**Πανεπιστήμιο Κρήτης**

**Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών**

**Τμήμα Βιολογίας**

# Αναστροφή του αυτοάνοσου φαινοτύπου εντερομυελίτιδας με διαλυτά τάξης ΙΙ MHC μόρια (sMHCII)

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

ΠΜΣ «Πρωτεινική Βιοτεχνολογία»

Συραγώ Σπανού

Α.Μ 867

Υπεύθυνη καθηγήτρια τμ. Βιολογίας: Ειρήνη Αθανασάκη

Σεπτέμβριος 2019

Ηράκλειο Κρήτης

## Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου, κ. Ειρήνη Αθανασάκη για την υποστήριξη και την καθοδήγηση της στην εκπόνηση της πτυχιακής μου εργασίας. Την ευχαριστώ για τη στήριξη και τις πολύτιμες συμβουλές της. Κάθε συζήτηση μαζί της ήταν πολύ βοηθητική για μένα καθώς μέσα από αυτές κατανόησα πόσο σημαντικό είναι να βλέπουμε κάθε πρόβλημα (ερευνητικό και μη) από διαφορετικές οπτικές γωνίες ώστε να το προσεγγίζουμε καλύτερα. Μέσα από τις συζητήσεις μας με έκανε να καταλάβω πόσο σημαντικό είναι να πιστεύουμε στις δυνάμεις μας και να πεισμώνουμε στους στόχους μας.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Κατερίνα Μπακέλα για την πολύτιμη βοήθεια της στα πειράματα μου, καθημερινά στο εργαστήριο. Την ευχαριστώ που μου μετέδωσε τις γνώσεις της και με εκπαίδευσε σε νέες τεχνικές. Οι συμβουλές της καθ'όλη τη διάρκεια πραγματοποίησης των πειραμάτων μου ήταν για μένα άκρως βοηθητικές.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Ανοσοβιολογίας του τμήματος Βιολογίας, Πανεπίστημίου Κρήτης για την βοήθεια τους και το όμορφο κλίμα συνεργασίας. Εύχομαι σε όλους να κατακτήσουν τους στόχους και τα όνειρα τους. Ευχαριστώ επίσης το Γιαννη Μπιτσάκη για τη βοήθεια του και την όμορφη συνεργασία μας στο ίδιο ερευνητικό πρότζεκτ.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου και στην αδερφή μου Κατερίνα. Χωρίς αυτούς δεν θα μπορούσα να είχα φτάσει ως εδώ. Ένα ευχαριστώ είναι πραγματικά λίγο για όλα όσα μου έχουν προσφέρει.

Περιεχόμενα

**1.** Περίληψη (σελ: 6)

**2. Εισαγωγή** (σελ: 7)

**2.1** Το ανοσοποιητικό σύστημα (σελ: 7)
**2.2** Αναγνώριση αντιγόνου από Τ-κύτταρα και στοιχεία του Μείζονος Συμπλόκου Ιστοσυμβατότητας (MHC) (σελ: 8)
**2.3** Μηχανισμοί ανοχής: Πρόληψη των αυτοάνοσων αντιδράσεων (σελ: 11)
**2.4** Η σκλήρυνση κατά πλάκας ως αυτοάνοσο νευροεκφυλλιστικό νόσημα (σελ: 13)
**2.5** Η Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα (experimental autoimmune encephalomyelitis -EAE) (σελ: 14)
**2.6** Η μικρογλοία (σελ: 14)
**2.7** Η ενεργοποίηση της μικρογλοίας (σελ: 17)
**2.8** Το εντερικό νευρικό σύστημα (σελ: 19**)**
**2.9** Η πρωτεΐνη του πρωτεολιπιδίου (PLP) (σελ: 21)
**2.10** Ο λιποπολυσακχαρίτης LPS (σελ: 22)
**2.11** Η κυτταρική σειρά BV-2 (σελ: 24)
**2.12** Ο ανασταλτικός παράγοντας μετανάστευσης των μακροφάγων (MIF) (σελ: 25)
**2.13** Σκοπός (σελ: 27)

**3. Πειραματικό μέρος: Υλικά και Μέθοδοι (σελ: 28)**
**3.1.** Πειραματικά ποντίκια Balb/c, συλλογή ορού και οργάνων (σελ: 28)
**3.2** Βιοχημικά υλικά (σελ: 28)
**3.2.1** Θρεπτικό υλικό και συμπληρώματα (σελ: 28)
**3.2.2** Ενεργοποίηση με λιποπολυσακχαρίτη (σελ: 28)
**3.2.3** Εγκεφαλικό εκχύλισμα και πλήρες ανοσοενισχυτικό του Freud (complete Feund's adjuvant- CFA) (σελ: 29)
**3.2.4** Διαλυτά MHC class II μόρια (σελ: 29)
**3.2.5** Αντισώματα (σελ: 29)
**3.3** *In Vitro* πειράματα (σελ: 31)
**3.3.1.1** Καλλιέργεια σπλενικών κυττάρων και διέγερση τους με εγκεφαλικό εκχύλισμα (σελ: 31)
**3.3.1.2** Απομόνωση κυττάρων σπλήνας (σελ: 31)
**3.3.1.3** Χαρακτηρισμός (σελ: 31)
**3.3.2.1** Καλλιέργεια κυττάρων BV2 (σελ: 31)
**3.3.2.2** Χαρακτηρισμός (σελ: 32)
**3.4** In vivo πειράματα (σελ: 32)
**3.4.1** Πειραματικά ποντίκια Balb/c (σελ: 32)
**3.4.2** Ανοσοποίηση πειραματικών ποντικιών (σελ: 32)
**3.4.3** Αιμοληψίες (σελ: 32)
**3.4.4** Απομόνωση οργάνων (σελ: 34)
**3.4.5** Χαρακτηρισμός (σελ: 34)
**3.5 Τεχνικές (σελ:34)**
**3.5.1** Παρασκευή εγκεφαλικού εκχυλίσματος (σελ:34)

**3.5.2** Απομόνωση πρωτογενών κυττάρων του μυεντερικού πλέγματος πειραματικού ποντικού Balb/c (σελ:35)
**3.5.3** Ποσοτικοποίηση πρωτεΐνης με τη μέθοδο Lowry (σελ:35)
**3.5.4** Έλεγχος πολλαπλασιασμού κυττάρων με ραδιενεργή θυμιδίνη ($^3$HTdR) (σελ:36)
**3.5.5** Κυτταρομετρία ροής (FACs) (σελ:37)
**3.5.6** Ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσροφητική δοκιμή (ELISA) (σελ: 38)
**3.5.7** Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών (σελ: 39)
**3.5.7.1** Ακινητοποίηση αντισώματος σε σφαιρίδια (σελ: 39)
**3.5.7.2** Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών (σελ: 40)
**3.5.8** Dialysis (σελ: 41)
**3.5.9** Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακριλαμίδης (SDS-PAGE) (σελ: 41)
**3.5.10** Χρώση με νιτρικό άργυρο (Silver staining) (σελ: 42)
**3.5.11** Ποιοτική και ποσοτική αξιολόγηση αποτελεσμάτων κυτταρομετρίας ροής με FCS Express V3 (σελ: 43)

**4. Αποτελέσματα (σελ: 45)**
**4.1** Η επίδραση της πρωτεΐνης πρωτεολιπιδικής μυελίνης (PLP) στο ανοσοποιητικό σύστημα, in vitro (σελ: 45)
**4.1.1** Ταυτοποίηση της ανοχογόνου δόσης PLP σε καλλιέργεια κυττάρων σπλήνα πειραματικών ποντικιών Balb/c, με χρήση ραδιενεργής θυμιδίνης (σελ: 45)
**4.1.2** Επίδραση της ανοσογόνου δόσης PLP στους λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς σπλήνα πειραματικών ποντικιών Balb/c, με χρήση ανοσοφθορισμού κυτταρομετρίας ροής (σελ: 46)
**4.1.3** Επίδραση της ανοσογόνου δόσης PLP στην παραγωγή μη-ειδικών και ειδικών αντισωμάτων στα υπερκείμενα καλλιεργειών σπλήνα πειραματικών ποντικιών Balb/c, με χρήση ανοσοδοκιμασίας ELISA (σελ:49)
**4.1.4** Επίδραση της ανοσογόνου δόσης PLP στην παραγωγή κυτοκινών, στα υπερκείμενα καλλιεργειών σπλήνα πειραματικών ποντικιών Balb/c, με χρήση ανοσοδοκιμασίας ELISA (σελ: 50)
**4.2** Η επίδραση της πρωτεΐνης πρωτεολιπιδικής μυελίνης (PLP) σε ανοσοποιημένα πειραματικά ποντίκια Balb/c, in vivo (σελ: 53)
**4.2.1** Επίδραση της ανοσογόνου δόσης PLP στην παραγωγή μη-ειδικών και ειδικών αντισωμάτων στον ορό ανοσοποιημένων πειραματικών ποντικιών Balb/c, με χρήση ανοσοδοκιμασίας ELISA (σελ: 53)
**4.2.1.1** Ανοσοποίηση πειραματικών ποντικιών με 500μg αυτοαντιγόνου (σελ: 53)
**4.2.1.2** Ανοσοποίηση πειραματικών ποντικιών με γαλάκτωμα αυτοαντιγόνου και πλήρες ανοσοενισχυτικό του Freud (CFA) (σελ: 55)
**4.2.2** Επίδραση της ανοσογόνου δόσης PLP στους λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς σπλήνα ανοσοποιημένων πειραματικών ποντικιών Balb/c, με χρήση ανοσοφθορισμού κυτταρομετρίας ροής (σελ: 58)
**4.2.3** Επίδραση της ανοσογόνου δόσης PLP στην έκφραση CD11 κυττάρων στο μυεντερικό πλέγμα ανοσοποιημένων πειραματικών ποντικιών Balb/c, με χρήση ανοσοφθορισμού κυτταρομετρίας ροής (σελ: 60)
**4.3** Η επίδραση του λιποπολυσακχαρίτη (LPS) στην ενεργοποίηση της μικρογλοιακής κυτταρικής σειράς BV-2, in vitro (σελ: 61)

**4.3.1** Μελέτη ανίχνευσης των επιφανειακών μαρτύρων $I_A/I_E$, CD74 και MIF, σε κύτταρα BV-2, με χρήση ανοσοφθορισμού κυτταρομετρίας ροής (σελ: 61)
**4.3.2** Μελέτη ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης παράγοντα TNF-α και πρωτεινών $I_A/I_E$, CD74 και MIF, σε υπερκείμενα κυτταροκαλλιεργειών BV-2, με χρήση ανοσοδοκιμασίας ELISA (σελ: 63)
**4.3.3** Ανοσοκατακρήμνιση CD74 πρωτεΐνης από ομογενοποίημα κυττάρων BV-2 και ποσοτικοποίηση της με τη μέθοδο Lowry (σελ: 67)
**4.3.4** Μελέτη απομόνωσης CD74 πρωτεΐνης από εκχύλισμα κυττάρων BV-2 και διερεύνηση πιθανού συμπλόκου CD74-MIF, με χρήση ανοσοδοκιμασίας ELISA (σελ: 67)

**5. Συζήτηση (σελ: 68)**

**5.1** Η επίδραση της πρωτεΐνης πρωτεολιπιδικής μυελίνης (PLP) στο ανοσοποιητικό σύστημα, in vitro (σελ: 70)
**5.2** Η επίδραση της πρωτεΐνης πρωτεολιπιδικής μυελίνης (PLP) σε ανοσοποιημένα πειραματικά ποντίκια Balb/c, in vivo (σελ: 72)
**5.3** Η επίδραση του λιποπολυσακχαρίτη (LPS) στην ενεργοποίηση της μικρογλοιακής κυτταρικής σειράς BV-2, in vitro (σελ: 75)

**6. Βιβλιογραφία (σελ: 77)**

# 1. Περίληψη

Το ανοσοποιητικό σύστημα, αποτελεί ένα πολύπλοκο λειτουργικά σύστημα με ευέλικτη αρχιτεκτονική και βέλτιστα αντανακλαστικά, το οποίο «απλώνει» τις διασυνδέσεις του σε όλους τους εύπλαστους ιστούς, διασφαλίζοντας μία λειτουργική ομοιόσταση και προστασία από παθογόνα. Υπόκειται σε αυστηρή ρύθμιση ενώ η βάση της ρύθμισης αυτής είναι η ικανότητα του να διαχωρίζει τα στοιχεία του μη-εαυτού από τον εαυτό. Δεν θα ήταν υπερβολικό να εκφράσουμε ότι το ανοσοποιητικό σύστημα ισορροπεί σε ένα λεπτό σχοινί, μεταξύ της δημιουργίας ανοσολογικών αποκρίσεων έναντι παθογόνων και της ανοχής σε στοιχεία του «εαυτού», με σκοπό τη διατήρηση της ομοιόστασης. Η διαταραχή της ισορροπίας αναγνώρισης ξένου αντιγόνου/αυτοαντιγόνου όπως π.χ., η έλλειψη ανοσολογικών αποκρίσεων (ανοσοανεπάρκεια), ή η απάντηση έναντι στοιχείων «εαυτού» οδηγούν σε παθολογικές καταστάσεις και συχνά σε ασθένεια.

Από τη δεκαετία του 1980, συσσωρεύονται στοιχεία που αποδεικνύουν μια αμφίδρομη ροή πληροφοριών μεταξύ του νευρικού συστήματος και του ανοσοποιητικού συστήματος. Προσπαθώντας να κατανοήσουμε την συνεργατικότητα και τη δυναμική των δύο αυτών συστημάτων σε καταστάσεις ασθένειας και μη, ήρθε για να προστεθεί ακόμα μία πληροφορία που αυξάνει το επίπεδο πολυπλοκότητας των μηχανισμών αυτών, το εντερικό νευρικό σύστημα (ΕΝΣ). Αυτό το σύνθετο δίκτυο νευρώνων και γλοιακών κυττάρων, ελέγχει βασικές γαστρεντερικές λειτουργίες, τη ροή αίματος και τις ανοσολογικές και φλεγμονώδεις διεργασίες. Επομένως, γίνεται αντιληπτό πως αποτελεί ένα ακόμα σημείο συνάντησης του ανοσοποιητικού και του νευρικού συστήματος. Η πρόσφατη μελέτη, Wunsch et al. 2017, υποστηρίζει την εμπλοκή του ΕΝΣ, ακόμα και σε αυτοάνοσα νευροεκφυλλιστικά νοσήματα όπως αυτό της σκλήρυνσης κατά πλάκας.

Ο σκοπός αυτής της εργασίας ήταν να μελετηθεί η απόκριση του ανοσοποιητικού και του εντερικού νευρικού συστήματος, σε ένα ζωικό μοντέλο εντερομυελίτιδας το οποίο προκλήθηκε με σπάσιμο της ανοχής, με αυτό-αντιγόνο. Το αυτό-αντιγόνο που χρησιμοποιήθηκε ήταν εκχύλισμα εγκεφάλου, ίδιου είδους με αυτό που μελετήθηκε (πειραματικά ποντίκια Balb/c), το οποίο βρίθει σε πρωτεΐνη PLP. Μία πρωτεΐνη που μαζί με άλλες (MBP, MOG) αποτελούν τον κύριο «στόχο» των μακροφάγων κατά τις διαδικασίες απομυελίνωσης των νευρώνων του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ), που συναντάται στο αυτοάνοσο νευροεκφυλλιστικό νόσημα της σκλήρυνσης κατά πλάκας (ΣΚΠ). Οι πειραματικές προσεγγίσεις για την ανίχνευση της αυτό-ανοσοαπόκρισης ήταν ποικίλες. Αρχικά, μελετήθηκε η παραγωγή αυτό-αντισωμάτων, καθώς και η έκκριση χαρακτηριστικών κυτοκινών που σηματοδοτούν την ανοσολογική αντίδραση. Παράλληλα, διερευνήθηκε το πρότυπο ποσοτικής έκφρασης λεμφοκυτταρικών πληθυσμών, όπως και τα επίπεδα έκφρασης της ενεργοποιημένης μικρογλοίας του εντέρου. Επιπλέον, επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη αυτό-αντισωμάτων και άρα φλεγμονής, προχωρήσαμε στην εφαρμογή πιθανής θεραπευτικής στρατηγικής με διαλυτά μόρια τάξης 2 (soluble-MHCII molecules), τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί και στο παρελθόν σε αντίστοιχη περίπτωση αυτό-ανοσοαπόκρισης (αυτοάνοσος συστηματικός ερυθηματώδης λύκος –SLE). Τέλος, μελετώντας τη κυτταρική σειρά BV-2 (*in vitro* μοντέλο για τη μελέτη της μικρογλοίας) και διεγείροντάς τη προς ενεργοποίηση με τον λιποπολυσακχαρίτη (LPS), αναζητήσαμε τον πιθανό ρόλο του συμπλόκου MIF-CD74, στη μη-επιδείνωση της αυτό-ανοσοαπόκρισης.

# 2. Εισαγωγή

## 2.1 Το ανοσοποιητικό σύστημα

Το ανοσοποιητικό σύστημα είναι μια οργάνωση κυττάρων και μορίων με εξειδικευμένους ρόλους που δρούν για την υπεράσπιση του οργανισμού από τη μόλυνση. Υπάρχουν δύο θεμελιώδεις διαφορετικοί τύποι ανοσολογικών αποκκρίσεων για τα εισβάλλοντα παθογόνα. Οι έμφυτες και οι προσαρμοστικές αποκρίσεις. Η έμφυτη απόκριση χρησιμοποιεί φαγοκυτταρικούς πληθυσμούς (ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα και μακροφάγα), κύτταρα που απελευθερώνουν φλεγμονώδεις παράγοντες (βασεόφιλα, μαστοκύτταρα και ηωσινόφιλα) και τα κύτταρα φυσικών φονιάδων (NK). Τα μοριακά συστατικά της έμφυτης απόκρισης, περιλαμβάνουν το συμπλήρωμα, πρωτεΐνες οξείας φάσης και κυτοκίνες (όπως οι ιντερφερόνες) [1]. Η προσαρμοστική απόκριση περιλαμβάνει το πολλαπλασιασμό των αντιγόνο-ειδικών Β και Τ κυττάρων, η οποία συμβαίνει όταν οι επιφανειακοί υποδοχείς αυτών των κυττάρων συνδέονται με το αντιγόνο. Εξειδικευμένα κύτταρα, τα αποκαλούμενα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APCs), παρουσιάζουν το αντιγόνο στα λεμφοκύτταρα και συνεργάζονται μαζί τους στην απόκριση προς το αντιγόνο. Τα Β-κύτταρα εκκρίνουν ανοσοσφαιρίνες, οι οποίες αποτελούν ειδικά για το αντιγόνο αντισώματα, υπεύθυνα για την εξάλειψη των εξωκυττάριων μικροοργανισμών. Τα Τ-κύτταρα βοηθούν τα Β-λεμφοκύτταρα να παράγουν αντισώματα όπως επίσης ενεργοποιούν τα μακροφάγα για την αντιμετώπιση των παθογόνων. Συνήθως, παρατηρείται συνεργασία μεταξύ των δύο αποκρίσεων, έμφυτης και προσαρμοστικής για την εξάλειψη των παθογόνων παραγόντων. Όλοι αυτοί οι κυτταρικοί πληθυσμοί που περιγράφηκαν, αναπτύσσονται από πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα του εμβρυικού ήπατος και του μυελού των οστών. Σχετικά με την ωρίμανση τους, τα Β-κύτταρα ωριμάζουν στο μυελό των οστών, και τα Τ-κύτταρα μεταφέρονται στον θύμο αδένα για την ολοκλήρωση της ανάπτυξης τους. Οι προσαρμοσμοστικές ανοσοαποκρίσεις λαμβάνουν χώρα στους λεμφαδένες, τον σπλήνα και στο λεμφοειδή ιστό που σχετίζεται με τη βλεννογόνο. Αυτοί αναφέρονται ως δευτερεύοντες λεμφοειδείς ιστοί. Στον σπλήνα και τους λεμφαδένες, η ενεργοποίηση λεμφοκυττάρων σε απόκριση προς το αντιγόνο, συμβαίνει σε διακριτά τμήματα των Β και Τ κυττάρων του λεμφοειδούς ιστού. Διάχυτοι πληθυσμοί λεμφοειδών κυττάρων συναντώνται σε ολόκληρο τον πνεύμονα και στη δομή του μυεντερικού πλέγματος [2].

Το ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί να ανταποκριθεί σχεδόν σε οτιδήποτε μπορεί να δεσμευτεί στους υποδοχείς είτε του έμφυτου είτε του προσαρμοστικού ανοσοποιητικού συστήματος. Τα μόρια που αναγνωρίζονται από τους υποδοχείς σε λεμφοκύτταρα, αναφέρονται ως αντιγόνα και μπορούν να κυμαίνονται από μικρές χημικές δομές έως πολύ περίπλοκα μόρια [3]. Μία ανοσοαπόκριση απαιτεί τη συνεισφορά πολλών λεμφοκυτταρικών πληθυσμών [4]. Οι διαφορετικοί υποπληθυσμοί λευκοκυττάρων μπορούν να διακριθούν μορφολογικά με ιστολογική μελέτη και με ανάλυση του φάσματος διαφοροποίησης γλυκοπρωτεϊνών, που εμφανίζονται στις κυτταρικές μεμβράνες τους. Αυτά τα αντιγόνα προσδιορισμού φαινοτύπου συνιστούν μία συστοιχία αριθμών διαφοροποίησης (CD). Χαρακτηριστικά, σήμερα υπάρχουν πάνω από 350 καθορισμένα αντιγόνα CD. Η σύνθεση όλων των κυτταρικών πληθυσμών του ανοσοποιητικού συστήματος ξεκινά όταν ένα αρχέγονο πολυδύναμο κύτταρο του αιμοποιητικού διαφοροποιείται προς στο μυελοειδές προγονικό

κύτταρο ή προς λεμφοειδές προγονικό κύτταρο. Ο κοινός λεμφοειδής πρόγονος διαφοροποιείται περαιτέρω στους τέσσερις κύριους πληθυσμούς των ώριμων λεμφοκυττάρων: Β-κύτταρα, Τ-κύτταρα, κύτταρα φονιάδες (NK) και κύτταρα NK-T. Αυτοί οι πληθυσμοί λεμφοκυττάρων μπορούν να διακριθούν ανάλογα με τους επιφανειακούς δείκτες που διαθέτουν. Τα Β-κύτταρα χαρακτηρίζονται από την έκφραση του υποδοχέα Β-κυττάρων για αντιγόνο, (Ig). Τα Τ-κύτταρα ορίζονται από την έκφραση του υποδοχέα TCR στη κυτταρική τους επιφάνεια, μια διαμεμβρανική ετεροδιμερή πρωτεΐνη που δεσμεύει το επεξεργασμένο αντιγόνο που εκτίθεται από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APC). Τα κύτταρα NK ορίζονται μορφολογικά ως μεγάλα κοκκώδη λεμφοκύτταρα. Διακρίνονται από την έλλειψη TCR ή Ig στην επιφάνεια τους. Τα κύτταρα NK-Τα, μοιράζονται χαρακτηριστικά τόσο των NK κυττάρων όσο και των κυττάρων Τ [4].

## 2.2 Αναγνώριση αντιγόνου από Τ-κύτταρα και στοιχεία του Μείζονος Συμπλόκου Ιστοσυμβατότητας (MHC)

Μια από τις μεγαλύτερες προκλήσεις που αντιμετωπίζει το ανοσοποιητικό σύστημα, είναι η ταυτοποίηση κυττάρων που έχουν μολυνθεί από παθογόνα. Η απλή αναγνώριση και εξουδετέρωση του μικροβίου στην εξωκυτταρική του μορφή δεν αποτελεί αποτελεσματικό τρόπο για την εξάλειψη της μόλυνσης. Ως εκ τούτου, το μολυσμένο κύτταρο πρέπει να ταυτοποιείται και να καταστρέφεται. Ένας από τους κύριους ρόλους των Τ-κυττάρων στην ανοσολογική απόκριση, είναι η ταυτοποίηση και η καταστροφή των μολυσμένων κυττάρων. Τα Τ-κύτταρα είναι ικανά να αναγνωρίσουν πεπτιδικά θραύσματα αντιγόνων, που εκτίθενται στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (μέσω της φαγοκύττωσης) [4]. Ο τρόπος με τον οποίο το ανοσοποιητικό σύστημα εκπαιδεύει τα Τ-κύτταρα να αναγνωρίζουν μολυσμένα κύτταρα και γενικότερα φλεγμονές, επιτυγχάνεται καθιστώντας τα ικανά να αναγνωρίζουν το ίδιο καλά, συστατικά του εαυτού και παθογόνα [4]. Τα μόρια που ευθύνονται για αυτού του είδους τη διττή αναγνώριση είναι οι πρωτεΐνες του μείζονος συμπλόκου ιστοσυμβατότητας MHC. Τα μόρια MHC (επίσης αποκαλούμενα αντιγόνα [HLA] που σχετίζονται με ανθρώπινα λευκοκύτταρα) είναι γλυκοπρωτεΐνες κυτταρικής επιφάνειας που δεσμεύουν πεπτιδικά θραύσματα πρωτεϊνών που είτε έχουν συντεθεί εντός του κυττάρου (μόρια MHC κατηγορίας I) είτε έχουν απορροφηθεί από το κύτταρο και είναι πρωτεολυτικά επεξεργασμένα (μόρια κατηγορίας II MHC) [1]. Τα προϊόντα του MHC, παίζουν σημαντικό ρόλο στην διακυτταρική αναγνώριση και την διάκριση του εαυτού από τον μη εαυτό. Το MHC συμμετέχει στην ανάπτυξη τόσο των χυμικών όσο και των κυτταρομεσολαβητικών αποκρίσεων. Ενώ τα αντισώματα μπορούν να αναγνωρίσουν το αντιγόνο σαν ελεύθερο μόριο, τα Τ κύτταρα αναγνωρίζουν ένα αντιγόνο μόνο όταν αυτό συνδέεται με ένα μόριο MHC. Επιπλέον, επειδή τα μόρια MHC λειτουργούν ως αντιγονοπαρουσιαστικές δομές, το συγκεκριμένο σύνολο των μορίων MHC που εκφράζονται σε ένα άτομο επηρεάζει το ρεπερτόριο των αντιγόνων στα οποία τα Τ-λεμφοκύτταρα του ατόμου μπορούν να αποκριθούν.

Τα **κλασσικά μόρια MHC τάξης I** που κωδικοποιούνται από τις περιοχές K, D και L στο ποντίκι και από τις A, B και C γενετικές θέσεις στον άνθρωπο. Εκφράζονται στο ευρύτερο φάσμα

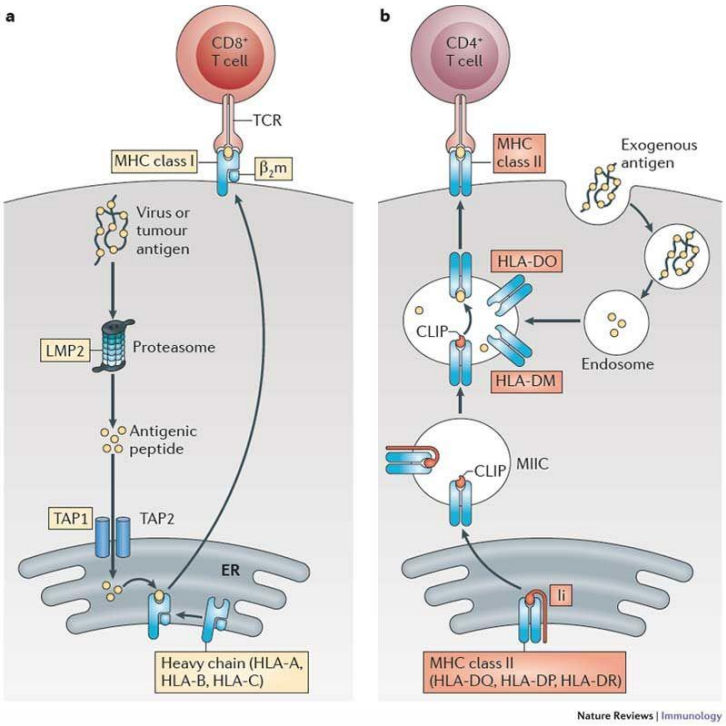
των κυτταρικών τύπων. Σημαντικές εξαιρέσεις, αποτελούν τα κύτταρα του τροφοβλάστη, τα κύτταρα του οφθαλμού και του εγκεφάλου, τα οποία παρουσιάζουν μειωμένη δυνατότητα αναγέννησης. Αυτό συμβαίνει για την προστασία των συγκεκριμένων κυττάρων (λόγω της εξειδικευμένης λειτουργίας τους) από κυτταροτοξικές επιθέσεις. Τα μόρια του MHC τάξης I εμφανίζονται 'αγκυροβολημένα' σε μεμβράνες και σε διαλυτή μορφή σε διάφορα υγρά του σώματος όπως ο ορός και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό [5]. Οι αλυσίδες συνδυάζονται με τέτοιο τρόπο, ώστε να δημιουργείται μία «βιβλιοθήκη», στην οποία τοποθετούνται πεπτίδια του εαυτού (ρύθμιση ανοχής) ή πεπτίδια που είναι ξένα για τον οργανισμό αλλά θεωρούνται ενδογενή (ιϊκές πρωτεΐνες, μη φυσιολογικές πρωτεΐνες του εαυτού) και οι οποίες αναγνωρίζονται από άλλους πληθυσμούς κυττάρων, οι οποίοι οδηγούν το 'μολυσμένο' κύτταρο στην καταστροφή. Ο υποπληθυσμός των Τ-κυττάρων που αναγνωρίζουν πεπτίδια, τα οποία βρίσκονται προσδεμένα με μόρια MHC τάξης I, παρουσιάζουν έντονη κυτταροτοξική δράση.

Τα **κλασσικά μόρια MHC τάξης II** (HLA-DR, DP, DQ στον άνθρωπο και I-A, I-E στον ποντικό) διαφοροποιούνται σημαντικά από τα μόρια MHC τάξης I. Δομικά, αποτελούνται από 2 διαμεμβρανικές βαριά γλυκοζυλιωμένες αλυσίδες, οι οποίες αλληλεπιδρούν με μη-ομοιοπολικούς δεσμούς και σχηματίζουν ένα ετεροδιμερές α/β. Κάθε αλυσίδα διαθέτει ένα τμήμα που διαπερνά την κυτταροπλασματική μεμβράνη, δένοντας έτσι το σύμπλοκο στην επιφάνεια του κυττάρου. Κάθε αλυσίδα έχει δυο επικράτειες α1/α2 και β1/β2. Οι περιοχές α1 και β1 (χαρακτηριστικές δομές μορίων MHC τάξης II, έντονα πολυμορφικές), σχηματίζουν μια θήκη, στην οποία προσδένονται πεπτίδια μήκους 10-15 καταλοίπων [6]. Το ετεροδιμερές συντίθενται στο ενδοπλασματικό δίκτυο όπου προσδένεται και ένα ακόμα μόριο, η σταθερή αλυσίδα (invariant chain, Ii) σχηματίζοντας τριμερές ενώ τελικά τρία τέτοια ετεροτριμερή συνδέονται σχηματίζοντας ένα εννιαμερές. Η σταθερή αλυσίδα δρα ως ένα είδος ψευδοϋποστρώματος καλύπτοντας με ένα μικρό της τμήμα που ονομαζεται Class II associated Ii Peptide-CLIP την αύλακα πρόσδεσης πεπτιδίου του τάξης II μορίου και κατευθύνει την μετακίνηση του συμπλόκου από το ενδοπλασματικό δίκτυο. Ενώ οι περισσότερες πρωτεΐνες κατευθύνονται μέσω του συμπλέγματος Golgi στην πλασματική μεμβράνη, η Ii οδηγεί τα τάξης II στο σύστημα των ώριμων ενδοσωμάτων και σε συγκεκριμένα κυστίδια που ονομάζονται MHC class II contaning Compartments- MIICs [7]. Τα MHC τάξης II μόρια προσδένουν πεπτίδια και τα παρουσιάζουν στα CD4+ κύτταρα μέσω της αλληλεπίδρασης με τον TCR υποδοχέα. Γενικά τα πεπτίδια αυτά προέρχονται από εξωγενείς πρωτεΐνες (είτε εαυτές, είτε μη εαυτές), που αποικοδομούνται μέσω της ενδοκυτταρικής οδού επεξεργασίας (φαγοκυττάρωση, λυσοσώματα κτλ) [8].

Η κύρια κατηγορία Τ-κυττάρων χαρακτηρίζεται από την επιφανειακή έκφραση του αβ TCR. Αυτός ο υποδοχέας αναγνωρίζει πεπτιδικά αντιγόνα που σχηματίζουν σύμπλοκο με τις πρωτεΐνες MHC τάξης I ή τάξης II. Τα κύτταρα αβ-Τ διαφοροποιούνται σε επιπλέον κυτταρικά υποσύνολα , όπως τα Τ-κυτταροτοξικά που (κύτταρα CD8 + Τ) δρουν κυρίως για να θανατώνουν μολυσμένα με παθογόνα κύτταρα. Επίσης, άλλο ένα υποσύνολο είναι αυτό των Τ-βοηθών (CD4 + Τ κύτταρα) που δρουν κυρίως για τη ρύθμιση της κυτταρικής και χυμικής ανοσοαπόκρισης. Ένα μικρό υποσύνολο των κυττάρων αβ-Τ, είναι αυτό που εκφράζει το αντιγόνο NK1.1 (CD161) NK κυττάρων (NK-T κύτταρα) είναι συνήθως CD4 και CD8 διπλά αρνητικά κύτταρα που αναγνωρίζουν γλυκολιπιδικά

αντιγόνα. Η δράση τους είναι κυρίως ρυθμιστική καθώς είναι ικανά να απελευθερώνουν γρήγορα μεγάλες ποσότητες κυτοκινών IFN-γ, IL-4, όπως και τους παράγοντες GM-CSF, TNF κ.α [9]. Περίπου το 90–95% των Τ- κυττάρων διαθέτουν τον αβTCR. Ωστόσο, μόνο ένα 5– 10% διαθέτουν το εναλλακτικό ετεροδιμερές του υποδοχεά τον γδTCR.

Στο θύμο αδένα, λαμβάνει χώρα η «εκπαίδευση» των Τ-κυττάρων. Στον φλοιό του θύμου, τα κύτταρα ελέγχονται για το εάν οι υποδοχείς τους έχουν επαρκή συγγένεια για τα μόρια MHC του εαυτού, κάτι που εν τέλει θα τους επιτρέψει να αναγνωρίσουν τα σύμπλοκα αντιγόνου-MHC. Αυτό περιλαμβάνει πλήθος αλληλεπιδράσεων μεταξύ του αναπτυσσόμενου λεμφοκυττάρου και του εξειδικευμένου φλοιώδους επιθηλίου [10]. Εάν το λεμφοκύτταρο αποτύχει σε αυτή τη θετική επιλογή, τότε υφίσταται απόπτωση και απομακρύνεται από τα μακροφάγα του φλοιού. Τέλος, στο μυελό του θύμου, τα κύτταρα υποβάλλονται σε διαλογή για πιθανή αυτό-αντιδραστικότητα. Αυτή η διαλογή περιλαμβάνει την εξέταση για αντιδραστικότητα σε μια εκτεταμένη σειρά ειδικών πρωτεϊνών που εκφράζονται από έναν πληθυσμό θυμικών μυελικών επιθηλιακών κυττάρων (υπό τον έλεγχο ενός γονιδίου που ονομάζεται AIRE (αυτοάνοσος ρυθμιστής)). Η ελαττωματική έκφραση του AIRE προκαλεί ένα σοβαρό αυτοάνοσο σύνδρομο, το APECED (αυτοάνοση πολυενδοκαρδιοπάθεια-καντιντίαση-εξωδερμική δυστροφία)[11]. Τα κύτταρα που αναγνωρίζουν τα αυτοπεπτίδια που εκφράζονται από αυτά τα επιθηλιακά κύτταρα, απομακρύνονται με απόπτωση και τα κύτταρα που επιβιώνουν από αυτή την αρνητική επιλογή, εξάγονται στην κυκλοφορία. Λιγότερο από το 5% των αναπτυσσόμενων Τ κυττάρων επιβιώνουν από αυτή τη θετική και αρνητική επιλογή.




**Εικόνα 2.1:** Τα μονοπάτια αντιγονοπαρουσίασης των μορίων MHCI και MHCII

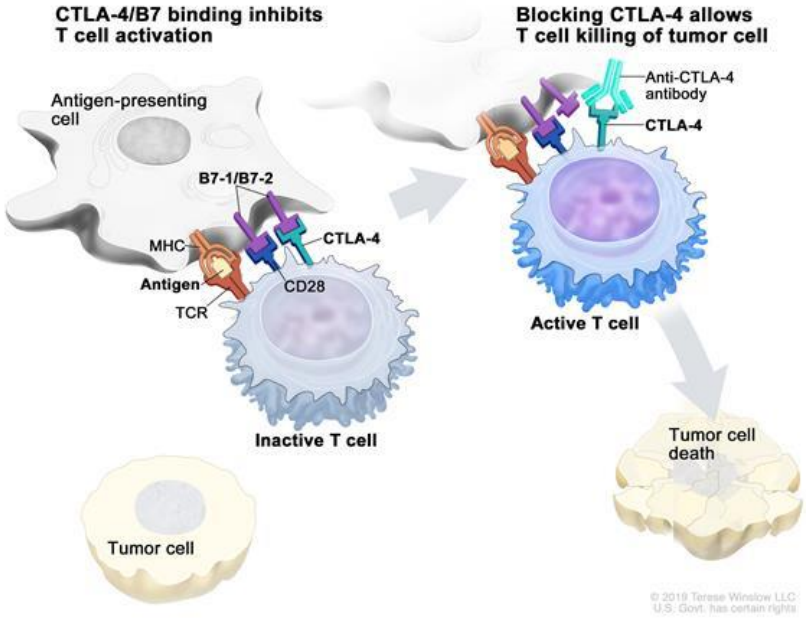
## 2.3 Μηχανισμοί ανοχής: Πρόληψη των αυτοάνοσων αντιδράσεων

Τα πολλαπλά επίπεδα προστασίας που διαθέτει το ανοσοποιητικό σύστημα για να προστατευθεί από τις αποκρίσεις των κυττάρων και των αντισωμάτων έναντι των συστατικών του ξενιστή και την έναρξη αυτοάνοσης νόσου, είναι γνωστά ως ανοχή. Ως ανοχή ορίζεται μια κατάσταση μη-απόκρισης σε ένα αντιγόνο και οι μηχανισμοί που διέπουν αυτή την έλλειψη, ποικίλλουν. Σε φυσιολογικές συνθήκες η συνάντηση του ανοσοποιητικού συστήματος με ένα αντιγόνο οδηγεί σε ανοσολογική απόκριση, αλλά η παρουσίαση του αντιγόνου με εναλλακτικό τρόπο, μπορεί να οδηγήσει σε ανοχή ή μη απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα αντιγόνα που επάγουν ανοχή, αναφέρονται ως ανοχογόνα, αντί για ανοσογόνα. Το ίδιο χημικό μόριο μπορεί να λειτουργήσει και ως ανοσογόνο και ως ανοχογόνο, ανάλογα με το πώς παρουσιάζεται στο ανοσοποιητικό σύστημα. Για παράδειγμα, ένα αντιγόνο που παρουσιάζεται στα Τ-κύτταρα χωρίς τα κατάλληλα συνδιεγερτικά μόρια, οδηγεί σε μία μορφή ανοχής που είναι γνωστή και ως ανεργεία,, ενώ το ίδιο αντιγόνο παρουσιαζόμενο με μόρια συνδιέγερσης μπορεί να μετατραπεί σε ένα δραστικό ανοσογόνο. Οι παράγοντες που προάγουν την ανοχή αντί τη διέγερση του ανοσοποιητικού από εάν δεδομένο αντιγόνο περιλαμβάνουν τα εξής: υψηλές δόσεις αντιγόνου, παράταση της παραμονής του αντιγόνου στο ξενιστή, ενδοφλέβια ή από το στόμα χορήγηση, απουσία ανοσοενισχυτικών και χαμηλά επίπεδα συνδιέγερσης.

Οι μηχανισμοί που προλαμβάνουν τις ανοσοαποκρίσεις έναντι σε αυτοαντιγόνα, κατηγοριοποιούνται σε τρείς ομάδες [2]. Ο κυριότερος μηχανισμός διατήρησης της ανοχής είναι η κεντρική ανοχή. Περιγράφει την εξάλειψη των λεμφοκυτταρικών κλώνων που θα μπορούσαν να αντιδράσουν με εαυτά συστατικά, στο στάδιο της πρώιμης ωρίμανσης τους. τα γονίδια που εμπλέκονται στη ρύθμιση της ωρίμανσης των λεμφοκυττάρων περιγράφονται από τους Fischer and Malissen το 1998 [12]. Ο δεύτερος μηχανισμός αποτελεί την περιφερική ανοχή, η οποία και συντηρείται από μηχανισμούς που δρουν σε ώριμα λεμφοκύτταρα τα οποία «κουβαλούν» αυτό-αντιγόνα στους περιφερικούς ιστούς. Αποτελεί τη διαδικασία απενεργοποίησης αυτοδραστικών Τ και Β κυττάρων στη περιφέρεια, καθιστώντας τα ανίκανα να αποκριθούν σε εαυτά αντιγόνα. Ποικίλες πειραματικές στρατηγικές έχουν αποδείξει την ύπαρξη περιφερικής ανοχής των Τ-κυττάρων, παρέχοντας συγχρόνως στοιχεία για τους μηχανισμούς τη διέπουν. Τα Τ-κύτταρα προκειμένου να απενεργοποιηθούν, απαιτούν όχι μόνο την αναγνώριση του αντιγόνου που παρουσιάζεται πάνω σε εαυτά μόρια MHC από τον TCR, αλλά επίσης και την ύπαρξη συνδιεγερτικών σημάτων. Αρχικά πειράματα των Jenkins, Mueller και Schwartz, δείχνουν ότι όταν τα CD4+ Τ-κυτταρικοί κλώνοι διεγερθούν in vitro μόνο μέσω του TCR τους, δεν ανταποκρίνονται. Χρησιμοποιήθηκε λοιπόν ο όρος κλωνική ανεργεία, για να περιγράψει αυτή την κατάσταση της μη-απόκρισης [13].

Η πιο ενδιαφέρουσα διαπίστωση, είναι ότι παρά την ύπαρξη πολλαπλών μηχανισμών αυτό-ανεκτικότητας, η διάσπαση οποιουδήποτε μονοπατιού οδηγεί σε αυτοανοσία. Πιο ειδικά, κανένας από αυτούς τους μηχανισμούς δεν είναι περιττός, όπως δε μπορούν να αντισταθμίσουν ο ένας τον άλλον. Αποτελέσματα από διάφορες μελέτες, δείχνουν ότι οι αλληλεπιδράσεις Fas-FasL, είναι υπεύθυνες για την πρόκληση της απόπτωση των ώριμων Τ-κυττάρων in vivo [2,14]. Ενδιαφέρον επίσης προκαλεί και ο ρόλος του CTLA-4, ο οποίος προκαλεί λειτουργική απενεργοποίηση στα Τ-

κύτταρα [15]. Η ιντερλευκίνη-2 (IL-2), συμμετέχει στο Fas-μονοπάτι κυτταρικού θανάτου. Μεταγενέστερα δεδομένα από διάφορες ερευνητικές ομάδες, έδειξαν ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ του CD28 των Τ-κυττάρων και του B7 των APCs, παρείχε όλα τα απαραίτητα συνδιεγερτικά σήματα για την ενεργοποίηση των Τ-κυττάρων. Η κατανόηση ότι η σύνδεση CD28/B7 παρέχει καίρια και βασικά συνδιεγερτικά σήματα, για την ενεργοποίηση των Τ-κυττάρων, οδήγησε στην προσεκτικότερη μελέτη του φαινομένου της συνδιέγερσης, αποκαλύπτοντας την ύπαρξη και ανασταλτικών υποδοχέων, όπως αυτός που αναφέρθηκε πιο πάνω, τον CTLA-4. Ο CTLA-4 όπως και ο CD28, προσδένονται στο B7, αλλά αντί να παρέχει διεγερτικά σήματα, καταστέλλει την ενεργοποίηση των Τ-κυττάρων. Μάλιστα η έκφραση του CTLA-4, επάγεται αφού τα Τ-κύτταρα ενεργοποιηθούν, εξασφαλίζοντας έτσι τον έλεγχο και τη ρύθμιση της ενεργοποίησης αυτής. Ποντίκια που δεν έχουν το γονίδιο του CTLA-4, εμφανίζουν μαζικό πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων τους καθώς και αυτοάνοσα νοσήματα, προτείνοντας έτσι ένα βασικό ρόλο για το μόριο αυτό στη διατήρηση της περιφερικής ανοχής.

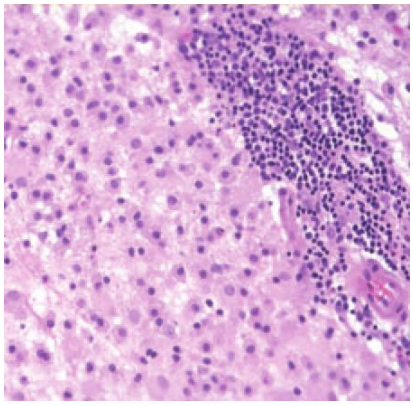



**Εικόνα 2.2:** Η κατασταλτική λειτουργία του CTLA-4. Οι πρωτεΐνες B7-1 / B7-2 σε αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APC) και το CTLA-4 σε Τ κύτταρα, βοηθούν να διατηρούνται υπό έλεγχο οι ανοσολογικές αντιδράσεις. Όταν ο υποδοχέας Τ-κυττάρων (TCR) δεσμεύεται με αντιγόνο και οι πρωτεΐνες συμπλόκου μείζονος ιστοσυμβατότητας (MHC) στο APC και το CD28 δεσμεύονται στο B7-1 / B7-2 στο APC, το Τ κύτταρο μπορεί να ενεργοποιηθεί. Ωστόσο, η σύνδεση του B7-1 / B7-2 με το CTLA-4 διατηρεί τα Τ κύτταρα στην αδρανή κατάσταση, έτσι ώστε να μην είναι σε θέση να θανατώνουν κύτταρα όγκου στο σώμα (αριστερά). Η δέσμευση του B7-1 / B7-2 με το CTLA-4 με έναν αναστολέα σημείου ελέγχου (αντίσωμα αντι-CTLA-4) επιτρέπει στα Τ κύτταρα να είναι δραστικά και να θανατώνουν κύτταρα όγκου (δεξιά).

## 2.4 Η σκλήρυνση κατά πλάκας ως αυτοάνοσο νευροεκφυλλιστικό νόσημα

Η σκλήρυνση κατά πλάκας (Multiple Sclerosis) είναι μια φλεγμονώδης και απομυελινωτική κατάσταση του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ), που χαρακτηρίζεται από περιαγγειακά διηθήματα που αποτελούνται κυρίως από Τ λεμφοκύτταρα και μακροφάγα, οδηγώντας σε χρόνια ανοσοδιαμεσολαβούμενη νευροεκφυλλιστική ασθένεια [16]. Αν και η ακριβής αιτία παραμένει άγνωστη, πολυάριθμες ερευνητικές εργασίες υποστηρίζουν την υπόθεση ότι οι αυτοάνοσοι μηχανισμοί διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της νόσου. Τα κύρια χαρακτηριαστικά της είναι νευροφλεγμονές που συνοδεύονται από απομυελίνωση και απώλεια νευραξόνων, η οποία σταδιακά οδηγεί σε κακή μετάδοση των νευρικών σημάτων και τελικά σε απώλεια λειτουργιών σε αισθητήριους και κινητικούς νευρώνες [17–22]. Ταυτόχρονα επηρεάζει αυτόνομες και γνωσιακές διαδιακασίες , ανάλογα με τη θέση που εδρεύουν οι νευροφλεγμονές στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ). Σαν ασθένεια, παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια, εμφανίζοντας διάφορα κλινικά στάδια όπως: επαναλαμβανόμενα επεισόδια με περιόδους ύφεσης (“relapsing-remitting”-RRMS) τα οποία μπορούν να εξελιχθούν σε μία προοδευτική δευτερογενή μορφή (“secondary progressive”-SPMS), ή σε μία κατάσταση επίμονης εξέλιξης της νόσου ("primary progressive" -PPMS). Η κατάσταση RRMS είναι η πιο διαδεδομένη κλινική πορεία της ΣΚΠ και χαρακτηρίζεται από υποτροπιάζοντα επεισόδια είτε νέων είτε επιδεινούμενων συμπτωμάτων.

Οι τρεις βασικές κατηγορίες πειραματικών μοντέλων που πλέον χρησιμοποιούνται για την κατανόηση της παθοφυσιολογίας της ΣΚΠ είναι τρία: 1) Πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα (ΕΑΕ), 2) Μοντέλα ιού, όπως ο ιός της μυελικής εγκεφαλομυελίτιδας Theiler (TMEV) και 3) μοντέλα τοξινών όπως το αιθιδικό βρωμίδιο, η λυσοφωσφοφατιδυλοχολίνη (LPC) και η κουμπιζόνη [23–30]. Παθολογικά, παρόμοιες βλάβες με αυτές που παρατηρούνται στην ΣΚΠ μπορούν να προκληθούν σε οργανισμούς-μοντέλα ανοσοποιώντας με αντιγόνα που προέρχονται από το ΚΝΣ [30,31]. Συγκεκριμένα, οι οργανισμοί που χρησιμοποιούνται για την επαγωγή της νόσου είναι τα τρωκτικά. Η επαγωγή ΣΚΠ σε τρωκτικά, ονομάζεται πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα (ΕΑΕ) και είναι συχνά το σημείο εκκίνησης στην έρευνα της ΣΚΠ, τόσο για τη μελέτη της παθογένειας όσο και για τη δημιουργία νέων θεραπειών. Υπάρχουν πολλά διαφορετικά μοντέλα ΕΑΕ, τα οποία μιμούνται μια συγκεκριμένη μορφή της ΣΚΠ. Όλα αυτά τα μοντέλα έχουν αναπτυχθεί χρησιμοποιώντας ως κοινή λογική, την ανοσοποίηση με αυτοαντιγόνο.



**Εικόνα 2.3:** Χρώση Η-Ε σε τομή εγκεφάλου ασθενούς με ΣΚΠ. Πάνω και δεξιά σημειώνεται έντονη απομυελίνωση καθώς και το χαρακτηριστικό διήθημα φλεγμονωδών κυττάρων [32]

## 2.5 Η Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα (experimental autoimmune encephalomyelitis -EAE)

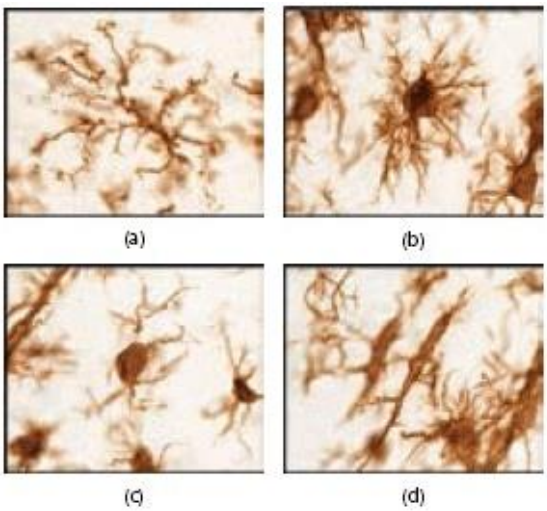
Η αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα (EAE) είναι ένα από τα πιο καλά μελετημένα μοντέλα τόσο για τη ΣΚΠ όσο και για άλλες αυτοάνοσες ασθένειες του ΚΝΣ [23]. Η EAE είναι το μόνο μοντέλο που συγκεντρώνει τα περισσότερα από τα παθολογικά και κλινικά συμπτώματα και χαρακτηριαστικά της ΣΚΠ. Αυτό το μοντέλο ανακαλύφθηκε το 1930 από τους Rivers et al ενώ παράλληλα χρησιμοποιήθηκε και για τη διερεύνηση των νευρολογικών επιπλοκών του εμβολίου κατά της λύσσας σε πιθήκους. Οι πίθηκοι εμφάνισαν παράλυση που σχετίζεται με περιαγγειακές διηθήσεις και απομυελίνωση στον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό, καθώς και οξεία εγκεφαλομυελίτιδα [33]. Η EAE προκαλείται από έγχυση μυελίνης του κεντρικού νευρικού συστήματος, νευρικών ή γλοιακών κυττάρων και η συμπτωματολογία περιλαμβάνει πολλές φλεγμονώδεις καταστάσεις [23,24,27,34–36]. Η EAE μπορεί να προκληθεί ανοσοποιώντας με ομογενοποιημένο CNS, πρωτεΐνη πρωτεολιπιδίου (PLP), βασική πρωτεΐνη μυελίνης (MBP) ή πρωτεΐνη ολιγοδενδροκυττάρων μυελίνης (MOG). Στη συνέχεια, το μοντέλο μπορεί να γίνει πιο περίπλοκο με την προσθήκη τοξίνης pertuss και του ανοσοενισχυτικού Freud για την πρόκληση υποτροπιών όπως RRMS που επιδεινώνεται μέσω της χυμικής ανοσίας. Έχουν αναπτυχθεί δύο κλινικοί και παθολογικοί φαινότυποι της EAE: υποτροπιάζουσα EAE (RR EAE) και χρόνια EAE (C EAE), οι οποίες προσπαθούν να προσομοιώσουν τις RRMS και PPMS μορφές αντίστοιχα. Πολύ σημαντικό είναι να αναφερθεί πως η EAE είναι το μοναδικό μοντέλο που έχει κλινική βαθμονόμηση που αντικατοπτρίζει την πρόοδο της νόσου, η οποία ταυτίζεται και με τη πορεία της νόσου στους ανθρώπους.

## 2.6 Η μικρογλοία

Ο όρος μικρογλοία χρησιμοποιείται για την περιγραφή κυττάρων με ιδιαίτερη μορφολογία και φαινότυπο που βρίσκονται στο παρέγχυμα της εγκεφαλικής ουσίας του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ). Τα συγκεκριμένα κύτταρα πρωτοπεριγράφηκαν από τον Rio Hortega (1932) και αποτελούν τα αυτόχθονα κύτταρα του εγκεφαλικού παρεγχύματος. Η μικρογλοία κατανέμεται παντού και σε μη-επικαλυπτόμενες περιοχές στο ΚΝΣ και αποτελεί το 20% των κυττάρων γλοίας στον εγκέφαλο [37]. Σύμφωνα με το αρχικό αξίωμα του Del Rio-Hortega, η μικρογλοία είναι μεσοδερμικής προέλευσης και προέρχεται από πρόδρομα κύτταρα μυελού των οστών [37]. Τα κύτταρα αυτά όπως και άλλα που προέρχονται από τις σειρές των μονοκυττάρων και των φαγοκυττάρων, εισέρχονται στο ΚΝΣ σε πρώιμο εμβρυικά αναπτυξιακό στάδιο, καταλήγοντας στο σχηματισμό της μικρογλοίας. Από την άποψη αυτή, είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι περίπου το 1% των μακροφάγων μυελού των οστών σε αρουραίους, εμφανίζουν ένα πρότυπο διαύλου καλίου [38], το οποίο παρουσιάζεται ως όμοιο τόσο στην ενδογενή μικρογλοία όσο και στα περιφερειακά μακροφάγα [39,40]. Η στενή σύνδεση της μικρογλοίας με άλλα κύτταρα της γραμμής μονοκυττάρων / μακροφάγων, υπογραμμίζεται περαιτέρω από το γεγονός ότι όλα τα αντισώματα που έχουν αναπτυχθεί για τη μικρογλοία, προσδένονται με «cross-react» και στα μακροφάγα των περιφερειακών ιστών [41–43]. Τα κύτταρα της μικρογλοίας αλληλεπιδρούν με όλους τους

κυτταρικούς πληθυσμούς του ΚΝΣ, συμπεριλαμβανομένου των νευρώνων [44] και των ολιγοδενδροκυττάρων [45] .

Τα κύτταρα της μικρογλοίας λειτουργούν ως οι αντιπρόσωποι του ανοσοποιητικού συστήματος στο ΚΝΣ και αποτελούν τα μικρότερα κύτταρα σε μέγεθος στον εγκέφαλο [38]. Ωστόσο, η μικρογλοία εκτελεί βασικές λειτουργίες στον υγιή και νοσούντα εγκέφαλο. Οι λειτουργίες της μικρογλοίας περιλαμβάνουν την υποστήριξη της ανάπτυξης του ΚΝΣ, την συναπτογένεση, τη διατήρηση της ομοιόστασης, τη συμβολή στην ανοσολογική απόκκριση έναντι μολυσματικών παραγόντων (παθογόνων) και τη συμμετοχή στην νευρογένεση, στις νευροφλεγμονές, και στις νευροεκφυλιστικές παθήσεις [46]. Περιφρουρώντας το μικροπεριβάλλον, ανιχνεύουν τυχόν αλλαγές στη σηματοδότηση, εισβολή παθογόνων και πρόκληση τραυματισμών. Μέσω της διαρκής κίνησης τους στον ιστό, μπορούν και «διαισθάνονται» άμεσα την παραμικρή αλλαγή του μικροπεριβάλλοντος. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, η πρόδρομη μικρογλοία περνά από τρία σημαντικά αναπτυξιακά στάδια ώστε να καταλήξει στην ολοκληρωμένη της δομή. Τα μικρογλοιακά κύτταρα πολλαπλασιάζονται, μεταναστεύουν και εξαπλώνονται σε διαφορετικές περιοχές του ΚΝΣ. Μπορούν και διαφοροποιούνται από την «αμοιβάδοειδή» δομή τους στην «διακλαδισμένη» μορφολογία τους. Είναι κύτταρα με πληθώρα άλλων χαρακτηριστικών ρόλων τόσο στην ανάπτυξη του εγκεφάλου όσο και στη συντήρηση του [47]. Η μορφολογία της μικρογλοίας ερμηνεύεται ώστε να αντικατοπτρίζει τη λειτουργία τους [48]. Γενικά, τα μικρογλοιακά κύτταρα συναντώνται σε τέσσερις διαφορετικές μορφολογικές διαμορφώσεις: ramified, hyperramified/bushy, active και amoeboid **(Εικόνα 2.4)**. Είναι γνωστό ότι υπάρχει και μια πέμπτη μορφολογική διαμόρφωση η rod microglia (ραβδοειδής μικρογλοία) [49]. Η μικρογλοία της μορφολογίας ramified, είναι ιδιαίτερα δυναμική. Ανιχνεύει διαρκώς το μικροπεριβάλλον με επέκταση και ανάσυρση των επεκτάσεων της [50]. Επίσης, μελέτες έχουν δείξει πως η μικρογλοία αυτής της διαμόρφωσης, βοηθά στη διατήρηση της συναπτικής ακεραιότητας, αφαιρώντας επιβλαβή τερματικά άκρα από τους νευράξονες, σταθεροποιώντας έτσι τις συνδέσεις μεταξύ νευρικών κυττάρων [51]. Η ανίχνευση αλλαγών στις συνάψεις έχει αποδειχθεί ότι μεταβάλλουν το ρόλο της μικρογλοίας, ενεργοποιώντας την. Η ενεργοποίηση αυτή προσδίδει ένα προστατευτικό αντιφλεγμονώδη ρόλο στη μικρογλοία, η οποία αλλάζει μορφολογικά και λειτουργικά, φαγοκυτώνοντας τα οποιαδήποτε κυτταρικά υπολείμματα [52]. Η ramified μικρογλοία, ενεργοποιείται γρήγορα μετά από την πρόκληση οποιουδήποτε ερεθίσματος. Με την ενεργοποίηση, η μικρογλοία πολλαπλασιάζεται και μεταναστεύει στο σημείο της φλεγμονής όπου παρουσιάζει χαρακτηριστικές μορφολογικές αλλαγές. Χαρακτηριστικό αυτής της μορφολογικής μεταβολής, είναι η απόσυρση και η πάχυνση των απολήξεών της, καθώς παρατηρείται και ανοσοφαινοτυπική και λειτουργική τροποποίηση [53]. Τα πλήρως ενεργοποιημένα μικρογλοιακά κύτταρα δεν διακρίνονται (φαινοτυπικά) από τα μακροφάγα καθώς διαθέτουν αμοιβαδοειδή μορφή. Τα κύτταρα αυτά, συνεισφέρουν στις φλεγμονές του ΚΝΣ, κυρίως φαγοκυτώνοντας κυτταρικά υπολείμματα, απελευθερώνοντας κυτταροτοξίνες, σκοτώνοντας γειτονικά κύτταρα και εκκρίνοντας αυξητικούς παράγοντες [54].




**Εικόνα 2.4:** Μορφολογίες της μικρογλοίας. Η Ramified μικρογλοία (a) συναντάται στο υγιές ΚΝΣ; όταν ενεργοποιείται μετατρέπεται σε hyperramified or bushy (b). Σε αυτό το στάδιο αποσύρουν τις απολήξεις τους (c). Όταν η ενεργοποίηση τους ολοκληρωθεί, τα κύτταρα αυτά δεν ξεχωρίζουν από τα μακροφάγα. Μια άλλη μορφολογία είναι η rod microglia (d) (Evilsizor *et al.*, 2015)

Η μικρογλοία προσελκύεται και συσσωρεύεται στα σημεία που συμβαίνει κυτταρικός θάνατος, όπου και «απορροφούν» τα αποπτωτικά κύτταρα κατά τις φυσιολογικές διαδικασίες της νευρογένεσης, μετανάστευσης και διαφοροποίησης [55]. Κατά τη διάρκεια της πρώιμης φάσης της ανάπτυξης, η πυκνότητα των μικρογλοιακών κυττάρων είναι μάλλον χαμηλή, κάτι το οποίο δικαιολογείται από την αυξημένη κινητικότητα τους [56]. Έχει παρατηρηθεί ότι, ανάλογα με τις χρονικές και αναπτυξιακές διαδικασίες, υπάρχει ένα πρότυπο χωρικού σχηματισμού της μικρογλοίας [57]: αρχικά συσσωρεύονται γύρω από τις περιοχές πολλαπλασιασμού πρόδρομών νευρικών κυττάρων. Στη συνέχεια, ευθυγραμμίζονται κατά μήκος των αναπτυσσόμενων αξόνων στην λευκή ουσία. Αργότερα, όταν οι νευρώνες έχουν σχηματίσει τις λειτουργικές δομές τους και έχουν κατασκευάσει τις μεταξύ τους συνδέσεις (με αστροκύτταρα και ολιγοδενδροκύτταρα), τα μικρογλοιακά κύτταρα αυξάνουν σε πυκνότητα, σταθεροποιούνται χωρικά χωρίς όμως να κατανέμονται ομοιόμορφα [58].

Η μικρογλοία συνδέει το ανοσοποιητικό σύστημα με το νευρικό αλλά ταυτόχρονα ανταποκρίνεται και σε ενδοκρινικά σήματα. Από την άποψη αυτή, οι παθολογίες που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα ή τις ενδοκρινικές παθήσεις, μπορεί να επηρεάσουν τις λειτουργίες της μικρογλοίας κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, οδηγώντας σε επακόλουθες λειτουργικές ή ακόμα και διανοητικές διαταραχές [59]. Προσφάτως, προτάθηκε επίσης ότι ενδεχόμενο παθολογικό μικροβίωμα του εντέρου επηρεάζει τη μικρογλοία και τη λειτουργία του, οδηγώντας ακόμα και σε ψυχικές ασθένειες [60,61]. Όπως προκύπτει, η πρόταση αυτή μας πληροφορεί και για περαιτέρω ρόλο της μικρογλοίας, δηλαδή για τη σύνδεση νευρικού και εντερικού συστήματος. Τα μικρογλοιακά κύτταρα παρουσιάζουν πολλού κοινούς δείκτες με τα μακροφάγα όπως τους δείκτες F4/80, CD11b, τον υποδοχέα 3 του συμπληρώματος (CR3;CD11b), τον υποδοχέα χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτείνης (LRP;CD90.2) και τον TREM2 (protein triggering receptor expressed on myeloid cells-2).

## 2.7 Η ενεργοποίηση της μικρογλοίας

Τα μικρογλοιακά κύτταρα, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, ανταποκρίνονται ταχέως σε οποιοδήποτε παθολογικό ερέθισμα, όπου και διαφοροποιούνται σε μακροφάγα κύτταρα του ΚΝΣ [50]. Κλασσικοί επαγωγείς της ενεργοποίησης του είναι ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS) και η ιντερφερόνη γ (IFN-γ), οι οποίοι δίνουν το έναυσμα για υψηλή έκφραση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών και οξειδωτικών μεταβολιτών, απαραίτητοι για την άμυνα του ξενιστή και τη φαγοκυτταρική δραστηριότητα. Η ενεργοποίηση της μικρογλοίας σε αυτές τις συνθήκες, χαρακτηρίζεται από πολλαπλασιασμό, αυξημένη έκφραση μορίων-δεικτών, όπως τα αντιγόνα του μείζονος συμπλόκου ιστοσυμβατότητας (MHC molecules), καθώς και από μορφολογικές μεταβολές του φαινοτύπου που ομοιάζει με εκείνο των μακροφάγων, με φαγοκυτταρικές και μεταναστευτικές ιδιότητες [62]. Πλήθος μελετών υποδεικνύουν ότι η ενεργοποιημένη μικρογλοία, παίζει σημαντικό ρόλο στις ανοσολογικές διεργασίες του ΚΝΣ [63]. Αποτελούν φαγοκύτταρα, ανταποκρίνονται σε κυτοκίνες [64], κάνουν αντιγονοπαρουσίαση στα Τ-λεμφοκύτταρα [65] και έχουν έντονη κυτταροτοξική ικανότητα [66]. Η ενεργοποίηση της μικρογλοίας στο ΚΝΣ, παρατηρήθηκε επίσης σε in vivo συνθήκες, σε απόκριση ισχαιμικών [67], χημικών [68] και μηχανικών αλλοιώσεων [69]. Τέλος, εμπλέκονται σε πλήθος νευρολογικών διαταραχών, συμπεριλαμβανομένου και του οξέος τραύματος, όπως η εγκεφαλική ισχαιμία, η σκλήρυνση κατά πλάκας, η εγκεφαλοπάθεια HIV, η νόσος του Alzheimer και η νόσος του Parkinson [70]. Η σύνδεση της μικρογλοίας με τα νευροεκφυλλιστικά νοσήματα, περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της σε διάφορα τμήματα του εγκεφάλου και την ικανότητας της να επηρεάζει την επιβίωση των νευρώνων.

Στις πειραματικές καταστάσεις , η μικρογλοία ενεργοποιείται και ακολούθως, μονοκύτταρα εισβάλλουν στο εγκεφαλικό παρέγχυμα. Μετά από πειράματα ακτινοβόλησης χιμαιρικού μυελού των οστών, αποδείχθηκε ότι όχι μόνο τα μονοκύτταρα αλλά και τα κύτταρα της μικρογλοίας ανταποκρίνονται στη φλεγμονή, με αυξημένη έκφραση του συμπληρώματος (CR3), CD4 καθώς και μόρια του μείζονος συμπλόκου ιστοσυμβατότητας (MHCI, MHCII) [71]. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα μικρογλοιακά κύτταρα μετατρέπονται σε μακροφάγα με την παραμικρή αλλαγή της ομοιόστασης. Σε πιο μαζικές ζημιές του ιστού, η μικρογλοία υποβοηθιέται με την εισροή μονοκυττάρων στο ιστό μέσω του αίματος, τα οποία υιοθετούν άμεσα το φαινότυπο της μικρογλοίας στο παρέγχυμα του ΚΝΣ. Έτσι, δεν είναι δυνατή η διάκριση τους ούτε μορφολογικά ούτε και ανοσοκυτταροχημικά. Αυτό είναι γνωστό ως η "υπόθεση σταδιακής απόκρισης" (graded response) [63]. Από τα παραπάνω γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι, ένας άθικτος αιματοεγκεφαλικός φραγμός (BBB) τείνει να ευνοεί τη συμμετοχή της μικρογλοίας, ενώ η διάσπαση του ευνοεί την εισροή των μονοκυττάρων. Ένα τραύμα που διαπερνά το ΚΝΣ, προκαλεί άμεση βλάβη στα αιμοφόρα αγγεία και ως εκ τούτου, διαταραχή στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και οξεία καταστροφή των νευρώνων.

Ο ανάδρομος εκφυλισμός των σωμάτων των νευρικών κυττάρων που συνεχίζει προς τους νευράξονες, είναι μια κοινή μορφή κυτταρικού θανάτου για τα νευρικά κύτταρα. Ένα πειραματικό μοντέλο που μελετήθηκε καλά από τον Kreutzberg και τους συνεργάτες του, είναι η απόκριση των

κινητικών νευρώνων μετά από τον τραυματισμό νεύρου του προσώπου (facial nerve injury) [67]. Καθώς οι νευρώνες τραυματίζονται, όπως είναι φυσιολογικό, τα μικρογλοιακά κύτταρα πολλαπλασιάζονται και ενεργοποιούνται. Τοποθετούνται κοντά σε αυτούς τους νευρώνες και συμμετέχουν στην απομάκρυνση των συνάψεων. Επειδή η μικρογλοία είναι ικανή προς αντιγονοπαρουσίαση, αυτό σημαίνει και την συμμετοχή της στην παθογένεια των αυτοάνοσων νοσημάτων του εγκεφάλου. Στην πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα, (ΕΑΕ), η οποία αποτελεί ένα πολύ καλά μελετημένο μοντέλο των απομυελινωτικών νοσημάτων, η είσοδος Τ-εγκεφαλιτογενιτικών κυττάρων προς την μυελίνη, οδηγεί σε φλεγμονή του εγκεφαλικού παρεγχύματος. Στους αρουραίους, οι τοπικές φλεγμονές που δημιουργούνται (infiltrates), συνίστανται κυρίως από μακροφάγα, Τ- κύτταρα και Β- κύτταρα. Κατά τη διάρκεια της ασθένειας, η έκφραση μορίων τάξης 2 (MHCII molecules) προηγείται της εμφάνισης εμφανών μορφολογικών διαταραχών [53]. Κυτοκίνες προερχόμενες από Τ- κύτταρα, συμπεριλαμβανομένης και της IFN-γ, ενεργοποιούν τη μικρογλοία in vitro, για να εκφράσει μόρια MHC τάξης 1 και τάξης 2 [65].

**Εικόνα 2.5:** Η μορφολογία της μικρογλοίας. Από τα αριστερά προς τα δεξιά η μετατροπή της «ήρεμης» μικρογλοίας στην ενεργοποιημένη της μορφή [72]

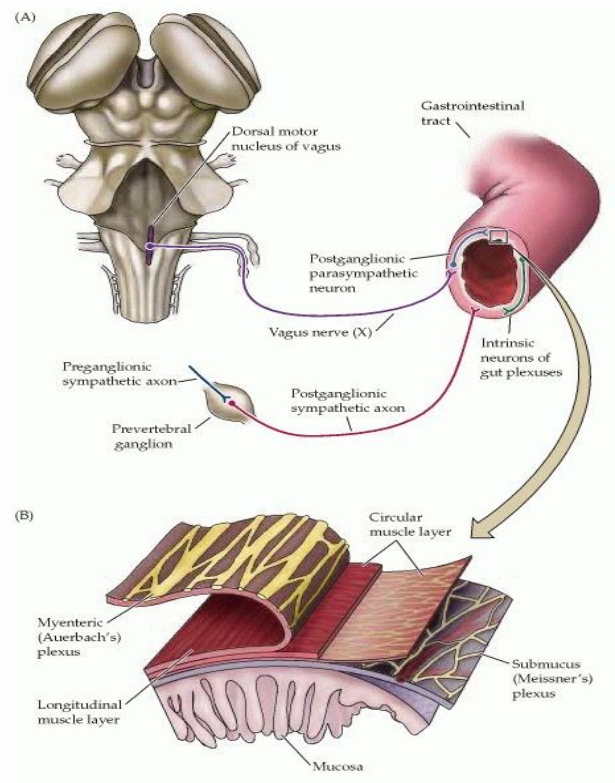
| Marker | Function | Microglial significance |
|---|---|---|
| CD68 | Involved in phagocytosis (Ramprasad et al. 1996) | Localised to monocytes and neutrophils (Saito et al. 1991) |
| CD11b (complement receptor 3) | Regulates leukocyte adhesion and migration to mediate inflammatory response (Meerschaert and Furie 1995) | Expressed in neutrophils, monocytes, natural killer cells, specific lymphocytes (Arnaout 1990) |
| Ionised calcium binding adapter molecule 1 (Iba-1) | Role in membrane ruffling and phagocytosis (Ohsawa et al. 2000) | Expressed centrally by microglia and infiltrating macrophage (Wohleb et al. 2013, Ito et al. 1998) |
| CD45 | Modulates activation and proliferation of inflammatory cell types (Huntington and Tarlinton 2004) | $CD45_{low}$—quiescent microglia<br>$CD45_{high}$—peripheral monocytes (Denker et al. 2007) |
| IL-1β, TNF-α, IL-6 | Pro-inflammatory cytokines | Released by stimulated neutrophils and monocytes (Konsman et al. 2002) |
| MHC-II | Role in antigen presentation to T cells (St Pierre and Watts 1991) | Expressed centrally by stimulated microglia and macrophage (Aloisi 2001; Xu and Ling 1994) |
| CCL2/MCP-1 | Triggers microglial proliferation and recruits other pro-inflammatory cells (Hinojosa et al. 2011) | Produced by stimulated microglia and expressed in high levels by infiltrating macrophage (Selenica et al. 2013) |
| CX3CR1 (fractalkine receptor) | Role in leukocyte migration and adhesion (Imai et al. 1997) | $CCR2_{low}$/$CX3CR1_{high}$—microglia $CCR2_{high}$/$CX3CR1_{low}$—monocytes (Mizutani et al. 2012) |

**Εικόνα 2.6:** Κοινοί επιφανειακοί μάρτυρες της μικρογλοίας [73]

Συνοπτικά, τα μικρογλοιακά κύτταρα που βρίσκονται μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων, των αστροκυττάρων και των νευρώνων, ανταποκρίνονται στις εγκεφαλικές βλάβες και εμπλέκονται σε αυτοάνοσες διεργασίες του νευρικού συστήματος. Μοριακές αλλοιώσεις όπως η έκφραση μορίων του μείζονος συμπλόκου ιστοσυμβατότητας, προηγούνται των δομικών αλλαγών στο εγκεφαλικό παρέγχυμα, σε όλα τα ζωικά μοντέλα. Σε μεταγενέστερα στάδια της νόσου, η μικρογλοιακή απόκριση διατηρείται λόγω των επακόλουθων μορφολογικών αλλαγών συμπεριλαμβανομένου του εκφυλισμού των νευραξόνων και την από μυελίνωση. Η ενεργοποίηση της μικρογλοίας, παρουσιάζεται ως ανεξάρτητη της μορφής του παθολογικού ερεθίσματος, διότι σε όλα τα ζωικά μοντέλα εμφανίζονται όμοιες αλλαγές, που συνοδεύονται από τον πολλαπλασιασμό, τον μετασχηματισμό σε φαγοκύτταρα και την περαιτέρω έκφραση επιφανειακών κυτταρικών μορίων, τα οποία είτε εκφράζονται στη μικρογλοία (CR3) είτε εκφράζονται μόνο σε πολύ χαμηλά επίπεδα όπως τα μόρια τάξης 1 και τάξης 2.

## 2.8 Το εντερικό νευρικό σύστημα

Ένας τεράστιος αριθμός νευρώνων συνδέονται ειδικά με τον γαστρεντερικό σωλήνα για τον έλεγχο των πολλών λειτουργιών του. Πράγματι, αναφέρεται πως περισσότεροι νευρώνες βρίσκονται στο ανθρώπινο έντερο παρά σε ολόκληρο το νωτιαίο μυελό. Η δραστηριότητα του εντέρου ρυθμίζεται τόσο από τις συμπαθητικές όσο και από τις παρασυμπαθητικές διαιρέσεις. Ωστόσο, το έντερο διαθέτει ένα εκτεταμένο σύστημα νευρικών κυττάρων στα τοιχώματά του (όπως και τα βοηθητικά του όργανα όπως το πάγκρεας και η χοληδόχος κύστη) που δεν συνδέονται με στις συμπαθητικές ή παρασυμπαθητικές διαιρέσεις [74]. Οι νευρώνες αυτοί και το πολύπλοκο εντερικό πλέγμα στο οποίο και βρίσκονται, λειτουργούν περισσότερο ανεξάρτητα και αυτό έχει ως αποτέλεσμα, πολλές από τις λειτουργίες του εντέρου να συνεχίζουν τη λειτουργία τους χωρίς τη παρακολούθηση του συμπαθητικού ή παρασυμπαθητικού νευρικού συστήματος. Όλες αυτές οι παραδοχές, οδηγούν στο γεγονός ότι το έντερο διαθέτει ένα δικό του ανεξάρτητο νευρικό σύστημα, το εντερικό νευρικό σύστημα (ENS). Το εντερικό νευρικό σύστημα είναι ιδιαίτερα πολύπλοκο στη δομή και στην αρχιτεκτονική του [74]. Οργανώνεται σε δύο διαστάσεις: το μυεντερικό πλέγμα, το οποίο ασχολείται ειδικά με τη ρύθμιση του μυός του εντέρου και το πλέγμα του υποβλεννογόνου (ή του Meissner), το οποίο βρίσκεται, όπως υποδηλώνει το όνομα, ακριβώς κάτω από τις μεμβράνες βλέννας του εντέρου και ασχολείται με τη χημική παρακολούθηση και την αδενική έκκριση [75].

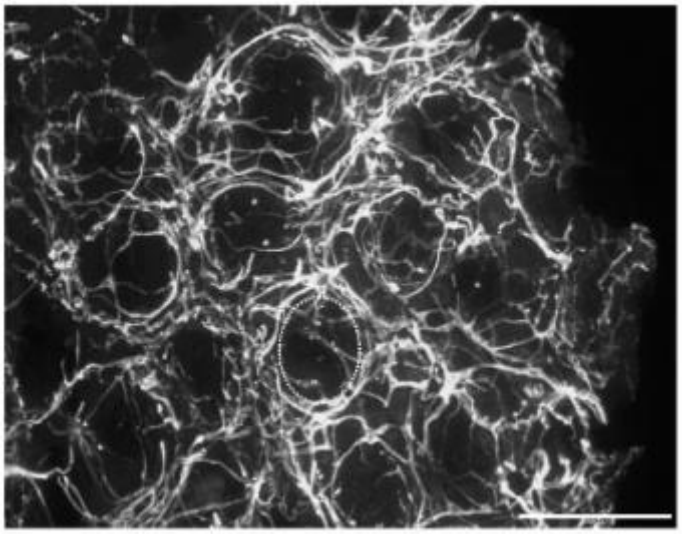



**Εικόνα 2.7:** Η οργάνωση του εντερικού νευρικού συστήματος (Neuroscience. 2nd edition.Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, et al., 2001.)

Η εντερική γλοία αποτελεί μέρος του εντερικού νευρικού συστήματος (ENS). Όλα τα γλοιακά κύτταρα του εντέρου προέρχονται από τα προγονικά κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας, τα οποία μεταναστεύουν μέσω της γαστροεντερικής οδού και δίνοντας τόσο νευρώνες όσο και μικρογλοία [76]. Αποτελεί ένα σύνθετο δίκτυο που ελέγχει τη γαστρεντερική κινητικότητα, την έκκριση, την πρόσληψη θρεπτικών ουσιών, τη ροή αίματος και τις ανοσολογικές και φλεγμονώδεις διεργασίες [74]. Η γλοία είναι πολύ πιο άφθονη από τους νευρώνες [77].

| CNS | PNS–somatic | Sympathetic and parasympathetic nervous system | ENS |
|---|---|---|---|
| **Macroglia** | | | |
| Astrocytes (*neurectodermal*) | – | – | Enteric glia (*neural crest*) |
| Oligodendrocytes (*neurectodermal*) | Satellite cells<br>Schwann cells<br>• myelinating<br>• non-myelinating (*neural crest*) | Satellite cells<br>Schwann cells<br>• myelinating<br>• non-myelinating (*neural crest*) | Schwann cells<br>• Non-myelinating (*neural crest*) |
| Ependymal cells (*neurectodermal*) | – | – | – |
| **Microglia** | | | |
| Microglial cells (*mesodermal*) | – | – | – |

**Εικόνα 2.8**: Η κατανομή των γλοιακών κυττάρων στο ΚΝΣ και στο ΕΝΣ [75]

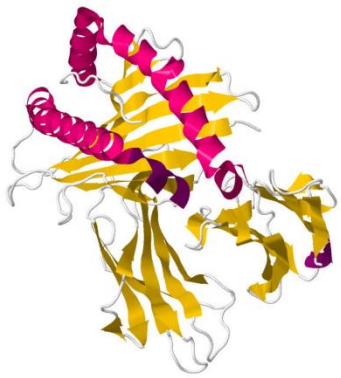


**Εικόνα 2.9:** Η βάση του επιθηλιακού κρύπτη στο έντερο περιστοιχίζεται από ένα πυκνό δίκτυο γλοιακών κυττάρων και των προεκβολών τους [75]. Χρώση με S-100, Scale bar=200μm

## 2.9 Η πρωτεΐνη του πρωτεολιπιδίου (PLP)

Η πρωτεΐνη πρωτεολιπιδίου (PLP ή λιποφιλίνη) αποτελεί τη κύρια πρωτεΐνη μυελίνης στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) αποτελώντας το 50% αυτής [78–80]. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο τόσο στο σχηματισμό όσο και στη διατήρηση της πολυελασματικής δομής της μυελίνης. Οι περιελίξεις της μυελίνης σχηματίζουν μια πολυστρωματική μεμβράνη, μοναδική στο νευρικό σύστημα, που λειτουργεί ως μονωτήρας για να αυξήσει σημαντικά την αποτελεσματικότητα της αγωγιμότητας μεταξύ των νευρικών κυττάρων [33,81]. Είναι εξαιρετικά συντηρημένη υδρόφοβη πρωτεΐνη, με 276-280 αμινοξέα. Δομικά, περιέχει τέσσερα διαμεμβρανικά τμήματα και δύο δισουλφιδικούς δεσμούς . Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω οι πρωτεΐνες MBP, MOG και PLP αποτελούν αντιγόνα για την έκφραση της ΣΚΠ και πιο ειδικά, για το πολύ καλά μελετημένο μοντέλο της νόσου, την ΕΑΕ. Τα πεπτίδια PLP 95-116, 105-124 και 139-155, είναι αποτελεσματικά για τη δημιουργία συγκεκριμένων σειρών Τ κυττάρων (TCL)

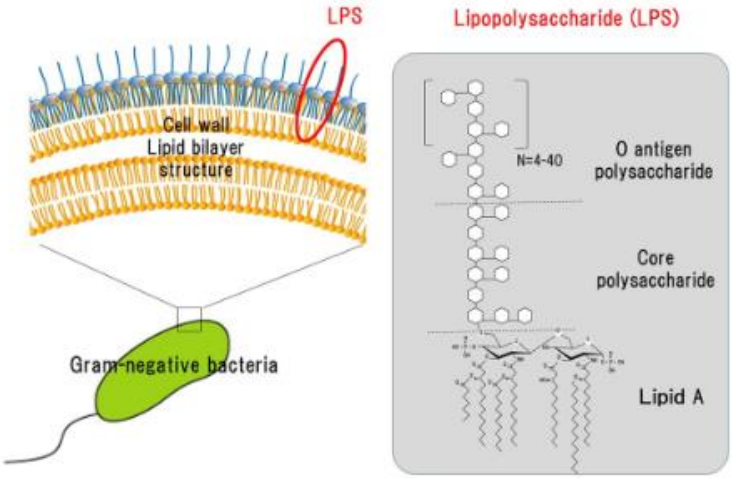
**Εικόνα 2.10:** Τομή παρεγκεφαλίδας από ασθενή-μάρτυρα χρώση για PLP. κλίμακας = 1 cm. [82]



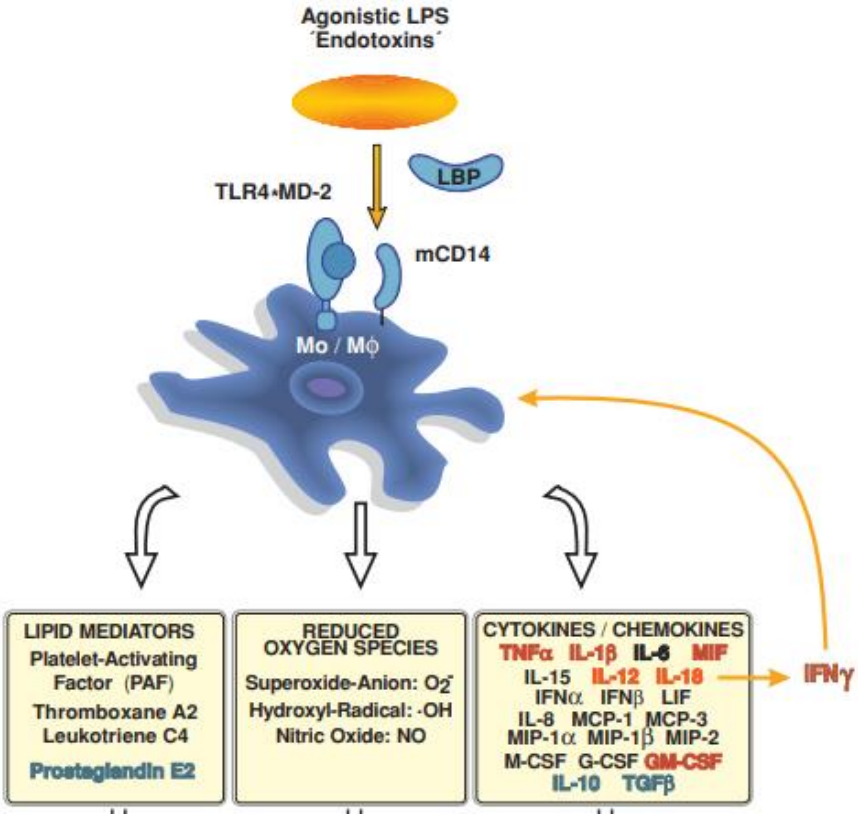
**Εικόνα 2.11:** Η τρισδιάστατη δομή της mouse-PLP (Wikipedia)

## 2.10 Ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS)

Ο βακτηριακός λιποπολυσακχαρίτης (LPS) αποτελεί ένα από τα κύρια συστατικά στην εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης σχεδόν όλων των Gram-αρνητικών βακτηρίων [83]. Δρα ως εξαιρετικά ισχυρός διεγέρτης της έμφυτης ή φυσικής ανοσίας [84], σε ένα ευρύ φάσμα ευκαρυωτικών ειδών, από τα έντομα μέχρι τους ανθρώπους. Ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS), είναι ένα εξαιρετικά θερμικά σταθερό αμφίφιλο μόριο, ο οποίος αποτελείται από έναν πολύ- ή ολιγοσακχαρίτη που αγκυροβολεί στην εξωτερική βακτηριακή μεμβράνη μέσω ενός λιπιδίου που ονομάζεται λιπίδιο Α [85]. Ο LPS φυσιολογικά, συναντάται σε ένα μεγάλο σύνολο κοινών παθογόνων όπως *Escherichia coli, Salmonella enterica, Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Pseudomonas aeruginosa, Helicobacter pylori, Klebsiella pneumoniae, Legionella pneumophila και Chlamydia trachomatis*. Το λιπίδιο Α, αντιπροσωπεύει το πρωτεύον ανοσοαντιδραστικό κέντρο του LPS λόγω της ειδικής και συχνά εξαιρετικά ευαίσθητης αναγνώρισης αυτής της βακτηριακής λιπιδικής δομής από πολυάριθμα κυτταρικά και χυμικά συστατικά της έμφυτης ανοσίας [86–88]. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει, πως συγκεκριμένα μέλη της οικογένειας υποδοχέων Toll-like (Toll-like receptors – TLRs) σε κύτταρα θηλαστικών συμπεριλαμβανομένου και φαγοκυττάρων, ενεργοποιούνται παρουσία του LPS [89–91]. Πιο ειδικά, κύριοι κυτταρικοί στόχοι του LPS, αποτελούν οι πληθυσμοί περιφερικών μονοκυττάρων, μακροφάγων και ουδετερόφιλων, οι οποίοι εκφράζουν συστηματικά τη μεμβρανική μορφή του αντιγόνου CD14 (mCD14) καθώς και TLR4 [92,93]. Βιβλιογραφικά, η πιο γνωστή βιολογική δραστηριότητα του LPS, είναι η ενεργοποίηση των μακροφάγων. Πιο συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση μονοπύρηνων κυττάρων με LPS *in vitro* οδηγεί στην έκκριση ενός ευρέος φάσματος ενδογενών παραγόντων μεταξύ των οποίων και οι προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες TNF-α, ανασταλτικός παράγοντας μετανάστευσης μακροφάγων (MIF), ιντερλευκίνες IL-8, IL-12, IL-15 και IL-18, οι παράγοντες M-CSF, GCSF και GM-CSF, ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF), προσταγλανδίνη Ε2 (PGE2), θρομβοξάνη Α2 (TXA2) ή λευκοτριένια, καθώς και ανοιγμένα είδη οξυγόνου όπως το ανιόν υπεροξειδίου (O2-), ρίζες υδροξυλίου (OH) ή νιτρικό οξείδιο (NO) [94].




**Εικόνα 2.12:** Η δομή του λιποπολυσακχαρίτη (LPS)




**Εικόνα 2.13:** Η ενεργοποίηση μακροφάγων απο LPS. Η κεντρική εξωκυτταρική οδός για την ενεργοποίηση των περιφερειακών μονοκυττάρων (Mo / Mφ) με LPS και το κύριο φάσμα κυτταρικών αποκρίσεων [94]

## 2.11 Η κυτταρική σειρά BV-2

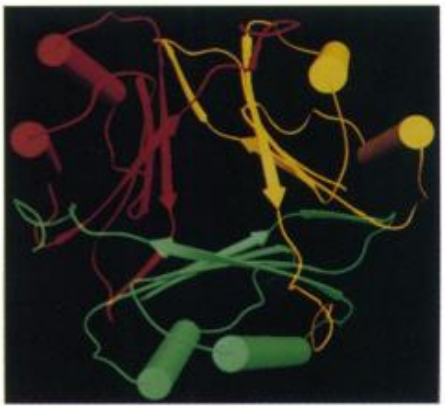
Τα κύτταρα BV-2 καλλιεργήθηκαν για πρώτη φορά από την ομάδα του E.Blasi, στο πανεπιστήμιο της Περούτζια, το 1989 [95] και προέρχονται από πρωτογενή μικρογλοία επίμυων. Μικρογλοιακές καλλιέργειες ποντικού, διαμολύνθηκαν με τον ανασυνδυασμένο ρετροϊό v-raf/v-myc και η προκύπτουσα κυτταρική σειρά (BV-2) εμφάνισε τις φαινοτυπικές και λειτουργικές ιδιότητες των "reactive" μικρογλοιακών κυττάρων. Παρατηρήθηκε ότι, ενώ αυτή η κυτταρική σειρά παρουσιάζει αντιγονικές ιδιότητες και εκκριτικά προϊόντα κοινά όμοια με αυτά των μακροφάγων, ωστόσο οι ιστοχημικοί δείκτες της και τα μορφολογικά της χαρακτηριστικά, την διακρίνουν από μακροφάγα [96]. Τα κύτταρα BV-2 είναι κυρίως προσκολλητικά κύτταρα, ενώ παρουσιάζουν μεταβλητό σχήμα κατά την καλλιέργεια τους. Αξίζει να σημειωθεί πως, συναντώνται και σε πιο μικρό μέγεθος, σφαιρικής διαμόρφωσης και πιο χαλαρής προσκόλλησης. Παρατηρήσεις με μικροσκόπιο ηλεκτρονικής σάρωσης, αποκάλυψε πως τα κύτταρα αυτά εμφανίζουν ακανθώδεις απολήξεις, παρόμοιες με κύτταρα πρωτογενούς μικρογλοίας [96].

Τα κύτταρα BV-2, αποτελούν ένα χρήσιμο *in vitro* μοντέλο για τη μελέτη της μικρογλοίας σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο. Ανταποκρίνονται σε διάφορους παράγοντες όπως ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS) και η ιντερφερόνη γ' (IFN-γ). Όταν διεγείρονται με κάποιον από τους προαναφερθέντες παράγοντες, ενεργοποιούνται, ο πολλαπλασιασμός τους αυξάνεται και αρχίζουν να αποκτούν φαινότυπο μακροφάγων. Ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS), είναι κλασσικός επαγωγέας της ενεργοποίησης των BV-2 κυττάρων. Απουσία LPS, η κυτταρική σειρά αυτή παραμένει βιώσιμη και διατηρεί τα χαρακτηριστικά του μητρικού ιστού. Τα κύτταρα αυτά όταν πολλαπλασιάζονται αναπτύσσονται σε τρισδιάστατα συσσωματώματα, ενώ παράλληλα συνθέτουν και εκκρίνουν πλήθος παραγόντων, όπως κυτοκίνες. Όταν προστεθεί στο θρεπτικό τους μέσο LPS, σταδιακά αυξάνουν το ρυθμό διαίρεσής τους και αρχίζουν να διαφοροποιούνται, μέσω αυτής της ενεργοποίησης, αποκτώντας το φαινότυπο μακροφάγων. Ωστόσο, η επίδραση του LPS στα BV-2 είναι αναστρέψιμη, καθώς μετά την αφαίρεση του από το θρεπτικό μέσο, τα κύτταρα επιστρέφουν στην απενεργοποιημένη τους μορφή (resting microglia).

Η μελέτη της ομάδας του Bocchini το 1992, επιβεβαίωσε ότι τα κύτταρα BV-2 έχουν όμοιες ιδιότητες με τη μικρογλοία και με βάση αυτό, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως το in vitro μοντέλο μικρογλοίας [96]. Επιπλέον, σύμφωνα με αυτή τη δημοσίευση, τα κύτταρα BV-2 εκφράζουν το ίδιο πρότυπο μεμβρανικών καναλιών που διακρίνει και τα μικρογλοιακά κύτταρα από τα μακροφάγα. Επίσης, τα κύτταρα αυτά παρουσιάζουν τις ίδιες ιδιότητες με τα ενεργοποιημένα μακροφάγα, κάτι που ταυτοποιεί ότι η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά δρα ακριβώς όπως τα κύτταρα ενεργοποιημένης μικρογλοίας. Η φαγοκυτταρική ικανότητα είναι ίσως ο πιο αξιόπιστος δείκτης για την ιδιότητα τους ως μακροφάγα, ανεξάρτητα από την ανατομική τους προέλευση. Παρόλο που υπάρχουν και άλλα νευρικά κύτταρα που μπορούν να φαγοκυτώσουν, η μικρογλοία αποτελεί τα κατεξοχήν φαγοκύτταρα του ΚΝΣ. Αυτή η ιδιότητα εκδηλώνεται σε υψηλό βαθμό στην κυτταρική σειρά BV-2, η οποία είναι ικανή να φαγοκυτώνει σφαιρίδια λάτεξ και να καταστρέφει (μέσω φαγοκύτωσης) μικροοργανισμούς όπως *C. albicans, A. Fumigatus και C. Neoformans.*

## 2.12 Ο ανασταλτικός παράγοντας μετανάστευσης των μακροφάγων (MIF)

Ο MIF (Macrophage migration inhibitory factor), ήταν από τις πρώτες κυτοκίνες που εντοπίστηκαν και το όνομά του προέρχεται από τις πρώτες γνωστές λειτουργίες των κυτοκινών: παράγοντας αναστολής της μετανάστευσης των μακροφάγων. Το 1966, κατά τη διάρκεια μελετών των αντιδράσεων υπερευαισθησίας καθυστερημένου τύπου, ο MIF περιγράφηκε ως η κυτοκίνη που εκκρίνεται από Τ-κύτταρα και αναστέλλει την τυχαία μετανάστευση των μακροφάγων από τους τριχοειδείς σωλήνες [97]. Από την ανακάλυψή του, έχει περιγραφεί ποικιλία ανοσολογικών και μη ανοσολογικών δραστηριοτήτων του MIF. Η κλωνοποίηση του MIF το 1989 από τον John David αποκάλυψε ένα εξαιρετικά διατηρημένο πολυπεπτίδιο των 114 αμινοξέων [98]. Η κρυσταλλογραφική ανάλυση έδειξε ότι ο MIF είναι ένα ομοτριμερές το οποίο παρουσιάζει τη ίδια δομική ομολογία με τρία μικροβιακά ένζυμα, υποδεικνύοντας μια ενζυματική λειτουργία για τον MIF. Κάθε ένα από αυτά τα μονομερή περιέχει δύο αντιπαράλληλες άλφα έλικες και ένα τετράκλωνο βήτα φύλλο. Τα μονομερή περιβάλλουν ένα κεντρικό κανάλι με τριπλή περιστροφική συμμετρία [99]. Ωστόσο, μελέτες δεν μπόρεσαν να εντοπίσουν την σύνδεση για την ενζυμική ικανότητα του MIF και της βιολογικής της λειτουργίας.



**Εικόνα 2.14:** Η αρχιτεκτονική δομή του τριμερούς του MIF. Οι α-έλικες αναπαρίστανται με κυλίνδρους και οι β-πτυχώσεις, με βέλη και διαστάσεις 35 A x 50 A x 50 A [99]

Ο MIF είναι μια κυτοκίνη με ευρεία κυτταρική έκφραση και ιστική κατανομή. Ιστορικά, η MIF θεωρήθηκε προϊόν ενεργοποιημένων Τ-λεμφοκυττάρων. Ωστόσο, μελέτες σε ποντίκια με ανεπάρκεια Τ κυττάρων οδήγησαν στην ανακάλυψη ότι τα μακροφάγα είναι σημαντική πηγή MIF [100]. Η έκφραση MIF είναι ιδιαίτερα υψηλό στους ιστούς του ενδοκρινικού συστήματος, συμπεριλαμβανομένης της υπόφυσης, όπου ο MIF παρατηρείται να εκκρίνεται σε φυσιολογικό στρες, υποδηλώνοντας έτσι ότι ο MIF παίζει σημαντικό ρόλο στην απόκριση σε στρες [100]. Σε φυσιολογικές συνθήκες, βασικά επίπεδα MIF ανιχνεύονται σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου. Ωστόσο, η έκφραση αυξάνεται δραματικά στον εγκέφαλο και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (CSF), σε απόκριση σε φλεγμονωδών ερεθισμάτων [101]. Οι λειτουργίες του MIF στο ανοσοποιητικό σύστημα είναι μοναδικές και ποικίλες. Σε αντίθεση με τις περισσότερες κυτοκίνες, ο MIF εκφράζεται και αποθηκεύεται σε ενδοκυτταρικές δομές έως ότου ενεργοποιηθεί η απελευθέρωσή του. Τα μακροφάγα περιέχουν μεγάλες ποσότητες προσχηματισμένου MIF που μπορεί να απελευθερωθεί ταχέως σε απόκριση φλεγμονωδών ερεθισμάτων, όπως TNF-α, IFN-γ και

λιποπολυσακχαρίτη (LPS) [100]. Αφού εκκριθεί, ο MIF έχει αποδειχθεί ότι ελέγχει μια σειρά από κυτταρικές αποκρίσεις, συμπεριλαμβανομένης της προαγωγής της κυτταρικής επιβίωσης, της παραγωγής προ-φλεγμονωδών κυτοκινών και της φαγοκύτωσης από τα μακροφάγα [102]. Τα προφλεγμονώδη αποτελέσματα του MIF προκαλούνται από την ικανότητά του να προάγει άμεσα ή έμμεσα την έκφραση αρκετών προ-φλεγμονωδών κυτοκινών και μεσολαβητών, συμπεριλαμβανομένων των TNF-α, IFN-γ, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-12 καθώς και τη iNOS [[100].

Μέχρι στιγμής, έχουν οριστεί τρεις εξωκυτταρικοί υποδοχείς για τον MIF, συμπεριλαμβανομένων των CD74, CXCR2 και CXCR4 [103]. Ο CD74, αποτελεί τμήμα της σταθερής αλυσίδας των MHC μορίων τάξης 2, και αποτελεί τον πρώτο αναγνωρισμένο υποδοχέα για τον MIF [103]. Η δέσμευση με CD74 έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών ERK 1/2, MAPK και AP-1[103]. Σε υψηλές συγκεντρώσεις, η πρόσληψη MIF μπορεί να γίνει μέσω ενδοκυττάρωσης ανεξάρτητης από τον υποδοχέα και να ανταγωνιστεί την προ-φλεγμονώδη και την αυξητική του δραστηριότητα [104]. Επιπρόσθετα, ο MIF ρυθμίζει την έκφραση του υποδοχέα τύπου Toll (TLR-4) 4 σε μακροφάγα μέσω του παράγοντα μεταγραφής PU.1 Καθιστώντας τα μακροφάγα με έλλειψη MIF, τότε αυτά υπο-ανταποκρίνονται στην διέγερση LPS [105]. Λόγω της προ-φλεγμονώδους φύσης του, ο MIF έχει καθιερωθεί ως μεσολαβητής σε παθογένειες αυτοάνοσων και μολυσματικών ασθενειών, καθώς και στον καρκίνο [100]. Η συμμετοχή του MIF στην έμφυτη ανοσολογική αντίδραση, έχει μελετηθεί εκτενώς. Η συμμετοχή του MIF στην αυτοανοσία έχει επικυρωθεί σε διάφορα ζωικά μοντέλα, συμπεριλαμβανομένων πειραματικών μοντέλων RA, διαβήτη και EAE, όπου η εξουδετέρωση του MIF μειώνει σημαντικά την δραστηριότητα της ασθένειας [106].

Σε ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας (ΣΚΠ), βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα MIF σε δείγματα CSF που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια της υποτροπιάζουσας φάσης σε σχέση με τα δείγματα που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια της ύφεσης [107]. Στην EAE, έχουν επιβεβαιωθεί αυξημένα επίπεδα MIF στα φλεγμονώδη διηθήματα του ΚΝΣ [107]. Άλλες μελέτες αποδεικνύουν ότι ο MIF είναι απαραίτητος για την πρόοδο της κλινικής EAE, καθώς η διαγραφή του γονιδίου του αποτρέπει την ανάπτυξη χρόνιας EAE [108]. Επιπλέον, σε ένα υποτροπιάζον-αναστρέψιμο ζωικό μοντέλο MS, ένας αναστολέας μικρού μορίου MIF στάθηκε αποτελεσματικός στην πρόληψη των υποτροπών και φλεγμονής του ΚΝΣ [109]. Συνολικά, αυτές οι μελέτες υποδεικνύουν ένα ρόλο για το MIF, στην παθογένεση της ΣΚΠ. Ωστόσο, ο μηχανισμός με τον οποίο ο MIF προωθεί την ασθένεια απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση.

## 2.13 Σκοπός

Ο σκοπός αυτής της εργασίας ήταν να μελετηθεί η απόκριση του ανοσοποιητικού και του εντερικού νευρικού συστήματος, σε ένα ζωικό μοντέλο εντερομυελίτιδας το οποίο προκλήθηκε με σπάσιμο της ανοχής, με αυτό-αντιγόνο. Το αυτό-αντιγόνο που χρησιμοποιήθηκε ήταν εκχύλισμα εγκεφάλου, ίδιου είδους με αυτό που μελετήθηκε (πειραματικά ποντίκια Balb/c), το οποίο βρίθει σε πρωτεΐνη PLP. Μία πρωτεΐνη που μαζί με άλλες (MBP, MOG) αποτελούν τον κύριο «στόχο» των μακροφάγων κατά τις διαδικασίες απομυελίνωσης των νευρώνων του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ), που συναντάται στο αυτοάνοσο νευροεκφυλλιστικό νόσημα της σκλήρυνσης κατά πλάκας (ΣΚΠ). Οι πειραματικές προσεγγίσεις για την ανίχνευση της αυτό-ανοσοαπόκρισης ήταν ποικίλες. Αρχικά, μελετήθηκε η παραγωγή αυτό-αντισωμάτων, καθώς και η έκκριση χαρακτηριστικών κυτοκινών που σηματοδοτούν την ανοσολογική αντίδραση. Παράλληλα, διερευνήθηκε το πρότυπο ποσοτικής έκφρασης λεμφοκυτταρικών πληθυσμών, όπως και τα επίπεδα έκφρασης της ενεργοποιημένης μικρογλοίας του εντέρου. Επιπλέον, επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη αυτό-αντισωμάτων και άρα φλεγμονής, προχωρήσαμε στην εφαρμογή πιθανής θεραπευτικής στρατηγικής με διαλυτά μόρια τάξης 2 (soluble-MHCII molecules), τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί και στο παρελθόν σε αντίστοιχη περίπτωση αυτό-ανοσοαπόκρισης (αυτοάνοσος συστηματικός ερυθηματώδης λύκος –SLE), [115–118]. Τέλος, μελετώντας τη κυτταρική σειρά BV-2 (*in vitro* μοντέλο για τη μελέτη της μικρογλοίας) και διεγείροντάς τη προς ενεργοποίηση με τον λιποπολυσακχαρίτη (LPS), αναζητήσαμε τον πιθανό ρόλο του συμπλόκου MIF-CD74, στη μη-επιδείνωση της αυτό-ανοσοαπόκρισης.

# 3. Πειραματικό μέρος: Υλικά και Μέθοδοι

## 3.1. Πειραματικά ποντίκια Balb/c, συλλογή ορού και οργάνων

Τα θηλυκά ποντίκια BALB/c (H-$2^d$ ) 4-12 εβδομάδων που χρησιμοποιήθηκαν αγοράστηκαν από τον Charles River (Milan, Italy) και στεγάζονται στο ζωοτροφείο του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, σε δωμάτια με σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (18-25$^o$C), υγρασίας (45-50%) και φωτοπερίοδο 12 ωρών φωτός και 12 σκοτάδι. Ο χειρισμός των ποντικών έγινε σύμφωνα με τους διεθνείς και ευρωπαϊκούς κανονισμούς βιοηθικής και συμβάδιζε με αυτούς του Πανεπιστημίου Κρήτης, εγκεκριμένους από τον υπεύθυνο ζωοτροφείου του Τμήματος Βιολογίας. Η συλλογή δείγματος αίματος γίνονταν με τοπική εγχάραξη της ουράς που επέτρεπε αφαίρεση μικροποσότητας και ταχεία επούλωση και τα ζώα θυσιάζονταν με αυχενική εξάρθρωση. Το αίμα παρέμενε σε θερμοκρασία δωματίου (rt) για 30' και στην συνέχεια για 30' στους 4$^o$ C. Ο ορός συλλέγονταν μετά από φυγοκέντρηση για 3' στις 3000 rpm και φυλασσόταν στους -20 $^o$C. Οι σπλήνες αφαιρούνταν υπό στείρες συνθήκες με την χρήση αποστειρωμένων εργαλείων. Με το πέρας του in vivo πρωτοκόλλου για τη διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος πειραματικών ποντικιών με εγκεφαλικό εκχύλισμα, αφαιρούταν για περαιτέρω μελέτη ο σπλήνας, ο εγκέφαλος και τμήμα του λεπτού εντέρου, στείρες συνθήκες με την χρήση αποστειρωμένων εργαλείων.

## 3.2 Βιοχημικά υλικά

### 3.2.1 Θρεπτικό υλικό και συμπληρώματα

Για την καλλιέργεια πρωτογενών κυττάρων σπλήνας χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω θρεπτικό μέσο: Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen, Grand Island, NY, USA). Στο παραπάνω θρεπτικό μέσο προστέθηκε fetal bovine serum 10% (FBS; Biosera, Sussex, UK) και το αντιβιοτικό penicillin / streptomycin 1% (GIBCO/ Life Technologies 15140-122).

Για τη καλλιέργεια των κυττάρων BV2 χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω θρεπτικό μέσο: Advanced RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 (RPMI 1640, Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc.). Στο παραπάνω θρεπτικό μέσο προστέθηκε fetal bovine serum 10% (FBS; Biosera, Sussex, UK) και το αντιβιοτικό penicillin / streptomycin 1% (GIBCO/ Life Technologies 15140-122).

### 3.2.2 Ενεργοποίηση με λιποπολυσακχαρίτη LPS

Ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS) (Sigma, Germany), χρησιμοποιήθηκε για την ενεργοποίηση των κυττάρων BV2, σε συγκέντρωση 500 ng/ml.

### 3.2.3 Εγκεφαλικό εκχύλισμα και πλήρες ανοσοενισχυτικό του Freud (complete Feud's adjuvant- CFA)

Το εγκεφαλικό εκχύλισμα, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως αντιγόνο για τη διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος των πειραματικών ποντικιών Balb/c και για τις in vitro καλλιέργειες σπλενικών κυττάρων, παρασκευάστηκε στο εργαστήριο Ανοσολογίας, στο τμήμα Βιολογίας του Πανεπίστημίου Κρήτης. Επίσης, για τη διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος των ζώων balb/c, χρησιμοποιήθεκε το πλήρες ανοσοενιχυτικό του Freud (Sigma, Germany).

### 3.2.4 Διαλυτά MHC class II μόρια

Τα διαλυτά MHC class II μόρια, χρησιμοποιήθηκαν ως πιθανή θεραπευτική στρατηγική έναντι στην ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού στυστήματος ποντικιών Balb/c σε απάντηση προς αντιγόνο, εγκεφαλικό εκχύλισμα. Τα διαλυτά MHC class II μόρια, απομονώθηκαν από τον ορό πειραματικών ποντικών Balb/c, στο εργαστήριο Ανοσολογίας, στο τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Η συγκέντρωση του διαλύματος που προέκυψε, έπειτα από τιτλοποίηση, ήταν 280μg/ml και η συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε για κάθε ζώο, ήταν 8.4 μg/πειραματικό ζώο.

### 3.2.5 Αντισώματα

- Mouse anti-IA/IE mAb (HB-225TM hybridoma: Mus musculus (myeloma), Hamster Armenian B cell, συνδέεται με μονομορφικό επίτοπο στην I-A και I-E περιοχή, ισότυπου IgG, ευγενική προσφορά από τον καθηγητή R. Steinman Rockefeller (University, NY).
- PE-labeled mouse anti-CD152 mAb (IgG, produced in Syrian Hamster, Biolegent, San Diego, CA),
- PE-labeled mouse anti-CD28 (IgG, produced in Armenian Hamster, Biolegent, San Diego, CA)
- FITC-labeled mouse anti-CD4 (IgG2b, produced in rat, Eurobioscience, Germany), χρησιμοποιήθηκε στην συγκέντρωση των 1μg/ml για τα πειράματα του cell sorting. • Mouse anti-IL-2 (IgG2a, k, produced in rat, Immunotools, USA
- Goat anti-mouse IgG (Fab fragment) secondary antibody, συνδεδεμένο με ένζυμο υπεροξειδάση (Sigma, Germany),
- HRP-conjugated anti-rabbit IgG (produced in goat, NIDA, IMBB-FORTH, Heraklion, Greece),
- MIF (N-20): SC-16965, Santa Cruz Biotechnology, inc.
- Anti-CD8a (mouse), FITC, clone 53-6.7, Millipore
- Anti-CD4 (mouse), FITC- conjugated, Eurobiosciences
- Purified anti-mouse TNF-α, Biolegend
- Anti-CD19 (mouse) FITC, Biolegend
- Anti-CD11b (mouse) PE, Biolegend

- Anti-CD74 (By2): SC-20062, Santa Cruz Biotechnology, inc.
- **3.2.6 Χημικά διαλύματα**
- Για την αποκόλληση των κυττάρων BV2 κατά τη διαδικασία της ανακαλλιέργειας χρησιμοποιήθηκε trypsin 0,05% (Gibco//Life Technologies, Cat. No.15090)
- Τα χημικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την τεχνική του ανοσοφθορισμού ήταν: PBS 1X για τις ενδιάμεσες πλύσεις, PBS-BSA 2% για το μπλοκάρισμα μη ειδικών προσδέσεων
- Για τον έλεγχο πολλαπλασιασμού κυττάρων με ραδιενεργή θυμιδίνη ($^3$HTdR) χρησιμοποιήθηκαν, θρεπτικό μέσο RPMI (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA), με προσθήκη 10% πρωτεϊνικό ορό (FBS, Gibco), ραδιενεργή θυμιδίνη ($^3$H) TdR (INC, 35Ci/mmol, 1mCi/ml, Costa Mesa, CA), σπινθηριστικό υγρό (toluene-omnifluor; 1.38 g/l, NEN, Chromasol Sigma-Aldrich, Germany)
- Για τη ποσοτικοποίηση πρωτείνης με τη μέθοδο Lowry χρησιμοποιήθηκαν TCA 20% , A reagent: 2gr NaOH, 10gr $Na_2CO_3$, 0,1gr Na-K-tartarate (V=500ml), B reagent: 0,5gr $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, C reagent: 10ml reagent A, 0,2ml reagent B, D reagent: 1,5ml Follin-Ciocalteau 2N + 1,5ml $H_2O$
- Για τη χρώση του gel με Νιτρικό Άργυρο χρησιμοποιήθηκαν: 5% και 1% CH3COOH, Methanol, Sodium triosulfate($Na_2S_2O_3 \bullet 5H_2O$) 0,02%, $AgNO_3$ 0,1%, και διάλυμα εμφάνισης ($Na_2CO_3$ 2%, 0,04% φορμαλδεΰδη).
- Για την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης κατά western, τα χημικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: Tris, Glycine, β-mercaptethanol , SDS, Glycerol, Bromophenol blue , Ακρυλαμίδη 30%, APS, Temed, Precision Plus Protein™ Marker Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards (1610375; 5μl; Biorad), TBS/Tween 20 1%, TBST-BSA 5%
- Για την ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσροφητική δοκιμή (ELISA), χρησιμοποιήθηκαν Coating buffer: 0.05M $NaHCO_3$, 0.05 $Na_2CO_3$ pH 9.6, Washing buffer: PBS -tween 20%, 0.05% , Blocking buffer: PBS-BSA (Bovine Serum Albumin) 2% , Ab buffer: PBS-BSA 0.1% , Tetramethylbenzidine-$H_2O_2$ (TMB Substrate Kit, Thermo Scientific, Waltham, MA) ,$H_2SO_4$, 1M
- Για την κατακρήμνιση πρωτεϊνών με σφαιρίδια χρησιμοποιήθηκαν, μαγνητικά σφαιρίδια συνδεμένα με ειδικό για την πρωτεΐνη αντίσωμα (25μl anti-CD74), washing buffer: PBS-Tween 20, 0.05%, NaCl 1M, υπερπαραμαγνητικά σφαιρίδια (Dynal Biotech)-διαμέτρου M-280, a-IgG, αποστειρωμένο PBS (pH 7,4), Triethanolamine 0,2M σε $dH_2O$ , pH 8,2, Διάλυμα dimethyl pimelimidate dihydrochloride (DMP, Pierce, Rockford, IL, USA, Tris buffer 50mM σε $dH_2O$ , pH 7,5

*****<u>Σημείωση:</u> Τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν τα παραπάνω διαλύματα περιγράφονται πιο κάτω αναλυτικά για κάθε τεχνική

## .3.3 *In Vitro* πειράματα

### 3.3.1.1 Καλλιέργεια σπλενικών κυττάρων και διέγερση τους με εγκεφαλικό εκχύλισμα

Κύτταρα σπλήνας πειραματικών ποντικιών Balb/c συλλέχθηκαν και υποβλήθηκαν σε καλλιέργεια 7 ημερών παρουσία διαβαθμισμένων συγκεντρώσεων εγκεφαλικού εκχυλίσματος προκειμένου να μελετηθεί η όποια επίδραση του στα κύτταρα αυτά. Οι καλλιέργειες έλαβαν χώρα σε πιάτα καλλιέργειας 6-well plates. Το εγκεφαλικό εκχύλισμα προστέθηκε στο θρεπτικό μέσο κατά την έναρξη της καλλιέργειας. Το θρεπτικό υλικό και οι δόσεις εγκεφαλικού εκχυλίσματος διατηρήθηκαν χωρίς ανανέωση για 7 ημέρες, μέχρι το πέρας της καλλιέργειας. Οι δόσεις εγκεφαλικού εκχυλίσματος που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής: 1μg/ml, 5 μg/ml, 10 μg/ml, 50μg/ml και 100 μg/ml. Επίσης διατηρήθηκαν και πηγάδια καλλιέργειας με control κύτταρα καθ'όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας. Το κάθε πείραμα επαναλαμβανόταν τουλάχιστον τρεις φορές για να διαπιστωθούν επαναλήψιμα αποτελέσματα.

### 3.3.1.2 Απομόνωση κυττάρων σπλήνας

- Θρεπτικό υλικό DMEM (10% FBS)
- HBSS
- Αποστειρωμένα εργαλεία

1. Απομάκρυνση του ερυθρού πολφού από τον σπλήνα (είχε τοποθετηθεί σε 1ml HBSS) με την βοήθεια μίας βελόνας ινσουλίνης

2. Συλλογή σε θρεπτικό μέσο DMEM

3. Μεταφορά σε τρυβλίο petri και επώαση στους 37$^{o}$C

### 3.3.1.3 Χαρακτηρισμός

Τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία διαβαθμισμένων συγκεντρώσεων εγκεφαλικού εκχυλίσματος ή μη, μετά το πέρας των 7 ημερών, συλλέχθηκαν και υποβλήθηκαν σε εξωτερικό ανοσοφθορισμό με την τεχνική της κυτταρομετρίας ροής (FACSs) για την ποσοτικοποίηση των επιμέρους κυτταρικών πληθυσμών που προέκυψαν έπειτα από την διέγερση τους με εκχύλισμα εγκεφάλου. Παράλληλα, ελέγχθηκε ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός με την τεχνική της ραδιενεργής θυμιδίνης ($^{3}$HTdR). Τα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιεργειών συλλέχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν Τα επίπεδα έκφρασης ειδικών πρωτεϊνών που αποδεικνύουν την διέγερση σπλενικών κυττάρων, εκτιμήθηκαν με την μέθοδο της ενζυμοσύνδετης ανοσοπροσροφητικής δοκιμής (ELISA).

### 3.3.2.1 Καλλιέργεια κυττάρων BV2

Τα αθανατοποιημένα μικρογλοιακά κύτταρα ποντικού BV-2, αποτελούν κυτταρική σειρά (ATCCLGC,Rockville, MD, USA) και καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό RPMI 1640 που συμπληρώνεται με 10% FBS (complete medium) και 0,1% pen/strep, στους 37$^{o}$C και σε

ατμόσφαιρα 5% $CO_2$. Για την συντήρηση των κυτταροκαλλιεργειών στη φλάσκα, το θρεπτικό υλικό αντικαθιστούνταν κάθε 2 ημέρες με φρέσκο ενώ ανά καλλιέργεια γινόταν κάθε 3-4 ημέρες ή όποτε η φλάσκα ήταν πλήρης με χρήση διαλύματος τρυψίνης (trypsin) 0,05% (Gibco//Life Technologies, Cat. No.15090) ή με τη χρήση ξύστρας. Προκειμένου να μελέτηθεί η ενεργοποίηση των κυττάρων αυτών σε απάντηση προς τον λιποπολυσακχαρίτη LPS, τα κύτταρα BV-2 καλλιεργήθηκαν σε πιάτα καλλιέργειας των έξι (6) πηγαδιών (6-well- plate) και σε συγκέντρωση $10^6$ cells/ml, για 24 και 48 ώρες παρουσία ή μη LPS. Ο λιποπολυσακχαρίτης LPS, προστίθεται σε συγκέντρωση 500ng/ml στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας . Το θρεπτικό μέσο δεν αντικαθιστούταν κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας 24 ή 48 ωρών. Μετά το πέρας της καλλιέργειας 24 ή 48 ωρών παρουσία ή μη LPS, τα κύτταρα συλλέγονταν με ξύστρα και τα υπερκείμενα των καλλιεργειών συλλέγονταν επίσης σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Το κάθε πείραμα επαναλαμβανόταν τουλάχιστον τρεις φορές για να διαπιστωθούν επαναλήψιμα αποτελέσματα.

#### 3.3.2.2 Χαρακτηρισμός

Τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν, παρουσία ή μη LPS, για 24 και 48 ώρες υποβλήθηκαν σε εξωτερικό ανοσοφθορισμό με την τεχνική της κυτταρομετρίας ροής (FACs), για τη μελέτη του κυτταρικού χαρακτήρα που αποκτούν έπειτα από διέγερση με λιποπολυσακχαρίτη (LPS). Παράλληλα, το κυτταρικό εκχύλισμα κυττάρων BV2, χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση ειδικών πρωτεϊνών (CD74), με την τεχνική της ανοσοκατακρήμνισης πρωτεϊνών με σφαιρίδια, το οποίο και υποβλήθηκε σε περαιτέρω μελέτη για την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών αυτών με την τεχνική της ενζυμοσύνδετης ανοσοπροσροφητικής δοκιμής (ELISA) και της ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακριλαμίδης (SDS-PAGE). Τα επίπεδα έκφρασης ειδικών πρωτεϊνών στα υπερκείμενα της καλλιέργειας, εκτιμήθηκαν με τη μέθοδο ELISA.

## 3.4 In vivo πειράματα

### 3.4.1 Πειραματικά ποντίκια Balb/c

Τα θηλυκά ποντίκια BALB/c (H-$2^d$ ) 4-12 εβδομάδων που χρησιμοποιήθηκαν αγοράστηκαν από τον Charles River (Milan, Italy) και στεγάζονται στο ζωοτροφείο του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, σε δωμάτια με σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (18-25oC), υγρασίας (45-50%) και φωτοπερίοδο 12 ωρών φωτός και 12 σκοτάδι. Ο χειρισμός των ποντικών έγινε σύμφωνα με τους διεθνείς και ευρωπαϊκούς κανονισμούς βιοηθικής και συμβάδιζε με αυτούς του Πανεπιστημίου Κρήτης, εγκεκριμένους από τον υπεύθυνο ζωοτροφείου του Τμήματος Βιολογίας.

### 3.4.2 Ανοσοποίηση πειραματικών ποντικιών

Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν συνολικά εννιά (9) ποντίκια Balb/c. Από αυτό το σύνολο, τα οχτώ (8) ποντίκια υποβλήθηκαν σε κάποιο πρωτόκολλο ανοσοποίησης και το ένα (1) χρησιμοποιήθηκε για τη συλλογή control οργάνων. Αναφορικά, το σύνολο των 8 ποντικιών υποβλήθηκαν σε δύο διαφορετικά πρωτόκολλα ανοσοποίησης. Δύο (2) ποντίκια ανοσοποιήθηκαν με

500μg/ποντίκι εγκεφαλικού εκχυλίσματος και μελετήθηκαν σε βάθος εβδομάδων. Έξι ποντίκια ανοσοποιήθηκαν με διάλυμα το οποίο αποτελούταν από 500μg /ποντίκι εγκεφαλικού εκχυλίσματος και πλήρες ανοσοενισχυτικό του Freud, σε ίσες ποσότητες (1:1), και μελετήθηκαν σε βάθος χρόνου 8 εβδομάδων. Από το σύνολο των έξι (6) ποντικιών, τρία ποντίκια δοκιμάστηκαν σε θεραπευτική στρατηγική/αγωγή κατά την 6η εβδομάδα του πρωτοκόλλου ανοσοποίησης. Για τα *in vivo* πρωτόκολλα ανοσοποίησης, οι ενέσεις στα ποντίκια πραγματοποιήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά (ip). Για τα πρωτόκολλα ανοσοποίησης δεν έγινε επανάληψη δόσης αντιγόνου μέχρι το πέρα του πρωτοκόλλου.

### 3.4.3 Αιμοληψίες

Για τη μελέτη της διέγερσης και της ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος των πειραματικών ποντικιών έπειτα από την ανοσοποίηση τους, δείγμα αίματος συλλέγονταν κάθε δεύτερη εβδομάδα ξεκινώντας από την πρώτη εβδομάδα. Δείγμα αίματος συλλέγονταν με εγχάραξη της ουράς, μέθοδος που δεν βλάπτει και δεν προκαλεί πόνο στο ζώο ενώ παράλληλα επιτρέπει ταχεία επούλωση. Το αίμα παρέμενε σε θερμοκρασία δωματίου (rt) για 30' και στην συνέχεια για 30' στους 4$^{o}$ C. Ο ορός συλλέγονταν μετά από φυγοκέντρηση για 3' στις 3000 rpm και φυλασσόταν στους -20 $^{o}$C.

### 3.4.4 Απομόνωση οργάνων

Με το πέρας του in vivo πρωτοκόλλου για τη διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος πειραματικών ποντικιών με εγκεφαλικό εκχύλισμα, αφαιρούταν για περαιτέρω μελέτη ο σπλήνας, ο εγκέφαλος και τμήμα του λεπτού εντέρου, στείρες συνθήκες με την χρήση αποστειρωμένων εργαλείων.

### 3.4.5 Χαρακτηρισμός

Τα δείγματα ορού που συλλέχθηκαν υποβλήθηκαν σε μελέτη για την ανίχνευση ειδικών και μη-ειδικών αντισωμάτων. Ο έλεγχος και η ποσοτικοποίηση των αντισωμάτων αυτών εκτιμήθηκαν με τη μέθοδο ELISA. Τα όργανα τα οποία συλλέχθηκαν με το πέρας του in vivo πρωτοκόλλου, χρησιμοποιήθηκαν για ανάλυση ιστού με κρυοτομές (εγκέφαλος και έντερο), ενώ κύτταρα απομονώθηκαν από τους σπλήνες και τμήμα του εντέρου (myenteric plexus) και υποβλήθηκαν σε εξωτερικό ανοσοφθορισμό με την τεχνική της κυτταρομετρίας ροής (FACSs).

## 3.5 Τεχνικές

### 3.5.1 Παρασκευή εγκεφαλικού εκχυλίσματος

Το εγκεφαλικό εκχύλισμα χρησιμοποιήθηκε ως πηγή της πρωτεΐνης PLP, το οποίο και στη συνέχεια χορηγήθηκε σε διάφορες συγκεντρώσεις σε καλλιέργεια σπλενικών κυττάρων, προκειμένου να μελετηθεί η όποια επίδραση του στα κύτταρα αυτά. Ο προσδιορισμός της συνολικής πρωτεΐνης που συλλέχθηκε από τον ιστό, προσδιορίστηκε με την μέθοδο Lowry. Η συνολική πρωτεΐνη που συλλέχθηκε ήταν 4mg/ml.

- **Εγκέφαλος ποντικού**
- **Υγρό άζωτο**
- **Γουδί και γουδοχέρι**
- **Ζυγαριά ακριβείας**
- **Αποστειρωμένο PBS 1X**

*Πειραματική διαδικασία*

1. Θυσιάζουμε το ζώο με αυχενική εξάρθρωση, χωρίς αναισθησία

2. Απομόνωση εγκεφάλου με τη βοήθεια κατάλληλων εργαλείων

3. Μεταφορά σε αποστειρωμένο πλαστικό τρυβλίο

4. Ζυγίζω το βάρος και αφαιρώ το απόβαρο του τρυβλίου

5. Άμεσο πάγωμα του ιστού με υγρό άζωτο, μεταφορά προς αποθήκευση στους -80oC

6. Αποστειρωμένο PBS σε όγκο εξαπλάσιο του βάρους του ιστού (για κάθε γραμμάριο ιστού αντιστοιχούν 6V PBS 1X)

7. Αποστείρωση του γουδιού και μεταφορά του σε πάγο έχοντας κοντά και υγρό άζωτο

8. Μεταφορά του ιστού στο γουδί και λιοτρίβηση του ιστού βουτώντας διαρκώς το γουδοχέρι στο υγρό άζωτο ώστε να διατηρηθεί η χαμηλή θερμοκρασία και να αποφευχθεί η απόψυξη του ιστού

9. Προσεκτική μεταφορά σε tube και προσθήκη ανάλογου όγκου PBS πριν ή μετα τον ιστό

10. Πραγματοποίηση πάγωμα-ξεπάγωμα σε υγρό άζωτο, επανάληψη 2-3 φορές και up-down με πιπέττα

11. Φυγοκέντρηση σε 12.000rpm για 10min ή και περισσότερο

12. Συλλογή υπερκειμένου και aliquots των 100μl

### 3.5.2 Απομόνωση πρωτογενών κυττάρων του μυεντερικού πλέγματος πειραματικού ποντικού Balb/c

Τα κύτταρα του μυεντερικού πλέγματος χρησιμοποιήθηκαν για τη ανίχνευση πληθυσμών CD11 σε ποντίκια που ανοσοποιήθηκαν με γαλάκτωμα (500μg) εγκεφαλικού εκχυλίσματος και πλήρες ανοσοενισχυτικό του Freud (CFA), πειραματικών ποντικιών Balb/c. Μετά το πέρας 8 εβδομάδων. Απομονώθηκαν ο εγκέφαλος, ο σπλήνας και τμήμα του εντέρου αυτών των ποντικιών. Το συγκεκριμένο τμήμα ιστού χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση φλεγμονής.

- Μυεντερικό πλέγμα
- Κολλαγενάση 1.3 mg/ml
- PBS 1X

*Πειραματική διαδικασία*

1. Θυσιάζουμε το ζώο με αυχενική εξάρθρωση, χωρίς αναισθησία
2. Απομόνωση τμήματος λεπτού εντέρου με τη βοήθεια κατάλληλων εργαλείων
3. Απομόνωση μυεντερικού πλέγματος
4. Μεταφορά σε αποστειρωμένο πλαστικό τρυβλίο
5. Προσθήκη διαλύματος κολλαγενάσης 1.3 mg/ml σε PBS (1X)
6. Επώαση σε κινούμενη επιφάνεια για 1 ώρα, 37$^{o}$C
7. Φυγοκέντρηση 1200rpm , 6 min
8. Πλύσεις με PBS 1X, για απομάκρυνση κολλαγενάσης

### 3.5.3 Ποσοτικοποίηση πρωτεΐνης με τη μέθοδο Lowry

Η ευαίσθητη αυτή μέθοδος χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών σε ένα δείγμα.

- TCA 20%
- A reagent: 2gr NaOH, 10gr $Na_2CO_3$, 0,1gr Na-K-tartarate (V=500ml)
- B reagent: 0,5gr $CuSO_4 \cdot 5H_2O$
- C reagent: 10ml reagent A, 0,2ml reagent B
- D reagent: 1,5ml Follin-Ciocalteau 2N + 1,5ml $H_2O$

*Πειραματική Διαδικασία*

1. Σε 10μl δείγματος προσθέτουμε 10μl TCA 20%. (2 επαναλήψεις/δείγμα)

2. Επωάζουμε για 30' στους 4 $^{o}$C.

3. Φυγοκεντρούμε στις 12.000 rpm, στους 4 $^{o}$C για 10'

4. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 100μl A και 1ml C reagent

5. Επωάζουμε για 10' στον πάγο

6. Προσθέτουμε 100μl D reagent στα δείγματα

7. Επωάζουμε σε rt για 30'

8. Φωτομετρούμε στα 625nm

9. Η συγκέντρωση του δείγματος υπολογίζεται με τον τύπο: ODx8= mg/ml

Το "τυφλό" δείγμα ξεκινά από το βήμα 4.

### 3.5.4 Έλεγχος πολλαπλασιασμού κυττάρων με ραδιενεργή θυμιδίνη ($^{3}$HTdR)

Η μέθοδος αυτή μας επιτρέπει να ελέγχουμε τον πολλαπλασιασμό σε έναν κυτταρικό πληθυσμό μετρώντας την ραδιενεργή θυμιδίνη που θα προσλάβουν τα κύτταρα κατά την διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης τους.

- Θρεπτικό μέσο RPMI (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA), με προσθήκη 10% πρωτεϊνικό ορό (FBS, Gibco)
- 96-V bottom plate sterile (Sarstedt, Numbrecht, Germany)
- Ραδιενεργή θυμιδίνη (3 H) TdR (INC, 35Ci/mmol, 1mCi/ml, Costa Mesa, CA)
- Φίλτρα κυτταρίνης (Scatron filter MAT)
- Σπινθηριστικό υγρό (toluene-omnifluor; 1.38 g/l, NEN, Chromasol Sigma-Aldrich, Germany)
- Συλλέκτη κυττάρων Tiretrek Cell Harvester, Flow Laboratories
- Μετρητής β-ακτινοβολίας LKB (Finland).

*Πειραματική διαδικασία*

1. Ετοιμάζουμε και τοποθετούμε στην plate σε τριπλέτες τα δείγματα. Τελικός όγκος 200μl/well και 1x 106 κύτταρα/well σε θρεπτικό μέσο. Επωάζουμε σε επωαστήρα για 72h στους 37ο C.

2. Με το πέρας των 72h προσθέτουμε 1μCi ραδιενεργής θυμιδίνης σε κάθε δείγμα και τοποθετούμε στον επωαστήρα για άλλες 18 ώρες.

3. Μεταφέρουμε τα κύτταρα στα φίλτρα με την χρήση του συλλέκτη κυττάρων και τα τοποθετούμε σε δοχεία που περιέχουν 2ml σπινθηριστικό υγρό και μετράμε σε μετρητή β-ακτινοβολίας.

### 3.5.5 Κυτταρομετρία ροής (FACs)

Η κυτταρομετρία ροής είναι μια τεχνική αυτοματοποιημένης κυτταρικής ανάλυσης που επιτρέπει τη μέτρηση μεμονωμένων σωματιδίων (κυττάρων, πυρήνων, χρωμοσωμάτων κ.τ.λ.) καθώς διέρχονται σε νηματική ροή από ένα σταθερό σημείο όπου προσπίπτει μια ακτίνα laser. Στα πειράματα που αφορούν την συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήσαμε την κυτταρομετρία ροής για τη μελέτη κυτταρικών πληθυσμών.

Για κάθε ένα κύτταρο καθώς αυτό διέρχεται από την ακτίνα laser καταγράφονται στοιχεία που σχετίζονται με το μέγεθός του (Forward Scatter Channel, FSC), την κοκκιότητα του (Side Scatter Channel, SSC) και την ένταση του φθορισμού (FL1 για Green Channel και FL2 για Red Channel) εφόσον έχει σημανθεί με χρωστικές ή φθορίζοντα αντισώματα. Πιο συγκεκριμένα στον άξονα FSC καταγράφεται η ένταση του φωτός που σκεδάζεται υπό γωνία περίπου 20ο σε σχέση με τον άξονα της ακτίνας laser. Η ένταση στον άξονα FSC ισοδυναμεί με το μέγεθος του σωματιδίου που διέρχεται εκείνη τη στιγμή από την
ακτίνα laser και μας βοηθά να διαχωρίσουμε τα ζωντανά από τα νεκρά κύτταρα και τα κυτταρικά υπολείμματα ή τους διαφορετικούς υποπληθυσμούς μέσα σε ένα σύνθετο μείγμα κυττάρων. Στον άξονα SSC καταγράφεται η ένταση του φωτός που σκεδάζεται υπό γωνία 90ο σε σχέση με τον άξονα της ακτίνας laser και έτσι μας δίνει πληροφορίες για την κοκκιότητα του σωματιδίου. Ο συνδυασμός της πληροφορίας από αυτούς τους δύο ξεχωριστούς άξονες είναι μοναδικός για κάθε κύτταρο και έτσι συμβάλει ουσιαστικά στη μελέτη ετερογενών κυτταρικών πληθυσμών.

Από την άλλη οι μετρήσεις της έντασης του φθορισμού σε διαφορετικά μήκη κύματος στα αντίστοιχα κανάλια (FL-channels) μπορούν να αποδώσουν ποιοτικά και ποσοτικά δεδομένα, που αφορούν τη σήμανση επιφανειακών αντιγόνων ή ενδοκυτταρικών παραγόντων με φθορίζοντα αντισώματα και χρωστικές. Στα πειράματά μας χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά φθορίζοντα αντισώματα συνδεδεμένα είτε με FITC είτε με PE. Τα συνδεδεμένα με FITC αντισώματα απορροφούν στα 490nm και εκπέμπουν στα 525nm και συνεπώς η ένταση τους καταγράφεται στο κανάλι FL1. Τα συνδεδεμένα με PE αντισώματα απορροφούν στα 490 και 565nm και εκπέμπουν στα 578nm και συνεπώς η ένταση τους καταγράφεται στο κανάλι FL2.

Στα πειράματα μας οι μετρήσεις έγιναν με το FACScan της εταιρίας Becton Dickinson και η στατιστική ανάλυση με το Cell Quest software και τα software WinMDI 2.9 και FCS express 3.0.

- Blocking buffer: PBS-BSA (Bovine Serum Albumin) 2%
- Ab buffer: PBS-BSA 0.1%
- PBS 1X
- Ξύστρα κυτταροκαλλιεργειών(cell scraper)

*Πειραματική διαδικασία*

1. Μετά το πέρας της καλλιέργειας τα κύτταρα αποκολλήθηκαν και συλλέχθηκαν

2. Φυγοκέντρηση 1200rpm για 6 min, RT

3. Συλλογή υπερκειμένου και αποθήκευση (για ELISA)

4. Διάλυση πελέττας σε 1ml PBS και μεταφορά σε μικρό tube

5. Φυγοκέντρηση 1200rpm για 6 min, RT

6. Πλύση με PBS 1X

7. Φυγοκέντρηση 1200rpm για 6 min, RT

8. Επώαση σε blocking buffer για 30 min (ανακίνηση πελέττας κάθε 10 min)

9. Φυγοκέντρηση 1200rpm για 6 min, RT

10. Πλύση με PBS 1X

11. Φυγοκέντρηση 1200rpm για 6 min, RT

12. Πλύση με PBS 1X και διαχωρισμός κυττάρων σε unstained (ψυγείο) και μεταφορά των υπόλοιπων σε Vee-bottom plate ανάλογα με τους δείκτες που θα δοκιμαστούν

13. Φυγοκέντρηση plate σε 1200rpm για 6min, RT

14. Επωάζω με αντισώματα (1:300) σε Ab solution 100λ/well, για 45 min, RT, χρήση αλουμινόχαρτου για αποφυγή photobleaching

15. Φυγοκέντρηση 1200rpm για 6 min, RT

16. Πλύση με PBS 1X

17. Φυγοκέντρηση 1200rpm για 6 min, RT

18. Πλύση με PBS 1X

19. Μεταφορά κυττάρων σε FACS tubes (5ml) και προσθήκη 1 ml PBS σε όλα τα δείγματα, χρήση αλουμινόχαρτου για αποφυγή photobleaching

20. Μέτρηση στο FACS

### 3.5.6 Ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσροφητική δοκιμή (ELISA)

Η ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσροφητική δοκιμή (ELISA) είναι μία πολύ ευαίσθητη βιοχημική μέθοδος ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών σε διαλύματα και κυτταρικές επιφάνειες μέσω αντισωμάτων. Η οπτικοποίηση της αντίδρασης γίνεται με την χρήση ενζύμου-υποστρώματος και μπορεί να μετρηθεί με φωτόμετρο. Υπάρχουν 3 είδη ELISA. Εδώ αναφέρεται η indirect ELISA.

- Coating buffer: 0.05M NaHCO3, 0.05 Na2CO3 pH 9.6
- Washing buffer: PBS -tween 20%, 0.05%
- Blocking buffer: PBS-BSA (Bovine Serum Albumin) 2%
- Ab buffer: PBS-BSA 0.1%
- Tetramethylbenzidine-$H_2O_2$ (TMB Substrate Kit, Thermo Scientific, Waltham, MA)
- $H_2SO_4$, 1M
- 96-flat bottom plate

*Πειραματική διαδικασία*

1. Τοποθετούμε τα δείγματα στην plate σε αντίστοιχη αραίωση (π.χ ορός σε 1/1000) σε coating buffer και όσες επαναλήψεις επιθυμούμε (τουλάχιστον 2). Τελικός όγκος 100μl/well. Επωάζουμε στους 4$^{o}$ C για 14-18h.

2. Πλένουμε 3x με το washing buffer. 200μl/well.

3. Προσθέτουμε το blocking buffer, 200μl/well για να παρεμποδίσουμε την μη-ειδική σύνδεση των πρωτεϊνών στα αντισώματα. Επωάζουμε σε rt για 2h.

4. Αφαιρούμε και πλένουμε 3x με το washing buffer. 200μl/well.

5. Προσθέτουμε το 1ο αντίσωμα (το οποίο είναι ειδικό για την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει) σε κατάλληλη C (συνήθως 1/1000) σε Ab buffer. Τελικός όγκος 100μl/well. Επωάζουμε σε rt για 2h.

6. Αφαιρούμε και πλένουμε 3x με το washing buffer. 200μl/well.

7. Προσθέτουμε το 2$^{o}$ αντίσωμα (a-IgG peroxidase) σε κατάλληλη C (συνήθως 1/5000) σε Ab buffer. Τελικός όγκος 100μl/well. Επωάζουμε σε rt για 1h στο σκοτάδι.

8. Αφαιρούμε και πλένουμε 3x με το washing buffer. 200μl/well.

9. Προσθέτουμε το διάλυμα TMB σε αραίωση 1:1. Τελικός όγκος 100μl/well. Περιμένουμε μέχρις ότου εμφανιστεί το χαρακτηριστικό μπλε χρώμα της αντίδρασης.

10. Ολοκληρώνουμε την αντίδραση με $H_2SO_4$. Τελικός όγκος 50μl/well.

11. Μετράμε σε ELISA reader στα 450nm.

### 3.5.7 Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών

Η ανοσοκατακρήμνιση είναι μία απλή, γρήγορη και ευαίσθητη μέθοδος που χρησιμοποιείται για απομόνωση πρωτεϊνών από ορούς, υπερκείμενα ή εκχυλίσματα και βασίζεται στην ειδικότητα των αντισωμάτων που ακινητοποιούνται πάνω στα σφαιρίδια για τις πρωτεΐνες που μας ενδιαφέρουν.

#### 3.5.7.1 Ακινητοποίηση αντισώματος σε σφαιρίδια

- Υπερπαραμαγνητικά σφαιρίδια (Dynal Biotech)-διαμέτρου M-280, a-IgG
- Αποστειρωμένο PBS (pH 7,4)
- Triethanolamine 0,2M σε $dH_2O$ , pH 8,2
- Διάλυμα dimethyl pimelimidate dihydrochloride (DMP, Pierce, Rockford, IL, USA /Triethanolamine (0,2M) 20Mm, pH 8.2
- Tris buffer 50mM σε $dH_2O$ , pH 7,5

*Πειραματική διαδικασία* (Δουλεύουμε σε στείρες συνθήκες)

1. Ξεπλένουμε $10^8$ beads 2x με αποστειρωμένο PBS 2ml χρησιμοποιώντας μαγνήτη. Χρησιμοποιούμε tube 5ml.

2. Προσθέτουμε το επιθυμητό αντίσωμα (ειδικό για την πρωτεΐνη που θέλουμε να απομονώσουμε) σε ποσότητα 5μg. Συμπληρώνουμε με $dH_2O$ για τελικό όγκο 1ml. Επωάζουμε για 1h στους 4 $^oC$ με ήπια ανάδευση.

3. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και πλένουμε 2x με αποστειρωμένο PBS.

4. Προσθέτουμε 1ml triethanolamine και επαναλαμβάνουμε 2 φορές ακόμα. Η triethanolamine δημιουργεί τους ομοιοπολικούς δεσμούς μεταξύ των 2 αντισωμάτων.

5. Επαναδιαλυτοποιούμε σε διάλυμα DMP/triethanolamine 1ml και επωάζουμε για 30' σε rt με ήπια ανάδευση.

6. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και σταματάμε την αντίδραση με διάλυμα Tris 1ml. Επωάζουμε για 15' σε rt και ήπια ανάδευση.

7. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και πλένουμε 2x με διάλυμα PBS-BSA 0,1%.

8. Διατηρούμε στους $4^o$ C σε PBS 1ml.

### 3.5.7.2 Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών

- Μαγνητικά σφαιρίδια συνδεμένα με ειδικό για την πρωτεΐνη αντίσωμα.
- Washing buffer: PBS-Tween 20, 0.05%
- NaCl 1M

1. Πλένουμε 2x τα σφαιρίδια με 2ml washing buffer για 10' με ήπια ανάδευση, χρησιμοποιώντας μαγνήτη. Ξεπλένουμε 2x με 2 ml PBS.

2. Προσθέτουμε 1ml πρωτεϊνικού εκχυλίσματος ή ορού στα σφαιρίδια. Τον αραιώνουμε αν χρειάζεται. Επωάζουμε για 1,5h στους 4ο C με ήπια ανάδευση.

3. Πλένουμε 2x τα σφαιρίδια με 2 ml washing buffer, χρησιμοποιώντας μαγνήτη, για να απομακρυνθούν τα μη ειδικά προσδεμένα μόρια.

4. Πλένουμε 2x τα σφαιρίδια με 2ml PBS, χρησιμοποιώντας μαγνήτη.

5. Για την έκλουση της πρωτεΐνης μας προσθέτουμε NaCl 1M στον επιθυμητό όγκο και επωάζουμε για 30' σε rt με ήπια ανάδευση.

6. Διατηρούμε την πρωτεΐνη στους 4ο C ή σε aliquots των 500λ στους -$20^o$ C.

7. Ξεπλένουμε 2x με 2ml washing buffer τα σφαιρίδια και 2x με PBS.

8. Διατηρούμε τα σφαιρίδια στους $4^o$ C σε PBS 1ml.

### 3.5.8 Dialysis

Με αυτή την μέθοδο μας δίνεται η δυνατότητα να αλλάξουμε ένα διάλυμα στο οποίο έχουμε διαλυτοποιήσει μία πρωτεΐνη ή/και να συμπυκνώσουμε μεγάλες ποσότητες πρωτεϊνών.

1. Φορτώνουμε το δείγμα σε ημιπερατή μεμβράνη (molecularporous membrane tubing, diameter 25,5mm, Spectra/Por) και επωάζουμε σε διάλυμα PBS, pH 7,4 για 24h στους 4 $^{o}$C χρησιμοποιώντας για ανάδευση μαγνήτη.

2. Συμπυκνώνουμε το κλάσμα χρησιμοποιώντας φίλτρα Amicon Ultra-15 (10.000 Nominal Molecular Weight Limit). Φυγοκεντρούμε στους 4 $^{o}$C, στις 3000rpm έως ότου να φτάσει στον επιθυμητό όγκο.

### 3.5.9 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακριλαμίδης (SDS-PAGE)

Η διαδικασία αυτή μας βοηθά στο διαχωρισμό πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος τους. Οι πρωτεΐνες του δείγματος που υπόκεινται σε ηλεκτροφόρηση, κινούνται ανάμεσα στους πόρους του πηκτώματος ανάλογα με το μέγεθος τους. Η ταυτοποίηση του μοριακού βάρους γίνεται με οδηγό (marker) πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους μετά την εμφάνιση τους χρησιμοποιώντας μία μέθοδο χρώσης. Όλες οι ηλεκτροφορήσεις έγιναν σε αποδιατακτικές συνθήκες, για να μην διατηρούνται δευτεροταγείς και τριτοταγείς δομές των πρωτεϊνών και σε μη συνεχή πηκτή πολυακρυλαμίδης που αποτελείται από ένα στρώμα πυκνότητας 4% σε ακρυλαμίδη και pH 6,8 (Stacking gel), το οποίο βοηθά στο πακετάρισμα των δειγμάτων, πάνω από ένα μεγαλύτερο στρώμα πυκνότητας 12% σε ακρυλαμίδη και pH 6,8 (Running gel) μέσα στο οποίο διαχωρίζονται οι πρωτεΐνες. Η διαδικασία έχει ως εξής:

<u>Για τα δείγματα:</u>

5X loading buffer: 0,0625M Tris, 5% β-mercaptethanol, 2% SDS, 20% Glycerol, 0,1% Bromophenol blue

<u>Για την ηλεκτροφόρηση:</u>

10X Running buffer (1Lt): 30.3 g Tris (pH =8.3), 144.2 g Glycine, 10 g SDS

**Χρειαζόμαστε 1lt, 1x**

| **Αντιδραστήρια** | **Running gel (15ml)** | **Stacking gel** |
|---|---|---|
| $dH_2O$ | 4.95ml | 5,1ml |
| Ακρυλαμίδη 30% | 6ml | 1.275ml |
| Running / Stacking buffer | 3.75ml | 0.937ml |
| APS | 150μl | 75 μl |
| Temed | 6 μl | 8.5 μl |

**Ακρυλαμίδη 30% (100ml):** 29.2 g Acrylamide, 0.8 g Bis-acrylamide
**Running buffer (100ml):** 18.161 g Tris 1.5M (pH =8.8), 0.4 g SDS 0.4% w/v
**Stacking buffer (100ml):** 6.05 g Tris 0.5M (pH =6.8), 0.4 g SDS 0.4% w/v
**APS (10ml):** 1 g APS, προσθέτω $dH_2O$ μέχρι 10ml

1. Τοποθετούμε στην συσκευή το gel ανάλυσης (running gel) και καλύπτουμε με ισοπροπανόλη για να προκύψει ενιαίο το gel. Στην συνέχεια προσθέτουμε το gel πακεταρίσματος (staking gel) και βάζουμε το ειδικό χτενάκι για να δημιουργηθούν οι θέσεις για τα δείγματα
2. Ετοιμάζουμε τα δείγματα στον επιθυμητό όγκο και προσθέτουμε αντίστοιχη ποσότητα 5X loading buffer (ώστε να αποτελεί το 1/5 του συνολικού όγκου). Τα βράζουμε στους $95^o$ C για 10' ώστε να αποδιαταχθούν οι πρωτεΐνες.
3. Τοποθετούμε τα δείγματα στις θέσεις μαζί με κατάλληλο οδηγό (marker) Biorad Kaleidoscope και πραγματοποιούμε την ηλεκτροφόρηση σε τάση 100-150 V. Σε κάθε θέση τοποθετήθηκε δείγμα όγκου 25μl.
4. Μετά το τέλος της διαδικασίας προχωρούμε σε χρώση του running gel.

### 3.5.10 Χρώση με νιτρικό άργυρο (Silver staining)

- Methanol 50%
- 5%, 1% CH3COOH
- Sodium Triosulfate ($Na_2S_2O_3$•$5H_2O$) 0,02%
- $AgNO_3$ 0,1%
- Διάλυμα εμφάνισης ($Na_2CO_3$ 2%, 0,04% φορμαλδεΰδη)

(όλα τα διαλύματα γίνονται σε V=50ml για gel δέκα θέσεων)

1. Μονιμοποιούμε τις πρωτεΐνες στο gel σε 50% methanol, 5% CH3COOH για τουλάχιστον 20' με ανάδευση.
2. Ξεπλένουμε με 50% methanol για 10' με ανάδευση.
3. Ενυδατώνουμε με $H_2O$ 2x για 10' με ανάδευση.
4. Ευαισθητοποιούμε το gel σε Sodium Triosulfate για 1' με ανάδευση.
5. Ξεπλένουμε με $H_2O$ 2x για 1' με ανάδευση.
6. Βάφουμε με $AgNO_3$ (pre-chilled) για 20' στους $4^o$ C με ανάδευση
7. Ξεπλένουμε με $H_2O$ 2x για 1' με ανάδευση
8. Εμφανίζουμε με το διάλυμα εμφάνισης, ανακινώντας και σταματάμε την διαδικασία με 5% CH3COOH.
9. Διατηρούμε σε 1% CH3COOH

### 3.5.11 Ποιοτική και ποσοτική αξιολόγηση αποτελεσμάτων κυτταρομετρίας ροής με FCS Express V3

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων κυτταρομετρίας ροής (FACs) με κύτταρα BV2, σπλενικά κύτταρα και κύτταρα του μυεντερικού πλέγματος για τη μελέτη επιμέρους υποπληθυσμών, αξιολογήθηκαν με το υπολογιστικό πρόγραμμα FCS Express V3.

# 4. Αποτελέσματα

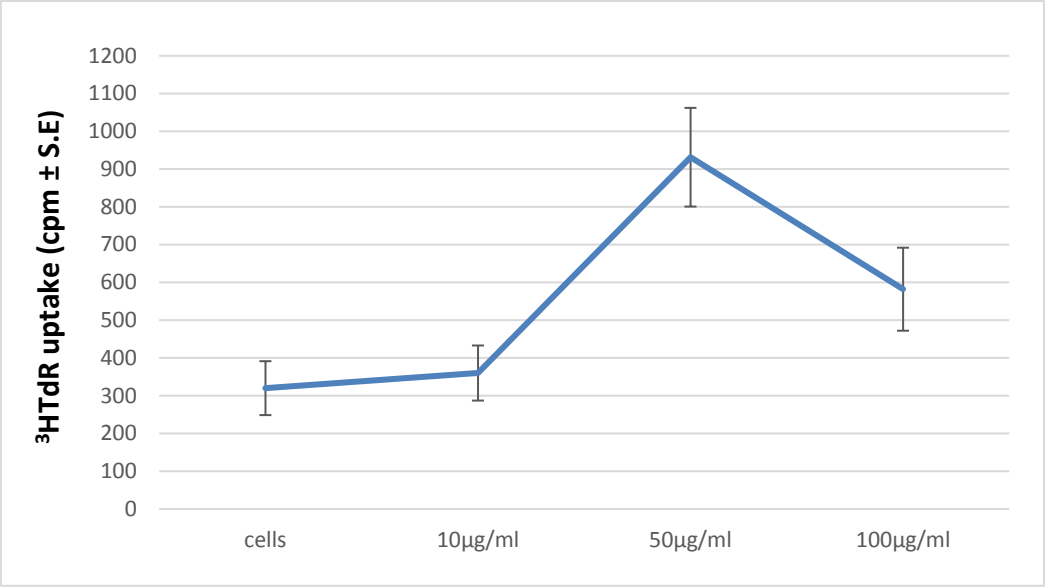
## 4.1 Η επίδραση της πρωτεΐνης πρωτεολιπιδικής μυελίνης (PLP) στο ανοσοποιητικό σύστημα, in vitro

### 4.1.1 Ταυτοποίηση της ανοχογόνου δόσης PLP σε καλλιέργεια κυττάρων σπλήνα πειραματικών ποντικιών Balb/c, με χρήση ραδιενεργής θυμιδίνης

Το εκχύλισμα εγκεφάλου το οποίο παράγχθηκε από φρέσκο ιστό πειραματικών ποντικών Balb/c, χρησιμοποιήθηκε ως πηγή της πρωτεΐνης πρωτεολιπιδικής μυελίνης (myelin proteolipid protein-PLP) ή αλλιώς PLP. Το εκχύλισμα αυτό, όπως περιγράφηκε και πιο πάνω (**Παράγραφος 3.2.3**), μελετήθηκε για τη χρήση του ως αυτοαντιγόνο σε πειράματα in vivo και in vitro ίδιου απλοτύπου πειραματικών ποντικιών.

Αρχικά, θελήσαμε να μελετήσουμε την επίδραση του εγκεφαλικού εκχυλίσματος ως αυτοαντιγόνο και να δούμε το πως συμπεριφέρεται σε καλλιέργειες κυττάρων σπλήνα για το σπάσιμο της ανοχής. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν πειράματα μέτρησης της κυτταρικής διαίρεσης σπλήνα, εκτεθειμένα σε διάφορες συγκεντρώσεις αυτοαντιγόνου, χρησιμοποιώντας ραδιοσημασμένη (τριτιωμένη) θυμιδίνη ($^3$HTdR). Κύτταρα σπλήνα, τα οποία προήλθαν από ποντίκι Balb/c, εκτέθηκαν σε διαφορετικές δόσεις αυτοαντιγόνου (εγκεφαλικό εκχύλισμα) και υποβλήθηκαν σε καλλιέργεια in vitro για 72 ώρες. Μετά το πέρας των 72 ωρών, σε κάθε δείγμα προστέθηκε 1μCi ραδιενεργής θυμιδίνης όπου και διατηρήθηκε για άλλες 18 ώρες in vitro. Οι διαφορετικές δόσεις αυτοαντιγόνου που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής: 10μg/ml, 50μg/ml και 100μg/ml. Στο **γράφημα 4.1.1**, παρατηρούμε πως έχουν διαμορφωθεί τα αποτελέσματα κυτταρικού πολλαπλασιασμού σπλήνας μετά από το πέρας της καλλιέργειας 4 ημερών. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται πολύ ήπια αύξηση των κρούσεων ραδιενεργών σωματιδίων θυμιδίνης στα κύτταρα που έχουν εκτεθεί σε αυτοαντιγόνο συγκέντρωσης 10μg/ml, σε σύγκριση με κύτταρα που δεν έχουν εκτεθεί σε αυτό. Στη συνέχεια, εξετάζοντας τα κύτταρα που έχουν εκτεθεί σε αυτοαντιγόνο συγκέντρωσης 50μg/ml, παρατηρούμε έντονη και απότομη αύξηση στις κρούσεις ραδιενεργών σωματιδίων, που σημειώνουν και τις υψηλότερες τιμές με διαφορά μεταξύ όλων των δειγμάτων πειραματισμού. Μέχρι στιγμής, διατηρείται ένα αναλογικό προφίλ των κρούσεων σε σχέση με τη συγκέντρωση του αυτοαντιγόνου, δηλαδή, όσο αυξάνουμε της συγκέντρωση του αυτοαντιγόνου, τόσο αυξάνεται και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων κάτι που σημαίνει πως μέχρι εδώ το αυτοαντιγόνο δρα ενεργοποιητικά. Προχωρώντας, παρατηρούμε πως η συγκέντρωση αυτοαντιγόνου 100μg/ml ανατρέπει το πρότυπο αναλογικής αύξησης που παρατηρήθηκε πιο πριν. Πιο συγκεκριμένα, αυξάνοντας το αυτοαντιγόνο στο διπλάσιο της προηγούμενης δόσης, προκαλείται δραματική μείωση στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, κάτι που σημαίνει πως σε αυτή τη συγκέντρωση το αυτοαντιγόνο παύει να δρα ενεργοποιητικά και η δράση του πια μετατρέπεται σε κατασταλτική. Τα πειράματα αυτά ήταν καθοριστικά για την συνέχεια άλλων πειραμάτων καθώς όχι μόνο ήταν σημαντικό να γνωρίζουμε πως συμπεριφέρεται το συγκεκριμένο αυτοαντιγόνο στις διάφορες συγκεντρώσεις, αλλά και να ταυτοποιήσουμε σε ποια δόση του σπάει η ανοχή και επέρχεται η

ενεργοποίηση των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών του σπλήνα, δηλαδή σε ποία δόση ενεργοποιείται το ανοσοποιητικό σύστημα και αναγνωρίζει ως αντιγόνο τον ίδιο τον εαυτό.



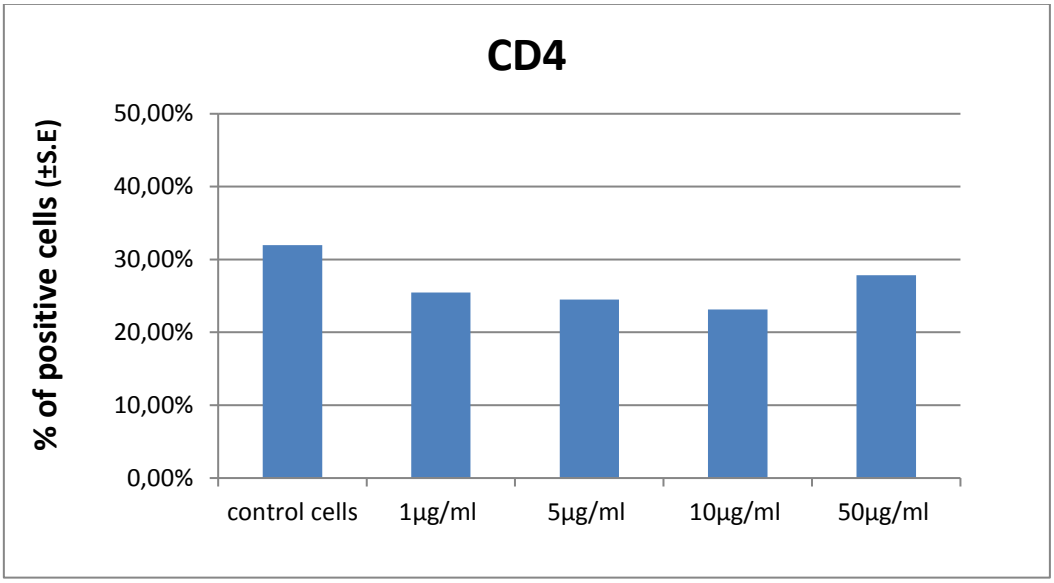

**Γράφημα 4.1.1:** Η επίδραση του αυτοαντιγόνου (εγκεφαλικό εκχύλισμα) σε πρωτόκολλο ενεργοποίησης κυττάρων σπλήνα, in vitro, για το σπάσιμο της ανοχής. Σπλενοκύτταρα επωάστηκαν παρουσία ή απουσία αυτοαντιγόνου. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων ελέγχθηκε με την μέθοδο ενσωμάτωσης ραδιενεργής θυμιδίνης ($^3$HTdR). Τα αποτελέσματα παρουσιάζουν τις κρούσεις των ραδιενεργών σωματιδίων (cpm) και η τυπική απόκλιση (S.D) υπολογίστηκε με βάση τα αποτελέσματα 3 πειραμάτων.

### 4.1.2 Επίδραση της ανοσογόνου δόσης PLP στους λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς σπλήνα πειραματικών ποντικιών Balb/c, με χρήση ανοσοφθορισμού κυτταρομετρίας ροής

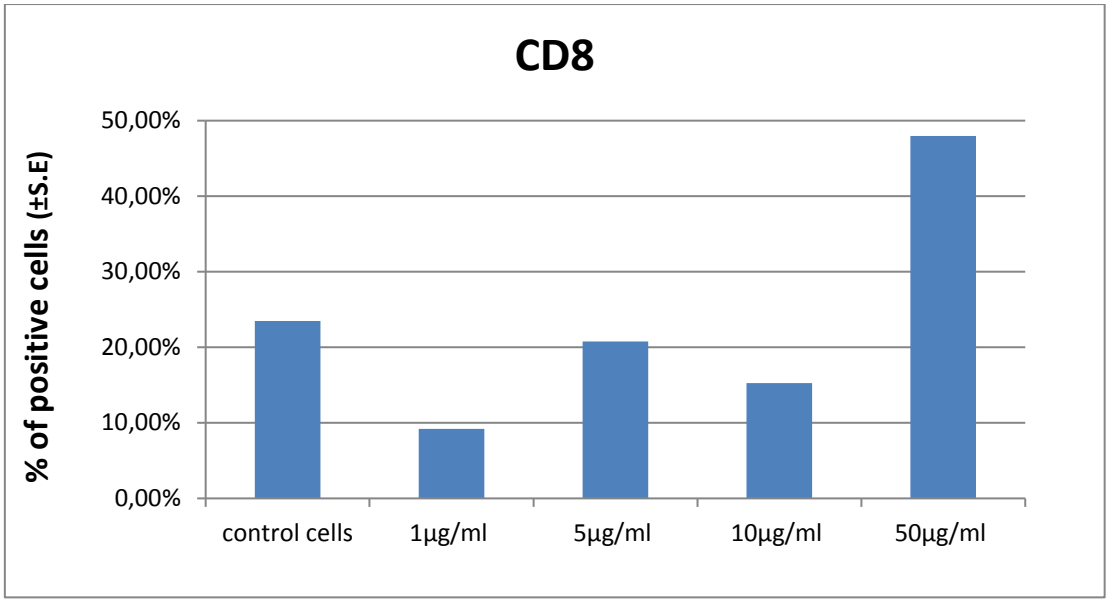
Ολοκληρώνοντας τα πειράματα μελέτης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σπλενικών κυττάρων παρουσία ή απουσία αυτοαντιγόνου με ραδιενεργή θυμιδίνη, θελήσαμε να εξετάσουμε περαιτέρω τη δράση του εγκεφαλικού εκχυλίσματος όταν αυτό προστίθεται σε καλλιέργειες σπλενικών κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, εξετάσαμε τους διάφορους λεμφοκυτταρικού πληθυσμούς που διεγείρονται και διαιρούνται κατά τη διάρκεια έκθεσής τους στο αυτοαντιγόνο, τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά. Για το λόγο αυτό, κύτταρα σπλήνας πειραματικών ποντικιών Balb/c καλλιεργήθηκαν in vitro, παρουσία ή απουσία αυτοαντιγόνου για 7 ημέρες. Το αυτοαντιγόνο χρησιμοποιήθηκε σε διάφορες συγκεντρώσεις, προκειμένου να περιγραφεί καλύτερα ο χαρακτήρας του και ο τρόπος δράσης του. Θέλοντας να εστιαστούμε στη πληροφορία των πρώτων πειραμάτων σχετικά με τη διεγερτική ικανότητα του αυτοαντιγόνου (**διάγραμμα 4.1.1**), περιορίσαμε το εύρος των συγκεντρώσεων μέχρι τα 50μg/ml, εμπλουτίζοντας το όμως με ενδιάμεσες δόσεις για καλύτερη μελέτη της δράσης του. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής: 1μg/ml, 5μg/ml, 10μg/ml και 50μg/ml. Μετά την ολοκλήρωση της καλλιέργειας, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και υποβλήθηκαν σε εξωτερικό ανοσοφθορισμό για τους CD4, CD8 και CD19 λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς. Το όριο μέτρησης

των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών σε κάθε δείγμα, ορίστηκε εξ αρχής στα $10^5$ κύτταρα. Ο φθορισμός των κυττάρων μετρήθηκε με κυτταρομετρία ροής και η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα FCS Express V3.

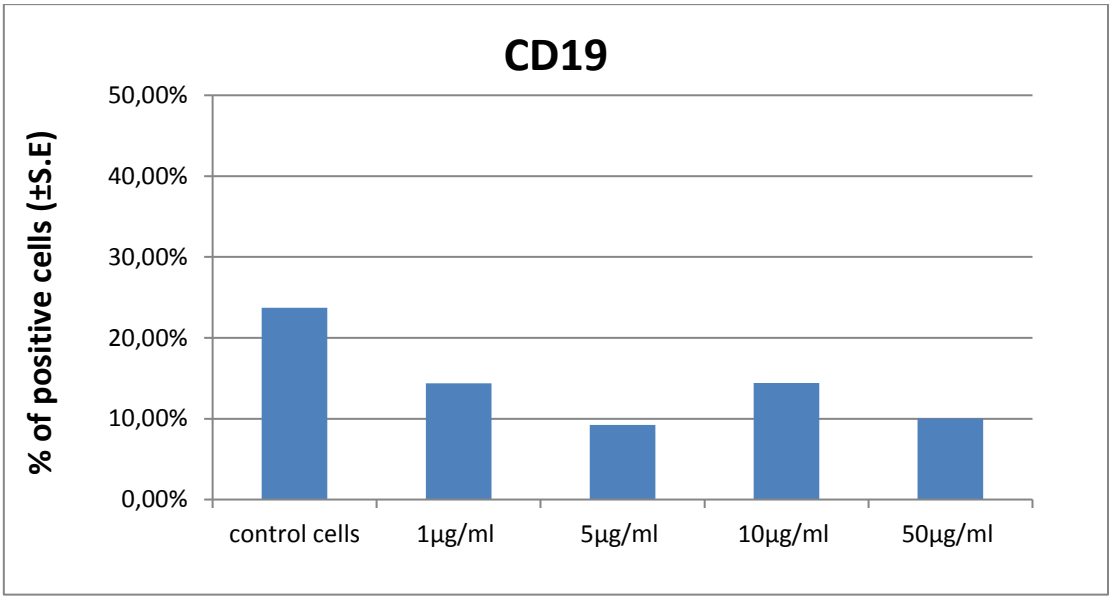
Στα **γραφήματα 4.1.2**, **4.1.3** και **4.1.4**, παρατηρούμε τα αποτελέσματα φθορισμού των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών CD4, CD8 και CD19 για κάθε δείγμα παρουσία ή απουσία αυτοαντιγόνου. Βλέπουμε πως κάθε λεμφοκυτταρικός πληθυσμός διαμορφώνει ένα πρότυπο φθορισμού που διαφέρει στις διαφορετικές συνθήκες. Ο CD4 πληθυσμός, στο **γράφημα 4.1.2,** παρουσιάζει ένα ήπιο προφίλ που κυμαίνεται από 23,15% μέχρι 31,97%. Ο CD8 πληθυσμός, στο **γράφημα 4.1.3,** παρουσιάζει έντονες διακυμάνσεις στις διάφορες συνθήκες από 9,19% μέχρι 47,97%, με τη μεγαλύτερη έκφραση (47,97%) CD8 πληθυσμού να εμφανίζεται σε κύτταρα που διεγέρθηκαν με τη μέγιστη συγκέντρωση αυτοαντιγόνου, 50μg.ml. Ο CD19 πληθυσμός, στο γράφημα 4.1.4, παρουσιάζει ήπιες διακυμάνσεις από 9,22% μέχρι 23,73%.




**Γράφημα 4.1.2:** Ο φθορισμός των CD4+ Τ-λεμφοκυττάρων σε in vitro καλλιέργεια κυττάρων σπλήνα, πειραματικών ποντικιών Balb/c παρουσία ή απουσία αυτοαντιγόνου. Το πρωτόκολλο καλλιέργειας διήρκησε 7 ημέρες, in vitro. Οι συγκεντρώσεις αυτοαντιγόνου που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: 1μg/ml, 5μg/ml, 10μg/ml και 50μg/ml. Ο φθορισμός των CD4+ Τ-λεμφοκυττάρων, ελέγχθηκε με την τεχνική του ανοσοφθορισμού με κυτταρομετρία ροής (FACs). Τα αποτελέσματα παρουσιάζουν το ποσοστό των CD4+ Τ-λεμφοκυττάρων σε κάθε δείγμα και η τυπική απόκλιση (S.E) υπολογίστηκε με βάση τα αποτελέσματα 3 πειραμάτων.



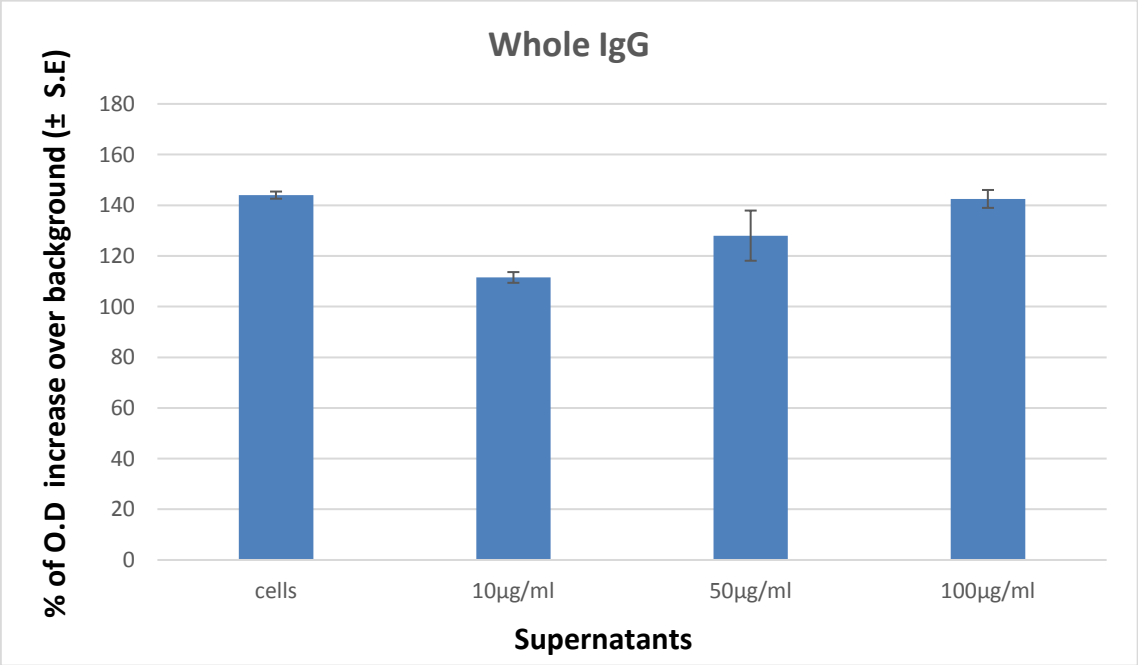

**Γράφημα 4.1.3:** Ο φθορισμός των CD8+ Τ-λεμφοκυττάρων σε in vitro καλλιέργεια κυττάρων σπλήνα, πειραματικών ποντικιών Balb/c παρουσία ή απουσία αυτοαντιγόνου. Το πρωτόκολλο καλλιέργειας διήρκησε 7 ημέρες, in vitro. Οι συγκεντρώσεις αυτοαντιγόνου που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: 1μg/ml, 5μg/ml, 10μg/ml και 50μg/ml. Ο φθορισμός των CD8+ Τ-λεμφοκυττάρων, ελέγχθηκε με την τεχνική του ανοσοφθορισμού με κυτταρομετρία ροής (FACs). Τα αποτελέσματα παρουσιάζουν το ποσοστό των CD8+ Τ-λεμφοκυττάρων σε κάθε δείγμα και η τυπική απόκλιση (S.E) υπολογίστηκε με βάση τα αποτελέσματα 3 πειραμάτων.



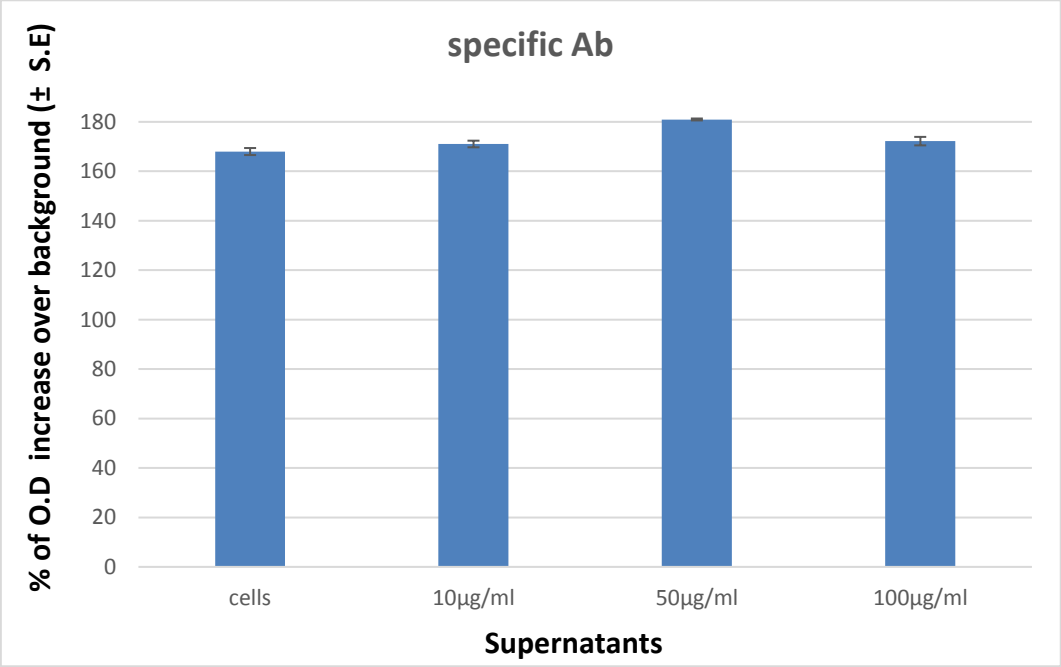

**Γράφημα 4.1.4:** Ο φθορισμός των CD19+ Β-λεμφοκυττάρων σε in vitro καλλιέργεια κυττάρων σπλήνα, πειραματικών ποντικιών Balb/c παρουσία ή απουσία αυτοαντιγόνου. Το πρωτόκολλο καλλιέργειας διήρκησε 7 ημέρες, in vitro. Οι συγκεντρώσεις αυτοαντιγόνου που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: 1μg/ml, 5μg/ml, 10μg/ml και 50μg/ml. Ο φθορισμός των CD19+ Β-λεμφοκυττάρων, ελέγχθηκε με την τεχνική του ανοσοφθορισμού με κυτταρομετρία ροής (FACs). Τα αποτελέσματα παρουσιάζουν το ποσοστό των CD19+ Β-λεμφοκυττάρων σε κάθε δείγμα και η τυπική απόκλιση (S.E) υπολογίστηκε με βάση τα αποτελέσματα 3 πειραμάτων.

### 4.1.3 Επίδραση της ανοσογόνου δόσης PLP στην παραγωγή μη-ειδικών και ειδικών αντισωμάτων στα υπερκείμενα καλλιεργειών σπλήνα πειραματικών ποντικιών Balb/c, με χρήση ανοσοδοκιμασίας ELISA

Γνωρίζοντας ήδη ότι το αυτοαντιγόνο (εγκεφαλικό εκχύλισμα) που χρησιμοποιούμε, ενεργοποιεί τα κύτταρα σπλήνας στα οποία εκτίθεται, σπάζοντας την ανοχή σε συγκεκριμένο εύρος της συγκέντρωσης του, θελήσαμε να μελετήσουμε εάν τα κύτταρα αυτά παράγουν αντισώματα προς αυτό το αντιγόνο (αυτοαντιγόνο). Για το λόγο αυτό, κύτταρα σπλήνας πειραματικών ποντικιών Balb/c καλλιεργήθηκαν in vitro, παρουσία ή απουσία αυτοαντιγόνου για 7 ημέρες. Το αυτοαντιγόνο χρησιμοποιήθηκε σε διάφορες συγκεντρώσεις, προκειμένου αποκτήσουμε μια πλήρη εικόνα για την παραγωγή αντισωμάτων, ειδικών και μη-ειδικών, σε κάθε συνθήκη. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής: 10μg/ml, 50μg/ml και 100μg/ml. Το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας παρέμεινε το ίδιο καθ'όλη τη διάρκεια της, χωρίς να ανανεωθεί ούτε το θρεπτικό υλικό ούτε και το αυτοαντιγόνο. Μετά την ολοκλήρωση της καλλιέργειας, το θρεπτικό υλικό συλλέχθηκε από κάθε πηγάδι καλλιέργειας και ελέγχθηκε για την ύπαρξη ειδικών και μη-ειδικών αντισωμάτων, με την τεχνική της ενζυμοσύνδετης ανοσοπροσροφητικής μεθόδου ELISA. Από τα **γραφήματα 4.1.5** και **4.1.6**, παρατηρούμε πως υψηλότερες τιμές παραγωγής αντισωμάτων, σημειώνεται στη περίπτωση του ειδικού αντισώματος (**γράφημα 4.1.6**), με εύρος από 168 έως 180,95 μονάδες επί τοις εκατό (%), στην αύξηση απορρόφησης σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (coating buffer). Ταυτόχρονα, βλέπουμε πως η υψηλότερη τιμή παραγωγής ειδικού αντισώματος, παρουσιάζεται στη περίπτωση της συγκέντρωσης 50μg/ml αυτοαντιγόνου, η οποία όπως έχει περιγραφεί και πιο πάνω (**παράγραφος 4.1.1**), ταυτοποιείται ως η δόση αυτοαντιγόνου που καταφέρνει να σπάσει την ανοχή του ανοσοποιητικού συστήματος.



**Γράφημα 4.1.5:** Ανίχνευση μη-ειδικών αντισωμάτων σε υπερκείμενα καλλιέργειας κυττάρων σπλήνας, πειραματικών ποντικών Balb/c, παρουσία ή απουσία αυτοαντιγόνου. Το πρωτόκολλο καλλιέργειας διήρκησε 7 ημέρες, in vitro. Οι συγκεντρώσεις αυτοαντιγόνου που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: 10μg/ml, 50μg/ml και 100μg/ml. Η ποσοτικοποίηση μη-ειδικών αντισωμάτων, πραγματοποιήθηκε με την ανοσοδοκιμασία ELISA. Ο άξονας y παρουσιάζει την % αύξηση της απορρόφησης σε σχέση με το διαλύτη των δειγμάτων (coating buffer) που λειτουργεί ως δείγμα ελέγχου. Η τυπική απόκλιση (S.E) προκύπτει από τα αποτελέσματα 3 πειραμάτων.

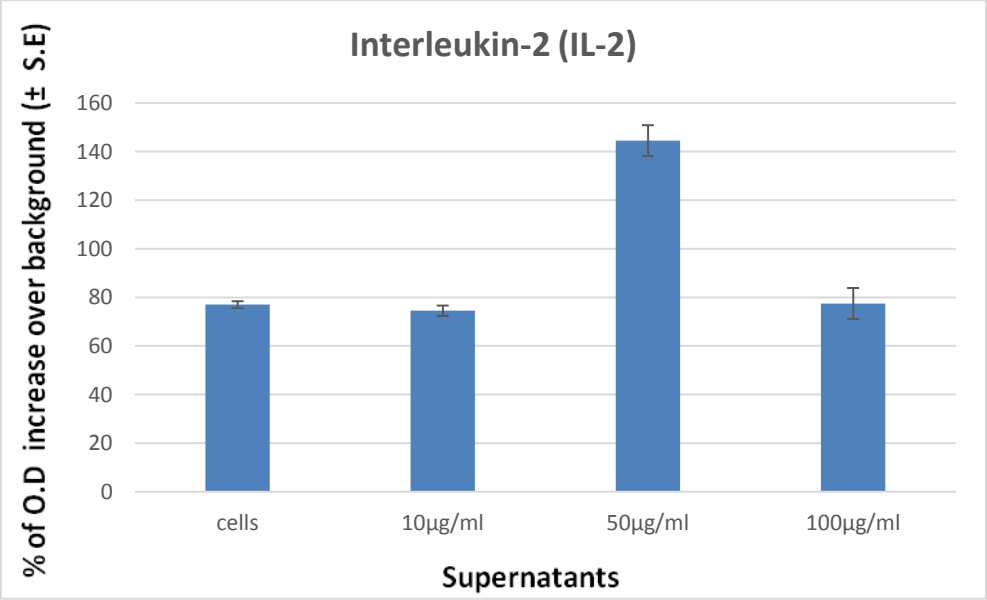



**Γράφημα 4.1.6:** Ανίχνευση ειδικού αντισώματος σε υπερκείμενα καλλιέργειας κυττάρων σπλήνας, πειραματικών ποντικών Balb/c, παρουσία ή απουσία αυτοαντιγόνου. Το πρωτόκολλο καλλιέργειας διήρκησε 7 ημέρες, in vitro. Οι συγκεντρώσεις αυτοαντιγόνου που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: 10μg/ml, 50μg/ml και 100μg/ml. Η ποσοτικοποίηση ειδικού αντισώματος, πραγματοποιήθηκε με την ανοσοδοκιμασία ELISA. Ο άξονας y παρουσιάζει την % αύξηση της απορρόφησης σε σχέση με το διαλύτη των δειγμάτων (coating buffer) που λειτουργεί ως δείγμα ελέγχου. Η τυπική απόκλιση (S.E) προκύπτει από τα αποτελέσματα 3 πειραμάτων.

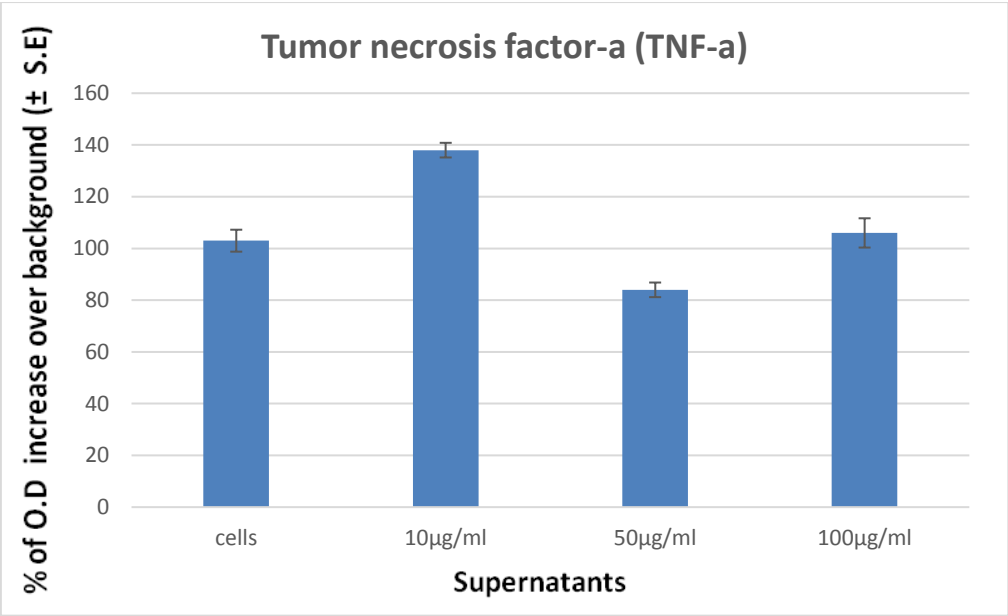
### 4.1.4 Επίδραση της ανοσογόνου δόσης PLP στην παραγωγή κυτοκινών, στα υπερκείμενα καλλιεργειών σπλήνα πειραματικών ποντικιών Balb/c, με χρήση ανοσοδοκιμασίας ELISA

Γνωρίζοντας ήδη ότι το αυτοαντιγόνο (εγκεφαλικό εκχύλισμα) που χρησιμοποιούμε, όχι μόνο ενεργοποιεί τα κύτταρα σπλήνας στα οποία εκτίθεται, σπάζοντας την ανοχή σε συγκεκριμένο εύρος της συγκέντρωσης του, αλλά επίσης διεγείρει με τέτοιο τρόπο τα κύτταρα ώστε να παράγονται και αντισώματα (μη-ειδικά και ειδικό) σε υπερκείμενα καλλιεργειών σπλήνας, θελήσαμε να μελετήσουμε εάν τα κύτταρα αυτά παράγουν και διάφορες κυτοκίνες (IL-2 και TNF-α) όταν ερεθίζονται με το συγκεκριμένο αντιγόνο (αυτοαντιγόνο). Για το λόγο αυτό, κύτταρα σπλήνας πειραματικών ποντικιών Balb/c καλλιεργήθηκαν in vitro, παρουσία ή απουσία αυτοαντιγόνου για 7

ημέρες. Το αυτοαντιγόνο, χρησιμοποιήθηκε σε διάφορες συγκεντρώσεις, προκειμένου αποκτήσουμε μια πλήρη εικόνα για την παραγωγή ιντερλευκίνης-2 (IL-2) και νεκρωτικού παράγοντα όγκων-α (TNF-α), σε κάθε συνθήκη. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής: 10μg/ml, 50μg/ml και 100μg/ml. Το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας παρέμεινε το ίδιο καθ' όλη τη διάρκεια της, χωρίς να ανανεωθεί ούτε αυτό ούτε και το αυτοαντιγόνο. Μετά την ολοκλήρωση της καλλιέργειας, το θρεπτικό υλικό συλλέχθηκε από κάθε πηγάδι καλλιέργειας και ελέγχθηκε για την ύπαρξη κυτοκινών IL-2 και TNF-α, με την τεχνική της ενζυμοσύνδετης ανοσοπροσροφητικής μεθόδου ELISA. Από τα **γραφήματα 4.1.7** και **4.1.8**, παρατηρούμε διαφορετική έκφραση των δύο κυτοκινών, IL-2 και TNF-α, μεταξύ ίδιων συνθηκών. Η ιντερλευκίνη-2, **(γράφημα 4.1.7)**, εκφράζεται με εύρος από 74,5 έως 144,5 μονάδες επί τοις εκατό (%), στην αύξηση απορρόφησης σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (coating buffer), ενώ ο νεκρωτικός παράγοντας όγκου-α, (**γράφημα 4.1.8**), εκφράζεται με εύρος από 84 έως 138 μονάδες επί τοις εκατό (%), στην αύξηση απορρόφησης σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (coating buffer). Υψηλότερες τιμές έκφρασης ιντερλευκίνης-2 παρατηρείται στη περίπτωση διέγερσης σπλενικών κυττάρων με αυτοαντιγόνο συγκέντρωσης 50μg/ml, ενώ η αντίστοιχη υψηλότερη τιμή έκφρασης για τον νεκρωτικό παράγοντα όγκου-α, σημειώνεται στη περίπτωση διέγερσης με αυτοαντιγόνο συγκέντρωσης 10μg/ml.




**Γράφημα 4.1.7:** Ανίχνευση ιντερλευκίνης-2 (IL-2) σε υπερκείμενα καλλιέργειας κυττάρων σπλήνας, πειραματικών ποντικιών Balb/c, παρουσία ή απουσία αυτοαντιγόνου. Το πρωτόκολλο καλλιέργειας διήρκησε 7 ημέρες, in vitro. Οι συγκεντρώσεις αυτοαντιγόνου που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: 10μg/ml, 50μg/ml και 100μg/ml. Η ποσοτικοποίηση της κυτοκίνης, πραγματοποιήθηκε με την ανοσοδοκιμασία ELISA. Ο άξονας y παρουσιάζει την % αύξηση της απορρόφησης σε σχέση με το διαλύτη των δειγμάτων (coating buffer) που λειτουργεί ως δείγμα ελέγχου. Η τυπική απόκλιση (S.E) προκύπτει από τα αποτελέσματα 3 πειραμάτων.




**Γράφημα 4.1.8:** Ανίχνευση νεκρωτικού παράγοντα όγκων-α (TNF-α) σε υπερκείμενα καλλιέργειας κυττάρων σπλήνας, πειραματικών ποντικιών Balb/c, παρουσία ή απουσία αυτοαντιγόνου. Το πρωτόκολλο καλλιέργειας διήρκησε 7 ημέρες, in vitro. Οι συγκεντρώσεις αυτοαντιγόνου που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: 10μg/ml, 50μg/ml και 100μg/ml. Η ποσοτικοποίηση του παράγοντα, πραγματοποιήθηκε με την ανοσοδοκιμασία ELISA. Ο άξονας y παρουσιάζει την % αύξηση της απορρόφησης σε σχέση με το διαλύτη των δειγμάτων (coating buffer) που λειτουργεί ως δείγμα ελέγχου. Η τυπική απόκλιση (S.E) προκύπτει από τα αποτελέσματα 3 πειραμάτων.

## 4.2 Η επίδραση της πρωτεΐνης πρωτεολιπιδικής μυελίνης (PLP) σε ανοσοποιημένα πειραματικά ποντίκια Balb/c, in vivo

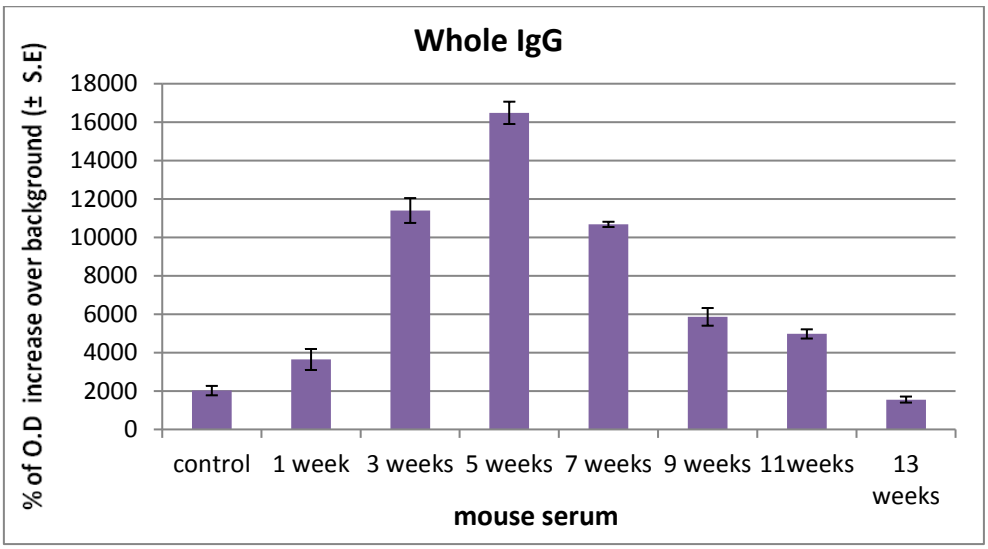
### 4.2.1 Επίδραση της ανοσογόνου δόσης PLP στην παραγωγή μη-ειδικών και ειδικών αντισωμάτων στον ορό ανοσοποιημένων πειραματικών ποντικιών Balb/c, με χρήση ανοσοδοκιμασίας ELISA

Μετά από μια σειρά in vitro πειραμάτων (**παράγραφος 4.1**), καταφέραμε να αποκτήσουμε πλήθος πληροφοριών για την δράση του αυτοαντιγόνου, (εγκεφαλικό εκχύλισμα) του εκπροσωπεί την πρωτεΐνη PLP, αλλά και την επίδραση του σε καλλιέργειες in vitro με κύτταρα σπλήνας. Πιο συγκεκριμένα, το αυτοαντιγόνο, επηρέασε το φυσιολογικό ρυθμό πολλαπλασιασμού των σπλενικών κυττάρων, επενεργώντας στους λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς- αναδεικνύοντας διαφορετικά προφίλ στις διάφορες συγκεντρώσεις του, όπως επίσης οδήγησε και στην παραγωγή κυτοκινών και αντισωμάτων (ειδικά και μη-ειδικά), στα υπερκείμενα των καλλιεργειών. Σε επόμενο στάδιο, μας δημιουργήθηκαν ερωτήματα για τη συμπεριφορά και τη δράση του εν λόγω αντιγόνου, in vivo. Οι πληροφορίες που αντλήσαμε από τα in vitro πειράματα, μας έκαναν να αναρωτηθούμε για το εάν επαληθεύονται και σε ένα ζωντανό οργανισμό, δηλαδή σε πειραματικά ποντίκια. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια Balb/c (H-$2^d$), θηλυκού γένους και ηλικίας 4-12 εβδομάδων, τα οποία και ανοσοποιήθηκαν με την επικρατέστερη σε επίδραση δόση PLP, 50μg. Όπως συνηθίζεται, για την ανοσοποίηση ζώων, η δόση αυτοαντιγόνου δεκαπλασιάστηκε, χρησιμοποιώντας 500μg/ποντίκι. Κατά τη διάρκεια των in vivo πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκαν δύο πρωτόκολλα ανοσοποίησης, τα οποία και θα αναλυθούν παρακάτω.

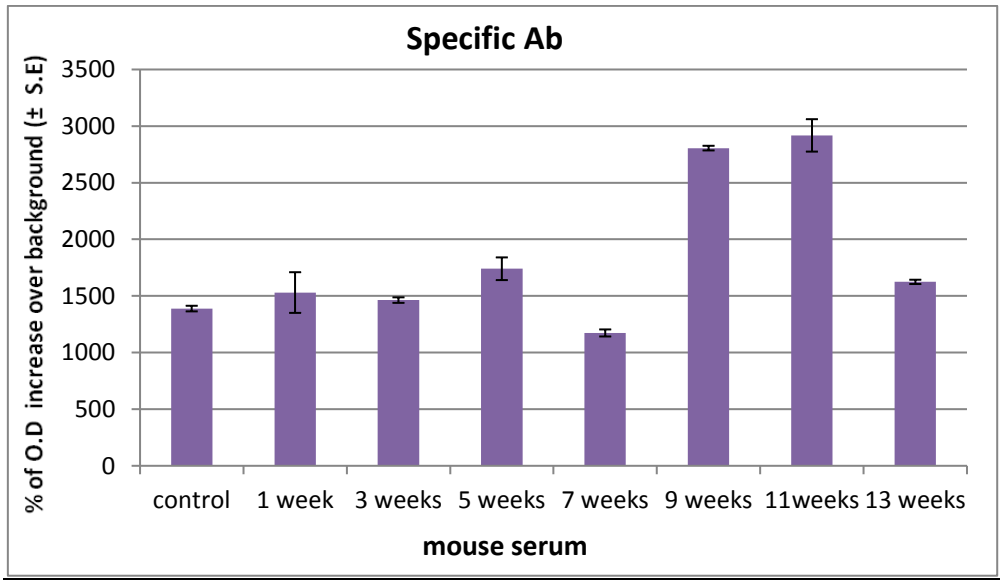
#### 4.2.1.1 Ανοσοποίηση πειραματικών ποντικιών με 500μg αυτοαντιγόνου

Θηλυκά πειραματικά ποντίκια Balb/c, ανοσοποιήθηκαν ενδοπεριτοναικά (i.p) με 500μg/ποντίκι αυτοαντιγόνου (εγκεφαλικό εκχύλισμα). Το πρωτόκολλο αυτό, είχε το χαρακτήρα παρακολούθησης του φαινομένου παραγωγής αντισωμάτων και διήρκησε 13 εβδομάδες. Δεν έγινε επανάληψη δόσης αντιγόνου μέχρι το πέρας του πρωτοκόλλου. Η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση ειδικών και μη-ειδικών αντισωμάτων γινόταν με αιμοληψίες κάθε δύο εβδομάδες. Από το δείγμα αίματος που λαμβανόταν, γινόταν απομόνωση του ορού. Στη συνέχεια, με χρήση της ανοσοδοκιμασίας ELISA στους ορούς, ανιχνεύονταν και πολιτικοποιούνταν τα ειδικά και τα μη-ειδικά αντισώματα. Το **γράφημα 4.2.1.1**, παρουσιάζει τα αποτελέσματα ποσοτικοποίησης μη-ειδικών αντισωμάτων και το **γράφημα 4.2.1.2** παρουσιάζει την αντίστοιχη ποσοτικοποίηση ειδικών αντισωμάτων, στο ορό ανοσοποιημένων πειραματικών ποντικιών Balb/c. Το **γράφημα 4.2.1.1**, που περιγράφει την ανίχνευση μη ειδικών αντισωμάτων , παρατηρούμε πως σχηματίζει μία κωδωνοειδή καμπύλη, όπου φτάνει σε μέγιστο 16483,17% την $5^η$ εβδομάδα μετά την ανοσοποίηση, ενώ στη συνέχεια μειώνεται βαθμιαία ώσπου την $13^η$ εβδομάδα παρουσιάζει τιμές πολύ όμοιες με τι τιμές κοντρόλ, πριν από την ανοσοποίηση. Το γράφημα 4.2.1.2, που περιγράφει την ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων, παρουσιάζει ένα τελείως διαφορετικό πρότυπο καμπύλης σε σχέση με εκείνο των μη-ειδικων αντισωμάτων. Βλέπουμε, για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα, από την αρχή μέχρι την $9^η$ εβδομάδα,

οι τιμές διατηρούνται στα ίδια επίπεδα. Στη συνέχεια, και μέχρι την 11η εβδομάδα, σημειώνει απότομη αύξηση για να ακολουθήσει πτωτική πορεία την 13η εβδομάδα. Συγκρίνοντας τα δύο γραφήματα, θα λέγαμε πως το ειδικό αντίσωμα αυξάνει τις τιμές του σε «καθυστέρηση» σε σχέση με τα μη-ειδικά αντισώματα, που σημειώνουν την πρώτη τους αύξηση ήδη από την 1η εβδομάδα μετά την ανοσοποίηση. Η παραγωγή ειδικού αντισώματος, έπεται των μη-ειδικών αντισωμάτων.




**Γράφημα 4.2.1.1:** Ανίχνευση μη-ειδικών αντισωμάτων στον ορό ανοσοποιημένων πειραματικών ποντικιών Balb/c. Το πρωτόκολλο ανοσοποίησης διήρκησε 13 εβδομάδες. Η ανοσοποίηση έγινε με 500μg/ποντίκι αυτοαντιγόνου. Η ποσοτικοποίηση μη-ειδικών αντισωμάτων, πραγματοποιήθηκε με την ανοσοδοκιμασία ELISA. Ο άξονας y παρουσιάζει την % αύξηση της απορρόφησης σε σχέση με το διαλύτη των δειγμάτων (coating buffer) που λειτουργεί ως δείγμα ελέγχου.

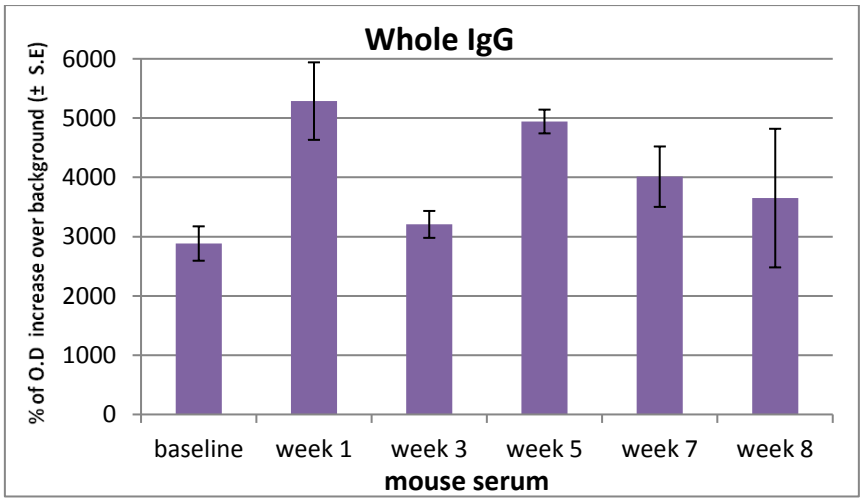



**Γράφημα 4.2.1.2:** Ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων στον ορό ανοσοποιημένων πειραματικών ποντικιών Balb/c. Το πρωτόκολλο ανοσοποίησης διήρκησε 13 εβδομάδες. Η ανοσοποίηση έγινε με 500μg/ποντίκι αυτοαντιγόνου. Η ποσοτικοποίηση μη-ειδικών αντισωμάτων, πραγματοποιήθηκε με την ανοσοδοκιμασία ELISA. Ο άξονας y παρουσιάζει την % αύξηση της απορρόφησης σε σχέση με το διαλύτη των δειγμάτων (coating buffer) που λειτουργεί ως δείγμα ελέγχου.

### 4.2.1.2 Ανοσοποίηση πειραματικών ποντικιών με γαλάκτωμα αυτοαντιγόνου και πλήρες ανοσοενισχυτικό του Freud (CFA)

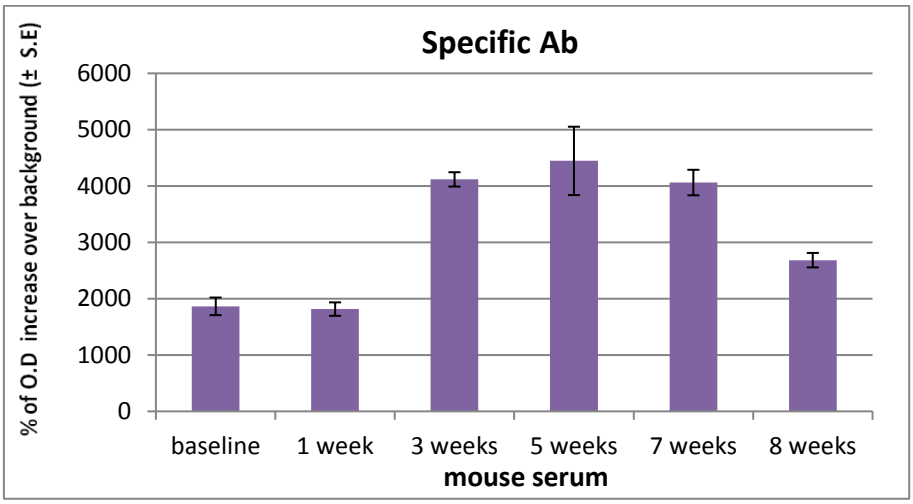
Θηλυκά πειραματικά ποντίκια Balb/c, ανοσοποιήθηκαν ενδοπεριτοναικά (i.p) με 500μg αυτοαντιγόνου και πλήρες ανοσοενισχυτικό του Freud, σε ίσους όγκους (1:1). Κατά την 6η εβδομάδα μετά την ανοσοποίηση τα ποντίκια αυτά, ενέθηκαν με διαλυτά μόρια τάξης 2 (soluble-MHCII), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν πειραματικά ως θεραπευτική στρατηγική που αποσκοπούσε στην μείωση των αυτοαντισωμάτων. Η συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε, ήταν 8,4μg/πειραματικό ζώο. Το πρωτόκολλο αυτό διήρκησε 8 εβδομάδες. Δεν έγινε επανάληψη δόσης αντιγόνου μέχρι το πέρας του πρωτοκόλλου. Η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση ειδικών και μη-ειδικών αντισωμάτων γινόταν με αιμοληψίες κάθε δύο εβδομάδες. Από το δείγμα αίματος που λαμβάνονταν, γινόταν απομόνωση του ορού. Στη συνέχεια, με χρήση της ανοσοδοκιμασίας ELISA στους ορούς, ανιχνεύονταν και ποσοτικοποιούταν τα ειδικά και τα μη-ειδικά αντισώματα. Το **γράφημα 4.2.1.3**, παρουσιάζει τα αποτελέσματα ποσοτικοποίησης μη-ειδικών αντισωμάτων και το **γράφημα 4.2.1.4** παρουσιάζει την αντίστοιχη ποσοτικοποίηση ειδικών αντισωμάτων, στο ορό ανοσοποιημένων πειραματικών ποντικιών Balb/c.

Στα **γραφήματα 4.2.1.3** και **4.2.1.4**, παρατηρούμε πως από την 1η κιόλας εβδομάδα, ανιχνεύονται υψηλά ποσοστά μη-ειδικών αντισωμάτων στο ορό των ανοσοποιημένων ποντικιών, στη συνέχεια παρακολουθώντας το ίδιο γράφημα, βλέπουμε πως την 3η εβδομάδα παρατηρείται πτώση των μη-ειδικών αντισωμάτων στα επίπεδα του κοντρόλ που όμως ενδέχεται να συνδέεται με την αύξηση των επιπέδων έκφρασης των ειδικών αντισωμάτων. Την 5η εβδομάδα, σημειώνεται άνοδος στις ποσότητες των αντισωμάτων και των δύο κατηγοριών. Την 7η και την 8η εβδομάδα, παρουσιάζεται βαθμιαία πτώση και στις δύο ομάδες αντισωμάτων. Δεδομένου πως την 6η εβδομάδα τα ανοσοποιημένα ζώα ενέθηκαν με διαλυτά μόρια τάξης 2, το πρότυπο σύγχρονης και βαθμιαίας πτώσης και στις δύο κατηγορίες αντισωμάτων, αποτελεί μία ενδιαφέρουσα παρατήρηση.

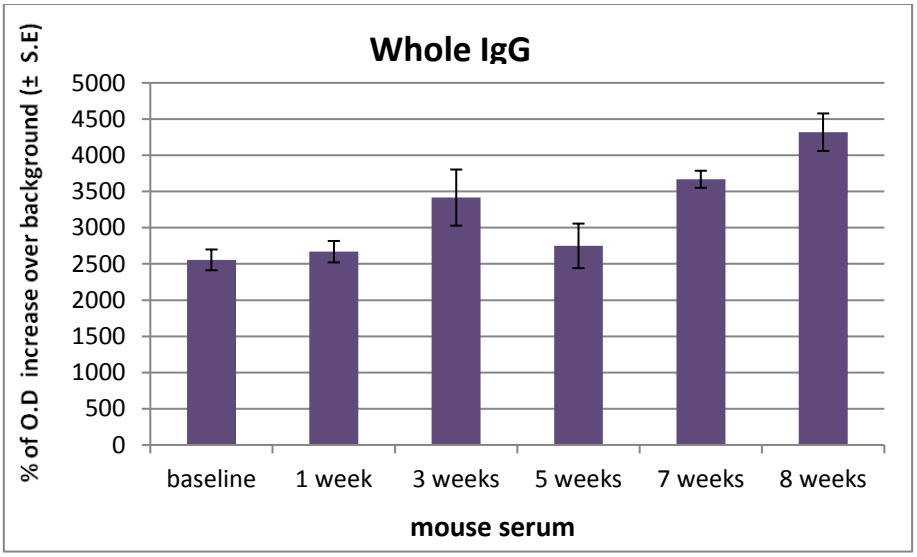



**Γράφημα 4.2.1.3:** Ανίχνευση μη-ειδικών αντισωμάτων στον ορό ανοσοποιημένων πειραματικών ποντικιών Balb/c. Το πρωτόκολλο ανοσοποίησης διήρκησε 8 εβδομάδες. Η ανοσοποίηση έγινε με 500μg και πλήρες ανοσοενισχυτικό του Freud, σε ίσους όγκους (1:1). Την 6η εβδομάδα έγινε ένεση με διαλυτά μόρια τάξης 2 (soluble-MHCII). Η ποσοτικοποίηση μη-ειδικών αντισωμάτων, πραγματοποιήθηκε με την ανοσοδοκιμασία

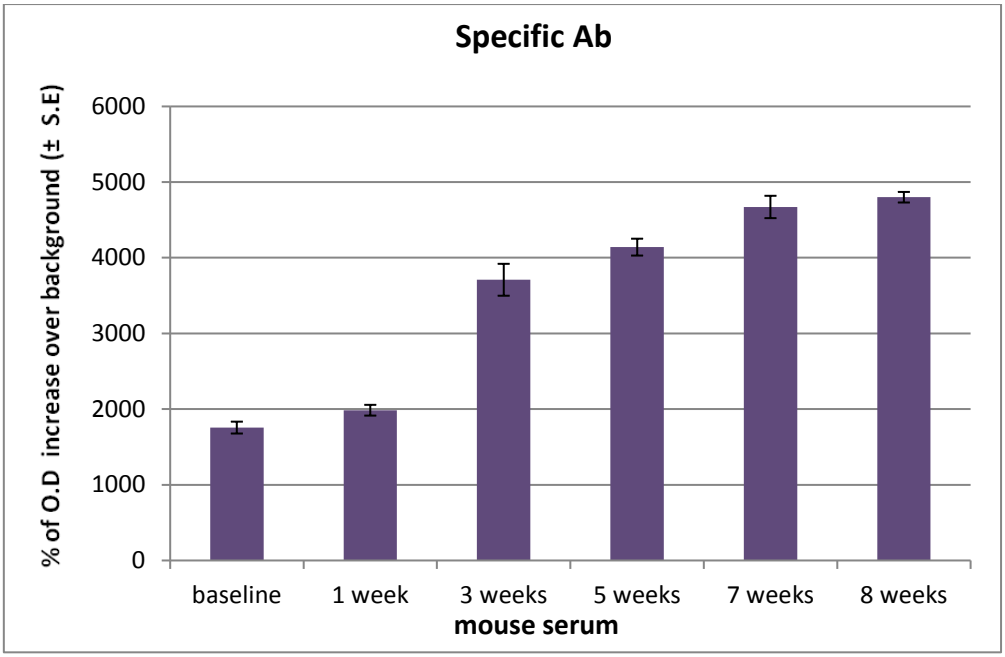
ELISA. Ο άξονας y παρουσιάζει την % αύξηση της απορρόφησης σε σχέση με το διαλύτη των δειγμάτων (coating buffer) που λειτουργεί ως δείγμα ελέγχου.




**Γράφημα 4.2.1.4:** Ανίχνευση ειδικού αντισώματος στον ορό ανοσοποιημένων πειραματικών ποντικιών Balb/c. Το πρωτόκολλο ανοσοποίησης διήρκησε 8 εβδομάδες. Η ανοσοποίηση έγινε με 500μg και πλήρες ανοσοενισχυτικό του Freud, σε ίσους όγκους (1:1). Την 6$^{η}$ εβδομάδα έγινε ένεση με διαλυτά μόρια τάξης 2 (soluble-MHCII). Η ποσοτικοποίηση ειδικού αντισώματος, πραγματοποιήθηκε με την ανοσοδοκιμασία ELISA. Ο άξονας y παρουσιάζει την % αύξηση της απορρόφησης σε σχέση με το διαλύτη των δειγμάτων (coating buffer) που λειτουργεί ως δείγμα ελέγχου.



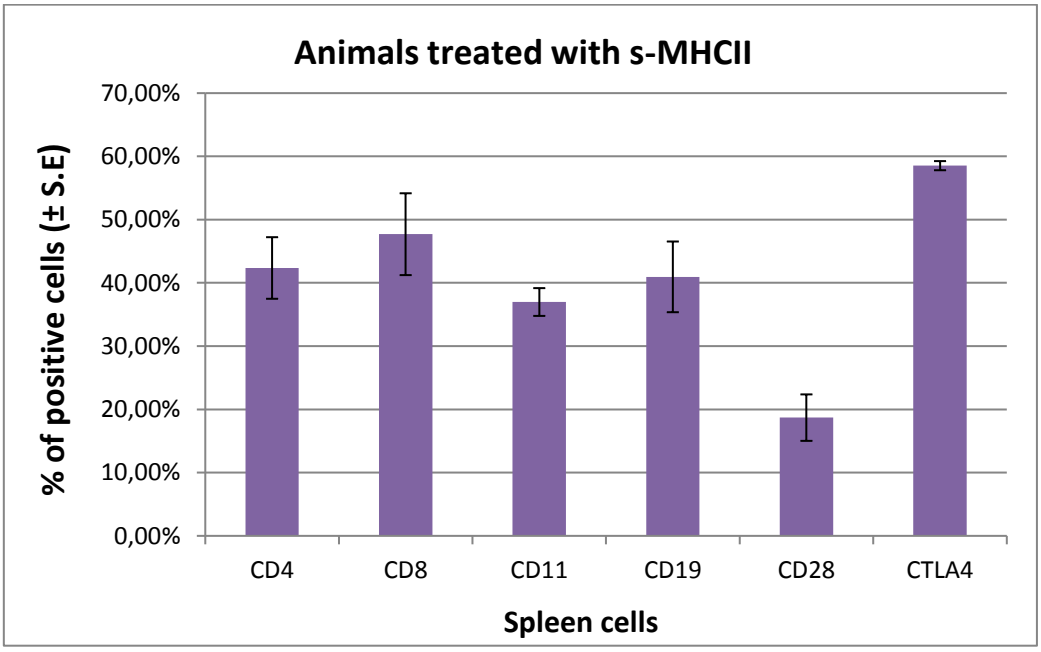

**Γράφημα 4.2.1.5:** Ανίχνευση μη-ειδικών αντισωμάτων στον ορό ανοσοποιημένων πειραματικών ποντικιών Balb/c. Το πρωτόκολλο ανοσοποίησης διήρκησε 8 εβδομάδες. Η ανοσοποίηση έγινε με 500μg και πλήρες ανοσοενισχυτικό του Freud, σε ίσους όγκους (1:1). Η ποσοτικοποίηση ειδικού αντισώματος, πραγματοποιήθηκε με την ανοσοδοκιμασία ELISA. Ο άξονας y παρουσιάζει την % αύξηση της απορρόφησης σε σχέση με το διαλύτη των δειγμάτων (coating buffer) που λειτουργεί ως δείγμα ελέγχου.



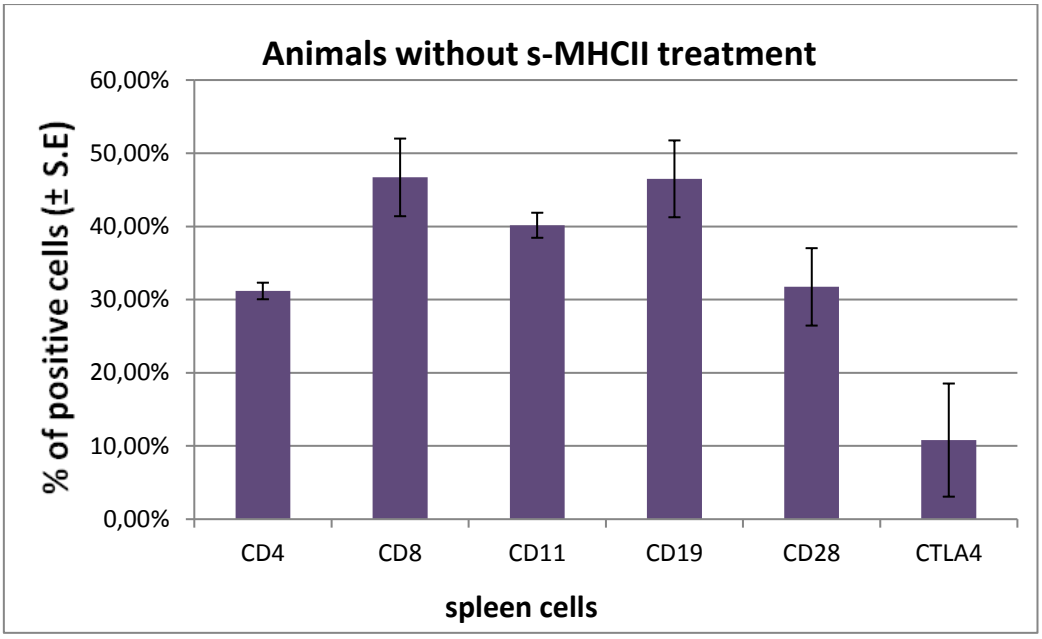

**Γράφημα 4.2.1.6:** Ανίχνευση ειδικού αντισώματος στον ορό ανοσοποιημένων πειραματικών ποντικιών Balb/c. Το πρωτόκολλο ανοσοποίησης διήρκησε 8 εβδομάδες. Η ανοσοποίηση έγινε με 500μg και πλήρες ανοσοενισχυτικό του Freud, σε ίσους όγκους (1:1). Η ποσοτικοποίηση ειδικού αντισώματος, πραγματοποιήθηκε με την ανοσοδοκιμασία ELISA. Ο άξονας y παρουσιάζει την % αύξηση της απορρόφησης σε σχέση με το διαλύτη των δειγμάτων (coating buffer) που λειτουργεί ως δείγμα ελέγχου.

### 4.2.2 Επίδραση της ανοσογόνου δόσης PLP στους λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς σπλήνα ανοσοποιημένων πειραματικών ποντικιών Balb/c, με χρήση ανοσοφθορισμού κυτταρομετρίας ροής

Μετά την ολοκλήρωση του πρωτοκόλλου ανοσοποίησης πειραματικών ποντικιών Balb/c, με γαλάκτωμα αυτοαντιγόνου (500μg) και πλήρες ανοσοενισχυτικό του Freud (CFA), ίσων όγκων (1:1), θελήσαμε να μελετήσουμε τους ιστούς των πειραματικών ποντικιών. Για το λόγο αυτό, θυσιάστηκαν τα πειραματικά ποντίκια και απομονώθηκαν ο σπλήνας, ο εγκέφαλος, τμήμα του λεπτού εντέρου και το μυεντερικό πλέγμα τους. Αρχικά, εξετάσαμε τους διάφορους λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς που διεγείρονται και πολλαπλασιάζονται κατά τη διάρκεια έκθεσής τους στο αυτοαντιγόνο, τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά. Απομονώθηκαν τα κύτταρα σπλήνας ανοσοποιημένων και κοντρόλ ζώων και υποβλήθηκαν σε εξωτερικό ανοσοφθορισμό για τους CD4, CD8, CD11, CD19, CD28 και CTLA-4 λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς. Το όριο μέτρησης των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών σε κάθε δείγμα, ορίστηκε εξ αρχής στα $10^5$ κύτταρα. Ο φθορισμός των κυττάρων μετρήθηκε με κυτταρομετρία ροής και η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα FCS Express V3. Στο **γράφημα 4.2.2.1**παρουσιάζονται τα αποτελέσματα φθορισμού του σπλήνα ανοσοποιημένων ποντικιών τα οποία κατά την 6η εβδομάδα του πρωτοκόλλου, δέχθηκαν ένεση με διαλυτά μόρια τάξης 2, ενώ στο **γράφημα 4.2.2.2** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα φθορισμού ζώων που ανοσοποιήθηκαν με τον ίδιο τρόπο αλλά δεν ενέθηκαν με διαλυτά μόρια τάξης 2, μέχρι το πέρας του πρωτοκόλλου των 8 εβδομάδων.



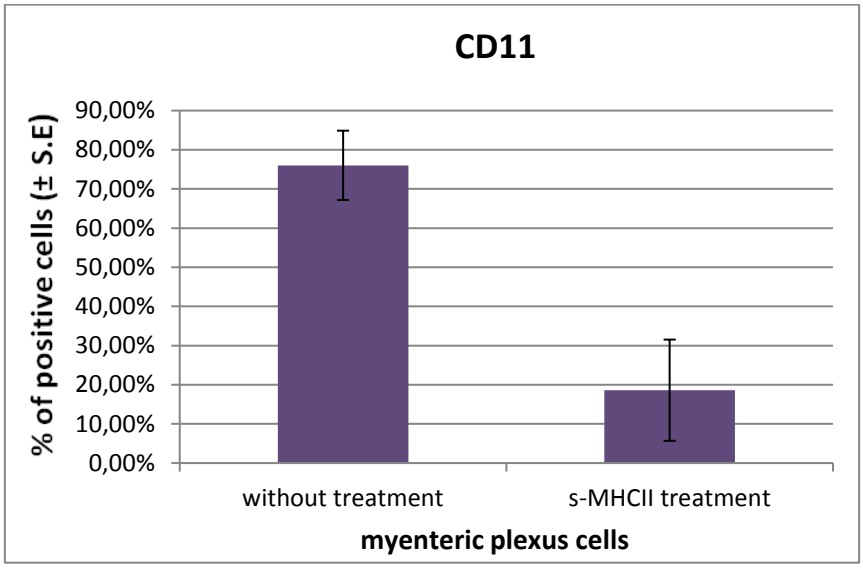

**Γράφημα 4.2.2.1:** Ο φθορισμός των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών CD8, CD11, CD19, CD28 και CTLA-4 ανοσοποιημένων με γαλάκτωμα (500μg) και πλήρες ανοσοενισχυτικό του Freud (CFA), πειραματικών ποντικιών Balb/c, μετά το πέρας 8 εβδομάδων. Την 6η εβδομάδα του πρωτοκόλλου έγινε ένεση με s-MHCII μόρια. Ο φθορισμός, ελέγχθηκε με την τεχνική του ανοσοφθορισμού με κυτταρομετρία ροής (FACs). Η τυπική απόκλιση (S.E) υπολογίστηκε με βάση τα αποτελέσματα 3 πειραματικών ποντικιών.




**Γράφημα 4.2.2.2** Ο φθορισμός των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών CD8, CD11, CD19, CD28 και CTLA-4 ανοσοποιημένων με γαλάκτωμα (500μg) και πλήρες ανοσοενισχυτικό του Freud (CFA), πειραματικών ποντικιών Balb/c, μετά το πέρας 8 εβδομάδων. Ο φθορισμός, ελέγχθηκε με την τεχνική του ανοσοφθορισμού με κυτταρομετρία ροής (FACs). Η τυπική απόκλιση (S.E) υπολογίστηκε με βάση τα αποτελέσματα 3 πειραματικών ποντικιών.

### 4.2.3 Επίδραση της ανοσογόνου δόσης PLP στην έκφραση CD11 κυττάρων στο μυεντερικό πλέγμα ανοσοποιημένων πειραματικών ποντικιών Balb/c, με χρήση ανοσοφθορισμού κυτταρομετρίας ροής

Μετά την ολοκλήρωση του πρωτοκόλλου ανοσοποίησης πειραματικών ποντικιών Balb/c, με γαλάκτωμα αυτοαντιγόνου (500μg) και πλήρες ανοσοενισχυτικό του Freud (CFA), ίσων όγκων (1:1), θελήσαμε να μελετήσουμε τους ιστούς των πειραματικών ποντικιών. Για το λόγο αυτό, θυσιάστηκαν τα πειραματικά ποντίκια και απομονώθηκαν ο σπλήνας, ο εγκέφαλος, τμήμα του λεπτού εντέρου και το μυεντερικό πλέγμα τους. Έχοντας εξετάσει τους λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς στον ιστό του σπλήνα, προχωρήσαμε στην ανίχνευση πληθυσμών CD11 στο μυεντερικό πλέγμα των πειραματικών ποντικιών, που διεγείρονται και πολλαπλασιάζονται κατά τη διάρκεια έκθεσής τους στο αυτοαντιγόνο, τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά. Αρχικά, απομονώθηκε τμήμα του λεπτού εντέρου και ύστερα διαχωρίστηκε προς μελέτη η δομή του μυεντερικού πλέγματος. Η απομόνωση των κυττάρων του μυεντερικού πλέγματος έγινε με ενζυμική πέψη με κολλαγενάση Α. Τα κύτταρα μυεντερικού πλέγματος ανοσοποιημένων και κοντρόλ ζώων, υποβλήθηκαν σε εξωτερικό ανοσοφθορισμό για τον CD11 επιφανειακό μάρτυρα.. Το όριο μέτρησης των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών σε κάθε δείγμα, ορίστηκε εξ αρχής στα $10^5$ κύτταρα. Ο φθορισμός των κυττάρων μετρήθηκε με κυτταρομετρία ροής και η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα FCS Express V3. Στο **γράφημα 4.2.3.1**παρουσιάζονται τα αποτελέσματα φθορισμού κυττάρων μυεντερικού πλέγματος ανοσοποιημένων ποντικιών τα οποία κατά την 6η εβδομάδα του πρωτοκόλλου, δέχθηκαν ένεση με διαλυτά μόρια τάξης 2, ενώ στο **γράφημα 4.2.3.2** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα φθορισμού ζώων που ανοσοποιήθηκαν με τον ίδιο τρόπο αλλά δεν ενέθηκαν με διαλυτά μόρια τάξης 2, μέχρι το πέρας του πρωτοκόλλου των 8 εβδομάδων.




**Γράφημα 4.2.3.1** Ο φθορισμός των CD11+ κυττάρων του μυεντερικού πλέγματος, ανοσοποιημένων με γαλάκτωμα (500μg) και πλήρες ανοσοενισχυτικό του Freud (CFA), πειραματικών ποντικιών Balb/c, μετά το πέρας 8 εβδομάδων, με ή χωρίς ένεση με διαλυτά τάξης 2 μόρια (s-MHCII). Ο φθορισμός, ελέγχθηκε με την τεχνική του ανοσοφθορισμού με κυτταρομετρία ροής (FACs). Η τυπική απόκλιση (S.E) υπολογίστηκε με βάση τα αποτελέσματα 3 πειραματικών ποντικιών.

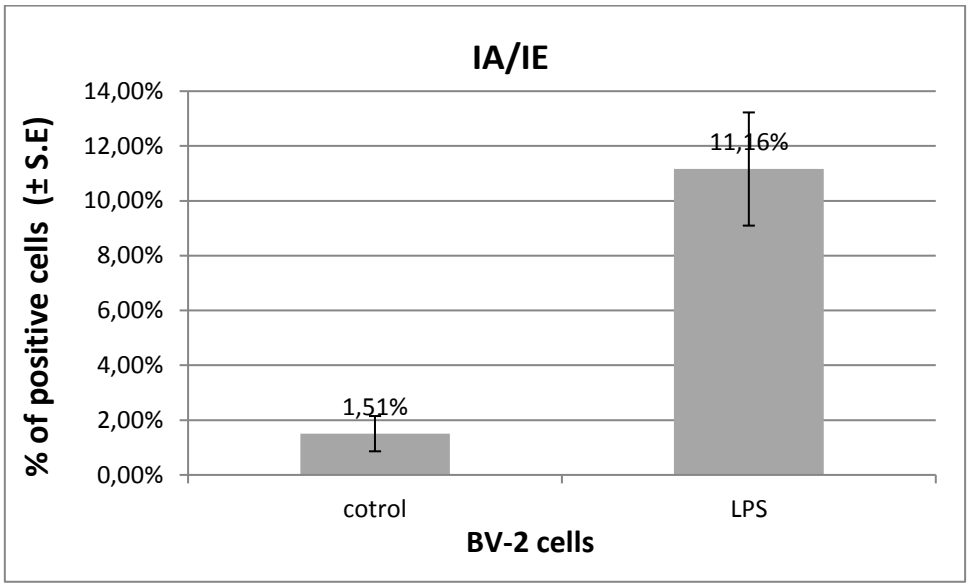
## 4.3 Η επίδραση του λιποπολυσακχαρίτη (LPS) στην ενεργοποίηση της μικρογλοιακής κυτταρικής σειράς BV-2, in vitro

Αθανατοποιημένα κύτταρα μικρογλοίας BV-2, καλλιεργήθηκαν in vitro παρουσία ή απουσία λιποπολυσακχαρίτη (LPS). Ο λιποπολυσακχαρίτης, όπως έχει ήδη αναφερθεί, δρα ενεργοποιητικά στα κύτταρα αυτά μεταβάλλοντας τόσο τη λειτουργία τους όσο και το φαινότυπο τους. Η επαγωγή BV-2 κυττάρων με LPS, διαρθρώθηκε σε δύο διαφορετικά πρωτόκολλα σε σχέση με το χρόνο διάρκειας της καλλιέργειας. Η επαγωγή κυττάρων με LPS μελετήθηκε για 24 και 48 ώρες. Η συγκέντρωση των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκε ήταν $10^6$ cells/ml και η αντίστοιχη συγκέντρωση λιποπολυσακχαρίτη (LPS) ήταν 500ng/ml. Ο λιποπολυσακχαρίτης, προστίθονταν κατά την έναρξη της καλλιέργειας, στο θρεπτικό υλικό των κυττάρων και μέχρι το πέρας της καλλιέργειας, δεν γινόταν ανανέωση του θρεπτικού υλικού. Από τις καλλιέργειες αυτές, χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω ανάλυση τόσο τα κύτταρα όσο και τα υπερκείμενα των καλλιεργειών. Τα κύτταρα των δύο συνθηκών (παρουσία και απουσία LPS), μελετήθηκαν ποιοτικά και ποσοτικά για την έκφραση επιφανειακών μαρτύρων (μόρια τάξης 2, CD74, MIF) με εξωτερικό ανοσοφθορισμό κυτταρομετρίας ροής, ενώ τα υπερκείμενα που συλλέχθηκαν μελετήθηκαν για την έκκριση κυτοκινών (TNF-α) και άλλων χαρακτηριστικών πρωτεϊνών (μόρια τάξης 2, CD74, MIF), με την ανοσοδοκιμασία ELISA. Για την απομόνωση της πρωτεΐνης CD74 με σφαιρίδια, από κύτταρα BV-2 που επάγχθηκαν με LPS, συλλέχθηκαν $28*10^6$ κύτταρα.

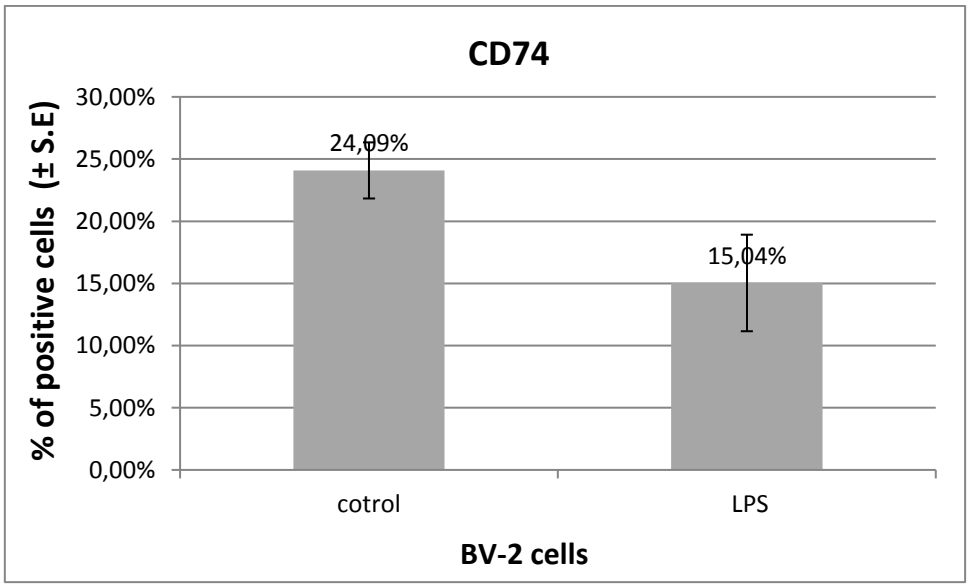
### 4.3.1 Μελέτη ανίχνευσης των επιφανειακών μαρτύρων $I_A/I_E$, CD74 και MIF, σε κύτταρα BV-2, με χρήση ανοσοφθορισμού κυτταρομετρίας ροής

Αθανατοποιημένα κύτταρα μικρογλοίας BV-2, καλλιεργήθηκαν in vitro παρουσία ή απουσία λιποπολυσακχαρίτη (LPS). Η επαγωγή BV-2 κυττάρων με LPS, διαρθρώθηκε σε δύο διαφορετικά πρωτόκολλα σε σχέση με το χρόνο διάρκειας της καλλιέργειας. Η επαγωγή κυττάρων με LPS μελετήθηκε για 24 και 48 ώρες. Η συγκέντρωση των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκε ήταν $10^6$ cells/ml και η αντίστοιχη συγκέντρωση λιποπολυσακχαρίτη (LPS) ήταν 500ng/ml. Μετά το πέρας των καλλιεργειών, τα κύτταρα συλλέχθηκα και υποβλήθηκαν σε εξωτερικό ανοσοφθορισμό για τους επιφανειακούς μάρτυρες CD74, MIF, και μόρια τάξης 2. Το όριο μέτρησης των κυττάρων BV-2 σε κάθε δείγμα, ορίστηκε εξ αρχής στα 20.000 κύτταρα. Ο φθορισμός των κυττάρων μετρήθηκε με κυτταρομετρία ροής και η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα FCS Express V3. Στο **γράφημα 4.3.1.1**, παρατηρούμε το φθορισμό των τάξης 2 μορίων σε κύτταρα BV-2, παρουσία ή μη λιποπολυσακχαρίτη. Η διαφορά μεταξύ των δύο συνθηκών είναι ευδιάκριτη, με την έκφραση των τάξης 2 μορίων στην κατάσταση LPS, να σημειώνει σχεδόν δεκαπλάσιο ποσοστό φθορισμού σε σχέση με κύτταρα σε συνθήκες κοντρόλ. Στο **γράφημα 4.3.1.2**, παρατηρούμε πως τα κύτταρα σε συνθήκη LPS εκφράζουν χαμηλότερο ποσοστό φθορισμού του υποδοχέα CD74, σε σχέση με κύτταρα σε συνθήκες κοντρόλ. Παρατηρώντας το **γράφημα 4.3.1.3**, που παρουσιάζει το φθορισμό του παράγοντα MIF σε συνθήκες παρουσίας ή απουσίας LPS, βλέπουμε πως διαμορφώνεται ένα πρότυπο έκφρασης παρόμοιο με αυτό των μορίων τάξης 2. Πιο συγκεκριμένα,

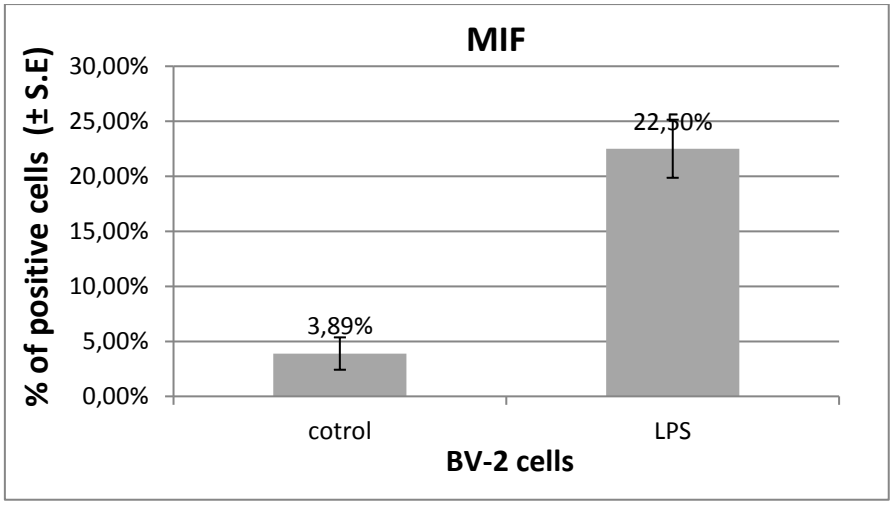
τα κύτταρα BV-2, σε συνθήκες LPS, εκφράζουν σχεδόν εξαπλάσιο ποσοστό φθορισμού σε σχέση με κύτταρα σε συνθήκες κοντρόλ.




**Γράφημα 4.3.1.1:** Ο φθορισμός των τάξης 2 μορίων από in vitro καλλιέργειαα BV-2 κυττάρων, παρουσία ή απουσία LPS (500ng/ml). Το πρωτόκολλο καλλιέργειας διήρκησε 48 ώρες, in vitro.. Ο φθορισμός των τάξης 2 μορίων, ελέγχθηκε με την τεχνική του ανοσοφθορισμού με κυτταρομετρία ροής (FACs). Τα αποτελέσματα παρουσιάζουν το ποσοστό των τάξης 2 μορίων σε κάθε δείγμα και η τυπική απόκλιση (S.E) υπολογίστηκε με βάση τα αποτελέσματα 3 πειραμάτων.



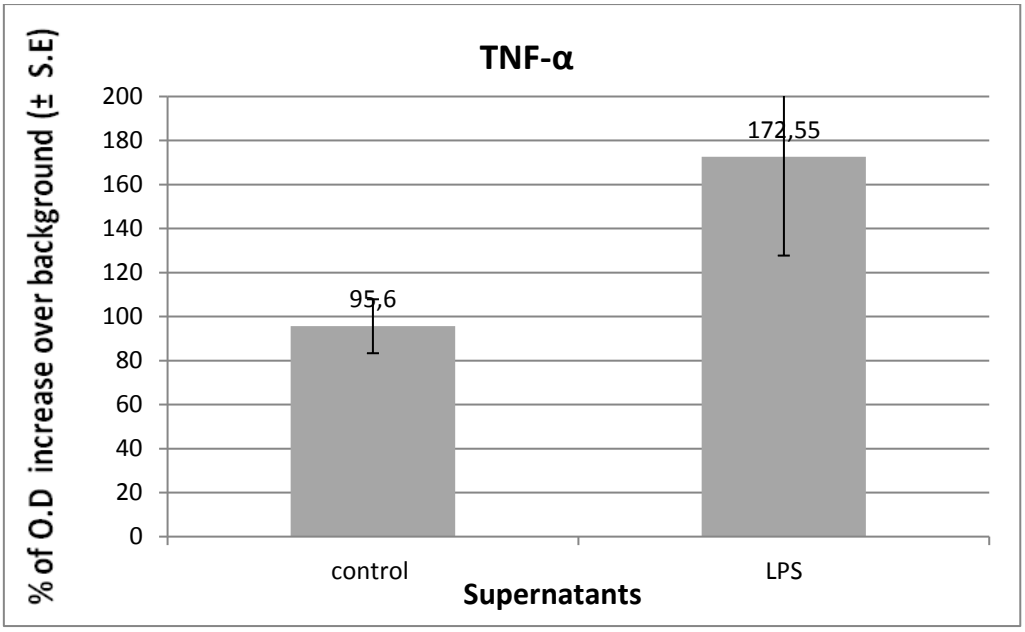

**Γράφημα 4.3.1.2:** Ο φθορισμός του υποδοχέα CD74 από in vitro καλλιέργειαα BV-2 κυττάρων, παρουσία ή απουσία LPS (500ng/ml). Το πρωτόκολλο καλλιέργειας διήρκησε 48 ώρες, in vitro.. Ο φθορισμός, του υποδοχέα CD74, ελέγχθηκε με την τεχνική του ανοσοφθορισμού με κυτταρομετρία ροής (FACs). Τα αποτελέσματα παρουσιάζουν το ποσοστό του υποδοχέα CD74 σε κάθε δείγμα και η τυπική απόκλιση (S.E) υπολογίστηκε με βάση τα αποτελέσματα 3 πειραμάτων.



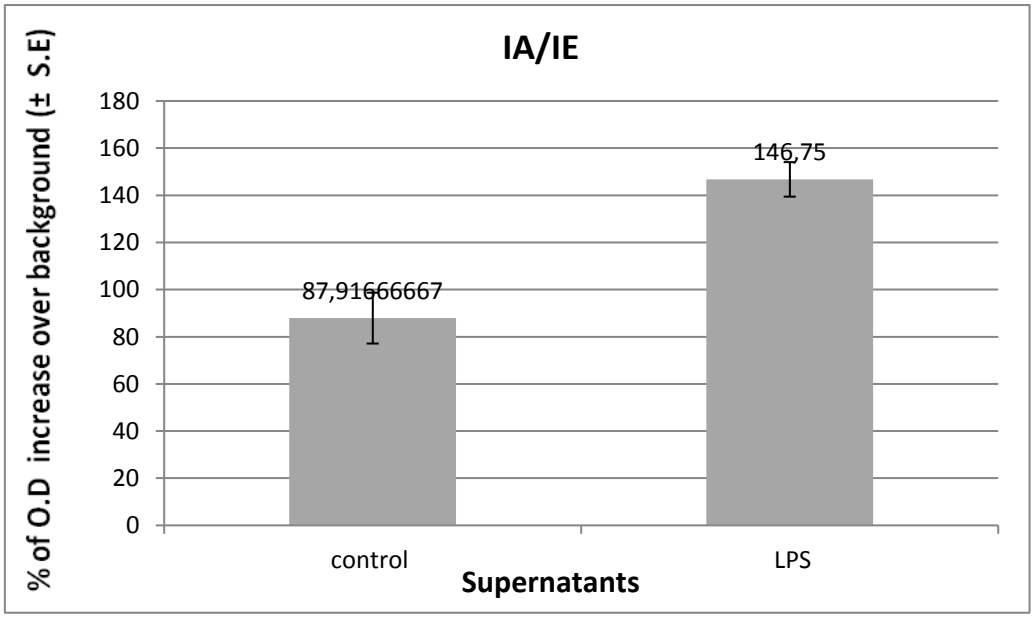

**Γράφημα 4.3.1.2:** Ο φθορισμός του παράγοντα MIF από in vitro καλλιέργειας BV-2 κυττάρων, παρουσία ή απουσία LPS (500ng/ml). Το πρωτόκολλο καλλιέργειας διήρκησε 48 ώρες, in vitro. Ο φθορισμός, του παράγοντα MIF, ελέγχθηκε με την τεχνική του ανοσοφθορισμού με κυτταρομετρία ροής (FACs). Τα αποτελέσματα παρουσιάζουν το ποσοστό του παράγοντα MIF σε κάθε δείγμα και η τυπική απόκλιση (S.E) υπολογίστηκε με βάση τα αποτελέσματα 3 πειραμάτων.

### 4.3.2 Μελέτη ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης παράγοντα TNF-α και πρωτεινών $I_A/I_E$, CD74 και MIF, σε υπερκείμενα κυτταροκαλλιεργειών BV-2, με χρήση ανοσοδοκιμασίας ELISA

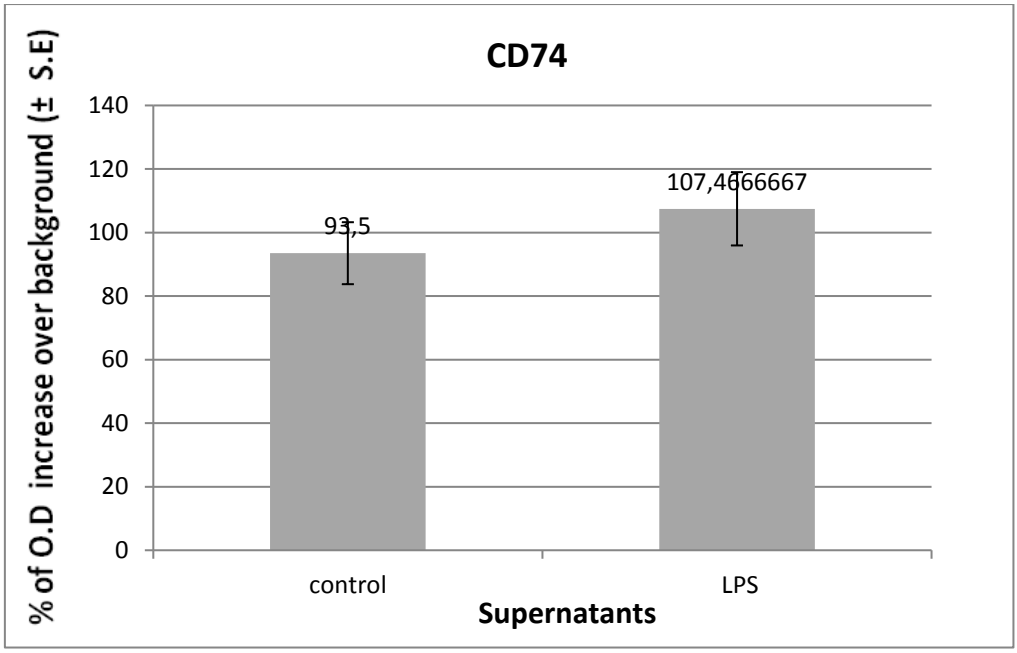
Αθανατοποιημένα κύτταρα μικρογλοίας BV-2, καλλιεργήθηκαν in vitro παρουσία ή απουσία λιποπολυσακχαρίτη (LPS). Η επαγωγή BV-2 κυττάρων με LPS, διαρθρώθηκε σε δύο διαφορετικά πρωτόκολλα σε σχέση με το χρόνο διάρκειας της καλλιέργειας. Η επαγωγή κυττάρων με LPS μελετήθηκε για 24 και 48 ώρες. Η συγκέντρωση των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκε ήταν $10^6$ cells/ml και η αντίστοιχη συγκέντρωση λιποπολυσακχαρίτη (LPS) ήταν 500ng/ml. Μετά την ολοκλήρωση της καλλιέργειας, το θρεπτικό υλικό συλλέχθηκε από κάθε πηγάδι καλλιέργειας και ελέγχθηκε για την ύπαρξη TNF-α, μόρια τάξης 2, CD74 και MIF με την τεχνική της εμζυμοσύνδετης ανοσοπροσροφητικής μεθόδου ELISA. Στα **γραφήματα 4.3.2.1**, **4.3.2.2, 4.3.2.3** και **4.3.2.4,** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών στα υπερκείμενα καλλιεργειών BV-2, για 24 ώρες, ενώ στα γραφήματα **4.3.2.5, 4.3.2.6, 4.3.2.7** και **4.3.2.8**, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών στα υπερκείμενα καλλιεργειών BV-2, για 48 ώρες.



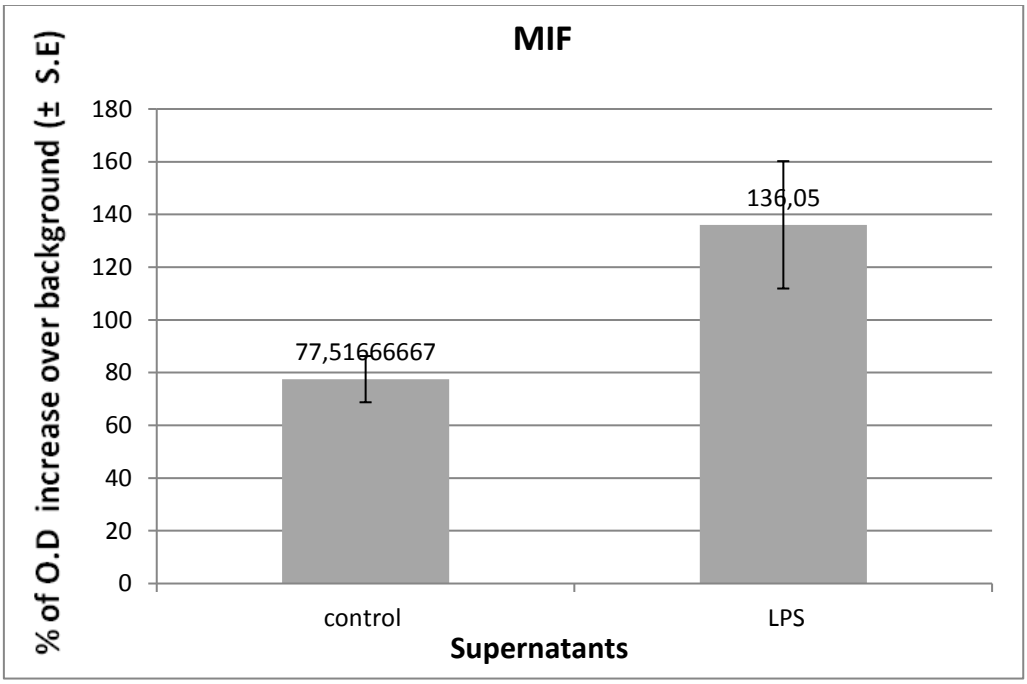

**Γράφημα 4.3.2.1**: Ανίχνευση TNF-α σε υπερκείμενα in vitro καλλιέργειας κυττάρων BV-2 κυττάρων, παρουσία ή απουσία LPS (500ng/ml). Το πρωτόκολλο καλλιέργειας διήρκησε 24 ώρες, in vitro. Η ποσοτικοποίηση της κυτοκίνης, πραγματοποιήθηκε με την ανοσοδοκιμασία ELISA. Ο άξονας y παρουσιάζει την % αύξηση της απορρόφησης σε σχέση με το διαλύτη των δειγμάτων (coating buffer) που λειτουργεί ως δείγμα ελέγχου. Η τυπική απόκλιση (S.E) προκύπτει από τα αποτελέσματα 3 πειραμάτων.



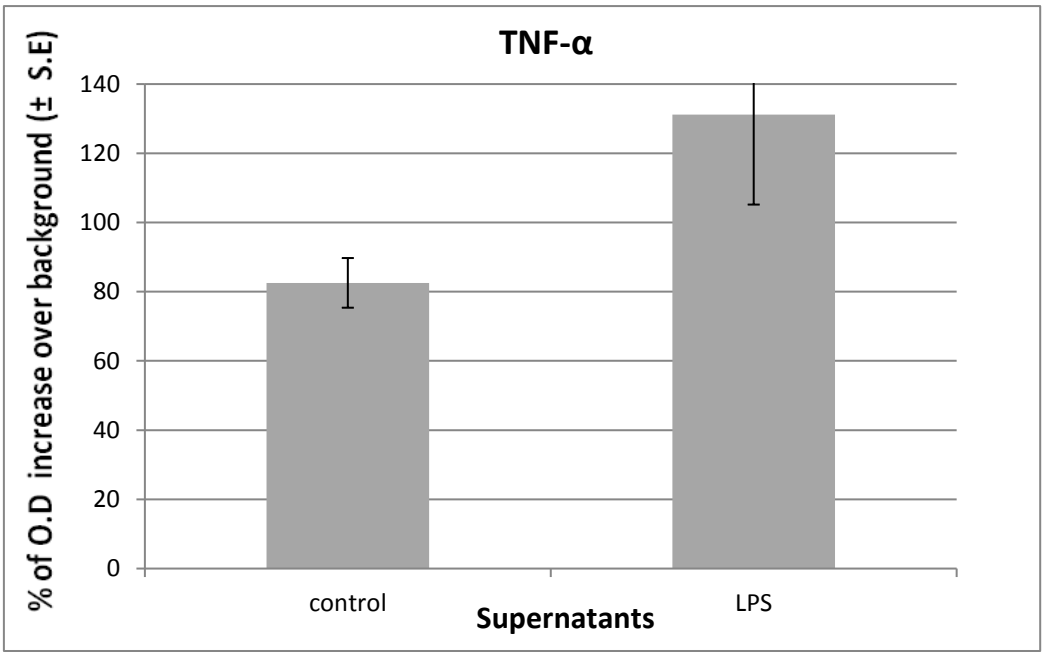

**Γράφημα 4.3.2.2**: Ανίχνευση μορίων τάξης 2 σε υπερκείμενα in vitro καλλιέργειας κυττάρων BV-2 κυττάρων, παρουσία ή απουσία LPS (500ng/ml). Το πρωτόκολλο καλλιέργειας διήρκησε 24 ώρες, in vitro. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με την ανοσοδοκιμασία ELISA. Ο άξονας y παρουσιάζει την % αύξηση της απορρόφησης σε σχέση με το διαλύτη των δειγμάτων (coating buffer) που λειτουργεί ως δείγμα ελέγχου. Η τυπική απόκλιση (S.E) προκύπτει από τα αποτελέσματα 3 πειραμάτων.



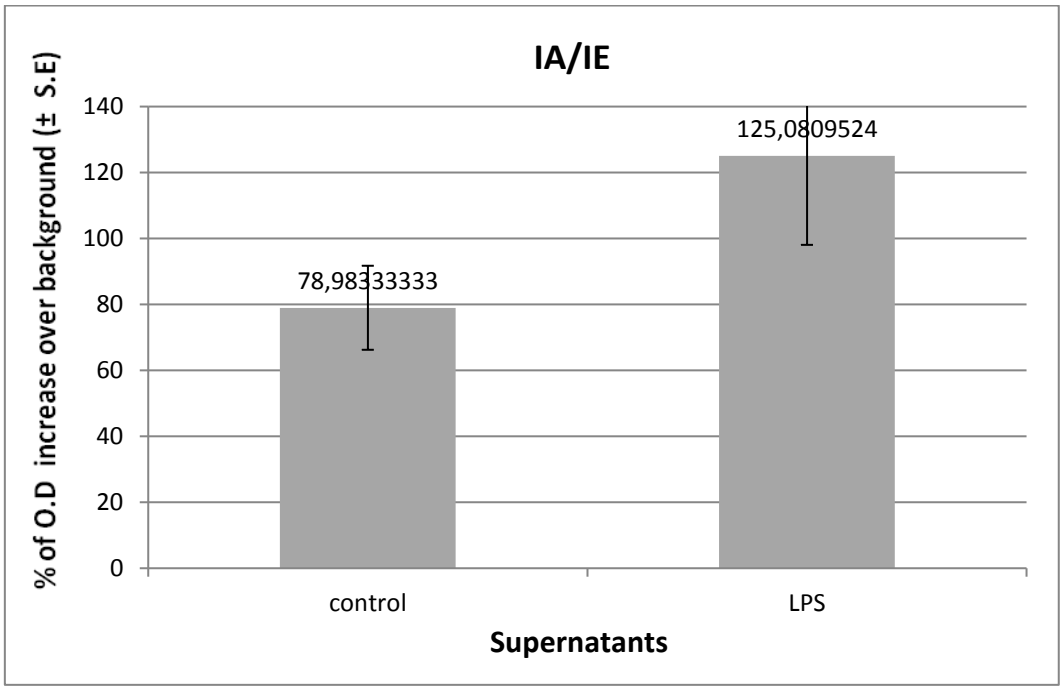

**Γράφημα 4.3.2.3**: Ανίχνευση πρωτεΐνης CD74 σε υπερκείμενα in vitro καλλιέργειας κυττάρων BV-2 κυττάρων, παρουσία ή απουσία LPS (500ng/ml). Το πρωτόκολλο καλλιέργειας διήρκησε 24 ώρες, in vitro. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με την ανοσοδοκιμασία ELISA. Ο άξονας y παρουσιάζει την % αύξηση της απορρόφησης σε σχέση με το διαλύτη των δειγμάτων (coating buffer) που λειτουργεί ως δείγμα ελέγχου. Η τυπική απόκλιση (S.E) προκύπτει από τα αποτελέσματα 3 πειραμάτων.



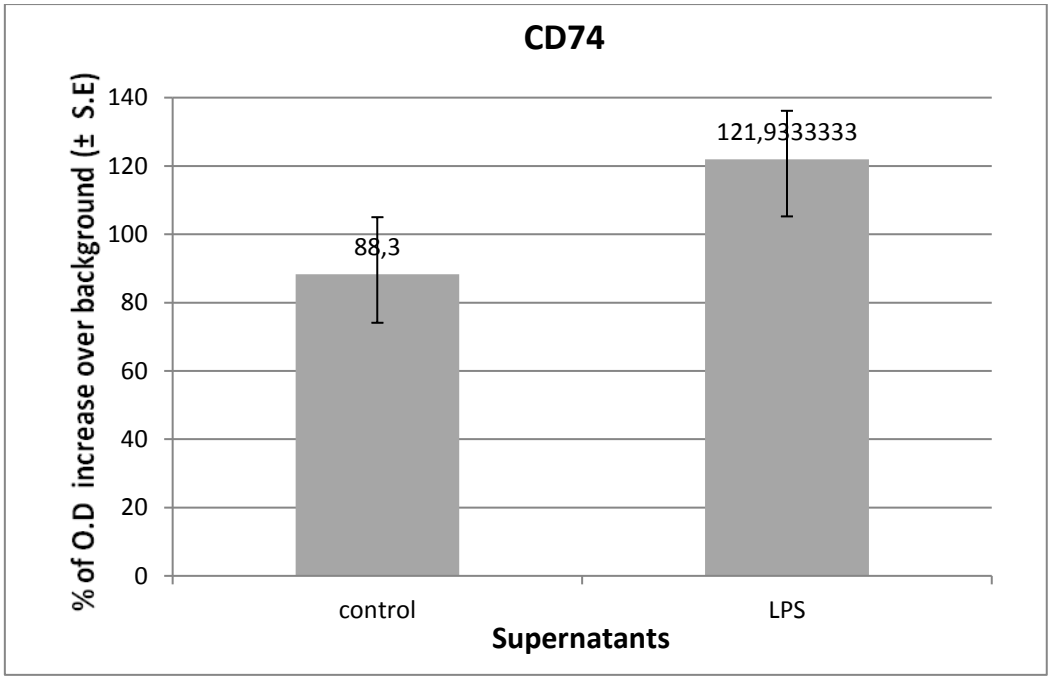

**Γράφημα 4.3.2.4**: Ανίχνευση παράγοντα MIF σε υπερκείμενα in vitro καλλιέργειας κυττάρων BV-2 κυττάρων, παρουσία ή απουσία LPS (500ng/ml). Το πρωτόκολλο καλλιέργειας διήρκησε 24 ώρες, in vitro. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με την ανοσοδοκιμασία ELISA. Ο άξονας y παρουσιάζει την % αύξηση της απορρόφησης σε σχέση με το διαλύτη των δειγμάτων (coating buffer) που λειτουργεί ως δείγμα ελέγχου. Η τυπική απόκλιση (S.E) προκύπτει από τα αποτελέσματα 3 πειραμάτων.



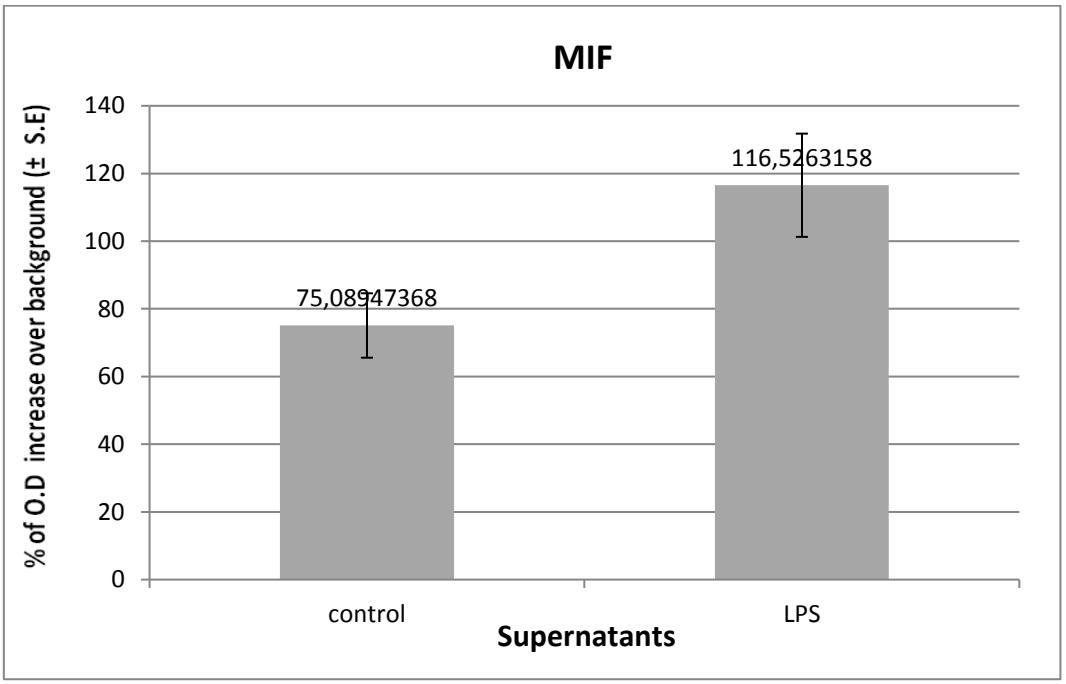

**Γράφημα 4.3.2.5**: Ανίχνευση TNF-α σε υπερκείμενα in vitro καλλιέργειας κυττάρων BV-2 κυττάρων, παρουσία ή απουσία LPS (500ng/ml). Το πρωτόκολλο καλλιέργειας διήρκησε 48 ώρες, in vitro. Η ποσοτικοποίηση της κυτοκίνης, πραγματοποιήθηκε με την ανοσοδοκιμασία ELISA. Ο άξονας y παρουσιάζει την % αύξηση της απορρόφησης σε σχέση με το διαλύτη των δειγμάτων (coating buffer) που λειτουργεί ως δείγμα ελέγχου. Η τυπική απόκλιση (S.E) προκύπτει από τα αποτελέσματα 3 πειραμάτων.




**Γράφημα 4.3.2.6**: Ανίχνευση μορίων τάξης 2 σε υπερκείμενα in vitro καλλιέργειας κυττάρων BV-2 κυττάρων, παρουσία ή απουσία LPS (500ng/ml). Το πρωτόκολλο καλλιέργειας διήρκησε 48 ώρες, in vitro. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με την ανοσοδοκιμασία ELISA. Ο άξονας y παρουσιάζει την % αύξηση της απορρόφησης σε σχέση με το διαλύτη των δειγμάτων (coating buffer) που λειτουργεί ως δείγμα ελέγχου. Η τυπική απόκλιση (S.E) προκύπτει από τα αποτελέσματα 3 πειραμάτων.




**Γράφημα 4.3.2.7**: Ανίχνευση CD74 σε υπερκείμενα in vitro καλλιέργειας κυττάρων BV-2 κυττάρων, παρουσία ή απουσία LPS (500ng/ml). Το πρωτόκολλο καλλιέργειας διήρκησε 48 ώρες, in vitro. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με την ανοσοδοκιμασία ELISA. Ο άξονας y παρουσιάζει την % αύξηση της απορρόφησης σε σχέση με το διαλύτη των δειγμάτων (coating buffer) που λειτουργεί ως δείγμα ελέγχου. Η τυπική απόκλιση (S.E) προκύπτει από τα αποτελέσματα 3 πειραμάτων.




**Γράφημα 4.3.2.8**: Ανίχνευση παράγοντα MIF σε υπερκείμενα in vitro καλλιέργειας κυττάρων BV-2 κυττάρων, παρουσία ή απουσία LPS (500ng/ml). Το πρωτόκολλο καλλιέργειας διήρκησε 48 ώρες, in vitro. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με την ανοσοδοκιμασία ELISA. Ο άξονας y παρουσιάζει την % αύξηση της απορρόφησης σε σχέση με το διαλύτη των δειγμάτων (coating buffer) που λειτουργεί ως δείγμα ελέγχου. Η τυπική απόκλιση (S.E) προκύπτει από τα αποτελέσματα 3 πειραμάτων.

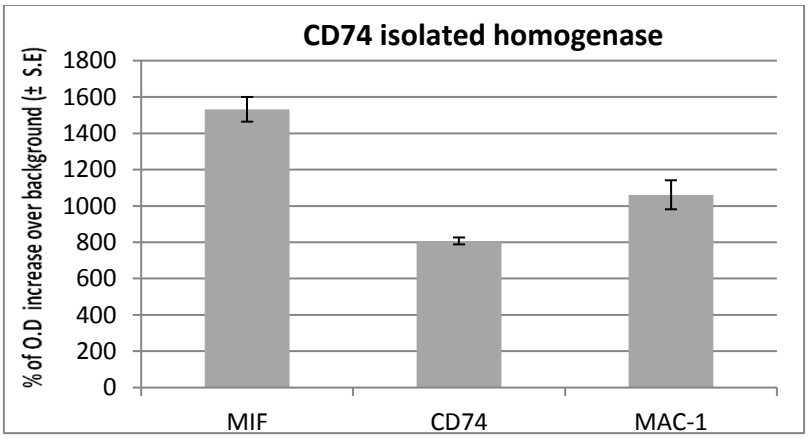
### 4.3.3 Ανοσοκατακρήμνιση CD74 πρωτεΐνης από ομογενοποίημα κυττάρων BV-2 και ποσοτικοποίηση της με τη μέθοδο Lowry

Αθανατοποιημένα κύτταρα μικρογλοίας BV-2, καλλιεργήθηκαν in vitro παρουσία λιποπολυσακχαρίτη (LPS). Ο λιποπολυσακχαρίτης, όπως έχει ήδη αναφερθεί, δρα ενεργοποιητικά στα κύτταρα αυτά, μεταβάλλοντας τόσο τη λειτουργία τους όσο και το φαινότυπο τους. Η επαγωγή κυττάρων με LPS μελετήθηκε για 24 ώρες. Η συγκέντρωση των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκε ήταν $28*10^6$ cells/ml και η αντίστοιχη συγκέντρωση λιποπολυσακχαρίτη (LPS) ήταν 500ng/ml. Ο λιποπολυσακχαρίτης, προστέθηκε κατά την έναρξη της καλλιέργειας, στο θρεπτικό υλικό των κυττάρων και μέχρι το πέρας της καλλιέργειας, δεν έγινε ανανέωση του θρεπτικού υλικού. Μετά το πέρας της καλλιέργειας, τα κύτταρα BV-2 συλλέχθηκαν και υποβλήθηκαν σε κυτταρική λύση σε διάλυμα ομογενοποίησης 1ml, σε πάγο. Στη συνέχεια, το ομογενοποίημα αυτό χρησιμοποιήθηκε για την ανοσοκατακρήμνιση της πρωτεΐνης CD74, με σφαιρίδια. Το πρωτεϊνικό εκχύλισμα που προέκυψε, ποσοτικοποιήθηκε με τη μέθοδο Lowry.

| | |
|---|---|
| CD74 isolated homogenate | 0,42mg/ml |

### 4.3.4 Μελέτη απομόνωσης CD74 πρωτεΐνης από εκχύλισμα κυττάρων BV-2 και διερεύνηση πιθανού συμπλόκου CD74-MIF, με χρήση ανοσοδοκιμασίας ELISA

Το ομογενοποίημα απομόνωσης CD74 (0,42mg/ml) που προέκυψε, υποβλήθηκε σε ανοσοδοκιμασία Elisa, για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση άλλων πιθανών πρωτεϊνών που ενδεχομένως να σχηματίζουν πρωτεϊνικό σύμπλοκο με τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη (CD74). Οι πρωτεΐνες που ελέγχθηκαν, ήταν οι παράγοντες MIF και Mac-1. Στο **γράφημα 4.3.4.1**, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ποσοτικοποίησης αυτών των πρωτεϊνών.




**Γράφημα 4.3.4.1**: Ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών MIF, CD74 και Mac-1 από ομογενοποίημα απομονωμένου CD74. In vitro καλλιέργεια κυττάρων BV-2 κυττάρων, παρουσία LPS (500ng/ml). Το πρωτόκολλο καλλιέργειας διήρκησε 24 ώρες. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με την ανοσοδοκιμασία ELISA. Ο άξονας y παρουσιάζει την % αύξηση της απορρόφησης σε σχέση με το διαλύτη των δειγμάτων (coating buffer) που λειτουργεί ως δείγμα ελέγχου.

# 5. Συζήτηση

Το ανοσοποιητικό σύστημα, ως γνωστόν, αποτελεί ένα πολύπλοκο λειτουργικά σύστημα με ευέλικτη αρχιτεκτονική και βέλτιστα αντανακλαστικά, το οποίο «απλώνει» τις διασυνδέσεις του σε όλους τους εύπλαστους ιστούς, διασφαλίζοντας μία λειτουργική ομοιόσταση και προστασία από παθογόνα. Διαθέτει την ικανότητα να απωθεί τους παθογόνους οργανισμούς που προκαλούν ασθένειες και ανταποκρίνεται σε τραυματισμό. Υπόκειται σε αυστηρή ρύθμιση ενώ η βάση της ρύθμισης αυτής είναι η ικανότητα του να διαχωρίζει τα στοιχεία του μη-εαυτού από τον εαυτό. Αποτελείται από ειδικά κύτταρα με εξειδικευμένες λειτουργίες, ικανά προς τη διατήρηση ενός αρχείου μνήμης, για την εισβολή παθογόνων ενώ παράλληλα συντονίζουν τις διαδικασίες της ανοσοαπόκρισης, μέσω της χρήσης σηματοδοτικών μορίων.

Δεν θα ήταν υπερβολικό να εκφράσουμε ότι το ανοσοποιητικό σύστημα ισορροπεί σε ένα λεπτό σχοινί, μεταξύ της δημιουργίας ανοσολογικών αποκρίσεων έναντι παθογόνων και της ανοχής σε στοιχεία του «εαυτού», με σκοπό να διατηρήσει την ομοιόσταση του. Πρόσφατα, έχει ευρέως αναγνωριστεί πως τα σήματα από τα στοιχεία του εαυτού παίζουν βασικό ρόλο στην βιολογία των ώριμων Τ-λεμφοκυττάρων της περιφέρειας καθώς η απουσία αντίδρασης σε αυτοαντιγόνα είναι μία ενεργή διαδικασία που πραγματοποιείται σε συνθήκες μη φλεγμονώδεις. Η διαταραχή της ισορροπίας αναγνώρισης ξένου αντιγόνου/αυτοαντιγόνου όπως π.χ., η έλλειψη ανοσολογικών αποκρίσεων (ανοσοανεπάρκεια), ή η απάντηση έναντι στοιχείων «εαυτού» (αποτέλεσμα της ενεργοποίησης αυτοδραστικών Τ-λεμφοκυττάρων ή βλάβη των υγιών κυττάρων από τους ανοσολογικούς μηχανισμούς, που κινητοποιούνται για τον περιορισμό ενός εξωγενούς αντιγόνου ή κάποιου όγκου) οδηγούν σε παθολογικές καταστάσεις και συχνά σε ασθένεια.

Από την άλλη πλευρά, το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ), αποτελεί ένα προνομιούχο ανατομικά σύστημα, το οποίο χρήζει προστασίας τόσο από τον εξωτερικό κόσμο όσο και από το εσωτερικό περιβάλλον του σώματος προκειμένου να προστατεύεται μηχανικά και μηχανιστικά (μολυσματικά ή τοξικά αίτια). Παρά την προστατευόμενη δομή του, το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) καλείται να συλλέξει πληροφορίες από το εξωτερικό περιβάλλον με τη βοήθεια των αισθήσεων σε συμφωνία με το εσωτερικό περιβάλλον, προκειμένου να συντονίσει συμπεριφορικές και νευροενδοκρινικές διαδικασίες και να διασφαλίσει τη βέλτιστη λειτουργία και επιβίωση. Σύνολα πληροφοριών του εσωτερικού περιβάλλοντος, είναι δυνατόν να μεταφέρονται μέσω του περιφερικού νευρικού συστήματος το οποίο προβάλει αισθητήρια και κινητικά μηνύματα από το ΚΝΣ φθάνοντας μέχρι τα εσωτερικά όργανα, τους σκελετικούς μύες ακόμα και στη επιφάνεια του σώματος. Από τη δεκαετία του 1980, συσσωρεύονται στοιχεία που αποδεικνύουν μια αμφίδρομη ροή πληροφοριών μεταξύ του ΚΝΣ και του ανοσοποιητικού συστήματος, η οποία μπορεί να παράσχει πρόσθετες πληροφορίες και γνώση σχετικά με την κατάσταση του εσωτερικού περιβάλλοντος. Τα τελευταία χρόνια, η θεωρία που περιγράφει ότι το ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί να θεωρηθεί ως ένα αισθητικό όργανο που ανιχνεύει τους παθογόνους παράγοντες, τον τραυματισμό των ιστών στο εσωτερικό περιβάλλον και σηματοδοτεί την παρουσία τους στο ΚΝΣ μέσω της ανοσοαπόκρισης, συγκεντρώνει όλο και περισσότερο επιστημονικό ενδιαφέρον.

Προσφάτως, κάτι που απέκτησε ευρεία αποδοχή, είναι η παραδοχή ότι υπάρχει μία αμοιβαία ρύθμιση μεταξύ του κεντρικού νευρικού και του ανοσοποιητικού συστήματος μέσω της οποίας, το ΚΝΣ σηματοδοτεί το ανοσοποιητικό σύστημα μέσω ορμονικών και νευρικών οδών ενώ το ανοσοποιητικό σύστημα, σηματοδοτεί το ΚΝΣ μέσω των κυτοκινών. Ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες όπως η ομάδα του Benveniste και εκείνη του Frei, έδειξαν ότι η μικρογλοία τρωκτικών και τα αστροκύτταρα, εκφράζουν μόρια του μείζονος συμπλόκου ιστοσυμβατότητας (MHC) τάξης 1 και τάξης 2, κάνουν αντιγονοπαρουσίαση και επιπλέον εκκρίνουν κυτοκίνες όπως η ιντερλευκίνη 1, η ιντερλευκίνη 2 και ο παράγοντας νέκρωσης όγκου-α [110][65]. Σε άλλες σειρές πειραμάτων ο Perry και ο Gordon έδειξαν ότι, όπως τα μονοπύρηνα φαγοκύτταρα που προέρχονται από το μυελό των οστών, έτσι και τα μικρογλοιακά κύτταρα, με το κατάλληλο ερέθισμα μπορούν αν μετατραπούν σε μακροφάγα και να εκφράσουν υποδοχείς Fc και C3 [63] . Με αυτό τον τρόπο, τα κύτταρα της γλοίας μπορούν να υιοθετήσουν και να ενισχύσουν τους μηχανισμούς ανοσοαπόκρισης, τοπικά εντός του ΚΝΣ. Άλλες ερευνητικές μελέτες επιβεβαιώνουν την παρουσία λεμφοκυττάρων και την έκφραση μορίων του MHC, σε ασθένειες όπως η σκλήρυνση κατά πλάκας (MS), η μετεγχειρητική εγκεφαλομυελίτιδα, η ιική εγκεφαλίτιδα και πειραματικά μοντέλα ανοσοδιαμεσολαβούμενων νευρολογικών ασθενειών [111–113].

Προσπαθώντας να κατανοήσουμε την συνεργατικότητα και τη διαφορετική δυναμική των δύο αυτών συστημάτων σε καταστάσεις ασθένειας και μη, ήρθε για να προστεθεί ακόμα μία πληροφορία που αυξάνει το επίπεδο πολυπλοκότητας των μηχανισμών αυτών. Πρόκειται, για το εντερικό νευρικό σύστημα, το οποίο είναι πολύπλοκο τόσο σε δομή του όσο και σε αρχιτεκτονική. Όπως αναφέρεται και πιο πάνω (**παράγραφος 2.8**), το ΕΝΣ διαθέτει πληθώρα νευρώνων και γλοιακών κυττάρων που παρουσιάζονται με τη μορφή πλέγματος, στο μυεντερικό τοίχωμα [74]. Σύμφωνα με ερευνητικές μελέτες αποτελεί ένα σύνθετο δίκτυο που ελέγχει τη γαστρεντερική κινητικότητα, την έκκριση, την πρόσληψη θρεπτικών ουσιών, τη ροή αίματος και τις ανοσολογικές και φλεγμονώδεις διεργασίες [75–77]. Επομένως, γίνεται αντιληπτό πως αποτελεί ένα ακόμα σημείο συνάντησης του ανοσοποιητικού και του νευρικού συστήματος.

Πρόσφατη μελέτη της Wunsch και συνεργατών, φωτίζει ακόμα περισσότερο το πεδίο γνώσεων μας για το εντερικό νευρικό σύστημα, και αυτή τη φορά υποδεικνύοντας την εμπλοκή του ακόμα και σε αυτοάνοσα νοσήματα όπως αυτό της σκλήρυνσης κατά πλάκας [114]. Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με αυτή τη μελέτη, ο εκφυλισμός του ENS προηγήθηκε της οποιαδήποτε βλάβης στο ΚΝΣ, ενώ παράλληλα η παθολογία διαμεσολαβήθηκε από αυτό-αντισώματα που ανιχνεύθηκαν στο ορό πειραματικών ποντικιών. Επιπλέον, παρατηρήθηκε έντονη ενεργοποίηση της γλοίας όπως και απώλεια νευρικών κυττάρων [114].

Ο σκοπός αυτής της εργασίας ήταν να μελετηθεί η απόκριση του ανοσοποιητικού και του εντερικού νευρικού συστήματος, σε ένα ζωικό μοντέλο εντερομυελίτιδας το οποίο προκλήθηκε με σπάσιμο της ανοχής, με αυτό-αντιγόνο. Το αυτό-αντιγόνο που χρησιμοποιήθηκε ήταν εκχύλισμα εγκεφάλου, ίδιου είδους με αυτό που μελετήθηκε (πειραματικά ποντίκια Balb/c), το οποίο βρίθει σε πρωτεΐνη PLP. Μία πρωτεΐνη που μαζί με άλλες (MBP, MOG) αποτελούν τον κύριο «στόχο» των μακροφάγων κατά τις διαδικασίες απομυελίνωσης των νευρώνων του Κεντρικού Νευρικού

Συστήματος (ΚΝΣ), που συναντάται στο αυτοάνοσο νευροεκφυλλιστικό νόσημα της σκλήρυνσης κατά πλάκας (ΣΚΠ). Οι πειραματικές προσεγγίσεις για την ανίχνευση της αυτό-ανοσοαπόκρισης ήταν ποικίλες. Αρχικά, μελετήθηκε η παραγωγή αυτό-αντισωμάτων, καθώς και η έκκριση χαρακτηριστικών κυτοκινών που σηματοδοτούν την ανοσολογική αντίδραση. Παράλληλα, διερευνήθηκε το πρότυπο ποσοτικής έκφρασης λεμφοκυτταρικών πληθυσμών, όπως και τα επίπεδα έκφρασης της ενεργοποιημένης μικρογλοίας του εντέρου. Επιπλέον, επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη αυτό-αντισωμάτων και άρα φλεγμονής, προχωρήσαμε στην εφαρμογή πιθανής θεραπευτικής στρατηγικής με διαλυτά μόρια τάξης 2 (soluble-MHCII molecules), τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί και στο παρελθόν σε αντίστοιχη περίπτωση αυτό-ανοσοαπόκρισης (αυτοάνοσος συστηματικός ερυθηματώδης λύκος –SLE), [115–118]. Τέλος, μελετώντας τη κυτταρική σειρά BV-2 (*in vitro* μοντέλο για τη μελέτη της μικρογλοίας) και διεγείροντάς τη προς ενεργοποίηση με τον λιποπολυσακχαρίτη (LPS), αναζητήσαμε τον πιθανό ρόλο του συμπλόκου MIF-CD74, στη μη-επιδείνωση της αυτό-ανοσοαπόκρισης.

## 5.1 Η επίδραση της πρωτεΐνης πρωτεολιπιδικής μυελίνης (PLP) στο ανοσοποιητικό σύστημα, in vitro

Το εκχύλισμα εγκεφάλου που παράγχθηκε από φρέσκο ιστό εγκεφάλου πειραματικών ποντικιών Balb/c, χρησιμοποιήθηκε ως πηγή, της άφθονης στο ιστό [82], πρωτεΐνης PLP. Όπως αναφέρθηκε και στη **παράγραφο 2.9**, πρόκειται για μία εξαιρετικά συντηρημένη υδρόφοβη πρωτεΐνη, με 276-280 αμινοξέα (τέσσερα διαμεμβρανικά τμήματα και δύο δισουλφιδικούς δεσμούς). Το εκχύλισμα αυτό, αποτέλεσε μία πηγή αυτό-αντιγόνου και χρησιμοποιήθηκε για τη διερεύνηση της επίδρασης του, στο ίδιο το ανοσοποιητικό σύστημα. Γνωρίζοντας την ιστολογική έκφραση της πρωτεΐνης PLP, η οποία εκτείνεται χωρικά μόνο στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα, εξαιτίας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, θελήσαμε να μελετήσουμε την απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος απέναντι σε ένα στοιχείο του εαυτού, που ωστόσο, το ανοσοποιητικό σύστημα και τα εξειδικευμένα κύτταρα του δεν είχαν συναντήσει ποτέ. Το εγκεφαλικό εκχύλισμα εκτέθηκε σε πρωτογενή κύτταρα του ανοσοποιητικού, κύτταρα σπλήνας πειραματικών ποντικιών Balb/c, in vitro. Για την καλύτερη χαρτογράφηση της συμπεριφοράς του συγκεκριμένου υλικού προς το ανοσοποιητικό σύστημα, χρησιμοποιήθηκαν δοκιμαστικά διαφορετικές συγκεντρώσεις του, ώστε να μπορούμε να παρακολουθήσουμε πιο στενά και ελεγχόμενα το φαινόμενο αυτό. Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν απλές καλλιέργειες σπλενικών κυττάρων στις οποίες προστέθηκε το εκχύλισμα σε διάφορες δόσεις. Μετά το πέρα της καλλιέργειας (72 ώρες), τα κύτταρα της καλλιέργειας υποβλήθηκαν σε μελέτη ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Όπως περιγράφεται και στη **παράγραφο 4.1.1**, μόνο μία από τις πειραματιζόμενες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος, φάνηκε να ερεθίζει το κύτταρα του ανοσοποιητικού προς πολλαπλασιασμό. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο **διάγραμμα 4.1.1**, υποδεικνύουν ότι η συγκέντρωση 50μg/ml, είναι εκείνη που ενεργοποιεί τα κύτταρα σπλήνας προς πολλαπλασιασμό. Βιβλιογραφικά, το συμπέρασμα αυτό επεξηγείται ως η συγκέντρωση που κάνει το ανοσοποιητικό σύστημα να αντιμετωπίζει το στοιχείο αυτό ως αντιγόνο, προκαλώντας έτσι την ενεργοποίηση των πρώτων μηχανισμών για την

ανοσολογική απόκριση, οδηγώντας στην ανασυγκρότηση του ανοσοποιητικού για την αντιμετώπιση αντιγόνου, μέσω του πολλαπλασιασμού των κυττάρων του. Πιο ειδικά, πρόκειται για τη συγκέντρωση αυτό-αντιγόνου που «βραχυκυκλώνει» τον μηχανισμό της ομοιόστασης και της ανοχής, με αποτέλεσμα ένα στοιχείο του εαυτού να το αντιμετωπίζει ως ξένο. Ο πολλαπλασιασμός των λεμφοκυττάρων, αποτελεί έναν ασφαλή δείκτη, για την ύπαρξη ανοσοαπόκρισης, κάτι που επιβεβαιώνεται και από πλήθος ερευνητικών μελετών [119–122].

Στη συνέχεια, ακολουθώντας το ίδιο πρωτόκολλο καλλιέργειας, για 7 ημέρες (χρονικό διάστημα ικανό για την ανίχνευση ανοσολογικής απόκρισης), θελήσαμε να εξετάσουμε το πρότυπο έκφρασης λεμφοκυτταρικών πληθυσμών όπως και την έκκριση κυτοκινών IL-2 και TNF-α. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών, που παρουσιάζονται στα **διαγράμματα 4.1.2, 4.1.3, 4.1.4** για τους λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς και στα **διαγράμματα 4.1.7 και 4.1.8** για την έκκριση κυτοκινών, παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για τον τρόπο επίδρασης του εγκεφαλικού εκχυλίσματος στα σπλενικά κύτταρα. Έχοντας αποκτήσει μία πρώτη εικόνα για το πώς συμπεριφέρεται το αυτοαντιγόνο, δοκιμάσαμε διαβαθμίσεις της συγκέντρωσής του, ωστόσο όμως, εστιαστήκαμε περισσότερο για το πως δρα στη συγκέντρωση των 50μg/ml, μίας και ήδη τα αποτελέσματα των προηγούμενων πειραμάτων κράτησαν εκεί την προσοχή μας. Συγκεκριμένα, παρατηρούμε αυξημένα επίπεδα έκφρασης για τα CD4+ (27,8%) και τα CD8+ (47,97%) κύτταρα, ενώ τα επίπεδα για τα CD19+ κύτταρα, είναι ιδιαιτέρως χαμηλά (10,02%). Αξίζει να σημειωθεί, πως τα επίπεδα CD8+ κυττάρων ήταν τα υψηλότερα σε σχέση με τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις, όπως και τα επίπεδα των CD19+ κυττάρων, ήταν τα χαμηλότερα. Συνδυάζοντας τα αποτελέσματα έκκρισης κυτοκινών, συμπεραίνουμε πως τα ιδιαίτερα υψηλά ποσοστά έκφρασης ιντερλευκίνης 2 (IL-2) στα 144,5% και τα αντίστοιχα χαμηλά του TNF-α στα 84% (κατά το ήμισυ σχεδόν μικρότερη έκφραση από την ιντερλευκίνη 2), συνάδουν με τα αποτελέσματα έκφρασης λεμφοκυτταρικών πληθυσμών.

Η IL-2 έχει εδώ και χρόνια αναγνωριστεί για τον ρόλο της στην ενίσχυση του πολλαπλασιασμού των Τ-λεμφοκυττάρων. Ανήκει στις ανοσορυθμιστικές κυτοκίνες, εκκρίνεται από τα CD4+ κύτταρα και συνδέεται με την επαγωγή της ανοσολογικής απόκρισης. Οι παραπάνω προτάσεις επιβεβαιώνονται από πληθώρα δημοσιεύσεων [123–126]. Επομένως, τα υψηλά ποσοστά έκφρασής της που σημειώνονται στη συγκέντρωση των 50μg/ml, συνιστούν μία απόδειξη για την πρόκληση ανοσολογικής αντίδρασης. Επιπλέον, τα αυξημένα επίπεδα CD8+ κυττάρων υποδηλώνουν μία κυτταρική ανοσία, σε συνδυασμό με την ήδη υπάρχουσα χυμική. Ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων α (TNF-α), ανήκει στις προφλεγμονώδεις κυτοκίνες και έχει αντίθετη δράση από την IL-2, κάτι που επιβεβαιώνεται και από τα πειράματα μας. Εφόσον, σημειώνεται μεγάλη αύξηση της IL-2, αναμένεται και μειωμένη έκφραση του TNF-α. Η παρουσία αυτού του αντίθετου προτύπου έκφρασης μεταξύ των δύο κυτοκινών, επιβεβαιώνει την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος προς ανοσοαπόκριση.

Συνεχίζοντας, τα υπερκείμενα των καλλιεργειών εκτός από τη μελέτη έκκρισης κυτοκινών, διερευνήθηκαν και για την ανίχνευση πιθανών αντισωμάτων, ειδικών και μη-ειδικών. Έχοντας ήδη στοιχεία για την ενεργοποίηση ανοσολογικής απόκρισης, χυμικής και κυτταρικής, έμενε να επιβεβαιώσουμε και την παραγωγή αντισώματος. Τα διαγράμματα **4.1.5 και 4.1.6,** παρουσιάζουν

αυτή την πληροφορία. Συγκεκριμένα, παρατηρούμε πως στη συγκέντρωση των 50μg/ml, παράγεται ειδικό αντίσωμα που μάλιστα ποσοτικά, έχει την υψηλότερη τιμή σε σχέση με τις υπόλοιπες συνθήκες. Η αυξημένη παραγωγή αντισώματος σε συνδυασμό με τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης CD19+ κυττάρων (δείκτη για τα Β λεμφοκύτταρα), κάνει την παρατήρηση μας αντιφατική. Ωστόσο, γνωρίζουμε ήδη από τη βιβλιογραφία ότι, όταν τα Β λεμφοκύτταρα παράγουν αντισώματα, διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα, χάνοντας έτσι κάποιους από τους επιφανειακούς δείκτες τους. Ένας από αυτούς είναι και ο CD19 [127–130]. Επομένως, αυτό όχι μόνο κάνει τα αποτελέσματά μας να συνάδουν με τη βιβλιογραφία, αλλά επίσης αποτελεί και μία επιβεβαίωση ότι στις υπόλοιπες συγκεντρώσεις τους αυτό-αντιγόνου που χρησιμοποιήθηκαν, τα Β λεμφοκύτταρα δεν έφτασαν ποτέ στο τελικό στάδιο τους πλασματοκυττάρου, για την παραγωγή αντισώματος, κάτι που στηρίζει ακόμα περισσότερο το επιχείρημα ότι η συγκέντρωση των 50μg/ml είναι η πλέον ενεργοποιητική, σε σχέση με τις υπόλοιπες.

## 5.2 Η επίδραση της πρωτεΐνης πρωτεολιπιδικής μυελίνης (PLP) σε ανοσοποιημένα πειραματικά ποντίκια Balb/c, in vivo

Τα πειραματικά μοντέλα ζώων έχουν προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για τους μηχανισμούς εκδήλωσης και δράσης ασθενειών, για την κατανόηση των μηχανισμών αυτών στον άνθρωπο και τις πιθανές θεραπείες. Σε όλους τους σχετικούς τομείς έρευνας, τα πειραματικά μοντέλα ζώων, αποτελούν ένα πολύτιμο εργαλείο. Σχετικά με τη μελέτη της αυτοανοσία, μπορεί και αναπτύσσεται αυθόρμητα σε συγκεκριμένα ομομικτικές φυλές ζώων, αλλά μπορεί επίσης να επαγχθεί έπειτα από συγκεκριμένους πειραματικούς χειρισμούς, **πίνακας 5.2.** Τα νοσήματα που περιγράφονται στο πίνακα 5.2, μπορεί να προκληθούν ενύοντας σε κατάλληλα ζώα τα συγκεκριμένα αντιγόνα με πλήρες ανοσοενισχυτικό του Freund, εκτός από τον αυτοάνοση αρθρίτιδα (Ανοσολογία, Kindt, Goldsby, Osborne, 2nd edition, 2013). Αυτοάνοσες δεισλειτουργίες παρόμοιες με συγκεκριμένα ανθρώπινα αυτοάνοσα νοσήματα μπορούν να προκληθούν πειραματικά. Ένα από τα πρώτα τέτοια ζωικά μοντέλα ανακαλύφθηκε το 1973, για τη μυασθένεια του Gravis.

| Ζωικό μοντέλο | Πιθανό ανθρώπινο νόσημα | Αντιγόνο που επάγει τη νόσο | Ασθένεια που μεταφέρεται από Τ κύτταρα |
|---|---|---|---|
| ΑΥΘΟΡΜΗΤΑ ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ | | | |
| Μη παχύσαρκο διαβητικό (NOD) ποντίκι | Ινσουλινο-εξαρτώμενος σακχαρώδης διαβήτης (IDDM) | Άγνωστο | Ναι |
| (NZB × NZW)$F_1$ ποντίκι | Συστηματικός ερυθηματώδης λύκος (SLE) | Άγνωστο | Ναι |
| Φυλή παχύσαρκων ορνίθων | Θυρεοειδίτιδα Hashimoto | Θυρεοσφαιρίνη | Ναι |
| ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΕΠΑΓΟΜΕΝΑ ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ* | | | |
| Πειραματική αυτοάνοση μυασθένεια gravis (EAMG) | Μυασθένεια gravis | Υποδοχέας ακετυλοχολίνης | Ναι |
| Πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα (EAE) | Σκλήρυνση κατά πλάκας (MS) | Βασική πρωτεΐνη της μυελίνης (MBP), πρωτεολιπιδική πρωτεΐνη (PLP) | Ναι |
| Αυτοάνοση αρθρίτιδα (AA) | Ρευματοειδής αρθρίτιδα | *M. tuberculosis* (πρωτεογλυκάνες) | Ναι |
| Πειραματική αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα (EAT) | Θυρεοειδίτιδα Hashimoto | Θυρεοσφαιρίνη | Ναι |

**Πίνακας 5.2:** Πειραματικά ζωικά μοντέλα για αυτοάνοσα νοσήματα (Ανοσολογία, Kindt, Goldsby, Osborne, 2nd edition, 2013)

Η πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) είναι ένα από τα καλύτερα μελετημένα ζωικά μοντέλα αυτοάνοσης νόσου [22–24,26,30,34,131,132]. Η EAE, μεσολαβείται αποκλειστικά από Τ-κύτταρα και επάγεται σε διάφορα είδη ζώων μετα την ανοσοποίηση τους με τη βασική πρωτεΐνη της μυελίνης (MBP), την myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) ή την πρωτεολιπιδική πρωτεΐνη (PLP), με πλήρες ανοσοενισχυτικό του Freund [23,25,29,34,35,133,134]. Η πρώτη αναφορά για το συγκεκριμένο αυτοάνοσο ζωικό μοντέλο, περιγράφηκε το 1933 από τους Rivers et al., και μάλιστα σε πρωτεύοντα [135]. Αξίζει να σημειωθεί, πως η συνεισφορά της επιστημονικής ομάδας του Lassmann, υπήρξε σημαντική τόσο για την κατανόηση του μοντέλου όσο και για την εφαρμογή θεραπειών [17–22,71]. Το μοντέλο της EAE στα ποντίκια, παρέχει ένα σύστημα ελέγχου των θεραπειών για την ανθρώπινη ΣΚΠ.

Επιβεβαιώνοντας, ότι το εγκεφαλικό εκχύλισμα από ποντίκια Balb/c, επιδρά σε πρωτογενή κύτταρα σπλήνας ποντικιών Balb/c, ενεργοποιητικά, καταφέρνοντας να σπάσει την ανοχή, σε συγκεκριμένη συγκέντρωση (50μg/ml), αναγνωρίζοντας έτσι ένα στοιχείο του εαυτού ως αντιγόνο, θελήσαμε να μεταβούμε σε in vivo κατάσταση για να μελετήσουμε και εκεί το αυτό-αντιγόνο. Τα πειραματικά ποντίκια Balb/c, χρησιμοποιήθηκαν για αυτό το σκοπό. Αν και η πλειονότητα της βιβλιογραφίας προσανατολίζεται για τις μελέτες αυτές σε ποντίκια C57BL/6 και αρουραίους DA (dark Agouti), παρόμοια αναγωγή της νόσου έχει πραγματοποιηθεί και παρελθοντικά στα ποντίκια Balb/c [35]. Για την αναγωγή από in vitro σε in vivo, τα ποντίκια ενέθηκαν με τη συγκέντρωση ενεργοποίησης in vitro επί δέκα (500μg/ποντίκι), σε συνδυασμό με πλήρες ανοσοενισχυτικό του Freund. Το πρωτόκολλο διήρκησε 8 εβδομάδες, όπου κατά τη διάρκεια τους, δείγμα ορού συλλέγονταν και μελετούνταν για την ύπαρξη αντισωμάτων, ειδικών και μη-ειδικών. Η ύπαρξη αντισώματος στα ζώα, όπως και στην in vitro κατάσταση, υποδεικνύει την ύπαρξη ανοσολογικής αντίδρασης του εαυτού προς στοιχείο του εαυτού, δηλαδή μία αυτοανοσία χαρακτηριζούμενη από την παραγωγή αυτοαντισωμάτων. Τα **διαγράμματα 4.2.1.3, 4.2.1.4, 4.2.1.5** και **4.2.1.6,** συνοψίζουν τα αποτελέσματα αυτά, δείχνοντας ξεκάθαρη παραγωγή αντισωμάτων, τόσο ειδικών όσο και μη-ειδικών, στο ορό του αίματος ανοσοποιημένων ποντικιών Balb/c. Η παραγωγή των αντισωμάτων ιδιαίτερα των ειδικών, ακολουθεί μία ανοδική πορεία, υποδεικνύοντας έτσι και την πορεία της ανοσολογικής αντίδρασης, στο βάθος χρόνου των 8 εβδομάδων.

Την 6η εβδομάδα του in vivo πρωτοκόλλου, χορηγήθηκε στα μισά ποντίκια (x3), ποσότητα διαλυτών μορίων τάξης 2. Τα διαλυτά μόρια τάξης 2 (s-MHCII molecules), απομονώθηκαν από τον ορό κοντρόλ ποντικιών, του ίδιου είδους Balb/c. Προηγούμενες ερευνητικές μελέτες του ίδιου εργαστηρίου για το αυτοάνοσο νόσημα του συστηματικού ερυθηματώδη λύκου (SLE), υποδεικνύουν τη συγκεκριμένη προσέγγιση ως θεραπευτική [115–118]. Αναφορικά, τα διαλυτά μόρια τάξης 2, δρούν κατασταλτικά προς CD4+ πληθυσμούς Τ-κυττάρων [118], ενώ σε in vivo καταστάσεις παίζουν πρωταγωνιστικό ρόλο για τη μείωση ειδικών αντιγονικών αντισωμάτων [118]. Για τη περίπτωση του αυτοάνοσου ερυθηματώδη λύκου (SLE), τα διαλυτά μόρια τάξης 2, είναι υπεύθυνα για την μείωση των ειδικών αντισωμάτων και για την καταστολή του επιβαρυμένου φανοτύπου [115,116]. Η μείωση των ειδικών αντισωμάτων στα ανοσοποιημένα ζώα που ενέθηκαν με διαλυτά μόρια τάξης 2, συνάδει με τις προαναφερθείσες ερευνητικές μελέτες, και για τη δική μας προσέγγιση ανοσοαπόκρισης σε αυτό-αντιγόνο.

Η μείωση παραγωγής ειδικών αντισωμάτων που σημειώθηκε στα ποντίκια που χορηγήθηκαν με διαλυτά μόρια τάξης 2, ήταν μία πρώτη ένδειξη της κατασταλτικής δράσης των μορίων αυτών. Σημειώνεται πως τα ποντίκια που δεν ενέθηκαν με τα μόρια αυτά, συνέχισαν να παρουσιάζουν ανοδική πορεία στη παραγωγή ειδικού και μη-ειδικού αντισώματος. Θέλοντας να επιβεβαιώσουμε και με άλλο τρόπο τη δράση των διαλυτών, πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις στα επίπεδα έκφρασης των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών, για όλα που συμμετείχαν στα in vivo πειράματα. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών παρουσιάζονται στα **διαγράμματα 4.2.2.1** και **4.2.2.2.** τα αποτελέσματα αυτά διαμορφώνουν μία σαφή εικόνα για την δράση των διαλυτών. Πιο ειδικά, τα ζώα που δεν ενέθηκαν με διαλυτά μόρια τάξης 2, εκτός του ότι παρουσιάζουν συνεχόμενη παραγωγή αντισώματος, ταυτόχρονα δείχνουν, υψηλότερα επίπεδα CD11, CD19 και CD28 κυττάρων σε σχέση με τα λεμφοκύτταρα των ζώων που υποβλήθηκαν σε θεραπευτική στρατηγική με διαλυτά. Η αυξημένα επίπεδα CD11 κυττάρων, υποδηλώνουν την παρουσία μακροφάγων που έχουν ενεργοποιηθεί εξαιτίας της ανοσολογικής αντίδρασης, ενώ η έκφραση CD19 κυττάρων μας δείχνει την παρουσία Β λεμφοκυττάρων. Αδιαμφισβήτητα, η αυξημένη παραγωγή αντισώματος υποδηλώνει και την ύπαρξη πλασματοκυττάρων. Συνδυάζοντας τη παρουσία CD19 πληθυσμού και την αυξανόμενη παραγωγή αντισώματος (πλασματοκύτταρα που χάνουν τον δείκτη CD19), θα μπορούσε κανείς να πει πως υπάρχει μία συνεχής ανατροφοδότηση σε Β κύτταρα. Ενδιαφέρον προκαλεί και τα υψηλά επίπεδα έκφρασης του CD28 για την περίπτωση των ζώων που δεν ενέθηκαν με διαλυτά MHC. Ο CD28, θεωρείται πως επάγει την ανοσολογική απόκριση όταν εκφράζεται, ενισχύοντας έτσι τον πολλαπλασιασμό των CD4+ κυττάρων, όπως επιβεβαιώνουν ο Acuto και ο Michel [136], κάτι που συνάδει και με τα αποτελέσματα μας. Η μελέτη των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών στα ζώα που ενέθηκαν με διαλυτά μόρια τάξης 2, αποκαλύπτει πολύ υψηλά επίπεδα έκφρασης του CTLA-4, σημειώνοντας σχεδόν 50% διαφορά με την αντίστοιχη έκφραση στα ζώα που διατηρήθηκαν χωρίς διαλυτά μόρια τάξης 2 (10%). Αυτή, η παρατήρηση έχει θετικό αντίκτυπο στην πλοκή της ιστορίας καθώς ο CTLA-4, αντίθετα με το CD28, περιορίζει την ενεργοποίηση του Τ-λεμφοκύτταρου ασκώντας πολλαπλές επιδράσεις στη TReg-μεσολαβούμενη καταστολή [137]. Επομένως, η έκφραση του CTLA-4, θεωρείται κρίσιμη στην αρνητική ρύθμιση της ανοσολογικής αντίδρασης. Όλα τα παραπάνω συνιστούν, πως μετά την χορήγηση διαλυτών μορίων τάξης 2 σε ανοσοποιημένα πειραματικά ποντίκια Balb/c, επέρχεται μία αρνητική ρύθμιση της ανοσολογικής αντίδρασης, δηλαδή μία καταστολή, η οποία επιβεβαιώνεται τόσο από την πτώση παραγωγής αντισωμάτων όσο και από το πρότυπο έκφρασης των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών στα ζώα αυτά.

Το εντερικό νευρικό σύστημα (ENS), αποτελείται από διάφορους κυτταρικούς πληθυσμούς νευρώνων (neurons, sensory neurosn and interneurons) καθώς και μικρογλοιακά κύτταρα που λειτουργούν προστατευτικά για τους νευρώνες **(παράγραφος 2.8).** Το εντερικό νευρικό σύστημα μπορεί και λειτουργεί αυτόνομα αλλά ωστόσο απαιτούνται και επικοινωνιακές συνδέσεις με το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ), οι οποίες και επιτυγχάνονται μέσω του Vagus nerve [138]. Τα πειράματα ανοσοφθορισμού που πραγματοποιήθηκαν για την ανίχνευση ενεργοποιημένης μικρογλοίας στο μυεντερικό πλέγμα του έντερου ανοσοποιημένων ποντικιών Balb/c, προσέφεραν σημαντικές καινούριες πληροφορίες σχετικά με την αυτό-ανοσοαπόκριση στο αυτό-αντιγόνο, όπως παρουσιάζεται και στο **διάγραμμα 4.3.2.1.** Τα αποτελέσματα αυτά δίνουν μία ξεκάθαρη εικόνα της προκληθείσας ανοσοαπόκρισης, τα οποία έρχονται σε συμφωνία με τις προηγούμενες παρατηρήσεις

μας, όσον αφορά την παραγωγή αντισωμάτων και το πρότυπο έκφρασης των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών. Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση των ανοσοποιημένων ζώων που δεν ενέθηκαν με διαλυτά μόρια τάξης 2, παρατηρείται μία ιδιαίτερα αυξημένη έκφραση του επιφανειακού υποδοχέα CD11b, ο οποίος εκφράζεται κατά παράδοση σε μακροφάγα. Στη περίπτωση μας, αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί ως ενεργοποιημένη μικρογλοία του εντέρου. Η **παράγραφος 2.7** περιγράφει το φαινόμενο ενεργοποίησης της μικρογλοίας σε μακροφάγα. Η έκφραση των μακροφάγων στο μυεντερικό πλέγμα, μία δομή που παρουσιάζει συγκεκριμένους κυτταρικούς πληθυσμούς (νευρώνες και γλοία), παρουσιάζει ένα ιδιαίτερο πρότυπο έκφρασης μακροφάγων: τα ποντίκια που δεν ενέθηκαν με διαλυτά παρουσιάζουν στο μυεντερικό πλέγμα τους μακροφάγα σε ποσοστό 76%, ενώ τα ποντίκια που υποβλήθηκαν σε χορήγηση διαλυτών, εκφράζουν ένα πολύ μικρό ποσοστό μακροφάγων στον ίδιο ιστό, της τάξης του 18,6 %. Αυτή η διαφορά, μας οδηγεί να σκεφτούμε πως είναι πολύ πιθανόν, τα επίπεδα μακροφάγων σε ποντίκια που ενέθηκαν με διαλυτά, να ήταν παρόμοια με αυτά που δεν ενέθηκαν, πριν από τη χορήγηση τους, υπονοώντας πως η δράση των διαλυτών ενδεχομένως να κατέστειλε και την ενεργοποίηση αυτή πέρα από την πτώση των αυτό-αντισωμάτων και την αύξηση του κατασταλτικού παράγοντα CTLA-4, που αναφέρθηκαν πιο πάνω.

Παράλληλα, ενδιαφέρον προκαλεί η έκταση αυτής της ανοσο-απόκρισης μέχρι το μυεντερικό πλέγμα του εντερικού νευρικού συστήματος. Δεν είναι λίγες οι δημοσιεύσεις που σχετίζουν φλεγμονές του εντερικού νευρικού συστήματος με την παθολογική κατάσταση της σκλήρυνσης κατά πλάκας [139,140], καθώς και με το πολύ καλά μελετημένο πειραματικό μοντέλο της, την πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα (ΕΑΕ) [114]. Τόσο η MBP όσο και η PLP εκφράζονται όχι μόνο στο ΚΝΣ, αλλά και στην ΕΝΣ στα εντερικά γλοιακά κύτταρα [114]. Στο ΚΝΣ, MBP και PLP-ειδικά λεμφοκύτταρα προκαλούν φλεγμονή, απομυελίνωση και αξονική βλάβη με αποτέλεσμα την ΕΑΕ [23,25–27,34,110,112,132,135]. Στο εντερικό νευρικό σύστημα ειδικότερα, ειδικά αντισώματα για την PLP δεσμεύονται σε εντερικά κύτταρα γλοίας και προκαλούν κυτταρική βλάβη. Τα ειδικά για τη PLP αντισώματα είναι πιο πιθανό να προκαλέσουν παθολογία, καθώς σε αντίθεση με το MBP, το PLP διαθέτει εξωκυτταρικές επικράτειες.

## 5.3 Η επίδραση του λιποπολυσακχαρίτη (LPS) στην ενεργοποίηση της μικρογλοιακής κυτταρικής σειράς BV-2, in vitro

Η χορήγηση λιποπολυσακχαρίτη (LPS) στο θρεπτικό υλικό της μικρογλοιακής κυτταρικής σειράς BV-2, έχει δράση ενεργοποιητική. Η ενεργοποίηση των κυττάρων αυτών, χαρακτηρίζεται από πολλαπλασιασμό, αυξημένη έκφραση μορίων-δεικτών, όπως τα αντιγόνα του μεγίστου συμπλόκου ιστοσυμβατότητας (MHC molecules), καθώς και από μορφολογικές μεταβολές του φαινοτύπου που ομοιάζει με εκείνο των μακροφάγων, με φαγοκυτταρικές και μεταναστευτικές ιδιότητες [62]. Πλήθος μελετών υποδεικνύουν ότι η ενεργοποιημένη μικρογλοία, παίζει σημαντικό ρόλο στις ανοσολογικές διεργασίες του ΚΝΣ [63]. Αποτελούν φαγοκύτταρα, ανταποκρίνονται σε κυτοκίνες [64], κάνουν αντιγονοπαρουσίαση στα Τ-λεμφοκύτταρα [65] και έχουν έντονη

κυτταροτοξική ικανότητα [66]. Η ενεργοποίηση των κυττάρων BV-2, δοκιμάστηκε για 24 και 48 ώρες. Τα αποτελέσματα των δύο ενεργοποιήσεων συμβαδίζουν καθώς δίνουν την ίδια πληροφορία.

Τα πειράματα ενεργοποίησης κυττάρων BV-2 με λιποπολυσακχαρίτη (LPS), πραγματοποιήθηκαν ως συνέχεια του πειραματικού μοντέλου της αυτοάνοσης εντερομυελίτιδας που περιγράφηκε πιο πάνω σαν προσέγγιση για τη μελέτη του μηχανισμού ενεργοποίησης της μικρογλοίας του εντέρου. Η ενεργοποίηση με λιποπολυσακχαρίτη σε κύτταρα BV-2, αποκαλύπτει αυξημένη έκφραση των μορίων MHCII και MIF ενώ πτώση στον υποδοχέα τους, το CD74, στη μεμβράνη των κυττάρων. Εξετάζοντας, τα υπερκείμενα των καλλιεργειών με άλλη μέθοδο, παρατηρήσαμε αυξημένη έκφραση των μορίων MHCII, MIF, CD74 και του TNF-α στην ενεργοποιημένη κατάσταση. Παρατηρώντας τα αποτελέσματα, ερμηνεύουμε την μειωμένη έκφραση του υποδοχέα CD74 στη μεμβράνη των κυττάρων ως αναμενόμενη, καθώς ο CD74 αποτελεί υποδοχέα και των μορίων τάξης 2 και του MIF, πράγμα που σημαίνει πως ο υποδοχέας CD74, είναι «κατειλημμένος» από τους προσδέτες του. Η αυξημένη έκφραση των προσδετών MIF και μορίων MHCII, επιβεβαιώνει έμμεσα και την ύπαρξη ανάλογης έκφρασης υποδοχέα, δηλαδή CD74. Βιβλιογραφικά, η αντιγονοπαρουσιαστική ικανότητα των μακροφάγων φαίνεται να ενισχύεται από την αύξηση των επιπέδων τάξης II αντιγόνων ιστοσυμβατότητας [64,113,141–143]. Συνεπώς, η αυξημένη έκφραση των μορίων MHCII στην ενεργοποιημένη κατάσταση των κυττάρων BV-2 σε σχέση με την κοντρόλ κατάσταση, επιβεβαιώνει και την επιτυχή διαφοροποίηση των κυττάρων αυτών στην ενεργοποιημένη τους μορφή. Οι Imamura et al. [64], στο άρθρο τους για την κατανομή των μορίων τάξης 2 και την έκκριση κυτοκινών σε εγκεφάλους ασθενών που πάσχουν από την ασθένεια του Parkinson, αναφέρουν την αυξημένη έκκριση του παράγοντα TNF-α από την ενεργοποιημένη μικρογλοία, κάτι που επιβεβαιώνει και το ανάλογο προφίλ έκκρισης του TNF-α, στα υπερκείμενα καλλιεργειών ενεργοποιημένων κυττάρων BV-2, στα πειράματα μας.

Χαμηλή έκφραση του MIF ανιχνεύεται στο υγιές ΚΝΣ. Ωστόσο, η έκκριση του αυξάνεται δραματικά στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, ως απόκριση σε φλεγμονώδη ερεθίσματα [101]. Συγκεκριμένα, επάγοντας νευροφλεγμονή με λιποπολυσακχαρίτη (LPS), η έκφραση MIF εντοπίζεται σε μονοκύτταρα και μακροφάγα, υποδηλώνοντας έτσι ότι η μικρογλοία αποτελεί σημαντική πηγή MIF κατά τη διάρκεια της φλεγμονής [101]. Στην ΣΚΠ, ανιχνεύθηκαν αυξημένα επίπεδα MIF στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό των ασθενών που υποτροπίασαν με σκλήρυνση κατά πλάκας, σε σχέση με τα δείγματα που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια της ύφεσης [107]. Δεδομένης της σύνδεσης του MIF με την κλινική επιδείνωση της ΣΚΠ και των ιδιοτήτων ενεργοποίησης των μακροφάγων, προτείνεται ότι ο MIF μπορεί να ενισχύσει το φλεγμονώδες πλαίσιο της ΣΚΠ. Η έλλειψη MIF, που επιτυγχάνεται είτε με γενετική διαγραφή είτε με εξουδετέρωση του Ab, έχει ως αποτέλεσμα την προστασία από κλινική νόσο ΕΑΕ [109,144,145].

Προχωρώντας, πραγματοποιώντας ανοσοκατακρήμνιση με σφαιρίδια απομονώθηκε ο υποδοχέας CD74, από ομογενοποίημα κυττάρων BV-2 ενεργοποιημένα με LPS. Η μελέτης της απομόνωσης του υποδοχέα CD74, όπως περιγράφεται και στο **διάγραμμα 4.3.4.1**, αποκάλυψε της παρουσία επιπλέον πρωτεϊνών MIF και Mac-1 (δείκτης για μακροφάγα), κάτι που ενδεχομένως οφείλεται στο σχηματισμό συμπλόκου με τον υποδοχέα CD74. Η έκφραση του MIF έναντι της αντίστοιχης CD74, εμφανίζεται ως υπερδιπλάσια κάτι που δικαιολογείται καθώς ο παραγοντας MIF οργανώνεται σε τριμερές (**εικόνα 2.14**).

Συμπερασματικά, μέσω της ενεργοποίησης της μικρογλοίας με LPS, προκαλούμε την αύξηση του παράγοντα MIF και συνεπώς μειώνουμε τα επίπεδα του ελεύθερου CD74, τα οποία είναι απαραίτητα για την έκκριση διαλυτών μορίων τάξης 2, φυσιολογικά στον οργανισμό [146]. Ο σχηματισμός συμπλόκου CD74-MIF, αποτελεί ένδειξη του μειωμένου ελεύθερου CD74. Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω [115,117,118], η έκκριση των μορίων τάξης 2 έχει κατασταλτικό χαρακτήρα. Επομένως, επάγοντας την μικρογλοία με LPS, ουσιαστικά μειώνουμε και τα επίπεδα διαλυτών μορίων τάξης 2, που θα θέλαμε να δράσουν θεραπευτικά (κατασταλτικά) για την αυτοάνοση κατάσταση μας, κάτι που επιβεβαιώνεται και από τη διατήρηση της ενεργοποιημένης μικρογλοίας του εντέρου, σε υψηλά ποσοστά, για την περίπτωση των πειραματικών ποντικιών που δεν ενέθηκαν με τα διαλυτά μόρια τάξης 2 (**διάγραμμα 4.2.3.1**).

# 6. Βιβλιογραφία


[1] R. Alam, A BRIEF REVIEW OF THE IMMUNE SYSTEM, 25 (n.d.) 727–738.

[2] L. Van Parijs, Homeostasis and Self-Tolerance in the Immune System: Turning lymphocytes off, 58 (n.d.).

[3] M.D. IAN MACKAY , M.D., AND FRED S. ROSEN, THE IMMUNE SYSTEM First of Two Parts, (2000) 37–49.

[4] P.. David D. Chaplin, M.D., Overview of the Immune Response, 125 (2010). doi:10.1016/j.jaci.2009.12.980.Overview.

[5] J.J. Van Rood, A. Van Leeuwen, P. Medawar, A. Mitchinson, L. Brent, L. Simpson, D. Van Bekkum, Soluble HLA Antigens : How It All Started, 8859 (n.d.).

[6] K. Maenaka, E.Y. Jones, MHC superfamily structure and the immune system, (1999) 745–753.

[7] H.J. Geuze, in MHC class II functioning, 5699 (1998) 282–287.

[8] T. Broeke, R. Wubbolts, W. Stoorvogel, MHC Class II Antigen Presentation by Dendritic Cells Regulated through Endosomal Sorting, (2019).

[9] D.I. Godfrey, H.R. Macdonald, M. Kronenberg, NKT cells : what ' s in a name ?, 4 (2004) 1–7.

[10] T. Nitta, S. Murata, T. Ueno, K. Tanaka, Y. Takahama, Chapter 3 - Thymic Microenvironments for T-Cell Repertoire Formation, Elsevier Inc., 2008. doi:10.1016/S0065-2776(08)00603-2.

[11] D. Mathis, C. Benoist, Aire, (2008). doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141532.

[12] A. Fischer, B. Malissen, Natural and Engineered Disorders of ~ymphocyte Development, (1998).

[13] D.L. Mueller, R.H. Schwartz, CLONAL INACTIVATION : A Costimulatory Signalling Pathway Determines the Outcome of T Cell Antigen Receptor Occupancyl, (1989).

[14] M. Kronenberg, Self-Tolerance and Autoimmunity Meeting Review, 85 (1991) 537–542.

[15] Sloan-lancaster, induction of T-cell anergy by altered T-cell-receptor ligand on live APCs, (n.d.).

[16] K.J. Smith, W.I. McDonald, The pathophysiology of multiple sclerosis: The mechanisms underlying the production of symptoms and the natural history of the disease, Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. 354 (1999) 1649–1673. doi:10.1098/rstb.1999.0510.

[17] A. Kutzelnigg, H. Lassmann, Pathology of multiple sclerosis and related inflammatory demyelinating diseases, Handb. Clin. Neurol. 122 (2014) 15–58. doi:10.1016/B978-0-444-52001-2.00002-9.

[18] H. Lassmann, Multiple sclerosis: Lessons from molecular neuropathology, Exp. Neurol. 262 (2014) 2–7. doi:10.1016/j.expneurol.2013.12.003.

[19] H. Lassmann, J. Van Horssen, The molecular basis of neurodegeneration in multiple sclerosis, FEBS Lett. 585 (2011) 3715–3723. doi:10.1016/j.febslet.2011.08.004.

[20] H. Lassmann, Multiple Sclerosis Pathology: Evolution of Pathogenetic Concepts, Brain Pathol. 15 (2010) 217–222. doi:10.1111/j.1750-3639.2005.tb00523.x.

[21] H. Lassmann, Mechanisms of white matter damage in multiple sclerosis, Glia. 62 (2014) 1816–1830. doi:10.1002/glia.22597.

[22] H. Lassmann, W. Brück, C.F. Lucchinetti, The immunopathology of multiple sclerosis: An overview, Brain Pathol. 17 (2007) 210–218. doi:10.1111/j.1750-3639.2007.00064.x.

[23] C.S. Constantinescu, N. Farooqi, K. O'Brien, B. Gran, Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS), Br. J. Pharmacol. 164 (2011) 1079–1106. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01302.x.
[24] A.P. Robinson, C.T. Harp, A. Noronha, S.D. Miller, The EAE model of MS: utility for understanding disease pathophysiology and treatment, Hand Clin Neurol. 122 (2014) 173–189. doi:10.1016/B978-0-444-52001-2.00008-X.The.
[25] S. Bittner, A.M. Afzali, H. Wiendl, S.G. Meuth, Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein ($MOG_{35-55}$) Induced Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 Mice, J. Vis. Exp. (2014) 1–5. doi:10.3791/51275.
[26] R.A. Desai, K.J. Smith, Experimental autoimmune encephalomyelitis from a tissue energy perspective, F1000Research. 6 (2017) 1973. doi:10.12688/f1000research.11839.1.
[27] R.A. Desai, K.J. Smith, Experimental autoimmune encephalomyelitis from a tissue energy perspective, F1000Research. 6 (2017) 1973. doi:10.12688/f1000research.11839.1.
[28] J.M. Greer, P.A. Csurhes, K.D. Cameron, P.A. Mccombe, M.F. Good, M.P. Pender, Increased immunoreactivity to two overlapping peptides of myelin proteolipid protein in multiple sclerosis, (1997) 1447–1460.
[29] B.A. Silva, C.C. Ferrari, Gr up SM Animal experimental models for understanding and treating Multiple Sclerosis, (2016) 1–16.
[30] F. Alasti, M.H. Sanati, MAKING AN EXPERIMENTAL ANIMAL MODEL FOR MULTIPLE SCLEROSIS, 17 (2003) 245–250.
[31] J.S. Skotnicki, D.M. Huryn, Treatment of Transplantation Rejection and Multiple Sclerosis, Compr. Med. Chem. II. (2007) 917–934. doi:10.1016/b0-08-045044-x/00233-9.
[32] E.J. Rushing, J.H. Rees, J.W. Schroeder, From the Archives of the AFIP Patterns of Contrast Enhancement in the Brain and Meninges 1 OBJECTIVES, (2007) 525–552.
[33] J.L. Trotter, H.B. Clark, K.G. Collins, C.L. Wegeschiede, J.D. Scarpellini, Myelin proteolipid protein induces demyelinating disease in mice, J. Neurol. Sci. 79 (1987) 173–188. doi:10.1016/0022-510X(87)90271-1.
[34] S.D. Miller, W.J. Karpus, T.S. Davidson, Experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse, Curr. Protoc. Immunol. (2010) 1–26. doi:10.1002/0471142735.im1501s77.
[35] J.A. Lyons, M.J. Ramsbottom, J.L. Trotter, A.H. Cross, Identification of the encephalitogenic epitopes of CNS proteolipid protein in BALB/c mice, J. Autoimmun. 19 (2002) 195–201. doi:10.1006/jaut.2002.0619.
[36] A.L. Davies, R.A. Desai, P.S. Bloomfield, P.R. McIntosh, K.J. Chapple, C. Linington, R. Fairless, R. Diem, M. Kasti, M.P. Murphy, K.J. Smith, Neurological deficits caused by tissue hypoxia in neuroinflammatory disease, Ann. Neurol. 74 (2013) 815–825. doi:10.1002/ana.24006.
[37] ling et al, The Origin and Nature of Ramified and Amoeboid Microglia : A Historical Review and Current Concepts, 18 (1993) 9–18.
[38] L.J. Lawson, V.H. Perry, P. Dri, S.G. Rlksn, HETEROGENEITY IN THE DISTRIBUTION AND MORPHOLOGY OF M ~ CROGLIA IN THE NORMAL ADULT MOUSE IBRAIN, 39 (1990) 151–170.
[39] H. Kettenmann, D. Hoppe, K. Gottmann, R. Banati, G. Kreutzberg, Cultured Microglial Cells Have a Distinct Pattern of Membrane Channels Different From Peritoneal Macrophages, (n.d.).
[40] H. Kettenmann, R. Banati, A.V.D.W. Walz, Electrophysiological Behavior of Microglia, 101 (1993) 93–101.
[41] W.F. Hickey, Characterization of Mieroglia and Macrophages in the Central Nervous System of Rats : Definition of the Differential Expression of Molecules Using Standard and Novel Monoclonal Antibodies in Normal CNS and in Four Models of Parenchymal Reaction, 40 (1993).
[42] J. Gehrma, G.W. Kreutzberg, Characterisation of Two New Monoclonal Antibodies Directed Against Rat Microglia, 430 (1991) 409–430.
[43] C.D. Dijkstra, E.A. Dopp, P. Jolingt, The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs : distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal, (1985).
[44] G.K. Sheridan, K.J. Murphy, G.K. Sheridan, Neuron – glia crosstalk in health and disease : fractalkine and CX 3 CR1 take centre stage, (2013).
[45] N. Lannes, E. Eppler, S. Etemad, P. Yotovski, L. Filgueira, Microglia at center stage : a comprehensive review about the versatile and unique residential macrophages of the central nervous system, 8 (2017) 114393–114413.
[46] A.M. Casano, F. Peri, Review Microglia : Multitasking Specialists of the Brain, Dev. Cell. 32 (2015) 469–477. doi:10.1016/j.devcel.2015.01.018.
[47] C. Matute, Neurotransmitter signaling in the pathophysiology of microglia, 7 (2013) 1–17. doi:10.3389/fncel.2013.00049.
[48] M. Scapegoat, S. Else, HHS Public Access, 339 (2015) 156–161. doi:10.1126/science.1227901.Microglia.
[49] O.G. Holloway, A.J. Canty, A.E. King, J.M. Ziebell, Seminars in Cell & Developmental Biology Rod microglia and their role in neurological diseases, Semin. Cell Dev. Biol. (2019) 0–1. doi:10.1016/j.semcdb.2019.02.005.
[50] M.B. Graeber, W. Li, M.L. Rodriguez, Role of microglia in CNS inflammation, FEBS Lett. 585 (2011) 3798–3805. doi:10.1016/j.febslet.2011.08.033.
[51] M.È. Tremblay, A. Sierra, Microglia in health and disease, Microglia Heal. Dis. 313 (2014) 1–486. doi:10.1007/978-1-4939-1429-6.
[52] B.D. Trapp, K.-A. Nave, Multiple Sclerosis: An Immune or Neurodegenerative Disorder?, Annu. Rev. Neurosci. 31 (2008) 247–269. doi:10.1146/annurev.neuro.30.051606.094313.
[53] M. Spranger, A. Fontana, Activation of microglia: A dangerous interlude in immune function in the brain,

Neuroscientist. 2 (1996) 293–299. doi:10.1177/107385849600200515.
[54] D. Giulian, Ameboid Microglia as Effectors of Inflammation in the Central Nervous System, (n.d.).
[55] A.M. Casano, M. Albert, A.M. Casano, M. Albert, F. Peri, Developmental Apoptosis Mediates Entry and Positioning of Microglia in the Zebrafish Brain Report Developmental Apoptosis Mediates Entry and Positioning of Microglia in the Zebrafish Brain, CellReports. 16 (2016) 897–906. doi:10.1016/j.celrep.2016.06.033.
[56] S. Marie-th, N. Swinnen, S. Kessels, K. Arnauts, S. Smolders, B. Le Bras, J. Rigo, Age-specific function of a 5 b 1 integrin in microglial migration during early colonization of the developing mouse cortex, (2017) 1072–1088. doi:10.1002/glia.23145.
[57] N. Swinnen, S. Smolders, A. Avila, K. Notelaers, P. Legendre, J. Rigo, R.I.K. Paesen, M. Ameloot, B. Bro, Complex Invasion Pattern of the Cerebral Cortex by Microglial Cells During Development of the Mouse Embryo, 163 (2013) 150–163. doi:10.1002/glia.22421.
[58] S. Gordon, A. Plüddemann, Tissue macrophages : heterogeneity and functions, (2017) 1–18. doi:10.1186/s12915-017-0392-4.
[59] C. Arcuri, C. Mecca, R. Bianchi, I. Giambanco, The Pathophysiological Role of Microglia in Dynamic Surveillance , Phagocytosis and Structural Remodeling of the Developing CNS, 10 (2017) 1–22. doi:10.3389/fnmol.2017.00191.
[60] A. Lena, H. De Angelis, D. Jaitin, P. Wieghofer, E. David, Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS, 18 (2017) 965–977. doi:10.1038/nn.4030.Host.
[61] E. Sherwin, K. Rea, T.G. Dinan, J.F. Cryan, O PINION A gut ( microbiome ) feeling about the brain, 32 (2016) 96–102. doi:10.1097/MOG.0000000000000244.
[62] A. Celada, C. Nathan, Macrophage activation revisited, 15 (1994) 100–102.
[63] V.H. Perry, P. Andersson, S. Gordon, Macrophages and inflammation in the central nervous system, 16 (1993) 16–17.
[64] K. Imamura, N. Hishikawa, M. Sawada, T. Nagatsu, M. Yoshida, Y. Hashizume, Distribution of major histocompatibility complex class II-positive microglia and cytokine profile of Parkinson's disease brains, Acta Neuropathol. 106 (2003) 518–526. doi:10.1007/s00401-003-0766-2.
[65] K. Frei, C. Siepl, P. Groscurtha, S. Bodmer, C. Schwerdel, Antigen presentation and tumor cytotoxicity by interferon-y-treated microglial cells*, (1987) 1271–1278.
[66] R.B. Banati, J. Gehrmann, P. Schubert, G.W. Kreutzberg, Cytotoxicity of Microglia, (1991) 111–118.
[67] M.B. Graeber, W.J. Streit, G.W. Kreutzberg, Axotomy of the Rat Facial Nerve Leads to Increased CR3 Complement Receptor Expression by Activated Microglial Cells, (n.d.).
[68] D. Tion, THE KINETICS AND MORPHOLOGICAL RESPONSE TO KAINIC NEURONAL, 42 (1991) 201–214.
[69] W.J. Streit, Peripheral nerve lesion produces increased levels of major ifistocompatib ~ ty complex antigens in the central nervous system, 21 (1989) 117–123.
[70] P.L.M. Geer, T. Kawamata, D.G. Walker, H. Akiyama, I. Tooyama, A.N.T. Edith, G.M. Geer, K. Sinen, N. Kesearch, Microglia in Degenerative Neurological Disease, (1993) 84–92.
[71] H. Lassmann, M. Schmied, K. Vass, W.F. Hickey, Bone Marrow Derived Elements and Resident Microglia in Brain Inflammation, (1993) 19–24.
[72] G.W. Kreutzberg, Microglia: A sensor for pathological events in the CNS, Trends Neurosci. 19 (1996) 312–318. doi:10.1016/0166-2236(96)10049-7.
[73] M.A. Calcia, D.R. Bonsall, P.S. Bloomfield, S. Selvaraj, T. Barichello, O.D. Howes, Stress and neuroinflammation : a systematic review of the effects of stress on microglia and the implications for mental illness, (2016) 1637–1650. doi:10.1007/s00213-016-4218-9.
[74] M.D.T. R AJ K. GOYAL , M.D., AND I KUO HIRANO, THE ENTERIC NERVOUS SYSTEM R, (1996) 1106–1115.
[75] A. Ru, Glial cells in the gut, (2005) 777–790. doi:10.1111/j.1365-2982.2005.00687.x.
[76] M.D. Gershon, T.P. Rothman, Enteric Glia, 204 (1991) 195–204.
[77] G. Gabella, OF THE NERVE PLEXUSES ~ TES ~ E : THE ENTERIC GLIAL CELLS, 6 (1981).
[78] T. Ohashi, T. Yamamura, J. Inoba, T. Kunishita, T. Tabira, Analysis of PLP-specific T cells in MS: Identification of PLP 95-116 as HLA-DR2 associated determinant, J. Neuroimmunol. 54 (2002) 186. doi:10.1016/0165-5728(94)90469-3.
[79] V.K. Tuohy, Peptide determinants of myelin proteolipid protein (PLP) in autoimmune demyelinating disease: A review, Neurochem. Res. 19 (1994) 935–944. doi:10.1007/BF00968703.
[80] T. Kondo, T. Yamamura, J. Inobe, T. Ohashi, TCR repertoire to proteolipid protein ( PLP ) in multiple sclerosis ( MS ): homologies between PLP-specific T cells and MS-associated T cells in TCR junctional sequences, 8 (2018) 123–130.
[81] N.L. Nadon, M. West, Myelin proteolipid protein: Function in myelin structure is distinct from its role in oligodendrocyte development, Dev. Neurosci. 20 (1998) 533–539. doi:10.1159/000017354.
[82] J.Y. Garbern, F. Cambi, X. Tang, A.A.F. Sima, J.M. Vallat, E.P. Bosch, R. Lewis, M. Shy, J. Sohi, G. Kraft, K.L. Chen, I. Joshi, D.G.B. Leonard, W. Johnson, W. Raskind, S.R. Dlouhy, V. Pratt, M.E. Hodes, T. Bird, J. Kamholz, Proteolipid Protein Is Necessary in Peripheral as Well as Central Myelin, 19 (1997) 205–218.

[83] Yoshiyuki Kamio and Hiroshi Nikaido, Outer Membrane of Salmonella typhimurium : Accessibility of Phospholipid Head Groups to Phospholipase C and Cyanogen Bromide Activated Dextran in the External Medium ?, 15 (1976) 2561–2570.
[84] C. Galanos, V. Lehmann, O. Luderitz, E.T. Rietschel, O. Westphal, H. Brade, L. Brade, M.A. Freudenberg, T. Hansen-hagge, T. Luderitz, G. Mckenzie, U. Schade, W. Strittmatter, K. Tanamoto, U. Zahringer, M. Imoto, H. Yoshimura, Endotoxic properties of chemically synthesized lipid A part structures Comparison of synthetic lipid A precursor and synthetic analogues with biosynthetic lipid A precursor and free lipid A, 227 (1984) 221–227.
[85] O. Holst, A.J. Ulmer, H. Brade, H. Flad, E.T. Rietschel, Biochemistry and cell biology of bacterial endotoxins, 49 (1996).
[86] J.A. Hoffmann, F.C. Kafatos, C.A.J. Jr, R.A.B. Ezekowitz, Phylogenetic Perspectives in Innate Immunity, 284 (1999) 1313–1319.
[87] S.O.F. Innate, I. Recognition, IMMUNE RECOGNITION, (2000).
[88] R. Medzhitov, C. Janeway, Innate immune recognition : mechanisms and pathways, (n.d.) 89–97.
[89] E.B. Kopp, R. Medzhitov, The Toll-receptor family and control of innate immunity, (1999) 13–18.
[90] K. V Anderson, Toll signaling pathways in the innate immune response, (2000) 13–19.
[91] A. Aderem, R.J. Ulevitch, the innate immune response, 406 (2000).
[92] M. Muzio, D. Bosisio, N. Polentarutti, A. Stoppacciaro, R. Mancinelli, C. Van Veer, G. Penton-rol, L.P. Ruco, P. Allavena, A. Mantovani, D. Cells, A. Stoppacciaro, R. Mancinelli, C. Van Veer, G. Penton-rol, Differential Expression and Regulation of Toll-Like Receptors (TLR) in Human Leukocytes: Selective Expression of TLR3 in Dendritic Cells, (2015). doi:10.4049/jimmunol.164.11.5998.
[93] R.L. Kitchens, Role of CD 1 4 in Cellular Recognition of Bacterial Lipopolysaccharides, 74 (2000) 61–82.
[94] C. Alexander, E.T. Rietschel, Invited review Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity, (2001).
[95] E. Blasi, R. Barluzzi, F. Bistoni, Immortalization of murine microglial cells by a carrying retrovirus, 27 (1990) 229–237.
[96] V. Bocchini, R. Mazzolla, R. Barluzzi, E. Blasi, P. Sick, H. Kettenmann, An Immortalized Cell Line Expresses Properties of Activated Microglial Cells, 621 (1992).
[97] J.R. DAVID, DELAYED HYPERSENSITIVITY IN VITRO: ITS MEDIATION BY CELL-FREE SUBSTANCES FORMED BY LYMPHOID CELL-ANTIGEN INTERACTION, (1966) 72–77.
[98] W.Y. Weiser, P.A. Templet, J.S. Witek-giannottit, H.G. Remold, S.C. Clarkt, J.R. David, Molecular cloning of a cDNA encoding a human macrophage migration inhibitory factor, 86 (1989) 7522–7526.
[99] H. Sun, J. Bernhagentt, R. Bucalat, E. Lolis, Crystal structure at 2 . 6-A resolution of human macrophage migration inhibitory factor, 93 (1996) 5191–5196.
[100] B.T. Calandra, J. Bernhagen, R.A. Mitchell, R. Bucala, The Macrophage Is an Important and Previously Unrecognized Source of Macrophage Migration Inhibitory Factor, 179 (1994).
[101] M. Bacher, A. Meinhardt, H.Y. Lan, F.S. Dhabhar, W. Mu, C.N. Metz, J.A. Chesney, D. Gemsa, T. Donnelly, R.C. Atkins, R. Bucala, M.M. Centre, Original Articles MIF Expression in the Rat Brain : Implications for Neuronal Function, (1998) 217–230.
[102] S. Onodera, K. Suzuki, T. Matsuno, K. Kaneda, M. Takagi, Macrophage migration inhibitory factor induces phagocytosis of foreign particles by macrophages in autocrine and paracrine fashion, (1997).
[103] L. Leng, C.N. Metz, Y. Fang, J. Xu, S. Donnelly, J. Baugh, T. Delohery, Y. Chen, R.A. Mitchell, R. Bucala, MIF Signal Transduction Initiated by Binding to CD74, J. Exp. Med. 197 (2003) 1467–1476. doi:10.1084/jem.20030286.
[104] R. Kleemann, M. Grell, R. Mischke, G. Zimmermann, Receptor Binding and Cellular Uptake Studies of Macrophage Migration Inhibitory Factor ( MIF ): Use of Biologically Active Labeled MIF Derivatives, 363 (2002) 351–363.
[105] T. Roger, J. David, M.P. Glauser, T. Calandra, MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4, 414 (2001) 2–6.
[106] C.M. Denkinger, M. Denkinger, J.J. Kort, C. Metz, T.G. Forsthuber, This information is current as of September 14, 2019., (2019). doi:10.4049/jimmunol.170.3.1274.
[107] M. Niino, A. Ogata, S. Kikuchi, K. Tashiro, J. Nishihira, Macrophage migration inhibitory factor in the cerebrospinal fluid of patients with conventional and optic-spinal forms of multiple sclerosis and ¸ et ' s disease, 179 (2000) 127–131.
[108] N.D. Powell, T.L. Papenfuss, A. Melanie, I.E. Gienapp, T.M. Shawler, R. Abhay, C.C. Whitacre, Cutting Edge: Macrophage Migration Inhibitory Factor Is Necessary for Progression of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, (2019). doi:10.4049/jimmunol.175.9.5611.
[109] A.P. Kithcart, G.M. Cox, T. Sielecki, A. Short, J. Pruitt, T. Papenfuss, T. Shawler, I. Gienapp, A.R. Satoskar, C.C. Whitacre, A small-molecule inhibitor of macrophage migration inhibitory factor for the treatment of inflammatory disease, (n.d.) 4459–4466. doi:10.1096/fj.10-162347.
[110] E.N. Benveniste, Role of macrophages / microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis, (1997) 165–173.
[111] A.J. Thompson, C.A. Whelan, C. Feighery, Peripheral blood, (1986) 905–912.
[112] F. Hickey, J.P. Osborn, M. Kirby, Expression of la Molecules by Astrocytes during Acute Experimental Allergic Encephalomyelitis in the Lewis Rat ', 535 (1985) 528–535.

[113] G.M. Hayes, M.N. Woodroofe, M.L. Cuzner, Microglia are the major cell type expressing MHC class II in human white matter, J. Neurol. Sci. 80 (1987) 25–37. doi:10.1016/0022-510X(87)90218-8.
[114] M. Wunsch, S. Jabari, B. Voussen, M. Enders, S. Srinivasan, F. Cossais, C.J. Scholz, J. Nickel, A. Friebe, K. Addicks, S. Ergün, The enteric nervous system is a potential autoimmune target in multiple sclerosis, Acta Neuropathol. 134 (2017) 281–295. doi:10.1007/s00401-017-1742-6.
[115] K.B.M. Dimakopoulou, P.B.N. Manidakis, Soluble MHC class II-driven therapy for a systemic lupus erythematosus murine experimental in vitro and in vivo model, (2018) 1–11. doi:10.1111/sji.12644.
[116] K. Bakela, M. Dimakopoulou, P. Batsou, N. Manidakis, V. Vouton, Clinical Immunology Soluble MHC Class II-driven Therapy for a Systemic Lupus Erythematosus Murine Experimental in vitro and in vivo Model, (n.d.) 0–3. doi:10.1111/sji.12644.
[117] K. Bakela, Soluble major histocompatibility complex molecules in immune regulation : highlighting class II antigens, (2017) 315–324. doi:10.1111/imm.12868.
[118] K. Bakela, M. Aivaliotis, Soluble MHC-II proteins promote suppressive activity in CD4 + T cells, (2014) 158–169. doi:10.1111/imm.12360.
[119] E.J. Peterson, J.S. Maltzman, 12 - T-Cell Activation and Tolerance, Fifth Edition, Elsevier Ltd, n.d. doi:10.1016/B978-0-7020-6896-6.00012-0.
[120] L.A. Burns-naas, Lamina propria, (n.d.).
[121] J.J. Goronzy, C.M. Weyand, SYSTEMS Principles of Innate Immune System Activation, (n.d.) 214.
[122] S. Heinzel, J.M. Marchingo, M.B. Horton, P.D. Hodgkin, ScienceDirect The regulation of lymphocyte activation and proliferation, Curr. Opin. Immunol. 51 (2018) 32–38. doi:10.1016/j.coi.2018.01.002.
[123] invivogen, IL-2: The Activator and Controller, 2 (2018) 4–5.
[124] and W.J.L. Wei Liao, Jian-Xin Lin*, Interleukin-2 at the Crossroads of Effector Responses, Tolerance, and Immunotherapy, 38 (2014) 13–25. doi:10.1016/j.immuni.2013.01.004.Interleukin-2.
[125] J.S.A. Perry, The effects of interleukin-2 on immune response regulation, 35 (2018) 79–119. doi:10.1093/imammb/dqw021.The.
[126] J. Theze, INTERLEYKIN 2, (1998).
[127] C.D. Cd, H. Bone, J.L. Halliley, C. Tipton, J. Liesveld, A.F. Rosenberg, J. Darce, I. V Gregoretti, L. Popova, D. Kaminiski, F. Christopher, I. Albizua-santin, S. Kyu, K. Chiang, K.T. Bradley, HHS Public Access, 43 (2016) 132–145. doi:10.1016/j.immuni.2015.06.016.Long-lived.
[128] F. Hiepe, The Maintenance of Memory Plasma, 10 (2019). doi:10.3389/fimmu.2019.00721.
[129] H.E. Mei, I. Wirries, D. Fr, M. Brisslert, C. Giesecke, J.R. Gr, T. Alexander, S. Schmidt, K. Luda, A.K. Anja, R. Engelmann, D. Michael, T. Scheel, M. Bokarewa, C. Perka, A. Radbruch, D. Thomas, IMMUNOBIOLOGY A unique population of IgG-expressing plasma cells lacking CD19 is enriched in human bone marrow, 125 (2019) 1739–1749. doi:10.1182/blood-2014-02-555169.The.
[130] J. Tellier, S.L. Nutt, Standing out from the crowd : How to identify plasma cells, (2017) 1276–1279. doi:10.1002/eji.201747168.
[131] P. V Lehmann, A. Rottlaender, S. Kuerten, The autoimmune pathogenesis of multiple sclerosis, (2015) 5–11. doi:10.1691/ph.2015.4718.
[132] R. Terry, I. Ifergan, S.D. Miller, Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice Rachael, Methods Mol. Biol. (2016) 257–284. doi:10.1007/7651.
[133] J.M. Greer, Autoimmune T-Cell Reactivity to Myelin Proteolipids and Glycolipids in Multiple Sclerosis, Mult. Scler. Int. 2013 (2013) 1–16. doi:10.1155/2013/151427.
[134] J. -B Sun, T. Olsson, W. -Z Wang, B. -G Xiao, V. Kostulas, S. Fredrikson, H. -P Ekre, H. Link, Autoreactive T and B cells responding to myelin proteolipid protein in multiple sclerosis and controls, Eur. J. Immunol. 21 (1991) 1461–1468. doi:10.1002/eji.1830210620.
[135] OBSERVATIONS ON ATTEMPTS TO PRODUCE ACUTE DISSEMINATED ENCEPHALOMYELITIS I N MONKEYS BY THOMAS M . RIVERS , M . D ., D . H . SPRUNT , M . D ., A ~ D G . P . BERRY , M . D . ( From the Hospital of The Rockefeller Institute for Medical Research ) 1 TO 3 ( Received for publication , February 21 , 1933 ) During convalescence from certain diseases , notably smallpox , vaccinia , and measles , and during or following vaccination against rabies , an occasional patient develops symptoms and signs referable to the central nervous system . A careful study ( 1-3 ) of the brains and cords of individuals who have died because of such involvement of the nervous system has revealed a characteristic pathological picture , acute disseminated encephalomyelitis , of which perivascular demyelin- afion is a striking feature . The etiology of this malady is unknown in spite of the fact that considerable experimental work has been done to disclose it . Inasmuch as vaccine virus is suitable for a variety of ex- periments , many of the investigations ( 4-10 ) have dealt with vaccinal infections of the brain in rabbits and monkeys . At present , as a result of these investigations two main views are held regarding the relation of vaccine virus to postvaccinal encephalomyelitis , namely , ( 1 ) that it is the etiological agent and can induce the disease under experimental conditions , ( 2 ) that there is no clinical , pathological , or experimental evidence to show that it is directly responsible for the malady . In view of this difference of opinion , we decided to conduct some experi- ments on vaccinal infections in monkeys in the hope of obtaining in- formation concerning the effect of the active agent on the central nervous system . We made no effort to repeat any work that had been

previously reported , yet some of our control animals were handled in a manner similar to that employed by other investigators . Conse- quently , our results in many instances are comparable with those al- ready recorded in the literature ., (1933).
[136] O. Acuto, F. Michel, CD28-MEDIATED CO-STIMULATION : A QUANTITATIVE SUPPORT FOR TCR SIGNALLING, 3 (2003). doi:10.1038/nri1248.
[137] J.G. Egen, M.S. Kuhns, J.P. Allison, CTLA-4 : new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy, 3 (2002).
[138] R.A. Haq, J.C.M. Schlachetzki, C.K. Glass, S.K. Mazmanian, Microbiome – microglia connections via the gut – brain axis, 216 (2018) 41–59.
[139] P.H. Wiesel, C. Norton, S. Glickman, M.A. Kamm, Pathophysiology and management of bowel dysfunction in multiple sclerosis, (n.d.) 441–448.
[140] D.J. Levinthal, A. Rahman, S. Nusrat, M.O. Leary, R. Heyman, K. Bielefeldt, Adding to the Burden : Gastrointestinal Symptoms and Syndromes in Multiple Sclerosis, 2013 (2013).
[141] G.M. Hayes, M.N. Woodroofe, M.L. Cuzner, Microglia are the major cell type expressing MHC Class II in human white matter, (1987) 25–37.
[142] C.T. Tran, P. Wolz, R. Egensperger, S. Kösel, Y. Imai, K. Bise, S. Kohsaka, P. Mehraein, M.B. Graeber, Differential expression of MHC class II molecules by microglia and neoplastic astroglia: Relevance for the escape of astrocytoma cells from immune surveillance, Neuropathol. Appl. Neurobiol. 24 (1998) 293–301. doi:10.1046/j.1365-2990.1998.00120.x.
[143] O. Butovsky, A.E. Talpalar, K. Ben-yaakov, M. Schwartz, Activation of microglia by aggregated B -amyloid or lipopolysaccharide impairs MHC-II expression and renders them cytotoxic whereas IFN- ; and IL-4 render them protective, 29 (2005) 381–393. doi:10.1016/j.mcn.2005.03.005.
[144] G.M. Cox, A.P. Kithcart, D. Pitt, Z. Guan, J. Alexander, J.L. Williams, T. Shawler, N.M. Dagia, P.G. Popovich, A.R. Satoskar, C.C. Whitacre, Macrophage Migration Inhibitory Factor Potentiates Autoimmune-Mediated Neuroinflammation, J. Immunol. 191 (2013) 1043–1054. doi:10.4049/jimmunol.1200485.
[145] G.M. Cox, A.P. Kithcart, D. Pitt, J. Alexander, J.L. Williams, N.M. Dagia, P.G. Popovich, R. Abhay, C.C. Whitacre, A. Neuroinflammation, J.L. Williams, T. Shawler, N.M. Dagia, P.G. Popovich, Macrophage Migration Inhibitory Factor Potentiates Autoimmune-Mediated Neuroinflammation, (2019). doi:10.4049/jimmunol.1200485.
[146] M. Georgouli, L. Papadimitriou, M. Glymenaki, V. Patsaki, Expression of MIF and CD74 in leukemic cell lines : correlation to DR expression destiny, 397 (2016) 519–528. doi:10.1515/hsz-2015-0280.