



ΠΑΡΑΔΟΤΕΟ: Π.3.2

«ΣΥΛΛΟΓΗ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ (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: ΟΜΑΔΑ ΥΠΟΕΡΓΟΥ 1

ΓΑΛΑΝΑΚΗΣ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ

ΚΟΚΚΙΝΟΥ ΔΗΜΗΤΡΑ

ΛΟΥΚΙΔΗΣ ΣΤΥΛΙΑΝΟΣ

ΜΑΓΓΙΝΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ

ΜΕΓΡΕΜΗΣ ΣΠΥΡΙΔΩΝ

ΜΠΑΚΑΚΟΣ ΠΕΤΡΟΣ

ΞΕΠΑΠΑΔΑΚΗ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ

ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

ΠΑΡΑΣΚΑΚΗΣ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ

ΡΟΥΜΠΕΔΑΚΗ ΕΙΡΗΝΗ

ΣΚΕΥΑΚΗ ΧΡΥΣΑΝΘΗ

ΤΑΚΑ ΣΤΥΛΛΙΑΝΗ



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

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 οχτώ (8) Δράσεις.

Το παρόν παραδοτέο 3.2 αποτελεί μέρος της Δράσης 3: «Μελέτη της ωρίμανσης της φυσικής ανοσίας του πνευμονικού επιθηλίου και συσχέτιση με την ανάπτυξη αλλεργίας και άσθματος» και περιλαμβάνει όλες τις ενέργειες για τη συλλογή επιθηλιακών κυττάρων του αναπνευστικού.

Συγκεκριμένα: Ολοκληρώθηκε η συλλογή δειγμάτων επιθηλιακών κυττάρων του αναπνευστικού από αλλεργικούς ασθενείς και υγιείς, μη ατοπικούς μάρτυρες αντίστοιχης ηλικίας και φύλου. Οι δότες επιθηλιακών κυττάρων (ασθενείς και μάρτυρες) προήλθαν από τη Μονάδα Αλλεργιολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας της Β΄ Παιδιατρικής κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών που εδράζεται στο Γ.Ν. Παίδων 'Π & Α Κυριακού' καθώς και από συνεργαζόμενες κλινικές του ίδιου νοσοκομείου (Παιδιατρική & ΩΡΛ κλινική).

Δράση 3:Μελέτη της ωρίμανσης της φυσικής ανοσίας του πνευμονικού επιθηλίου και συσχέτιση με την ανάπτυξη αλλεργίας και άσθματος.

3.2 Συλλογή επιθηλιακών κυττάρων του αναπνευστικού

Το υλικό της μελέτης προέρχεται από διαστρωματοποιημένη ως προς την ηλικία δειγματοληψία σε αλλεργικούς ασθενείς και υγιείς, μη ατοπικούς μάρτυρες.

Η διαστρωμάτωση ανά ηλικία για τα δείγματα των ρινικών επιθηλιακών κυττάρων είχε προβλεφθεί ως εξής:

1. Παιδιά 0 - 3 ετών
2. Παιδιά >3 - 6 ετών
3. Παιδιά >6 - 10 ετών
4. Έφηβοι >10 - 18 ετών
5. Ενήλικες >18 ετών

Σε κάθε ηλικιακή ομάδα εντάχθηκαν αλλεργικοί ασθενείς και μάρτυρες. Ο χαρακτηρισμός των δοτών πραγματοποιήθηκε με βάση το ατομικό αναμνηστικό, την αντικειμενική εξέταση και τη διενέργεια δερματικών δοκιμασιών δια νυγμού για την ανίχνευση ατοπικής ευαισθητοποίησης σε συνήθη αερο-αλλεργιογόνα.

Έγινε λήψη ρινικών επιθηλιακών κυττάρων από 68 άτομα. Τα κύτταρα αυτά καλλιεργήθηκαν μέχρι τη τρίτη γεννεά ($p=3$)σεειδικά καλλιεργητικάμέσα. Ένα ποσοστό (23%) αυτών των κυττάρων δεν κατάφεραν να καλλιεργηθούν μέχρι τη τρίτη γεννεά, λόγω ανεπάρκειας ικανοποιητικού αριθμού κυττάρων κατά τη λήψη ή δευτερευόντως λόγω επιμολύνσεων. Ο συνολικός αριθμός των ατόμων που τα κύτταρα του αναπνευστικού επιθηλίου κατάφεραν να καλλιεργηθούν είναι 45. Το ποσοστό επιτυχίας της καλλιέργειας φτάνει το 77%.

Το σύνολο των ατόμων που έχουν ενταχθεί στην μελέτη φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ	ΑΛΛΕΡΓΙΚΟΙ	ΜΗ ΑΛΛΕΡΓΙΚΟΙ	Σύνολο
Παιδιά 0 - 3 ετών	3	4	7
Παιδιά >3 - 6 ετών	5	8	13
Παιδιά >6 - 10 ετών	1	2	3
Έφηβοι >10 - 18 ετών	6	6	12
Ενήλικες >18 ετών	5	5	10
Σύνολο	20	25	45

Για κάθε άτομο που έχει ενταχθεί στην μελέτη, έχει συμπληρωθεί λεπτομερές ερωτηματολόγιο που αφορά στο ατομικό και οικογενειακό ιστορικό, στην αντικειμενική εξέταση αλλά και σε δημογραφικά στοιχεία (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ).

Επιπλέον, αφού καλλιεργήθηκαν τα ρινικά επιθηλιακά κύτταρα έως τη τρίτη γεννεά ($p=3$), και εισήλθαν σε κατάσταση «εφησυχασμού» μετά από επώαση σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό και συμπληρώματα, ακολούθησε η μόλυνση με έναν ελάσσονα (HRVA1B) ορότυπο ρινοϊού και έναν μείζονα (HRVA16). Έγινε συλλογή νουκλεϊκών οξέων (RNA, DNA, πρωτεΐνες), καθώς και των υπερκείμενων των καλλιέργειών σε 0, 6, 8, 24, 48 και 72 ώρες μετά τη μόλυνση και επακόλουθη αποθήκευσή τους στους -80°C . Επίσης, έγινε αξιολόγηση της κυτταροτοξικότητας με τη χρήση της τεχνικής crystal violet στις 8, 24, 48 και 72 ώρες μετά τη μόλυνση. Τέλος, σε 25 από τα παραπάνω δείγματα έγινε αξιολόγηση της απελευθέρωσης ελευθέρων ριζών ύστερα από τη μόλυνση με τον HRVA1B 1, 3 και 24 ώρες μετά τη μόλυνση.

Τα υπερκείμενα θα χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση του ιικού πολλαπλασιασμού με τη μέθοδο της τιτλοδότησης καθώς και για τη μέτρηση κυτταροκινών και χυμοκινών με τη χρήση των μεθόδων ELISA και LUMINEX. Η επιλογή των μορίων που θα μετρηθούν έγινε μετά από μελέτη της σχετικής βιβλιογραφίας αλλά και την ανάλυση αποτελεσμάτων προηγηθεισών μελετών του εργαστηρίου μας.

Τέλος, το αποθηκευμένο RNA θα χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της έκφρασης επιλεγμένων γονιδίων με Real-time PCR.

Αθήνα, Απρίλιος 2015

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ:

Το προαναφερθέν ερωτηματολόγιο της κλινικοεργαστηριακής μελέτης