειοκινών είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της έκφρασης του mRNA των χημειοκινών αυτών και στις δύο επιθηλιακές κυτταρικές σειρές. Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα και σε επίπεδο πρωτεΐνης όπου επίδραση των αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών IL-4, IL-10 και IL-13 προκαλούσε σημαντική μείωση των επαγόμενων από της Th1 κυτταροκίνες, MIG, IP-10 και I-TAC πρωτεϊνών και στις δύο κυτταρικές σειρές με εξαίρεση την I-TAC χημειοκίνη στα HT-29 κύτταρα η οποία δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική μείωση.

Ο υποδοχέας των χημειοκινών αυτών, CXCR3 ανιχνεύτηκε σημαντικά αυξημένος με κυτταρομετρία ροής σε CD3⁺ ανοσομαγνητικά διαχωρισθέντα περιφερικά λεμφοκύτταρα ασθενών με Νόσο Crohn και λιγότερο με Ελκώδη Κολίτιδα σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. Παρόμοιο μοτίβο ακολουθεί και η ενδοκυττάρια έκφραση του CXCR3.

Σε ανοσομαγνητικά διαχωρισθέντα CD3⁺ περιφερικά λεμφοκύτταρα από ασθενείς με Νόσο Crohn παρατηρήθηκε κυρίως έκφραση mRNA του CXCR3B υποδοχέα, του μεταγραφικού αλληλίου που προέρχεται από διαφορετικό πάντρεμα των βάσεων του CXCR3 ο οποίος μετονομάστηκε σε CXCR3A. Αντίθετα υγιείς μάρτυρες εξέφραζαν κυρίως

το mRNA του CXCR3A ενώ στην Ελκώδη Κολίτιδα παρατηρήθηκε παρόμοια έκφραση CXCR3A και CXCR3B.

In vitro επιδράσεις στη λευχαιμική κυτταρική σειρά Jurkat έδειξαν επαγωγή των CXCR3A και CXCR3B mRNAs μετά από επίδραση με IFN- γ , ενώ η IL-1 α προκαλούσε επαγωγή μόνο του CXCR3B mRNA. Επίδραση TNF- α είχε ως αποτέλεσμα επαγωγή του CXCR3A.

5.2. CC χημειοκίνες

5.2.1. CCR3 συνδεδεμένες χημειοκίνες

Σε βιοψίες παχέος εντέρου από ασθενείς με Ελκώδη Κολίτιδα, Νόσο Crohn και υγιείς μάρτυρες παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση του mRNA και των τριών CCR3 συνδεδεμένων χημειοκινών – CCL11 (eotaxin), CCL24 (eotaxin 2) και CCL26 (eotaxin 3) - σε φλεγμαίνοντες ιστούς ασθενών με Ελκώδη Κολίτιδα σε σχέση με φυσιολογικούς μάρτυρες και ασθενείς με Νόσο Crohn.

Αυξημένα επίπεδα CCL11/Eotaxin-1 βρέθηκαν τόσο σε ασθενείς με Ελκώδη Κολίτιδα όσο και σε αυτούς με Νόσο Crohn σε σχέση με φυσιολογικούς μάρτυρες. Η CCL24/Eotaxin-2 ανιχνεύτηκε αυξημένη σε ασθενείς με Ελκώδη Κολίτιδα και λιγότερο σε Νόσο Crohn και φυσιολογικούς μάρτυρες. Παρομοίως και η CCL26/Eotaxin-3 ανιχνεύτηκε σημαντικά αυξημένη σε ασθενείς με Ελκώδη Κολίτιδα σε σχέση με φυσιολογικούς μάρτυρες και ασθενείς με Νόσο Crohn. Συνολικά και οι τρεις χημειοκίνες που συνδέονται στον CCR3 υποδοχέα βρέθηκαν αυξημένες στον ορό ασθενών με Ελκώδη Κολίτιδα.

Προκειμένου να διερευνήσουμε τη συμμετοχή των επιθηλιακών κυττάρων μελετήσαμε in vitro στις HT-29 και Caco-2 κυτταρικές σειρές την έκφραση mRNA και την παραγωγή των χημειοκινών αυτών μετά από επίδραση κυτταροκινών. Επίδραση του συνδυασμού των Th1 κυτταροκινών είχε ως αποτέλεσμα σημαντική αύξηση του mRNA της CCL26/Eotaxin-3 και στις δύο κυτταρικές σειρές καθώς και των χημειοκινών CCL11/Eotaxin-1 και CCL24/Eotaxin-2 σε μικρότερο βαθμό. Επίδραση με το συνδυασμό των προφλεγμωνωδών κυτταροκινών Th2 προκάλεσε σημαντική επαγωγή mRNA και των τριών χημειοκινών, CCL11/Eotaxin-1 και στις δύο κυτταρικές σειρές.

Αλλά και σε επίπεδο πρωτεΐνης, οι Th2 προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες σε συνδυασμό επάγουν την παραγωγή των CCR3 συνδεδεμένων χημειοκινών και στις δύο κολονικές επιθηλιακές κυτταροσειρές.

Όσον αφορά τον υποδοχέα των χημειοκινών αυτών CCR3, η έκφραση του mRNA ήταν μέγιστη σε βιοψίες κολονικού βλεννογόνου ασθενών με Ελκώδη Κολίτιδα (95%), σε σχέση με φυσιολογικούς μάρτυρες (20%). Έκφραση παρατηρήθηκε και στο 65% των ασθενών με Νόσο Crohn. Η έκφραση αυτή παρουσιάζονταν ανεξάρτητα από την ενεργότητα της νόσου και το βαθμό φλεγμονής του κολονικού βλεννογόνου.

Η κυτταρομετρία ροής σε ανοσομαγνητικά διαχωρισθέντα CD3+ κύτταρα ανέδειξε έκφραση του υποδοχέα CCR3 κυρίως σε ασθενείς με Ελκώδη Κολίτιδα, λιγότερο σε Νόσο Crohn και σχεδόν καθόλου σε υγιείς μάρτυρες. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν μια αύξηση των CD3+CCR3+ λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος σε ασθενείς με Ελκώδη Κολίτιδα που θα μπορούσαν να αντιπροσωπεύουν ενεργοποιημένα κυκλοφορούντα T λεμφοκύτταρα.

5.2.2. CCR8 συνδεδεμένη χημειοκίνες

Σε βιοψίες παχέος εντέρου από ασθενείς με Ελκώδη Κολίτιδα, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση του mRNA της CCL1 (I-309) χημειοκίνης σε σχέση με ασθενείς με Νόσο Crohn και υγιείς μάρτυρες.

Προκειμένου να διερευνήσουμε τη συμμετοχή των επιθηλιακών κυττάρων μελετήσαμε *in vitro* στα HT-29 κύτταρα την έκφραση mRNA της CCL1 (I-309) χημειοκίνης μετά από επίδραση κυτταροκινών. Τόσο οι Th1 κυτταροκίνες όσο και οι IL-13 προκαλούσαν παρόμοια επαγωγή στην έκφραση mRNA της CCL1 4h μετά την επίδραση.

Στις βιοψίες παχέος εντέρου των ασθενών αυτών μελετήθηκε και η έκφραση του CCR8 υποδοχέα σε επίπεδο mRNA. Η έκφραση του CCR8 mRNA ήταν ελάχιστη στους φυσιολογικούς μάρτυρες, ενώ το 95% των ασθενών με Νόσο Crohn και το 88% αυτών με Ελκώδη Κολίτιδα εξέφραζαν CCR8 mRNA.

Επιπλέον η έκφραση του CCR8 υποδοχέα σε επίπεδο mRNA μελετήθηκε και σε ανοσομαγνητικά διαχωρισθέντα CD3+ περιφερικά λεμφοκύτταρα από τους ίδιους ασθενείς. Είναι αξιοσημείωτο ότι το CCR8 mRNA εκφράζονταν σε όλους τους φυσιολογικούς

μάρτυρες, λιγότερο σε ασθενείς με Νόσο Crohn και ακόμη λιγότερο σε ασθενείς με Ελκώδη Κολίτιδα ακολουθώντας αντίθετο τρόπο έκφρασης από το βλεννογόνο του παχέος εντέρου.

Πάραυτα, η κυτταρομετρία ροής για διπλοθετικά CD3+CCR8+ κύτταρα σε ανοσομαγνητικά διαχωρισθέντα CD3+ T λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος ανέδειξε έκφραση του υποδοχέα CCR8 χωρίς σημαντικές διαφορές σε ασθενείς με Νόσο Crohn και λιγότερο σε υγιείς μάρτυρες, και ασθενείς με Ελκώδη Κολίτιδα.

6. Συζήτηση

6.1 Συζήτηση

Το επιθήλιο του εντέρου αποτελεί μέρος ενός ολοκληρωμένου ανοσολογικού δικτύου που περιλαμβάνει επίσης μακροφάγα, κύτταρα του λεμφικού συστήματος αλλά και αντισώματα, χημειοκίνες και κυτταροκίνες. Τα αντιγόνοπαρουσιαστικά κύτταρα όπως τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα, και τα T λεμφοκύτταρα με την έκκριση κυτταροκινών διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην ενορχήστρωση της ανοσολογικής απάντησης(75) (76). Ειδικότερα, οι κυτταροκίνες οι οποίες παράγονται από τους T-κυτταρικούς υποπληθυσμούς και η μεταγραφική ρύθμιση της διαφοροποίησης των T κυττάρων φαίνεται να είναι θεμελιώδους σημασίας για την ανοσολογική απόκριση του βλεννογόνου (77) (314).

Η εκδήλωση της Νόσου Crohn και της Ελκώδους Κολίτιδας είναι αποτέλεσμα ενός καταρράκτη αντιδράσεων ανοσολογικής φύσης. Η αλληλεπίδραση ξενιστή με τον παθογόνο εισβολέα στην επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων κηρύσσει την έναρξη των φλεγμονωδών αντιδράσεων. Ακολουθεί η αλληλεπίδραση των αντιγόνοπαρουσιαστικών κυττάρων με τα 'αδιέγερτα' T κύτταρα. Η ενεργοποίηση των κυττάρων αυτών τα οδηγεί μέσω της δράσης προφλεγμονωδών κυτταροκινών σε διαφοροποίηση προς Th1, Th2, Th17, και NK κύτταρα. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυκλοφορούντων λευκοκυττάρων και των παραγόμενων κυτταροκινών έχουν ως αποτέλεσμα τη μετανάστευση λεμφοκυττάρων προς το χόριο μέσω των υποδοχέων των ενδοθηλιακών κυττάρων (64). Ταυτοχρόνως υπό την επίδραση αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών, κυρίως του TGFb, άλλα αδιέγερτα T λεμφοκύτταρα διαφοροποιούνται προς Ρυθμιστικά T κύτταρα (Treg), που αναστέλλουν την ανοσολογική απάντηση. Διαταραχή στην ανοσολογική αυτή ισορροπία προκαλεί την εμφάνιση φλεγμονής.

Αρχικά υπήρχε η αντίληψη ότι η Νόσος Crohn ήταν αποτέλεσμα Th1 ανοσολογικής απόκρισης και η Ελκώδης Κολίτιδα Th2 ανοσολογικής απάντησης (315-317) (318). Η θεωρία αυτή πρόσφατα αμφισβητήθηκε από πολλούς ερευνητές (319) (320). Παρατήρησαν ότι σε ιστούς ασθενών με Ελκώδη Κολίτιδα δεν ανιχνεύονταν IL4 και επιπλέον υπήρχαν αυξημένα επίπεδα τόσο IL-13 όσο και IFN-γ (57). Μια άλλη ομάδα ερευνητών υποστήριξε ότι η IL-13 στους φλεγμαίνοντες ιστούς των ασθενών αυτών παράγεται από τα NK- κύτταρα (48), και στρέφεται εναντίον των επιθηλιακών κυττάρων με στόχο τη δυσλειτουργία του επιθηλίου (56).

Επιπλέον, ο ρόλος των χημειοκινών και των υποδοχέων τους στην ανοσολογική ρύθμιση του βλεννογόνου του εντέρου, μελετήθηκε σε μοντέλα πειραματόζωων. Ποντίκια με έλλειψη CCR5 υποδοχέα εμφανίστηκαν ανθεκτικά στη επαγωγή κολίτιδας μέσω προσθήκης νατριοθειούχου δεξτράνης (DSS) στο πόσιμο νερό (78). Εναλλακτικά χρήση αντισωμάτων εναντίον του CCR2 υποδοχέα ή εναντίον του συνδυασμού CCR5 και CXCR3, είχε ως αποτέλεσμα μειωμένο επιπολασμό κολίτιδας στα ίδια ποντίκια (78). Η προστασία αυτή του βλεννογόνου από την επαγόμενη με DSS κολίτιδα οφείλονταν στην κατάργηση της μετανάστευσης των λευκοκυττάρων προς των εντερικό βλεννογόνο λόγω του φαρμακολογικού αποκλεισμού των υποδοχέων χημειοκινών CCR2, CCR5 και CXCR3 (79). Η ευρεία έκφραση αυτών των υποδοχέων από τα μονοκύτταρα και T λεμφοκύτταρα, των οποίων ο ρόλος είναι γνωστός στην παθογένεση των ΙΦΕΝ, είχε ως αποτέλεσμα την άρση της μετανάστευσης των κυττάρων αυτών του ανοσοποιητικού προς το βλεννογόνο. Η θεωρία αυτή, ενισχύθηκε περαιτέρω μετά από πρόσφατες μελέτες σε πειραματικά μοντέλα φλεγμονής στις οποίες η παρουσία T λεμφοκυττάρων στο έντερο επιδείνωνε υπάρχουσες ανωμαλίες του επιθηλιακού φραγμού με συνέπεια την επιδείνωση της φλεγμονής (80; 81).

Και ενώ αρκετές μελέτες εμπλέκουν την αλληλεπίδραση των επιθηλιακών κυττάρων μέσω της έκφρασης των χημειοκινών με τα κυκλοφορούντα T λεμφοκύτταρα και την μετανάστευσή τους προς το βλεννογόνο ασθενών με ΙΦΕΝ, η έκφραση και λειτουργία των χημειοκινών αυτών σε ασθενείς με ΙΦΕΝ έχει μελετηθεί ελάχιστα ως σήμερα (82). Ετσι σε προκαταρκτικές μελέτες, έκφραση των υποδοχέων χημειοκινών από τα επιθηλιακά κύτταρα του λεπτού και παχέος εντέρου παρατηρήθηκε σε συνδυασμό με την παραγωγή χημειοκινών από τα εν λόγω κύτταρα (83; 84). Οι αρχικές αυτές μελέτες απέδωσαν περιορισμένο λειτουργικό ρόλο στους υποδοχείς χημειοκινών - μέσω της αλληλεπίδρασης με πρόσθετες χημειοκίνες ή μέσω της έκφρασης προσκολλητικών μορίων - για την τροποποίηση της ανοσολογικής απάντησης των επιθηλιακών κυττάρων σε καταστάσεις φλεγμονής (83) (84). Πρόσφατα όμως στοιχεία από διάφορα ερευνητικά κέντρα προσδίδουν έναν ουσιώδη ρόλο στη πρόσδεση υποδοχέων - χημειοκινών όσον αφορά τη διατήρηση ή αποκατάσταση του επιθηλιακού φραγμού υπό συνθήκες φλεγμονής (85-87).

Στη παρούσα μελέτη εξετάσαμε την έκφραση του CXCR3 υποδοχέα εκ των CXC χημειοκινών και του CCR3 υποδοχέα εκ των CC χημειοκινών καθώς και τις χημειοκίνες που συνδέονται με αυτούς τόσο στο εντερικό επιθήλιο όσο και στα κυκλοφορούντα T λεμφοκύτταρα ασθενών με Νόσο Crohn και Ελκώδη Κολίτιδα. Επιπλέον μελετήσαμε την έκφραση και παραγωγή των CCR3 και CXCR3-συνδεόμενων χημειοκινών σε κολονικές

επιθηλιακές κυτταροσειρές *in vitro* κατόπιν επίδρασης με Th1 και Th2 παραγόμενες κυτταροκίνες.

Στη μελέτη μας παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση του CXCR3 υποδοχέα σε ανοσομαγνητικά διαχωρισθέντα CD3+ λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος από ασθενείς με Νόσο Crohn και Ελκώδη Κολίτιδα σε σύγκριση με φυσιολογικούς μάρτυρες. Αυτή η έκφραση ήταν υψηλότερη στους ασθενείς με Νόσο Crohn σε σύγκριση με αυτούς με Ελκώδη Κολίτιδα, χωρίς η διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική. Σέ προηγούμενες μελέτες, ο CXCR3 υποδοχέας φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση των ΙΦΕΝ.

Έκφραση του CXCR3 υποδοχέα ανευρέθει στο 80-90% των CD4 + T-κυττάρων που απομονώθηκαν από ποντίκια με κολίτιδα σε σύγκριση με μόνο 4-10% των CD4 + T-κυττάρων που εκφράζουν CXCR3 σε ποντίκια χωρίς κολίτιδα (321). Αυξημένη έκφραση CXCR3 αναφέρθηκε και σε CD4+ T κύτταρα απομονωμένα από το χόριο ασθενών με Νόσο Crohn και Ελκώδη Κολίτιδα σε σχέση με υγιείς μάρτυρες χωρίς όμως να υπάρχουν διαφορές μεταξύ των ασθενών με Crohn και ελκώδη κολίτιδα (244). Μια άλλη ερευνητική ομάδα έδειξε έκφραση του CXCR3 υποδοχέα και των συνδεδεμένων χημειοκινών σε ενδοεπιθηλιακά λεμφοκύτταρα και επιθηλιακά κύτταρα εντέρου (322). Έχει αποδειχθεί επίσης έκφραση του υποδοχέα CXCR3 στην πλειοψηφία των CD4+ T λεμφοκυττάρων της βασικής μεμβράνης και σε ομάδα των T λεμφοκυττάρων των μεσεντέριων λεμφαδένων ασθενών με Νόσο Crohn αλλά και Ελκώδη Κολίτιδα (247). Οι ίδιοι ερευνητές καταδεικνύουν ως πιθανότερη θέση διαφοροποίησης των CXCR3+ CD4 T λεμφοκυττάρων τους μεσεντέριους λεμφαδένες. Το φαινόμενο αυτό λαμβάνει χώρα πριν την πόλωση τους προς Th1 λεμφοκύτταρα.

Η μελέτη μας σε επίπεδο mRNA ανέδειξε ένα διαφορετικό πρότυπο έκφρασης του mRNA του CXCR3 με μείωση του mRNA του CXCR3A σε ανοσομαγνητικά διαχωρισθέντα CD3+ λεμφοκύτταρα ασθενών με Νόσο Crohn σε σχέση με υγιείς μάρτυρες (313). Πρόσφατα περιγράφηκε η ύπαρξη ενός νέου υποδοχέα που προέρχεται από διαφορετική σύνδεση των βάσεων του CXCR3 γονιδίου και ονομάστηκε CXCR3B. Το διαφορετικό αυτό πάντρεμα των βάσεων πραγματοποιείται από την ίδια περιοχή με αυτή που προκύπτει ο CXCR3 υποδοχέας (που μετονομάστηκε σε CXCR3A), σε συνδυασμό με άλλη μια θέση που βρίσκεται στο ιντρόνιο του CXCR3. Μετάφραση του CXCR3B mRNA έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός υποδοχέα 416 αμινοξέων ο οποίος περιέχει ένα μεγαλύτερο μήκος αμινοτελικό άκρο διαφορετικό κατά 52 αμινοξέα από τον CXCR3A υποδοχέα (242; 247; 323). Ο CXCR3B εκφράζεται κυρίως σε ενδοθηλιακά κύτταρα και ενεργοποιημένα T

λεμφοκύτταρα. Εξετάσαμε περαιτέρω την έκφραση του CXCR3B σε μαγνητικά διαχωρισθέντα CD3+ κύτταρα περιφερικού αίματος. Η έκφραση mRNA του CXCR3B ήταν αυξημένη σε ασθενείς με Νόσο Crohn, γεγονός που εξηγεί τα ευρήματα της κυτταρομετρίας ροής, την αυξημένη δηλαδή έκφραση του CXCR3 υποδοχέα σε CD3+ κύτταρα στους ίδιους ασθενείς. Είναι αξιοσημείωτο ότι σε κανέναν ασθενή με Νόσο Crohn δεν συνυπήρχε έκφραση των CXCR3A και CXCR3B mRNAs. Ασθενείς με Ελκώδη Κολίτιδα και υγιείς μάρτυρες εξέφραζαν κυρίως το mRNA του CXCR3A.

Έκφραση του mRNA του CXCR3B έχει αναφερθεί και σε άλλους ιστούς όπως των νεφρών, του ήπατος, των σκελετικών μυών, και των επιθηλιακών κυττάρων των αεραγωγών οι οποίοι εκφράζουν και τα CXCR3 mRNAs, ενώ άλλοι ιστοί όπως ο πλακούντας και τα μεσεγχυματικά κύτταρα εκφράζουν το ένα από τα δύο mRNAs. Έχει αναφερθεί ότι όταν η CXCL10/ IP-10 προσδένεται στον CXCR3A οδηγεί σε πολλαπλασιασμό των κυττάρων και χημειοταξία, ενώ η σύνδεση της IP-10 με τον CXCR3B έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της ανάπτυξης (324-326) (327).

Το επόμενο βήμα ήταν να εξετάσουμε τον τρόπο επαγωγής της έκφρασης του CXCR3 mRNA στα CD3+ περιφερικά λεμφοκύτταρα. Προβήκαμε σε επιδράσεις *in vitro* στην T λευχαιμική κυτταροσειρά Jurkat. Διέγερση των κυττάρων με Th1 κυτταροκίνες προκαλούσε μια επιλεκτική έκφραση του CXCR3A ή CXCR3B mRNA ανάλογα με τη κυτταροκίνη. Η IL-1α προκαλούσε επαγωγή του mRNA του μεταγραφικού αλληλίου CXCR3B, σε αντίθεση με τον TNF-α ο οποίος προκαλούσε επαγωγή του CXCR3A στα Jurkat κύτταρα. Αυτό υποδηλώνει ότι τα δύο μεταγραφικά αλληλία του CXCR3 mRNA εμπλέκονται σε διαφορετικά μονοπάτια κυτταροκινών. Επιπλέον η διέγερση με το υπερκείμενο των HT-29 κυττάρων κατόπιν επίδρασης με το συνδυασμό των τριών κυτταροκινών είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή του μεταγραφικού αλληλίου του CXCR3B, πιθανώς μέσω διαλυτών μεσολαβητών που παράγονται από τα HT-29 κύτταρα. Το τελευταίο υποδηλώνει ότι τα επιθηλιακά κύτταρα του παχέος εντέρου μπορεί να συμμετέχουν στη μετανάστευση των T λεμφοκυττάρων στον φλεγμαίνοντα βλεννογόνο του παχέος εντέρου. Αυτή η εκλεκτική έκφραση του CXCR3B ή του CXCR3A ανάλογα με την κυτταροκίνη διεγέρτη ανοίγει νέους δρόμους στη μελέτη του μηχανισμού επαγωγής του CXCR3 mRNA στα πλαίσια των διαφόρων φλεγμονωδών αντιδράσεων όπου πιθανόν κινητοποιούνται διαφορετικά μονοπάτια μεταδόσεως σημάτων.

Η διαφορετική απάντηση στη διέγερση διαφορετικών κυτταροκινών μπορεί να μας οδηγήσει σε μια εναλλακτική προσέγγιση για τις μελλοντικές μελέτες που βασίζονται στη χρήση των διαφορετικών κυτταροκινών στην κλινική πράξη, για παράδειγμα χρήση αντι-IL-1α, για τους ασθενείς που δεν ανταποκρίνονται στον αντι TNF-α. Έτσι, η πιθανή βιολογική σημασία των μεταγραφικών αλληλίων του CXCR3 mRNA σε ασθενείς με Νόσο του Crohn χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Στη συνέχεια ερευνήσαμε την παραγωγή και ρύθμιση των CXCR3 συνδεόμενων χημειοκινών, καθώς αυξημένα επίπεδα των CXCL9, CXCL10 και CXCL11 έχουν αναφερθεί και από άλλες ερευνητικές ομάδες (328) (329). Στη μελέτη μας, αυξημένη έκφραση του mRNA των τριών χημειοκινών παρατηρήθηκε σε βιοψίες κολονικού επιθηλίου από ασθενείς με Νόσο Crohn και λιγότερο από αυτούς με Ελκώδη Κολίτιδα σε σχέση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες. Στα *in vitro* πειράματά μας, διέγερση με τις Th1 κυτταροκίνες προκαλούσε επαγωγή των CXCR3 συνδεόμενων χημειοκινών και στις δυο κολονικές κυτταροσειρές HT-29 και Caco-2 που μελετήθηκαν. Σε προηγούμενες μελέτες έχει ήδη αναφερθεί η κατασταλτική δράση των αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών στη διάρκεια της φλεγμονώδους αντίδρασης (228). Με βάση αυτά τα ευρήματα προχωρήσαμε *in vitro* σε επίδραση των αντίφλεγμονωδών κυτταροκινών IL-4, IL-10, και IL-13, μόνες τους ή σε συνδυασμό με προφλεγμονώδεις Th1 κυτταροκίνες. Είναι ενδιαφέρον ότι παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της επαγόμενης από τις Th1 κυτταροκίνες έκφρασης του mRNA των MIG, IP-10, and I-TAC χημειοκινών μετά την επίδραση των Th2 αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών.

Προκειμένου να μελετήσουμε την ρύθμιση της έκφρασης των χημειοκινών αυτών από τις Th1 και Th2 κυτταροκίνες σε επίπεδο πρωτεΐνης, το επόμενο βήμα μας ήταν η μέτρηση πρωτεΐνης με την ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA τόσο στα υπερκείμενα των κυτταρικών σειρών όσο και στους ορούς των ασθενών και υγιών μαρτύρων που μελετήθηκαν. Υπήρξε μια στατιστικά σημαντική παραγωγή των MIG και I-TAC πρωτεϊνών στον ορό ασθενών με Νόσο Crohn σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες. Η παραγωγή της MIG πρωτεΐνης ήταν σημαντικά υψηλότερη στους ασθενείς αυτούς ακόμη και σε σύγκριση με ασθενείς με Ελκώδη Κολίτιδα. Αυξημένα επίπεδα χημειοκινών στον ορό ασθενών με ΙΦΕΝ έχουν αναφερθεί και από άλλες ερευνητικές ομάδες (329) (328). Επιπλέον η CXCL10 επάγεται σε ασθενείς με Ελκώδη Κολίτιδα (248; 249) (250) ενώ σε ιστούς ασθενών με Νόσο Crohn παρατηρήθη έκφραση CXCL9 και CXCR3 (244; 251) (247). Η δική μας μελέτη αποκαλύπτει

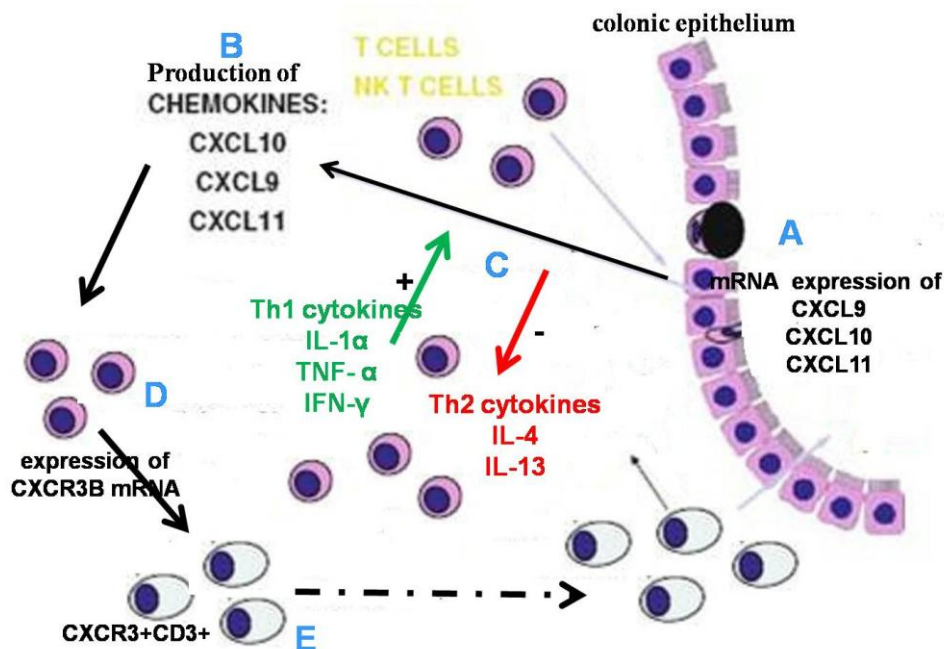
μία στατιστικά σημαντική διαφορά στην παραγωγή χημειοκινών μεταξύ των ασθενών με Νόσο Crohn και αυτών με Ελκώδη Κολίτιδα.

Είναι γνωστός ο ρόλος των CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, και CXCL11/I-TAC χημειοκινών στην προσέλκυση T λεμφοκυττάρων σε θέσεις φλεγμονής μέσω αλληλεπίδρασης χημειοκίνης – υποδοχέα και ενίσχυσης της Th1 ανοσολογικής απόκρισης (322) (330). Η επαγωγή της έκφρασης του CXCR3 με επαγωγή του μεταγραφικού του αλληλίου CXCR3B mRNA στα περιφερικά λεμφοκύτταρα, σε συνδυασμό με τα αυξημένα επίπεδα των CXCL9/MIG και CXCL11/I-TAC χημειοκινών παραγόμενες και από τα κολονικά επιθηλιακά κύτταρα, όπως δηλώνουν τα ευρήματά μας στον ιστό και στις επιθηλιακές κυτταροσειρές, υποδεικνύουν μια αλληλεπίδραση μεταξύ των CXCR3+CD3+ κυττάρων περιφερικού αίματος και των παραγόμενων χημειοκινών από τον φλεγμαίνοντα βλεννογόνο ασθενών με Νόσο Crohn και εν μέρει με Ελκώδη Κολίτιδα. Οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL-1 α , TNF- α , and IFN- γ , επάγουν την έκφραση των CXCR3 συνδεόμενων χημειοκινών και η επαγωγή αυτή αναστέλλεται από τις Th2 κυτταροκίνες IL-4, IL-10 και IL-13. Το μεταγραφικό αλληλίο του CXCR3, CXCR3B, παρά τις σοβαρές δομικές αλλαγές, εξακολουθεί να βρίσκεται στην επιφάνεια των κυττάρων που το εκφράζουν και να ρυθμίζει λειτουργικές δραστηριότητες της CXCL11/ITAC χημειοκίνης (323).

Εν κατακλείδι, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι σε ασθενείς κυρίως με Νόσο Crohn η αλληλεπίδραση χημειοκινών – υποδοχέα έχει ως αποτέλεσμα την μετανάστευση των CD3+ κυττάρων που φέρουν τον υποδοχέα αυτό προς το βλεννογόνο των ασθενών με Νόσο Crohn. Στους περιορισμούς της μελέτης αυτής ήταν ότι δεν αποδείξαμε την έκφραση του CXCR3 υποδοχέα στο βλεννογόνο του παχέος εντέρου με ανοσοιστοχημεία, ούτε διεξάγαμε πειράματα χημειοταξίας ώστε να αποδείξουμε την μετανάστευση των λεμφοκυττάρων προς τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου (**εικόνα 6.1**).

Εικόνα 6.1. Υποθετικό μοντέλο πυροδότησης των φλεγμονωδών αντιδράσεων σε ασθενείς με Νόσο Crohn στηριζόμενο στα ευρήματά μας.

Crohn's Disease



(A). Τα mRNA των MIG, IP-10 και ITAC ανευρίσκονται αυξημένα σε βιοψίες παχέος εντέρου ασθενών με Νόσο Crohn.

(B). Αυξημένα ανευρίσκονται και τα επίπεδα των χημειοκινών αυτών στον ορό των ασθενών με Νόσο Crohn.

(C). Σε επιθηλιακές κυτταροσειρές, διέγερση με Th1 κυτταροκίνες προκαλούσε επαγωγή του mRNA των τριών χημειοκινών. Επίδραση των Th2 αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της έκφρασης του mRNA των χημειοκινών αυτών και σε επίπεδο πρωτεΐνης.

(E). Ο υποδοχέας των χημειοκινών αυτών, CXCR3 ανιχνεύτηκε σημαντικά αυξημένος σε CD3⁺ ανοσομαγνητικά διαχωρισθέντα περιφερικά λεμφοκύτταρα ασθενών με Νόσο Crohn. Στη μελέτη αυτή δεν αποδείξαμε τη μετανάστευση των CD3⁺CXCR3⁺ κυττάρων προς το βλεννογόνο των ασθενών με Νόσο Crohn (διακεκομμένο βέλος)

(D). Στους ασθενείς αυτούς παρατηρήθηκε κυρίως έκφραση mRNA του CXCR3B υποδοχέα.

Μία εναλλακτική ενδιαφέρουσα υπόθεση που αξίζει περαιτέρω διερευνησεως ,βασίζεται στην ηυξημένη έκφραση του CXCR3B υποδοχέα σε ασθενείς με νόσο Crohn. Οπως προαναφέρθη η διέγερση του υποδοχέα αυτού οδηγεί σε αναστολή της αναπτύξεως των T κυττάρων, η δέ επαγωγή του γίνεται προ της διαφοροποιήσεως των T λεμφοκυττάρων. Είναι λοιπόν πιθανόν στην νόσο Crohn η υπερέκφρασή του να οδηγεί στην εκλεκτική καταστολή της αναπτύξεως των Treg κυττάρων με συνέπεια αδυναμία καταστολής της δράσεως των καταστρεπτικών T λεμφοκυττάρων

Στο σκέλος των CC χημειοκινών, επιδείξαμε σημαντική αύξηση των κυκλοφορούντων CCR3+CD3+ κυττάρων σε ασθενείς με Ελκώδη Κολίτιδα σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες. Επιπρόσθετα, τα ευρήματα αυτά συνδυάζονταν με την αυξημένη έκφραση του CCR3 mRNA σε βιοψίες παχέος εντέρου ασθενών με Ελκώδη Κολίτιδα. Υπήρξε μια σημαντική έκφραση του CCR3 mRNA στο 95% των ασθενών με Ελκώδη Κολίτιδα και το 65% των ασθενών με Νόσο Crohn σε σύγκριση με το 20% των φυσιολογικών μαρτύρων που εξετάστηκαν. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματά μας, και άλλες ερευνητικές ομάδες έχουν παρουσιάσει σημαντική αύξηση των CD3+CCR3+ κυττάρων στο βλεννογόνο του παχέος εντέρου ασθενών με Ελκώδη Κολίτιδα (261) (331). Τα αποτελέσματά μας επίσης είναι σύμφωνα με μια άλλη μελέτη όπου ανεβρέθηκε έκφραση CCR3 στο 15% των CD3 + λεμφοκυττάρων απομονωμένα από ασθενείς με Ελκώδη Κολίτιδα (261), με τη δική μας όμως έκφραση διπλοθετικών κυττάρων να είναι πολύ χαμηλότερη. Ωστόσο, ο Υο και οι συνεργάτες του, κατά τη σύγκριση ασθενών με Ελκώδη Κολίτιδα, Νόσο Crohn και φυσιολογικών μαρτύρων διαπίστωσαν ότι CCR3+ κύτταρα αποτελούν λιγότερο από το 1% των CD4+ κυττάρων (263) γεγονός που συμφωνεί σε μεγάλο βαθμό με τα αποτελέσματα μας.

Επίσης κατά τη μελέτη μας αναδείξαμε αυξημένη παραγωγή των CCR3 συνδεόμενων χημειοκινών CCL11/ eotaxin-1, CCL24/ eotaxin-2 και CCL26/eotaxin-3 στον ορό ασθενών με Ελκώδη Κολίτιδα, καθώς και αύξηση της CCL11/ eotaxin-1 σε ασθενείς με Νόσο Crohn. Είναι αξιοσημείωτο ότι αυξημένη βρέθηκε και η έκφραση του mRNA των τριών χημειοκινών σε βιοψίες κολονικού επιθηλίου ασθενών με Ελκώδη Κολίτιδα και σε μικρότερο βαθμό από ασθενείς με Νόσο Crohn, υποδηλώνοντας και μια πιθανή εστία παραγωγής των αυξημένων χημειοκινών στον ορό των ασθενών αυτών. Αυξημένα επίπεδα CCR3-συνδεόμενων χημειοκινών στον ορό ασθενών έχουν ανεβρεθεί και από άλλες ερευνητικές ομάδες. Ο Garcia-Zepeda και οι συνεργάτες του επέδειξαν αυξημένη έκφραση του mRNA της CCL11/eotaxin 1 σε ασθενείς με ΙΦΕΝ(264). Μια άλλη ομάδα έδειξε

αυξημένα επίπεδα των CCR3-συνδεόμενων χημειοκινών στον ορό ασθενών με ΙΦΕΝ. Σε αντίθεση όμως με τα δικά μας αποτελέσματα δε βρήκαν διαφορές στην CCL24/eotaxin 2 και επιπλέον αναφέρουν διαφορά στην έκφραση χημειοκινών μεταξύ ασθενών με ενεργό νόσο και με νόσο σε ύφεση (332). Από την άλλη ο Mir και οι συνεργάτες του αναφέρουν αυξημένη έκφραση της eotaxin 1, άσχετα με την ενεργότητα νόσου ή τη θεραπεία (329), ευρήματα τα οποία συμφωνούν απόλυτα με τα δικά μας. Η υπόθεση που διατυπώνει αυτή η ερευνητική ομάδα, ότι τα ευρήματα αυτά αναδεικνύουν μια ανοσολογική ανισορροπία ανεξάρτητη με την ενεργότητα της νόσου, μας βρίσκει απολύτως σύμφωνους.

Δεδομένου ότι η φλεγμονή κατά τη διάρκεια της ενεργού Ελκώδους Κολίτιδας περιορίζεται κυρίως στο βλεννογόνο και λαμβάνοντας υπόψιν ότι οι υποπληθυσμοί των T κυττάρων μεταναστεύουν σε θέσεις έκφρασης των χημειοκινών, προσπαθήσαμε να χαρακτηρίσουμε τον υπεύθυνο κυτταρικό πληθυσμό για την παραγωγή χημειοκινών με *in vitro* πειράματα. Μελετήσαμε τα κολονικά επιθηλιακά κύτταρα HT-29 και Caco-2, τα οποία έχει αποδειχτεί ότι αποτελούν πηγή παραγωγής χημειοκινών (228; 333). Κατά τις *in vitro* επιδράσεις μας, αποδείξαμε για πρώτη φορά ότι οι Th2 κυτταροκίνες IL-4, IL-10 και IL-13 προκαλούσαν επαγωγή της έκφρασης και παραγωγής των τριών CCR3 συνδεόμενων χημειοκινών και στις δυο επιθηλιακές κυτταροσειρές. Τα αποτελέσματα αυτά σε συνδυασμό με τα *ex vivo* πειράματά μας ενισχύουν την υπόθεση της Th2 πόλωσης σε ασθενείς με Ελκώδη Κολίτιδα. Ωστόσο, και οι Th1 παραγόμενες κυτταροκίνες προκαλούσαν μερική επαγωγή της έκφρασης και παραγωγής των τριών CCR3-συνδεόμενων χημειοκινών σε αντίθεση με τη μεγάλη αύξηση των CXCR3 συνδεόμενων χημειοκινών μετά από την ίδια επίδραση. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η Ελκώδης Κολίτιδα δεν χαρακτηρίζεται εξ ολοκλήρου από Th2 ανοσολογική απόκριση. Το συμπέρασμα αυτό είναι σύμφωνο με τα ευρήματα μιας άλλης ομάδας (334) οι οποίοι κατόπιν αναστολής των ηοταξινών, διαπίστωσαν μείωση τόσο της Th1 όσο και της Th2 επαγόμενης από κυτταροκίνες φλεγμονής.

Τα ευρήματά μας υποδηλώνουν ότι η παραγωγή των CCR3 συνδεόμενων χημειοκινών από το επιθήλιο του εντερικού βλεννογόνου δύναται να προσελκύσει τα CD3+CCR3+ κυκλοφορούντα κύτταρα προς τον πάσχοντα ιστό ασθενών με Ελκώδη Κολίτιδα. Ωστόσο, σε πειραματικό επίπεδο δεν αναδείξαμε αυτήν τη μετανάστευση των CCR3+ κυττάρων, παρά το ότι δείξαμε έκφραση του CCR3 mRNA σε βιοψίες βλεννογόνου ασθενών με Ελκώδη Κολίτιδα. Περιορισμοί της μελέτης αυτής ήταν επίσης η έλλειψη ανοσοιστοχημείας και πειραματικών μοντέλων χημειοταξίας.

Παρά ταύτα, τα ευρήματά μας τόσο στις CC όσο και στις CXC χημειοκίνες αναδεικνύουν την αλληλεπίδραση επιθηλιακών κυττάρων – λεμφοκυττάρων ως έναν πιθανό στόχο μελλοντικής θεραπευτικής προσέγγισης των ασθενών με Crohn και Ελκώδη Κολίτιδα, εκτός της μέχρι σήμερα αγωγής η οποία βασίζεται στην αναστολή της παραγωγής κυτταροκινών.

7. Περίληψη/ abstract

7.1 Abstract

Background

Human colonic epithelial cells express Th1-associated chemoattractants, yet little is known about the production of Th2-associated chemoattractants. Furthermore, T-lymphocyte migration is implicated in the pathogenesis of Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). CXC chemokines MIG, IP-10, and I-TAC act by binding to the CXCR3A or the splice variant CXCR3B receptor on Th1-lymphocytes. On the other hand, CC chemokines, CCL11/Eotaxin-1, CCL24/Eotaxin-2, and CCL26/Eotaxin-3 are known to attract CCR3-expressing, Th2-polarized lymphocytes. We investigated the role of these CXC and CC chemokines and their receptors in patients with UC, CD, and normal controls (NC).

Methods We studied constitutive and inflammation-induced expression and production of CXCR3 and CCR3 together with their ligands in the colon and CD3+ peripheral blood lymphocytes of patients with inflammatory bowel diseases (IBD) by flow cytometry, reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). We further defined the regulated expression of these chemokines by RT-PCR and ELISA using cultured human epithelial cell lines. Thus, HT-29 and Caco-2 colonic epithelial cells were studied following in vitro stimulation with pro-inflammatory (Th1) and Th2-derived cytokines.

Results

CXCR3A mRNA (full size) expression was found in CD3+ PBL from normal controls and UC patients, but not from CD patients. In contrast, CD3+ PBL from CD patients showed a marked mRNA expression of the spliced variant CXCR3B. This finding could explain the high expression of CXCR3 on CD3+ PBL from CD patients in flow cytometry. Increased chemokines expression and production was found in colonic biopsies and serum from CD compared to UC patients and normal controls. Stimulation of epithelial cells with Th1 proinflammatory cytokines significantly induced chemokines production. The addition of Th2-derived cytokines had an inhibitory effect. Stimulation of Jurkat cells with cytokines

and supernatant conditioned media from epithelial cells induced CXCR3A or CXCR3B expression depending on the stimuli.

When CC chemokines were examined, a higher fraction of peripheral T lymphocytes were found to be positive for CCR3 in patients with ulcerative colitis (UC) compared to Crohn's Disease (CD) whilst almost no CCR3⁺ T cells were found in normal controls (NC). Similarly, higher and more frequent expression of CCR3 was observed in colonic biopsies from patients with UC-regardless of the disease activity-when compared to CD or NCs. Serum CCL11/Eotaxin-1 was significantly increased in UC (306±87pg/ml) and less so in CD (257±43pg/ml) whereas CCL24/Eotaxin-2, and CCL26/Eotaxin-3 were increased only in UC. Colonic expression of the three chemokines was minimal in NCs but high in IBD (especially UC) and was independent of disease activity. Th2 and to a lesser extent Th1 cytokines were able to induce expression and production of all three eotaxins from colonic epithelial cells in culture.

Conclusions

These data demonstrate that PBL from CD patients express a spliced variant of the CXCR3 receptor and suggests that epithelium can play a role in modulating pathologic T cell-mediated mucosal inflammation.

Furthermore CCR3 and ligands over-expression would appear to be a characteristic of UC. The production of CCR3 ligands by human colonic epithelial cells further supports the important role of epithelium – lymphocyte interaction in the pathogenesis of IBD

7.2 Περίληψη

Εισαγωγή

Τα κολονικά επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου εκφράζουν χημειοκίνες σχετιζόμενες με την Th1 ανοσολογική απόκριση. Ωστόσο λίγα είναι γνωστά για τον ρόλο των επιθηλιακών κυττάρων στην Th2 ανοσολογική αντίδραση. Επιπλέον η μετανάστευση των T λεμφοκυττάρων, τα οποία εκφράζουν στην επιφάνειά τους υποδοχείς χημειοκινών, προς το κολονικό επιθήλιο εμπλέκεται στην αιτιοπαθογένεια της Crohn και Ελκώδους Κολίτιδας.

Μελετήσαμε την έκφραση των CXC χημειοκινών MIG, IP-10, και I-TAC οι οποίες προσδένονται στον CXCR3A υποδοχέα των Th1 κυκλοφορούντων λεμφοκυττάρων ή στο μεταγραφικό του αλληλίο CXCR3B αλλά και των CC χημειοκινών, CCL11/Eotaxin-1, CCL24/Eotaxin-2, και CCL26/Eotaxin-3 οι οποίες προσδένονται στον CCR3 υποδοχέα των Th2 κυκλοφορούντων λεμφοκυττάρων σε ασθενείς με Νόσο Crohn, Ελκώδη Κολίτιδα και σε υγιείς μάρτυρες.

Αποτελέσματα

Τα mRNA των τριών CXCR3 συνδεόμενων χημειοκινών (MIG, IP-10 και ITAC) ανευρίσκονται αυξημένα σε βιοψίες παχέος εντέρου ασθενών με Νόσο Crohn (CD). Παρομοίως ανευρίσκονται αυξημένα τα επίπεδα των MIG και ITAC χημειοκινών στον ορό των ασθενών με Νόσο Crohn και λιγότερο με Ελκώδη Κολίτιδα σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. In vitro πειράματα σε κολονικά επιθηλιακά κύτταρα έδειξαν επαγωγή της έκφρασης mRNA και της παραγωγής των τριών χημειοκινών MIG, IP-10 και I-TAC και στις δύο κυτταρικές σειρές μετά από επίδραση Th1 κυτταροκινών. Επίδραση των Th2 αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-4, IL-10, IL-13) στην επαγόμενη από τις Th1 κυτταροκίνες (IL-1 α , TNF- α και IFN- γ) έκφραση των τριών CXCR3 συνδεόμενων χημειοκινών είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της έκφρασης και παραγωγής των χημειοκινών αυτών και στις δύο επιθηλιακές κυτταρικές σειρές. Ο υποδοχέας των χημειοκινών αυτών, CXCR3 ανιχνεύτηκε σημαντικά αυξημένος με κυτταρομετρία ροής σε CD3⁺ ανοσομαγνητικά διαχωρισθέντα περιφερικά λεμφοκύτταρα ασθενών με Νόσο Crohn και λιγότερο με Ελκώδη Κολίτιδα σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. Σε ανοσομαγνητικά διαχωρισθέντα CD3⁺ περιφερικά λεμφοκύτταρα από ασθενείς με Νόσο Crohn παρατηρήθηκε κυρίως έκφραση mRNA του μεταγραφικού αλληλίου CXCR3B υποδοχέα, Αντίθετα υγιείς μάρτυρες εξέφραζαν κυρίως το mRNA του CXCR3A ενώ στην Ελκώδη

Κολίτιδα παρατηρήθηκε παρόμοια έκφραση CXCR3A και CXCR3B. In vitro επιδράσεις στη λευχαιμική κυτταρική σειρά Jurkat έδειξαν επαγωγή των CXCR3A και CXCR3B mRNAs μετά από επίδραση με IFN- γ , ενώ η IL-1 α προκαλούσε επαγωγή μόνο του CXCR3B mRNA. Επίδραση TNF- α είχε ως αποτέλεσμα επαγωγή του CXCR3A.

Όσον αφορά τις CC χημειοκίνες, σε βιοψίες παχέος εντέρου παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση του mRNA και των τριών CCR3 συνδεόμενων χημειοκινών – CCL11 (eotaxin), CCL24 (eotaxin 2) και CCL26 (eotaxin 3) - σε ιστούς ασθενών με Ελκώδη Κολίτιδα σε σχέση με φυσιολογικούς μάρτυρες και ασθενείς με Νόσο Crohn. Συνολικά και οι τρεις χημειοκίνες που συνδέονται στον CCR3 υποδοχέα βρέθηκαν αυξημένες στον ορό ασθενών με Ελκώδη Κολίτιδα. Κατόπιν μελετήσαμε in vitro στις HT-29 και Caco-2 κυτταρικές σειρές την έκφραση mRNA και την παραγωγή των χημειοκινών αυτών μετά από επίδραση κυτταροκινών. Επίδραση του συνδυασμού των Th1 κυτταροκινών είχε ως αποτέλεσμα αύξηση του mRNA της CCL26/Eotaxin-3 και στις δύο κυτταρικές σειρές καθώς και των χημειοκινών CCL11/Eotaxin-1 και CCL24/Eotaxin-2 σε μικρότερο βαθμό. Επίδραση με το συνδυασμό των προφλεγμονωδών κυτταροκινών Th2 προκάλεσε σημαντική επαγωγή mRNA και των τριών χημειοκινών, CCL11/Eotaxin-1 και στις δύο κυτταρικές σειρές. Αλλά και σε επίπεδο πρωτεΐνης, οι Th2 προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες σε συνδυασμό επάγουν την παραγωγή των CCR3 συνδεόμενων χημειοκινών και στις δύο κολονικές επιθηλιακές κυτταροσειρές. Όσον αφορά τον υποδοχέα των χημειοκινών αυτών CCR3, η έκφραση του mRNA ήταν μέγιστη σε βιοψίες κολονικού βλεννογόνου ασθενών με Ελκώδη Κολίτιδα (95%), σε σχέση με φυσιολογικούς μάρτυρες (20%). Έκφραση παρατηρήθηκε και στο 65% των ασθενών με Νόσο Crohn. Η έκφραση αυτή παρουσιάζονταν ανεξάρτητα από την ενεργότητα της νόσου και το βαθμό φλεγμονής του κολονικού βλεννογόνου. Η κυτταρομετρία ροής σε ανοσομαγνητικά διαχωρισθέντα CD3+ κύτταρα ανέδειξε έκφραση του υποδοχέα CCR3 κυρίως σε ασθενείς με Ελκώδη Κολίτιδα, λιγότερο σε Νόσο Crohn και σχεδόν καθόλου σε υγιείς μάρτυρες.

Συμπεράσματα

Στη μελέτη μας παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση του CXCR3 υποδοχέα σε ανοσομαγνητικά διαχωρισθέντα CD3+ λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος από ασθενείς με Νόσο Crohn και Ελκώδη Κολίτιδα σε σύγκριση με φυσιολογικούς μάρτυρες. Αυτή η έκφραση ήταν υψηλότερη στους ασθενείς με Νόσο Crohn οι οποίοι εξέφραζαν το mRNA του μεταγραφικού αλληλίου CXCR3B. Επιπρόσθετα, η έκφραση των CCR3 συνδεόμενων

χημειοκινών και του υποδοχέα τους φαίνεται να είναι χαρακτηριστικό των ασθενών με Ελκώδη Κολίτιδα.

Τα ευρήματά μας τόσο στις CC όσο και στις CXC χημειοκίνες αναδεικνύουν το ρόλο της αλληλεπίδραση επιθηλιακών κυττάρων – λεμφοκυττάρων στην αιτιοπαθογένεια της Νόσου Crohn και της Ελκώδους Κολίτιδας.

Βιβλιογραφία

1. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002;347:417-429.
2. McFarland LV. State-of-the-art of irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease research in 2008. *World J Gastroenterol* 2008;14:2625-2629.
3. Lok KH, Hung HG, Ng CH and others. The epidemiology and clinical characteristics of Crohn's disease in the Hong Kong Chinese population: experiences from a regional hospital. *Hong Kong Med J* 2007;13:436-441.
4. Lennard-Jones JE, Shivananda S. Clinical uniformity of inflammatory bowel disease a presentation and during the first year of disease in the north and south of Europe. EC-IBD Study Group. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1997;9:353-359.
5. Wang Y, Ouyang Q. Ulcerative colitis in China: retrospective analysis of 3100 hospitalized patients. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22:1450-1455.
6. Yantiss RK, Odze RD. Diagnostic difficulties in inflammatory bowel disease pathology. *Histopathology* 2006;48:116-132.
7. Yu CS, Pemberton JH, Larson D. Ileal pouch-anal anastomosis in patients with indeterminate colitis: long-term results. *Dis Colon Rectum* 2000;43:1487-1496.
8. Geboes K. Crohn's disease, ulcerative colitis or indeterminate colitis--how important is it to differentiate? *Acta Gastroenterol Belg* 2001;64:197-200.
9. Morpurgo E, Petras R, Kimberling J and others. Characterization and clinical behavior of Crohn's disease initially presenting predominantly as colitis. *Dis Colon Rectum* 2003;46:918-924.
10. Guy TS, Williams NN, Rosato EF. Crohn's disease of the colon. *Surg Clin North Am* 2001;81:159-68, ix.
11. Calkins BM, Mendeloff AI. Epidemiology of inflammatory bowel disease. *Epidemiol Rev* 1986;8:60-91.
12. Economou M, Pappas G. New global map of Crohn's disease: Genetic, environmental, and socioeconomic correlations. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:709-720.
13. Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R and others. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut* 1996;39:690-697.

14. Sonnenberg A, McCarty DJ, Jacobsen SJ. Geographic variation of inflammatory bowel disease within the United States. *Gastroenterology* 1991;100:143-149.
15. Loftus EV, Jr., Sandborn WJ. Epidemiology of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 2002;31:1-20.
16. Munkholm P. Crohn's disease--occurrence, course and prognosis. An epidemiologic cohort-study. *Dan Med Bull* 1997;44:287-302.
17. Loftus EV, Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 2004;126:1504-1517.
18. Ouyang Q, Tandon R, Goh KL and others. The emergence of inflammatory bowel disease in the Asian Pacific region. *Curr Opin Gastroenterol* 2005;21:408-413.
19. Basu D, Lopez I, Kulkarni A and others. Impact of race and ethnicity on inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2005;100:2254-2261.
20. Niv Y, Abuksis G, Fraser GM. Epidemiology of Crohn's disease in Israel: a survey of Israeli kibbutz settlements. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2961-2965.
21. Orholm M, Munkholm P, Langholz E and others. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 1991;324:84-88.
22. Mayer L. Evolving paradigms in the pathogenesis of IBD. *J Gastroenterol* 2010;45:9-16.
23. Mizoguchi A, Mizoguchi E. Inflammatory bowel disease, past, present and future: lessons from animal models. *J Gastroenterol* 2008;43:1-17.
24. Braun J, Wei B. Body traffic: ecology, genetics, and immunity in inflammatory bowel disease. *Annu Rev Pathol* 2007;2:401-429.
25. Halme L, Paavola-Sakki P, Turunen U and others. Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2006;12:3668-3672.
26. Brant SR, Shugart YY. Inflammatory bowel disease gene hunting by linkage analysis: rationale, methodology, and present status of the field. *Inflamm Bowel Dis* 2004;10:300-311.
27. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N and others. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:603-606.
28. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H and others. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603.
29. Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD and others. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet* 2007;39:596-604.

30. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR and others. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 2006;314:1461-1463.
31. Esters N, Pierik M, Van Steen K and others. Transmission of CARD15 (NOD2) variants within families of patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2004;99:299-305.
32. Abreu MT, Taylor KD, Lin YC and others. Mutations in NOD2 are associated with fibrostenosing disease in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002;123:679-688.
33. Peltekova VD, Wintle RF, Rubin LA and others. Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat Genet* 2004;36:471-475.
34. Halfvarson J, Jess T, Bodin L and others. Longitudinal concordance for clinical characteristics in a Swedish-Danish twin population with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:1536-1544.
35. Drossman DA. Presidential address: Gastrointestinal illness and the biopsychosocial model. *Psychosom Med* 1998;60:258-267.
36. Gill SR, Pop M, Deboy RT and others. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 2006;312:1355-1359.
37. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T and others. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 2009;457:480-484.
38. Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol* 2009;9:313-323.
39. Umesaki Y, Setoyama H, Matsumoto S and others. Expansion of alpha beta T-cell receptor-bearing intestinal intraepithelial lymphocytes after microbial colonization in germ-free mice and its independence from thymus. *Immunology* 1993;79:32-37.
40. Mazmanian SK, Round JL, Kasper DL. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature* 2008;453:620-625.
41. Ivanov II, Atarashi K, Manel N and others. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* 2009;139:485-498.
42. Frank DN, St Amand AL, Feldman RA and others. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:13780-13785.
43. Janeway CA, Jr., Bottomly K. Signals and signs for lymphocyte responses. *Cell* 1994;76:275-285.
44. Huang JS, Noack D, Rae J and others. Chronic granulomatous disease caused by a deficiency in p47(phox) mimicking Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004;2:690-695.

45. Dieckgraefe BK, Korzenik JR. Treatment of active Crohn's disease with recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Lancet* 2002;360:1478-1480.
46. Kugathasan S, Saubermann LJ, Smith L and others. Mucosal T-cell immunoregulation varies in early and late inflammatory bowel disease. *Gut* 2007;56:1696-1705.
47. Brown SJ, Mayer L. The immune response in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2007;102:2058-2069.
48. Fuss IJ, Heller F, Boirivant M and others. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2004;113:1490-1497.
49. Kobayashi K, Kaneda K, Kasama T. Immunopathogenesis of delayed-type hypersensitivity. *Microsc Res Tech* 2001;53:241-245.
50. Glimcher LH. Trawling for treasure: tales of T-bet. *Nat Immunol* 2007;8:448-450.
51. Hunter CA. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat Rev Immunol* 2005;5:521-531.
52. Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR and others. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 2007;25:821-852.
53. Zhou L, Ivanov II, Spolski R and others. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* 2007;8:967-974.
54. Fujino S, Andoh A, Bamba S and others. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 2003;52:65-70.
55. Fuss IJ, Becker C, Yang Z and others. Both IL-12p70 and IL-23 are synthesized during active Crohn's disease and are down-regulated by treatment with anti-IL-12 p40 monoclonal antibody. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:9-15.
56. Heller F, Florian P, Bojarski C and others. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* 2005;129:550-564.
57. Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2003;3:521-533.
58. Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG and others. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2005;353:2462-2476.
59. Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V and others. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* 2007;204:1849-1861.

60. Denning TL, Qi H, Konig R and others. CD4+ Th cells resembling regulatory T cells that inhibit chronic colitis differentiate in the absence of interactions between CD4 and class II MHC. *J Immunol* 2003;171:2279-2286.
61. Papadakis KA, Prehn J, Moreno ST and others. CCR9-positive lymphocytes and thymus-expressed chemokine distinguish small bowel from colonic Crohn's disease. *Gastroenterology* 2001;121:246-254.
62. Hosoe N, Miura S, Watanabe C and others. Demonstration of functional role of TECK/CCL25 in T lymphocyte-endothelium interaction in inflamed and uninfamed intestinal mucosa. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;286:G458-G466.
63. Lu B, Humbles A, Bota D and others. Structure and function of the murine chemokine receptor CXCR3. *Eur J Immunol* 1999;29:3804-3812.
64. Melmed GY, Targan SR. Future biologic targets for IBD: potentials and pitfalls. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010;7:110-117.
65. Kraus TA, Toy L, Chan L and others. Failure to induce oral tolerance to a soluble protein in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2004;126:1771-1778.
66. Stephens GL, Shevach EM. Foxp3+ regulatory T cells: selfishness under scrutiny. *Immunity* 2007;27:417-419.
67. Zheng Y, Rudensky AY. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat Immunol* 2007;8:457-462.
68. Cong Y, Weaver CT, Lazenby A and others. Bacterial-reactive T regulatory cells inhibit pathogenic immune responses to the enteric flora. *J Immunol* 2002;169:6112-6119.
69. Rennick DM, Fort MM, Davidson NJ. Studies with IL-10^{-/-} mice: an overview. *J Leukoc Biol* 1997;61:389-396.
70. Coffman RL, Leberman DA, Shrader B. Transforming growth factor beta specifically enhances IgA production by lipopolysaccharide-stimulated murine B lymphocytes. *J Exp Med* 1989;170:1039-1044.
71. Ochs HD, Gambineri E, Torgerson TR. IPEX, FOXP3 and regulatory T-cells: a model for autoimmunity. *Immunol Res* 2007;38:112-121.
72. Boden EK, Snapper SB. Regulatory T cells in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2008;24:733-741.
73. Brimnes J, Allez M, Dotan I and others. Defects in CD8+ regulatory T cells in the lamina propria of patients with inflammatory bowel disease. *J Immunol* 2005;174:5814-5822.
74. Allez M, Brimnes J, Dotan I and others. Expansion of CD8+ T cells with regulatory function after interaction with intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2002;123:1516-1526.

75. De Jong YP, Abadia-Molina AC, Satoskar AR and others. Development of chronic colitis is dependent on the cytokine MIF. *Nat Immunol* 2001;2:1061-1066.
76. Podolsky DK. Mucosal immunity and inflammation. V. Innate mechanisms of mucosal defense and repair: the best offense is a good defense
180. *Am J Physiol* 1999;277:G495-G499.
77. Neurath MF, Finotto S, Glimcher LH. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat Med* 2002;8:567-573.
78. Andres PG, Beck PL, Mizoguchi E and others. 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
163. *J Immunol* 2000;164:6303-6312.
79. Tokuyama H, Ueha S, Kurachi M and others. The simultaneous blockade of chemokine receptors CCR2, CCR5 and CXCR3 by a non-peptide chemokine receptor antagonist protects mice from dextran sodium sulfate-mediated colitis. *Int Immunol* 2005;17:1023-1034.
80. Hyun JG, Lee G, Brown JB and others. Anti-interferon-inducible chemokine, CXCL10, reduces colitis by impairing T helper-1 induction and recruitment in mice. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11:799-805.
81. Clayburgh DR, Barrett TA, Tang Y and others. Epithelial myosin light chain kinase-dependent barrier dysfunction mediates T cell activation-induced diarrhea in vivo. *J Clin Invest* 2005;115:2702-2715.
82. Zimmerman NP, Vongsa RA, Wendt MK and others. Chemokines and chemokine receptors in mucosal homeostasis at the intestinal epithelial barrier in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:1000-1011.
83. Dwinell MB, Eckmann L, Leopard JD and others. Chemokine receptor expression by human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 1999;117:359-367.
84. Jordan NJ, Kolios G, Abbot SE and others. Expression of functional CXCR4 chemokine receptors on human colonic epithelial cells. *J Clin Invest* 1999;104:1061-1069.
85. Sturm A, Baumgart DC, d'Heureuse JH and others. CXCL8 modulates human intestinal epithelial cells through a CXCR1 dependent pathway. *Cytokine* 2005;29:42-48.
86. Moyer RA, Wendt MK, Johanesen PA and others. Rho activation regulates CXCL12 chemokine stimulated actin rearrangement and restitution in model intestinal epithelia. *Lab Invest* 2007;87:807-817.
87. Smith JM, Johanesen PA, Wendt MK and others. CXCL12 activation of CXCR4 regulates mucosal host defense through stimulation of epithelial cell migration and promotion of intestinal barrier integrity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;288:G316-G326.

88. Haynes BF, Hale LP. The human thymus. A chimeric organ comprised of central and peripheral lymphoid components. *Immunol Res* 1998;18:61-78.
89. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med* 2000;343:108-117.
90. Goncharova LB, Tarakanov AO. Why chemokines are cytokines while their receptors are not cytokine ones? *Curr Med Chem* 2008;15:1297-1304.
91. Cannon JG. Inflammatory Cytokines in Nonpathological States. *News Physiol Sci* 2000;15:298-303.
92. Oppmann B, Lesley R, Blom B and others. 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;13:715-725.
93. Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* 2008;28:454-467.
94. Cho ML, Kang JW, Moon YM and others. STAT3 and NF-kappaB signal pathway is required for IL-23-mediated IL-17 production in spontaneous arthritis animal model IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *J Immunol* 2006;176:5652-5661.
95. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM and others. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2005;201:233-240.
96. Park H, Li Z, Yang XO and others. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005;6:1133-1141.
97. Neuman MG. Immune dysfunction in inflammatory bowel disease. *Transl Res* 2007;149:173-186.
98. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S and others. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 2003;374:1-20.
99. Senaldi G, Varnum BC, Sarmiento U and others. Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3: a cytokine of the IL-6 family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:11458-11463.
100. Heaney ML, Golde DW. Soluble cytokine receptors. *Blood* 1996;87:847-857.
101. Symons JA, Duff GW. A soluble form of the interleukin-1 receptor produced by a human B cell line. *FEBS Lett* 1990;272:133-136.
102. Heaney ML, Vera JC, Raines MA and others. Membrane-associated and soluble granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor receptor alpha subunits are independently regulated in HL-60 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:2365-2369.
103. Fukunaga R, Ishizaka-Ikeda E, Seto Y and others. Expression cloning of a receptor for murine granulocyte colony-stimulating factor. *Cell* 1990;61:341-350.

104. Mosley B, Beckmann MP, March CJ and others. The murine interleukin-4 receptor: molecular cloning and characterization of secreted and membrane bound forms. *Cell* 1989;59:335-348.
105. Barron C, Migliaccio AR, Migliaccio G and others. Alternatively spliced mRNAs encoding soluble isoforms of the erythropoietin receptor in murine cell lines and bone marrow. *Gene* 1994;147:263-268.
106. Wypych J, Bennett LG, Schwartz MG and others. Soluble kit receptor in human serum. *Blood* 1995;85:66-73.
107. Mullberg J, Dittrich E, Graeve L and others. Differential shedding of the two subunits of the interleukin-6 receptor. *FEBS Lett* 1993;332:174-178.
108. Mullberg J, Oberthur W, Lottspeich F and others. The soluble human IL-6 receptor. Mutational characterization of the proteolytic cleavage site. *J Immunol* 1994;152:4958-4968.
109. Lust JA, Donovan KA, Kline MP and others. Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor. *Cytokine* 1992;4:96-100.
110. Porteu F, Hieblot C. Tumor necrosis factor induces a selective shedding of its p75 receptor from human neutrophils. *J Biol Chem* 1994;269:2834-2840.
111. Baumann H, Prowse KR, Marinkovic S and others. Stimulation of hepatic acute phase response by cytokines and glucocorticoids. *Ann N Y Acad Sci* 1989;557:280-95, discussion.
112. Aderka D, Engelmann H, Wysenbeek AJ and others. The possible role of tumor necrosis factor (TNF) and its natural inhibitors, the soluble-TNF receptors, in autoimmune diseases. *Isr J Med Sci* 1992;28:126-130.
113. Kishimoto T, Akira S, Taga T. Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. *Science* 1992;258:593-597.
114. Taga T, Hibi M, Hirata Y and others. Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell* 1989;58:573-581.
115. Yun TJ, Bevan MJ. The Goldilocks conditions applied to T cell development. *Nat Immunol* 2001;2:13-14.
116. O'Shea JJ, Notarangelo LD, Johnston JA and others. Advances in the understanding of cytokine signal transduction: the role of Jaks and STATs in immunoregulation and the pathogenesis of immunodeficiency. *J Clin Immunol* 1997;17:431-447.
117. Jump RL, Levine AD. Mechanisms of natural tolerance in the intestine: implications for inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2004;10:462-478.
118. O'Shea JJ, Murray PJ. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity* 2008;28:477-487.

119. Maloy KJ. The Interleukin-23 / Interleukin-17 axis in intestinal inflammation. *J Intern Med* 2008;263:584-590.
120. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007;448:427-434.
121. Papadakis KA, Targan SR. Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Annu Rev Med* 2000;51:289-298.
122. Rogler G, Andus T. Cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Surg* 1998;22:382-389.
123. Nassif A, Longo WE, Mazuski JE and others. Role of cytokines and platelet-activating factor in inflammatory bowel disease. Implications for therapy. *Dis Colon Rectum* 1996;39:217-223.
124. Garg AK, Aggarwal BB. Reactive oxygen intermediates in TNF signaling. *Mol Immunol* 2002;39:509-517.
125. Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M and others. 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. *J Immunol* 1996;157:1261-1270.
126. Fort M, Lesley R, Davidson N and others. IL-4 exacerbates disease in a Th1 cell transfer model of colitis. *J Immunol* 2001;166:2793-2800.
127. Gor DO, Rose NR, Greenspan NS. TH1-TH2: a procrustean paradigm. *Nat Immunol* 2003;4:503-505.
128. Yen D, Cheung J, Scheerens H and others. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest* 2006;116:1310-1316.
129. Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. *Immunol Today* 1994;15:74-80.
130. Begue B, Wajant H, Bambou JC and others. Implication of TNF-related apoptosis-inducing ligand in inflammatory intestinal epithelial lesions. *Gastroenterology* 2006;130:1962-1974.
131. O'Shea JJ, Ma A, Lipsky P. Cytokines and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2002;2:37-45.
132. Stucchi A, Reed K, O'Brien M and others. A new transcription factor that regulates TNF-alpha gene expression, LITAF, is increased in intestinal tissues from patients with CD and UC. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:581-587.
133. Reimund JM, Wittersheim C, Dumont S and others. Increased production of tumour necrosis factor-alpha interleukin-1 beta, and interleukin-6 by morphologically normal intestinal biopsies from patients with Crohn's disease. *Gut* 1996;39:684-689.

134. Spoettl T, Hausmann M, Klebl F and others. Serum soluble TNF receptor I and II levels correlate with disease activity in IBD patients. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:727-732.
135. Bamias G, Martin C, III, Marini M and others. Expression, localization, and functional activity of TL1A, a novel Th1-polarizing cytokine in inflammatory bowel disease. *J Immunol* 2003;171:4868-4874.
136. Dinarello CA. The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol* 2002;20:S1-13.
137. Ashwood P, Harvey R, Verjee T and others. Functional interactions between mucosal IL-1, IL-ra and TGF-beta 1 in ulcerative colitis. *Inflamm Res* 2004;53:53-59.
138. Dionne S, D'Agata ID, Hiscott J and others. Colonic explant production of IL-1 and its receptor antagonist is imbalanced in inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 1998;112:435-442.
139. Isaacs A, LINDENMANN J. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1957;147:258-267.
140. Bach EA, Aguet M, Schreiber RD. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol* 1997;15:563-591.
141. Jonasch E, Haluska FG. Interferon in oncological practice: review of interferon biology, clinical applications, and toxicities. *Oncologist* 2001;6:34-55.
142. Carnaud C, Lee D, Donnars O and others. Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *J Immunol* 1999;163:4647-4650.
143. Gessani S, Belardelli F. IFN-gamma expression in macrophages and its possible biological significance. *Cytokine Growth Factor Rev* 1998;9:117-123.
144. Yoshimoto T, Takeda K, Tanaka T and others. IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. *J Immunol* 1998;161:3400-3407.
145. Flaishon L, Hershkovich R, Lantner F and others. Autocrine secretion of interferon gamma negatively regulates homing of immature B cells. *J Exp Med* 2000;192:1381-1388.
146. Sen GC. Viruses and interferons. *Annu Rev Microbiol* 2001;55:255-281.
147. Golab J, Zagodzón, Stoklosa T and others. Direct stimulation of macrophages by IL-12 and IL-18--a bridge too far? *Immunol Lett* 2000;72:153-157.
148. Pien GC, Biron CA. Compartmental differences in NK cell responsiveness to IL-12 during lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J Immunol* 2000;164:994-1001.

149. Schindler H, Lutz MB, Rollinghoff M and others. The production of IFN-gamma by IL-12/IL-18-activated macrophages requires STAT4 signaling and is inhibited by IL-4. *J Immunol* 2001;166:3075-3082.
150. Fukao T, Frucht DM, Yap G and others. Inducible expression of Stat4 in dendritic cells and macrophages and its critical role in innate and adaptive immune responses. *J Immunol* 2001;166:4446-4455.
151. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T and others. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 2004;75:163-189.
152. Matthys P, Vermeire K, Billiau A. Mac-1(+) myelopoiesis induced by CFA: a clue to the paradoxical effects of IFN-gamma in autoimmune disease models. *Trends Immunol* 2001;22:367-371.
153. Gadina M, Hilton D, Johnston JA and others. Signaling by type I and II cytokine receptors: ten years after. *Curr Opin Immunol* 2001;13:363-373.
154. Lebel-Binay S, Berger A, Zinzindohoue F and others. Interleukin-18: biological properties and clinical implications. *Eur Cytokine Netw* 2000;11:15-26.
155. Leach ST, Messina I, Lemberg DA and others. Local and systemic interleukin-18 and interleukin-18-binding protein in children with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:68-74.
156. Pizarro TT, Michie MH, Bentz M and others. IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells. *J Immunol* 1999;162:6829-6835.
157. Schmidt C, Giese T, Goebel R and others. Interleukin-18 is increased only in a minority of patients with active Crohn's disease. *Int J Colorectal Dis* 2007;22:1013-1020.
158. Kanai T, Watanabe M, Okazawa A and others. Macrophage-derived IL-18-mediated intestinal inflammation in the murine model of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2001;121:875-888.
159. Okazawa A, Kanai T, Nakamaru K and others. Human intestinal epithelial cell-derived interleukin (IL)-18, along with IL-2, IL-7 and IL-15, is a potent synergistic factor for the proliferation of intraepithelial lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 2004;136:269-276.
160. Micallef MJ, Tanimoto T, Kohno K and others. Interleukin 18 induces a synergistic enhancement of interferon gamma production in mixed murine spleen cell-tumor cell cultures: role of endogenous interleukin 12. *Cancer Detect Prev* 2000;24:234-243.
161. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB and others. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 2006;441:231-234.
162. Paradowska A, Masliniski W, Grzybowska-Kowalczyk A and others. The function of interleukin 17 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2007;55:329-334.

163. Cho ML, Kang JW, Moon YM and others. STAT3 and NF-kappaB signal pathway is required for IL-23-mediated IL-17 production in spontaneous arthritis animal model IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *J Immunol* 2006;176:5652-5661.
164. Witowski J, Ksiazek K, Jorres A. Interleukin-17: a mediator of inflammatory responses. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:567-579.
165. Ruddy MJ, Wong GC, Liu XK and others. Functional cooperation between interleukin-17 and tumor necrosis factor-alpha is mediated by CCAAT/enhancer-binding protein family members. *J Biol Chem* 2004;279:2559-2567.
166. Chen Z, O'Shea JJ. Th17 cells: a new fate for differentiating helper T cells. *Immunol Res* 2008;41:87-102.
167. Wirtz S, Neurath MF. Mouse models of inflammatory bowel disease. *Adv Drug Deliv Rev* 2007;59:1073-1083.
168. Kuhn R, Lohler J, Rennick D and others. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993;75:263-274.
169. Melgar S, Yeung MM, Bas A and others. Over-expression of interleukin 10 in mucosal T cells of patients with active ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol* 2003;134:127-137.
170. Latinne D, Fiasse R. New insights into the cellular immunology of the intestine in relation to the pathophysiology of inflammatory bowel diseases. *Acta Gastroenterol Belg* 2006;69:393-405.
171. Mizoguchi A, Bhan AK. A case for regulatory B cells. *J Immunol* 2006;176:705-710.
172. Goetz M, Atreya R, Ghalibafian M and others. Exacerbation of ulcerative colitis after rituximab salvage therapy. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:1365-1368.
173. Griga T, Hebler U, Voigt E and others. Interleukin-4 inhibits the increased production of vascular endothelial growth factor by peripheral blood mononuclear cells in patients with inflammatory bowel disease. *Hepatology* 2000;47:1604-1607.
174. Marek A, Brodzicki J, Liberek A and others. TGF-beta (transforming growth factor-beta) in chronic inflammatory conditions - a new diagnostic and prognostic marker? *Med Sci Monit* 2002;8:RA145-RA151.
175. Del Zotto B, Mumolo G, Pronio AM and others. TGF-beta1 production in inflammatory bowel disease: differing production patterns in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol* 2003;134:120-126.
176. Kanazawa S, Tsunoda T, Onuma E and others. VEGF, basic-FGF, and TGF-beta in Crohn's disease and ulcerative colitis: a novel mechanism of chronic intestinal inflammation. *Am J Gastroenterol* 2001;96:822-828.

177. McKenzie AN, Li X, Largaespada DA and others. Structural comparison and chromosomal localization of the human and mouse IL-13 genes. *J Immunol* 1993;150:5436-5444.
178. Marietta EV, Chen Y, Weis JH. Modulation of expression of the anti-inflammatory cytokines interleukin-13 and interleukin-10 by interleukin-3. *Eur J Immunol* 1996;26:49-56.
179. de Waal MR, Figdor CG, Huijbens R and others. Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes. Comparison with IL-4 and modulation by IFN-gamma or IL-10. *J Immunol* 1993;151:6370-6381.
180. Kucharzik T, Luger N, Weigelt H and others. Immunoregulatory properties of IL-13 in patients with inflammatory bowel disease; comparison with IL-4 and IL-10. *Clin Exp Immunol* 1996;104:483-490.
181. Kolios G, Rooney N, Murphy CT and others. Expression of inducible nitric oxide synthase activity in human colon epithelial cells: modulation by T lymphocyte derived cytokines. *Gut* 1998;43:56-63.
182. Jinquan T, Frydenberg J, Mukaida N and others. Recombinant human growth-regulated oncogene-alpha induces T lymphocyte chemotaxis. A process regulated via IL-8 receptors by IFN-gamma, TNF-alpha, IL-4, IL-10, and IL-13. *J Immunol* 1995;155:5359-5368.
183. Bochner BS, Klunk DA, Sterbinsky SA and others. IL-13 selectively induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *J Immunol* 1995;154:799-803.
184. D'Andrea A, Ma X, Aste-Amezaga M and others. Stimulatory and inhibitory effects of interleukin (IL)-4 and IL-13 on the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: priming for IL-12 and tumor necrosis factor alpha production. *J Exp Med* 1995;181:537-546.
185. Vainer B, Nielsen OH, Hendel J and others. Colonic expression and synthesis of interleukin 13 and interleukin 15 in inflammatory bowel disease. *Cytokine* 2000;12:1531-1536.
186. Fantini MC, Monteleone G, MacDonald TT. New players in the cytokine orchestra of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:1419-1423.
187. de Rham C, Ferrari-Lacraz S, Jendly S and others. The proinflammatory cytokines IL-2, IL-15 and IL-21 modulate the repertoire of mature human natural killer cell receptors. *Arthritis Res Ther* 2007;9:R125.
188. Caruso R, Fina D, Peluso I and others. A functional role for interleukin-21 in promoting the synthesis of the T-cell chemoattractant, MIP-3alpha, by gut epithelial cells. *Gastroenterology* 2007;132:166-175.
189. Chen Z, Laurence A, O'Shea JJ. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation. *Semin Immunol* 2007;19:400-408.

190. Monteleone G, Monteleone I, Fina D and others. Interleukin-21 enhances T-helper cell type I signaling and interferon-gamma production in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2005;128:687-694.
191. Xie MH, Aggarwal S, Ho WH and others. Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2-4 and IL-22R. *J Biol Chem* 2000;275:31335-31339.
192. Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP and others. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 2006;203:2271-2279.
193. Andoh A, Zhang Z, Inatomi O and others. Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts. *Gastroenterology* 2005;129:969-984.
194. Schmechel S, Konrad A, Diegelmann J and others. Linking genetic susceptibility to Crohn's disease with Th17 cell function: IL-22 serum levels are increased in Crohn's disease and correlate with disease activity and IL23R genotype status. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:204-212.
195. Sugimoto K, Ogawa A, Mizoguchi E and others. IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2008;118:534-544.
196. Kim CH, Broxmeyer HE. SLC/exodus2/6Ckine/TCA4 induces chemotaxis of hematopoietic progenitor cells: differential activity of ligands of CCR7, CXCR3, or CXCR4 in chemotaxis vs. suppression of progenitor proliferation. *J Leukoc Biol* 1999;66:455-461.
197. Agnati LF, Leo G, Genedani S and others. Common key-signals in learning and neurodegeneration: focus on excitio-amino acids, beta-amyloid peptides and alpha-synuclein. *J Neural Transm* 2008.
198. Yang D, Chen Q, Hoover DM and others. Many chemokines including CCL20/MIP-3alpha display antimicrobial activity. *J Leukoc Biol* 2003;74:448-455.
199. Nakayama M, Both GW, Banizs B and others. An adenovirus serotype 5 vector with fibers derived from ovine atadenovirus demonstrates CAR-independent tropism and unique biodistribution in mice. *Virology* 2006;350:103-115.
200. Wakasugi K, Schimmel P. Two distinct cytokines released from a human aminoacyl-tRNA synthetase. *Science* 1999;284:147-151.
201. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000;12:121-127.
202. Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF and others. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 2000;52:145-176.
203. Wells TN, Proudfoot AE. Chemokine receptors and their antagonists in allergic lung disease. *Inflamm Res* 1999;48:353-362.

204. Clark-Lewis I, Kim KS, Rajarathnam K and others. Structure-activity relationships of chemokines. *J Leukoc Biol* 1995;57:703-711.
205. Allen SJ, Crown SE, Handel TM. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol* 2007;25:787-820.
206. Imai T, Hieshima K, Haskell C and others. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell* 1997;91:521-530.
207. Kelner GS, Kennedy J, Bacon KB and others. Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* 1994;266:1395-1399.
208. Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *J Leukoc Biol* 2001;70:465-466.
209. Struyf S, Burdick MD, Proost P and others. Platelets release CXCL4L1, a nonallelic variant of the chemokine platelet factor-4/CXCL4 and potent inhibitor of angiogenesis. *Circ Res* 2004;95:855-857.
210. Zimmerman NP, Vongsa RA, Wendt MK and others. Chemokines and chemokine receptors in mucosal homeostasis at the intestinal epithelial barrier in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:1000-1011.
211. Vandercappellen J, Van Damme J, Struyf S. The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. *Cancer Lett* 2008;267:226-244.
212. Fernandez EJ, Lolis E. Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002;42:469-499.
213. Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL and others. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem* 1995;270:27348-27357.
214. White MV, Yoshimura T, Hook W and others. Neutrophil attractant/activation protein-1 (NAP-1) causes human basophil histamine release. *Immunol Lett* 1989;22:151-154.
215. Warringa RA, Koenderman L, Kok PT and others. Modulation and induction of eosinophil chemotaxis by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3. *Blood* 1991;77:2694-2700.
216. Larsen CG, Anderson AO, Appella E and others. The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. *Science* 1989;243:1464-1466.
217. Wang D, Richmond A. Nuclear factor-kappa B activation by the CXC chemokine melanoma growth-stimulatory activity/growth-regulated protein involves the MEKK1/p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 2001;276:3650-3659.
218. Palmer K, Emtage PC, Strieter RM and others. Transient gene transfer of non-ELR chemokines to rodent lung induces mononuclear cell accumulation and activation. *J Interferon Cytokine Res* 1999;19:1381-1390.

219. Cole KE, Strick CA, Paradis TJ and others. Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. *J Exp Med* 1998;187:2009-2021.
220. Keane MP, Arenberg DA, Moore BB and others. CXC chemokines and angiogenesis/angiostasis. *Proc Assoc Am Physicians* 1998;110:288-296.
221. Bajetto A, Bonavia R, Barbero S and others. Chemokines and their receptors in the central nervous system. *Front Neuroendocrinol* 2001;22:147-184.
222. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K and others. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 1996;382:635-638.
223. Gunn MD, Ngo VN, Ansel KM and others. A B-cell-homing chemokine made in lymphoid follicles activates Burkitt's lymphoma receptor-1. *Nature* 1998;391:799-803.
224. Wuyts A, Proost P, Lenaerts JP and others. Differential usage of the CXC chemokine receptors 1 and 2 by interleukin-8, granulocyte chemotactic protein-2 and epithelial-cell-derived neutrophil attractant-78. *Eur J Biochem* 1998;255:67-73.
225. Luster AD, Ravetch JV. Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10). *J Exp Med* 1987;166:1084-1097.
226. Farber JM. HuMig: a new human member of the chemokine family of cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;192:223-230.
227. Mach F, Sauty A, Iarossi AS and others. Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells. *J Clin Invest* 1999;104:1041-1050.
228. Kolios G, Wright KL, Jordan NJ and others. 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. *Eur J Immunol* 1999;29:530-536.
229. Farber JM. Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *J Leukoc Biol* 1997;61:246-257.
230. Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP and others. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med* 1998;187:129-134.
231. Loetscher M, Gerber B, Loetscher P and others. Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *J Exp Med* 1996;184:963-969.
232. Loetscher P, Seitz M, Baggiolini M and others. Interleukin-2 regulates CC chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness in T lymphocytes. *J Exp Med* 1996;184:569-577.

233. Loetscher P, Clark-Lewis I. Agonistic and antagonistic activities of chemokines. *J Leukoc Biol* 2001;69:881-884.
234. Taub DD, Sayers TJ, Carter CR and others. Alpha and beta chemokines induce NK cell migration and enhance NK-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 1995;155:3877-3888.
235. Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 1997;9:10-16.
236. Salmaggi A, Gelati M, Dufour A and others. Expression and modulation of IFN-gamma-inducible chemokines (IP-10, Mig, and I-TAC) in human brain endothelium and astrocytes: possible relevance for the immune invasion of the central nervous system and the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Interferon Cytokine Res* 2002;22:631-640.
237. Ternant D, Aubourg A, Magdelaine-Beuzelin C and others. Infliximab pharmacokinetics in inflammatory bowel disease patients. *Ther Drug Monit* 2008;30:523-529.
238. Mazanet MM, Neote K, Hughes CC. Expression of IFN-inducible T cell alpha chemoattractant by human endothelial cells is cyclosporin A-resistant and promotes T cell adhesion: implications for cyclosporin A-resistant immune inflammation. *J Immunol* 2000;164:5383-5388.
239. Singh UP, Venkataraman C, Singh R and others. CXCR3 axis: role in inflammatory bowel disease and its therapeutic implication. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2007;7:111-123.
240. Clark-Lewis I, Mattioli I, Gong JH and others. Structure-function relationship between the human chemokine receptor CXCR3 and its ligands. *J Biol Chem* 2003;278:289-295.
241. Soejima K, Rollins BJ. A functional IFN-gamma-inducible protein-10/CXCL10-specific receptor expressed by epithelial and endothelial cells that is neither CXCR3 nor glycosaminoglycan. *J Immunol* 2001;167:6576-6582.
242. Lasagni L, Francalanci M, Annunziato F and others. An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the inhibition of endothelial cell growth induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and acts as functional receptor for platelet factor 4. *J Exp Med* 2003;197:1537-1549.
243. Romagnani P, Maggi L, Mazzinochi B and others. CXCR3-mediated opposite effects of CXCL10 and CXCL4 on TH1 or TH2 cytokine production. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:1372-1379.
244. Yuan YH, Ten Hove T, The FO and others. Chemokine receptor CXCR3 expression in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2001;7:281-286.
245. Sasaki S, Yoneyama H, Suzuki K and others. Blockade of CXCL10 protects mice from acute colitis and enhances crypt cell survival. *Eur J Immunol* 2002;32:3197-3205.

246. Davidson NJ, Leach MW, Fort MM and others. T helper cell 1-type CD4+ T cells, but not B cells, mediate colitis in interleukin 10-deficient mice. *J Exp Med* 1996;184:241-251.
247. Papadakis KA, Prehn J, Zhu D and others. Expression and regulation of the chemokine receptor CXCR3 on lymphocytes from normal and inflammatory bowel disease mucosa. *Inflamm Bowel Dis* 2004;10:778-788.
248. Uguccioni M, Mackay CR, Ochensberger B and others. High expression of the chemokine receptor CCR3 in human blood basophils. Role in activation by eotaxin, MCP-4, and other chemokines. *J Clin Invest* 1997;100:1137-1143.
249. Helwig U, Lammers KM, Gionchetti P and others. MCP-3 in inflammatory bowel disease. *Gut* 2000;47:155.
250. Autschbach F, Giese T, Gassler N and others. Cytokine/chemokine messenger-RNA expression profiles in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Virchows Arch* 2002;441:500-513.
251. Lacher M, Kappler R, Berkholtz S and others. Association of a CXCL9 polymorphism with pediatric Crohn's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;363:701-707.
252. Meyer M, Hensbergen PJ, van der Raaij-Helmer EM and others. Cross reactivity of three T cell attracting murine chemokines stimulating the CXC chemokine receptor CXCR3 and their induction in cultured cells and during allograft rejection. *Eur J Immunol* 2001;31:2521-2527.
253. Sauty A, Colvin RA, Wagner L and others. CXCR3 internalization following T cell-endothelial cell contact: preferential role of IFN-inducible T cell alpha chemoattractant (CXCL11). *J Immunol* 2001;167:7084-7093.
254. Wang W, Soto H, Oldham ER and others. Identification of a novel chemokine (CCL28), which binds CCR10 (GPR2). *J Biol Chem* 2000;275:22313-22323.
255. Forssmann U, Uguccioni M, Loetscher P and others. Eotaxin-2, a novel CC chemokine that is selective for the chemokine receptor CCR3, and acts like eotaxin on human eosinophil and basophil leukocytes. *J Exp Med* 1997;185:2171-2176.
256. Kitaura M, Suzuki N, Imai T and others. Molecular cloning of a novel human CC chemokine (Eotaxin-3) that is a functional ligand of CC chemokine receptor 3. *J Biol Chem* 1999;274:27975-27980.
257. Shinkai A, Yoshisue H, Koike M and others. A novel human CC chemokine, eotaxin-3, which is expressed in IL-4-stimulated vascular endothelial cells, exhibits potent activity toward eosinophils. *J Immunol* 1999;163:1602-1610.
258. Garcia G, Godot V, Humbert M. New chemokine targets for asthma therapy. *Curr Allergy Asthma Rep* 2005;5:155-160.
259. Smith RE, Strieter RM, Zhang K and others. A role for C-C chemokines in fibrotic lung disease. *J Leukoc Biol* 1995;57:782-787.

260. Kabelitz D, Wesch D. Features and functions of gamma delta T lymphocytes: focus on chemokines and their receptors. *Crit Rev Immunol* 2003;23:339-370.
261. Shibahara T, Si-Tahar M, Shaw SK and others. Adhesion molecules expressed on homing lymphocytes in model intestinal epithelia. *Gastroenterology* 2000;118:289-298.
262. Berrebi D, Languetin J, Ferkdadji L and others. Cytokines, chemokine receptors, and homing molecule distribution in the rectum and stomach of pediatric patients with ulcerative colitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003;37:300-308.
263. Jo Y, Matsumoto T, Yada S and others. CCR4 is an up-regulated chemokine receptor of peripheral blood memory CD4+ T cells in Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* 2003;132:332-338.
264. Garcia-Zepeda EA, Rothenberg ME, Ownbey RT and others. Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophil cells and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia. *Nat Med* 1996;2:449-456.
265. Chen W, Paulus B, Shu D and others. Increased serum levels of eotaxin in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:515-520.
266. Mir A, Minguez M, Tatay J and others. Elevated serum eotaxin levels in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2002;97:1452-1457.
267. Yoshida T, Imai T, Takagi S and others. Structure and expression of two highly related genes encoding SCM-1/human lymphotactin. *FEBS Lett* 1996;395:82-88.
268. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G and others. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 1997;385:640-644.
269. von Andrian UH, Mackay CR. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med* 2000;343:1020-1034.
270. Bonecchi R, Sozzani S, Stine JT and others. Divergent effects of interleukin-4 and interferon-gamma on macrophage-derived chemokine production: an amplification circuit of polarized T helper 2 responses. *Blood* 1998;92:2668-2671.
271. Syrbe U, Siveke J, Hamann A. Th1/Th2 subsets: distinct differences in homing and chemokine receptor expression? *Springer Semin Immunopathol* 1999;21:263-285.
272. Yoshimura HH, Graham DY, Estes MK and others. Investigation of association of mycobacteria with inflammatory bowel disease by nucleic acid hybridization. *J Clin Microbiol* 1987;25:45-51.
273. Murphy PM. Chemokine Receptors: Cloning Strategies. *Methods* 1996;10:104-118.
274. Wu D, LaRosa GJ, Simon MI. G protein-coupled signal transduction pathways for interleukin-8. *Science* 1993;261:101-103.
275. Olson TS, Ley K. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002;283:R7-28.

276. Rodriguez-Frade JM, Vila-Coro AJ, de Ana AM and others. The chemokine monocyte chemoattractant protein-1 induces functional responses through dimerization of its receptor CCR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:3628-3633.
277. Rasmussen SG, Choi HJ, Rosenbaum DM and others. Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 2007;450:383-387.
278. Lefkowitz RJ, Cotecchia S, Samama P and others. Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Trends Pharmacol Sci* 1993;14:303-307.
279. Forster R, Emrich T, Kremmer E and others. Expression of the G-protein--coupled receptor BLR1 defines mature, recirculating B cells and a subset of T-helper memory cells. *Blood* 1994;84:830-840.
280. Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science* 1997;277:2005-2007.
281. Sallusto F, Lenig D, Mackay CR and others. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med* 1998;187:875-883.
282. Luster AD. Chemokines regulate lymphocyte homing to the intestinal mucosa. *Gastroenterology* 2001;120:291-294.
283. Legler DF, Loetscher M, Roos RS and others. B cell-attracting chemokine 1, a human CXC chemokine expressed in lymphoid tissues, selectively attracts B lymphocytes via BLR1/CXCR5. *J Exp Med* 1998;187:655-660.
284. Kunkel EJ, Campbell JJ, Haraldsen G and others. 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. *J Exp Med* 2000;192:761-768.
285. Matloubian M, David A, Engel S and others. A transmembrane CXC chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo. *Nat Immunol* 2000;1:298-304.
286. Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 1998;392:565-568.
287. Olson TS, Ley K. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002;283:R7-28.
288. Thelen M. Dancing to the tune of chemokines. *Nat Immunol* 2001;2:129-134.
289. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 1997;15:675-705.
290. Kuschert GS, Coulin F, Power CA and others. Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses. *Biochemistry* 1999;38:12959-12968.

291. Hoogewerf AJ, Kuschert GS, Proudfoot AE and others. Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines. *Biochemistry* 1997;36:13570-13578.
292. Ley K. Pathways and bottlenecks in the web of inflammatory adhesion molecules and chemoattractants. *Immunol Res* 2001;24:87-95.
293. Jones SA, Moser B, Thelen M. A comparison of post-receptor signal transduction events in Jurkat cells transfected with either IL-8R1 or IL-8R2. Chemokine mediated activation of p42/p44 MAP-kinase (ERK-2). *FEBS Lett* 1995;364:211-214.
294. Tilton B, Andjelkovic M, Didichenko SA and others. G-Protein-coupled receptors and Fcγ-receptors mediate activation of Akt/protein kinase B in human phagocytes. *J Biol Chem* 1997;272:28096-28101.
295. Thelen M, Ugucioni M, Bosiger J. PI 3-kinase-dependent and independent chemotaxis of human neutrophil leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;217:1255-1262.
296. Turner L, Ward SG, Westwick J. RANTES-activated human T lymphocytes. A role for phosphoinositide 3-kinase. *J Immunol* 1995;155:2437-2444.
297. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv Immunol* 1994;55:97-179.
298. Ali H, Richardson RM, Haribabu B and others. Chemoattractant receptor cross-desensitization. *J Biol Chem* 1999;274:6027-6030.
299. Richardson RM, DuBose RA, Ali H and others. Regulation of human interleukin-8 receptor A: identification of a phosphorylation site involved in modulating receptor functions. *Biochemistry* 1995;34:14193-14201.
300. Proudfoot AE, Power CA, Wells TN. The strategy of blocking the chemokine system to combat disease. *Immunol Rev* 2000;177:246-256.
301. Bokoch GM. Chemoattractant signaling and leukocyte activation. *Blood* 1995;86:1649-1660.
302. Lee MS, Kim YJ. Pattern-recognition receptor signaling initiated from extracellular, membrane, and cytoplasmic space. *Mol Cells* 2007;23:1-10.
303. Ma Q, Jones D, Borghesani PR and others. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:9448-9453.
304. Harrison JK, Jiang Y, Chen S and others. Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:10896-10901.
305. Cyster JG. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science* 1999;286:2098-2102.

306. Loetscher P, Moser B, Baggiolini M. Chemokines and their receptors in lymphocyte traffic and HIV infection. *Adv Immunol* 2000;74:127-180.
307. Arimilli S, Ferlin W, Solvason N and others. Chemokines in autoimmune diseases. *Immunol Rev* 2000;177:43-51.
308. Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1989;170:2-6.
309. Best WR, Bechtel JM, Singleton JW and others. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* 1976;70:439-444.
310. Walmsley RS, Ayres RC, Pounder RE and others. A simple clinical colitis activity index. *Gut* 1998;43:29-32.
311. Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 1989;96:736-749.
312. Sambuy Y, De A, I, Ranaldi G and others. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol* 2005;21:1-26.
313. Manousou P, Kolios G, Drygiannakis I and others. Expression of a splice variant of CXCR3 in Crohn's disease patients; indication for a lymphocyte--epithelial cell interaction. *J Gastroenterol Hepatol* 2008;23:1823-1833.
314. Neuman MG. Immune dysfunction in inflammatory bowel disease. *Transl Res* 2007;149:173-186.
315. Monteleone G, Fina D, Caruso R and others. New mediators of immunity and inflammation in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2006;22:361-364.
316. Ince MN, Elliott DE. Immunologic and molecular mechanisms in inflammatory bowel disease. *Surg Clin North Am* 2007;87:681-696.
317. Boirivant M, Fuss IJ, Chu A and others. Oxazolone colitis: A murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4. *J Exp Med* 1998;188:1929-1939.
318. Parronchi P, Romagnani P, Annunziato F and others. Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am J Pathol* 1997;150:823-832.
319. Kobayashi T, Okamoto S, Hisamatsu T and others. IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 2008;57:1682-1689.
320. Abraham C, Cho JH. IL-23 and autoimmunity: new insights into the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Annu Rev Med* 2009;60:97-110.

321. Kristensen NN, Gad M, Thomsen AR and others. CXC chemokine receptor 3 expression increases the disease-inducing potential of CD4+. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:374-381.
322. Dwinell MB, Luger N, Eckmann L and others. Regulated production of interferon-inducible T-cell chemoattractants by human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2001;120:49-59.
323. Ehlert JE, Addison CA, Burdick MD and others. Identification and partial characterization of a variant of human CXCR3 generated by posttranscriptional exon skipping. *J Immunol* 2004;173:6234-6240.
324. Kelsen SG, Aksoy MO, Yang Y and others. The chemokine receptor CXCR3 and its splice variant are expressed in human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;287:L584-L591.
325. Glaser J, Gonzalez R, Perreau VM and others. Neutralization of the chemokine CXCL10 enhances tissue sparing and angiogenesis following spinal cord injury. *J Neurosci Res* 2004;77:701-708.
326. Strieter RM, Belperio JA, Burdick MD and others. CXC chemokines in angiogenesis relevant to chronic fibroproliferation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005;4:23-26.
327. Romagnani P, Lasagni L, Annunziato F and others. CXC chemokines: the regulatory link between inflammation and angiogenesis. *Trends Immunol* 2004;25:201-209.
328. Banks C, Bateman A, Payne R and others. Chemokine expression in IBD. Mucosal chemokine expression is unselectively increased in both ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Pathol* 2003;199:28-35.
329. Mir A, Minguetz M, Tatay J and others. Elevated serum eotaxin levels in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2002;97:1452-1457.
330. Sauty A, Dziejman M, Taha RA and others. The T cell-specific CXC chemokines IP-10, Mig, and I-TAC are expressed by activated human bronchial epithelial cells. *J Immunol* 1999;162:3549-3558.
331. Gerber BO, Zanni MP, Ugucioni M and others. Functional expression of the eotaxin receptor CCR3 in T lymphocytes co-localizing with eosinophils. *Curr Biol* 1997;7:836-843.
332. Chen W, Paulus B, Shu D and others. Increased serum levels of eotaxin in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:515-520.
333. Kucharzik T, Hudson JT, III, Luger A and others. Acute induction of human IL-8 production by intestinal epithelium triggers neutrophil infiltration without mucosal injury. *Gut* 2005;54:1565-1572.
334. Ruth JH, Lukacs NW, Warmington KS and others. Expression and participation of eotaxin during mycobacterial (type 1) and schistosomal (type 2) antigen-elicited granuloma formation. *J Immunol* 1998;161:4276-4282.

