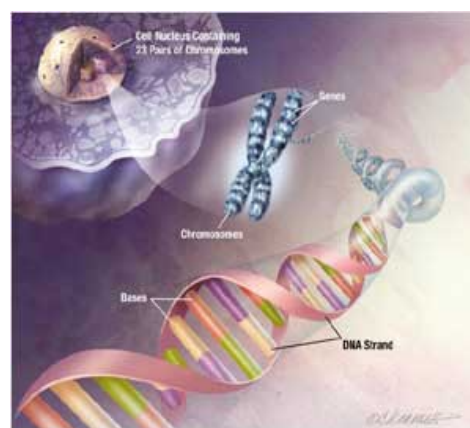
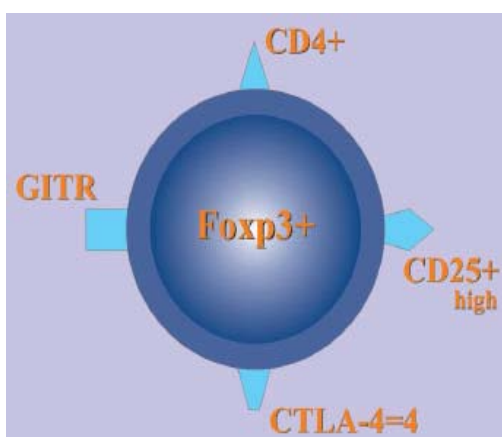


« Μελέτη των Τ Ρυθμιστικών Κυττάρων στο Περιφερικό Αίμα και το Μυελό των Οστών Ασθενών με Χρόνια Ιδιοπαθή Ουδετεροπενία »



Διπλωματική Εργασία για το ΜΤΠΧ Πρόγραμμα:
« Κυτταρική και Γενετική Αιτιολογία
Διαγνωστική των Ασθενειών του Ανθρώπου.»

Αντωνία Αντωνίου

Υπεύθυνη Καθηγήτρια: κ. Ελένη Παπαδάκη

Οκτώβριος 2008

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Μόλις έκανα τις τελευταίες διορθώσεις στη διπλωματική μου εργασία και αντί για επίλογο καλούμαι να γράψω πρόλογο. Τα συναισθήματα ανάμεικτα. Χαρά και ανακούφιση γιατί η ζωή προχωράει, αλλάζει χώρο, χρόνο, ανθρώπους και οφείλουμε να προχωράμε μαζί της. Θλίψη και στεναχώρια για όλα αυτά και όλους αυτούς που αφήνουμε πίσω μας. Σήμερα, εδώ, τώρα, τελειώνει για μένα ένα από τα μεγαλύτερα ταξίδια της ζωής μου. Ένα ταξίδι που κράτησε οχτώ ολόκληρα χρόνια. Το ξέρω, δεν είναι και τόσα πολλά, αλλά σίγουρα θα είναι τα πιο αλησμόνητα στη σκέψη μου. Αυτό το ταξίδι μου χάρισε πάρα πολλά. Κάθε στιγμή του ήταν και θα είναι πάντοτε γεμισμένη με έντονα συναισθήματα και πρωτόγνωρες εμπειρίες. Κάθε εικόνα του θα είναι πάντοτε γεμάτη από χαμόγελα φίλων αληθινών που χωρίς αυτούς δε θα είχε καμιά αξία, κανένα απολύτως νόημα. Όσα κι αν έζησα, όσα κι αν έχω κάνει, όπου κι αν βρεθώ, όσα και να ξεθωριάσουν στο πέρασμα του χρόνου, θα κρατήσω ολοζώντανους στη σκέψη μου τους ανθρώπους που περάσαμε μαζί τις πιο όμορφες και τις πιο άσχημες στιγμές, τα πιο ξέφρενα γλέντια και τα πιο δύσκολα ξενύχτια, το γέλιο, το δάκρυ, την ευτυχία, την απόγνωση. Ευχαριστώ Γιάννη. Ευχαριστώ Μαίρη, Ελένη, Αλεξάνδρα, Ηλία, Δήμητρα, Μελίνα, Γιώργο. Ευχαριστώ μαμά, μπαμπά, είστε απλά υπέροχοι! Αν και μακριά, ποτέ δε με αφήσατε να νιώσω μόνη.

Είναι όμως κι άλλοι πολλοί που έκαναν αυτό το ταξίδι πραγματικά να αξίζει τον κόπο. Ευχαριστώ κ. Παπαδάκη. Όχι μόνο για την ευκαιρία που μου δώσατε να δουλέψω δίπλα σας αλλά και να γνωρίσω την ανθρώπινη πλευρά σας. Ευχαριστώ για την υπομονή, την κατανόηση και την πίστη σας σε μένα και για όλα αυτά που έμαθα τον τελευταίο χρόνο. Ευχαριστώ Κλαυδία. Για τη ζωντάνια σου από τη μία αλλά και το μητρικό σου βλέμμα από την άλλη που γέμιζε στο εργαστήριο με ζεστασιά και χρώμα. Ευχαριστώ Μαρία Β., Μαρία Ξ., Ειρήνη, Χριστίνα, Μύριαμ, Δημήτρη, Κατερίνα, Μιχάλη, Βάσια, Μανώλη, τόσο για την έμπρακτη βοήθεια σας όσο και για κάθε στιγμή και κάθε μέρα που περάσαμε μαζί.

Όσα κι αν πω θα είναι λίγα..

Η αυλαία πέφτει. Τα φώτα της σκηνης σβήνουν. Σιωπή..

Είμαστε ακόμα ζωντανοί..

Αύριο ξεκινάει ένα καινούριο ταξίδι..

Στο επανιδείν!

Αντωνία

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ABSTRACT	4
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
1.1 Τ ρυθμιστικά κύτταρα	6
1.1.1 Ανάπτυξη των Τ ρυθμιστικών κυττάρων στο θύμο αδέν	7
1.1.2 Φυσικά Τ ρυθμιστικά κύτταρα	8
1.1.3 FOXP3: Ο κύριος ρυθμιστής των Τ ρυθμιστικών κυττάρων	10
1.1.3.1 Έκφραση του FOXP3	10
1.1.3.2 Δομή του FOXP3	11
1.1.3.3 Λειτουργία του FOXP3	12
1.1.3.4 Γονίδια-στόχοι του FOXP3	13
1.1.3.5 Μεταλλάξεις του γονιδίου του FOXP3	13
1.1.4 Μηχανισμοί καταστολής των Τρυθ κυττάρων	13
1.1.4.1 Επαφή κυττάρου με κύτταρο	14
1.1.4.2 Κυτταροκίνες	14
1.1.4.3 Κυτταροτοξικότητα	15
1.1.5 Επαγόμενα Τρυθ κύτταρα	15
1.1.6 Τα Th17 κύτταρα και η σχέση τους με τα Τ ρυθμιστικά κύτταρα	16
1.2 Τα Τρυθ κύτταρα και τα αυτοάνοσα νοσήματα	17
1.2.1 Νόσος του Crohn και ελκώδης κολίτιδα	17
1.2.2 Πολλαπλή σκλήρυνση	17
1.2.3 Συστηματικός ερυθηματώδης λύκος	18
1.2.4 Ρευματοειδής αρθρίτιδα	18
1.2.5 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1	19
1.2.6 Απλαστική αναιμία	19
2. ΧΡΟΝΙΑ ΙΔΙΟΠΑΘΗΣ ΟΥΔΕΤΕΡΟΠΕΝΙΑ ΚΑΙ ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	20
2.1 Χρόνια ιδιοπαθής ουδετεροπενία	20
2.2 Σκοπός της μελέτης	21
3. ΑΣΘΕΝΕΙΣ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	22
3.1 Δείγματα Ασθενών	22
3.1.1 Περιφερικό αίμα και μυελός των οστών	22
3.2 Υλικά και Μέθοδοι	22
3.2.1 Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος και του μυελού των οστών	22
3.2.2 Κυτταρομετρία Ροής	23
3.2.3 Μέθοδος ανοσομαγνητικού διαχωρισμού CD4+CD25+ Τ ρυθμιστικών κυττάρων	24
3.2.4 Κυτταρικές καλλιέργειες	25
3.2.4.2 Δοκιμασίες καταστολής των CD4+CD25- και των CD4+CD25+ Τ κυττάρων	26
3.2.5 Απομόνωση RNA από CD4+CD25+ Τ κύτταρα	27
3.2.6 Μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης ανάστροφης μεταγραφάσης (RT-PCR)	27
3.2.7 Μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)	28
3.2.8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR)	29
3.2.9 Προσδιορισμός κυτταροκινών	32
3.3. Στατιστική ανάλυση	33
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	34

4.1 Δημογραφικά, κλινικά και εργαστηριακά στοιχεία ασθενών	34
4.1.1 Δείγμα ασθενών με CIN στους οποίους μελετήθηκε η ποσοτική μεταβολή των Τρυθ κυττάρων στο περιφερικό αίμα	34
4.1.2 Δείγμα ασθενών με CIN στους οποίους μελετήθηκε η ποσοτική μεταβολή των Τρυθ κυττάρων στο μυελό των οστών	34
4.2 Ποσοτική μεταβολή διαφόρων υποπληθυσμών στο περιφερικό αίμα ασθενών με CIN	34
4.2.1 Μεταβολή του απόλυτου αριθμού ολικών λεμφοκυττάρων και του αριθμού των CD4+ T κυττάρων	34
4.2.2 Μεταβολή της συχνότητας των CD4+CD25+ T κυττάρων και των FOXP3+ σε υποπληθυσμούς CD4+CD25+ T κυττάρων	35
4.3 Ποσοτική μεταβολή των Τρυθ κυττάρων στο μυελό των οστών σε σχέση με το περιφερικό αίμα στους ασθενείς με CIN	39
4.3.1 Μεταβολή της συχνότητας των CD4+CD25+ T κυττάρων και των FOXP3+ σε υποπληθυσμούς CD4+CD25+ T κυττάρων	39
4.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου	41
4.5 Κυτταρικές καλλιέργειες	42
4.5.1 Δοκιμασίες καταστολής των CD4+CD25- από τα CD4+CD25+ T κύτ	42
4.6 Προσδιορισμός Κυτταροκινών	45
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	46
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	49

ABSTRACT

Introduction: Functional and/or quantitative changes of T-regulatory (T-reg) cells have been implicated in the pathophysiology of autoimmune diseases. CIN is bone marrow (BM) failure syndrome characterized by increased apoptosis of granulocyte progenitor cells due to the presence of activated T cells with myelosuppressive properties. Their role of Tregs in CIN has not been studied.

Aim of the study: To investigate the frequency and the function of Tregs in CIN patients and probe the underlying mechanisms implicated in their abnormalities, if any.

Patients and Methods: 50 CIN patients and 20 age and sex-matched healthy controls were included in the study. All patients fulfilled the diagnostic criteria for CIN. We evaluated the frequency of FOXP3⁺ cells in the CD4⁺/CD25^{high} T cell population in the peripheral blood and BM using flow cytometry. Flow cytometric analysis was performed in the CD4⁺CD25⁺ T cell fraction. FOXP3 mRNA levels of bead-sorted CD4⁺CD25⁺ T cells were measured using real-time PCR. In matters of function, we performed suppression assays using bead-sorted CD4⁺CD25⁻ and CD4⁺CD25⁺ T cells from 2 patients with CIN and 1 healthy control. Finally we assessed IL-17 levels in serum and long-term BM culture (LTBMC) supernates of CIN patients and healthy controls using ELISA as IL-17 levels reflect the Th17 cell numbers and there is evidence of a mutually exclusive relationship between these pro-inflammatory cells and Tregs.

Results: CIN patients displayed statistically significant low number of total lymphocytes (1632±493) and CD4⁺ T-cells (765±281) compared to healthy controls (2575±559 and 1096±308 respectively) (P<0.0001 and P<0.0001, respectively). The percentage of FOXP3⁺ cells within CD4⁺/CD25^{high} T cells (FI >3x10¹) was significantly decreased in CIN patients (57.77%±15.77%) compared to controls (72.95±12.23%) (0.80%±0.49%, P=0.0005). Interestingly however, a parallel measurement of Treg cell proportion in peripheral blood and BM specimens of CIN patients (n=6) showed statistically significant increased percentage of FOXP3⁺ cells within the CD4⁺/CD25^{high} T-cells (FI>3x10¹) of BM (68.51%±11.88%) compared to peripheral blood (52.20%±12.77%, P=0.0005 suggesting a possible accumulation of Tregs in patients' BM. Real-Time PCR assay confirmed that there is a statistically significant decrease in the expression of the FOXP3 mRNA in bead-sorted CD4⁺CD25⁺ T cells of CIN patients (n=11) compared with healthy donors (n=3, P=0.0293). Serum IL-17 levels did not differ significantly between CIN patients (5.41±7.98 ng/ml) and healthy controls (5.99±9.40 ng/ml, P=0.8788) but were statistically significant increased in patient LTBMC supernatants (4.09±6.20 ng/ml) compared to healthy controls (0.69 ±1.82 ng/ml) (P=0.0268). Finally, in 2 patient 1 healthy control co-culture suppression assays, bead-sorted CD4⁺CD25⁺ Treg cells from healthy donors suppressed CFSE-labeled CD4⁺CD25⁻ T responder cells much more effectively than CD4⁺CD25⁺ Treg cells from CIN patients. CFSE signal was measured on Day 3 and Day 7 of co-culture using flow-cytometry.

Conclusions: CIN patients display decreased number of Tregs and decreased expression of FOXP3 mRNA in the peripheral blood. There probably is an accumulation of these cells in the BM in an attempt to suppress

the local immune reactions mediated by activated T cells and pro-inflammatory Th17 cells which produce higher levels of IL-17 in LT BMC supernates of patients with CIN . The Treg cell function also seems to be defective in CIN patients but more investigation is needed in order to support this postulation.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Τ ρυθμιστικά κύτταρα

Ο πιο σημαντικός ρόλος που διαδραματίζει το ανοσολογικό σύστημα είναι η προστασία του οργανισμού από ξένες απειλές. Συγκεκριμένα, το ανοσολογικό σύστημα φυσιολογικά οφείλει να έχει την ικανότητα να προκαλεί μια αποτελεσματική ανοσολογική απάντηση εναντίον ξένων/μικροβιακών παραγόντων αλλά ταυτόχρονα να μην αντιδρά κατά του εαυτού. Αυτό σημαίνει ότι το ανοσολογικό σύστημα πρέπει να διατηρεί την ικανότητα όχι μόνο να αναγνωρίζει αναρίθμητα παθογόνα αλλά και να διαφοροποιεί ανάμεσα σε ουσίες του εαυτού και ξένες ουσίες[1].

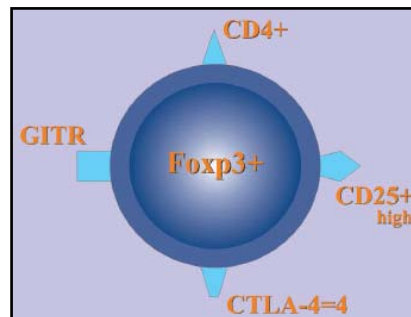
Η κεντρική ανοσολογική ανοχή στο θύμο αδένα είναι υπεύθυνη τόσο για τη δημιουργία ενός εκτεταμένου ρεπερτορίου Τ κυτταρικών υποδοχέων (T Cell Receptors, TCRs) μέσω του ανασυνδυασμού των VDJ γονιδίων στα Τ κύτταρα όσο και για τη διαγραφή των αυτοαντιδρώντων Τ κυττάρων. Οπότε, η ειδικότητα της ανοσολογικής απόκρισης για το «μη-ίδιον» εξαρτάται από την κεντρική ανοχή, όπου περισσότερα από 95% των ανώριμων Τ κυττάρων που προέκυψαν από το θύμο περνάνε από το στάδιο της αρνητικής επιλογής για απαλλαγή από τα αυτοδραστικά κύτταρα [1].

Εκτός από την κεντρική ανοχή στο θύμο, υπάρχουν και στην περιφέρεια μηχανισμοί για τη διαγραφή των αυτοαντιδρώντων κλώνων που κατάφεραν να ξεφύγουν από τον θύμο. Ανάμεσα σε αυτούς, σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν τα CD4+CD25+ (IL-2Rα) ρυθμιστικά Τ κύτταρα που όπως έχει αποδειχτεί περιορίζουν αυτοάνοσες και φλεγμονώδεις διαδικασίες [2].

Η ιδέα για την ύπαρξη των Τ ρυθμιστικών κυττάρων (Εικόνα 1) ξεκίνησε τη δεκαετία του '60 από τον Dick Gershon [3] που υπέθεσε ότι συγκεκριμένα και προορισμένα κατασταλτικά κύτταρα προλάμβαναν την ιστική καταστροφή που προκαλούσαν τα αυτοδραστικά κύτταρα. Παρόλα αυτά, η ύπαρξη αυτών των κυττάρων δε μπορούσε να αποδειχθεί εξαιτίας της απουσίας ενός φαινοτυπικού ή λειτουργικού δείκτη για την ταυτοποίηση τους και το πεδίο έρευνας εγκαταλείφθηκε για πάρα πολλά χρόνια. Μερικές δεκαετίες αργότερα, και πιο συγκεκριμένα το 1985, η ομάδα του Hall's ανέφερε την επαγωγή κατασταλτικής δραστηριότητας στα CD4+ Τ κύτταρα αρουραίων μετά από μεταμόσχευση καρδιάς και βραχυπρόθεσμη θεραπεία με κυκλοσπορίνη [4]. Το 1989, η ομάδα των Morris και Wood ανέφερε κι αυτή με τη σειρά της την επαγωγή των CD4+ κατασταλτικών Τ κυττάρων μετά από μετάγγιση σε αρουραίους. Η ομάδα του Waldmann έδειξε ότι η αλλοειδική ανοχή στα ποντίκια που επαγόταν από συνδυασμένη αντι-CD4 και αντι-CD8 θεραπεία εξαρτιόταν από τα CD4+ Τ κύτταρα και τέλος η ομάδα του Wood συνεχίζοντας τις έρευνες της, έδειξε ότι η επιμήκυνση του χρόνου ζωής αλλομοσχεύματος με αντι-CD4 θεραπεία σε ποντίκια εξαρτιόταν από τα CD4+ Τ κατασταλτικά κύτταρα. Εντούτοις, παρά τις επαναλαμβανόμενες ενδείξεις για την ύπαρξη ενός πληθυσμού CD4+ κατασταλτικών Τ κυττάρων σε διάφορα μοντέλα τρωκτικών, η ύπαρξη τους εξακολουθούσε να είναι αμφιλεγόμενη κυρίως λόγω της έλλειψης αξιόπιστων και διακριτών μοριακών δεικτών.

Το 1995 η ομάδα του Sakaguchi έδειξε ότι σε ένα μοντέλο επαγόμενης αυτοανοσίας η κατασταλτική δραστηριότητα οφειλόταν αποκλειστικά στον CD4+CD25+ Τ κυτταρικό υποπληθυσμό [5]. Αυτά τα αποκαλούμενα

«ρυθμιστικά T κύτταρα» (T_{reg}) προέρχονται από συμβατικά T κύτταρα του θύμου που εξέφραζαν τυπικούς TCR με α και β αλυσίδες (TCRαβ). Η μεγάλη σημασία των CD4+CD25+ T ρυθμιστικών κυττάρων ήταν πλέον αδιαμφισβήτητη δεδομένης και της πειραματικής απόδειξης ότι ενήλικα ποντίκια υπόκεινται σε μαζική αυτοανοσία μετά από στοχευμένη απαλοιφή του γονιδίου του FOXP3 από τα κύτταρα τους [6] ενώ αποκατάσταση του γονιδίου λίγο μετά την απαλοιφή σταματά τις εκδηλώσεις αυτοανοσίας. Συμπερασματικά, η εμπλοκή των T_{reg} κυττάρων στα περισσότερα μοντέλα αλλοειδικής ανοχής είναι πλέον ιστορικά αποδεδειγμένη [4] και η απαλοιφή τους σε ζωικά μοντέλα ποντικών οδηγεί σε μαζική αυτοάνοση αντίδραση.

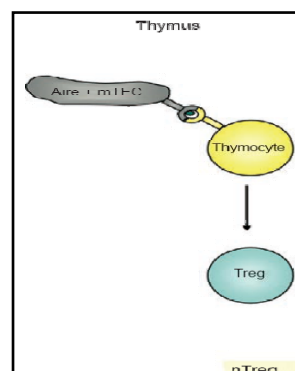


Εικόνα 1. Το T ρυθμιστικό κύτταρο

1.1.1 Ανάπτυξη των T ρυθμιστικών κυττάρων στο θύμο αδένα

Η διαδικασία διαγραφής των αυτοαντιδρώντων κλώνων με παράλληλη διατήρηση της δυνατότητας καταπολέμησης ξένων εισβολών και ταυτόχρονης διατήρησης της ανοχής εναντίον των λίγων αυτοδραστικών κλώνων που δραπέτευσαν από το θύμο προς την περιφέρεια είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, σημαντικό ρόλο διαδραματίζει ο θύμος που αποτελεί το βασικό όργανο κεντρικής ανοχής. Τα περισσότερα αυτοαντιγόνα της περιφέρειας είναι παρόντα στο θύμο και με τη βοήθεια του μεταγραφικού παράγοντα AIRE (AutoImmune REgulator), τα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα εκφράζουν χαμηλά επίπεδα αυτών των αυτό-αντιγόνων (Εικόνα 2) [1].



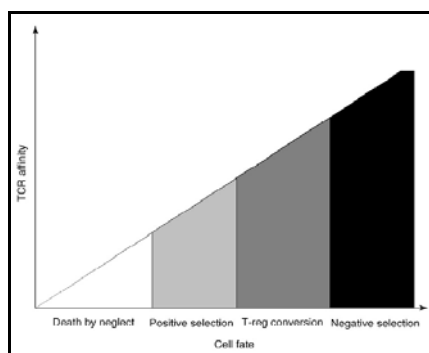
Εικόνα 2. Η δημιουργία των T_{reg} κυττάρων

Όταν ο TCR ενός ανώριμου T κυττάρου προσδεθεί με αυτοαντιγόνο και αυτο-MHC με χαμηλή συγγένεια, λαμβάνει σήμα για διαφοροποίηση και υπόκειται σε «θετική επιλογή». Αυτά τα T κύτταρα, όταν αργότερα περάσουν

στην περιφέρεια σαν ώριμα CD4+ ή CD8+ T κύτταρα θα αναγνωρίσουν και θα καταπολεμήσουν ξένα αντιγόνα πάνω σε MHC πρωτεΐνες του εαυτού.

Ένα ποσοστό των ανώριμων T κύτταρα στο θύμο αναγνωρίζουν τα αυτοαντιγόνα σε MHC του εαυτού με πολύ μεγάλη συγγένεια και προκαλούν μία αντίδραση που είναι υπερβολικά έντονη για το κύτταρο επάγοντας άμεσα τον κυτταρικό θάνατο. Αυτή είναι η διαδικασία της «αρνητικής επιλογής» των αυτοδραστικών κυττάρων.

Τέλος, υπάρχει περίπτωση η αλληλεπίδραση του αυτοαντιγόνου με τον TCR του ανώριμου T κυττάρου να γίνει με ενδιάμεση συγγένεια, οπότε αυτός ο πληθυσμός T κυττάρων ξεφεύγει από την αρνητική επιλογή και μεταναστεύει στην περιφέρεια όπου έχει ανεργικό φαινότυπο με μειωμένο πολλαπλασιασμό και μειωμένη έκκριση κυτταροκινών μετά την πρόσδεση αντιγόνου στον T κυτταρικό υποδοχέα. Αυτά τα κύτταρα ονομάζονται φυσικά T ρυθμιστικά κύτταρα (nTregs) (Εικόνα 3). Για τη δέσμευση στην T ρυθμιστική κυτταρική σειρά χρειάζονται και άλλα δευτερεύοντα σήματα [1].



Εικόνα 3. Η «τύχη» των ανώριμων T κυττάρων

Εντούτοις, επειδή ο μεταγραφικός παράγοντας AIRE δεν επάγει την έκφραση όλων των αντιγόνων στα επιθηλικά κύτταρα του θύμου με αποτέλεσμα , μερικά αυτοδραστικά T κύτταρα να μην προσδένονται ποτέ με τα αντίστοιχα αυτοαντιγόνα. Αυτά τα κύτταρα ξεφεύγουν από τη διαγραφή και την ανεργία μεταναστεύοντας στα περιφερικά λεμφικά όργανα σαν άωρα T κύτταρα [1]. Στην περιφέρεια αυτά τα T κύτταρα είναι αυτοδραστικά και έχουν την ικανότητα να προκαλούν αυτοανοσία αν ενεργοποιηθούν ή δεν κατασταλούν επαρκώς. Αυτοανοσία είναι η αποτυχία του ανοσολογικού συστήματος να διατηρεί ανοχή έναντι του εαυτού. Τα T ρυθμιστικά κύτταρα διαδραματίζουν ένα κρίσιμο ρόλο στην άρση της αυτοανοσίας και τον περιορισμό άλλων φλεγμονωδών διεργασιών [2].

1.1.2 Φυσικά T ρυθμιστικά κύτταρα

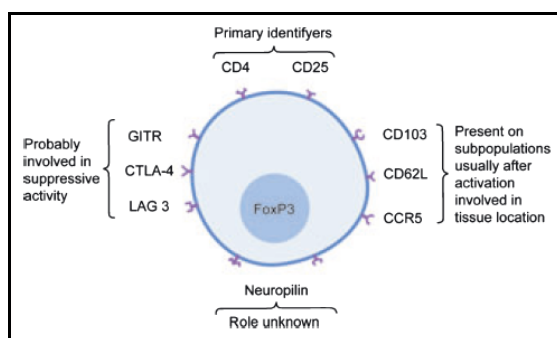
Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, τα φυσικά T_{reg} κύτταρα αναπτύσσονται στο θύμο και το ρεπερτόριο των TCR τους είναι κυρίως αυτοδραστικό. Αρχικά, τα φυσικά T_{reg} κύτταρα καθορίζονταν χρησιμοποιώντας μόνο τον CD4+ και τον CD25+ φαινότυπο. Στους ανθρώπους αυξάνει η πολυπλοκότητα όσον αφορά τα T_{reg} κύτταρα γιατί υπάρχει και ένας αρκετά μεγάλος αριθμός ενεργοποιημένων CD4+ T κυττάρων που εκφράζουν το χαρακτηριστικό για τα T_{reg} κύτταρα CD25^{hi} μόριο [7]. Βρέθηκε ότι καλύτερος δείκτης για τα φυσικά T ρυθμιστικά κύτταρα είναι η

υψηλή έκφραση του CD25 μορίου (CD25^{high}). Εντούτοις, δεν υπάρχει ένα γενικώς αποδεκτό όριο ανάμεσα στην ενδιάμεση (CD25^{int}) και την υψηλή (CD25^{high}) έκφραση του CD25 μορίου. Έτσι, είναι δύσκολη η σύγκριση των αποτελεσμάτων για τα Τρυθ κύτταρα, τόσο όσον αφορά τον πληθυσμό τους όσο και τη λειτουργία τους κυρίως σε φλεγμονώδεις καταστάσεις όπου υπάρχουν μεγάλοι αριθμοί ενεργοποιημένων Τ δραστικών κυττάρων (T effector cells).

Υπάρχουν πολλά αντιγόνα παρόντα στα φυσικά Τρυθ κύτταρα (Εικόνα 4) που είναι απόντα ή εκφράζονται πολύ λιγότερο στα Τ συμβατικά κύτταρα, αλλά όλα παρουσιάζουν το ίδιο πρόβλημα όπως και το CD25 μόριο, δηλαδή μπορούν να εκφραστούν στα Τ συμβατικά κύτταρα κάτω από συνθήκες ενεργοποίησης.

Αυτά τα μόρια είναι τα εξής :

- **CTLA-4 (Coreceptor family Cytotoxic T Lymphocyte Associated Receptor-4)**, που ανταγωνίζεται το CD28 μόριο για πρόσδεση του στο B7 των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων. Η σύνδεση του CTLA-4 με το B7 στέλνει ανασταλτικά σήματα στο Τ κύτταρο [1].
- **LAG3 (Lymphocyte Activating Gene 3)**
- **CD45RB**
- **Νευροπιλίνη**
- Τα μεταναστευτικά μόρια **CD62L** και **α E integrin CD103** μπορούν να διαχωρίσουν τα Τρυθ των λεμφαδένων που είναι CD62L⁺ και τα Τρυθ κύτταρα που ενσωματώνονται στους διάφορους ιστούς (CD103⁺) [8].
- **Υποδοχείς χημειοκινών** μπορεί επίσης να ενέχονται στο πώς τα Τρυθ κύτταρα εντοπίζονται στους διάφορους ιστούς [8].
- Τέλος, ένας **νέος φαινοτυπικός δείκτης, το CD127 μόριο (IL7R α)** πιστεύεται ότι εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα στον Τρυθ κυτταρικό πληθυσμό



Εικόνα 4. Οι επιφανειακοί δείχτες των Τ ρυθμιστικών κυττάρων

Πιο συγκεκριμένα, σε μία πρόσφατη μελέτη [9], οι συγγραφείς έδειξαν ότι χαμηλή έκφραση του επιφανειακού μορίου CD127 (IL-7R α), σε συνδυασμό με το CD25 μόριο (IL2R α), μπορεί να διαχωρίσει τα συμβατικά CD4⁺ Τ κύτταρα από τα Τ ρυθμιστικά κύτταρα στο αίμα, στους λεμφαδένες και στο θύμο [9]. Συγκεκριμένα, ο συνδυασμός των τριών επιφανειακών δεικτών CD4⁺ CD25⁺ και CD127^{low} φαίνεται να συμπεριλαμβάνει ~80% των FOXP3⁺ Τ κυττάρων και αυτά τα κύτταρα είναι σε πολύ μεγάλο βαθμό κατασταλτικά σε λειτουργικές δοκιμασίες καταστολής. Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός ότι όταν τα

κύτταρα διαχωρίζονταν μόνο την έκφραση CD4+ και CD127^{low}, ο κυτταρικός πληθυσμός που προέκυπτε ήταν ανεργικός και παρουσίαζε εξίσου υψηλά επίπεδα καταστολής όπως και ο συμβατικά καθορισμένος Τρυθ κυτταρικός πληθυσμός.

Μια πολύ σημαντική μελλοντική προοπτική είναι η ταυτοποίηση ενός επιφανειακού δείκτη μοναδικού για την αποκλειστική απομόνωση Τρυθ κυττάρων ανεξάρτητα από την έκφραση του CD25. Ένας τέτοιος δείκτης θα μπορούσε να είναι και ο GPR83 (G protein-coupled receptor 83). Η έκφραση του mRNA του GPR83 συμβαδίζει με αυτή του γονιδιακού προφίλ του FOXP3 και η υπερέκφραση του έχει σαν αποτέλεσμα την περιφερική παραγωγή FOXP3+ Τρυθ κυττάρων *in vivo*. Η παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι του GPR83 θα αποτελεί ένα σημαντικό βήμα για τον καθορισμό των Τρυθ κυττάρων.

1.1.3 FOXP3: Ο κύριος ρυθμιστής των T ρυθμιστικών κυττάρων

1.1.3.1 Έκφραση του FOXP3

Ο κύριος ρυθμιστής των Τρυθ κυττάρων, ο πιο ειδικός δείκτης για τη διάκριση ανάμεσα στα Τρυθ κύτταρα και τα συμβατικά Τ κύτταρα περιγράφηκε σχεδόν ταυτόχρονα από τρεις διαφορετικές ομάδες το 2003 [3]. Πρόκειται για τον μεταγραφικό παράγοντα FOXP3 (Forkhead Box 3) στην έκφραση του οποίου στηρίζεται σήμερα η ταυτοποίηση των φυσικών Τρυθ κυττάρων καθώς πρόκειται ουσιαστικά για τον ενδοκυττάριο δείκτη που ενέχεται στη διαφοροποίηση των Τ κυττάρων σε κύτταρα με ρυθμιστική λειτουργία.

Ο FOXP3 μεταγραφικός παράγοντας εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα λεμφικά όργανα όπως ο θύμος και ο σπλήνας. Περιφερικά, τα CD4+ Τ κύτταρα που εκφράζουν τον FOXP3 ανήκουν στο CD4+CD25+ κυτταρικό υποσύνολο [10]. Ενώ ο FOXP3 εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα CD4+CD8-CD25+ Τ κύτταρα της περιφέρειας και στα θυμοκύτταρα, χαμηλή έκφραση του υπάρχει και στα άωρα και στα ενεργοποιημένα CD4+ CD25- Τ κύτταρα καθώς και σε άλλα Τ κύτταρα (CD4- CD8+ Τ κύτταρα) και σε Β, NK και NKT κύτταρα. Συνολικά, από το 15% των Τ κυττάρων που εκφράζουν το FOXP3 μόριο, 70-80% είναι CD4+CD25+. Η σηματοδότηση μέσω του CD28 μορίου είναι απαραίτητη για την έκφραση του FOXP3 και για την προαγωγή της διαφοροποίησης των Τρυθ κυττάρων από τα αναπτυσσόμενα θυμοκύτταρα [11].

Παρόλα αυτά, πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι η ενδογενής έκφραση του FOXP3 στους ανθρώπους δεν είναι επαρκής για να επάγει Τ ρυθμιστική δραστηριότητα ή να ταυτοποιήσει τα Τρυθ κύτταρα [12]. Η μελέτη των Wang *et al* προσπάθησε να καθορίσει τις συνέπειες της ενεργοποίησης των Τ κυττάρων στην έκφραση του FOXP3 και στην κατασταλτική ικανότητα των Τρυθ κυττάρων. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης δείχνουν ότι στους ανθρώπους, ο FOXP3 εκφράζεται σε αναπάντεχα υψηλά ποσοστά στα Τ ενεργοποιημένα κύτταρα μετά από *in vitro* διέγερση CD4+CD25- Τ κυττάρων σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες που αναφέρουν ότι λιγότερο από το 30% των CD4+CD25- Τ κυττάρων εκφράζουν FOXP3 μετά από ενεργοποίηση [βιβλιογραφίες]. Αυτή η διαφορά πιθανά σχετίζεται με το ερέθισμα δοθέντος ότι έχει αποδειχτεί ότι διέγερση με μονοκλωνικό αντι-CD3

αντίσωμα προσδεδεμένο σε πλάκα καλλιέργειας και εξωγενή IL-2 οδηγεί σε υψηλότερη έκφραση του FOXP3 από ότι η διέγερση με διαλυτό μονοκλωνικό αντι-CD3 αντίσωμα. Επίσης, φαίνεται ότι η έκφραση του FOXP3 στα ενεργοποιημένα T κύτταρα παρόλο που σχετίζεται με μειωμένη απόκριση σε ερεθίσματα (παραγωγή κυτταροκινών και πολλαπλασιασμός) είναι παροδική και δε συνδυάζεται απαραίτητα με κατασταλτικές ιδιότητες. Είναι επομένως πιθανό ο FOXP3 να δρα ως ένας μεταγραφικός καταστολέας των διαφόρων γονιδίων των ανοσολογικών απαντήσεων στα ανθρώπινα T κύτταρα παρά σαν ένα κύριο γονίδιο διακόπτης για την ανάπτυξη των Τρυθ κυττάρων. Από τα προαναφερθέντα επίσης φαίνεται ότι το προφίλ έκφρασης του FOXP3 διαφέρει ανάμεσα στους ανθρώπους και τα ποντίκια.

Μια άλλη ερευνητική ομάδα ανακάλυψε ότι στους ανθρώπους, όλα τα διαιρούμενα T δραστικά κύτταρα έχουν τη δυνατότητα να καθίστανται παροδικά θετικά στο FOXP3 και συμπέραναν ότι η χαμηλή έκφραση του FOXP3 είναι μια φυσιολογική συνέπεια της ενεργοποίησης των CD4+ T κυττάρων αλλά είναι ανεπαρκής για να καταστείλει την έκφραση γονιδίων στόχων του FOXP3 συμπεριλαμβανομένου του CD127, της IL-2 και της IFN- γ και δε σχετίζεται με επαγωγή του Τρυθ κυτταρικού φαινοτύπου [13]. Συνεπώς, ο FOXP3 φαίνεται να σχετίζεται αυστηρά με το μοναδικό φαινότυπο και λειτουργία των φυσικών Τρυθ κυττάρων μόνο όταν εκφράζεται συνεχώς σε υψηλά επίπεδα και εκφράζεται μόνο προσωρινά και σε χαμηλότερα επίπεδα στα ενεργοποιημένα T δραστικά κύτταρα.

Με βάση το πρόσφατο εύρημα ότι χαμηλή έκφραση του CD127 μορίου πιθανά να είναι ένας πιο ειδικός επιφανειακός κυτταρικός δείκτης για τα Τρυθ κύτταρα από το CD25, βρέθηκε ότι τα Τρυθ κύτταρα εκφράζουν χαμηλά ποσά CD127 ex vivo και τα επίπεδα παραμένουν χαμηλά κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης. Σε αντίθεση με τα Τρυθ κύτταρα, η έκφραση του CD127 μειωνόταν αμέσως μετά την ενεργοποίηση των T δραστικών κυττάρων και μετά επανεμφανιζόταν τόσο στα FOXP3- όσο και στα FOXP3+ κυτταρικά κλάσματα [13]. Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η επαγόμενη από ενεργοποίηση έκφραση του FOXP3 στα T δραστικά κύτταρα δεν είναι επαρκής για να καταστείλει την έκφραση του CD127, ενώ υψηλή και σταθερή/συνεχής έκφραση του FOXP3 στα φυσικά Τρυθ κύτταρα σχετίζεται με το χαρακτηριστικό CD127low φαινότυπο τους.

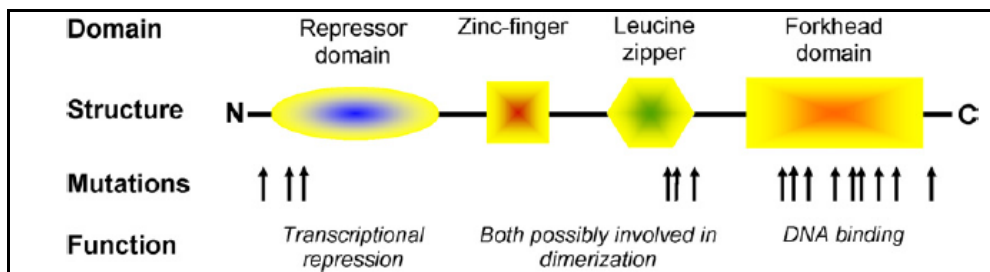
Συμπερασματικά, η άποψη ότι ο FOXP3 μεταγραφικός παράγοντας αποτελεί τον αποκλειστικό μοριακό διακόπτη της ανάπτυξης των φυσικών T ρυθμιστικών θα πρέπει να επανεξεταστεί και θα πρέπει επιπλέον να γίνουν περισσότερες μελέτες για να διευκρινιστεί αν ο FOXP3 διαδραματίζει θετικό ή/και αρνητικό ρόλο όσον αφορά την ενεργοποίηση των CD4+ T κυττάρων.

1.1.3.2 Δομή του FOXP3

Ο μεταγραφικός παράγοντας FOXP3 στον άνθρωπο είναι μια πρωτεΐνη 40 kDa μέλος της οικογένειας των Forkhead Box μεταγραφικών παραγόντων [14] (Εικόνα 5). Τα μέλη αυτής της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων είναι ταυτόχρονα μεταγραφικοί αναστολείς και ενεργοποιητές και έχουν τα εξής δομικά και λειτουργικά τμήματα:

- Στο καρβοξυ-τελικό άκρο, ένα forkhead (FKH) τμήμα, κρίσιμο για την πρόσδεση του DNA και την εντόπιση των παραγόντων αυτών στον πυρήνα.

- Ένα τμήμα leucine-zipper που ακολουθεί το FKH τμήμα.
- Στο αμινο-τελικό άκρο, ένα τμήμα καταστολής της μεταγραφικής δραστηριότητας
- Ένα C2H2 zinc-finger τμήμα που ακολουθεί το τμήμα της μεταγραφικής καταστολής.

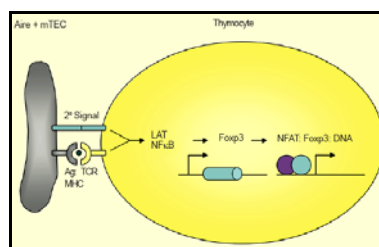


Εικόνα 5. Η δομή του FOXP3 μεταγραφικού παράγοντα

1.1.3.3 Λειτουργία του FOXP3

Ο FOXP3 εκφράζεται μετά από διέγερση του TCR και εντοπίζεται στον πυρήνα όπου προσδένεται στο DNA για να ρυθμίσει τη γονιδιακή έκφραση προσλαμβάνοντας ρόλο μεταγραφικού ρυθμιστή (Εικόνα 6). Ο FOXP3 μειώνει τη μεταγραφή του γονιδίου της IL-2 και της IL-4 και αυξάνει την έκφραση του CD25 και του CTLA-4.

Μελέτες έχουν δείξει ότι πολλά από τα γονίδια που ρυθμίζονται από τον FOXP3 είναι επίσης γονίδια-στόχοι και για τον NFAT μεταγραφικό παράγοντα [15]. Ο NFAT αυξάνει την έκφραση της IL-2, της IL-4, του CD25 και του CTLA-4. Αποδεικτικό στοιχείο της αλληλεπίδρασης του FOXP3 με τον NFAT είναι και το γεγονός ότι κοντά στα σημεία πρόσδεσης του NFAT στο DNA υποκινητών πολλών γονιδίων κυτταροκινών (IL-2, IL-4 και TNF) υπάρχουν και σημεία πρόσδεσης του FOXP3. Η FOXP3 πρωτεΐνη μπορεί να σχηματίσει συναγωνιστικό σύμπλοκο με τον NFAT στο DNA, δρώντας ως μεταγραφικός παράγοντας που καταστέλλει γονίδια που ενέχονται στην T κυτταρική ενεργοποίηση (IL-2, IL-4) και ενεργοποιεί άλλα γονίδια που ενέχονται στην επαγωγή της Τρυθ κυτταρικής σειράς και κατασταλτικής δραστηριότητας (CD25, CTLA-4).



Εικόνα 6. Έκφραση και τρόπος λειτουργίας του FOXP3 μεταγραφικού παράγοντα

Μελέτες που έγιναν σε μεταλλάξεις στη δομή του FOXP3 που διασπούν την επίδραση του με τον NFAT, έδειξαν μείωση της ικανότητας του

να καταστείλει την έκφραση της IL-2, του CTLA-4 και, σε μικρότερο βαθμό, του CD25, του CD103 και του GITR. Αυτές οι μεταλλάξεις προκαλούν βλάβη και στη λειτουργία του FOXP3 στα Τρυθ κύτταρα μειώνοντας την ικανότητα τους να προλαμβάνουν την αυτοανοσία [15]. Επομένως, φαίνεται από τα παραπάνω ότι ο μεταγραφικός ρόλος του FOXP3 πάνω στην ανάπτυξη κατασταλτικής δραστηριότητας εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ακεραιότητα αλληλεπίδρασης του με τον NFAT, συνιστώντας ένα μοντέλο αλληλεπίδρασης ανάμεσα στον NFAT, τον FOXP3 και το DNA.

1.1.3.4 Γονίδια-στόχοι του FOXP3

Παρόλο που υπάρχει πολλή πρόοδος στην ταυτοποίηση γονιδίων-στόχων του FOXP3, εντούτοις πολλά από αυτά δεν έχουν ακόμη προσδιοριστεί. Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο ανοσοκαθίζησης της χρωματίνης (Chromatin immune-precipitation, ChIP), βρέθηκε ότι οι υποκινητές 1 119 γονιδίων είναι άμεσοι στόχοι πρόσδεσης του FOXP3, συμπεριλαμβανομένων και των υποκινητών της IL-2, του CD25 και του GITR. Επιπλέον, οι στόχοι του FOXP3 φαίνεται να σχετίζονται με τη σηματοδότηση μέσω του TCR και την ενεργοποίηση των Τ δραστικών κυττάρων [16]. Στο ερώτημα αν η πρόσδεση του FOXP3 επηρεάζει την έκφραση αυτών των γονιδίων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των DNA μικροσυστοιχιών και βρέθηκε ότι στα μη διεγερμένα κύτταρα, η γονιδιακή έκφραση διέφερε ελάχιστα παρουσία ή απουσία του FOXP3 (μόνο 125 γονίδια παρουσίαζαν κάποια αλλαγή στην έκφραση). Εντούτοις, στα διεγερμένα κύτταρα, η πρόσδεση του FOXP3 σχετίστηκε με αύξηση της έκφρασης γονιδίων-στόχων που φυσιολογικά αυξάνονται κατά τη διάρκεια της διέγερσης του TCR. Συμπερασματικά, βρέθηκε ότι οι στόχοι πρόσδεσης του FOXP3 είναι κυρίως γονίδια που ενέχονται στην Τ κυτταρική ενεργοποίηση και πρόσδεση του FOXP3 στα γονίδια αυτά φαίνεται να μειώνει την έκφραση τους [16].

1.1.3.5 Μεταλλάξεις του γονιδίου του FOXP3

Μεταλλάξεις του γονιδίου του FOXP3 προκαλούν τόσο το συνδεδεμένο με το Χ χρωμόσωμα θανατηφόρο αυτοάνοσο σύνδρομο ανοσολογικής απορύθμισης, πολυενδοκρινεοπάθειας, εντεροπάθειας στον άνθρωπο (να γραφεί πλήρως η νόσος, IPEX) [17] όσο και μία ανάλογη νοσολογική οντότητα στα μεταλλαγμένα ποντίκια *scurfy* (*sf*) [18]. Και οι δύο παραλλαγές του συνδρόμου χαρακτηρίζονται από ανεπάρκεια της λειτουργίας των Τρυθ κυττάρων εξαιτίας δυσλειτουργίας του FOXP3, ρίχνοντας φως και τονίζοντας τη σημασία του FOXP3 στην ανάπτυξη των Τρυθ κυττάρων [19]. Αντίθετα από τα άλλα λειτουργικά τμήματα του FOXP3, δεν έχουν βρεθεί μεταλλάξεις στο C2H2 Zinc τμήμα στους ασθενείς με IPEX [19].

1.1.4 Μηχανισμοί καταστολής των Τρυθ κυττάρων

In vitro μελέτες έχουν δείξει ότι τα φυσικά Τρυθ κύτταρα καταστέλλουν την ενεργοποίηση ή/και τον πολλαπλασιασμό των CD4+ και των CD8+ Τ κυττάρων και την παραγωγή κυτταροκινών από τα κύτταρα αυτά ακόμα και σε απουσία των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (Antigen Presenting Cells, APCs). Τα φυσικά Τρυθ κύτταρα καταστέλλουν επίσης και τον

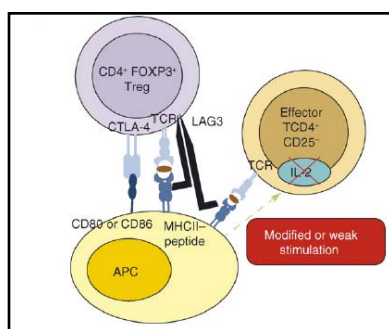
πολλαπλασιασμό των Β κυττάρων [20] και την παραγωγή ανοσοσφαιρινών [21]. Επιπλέον, αναστέλλουν τις κυτταροτοξικές ιδιότητες των ΝΚ κυττάρων και των ΝΚΤ κυττάρων [22, 23] καθώς και την λειτουργία και ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων. Επίσης, τα φυσικά Τρυθ κύτταρα αναστέλλουν όχι μόνο την ενεργοποίηση ή/και την επέκταση των άωρων Τ κυττάρων αλλά και τη λειτουργία των δραστικών Τ κυττάρων. Μπορούν ακόμα να καταστείλουν τη λειτουργία των Τ κυττάρων μνήμης παρόλο που ελέγχουν την ενεργοποίηση και την επέκταση των Τ δραστικών κυττάρων πολύ πιο αποτελεσματικά [24].

Η επαγωγή της κατασταλτικής δραστηριότητας των Τρυθ κυττάρων προϋποθέτει αντιγονική διέγερση μέσω του TCR ενώ η καταστολή που ασκείται από τα Τρυθ κύτταρα έχει βρεθεί μη αντιγονοειδική [21]. Επομένως, τα ενεργοποιημένα Τρυθ κύτταρα μπορούν να αναστείλουν ένα μεγάλο εύρος ανοσολογικών αποκρίσεων μέσω έμμεσης μη αντιγονοειδικής καταστολής. Πολλά μοριακά γεγονότα πρέπει να διευκρινιστούν για να κατανοηθεί πλήρως ο μηχανισμός με τον οποίο τα Τρυθ κύτταρα προκαλούν καταστολή στους διαφορετικούς τύπους κυττάρων και ανοσολογικών απαντήσεων.

Παρόλο που έχουν γίνει πολλές έρευνες για την διερεύνηση ύπαρξης ενός κύριου μηχανισμού δράσης των Τρυθ κυττάρων, εντούτοις φαίνεται ότι πρόκειται για δράση πολλών κατασταλτικών μηχανισμών ταυτόχρονα [25].

1.1.4.1 Επαφή κυττάρου με κύτταρο

Όπως φαίνεται από *in vitro* πειράματα, η καταστολή που ασκούν τα Τρυθ κύτταρα είναι εξαρτώμενη από την επαφή κυττάρου με κύτταρο (Εικόνα 7). Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι η καταστολή από τα Τρυθ κύτταρα καταργείται όταν τα Τρυθ και τα Τ δραστικά κύτταρα διαχωριστούν από μία ημιδιαπερατή μεμβράνη [23] και ότι βοηθητικά μόρια όπως το CTLA-4 και το LAG-3 καθώς και συνδιεγερτικά μόρια όπως το CD80 και το CD86 που εκφράζονται στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα συμμετέχουν σε αυτό το μηχανισμό καταστολής. Το CTLA-4 μόριο ασκεί την κατασταλτική δράση του μέσω ενός άμεσου και ενός έμμεσου μονοπατιού [26].



Εικόνα 7. Καταστολή εξαρτώμενη από την κυτταρική επαφή

1.1.4.2 Κυτταροκίνες

IL-10

Πολλές *in vitro* μελέτες έχουν δείξει η IL-10 είναι απαραίτητη στη διαμεσολάβηση της καταστολής. *In vivo* δεδομένα υποστηρίζουν ότι η IL-10 είναι απολύτως απαραίτητη για την καταστολή από τα Τρυθ κύτταρα [27].

TGF-β

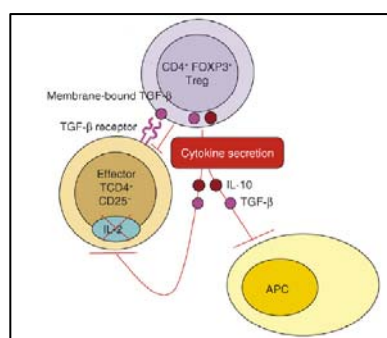
Ο TGF-β ανευρίσκεται πάνω στις μεμβράνες των Τρυθ κυττάρων ποντικών και ανθρώπων και πιστεύεται ότι διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην καταστολή που εξαρτάται από την κυτταρική επαφή [28].

IL-2

Υπάρχουν ισχυρά δεδομένα που υποστηρίζουν ότι η IL-2 είναι πολύ σημαντική για τη διατήρηση των Τρυθ κυττάρων στην περιφέρεια. Ο υποδοχέας της IL-2 εκφράζεται συνεχώς στα περισσότερα Τρυθ κύτταρα και στα ποντίκια με έλλειψη του, τα FOXP3⁺ T κύτταρα είναι πολύ μειωμένα [29, 30].

1.1.4.3 Κυτταροτοξικότητα

Ένας άλλος εξίσου σημαντικός μηχανισμός καταστολής είναι η κυτταροτοξικότητα (Εικόνα 8) που επιτυγχάνεται μέσω της περφορίνης που προκαλεί θάνατο στα T κύτταρα, στα μονοκύτταρα και στα δενδριτικά κύτταρα [31].



Εικόνα 8. Καταστολή εξαρτώμενη από τις κυτταροκίνες

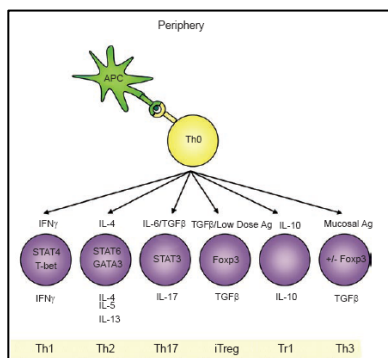
1.1.5 Επαγώμενα Τρυθ κύτταρα

Υπάρχουν στοιχεία που υποστηρίζουν ότι χαμηλά αντιγονικά σήματα μπορούν να μετατρέψουν τα CD4⁺CD25⁻FOXP3⁻ T κύτταρα σε FOXP3⁺ Τρυθ κύτταρα στην περιφέρεια [1]. Μετά την αντιγονική διέγερση, τα άωρα CD4⁺ T κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν σε διάφορους λειτουργικούς φαινοτύπους όπως Th1, Th2, Th17 και Τρυθ ανάλογα με το μικροπεριβάλλον των κυτταροκινών τη στιγμή της διαφοροποίησης και την έκφραση μεταγραφικών παραγόντων ειδικών για τις συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές (Εικόνα 9).

Έχουν αναφερθεί και άλλες υποκατηγορίες κυττάρων που φαίνεται να ανήκουν στην κατηγορία των επαγόμενων Τρυθ κυττάρων όπως είναι τα Tr1 κύτταρα τα οποία εκκρίνουν IL-10 και TGF-β, μόρια πολύ σημαντικά για την κατασταλτική τους δραστηριότητα, τα Th3 κύτταρα που βρίσκονται στις πλάκες του Peyer και εκκρίνουν TGF-β και τέλος κάποια CD8⁺ T κύτταρα με ρυθμιστική δραστηριότητα.

Τέλος, και άλλοι κυτταρικοί υποπληθυσμοί T κυττάρων, όπως τα NKT κύτταρα και τα CD4⁻CD8⁻ T κύτταρα [20, 22] έχουν κατασταλτική

δραστηριότητα. Όλοι οι παραπάνω κυτταρικοί πληθυσμοί, παρόλο που γενικά δεν εκφράζουν τον FOXP3 μεταγραφικό παράγοντα και δεν έχουν χαρακτηριστικούς δείκτες επιφανείας που επιτρέπουν την εκλεκτική ταυτοποίηση και απομόνωση τους, φαίνεται να αποτελούν μέλη της οικογένειας των κατασταλτικών κυττάρων κρίσιμα για την απόρριψη μοσχευμάτων [4].



Εικόνα 9. Επαγόμενα T ρυθμιστικά κύτταρα και άλλοι T κυτταρικοί υποπληθυσμοί

1.1.6 Τα Th17 κύτταρα και η σχέση τους με τα T ρυθμιστικά κύτταρα

Έχει αποδειχθεί σε πειραματικά μοντέλα ποντικών ότι τα CD4⁺ T βοηθητικά κύτταρα έχουν την ικανότητα διαφοροποίησης σε τουλάχιστον τέσσερις υποτύπους T βοηθητικών κυττάρων, τα Th1, Th2, Th17 και τα T_H3 κύτταρα. Στους ανθρώπους υπάρχουν ενδείξεις της ύπαρξης όλων των υποπληθυσμών των T βοηθητικών κυττάρων αν και δεν υπάρχει ειδικός δείκτης της ταυτοποίησης των Th17 κυττάρων εκτός από την παραγωγή IL-17 [32]. Η IL-17 είναι μια προφλεγμονώδης κυτταροκίνη που επίσης ενέχεται στην παθοφυσιολογία πολλών φλεγμονωδών νοσημάτων σε αντίθεση με τον προστατευτικό ρόλο που αντίστοιχα διαδραματίζουν τα T_H3 κύτταρα σε αυτές τις καταστάσεις. Τα Th17 κύτταρα, όπως και τα T_H3 κύτταρα, έχουν μελετηθεί σε πληθώρα αυτοάνοσων καταστάσεων όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, η πολλαπλή σκλήρυνση, ο αυτοάνοσος διαβήτης τύπου 1 και η απλαστική αναιμία. Υπάρχουν ευρήματα που προτείνουν ότι οι 2 αυτοί κυτταρικοί πληθυσμοί έχουν αμοιβαία αποκλειόμενη σχέση.

Κάποιες σχετικά πρόσφατες μελέτες διευκρίνησαν τους μηχανισμούς με τους οποίους τα άωρα T κύτταρα δεσμεύονται προς την Th17 κυτταρική σειρά. Σε μία από αυτές [33], παρουσία των T_H3 κυττάρων και των δενδριτικών κυττάρων σε φλεγμονώδες περιβάλλον (διέγερση με λιποπολυσακχαρίτες), τα άωρα CD4⁺ T κύτταρα δεσμεύονται προς την Th17 κυτταρική σειρά μέσω της επίδρασης του TGFβ που παράγεται από τα T_H3 κύτταρα και της IL-6 που παράγεται από τα δενδριτικά κύτταρα.

Τα δεδομένα αυτά επιτεβαιώθηκαν από μία άλλη ερευνητική εργασία [34] όπου ενεργοποίηση άωρων προγονικών κυττάρων χρησιμοποιώντας το αντι-CD3 αντίσωμα παρουσία του TGF-β οδηγούσε σε παραγωγή FOXP3⁺ T_H3 κυττάρων, ενώ ενεργοποίηση παρουσία της IL-6 και του TGF-β ανέστειλε την παραγωγή των T_H3 κυττάρων και προώθησε την επέκταση των Th17 κυττάρων. Τα διαφοροποιημένα κύτταρα είχαν αντίστοιχα κατασταλτικές και φλεγμονώδεις ιδιότητες. Μια τελευταία μελέτη [35], απέδειξε

τη αμοιβαία αποκλειόμενη σχέση μεταξύ Τρυθ και Th17 κυττάρων καθώς IL-6 μαζί με TGF-β οδηγούσε σε απώλεια των FOXP3+ κυττάρων ενώ αναστολή της IL-6 αυξάνει τον Τρυθ κυτταρικό πληθυσμό. Παρόλα αυτά, αξίζει να σημειωθεί ότι αυτά τα αποτελέσματα αφορούν σε πειραματικά μοντέλα ποντικών και ότι στους ανθρώπους δεν έχει αποδειχθεί η σχέση αυτή.

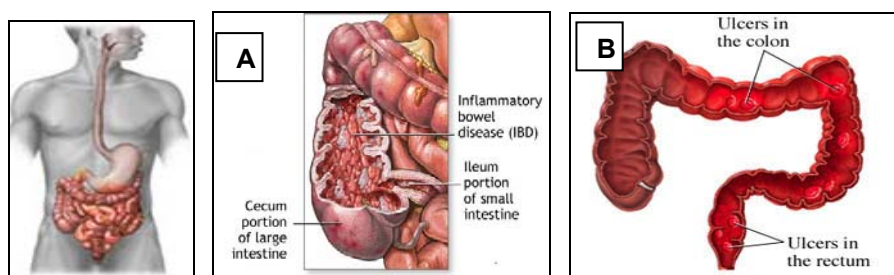
Από όλα τα παραπάνω έχει προκύψει η υπόθεση [36] ότι επάγοντας το φαινότυπο των Th17 κυττάρων καταστέλεται η παραγωγή Τρυθ κυττάρων με αποτέλεσμα την ανάπτυξη και προοδευτική επιδείνωση των φλεγμονωδών διεργασιών των αυτοάνοσων νοσημάτων στους ανθρώπους ενώ αναστολή κυτταροκινών κρίσιμων για τη δέσμευση προς τον Th17 φαινότυπο όπως η IL-6 οδηγεί στην ανάπτυξη του Τρυθ κυτταρικού φαινότυπου και στην ύφεση αυτοάνοσων καταστάσεων.

1.2 Τα Τρυθ κύτταρα και τα αυτοάνοσα νοσήματα

Τα Τρυθ κύτταρα έχει βρεθεί ότι ενέχονται στην παθοφυσιολογία πολλών αυτοάνοσων νοσημάτων :

1.2.1 Νόσος του Crohn και ελκώδης κολίτιδα

Στη νόσο του Crohn [37] και την ελκώδη κολίτιδα [38] (Εικόνα 10) παρατηρείται αύξηση των CD4+FOXP3+ T κυττάρων στους βλεννογόνους του εντέρου, στους μεσεντέριους λεμφαδένες και σε περιοχές όπου υπάρχει φλεγμονή. Αντίθετα, στην ενεργή νόσο, τα Τρυθ κύτταρα είναι μειωμένα στο περιφερικό αίμα των ασθενών σε σχέση με υγιείς μάρτυρες. Τα CD4+CD25+ T κύτταρα των μεσεντέριων λεμφαδένων εξακολουθούν να διατηρούν την κατασταλτική τους δραστηριότητα ex vivo για αυτό και πιστεύεται ότι μειώνεται η κατασταλτική τους δραστηριότητα σε in vivo συνθήκες.

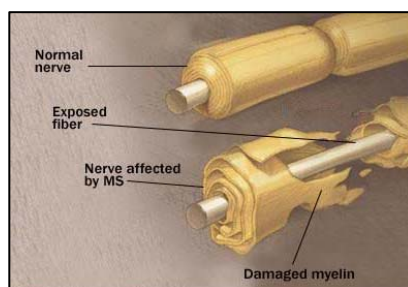


Εικόνα 10. Σημεία προσβολής του εντέρου **A.** νόσος του Crohn και **B.** ελκώδης κολίτιδα

1.2.2 Πολλαπλή σκλήρυνση

Η πολλαπλή σκλήρυνση (Εικόνα 11), μια χρόνια φλεγμονώδης νόσος του κεντρικού νευρικού συστήματος, στην οποία πιστεύεται ότι T κύτταρα ειδικά κατά της μυελίνης αποτελούν τα αρχικά δραστικά κύτταρα της νόσου [39]. Αρχικές μελέτες που αφορούσαν τα Τρυθ κύτταρα ανέφεραν δυσλειτουργία των κυττάρων αυτών στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες [40]. Περαιτέρω μελέτες που χώριζαν τους ασθενείς ανάλογα με τη φάση της νόσου έδειξαν ότι δεν υπήρχαν φαινοτυπικές ή ποσοτικές διαφορές στον πληθυσμό των CD4+CD25+ Τρυθ κυττάρων στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς [41]. Παρόλα αυτά, τα Τρυθ κύτταρα ασθενών με την

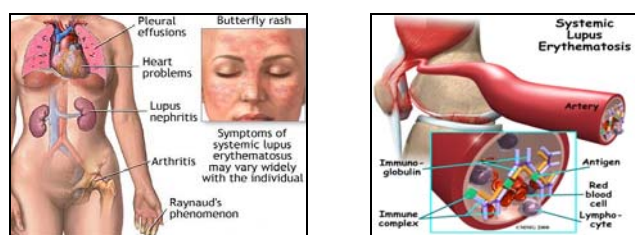
υποτροπιάζουσα μορφή της νόσου παρουσιάζουν μειωμένη κατασταλτική δραστηριότητα και μειωμένη έκφραση FOXP3 mRNA σε σχέση με τα Τρυθ κύτταρα των ασθενών με το δευτεροπαθή προοδευτικό τύπο της νόσου. Νεότερα δεδομένα έχουν δείξει ότι τα CD4+CD25hiFOXP3+ Τ κύτταρα είναι μειωμένα σε αριθμό και η έκφραση του FOXP3 μεταγραφικού παράγοντα είναι ελαττωμένη στους ασθενείς με την υποτροπιάζουσα μορφή της νόσου σε σχέση με τους ασθενείς με την προοδευτική μορφή και τους υγιείς μάρτυρες [42].



Εικόνα 11. Καταστροφή της μυελίνης των νευρικών κυττάρων στην πολλαπλή σκλήρυνση

1.2.3 Συστηματικός ερυθηματώδης λύκος

Στον **Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο** (Εικόνα 12) έχει αποδειχτεί ότι τα CD4+CD25+ Τ και τα CD4+CD25+CTLA4+FOXP3+ Τ κύτταρα είναι μειωμένα στους νοσηλοποιηθέντες ασθενείς που δεν έχουν λάβει θεραπεία σε σχέση με τους ασθενείς που έχουν πάρει αγωγή με κυτταροστατικά και στεροειδή ενώ η έκφραση του FOXP3 είναι εξίσου μειωμένη και στις δύο ομάδες αρρώστων [43]. Έχει, επίσης, βρεθεί σημαντική έκπτωση της λειτουργικότητας των Τρυθ κυττάρων στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες (Εικόνα 37) [43]. Πιο συγκεκριμένα, τα Τρυθ κύτταρα από ασθενείς με ΣΕΛ έχουν μειωμένη ικανότητα αναστολής του πολλαπλασιασμού και έκκρισης κυτταροκινών από CD4+ Τ δραστικών κυττάρων και έχουν, επίσης, μειωμένη έκφραση του FOXP3 γονιδίου.

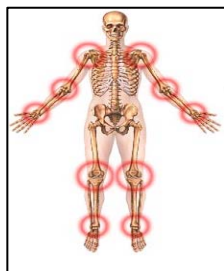


Εικόνα 12. Σημεία προσβολής στο συστηματικό ερυθηματώδη λύκο

1.2.4 Ρευματοειδής αρθρίτιδα

Η **Ρευματοειδής Αρθρίτιδα** (Εικόνα 13), αποτελεί μία άλλη αυτοάνοση ρευματολογική ασθένεια, στην οποία βρέθηκε ελαττωμένη η έκφραση του FOXP3 και η ικανότητα των CD4+CD25high Τρυθ κυττάρων να καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των CD4+ Τ δραστικών κυττάρων [44]. Επίσης βρέθηκε ότι θεραπεία με αντι-TNF παράγοντα αποκαθιστά τη λειτουργία των Τρυθ κυττάρων και την έκφραση του FOXP3 γονιδίου. Μια άλλη μελέτη έδειξε για

πρώτη φορά, την ικανότητα αυτόλογων Τρυθ κυττάρων να ελέγχουν τη φλεγμονή σε κυτταρικές καλλιέργειες αρθρικού ιστού ex vivo [45].



Εικόνα 13. Η συμμετρική προσβολή των αρθρώσεων στη ρευματοειδή αρθρίτιδα

1.2.5 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1

Στον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 βρέθηκε αρχικά μειωμένος αριθμός των CD4+CD25+ Τρυθ κυττάρων [46, 47] ενώ επόμενες μελέτες απέτυχαν να αναπαράγουν αυτά τα δεδομένα [48] και άλλες απέδωσαν τη διαφορά σε ηλικιακές διαφορές [49]. Εντούτοις, όλες οι παραπάνω μελέτες έγιναν υπολογίζοντας όλα τα CD25+ Τ κύτταρα ως ρυθμιστικά, υπερεκτιμώντας με αυτό τον τρόπο, τον αριθμό των Τρυθ κυττάρων. Σε μία μεταγενέστερη μελέτη βρέθηκε ότι δεν διαφέρουν οι αριθμοί των FOXP3+ Τ κυττάρων μεταξύ ασθενών και υγιών αλλά ότι τα CD4+CD25+FOXP3- Τ κύτταρα αυξάνονται ενώ τα CD4+CD25+FOXP3+ μειώνονται με την ηλικία [50], εύρημα που αποδόθηκε σε μειωμένη έξοδο των κυττάρων από το θύμο ή/και σε συσσώρευση των αντιγονικών εκθέσεων. Τέλος, τα πιο πρόσφατα δεδομένα με βάση την έκφραση του CD127 μορίου επιφανείας ως δείκτη για τα Τρυθ κύτταρα έδειξαν ότι τα CD4+CD25+CD127lowFOXP3+ Τ κύτταρα δεν διαφέρουν μεταξύ ασθενών όσο και των υγιών [9].

1.2.6 Απλαστική αναιμία

Η απλαστική αναιμία είναι μια σπάνια αιματολογική ασθένεια με ανοσολογικό χαρακτήρα, όπου ενεργοποίηση και πολλαπλασιασμός των Τ δραστικών κυττάρων με συνοδό αύξηση των αποπτωτικών παραγόντων Fas-FasL οδηγεί σε πρόωρο θάνατο των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων [51]. Σε μια πολύ πρόσφατη μελέτη [52], βρέθηκε μειωμένος αριθμός των Τρυθ κυττάρων και μειωμένη έκφραση τόσο του FOXP3 όσο και του NFAT μεταγραφικού παράγοντα. Επιπλέον, μειωμένη έκφραση του NFAT με siRNA έχει ως αποτέλεσμα ταυτόχρονη μείωση του FOXP3 γονιδίου δείχνοντας τη σχέση ανάμεσα στους δύο μεταγραφικούς παράγοντες.

2. ΧΡΟΝΙΑ ΙΔΙΟΠΑΘΗΣ ΟΥΔΕΤΕΡΟΠΕΝΙΑ ΚΑΙ ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

2.1 Χρόνια ιδιοπαθής ουδετεροπενία

Ως Χρόνια Ιδιοπαθής Ουδετεροπενία (chronic idiopathic neutropenia, CIN) ορίζεται η επίμονη και ανεξήγητη ελάττωση στον απόλυτο αριθμό των ουδετερόφιλων πολυμορφοκυττάρων κάτω από το φυσιολογικό όριο για ένα δεδομένο πληθυσμό [53]. Είναι επίκτητο νόσημα, με ήπιο ή μέτριο φαινότυπο, κυρίως προσβάλλει γυναίκες και υπάρχει γενετική προδιάθεση που σχετίζεται με το HLA-DRB1*1302 [54].

Εκτεταμένη έρευνα για τη CIN έχει πραγματοποιηθεί στο Εργαστήριο Αιματολογίας της Ιατρικής Σχολής Κρήτης. Τα διαγνωστικά κριτήρια που έχουν τεθεί για τη νόσο [55] είναι τα εξής:

- Απόλυτος αριθμός ουδετερόφιλων ΠΜΠ < 1800/μl στους Καυκάσιους και <1500/μl στους Αφρικανούς για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των 3 μηνών
- Απουσία κλινικών, ορολογικών ή υπερηχογραφικών ευρημάτων άλλης νόσου που σχετίζεται με την ανεύρεση της ουδετεροπενίας
- Ιστορικό μη έκθεσης σε ακτινοβολία, χρήσης χημικών ουσιών/σκευασμάτων ή λήψης φαρμάκων στα οποία μπορεί να αποδοθεί η ουδετεροπενία
- Φυσιολογικός καρυότυπος μυελού των οστών
- Αρνητικές δοκιμασίες ανεύρεσης αντιπολυμορφοκυτταρικών αντισωμάτων στον ορό

Όσον αφορά την κλινική σημειολογία, στους ασθενείς με CIN , παρατηρείται χαμηλή συχνότητα λοιμώξεων που σχετίζεται με τη σοβαρότητα της ουδετεροπενίας ενώ τα μειωμένα ποσά IgG3 δε φαίνεται να σχετίζονται με αυξημένη επίπτωση λοιμώξεων [56, 57]. Οι πιο συχνές λοιμώξεις που παρουσιάζουν οι ασθενείς αυτοί αφορούν σε δερματικές και αναπνευστικές λοιμώξεις. Εντούτοις, οι ασθενείς αυτοί παρουσιάζουν αυξημένη απώλεια οστικής μάζας, οστεοπενία σε ποσοστό 44.4% και οστεοπόρωση σε ποσοστό 15.6% [58]. Η οστική πυκνότητα είναι αντιστρόφως ανάλογη με τα ποσά του TNFα και της IL-1β στον ορό των ασθενών προτείνοντας ότι η απώλεια οστικής μάζας οφείλεται σε χρόνια φλεγμονώδη διεργασία. Σπάνια, κάποιοι από τους ασθενείς με CIN παρουσιάζουν εξέλιξη σε οξεία μυελογενή λευχαιμία [59-62].

Όσον αφορά τα εργαστηριακά ευρήματα, εκτός από την ουδετεροπενία, οι ασθενείς με τη νόσο αυτή μπορεί να παρουσιάσουν ήπια αναιμία σε ποσοστό 14.2% [63] που παθοφυσιολογικά σχετίζεται με την αναιμία χρόνιας νόσου αν και υπάρχουν ενδείξεις και για μείωση των υποδοχέων ερυθροποιητίνης λόγω της αυξημένης παραγωγής TNFα [63], ήπια θρομβοκυτταροπενία που έχει συσχετισθεί με τα αυξημένα ποσά TGFβ1 [64], χαμηλούς αριθμούς μονοκυττάρων και λεμφοπενία που έχει αποδοθεί σε εξαγγείωση λόγω ενεργοποίησης των ενδοθηλιακών κυττάρων από τον TNFα [65]. Στην εξέταση επιχρισμάτων του μυελού των οστών βρίσκεται χαμηλός ο λόγος πολλαπλασθέντων/ ώριμων κοκκιοκυττάρων στους ασθενείς σε σχέση με υγιείς μάρτυρες.

Σαν κύριος παθογενετικός μηχανισμός στη CIN θεωρείται βλάβη στη δημιουργία και ανάπτυξη των κοκκιοκυτταρικών προβαθμίδων στο μυελό των οστών [66, 67] και/ή αυξημένη εξαγγείωση τους [68]. Πιστεύεται ότι υπάρχει φλεγμονή στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών όπου συσσωρεύονται ενεργοποιημένα T κύτταρα και αποπτωτικοί διαμεσολαβητές με αποτέλεσμα να οδηγούν σε πρόωρο θάνατο τις κοκκιοκυτταρικές προβαθμίδες. Πιο συγκεκριμένα, πολυκλωνικά ή ολιγοκλωνικά T μυελοκατασταλτικά λεμφοκύτταρα που παράγουν IFN- γ και FasL έχουν βρεθεί σε ασθενείς με χρόνια ιδιοπαθή ουδετεροπενία. Επιπλέον, αυξημένη παραγωγή αναστολέων της αιμοποίησης, όπως ο IFN γ και ο TGF β 1 και μειωμένα επίπεδα της IL-10 διαταράσσουν και πάλι την ισορροπία ανάμεσα στην απόπτωση έναντι της επιβίωσης των αιμοποιητικών προγόνων, συμβάλλοντας σε αυξημένη και ταχεία απόπτωση των προγονικών προβαθμίδων των κοκκιοκυττάρων [69, 70].

Η CIN φαίνεται να έχει κοινό παθογενετικό μηχανισμό με τα υπόλοιπα επίκτητα σύνδρομα μυελικής ανεπάρκειας και πιθανά να αντιπροσωπεύει την πιο ήπια μορφή μιας ομάδας νοσημάτων στα οποία συμπεριλαμβάνονται η λευχαμία από λεμφοκύτταρα με μεγάλα κοκκία (Large Granular Lymphocyte leukemia), η απλαστική αναιμία και τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα και τα οποία χαρακτηρίζονται από καταστολή της αιμοποίησης από T κύτταρα και κυτταροκίνες.

2.2 Σκοπός της μελέτης

Δεν υπάρχει στη βιβλιογραφία καμία μελέτη μέχρι σήμερα που να αναφέρεται στον ρόλο των T $\gamma\delta$ κυττάρων στην CIN. Θα μπορούσε, ωστόσο, η φλεγμονώδης διεργασία στον μυελό των οστών των ασθενών καθώς και η παρουσία των διεγερμένων μυελοκατασταλτικών T κυττάρων να οφείλεται σε ποσοτικές διαταραχές των T $\gamma\delta$ κυττάρων στο αίμα ή/και στον μυελό των οστών ή/και σε ποιοτικές διαταραχές αυτών με την έννοια της αδυναμίας καταστολής της διεγερσιμότητας των T λεμφοκυττάρων των ασθενών. Οι ενδεχόμενες ανωμαλίες θα μπορούσαν να οφείλονται σε διαταραχή της σχέσης T $\gamma\delta$ και Th17 κυττάρων. Συγκεκριμένα, η υπερπαραγωγή IL-6 στον μυελό των οστών των ασθενών με CIN να οδηγεί σε εκτροπή της διαφοροποίησης προς τα Th17 κύτταρα με αντίστοιχη μείωση των T $\gamma\delta$ κυττάρων. Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση του αριθμού και των ποιοτικών χαρακτηριστικών των T $\gamma\delta$ κυττάρων στο αίμα και των μυελό των ασθενών με CIN καθώς και η σχέση αυτών με τα Th17 κύτταρα με την προοπτική να απαντηθούν όλα τα παραπάνω ερωτήματα.

3. ΑΣΘΕΝΕΙΣ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Δείγματα Ασθενών

3.1.1 Περιφερικό αίμα και μυελός των οστών

Τα βιολογικά δείγματα ασθενών προήλθαν από 50 ασθενείς με Χρόνια Ιδιοπαθή Ουδετεροπενία οι οποίοι παρακολουθούνται σε εξάμηνη βάση στα εξωτερικά ιατρεία της Αιματολογικής κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου κατόπιν προφορικής ή γραπτής συγκατάθεσης. Τα δείγματα ελέγχου προήλθαν από υγιείς εθελοντές αιμοδότες και παραχωρήθηκαν στο εργαστήριο από το τμήμα εθελοντικής αιμοδοσίας του ίδιου νοσοκομείου.

Πιο συγκεκριμένα έγινε λήψη 4ml περιφερικού αίματος από 50 ασθενείς και 20 υγιείς μάρτυρες και λήψη 5ml μυελού των οστών (αραιωμένου 1:1 με θρεπτικό υλικό IMDM 340) από 7 από αυτούς τους ασθενείς. Τα δείγματα αίματος και μυελού των οστών επεξεργάζονταν εντός 24 ωρών από τη στιγμή της λήψης τους.

Όλοι οι ασθενείς πληρούσαν τα κριτήρια για τη διάγνωση της Χρόνιας Ιδιοπαθούς Ουδετεροπενίας. Όλοι οι υγιείς μάρτυρες είχαν φυσιολογικό αριθμό ουδετερόφιλων πολυμορφοκυττάρων.

3.2 Υλικά και Μέθοδοι

3.2.1 Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος και του μυελού των οστών

Υλικά και Συσκευές

Ficoll-Paque (Stem Cell Technologies)

Ρυθμιστικό διάλυμα κυτταρομετρίας (Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών-PBS 1I+ 5% Horse Serum + Sodium Azide)

Πλάκα αιμοκυτταρόμετρου (Neubauer)

Μικροσκόπιο ορατού φωτός

Χρωστική Trypan Blue

Μέθοδος

Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων

Περιφερικά μονοπύρηννα κύτταρα (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) ή μονοπύρηννα κύτταρα μυελού των οστών (bone marrow mononuclear cells, BMMCs) απομονώνονται με φυγοκέντρηση κλίσης (gradient centrifugation) μετά από επιστίβαση του ηπαρινισμένου δείγματος αίματος ή μυελού των οστών σε φικόλη. Συγκεκριμένα, γίνεται επιστίβαση 4ml περιφερικού αίματος ή μυελού των οστών σε 3ml φικόλης μέσα σε αποστειρωμένο σωληνάριο (falcon tube) χωρητικότητας 15ml και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1700 στροφές/ λεπτό για 30 λεπτά χωρίς φρένο σε θερμοκρασία ~20°C. Εν συνεχεία, γίνεται συλλογή της κυτταρικής μεσόφασης με τη χρήση πιπέτας Pasteur ξανά σε σωληνάριο χωρητικότητας 15ml και ακολουθεί πλύσιμο των κυττάρων με προσθήκη ~5 όγκων ρυθμιστικού διαλύματος κυτταρομετρίας και φυγοκέντρηση στις 1680 στροφές/ λεπτό για 5

λεπτά με φρένο σε θερμοκρασία ~20°C. Μετά από απόρριψη του υπερκειμένου, γίνεται επαναδιάλυση της κυτταρικής πελέτας σε ~2ml ρυθμιστικού διαλύματος κυτταρομετρίας για τους ασθενείς και ~5ml ρυθμιστικού διαλύματος κυτταρομετρίας για τους υγιείς μάρτυρες (λόγω του αναμενόμενου μεγαλύτερου αριθμού μονοπύρηνων κυττάρων σε σχέση με τους ασθενείς). Ακολουθεί μέτρηση των κυττάρων σε πλάκα αιμοκυτταρόμετρου (Neubauer) με ανάμιξη ίσων όγκων κυτταρικού εναιωρήματος και χρωστικής Trypan Blue (συνήθως 10-15μl) και καταμέτρηση των κυττάρων σε μικροσκόπιο ορατού φωτός.

3.2.2 Κυτταρομετρία Ροής

Μονοκλωνικά αντισώματα και συσκευή κυτταρομετρίας ροής

Anti-human

- FOXP3-FITC (Clone PCH101, eBioscience),
- CD4-PC5 (Beckman Coulter)
- CD25-PE (Beckman Coulter)

Χρησιμοποιήθηκε σετ χρώσης του FOXP3 (FOXP3 Staining Kit, eBioscience) που περιείχε διαλύτη και συμπυκνωμένο διάλυμα κυτταρικής διαπερατότητας καθώς και ρυθμιστικό διάλυμα για το πλύσιμο των κυττάρων και έκπλυση της περίσσειας του αντισώματος.

Μονοκλωνικά αντισώματα ελέγχου:

- Rat anti-human IgG2a-FITC isotype control (Clone eBR2α, eBioscience)
- Mouse anti-human IgG1-PE isotype control (Beckman Coulter)

Παραφορμαδεύδη 2% (PFA)

Κυτταρομετρητής ροής Epics Elite Model flow cytometer (Coulter)

Μέθοδος

Αρχές της μεθόδου

Η κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιείται για την ανάλυση φαινοτυπικών ιδιοτήτων κυττάρων που έχουν κοινά χαρακτηριστικά όπως το μέγεθος, ο όγκος, η κοκκίωση, το pH και το ηλεκτρικό τους δυναμικό. Η λειτουργία του κυτταρομετρητή βασίζεται στην αρχή ότι τα κύτταρα που είναι συνδεδεμένα με ένα φθορίζον μόριο, διερχόμενα μέσα από μία δέσμη ακτινών laser, προκαλούν λόγω της διέγερσης και αποδιέγερσης των ηλεκτρονίων τους, σκεδασμό φωτός και εκπομπή φωτονίων σε διάφορα μήκη κύματος. Τα φωτόνια διέρχονται από ένα ειδικό δίχτυο κατόπτρων και φίλτρων σε μια ομάδα φωτοανιχνευτών που μετατρέπουν τα φωτεινά σήματα σε ηλεκτρικές ώσεις οι οποίες έχουν ένταση ανάλογη της έντασης των φωτεινών σημάτων που φθάνουν σε αυτούς. Τα ηλεκτρικά σήματα προσλαμβάνονται, καταγράφονται και αναλύονται από ειδικό λογισμικό στον ηλεκτρονικό υπολογιστή. Η κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιείται κυρίως για την ταυτοποίηση επιφανειακών δεικτών ή ενδοκυττάρων πρωτεϊνών για αναγνώριση διαφόρων κυτταρικών υποτύπων σε φυσιολογικές, παθολογικές

και πειραματικές συνθήκες. Γίνεται χρώση των μορίων και πρωτεϊνών από μονοκλωνικά αντισώματα ειδικά για τις πρωτεΐνες αυτές που είναι συζευγμένα με κάποιο χρωμοφόρο. Αφού τα κύτταρα επωαστούν στους 4°C για 20-30 λεπτά και πλυθούν με το ρυθμιστικό διάλυμα κυτταρομετρίας ροής, ακολουθεί μονιμοποίηση των κυττάρων με παραφορμαλδεΐδη και μέτρηση τους στον κυτταρομετρητή ροής

Πειραματική διαδικασία

Στην παρούσα μελέτη έγινε άμεση φαινοτυπική ανάλυση των ακόλουθων κυτταρικών υποπληθυσμών:

- CD4+ κύτταρα: T βοηθητικά λεμφοκύτταρα
- CD4+CD25+: T κύτταρα με θετικότητα στο CD25 μόριο (φθορισμός $>1 \times 10^1$)
- CD4+CD25^{high}: T ρυθμιστικά κύτταρα (φθορισμός χρωστικής $> 2 \times 10^1$)
- CD4+CD25^{hi}FOXP3+: T ρυθμιστικά κύτταρα με έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα FOXP3

Μετά από συλλογή, πλύσιμο και μέτρηση των PBMCs και των BMMCs, 1×10^6 κύτταρα επωάζονται για 30 λεπτά με μονοκλωνικά αντισώματα για τους επιφανειακούς δείχτες CD4-PC5 (Φικοερυθρίνη-Cy5) και CD25-PE (Φικοερυθρίνη). Ταυτόχρονα γίνεται και αντίστοιχη επώαση με κατάλληλα ισοτυπικά αντισώματα ελέγχου του ίδιου χρώματος και υποτάξης με το προς μελέτη αντίσωμα χωρίς ειδικότητα για κάποια από τις κυτταρικές πρωτεΐνες προκειμένου από τις αναλύσεις να αφαιρεθούν τα κύτταρα που δεσμεύουν τα αντισώματα με μη ειδικό τρόπο. Ακολουθεί πλύσιμο των κυττάρων για να εκπλυθεί η περίσσεια του αντισώματος και να αποφευχθεί η μη ειδική πρόσδεση του. Για τη μελέτη του ενδοκυττάριου μορίου FOXP3 προκαλείται διάτρηση της μεμβράνης των κυττάρων με το διάλυμα κυτταρικής διαπερατότητας που παρέχει το σετ χρώσης για τον FOXP3. Για την παρασκευή του χρησιμοποιείται 1ml συμπυκνωμένου διαλύματος κυτταρικής διαπερατότητας και 3ml διαλύτη που παρέχει ο κατασκευαστής για κάθε 1×10^6 κύτταρα. Τα κύτταρα επωάζονται με το διάλυμα κυτταρικής διαπερατότητας για 30-60 λεπτά στους 4°C. Μετά από μία πλύση με το ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει το σετ ακολουθεί προσθήκη του μονοκλωνικού αντισώματος έναντι του FOXP3 και επώαση για μισή ώρα στους 4°C. Τέλος, γίνεται μονιμοποίηση των κυττάρων με 100μl PFA 2%. Τα δείγματα μεταφέρονται για ανάλυση στον κυτταρομετρητή. Η επεξεργασία των δεδομένων γίνεται στο πρόγραμμα WinMDI 2.8.

3.2.3 Μέθοδος ανοσομαγνητικού διαχωρισμού CD4+CD25+ T ρυθμιστικών κυττάρων

Υλικά και συσκευές

- Σετ ανοσομαγνητικού διαχωρισμού για την απομόνωση των CD4+CD25+ T ρυθ κυττάρων (CD4+CD25+ T regulatory cell isolation kit, Miltenyi Biotec) που περιείχε:
- Μείγμα μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι ανθρώπινων μορίων επιφανείας CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCRγ/δ, και γλυκοφορίνης A και συζευγμένων με βιοτίνη, Miltenyi Biotec)
- Μαγνητικά μικροσφαιρίδια με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της βιοτίνης

- Μαγνητικά μικροσφαιρίδια με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του CD25 μορίου επιφανείας.
- Επίσης για το διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκαν:
 - LS στήλες μαγνητικού διαχωρισμού (Miltenyi Biotec)
 - MS στήλες μαγνητικού διαχωρισμού (Miltenyi Biotec)
 - Συσκευή μαγνητικού κυτταρικού διαχωρισμού MACS, (Miltenyi Biotec)
 - Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσεων Mini MACS (PBS/5% BSA/4% H₂CO₃/10% ACD)

Μέθοδος

Για την απομόνωση των CD4+CD25+ T κυττάρων χρησιμοποιείται αρχικά η μέθοδος του αρνητικού μαγνητικού διαχωρισμού για απαλοιφή όλων των κυτταρικών υποπληθυσμών των μονοπύρηνων κυττάρων εκτός από τα CD4+ κύτταρα και ακολουθεί θετικός μαγνητικός διαχωρισμός των CD4+CD25+ T κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, το εναιώρημα των περιφερικών μονοπυρήνων κυττάρων με συγκέντρωση 10⁷ κύτταρα/ml επωάζεται για 15 λεπτά με μείγμα μονοκλωνικών αντισωμάτων συζευγμένων με βιοτίνη έναντι των δεικτών επιφανείας όλων των κυτταρικών πληθυσμών εκτός των CD4+ κυττάρων και συγκεκριμένα έναντι των CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCRγ/δ, και γλυκοφορίνης A έναντι των ερυθροκυττάρων. Ακολουθεί πλύσιμο των κυττάρων με το διάλυμα Mini MACS στους 4-8°C και στη συνέχεια επώαση με μαγνητικά μικροσφαιρίδια με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της βιοτίνης για άλλα 15 λεπτά. Μετά από πλύσιμο των κυττάρων γίνεται επαναδιάλυση της κυτταρικής πελέτας σε 500μl διαλύματος Mini MACS και το κυτταρικό εναιώρημα διέρχεται από στήλη LS μαγνητικού διαχωρισμού κατάλληλα τοποθετημένη στο σύστημα μαγνητικού κυτταρικού διαχωρισμού MACS. Συλλέγονται τα κύτταρα που δεν προσδέθηκαν με κανένα αντίσωμα δηλαδή τα CD4+ τα οποία διέρχονται της στήλης. Ακολουθεί πλύσιμο των κυττάρων, επαναδιάλυση της κυτταρικής πελέτας και επώαση για 15 λεπτά με μαγνητικά μικροσφαιρίδια προσδεδεμένα με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του CD25 μορίου. Μετά από πλύσιμο και επαναδιάλυση της πελέτας πάλι σε 500μl διαλύματος Mini MACS ακολουθεί θετικός διαχωρισμός των CD4+CD25+ T κυττάρων. Συγκεκριμένα, τοποθετείται στο σύστημα μαγνητικού διαχωρισμού μία MS στήλη μαγνητικού διαχωρισμού και αφού το κυτταρικό εναιώρημα των CD4+CD25- T κυττάρων διέρχεται της μαγνητικής στήλης και τα CD4+CD25+ T κύτταρα παραμένουν προσδεδεμένα στη μαγνητική στήλη, η στήλη αφαιρείται από το μαγνητικό πεδίο και γίνεται έκπλυση της με 1ml διαλύματος Mini MACS. Για αύξηση της καθαρότητας των CD4+CD25+ T κυττάρων, τα εκλουόμενα κύτταρα εμπλουτίζονται επαναλαμβάνοντας τη διαδικασία του θετικού διαχωρισμού με μια δεύτερη MS μαγνητική στήλη. Μετά τη συλλογή των κυττάρων γίνεται καταμέτρηση τους με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer. Η καθαρότητα του εναιωρήματος για CD4+CD25+ T κύτταρα ελέγχεται με κυτταρομετρία ροής.

3.2.4 Κυτταρικές καλλιέργειες

Συσκευές και υλικά

- Πλάκες κυτταρικής καλλιέργειας με 96 μικροβοθρία κυκλικού πυθμένα (96 round bottom well plates)
- Cell trace CFSE cell proliferation kit 2μM (Invitrogen)

- Μονοκλωνικό αντίσωμα αCD3 κατά του CD3 μορίου επιφανείας στον άνθρωπο (Clone OKT3, eBioscience)
- Μονοκλωνικό αντίσωμα αCD28 κατά του CD28 συνδεδεγμένου μορίου των T κυττάρων στον άνθρωπο (BD Biosciences Pharmingen)
- Εμπλουτισμένο RPMI θρεπτικό υλικό (RPMI, 10% FBS, Streptomycin-Penicillin 1x)
- Labeling ρυθμιστικό διάλυμα (PBS, 0.1% BSA)
- Αλατούχο διάλυμα φωσφορικών (PBS)
- Επωαστήρας κυττάρων (Model IR2424 CO₂ Incubator, Shellab)

Αρχές της μεθόδου

Η μέτρηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού χρησιμοποιώντας τη φθορίζουσα χρωστική ουσία CFSE βασίζεται στο γεγονός ότι η χρωστική αυτή διαχέεται παθητικά μέσα σε όλα τα κύτταρα. Είναι άχρωμη και μη φθορίζουσα μέχρι ενδοκυττάρια εστεράσες να κόψουν τις ομάδες οξικού εστέρα με αποτέλεσμα τη δημιουργία της φθορίζουσας χρωστικής που συνδέεται στη συνέχεια με ενδοκυττάρια αμίνες και σχηματίζει φθορίζοντα σύμπλοκα που δε μπορούν πια να διαχυθούν έξω από το κύτταρο. Τα σύμπλοκα χρωστικής-πρωτεϊνών παραμένουν στα κύτταρα καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης τους αλλά και κατά τη μείωση με αποτέλεσμα σε κάθε κυτταρική διαίρεση τα θυγατρικά κύτταρα να έχουν τη μισή ποσότητα της φθορίζουσας χρωστικής σε σχέση με τα μητρικά τους κύτταρα.

3.2.4.1 Δοκιμασίες καταστολής των CD4+CD25- από τα CD4+CD25+ T κύτταρα

Μετά την απομόνωση των CD4+CD25- T δραστικών κυττάρων και των CD4+CD25+ T ρυθμιστικών κυττάρων, αυτά επαναδιαλύονται σε 1ml labeling ρυθμιστικό διάλυμα και αφού μετρηθούν προστίθενται 2ml πράσινης χρωστικής CFSE στα CD4+CD25- T δραστικά κύτταρα. Ακολουθεί επώαση των κυττάρων με τη χρωστική στους 37° C για 10 λεπτά ακριβώς, αμέσως μετά πλύσιμο με εμπλουτισμένο RPMI θρεπτικό υλικό και τέλος επαναδιάλυση τους σε κατάλληλο όγκο του εμπλουτισμένου θρεπτικού υλικού RPMI (RPMI, 10% FBS, S-P 1x) ώστε η τελική τους συγκέντρωση να είναι 4 x 10⁵ /ml. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε πλάκα καλλιέργειας 96 βοθρίων κυκλικού πυθμένα που έχει επιστρωθεί με ανθρώπινο αCD3 μονοκλωνικό αντίσωμα και έχει επωαστεί για 4 ώρες στους 37° C. Αφού αφαιρεθεί η επιπλέον ποσότητα του αντισώματος με 2 πλυσίματα με αλατούχο διάλυμα φωσφορικών (PBS), επιστρώνονται στην πλάκα καλλιέργειας 100μl από τα σημασμένα με CFSE CD4+CD25- κύτταρα αCD28 μονοκλωνικό αντίσωμα. Για μελέτη της κατασταλτικής ικανότητας των CD4+CD25+ κυττάρων συνκαλλιεργείται με CD4+CD25+ T κύτταρα σε αναλογίες T δραστικά :T ρυθμιστικά κύτταρα 1:0, 1:1/4, 1:1/2 και 1:1. Εν συνεχεία, γίνεται συλλογή των κυττάρων την 3^η και 7^η μέρα μετά την επίστρωση της πλάκας και επώαση τους με φθορίζοντα μονοκλωνικά αντισώματα κατά των CD4 και CD69 μορίων επιφανείας. Ακολουθεί πλύσιμο για αφαίρεση της περίσσειας των αντισωμάτων και στη συνέχεια τα κύτταρα διέρχονται και μετρούνται από τον κυτταρομετρητή ροής για να διαπιστωθεί η ενεργοποίησή τους και να μετρηθεί η καταστολή που προκαλούν τα T ρυθμιστικά στα T δραστικά κύτταρα μέσω

των διαδοχικών αραιώσεων της χρωστικής CFSE σε κάθε κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Επιπλέον, ως control, επιστρώνονται στην πλάκα καλλιέργειας 100μl από το σημασμένο με CFSE κυτταρικό πληθυσμό των CD4+CD25- T κυττάρων σε συγκέντρωση 4×10^4 /ml:

- μόνα τους χωρίς καμία διέγερση με μονοκλωνικό αντίσωμα
- με διέγερση αCD3 μονοκλωνικό αντίσωμα
- με διέγερση με αCD3 μονοκλωνικό αντίσωμα και αCD28 μονοκλωνικό αντίσωμα.

Σε κάθε πηγαδάκι προστίθενται άλλα 100μl εμπλουτισμένου θρεπτικού μέσου RPMI και τέλος γίνεται συλλογή των κυττάρων την 1^η, 3^η και 7^η μέρα μετά την επίστρωση της πλάκας και επώαση τους με φθορίζοντα μονοκλωνικά αντισώματα κατά των CD4 και CD69 μορίων επιφανείας. Ακολουθεί πλύσιμο για αφαίρεση της περίσσειας των αντισωμάτων, και ακολουθεί η ανάλυση στον κυτταρομετρητή ροής για να διαπιστωθεί και να μετρηθεί ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η κυτταρική ενεργοποίηση.

3.2.5 Απομόνωση RNA από CD4+CD25+ T κύτταρα

Υλικά και συσκευές

Χρησιμοποιήθηκε το RNeasy Mini Kit για εξαγωγή ολικού RNA από κύτταρα (Qiagen)

Μέθοδος

Για την απομόνωση του RNA από τα CD4+CD25+ Τρυθ κύτταρα ακολουθήσαμε τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ο προσδιορισμός της ποσότητας του RNA έγινε με τη συσκευή Qubit χρησιμοποιώντας μέχρι και 8μl από το RNA που είχε εξαχθεί από τα κύτταρα. Η μετρούμενη από το μηχάνημα ποσότητα RNA σε ng/μl υπολογίζεται με τον εξής τύπο:

$$\frac{200 \times *Qf}{\text{-----}}$$

Ποσότητα (μl) που χρησιμοποιήθηκε από το ολικό mRNA που εξάχθηκε από τα κύτταρα

*Qf= η μετρούμενη από τη συσκευή Qubit συγκέντρωση του mRNA

3.2.6 Μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης ανάστροφης μεταγραφάσης (RT-PCR)

Υλικά και συσκευές

SuperScript II RT kit (Invitrogen) που περιέχει:

- Τυχαία εξαμερή (Random Hexamers)
- Νερό κατεργασμένο με διαιθυλοπυροκαρβονικό εστέρα, (DECP treated water)
- Ρυθμιστικό διάλυμα για cDNA (RT PCR buffer) 10x
- Μείγμα ολιγονουκλεοτιδίων (dNTP mix) 10Mm
- MgCl₂ 25mM
- Διθειοθρεϊτόλη (DTT) 0.1M
- Διάλυμα αναστολέων RNAσών (RNase OUT)

- RNase H
- Ένζυμο ανάστροφης μεταγραφάσης (SuperScript II) 500 units/μl
- Συσκευή PCR (Peltier Thermal Cycler, MJ Research)

Μέθοδος

Η αλυσιδωτή αντίδραση ανάστροφης μεταγραφάσης είναι μία μέθοδος μετατροπής του mRNA σε συμπληρωματικό DNA (complementary DNA, cDNA) έτσι ώστε να χρησιμοποιηθεί για την εκλεκτική σύνθεση/ενίσχυση μεγάλης ποσότητας του υπό μελέτη γονιδίου.

Αρχικά παρασκευάζεται ένα μείγμα αντίδρασης που περιλαμβάνει: 1μl τυχαίων εξαμερών, 1μl από το μείγμα δινουκλεοτιδίων, 20ng ολικού RNA και DECP-κατεργασμένο H₂O έτσι ώστε ο τελικός όγκος του δείγματος να είναι 10μl. Στη συνέχεια πραγματοποιείται αποδιάταξη του RNA και των τυχαίων εξαμερών με την επώαση του δείγματος μέσα στο θερμικό κυκλοποιητή για 5 λεπτά στους 65°C και αμέσως μετά ψύξη στους 4°C. Με τη διαδικασία αυτή καταστρέφονται τυχόν συσσωματώματα ή δευτεροταγείς δομές που θα μπορούσαν να αναστείλουν την έναρξη σχηματισμού του cDNA. Εν τω μεταξύ προετοιμάζεται το κύριο μείγμα της αντίδρασης που περιέχει 2μl cDNA RT buffer 10x, 2μl DTT 0.1M, 4μl MgCl₂ 25Mm, 1μl RNase out και τέλος 0.25μl SuperScript II. Προστίθεται DECP-κατεργασμένο H₂O μέχρι τελικό όγκο 10μl και όλο το μείγμα προστίθεται στο αρχικό. Ακολουθεί επώαση για 10 λεπτά στους 25° C και μετά για 50 λεπτά στους 42° C όπου πραγματοποιείται υβριδοποίηση των τυχαίων εξαμερών με βάση την αρχή της συμπληρωματικότητας των βάσεων και ενεργοποίηση του ενζύμου της ανάστροφης μεταγραφάσης. Η αντίδραση τερματίζεται με επώαση του δείγματος για 15 λεπτά στους 70° C, όπου γίνεται απενεργοποίηση της ανάστροφης μεταγραφάσης και τέλος προστίθεται 1μl RNase H που επωάζεται για 20 λεπτά στους 37° C για να καταστραφεί και η ελάχιστη ποσότητα RNA που έχει απομείνει. Το cDNA φυλάσσεται στους -20° C μέχρι τη χρήση του.

Στα πειράματα που ακολουθούν το cDNA προήλθε από τα CD4+CD25+ T κύτταρα ασθενών με Χρόνια Ιδιοπαθή Ουδετεροπενία καθώς και από τον ίδιο υποπληθυσμό κυττάρων από υγιείς μάρτυρες για ποσοτική μελέτη της έκφρασης του FOXP3 γονιδίου στα κύτταρα αυτά.

3.2.7 Μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

Υλικά και συσκευές

- Συσκευή PCR (Peltier Thermal Cycler, MJ Research)
- Μικροφυγοκεντρικά σωληνάρια 0.2ml
- Ρυθμιστικό διάλυμα PCR (PCR Buffer) 10x
- Μείγμα δινουκλεοτιδίων (DNTPs) 10Mm
- MgCl₂ 50Mm
- Εκκινητής (F/R) 10Mm του FOXP3 γονιδίου
- Εκκινητής (F/R) 10Mm του GAPDH γονιδίου
- Ταq πολυμεράση (500 u/μl)

Μέθοδος

Αρχές της μεθόδου

Η απλή αντίδραση PCR περιλαμβάνει τον εκλεκτικό πολλαπλασιασμό μιας επιλεγμένης αλληλουχίας DNA. Συγκεκριμένα, το dsDNA αποδιατάσσεται σε 2 μονόκλωνα μόρια με θέρμανση σε υψηλές θερμοκρασίες. Εν συνεχεία, το κάθε μονόκλωνο μόριο DNA χρησιμεύει ως εκμαγείο για τη σύνθεση του συμπληρωματικού του κλώνου με τη βοήθεια του ενζύμου της DNA πολυμεράσης και παρουσία της απαραίτητης ποσότητας ολιγονουκλεοτιδίων. Το σημείο από όπου θα ξεκινήσει η σύνθεση καθορίζεται από την παρουσία ειδικών εκκινητών (primers) που είναι ολιγονουκλεοτιδικά μόρια τα οποία συνδέονται με τη μήτρα του DNA στο σημείο που μας ενδιαφέρει με βάση την αρχή της συμπληρωματικότητας των βάσεων. Κάθε επανάληψη της σύνθεσης νέου κλώνου αποτελεί ένα κύκλο ενίσχυσης ενώ κάθε νεοσυντιθέμενος κλώνος είναι το εκμαγείο για τον επόμενο κύκλο ενίσχυσης. Το μείγμα της αντίδρασης θερμαίνεται ξανά για να αποχωριστούν νέοι και παλιοί κλώνοι του DNA και επαναλαμβάνεται ο κύκλος υβριδοποίησης των εκκινητών, σύνθεσης του DNA και αποχωρισμού των κλώνων.

Πειραματική διαδικασία

Το 10% του cDNA που έχει προκύψει από ένα δείγμα της αντίδρασης ανάστροφης μεταγραφάσης (RT-PCR) χρησιμοποιείται για την απλή αντίδραση PCR για να ελεγχθεί αν οι εκκινητές του ζητούμενου γονιδίου είναι λειτουργικοί. Συγκεκριμένα, 2,5μl του δείγματος χρησιμοποιούνται ως μήτρα για την αντίδραση PCR. Το cDNA επωάζεται παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος PCR, του ζεύγους εκκινητών, μείγματος dNTPs, MgCl₂ και του ενζύμου της Taq πολυμεράσης αρχικά στους 94° C για 5 λεπτά για να γίνει η αποδιάταξη του DNA και αμέσως μετά ακολουθούν 41 κύκλοι με επωάσεις στους 94° C για 30 δευτερόλεπτα, στους 65° C για 30 δευτερόλεπτα και στους 72° C για 30 δευτερόλεπτα. Κατά τη διάρκεια αυτών των κύκλων γίνεται η υβριδοποίηση και ο πολλαπλασιασμός και η ενίσχυση του DNA. Ο τερματισμός της αντίδρασης γίνεται με επώαση στους 72° C για 10 λεπτά.

Το προϊόν της αντίδρασης PCR διαχωρίζεται και ταυτοποιείται μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Το προϊόν αναμειγνύεται με το διάλυμα φόρτωσης (loading buffer) και φορτώνεται σε πηκτή αγαρόζης 1.5% στην οποία έχει προστεθεί βρωμιούχο αιθίδιο. Το βρωμιούχο αιθίδιο δεσμεύεται από το DNA και επιτρέπει την ανίχνευση του στο υπεριώδες φως. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης συνδέεται με τροφοδοτικό, εφαρμόζεται σταθερή τάση και αφήνεται να διαχωριστεί το DNA. Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται ανάλογα με το μοριακό βάρος (αριθμός βάσεων). Ο υπολογισμός του μοριακού βάρους των ενισχυμένων τμημάτων DNA είναι εφικτός με τη χρήση των δεικτών γνωστού μοριακού βάρους που τρέχουν παράλληλα με τα άγνωστο δείγμα.

3.2.8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR)

Υλικά και συσκευές

- Μικροφυγοκεντρικά σωληνάρια 0.2ml

- SYBR GreenER qPCR SuperMix Universal 2x (Invitrogen) που περιέχει:
 - Taq DNA πολυμεράση
 - SYBR GreenER φθορίζουσα χρώση
 - MgCl₂ 3mM
 - Μείγμα δινουκλεοτιδίων 10mM
 - Ουρακίλη DNA γλυκοζιλάση (UDG)
 - Χρωστική αναφοράς ROX 25μM
 - Σταθεροποιητές
 - Νερό κατεργασμένο με διαιθυλπυροκαρβονικό εστέρα (DECP treated)
- Συσκευή Real Time PCR (Corbett)
- Εκκινητές (primers) για:

FOXP3

Sense: 5'- GAA ACA GCA CAT TCC CAG AGT TC- 3'

Antisense: 5'- ATG GCC CAG CGG ATG AC- 3'

GAPDH

Sense: 5'- CAT GTT CCA ATA TGA TTC CAC C- 3'

Antisense: 5'- GAT GGG ATT TCC ATT GAT GAC- 3'

Μέθοδος

Αρχές της μεθόδου

Η μέθοδος αποτελεί εξελιγμένη, πιο εξειδικευμένη και επαναλήψιμη εκδοχή της κλασικής (PCR) και περιλαμβάνει τον εκλεκτικό πολλαπλασιασμό συγκεκριμένου τμήματος ενός γονιδίου και την παράλληλη ποσοτικοποίηση του, με βάση τη μέτρηση του φθορισμού που εκπέμπεται από τη SYBRGreenER, μιας χρωστικής που διεισδύει και προσλαμβάνεται στο δίκλωνο dsDNA κατά τη διάρκεια της αντίδρασης.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real time PCR) στηρίζεται στις ίδιες αρχές της απλής PCR που περιγράφηκε πιο πάνω (2.2.7 Μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης) με τη διαφορά ότι όλα τα παραπάνω διεξάγονται σε ειδικό θερμικό κυκλοποιητή (Corbett Real Time PCR). Στην περίπτωση αυτή το dsDNA που παράγεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης μπορεί να ποσοτικοποιηθεί στο τέλος του κάθε κύκλου. Αυτό γίνεται με τη βοήθεια της SYBRGreenER φθορίζουσας χρωστικής που έχει την ιδιότητα να διεισδύει και να προσλαμβάνεται μη ειδικά στο dsDNA, αλλά όχι στο ssDNA και να εκπέμπει πολύ μικρή ποσότητα φθορισμού όταν βρίσκεται σε διάλυμα αλλά έντονο σήμα όταν συνδέεται. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, δέσμη φωτός από λάμπα αλογόνου προσπίπτει πάνω στην επιφάνεια των δειγμάτων διεγείροντας την προσδεσμένη χρωστική, με αποτέλεσμα να εκπέμπεται ακτινοβολία στην περιοχή του πράσινου χρώματος (500-660nm). Διερχόμενη μέσα από σύστημα φακών, φίλτρων και ηλεκτρονικών ενισχυτών σήματος, η εκπεμπόμενη ακτινοβολία καταγράφεται από ειδική κάμερα και μέσω ειδικού λογισμικού μετατρέπεται σε ψηφιακό σήμα. Έτσι, η ποσότητα του dsDNA που έχει παραχθεί στο τέλος του κάθε

κύκλου είναι ανάλογη της ακτινοβολίας που εκπέμπεται στον ίδιο χρόνο. Η σταδιακή καταγραφή του σήματος στο τέλος του κάθε κύκλου ορίζει μια καμπύλη που αντιστοιχεί στην παραγωγή του προϊόντος της αντίδρασης. Η συγκριτική ανάλυση των αποτελεσμάτων γίνεται αφού οριστεί από τον ερευνητή ένας ουδός (threshold) κατά τη φάση της λογαριθμικής αύξησης του προϊόντος της αντίδρασης. Το σημείο στο οποίο η καμπύλη αύξησης της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας τέμνει τον ουδό ονομάζεται «κύκλος ουδός» (threshold cycle, C_t). Όσο περισσότερο είναι το αρχικό προϊόν, τόσο μικρότερη είναι η τιμή του C_t. Η ποσοτικοποίηση του προϊόντος του γονιδίου στόχου απαιτεί την κανονικοποίηση του λαμβανόμενου σήματος ως προς το σήμα ενός ενδογενούς γονιδίου μάρτυρα (endogenous control) που είναι καθολικά και σταθερά εκφραζόμενο, στην περίπτωση μας της αφυδρογονάσης της 3' φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης (GAPDH). Προκειμένου να γίνει η σχετική ποσοτικοποίηση του γονιδίου που μας ενδιαφέρει, για κάθε δείγμα γίνεται ταυτόχρονα η ενίσχυση του υπό μελέτη γονιδίου και του γονιδίου-μάρτυρα. Στα δικά μας πειράματα, το υπό μελέτη γονίδιο (FOXP3) αντιδρά σε διαφορετικές θερμοκρασίες από το γονίδιο μάρτυρα (GAPDH) και έτσι, για κάθε πείραμα πραγματοποιούνται διαδοχικά δύο αντιδράσεις, μία για το FOXP3 και μία για το GAPDH, που ωστόσο έχουν προετοιμαστεί με κοινή διαδικασία στον ίδιο χρόνο και με τα ίδια αντιδραστήρια.

Για τη σχετική ποσοτικοποίηση (relative quantification) του υπό μελέτη γονιδίου χρησιμοποιείται ανάλυση των αποτελεσμάτων με χρήση καμπύλης αναφοράς (standard curve). Για τη δημιουργία της καμπύλης αναφοράς, τόσο το υπό μελέτη γονίδιο όσο και το γονίδιο αναφοράς ενισχύεται με PCR, ταυτόχρονα με τα άγνωστα δείγματα, και διαδοχικές γνωστές αραιώσεις ενός δείγματος που είναι θετικό για την έκφραση του υπό μελέτη γονιδίου (στην προκειμένη περίπτωση πρόκειται για cDNA από απομονωμένα CD4+CD25+ T κύτταρα από το περιφερικό αίμα υγιών μαρτύρων). Για κάθε άγνωστο δείγμα η σχετική ποσότητα αρχικών μεταγράφων του γονιδίου του FOXP3 και της GAPDH προσδιορίζεται μέσω προβολής των C_{ts} στην αντίστοιχη καμπύλη αναφοράς. Για κάθε δείγμα, η έκφραση του γονιδίου στόχου ορίζεται ως ο λόγος της σχετικής ποσότητας του υπό μελέτη γονιδίου προς τη σχετική ποσότητα του γονιδίου αναφοράς.

Τα παραπάνω γίνονται με τη χρήση του κατάλληλου λογισμικού για τη δημιουργία καμπύλων και τον υπολογισμό της σχετικής ποσότητας μεταγράφων και μεταφορά και επεξεργασία των αποτελεσμάτων σε μια βάση δεδομένων Excel.

Πειραματική διαδικασία

Το cDNA που έχει προκύψει από την αντίδραση ανάστροφης μεταγραφής (reverse transcription) 20ng ολικού RNA και βρίσκεται σε συνολικό όγκο 20μl, αραιώνεται με 30μl νερό κατεργασμένο με DECP. Χρησιμοποιούμε 5μl του αραιωμένου δείγματος για την αντίδραση PCR. Το cDNA επωάζεται παρουσία του ζεύγους εκκινητών για το υπό μελέτη γονίδιο ή το γονίδιο αναφοράς μαζί με μείγμα dNTPs, ρυθμιστικό διάλυμα PCR και SYBRGreenER στις κατάλληλες κάθε φορά συνθήκες.

Οι αντιδράσεις γίνονται σε σωληνάρια μικροφυγοκέντρου 0.2ml κατάλληλης οπτικής διαύγειας εις διπλούν και για την τελική ανάλυση χρησιμοποιείται ο μέσος όρος των 2 τιμών.

Ο τελικός όγκος της κάθε αντίδρασης είναι 20μl όπου περιέχονται:

Για το FOXP3 γονίδιο :

- Ρυθμιστικό διάλυμα SYBRGreenER qPCR SuperMix Universal 1x
- FOXP3 εκκινητής (F) 0.6mM
- FOXP3 εκκινητής (R) 0.6mM
- Νερό κατεργασμένο με DECP μέχρι τελικού όγκου 20μl

Οι συνθήκες της αντίδρασης είναι οι εξής:

- 52° C για 2 λεπτά
 - 95° C για 10 λεπτά
 - 95° C για 15 δευτερόλεπτα
 - 65° C για 15 δευτερόλεπτα
 - 72° C για 30 δευτερόλεπτα
- } 65 κύκλοι

Για το GAPDH γονίδιο:

- Ρυθμιστικό διάλυμα SYBRGreenER qPCR SuperMIX Universal 1x
- GAPDH εκκινητές (F/R) 0.6mM
- Νερό κατεργασμένο με DECP μέχρι τελικού όγκου 20μl

Οι συνθήκες της αντίδρασης είναι οι εξής:

- 52° C για 2 λεπτά
 - 95° C για 10 λεπτά
 - 95° C για 15 δευτερόλεπτα
 - 58° C για 15 δευτερόλεπτα
 - 72° C για 30 δευτερόλεπτα
- } 65 κύκλοι

3.2.9 Προσδιορισμός κυτταροκινών

Υλικά και συσκευές

- Quantikine IL-17 Immunoassay (R&D Systems) για τον ποσοτικό προσδιορισμό των συγκεντρώσεων ανθρώπινης IL-17 σε υπερκείμενα καλλιέργειών, ορό και πλάσμα
- Μέτρηση έντασης του χρώματος που αναπτύχθηκε, σε φωτόμετρο .

Μέθοδος

Για την ELISA που πραγματοποιήθηκε για μέτρηση των επιπέδων της IL-17 στα υπερκείμενα μακρόχρονων μυελικών καλλιέργειών και στον ορό ασθενών με CIN και υγιών μαρτύρων, χρησιμοποιήθηκε η ποσοτική ανοσοενζυμική «σάντουιτς» μέθοδος (quantitative sandwich enzyme immunoassay technique).

Οι μακρόχρονες μυελικές καλλιέργειες αναπτύχθηκαν από 10^7 BMDCs ασθενών και μαρτύρων σε 10 mL θρεπτικού υλικού IMDM εμπλουτισμένου με 10% FCS, 10% HS (horse serum), 100 IU/mL πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη, 2 mM L-glutamine και 10^{-6} M θειϊκή σουξινική υδροκορτιζόνη, και επώαστηκαν στους 33°C-5% CO₂-95% υγρασία. Ανά εβδομάδα οι καλλιέργειες εξετάζονταν για σχηματισμό στρώματος με ανάστροφο μικροσκόπιο και γίνονταν ανανέωση κατά το ήμισυ του θρεπτικού υλικού. Την εβδομάδα 3-4, όταν είχε σχηματισθεί πλήρης τάπητας, ελεύθερα κυττάρων υπερκείμενα

καλλιεργείων αποθηκεύτηκαν στους -72°C για τον προσδιορισμό IL-17 με ELISA

Η πλάκα της ELISA που παρείχε ο κατασκευαστής ήταν ήδη επικαλυμμένη με ένα ακινητοποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για την IL-17. Τα προτυποποιημένα δείγματα (standards) καθώς και τα δείγματα από τους ασθενείς και τους υγιείς μάρτυρες τοποθετούνται στα βοθρία της πλάκας και η υπάρχουσα IL-17 σε αυτά προσλαμβάνεται από το ακινητοποιημένο αντίσωμα. Μετά από πλύσιμο της πλάκας ώστε να απομακρυνθούν όλες οι ουσίες που δεν προσκολλήθηκαν στο αντίσωμα, ένα πολυκλωνικό αντίσωμα προσδεδεμένο με ένζυμο και ειδικό για την IL-17 προστίθεται στα βοθρία. Μετά από επώαση ακολουθεί και πάλι πλύσιμο για να αφαιρεθεί η επιπλέον ποσότητα του μη-προσεδεμένου αντισώματος-ενζύμου και αμέσως μετά προστίθεται στα βοθρία το υπόστρωμα του ενζύμου. Η αντίδραση ενζύμου-υποστρώματος προκαλεί την ανάπτυξη χρώματος που η ένταση του είναι ανάλογη της ποσότητας της IL-17 που προσδέθηκε όταν προστέθηκαν τα δείγματα στα βοθρία. Τέλος, τερματίζεται η ανάπτυξη του χρώματος μετά από κάποιο χρονικό διάστημα και μετριέται η ένταση του χρώματος σε φωτόμετρο. Σύμφωνα με τον κατασκευαστή, η ευαισθησία της μεθόδου είναι ...

3.3. Στατιστική ανάλυση

Η ανάλυση των δεδομένων έγινε (α) με δοκιμασία χ^2 για προσδιορισμό τυχόν διαφορών στην κατά ηλικία και φύλο κατανομή μεταξύ ασθενών και μαρτύρων (β) με δοκιμασία Mann-Whitney για έλεγχο τυχόν διαφορών στις μέσες τιμές διάφορων παραμέτρων ασθενών και μαρτύρων, και (γ) με δοκιμασία paired t test για διερεύνηση τυχόν διαφορών στο ποσοστό των Τρυθ κυττάρων μεταξύ αίματος και μυελού στα ίδια άτομα.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Δημογραφικά, κλινικά και εργαστηριακά στοιχεία ασθενών

4.1.1 Δείγμα ασθενών με CIN στους οποίους μελετήθηκε η ποσοτική μεταβολή των Τρυθ κυττάρων στο περιφερικό αίμα

Μελετήθηκαν 50 ασθενείς με CIN και 20 αναλόγου ηλικίας και φύλου με τους ασθενείς, υγιείς μάρτυρες. Λήφθηκαν και επεξεργάστηκαν δείγματα αίματος τη μέρα παρακολούθησης τους στα εξωτερικά ιατρεία της Αιματολογικής κλινικής. Θα πρέπει να τονισθεί, όπως προαναφέρθηκε, ότι η CIN μία νόσος με καλοήθη και ανεπίπλεκη συνήθως πορεία που δε χρήζει φαρμακευτικής ή άλλης παρέμβασης παρά μόνο σε περιπτώσεις επικίνδυνες για ανάπτυξη λοιμώξεων. Ως εκ τούτου οι υπό μελέτη ασθενείς δεν ελάμβαναν κάποιο φάρμακο.

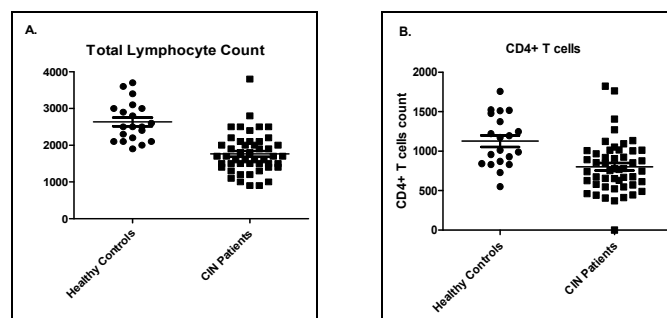
4.1.2 Δείγμα ασθενών με CIN στους οποίους μελετήθηκε η ποσοτική μεταβολή των Τρυθ κυττάρων στο μυελό των οστών

Σε 6 ασθενείς με CIN πραγματοποιήθηκε συγκριτική ανάλυση της ποσοτικής μεταβολής των Τρυθ κυττάρων μεταξύ του περιφερικού αίματος και του μυελού των οστών

4.2 Ποσοτική μεταβολή διαφόρων υποπληθυσμών στο περιφερικό αίμα ασθενών με CIN

4.2.1 Μεταβολή του απόλυτου αριθμού ολικών λεμφοκυττάρων και του αριθμού των CD4+ T κυττάρων

Οι ασθενείς με CIN είχαν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερο απόλυτο αριθμό λεμφοκυττάρων (1767 ± 78.68) και CD4+ T κυττάρων (802.7 ± 47.64) σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες (2635 ± 119.7 $P < 0.0001$ και 1127 ± 72.27 $P < 0.0004$ αντίστοιχα) (Εικόνα 14)



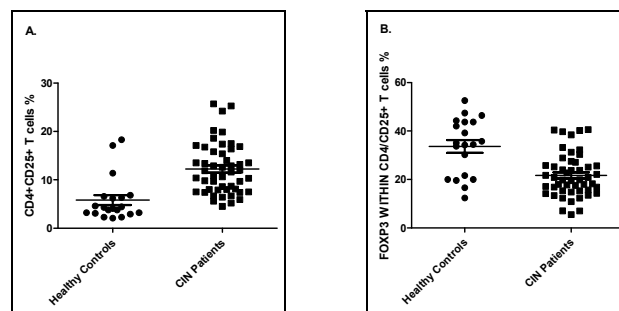
Εικόνα 14. Α. Απόλυτος αριθμός λεμφοκυττάρων σε ασθενείς με CIN και υγιείς μάρτυρες, **Β.** Αριθμός CD4+ T κυττάρων σε ασθενείς με CIN και υγιείς μάρτυρες. Οι οριζόντιες γραμμές παριστάνουν τη μέση τιμή (Mean) και την τυπική απόκλιση από το μέσο (SEM)

4.2.2 Μεταβολή της συχνότητας των CD4+CD25+ T κυττάρων και των FOXP3+ σε υποπληθυσμούς CD4+CD25+ T κυττάρων

Για τη μέτρηση των Τρυθ κυττάρων χρησιμοποιήθηκε, όπως προαναφέρθηκε, κυτταρομετρία ροής τριών χρωμάτων. Συγκεκριμένα, έγινε τριπλή χρώση για τους επιφανειακούς δείκτες CD4-PC5 και CD25-PE και για τον ενδοκυττάριο μεταγραφικό παράγοντα FOXP3-FITC και η ανάλυση έγινε στο «παράθυρο» (gate) των λεμφοκυττάρων (κύτταρα με χαμηλό πρόσθιο και πλάγιο σκεδασμό) για το προσδιορισμό του ποσοστού των FOXP3+ κυττάρων :

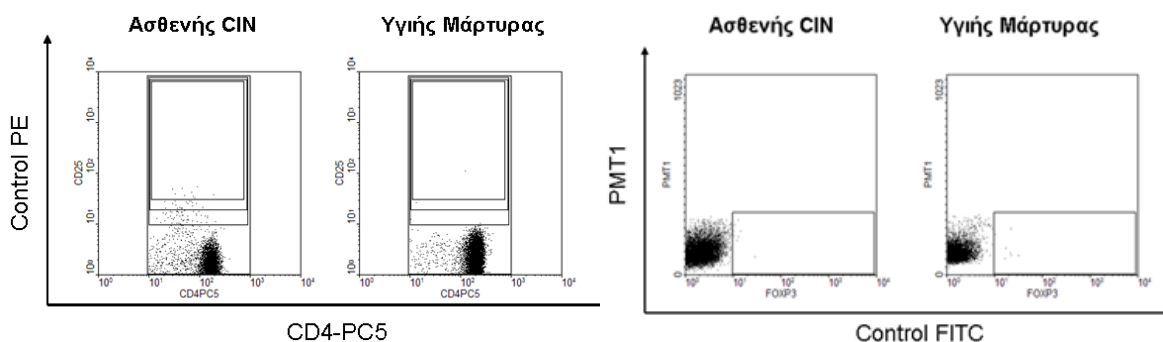
- Στον πληθυσμό των CD4+CD25+ T κυττάρων (CD4+CD25+ T κύτταρα ορίζεται ως φθορισμός $> 10^1$)

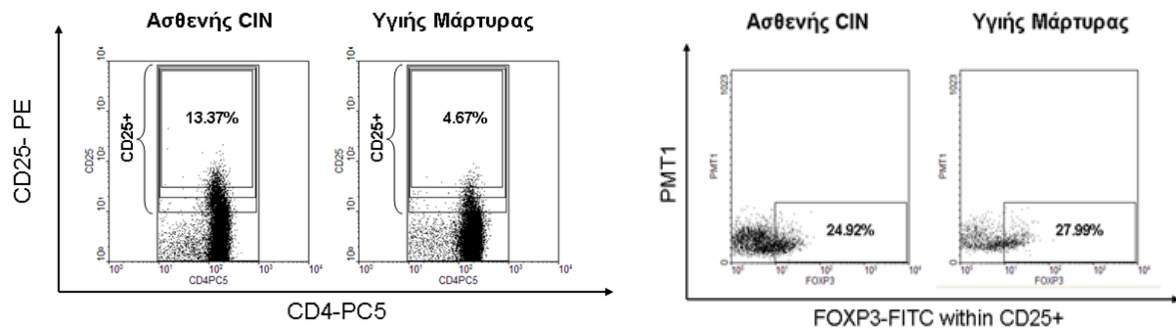
Τα CD4+CD25+ T κύτταρα (Εικόνα 15 A) είναι σημαντικά αυξημένα στους ασθενείς ($12.25\% \pm 0.7540\%$) σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες ($5.840\% \pm 1.028\%$, $P < 0.0001$). Το εύρημα αυτό είναι σε συμφωνία με προηγούμενα δεδομένα μας [70] και αντανακλά το αυξημένο ποσοστό των διεγερμένων T λεμφοκυττάρων στους ασθενείς με CIN. Ωστόσο, η συχνότητα των FOXP3+ T κυττάρων στον πληθυσμό των CD4+CD25+ κυττάρων (Εικόνα 15 B) είναι στατιστικά σημαντικά μειωμένη στους ασθενείς ($21.69\% \pm 1.271\%$) σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες ($33.65\% \pm 2.618\%$ $P < 0.0001$). Ενδεικτικά αποτελέσματα της ανάλυσης που έγινε για τις παραπάνω μετρήσεις με κυτταρομετρία ροής σε ασθενείς και υγιείς φαίνονται στην Εικόνα 16.



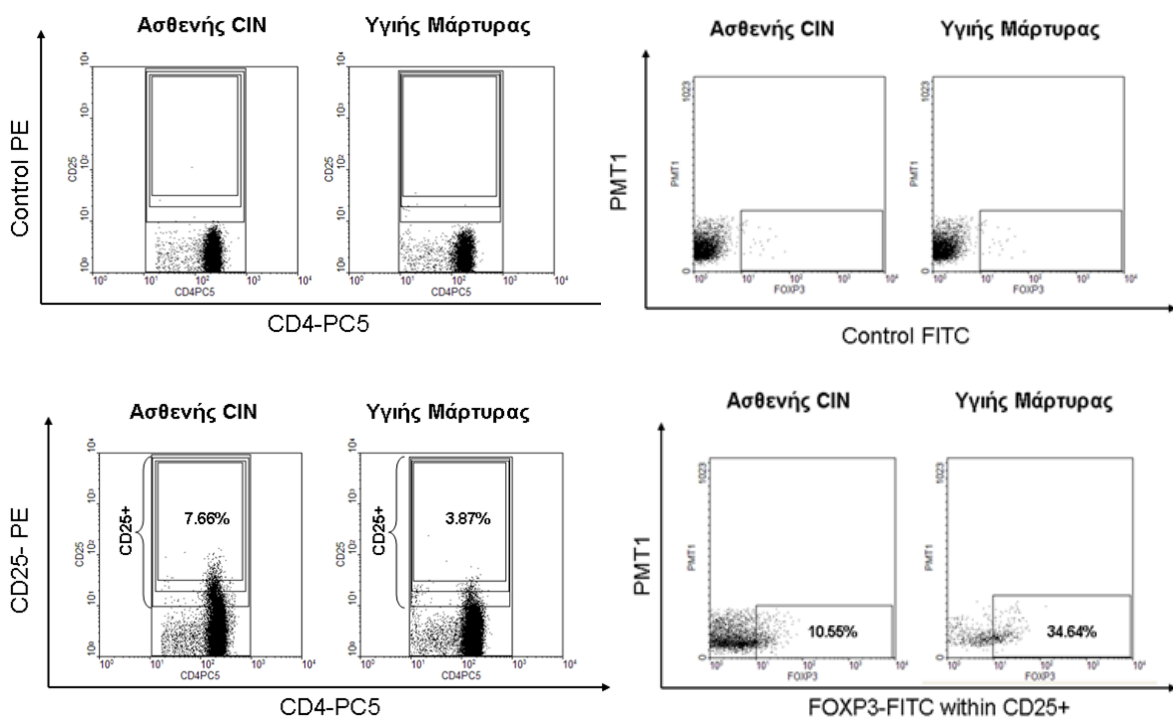
Εικόνα 15. A. Συχνότητα CD4+CD25+ T κυττάρων σε ασθενείς με CIN και υγιείς μάρτυρες. **B.** Συχνότητα των FOXP3+ κυττάρων στα CD4+CD25+ T κύτταρα. (Οι οριζόντιες γραμμές παριστάνουν τη μέση τιμή (Mean) και την τυπική απόκλιση από το μέσο (\pm SEM))

Ασθενής 1 – Υγιής Μάρτυρας 1





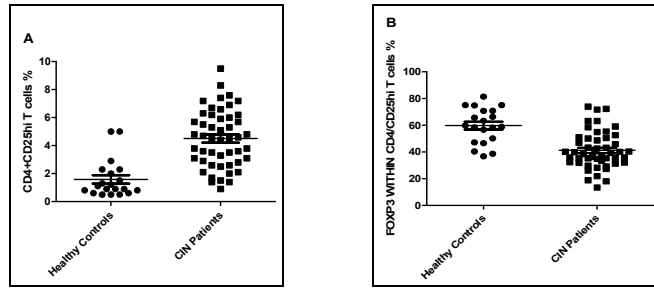
Ασθενής 2 – Υγιής Μάρτυρας 2



Εικόνα 16. Συχνότητες CD4+CD25+ T κυττάρων και FOXP3+ T κυττάρων σε ασθενείς με CIN και υγιείς μάρτυρες. Τα ποσοστά υπολογίστηκαν με κυτταρομετρία ροής των μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού χρησιμοποιώντας CD4-PC5, CD25-PE και ενδοκυττάριο FOXP3-FITC μονοκλωνικά αντισώματα καθώς και τα αντίστοιχα ιστοτυπικά αντισώματα ελέγχου (control PE, control FITC) αίματος. Τα διαγράμματα κυτταρομετρίας ροής που παρουσιάζονται

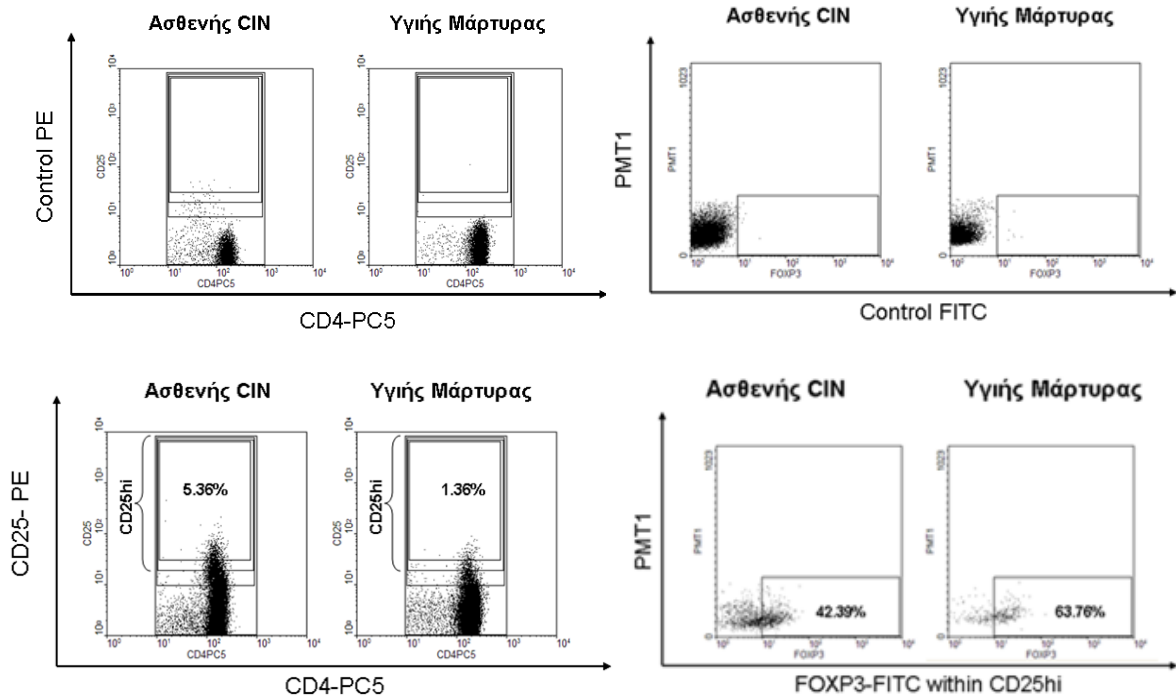
- Στον πληθυσμό των CD4+CD25hi (CD25high ορίζεται ως φθορισμός των CD25+ T κυττάρων $> 2 \times 10^1$).

Τα CD4+CD25hi T κύτταρα (Εικόνα 17 A) είναι σημαντικά αυξημένα στους ασθενείς ($4.504\% \pm 0.2912\%$) σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες ($1.580\% \pm 0.3028\%$, $P < 0.0001$) για τον ίδιο λόγο που αναλύθηκε παραπάνω. Η συχνότητα, ωστόσο, των FOXP3+ T κυττάρων (Εικόνα 17 B) στον πληθυσμό αυτό είναι στατιστικά σημαντικά μειωμένη στους ασθενείς ($41.19\% \pm 1.976\%$) σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες ($59.70\% \pm 2.942\%$, $P < 0.0001$). Ενδεικτικά αποτελέσματα της ανάλυσης που έγινε για τις παραπάνω μετρήσεις με κυτταρομετρία ροής σε ασθενείς και υγιείς φαίνονται στην Εικόνα 18.

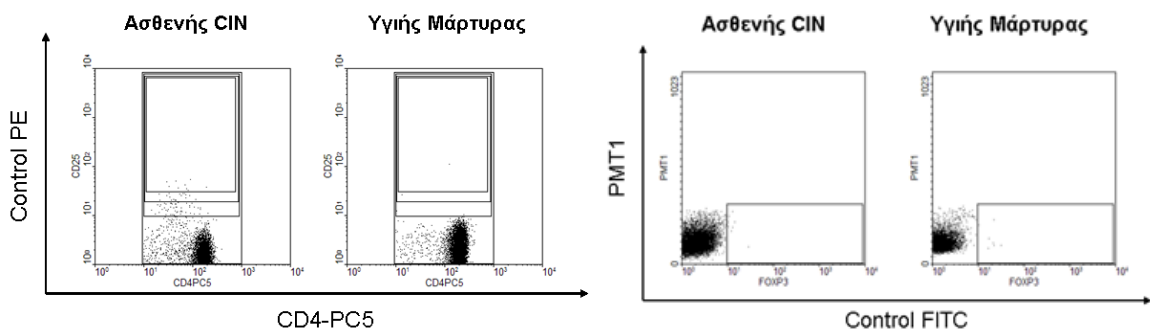


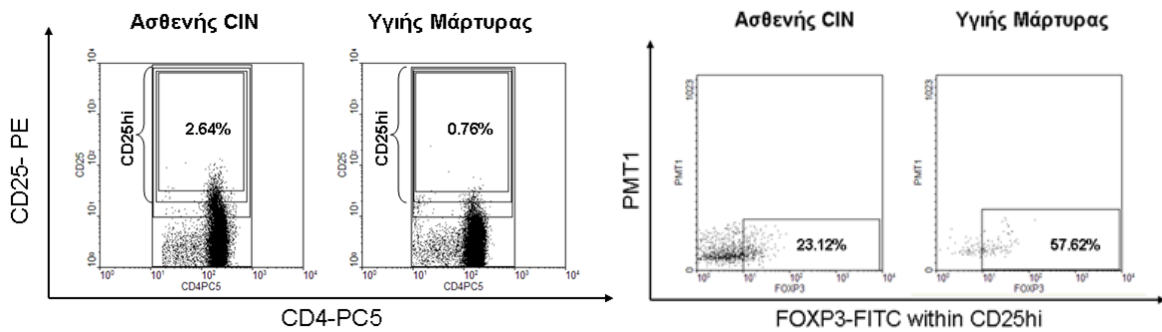
Εικόνα 17. Α. Συχνότητα CD4+CD25+ T κυττάρων σε ασθενείς με CIN και υγιείς μάρτυρες. **Β.** Συχνότητα των FOXP3+ κυττάρων στα CD4+CD25+ T κύτταρα. (Οι οριζόντιες γραμμές παριστάνουν τη μέση τιμή (Mean) και την τυπική απόκλιση από το μέσο (\pm SEM))

Ασθενής 1- Υγιής Μάρτυρας 1



Ασθενής 2 – Υγιής Μάρτυρας 2

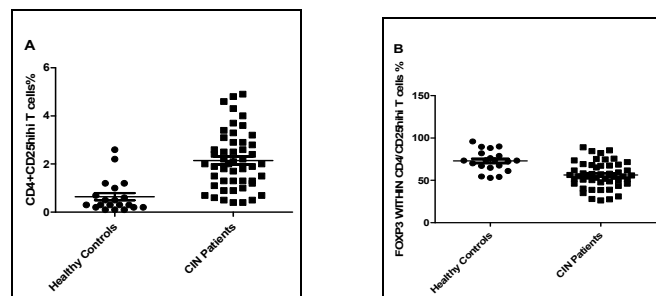




Εικόνα 18. Συχνότητες CD4+CD25high T κυττάρων και FOXP3+ T κυττάρων στον πληθυσμό των CD25high T κυττάρων σε ασθενείς με CIN και υγιείς μάρτυρες. (Τα ποσοστά υπολογίστηκαν με κυτταρομετρία ροής των μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος χρησιμοποιώντας CD4-PC5, CD25-PE και ενδοκυττάριο FOXP3-FITC μονοκλωνικά αντισώματα καθώς και τα αντίστοιχα ισοτυπικά αντισώματα ελέγχου (control PE, control FITC)).

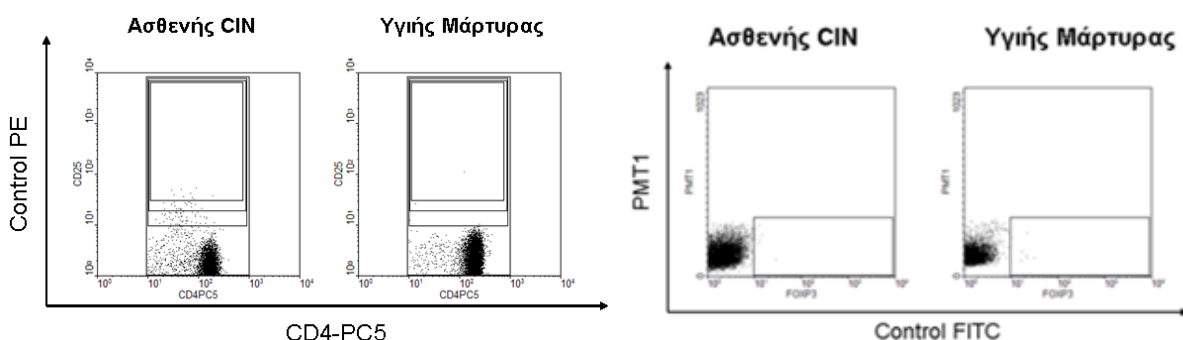
- Στον πληθυσμό των CD4+CD25hihiFOXP3+ (CD25highhigh ορίζεται ως φθορισμός των CD25+ T κυττάρων $> 3 \times 10^1$)

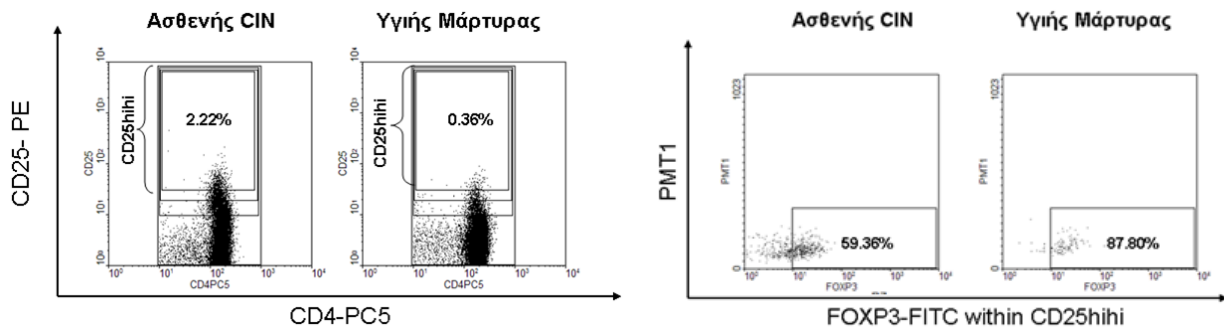
Τα CD4+CD25hihi T κύτταρα είναι σημαντικά αυξημένα στους ασθενείς ($2.147\% \pm 0.171\%$) σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες ($0.6450\% \pm 0.1548\%$, $P < 0.0001$) για τον λόγο που αναλύθηκε παραπάνω. Όπως και στις παραπάνω υποπληθυσμούς, η συχνότητα των FOXP3+ T κυττάρων στον πληθυσμό αυτό είναι στατιστικά σημαντικά μειωμένη στους ασθενείς ($56.26\% \pm 2.197\%$) σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες ($72.95\% \pm 2.735\%$, $P < 0.0001$). Ενδεικτικά αποτελέσματα της ανάλυσης που έγινε για τις παραπάνω μετρήσεις με κυτταρομετρία ροής σε ασθενείς και υγιείς φαίνονται στην Εικόνα 20.



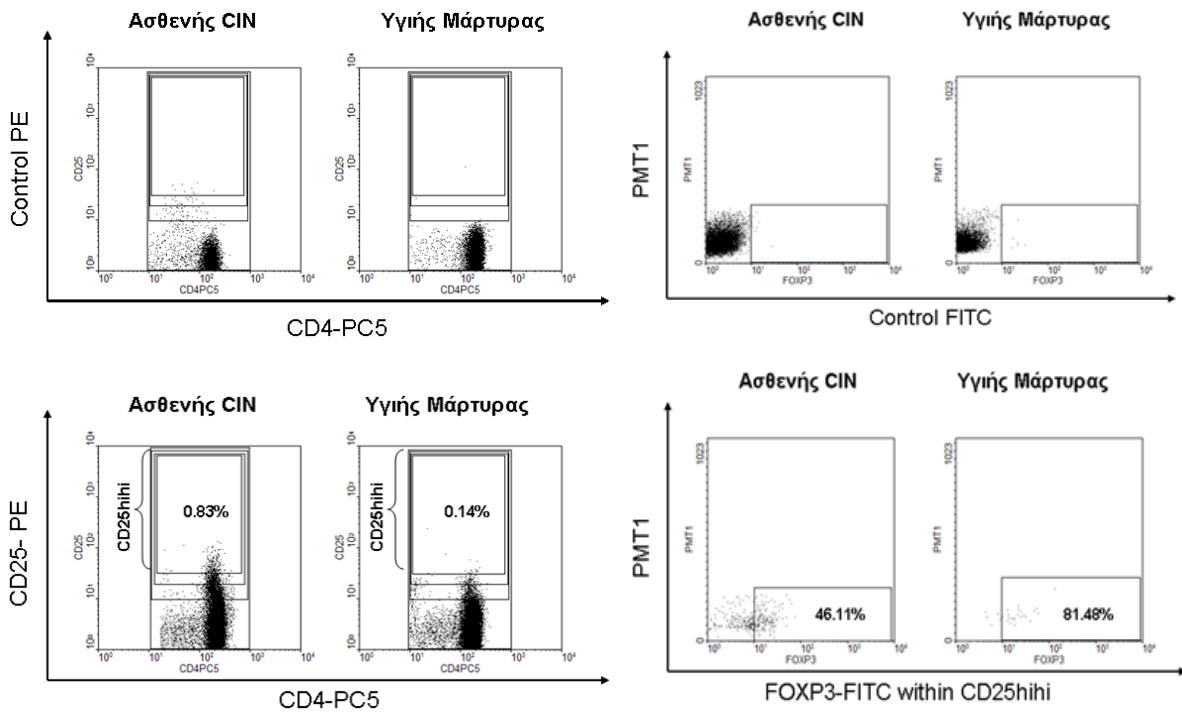
Εικόνα 19. Α. Συχνότητα CD4+CD25+ T κυττάρων σε ασθενείς με CIN και υγιείς μάρτυρες. **Β.** Συχνότητα των FOXP3+ κυττάρων στα CD4+CD25+ T κύτταρα. (Οι οριζόντιες γραμμές παριστάνουν τη μέση τιμή (Mean) και την τυπική απόκλιση από το μέσο (\pm SEM))

Ασθενής 1 – Υγιής Μάρτυρας 1





Ασθενής 2 – Υγιής Μάρτυρας 2



Εικόνα 20. Συχνότητες CD4+CD25^{highhigh} T κυττάρων και FOXP3⁺ T κυττάρων στον πληθυσμό των CD25^{highhigh} T κυττάρων σε ασθενείς με CIN και υγιείς μάρτυρες. (Τα ποσοστά υπολογίστηκαν με κυτταρομετρία ροής των μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος χρησιμοποιώντας CD4-PC5, CD25-PE και ενδοκυττάριο FOXP3-FITC μονοκλωνικά αντισώματα καθώς και τα αντίστοιχα ισουτυπικά αντισώματα ελέγχου (control PE, control FITC)

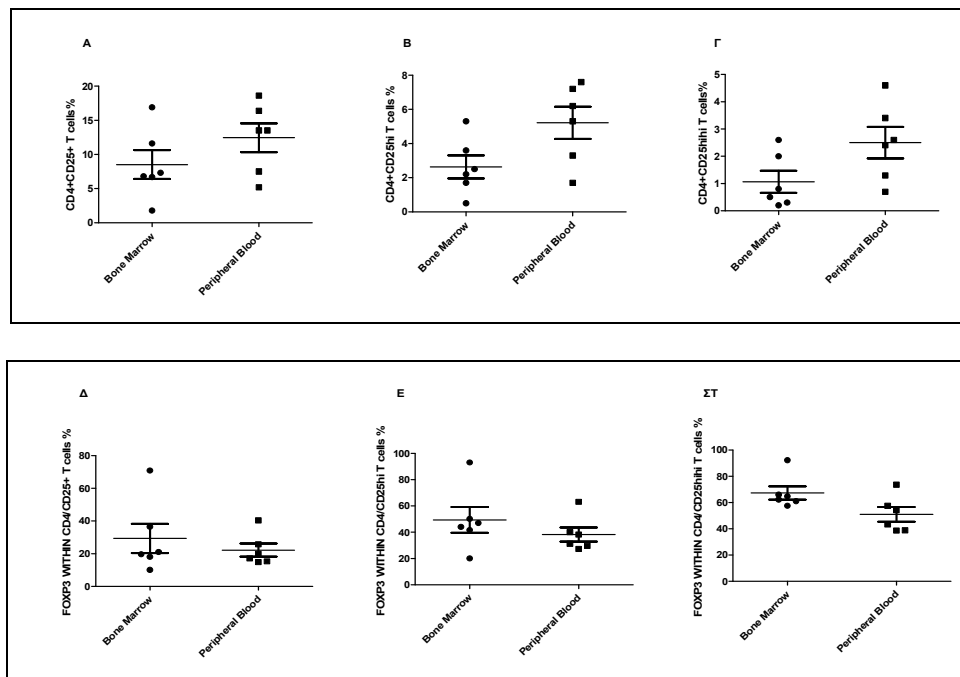
4.3 Ποσοτική μεταβολή των Τρυθ κυττάρων στο μυελό των οστών σε σχέση με το περιφερικό αίμα στους ασθενείς με CIN

4.3.1 Μεταβολή της συχνότητας των CD4+CD25⁺ T κυττάρων και των FOXP3⁺ σε υποπληθυσμούς CD4+CD25⁺ T κυττάρων

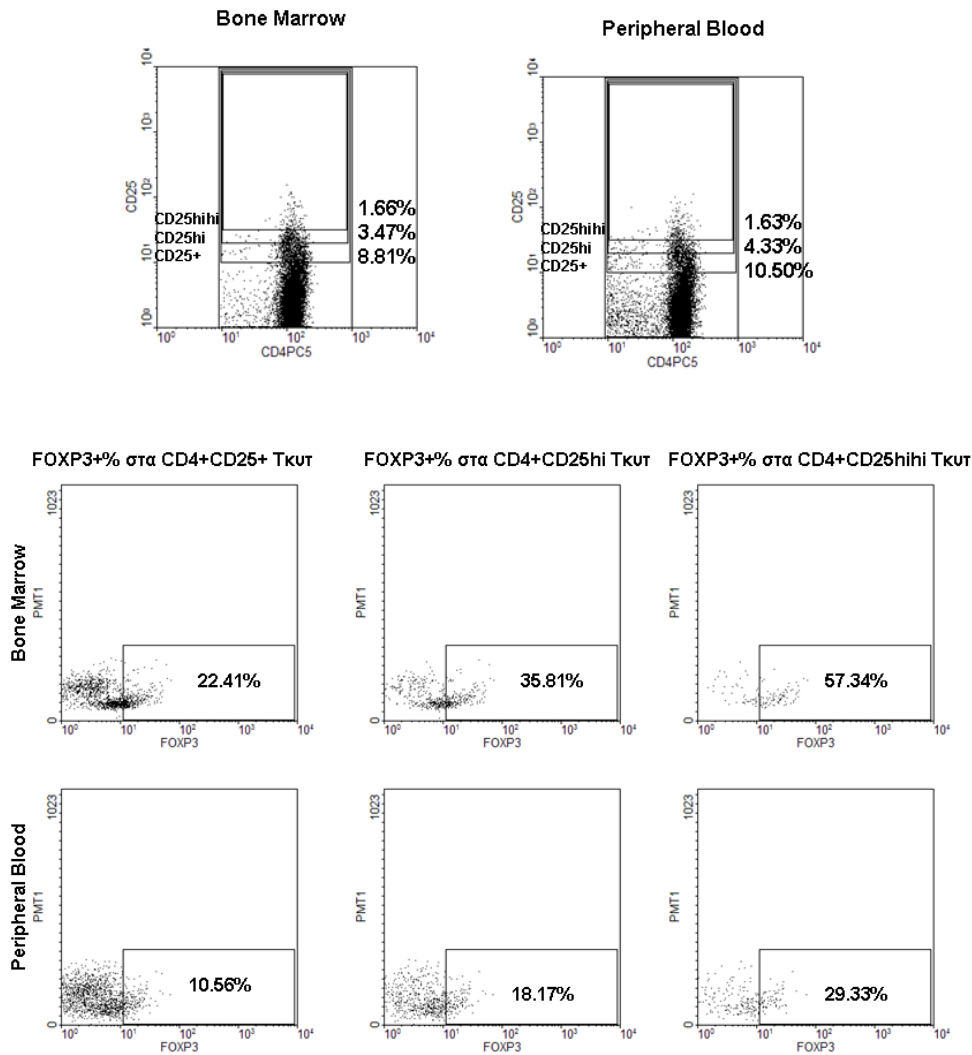
Για τον προσδιορισμό των Τρυθ κυττάρων χρησιμοποιήθηκε και πάλι κυτταρομετρία ροής τριών χρωμάτων μετά από χρώση των μυελικών κυττάρων με τους επιφανειακούς δείκτες CD4-PC5 και CD25-PE και τον ενδοκυττάριο μεταγραφικό παράγοντα FOXP3-FITC. Η ανάλυση έγινε και πάλι στο gate των λεμφοκυττάρων (κύτταρα με χαμηλό πρόσθιο και πλάγιο σκεδασμό). Συγκεκριμένα, σε 7 ασθενείς προσδιορίστηκε στον μυελό (έχοντας παράλληλα τα δεδομένα από τις αντίστοιχες τιμές στο αίμα) το ποσοστό των FOXP3⁺ κυττάρων :

- Στους πληθυσμούς των CD4+CD25+ ,CD4+CD25hi και CD4+CD25hihi T κυττάρων που ορίσθηκαν όπως αναλύθηκε παραπάνω

Δε φαίνεται να υπάρχει στατιστικά σημαντική ποσοστιαία διαφορά ανάμεσα στο ποσοστό των CD4+CD25+ T κυττάρων του μυελού των οστών ($8.517\% \pm 5.150\%$) σε σχέση με το περιφερικό αίμα ($12.45\% \pm 5.152\%$, $P=0.2403$) όπως επίσης και ανάμεσα στο ποσοστό των CD4+CD25hi T κυττάρων του μυελού των οστών (2.633 ± 1.654) και του περιφερικού αίματος ($5.217\% \pm 2.308\%$, $P=0.0916$) και τέλος ανάμεσα στα CD4+CD25hihi T κύτταρα του μυελού των οστών ($1.067\% \pm 0.9953\%$) σε σχέση με το περιφερικό αίμα ($2.5\% \pm 1.409\%$, $P=0.0777$) (Εικόνα 21 Α, Β, Γ). Η συχνότητα των FOXP3+ T κυττάρων στον πληθυσμό των CD4+CD25+ T κυττάρων στο μυελό των οστών ($29.37\% \pm 22.09\%$) δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το περιφερικό αίμα ($22.23\% \pm 9.762\%$, $P=0.6991$). Το ίδιο συμβαίνει και με τη συχνότητα των FOXP3+ T κυττάρων ανάμεσα στο μυελό των οστών ($49.37\% \pm 23.92\%$) και το περιφερικό αίμα ($38.27\% \pm 13.14\%$, $P=0.2403$). (Εικόνα 21 Δ, Ε). Παρόλα αυτά το ποσοστό των FOXP3+ T κυττάρων στον πληθυσμό των CD4+CD25hihi T κυττάρων είναι στατιστικά αυξημένο στο μυελό των οστών ($67.35\% \pm 12.57\%$) σε σχέση με το περιφερικό αίμα των ίδιων ασθενών ($51.03\% \pm 13.57\%$, $P<0.05$) (Εικόνα 21 ΣΤ). Ενδεικτικά αποτελέσματα της ανάλυσης που έγινε για τις παραπάνω μετρήσεις με κυτταρομετρία ροής σε ασθενείς και υγιείς φαίνονται στην Εικόνα 22.



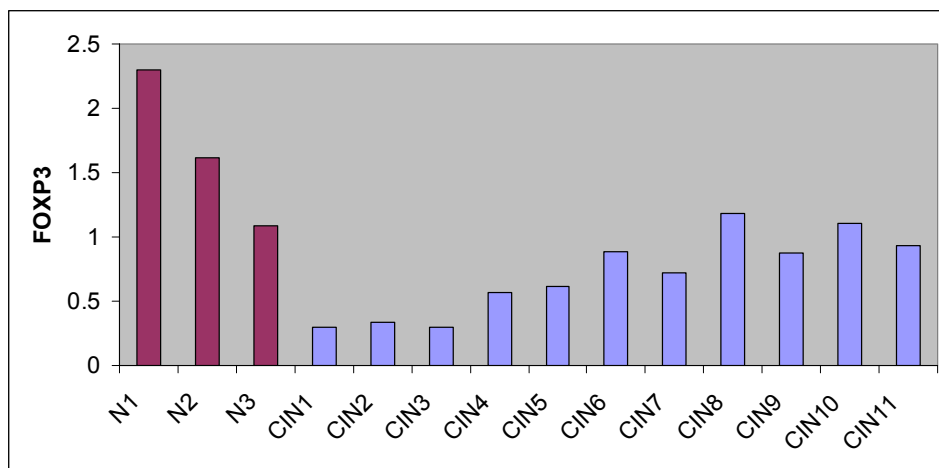
Εικόνα 21. Α, Β, Γ. Συχνότητα CD4+CD25+, CD4+CD25high και CD4+CD25highhigh T κυττάρων στο περιφερικό αίμα και στο μυελό των οστών ασθενών με CIN. **Δ, Ε, ΣΤ.** Συχνότητα των FOXP3+ κυττάρων στα CD4+CD25+, CD4+CD25high και CD4+CD25highhigh T κύτταρα στο περιφερικό αίμα και στο μυελό των οστών ασθενών με CIN. (Οι οριζόντιες γραμμές παριστάνουν τη μέση τιμή (Mean) και την τυπική απόκλιση από το μέσο (\pm SEM))



Εικόνα 22. Συχνότητες CD4+CD25high T κυτάρων και FOXP3+ T κυτάρων στον πληθυσμό των CD25high T κυτάρων στο περιφερικό αίμα και στο μυελό των οστών ασθενών με CIN. (Τα ποσοστά υπολογίστηκαν με κυτταρομετρία ροής των μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος χρησιμοποιώντας CD4-PC5, CD25-PE και ενδοκυττάριο FOXP3-FITC μονοκλωνικά αντισώματα καθώς και τα αντίστοιχα ισουτυπικά αντισώματα ελέγχου control PE και control FITC)

4.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου

Η επιβεβαίωση της μειωμένης έκφρασης του γονιδίου του ειδικού για τα φυσικά T ρυθμιστικά κύτταρα μεταγραφικού παράγοντα FOXP3 έγινε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Εικόνα 23). Απομονώθηκε mRNA από τα CD4+CD25+ T κύτταρα ασθενών με CIN καθώς και υγιών μαρτύρων. Συνολικά εξετάστηκε η έκφραση του FOXP3 στα CD4+CD25+ T κύτταρα 11 ασθενών και 3 υγιών μαρτύρων. Η κανονικοποίηση έγινε με βάση την έκφραση του γονιδίου της GAPDH. Οι ασθενείς με CIN παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση του γονιδίου του FOXP3 (0.711 ± 0.095) σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες (1.665 ± 0.349 , $P < 0.05$).



Εικόνα 23. Έκφραση του γονιδίου του FOXP3 μεταγραφικού παράγοντα στα CD4+CD25+ T κύτταρα ασθενών με CIN (n=11) και υγιών μαρτύρων (n=3).

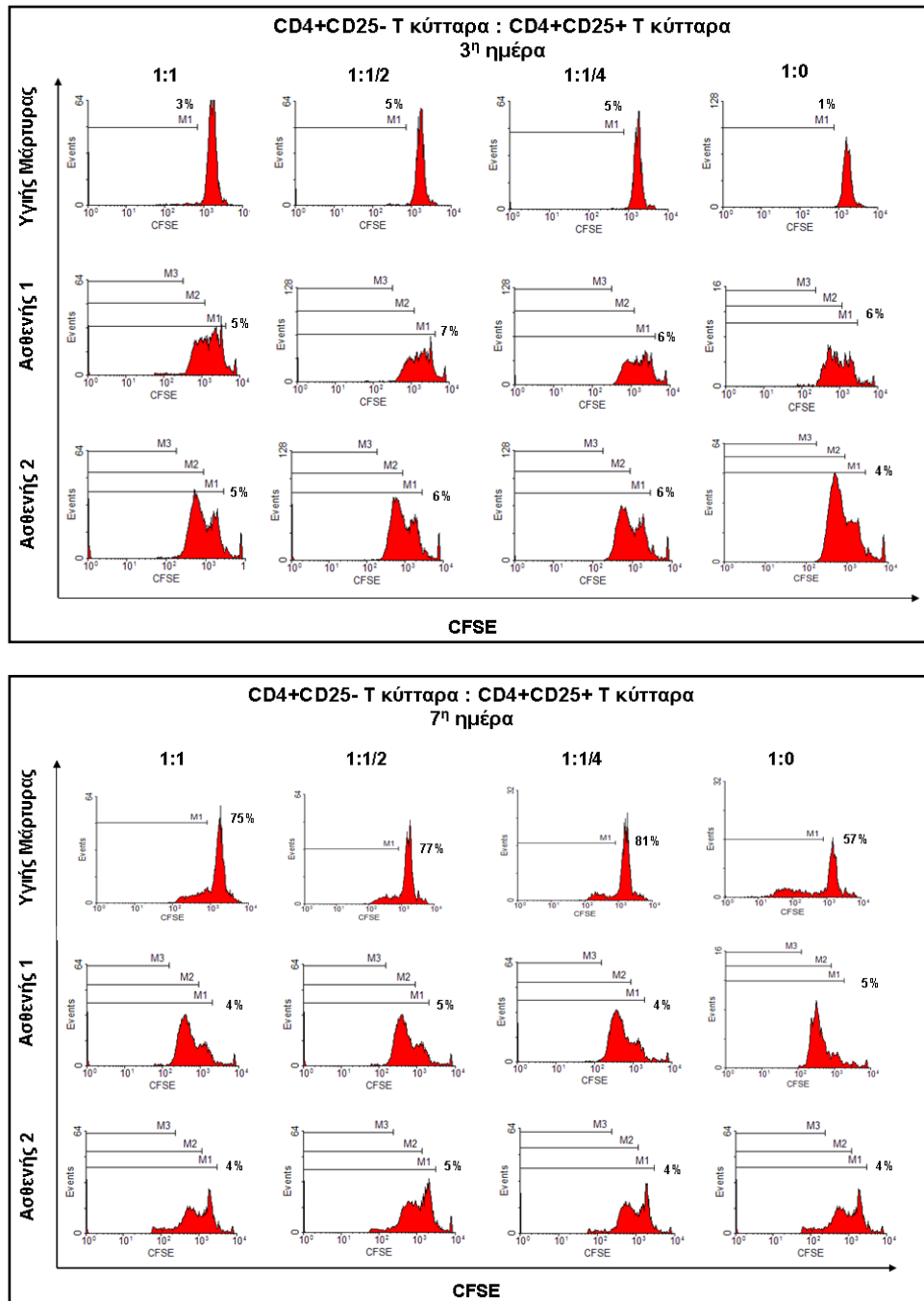
4.5 Κυτταρικές καλλιέργειες

4.5.1 Δοκιμασίες καταστολής των CD4+CD25- από τα CD4+CD25+ T κύτταρα

Σημασμένα με CFSE CD4+CD25- T κύτταρα συνκαλλιεργούνται με CD4+CD25+ T κύτταρα σε αναλογίες T δραστικά :T ρυθμιστικά κύτταρα 1:0, 1:1/4, 1:1/2 και 1:1 μαζί με αCD3 και αCD28 μονοκλωνικά αντισώματα. Εν συνεχεία, γίνεται συλλογή των κυττάρων την 3^η και 7^η μέρα μετά την επίστρωση της πλάκας και αξιολογείται η κατασταλτική ικανότητα των T ρυθμιστικών κυττάρων στα T δραστικά κύτταρα μέσω των διαδοχικών αραιώσεων που παρουσιάζει η χρωστική CFSE μετά από κάθε κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Επίσης χρησιμοποιείται μονοκλωνικό αντίσωμα κατά του CD69 επιφανειακού αντιγόνου που αποτελεί δείκτη πρώιμης ενεργοποίησης των κυτταρικών πληθυσμών.

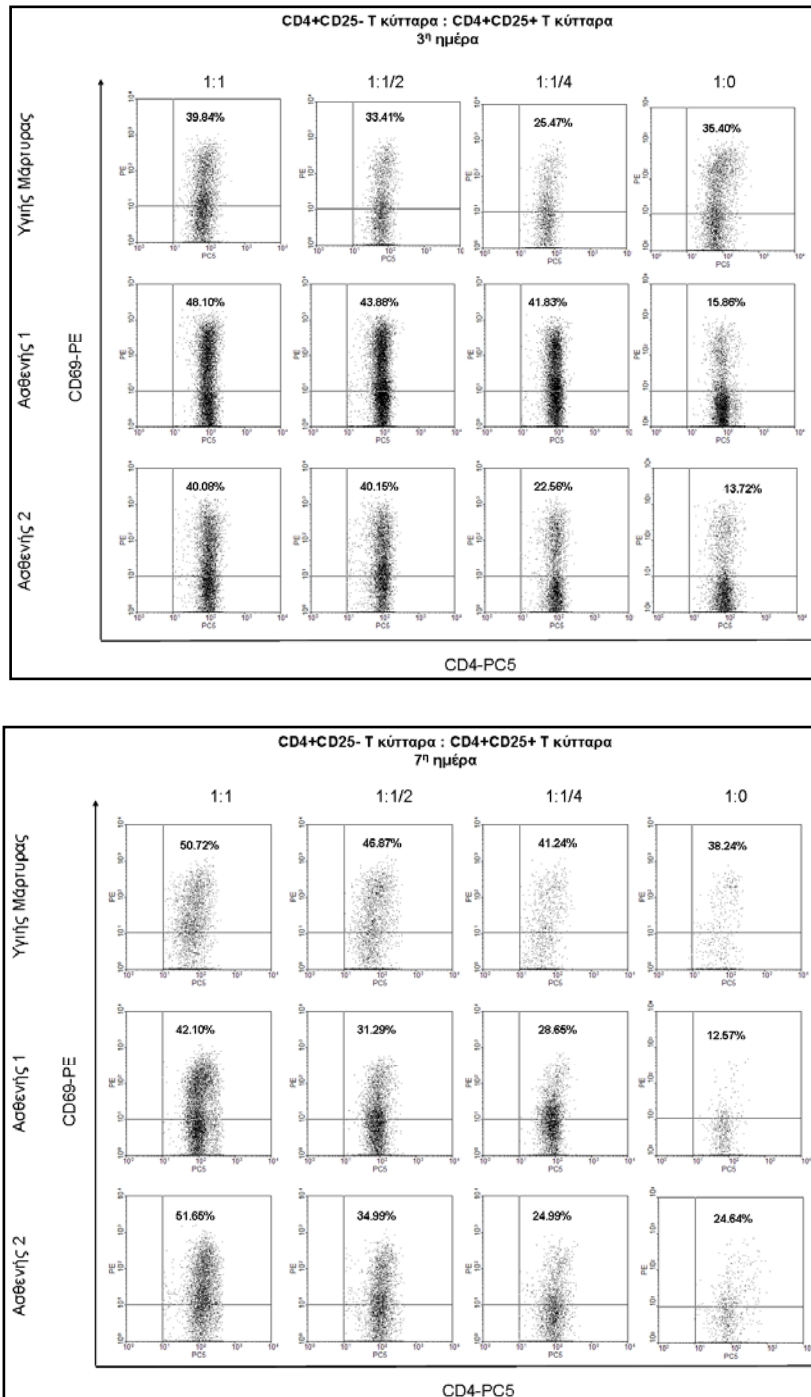
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, στους υγιείς μάρτυρες παρατηρείται καταστολή του πολλαπλασιασμού των T δραστικών κυττάρων από τα T ρυθμιστικά κύτταρα των υγιών σε όλες τις αναλογίες T δραστικά : T ρυθμιστικά κύτταρα ενώ στους ασθενείς τα T ρυθμιστικά κύτταρα αποτυγχάνουν να καταστείλουν τον πολλαπλασιασμό των T δραστικών κυττάρων. Στις εικόνες που παρουσιάζονται εδώ, το M1 αντιπροσωπεύει το ποσοστό των αδιαίρετων κυττάρων, το M2 και το M3 τη 1^η και την 2^η κυτταρικές διαιρέσεις αντίστοιχα. Όπως φαίνεται στην εικόνα 24 A και B, ένα πολύ μικρό ποσοστό (1% - 5%) των T δραστικών κυττάρων των υγιών παρουσιάζουν διαίρεση ενώ τα υπόλοιπα 95-99% (M1) παραμένουν αδιαίρετα την 3^η και 7^η ημέρα. Αντίθετα με τους υγιείς μάρτυρες, στους ασθενείς με CIN η κατασταλτική δραστηριότητα των T ρυθμιστικών κυττάρων δεν είναι το ίδιο αποτελεσματική. Τόσο την 3^η όσο και την 7^η ημέρα της συλλογής των κυττάρων φαίνεται ξεκάθαρα η επηρεασμένη κατασταλτική ικανότητα των T ρυθμιστικών κυττάρων των ασθενών. Την 3^η ημέρα 93-96% των T δραστικών κυττάρων έχουν κίολας διαιρεθεί (M2 και M3) ενώ μόνο ένα 4-7% παραμένουν αδιαίρετα (M1). Είναι επίσης προφανές ότι τα T ρυθμιστικά κύτταρα των υγιών καταστέλλουν τα T δραστικά κύτταρα ακόμη και σε μικρές αναλογίες T δραστικά : T ρυθμιστικά κύτταρα (π.χ 1: 1/4). Η κατασταλτική

δραστηριότητα των T ρυθμιστικών κυττάρων θα έπρεπε να αυξάνεται όσο μεγαλώνει η αναλογία τους στην συνκαλλιέργεια με τα T δραστικά κύτταρα. Όπως φαίνεται στην εικόνα παρατηρείται όμοια και σε κάποιες περιπτώσεις μικρότερη καταστολή του πολλαπλασιασμού των T δραστικών κυττάρων με αυξανόμενες αναλογίες T ρυθμιστικών κυττάρων. Οι λόγοι για τους οποίους συμβαίνει αυτό είναι ακόμη υπό διερεύνηση.



Εικόνα 24. Ιστογράμματα κυτταρικού πολλαπλασιασμού με χρωστική CFSE. Δοκιμασίες κυτταρικής καταστολής των T δραστικών κυττάρων από τα T ρυθμιστικά κύτταρα σε αναλογίες 1:1, 1:1/2, 1:1/4 και 1:0 σε ασθενείς με CIN και σε υγιείς μάρτυρες **A.** την 3^η ημέρα και **B.** την 7^η ημέρα μετά την καλλιέργεια. Το M1 αναπαριστά τα αδιαίρετα κύτταρα και τα M2 και M3 την 1^η και 2^η κυτταρικές διαιρέσεις αντίστοιχα.

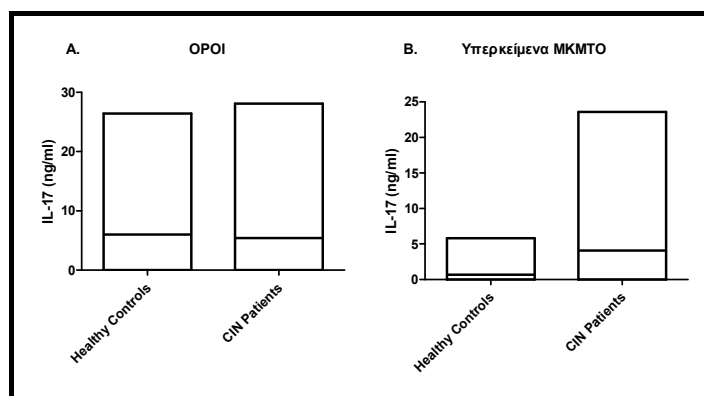
Για να παρακολουθήσουμε την ενεργοποίηση των κυττάρων μέσω της διέγερσης τους με επίστρωση της πλάκας με ανθρώπινο αCD3 και αCD28 αντισώματα χρησιμοποιήσαμε το δείκτη πρώιμης ενεργοποίησης CD69. Παρατηρείται έντονη ενεργοποίηση των κυτταρικών πληθυσμών την 1^η ημέρα (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται) η οποία μειώνεται προοδευτικά την 3^η και την 7^η ημέρα όπως είναι αναμενόμενο (Εικόνα 25 Α, Β).



Εικόνα 25. Χρήση του CD69 μορίου επιφανείας ως δείκτη πρώιμης ενεργοποίησης των κυττάρων μετά από διέγερση τους με αCD3 και αCD28 μονοκλωνικά αντισώματα στις δοκιμασίες καταστολής των Τ δραστικών κυττάρων από τα Τ ρυθμιστικά κύτταρα σε ασθενείς με CIN και υγιείς μάρτυρες **A.** την 3^η και **B.** την 7^η ημέρα από την κυτταρική καλλιέργεια

4.6 Προσδιορισμός Κυτταροκινών

Μετρήθηκε η IL-17 στον ορό και στα υπερκείμενα μακρόχρονων μυελικών καλλιέργειών σε 24 ασθενών με CIN και 8 υγιείς μάρτυρες (Εικόνα 26). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα της IL-17 του ορού μεταξύ των ασθενών (5.41 ± 7.98 ng/ml) και των υγιών μαρτύρων (5.99 ± 9.40 ng/ml, $P=0.8788$). Εντούτοις, τα επίπεδα αυτής της κυτταροκίνης ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένα στα υπερκείμενα των μακροπρόθεσμων καλλιέργειών του μυελού των οστών των ασθενών (4.09 ± 6.20 ng/ml) σε σχέση με τα επίπεδα της κυτταροκίνης στα υπερκείμενα των υγιών μαρτύρων (0.69 ± 1.82 ng/ml, $P=0.0268$).



Εικόνα 26. Μέτρηση της IL-17 στον ορό και σε υπερκείμενα μακροπρόθεσμων καλλιέργειών του μυελού των οστών σε ασθενείς με CIN (n=24) και σε υγιείς μάρτυρες (n=24)

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα Τ ρυθμιστικά κύτταρα αποτελούν μία ξεχωριστή και ιδιαίτερης σημασίας οντότητα όσον αφορά την παθοφυσιολογία πολλών νοσημάτων ανοσολογικού χαρακτήρα. Στην παραπάνω εργασία μελετήθηκαν τα ποσοτικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά των Τ ρυθμιστικών κυττάρων σε ασθενείς με Χρόνια Ιδιοπαθή Ουδετεροπενία, ένα επίκτητο ανοσολογικό σύνδρομο μυελικής ανεπάρκειας με ήπιο χαρακτήρα.

Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ποσοτικές και ποιοτικές διαταραχές των Τ ρυθμιστικών κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής τριών χρωμάτων παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της συχνότητας των FOXP3+ Τ ρυθμιστικών κυττάρων σε όλους τους υπό μελέτη υποπληθυσμούς CD4+CD25+ Τ κυττάρων - CD4+CD25+ (FI> 10¹), CD4+CD25^{high} (FI> 2 x 10¹), CD4+CD25^{highhigh} (FI> 3 x 10¹) - του περιφερικού αίματος των ασθενών με CIN σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. Παρόλα αυτά, μέτρηση των Τ ρυθμιστικών κυττάρων στο μυελό των οστών 6 ασθενών με CIN και σύγκριση με τις αντίστοιχες μετρήσεις των ίδιων ασθενών στο περιφερικό αίμα έδειξε ότι στον υποπληθυσμό των CD4+CD25^{highhigh} Τ κυττάρων (FI> 3 x 10¹) παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση του ποσοστού των FOXP3+ Τ ρυθμιστικών κυττάρων. Παρόλο που τα αποτελέσματα χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης και μεγαλύτερου αριθμού ασθενών για να επιβεβαιωθούν, εντούτοις υπονοούν μια μετακίνηση των Τ ρυθμιστικών κυττάρων από την περιφέρεια στο σημείο της φλεγμονής, το μυελό των οστών. Η μετανάστευση των Τ ρυθμιστικών κυττάρων από το περιφερικό αίμα στο μυελό των οστών αποσκοπεί στην τοπική καταστολή των διεγερμένων Τ δραστικών κυττάρων και των άλλων φλεγμονωδών διεργασιών που οδηγούν στον πρόωρο θάνατο των κοκκιοκυταρικών προβαθμίδων και κατά συνέπεια στη Χρόνια Ιδιοπαθή Ουδετεροπενία. Συνεχίζοντας τη μελέτη, έγινε προσπάθεια επιβεβαίωσης της χαμηλότερης συχνότητας των Τ ρυθμιστικών κυττάρων μετρώντας τη σχετική ποσότητα της έκφρασης του γονιδίου του FOXP3 με Real-Time PCR. Όπως ήταν αναμενόμενο, το FOXP3 γονίδιο βρέθηκε να εκφράζεται σε στατιστικά σημαντικά μειωμένες ποσότητες στα ανοσομαγνητικά απομονωμένα CD4+CD25+ Τ κύτταρα του περιφερικού αίματος ασθενών με CIN σε σχέση με την αυξημένη έκφραση του στον ίδιο κυτταρικό υποπληθυσμό στους υγιείς μάρτυρες.

Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα στην εισαγωγή, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει μια αμοιβαία αποκλειόμενη σχέση ανάμεσα στα Τ ρυθμιστικά κύτταρα και τα νεοσύστατα προφλεγμονώδη Th17 κύτταρα. Η σχέση αυτή έχει αποδειχθεί στα ποντίκια αλλά παραμένει να τεκμηριωθεί και στον άνθρωπο. Συγκεκριμένα, αύξηση της IL-6, του TGF-β και του TNF-α στο φλεγμονώδες περιβάλλον οδηγεί σε αύξηση του πληθυσμού των Th17 κυττάρων, μείωση των Τ_{reg} κυττάρων και επιδείνωση των τοπικών φλεγμονωδών διεργασιών, ενώ αύξηση μόνο του TGF-β και του TNF-α στο φλεγμονώδες περιβάλλον οδηγεί σε αύξηση του Τ ρυθμιστικού κυτταρικού πληθυσμού με αντίστοιχη μείωση του Th17 κυτταρικού πληθυσμού και καταστολή της τοπικής φλεγμονής. Από προηγούμενες μελέτες που έχουν γίνει στο εργαστήριο μας, έχουν βρεθεί αυξημένα τα επίπεδα της του TGF-β, του TNF-α καθώς και της IL-6 στα υπερκείμενα των μακροπρόθεσμων καλλιέργειών του μυελού των οστών. Με βάση τα παραπάνω δεδομένα,

υποθέσαμε ορθά ότι τα ποσά της IL-17 θα είναι επίσης αυξημένα στο μυελό των οστών αποδεικνύοντας έμμεσα ποσοτική αύξηση των Th17 προφλεγμονωδών κυττάρων στους ασθενείς αυτούς. Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της ELISA βρέθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων της IL-17 στα υπερκείμενα των μακροπρόθεσμων καλλιιεργειών του μυελού των οστών στους ασθενείς με CIN σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες ενώ παρόμοια ποσά της κυτταροκίνης βρέθηκαν στον ορό υγιών μαρτύρων και ασθενών. Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε τόσο την εμπλοκή ενός νέου κυτταρικού πληθυσμού στη Χρόνια Ιδιοπαθή Ουδετεροπενία όσο και την πιθανή μειωμένη μετανάστευση των T ρυθμιστικών κυττάρων στο φλεγμονώδες μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών λόγω της αποίκισης του από τους Th17 φλεγμονώδεις διαμεσολαβητες με αποτέλεσμα την ανεπαρκή και μη αποτελεσματική καταστολή της φλεγμονώδους διεργασίας στο μυελό των οστών των ασθενών με τη νόσο αυτή. Για την επιβεβαίωση της ύπαρξης και υπερανάπτυξης του Th17 κυτταρικού υποπληθυσμού είναι απαραίτητη η μέτρηση των Th17 κυττάρων στο μυελό των οστών ασθενών και υγιών μαρτύρων με κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιώντας ενδοκυττάριο μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της IL-17.

Τέλος, πέρα από τις ποσοτικές διαφορές των T ρυθμιστικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα και το μυελό των οστών των ασθενών με Χρόνια Ιδιοπαθή Ουδετεροπενία εκτελέσαμε δοκιμασίες κυτταρικής καταστολής χρησιμοποιώντας ανοσομαγνητικά διαχωρισμένα CD4+CD25+ T ρυθμιστικά κύτταρα και CD4+CD25- T δραστικά κύτταρα σε διάφορες αναλογίες (1:1, 1:1/2, 1:1/4 και 1:0. χρησιμοποιώντας τη χρωστική CFSE ως δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Στις δοκιμασίες κυτταρικής καταστολής των CD4+CD25- T δραστικών κυττάρων από τα CD4+CD25+ T ρυθμιστικά κύτταρα ήταν προφανής η μειωμένη κατασταλτική ικανότητα των T ρυθμιστικών κυττάρων των ασθενών κυρίως την 3^η ημέρα της κυτταρικής συνκαλλιέργειας σε αντίθεση με τα T ρυθμιστικά κύτταρα των υγιών που καταστέλλουν αποτελεσματικά τα T δραστικά κύτταρα. Την 7^η ημέρα παρατηρείται και πάλι εντονότερη καταστολή των T δραστικών κυττάρων από τους υγιείς σε σχέση με τους ασθενείς αλλά παρατηρείται ταυτόχρονα και μεγαλύτερη απόπτωση για αυτό είναι καλύτερο να αξιολογούμε τα αποτελέσματα των δοκιμασιών αυτών την 3^η ημέρα της κυτταρικής καλλιέργειας. Παραμένει να διασαφηνιστεί αν η κατασταλτική ικανότητα των T ρυθμιστικών κυττάρων έναντι στα T δραστικά κύτταρα είναι δόσοεξαρτώμενη, δηλαδή αυξάνεται με την αύξηση της αναλογίας των T ρυθμιστικών κυττάρων στην καλλιέργεια.

Τα T ρυθμιστικά κύτταρα ενέχονται στην παθοφυσιολογία της Χρόνιας Ιδιοπαθούς Ουδετεροπενίας. Παρουσιάζουν τόσο ποσοτικές και αριθμητικές όσο και ποιοτικές διαταραχές της λειτουργίας τους. Η μειωμένη συχνότητα τους σε συνεργασία με τη μειωμένη κατασταλτική τους ικανότητα έχει σαν αποτέλεσμα την μη ικανοποιητική καταστολή των ενεργοποιημένων δραστικών κυττάρων που βρίσκονται στο μυελό των οστών. Η μετανάστευση τους προς το μυελό των οστών σε μια προσπάθεια καταστολής της τοπικής φλεγμονής και των ενεργοποιημένων T δραστικών κυττάρων αποτυγχάνει λόγω της αποίκισης του μυελού των οστών από προφλεγμονώδη Th17 κύτταρα. Για την επιβεβαίωση των ευρημάτων αυτών είναι απαραίτητη η επανάληψη των πειραματικών διεργασιών σε μεγαλύτερο δείγμα ασθενών καθώς και η εξακρίβωση αν η δυσλειτουργία και η αριθμητική μείωση των T ρυθμιστικών κυττάρων οφείλεται στη νόσο ή αν συμβαίνει πρωτογενώς και

οδηγεί στην ανάπτυξη της νόσου. Για το σκοπό αυτό η έρευνα μας θα συνεχιστεί για να διαλευκανθούν οι παράγοντες που οδηγούν στην απώλεια της ανοσορυθμιστικής ικανότητας του οργανισμού και την παθογένεια της νόσου. Επιπλέον, θα διερευνηθεί αν με την προσθήκη μονοκλωνικού αντισώματος κατά της IL-6 παρεμποδίζεται η παραγωγή IL-17, άρα μειώνεται και ο αριθμός των Th17 κυττάρων μειώνοντας την τοπική φλεγμονή, αποκαθιστώντας τη ανοσολογική ομοιόσταση στο μυελό των οστών. Η κλινική σημασία ενός τέτοιου ευρήματος είναι πολύ μεγάλη αφού η χρήση του αντι-IL16 μονοκλωνικού αντισώματος αποτελεί πιθανό θεραπευτικό στόχο για τη θεραπεία της Χρόνιας Ιδιοπαθούς Ουδετεροπενίας.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Mays, L.E. and Y.H. Chen, *Maintaining immunological tolerance with Foxp3*. Cell Res, 2007. 17(11): p. 904-18.
2. Ziegler, S.F., *FOXP3: not just for regulatory T cells anymore*. Eur J Immunol, 2007. 37(1): p. 21-3.
3. Rouse, B.T., *Regulatory T cells in health and disease*. J Intern Med, 2007. 262(1): p. 78-95.
4. Kang, S.M., Q. Tang, and J.A. Bluestone, *CD4+CD25+ regulatory T cells in transplantation: progress, challenges and prospects*. Am J Transplant, 2007. 7(6): p. 1457-63.
5. Sakaguchi, S., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases*. J Immunol, 1995. 155(3): p. 1151-64.
6. Kim, J.M., J.P. Rasmussen, and A.Y. Rudensky, *Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice*. Nat Immunol, 2007. 8(2): p. 191-7.
7. Banham, A.H., F.M. Powrie, and E. Suri-Payer, *FOXP3+ regulatory T cells: Current controversies and future perspectives*. Eur J Immunol, 2006. 36(11): p. 2832-6.
8. Huehn, J., et al., *Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4+ regulatory T cells*. J Exp Med, 2004. 199(3): p. 303-13.
9. Liu, W., et al., *CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells*. J Exp Med, 2006. 203(7): p. 1701-11.
10. Hori, S. and S. Sakaguchi, *Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells*. Microbes Infect, 2004. 6(8): p. 745-51.
11. Tai, X., et al., *CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2*. Nat Immunol, 2005. 6(2): p. 152-62.
12. Wang, J., et al., *Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells*. Eur J Immunol, 2007. 37(1): p. 129-38.
13. Allan, S.E., et al., *Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production*. Int Immunol, 2007. 19(4): p. 345-54.
14. Nik Tavakoli, N., et al., *Forkhead box protein 3: Essential immune regulatory role*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. 40(11): p. 2369-73.
15. Wu, Y., et al., *FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT*. Cell, 2006. 126(2): p. 375-87.
16. Marson, A., et al., *Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation*. Nature, 2007. 445(7130): p. 931-5.
17. Bacchetta, R., et al., *Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations*. J Clin Invest, 2006. 116(6): p. 1713-22.
18. Brunkow, M.E., et al., *Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurf mouse*. Nat Genet, 2001. 27(1): p. 68-73.

19. Ziegler, S.F., *FOXP3: of mice and men*. *Annu Rev Immunol*, 2006. 24: p. 209-26.
20. Lim, H.W., et al., *Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells*. *J Immunol*, 2005. 175(7): p. 4180-3.
21. Thornton, A.M. and E.M. Shevach, *Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific*. *J Immunol*, 2000. 164(1): p. 183-90.
22. Azuma, T., et al., *Human CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress NKT cell functions*. *Cancer Res*, 2003. 63(15): p. 4516-20.
23. Thornton, A.M. and E.M. Shevach, *CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production*. *J Exp Med*, 1998. 188(2): p. 287-96.
24. Suvas, S., et al., *CD4+CD25+ T cells regulate virus-specific primary and memory CD8+ T cell responses*. *J Exp Med*, 2003. 198(6): p. 889-901.
25. Miyara, M. and S. Sakaguchi, *Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression*. *Trends Mol Med*, 2007. 13(3): p. 108-16.
26. Fallarino, F., et al., *The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells*. *J Immunol*, 2006. 176(11): p. 6752-61.
27. Kingsley, C.I., et al., *CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses*. *J Immunol*, 2002. 168(3): p. 1080-6.
28. Nakamura, K., et al., *TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice*. *J Immunol*, 2004. 172(2): p. 834-42.
29. Fontenot, J.D., et al., *A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells*. *Nat Immunol*, 2005. 6(11): p. 1142-51.
30. Setoguchi, R., et al., *Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization*. *J Exp Med*, 2005. 201(5): p. 723-35.
31. Grossman, W.J., et al., *Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death*. *Immunity*, 2004. 21(4): p. 589-601.
32. Fossiez, F., et al., *T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines*. *J Exp Med*, 1996. 183(6): p. 2593-603.
33. Veldhoen, M., et al., *TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells*. *Immunity*, 2006. 24(2): p. 179-89.
34. Bettelli, E., et al., *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells*. *Nature*, 2006. 441(7090): p. 235-8.
35. Mangan, P.R., et al., *Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage*. *Nature*, 2006. 441(7090): p. 231-4.
36. Weaver, C.T., et al., *Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties*. *Immunity*, 2006. 24(6): p. 677-88.

37. Saruta, M., et al., *Characterization of FOXP3+CD4+ regulatory T cells in Crohn's disease*. Clin Immunol, 2007. 125(3): p. 281-90.
38. Yu, Q.T., et al., *Expression and functional characterization of FOXP3+ CD4+ regulatory T cells in ulcerative colitis*. Inflamm Bowel Dis, 2007. 13(2): p. 191-9.
39. Hellings, N., J. Raus, and P. Stinissen, *Insights into the immunopathogenesis of multiple sclerosis*. Immunol Res, 2002. 25(1): p. 27-51.
40. Viglietta, V., et al., *Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis*. J Exp Med, 2004. 199(7): p. 971-9.
41. Venken, K., et al., *Secondary progressive in contrast to relapsing-remitting multiple sclerosis patients show a normal CD4+CD25+ regulatory T-cell function and FOXP3 expression*. J Neurosci Res, 2006. 83(8): p. 1432-46.
42. Venken, K., et al., *Compromised CD4+ CD25(high) regulatory T-cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression at the single-cell level*. Immunology, 2008. 123(1): p. 79-89.
43. Valencia, X., et al., *Deficient CD4+CD25high T regulatory cell function in patients with active systemic lupus erythematosus*. J Immunol, 2007. 178(4): p. 2579-88.
44. Valencia, X., et al., *TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells*. Blood, 2006. 108(1): p. 253-61.
45. Behrens, F., et al., *Imbalance in distribution of functional autologous regulatory T cells in rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2007. 66(9): p. 1151-6.
46. Bisikirska, B.C. and K.C. Herold, *Regulatory T cells and type 1 diabetes*. Curr Diab Rep, 2005. 5(2): p. 104-9.
47. Kukreja, A., et al., *Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes*. J Clin Invest, 2002. 109(1): p. 131-40.
48. Lindley, S., et al., *Defective suppressor function in CD4(+)/CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes*. Diabetes, 2005. 54(1): p. 92-9.
49. Brusko, T.M., et al., *Functional defects and the influence of age on the frequency of CD4+ CD25+ T-cells in type 1 diabetes*. Diabetes, 2005. 54(5): p. 1407-14.
50. Brusko, T., et al., *No alterations in the frequency of FOXP3+ regulatory T-cells in type 1 diabetes*. Diabetes, 2007. 56(3): p. 604-12.
51. Young, N.S., R.T. Calado, and P. Scheinberg, *Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia*. Blood, 2006. 108(8): p. 2509-19.
52. Solomou, E.E., et al., *Deficient CD4+ CD25+ FOXP3+ T regulatory cells in acquired aplastic anemia*. Blood, 2007. 110(5): p. 1603-6.
53. Palmblad, J. and H.A. Papadaki, *Chronic idiopathic neutropenias and severe congenital neutropenia*. Curr Opin Hematol, 2008. 15(1): p. 8-14.
54. Papadaki, H.A., et al., *Increased frequency of HLA-DRB1*1302 haplotype in patients with nonimmune chronic idiopathic neutropenia of adults*. Blood, 2001. 97(2): p. 580-1.

55. Papadaki, H.A., J. Palmblad, and G.D. Eliopoulos, *Non-immune chronic idiopathic neutropenia of adult: an overview*. Eur J Haematol, 2001. 67(1): p. 35-44.
56. Karlstrom, R., R. Gustafson, and J. Palmblad, *Chronic mild neutropenia in adults: relation to IgG3 deficiency and infection susceptibility*. J Intern Med, 2001. 250(4): p. 342-7.
57. Papadaki, H.A., et al., *Increased serum IgA and decreased IgG3 strongly correlate with increased serum TGF-beta1 levels in patients with nonimmune chronic idiopathic neutropenia of adults*. Eur J Haematol, 2000. 65(4): p. 237-44.
58. Papadaki, H.A., et al., *Chronic idiopathic neutropenia of adults is associated with decreased bone mineral density and alterations in bone turnover biochemical markers*. Eur J Haematol, 1999. 62(5): p. 311-6.
59. Auner, H.W., et al., *Two case studies of chronic idiopathic neutropenia preceding acute myeloid leukaemia*. Br J Haematol, 1999. 105(2): p. 431-3.
60. Megalakaki, A., et al., *Chronic idiopathic neutropenia preceding polymyalgia rheumatica and acute myeloid leukemia*. Ann Hematol, 2004. 83(12): p. 791-2.
61. Papadaki, H.A., et al., *Two patients with nonimmune chronic idiopathic neutropenia of adults developing acute myeloid leukemia with aberrant phenotype and complex karyotype but no mutations in granulocyte colony-stimulating factor receptor*. Ann Hematol, 2002. 81(1): p. 50-4.
62. Papadaki, H.A., et al., *Acute myeloid/NK precursor cell leukemia with trisomy 4 and a novel point mutation in the extracellular domain of the G-CSF receptor in a patient with chronic idiopathic neutropenia*. Ann Hematol, 2004. 83(6): p. 345-8.
63. Pontikoglou, C., et al., *Evidence for downregulation of erythropoietin receptor in bone marrow erythroid cells of patients with chronic idiopathic neutropenia*. Exp Hematol, 2006. 34(10): p. 1312-22.
64. Psyllaki, M., et al., *Impaired megakaryopoiesis in patients with chronic idiopathic neutropenia is associated with increased transforming growth factor beta1 production in the bone marrow*. Br J Haematol, 2006. 134(6): p. 624-31.
65. Papadaki, H.A. and G.D. Eliopoulos, *Selective loss of peripheral blood CD45RO+ T lymphocytes correlates with increased levels of serum cytokines and endothelial cell-derived soluble cell adhesion molecules in patients with chronic idiopathic neutropenia of adults*. Ann Hematol, 1998. 77(4): p. 153-9.
66. Papadaki, H.A., et al., *Impaired granulocytopoiesis in patients with chronic idiopathic neutropenia is associated with increased apoptosis of bone marrow myeloid progenitor cells*. Blood, 2003. 101(7): p. 2591-600.
67. Papadaki, H.A., K. Giouremou, and G.D. Eliopoulos, *Low frequency of myeloid progenitor cells in chronic idiopathic neutropenia of adults may be related to increased production of TGF-beta1 by bone marrow stromal cells*. Eur J Haematol, 1999. 63(3): p. 154-62.
68. Papadaki, H.A. and G.D. Eliopoulos, *Enhanced neutrophil extravasation may be a contributing factor in the determination of*

- neutropenia in patients with chronic idiopathic neutropenia of adults.* Eur J Haematol, 1998. 61(4): p. 272-7.
69. Koumaki, V., et al., *Pro-inflammatory bone marrow milieu in patients with chronic idiopathic neutropenia is associated with impaired local production of interleukin-10.* Br J Haematol, 2006. 135(4): p. 570-3.
70. Papadaki, H.A., et al., *Activated T-lymphocytes with myelosuppressive properties in patients with chronic idiopathic neutropenia.* Br J Haematol, 2005. 128(6): p. 863-76.