



ΠΑΡΑΔΟΤΕΟ: Π.5.5

«ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΜΑΚΡΟΦΑΓΩΝ (ΑΝΑΦΟΡΑ)»

για το ΥΠΟΕΡΓΟ 1 της Πράξης:

**«ΘΑΛΗΣ- Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας
Αθηνών- Ωρίμανση της μη ειδικής ανοσίας: επιρροή των
λοιμώξεων και ρόλος τους στην ανάπτυξη ατοπίας και
άσθματος» (MIS 377047)**

του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση»

Επιστημονικός Υπεύθυνος Πράξης και Υπεύθυνος Υποέργου 1:
Ανδρέακος Ευάγγελος

Επιμέλεια σύνταξης εγγράφου:

ΑΝΔΡΕΑΚΟΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ

ΚΟΛΤΣΙΔΑ ΟΥΡΑΝΙΑ

ΓΑΛΑΝΗ ΙΩΑΝΝΑ

ΜΟΥΡΑΤΗΣ ΜΑΡΙΟΣ- ΑΓΓΕΛΟΣ

ΕΛΕΜΗΝΙΑΔΟΥ ΕΥΡΥΔΙΚΗ

ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΙΑ ΒΑΣΙΛΙΚΗ-ΓΕΩΡΓΙΑ

ΣΤΕΛΙΟΣ ΨΑΡΡΑΣ



Η προαναφερθείσα συγχρηματοδοτούμενη πράξη ΕΚΤ-ΕΣΠΑ 2007-2013 έχει ως σκοπό να εξετάσει την υπόθεση ότι η ελαττωματική ωρίμανση της φυσικής ανοσίας νωρίς στη ζωή, επηρεαζόμενη από λοιμώξεις, συμβάλλει στην ανάπτυξη αλλεργικών παθήσεων του αναπνευστικού συστήματος.

Στόχοι της πράξης είναι να περιγραφεί η ωρίμανση της φυσικής ανοσίας σε υγιείς και ασθματικούς δότες, να διευκρινιστεί η επιρροή των λοιμώξεων στην ωρίμανση της φυσικής ανοσίας και την ανάπτυξη/επιμονή αλλεργικών αντιδράσεων στους αεραγωγούς, να προσδιοριστεί η συσχέτιση ιϊκών λοιμώξεων με τη μικροβιακή αποικιοποίηση του ανώτερου αναπνευστικού και να αποσαφηνιστεί ο ρόλος του αναπνευστικού επιθηλίου και την αναδόμησης των αεραγωγών στην ανάπτυξη αλλεργίας και άσθματος. Σκοπός του προγράμματος είναι να αποκαλύψει σημαντικές βιολογικές διαδικασίες που ενεργοποιούνται στα πρώτα στάδια της ζωής και συμβάλλουν στην ανάπτυξη αλλεργικών παθήσεων του αναπνευστικού συστήματος με σημαντική διαγνωστική και θεραπευτική σημασία.

Στο πλαίσιο της πράξης, υλοποιείται το Υποέργο 1 με τίτλο «Ωρίμανση της μη-ειδικής ανοσίας: επιρροή των λοιμώξεων και ρόλος τους στην ανάπτυξη ατοπίας και άσθματος» και θα εκτελεστούν οκτώ (8) Δράσεις.

Το παρόν παραδοτέο 5.5 αποτελεί μέρος της **Δράσης 5: «Επιρροή της ηλικιακής ωρίμανσης ανοσιακών αποκρίσεων στην ανάπτυξη αλλεργικής ευαισθητοποίησης και άσθματος σε πειραματικά μοντέλα μυών»** και περιλαμβάνει την πορεία ωρίμανσης της μη ειδικής ανοσίας του ανοσοποιητικού συστήματος των μυών από τη γέννηση μέχρι την ενηλικίωσή τους.

Συγκεκριμένα:

Αναπτύχθηκαν πρωτόκολλα για την ανάλυση των μακροφάγων του πνεύμονα σε νεογνικούς και ενήλικους μύες, καθώς και πρωτόκολλα καλλιέργειας κυψελιδικών μακροφάγων ενήλικων μυών. Μελετήθηκε η παρουσία των μακροφάγων σε πνεύμονα νεογνών και ενηλίκων μυών, η ικανότητα των πνευμονικών ινοβλαστών να μεταγουν ερεθίσματα επαγωγής των μονοπατιών αναδόμησης, καθώς και η σημασία της παρακρινούς επίδρασης των μακροφάγων στις βιολογικές διαδικασίες των ινοβλαστών.

Δράση 5: «Επιρροή της ηλικιακής ωρίμανσης ανοσιακών αποκρίσεων στην ανάπτυξη αλλεργικής ευαισθητοποίησης και άσθματος σε πειραματικά μοντέλα μυών»

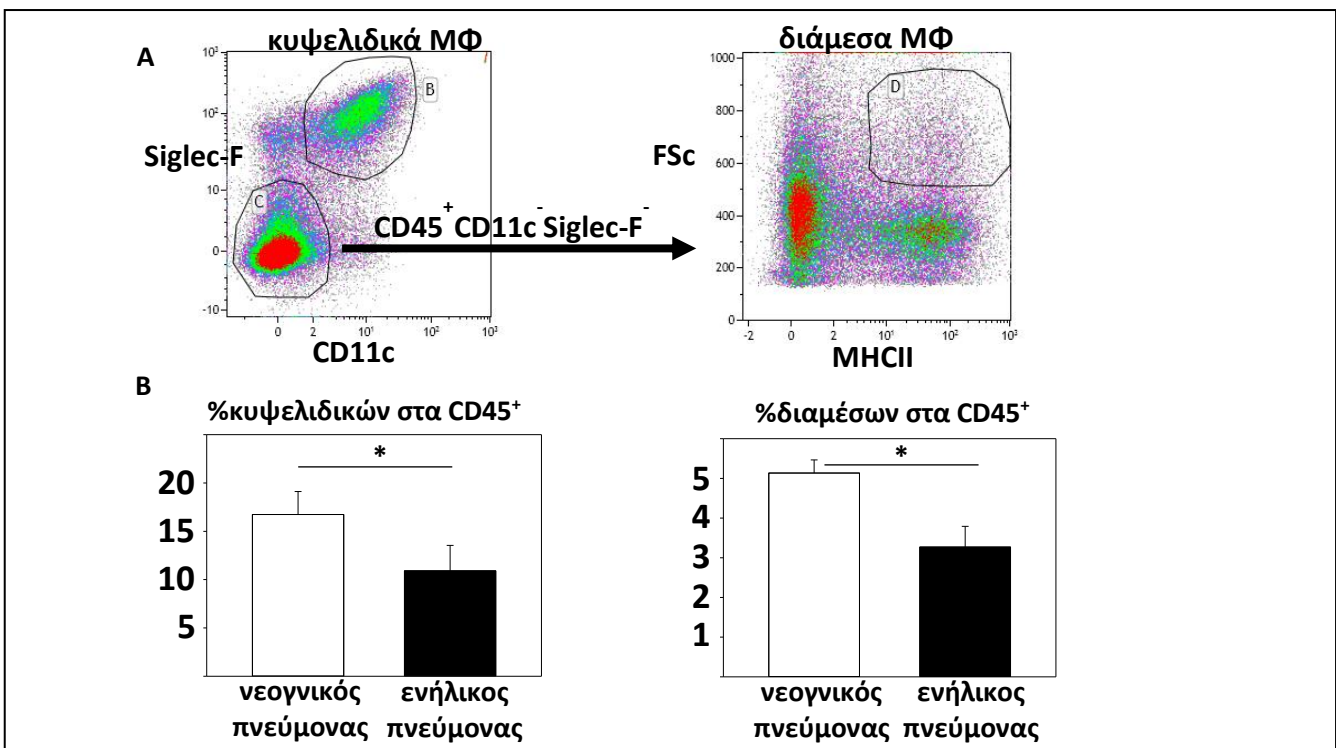
5.4 Ρόλος των πνευμονικών μακροφάγων στην ανάπτυξη μεταλοιμώδους πειραματικού άσθματος

Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν την κεντρική συνεισφορά των μακροφάγων και της κατάστασης ενεργοποίησης στην οποία ανήκουν σε μια συγκεκριμένη χρονική στιγμή (φλεγμονώδης τύπου M1, εναλλακτική τύπου M2 και οι υποκατηγορίες τους) στην ιστική ομοιόσταση και τις διεργασίες της φλεγμονής και της αποδρομής της, καθώς και της αναδόμησης (remodeling) που ακολουθούν την εξωγενή αλλά και ενδογενή προσβολή του ιστού. Στο μεταλοιμώδες άσθμα που αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα των παραπάνω, ο ρόλος των μακροφάγων δεν έχει διευκρινισθεί. Επιπλέον όσες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί επικεντρώνονται κυρίως στο ρόλο των μακροφάγων στην έναρξη και αποδρομή της φλεγμονής και όχι στην αναδόμηση του πνεύμονα, αν και ο ρόλος της τελευταίας φαίνεται να είναι ιδιαίτερα σημαντικός και σύνθετος. Η αναγνώριση της ύπαρξης δύο τουλάχιστον τοπολογικά διακριτών υποπληθυσμών μακροφάγων στον πνεύμονα (διάμεσα και κυψελιδικά), που μπορεί να περιπλακεί ακόμα περισσότερο αν αποκαλυφθούν και στον πνεύμονα, όπως έγινε πρόσφατα σε άλλα όργανα, πολλαπλοί υποπληθυσμοί εμβρυϊκής ή ενήλικης προέλευσης και διακριτών ιδιοτήτων, δυσχεραίνει περαιτέρω τη λειτουργική ανάλυση.

Ο στόχος είναι να μελετηθεί η ενδεχόμενη μεταβολή των χαρακτηριστικών των μακροφάγων υπό την επιρροή ιογενών λοιμώξεων στην αλλεργική φλεγμονή σε διαφορετικές ηλικιακές περιόδους και να συσχετιστεί με την ανάπτυξη αλλεργικού άσθματος αλλά και των χαρακτηριστικών ιστικής αναδόμησης που αποτελούν μέρος της παθοφυσιολογίας του.

Για το σκοπό αυτό, αναλύθηκαν αρχικά με τη βοήθεια κυτταρομετρίας ροής οι δύο τοπολογικά διακριτοί τύποι πνευμονικών μακροφάγων (κυψελιδικά και διάμεσα) σε νεογνικούς και ενήλικους μύες. Για την ανάλυση αυτή χρησιμοποιήθηκε πληθώρα δεικτών επιφανείας με πρωτόκολλα πολλαπλής χρώσης και στηρίχθηκαν σε περιγραφόμενα στη βιβλιογραφία χαρακτηριστικά των πνευμονικών ανοσοκυττάρων για τα οποία πάντως δεν υπάρχει απόλυτη συμφωνία, ενώ πολλοί από τους δείκτες εκφράζονται και σε παρόμοιας κατανομής μεγέθους/κοκκίωσης κύτταρα δυσχαιρένοντας την ανάλυση. Επιπλέον δοκιμές με χαρακτηριστικούς δείκτες μακροφάγων, όπως το F4/80, δεν βοήθησαν την ταυτοποίηση των πληθυσμών στο εργαστήριό μας (παρά τη χρήση διαφορετικών εμπορικά διαθέσιμων κλώνων του αντισώματος), ενώ ενδοκυττάρια χρώσεις (CD68)

ή η ιδιότητα αυτοφθορισμού τους χρησιμοποιήθηκαν μεν με επιτυχία, δεν επέτρεπαν όμως τον πρακτικό διαχωρισμό τους από άλλες κατηγορίες ανοσοκυττάρων (CD45⁺) λόγω του περιορισμού των επιφανειακών δεικτών κατά την πενταχρωματική ανάλυση. Η τελική επιλογή έγινε με βάση την ιδιότητα των κυψελιδικών μακροφάγων να εκφράζουν Siglec F, που είναι επίσης δείκτης ηωσινοφίλων, αλλά και CD11c, που εκφράζεται σε δενδριτικά κύτταρα, αλλά όχι σε ηωσινόφιλα. Επιπλέον, οι πληθυσμοί κυψελιδικών και διάμεσων πνευμονικών μακροφάγων ήταν δυνατόν να διαχωρισθούν λόγω της ικανότητας των τελευταίων να εκφράζουν CD11b (χαρακτηριστικός επιφανειακός δείκτης για πληθυσμούς μακροφάγων σε άλλα όργανα) και υψηλά επίπεδα MHCII (Εικόνα 1A). Έτσι, τα διάμεσα μακροφάγα (MHCII⁺SiglecF⁻CD11c⁻CD11b⁺) ανέρχονταν σε 6-8% των CD45⁺ κυττάρων στους νεογνικούς πνεύμονες και 3-4% στους ενήλικους, ενώ τα κυψελιδικά μακροφάγα (SiglecF⁺CD11c⁺CD11b⁻) εμφανίσθηκαν λιγότερα στον ενήλικο πνεύμονα σε σχέση με τον νεογνικό (Εικόνα 1B).



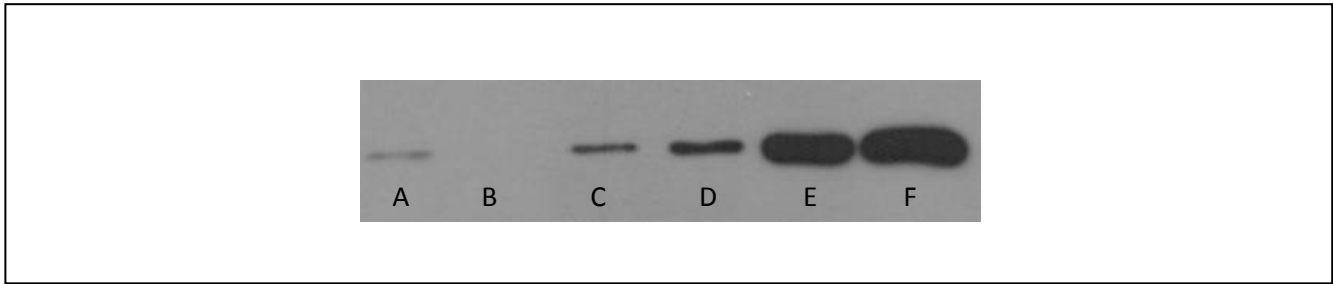
Εικόνα 1. Χαρακτηρισμός των πνευμονικών μακροφάγων με κυτταρομετρία ροής. Α. Στρατηγική διαχωρισμού των κυψελιδικών και διάμεσων μακροφάγων μετά από ενζυμική πέψη του πνεύμονα. Β. Σύγκριση των ποσοστών κυψελιδικών και διάμεσων μακροφάγων σε νεογνικούς και ενήλικους πνεύμονες.

Ο τελικός στόχος είναι η ανάλυση του επιπέδου των σχετικών υποπληθυσμών στο ενήλικο ποντίκι, το οποίο έχει εκτεθεί ως νεογνό στο μοντέλο ρινοϊικής λοίμωξης παρουσία αλλεργιογόνων, ώστε να ανιχνευθούν οι ενδεχόμενες διαφορές στην ανάπτυξη και τα χαρακτηριστικά των υποπληθυσμών σε σύγκριση με μη εκτεθειμένα ποντίκια.

Παράλληλα με τα παραπάνω αναπτύχθηκαν *in vitro* συστήματα αποτίμησης α) της ικανότητας των πνευμονικών ινοβλαστών να αποκρίνονται σε εξωγενή ερεθίσματα που ενεργοποιούν τα μονοπάτια της ιστικής αναδόμησης και ίνωσης και β) της ικανότητας των πνευμονικών μακροφάγων να ενεργοποιούν παρακρινώς τέτοια μονοπάτια στους πνευμονικούς ινοβλάστες, ως συνάρτηση μάλιστα της κατάστασης ενεργοποίησης στην οποία βρίσκονται.

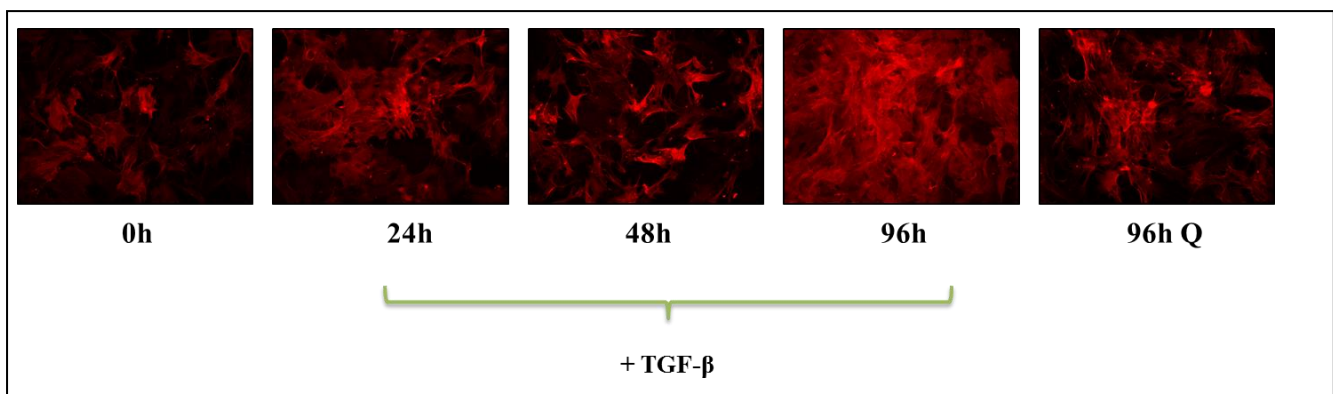
Υπό την επίδραση του TGFβ1 οι ινοβλάστες εισέρχονται σε πρόγραμμα διαφοροποίησης προς μυοϊνοβλάστες που αντανακλάται στην αυξημένη έκφραση αλλά και ενσωμάτωση α-ακτίνης λείου μυός (α-smooth muscle actin, αSMA) στον κυτταροσκελετό. Τα αυξημένα επίπεδα αSMA πρωτεΐνης υποδηλώνουν μεγαλύτερο βαθμό διαφοροποίησης προς μυοϊνοβλάστες και συνάδουν με αυξημένη ίνωση, όπως παρατηρείται στους ασθματικούς αεραγωγούς. Ο TGFβ1 είναι ο κεντρικός αυξητικός παράγων που επάγει ινωτικές διεργασίες, ενώ είναι γνωστό ότι εκκρίνεται από τύπου M2 μακροφάγα.

Πράγματι, υπό την επίδραση 5 ng/ml TGFβ1 για 48 ώρες ηρεμούντες πνευμονικοί ινοβλάστες σε θρεπτικό μέσο με χαμηλά επίπεδα ορού (0.5% FBS) αυξάνουν τα επίπεδα αSMA (Σχήμα 2, C & D), ενώ επίδραση για 48 ώρες ακόμη αυξάνει κατά πολύ περισσότερο τα επίπεδα αSMA (Σχήμα 2, E & F). Ινοβλάστες που απομονώθηκαν από την περιφέρεια του πνεύμονα (distal lung, Σχήμα 2, F & D) εμφανίζουν αυξημένη ικανότητα μετατροπής σε μυοϊνοβλάστες σε σχέση με τους ινοβλάστες από το τμήμα που βρίσκεται κοντά στα κεντρικά αγγεία και βρόγχους (proximal lung, Σχήμα 2, C & E). Κανονικοποίηση ως προς τη συνολική κυτταρική πρωτεΐνη (που αυξάνεται λόγω κυτταρικού πολλαπλασιασμού υπό την επίδραση του TGFβ1) δείχνει ότι 96 ώρες μετά την επίδραση TGFβ1 οι ινοβλάστες από την περιφέρεια του πνεύμονα μπορεί να εμφανίσουν έως και 5.5 φορές αύξηση των επιπέδων της αSMA, ενώ οι ινοβλάστες από το κεντρικό τμήμα έως και 3 περίπου φορές, σε συνάφεια με πρόσφατες μελέτες που υποδεικνύουν την ύπαρξη τοπολογικά εντοπισμένων υποπληθυσμών πνευμονικών ινοβλαστών με διαφορετική ικανότητα επαγωγής της πνευμονικής ίνωσης.



Εικόνα 2. Επαγωγή έκφρασης της α SMA σε τοπολογικά διακριτούς πνευμονικούς ινοβλάστες. Ανοσοαποτύπωμα (western blot) έναντι της πρωτεΐνης α SMA proximal (A, C, E) και distal (B, D,F) πνευμονικών ινοβλαστών ποντικού που επιστρώθηκαν σε ίση κυτταρική πυκνότητα και καλλιεργήθηκαν υπό συνθήκες εφησυχασμού (0.5% FBS) απουσία (A, B) ή παρουσία 5 ng/ml TGF β 1 για 48 (C, D) ή 96 ώρες (E, F).

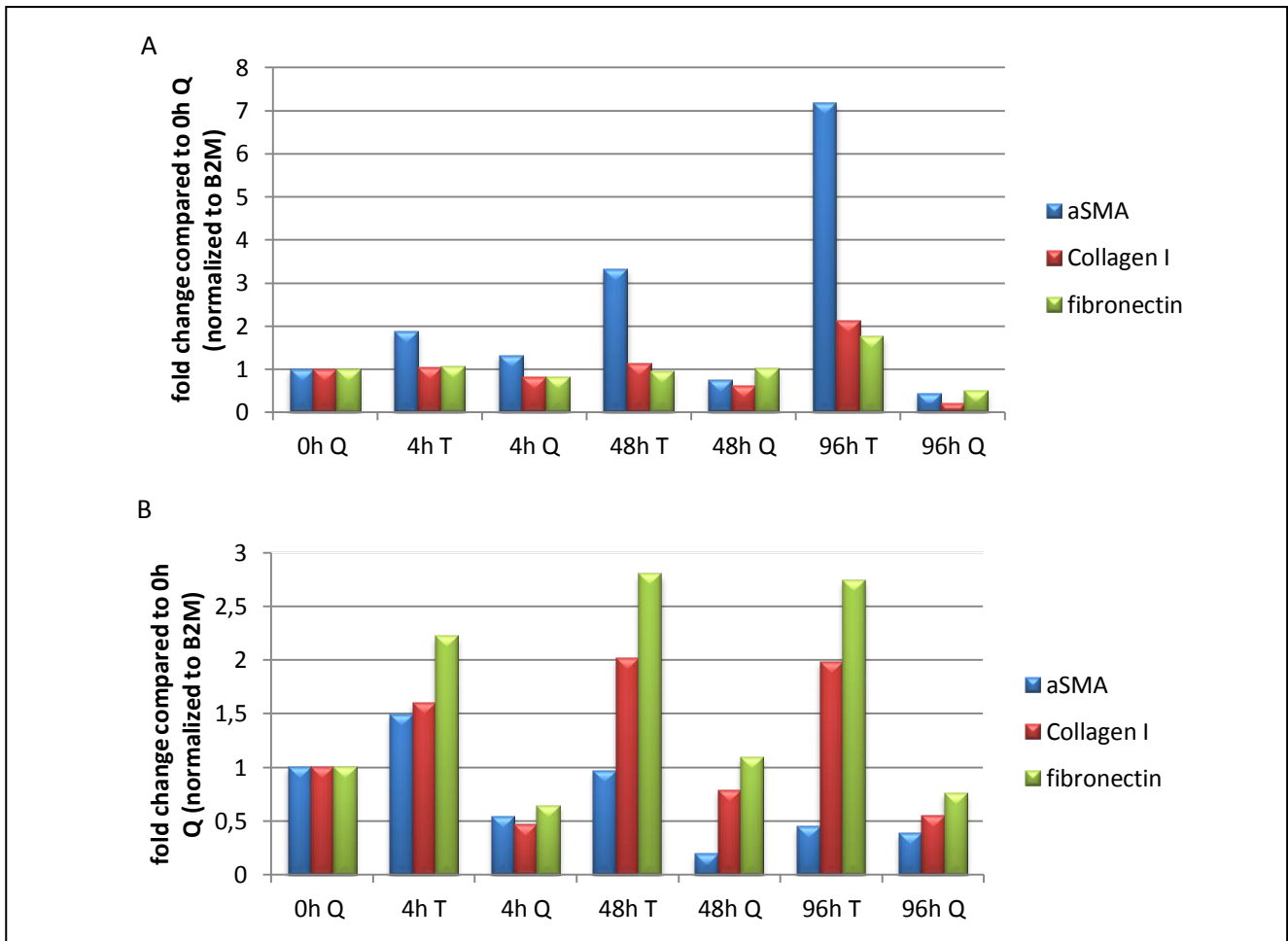
Επιπλέον, με μελέτες ανοσοφθορισμού παρατηρήθηκε ότι η ενσωμάτωση του α SMA στο κυτταροσκελετικό δίκτυο αυξάνεται στις 48 ώρες και περαιτέρω στις 96 ώρες υπό την επίδραση TGF β 1 (Εικόνα 3). Το κυτταρικό αυτό σύστημα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αποτίμηση της επίδρασης εξωγενών ερεθισμάτων π.χ. εκκρίσεων μακροφάγων.



Εικόνα 3. Επαγωγή της ενσωμάτωσης α -SMA (κόκκινο) στον κυτταροσκελετό πνευμονικών ινοβλαστών. Πνευμονικοί ινοβλάστες καλλιεργήθηκαν σε καλυπτρίδες, διατηρήθηκαν σε εφησυχασμό (0.5% FBS, quiescence, Q) για 24 ώρες και στη συνέχεια εκτέθηκαν ή όχι σε 5 ng/ml TGF β 1 έως και 96 ώρες.

Παρόμοια, υπό την επίδραση του TGF β 1 μελετήθηκε η έκφραση τόσο του α SMA, όσο και αυτού καθεαυτού του κολλαγόνου τύπου I, επαγωγή της έκφρασης του οποίου σημαίνει εξ' ορισμού επαγωγή της διεργασίας της ίνωσης, αλλά και της ινωδονεκτίνης I (fibronectin-1, FN1) που επάγεται πρόωρα σε αντίστοιχες διεργασίες. Παλαιότερες μελέτες μας είχαν δείξει ότι η κυτταρική πυκνότητα μπορεί να παίζει καθοριστικό ρόλο στην απόκριση των πνευμονικών ινοβλαστών στον TGF- β 1. Πράγματι διαπιστώθηκε ότι η απόκριση στο εξωγενές ινωτικό ερέθισμα προκαλεί επαγωγή της έκφρασης α SMA στις καλλιέργειες υψηλής πυκνότητας (100,000 κύτταρα/cm²) ενώ αντίστοιχα οι αραιές καλλιέργειες (10,000-20,000 κύτταρα/cm²) είναι κατάλληλες για την ανίχνευση της επαγωγής

της έκφρασης κολλαγόνου τύπου I και FN1 (Εικόνα 4). Είναι προς μελλοντική διευκρίνιση η βιολογική σημασία της διαφορικής αυτής απόκρισης στο περιβάλλον μεταβαλλόμενης πυκνότητας του αναδομούμενου στρώματος των ινοβλαστών του ασθματικού πνεύμονα.



Εικόνα 4. Σύστημα αποτίμησης επαγωγής της ίνωσης σε πνευμονικούς ινοβλάστες. Πυκνές (A) και αραιές (B) καλλιέργειες πνευμονικών ινοβλαστών παρέμειναν σε εφησυχασμό (0.5% FBS, quiescence, Q) για 24 ώρες και στη συνέχεια εκτέθηκαν ή όχι σε 5 ng/ml TGFβ1 (T) 4 έως και 96 ώρες και μετρήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης αSMA, προκολλαγόνου τύπου I και ινωδονεκτίνης 1 (fibronectin) με real time PCR. Η μεγαλύτερη επαγωγή υπό την επίδραση του TGFβ1 παρατηρείται για την έκφραση αSMA στις πυκνές καλλιέργειες, ενώ για το κολλαγόνο I και την ινωδονεκτίνη 1 στις αραιές καλλιέργειες.

Τέλος, χρησιμοποιήθηκε το *in vitro* μοντέλο επούλωσης της πληγής (wound scratch assay) για την αποτίμηση της επουλωτικής ικανότητας εξωγενών ερεθισμάτων. Παρουσία 10% ορού (FBS) η δημιουργούμενη τεχνητή πληγή στο τρυβλίο κυτταροκαλλιέργειας «επουλώνεται» λόγω κυτταρικού

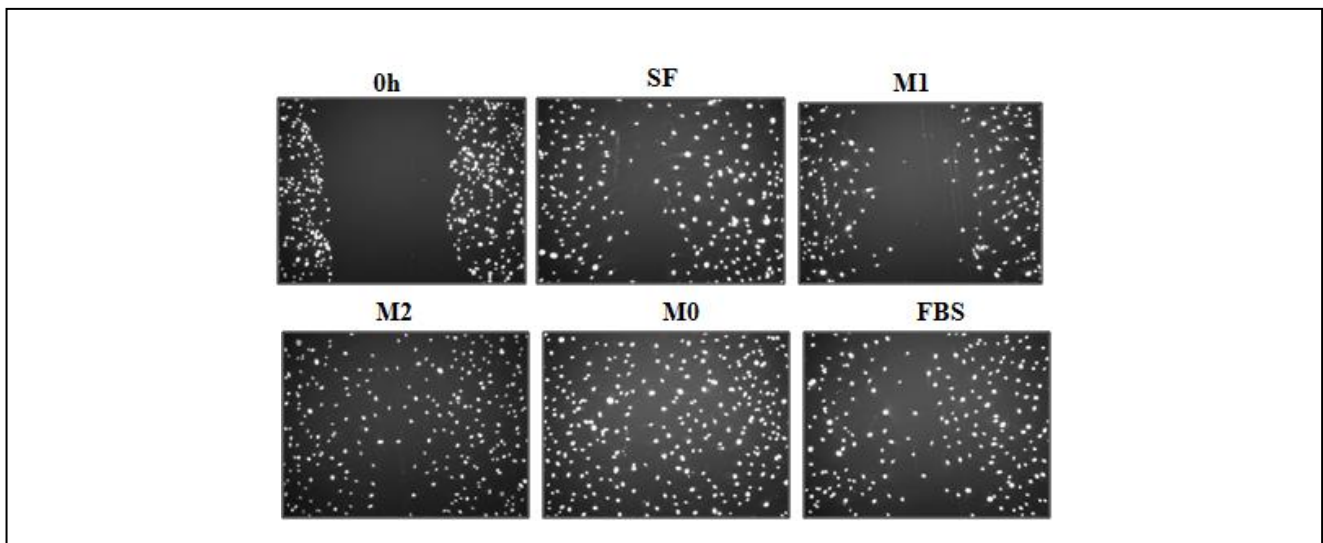
πολλαπλασιασμού ή/και μετακίνησης των πνευμονικών ινοβλαστών που βρίσκονται στα όρια της πληγής εντός 24 ωρών, ενώ στο θρεπτικό μέσο εφησυχασμού (0.5% FBS) δεν καθίσταται δυνατή η πλήρης επούλωση.

Παρακρινής επίδραση των κυψελιδικών μακροφάγων

Τα κυψελιδικά μακροφάγα αποτελούν το 80-95% του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (BAL fluid) και έχουν την ιδιότητα να προσκολλώνται στο πλαστικό των τρυβλίων κυτταροκαλλιέργειας εντός 1-2 ωρών, γεγονός που επιτρέπει τον διαχωρισμό τους από τα άλλα είδη κυττάρων. Παρόλα αυτά, τα γνωστά πρωτόκολλα συλλογής BAL αποδίδουν πολύ χαμηλούς αριθμούς μακροφάγων ανά ποντίκι, καθιστώντας αδύνατο τον εκτεταμένο πειραματισμό. Με ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο που περιλαμβάνει εκτεταμένες εκπλύσεις της τραχείας (10-15) κατέστη δυνατή η συλλογή και απομόνωση αρκετών κυψελιδικών μακροφάγων, που καλλιεργήθηκαν σε πυκνότητες 100,000 και 200,000 / cm^2 απουσία ορού και στη συνέχεια διεγέρθηκαν για 48 ώρες με τύπου M1 (100 ng/ml LPS, 100 U/ml IFN- γ), M2 (25 ng/ml IL-4), 5 ng/ml TGF β 1 (M0) ή παρέμειναν αδιέγερτα απουσία ορού (serum-free conditions; SF) και στη συνέχεια συλλέχθηκε το υπερκείμενο τους, στο οποίο εκτέθηκαν καλλιέργειες πνευμονικών ινοβλαστών, όπως περιγράφηκε παραπάνω.

Με τη χρήση του wound scratch assay παρατηρήθηκε ότι τα M2 διεγερμένα κυψελιδικά μακροφάγα επάγουν παρακρινώς τη μετακίνηση ή/και πολλαπλασιασμό των πνευμονικών ινοβλαστών σε σύγκριση με τα φλεγμονώδη M1 μακροφάγα (Εικόνα 5). Τα τελευταία επιτρέπουν μερική «επούλωση» σε σχέση με το αρχικό στάδιο (Εικόνα 5, 0h), αλλά σαφώς υστερούν έναντι ακόμη και της επούλωσης απουσία ορού (απουσία δηλαδή επουλωτικών αυξητικών παραγόντων όπως ο PDGF και ο TGF β 1, που περιέχονται στον ορό, Εικόνα 5 SF). Το αποτέλεσμα αυτό συνάδει με πρόσφατα αποτελέσματα από άλλους ιστούς όπου πράγματι τα M2 μακροφάγα φαίνεται να έχουν την ικανότητα επαγωγής ινωτικών διεργασιών και είναι σε συμφωνία με την παρατηρούμενη αυξημένη παρουσία M2 μακροφάγων σε ινωτικούς ασθματικούς αεραγωγούς. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η επαγωγή της επούλωσης από την παρακρινή δράση κυψελιδικών μακροφάγων που εκτέθηκαν σε TGF β 1 (Εικόνα 5, M0) και προσομοιάζουν προς μια υποκατηγορία των τύπου M2 μακροφάγων, των λεγόμενων επουλωτικών (M2-like, *in vitro* προσομοίωση μετά από έκθεση σε TGF β 1 ή IL-10). *In vivo*, υπό συνθήκες αυξημένης ίνωσης (και συνεπώς πιθανότατα αυξημένων επιπέδων ενεργού TGF β 1), ένας παρόμοιος υποπληθυσμός θα μπορούσε να παίζει σημαντικότατο

ρόλο στην επαγωγή μετακίνησης ή/και πολλαπλασιασμού των ινοβλαστών του στρώματος των αεραγωγών, μετάγοντας έτσι τα μονοπάτια της αναδόμησής τους.



Εικόνα 5. Παρακρινής επίδραση κυψελιδικών μακροφάγων στη μετανάστευση/πολλαπλασιασμό πνευμονικών ινοβλαστών. Καλλιέργειες πνευμονικών ινοβλαστών παρέμειναν σε εφησυχασμό (0.5% FBS) για 24 ώρες και στη συνέχεια δημιουργήθηκε *in vitro* τεχνητή «πληγή» (0h). Τα κύτταρα εκτέθηκαν για 24 ώρες σε υπερκείμενο κυψελιδικών μακροφάγων με ενεργοποίηση τύπου M1, M2, M0 ή καθόλου ενεργοποίηση (SF), και μετά από μονιμοποίηση και πυρηνική χρώση με Hoechst 33342 παρατηρήθηκε η ικανότητα ανασύστασης της καλλιέργειας.

Ο απώτερος στόχος είναι να μελετηθούν στα ανωτέρω κυτταρικά συστήματα τα εκκρίματα των πνευμονικών μακροφάγων που θα έχουν ενεργοποιηθεί/τροποποιηθεί *in vivo* στο ενήλικο ποντίκι, το οποίο έχει εκτεθεί ως νεογνό στο μοντέλο ρινοϊκής λοίμωξης παρουσία αλλεργιογόνων, ώστε να ανιχνευθούν οι ενδεχόμενες διαφορές στα χαρακτηριστικά των ιδιοτήτων επαγωγής της ίνωσης σε σύγκριση με αυτά των μη εκτεθειμένων ποντικών και να συσχετιστούν με την ανάπτυξη άσθματος.

Ιούλιος 2015, Αθήνα

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ-ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

1. Πειραματόζωα

Χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί μύες πέντε έως επτά ημερών (νεογνικοί μύες) και δύο μηνών (ενήλικοι μύες) της φυλής C57BL/6.

2. Ενζυμική πέψη του ιστού και κυτταρομετρία ροής

Έπειτα από θυσία των ζώων, συλλέχθηκαν οι πνεύμονες και πραγματοποιήθηκε πέψη παρουσία των ενζύμων κολλαγενάση I και DNase I, στους 37°C για μία ώρα. Αποκτήθηκαν εναιωρήματα πνευμονικών κυττάρων με διήθηση από φίλτρο 40μm και έπειτα από καταμέτρηση ακολούθησε χρώση των κυττάρων με διάφορους δείκτες για να αναλυθούν με κυτταρομετρία ροής.

3. Απομόνωση, καλλιέργεια και συλλογή εκκριμάτων κυψελιδικών μακροφάγων

Αναισθητοποίηση ενήλικων ποντικών και ενδοτραχειακή χορήγηση 0.5 ml 1xPBS (10 φορές) σε ενήλικους μύες. Έπειτα από λύση των ερυθρών κυττάρων, ακολούθησε επίστρωση σε τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας (48-well) σε πυκνότητα 100,000 ή 200,000/cm² και παραμονή σε επωαστικό κλίβανο κυτταροκαλλιέργειας για 1 ώρα. Ακολούθησε απομάκρυνση των μη προσκολλημένων κυττάρων και αλλαγή θρεπτικού υλικού σε ελεύθερο ορού DMEM + gentamycin. Έπειτα από παραμονή σε επωαστικό κλίβανο για 12 ώρες, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε συνθήκες διέγερσης τύπου M1 (100 ng/ml LPS, 100 U/ml IFN-γ), M2 (25 ng/ml IL-4), M0 (5 ng/ml TGFβ1) ή SF (ελεύθερου ορού DMEM). Τα υπερκείμενα συλλέχθηκαν, απομακρύνθηκαν τα κυτταρικά στοιχεία με ήπια φυγοκέντρηση (<400xg) και φυλάχθηκαν στους -70°C μέχρι τη χρήση του.

4. Απομόνωση και καλλιέργεια πνευμονικών ινοβλαστών

Ενήλικες μύες αναισθητοποιήθηκαν και θυσιάστηκαν με κρανιοαυχενική παρεκτόπιση μετά από αναισθησία. Πραγματοποιήθηκε εξαγωγή και τοποθέτηση του πνευμονικού ιστού σε ψυχρό ρυθμιστικό διάλυμα (π.χ. HBSS). Χρησιμοποιήθηκε το σύνολο των λοβών δεξιού και αριστερού πνεύμονα (σύνηθες πρωτόκολλο) ή διαχωρισμός του περιφερικού εξωτερικού τμήματος πλάτους περίπου 0.5 cm. Οι ιστοί επώαστηκαν σε 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει 0.1% collagenase IV, 0.2% trypsin και 0.4 mg/ml DNase I για 30 min/37°C υπό ανάδευση. Τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε φλάσκα κυτταροκαλλιέργειας 25 cm² και μετά από την παραμονή σε επωαστικό

κλίβανο για 12-16 ώρες, προστέθηκε φρέσκο πλήρες θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα ανακαλλιιεργήθηκαν (passaging) σε λόγο 1:2-1:3 μέχρι την χρήση τους (passage 2-4).

5. Αποτίμηση αναδομητικής ικανότητας πνευμονικών ινοβλαστών

Πνευμονικοί ινοβλάστες που καλλιιεργήθηκαν όπως παραπάνω επιστρώθηκαν με πυκνότητα $1-2 \times 10^4/\text{cm}^2$ (αραιή καλλιέργεια) ή $1 \times 10^5/\text{cm}^2$ (πυκνή καλλιέργεια) σε τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας (6-well, 24-well, 48-well) προ επιστρωμένα ή όχι με υάλινες καλυπτρίδες. Την επόμενη ημέρα αφαιρέθηκε το πλήρες θρεπτικό μέσο και αντικαταστάθηκε με θρεπτικό μέσο εφησυχασμού (quiescence, Q, DMEM+0.5% FBS). 24 ώρες αργότερα τα εφησυχάζοντα κύτταρα υπόκεινται σε wound scratch assay ή εκτίθενται σε ερεθίσματα διέγερσης των διεργασιών ίνωσης, όπως 5 ng/ml TGFβ1.

Wound scratch assay: Σε πυκνή καλλιέργεια χαράσσεται μια τεχνητή «πληγή» με τη βοήθεια ενός πλαστικού tip. 24 ώρες αργότερα τα κύτταρα μονιμοποιούνται με 10% φορμαλίνη και παρατηρούνται στο μικροσκόπιο κατά μήκος της δημιουργηθείσας «πληγής» με τη βοήθεια της πυρηνικής χρώσης Hoechst 33342. Η παρακρινής επίδραση των κυψελδικών μακροφάγων έγινε με την έκθεση των ινοβλαστών σε 50% CM κυψελδικών ινοβλαστών και 50% μέσο εφησυχασμού (τελική συγκέντρωση FBS: 0.5%)

Real time PCR: Πυκνή ή αραιή καλλιέργεια εκτέθηκε ή όχι σε 5 ng/ml TGFβ1 και 4-96 ώρες αργότερα συλλέχθηκαν τα κύτταρα σε Trizol. Ακολούθησε απομόνωση RNA και σύνθεση cDNA με standard πρωτόκολλα. Η αποτίμηση της έκφρασης προκολλαγόνου I, αSMA (ACTA2), και ινωδονεκτίνης 1 έγινε με βασιζόμενη στη SYBR Green 1 real time PCR και η κανονικοποίηση έγινε με την ανίχνευση της β2-μικρογλοβουλίνης. Για τη σχετική μεταβολή των επιπέδων έκφρασης ακολουθήθηκε η μέθοδος $-\Delta\Delta C_T$

Ανοσοφθορισμός: Εφησυχάζοντες πνευμονικοί ινοβλάστες που καλλιιεργήθηκαν σε καλυπτρίδες εκτίθεται έως και 96 ώρες σε 5 ng/ml TGFβ1 ή παρέμειναν χωρίς διέγερση. Μετά τη μονιμοποίηση τους σε ψυχρή μεθανόλη ακολούθησε χρώση έναντι του αSMA (clone 1A4, Sigma, αραιώση 1:300), ακολουθούμενο από δευτερογενές φθορίζον (κόκκινο) αντίσωμα και παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού (Leica DSRA2)

Western blot: Πνευμονικοί ινοβλάστες που καλλιιεργήθηκαν και εκτέθηκαν ή όχι σε TGFβ1 όπως παραπάνω παρελήφθησαν με τη βοήθεια πλαστικού μάκτρου, επαναιωρήθηκαν σε PBS και μετά

από ήπια φυγοκέντρηση ακολούθησε πρωτεϊνική εκχύλιση παρουσία αναστολέων των πρωτεασών. Στη συνέχεια της SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης σε 10% gel ακρυλαμιδίου προσδιορίστηκε με τη βοήθεια του αντισώματος (clone 1A4, Sigma, αραιώση 1:1000) η χαρακτηριστική ζώνη αSMA στα 42 KDa και κανονικοποιήθηκε ή σχετική της ένταση ως προς τη συνολική φόρτωση των δειγμάτων όπως αυτή αποτυπώνεται με χρώση Coomassie Brilliant Blue.