

Πανεπιστήμιο Κρήτης  
Σχολή Επιστημών Υγείας  
Τμήμα Ιατρικής

Μεταπτυχιακό πρόγραμμα:

“Κυτταρική και μοριακή αιτιολογία, διαγνωστική και θεραπευτική των ασθενειών του ανθρώπου”

Η θεραπευτική αποτελεσματικότητα των ενσωματωμένων σε λιποσώματα CD40 anti-sense ολιγονουκλεοτιδίων στην επαγόμενη με TNB-S ελκώδη κολίτιδα

Αγγελική Ε. Κλεισαρχάκη  
Νοέμβριος 2008

Επιβλέποντες καθηγητές: κ. Χρήστος Τσατσάνης  
κ. Κωνσταντίνος Παπαδάκης

## **Ευχαριστίες:**

Με αυτή τη μεταπτυχιακή εργασία είχα την ευκαιρία να αποκτήσω μία μικρή έστω εμπειρία για την βιοιατρική έρευνα στην οποία έχουν εναποτεθεί οι ελπίδες για την ριζική αντιμετώπιση πολλών νοσημάτων του ανθρώπου. Προσωπικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τους επιβλέποντες καθηγητές μου, κ. Χρήστο Τσατσάνη και κ. Κωνσταντίνο Παπαδάκη για την καθοδήγηση και τη βοήθειά τους, την κ. Βαπορίδη Κατερίνα πνευμονολόγο MD,PhD για τη συνεργασία της και την Αργυρώ Φραγκιαδάκη, φοιτήτρια του Βιολογικού τμήματος του Πανεπιστημίου Κρήτης με την οποία δουλέψαμε μαζί στη διεξαγωγή των πειραμάτων. Αν και η προαγωγή της γνώσης μέσω της έρευνας αποτελεί μία ιδιαίτερα απαιτητική διαδικασία που απαιτεί έμπνευση, ενθουσιασμό, πολύ κόπο, αφοσίωση και υπομονή δεν παύει παράλληλα να αποτελεί ένα μαγευτικό τομέα με τον οποίο αξίζει να έρχονται σε επαφή οι κλινικοί γιατροί.

## **Πίνακας περιεχομένων**

### **A. Εισαγωγή:**

1. Ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις εντεροπάθειες: κλινικά χαρακτηριστικά και μοριακή βάση αυτών των νόσων σελ5
  
2. Αιτιολογία σελ6
  - α. Γενετική προδιάθεση σελ6
  - β. Ο ρόλος της χλωρίδας του εντέρου σελ7
  - γ. Δυσλειτουργία εντερικού επιθηλίου σελ8
  - δ. Δυσλειτουργία του ανοσολογικού συστήματος σελ8
  
3. Ο ρόλος των συνδεδεμένων μορίων γενικά στην ανοσολογική απόκριση σελ9
  
4. Το συνδεδεμένο σήμα CD40/CD40L σελ10
  
5. Εκφραση των μορίων CD40/CD40L στις ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις εντεροπάθειες σελ12
  
6. Μηχανισμοί επαγωγής των μορίων CD40/CD40L στις ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις εντεροπάθειες σελ13
  
7. Συνέπειες της αλληλεπίδρασης CD40/CD40L σελ14
  
8. Η διακοπή του μονοπατιού CD40 ως θεραπευτική παρέμβαση των ιδιοπαθών φλεγμονωδών εντεροπαθειών σελ14

### **B. Στόχος της εργασίας**

σελ16

### **Γ. Υλικά και μέθοδοι**

σελ17

- α. Επαγωγή της TNB-S κολίτιδας σελ17
- β. Σύγκριση θεραπευτικής δράσης των διάφορων smarticles μεταξύ τους και με τη σύγχρονη θεραπεία σελ17

|  |       |
|--|-------|
| γ. Θεραπευτική δραστηριότητα των smarticles στην πρόιμη μορφή της νόσου και μηχανισμός δράσης        | σελ19 |
| δ. Θεραπευτική δραστηριότητα των smarticles στην όπιμη μορφή της νόσου και μηχανισμός δράσης         | σελ20 |
| ε. Καθορισμός της δραστηριότητας του smarticle nov38d198 και του nov38lγo στην όπιμη μορφή της νόσου | σελ21 |
| στ. Καθορισμός της σημασίας του IRAK-M στην TNB-S επαγόμενη κολίτιδα                                 | σελ21 |
| <b><u>Δ. Αποτελέσματα</u></b>  | σελ21 |
| 1.Τα CD40ASO smarticles είναι αποτελεσματικά στην ελκώδη κολίτιδα                                    | σελ21 |
| α. nov38d193 (8mg/kg CD40ASO σε 105mM lipid).  | Σελ22 |
| β. nov38d194 (4mg/kg CD40ASO in 107mM lipid )  | σελ23 |
| γ. nov38d187 (8mg/kg CD40ASO in 44mM lipid )   | σελ25 |
| δ. nov38d188 (8 mg/kg ASO in 60Mm lipid)   | σελ26 |
| ε. nov38d190 (4mg/kgASO σε 54mM lipid)   | σελ27 |
| στ.smarticle με CD40ASO και lipid  | σελ28 |
| 2. Μακροσκοπική εμφάνιση και ιστολογικές εικόνες των εντέρων των ποντικών διαφόρων ομάδων            | σελ31 |
| 3.Μακροσκοπική εμφάνιση σπληνών διαφόρων ομάδων ποντικών   | σελ34 |
| 4. Κυτταρικοί πληθυσμοί στο σπλήνα   |       |
| α.Δενδριτικά   | σελ35 |
| β.Β-λεμφοκύτταρα   | σελ38 |
| γ.Τ-λεμφοκύτταρα   | σελ39 |
| Τ-ρυθμιστικά   |       |
| 5. Κυτταροκίνες  |       |
| α.TNF-a  | σελ41 |
| β.IL 6   | σελ42 |
| γ.IL1β   | σελ44 |

|   |       |
|---|-------|
| 6. Χημειοκίνες  |       |
| α. MCP-1  | σελ46 |
| β. MIP-1 <sup>α</sup>   | σελ48 |
| γ. IP-10  | σελ49 |
| 7. Ανοσορυθμιστικές κυτταροκίνες  |       |
| α. IL10   | σελ50 |
| β. IL-12  | σελ51 |
| γ. IL17   | σελ51 |
| 8. Οι επιδράσεις της χορήγησης CD40ASO στους διάφορους πλυθυσμούς κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος στην πρωιμη και στην όψιμη μορφή της νόσου |       |
| α. Η έκφραση του CD40 στα CD11b μακροφάγα στους μεσεντέριους λεμφαδένες στην πρωιμη μορφή της νόσου   | σελ52 |
| β. Η έκφραση του CD40 στα CD11b μακροφάγα στους μεσεντέριους λεμφαδένες στην όψιμη μορφή της νόσου  | σελ54 |
| γ. CD11b μακροφάγα στο σπλήνα στην πρωιμη μορφή της νόσου   | σελ54 |
| δ. Η έκφραση του CD40 στα CD11b μακροφάγα στο σπλήνα στην πρωιμη μορφή της νόσου  | σελ55 |
| ε. Η έκφραση του CD40 στα CD11b μακροφάγα στο σπλήνα στην όψιμη μορφή της νόσου   | σελ55 |
| στ. Η έκφραση του CD40 στα B λεμφοκύτταρα στο σπλήνα στην πρωιμη μορφή της νόσου  | σελ56 |
| 9 Έκφραση προφλεγμονωδών κυτταροκινών στην όψιμη φάση της νόσου   |       |
| α. TNF-α  | σελ57 |
| β. IL6  | σελ57 |
| 10. Χημειοκίνες στην όψιμη μορφή της νόσου  |       |
| α. IL8  | σελ58 |
| β. IP10   | σελ58 |

11. Αποτελεσματικότητα του smarticle non38d198 και non38lgo στην όψιμη μορφή της νόσου σελ59
12. Ο ρόλος του IRAK-M στην TNB-S επαγόμενη ελκώδη κολίτιδα σελ61

**E. Συμπεράσματα/Συζήτηση** σελ62

**ΣΤ. Βιβλιογραφία** σελ65

## A. Εισαγωγή:

### **1.Ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις εντεροπάθειες: κλινικά χαρακτηριστικά και μοριακή βάση αυτών των νόσων**

Ο όρος ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις εντεροπάθειες περιλαμβάνει δύο κλινικές οντότητες: τη νόσο του Crohn και την ελκώδη κολίτιδα. Οι μελέτες όσον αφορά στη συχνότητα των παραπάνω νόσων είναι περιορισμένες αλλά υπολογίζεται παγκοσμίως ότι εμφανίζονται περίπου 20 νέες περιπτώσεις/100000 κατοίκους το χρόνο ενώ διαπιστώνεται σταθερή αύξηση της νόσου Crohn μετά το 1950. Στο 20% των ασθενών τα συμπτώματα ξεκινούν από την παιδική ηλικία ενώ έχει διαπιστωθεί αυξημένη επίπτωση αυτών των νόσων στην ίδια οικογένεια σε ποσοστό 15-25%.Η φυσική τους πορεία χαρακτηρίζεται από απρόβλεπτες εξάρσεις και υφέσεις, η αιτιολογία των οποίων παραμένει άγνωστη.

Οι παραπάνω νόσοι παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες μεταξύ τους όσον αφορά στην κλινική τους εικόνα, με υποτροπιάζοντα κοιλιακά άλγη, αίσθημα τεινεσμού και βλεννοαιματηρές διάρροιες ενώ μπορεί να παρουσιάζουν και εξωεντερικές εκδηλώσεις. Ωστόσο τα συμπτώματα στην ελκώδη κολίτιδα είναι ηπιότερης έντασης ενώ στη νόσο Crohn παρατηρούνται συχνά συστηματικά συμπτώματα πυρετού, κακουχίας και εύκολης κόπωσης και επιπλοκές με συρίγγια, στενώσεις και αποστήματα. Επίσης αναγνωρίζονται μεταξύ τους ιστολογικές διαφορές όσον αφορά στην εντόπιση και τα χαρακτηριστικά της φλεγμονής του γαστρεντερικού συστήματος. Συγκεκριμένα, στην ελκώδη κολίτιδα η φλεγμονή εντοπίζεται στο παχύ έντερο κατά συνέχεια ιστού και προσβάλλεται κατά κύριο λόγο ο βλεννογόνο που είναι υπεραιμικός, οιδηματώδης με κοκκιωματώδεις βλάβες και συχνές εξελκώσεις με διηθήσεις από ουδετερόφιλα, λεμφοκύτταρα, πλασματοκύτταρα και μακροφάγα στο ενδοθήλιο ενώ η αρχιτεκτονική των αδένων του εντέρου μεταβάλλεται. Όταν η προσβολή της νόσου είναι χρόνια μπορούν να παρουσιαστούν ψευδοπολύποδες. Στη νόσο Crohn, από την άλλη, η φλεγμονή προσβάλλει σε οποιοδήποτε τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα όλους τους χιτώνες του εντερικού τοιχώματος από το βλεννογόνο έως το ορογόνο με κοκκιώματα από επιθηλιοειδή και πολυπύρηννα γιγαντοειδή κύτταρα. Στη διατοιχωματική φλεγμονή συμβάλλουν τα λεμφοκύτταρα και τα πλασματοκύτταρα ενώ είναι συχνές και οι λεμφαδενικές διογκώσεις.

Σε μοριακό επίπεδο και στις δύο νόσους υπάρχει αυξημένη έκφραση των κυτταροκινών IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  που παράγονται από τα μακροφάγα. Ωστόσο, στη νόσο Crohn αυξάνεται η IL-2 και μειώνεται η IL-4 ενώ στην ελκώδη κολίτιδα αυξάνεται η έκφραση των IL-4 και IL-5 δεδομένα που υποδεικνύουν την υπεροχή της Th1 ανοσολογικής απόκρισης στη νόσο Crohn και την υπεροχή της Th2 ανοσολογικής απόκρισης στην ελκώδη κολίτιδα.

## **2.Αιτιολογία:**

Η αιτιολογία των ιδιοπαθών φλεγμονωδών εντεροπαθειών όπως προαναφέρθηκε παραμένει άγνωστη και η διερεύνησή της παραμένει πολυσύνθετη μιας και γενετικοί, περιβαλλοντικοί, βακτηριακοί και ανοσολογικοί παράγοντες φαίνεται να συμβάλλουν στην εκδήλωσή τους. Από τα έως τώρα δεδομένα είναι σαφής ο ρόλος της ανοσολογικής απάντησης του οργανισμού έναντι των αντιγόνων του εντερικού επιθηλίου. Η παραπάνω υπόθεση στηρίζεται κλινικά στην συνύπαρξη αυτών των νόσων με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα, στις εξωεντερικές εκδηλώσεις που αποδίδονται στην παρουσία ανοσοσυμπλεγμάτων στην κυκλοφορία και στην ανταπόκριση τους σε ανοσοκατασταλτικά φάρμακα. Για την αντιμετώπιση λοιπόν αυτών των νοσημάτων έχει σημασία να προσδιοριστούν οι παράγοντες που οδηγούν στην έναρξη της φλεγμονής και οι παράγοντες που συμβάλλουν στη χρονιότητα της.

### α. Γενετική προδιάθεση:

Παρόλο που είχε καταγραφεί προδιάθεση για τη νόσο του Crohn σε κάποιες οικογένειες μόλις το 2001 ανιχνεύτηκαν μεταλλάξεις και πολυμορφισμοί γονιδίων που σχετίζονται με τη νόσο και κωδικοποιούν τις πρωτείνες NOD1/2, MDR-1, OCTN1/2 και DLG5. Οι NODs (Nucleotide-binding Oligomerization Domain proteins) είναι σημαντικές για την άμυνα του ξενιστή σε ιστούς όπου η έκφραση των TLRs είναι απύσχα ή μειωμένη όπως στους βλεννογόνους και τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου. Αναγνωρίζουν αντιγονικά μοτίβα των βακτηρίων δηλαδή είναι οι ενδοκυττάριοι ανιχνευτές βακτηριακών συστατικών και έχουν σημαντικό ρόλο στη σηματοδότηση της φυσικής ανοσίας του ξενιστή. Η NOD2 οδηγεί σε ενεργοποίηση του μονοπατιού MAPK, του NF- $\kappa$ B και των κασπασών που συνοδεύονται από αύξηση της παραγωγής προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Η NOD1 οδηγεί σε ενεργοποίηση



του JNK που μαζί με την ενεργοποίηση των MAPK και του NF-kb οδηγεί επίσης στην παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Στα πλαίσια της δράσης της η NOD2 επίσης ρυθμίζει και την παραγωγή της  $\alpha$ -defensin στα κύτταρα Paneth περιορίζοντας τον αποικισμό του εντερικού βλεννογόνου. Οι μεταλλάξεις της που σχετίζονται με τις ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις εντεροπάθειες αφορούν περιοχές της πρωτεΐνης με τις οποίες αυτή αλληλεπιδρά με βακτηριακά αντιγόνα και οδηγούν σε αδυναμία τοπικής ανοσολογικής απάντησης και ενεργοποίηση συστηματικής απάντησης που οδηγεί σε ανεξέλεγκτη φλεγμονή. Μεταλλάξεις και πολυμορφισμοί της NOD2 σχετίζονται με πρόωμη έναρξη των νόσων και επιπλοκές π.χ. συρίγγια. Υπάρχουν δύο θεωρίες για τη συσχέτιση των μεταλλάξεων της NOD2 με τις ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις εντεροπάθειες. Σύμφωνα με την πρώτη μία gain of function μετάλλαξη της οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή κυτταροκινών που χαρακτηρίζει αυτές τις νόσους. Σύμφωνα με τη δεύτερη μία loss of function μετάλλαξη της ίδιας πρωτεΐνης οδηγεί σε αναστολή της NOD2 εξαρτώμενης παραγωγής της  $\alpha$ -defensin στα κύτταρα Paneth και στην αναστολή του ελέγχου του πολλαπλασιασμού των παθογόνων βακτηρίων και της φλεγμονώδους απάντησης.

Η MDR-1 είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη που μετατοπίζει φάρμακα εκτός κυττάρων και πολυμορφισμοί της στα εξόνια 21 και 26 σχετίζονται με ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις εντεροπάθειες όπως και οι πολυμορφισμοί των OCTN1/2 (organic cationic transporters) που μεταφέρουν ξενοβιοτικά και καρνιτίνη και της DLG5 η λειτουργία της οποίας είναι άγνωστη.

### β. Ο ρόλος της γλωρίδας του εντέρου

Μελέτες έχουν δείξει διαφορές στη γλωρίδα του εντέρου μεταξύ ατόμων που νοσούν από ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις εντεροπάθειες και ατόμων που δε νοσούν. Στις ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις εντεροπάθειες απουσιάζουν φυσιολογικά αναερόβια βακτήρια που είναι σημαντικά για το μεταβολισμό θρεπτικών συστατικών και την ισορροπία μεταξύ των βακτηριακών πληθυσμών όπως είδη του Bacteroides, του Eubacterium και του Lactobacillus ενώ παρατηρούνται βακτήρια που φαίνεται ότι εμπλέκονται στην παθογένεια των ιδιοπαθών φλεγμονωδών εντεροπαθειών. Έτσι έχει αναφερθεί επούλωση βλαβών της νόσου του Crohn με επεμβάσεις παράκαμψης του εντέρου και κατά συνέπεια της πορείας των κοπράνων και διαφόρων βακτηρίων. Επιπλέον αντιβιοτικά έχουν αποδειχτεί αποτελεσματικά για την ίαση της νόσου.

Φαίνεται δηλαδή ότι χρειάζεται αλλαγή των βακτηριακών πληθυσμών που αποικίζουν το έντερο για να αλλάξει η πορεία της νόσου γεγονός που στηρίζεται και στην ευεργετική δράση των προβιοτικών.

#### γ. Δυσλειτουργία εντερικού επιθηλίου:

Το εντερικό επιθήλιο λειτουργεί σαν επιλεκτικός φραγμός που περιορίζει τη διεισδυση αντιγόνων στο ανοσολογικό σύστημα του βλεννογόνου με σκοπο την ανοχή του οργανισμού σε αντιγόνα τροφών και σε βακτήρια. Κατά συνέπεια το επιθήλιο δρα σα μεσολαβητής της επικοινωνίας μεταξύ του αυλού του εντέρου και του ανοσολογικού συστήματος του βλεννογόνου με απελευθέρωση κυτταροκινών και χημειοκινών που σηματοδοτούν την παρουσία παθογόνων. Τα επιθηλιακά κύτταρα συγκρατούνται μαζί με συνδέσμους που εμποδίζουν την παθητική ροή των μορίων μεταξύ των κυττάρων. Προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες που απελευθερώνονται κατά τη φλεγμονή του βλεννογόνου όπως ο TNF-α ή IFN-γ μπορούν να επάγουν αύξηση στη διαπερατότητα του επιθηλίου ρυθμίζοντας τους συνδέσμους. Σε άτομα με ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις εντεροπάθειες παρατηρείται αυξημένη διαπερατότητα μακρομορίων. Θεωρείται βέβαια συνέπεια της απόπτωσης των επιθηλιακών κυττάρων που μεσολαβείται από τον TNF- α και την IL-13. Θεραπεία με anti-TNFα οδηγεί σε διόρθωση του φραγμού του επιθηλίου και μειώνει την απόπτωση. Άλλο κριτικό σημείο της επικοινωνίας που διευκολύνεται από το επιθήλιο είναι η αμφοτερόπλευρη μεταφορά ανοσοσφαιρινών που εξουδετερώνουν τα παθογόνα του αυλού ή δίνουν πληροφορίες των περιεχομένων του αυλού στο ανοσολογικό σύστημα του βλεννογόνου. Επιπλέον το επιθήλιο συμβάλλει και στη μεταφορά ηλεκτρολυτών η οποία όταν διαταράσσεται παρατηρούνται διαρροϊκές κενώσεις. Σε άτομα που νοσούν παρατηρείται ελαττωματική επαγωγή των καναλιών νατρίου του εντερικού επιθηλίου από την αλδοστερόνη και μείωση της απορρόφησης νατρίου.

#### δ. Δυσλειτουργία του ανοσολογικού συστήματος:

Στους ασθενείς με ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις εντεροπάθειες έχουν αναφερθεί μεταβολές στην ανοσολογική απάντηση του βλεννογόνου. Συγκεκριμένα στην νόσο Crohn παρατηρείται μία Th1 ανοσολογική απάντηση η οποία συμβάλλει στην παθογένεια της νόσου. Σε φυσιολογικές συνθηκες υπάρχει μία ισορροπία μεταξύ των

δραστικών ( Th1/Th2/Th17) και των ρυθμιστικών κυττάρων. Τα ρυθμιστικά κύτταρα είναι CD4+CD25+ κύτταρα με κατασταλτική δράση που αποτελούν το 5-10% των βοηθητικών T λεμφοκυττάρων του ανθρώπινου οργανισμού. Μία αύξηση των πληθυσμών των δραστικών κυττάρων ή η μειωμένη δραστηριότητα των ρυθμιστικών κυττάρων μπορεί να οδηγήσουν σε φλεγμονή του βλεννογόνου. Σε ασθενείς με ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις εντεροπάθειες παρατηρείται ανοσολογική απάντηση έναντι αντιγόνων της εντερικής χλωρίδας που δεν παρατηρείται σε υγιείς γεγονός που υποδηλώνει ανεπάρκεια ρυθμιστικών κυττάρων.

Συνοψίζοντας λοιπόν υπάρχουν δεδομένα που υποδεικνύουν ότι οι ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις εντεροπάθειες είναι αποτέλεσμα της διαταραγμένης συνύπαρξης των μικροοργανισμών του αυλού, του εντερικού επιθηλίου και του ανοσολογικού συστήματος του ξενιστή σε γενετικά προδιαθετειμένα άτομα. Ιδιαίτερη βαρύτητα έχει η ανοσολογική ανταπόκριση τόσο για την παθοφυσιολογία αυτών των νόσων όσο και γιατί μπορεί να αποτελέσει μελλοντικό θεραπευτικό στόχο. Ας δούμε λοιπόν παρακάτω κάποια χαρακτηριστικά της επίκτητης ανοσίας και ας εστιάσουμε στη σημασία των συνδιεγερτικών μορίων σ' αυτήν.

### **3.Ο ρόλος των συνδιεγερτικών μορίων γενικά στην ανοσολογική απόκριση:**

Για την επίκτητη ανοσία είναι αναγκαία η ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων η οποία ρυθμίζεται με το κλασσικό μοντέλο δύο σημάτων. Σύμφωνα με το παραπάνω μοντέλο τα T-λεμφοκύτταρα απαιτούν δύο σήματα για να ενεργοποιηθούν πλήρως. Το πρώτο σήμα είναι αντιγονο-ειδικό και γίνεται με την παρουσίαση του αντιγόνου από τα αντιγόνα του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας ( MHCII ) των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων στον αντιγονο-ειδικό υποδοχέα των T-λεμφοκυττάρων ( TcR ). Ωστόσο τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα δεν είναι απλώς παθητικοί παρουσιαστές αντιγόνων αλλά δίνουν και το δεύτερο σήμα για την πλήρη ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων, μία διαδικασία που είναι γνωστή σαν συνδιέγερση. Η συνδιέγερση είναι μηχανισμός ασφαλείας του ανοσολογικού συστήματος για την αποφυγή ανεπιθύμητης ενεργοποίησης των T-λεμφοκυττάρων και λειτουργεί σε πολλά επίπεδα. Επιτρέπει την πλήρη ενεργοποίηση, προλαμβάνει την ανέργια και την απόπτωση, επάγει τη διαφοροποίηση των λεμφοκυττάρων σε δραστικά και μνημονικά, οδηγεί στον πολλαπλασιασμό τους και επιτρέπει τη διακυτταρική αλληλεπίδραση. Σε απουσία συνδιεγερτικού σήματος, τα T-

λεμφοκύτταρα δεν ενεργοποιούνται ,αδυνατούν να παράγουν κυτταροκίνες και μπαίνουν σε μία κατάσταση που ονομάζεται ανέργια.

Αρχικά υπήρχε η άποψη ότι οι μεταβιβαστές–κλειδιά των συνδिएγερτικών σημάτων είναι διαλυτοί παράγοντες, όπως οι κυτταροκίνες. Αργότερα όμως φάνηκε ότι η συνδιέγερση μεσολαβείται από την αλληλεπίδραση ζευγαριών-υποδοχέων μεταξύ αντιγονοπαρουσιαστικών και T-λεμφοκυττάρων που επιτρέπουν την αμφίδρομη επικοινωνία αυτών των κυττάρων. Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός συνδिएγερτικών ζευγαριών-υποδοχέων που έχουν διακριτές αλλά και αλληλοεπικαλυπτόμενες λειτουργίες. Γενικά όμως η συνδιέγερση μεσολαβείται από τρεις μεγάλες οικογένειες συνδिएγερτικών μορίων: την υπεροικογένεια B7:CD28, την οικογένεια TNF:TNF υποδοχέα και την οικογένεια CD2. Σημασία στη συνδιέγερση έχουν και κάποιες ιντεγκρίνες (μία κατηγορία μορίων κυτταρικής προσκόλλησης). Στη δεύτερη οικογένεια (TNF:TNF υποδοχέα ) ανήκει το ζευγάρι υποδοχέων CD40/CD40L το οποίο έχει φανεί ότι υπερεκφράζεται και εμπλέκεται στην απώλεια της ανοχής έναντι αυτοαντιγόνων σε πολλές αυτοάνοσες νόσους. Σ' αυτό το ζευγάρι και στο ρόλο του στις ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις εντεροπάθειες θα εστιάσουμε εδώ.

#### **4.Το συνδिएγερτικό σήμα CD40/CD40L**

Το μόριο CD40 ταυτοποιήθηκε αρχικά στα μέσα της δεκαετίας του 80 σαν υποδοχέας της επιφάνειας των B λεμφοκυττάρων του οποίου η δέσμευση οδηγούσε στην πολυκλωνική ενεργοποίησή τους. Είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου I, 45-50kDa, που ανήκει στην υπεροικογένεια TNF υποδοχέα εξαιτίας της ομολογίας της με αυτόν και εκφράζεται σε B λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα, μακροφάγα, επιθηλιακά, ενδοθηλιακά, μεσεγχυματικά κύτταρα και αιμοπετάλια. Από την άλλη το μόριο CD40L αναγνωρίστηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1990 ως μόριο της κυτταρικής μεμβράνης των T λεμφοκυττάρων που οδηγεί σε διαφοροποίηση B λεμφοκυττάρων. Είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου II, 39kDa, που ανήκει στην υπεροικογένεια TNF και εκφράζεται κυρίως από τα ενεργοποιημένα CD4<sup>+</sup> T λεμφοκύτταρα, από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια αλλά και από μονοκύτταρα, NK κύτταρα, B κύτταρα, CD8<sup>+</sup> T λεμφοκύτταρα, μαστοκύτταρα και βασεόφιλα. Μετά την έκφραση του, το CD40L αποκόπτεται από την κυτταρική μεμβράνη και λειτουργεί ελεύθερο στην κυκλοφορία του αίματος σε βιολογικά δραστική μορφή (sCD40L). Μετά την πρόσδεση του CD40 με το CD40L ξεκινά η ενεργοποίηση μίας σειράς κινασών όπως

η ERK1, ERK2, p38, JNK και μίας σειράς μεταγραφικών παραγόντων όπως ο NFκB, ο AP-1 και ο NFAT. Αυτό οδηγεί στην ενεργοποίηση των κυττάρων που εκφράζουν CD40 τα οποία παράγουν βιοενεργά μόρια η δράση των οποίων εξαρτάται από το στάδιο διαφοροποίησης των εμπλεκόμενων κυττάρων, από το ποσοστό έκφρασης των συνδιεγερτικών σημάτων και το ιστικό μικροπεριβάλλον όπου αυτή η πρόσδεση λαμβάνει χώρα.

Μία από τις περισσότερο μελετημένα βιολογικά αποτελέσματα της πρόσδεσης CD40/CD40L είναι η αλλαγή στο VDJ ανασυνδυασμό και η σύνθεση ανοσοσφαιρινών από τα B λεμφοκύτταρα. Ο κριτικός ρόλος αυτής της αλληλεπίδρασης γίνεται εμφανής και αποκτά κλινική σημασία σε ασθενείς με X συνδεδεμένο υπερ-IgM σύνδρομο όπου υπάρχει γενετική μετάλλαξη στο CD40L με αποτέλεσμα διαταραχές στην παραγωγή αντισωμάτων με έλλειψη κυκλοφορούντων ανοσοσφαιρινών IgA και IgG στο αίμα εξαιτίας της αδυναμίας της αλλαγής του ανασυνδυασμού από τον IgM ισότυπο. Επιπλέον η πρόσδεση CD40/CD40L οδηγεί στην ωρίμανση των B-λεμφοκυττάρων σε μνημονικά και επάγει την ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό τους όπως έχει φανεί σε *in vivo* πειράματα σε ποντίκια.

Ωστόσο υπάρχουν δεδομένα για τη σημασία της CD40/CD40L πρόσδεσης και στην κυτταρική ανοσία. Ο CD40L επάγει την αυξημένη έκφραση B7.1 και B7.2 στα B-λεμφοκύτταρα και διεγείρει την αύξηση της έκφρασης στην επιφάνεια των δενδριτικών κυττάρων και άλλων συνδιεγερτικών μορίων όπως των CD54 και CD86. Επιπλέον επάγει την παραγωγή ποικίλων κυτταροκινών όπως της IL-8, του TNF- $\alpha$ , του MIP-1 $\alpha$  και της IL-12, μίας κυτταροκίνης καθοριστικής για την Th1 ανοσολογική απόκριση. Τέλος οδηγούν στην απόπτωση των CD4<sup>+</sup> και την παραγωγή μνημονικών CD8<sup>+</sup> T κυττάρων μνήμης.

Εκτός από τα κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος τα μόρια CD40 και CD40L όπως προαναφέρθηκε εκφράζονται σε πολλά κύτταρα του οργανισμού όπως τα επιθηλιακά κύτταρα και τα αιμοπετάλια.. Σε αυτά τα κύτταρα η αλληλεπίδραση CD40/CD40L συνεισφέρει στην ενίσχυση της ανοσολογικής απόκρισης και της φλεγμονής. Έτσι η πρόσδεση CD40 στα επιθηλιακά κύτταρα οδηγεί στην παραγωγή των χημειοκινών IL-8, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  και RANTES, στην παραγωγή κυτταροκινών IL-1, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ , στην παραγωγή μορίων διακυτταρικής προσκόλλησης ICAM-1, VCAM-1, E-selectin και έκκριση μεταλλοπρωτεασών. Στους ινοβλάστες επάγεται η έκφραση COX-2 και η παραγωγή προσταγλαδίνης PGE2. Ο παράγοντας sCD40L ενεργοποιεί στα αιμοπετάλια την έκφραση της P-

selectin και την απελευθέρωση της β-θρομβοσφαιρίνης και της 5-υδροξυτρυπταμίνης ενώ ο προσδεδεμένος στα κύτταρα CD40L επάγει την απελευθέρωση του παράγοντα RANTES από τα κοκκία των αιμοπεταλίων.

Τέλος, τόσο ο διαλυτός όσο και ο προσδεδεμένος παράγοντας CD40L επάγουν την αγγειογένεση όπως φαίνεται με την παραγωγή του παράγοντα αύξησης των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα μονοκύτταρα *in vitro* και την δημιουργία αγγείων *in vivo*.

### **5.Εκφραση των μορίων CD40/CD40L στις ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις εντεροπάθειες**

Πέρα από τη σημασία της αλληλεπίδρασης CD40/CD40L στην επίκτητη ανοσία, την αιμόσταση και τη φλεγμονή τα παραπάνω μόρια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε χρόνιες φλεγμονώδεις νόσους όπως οι ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις εντεροπάθειες. Από την ανοσοιστοχημεία για το CD40 στο παχύ έντερο υγιών ατόμων εντοπίζονται λίγα μονοκύτταρα στη βασική μεμβράνη που εκφράζουν το παραπάνω μόριο, παρατηρείται ασθενής έκφραση του στα ενδοθηλιακά κύτταρα του υποβλεννογονίου χιτώνα ενώ επίσης λίγα μονοκύτταρα εκφράζουν το μόριο CD40L. Αυτά τα ευρήματα έρχονται σε αντίθεση με τα ευρήματα σε ασθενείς με νόσο Crohn και ελκώδη κολίτιδα όπου υπάρχει έντονη και διάχυτη έκφραση του CD40 στα μονοκύτταρα, ενδοθηλιακά και μεσεγχυματικά κύτταρα σε βλεννογόνο και υποβλεννογόνο χιτώνα όπως φαίνεται σε βιοψίες ασθενών. Επιπλέον φαίνεται ότι η υπερέκφραση του CD40 στα κύτταρα της βασικής μεμβράνης συσχετίζεται με την ενεργό φάση της νόσου. Από την άλλη, στους ασθενείς με ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις εντεροπάθειες υπάρχει αυξημένη έκφραση του μορίου CD40L στα αιμοπετάλια και κυρίως στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια μικροθρόμβων που έρχονται σε στενή επαφή με τα ενδοθηλιακά κύτταρα γεγονός που εξηγεί τα θρομβοεμβολικά επεισόδια που παρατηρούνται συχνά στις ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις εντεροπάθειες.

Πέρα από την ενεργοποίηση των CD40/CD40L στο έντερο, παρατηρείται ενεργοποίηση των παραπάνω μορίων και συστηματικά. Έτσι αυξάνεται η έκφραση του CD40 στα κυκλοφορούντα λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα και του CD40L στα αιμοπετάλια γεγονός που οφείλεται στην αυξημένη ενεργοποίηση και στην επαφή με τα ενδοθηλιακά κύτταρα των μικρών αγγείων του βλεννογόνου που φλεγμαίνει. Επίσης αυξάνονται τα επίπεδα sCD40L στο πλάσμα ανάλογα με την έκταση της

φλεγμονής γεγονός που δίνει τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν σε δείκτης αξιολόγησης της έκτασης και της ενεργότητας της νόσου.

## **6.Μηχανισμοί επαγωγής των μορίων CD40/CD40L στις ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις εντεροπάθειες**

Η γνώση μας για τους μηχανισμούς που επάγουν την αύξηση των επιπέδων sCD40L στη συστηματική κυκλοφορία και την αυξημένη έκφραση των CD40 και CD40L στο έντερο προέκυψαν από πειράματα σε καλλιέργειες ινοβλαστών εντέρου ανθρώπου ( HIF ) και ενδοθηλιακών κυττάρων των μικρών αγγείων του εντέρου ( HIMEC ). Έτσι έχει φανεί με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ότι μη διεγερμένα HIF ή HIMEC έχουν χαμηλά επίπεδα CD40 mRNA τα οποία όμως αυξάνονται σημαντικά όταν οι παραπάνω κυτταρικές σειρές διεγείρονται με IFN- $\gamma$  και λιγότερο όταν διεγείρονται με τις κλασσικές προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες. Το παραπάνω συμπέρασμα επιβεβαιώθηκε με πειράματα κυτταρομετρίας ροής στα οποία μη διεγερμένες καλλιέργειες HIF έχουν χαμηλή έκφραση CD40 στην επιφάνειά τους που προοδευτικά αυξάνεται μετά από διέγερση από IFN- $\gamma$  για 72 ώρες. Έκθεση των HIF σε άλλες προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως η IL-1 $\beta$ , ο TNF- $\alpha$  ή λιποπολυσακχαρίτες δεν οδηγούν σε αξιοσημείωτη αύξηση της έκφρασης του CD40 γεγονός που υποδεικνύει το ρόλο της Th1 κυτταροκίνης στην έκφραση του CD40. Επίσης είναι ενδιαφέρον ότι μετά την επίτευξη της μέγιστης έκφρασης του CD40 η σειρά HIF θα συνεχίσει να εκφράζει αυξημένα επίπεδα CD40 για μερικές μέρες. Και η κυτταρική σειρά HIMEC εκφράζει χαμηλά επίπεδα CD40 τα οποία αυξάνονται μετά από διέγερση με IFN- $\gamma$  και παραμένουν αυξημένα για μέρες μετά την απομάκρυνση της κυτταροκίνης. Η παρατεταμένη αύξηση της έκφρασης του CD40 επιτρέπει την επίσης παρατεταμένη αλληλεπίδραση με τα CD40L<sup>+</sup> T λεμφοκύτταρα ενισχύοντας τη φλεγμονή.

Ο μηχανισμός της επαγωγής του CD40L έχει επίσης μελετηθεί in vitro με T λεμφοκύτταρα της βασικής στοιβάδας του εντέρου, T λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος και αιμοπετάλια από το βλεννογόνο και το περιφερικό αίμα ασθενών με ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις εντεροπάθειες. Αμφότερα τα T λεμφοκύτταρα της βασικής στοιβάδας του εντέρου και τα T λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση CD40L μετά από διέγερση με anti-CD3 που διαρκεί τουλάχιστον 48 ώρες. Τα αιμοπετάλια από την άλλη ενεργοποιούνται και

εκφράζουν CD40L μετά από διέγερση διάφορων παραγόντων όπως της θρομβίνης, του κολλαγόνου, του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων, λιποπολυσακχαριτών, IL1β και του πεπτιδίου που ενεργοποιεί τον υποδοχέα θρομβίνης τα περισσότερα από τα οποία κυκλοφορούν στο βλεννογόνο και στη συστηματική κυκλοφορία κατά την ενεργό φάση της νόσου. Μη διεγερμένα αιμοπετάλια υγιών ατόμων έχουν χαμηλά επίπεδα CD40L τα οποία μετά από ενεργοποίηση με θρομβίνη αυξάνονται σε λίγα λεπτά και επανέρχονται σε μία ώρα. Αντίθετα ένα σημαντικό ποσοστό μη διεγερμένων αιμοπεταλίων ασθενών με ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις εντεροπάθειες είναι CD40L<sup>+</sup> αν και επάγεται περαιτέρω έκφραση του CD40L μετά από διέγερση με θρομβίνη. Τέλος, κύτταρα HIMEC που φλεγμαίνουν φαίνεται ότι επάγουν εξ επαφής την έκφραση και την έκκριση του CD40L από τα αιμοπετάλια υποδεικνύοντας τον κεντρικό ρόλο των μικρών αγγείων του εντέρου που φλεγμαίνουν στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων στις ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις εντεροπάθειες και υπογραμμίζοντας την κλινική σημασία της αλληλεπίδρασης CD40/CD40L στις παραπάνω νόσους

Τα CD40L<sup>+</sup> λεμφοκύτταρα ή η έκθεση στο διαλυτό CD40L επάγουν αυξημένη έκφραση μορίων προσκόλλησης και παραγωγή χημειοκινών από τα ενδοθηλιακά και μεσεγχυματικά κύτταρα των μικρών αγγείων οδηγώντας σε άθροιση περισσότερων T λεμφοκυττάρων που ενεργοποιούνται και επάγουν περαιτέρω παραγωγή χημειοκινών που προσελκύει περισσότερα T κύτταρα δημιουργώντας ένα φαύλο κύκλο που οδηγεί σε επέκταση της φλεγμονής του βλεννογόνου. Επίσης η επαφή των ενεργοποιημένων CD40L<sup>+</sup> αιμοπεταλίων με τα ενδοθηλιακά κύτταρα των μικρών αγγείων επάγει την απελευθέρωση RANTES που προσδένεται με τα ενδοθηλιακά κύτταρα του βλεννογόνου και προσελκύουν επιπλέον T λεμφοκύτταρα πολλαπλασιάζοντας τη φλεγμονή.

#### **7.Η διακοπή του μονοπατιού CD40 ως θεραπευτική παρέμβαση των ιδιοπαθών φλεγμονωδών εντεροπαθειών**

Βασιζόμενοι στη σημασία των συνδιεγερτικών μορίων στην έναρξη και την επέκταση της ανοσολογικής απάντησης, η στόχευση στα μόρια συνδιέγερσης γίνεται θεραπευτικά ελκυστική γιατί παρέχει νέες μεθόδους στο μπλοκάρισμα ανεπιθύμητων B- και T- αποκρίσεων που μεσολαβούν στην ιστική βλάβη. Αυτό ισχύει και για το συνδιεγερτικό ζεύγος CD40/CD40L γιατί εμπλέκεται στη ρύθμιση μεγάλου αριθμού



ανοσολογικών διαδικασιών. Έτσι, ο σχεδιασμός ειδικών μορίων που διακόπτουν τις δράσεις του CD40 ή CD40L θα μπορούσαν να αποτελέσουν νέες θεραπευτικές στρατηγικές για νόσους όπου η σηματοδότηση με CD40 έχει παθογόνο ρόλο. In vivo ενδείξεις που υποστηρίζουν την παραπάνω υπόθεση αφορούν ζωικά μοντέλα και πράγματι η χορήγηση αντισωμάτων έναντι του CD40L έχει φανεί ότι ωφελούν ποντίκια με σοβαρές αυτοάνοσες και φλεγμονώδεις νόσους συμπεριλαμβανομένων της αρθρίτιδας των χρόνιων νόσων του κολλαγόνου, της πνευμονικής ίνωσης, της πολλαπλής σκλήρυνσης, της νεφρίτιδας του λύκου, της αθηροσκλήρυνσης και της οξείας παγκρεατίτιδας. Παρόλο που το μπλοκάρισμα της συνδιέγερσης θεωρείται ο υποκείμενος μηχανισμός υπάρχουν μελέτες με τις οποίες φαίνεται ότι μηχανισμός δράσης μπορεί να είναι και η Fc εξαρτώμενη μείωση των ενεργοποιημένων T λεμφοκυττάρων μέσω ειδικών αντισωμάτων για το CD40L. Ουσιαστικά ποιος μηχανισμός-ο πρώτος ή ο δεύτερος- είναι υπεύθυνος για την παρατηρούμενη κλινική βελτίωση παραμένει αδιευκρίνιστος.

Όσον αφορά στη σημασία των CD40/CD40L αλληλεπιδράσεων στη φλεγμονή του εντέρου έχει παρατηρηθεί ευεργετική δράση των CD40L αντισωμάτων σε ζωικά μοντέλα όπως στο μοντέλο επαγόμενης με απτίνη (μίας τυπικής Th1 ανοσολογικής απάντησης) κολίτιδας σε ποντίκια. Επίσης σε άλλο Th1 ζωικό μοντέλο που επάγεται με τη μεταφορά CD45RB<sup>high</sup> CD4+ T κύτταρα σε SCID ποντίκια η εξέλιξη της κολίτιδας και της φλεγμονής του εντέρου ήταν παράλληλη με την αυξημένη έκφραση των πρωτεϊνών και του mRNA των CD40 και του CD40L. Στο παραπάνω μοντέλο η φλεγμονή του εντέρου περιορίστηκε πλήρως με τη χορήγηση του μονοκλωνικού αντισώματος έναντι του CD40L μετά τη μεταφορά των CD45RB<sup>high</sup> CD4+ T κύτταρων. Ακόμη όμως κι αν η χορήγηση του αντισώματος ακολουθούσε την επαγωγή της κολιτιδας το μπλοκάρισμα του CD40L οδηγούσε σε σημαντική κλινική και ιστολογική βελτίωση. Τέλος σε άλλες μελέτες, η χορήγηση αντισώματος έναντι του CD40L προλάμβανε την επαγωγή της κολίτιδας με τη μεταφορά CD4+ T κύτταρων ενεργοποιημένων έναντι βακτηρίων του εντέρου.

Δεδομένης της αποτελεσματικότητας της αναστολής του CD40/CD40L μονοπατιού στις ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις εντεροπάθειες στα ζωικά μοντέλα έχουν ξεκινήσει κλινικές δοκιμές με διάφορα μονοκλωνικά αντισώματα σε άτομα με διάφορες αυτοάνοσες και ανοσομεσολαβούμενες καταστάσεις. Ήδη έχει γίνει κλινική δοκιμή φάσης I με χειμερινό μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του CD40 σε ασθενείς με νόσο του Crohn. Όμως, κλινικές δοκιμές φάσης I και II με αντίσωμα έναντι CD40L

έχουν ξεκινήσει σε ασθενείς με νόσο του Crohn, με ψωρίαση, με ιδιοπαθή θρομβοκυτταροπενική πορφύρα, πολλαπλή σκλήρυνση και συστηματικό ερυθρηματώδη λύκο και έχει φανεί από τη μια μείωση των αυτοαντισωμάτων αλλά και πρωτεϊνουρία και κλινική εξέλιξη της νόσου παρά τη θεραπεία. Επίσης παρά την αποτελεσματικότητα τους συνοδεύονται από θρομβοεμβολικές επιπλοκές τόσο στα πειραματικά μοντέλα όσο και στους ασθενείς. Από την άλλη, τα anti-CD40 αντισώματα ενεργοποιούν τα κύτταρα που εκφράζουν CD40 και δεν υπάρχουν μέχρι σήμερα διαθέσιμοι ανταγωνιστές του CD40 χαμηλού μοριακού βάρους

## **B.Στόχος της εργασίας μας**

Παρόλο που η χορήγηση αντισωμάτων σχετίζεται με παρενέργειες, παρατηρείται και κλινική αποτελεσματικότητα, υποδηλώνοντας τη σημασία της anti-CD40L θεραπείας στις ανοσομεσολαβούμενες διαταραχές. Βασίζόμενοι λοιπόν στις έως τώρα ενδείξεις θα πρέπει να συνεχιστούν οι μελέτες μέχρι να αναγνωριστεί ασφαλής τρόπος μπλοκαρίσματος του μονοπατιού CD40/CD40L, να καθοριστεί η σωστή δόση και η κατάλληλη δοσολογία της αγωγής σε προσεκτικά σχεδιασμένα πολυκεντρικά πρωτόκολλα που περιλαμβάνουν μεγάλο αριθμό κατάλληλα επιλεγμένων ασθενών. Εδώ εμείς θα ασχοληθούμε με την αποτελεσματικότητα της μετα-μεταγραφικής αναστολής του CD40 με anti-sense oligonucleotides (CD40ASO) στη θεραπεία της επαγόμενης με TNB-S κολίτιδας σε ποντίκια BALB/c τόσο στην πρόιμη όσο και στην όσιμη μορφή της νόσου. Για τη δραστικότητα του CD40ASO στην TNB-S κολίτιδα έχουν προηγηθεί μελέτες σύμφωνα με τις οποίες αποτελεί υψηλής δυνατότητας παρέμβαση στη νόσο τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*. Εμείς εδώ θα συγκρίνουμε τη δράση διαφόρων CD40ASO smarticles δηλαδή ενσωματωμένων σε λιποσώματα CD40ASO με διαφορετικές συγκεντρώσεις λιποσώματος και CD40ASO μεταξύ τους και με διάφορες φαρμακευτικές ουσίες που ανήκουν στην κλασική θεραπεία της νόσου σήμερα. Η σύγκριση θα αφορά την πορεία της νόσου, την ιστολογική εικόνα και τις επιδράσεις των διαφόρων θεραπειών στους κυτταρικούς πληθυσμούς του ανοσοποιητικού συστήματος και στις κυτταροκίνες που συμμετέχουν στη φλεγμονή. Επιπλέον θα εξετάσουμε την αποτελεσματικότητα των ίδιων λιποσωμάτων (smarticles) που περιέχουν CD40ASO στην TNB-S επαγόμενη κολίτιδα όταν αυτά λυοφυλιωθούν και επαναδιαλυθούν και το ρόλο της ψευδοκινάσης IRAK-M στην TNB-S επαγόμενη κολίτιδα. Η IRAK-M (IL-1

Receptor Associated Kinase-M) είναι ένα πολύ σημαντικό μόριο στην καταστολή ανοσολογικών αποκρίσεων. Εκφράζεται αποκλειστικά στα περιφερικά λευκοκύτταρα και επάγεται κατά τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε μακροφάγα. Ο κύριος ρόλος της είναι η αναστολή της ενεργοποίησης του μονοπατιού IL-1 καθώς και η επαγωγή ανοχής στα μακροφάγα έναντι των αντιγόνων. Τα IRAK-M knock out ποντίκια δεν αναπτύσσουν το κλασικό μοντέλο ανοχής στον LPS. Εδώ εμείς θα εξετάσουμε αν η απουσία της IRAK-M συνοδεύεται *in vivo* από εντονότερη φλεγμονή του εντέρου.

### **Γ. Υλικά και μέθοδοι:**

#### α. Επαγωγή της TNB-S κολίτιδας

Για τα πειράματά μας χρησιμοποιήσαμε ποντίκια BALB/c από το Ινστιτούτο Παστέρ. Η επαγωγή της κολίτιδας έγινε με υποκλυσμό κάθε ποντικίου BALB/c με 120μl μείγματος που προέκυπτε από την ανάμειξη ενός μέρους 5% (w/v) σε νερό 2,4,6 trinitro benzene sulfonic acid (TNB-S) το οποίο λειτουργεί σαν απτίνη (60μl), και ενός μέρους αιθανόλης (60μl). Η αιθανόλη χρησιμοποιείται για να καταστρέψει το φραγμό του βλεννογόνου ενώ το TNB-S θεωρείται ότι δίνει σε κάποιες πρωτείνες του παχέως εντέρου ή της εντερικής χλωρίδας την ιδιότητα να διεγείρουν το ανοσολογικό σύστημα του ξενιστή. Πριν την επαγωγή της νόσου τα ποντίκια παρέμεναν νηστικά για 24 ώρες ώστε το έντερό τους να έχει όσο γίνεται μικρότερη ποσότητα κοπράνων και να αποφευχθεί η αποβολή του φαρμάκου μαζί με κάποια κένωση κατά τον υποκλυσμό (εξαιτίας του γαστροκολικού αντανακλαστικού). Για τη χορήγηση του μείγματος χρησιμοποιούσαμε 3,5F καθετήρα, τον οποίο προσαρμόζαμε σε σύριγγα και αναρροφούσαμε το μείγμα. Στη συνέχεια τοποθετούσαμε αργά τον καθετήρα στο ορθό με πολύ προσοχή ώστε να αποφύγουμε τη διάτρηση του εντέρου. Στη συνέχεια εξίσου αργά ενίσαμε το περιεχόμενο της σύριγγας στο ορθό και αφού τελειώναμε απομακρύναμε τον καθετήρα και κρατάγαμε το ποντίκι σε κάθετη θέση από την ουρά με το κεφάλι κάτω για περίπου 60 δευτερόλεπτα ώστε το μείγμα να προχωρήσει στο έντερο.

#### β. Σύγκριση θεραπευτικής δράσης των διάφορων CD40ASO smarticles μεταξύ τους και με τη σύγχρονη θεραπεία

Μετά την επαγωγή της νόσου χωρίσαμε τα ποντίκια μας σε ομάδες ανάλογα με τη θεραπεία που σκοπεύαμε να τους χορηγήσουμε. Στο πρώτο μέρος των πειραμάτων μας, που αφορά τη δραστηριότητα διαφόρων CD40ASO smarticles (δηλαδή σωματιδίων με διαφορετικές περιεκτικότητες λιπιδίων και CD40ASO) στην πρόιμη μορφή της νόσου σε σύγκριση τόσο μεταξύ τους όσο και με την κλασική θεραπεία χωρίζουμε τα ποντίκια στις εξής 12 ομάδες (στην κάθε μία αναλογούσαν 5 ποντίκια ):

- (i) στην ομάδα που κάνουμε υποκλυσμό μόνο με αιθανόλη
- (ii) στην ομάδα που κάνουμε υποκλυσμό με TNB-S/αιθανόλη και δε χορηγούμε καμία θεραπεία
- (iii) στην ομάδα που κάνουμε υποκλυσμό με TNB-S/αιθανόλη και χορηγούμε σα θεραπεία σουλφασαλαζίνη
- (iv) στην ομάδα που κάνουμε υποκλυσμό με TNB-S/αιθανόλη και χορηγούμε σα θεραπεία μόνο CD40ASO χωρίς λιπίδιο
- (v) στην ομάδα που κάνουμε υποκλυσμό με TNB-S/αιθανόλη και χορηγούμε σα θεραπεία μόνο λιπίδιο nov38d192
- (vi) στην ομάδα που κάνουμε υποκλυσμό με TNB-S/αιθανόλη και χορηγούμε σα θεραπεία smarticle nov38d193 (8mg/kg CD40ASO in 105mM lipid )
- (vii) στην ομάδα που κάνουμε υποκλυσμό με TNB-S/αιθανόλη και χορηγούμε σα θεραπεία smarticle nov38d194 (4mg/kg CD40ASO in 107mM lipid )
- (viii) στην ομάδα που κάνουμε υποκλυσμό με TNB-S/αιθανόλη και χορηγούμε σα θεραπεία smarticle nov38d188 (8mg/kg CD40ASO in 60mM lipid )
- (ix) στην ομάδα που κάνουμε υποκλυσμό με TNB-S/αιθανόλη και χορηγούμε σα θεραπεία smarticle nov38d190 (4mg/kg CD40ASO in 54mM lipid )
- (x) στην ομάδα που κάνουμε υποκλυσμό με TNB-S/αιθανόλη και χορηγούμε σα θεραπεία smarticle nov38d191(2mg/kg CD40ASO in 60mM lipid )
- (xi) στην ομάδα που κάνουμε υποκλυσμό με TNB-S/αιθανόλη και χορηγούμε σα θεραπεία smarticle nov38d189(4mg/kg CD40ASO in 40mM lipid )
- (xii) στην ομάδα που κάνουμε υποκλυσμό με TNB-S/αιθανόλη και χορηγούμε σα θεραπεία smarticle nov38d187(8mg/kg CD40ASO in 44mM lipid )

Στη συνέχεια, κάναμε ενδοφλέβια χορήγηση στις ουρές των ποντικιών τη θεραπεία τους ανάλογα με την ομάδα στην οποία ανηκαν σε 3 δόσεις. Η πρώτη δόση γίνεται σε

12 ώρες μετά τον υποκλυσμό, η δεύτερη την τρίτη ημέρα μετά τον υποκλυσμό και η τρίτη την πέμπτη ημέρα μετά τον υποκλυσμό. Γίνονταν καθημερινή καταγραφή του βάρους των ποντικών καθώς και της θνητότητας τους. Η νόσος διαπιστώνεται με την έναρξη διαρροιών και ενίοτε αιματηρών κενώσεων και με την ελάττωση του βάρους των ποντικών ενώ η ανταπόκριση στη χορηγούμενη θεραπεία με την ανάκτηση του βάρους τους. Τη δέκατη ημέρα μετά τον υποκλυσμό όλα τα ποντίκια θυσιάζονταν.

#### γ. Θεραπευτική δραστηριότητα των CD40ASO smarticles στην πρόιμη μορφή της νόσου και μηχανισμός δράσης

Στο δεύτερο μέρος των πειραμάτων μας που αφορά την αποτελεσματικότητα της θεραπείας με CD40ASO smarticles στην πρόιμη μορφή της νόσου επάγουμε όπως και στο πρώτο μέρος κολίτιδα με υποκλυσμό TNB-S σε ποντίκια BALB/c. Χωρίζουμε τα ποντίκια σε 7 ομάδες αυτή τη φορά (με 5 ποντίκια η κάθε μία ) και συγκεκριμένα

- (i) στην ομάδα που κάνουμε υποκλυσμό μόνο με αιθανόλη και δε χορηγούμε θεραπεία
- (ii) στην ομάδα που κάνουμε υποκλυσμό με TNB-S/αιθανόλη και δε χορηγούμε καμία θεραπεία
- (iii) στην ομάδα που κάνουμε υποκλυσμό με TNB-S/αιθανόλη και χορηγούμε σα θεραπεία πρεδνιζολόνη
- (iv) στην ομάδα που κάνουμε υποκλυσμό με TNB-S/αιθανόλη και χορηγούμε σα θεραπεία μόνο CD40ASO χωρίς λιπίδιο
- (v) στην ομάδα που κάνουμε υποκλυσμό με TNB-S/αιθανόλη και χορηγούμε σα θεραπεία smarticle nov38d193 (8mg/kg CD40ASO in 105mM lipid )
- (vi) στην ομάδα που κάνουμε υποκλυσμό με TNB-S/αιθανόλη και χορηγούμε σα θεραπεία smarticle nov38d194 (4mg/kg CD40ASO in 107mM lipid )
- (vii) στην ομάδα που κάνουμε υποκλυσμό με TNB-S/αιθανόλη και χορηγούμε σα θεραπεία smarticle nov38d188 (8mg/kg CD40ASO in 60mM lipid )

Χορηγούμε ενδοφλέβια στις ουρές των ποντικών την ανάλογη με την κάθε ομάδα θεραπεία 12 ώρες μετά τον υποκλυσμό, παρακολουθούμε την πορεία της νόσου και ανταπόκριση στην αγωγή όπως και στο πρώτο μέρος, θυσιάζουμε τα ποντίκια την τρίτη ημέρα και συλλέγουμε το παχύ έντερο, το σπλήνα και το αίμα τους.

Ακολουθεί μακροσκοπική και ιστολογική εξέταση των εντέρων, μακροσκοπική εξέταση των σπληνών, ομογενοποίηση σπληνών και κυτταρομετρία ροής στα κύτταρα του σπλήνα με δείκτες μακροφάγων ,B-κυττάρων και T-λεμφοκυττάρων. Τέλος γίνεται προσδιορισμός των επιπέδων προ-φλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών σε ομογενοποιημένο έντερο και ορό με την τεχνική ELISA.

#### δ. Θεραπευτική δραστηριότητα των CD40ASO smarticles στην όψιμη μορφή της νόσου και μηχανισμός δράσης

Στο δεύτερο μέρος των πειραμάτων μας που αφορά την αποτελεσματικότητα της θεραπείας με CD40ASO smarticles στην όψιμη μορφή της νόσου επαγάγαμε όπως και στο πρώτο μέρος κολίτιδα με υποκλυσμό TNB-S σε ποντίκια BALB/c και τα χωρίσαμε σε ομάδες ανάλογα με τη θεραπεία τους.

- (i) στην ομάδα που κάνουμε υποκλυσμό μόνο με αιθανόλη και δε χορηγούμε θεραπεία
- (ii) στην ομάδα που κάνουμε υποκλυσμό με TNB-S/αιθανόλη και δε χορηγούμε καμία θεραπεία
- (iii) στην ομάδα που κάνουμε υποκλυσμό με TNB-S/αιθανόλη και χορηγούμε σα θεραπεία πρεδνιζολόνη
- (iv) στην ομάδα που κάνουμε υποκλυσμό με TNB-S/αιθανόλη και χορηγούμε σα θεραπεία μόνο CD40ASO χωρίς λιπίδιο (2,5mg/ml)
- (v) στην ομάδα που κάνουμε υποκλυσμό με TNB-S/αιθανόλη και χορηγούμε σα θεραπεία nov38 (110mM lipid )
- (vi) στην ομάδα που κάνουμε υποκλυσμό με TNB-S/αιθανόλη και χορηγούμε σα θεραπεία nov38-scr ( 105mM lipid +1mg/ml ASO)
- (vii) στην ομάδα που κάνουμε υποκλυσμό με TNB-S/αιθανόλη και χορηγούμε σα θεραπεία nov38-CD40ASO (1mg/ml CD40ASO in 60mM lipid )

Χορηγήσαμε την ανάλογη θεραπεία την τρίτη ημέρα μετά τον υποκλυσμό και θυσιάσαμε τα ποντίκια την τέταρτη ημέρα συλλέγοντας το έντερο, το σπλήνα, τους μεσεντέριους λεμφαδένες και τον ορό των ποντικών. Κάναμε κυτταρομετρία ροής στον ομογενοποιημένο σπλήνα για τους κυτταρικούς πληθυσμούς και προσδιορίσαμε τα επίπεδα κυτταροκινών στον ορό και στο ομογενοποιημένο έντερο με ELISA.

ε. Καθορισμός της δραστηριότητας του smarticle nov38d198 και του nov38lyo στην όψιμη μορφή της νόσου

Χωρίζουμε τα ποντίκια σε 5 ομάδες μετά την επαγωγή της νόσου

- (i) στην ομάδα που κάνουμε υποκλυσμό μόνο με αιθανόλη και δε χορηγούμε θεραπεία
- (ii) στην ομάδα που κάνουμε υποκλυσμό με TNB-S/αιθανόλη και δε χορηγούμε καμία θεραπεία
- (iii) στην ομάδα που κάνουμε υποκλυσμό με TNB-S/αιθανόλη και χορηγούμε σα θεραπεία smarticle nov38d193 (8mg/kg CD40ASO in 105mM lipid )
- (iv) στην ομάδα που κάνουμε υποκλυσμό με TNB-S/αιθανόλη και χορηγούμε σα θεραπεία smarticle nov38d198
- (v) στην ομάδα που κάνουμε υποκλυσμό με TNB-S/αιθανόλη και χορηγούμε σα θεραπεία smarticle nov38lyo

Την τρίτη ημέρα μετά την επαγωγή της νόσου χορηγήθηκε η ανάλογη θεραπεία, την πέμπτη ημέρα έγινε συλλογή αίματος των ποντικιών με σκαριφισμό των ουρών τους και την 8<sup>η</sup> ημέρα τα ποντίκια θυσιάστηκαν και συλλέχθηκαν τα έντερα τους για ιστολογική εξέταση. Στο αίμα που συλλέχθηκε την πέμπτη ημέρα προσδιορίστηκε με ELISA η IL-6.

στ. Καθορισμός της σημασίας του IRAK-M στην TNB-S επαγόμενη κολίτιδα

Επάγαμε τη νόσο (όπως στο α) σε WT BLACK6 και IRAK-M knock out BLACK6 ποντίκια ίδιου σωματικού βάρους (9 ποντίκια σε κάθε κατηγορία). Σαν αρνητικό control χρησιμοποιήσαμε WT και IRAK-M KO ποντίκια (5 ποντίκια σε κάθε κατηγορία) στα οποία κάναμε υποκλυσμό μόνο με αιθανόλη. Παρακολοθήσαμε την πορεία της νόσου με τις διακυμάνσεις του σωματικού βάρους τους και εξετάσαμε μακροσκοπικά το έντερό τους.

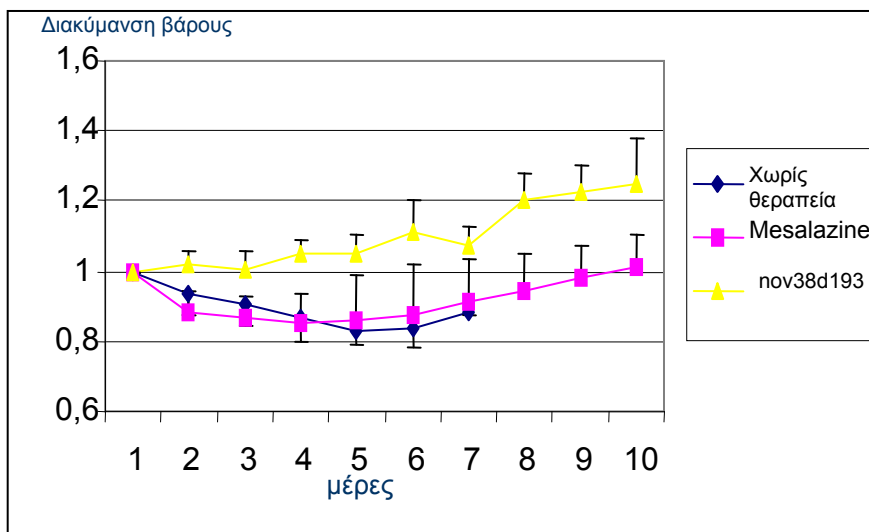
**Δ.Αποτελέσματα:**

1. Τα CD40ASO smarticles είναι αποτελεσματικά στην ελκώδη κολίτιδα.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, στο πρώτο μέρος των πειραμάτων μας συγκρίναμε τη θεραπευτική δράση διαφόρων CD40ASO smarticles με διαφορετικές περιεκτικότητες λιπιδίου και CD40ASO τόσο μεταξύ τους όσο και με την κλασική θεραπεία. Στις 12 ομάδες που χρησιμοποιήσαμε καταγράψαμε το μέσο όρο της διακύμανσης του βάρους των ποντικών που απάρτιζαν την κάθε ομάδα καθώς και το μέσο όρο θνητότητας. Για λόγους σαφέστερης απεικόνισης των αποτελεσμάτων παρουσιάζουμε τμηματικά τα αποτελέσματα μας με τις διάφορες ομάδες των ποντικών κι όχι όλες τις ομάδες μαζί σε ένα διάγραμμα. Συγκεκριμένα σε κάθε διάγραμμα απεικονίζεται ένα smarticle συγκεκριμένης περιεκτικότητας σε λιπίδιο και CD40ASO, με το θετικό control (τα ποντίκια που νοσούν και δε δίνεται θεραπεία) με το αρνητικό control (τα ποντίκια που χορηγούμε μόνο αιθανόλη δηλαδή δεν επάγουμε τη νόσο) και με την κλασική θεραπεία (μεσαλαζίνη).

α. nov38d193 (8mg/kg CD40ASO σε 105mM lipid).

Έτσι στο παρακάτω διάγραμμα βλέπουμε τη διακύμανση του βάρους της ομάδας των ποντικών που δεν έλαβε θεραπεία, της ομάδος που έλαβε την κλασική θεραπεία και της ομάδος στην οποία χορηγήθηκε το smarticle nov38d193 (8mg/kg CD40ASO σε 105mM lipid).



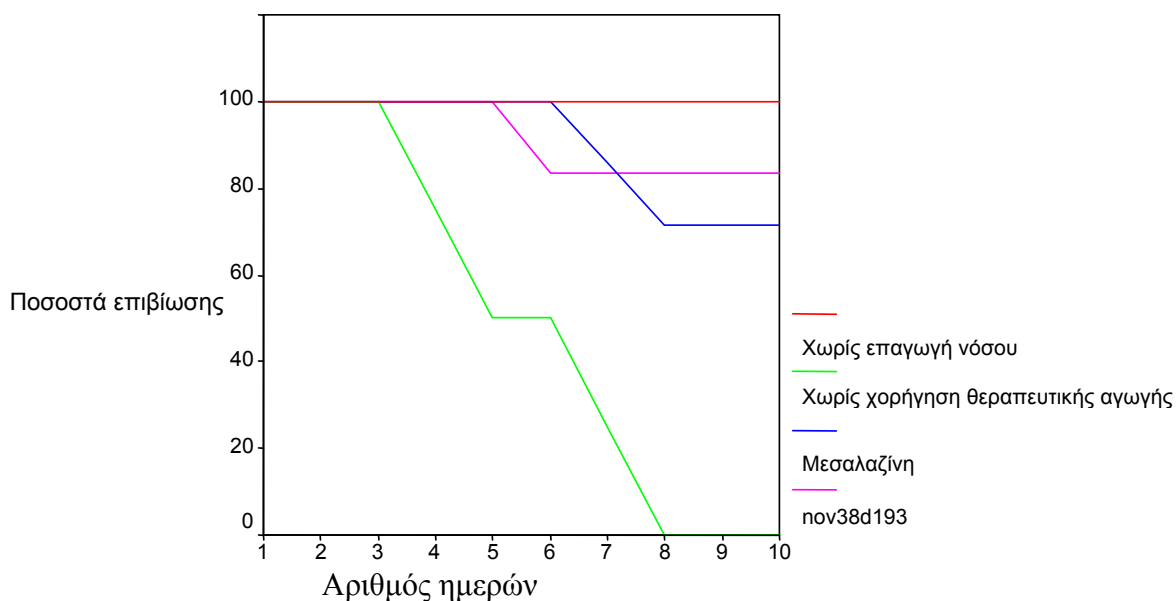
*Εικόνα 1α:* διακύμανση του βάρους των ποντικών που δεν έλαβαν θεραπεία ή έλαβαν ως θεραπεία είτε nov38d193 είτε mesalazine

Στην ομάδα που δεν έλαβε θεραπεία το βάρος των ποντικών μειωνόταν καθημερινά σημείο εξέλιξης της νόσου, στην ομάδα που έλαβε θεραπεία με μεσαλαζίνη το βάρος



μειωνόταν μέχρι την πέμπτη ημέρα οπότε χορηγήθηκε η τρίτη δόση του φαρμάκου και ακολούθησε ανάκτηση του βάρους των ποντικών ενώ στην ομάδα που έλαβε τη θεραπεία με CD40ASO smarticles το βάρος των ποντικών παρέμεινε σταθερό και συγκεκριμένα άρχισε να αυξάνεται μετά την πέμπτη ημέρα δηλαδή μετά την τρίτη και τελευταία δόση του φαρμάκου. Μπορούμε λοιπόν να συμπεράνουμε ότι η πειραματική ουσία που χρησιμοποιήσαμε έχει θεραπευτική δράση στην εξέλιξη της νόσου ανάλογη με αυτή της κλασικής θεραπείας με μεσαλαζίνη.

Παρακάτω βλέπουμε την επιβίωση των ποντικών των παραπάνω ομάδων:



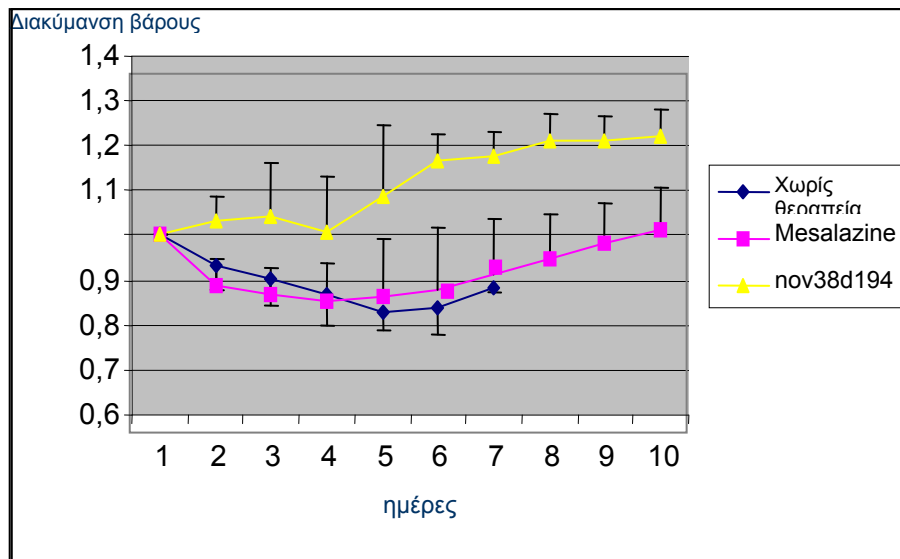
*Εικόνα 1β: Ποσοστά επιβίωσης του αρνητικού control, των ποντικών που δε λαμβάνουν θεραπεία και των ομάδων που λαμβάνουν θεραπεία είτε nov38d193 είτε mesalazine*

Όπως φαίνεται, στα ποντίκια στα οποία δεν επάγουμε τη νόσο η θνητότητα είναι μηδενική, στα ποντίκια που επάγουμε τη νόσο αλλά δε χορηγούμε αγωγή η θνητότητα προσεγγίζει το 100%, ενώ στα ποντίκια που χορηγούμε ως θεραπεία nov38d193 το ποσοστό επιβίωσης είναι μεγαλύτερο από το ποσοστό επιβίωσης των ποντικίων στα οποία χορηγούμε την κλασική θεραπεία.

β. nov38d194 (4mg/kg CD40ASO in 107mM lipid )

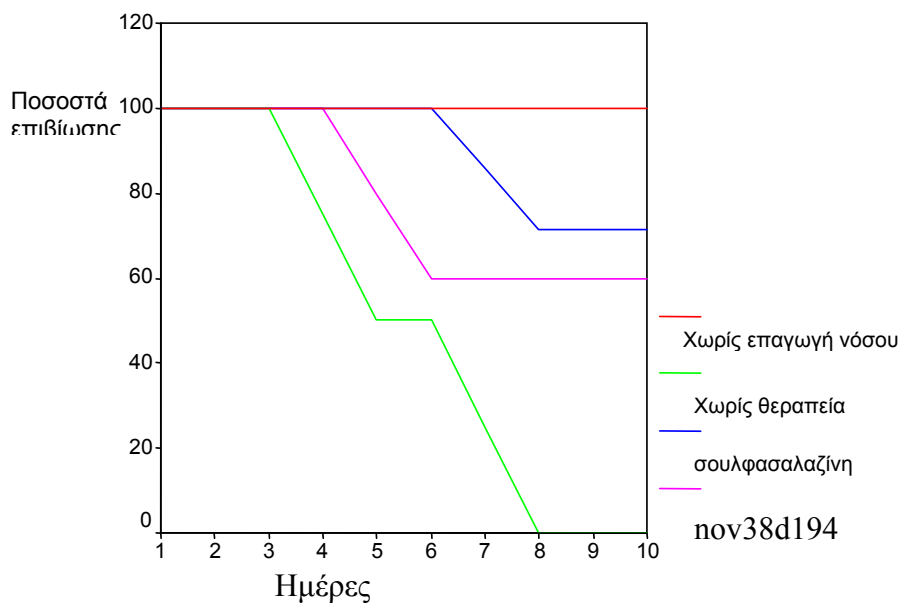
Στο επόμενο διάγραμμα βλέπουμε συγκριτικά τη διακύμανση του βάρους των ποντικίων που δεν έλαβαν θεραπεία, των ποντικίων που έλαβαν την κλασική θεραπεία και των ποντικίων στα οποία χορηγήσαμε το smarticle nov38d194 (4mg/kg

CD40ASO in 107mM lipid ) το οποίο έχει μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε λιπίδιο και μικρότερη περιεκτικότητα σε CD40ASO από το smarticle nov38d193.



*Εικόνα 2α:* διακύμανση του βάρους των ποντικών που δεν έλαβαν θεραπεία ή έλαβαν ως θεραπεία είτε nov38d19 είτε mesalazine

Εδώ τα ποντίκια που λαμβάνουν το smarticle δε χάνουν σχεδόν καθόλου βάρος παρά την επαγωγή της νόσου και μάλιστα το βάρος τους αυξάνεται περισσότερο ήδη από την τέταρτη ημέρα μετά την επαγωγή της νόσου (δηλαδή έπειτα μόλις από τη δεύτερη δόση του φαρμάκου). Όσον αφορά στη θνητότητα:

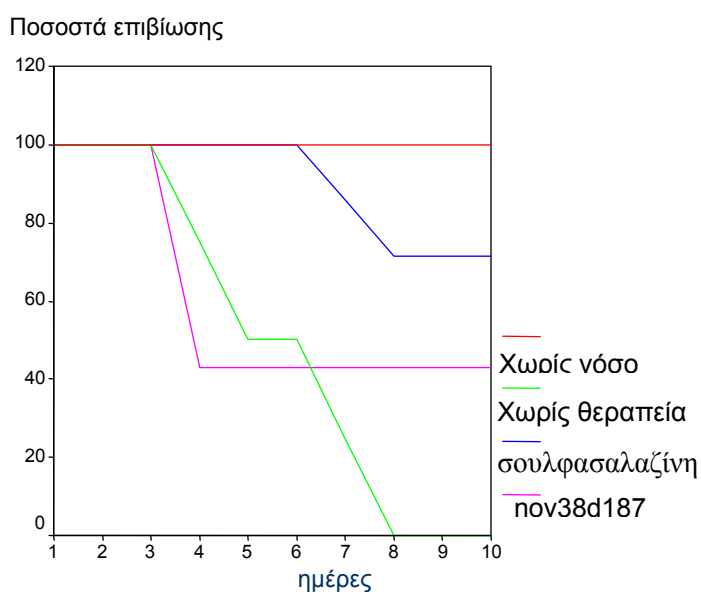
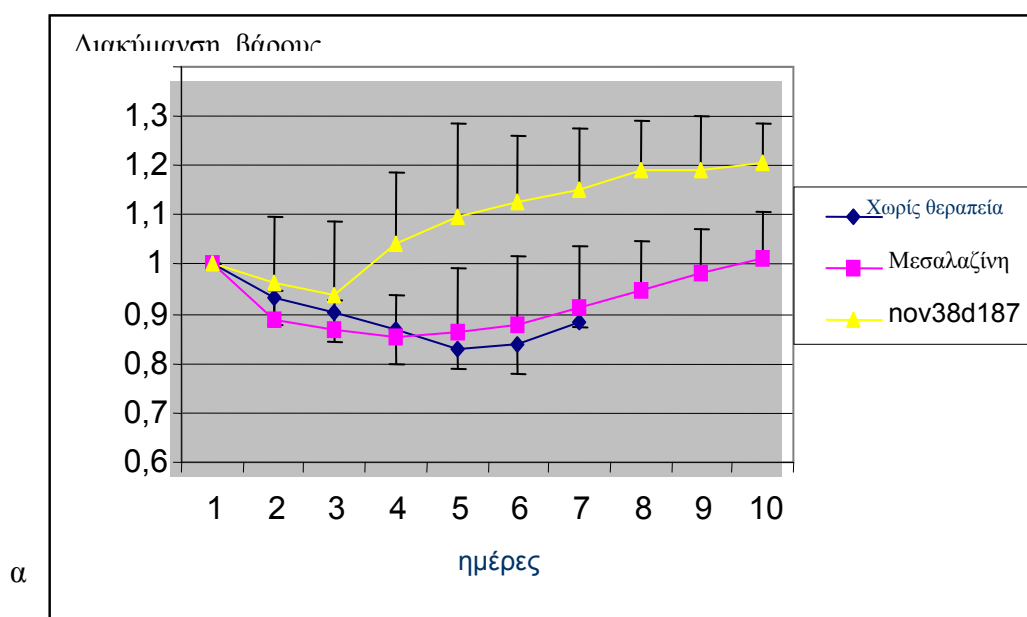


*Εικόνα 2β:* Ποσοστά επιβίωσης του control, των ποντικών που δε λαμβάνουν θεραπεία και των ομάδων που λαμβάνουν θεραπεία nov38d194 και σουλφασαλαζίνη

αυτή είναι λίγο μεγαλύτερη στο smarticle nov38d194 τόσο σε σύγκριση με την κλασική θεραπεία όσο και σε σύγκριση με το nov38d193.

γ. nov38d187 (8mg/kg CD40ASO in 44mM lipid ).

Στη συνέχεια, βλέπουμε την επίδραση στο σωματικό βάρος και στη θνητότητα των ποντικών ενός smarticle , του nov38d187 (8mg/kg CD40ASO in 44mM lipid ). με υψηλότερη συγκέντρωση CD40ASO και μικρότερη συγκέντρωση λιπιδίου.

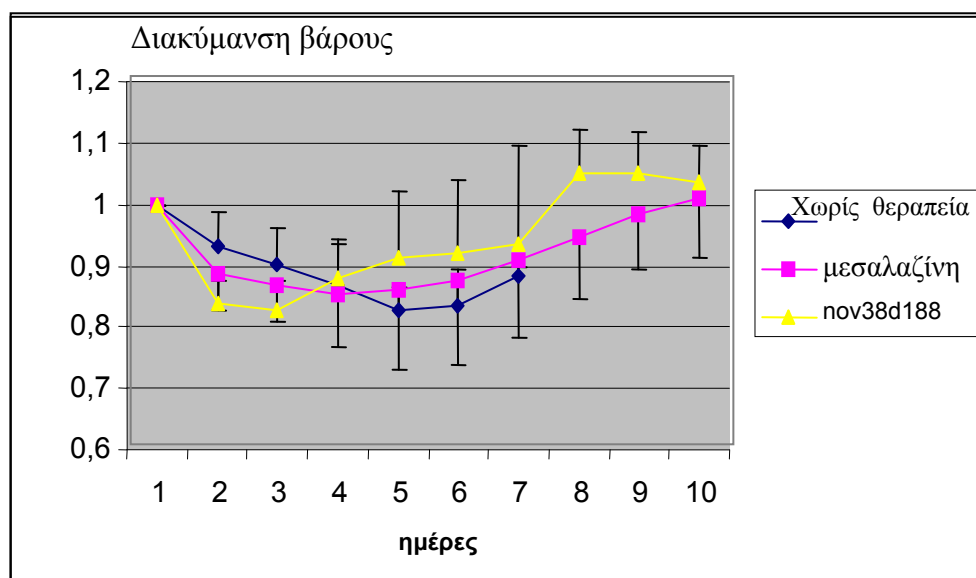


Εικόνα 3: πάνω διακύμανση του βάρους των ποντικών που δεν έλαβαν θεραπεία ή έλαβαν ως θεραπεία nov38d187 ή σουλφασαλαζίνη κάτω. ποσοστά επιβίωσης των παραπάνω ομάδων

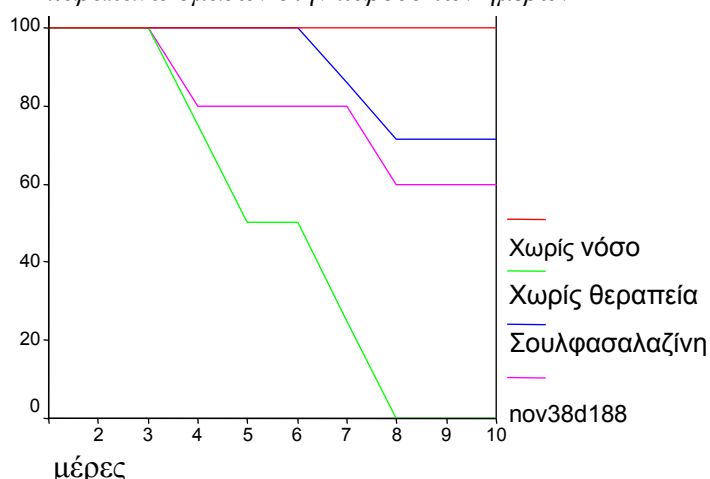
θεραπεία, και αυτών που λαμβάνουν την κλασική θεραπεία και αυτών που λαμβάνουν τη θεραπεία με smarticle ) χάνουν βάρος μετά την επαγωγή της νόσου. Ωστόσο μετά τη δεύτερη δόση και της σουλφασαλαζίνης και του nov38d187 το βάρος τους ανακάτται, στη μεν σουλφασαλαζίνη σταδιακά στο δε nov38d187 σε μεγαλύτερο ρυθμό. Κατά συνέπεια και τα δύο φάρμακα δρουν θεραπευτικά στην εξέλιξη της νόσου. Όμως με το nov38d187 τα ποσοστά επιβίωσης είναι μικρότερα σε σχέση με τη χορήγηση σουλφασαλαζίνης.

δ. smarticle nov38d188 (8 mg/kg ASO in 60Mm lipid)

Όπως βλέπουμε στα παρακάτω διαγράμματα, παρόμοια θεραπευτική δράση με τη μεσαλαζίνη και παρόμοια θνητότητα σε σχέση με αυτήν έχει το smarticle nov38d188 (8 mg/kg ASO in 60Mm lipid) το οποίο έχει μεγαλύτερη συγκέντρωση λιπιδίου σε σχέση με το nov38d187.

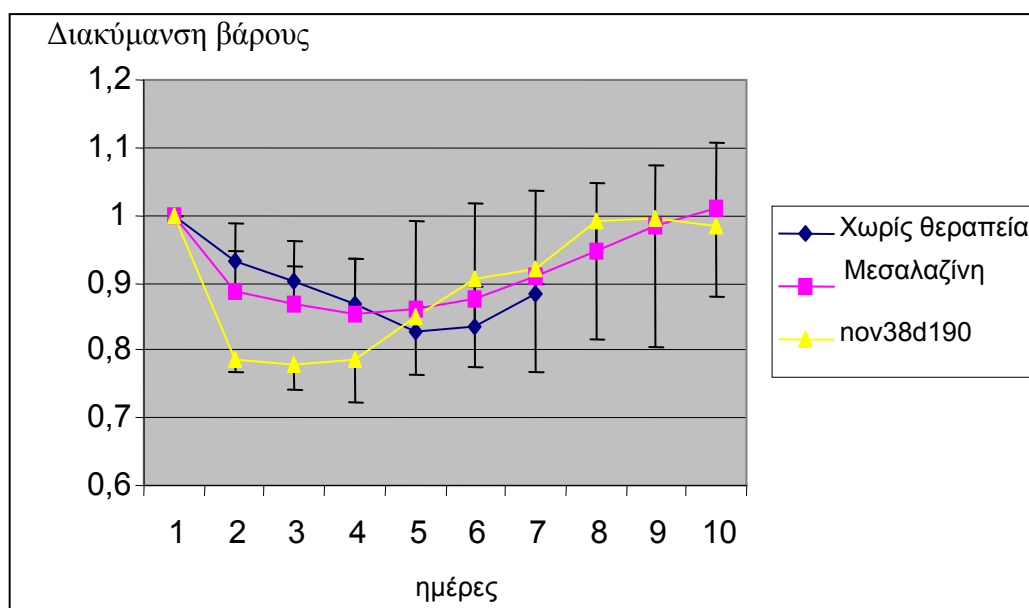


Εικόνα 4: πάνω διακύμανση του βάρους των ποντικιών που δεν έλαβαν θεραπεία ή έλαβαν ως <sup>12</sup> θεραπεία nov38d188 ή μεσαλαζίνη στην πάροδο των ημερών κάτω. ποσοστά επιβίωσης των παραπάνω ομάδων στην πάροδο των ημερών



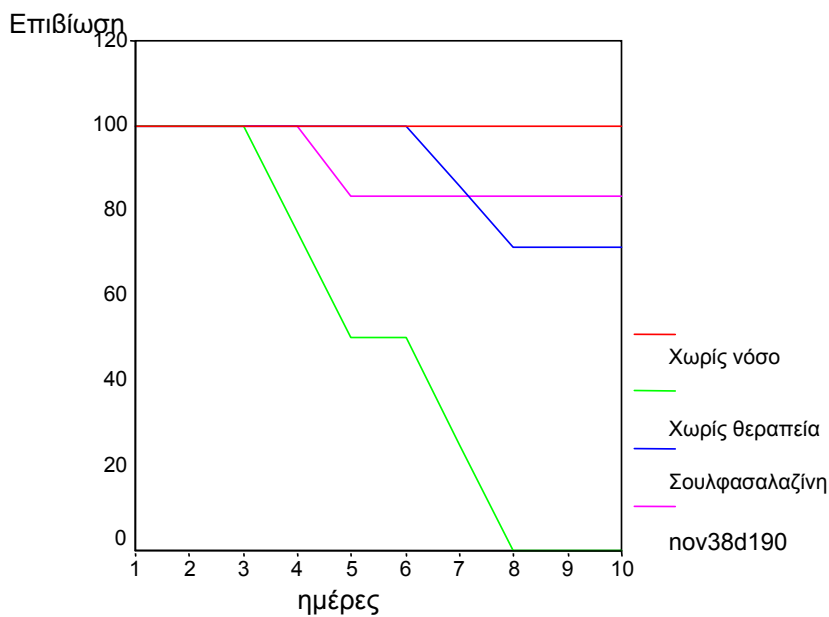
ε. nov38d190 (4mg/kgASO σε 54mM lipid)

Το smarticle που έχει θεραπευτική δραστηριότητα παρόμοια με τη δραστηριότητα της σουλφασαλαζίνης και ποσοστά επιβίωσης μεγαλύτερα από αυτήν είναι το nov38d190 (4mg/kgASO σε 54mM lipid) το οποίο έχει ακόμη μεγαλύτερη συγκέντρωση λιπιδίου σε σχέση με το smarticle nov38d188 (8 mg/kg ASO σε 60mM lipid). Πράγματι, όπως φαίνεται στα παρακάτω διαγράμματα:



*Εικόνα 5α: διακύμανση του βάρους των ποντικών που δεν έλαβαν θεραπεία ή έλαβαν ως θεραπεία nov38d190 ή μεσαλαζίνη στην πάροδο των ημερών*

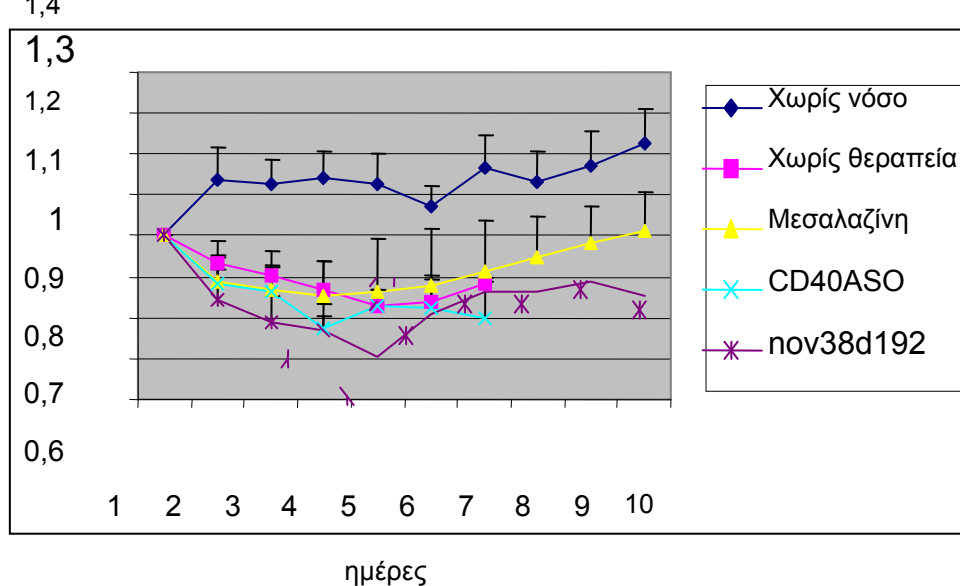
Αρχικά μετά τον υποκλυσμό με TNB-S παρατηρήθηκε απώλεια βάρους και στην ομάδα της μεσαλαζίνης και στην ομάδα του nov38d190-ιδιαίτερα όμως στην ομάδα του nov38d190. Μετά όμως από την πλήρη χορήγηση της θεραπείας τα ποντίκια της ομάδας του nov38d190 ανέκτησαν θεαματικά το βάρος τους και έφτασαν κατά μέσο όρο το τελικό μέσο όρο του βάρους της μεσαλαζίνης. Από την άλλη, όπως βλέπουμε πιο κάτω στο διάγραμμα της επιβίωσης τα ποντίκια αυτά έχουν μεγαλύτερο ποσοστό επιβίωσης σε σχέση με τα ποντίκια που έλαβαν μεσαλαζίνη.

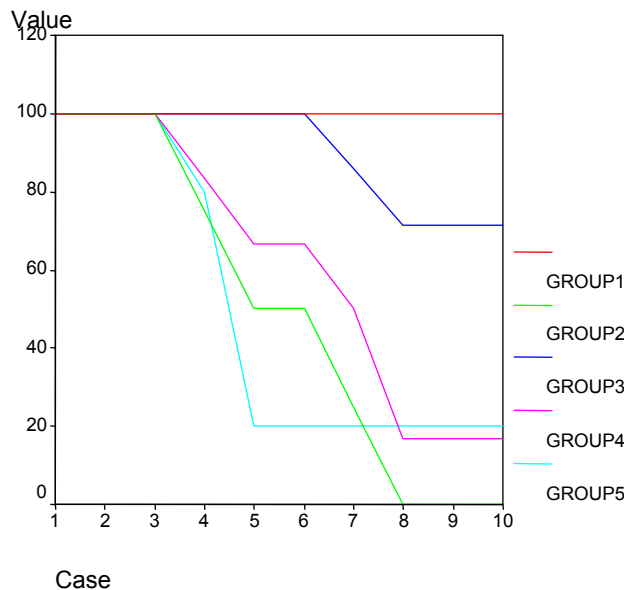


*Εικόνα 5β: ποσοστά επιβίωσης των ποντικίων που δεν έλαβαν θεραπεία ή έλαβαν ως θεραπεία νον38d190 ή μεσαλαζίνη στην πάροδο των ημερών*

Τέλος εξετάστηκε η θεραπευτική δράση CD40ASO smarticles που είχαν μόνο λιπίδιο ή μόνο CD40ASO. Όπως βλέπουμε στο παρακάτω διάγραμμα μόνο η ομάδα που έλαβε ως θεραπευτική αγωγή σουλφασαλαζίνη ανάκτησε το βάρος που είχε χάσει κατά την επαγωγή της νόσου. Αντίθετα, τόσο στην περίπτωση μόνο του λιπιδίου όσο και στην περίπτωση μόνο του CD40ASO παρατηρήθηκε μόνο απώλεια βάρους. Συνεπώς κανένα από τα δύο δεν αρκεί για την αντιμετώπιση της νόσου.

#### Διακύμανση βάρους





*Εικόνα 6: πάνω διακύμανση του βάρους των ομάδων που δεν έλαβαν θεραπεία ή έλαβαν ως θεραπεία non38d192, CD40ASO ή μεσαλαζίνη κάτω ποσοστά επιβίωσης των παραπάνω ποντικών στην πάροδο των ημερών*

Όπως προκύπτει λοιπόν από τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας, τα smarticles CD40ASO έχουν θεραπευτική δράση στην επαγόμενη με TNB-S ελκώδη κολίτιδα μια και μετά τη χορήγησή τους τα ποντίκια που έχουν χάσει βάρος-δηλαδή νοσούν-το ανακτούν-δηλαδή αναρρώνουν. Η ανάκτηση του βάρους είναι ανάλογη με την ανακτηση του βάρους μετά τη χορήγηση μεσαλαζίνης γεγονός που υποδηλώνει ανάλογη αποτελεσματικότητα. Θέλοντας να βρούμε την ιδανική αναλογία CD40ASO/λιπιδίου δοκιμάσαμε CD40ASO smarticles με διάφορες συγκεντρώσεις των παραπάνω συστατικών. Θεωρητικά, αφού η θεραπευτική ουσία είναι το CD40ASO θα περίμενε κανείς ότι τα CD40ASO smarticles με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση CD40ASO θα έχουν μεγαλύτερη θεραπευτική δράση. Ωστόσο παρατηρείται ακριβώς το αντίθετο. Τα CD40ASO smarticles με μεγαλύτερη συγκέντρωση CD40ASO είναι λιγότερο αποτελεσματικά σε σχέση με τα CD40ASO smarticles με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση λιπιδίου που είναι και περισσότερο αποτελεσματικά. Στο ερώτημα τώρα αν μπορεί να δράσει από μόνο του το λιπίδιο θεραπευτικά η απάντηση είναι αρνητική αφού η ομάδα των ποντικών που το έλαβε ως θεραπεία δεν ανάκτησε το βάρος της σε επίπεδα παρόμοια με αυτά της μεσαλαζίνης ενώ η θνητότητα ήταν υψηλή. Το ίδιο αναποτελεσματικό είναι από μόνο

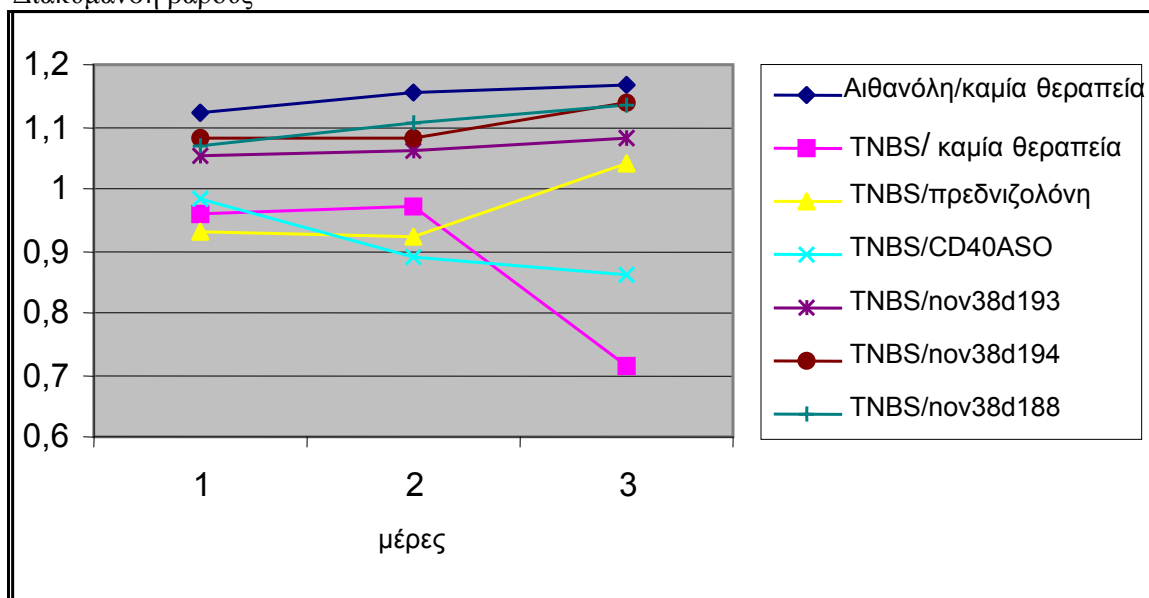
του και το CD40ASO με το οποίο τα ποντίκια δεν ανακτούν καθόλου βάρος ενώ τα ποσοστά επιβίωσης είναι χαμηλά. Ούτε το λιπίδιο μόνο του λοιπόν, ούτε το ολιγονουκλεοτίδιο CD40ASO μπορούν να δράσουν από μόνα τους στη νόσο.

Ιδανικός είναι ο συνδυασμός χαμηλής συγκέντρωσης CD40ASO και αυξημένης συγκέντρωσης λιπιδίου.

### Θεραπευτική δράση των CD40ASO-smarticles στην πρόιμη φάση της ελκώδους κολίτιδας και μηχανισμός δράσης

Σε αυτή τη φάση των πειραμάτων μας, στόχος μας είναι η μελέτη της αποτελεσματικότητας των πιο αποτελεσματικών στη θεραπεία της κολίτιδας CD40ASO smarticles (nov38d188, nov38d193, nov38d194 ) στα αρχικά στάδια της νόσου. Η θεραπεία χορηγείται λοιπόν σε μία δόση 12 ώρες μετά την επαγωγή της νόσου και το βάρος των ποντικιών παρακολουθείται καθημερινά μέχρι τη θανάτωσή τους τρεις ημέρες μετά την επαγωγή. Οι διακυμάνσεις του μέσου όρου του βάρους των ομάδων μέχρι τη θανάτωση των ποντικιών καταγράφονται σε συνάρτηση με το χρόνο και παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα:

Διακύμανση βάρους



Εικόνα 7: πάνω διακύμανση του βάρους των ομάδων control, αυτών που δεν έλαβαν θεραπεία ή έλαβαν ως θεραπεία nov38d193, nov38d194, nov38d188, CD40ASO και πρεδνιζόνη

Είναι σαφές ότι οι ομάδες στις οποίες χορηγήσαμε τα CD40ASO smarticles nov38d188, nov38d193, nov38d194 έχουν παραπλήσιες διακυμάνσεις βάρους με τη



διακύμανση του βάρους του αρνητικού control, δηλαδή της ομάδας στην οποία κάναμε υποκλυσμό μόνο με αιθανόλη, δηλαδή δεν επάγαμε τη νόσο. Συγκεκριμένα το βάρος παρουσιάζει διαρκή αύξηση, παρατήρηση η οποία υποδηλώνει ότι η επαγωγή της νόσου προλαμβάνεται. Η χορήγηση της πρεδνιζολόνης που αντιπροσωπεύει τη σύγχρονη θεραπευτική αγωγή οδηγεί αρχικά σε στασιμότητα του βάρους κι έπειτα σε αύξηση. Άρα η δράση της θα μπορούσε να θεωρηθεί πιο αργή σε σχέση με τη δραστηριότητα των CD40ASO smarticles. Μόνο απώλεια βάρους παρατηρήθηκε όπως αναμενόταν στην ομάδα στην οποία μετά την επαγωγή της νόσου δε χορηγήθηκε καμία θεραπεία (θετικό control) . Ομοίως, μόνο απώλεια βάρους, αν και σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με το θετικό control παρατηρείται και στην ομάδα που έλαβε ως θεραπεία μόνο το CD40ASO χωρίς λιπίδιο, παρατήρηση που επαληθεύει το αποτέλεσμα της πρώτης φάσης των πειραμάτων μας στο οποίο από μόνο του το CD40ASO δεν έχει θεραπευτική δράση.

## **2.Η μακροσκοπική εμφάνιση και οι ιστολογικές εικόνες των εντέρων επαληθεύουν την αποτελεσματικότητα των CD40ASO smarticles στον περιορισμό της φλεγμονής στο έντερο**

Θέλοντας τώρα να εξετάσουμε και να συγκρίνουμε τη δράση των διάφορων θεραπειών που χορηγήσαμε για την αντιμετώπιση της νόσου σε επίπεδο ιστού στις παραπάνω ομάδες συλλέξαμε μετά τη θυσία των ποντικών το παχύ τους έντερο. Μακροσκοπικά λοιπόν το παχύ έντερο των ποντικών που νοσούν χωρίς θεραπεία έχει τα ίδια χαρακτηριστικά με το παχύ έντερο των ποντικών που έλαβαν ως θεραπεία μόνο το CD40ASO: είναι βραχύ, με παχυσμένο τοίχωμα και αυξημένη αιμάτωση. Αντίθετα τα ποντίκια που δε νοσούν έχουν έντερο με χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά των ποντικών που έλαβαν θεραπεία με πρεδνιζολόνη και CD40ASO smarticles nov38d188, nov38d193, nov38d194.

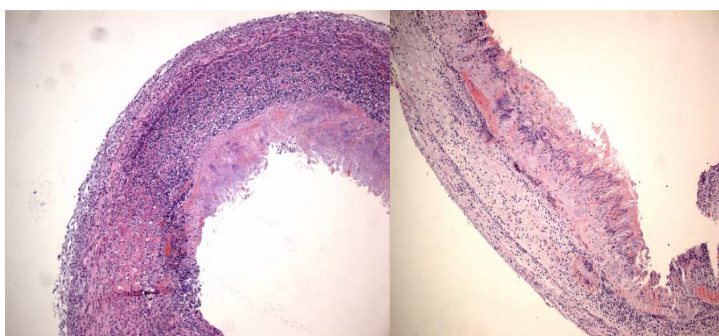
Οι παραπάνω μακροσκοπικές παρατηρήσεις επαληθεύονται και σε ιστολογικό επίπεδο. Όπως είναι γνωστό το εντερικό τοίχωμα απαρτίζεται από τρεις στοιβάδες : το εντερικό επιθήλιο, τον υποβλεννογόνο χιτώνα και τον ορογόνο. Στο εντερικό επιθήλιο σχηματίζονται λάχνες ενώ υπάρχει διάσπαρτος λεμφικός ιστός (GALT:Gut Associated Lymphoid Tissue ) που περιλαμβάνει κυρίως τις πλάκες του Peyer και μεμονωμένα λεμφικά θυλάκια.



*Εικόνα 8: Μακροσκοπική εικόνα των εντέρων των ποντικών διαφόρων ομάδων. Από αριστερά α. Ethanol β. TNB-S γ. PDZ δ CD40ASO ε. nov38d192 στ. nov38d193 η. nov38d194 θ. nov38d188*

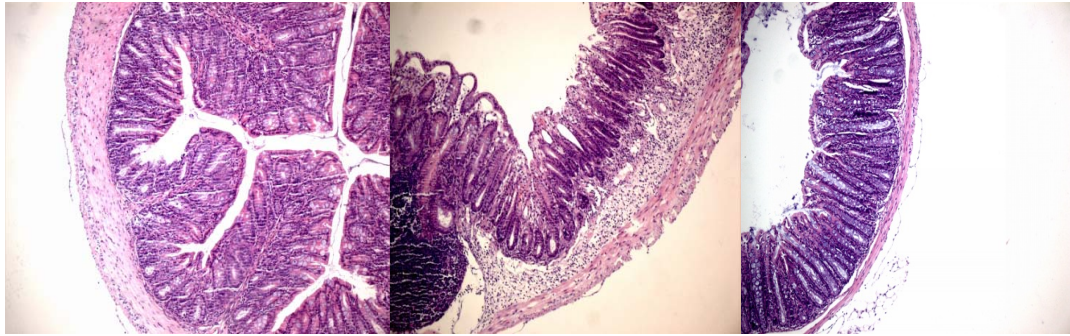
Στις φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου, παρατηρείται ενεργοποίηση του ανοσολογικού συστήματος σε όλο το GALT στην πρωιμη φάση της νόσου υποδεικνύοντας τον κυρίαρχο ρόλο αυτών των δομών στη φλεγμονώδη εξεργασία. Όπως βλέπουμε λοιπόν στις παρακάτω ιστολογικές εικόνες των εντέρων των ποντικών των διαφόρων ομάδων στα ποντίκια που δεν επάγαμε τη νόσο η δομή του εντερικού επιθηλίου παραμένει αμετάβλητη με βαθιές εντερικές κρύπτες χωρίς φλεγμονώδη κύτταρα (εικόνα γ) ενώ στα ποντίκια που δεν έλαβαν θεραπεία παρατηρείται πλήρης αποδιοργάνωση των κρυπτών του εντερικού επιθηλίου, πάχυνση του εντερικού τοιχώματος και διήθηση του τελευταίου με κύτταρα φλεγμονής (εικόνα α).

*Εικόνα 9: Ιστολογική εικόνα των εντέρων των ποντικών διαφόρων ομάδων*



α. TNB-S/χωρίς θεραπεία

β. TNBS/PDZ

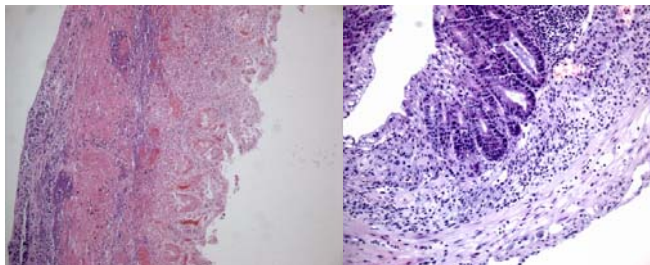


γ. αιθανόλη

δ. nov38d193

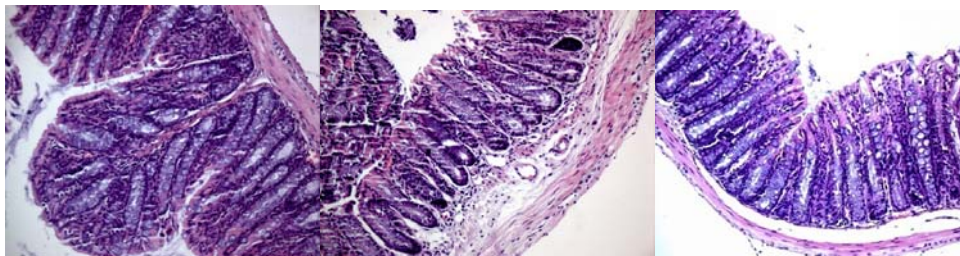
ε. nov38d188

Στα ποντίκια που έλαβαν θεραπεία με πρεδνιζολόνη παρόλο που μακροσκοπικά το έντερό τους μοιάζει με το έντερο των ποντικιών που δε νόσησαν και παρόλο που φαίνεται από τη διακύμανση του βάρους τους ότι αναρρώνουν ιστολογικά παραμένει έντονη διαταραχή της αρχιτεκτονικής των κρυπτών και συνοδός φλεγμονώδης διήθηση του εντερικού τοιχώματος(εικόνα β). Στα CD40ASO smarticles από την άλλη φαίνεται να μην αλλοιώνεται η δομή των κρυπτών ενώ η απότοκη της φλεγμονής πάχυνση του εντερικού τοιχώματος είναι λιγότερο εκσεσημασμένη (εικόνες δ και ε). Στα ίδια συμπεράσματα καταλήγουμε και με μεγαλύτερη μεγέθυνση των παραπάνω τομών



α. TNB-S/χωρίς θεραπεία

β. TNBS/PDZ



γ. αιθανόλη

δ. nov38d193

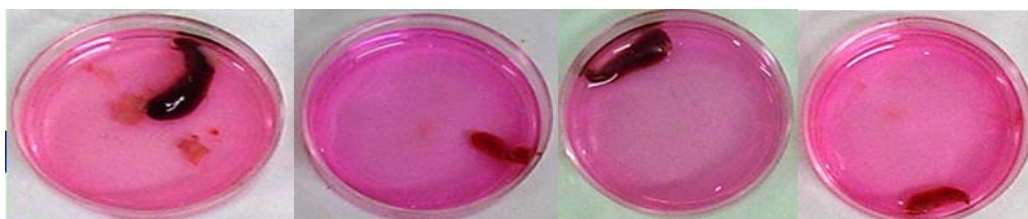
ε. nov38d188

*Εικόνα 10: Ιστολογική εικόνα των εντέρων των ποντικιών διαφόρων ομάδων μεγαλύτερης ανάλυσης*

### 3. Μακροσκοπική εμφάνιση σπληνών διαφόρων ομάδων ποντικών

Στη φλεγμονώδη εξεργασία του εντέρου συμμετέχουν κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος που προέρχονται από το σπλήνα. Εξετάζοντας μακροσκοπικά τους σπλήνες από τις διάφορες ομάδες ποντικών συμπεραίνουμε ότι το μέγεθος και το χρώμα τους διαφέρει. Στα ποντίκια στα οποία δεν προκλήθηκε η νόσος ο σπλήνας είναι μεγάλος και περισσότερο ερυθρός σε σχέση με το σπλήνα ποντικών που νοσούν και δε λαμβάνουν θεραπεία ο οποίος είναι μικρότερος σε μέγεθος και λιγότερο ερυθρός. Η εικόνα αυτή των σπληνών των ποντικών που νοσούν αντικατοπτρίζει τη μετακίνηση των φλεγμονωδών κυττάρων στη θέση της φλεγμονής κατά την εξέλιξη της νόσου και τη μετατόπιση των ερυθρών αιμοσφαιρίων εξαιτίας αιμορραγιών στη ίδια περιοχή.

Είναι ενδιαφέρον λοιπόν ότι και στα ποντίκια που νοσούν και λαμβάνουν θεραπεία είτε με CD40ASO είτε με nov38d192 που δεν έχουν αποδειχτεί αποτελεσματικές θεραπείες βασει των παρατηρήσεων μας όσον αφορά στη διακύμανση του βάρους των ποντικών η μορφολογία του σπλήνα προσομοιάζει με την αντίστοιχη του σπλήνα των ποντικών που δε λαμβάνουν θεραπεία.

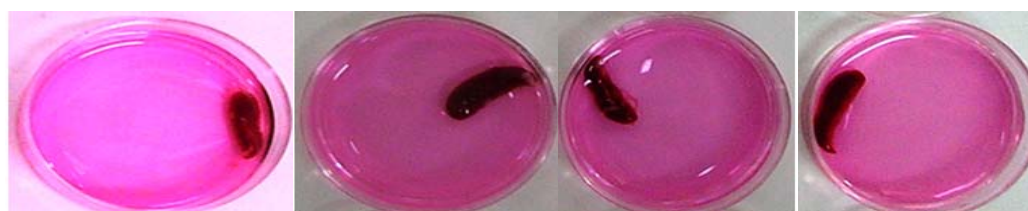


α. αιθανόλη

β. TNB-S

γ. πρεδνιζόνη

δ. CD40ASO



ε. nov38d192

στ. nov38d193

ζ. nov38d194

η. nov38d188

*Εικόνα 11: Σπλήνες των ποντικών διαφόρων ομάδων*

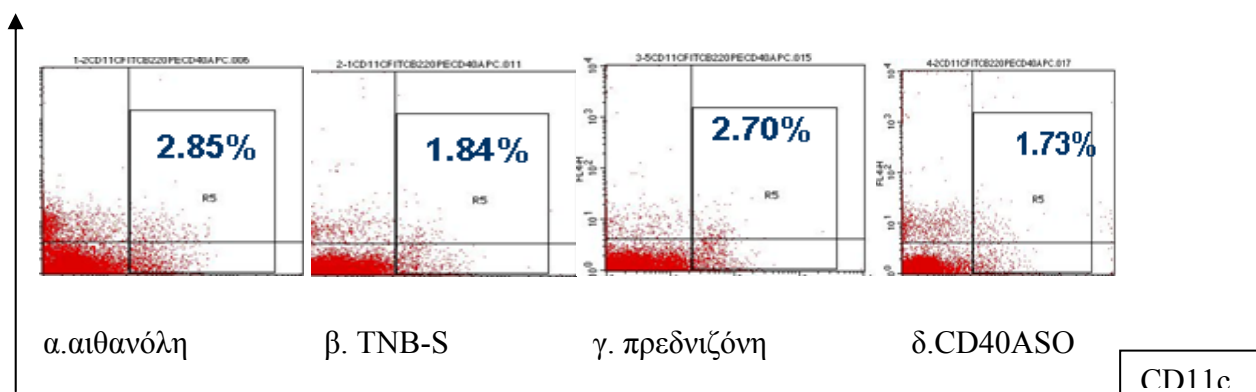
Αντίθετα, τα ποντίκια στα οποία χορηγείται θεραπεία με πον38d193, πον38d194 και πον38d188 που είναι αποτελεσματικά στην εξέλιξη της νόσου η μορφολογία του σπλήνα είναι παρόμοια με τη μορφολογία του σπλήνα των ποντικιών χωρίς νόσο. Οι παραπάνω παρατηρήσεις υποδεικνύουν την πιθανή αναστολή της επαγωγής της νόσου από τα παραπάνω CD40ASO smarticles.

#### 4.Οι κυτταρικοί πληθυσμοί στο σπλήνα:

##### α. Δενδριτικά

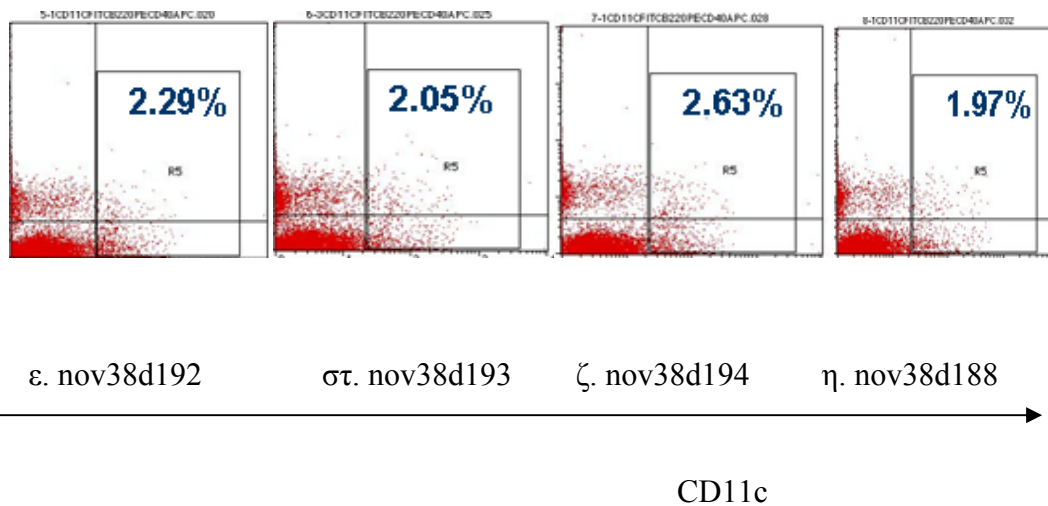
Για να έχουμε μία εικόνα των κυτταρικών πληθυσμών που υπάρχουν στο σπλήνα ομογενοποιήσαμε σπλήνες από τις ομάδες των ποντικιών μας και χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. Μιας και τα δενδριτικά είναι ο πρώτος κυτταρικός πληθυσμός που εμπλέκεται στην έναρξη μιας φλεγμονής αρχικά προσδιορίσαμε τη δική τους παρουσία στο σπλήνα. Στους ανθρώπους υπάρχουν δύο κατηγορίες δενδριτικών κυττάρων :τα CD11c και τα CD11b. Και οι δύο κατηγορίες όταν απομονώνονται από το αίμα είναι σε μία ηρεμη, μη ενεργοποιημένη κατάσταση, δεν έχουν τη μορφολογία δενδριτικών κυττάρων και χαρακτηρίζονται από χαμηλή έκφραση συνδिएεργετικών μορίων στην επιφάνεια τους. Τα CD11c έχουν μεγαλύτερη δυνατότητα πρόσληψης και παρουσίασης αντιγόνων ενώ τα CD11b έχουν λεμφοειδή μορφολογία και εκφράζουν υψηλά επίπεδα IL-3R.Αν και ανοσοδιεγερτικά, φαίνεται ότι αυτά τα κύτταρα ανάλογα με τα αντιγόνα που προσλαμβάνουν προκαλούν διαφορετικές απαντήσεις από τα T βοηθητικά κύτταρα. Ωστόσο δεν υπάρχουν μέχρι σήμερα σαφείς ενδείξεις ότι τα CD11c αντιστοιχούν στα μυελοειδή (ανοσογόνα) δενδριτικά και τα CD11b στα λεμφοειδή δενδριτικά που συμβάλλουν στην ανοσολογική ανοχή-διαχωρισμός που γίνεται στα ποντίκια. Η μετακίνηση των δενδριτικών κυττάρων γίνεται με χημειοτακτικά μόρια.

Όπως βλέπουμε λοιπόν για τα CD11c δενδριτικά κύτταρα στο σπλήνα



*Εικόνα 12:* αριθμός CD11c μακροφάγων στο σπλήνα των ομάδων ποντικών α. χωρίς νόσο β. χωρίς θεραπεία γ. θεραπεία με πρεδνιζόνη και δ. θεραπεία με CD40ASO

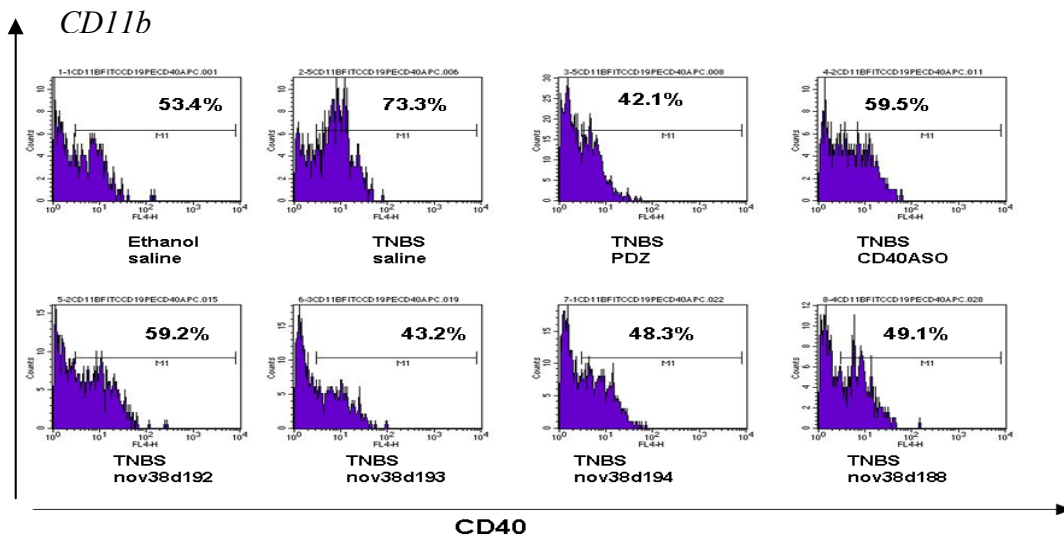
το ποσοστό των δενδριτικών κυττάρων στο σπλήνα των ποντικών που δε νοσούν είναι παρόμοιο με το αντίστοιχο ποσοστό στα ποντίκια που έχουν λάβει ως θεραπεία πρεδνιζόνη ενώ το αντίστοιχο ποσοστό στα ποντίκια που δεν έλαβαν θεραπεία και στα ποντίκια που έλαβαν αναποτελεσματική θεραπεία με CD40ASO είναι πολύ μικρότερο και άρα μετακινούνται στο έντερο και έχουν μεγαλύτερης έκτασης φλεγμονή. Από την άλλη, στα ποντίκια που έλαβαν θεραπεία με nov38d193, nov38d192 και nov38d194 το ποσοστό των δενδριτικών κυττάρων στο σπλήνα είναι όπως βλέπουμε παρακάτω ανάλογο με το ποσοστό στα ποντίκια που δε νοσούν.



*Εικόνα 13:* αριθμός CD11c μακροφάγων στο σπλήνα των ομάδων ποντικών που έλαβαν θεραπεία με ε. nov38d192 στ. nov38d193 ζ. nov38d194 η. nov38d188

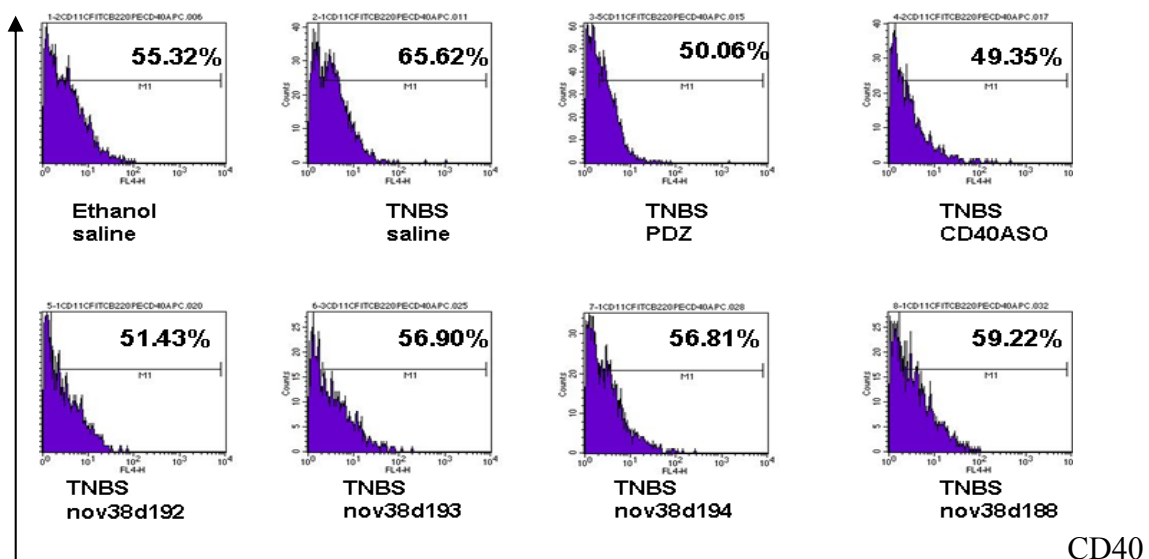
Μπορούμε λοιπόν να συμπεράνουμε ότι κατά τη χορήγηση της θεραπείας με CD40ASO smarticles μεγάλο μέρος των δενδριτικών κυττάρων που συμμετέχουν στην εντερική φλεγμονή παραμένουν στο σπλήνα συνεπώς η εντερική φλεγμονή εδώ είναι πιο περιορισμένη σε σχέση με τα ποντίκια που δε λαμβάνουν θεραπεία.

Όσον αφορά στα CD11b όπως και στα CD11c βλέπουμε αύξηση της έκφρασης του μορίου CD40 στα ποντίκια που νοσούν χωρίς θεραπεία. Αντίθετα στην ομάδα που λαμβάνει σα θεραπεία πρεδνιζόνη και στις ομάδες που χορηγούμε CD40ASO smarticles παρατηρείται ελάχιστη μείωση της έκφρασης του μορίου σε σχέση με την ομάδα των υγιών ποντικών.



*Εικόνα 14: Έκφραση του CD40 στα CD11b μακροφάγα κύτταρα του σπλήνα διαφόρων ομάδων ποντικών*

Το επόμενο βήμα μας είναι ο προσδιορισμός της έκφρασης του συνδιεγερτικού μορίου CD40 στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα που βρίσκονται στο σπληνα. Όπως έχει προκύψει από προηγούμενες μελέτες της βιολογίας των δενδριτικών κυττάρων στις ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις εντεροπάθειες υπάρχει αυξημένη έκφραση συνδιεγερτικών μορίων στα δενδριτικά κύτταρα του αίματος και του φλεγμάνοντος ιστού σε ασθενείς με έξαρση της νόσου. Στα παρακάτω διαγράμματα φαίνεται η έκφραση του CD40 στα δενδριτικά κύτταρα του σπληνός. Παρατηρούμε ότι η έκφραση του είναι αυξημένη στα ποντίκια που νοσούν και χαμηλότερη και περίπου η ίδια στο αρνητικό control και στα ποντίκια που έλαβαν ως θεραπεία πρεδνιζόνη και nov38d193, nov38d194 αντίστοιχα. Η χορήγηση των CD40ASO smarticles λοιπόν πράγματι

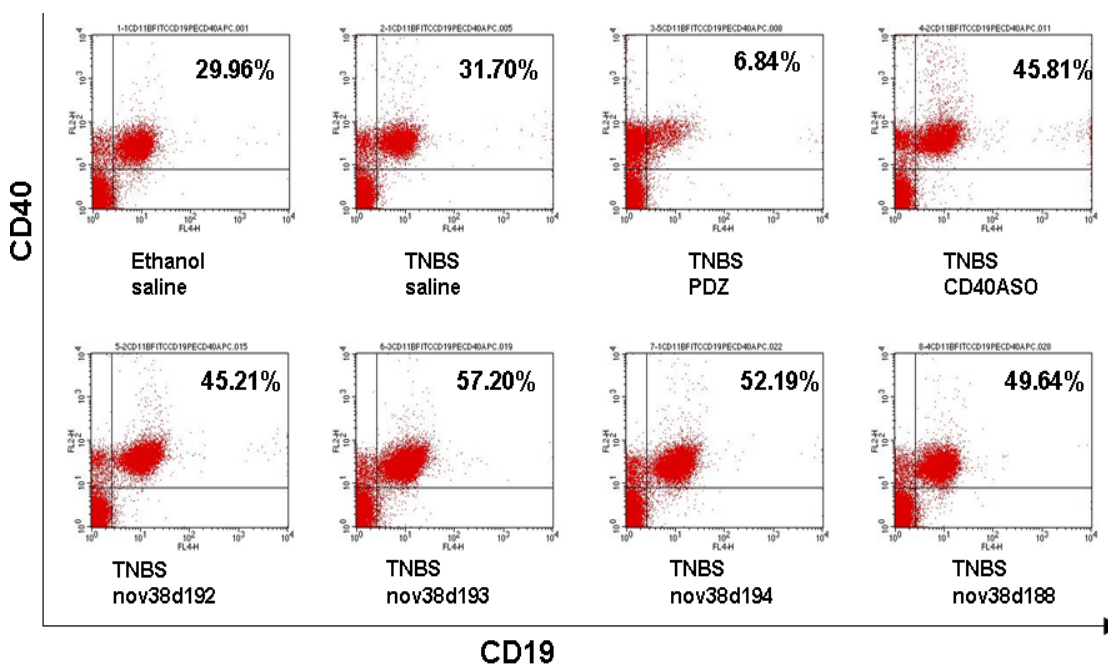


*Εικόνα 15: Έκφραση του CD40 στα δενδριτικά κύτταρα CD11c του σπληνός διαφόρων ομάδων ποντικών*

μειώνει τα επίπεδα της έκφρασης του μορίου CD40 στα δενδριτικά κύτταρα παρεμβαίνοντας στην πρώτη φάση της εξέλιξης της φλεγμονής.

### β. Β λεμφοκύτταρα

Παρακάτω βλέπουμε την έκφραση του CD40 στα Β λεμφοκύτταρα του σπληνός, μία άλλης κατηγορίας αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων:



*Εικόνα 16: Έκφραση του CD40 στα Β-λεμφοκύτταρα στο σπληνα διαφόρων ομάδων ποντικών*

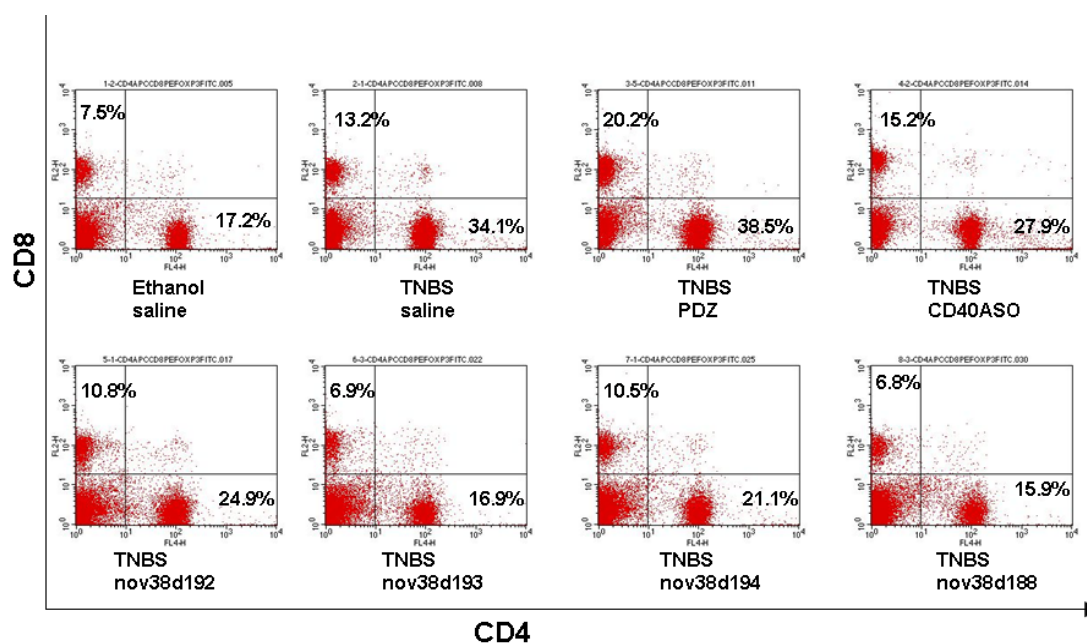
Παρόλο που δεν έχει αναλυθεί σε μεγάλο βαθμό η συμμετοχή των Β λεμφοκυττάρων στις ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις εντεροπάθειες, τα Β λεμφοκύτταρα και η παραγωγή αυτοαντισωμάτων έχουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια αυτών των νόσων. Συγκεκριμένα παραγονται εκτός από τα αντισώματα έναντι βακτηρίων στον αυλό του εντέρου, αυτοαντισώματα έναντι ενδοκυττάρων συστατικών των επιθηλιακών κυττάρων, έναντι του κυτταροπλάσματος των ουδετεροφίλων. Παρατηρούμε ότι στα ποντικά που επάγουμε τη νόσο, χωρίς στη συνέχεια να δόσουμε θεραπεία, η έκφραση του μορίου CD40 αυξάνεται στα Β λεμφοκύτταρα όπως ακριβώς αυξανόταν και στα δενδριτικά. Με τη χορήγηση πρεδνιζόνης όμως παρατηρείται εντυπωσιακή μείωση της έκφρασης του μορίου παρατηρηση που εξηγεί τη γενικευμένη ανοσοκαταστολή που προκαλούν τα κορτικοειδή ενώ με τη χορήγηση των CD40ASO smarticles παρατηρείται περαιτέρω αύξηση. Η αύξηση αυτή είναι ενδιαφέρουσα μιας



και θα περίμενε κανείς η έκφραση του μορίου να μειώνεται με τη χορήγηση των CD40 antisense oligonucleotides. Βέβαια, θα μπορούσε να αποδοθεί σε μία προηγηθείσα μεγάλη μείωση της έκφρασης αυτού του μορίου που ακολουθείται από έντονη αύξηση της έκφρασης του. Οποια κι αν είναι η αιτία της απουσίας μείωσης της έκφρασης του CD40 στα B λεμφοκύτταρα είναι θεμιτή γιατί η χορήγηση της θεραπείας με CD40 antisense oligonucleotides δεν οδηγεί στη γενικευμένη ανοσοκαταστολή που οδηγεί η χορήγηση των κορτικοστεροειδών.

### γ. T λεμφοκύτταρα

Σχετικά με τον αριθμό των κυτταρικών πληθυσμών των T λεμφοκυττάρων στο σπλήνα βλέπουμε τα παρακάτω διαγράμματα κυτταρομετρίας ροής σύμφωνα με τα οποία:

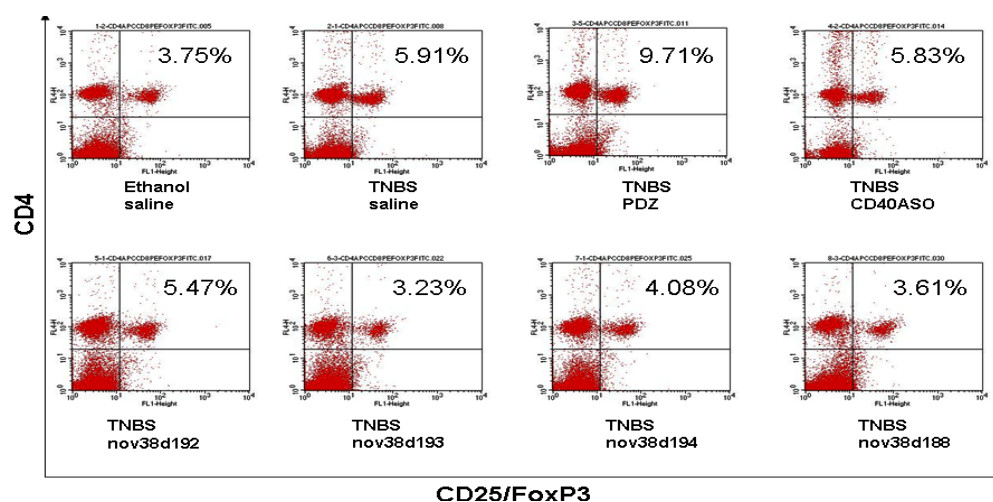


*Εικόνα 17: Αριθμός T-λεμφοκυττάρων στο σπλήνα διαφόρων ομάδων ποντικών*

τόσο τα βοηθητικά T λεμφοκύτταρα όσο και τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα διπλασιάζονται με την επαγωγή της νόσου και η αύξηση αυτή παραμένει υψηλή με τη χορήγηση της πρεδνιζόνης ενώ παραμένει σταθερή με τη χορήγηση μόνο του λιπιδίου ή μόνο του CD40ASO. Με τη χορήγηση όμως του nov38d193, του nov38d194 ή του nov38d188 παρατηρούμε τον ίδιο με τα υγιή ποντικά αριθμό και των δύο κατηγοριών των T κυττάρων. Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί σε ταχεία δράση των

CD40ASO στη φλεγμονώδη εξεργασία που δεν επιτρέπει την αύξηση των T κυττάρων και την επέκταση της φλεγμονής.

Ενας άλλος κυτταρικός πληθυσμός με σημαντικό ρόλο στην ισορροπία μεταξύ ανοσολογικής απάντησης και ανοχής στο έντερο είναι τα T ρυθμιστικά κύτταρα (Tregs). Το ενδιαφέρον για αυτά τα κύτταρα έχει αναζωπυρωθεί τα τελευταία χρόνια μετά τα πειράματα των Sakagushi et al σύμφωνα με τα οποία η απουσία των Tregs οδηγεί στην ανάπτυξη ποικίλων αυτοάνοσων και φλεγμονωδών νόσων η οποία διακόπτεται με την επαναφορά τους. Τα Tregs αποτελούν το 5-10% των CD4<sup>+</sup> T κυττάρων στο περιφερικό αίμα των υγιών ατόμων και διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: τα φυσικά Tregs και τα επίκτητα Tregs. Τα φυσικά Tregs αναγνωρίζονται αναγνωρίζονται από την παρουσία των CD4 και CD25 ( την α-αλυσίδα του υψηλής συγγένειας υποδοχέα της IL-2) στην επιφάνειά τους. Ενας άλλος πιο ειδικός δείκτης για αυτά τα κύτταρα είναι ο μεταγραφικός παράγοντας Foxp3. Τα CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3 φυσικά T λεμφοκύτταρα αναπτύσσονται στο θύμο αδένα και περνάνε στην περιφέρεια όπου καταστέλλουν τα αυτό-αντιδρώντα T κύτταρα δια μέσου άμεσης κυτταρικής αλληλεπίδρασης. Από την άλλη τα επίκτητα Tregs παράγονται στην περιφέρεια από CD4 T λεμφοκύτταρα μετά από επίδραση δενδριτικών κυττάρων. Για τα επαγόμενα T λεμφοκύτταρα δεν υπάρχουν ειδικοί φαινοτυπικοί ή γονιδιακοί δείκτες και η κατασταλτική τους δράση επιτυγχάνεται με την παραγωγή κυτταροκινών. Παρακάτω βλέπουμε κυτταρομετρία ροής για φυσικά Tregs



Εικόνα 18: Αριθμός Tregs στο σπλινα διαφόρων ομάδων ποντικών

Παρατηρούμε ότι στη νόσο, στη χορήγηση CD40ASO ή pon38d192 και στη χορήγηση τα Tregs αυξάνονται, ιδίως όμως αυξάνονται με τη χορήγηση της πρεδνιζόνης. Αντίθετα με τη χορήγηση των άλλων CD40ASO smarticles παραμένουν χαμηλά. Η επαγωγή των Tregs με την πρεδνιζόνη υποδηλώνει την ανοσοκατασταλτική δράση των κορτικοστεροειδών ενώ τα χαμηλά ποσοστά Tregs με τη χορήγηση των CD40ASO smarticles υποδηλώνουν ότι ο περιορισμός της φλεγμονής επιτυγχάνεται χωρίς την επαγωγή γενικότερης ανοσοκαταστολής. Αυτό το δεδομένο καθιστά την παραπάνω θεραπεία προνομιακή.

## **5.Επίπεδα κυτταροκινών στο περιφερικό αίμα και το φλεγμαίον έντερο:**

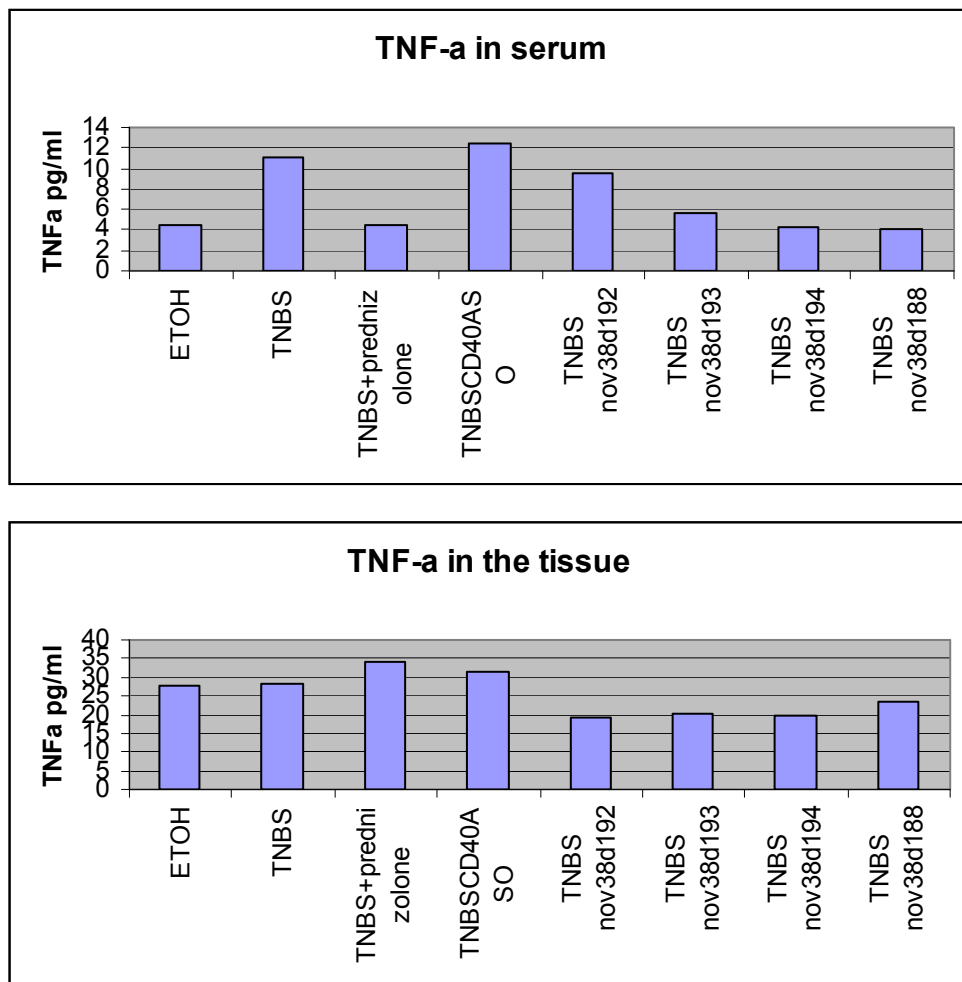
Τόσο τα T λεμφοκύτταρα όσο και τα μακροφάγα στον εντερικό βλεννογόνο που φλεγμαίνει συνθέτουν και εκκρίνουν μεγάλα ποσά προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Οι καταστροφικές διεργασίες της φλεγμονής μεσολαβούνται από τον TNF- $\alpha$ , την IL-1 (IL-1 $\alpha$  και IL-1 $\beta$ ) και την IL6. Μελέτες στη βασική μεμβράνη του αυλού του εντέρου έχουν δείξει αυξημένα επίπεδα των παραπάνω κυτταροκινών σε ασθενείς με ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις εντεροπάθειες. Παρακάτω ακολουθούν τα δικά μας αποτελέσματα για τα επίπεδα προφλεγμονωδών κυτταροκινών στις διάφορες ομάδες των ποντικών

### **α. TNF- $\alpha$**

Ο TNF- $\alpha$  παράγεται κυρίως από τα μακροφάγα αλλά κι από ένα ευρύ φάσμα κυττάρων που περιλαμβάνουν τα μαστοκύτταρα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, το λιπώδη ιστό, τους ινοβλάστες και το νευρικό ιστό σε ανταπόκριση σε λιποπολυσακχαρίτες, βακτηριακά παράγωγα και IL-1. Ο TNF- $\alpha$  ενεργοποιεί ενδοθηλιακά κύτταρα και επάγει τις κυτταροκίνες IL-1 και IL6 μαζί με τις οποίες δρα στο ήπαρ διεγείροντας την παραγωγή CRP, δρα χημειοτακτικά στα ουδετερόφιλα, διεγείρει τη φαγοκυττάρωση στα μακροφάγα. Η εντοπισμένη αύξηση αυτής της κυτταροκίνης οδηγεί σε ιστική καταστροφή.

Ακολουθούν δύο ραβδογράμματα. Το πρώτο αφορά τα επίπεδα του TNF- $\alpha$  στο ορό και το δεύτερο τα επίπεδα αυτής της κυτταροκίνης στο έντερο διαφόρων ομάδων ποντικών. Όπως φαίνεται, τα επίπεδα του TNF- $\alpha$  είναι αυξημένα στον ορό και στο έντερο των ποντικών που δε λαμβάνουν θεραπεία. Η θεραπεία με πρεδνιζόνη

συνοδεύεται από μείωση των επιπέδων του TNF-α κυρίως στον ορό. Ομως και η θεραπεία με CD40ASO smarticles οδηγεί σε μείωση των επιπέδων αυτής της κυτταροκίνης και μάλιστα ειδικά στον φλεγμαίνοντα ιστό.



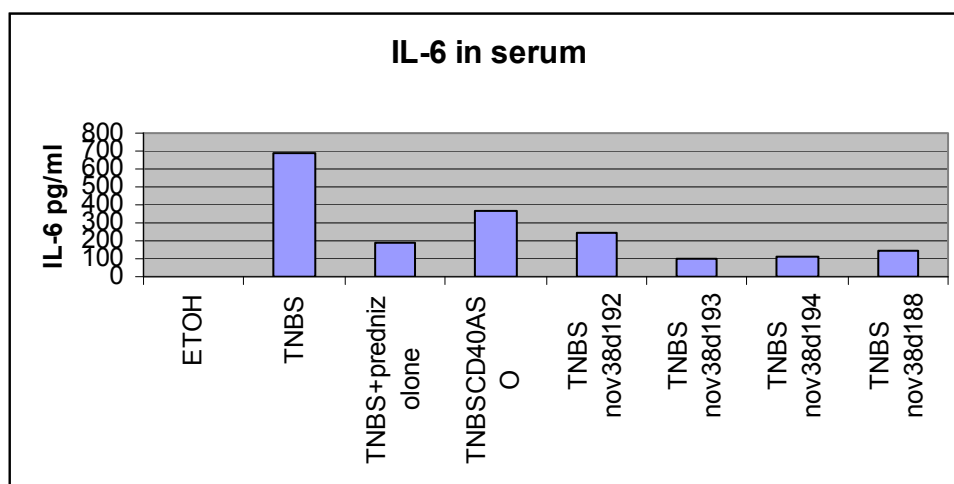
*Εικόνα 19: Επίπεδα TNF-α στον ορό και στο φλεγμαίνον έντερο διαφόρων ομάδων ποντικίων*

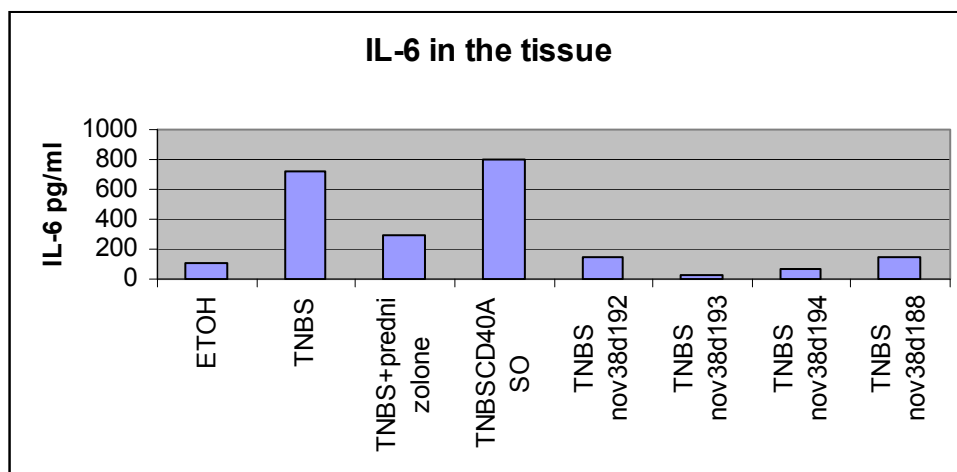
## β. IL 6

Η IL6 παράγεται από ποικίλους κυτταρικούς τύπους και έχει πλειοτροπικές δράσεις. Αυξημένα επίπεδα IL6 στον ορό σχετίζονται γενικότερα με οξεία ή χρόνια φλεγμονή. Από τις πρώτες δράσεις που περιγράφηκαν ήταν η επαγωγή του πολλαπλασιασμού των B λεμφοκυττάρων και η επαγωγή των Th17 κυττάρων μαζί με την IL23. Από μελέτες των Hyams et al προκύπτει στενή συσχέτιση των επιπέδων της IL6 στον ορό με τη σοβαρότητα της νόσου. Επίσης από πρόσφατες μελέτες προκύπτει ότι τα

επίπεδα της IL6 στον ορό μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν προγνωστικός δείκτης υποτροπών των ιδιοπαθών φλεγμονωδών εντεροπαθειών καθώς και σα δείκτης ανταπόκρισης της θεραπείας με στεροειδή.

Από μελέτες των Reinecker et al που καθόρισαν την έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών από τα μονοπύρηνια της βασικής στοιβάδας ασθενών με ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις εντεροπάθειες που απομονώθηκαν από βιοψίες του παχέως εντέρου φάνηκε ότι τα αυξημένα επίπεδα της IL6 στο φλεγμαίνοντα ιστό σχετίζονται την κλινική, ενδοσκοπική και ιστοπαθολογική ενεργότητα της νόσου ενώ υπάρχει μείωση της IL6 στις υφέσεις της νόσου. Στο φλεγμαίνοντα ιστό του εντέρου τα μακροφάγα και τα T λεμφοκύτταρα είναι οι κύριοι παραγωγοί IL6 που εμποδίζει την απόπτωση των T λεμφοκυττάρων. Η ικανότητα της να επάγει διατοιχωματική φλεγμονή μεσολαβείται από την παραγωγή χημειοκινών ( CCL4, CCL5 ), υποδοχέων χημειοκινών ( CCR3, CCR4, CCR5, CXCR3 ) και μεταλλοπρωτεασών. Είναι η πιο σημαντική κυτταροκίνη που μαζί με τις IL 1 και TNF-α συνεισφέρει στην επιβίωση των T λεμφοκυττάρων και στην αντίσταση στην απόπτωση της βασικής μεμβράνης του φλεγμαίνοντος ιστού. Έτσι τα CD4+ T λεμφοκύτταρα αθροίζονται στη βασική στοιβάδα οδηγώντας στην επέκταση της φλεγμονής. Επίσης επάγει τον NF-kB και την έκφραση του ICAM1 που είναι σημαντικό μόριο προσκόλλησης. Ακολουθούν δύο ραβδογράμματα: στο πρώτο βλέπουμε τα επίπεδα της IL6 στον ορό και στο δεύτερο τα επίπεδα της IL6 στο έντερο διαφόρων ομάδων ποντικών.





*Εικόνα 20: Επίπεδα IL6 στον ορό και στο φλεγμαίνον έντερο διαφόρων ομάδων ποντικών*

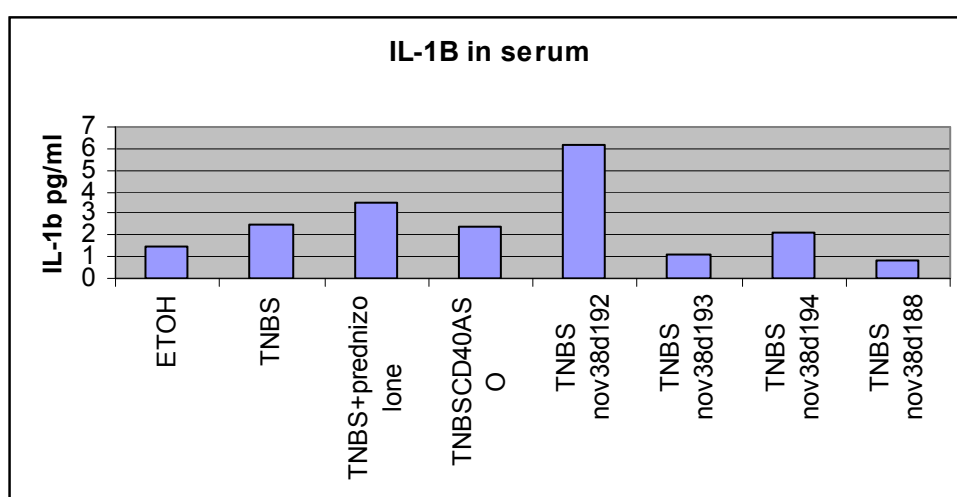
Και στα δικά μας πειράματα είναι εμφανές ότι στα ποντίκια που νοσούν και στα οποία δε χορηγούμε θεραπεία τα επίπεδα της IL6 αυξάνονται τόσο στον ορό όσο και στο έντερο. Με τη χορήγηση της πρεδνιζόνης ως θεραπεία τα επίπεδα της IL6 μειώνονται τόσο στον ορό όσο και στο φλεγμαίνοντα ιστό. Με τη χορήγηση όμως των CD40ASO smarticles που έχει φανεί από τα προηγούμενα δεδομένα μας ότι δρουν ανασταλτικά στην εξέλιξη της νόσου η μείωση της IL6 είναι πολύ μεγαλύτερη και τα επίπεδα της προσεγγίζουν τα επίπεδα της IL6 στα ποντίκια που δε νοσούν.

### γ. IL1β

Η υπερικογένεια της IL1 περιλαμβάνει την IL1α, την IL1β και τον IL1RA (IL1 Receptor Antagonist). Η IL1α και η IL1β είναι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες ενώ ο IL1RA είναι μόριο που ανταγωνίζεται με την IL1α και IL1β για την πρόσδεση με τον υποδοχέα εμποδίζοντας την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού. Παρά τη διαφορετική προέλευσή τους και τις δομικές διαφορές τους οι δύο μορφές της IL1 έχουν παρόμοιες λειτουργίες οι πιο γνωστές από τις οποίες είναι η επαγωγή του πυρετού (είναι γνωστή ως ενδογενές πυρετογόνο), η διέγερση της σύνθεσης των πρωτεϊνών οξείας φάσης και η ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων. Συγκεκριμένα η IL1β παράγεται από μακροφάγα, μονοκύτταρα και δενδριτικά κύτταρα σαν πρόδρομο πεπτίδιο από το οποίο προκύπτει το ενεργό πεπτίδιο με πρωτεολυτική επεξεργασία. Στα πλαίσια των ιδιοπαθών φλεγμονωδών νόσων του εντέρου αυξάνει την έκφραση μορίων προσκόλλησης στα ενδοθηλιακά κύτταρα επιτρέποντας τη μετακίνηση

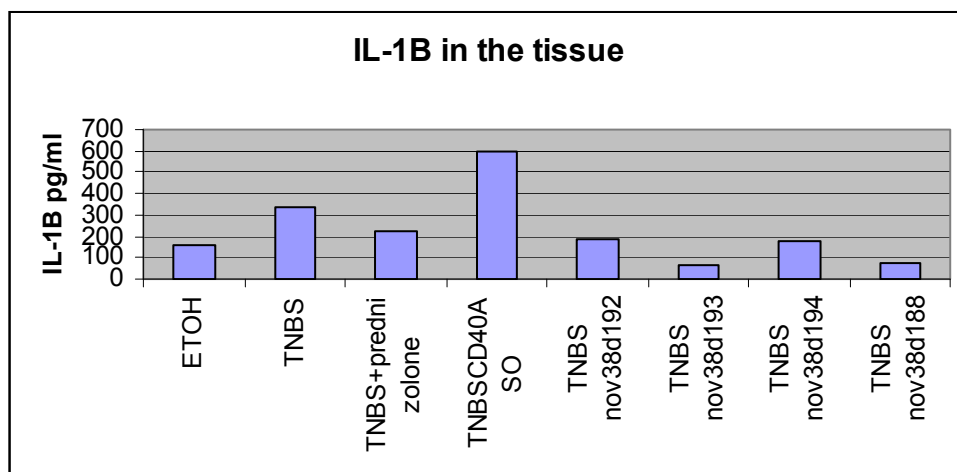
λεμφοκυττάρων στη θέση της φλεγμονής. Από μελέτες των Mahida et al σχετικά με την απελευθέρωση IL1β από μονοκύτταρα της βασικής στοιβάδας προκύπτει αυξημένη παραγωγή αυτής της κυτταροκίνης σε άτομα που νοσούν σε σύγκριση με υγιείς. Επίσης οι Cominelli και Dinarello έχουν δεδομένα με τα οποία φαίνεται ότι οι αυξημένες συγκεντρώσεις IL1 έχουν ρόλο κλειδί στην παθογένεια της κολίτιδας στα κουνέλια ενώ τα επίπεδα της IL1 στο φλεγμαίνοντα ιστό σχετίζονται με τη σοβαρότητα της φλεγμονής. Τέλος έχει φανεί ότι η χορήγηση IL1RA μειώνει την έκταση και τη σοβαρότητα της φλεγμονώδους απόκρισης στην κολίτιδα.

Στα δύο ραβδογράμματα που ακολουθούν βλέπουμε τα επίπεδα της IL1β στον ορό και στο φλεγμαίνον έντερο των διαφόρων κατηγοριών ποντικίων μας.



Εικόνα 21α: Επίπεδα IL1β στον ορό διαφόρων ομάδων ποντικίων

Στον ορό υπάρχει αύξηση της IL1β στα ποντίκια που νοσούν χωρίς να λαμβάνουν θεραπεία καθώς και στα ποντίκια που λαμβάνουν ως θεραπεία μόνο λιπίδιο ( nov38d 192) που ξέρουμε ότι δεν είναι αποτελεσματικό στην εξέλιξη της νόσου. Αντίθετα με τα CD40ASO smarticles που είναι δραστικά στη νόσο παρατηρείται μείωση των επιπέδων της IL1β. Από την άλλη στο φλεγμαίνον έντερο επίσης παρατηρείται αύξηση των επιπέδων της IL1β στο έντερο των ποντικίων που νοσούν και μείωση της συγκεκριμένης κυτταροκίνης τόσο με τη χορήγηση πρεδνιζόνης όσο και με τη χορήγηση των CD40ASO smarticles



*Εικόνα 21β: Επίπεδα IL1b στο φλεγμαίνον έντερο διαφόρων ομάδων ποντικών*

### **6.Χημειοτακτικές κυτταροκίνες στον ορό και στο φλεγμαίνον έντερο:**

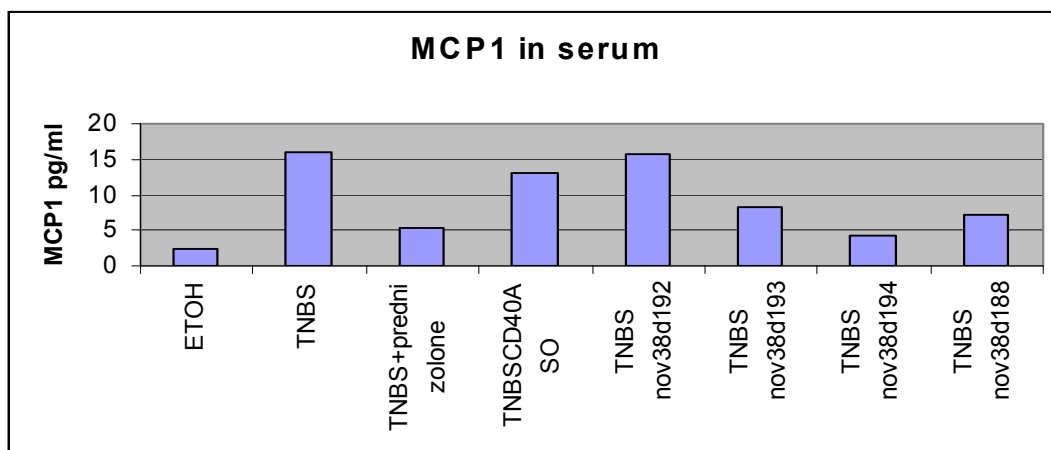
Οι χημειοκίνες ή χημειοτακτικές κυτταροκίνες επάγονται από προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες οι οποίες όταν εκκρίνονται εμπλέκονται στην ενεργοποίηση και τη ρύθμιση της προσκόλλησης της ενεργοποίησης και της μετακίνησης των λευκοκυττάρων που πραγματοποιείται σε διάφορα στάδια. Οι χημειοκίνες που έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν την έναρξη και την εξέλιξη της φλεγμονής παράγονται στο φλεγμαίνον έντερο τόσο από τα λευκοκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα της βασικής μεμβράνης όσο και από τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου. Είναι μία οικογένεια χαμηλού μοριακού βάρους πρωτεϊνών (8-10kDa) με τέσσερις κυστείνες που διακρίνεται σε δύο υπο-οικογένειες βάσει της θέσης των δύο κυστεϊνών. Στην C-X-C υπο-οικογένεια (α χημειοκίνες) οι πρώτες δύο κυστείνες διαχωρίζονται από ένα αμινοξύ. Μέλη αυτής της υπο-οικογένειας είναι η ιντερλευκίνη 8 (IL8), η επαγόμενη από την ιντερφερόνη γ πρωτεΐνη των 10 kDa (γIP-10), ο platelet factor 4 (PF4), ο GRO-α, ο GRO-β και ο NAP-2. Στην C-C υπο-οικογένεια (β-χημειοκίνες) οι δύο κυστείνες προσδέονται μεταξύ τους άμεσα χωρίς την παρεμβολή αμινοξέος. Σε αυτήν περιλαμβάνονται η monocyte chemoattractant protein 1,2,3 (MCP-1, MCP-2, MCP-3), regulated on activation, normal T cell expressed and secreted protein (RANTES) και macrophage inflammatory proteins 1α, 1β (MIP-1, MIP-1). Γενικά, οι α-χημειοκίνες σχετίζονται με χημειοταξία ουδετεροφίλων και οι β-χημειοκίνες σχετίζονται με τη χημειοταξία ουδετεροφίλων. Κάποιες χημειοκίνες ωστόσο εμπλέκονται και με χημειοταξία λεμφοκυττάρων, π.χ. οι MCP-1, MCP-2, MCP-3 που



κατευθύνουν τη χημειοταξία ενεργοποιημένων βοηθητικών και κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων. Εμείς εδώ προσδιορίσαμε στον ορό και στο έντερο των διαφόρων ομάδων ποντικών τις χημειοκίνες MCP-1 και MIP-1<sup>α</sup>

#### α. MCP-1

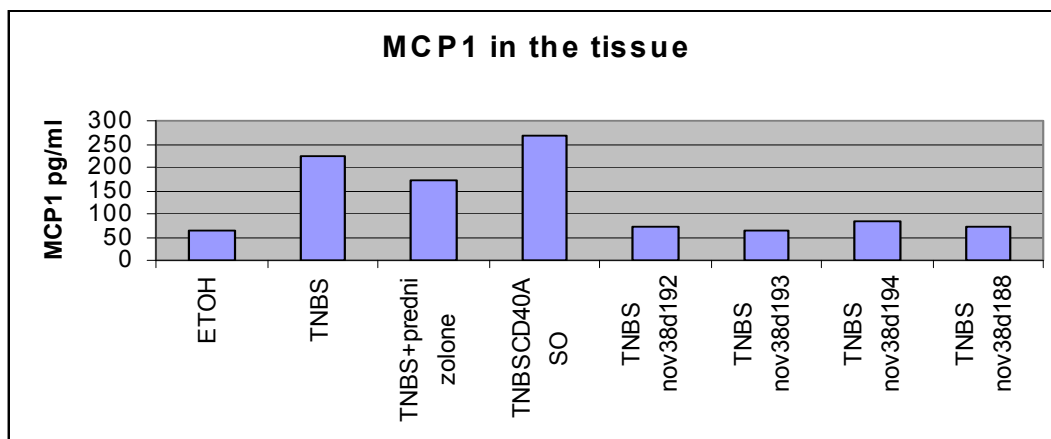
Σε μελέτες που έχουν γίνει με RT-PCR για τον καθορισμό του mRNA της MCP-1 σε τμήματα του βλεννογόνου ασθενών με ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις εντεροπάθειες φάνηκαν πολύ υψηλά επίπεδα αυτής της κυτταροκίνης. Φαίνεται λοιπόν ότι έχει σημαντικό ρόλο στην αιτιοπαθογένεια αυτών των νόσων μέσω της επίτευξης μιας κλίσης συγκέντρωσης χημειοτακτικών παραγόντων από την αιματική κυκλοφορία στο ενδοθήλιο, στο βλεννογόνο και στον υποβλεννογόνο χιτώνα. Σε προηγούμενες μελέτες έχει φανεί ότι η δεξαμεθαζόνη αναστέλλει τη σύνθεση και την έκκριση των χημειοκινών, γι αυτό θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι ένας πιθανός αντιφλεγμονώδης μηχανισμός των στεροειδών στις ιδιοπαθείς αντιφλεγμονώδεις εντεροπάθειες είναι η μείωση της παραγωγής κυτταροκινών. Όπως βλέπουμε στο παρακάτω ραβδόγραμμα στα ποντίκια που δε λαμβάνουν θεραπεία, τα επίπεδα της MCP-1 είναι πολύ μεγαλύτερα σε σχέση με το control. Επίσης τα επίπεδα αυτής της κυτταροκίνης παραμένουν υψηλά στον ορό με τη χορήγηση αναποτελεσματικών θεραπειών (nov38192, CD40ASO) ενώ μειώνονται εντυπωσιακά με τη χορήγηση πρεδνιζόνης και των CD40ASO smarticles που έχουν αποδειχτεί αποτελεσματικά.



*Εικόνα 22α: Επίπεδα MCP1 στον ορό διαφόρων ομάδων ποντικών*

Και στο έντερο που φλεγμαίνει, η πρεδνιζόνη μειώνει τα επίπεδα της MCP-1 που στα ποντίκια που νοσούν είναι αυξημένα. Η μείωση αυτή είναι πολύ μικρότερη όμως σε

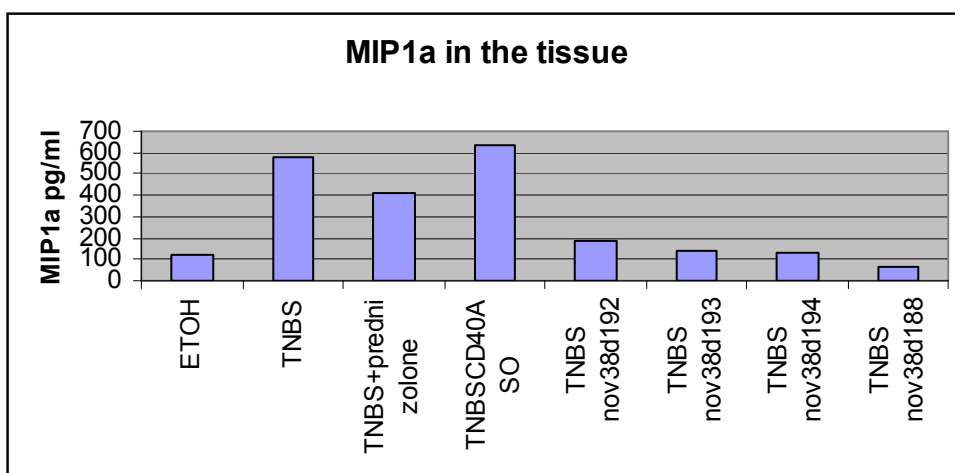
σχέση με τη μεγαλύτερη μείωση της MCP-1 που προκαλούν τα CD40ASO smarticles που έχουν φανεί αποτελεσματικά στην αντιμετώπιση της νόσου

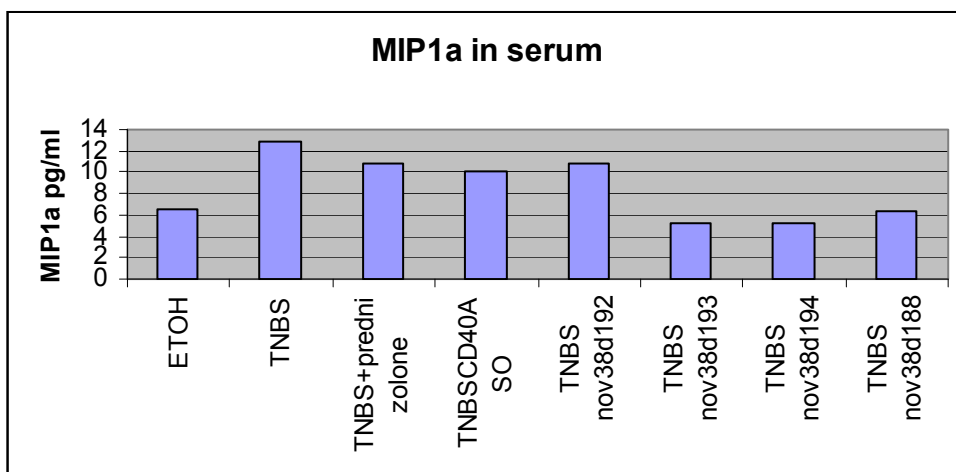


Εικόνα 22β: Επίπεδα MCP1 στο φλεγμαίνον έντερο διαφόρων ομάδων ποντικών

### β. MIP-1α

Και όσον αφορά στη χημειοκίνη MIP-1α παρατηρείται αξιοσημείωτη μείωση ιδίως μετά τη χορήγηση των CD40ASO smarticles τόσο στον ορό όσο και στο έντερο. Η πρεδνιζόνη από την άλλη μειώνει ελάχιστα τα επίπεδα της MIP-1α .

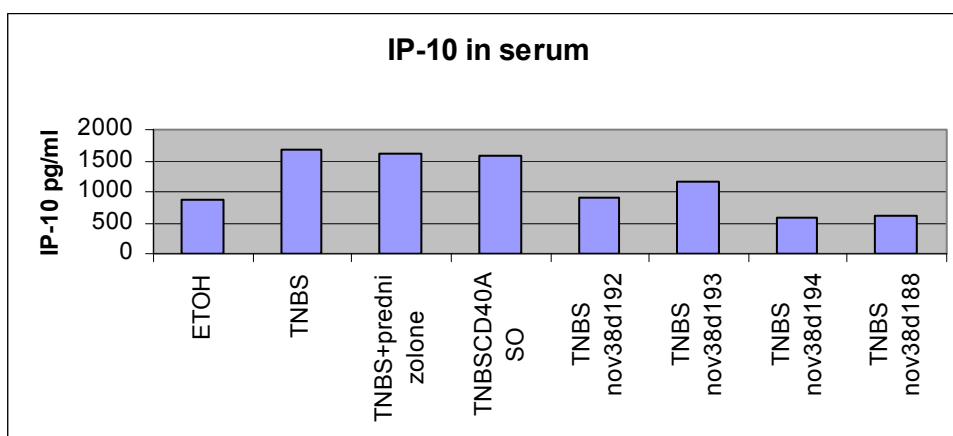




*Εικόνα 23: Επίπεδα MIP1α στον ορό (πάνω) και στο φλεγμαίνον έντερο (κάτω) διαφόρων ομάδων ποντικών*

### γ. IP-10

Η IP-10 εκκρίνεται από διάφορους κυτταρικούς τύπους (μονοκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες ) μετά από την επίδραση της IFN-γ. Της έχουν αποδοθεί διάφοροι ρόλοι όπως η χημειοταξία μονοκυττάρων/μακροφάγων, T λεμφοκυττάρων, NK κυττάρων και δενδριτικών, η προαγωγή της προσκόλλησης των T λεμφοκυττάρων. Όπως και με τη χημειοκίνη MIP-1<sup>α</sup> , στα ποντίκια που νοσούν παρατηρείται αύξηση της IP-10, η οποία επανέρχεται στο φυσιολογικό με τη χορήγηση των CD40ASO smarticles nov38d192, nov38d194 και nov38d188

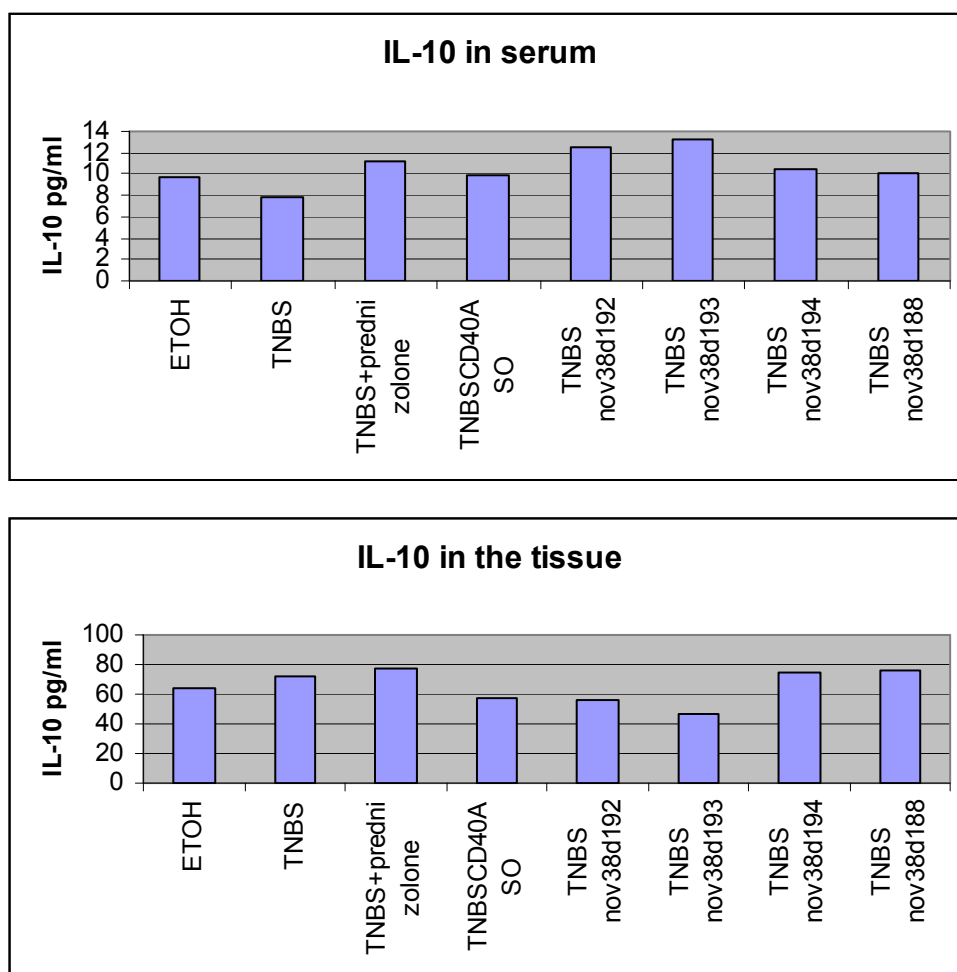


*Εικόνα 24: Επίπεδα IP10 στον ορό διαφόρων ομάδων ποντικών*

## 7.Ανοσορυθμιστικές κυτταροκίνες

### α. IL10

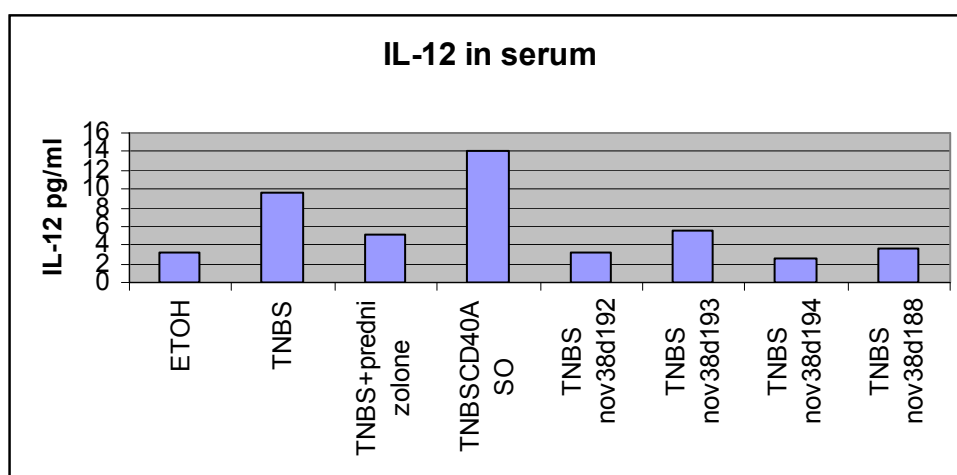
Η συσχέτιση της IL10 και της ρύθμισης της ανοσολογικής απάντησης στο παχύ έντερο βασίστηκε αρχικά στο δεδομένο ότι τα ποντίκια με ανεπάρκεια IL10 αναπτύσσουν αυτόματα κολίτιδα. Μάλιστα υπάρχουν δεδομένα σύμφωνα με τα οποία η ανοσοκατασταλτική δράση των T ρυθμιστικών κυττάρων στη φλεγμονή μεσολαβείται μεταξύ άλλων και με την IL10. Στο παρακάτω διάγραμμα με το οποίο απεικονίζεται η συγκέντρωση της IL10 στις διάφορες ομάδες ποντικών βλέπουμε ότι η χορήγηση θεραπείας είτε με πρεδνιζόνη είτε με CD40ASO smarticles οδηγεί σε επαγωγή της IL10 κυρίως στον ορό αλλά και στο έντερο.



*Εικόνα 25: Επίπεδα IL10 στον ορό (πάνω) και στο φλεγμαίνον έντερο (κάτω) διαφόρων ομάδων ποντικών*

## β. IL-12

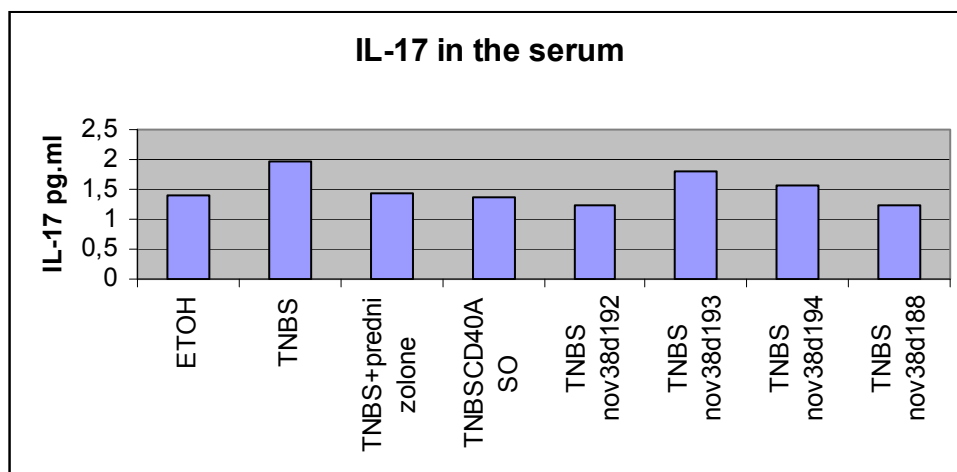
Η IL-12 είναι ανοσοδιεγερτική κυτταροκίνη. Παράγεται από δενδριτικά κύτταρα, μακροφάγα και Β-λεμφοκύτταρα. Εμπλέκεται στη διαφοροποίηση naïve Τ λεμφοκυττάρων σε Th1 κύτταρα που είναι σημαντικά για την άμυνα έναντι παθογόνων. Διεγείρει την παραγωγή IFN- $\gamma$  και TNF- $\alpha$  από Τ και NK κύτταρα και μειώνει την IL-4 μεσολαβούμενη καταστολή της IFN- $\gamma$ . Όπως βλέπουμε και στο παρακάτω ραβδόγραμμα, κατά τη φλεγμονή τα επίπεδα της IL-12 αυξάνονται στη νόσο και μειώνονται με τη χορήγηση της πρεδνιζόνης αλλά και των CD40ASO smarticles.



*Εικόνα 26: Επίπεδα IL12 στον ορό διαφόρων ομάδων ποντικών*

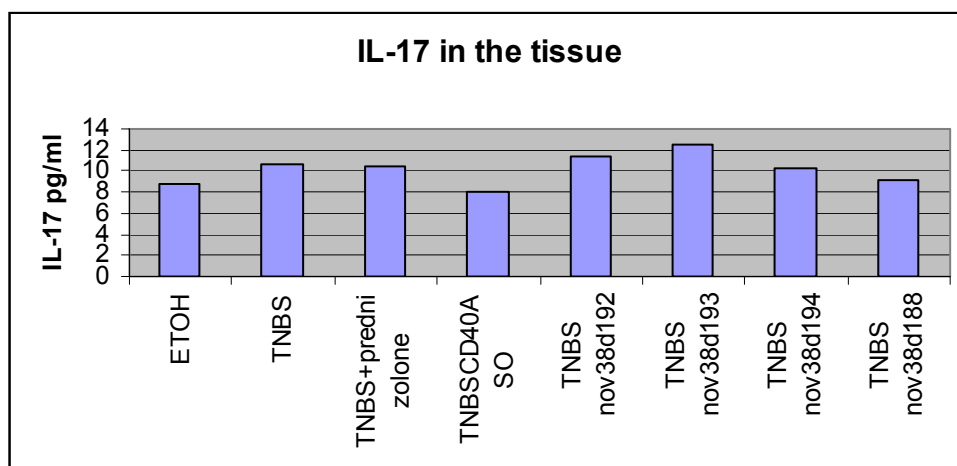
## γ. IL17

Η IL17 εμπλέκεται στην επαγωγή και τη μεσολάβηση προφλεγμονωδών αποκρίσεων. Επάγει την παραγωγή διαφόρων κυτταροκινών (IL-6, G-CSF, GM-CSF, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) χημειοκινών (IL-8, MCP-1) και προσταγλαδινών (PGE<sub>2</sub>) από διαφορους κυτταρικούς τύπους (ινοβλάστες, ενδοθηλιακά κύτταρα, μακροφάγα). Παρακάτω βλέπουμε ότι σε σχέση με το control τα ποντίκια που νοσούν έχουν λίγο πιο υψηλά επίπεδα IL17 στον ορό και στο έντερο. Η πρεδνιζόνη, το nov38d188, το nov38d192 και το CD40ASO ρίχνουν τα επίπεδα της IL17 στον ορό κοντά στο φυσιολογικό.



Εικόνα 27α: Επίπεδα IL17 στον ορό διαφόρων ομάδων ποντικίων

Στο έντερο από την άλλη η πρεδνιζόνη δε μειώνει καθόλου τα επίπεδα της IL17 όπως και ούτε και τα nov38d188, το nov38d192. Μόνο η χορήγηση του CD40ASO μειώνει τα επίπεδα της IL17 κοντά στα επίπεδα του φυσιολογικού στο φλεγμαίνον έντερο.

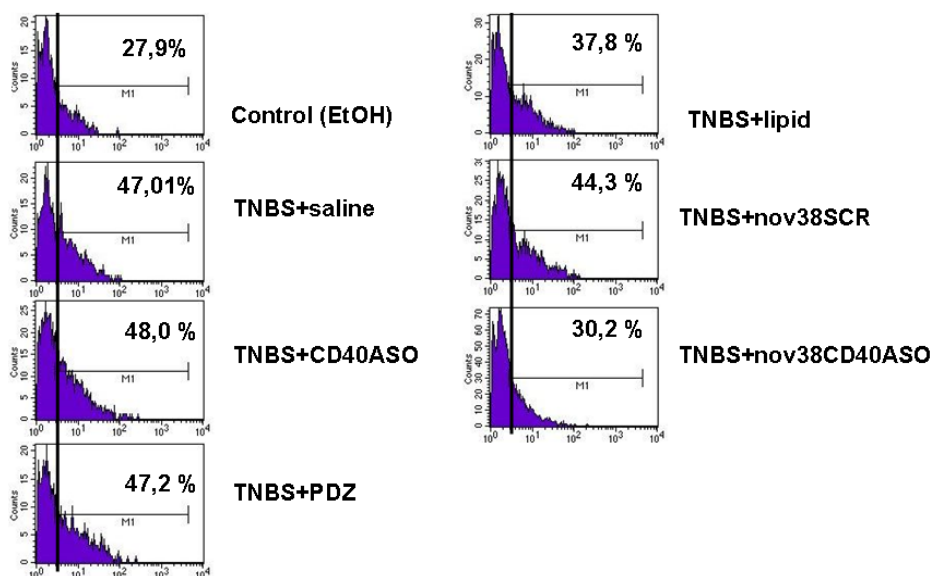


Εικόνα 27β: Επίπεδα IL17 στο ωλενμαίνον έντερο διαφόρων ομάδων ποντικίων

## 8. Οι επιδράσεις της χορήγησης CD40ASO στους διάφορους πλυθυσμούς κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος στην πρωίμη και στην όψιμη μορφή της νόσου

α. Η έκφραση του CD40 στα CD11b μακροφάγα στους μεσεντέριους λεμφαδένες στην πρώιμη μορφή της νόσου

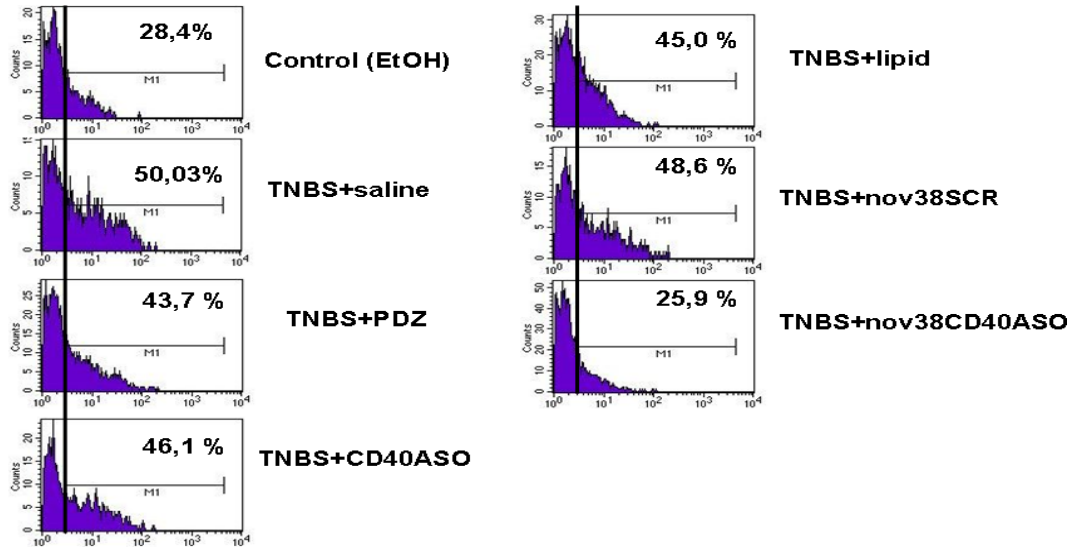
Τα δενδριτικά κύτταρα και τα λεμφοκύτταρα βρίσκονται σε στενή επαφή τόσο με το εντερικό επιθήλιο όσο και με την υποκείμενη βασική στοιβάδα. Επιπρόσθετα, το έντερο διαθέτει εξειδικευμένα λεμφικά όργανα όπως τις πλάκες του Peyer (που εντοπίζονται κυρίως στο λεπτό έντερο) και τα διάσπαρτα λεμφικά θυλάκια (που εντοπίζονται σε λεπτό και παχύ έντερο). Και οι δύο δομές έχουν παρόμοια δομή και έχουν αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, B και T λεμφοκύτταρα. Η λέμφος από το έντερο μεταφέρεται στους μεσεντέριους λεμφαδένες. Οι ανοσολογικές αποκρίσεις στο έντερο λαμβάνουν χώρα σε τόσο στη βασική στοιβάδα, όσο και στα διάσπαρτα λεμφικά θυλάκια και στους μεσεντέριους λεμφαδένες. Οι δύο τελευταίες θέσεις φαίνεται ότι διαδραματίζουν τον πιο σημαντικό ρόλο στα ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά της ανοσολογικής απόκρισης. Συγκεκριμένα τα δενδριτικά κύτταρα του εντέρου διεγείρουν T λεμφοκύτταρα τόσο τοπικά στο έντερο όσο και στους λεμφαδένες αφού μετακινηθούν σ αυτούς. Στα διαγράμματα παρακάτω βλέπουμε την έκφραση του CD40 στα CD11b μακροφάγα στους μεσεντέριους λεμφαδένες



*Εικόνα 28: Η έκφραση του CD40 στα CD11b μακροφάγα στους μεσεντέριους λεμφαδένες στην πρόιμη μορφή της νόσου διαφόρων ομάδων ποντικών*

Είναι φανερό ότι η έκφραση του μορίου CD40 στα CD11b μακροφάγα αυξάνεται στους μεσεντέριους λεμφαδένες στα ποντίκια που νοσούν και δε λαμβάνουν θεραπεία σε σύγκριση με τα υγιή και επανέρχεται στα επίπεδα των υγιών με τη χορήγηση του nov38CD40ASO.

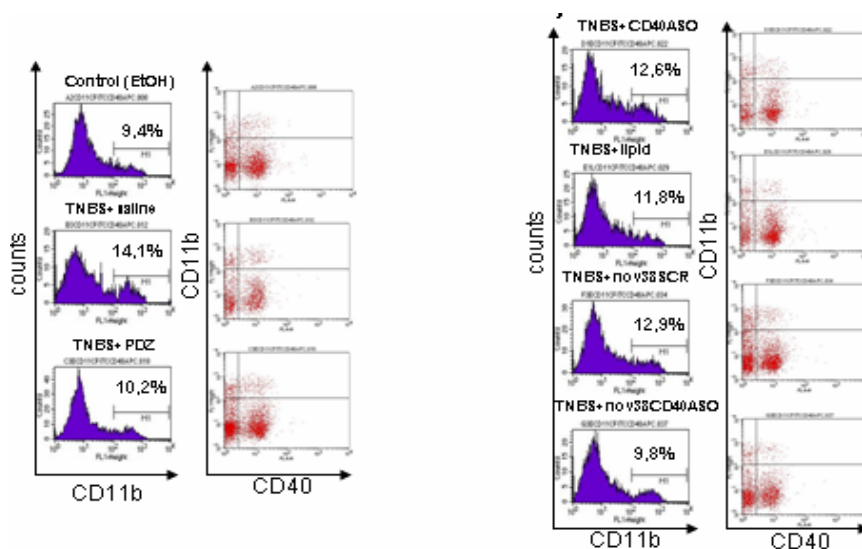
β. Η έκφραση του CD40 στα CD11b μακροφάγα στους μεσεντέριους λεμφαδένες στην όψιμη μορφή της νόσου



*Εικόνα 29: Η έκφραση του CD40 στα CD11b μακροφάγα στους μεσεντέριους λεμφαδένες στην όψιμη μορφή της νόσου διαφόρων ομάδων ποντικών*

Στην όψιμη μορφή της νόσου όπως και στην πρώιμη η έκφραση του CD40 στα CD11b μακροφάγα στους μεσεντέριους λεμφαδένες σχεδόν διπλασιάζεται και επανέρχεται στο φυσιολογικό με τη χορήγηση nov38CD40ASO.

γ. CD11b μακροφάγα στο σπλήνα στην πρώιμη μορφή της νόσου

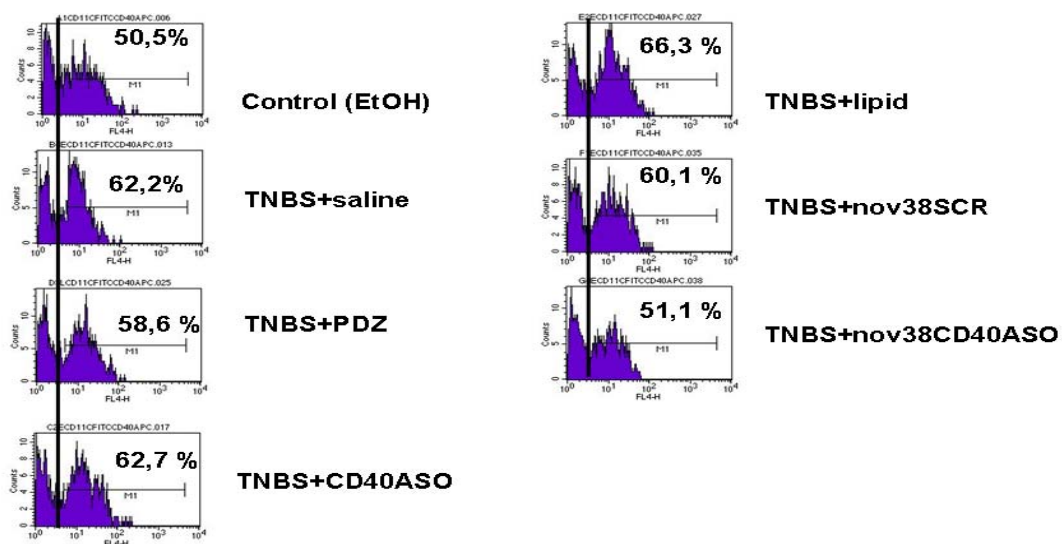


*Εικόνα 30: Αριθμός CD11b μακροφάγων στο σπλήνα στην πρώιμη μορφή της νόσου διαφόρων ομάδων ποντικών*



Σε πολλά ζωικά μοντέλα των ιδιοπαθών φλεγμονωδών εντεροπαθειών η εντοπισμένη εντερική φλεγμονή επάγει την άθροιση ενεργοποιημένων δενδριτικών και T λεμφοκυττάρων στο σπλήνα. Στην TNB-S επαγόμενη κολίτιδα όπως βλέπουμε στα παραπάνω διαγράμματα κυτταρομετρίας ροής τα CD11b μακροφάγα στο σπλήνα αυξάνονται με την επαγωγή της νόσου και επανέρχονται στο φυσιολογικό με τη χορήγηση του nov38CD40ASO

δ. Η έκφραση του CD40 στα CD11b μακροφάγα στο σπλήνα στην πρώιμη μορφή της νόσου



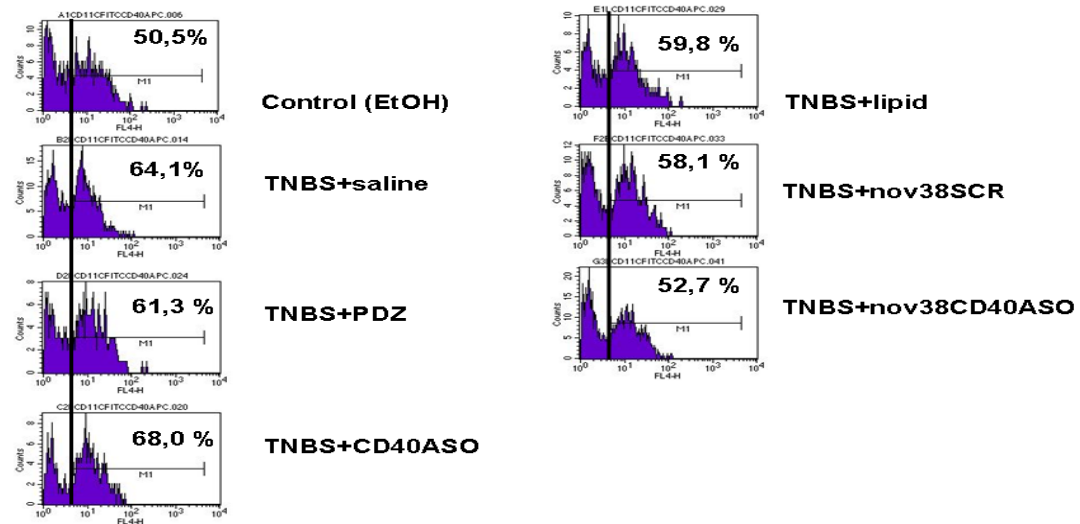
*Εικόνα 31: Η έκφραση του CD40 στα CD11b μακροφάγα στο σπλήνα στην πρώιμη μορφή της νόσου διαφόρων ομάδων ποντικών*

Βλέπουμε λοιπόν στα παραπάνω διαγράμματα κυτταρομετρίας ροής ότι τα CD11b μακροφάγα στο σπλήνα εκφράζουν σε διπλάσιο ποσοστό το μόριο CD40 σε σύγκριση με τα υγιή. Επίσης όπως και στους μεσεντέριους λεμφαδένες η έκφραση του CD40 επανέρχεται στο φυσιολογικό με τη χορήγηση nov38CD40ASO.

ε. Η έκφραση του CD40 στα CD11b μακροφάγα στο σπλήνα στην όψιμη μορφή της νόσου

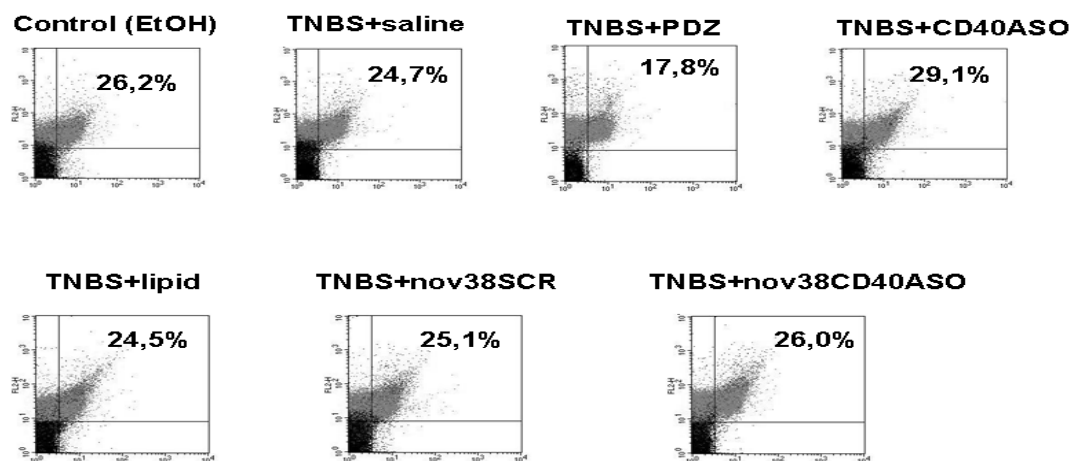
Στην όψιμη μορφή της νόσου τα αποτελέσματα όσον αφορά την έκφραση του μορίου

CD40 στα CD11b μακροφάγα στο σπλήνα είναι τα ίδια με την έκφραση του μορίου στην πρωιμη μορφή της νόσου.



*Εικόνα 32: Η έκφραση του CD40 στα CD11b μακροφάγα στο σπλήνα στην όσιμη μορφή της νόσου διαφόρων ομάδων ποντικών*

στ. Η έκφραση του CD40 στα B λεμφοκύτταρα στο σπλήνα στην πρωιμη μορφή της νόσου

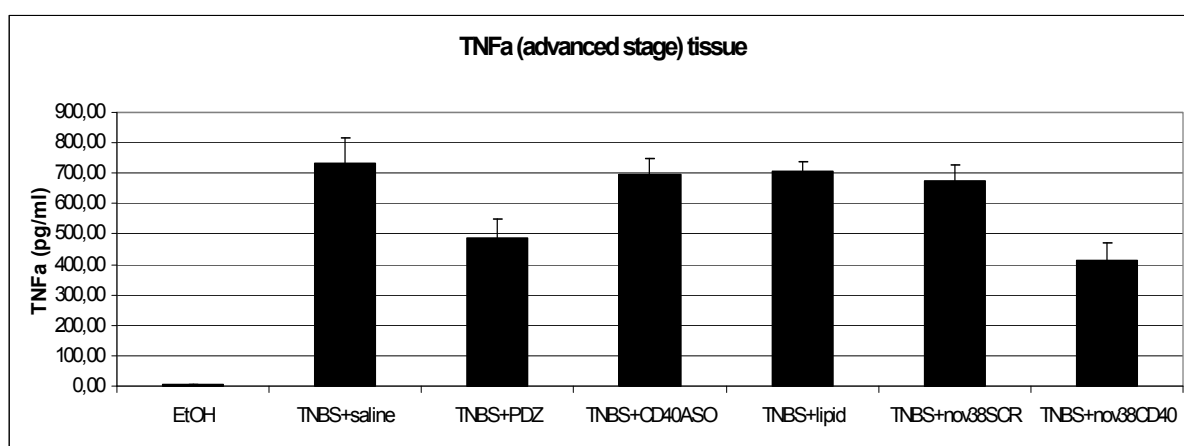


*Εικόνα 33: Η έκφραση του CD40 στα B λεμφοκύτταρα στο σπλήνα στην πρωιμη μορφή της νόσου*

Τα Β λεμφοκύτταρα στο σπλήνα εκφράζουν περίπου τα ίδια επίπεδα CD40 τόσο στη νόσο όσο και στο control. Είναι ωστόσο εντυπωσιακή η μείωση της έκφρασης του CD40 με τη χορήγηση της πρεδνιζόνης ως θεραπεία της νόσου δεδομένο που υποδεικνύει τη γενικότερη ανοσοκαταστολή που συνοδεύει τη χορήγηση κορτικοειδών. Αντίθετα η χορήγηση του non38CD40ASO δε μειώνει καθόλου την έκφραση του μορίου CD40 στα Β λεμφοκύτταρα.

## 9. Έκφραση προφλεγμονωδών κυτταροκινών στην όψιμη φάση της νόσου

### α. TNF-α

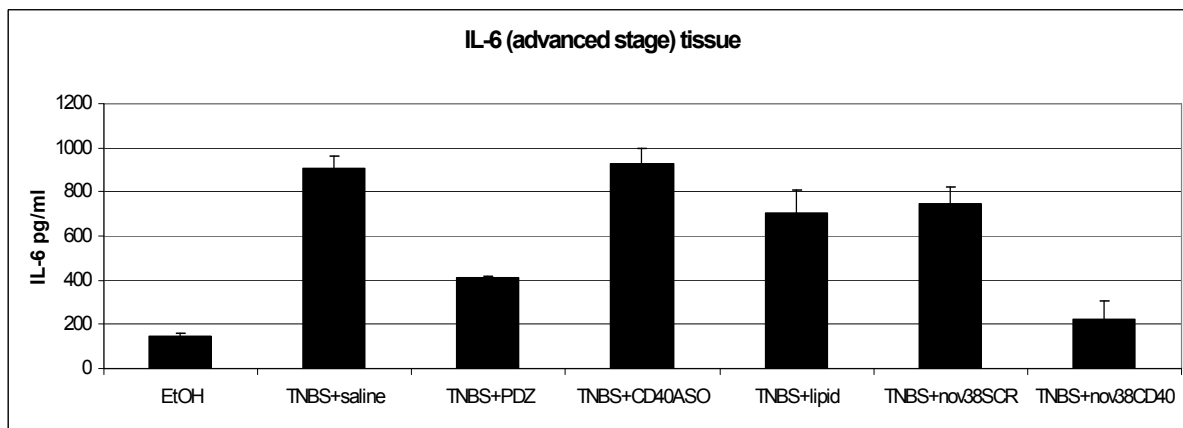


Εικόνα 34: Επίπεδα TNF-α στο έντερο στην όψιμη φάση της νόσου σε διάφορες ομάδες ποντικίων

Στην όψιμη φάση της νόσου τα επίπεδα του TNF-α αυξάνονται εντυπωσιακά σε σχέση με το control και μειώνονται σε μικρό ωστόσο ποσοστό και με τη χορήγηση πρεδνιζόνης και με το non38CD40ASO.

### β. IL6

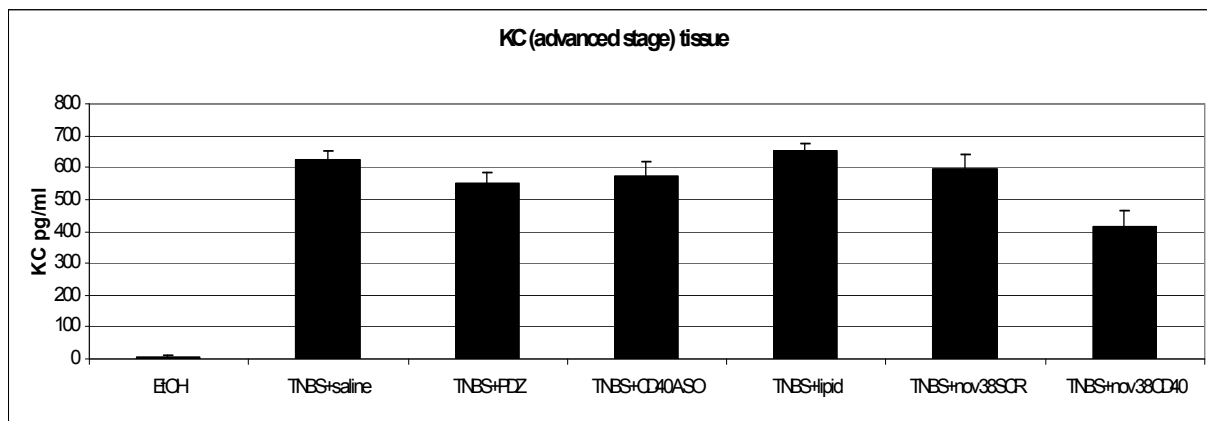
Και η IL6 αυξάνεται εντυπωσιακά στα ποντίκια που νοσούν σε σχέση με τα υγιή ποντίκια στην όψιμη μορφή της νόσου. Με την πρεδνιζόνη τα επίπεδα της IL6 μειώνονται περίπου στο μισό σε σύγκριση με τα ποντίκια που νοσούν ενώ με το non38CD40ASO η μείωση είναι ακόμη μεγαλύτερη.



*Εικόνα 35: Επίπεδα IL6 στο έντερο στην όψιμη φάση της νόσου σε διάφορες ομάδες ποντικών*

## 10. Χημειοκίνες στην όψιμη μορφή της νόσου:

### α. IL8

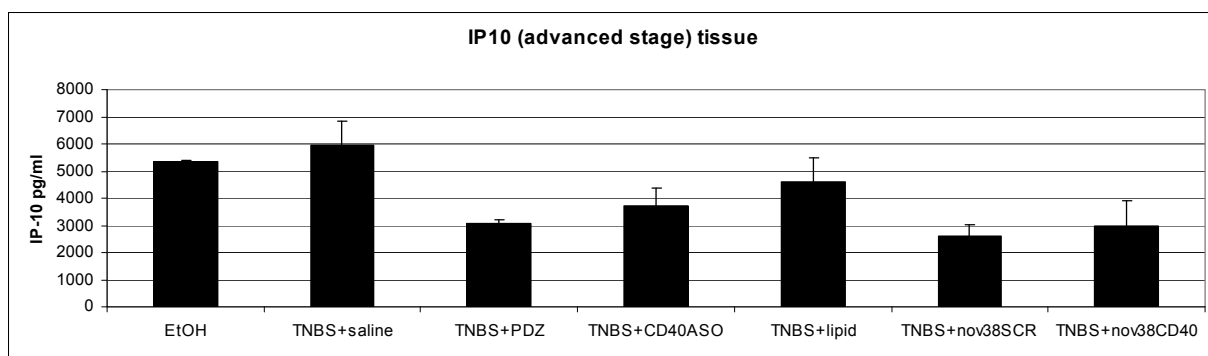


*Εικόνα 36: Επίπεδα IL8 στο έντερο στην όψιμη φάση της νόσου σε διάφορες ομάδες ποντικών*

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα, κατά την όψιμη μορφή της νόσου η IL8 αυξάνεται και μειώνεται σε μικρό βαθμό με τη χορήγηση του nov38CD40ASO. Μείωση παρατηρείται και με την πρεδνιζόνη αλλά πολύ μικρότερη.

### β. IP10

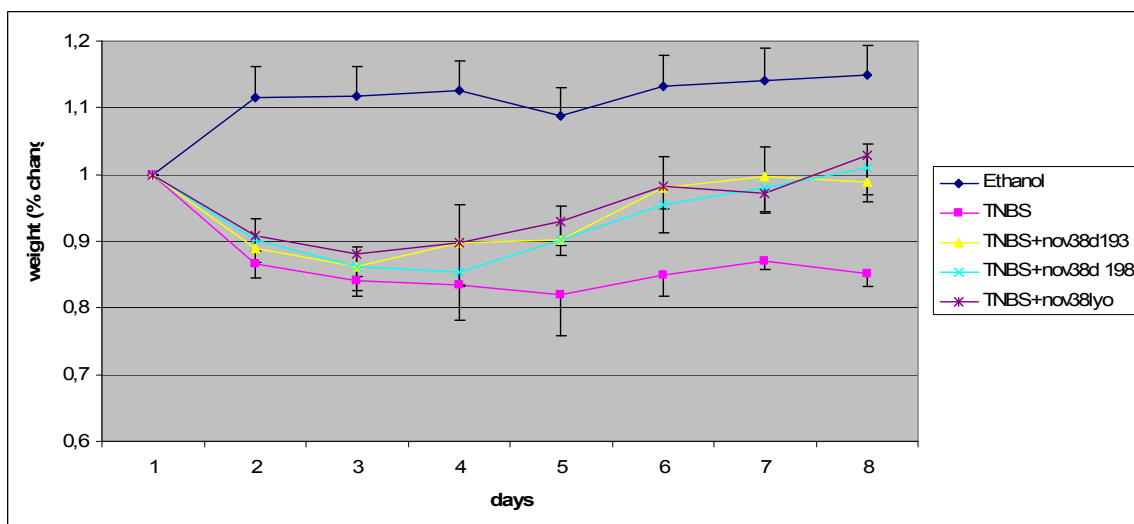
Και όσον αφορά τη χημειοκίνη IP10, η χορήγηση πρεδνιζόνης και nov38CD40ASO οδηγούν σε μείωση των επιπέδων της περίπου στο μισό σε σχέση με τα επίπεδα της IP10 στα ποντίκια που νοσούν.



Εικόνα 37: Επίπεδα IP10 στο έντερο στην όψιμη φάση της νόσου σε διάφορες ομάδες ποντικών

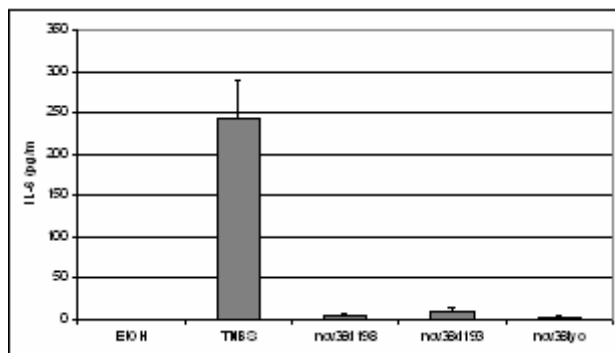
### 11. Αποτελεσματικότητα του smarticle nov38d198 και nov38lyo στην όψιμη μορφή της νόσου

Σε αυτή τη φάση των πειραμάτων μας σκοπός μας ήταν να καθορίσουμε την αποτελεσματικότητα ενός άλλου smarticle, του nov38d198 και της λυοφυλιωμένης μορφής του nov38d193. Και εδώ παρακολουθήσαμε την πορεία της νόσου στα ποντίκια των διαφόρων κατηγοριών με βάση τη διακύμανση του βάρους τους. Θεραπεία χορηγήθηκε την Τρίτη ημέρα μετά την επαγωγή της νόσου. Στα ποντίκια που έλαβαν ως θεραπεία nov38d198 ή nov38lyo η πορεία του βάρους που αντικατοπτρίζει και την πορεία της νόσου ήταν παρόμοια με αυτή των ποντικών που έλαβαν ως θεραπεία nov38d193 η οποία έχει διαπιστωθεί αποτελεσματική



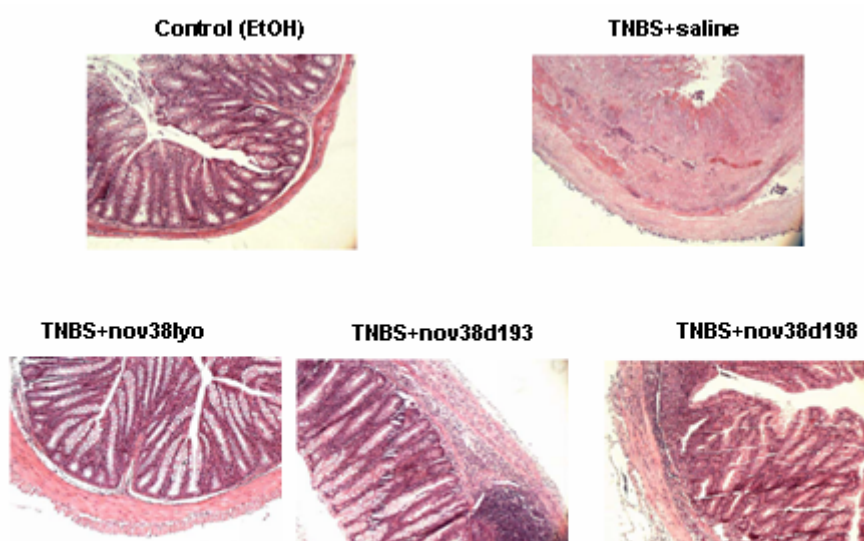
Εικόνα 38: διακύμανση του βάρους των ποντικών control, των ποντικών που δεν έλαβαν θεραπεία ή έλαβαν ως θεραπεία nov38d198, nov38d193 ή nov38lyo

Δύο ημέρες μετά τη χορήγηση της θεραπείας προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της IL-6 στον ορό. Όπως βλέπουμε στο ραβδόγραμμα παρακάτω τα επίπεδα της αυξάνονται δραματικά χωρίς θεραπεία αλλά μειώνονται πραγματικά εντυπωσιακά με τη χορήγηση nov38d198, nov38d193 ή nov38lyo.



*Εικόνα 39: Επίπεδα IL6 στα ποντίκια control, στα ποντίκια που δεν έλαβαν θεραπεία ή έλαβαν ως θεραπεία nov38d198, nov38d193 ή nov38lyo*

Στη συνέχεια, τα ποντίκια θυσιάστηκαν 8 ημέρες μετά την επαγωγή της νόσου και αφού συλλέχτηκε το έντερό τους έγινε ιστολογική εξέταση.



*Εικόνα 40: Ιστολογική εικόνα των εντέρων των control, των ποντικιών που δεν έλαβαν θεραπεία ή έλαβαν ως θεραπεία nov38d198, nov38d193 ή nov38lyo*

Όπως φαίνεται με τη χορήγηση των nov38d198, nov38d193 ή nov38lyo η αρχιτεκτονική των κρυπτών του εντέρου διατηρείται και το μόνο που υποδηλώνει την πρόκληση της νόσου είναι η πάχυνση της βασικής στοιβάδας και του

υποβλεννογόνιου σε σύγκριση με το control που απορρέει από την ίνωση που ακολουθεί τη φλεγμονή.

Μακροσκοπικά βλέπουμε την αποφυγή της επέκτασης της φλεγμονής στα ποντίκια που έλαβαν θεραπεία με CD40ASO smarticles (a,c,d,e,f,h) σε αντίθεση με το έντονα φλεγμαίνον έντερο αυτών που δεν έλαβαν θεραπεία.



*Εικόνα 41: Μακροσκοπική εικόνα εντέρων που έλαβαν διάφορες θεραπείες (από αριστερά στα δεξιά: a.control b.TNBS c.nov38d198 d.nov38d193 e.nov38dlyo f.nov38d193 g.nov38dlyo h.nov38dlyo)*

## 12. Ο ρόλος του IRAK-M στην TNB-S επαγόμενη ελκώδη κολίτιδα

Από τη παρακολούθηση του βάρους τόσο των WT BLACK6 όσο και των IRAK-M knock out BLACK6 ποντικίων οι διακυμάνσεις των βαρών είναι παρόμοιες. Κατά συνέπεια η πορεία της νόσου είναι ανάλογη. Επίσης μακροσκοπικά στα IRAK-M knock out ποντίκια στα οποία είχαμε προκαλέσει κολίτιδα οι βλάβες δεν ήταν εντονότερες. Ωστόσο παρότι ο μέσος όρος του βάρους και των WT BLACK6 και των IRAK-M knock out BLACK6 (βλέπε πίνακα 1) στα οποία προκαλέσαμε τη νόσο ήταν παρόμοιος (22,5g) υπήρχε διαφορά στο μέσο όρο του μήκους του εντέρου (WT:7,35cm IRAK-M knock out: 6,42cm). Η διαφορά στο μήκος του εντέρου μπορεί να αντιπροσωπεύει μία πιο οξεία φλεγμονή και κατά συνέπεια βράχυνση του εντέρου στα IRAK-M knock out ποντίκια.

|  | WT<br>BLACK6<br>(αιθανόλη) | IRAK-M<br>knock out<br>(αιθανόλη) | WT BLACK6<br>(TNB-S χωρίς<br>θεραπεία) | IRAK-M knock out<br>(TNB-S χωρίς<br>θεραπεία) |
|--|----------------------------|-----------------------------------|--|---|
|  |                            |                                   |  |   |

|                         |        |        |         |        |
|-------------------------|--------|--------|---------|--------|
| Μέσο βάρος<br>ποντικίων | 27,17g | 30,5 g | 23,52 g | 22,3 g |
| Μέσο μήκος<br>εντέρου   | 8cm    | 8,75cm | 7,35cm  | 6,42cm |

Πίνακας 1: Μέσος βάρος και μέσο μήκος εντέρου WT και των IRAK-M knock out ποντικίων

### **Ε. Συμπεράσματα/Συζήτηση:**

Αν και η αιτιοπαθογένεια των ιδιοπαθών φλεγμονωδών εντεροπαθειών παραμένει αδιευκρίνιστη, με βάση τα σημερινά ερευνητικά δεδομένα φαίνεται να είναι το αποτέλεσμα μίας ανεξέλεγκτης ανοσολογικής απόκρισης ενός γενετικά προδιαθετειμένου ξενιστή έναντι αντιγόνων του εντέρου. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, το ανοσοποιητικό σύστημα του εντέρου βρίσκεται σε ισορροπία ώστε να επιτυγχάνεται η φυσιολογική αμυντική ικανότητα του ξενιστή έναντι των αντιγόνων χωρίς την καταστροφή εντερικού ιστού και ανοσολογική ανοχή έναντι των τροφικών αντιγόνων και της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου. Το γεγονός ότι οι μεσεντέριοι λεμφαδένες στους οποίους καταλήγει η εντερική λέμφος είναι οι πρώτοι λεμφαδένες που σχηματίζονται στην εμβρυογένεση υποδηλώνει τη σημασία των ανοσολογικών αποκρίσεων στο έντερο.

Στις ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις εντεροπάθειες όμως οι ανοσοκατασταλτικοί μηχανισμοί που αναστέλλουν τη διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος είναι ελλιπείς ή μερικώς αποτελεσματικοί. Πολλοί κυτταρικοί τύποι εμπλέκονται στην φλεγμονώδη διεργασία που χαρακτηρίζει αυτές τις νόσους, οι οποίοι αλληλεπιδρούν μεταξύ τους χρησιμοποιώντας μία ποικιλία διεγερτικών και συνδιεγερτικών μορίων. Ανάμεσά τους ιδιαίτερη σημασία έχει το CD40/CD40L συνδιεγερτικό μονοπάτι εξαιτίας της διάχυτης κατανομής του και της ποικιλίας των δράσεών του στην εντερική φλεγμονή. Σ αυτές περιλαμβάνονται η παραγωγή αντισωμάτων, η ενεργοποίηση μακροφάγων και δενδριτικών κυττάρων, η παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών, χημειοκινών, προσταγλαδινών, πρωτεολυτικών ενζύμων, NO και μορίων προσκόλλησης. Η αναστολή του CD40/CD40L λοιπόν και



συνεπώς των δράσεων που το συνοδεύουν αποτελεί πολύ ενδιαφέρον τρόπο αναστολής φλεγμονωδών διεργασιών.

Από τους τρόπους αναστολής του CD40/CD40L που έχει αποδειχτεί αποτελεσματικός σε ζωικά μοντέλα είναι η αναστολή της έκφρασης του CD40 σε αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα με CD40ASO smarticles (ενσωματωμένα σε λιποσώματα CD40 antisense ολιγονουκλεοτίδια). Στόχος της δικής μας εργασίας εδώ είναι η σύγκριση της αποτελεσματικότητας CD40ASO smarticles με διαφορετική συγκέντρωση CD40 και λιποσώματος μεταξύ τους και με την κλασική θεραπεία στην αντιμετώπιση της επαγόμενης με TNB-S κολίτιδας. Η σύγκριση αφορούσε την κλινική πορεία της νόσου, την ιστοπαθολογική εικόνα των εντέρων και την επίδραση σε κυτταρικούς πληθυσμούς και κυτταροκίνες/χημειοκίνες στο σπλήνα, στο έντερο και στους μεσεντέριους λεμφαδένες τόσο στην πρόιμη μορφή της νόσου.

Τα πιο αποτελεσματικά CD40ASO smarticles στην αντιμετώπιση της νόσου είναι το nov38d193 (8mg/kg CD40ASO in 105mM lipid) και το nov38d194 (4mg/kg CD40ASO in 107mM lipid) η επίδραση των οποίων στην κλινική πορεία της νόσου με βάση τις διακυμάνσεις βάρους των ποντικών είναι καλύτερη από τη μεσαλαζίνη που αντιπροσωπεύει την κλασική θεραπεία. Από μόνο του ούτε το λιπίδιο, ούτε το CD40ASO είναι δραστικά στη νόσο. Υψηλή συγκέντρωση του CD40ASO δε φαίνεται να είναι απαραίτητη για τον περιορισμό της φλεγμονής. Αντίθετα φαίνεται ότι είναι η σημαντική η εξασφάλιση υψηλής συγκέντρωσης λιπιδίου.

Η μακροσκοπική εικόνα των παχέων εντέρων των ποντικών που έλαβαν ως θεραπεία τα πιο αποτελεσματικά CD40ASO smarticles είναι αντιπροσωπευτική για την αναστολή της νόσου που επιτυγχάνεται με αυτά. Το μήκος του εντέρου είναι παρόμοιο με το μήκος του εντέρου των ποντικών που δε νοσούν, το εντερικό τοίχωμα δεν είναι πεπαχυσμένο και δεν παρατηρείται υπεραιμία όπως στο τοίχωμα των ποντικών που νοσούν και δε λαμβάνουν θεραπεία. Η επαγόμενη λοιπόν κολίτιδα στα ποντίκια που έλαβαν θεραπεία με αυτά τα CD40ASO smarticles περιορίζεται.

Η ιστοπαθολογική εικόνα των εντέρων επίσης αντικατοπτρίζει τις μακροσκοπικές παρατηρήσεις. Στα ποντίκια που λαμβάνουν ως θεραπεία αποτελεσματικά CD40ASO smarticles η αρχιτεκτονική δομή των κρυπτών διατηρείται σε αντίθεση με τα ποντίκια που δε λαμβάνουν θεραπεία στα οποία καταστρέφεται. Το μόνο που υποδηλώνει την προηγηθείσα φλεγμονή στα ποντίκια που λαμβάνουν ως θεραπεία αποτελεσματικά CD40ASO smarticles είναι η αυξημένη κυτταροβρίθεια και η σχετική αύξηση του πάχους του υποβλεννογόνιου σε σχέση με τα control.

Το μέγεθος και η μορφολογία του σπλήνα στα ποντίκια που λαμβάνουν ως θεραπεία αποτελεσματικά CD40ASO smarticles προσομοιάζουν με τα αντίστοιχα χαρακτηριστικά του σπλήνα των υγιών ποντικιών: είναι μεγαλύτεροι και έντονα ερυθροί. Δεν παρατηρείται δηλαδή η μετακίνηση των ερυθροκυττάρων και των κυτταρικών πληθυσμών του ανοσοποιητικού (μακροφάγων, Β λεμφοκυττάρων) στη θέση της φλεγμονής στο έντερο η οποία οδηγεί στη συρρίκνωση και την απώλεια του ζωντανού ερυθρού χρώματος του σπλήνα στη νόσο. Η αποφυγή της μετακίνησης των μακροφάγων από το σπλήνα φαίνεται στην κυτταρομετρία ροής στην οποία παραμένει σταθερός.

Η έκφραση του μορίου CD40 παραμένει σταθερή στα δενδριτικά κύτταρα και στα Β λεμφοκύτταρα του σπλήνα ίσως επειδή δρουν πολύ γρήγορα και η έκφραση του CD40 αυξάνεται έντονα μετά από μείωση. Τα επίπεδα επίσης κυτταροτοξικών και βοηθητικών Τ κυττάρων παραμένουν στο σπλήνα στα ίδια επίπεδα με τα αντίστοιχα των υγιών ποντικιών σε αντίθεση με τα ποντίκια που νοσούν ή λαμβάνουν ως θεραπεία κορτικοστεροειδή και τα επίπεδα αυτών των κυττάρων αυξάνονται. Αυτό αποτελεί άλλη μία ένδειξη της άμεσης δράσης των CD40ASO smarticles στη φλεγμονή που δεν επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό των Τ λεμφοκυττάρων.

Αντίθετα η έκφραση του μορίου CD40 στα Β λεμφοκύτταρα του σπλήνα μειώνεται εντυπωσιακά μετά τη χορήγηση κορτιζόνης γεγονός που υποδηλώνει μια γενικευμένη ανοσοκατασταλτική δράση των κορτικοειδών. Από την άλλη, τα CD40ASO smarticles δεν επηρεάζουν τον πληθυσμό των Τ ρυθμιστικών κυττάρων ο οποίος μειώνεται με την κορτιζόνη. Εκτός λοιπόν από το γεγονός ότι δρουν πολύ άμεσα τα CD40ASO smarticles δεν προκαλούν τη γενικευμένη ανοσοκαταστολή της πρεδνιζόνης.

Τέλος, με τη χορήγηση των CD40ASO smarticles παρατηρείται μείωση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών ( TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1b ) και των χημειοκινών (MCP, MIP-1a, IP10 ) τόσο στον ορό όσο και στο φλεγμαίνον έντερο.

Στην όψιμη μορφή της νόσου, όπως και στην πρώιμη ο αριθμός των μακροφάγων δε μειώνεται με τη χορήγηση CD40ASO smarticles. Επίσης, δε μειώνεται η έκφραση του μορίου CD40 ούτε στα μακροφάγα, ούτε στα Β λεμφοκύτταρα. Τέλος παρατηρείται μείωση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών ( TNF- $\alpha$ , IL-6 ) τόσο στον ορό όσο και στο έντερο και της IL8 και της IP10 στον ορό.

Συνεπώς τα smarticles είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος αναστολής του CD40/CD40L συνδιεγερτικού μονοπατιού τόσο στην πρώιμη όσο και στην όψιμη

μορφή της TNB-S επαγόμενης κολίτιδας. Εξίσου αποτελεσματική στη νόσο είναι η λυοφιλιωμένη μορφή του nov38d193.

Όσο για το IRAK-M φαίνεται ότι η απουσία του μπορεί να συνοδεύεται από σοβαρότερης μορφής εντερική φλεγμονή αν και για την επιβεβαίωση αυτής της ένδειξης απαιτούνται πολλά συμπληρωματικά πειράματα. Επιπλέον αν η σημασία του επιβεβαιωθεί, η επαγωγή αυτού του μορίου θα αποτελέσει άλλο ένα νέο ενδιαφέροντα στόχο μοριακής παρέμβασης για τη θεραπεία των ιδιοπαθών φλεγμονωδών νόσων του εντέρου.

### **ΣΤ.Βιβλιογραφία:**

1. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies, D. Baumgart, W. Sandbom, Lancet 2007, 369: 1641-1657
2. Ulcerative colitis: an immunological disease? Radford-Smith G. Baillieres Clinical Gastroenterology 1991; 11:35-52
3. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis Gastroenterology 1998;115:182-205
4. Inflammatory bowel disease, Podolsky DK N Engl J Medic 2002;347:417-29
5. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease, D. Shin, S. Targan, World Journal of Gastroenterology 2008,14(3):390-400
6. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease, Bouma G, Strober W, Nat Rev Immunol 2003 3 521-533
7. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease, Duchmann R, Kaiser I et al, Clin Exp Immunol 1995 102 448-455
8. Modulating the intestinal immune system: the role of lymphotoxin and GALT organs, Spahn T, Kucharzik T et al, Gut 2004 53 456-465

9. Isolated lymphoid follicles can function as sites for induction of mucosal immune responses ,Lorenz RG, Newberry RD, Ann N Y Acad Sci 2004;1029:44-57
10. Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues Neutra MR, Mantis NJ, Nat Immunol 2001
11. Recent understanding of IBD pathogenesis: implications for future therapies, T.Kucharzik, C.Maaser, A.Lugering, M.Kagnoff, L.Mayer, S.Targan, W.Domschke, Inflammatory Bowel Disease 2006, 12( 11) 1068-1083
12. Environmental risk factors in inflammatory bowel disease Koutroubakis I, Manousos O, Mewwissen S Hepatogastroenterology 1996;43 :381-93
13. The genetics of inflammatory bowel disease Bonen DK Cho J Gastroenterology 2003;124:521-36
14. Immunoregulation in the gut:success and failures in human disease Monteleone I, Vavassori P, Biancone L et al Gut 2002;50 (suppl III) iii 60-4
15. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease Ogura Y, Bonen D et al, Nature 2001;411 603-606
16. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease, Lesage S, Zouali H et al, Am J Hum Genet 2002 70 845-57
17. Association of NOD2 genotype with clinical course of Crohn's disease: a cohort study ,Hambe J, Grebe J et al, Lancet 2002;359 1661-1665
18. Association between the C3435T MDR1 gene polymorphism and susceptibility for ulcerative colitis, Schwab M, Schaeffeler E et al, Gastroenterology 2003;2003 124 26-33

19. Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier ion transport and inflammation Berkes J, Viswanathan V et al Gut 2003 52 439-51
20. Decreased expression of apical Na<sup>+</sup> channels and basolateral Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase in ulcerative colitis, Kreig E, Boot-Handford R et al, J Pathol 2004 204 84-92
21. Leucocyte-endothel cell interactions: molecular mechanisms and implications in gastrointestinal disease, Panes J, Granger DN Gastroenterology 1998 114 1066-1090
22. Innate immunity and mucosal bacterial interactions in the intestine, Eckmann L, Curr Opin Gastroenterol 2004 20 82-88
23. NOD2 mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression, Wehkamp J, Harder J et al, Gut 2004 53 1658-1664
24. CD40 and CD154 on cell mediated immunity, Grewal IS, Flavell RA Annu Rev Immunol 1998; 16:111-35
25. CD40-CD40L, Van Kooten, Banchereau J Leukoc Biol 2000;67:2-17
26. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad, Schonbeck U, Libby P, Cell Mol Life Sci 2001;58:4-43
27. Targeting of costimulatory molecules as a therapeutic approach in inflammatory bowel disease, Maerten P, Liu Z, Ceuppens JL, Biodrugs 2003;17: 395-411
28. Expression of CD40 and its ligand, CD40L, in intestinal lesions of Crohn's disease, Battaglia E, Biancone L, Resegotti A, et al, Am J Gastroenterology 1999;94:3279-84
29. The role of CD40 in ulcerative colitis: histochemical analysis and clinical correlation. Polese L, Angrimann I, Cecchetto A et al, Eur J Gastroenterol Hepatol 2002; 14:237-41

30. Hyperexpression of CD40 ligand ( CD154) in inflammatory bowel disease and its contribution to pathogenic cytokine production, Liu Z , Colpaert S, D'Haens GR et al, *J Immunology* 1999;163:4049-57
31. Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation, Frauwirth A, et al *J Clin Investig* 109 295-299
32. Activated platelets are the source of elevated of soluble CD40 ligand in the circulation of inflammatory bowel disease patients, Danese S, Katz JA, Saibeni S *Gut* 2003;52:1435-41
33. An increased number of CD40-high monocytes in patients with Crohn's disease Sawada-Hase N, Miyagawa J et al *Am J Gastroenterol* 2000;95:1516-23
34. Chronic murine colitis is dependent on the CD154/CD40 pathway and can be attenuated by antiCD154 administration, De Jong Y et al *Gastroenterology* 2000 119 715-23
35. CD40/CD154 ligation is required for the development of acute ileitis following oral infection with an intracellular pathogen in mice, Li W, Buzoni-Gatel D, *Gastroenterology* 2002;122 762-773
36. CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity, S. Quezada, L. Jarvinen, E.Lind, R.Noelle, *Annu. Rev. Immunol* 2004, 22:307-328
37. Role of CD40 and B7 costimulators in inflammatory bowel diseases, L.Polese, I. Angriman, M. Scarpa, L. Norberto, G.Carlo Sturniolo, A.Cecchetto, C.Ruffolo, D.D Amico *Acta Bio Medica* 2003,74, suppl:65-70
38. The CD40/CD40L costimulatory pathway in inflammatory bowel disease, S.Danese, M.Sans, C.Fiocchi *Gut* 2004 53:1035-1043

39. Targeting CD40L: a promising therapeutic approach, D. Daoussis, A. Andonopoulos, S. Liossis *Clinical and Diagnostic laboratory immunology* 2004 635-641
40. Prevention of experimental colitis in SCID mice reconstituted with CD42RBhigh CD4+ T cells by blocking the CD40-CD154 interactions Liu Z, Geboes et al *J Immunol* 2000;164:6005-14
41. Thromboembolic complications after treatment with monoclonal antibody against CD40 ligand, Kawai T, Andrews D et al *Nat Med* 2000;6:114
42. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation, S. Wirtz, C. Neufert, B. Weigmann, M. Neurath, *Nature protocols* 2007 Vol 2, no3
43. CD40 antisense oligonucleotide inhibition of trinitrobenzene sulphonic acid induced rat colitis DGao, AWagner, SFankhaenel, TStojanovic, SSchweyer, SPanzner, MHecker *Gut* 2005 54:70-77
44. Insights from advances in research of chemically induced experimental models of human inflammatory bowel disease M Kawada, A Arihiro, E Mizoguchi *World Journal of Gastroenterology* 2007, 13 (42) 5581-5593
45. CD40 antisense based strategy for inflammatory bowel disease: shutting down multiple cellular communication systems S. Danese, M. Sans A Gasbarrini
46. Alterations of the mucosal immune system in inflammatory bowel disease R. McDermott *J Gastroenterology* 1996 31:907-916
47. Dendritic cells and the control of immunity, Bachereau J, Steinman RM et al *Nature* 1998;392:245-52
48. Human blood contained two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. O'Doherty, Peng M et al *Immunology* 1994;82:487-92

49. Control of intestinal inflammation by regulatory T cells Singh B et al, *Immunol Rev* 2001;182:190-200
50. CD4+CD25+Tregs suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms Maloy KJ, Salaun L et al, *J Exper Med* 2003 197 111-119
51. Cutting edge: cure of colitis by CD4+CD25+Tregs Mottet C, Uhlig H et al *J Immunol* 2003 170 3939-3943
52. Regulatory T cells in the prevention of mucosal inflammatory diseases: patrolling the border R. Lan, I Mackay, M. Gershwin *Journal of autoimmunity* 2007, 272-280
53. Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation A Izcue, J Coombes, F Powrie *Immunological reviews* 2006, 212:256-271
54. Interleucin-10 gene deficient mice develop a primary intestinal permeability defect in response to enteric microflora Madsen K, Malfair D et al *Inflammat Bowel Disease* 1999, 5, 262-270
55. Interleucin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis, Kuhn R, Lohler J et al, *Cell* 1993 75:263-74
56. Acute induction of human IL-8 production by intestinal epithelium triggers neutrophil infiltration without mucosal injury Kucharzik T, Hudson J et al *Gut* 2005 54 1565-1572
57. Biology of interleukin-1 Dinarello CA *FASEB J* 1988; 2:108-115
58. Interleukin-6, interleukin-1-beta and tumor necrosis factor: expression in inflammatory bowel disease, Stevens C, Waltz G et al, *Gastroenterology* 1990; 98:A475



59. Enhanced production of IL-8 in ulcerative colitis Hommes DW, Jansen J et al *Gastroenterology* 1992;102A927
60. Monocyte-chemoattractant protein 1 gene expression in intestinal epithelial cells and inflammatory bowel disease mucosa Reinecker HC, Loh EY et al *Gastroenterology* 1995; 108:40-50
61. NCX-1015, a nitric-oxide derivative of prednisolone, enhances regulatory T cells in the lamina propria and protects against 2,4,6 trinitrobenzene sulfonic acid induced colitis in mice S Fiorucci, E Antonelli, E Distrutti, R Flower et al *PNAS* 2002 99 24
62. IL6 signalling in inflammatory bowel disease: pathophysiological role and clinical relevance J Mudter, MNeurath *Inflammatory bowel disease* 2007 13 (8)
63. Pathophysiology of IRAK-M implications in refractory state E.Colazo, P.Prior, F.Arnalich, C.del Fresno *Current Opinion in Infectious Diseases* 2006, 19:237–244

