



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB σε ανθρώπινα
μονοκύτταρα-μακροφάγα *in vitro*.

DIPLOMA THESIS

In vitro studies on NF-κB using human monocytes-
macrophages

Ιωάννα Φραγκουλίδου του Ηρακλή

Λάρισα, Σεπτέμβριος, 2023

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

Παπουτσοπούλου Σταματία

Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Ανοσοβιολογίας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,
Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Βασιλάκη Άννα

Επίκουρος Καθηγήτρια Φαρμακολογίας
Τμήμα Ιατρικής,
Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Καλαλά Φανή

Επίκουρος Καθηγήτρια Ιατρικής Ανοσολογίας
Τμήμα Ιατρικής
Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	1
ABSTRACT	2
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	3
1.1 Φυσική ανοσία.....	3
1.2 Μονοκύτταρα και Μακροφάγα	5
1.2.1 Διαφοροποίηση και στρατολόγηση μονοκυττάρων	6
1.2.2 Αναγνώριση παθογόνων.....	7
1.2.3 Λιποπολυσακχαρίτης LPS.....	8
1.2.4. Σηματοδότηση μέσω του υποδοχέα TLR4.....	8
1.3 Μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ	10
1.3.1. ΙκΒ Πρωτεΐνες	13
1.3.2. Ενεργοποίηση του NF-κΒ	14
1.3.2.α. Κανονική οδός.....	14
1.3.2.β Εναλλακτική οδός	15
1.4. Σύνδεση του NF-κΒ στο DNA.....	17
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	18
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	19
2.1 Λύση ερυθρών κυττάρων σε περιφερικό αίμα	19
2.2 Χρώση May-Grunwald-Giemsa	19
2.3 Ανοσοκυτταροχημεία	21
2.3.1 Ανοσοφθορισμός.....	22
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	23
3.1 Κατακρήμνιση και μονιμοποίηση κυττάρων περιφερικού αίματος.....	23
3.2 Ανίχνευση μονοκυττάρων σε περιφερικό αίμα με χρώση May Grunwald-Giemsa	25
3.3. Ανίχνευση μορίων του NF-κΒ σε μονιμοποιημένα κύτταρα	27
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	28
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	32

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε σε συνεργασία μεταξύ του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (TBB) και του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Τα πειράματα διεξήχθησαν στο Εργαστήριο ΒιοΟργανικής Χημείας του TBB, Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας και στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής.

Η διπλωματική αυτή εργασία διαμορφώθηκε μέσα από τις πολύτιμες αλληλεπιδράσεις διαφόρων ατόμων, καθένα από τα οποία διαδραμάτισαν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της. Θα ήθελα, συνεπώς, να αφιερώσω αυτήν την σελίδα για να εκφράσω τη ευγνωμοσύνη μου προς όλα αυτά τα άτομα για την ανεκτίμητη βοήθεια που μου παρείχαν.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα της διπλωματικής μου εργασίας, Επίκουρη Καθηγήτρια Μοριακής Ανοσοβιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, κυρία Παπουτσοπούλου Σταματία για τη συνεχή καθοδήγηση, την αμέριστη υποστήριξη, τις ουσιώδεις συμβουλές, καθώς επίσης και την αδιάκοπη συμπαράσταση και ενθάρρυνση που μου παρείχε σε όλο αυτό το χρονικό διάστημα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα άλλα δύο μέλη της επιτροπής, την Επίκουρη Καθηγήτρια Φαρμακολογίας του τμήματος Ιατρικής, κυρία Βασιλάκη Άννα, για την εμπιστοσύνης που δεν δίσταξε να μου δείξει, και για τις ανεκτίμητες συμβουλές και γνώσεις που μοιράστηκε μαζί μου πάνω στο θέμα της ανοσοκυτταροχημείας και του ανοσοσθορισμού, καθώς και, την Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατρικής Ανοσολογίας του τμήματος Ιατρικής, κυρία Καλαλά Φανή, για τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσε ώστε να μου εξηγήσει σημαντικά στοιχεία για την ανάλυση μικροσκοπίας, αλλά και για τα δείγματα αίματος που μου παρείχε ώστε να είναι δυνατή η εκτέλεση των πειραμάτων της πτυχιακής αυτής εργασίας. Επιπλέον, δεν μπορούσα να μην ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του τμήματος Ιατρικής και ιδιαίτερα την τεχνολόγο του εργαστηρίου, κυρία Φουσίκα Αθανασία, μου που προσέφερε βοήθεια και καθοδήγηση όποτε τη χρειαζόμουν, κατά τη διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο. Ένα μεγάλο ευχαριστώ θέλω, επίσης, να πω και στα μέλη του εργαστηρίου Φαρμακολογίας, με έμφαση στην κυρία Τζίνη Δήμητρα, που με την καλή της διάθεση αλλά και την όρεξη της να μεταδώσει τις γνώσεις της βοήθησε εξίσου στην επιτυχημένη ολοκλήρωση της πτυχιακής εργασίας.

Το μεγαλύτερο "ευχαριστώ" οφείλω να το πω στα αγαπημένα μου πρόσωπα, στους γονείς μου, που αποδέχθηκαν και υποστήριζαν όλες τις επιλογές μου. Χωρίς την ανιδιοτελή στήριξή τους καθ' όλη τη διάρκεια αυτής της πορείας, τίποτα από όσα έχω επιτύχει μέχρι σήμερα δεν θα ήταν πραγματικότητα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η φυσική ανοσία αποτελεί έναν σημαντικό και πρωταρχικό μηχανισμό προστασίας του ανθρώπου από μικρόβια και άλλες ασθένειες. Τα μονοκύτταρα αποτελούν σημαντικό στοιχείο αυτής, ως μια ομάδα λευκοκυττάρων που είναι υπεύθυνα για την ανίχνευση και την καταπολέμηση παθογόνων ουσιών στον ανθρώπινο οργανισμό. Κατά τη διάρκεια της αντιμετώπισης της φλεγμονής, τα μονοκύτταρα κυκλοφορούν στο περιφερικό αίμα και έχουν την ικανότητα να μεταναστεύουν στον ιστό που πλήττεται από τη φλεγμονή. Οι παθογόνοι, μπορούν να συνδεθούν στους υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων (PRR), όπως οι υποδοχείς τύπου Toll (TLRs) που βρίσκονται στην επιφάνεια των μονοκυττάρων και να ενεργοποιήσουν τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κΒ, που έχει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης στο ανοσοποιητικό σύστημα. Η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για την ανθρώπινη υγεία, καθώς δυσλειτουργία σε αυτήν την διαδικασία συνδέεται με διάφορες αυτοάνοσες, φλεγμονώδεις και κακοήθεις διαταραχές. Ο κύριος στόχος των πειραμάτων ήταν ανίχνευση και η καταμέτρηση μονοκυττάρων σε δείγματα του περιφερικού αίματος, η ανάπτυξη ενός πειραματικού πρωτοκόλλου για την άμεση μελέτη μονοκυττάρων από δείγμα περιφερικού αίματος, όπου δοκιμάστηκαν διάφορες συνθήκες προκειμένου να αξιολογηθεί ποια από αυτές θα παρήγαγε τα καλύτερα αποτελέσματα για την έρευνα και τη μελέτη και τέλος, η ανίχνευση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ με μια ανοσοκυτταρολογική μέθοδο

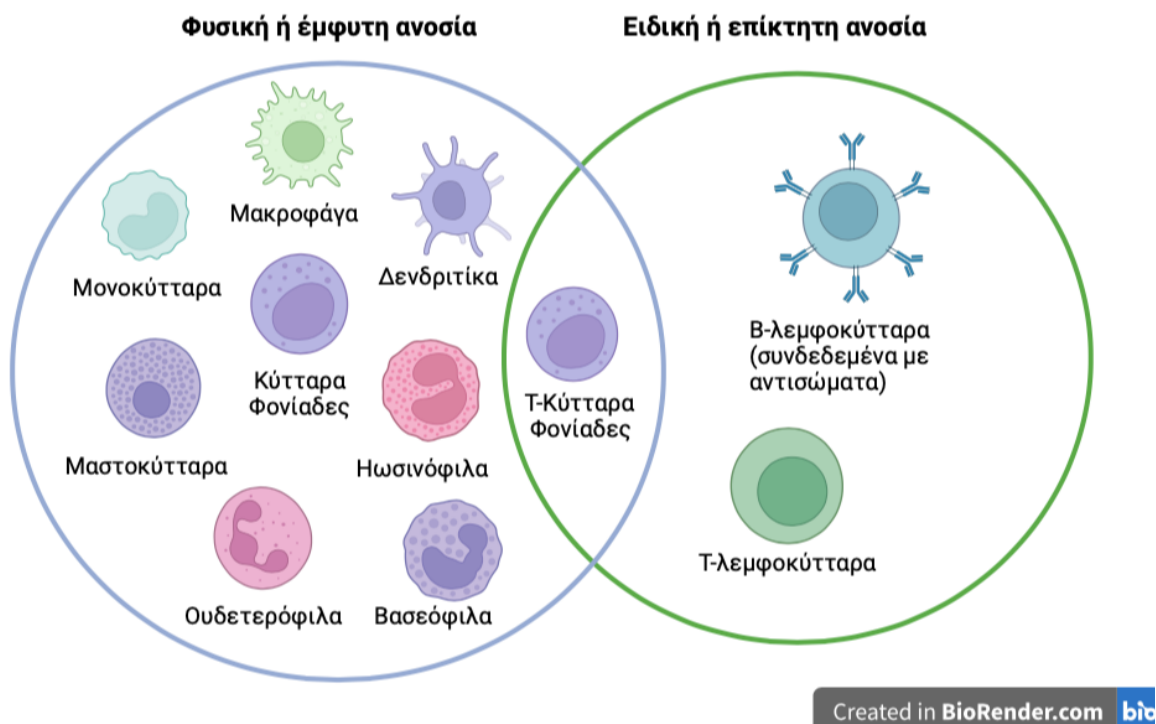
ABSTRACT

The transcription factor NF- κ B is a central regulator of many biological processes including inflammation, immune response and carcinogenesis. The present study focuses on the localization of NF- κ B in monocytes and macrophages through an immunocytochemistry and immunofluorescence technique in order to optimize the imaging of this active transcription factor in cells of the immune system, mainly in monocytes and macrophages. Using peripheral blood samples from 5 different donors, we experimented with different sample handling conditions to arrive at those that would give us the best visualization results for NF- κ B study and analysis. The results of this work are intended to prompt the development of further exploration and experimental procedures to study the activation of the transcription factor NF- κ B in cells of the immune system, which will allow us to better understand the action and role of NF- κ B.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Φυσική ανοσία

Το ανοσοποιητικό σύστημα είναι ένα πολύπλοκο σύνολο οργάνων, κυττάρων και μορίων που συνεργάζονται στενά για να προστατεύσουν το σώμα από επιβλαβείς παράγοντες όπως μικροοργανισμούς, ιούς, μύκητες και παράσιτα. Η ανοσία διακρίνεται: στη μη ειδική, που ονομάζεται και φυσική ή έμφυτη και στην ειδική ή επίκτητη. Η έμφυτη ανοσία είναι γενετικά καθορισμένη και περιλαμβάνει τους φυσιολογικούς φραγμούς του δέρματος και των βλεννογόνων που εμποδίζουν την είσοδο μολυσματικών παραγόντων στο σώμα, καθώς και αμυντικούς μηχανισμούς που ενεργοποιούνται αμέσως μετά την επίδραση επιβλαβών ερεθισμάτων [1]. Τα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας διαφέρουν από τα κύτταρα της επίκτητης ανοσίας. Στην παρακάτω εικόνα μπορούμε να δούμε μία σύνοψη των κυττάρων αυτών (**Εικόνα 1**) ενώ οι λειτουργίες τους περιγράφονται παρακάτω στο κείμενο.



Εικόνα 1. Σύνοψη κυττάρων έμφυτης και επίκτητης ανοσίας

Η ενεργοποίηση των κυττάρων της έμφυτης ανοσοαπόκρισης συμβαίνει μέσω της αναγνώρισης μοριακών μοτίβων που σχετίζονται με το παθογόνο (PAMPs), καθώς και μοριακών μοτίβων που σχετίζονται με τον κίνδυνο (DAMPs) από υποδοχείς αναγνώρισης παθογόνων (PRRs) και οδηγούν στην παραγωγή φλεγμονωδών, αντιακτικών κυτοκινών και

χημειοκίνων [2]. Οι κυτοκίνες είναι πρωτεΐνες που μεσολαβούν στην επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων και είναι απαραίτητες για την ανοσολογική απόκριση [3]. Οι κυτοκίνες θεωρούνται από τα πιο διατηρημένα στοιχεία της έμφυτης ανοσίας των σπονδυλωτών και υποδιαιρούνται σε διαφορετικές κατηγορίες ανάλογα με τις γονιδιωματικές κωδικοποιητικές περιοχές τους, τους υποδοχείς στόχους, τις οδούς σηματοδότησης και τις βιολογικές τους λειτουργίες. Αυτές οι κατηγορίες περιλαμβάνουν ιντερφερόνες (IFNs), ιντερλευκίνες (IL), παράγοντες νέκρωσης όγκου (TNF) και αυξητικούς παράγοντες μετασχηματισμού (TGFs) [3]. Στα σπονδυλωτά, η έμφυτη ανοσία βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στη λειτουργία των μυελοειδών κυττάρων.

Τα μυελοειδή κύτταρα περιλαμβάνουν μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα και πολυμορφοπύρρηνα φαγοκύτταρα. Τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα είναι τα μακροφάγα, που προέρχονται από τα μονοκύτταρα του αίματος, και τα δενδριτικά κύτταρα, τα οποία είναι επίσης μονοκυτταρικής προέλευσης και εξαιρετικά αποτελεσματικά στην παρουσίαση αντιγόνων στα Τ κύτταρα του προσαρμοστικού ανοσοποιητικού συστήματος [37]. Τα μακροφάγα είναι κατανεμημένα σε όλο το σώμα του ξενιστή, και σε ορισμένες περιπτώσεις (π.χ. καρδιά, εγκέφαλος, πνεύμονας και ήπαρ) βρίσκονται μέσα στο παρέγχυμα των κύριων οργάνων [37]. Μέσω της επεξεργασίας χημειοτακτικών κυτοκινών, στρατολογούν άλλα μυελοειδή κύτταρα, και ειδικότερα, τα πολυμορφοπύρρηνα φαγοκύτταρα, στο σημείο της μόλυνσης. Τα μακροφάγα, και ακόμη περισσότερο τα δενδριτικά κύτταρα, ξεκινούν επίσης την προσαρμοστική ανοσολογική απόκριση στα περισσότερα παθογόνα.

Τα πολυμορφοπύρρηνα φαγοκύτταρα (τα οποία περιλαμβάνουν ουδετερόφιλα, βασεόφιλα και ηωσινόφιλα) έχουν καίρια σημασία για τον περιορισμό της μόλυνσης. Τα ουδετερόφιλα, ειδικότερα, είναι εξειδικευμένοι δολοφόνοι, τα οποία καταστρέφουν τη μικροβιακή λεία τους. Τα ηωσινόφιλα και τα βασεόφιλα ασχολούνται πιο άμεσα με την παραγωγή μεσολαβητών που διαμορφώνουν το φλεγμονώδες περιβάλλον και ανταποκρίνονται στις κυτοκίνες που αναπτύσσονται από το προσαρμοστικό ανοσοποιητικό σύστημα. Αυτά τα κύτταρα είναι συνήθως πολύ πιο σπάνια από τα ουδετερόφιλα, αλλά τα ηωσινόφιλα, ειδικότερα, μπορούν να παραχθούν σε μεγάλους αριθμούς κατά τη διάρκεια παρασιτικών λοιμώξεων ή ως αποτέλεσμα αλλεργικών προσαρμοστικών ανοσολογικών αποκρίσεων. Τα μαστοκύτταρα, απόγονοι της μυελοειδούς γραμμής που κατοικούν στους ιστούς, έχουν παρόμοιο ρόλο και όπως τα ηωσινόφιλα, είναι σημαντικοί μεσολαβητές αλλεργικών αποκρίσεων. Κάθε ομάδα κυττάρου βρίσκεται στο αίμα με διαφορετική συγκέντρωση, όπως μπορούμε να διακρίνουμε και στον **Πίνακα 1**, και η εξάλειψη

έστω και μιας ομάδας των έμφυτων αυτών ανοσοενεργών κυττάρων μπορεί να είναι αρκετή για να προκαλέσει μια κατάσταση βαθιάς ανοσοανεπάρκειας [5].

Πίνακας 1: Παρουσίαση όλων των κυτταρικών τύπων του ανοσοποιητικού συστήματος καθώς και το φυσιολογικό ποσοστό συγκέντρωσής του στο αίμα.

Τύπος κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος	Ποσοστό κυττάρων στο αίμα φυσιολογικών ατόμων
Μονοκύτταρα	2-8%
Μακροφάγα	1-6%
Δενδριτικά κύτταρα	1%
NK κύτταρα	2-18%
Ουδετερόφιλα	40-60%
Ηωσινόφιλα	1-4%
Μαστοκύτταρα	10%
Βασεόφιλα	0,5-1%
T-λεμφοκύτταρα	70%
B-λεμφοκύτταρα	10%

1.2 Μονοκύτταρα και Μακροφάγα

Τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα μαζί με τα δενδριτικά κύτταρα (DCs) θεωρούνται σημαντικοί κυτταρικοί τύποι τόσο στην έμφυτη όσο και στην προσαρμοστική ανοσία. Τα μονοκύτταρα κυκλοφορούν στο περιφερικό αίμα και έχουν την ικανότητα όχι μόνο να μεταναστεύουν στο σημείο της φλεγμονής αλλά και να παρουσιάζουν πλαστικότητα ώστε να διαφοροποιούνται σε μακροφάγα στους ιστούς. Μόλις εισέλθουν στον ιστό, αυτά τα κύτταρα διαφοροποιούνται σε μακροφάγα και έχουν διαφορετικές λειτουργίες: i) είναι φαγοκυτταρικά και εμφανίζουν μικροβιοκτόνο μηχανισμό μέσω οξυγονοεξαρτώμενου και ανεξάρτητου από το οξυγόνο μηχανισμού. ii) είναι ικανά να παρουσιάζουν αντιγόνα (Antigen presenting cells, APCs) και να ενεργοποιούν τα T και τα B λεμφοκύτταρα. iii) απελευθερώνουν και διεγείρουν την έκκριση κυτοκινών. iv) συμμετέχουν στην αναδιοργάνωση των ιστών μετά την παύση της διαδικασίας της φλεγμονής μέσω της παραγωγής πρωτεϊνών εξωκυτταρικής ύλης. και vi) παράγουν κυτταροτοξικούς παράγοντες που εμπλέκονται στην ανοσία κατά των όγκων [6].

Τα μακροφάγα χαρακτηρίζονται από ετερογένεια, η οποία αντικατοπτρίζει την εξειδίκευση της λειτουργίας τους σε διαφορετικές ανατομικές θέσεις. Με βάση τη βιολογική λειτουργία, υπάρχουν τρεις πληθυσμοί μακροφάγων: i) κλασικά ενεργοποιημένα μακροφάγα ή μακροφάγα ενεργοποιημένα τύπου I (M1). ii) εναλλακτικά ενεργοποιημένα μακροφάγα (M2) και iii) ενεργοποιημένα μακροφάγα τύπου II [7]. Τα μακροφάγα τύπου I διεγείρονται συνήθως από την IFN- γ ή τον TNF- α σε συνδυασμό με μικροβιακά προϊόντα όπως ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS) και θεωρούνται κύτταρα τελεστές στην Th1 (T-βοηθητικά λεμφοκύτταρα 1) ανοσοαπόκριση. Μόλις ενεργοποιηθούν, τα M1 μακροφάγα επάγουν την έκφραση και την παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών και χημειοκινών [TNF- α , IL-23/IL-12, IL-6, IL-1, IP-10, φλεγμονώδης πρωτεΐνης μακροφάγου 1 άλφα (MIP-1 α), και μονοκυτταρική χημειοελκυστική πρωτεΐνη 1 (MCP-1), κύριο σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (MHC) κατηγορίας II, και συν-διεγερτικά μόρια] και ενισχύουν την ικανότητά τους να σκοτώνουν μικροβιακά παθογόνα μέσω της παραγωγής NO και ROS. Τα εναλλακτικά ενεργοποιημένα μακροφάγα διεγείρονται κυρίως από την IL-4 και τα γλυκοκορτικοειδή και μόλις ενεργοποιηθούν, συνθέτουν τις IL-10, IL-8, MIP1 β , MCP-1 και RANTES. Τα κύτταρα αυτά παράγουν επίσης υψηλά επίπεδα φιμπροεκτίνης καθώς και αργινάσης ενώ επιπλέον εμπλέκονται στη σύνθεση πολυαμίνης και προλίνης, η οποία, με τη σειρά της, διεγείρει την ανάπτυξη των κυττάρων και το σχηματισμό κολλαγόνου και έτσι συμμετέχει στην επισκευή των ιστών. Αυτά τα εναλλακτικά μακροφάγα δεν παράγουν NO και αδυνατούν να σκοτώσουν ενδοκυτταρικούς μικροοργανισμούς [7,8].

1.2.1 Διαφοροποίηση και στρατολόγηση μονοκυττάρων

Τα μονοκύτταρα αναπτύσσονται από αιμοποιητικούς προγονικούς παράγοντες στον μυελό των οστών, τον κοινό πρόγονο μονοκυττάρων (cMoP), ο οποίος ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά σε ποντίκια, και που στην συνέχεια διαφοροποιείται από τον πρόδρομο DC μακροφάγου [11]. Η ανάπτυξη μονοκυττάρων του αίματος από τους προγόνους εξαρτάται από έναν αυξητικό παράγοντα, τον παράγοντα 1 (επίσης γνωστός ως M-CSF ή CD115). Ο M-CSF λειτουργεί ως σήμα κινητοποίησης για τους προγόνους των μονοκυττάρων, ενθαρρύνοντάς τους να πολλαπλασιαστούν και να διαφοροποιηθούν σε μονοκύτταρα και μακροφάγα ενώ ο CCR2 και η μονοκυτταρική χημειοελκυστική πρωτεΐνη-1/μονοκυτταρική χημειοελκυστική πρωτεΐνη-3 είναι κρίσιμες για την κινητοποίηση των μονοκυττάρων από τον μυελό των οστών στην κυκλοφορία του αίματος, καθώς και για τη διατήρηση της ομοιόστασης τους στο αίμα. [12]. Η μορφολογία των ώριμων μονοκυττάρων στην περιφερική κυκλοφορία είναι ετερογενής. Διαφέρουν σε μέγεθος και έχουν διαφορετικούς βαθμούς κοκκοποίησης και ποικίλη πυρηνική μορφολογία, η οποία

μπορεί να οδηγήσει σε σύγχυση με τα κοκκιοκύτταρα, τα λεμφοκύτταρα, τα φυσικά φονικά κύτταρα και τα DCs [9].

Τα μονοκύτταρα κυκλοφορούν στο αίμα και στους ιστούς κατά τη διάρκεια της σταθερής κατάστασης και συσσωρεύονται σε σημεία κατά τη διάρκεια της φλεγμονής [10]. Υπάρχουν 3 υποομάδες μονοκυττάρων στον άνθρωπο που κινητοποιούνται από τον μυελό των οστών και στρατολογούνται σε σημεία φλεγμονής, όπου εκτελούν την λειτουργία τους. Οι 3 υποομάδες αυτές διαφέρουν ως προς το μέγεθος, τη διακίνηση και την έμφυτη έκφραση των υποδοχέων του ανοσοποιητικού και στην ικανότητά τους να διαφοροποιούνται μετά από διέγερση με κυτοκίνες και μικροβιακά μόρια. Τα ανθρώπινα μονοκύτταρα χωρίζονται σε υποσύνολα με βάση την επιφανειακή έκφραση των πρωτεϊνών CD14 και CD16. Τα $CD14^{++}/CD16^{-}$, μονοκύτταρα τα οποία αναφέρονται επίσης ως κλασικά μονοκύτταρα, είναι η πιο διαδεδομένη υποομάδα μονοκυττάρων στο ανθρώπινο. Ο πληθυσμός $CD16^{+}$ μονοκυττάρων περιλαμβάνει δύο υποομάδες, τα μονοκύτταρα $CD14^{+}/CD16^{++}$ και $CD14^{++}/CD16^{+}$. Αυτά αναφέρονται ως μη κλασικά και ενδιάμεσα μονοκύτταρα, αντίστοιχα [10].

Η στρατολόγηση μονοκυττάρων σε σημεία φλεγμονής είναι κρίσιμη για την άμυνα του ξενιστή. Κατά τη διάρκεια της φλεγμονής, τα μονοκύτταρα κυκλοφορούν μέσω του αίματος και εξαγγειώνονται σε φλεγμονώδεις ιστούς σύμφωνα με το γενικό παράδειγμα στρατολόγησης λευκοκυττάρων, που περιλαμβάνει κύλιση, προσκόλληση και μετανάστευση. Η "κύλιση" αναφέρεται στον τρόπο με τον οποίο τα μονοκύτταρα κινούνται στην κυκλοφορία του αίματος. Η "προσκόλληση" σημαίνει ότι τα μονοκύτταρα προσκολλούνται στον εσωτερικό τοίχο των αιμοφόρων αγγείων όταν ανιχνεύουν φλεγμονώδεις σήματα. Η "μετανάστευση" αναφέρεται στην κίνηση των μονοκυττάρων από το αίμα προς τους φλεγμονώδεις ιστούς, όπου συμμετέχουν στην αντιμετώπιση της φλεγμονής [13].

1.2.2 Αναγνώριση παθογόνων

Πολλά παθογόνα αναγνωρίζονται από τους ειδικούς υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων (PRR) που έχουν εξελιχθεί για να αναγνωρίζουν ουσίες που προέρχονται από παθογόνα, όπως λιποπολυσακχαρίτες (LPS), πεπτιδυλογλυκάνες, λιποπρωτεΐνες, μη μεθυλιωμένο βακτηριακό DNA και δίκλωνο RNA [5]. Οι πιο γνωστοί PRR είναι οι υποδοχείς τύπου Toll (TLRs), μια ομάδα διαμεμβρανικών πρωτεϊνών που διαμεσολαβούν στην ενεργοποίηση των ενδοκυτταρικών οδών σηματοδότησης μετά την άμεση ή έμμεση αναγνώριση εξωκυτταρικών παθογόνων. Μέχρι στιγμής, δέκα μέλη (TLR1–TLR10) της οικογένειας TLR έχουν αναφερθεί σε κύτταρα

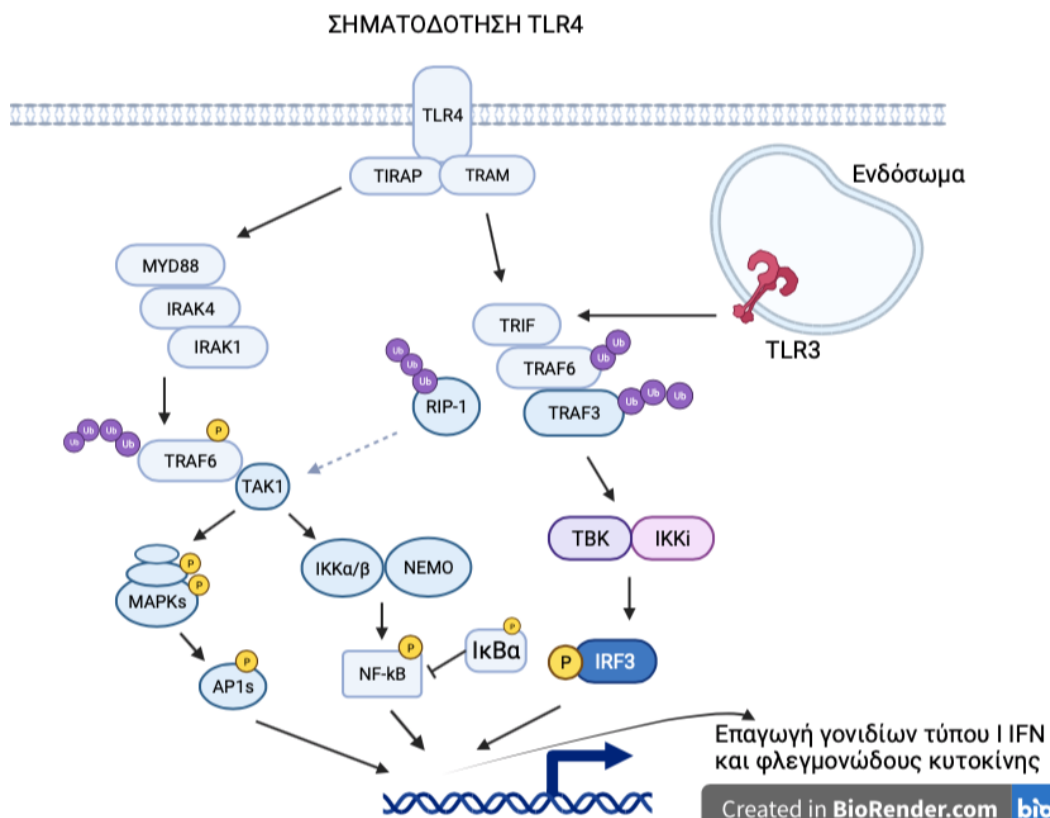
θηλαστικών. Δύο από αυτούς, ο TLR2 και ο TLR4, έχει αποδειχθεί ότι είναι απαραίτητοι για την αναγνώριση διακριτών βακτηριακών συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος. Ο υποδοχέας TLR2 αναγνωρίζει την πεπτιδογλυκάνη, τη λιποπρωτεΐνη, τη λιποαραβινομαννάνη και τη ζυμοσάνη, ενώ ο υποδοχέας TLR4 αναγνωρίζει το LPS και το λιποτεϊχοϊκό οξύ [15,16]. Η λειτουργία των TLRs ως διαιτητών της διάκρισης εαυτού/μη εαυτού υπογραμμίζει τον κεντρικό ρόλο τους στην έμφυτη ανοσία καθώς και στην έναρξη της προσαρμοστικής ανοσοαπόκριση. Ο ετεροδιμερισμός ορισμένων TLR και η χρήση συνυποδοχέων, π.χ. CD14 και MD-2 για τον TLR4, επεκτείνουν περαιτέρω την γκάμα των αναγνωρισμένων PAMP [17]. Η σηματοδότηση από τα ιικά PAMPs έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των NF-κΒ και IRF, τα οποία μεσολαβούν συνεργατικά στην παραγωγή IFN-α/β [18].

1.2.3 Λιποπολυσακχαρίτης LPS

Ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS) είναι ένα κύριο συστατικό των εξωτερικών μεμβρανών των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων και ένας ισχυρός ενεργοποιητής των μακροφάγων. Αποτελείται από τρία μέρη: το λιπίδιο A, έναν ολιγοσακχαρίτη και μια πλευρική αλυσίδα O [29]. Αν και το LPS σε κατάλληλες ποσότητες μπορεί να προκαλέσει αποκρίσεις που είναι ευνοϊκές για τον ξενιστή αυξάνοντας τις μικροβιοκτόνες δράσεις των μακροφάγων, η υπερενεργοποίηση των μακροφάγων από μεγάλες ποσότητες LPS οδηγεί σε σοκ ενδοτοξίνης [29]. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι το LPS ενεργοποιεί τον NF-κΒ σε ανθρώπινα μονοκύτταρα και μονοκυτταρικές σειρές [30]. Η διέγερση των μακροφάγων με LPS έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή διαφόρων κυτοκινών όπως ο TNFα, η IL-1, η IL-6, η IL-10, η φλεγμονώδη πρωτεΐνη-1α/β των μακροφάγων (MIP-1 α/β), την παραγωγή φλεγμονωδών δραστικών ουσιών όπως η πρωτανοειδή, τα λευκοτριένια και το μονοξείδιο του αζώτου (NO), καθώς επίσης και την ενίσχυση της έκφρασης αντιγόνων κυτταρικής επιφάνειας. Η διέγερση των κυττάρων των θηλαστικών με LPS λαμβάνει χώρα μέσω μιας σειράς αλληλεπιδράσεων με διάφορες πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένης της πρωτεΐνης δέσμευσης LPS (LBP), CD14, MD-2 και του υποδοχέα TLR4.

1.2.4. Σηματοδότηση μέσω του υποδοχέα TLR4

Με την αναγνώριση του LPS, ο TLR4 υφίσταται ολιγομερισμό και στρατολογεί περαιτέρω σηματοδοτικά μονοπάτια [35]. Οι περιοχές TIR περιέχουν τρεις εξαιρετικά διατηρημένες περιοχές, οι οποίες μεσολαβούν στις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης μεταξύ των TLR και των πρωτεϊνών προσαρμογής μεταγωγής σήματος. Η σηματοδότηση του TLR4 έχει χωριστεί σε εξαρτώμενη από την MyD88 και σε ανεξάρτητη από την MyD88 (εξαρτώμενη από TRIF), και τα δυο μονοπάτια φαίνονται στην **Εικόνα 2**.



Εικόνα 2: Σηματοδότηση του υποδοχέα TLR4

Ο υποδοχέας TLR4 εντοπίζεται στην επιφάνεια του κυττάρου ενώ ο TLR3 εντοπίζεται στο διαμέρισμα του ενδοσώματος. Ο σχηματισμός ομο- ή ετεροδιμερών ξεκινά με τη σηματοδότηση στις δύο κύριες πρωτεΐνες προσαρμογής, την MyD88 και την TRIF. Το TIRAP μεταφέρει το σήμα από τον TLR4 στην MyD88 ενώ η TRAM μεσολαβεί στο σήμα από τον TLR4 στην TRIF. Η ενεργοποίηση της IRAK1 επάγει την ενεργοποίηση της TRAF6 μετά από πολυουβικουϊτινοποίηση στην ίδια την TRAF6 και την TAK1. Η ενεργοποίηση της TAK1 οδηγεί στην ενεργοποίηση του συμπλέγματος IKK-NF-κB και MAPK-AP1s. Η δέσμευση TLR προκαλεί επίσης ενεργοποίηση της TRIF μετά από στρατολόγηση των TRAF6 και TRAF3. Η TRAF6 στρατολογεί την RIP-1, η οποία ενεργοποιεί το σύμπλεγμα TAK1 μετά την ενεργοποίηση της MAPK. Η TRAF3 προσλαμβάνει TBK1 και IKKi για φωσφορυλίωση της IRF3.

Μια πρωτεΐνη προσαρμογής η TRAF6 (παράγοντας 6 που σχετίζεται με τον υποδοχέα TNF), είναι κρίσιμη για το εξαρτώμενο από την MyD88 μονοπάτι κατάντη των IRAK4 και IRAK1. Η TRAF6 σχηματίζει ένα σύμπλεγμα με το UBC13 (ένζυμο σύζευξης ουβικιτίνης 13) και το UEV1A (ένζυμο σύζευξης ουβικιτίνης E2 παραλλαγή 1 ισομορφή A) και ενεργοποιεί την TAK1 (μετασχηματιστικός αυξητικός παράγοντας-β-ενεργοποιημένη κινάση 1). Στη συνέχεια, η TAK1

ενεργοποιεί το μονοπάτι της IKK (κινάση IκB). Τα IKKα, IKKb και IKKc σχηματίζουν σύμπλοκα και φωσφορυλιώνουν τις πρωτεΐνες IκB (αναστολέας του ενισχυτή γονιδίου ελαφριάς αλυσίδας κ στα Β κύτταρα). Αυτή η φωσφορυλίωση οδηγεί στην αποικοδόμηση των πρωτεϊνών IκB και στην επακόλουθη μετατόπιση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, ο οποίος ελέγχει την έκφραση των προφλεγμονωδών κυτοκινών, μαζί με τα άλλα γονίδια που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό.

Η ενεργοποίηση του NF-κB εξακολουθεί να προκαλείται στα μακροφάγα ακόμα και με έλλειψη της MyD88, αν και η κινητική της ενεργοποίησης του NF-κB καθυστερεί ελαφρώς. Η δραστηριότητα σύνδεσης DNA—NF-κB ανιχνεύθηκε στα πυρηνικά εκχυλίσματα στα μακροφάγα άγριου τύπου και στα MyD88 KO, με μια καθυστέρηση 10 λεπτών στην ενεργοποίηση του NF-κB σε MyD88 KO μακροφάγα. Αυτό υποδηλώνει ότι ο NF-κB μπορεί να ενεργοποιηθεί και μέσω της ανεξάρτητης από την MyD88 σηματοδότησης [29].

Η TRIF είναι μια σημαντική πρωτεΐνη προσαρμογής που περιέχει TIR, η οποία μεσολαβεί στη σηματοδότηση ανεξάρτητη από την MyD88. Μελέτες που χρησιμοποιούν μακροφάγα με ανεπάρκεια στην TRIF καταδεικνύουν ότι η TRIF παίζει βασικό ρόλο στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα IRF3 και στην ενεργοποίηση της όψιμης φάσης του NF-κB και της MAPK. Επιπλέον, η αφαίρεση τόσο της MyD88 όσο και της TRIF οδηγεί σε σοβαρά εξασθενημένη ενεργοποίηση του NF-κB και της MAPK. Τα πειράματα υποδεικνύουν ότι η TRIF στρατολογεί την TRAF3 για να ενεργοποιήσει την IRF3 και συνεπώς η επαγωγή των ιντερφερονών Τύπου Ι ήταν ελαττωματική σε κύτταρα με έλλειψη σε TRAF3. Η TRAF3 μπορεί να συσχετιστεί με την TANK (ενεργοποιητής NF-κB που σχετίζεται με μέλη της οικογένειας TRAF), την TBK1 (κινάση δέσμευσης TANK 1) και την IKKι για να μεσολαβήσει στη μεταγενέστερη σηματοδότηση. Η TBK1 και η IKKι είναι σημαντικές για τον διμερισμό και τη μετατόπιση της IRF3. Η IRF3, μαζί με τον NF-κB, ενεργοποιούν τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων, όπως οι ιντερφερόνες τύπου Ι. Η επαγωγή παρεμβολών τύπου Ι και των γονιδίων επαγόμενων από την ιντερφερόνη είναι σημαντική για τις αντι-ιικές και τις αντιβακτηριακές αποκρίσεις.

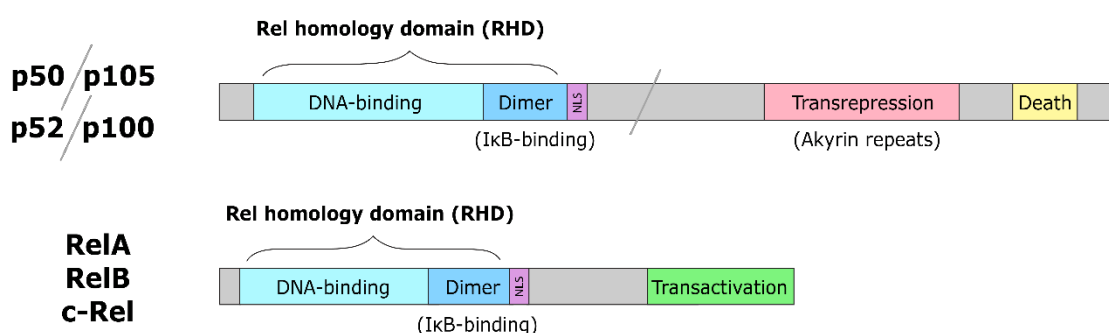
1.3 Μεταγραφικός παράγοντας NF-κB

Ο NF-κB ανακαλύφθηκε και χαρακτηρίστηκε για πρώτη φορά πριν από 37 χρόνια ως βασικός ρυθμιστής της επαγωγίσιμης γονιδιακής έκφρασης στο ανοσοποιητικό σύστημα, και περιλαμβάνει μια οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων που εμπλέκονται στη ρύθμιση μιας μεγάλης ποικιλίας βιολογικών αποκρίσεων [36]. Ο NF-κB είναι εξίσου σημαντικός για τον έλεγχο τόσο της έμφυτης όσο και της προσαρμοστικής ανοσίας [4]. Στον παρακάτω **Πίνακα 2** συνοψίζονται μερικές πρωτεΐνες-στόχοι του NF-κB.

Στα θηλαστικά η οικογένεια του NF-κΒ αποτελείται από τις υπομονάδες p50, p52 p65 (RelA), c-Rel και RelB (**Εικόνα 3**). Οι υπομονάδες p50 και p52 αντιπροσωπεύουν τα μερικώς επεξεργασμένα προϊόντα δύο μεγαλύτερων πρόδρομων πρωτεϊνών γνωστών ως p105 και p100, αντίστοιχα. Η περιοχή ομολογίας Rel (Rel Homology domain) είναι διατηρημένη και έχει μήκος περίπου 300 αμινοξέων [20]. Οι μεμονωμένες πρωτεϊνικές υπομονάδες του NF-κΒ συνδέονται μεταξύ τους για να σχηματίσουν 15 διαφορετικά ομο- ή ετεροδιμερή που ορίζονται ως το σύμπλεγμα NF-κΒ [34]. Ο διμερισμός λαμβάνει χώρα σε μια N-τελική περιοχή σύνδεσης/διμερισμού DNA, γνωστή ως περιοχή ομολογίας Rel. Μερικοί από αυτούς τους συνδυασμούς είναι άφθονοι σε διάφορους τύπους κυττάρων, ενώ άλλοι είναι εξαιρετικά σπάνιοι [19]. Τα διμερή NF-κΒ μπορούν να συνδεθούν σε μια ποικιλία σχετικών αλληλουχιών DNA-στόχων που ονομάζονται θέσεις κΒ για να ρυθμίσουν την έκφραση γονιδίων. Οι υπομονάδες RelB, c-Rel και p65 περιέχουν C-τερματικές περιοχές ενεργοποίησης μεταγραφής (TADs) που επιτρέπουν τη στρατολόγηση συνενεργοποιητή και την έκφραση γονιδίου στόχου. Οι υπομονάδες p50 και p52, δεν περιέχουν TAD, αλλά περιέχουν στα καρβοξυτελικά άκρα τους μια περιοχή πλούσια σε γλυκίνη (GRR), η οποία πιθανώς να είναι αποτέλεσμα μιας ατελούς πρωτεολυτικής τους επεξεργασίας από τα p105 και p100, αντίστοιχα. Ως εκ τούτου, τα ομοδιμερή είτε του p50 είτε του p52 λειτουργούν ως μεταγραφικοί καταστολείς. Ωστόσο, αυτές οι δύο πρωτεΐνες NF-κΒ μπορούν να ενεργοποιήσουν τη μεταγραφή επιλεγμένων γονιδίων-στόχων μέσω της συσχέτισής τους με τις συνενεργοποιητικές πρωτεΐνες στον πυρήνα, για παράδειγμα σχηματίζοντας ετεροδιμερή με p65, c-Rel ή RelB ή στρατολογώντας άλλες πρωτεΐνες που περιέχουν TAD [4]. Οι κρυσταλλογραφικές αναλύσεις ακτίνων X έχουν αποκαλύψει ότι η RHR περιέχει τρία ανεξάρτητα δομικά στοιχεία: την N-τερματική περιοχή (NTD), την περιοχή διμερισμού (DD) και το σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS). Τόσο η NTD όσο και η DD είναι διπλωμένες, σφαιρικές περιοχές, ενώ η δομή της περιοχής που περιλαμβάνει το NLS εξαρτάται από τις αλληλεπιδράσεις της με άλλες πρωτεΐνες. Τα διμερή NF-κΒ μπορούν να συνδεθούν σε μια ποικιλία σχετικών αλληλουχιών DNA-στόχων που ονομάζονται θέσεις κΒ για να ρυθμίσουν την έκφραση γονιδίου [21].

Πίνακας 2: Περιγραφή των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από γονίδια-στόχους του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ σε μακροφάγα, καθώς και συνοπτική περιγραφή της λειτουργίας των μορίων που κωδικοποιούνται από αυτά τα γονίδια.

Πρωτεΐνη	Λειτουργία
TNF- α	Προφλεγμονώδης κυτοκίνη που εμπλέκεται στην ανοσολογική απόκριση και την φλεγμονή
IL-1 β	Προφλεγμονώδη κυτοκίνη που ενισχύει την ανοσολογική απόκριση και την φλεγμονή
IL-6	Κυτοκίνη που ρυθμίζει την αιμοποίηση και τις αντιδράσεις οξείας φάσεως
IL-12	Κυτοκίνη που παίζει καθοριστικό ρόλο στην ενεργοποίηση των T κυττάρων και των φυσικών φονικών κυττάρων
IL-23	Κυτοκίνη που εμπλέκεται στην διαφοροποίηση και ενεργοποίηση των Th17 κυττάρων
COX-2	Ένζυμο που εμπλέκεται στην παραγωγή προσταγλανδίνης
iNOS	Ένζυμο υπεύθυνο για την παραγωγή NO
MHC II	Μόριο ζωτικής σημασίας για την παρουσία αντιγόνου στα T κύτταρα
Fc γ Rs	Εμπλέκεται στην φαγοκύτωση και την απομάκρυνση παθογόνων
MMPs	Εμπλέκονται στην διαδικασία αναδόμησης και αποκατάσταση των ιστών
SODM, PGH2, TXNIP	Πρωτεΐνες που εμπλέκονται με το στρες
GADD45B, TRIP, TNFAIP3, cIAP2	Πρωτεΐνες που εμπλέκονται με την απόπτωση
I κ B-a, NF κ B1, C-REL, C-MYB, CEBP α , PCH2, HMGB2	Πρωτεΐνες που εμπλέκονται με την μεταγραφή
BTG, ID-2, CDC28, κυκλίνη B2	Πρωτεΐνες που εμπλέκονται με την διαφοροποίηση

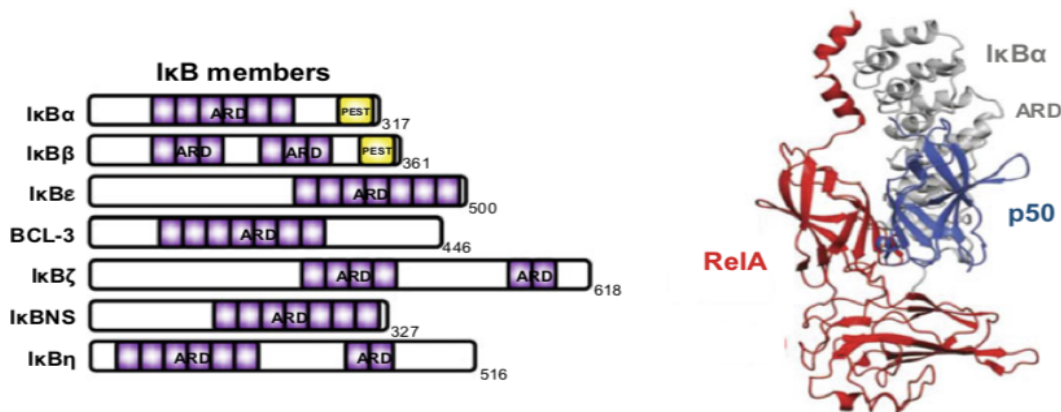


Εικόνα 3: Δομή των πρωτεϊνών τις οικογένειας NF- κ B/Rel

1.3.1. IκB Πρωτεΐνες

Στα περισσότερα κύτταρα, τα σύμπλοκα NF-κB είναι ανενεργά, και βρίσκονται κυρίως στο κυτταρόπλασμα ως σύμπλοκο με τις πρωτεΐνες της οικογένειας των ανασταλτικών πρωτεϊνών IκB. Όταν η οδός ενεργοποιείται, η πρωτεΐνη IκB αποικοδομείται και το σύμπλεγμα NF-κB εισέρχεται στον πυρήνα για να ρυθμίσει την έκφραση του γονιδίου στόχου. Οι πρωτεΐνες IκB είναι ζωτικοί παράγοντες στη ρύθμιση της οδού NF-κB λειτουργώντας γενικά ως αναστολείς του NF-κB μέσω μη ομοιοπολικής δέσμησης [21].

Η οικογένεια των ανασταλτικών πρωτεϊνών IκB περιλαμβάνει πρωτεΐνες που μπορούν λειτουργικά να ταξινομηθούν σε τρεις ξεχωριστές ομάδες: την κλασική ομάδα IκB (IκBα, IκBβ και IκBε), την ομάδα των πρόδρομων IκB (p105/IκBγ και p100/IκBδ) και την πυρηνική ομάδα IκB (Bcl-3, IκBζ, IκBNS, **Εικόνα 4**). Αυτές οι πρωτεΐνες χαρακτηρίζονται από πολλαπλές περιοχές ομολογίας αλληλουχίας 33 αμινοξέων με επαναλαμβανόμενες αγκυρίνες (ARD). Η IκB ARD είναι μια δομικά διατεταγμένη περιοχή που αποτελείται από έξι ή επτά αντίγραφα ενός επαναλαμβανόμενου δομικού μοτίβου γνωστό ως επανάληψη αγκυρίνης (AR). Η αγκυρίνη αλληλεπιδρώντας ειδικά με την περιοχή RHD του NF-κB, εμποδίζει την πυρηνική του μετατόπιση. Τα p100 και p105 περιέχουν επίσης επαναλήψεις αγκυρίνης και έτσι λειτουργούν ως αναστολείς όπως της IκB. Οι IκBα και IκBβ συνήθως αναστέλλουν τα διμερή που περιέχουν Rel A και c-Rel, ενώ οι IκBγ και Bcl-3 αλληλεπιδρούν κατά προτίμηση με τα διμερή που περιέχουν p50 και p52 [32].



Εικόνα 4: Μέλη της οικογένειας IκB. Αριστερά: μέλη της οικογένειας των IκB με φανερές τις περιοχές που τα χαρακτηρίζουν. Δεξιά: Τρισδιάστατη δομή του συμπλέγματος p50:RelA:IκBα (με μπλε, κόκκινο και γκρι χρώμα, αντίστοιχα) Συντομογραφίες: ARD, Ankyrin Repeat Domain; PEST, περιοχή πλούσια σε προλίνη (P), γλουταμινικό (E), σερίνη (S) και θρεονίνη (T) [22].

1.3.2. Ενεργοποίηση του NF-κB

Η ενεργοποίηση του NF-κB απαιτεί την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών IκB, η οποία με τη σειρά της εξαρτάται από τη φωσφορυλίωση της IκB και την εξαρτώμενη από την ουβικιτίνη αποδόμηση του πρωτεασώματος [21]. Το σύμπλεγμα κινάσης IκB (IKK) αποτελείται από τρεις πρωτεΐνες. Οι IKK1/α και IKK2/β είναι δύο πολύ παρόμοιες πρωτεΐνες, καθώς παρουσιάζουν αρκετές ομοιότητες στις αλληλουχίες των αμινοξέων τους σε σημαντικά σημεία της δομής τους. Και οι δύο πρωτεΐνες περιέχουν λειτουργικές περιοχές καταλυτικής πρωτεϊνικής κινάσης στα N-τελικά άκρα τους. Η τρίτη IKK πρωτεΐνη δρα ως πρωτεΐνη προσαρμογής, και είναι γνωστή ως NEMO/IKKγ. Τέλος, **οι** IKK-1 και IKK-2 μπορούν να σχηματίσουν ετεροδιμερή και έχουν αλληλουχίες στη N-τελική περιοχή που μπορούν να φωσφορυλιωθούν από την κινάση MAP [22]. Η επαγόμενη από σήμα ενεργοποίηση του IKK μέσω είτε της κανονικής είτε της εναλλακτικής οδού σηματοδότησης NF-κB απαιτεί τη φωσφορυλίωση δύο υπολειμμάτων Ser (Ser176 και Ser180 για IKK1/α και Ser177 και Ser181 για IKK2/β) που βρίσκονται στον αντίστοιχο βρόχο ενεργοποίησης της κινάσης (Εικόνα 4). Ωστόσο, ο μηχανισμός με τον οποίο ενεργοποιούνται οι υπομονάδες που περιέχουν την κινάση στο σύμπλεγμα IKK δεν είναι πλήρως κατανοητός [4].

1.3.2. α . Κανονική οδός

Η κανονική οδός σηματοδότησης μέσω του NF-κB σχετίζεται με την παθογένεση χρόνιων φλεγμονωδών ασθενειών όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα (RA), η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (IBD), το άσθμα και χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) [25]. Η ενεργοποίηση της κανονικής οδού χαρακτηρίζεται από ένα καταρράκτη σηματοδότησης (**Εικόνα 5Α**) που στοχεύει το σύμπλεγμα IKK έτσι ώστε μία από τις καταλυτικές υπομονάδες του, γνωστή ως IKK2/β, να μεταβεί από την ανενεργή της κατάσταση σε μια κατάσταση καταλυτικής δραστηριότητας. Αυτή η ενεργοποίηση της IKK2/β απαιτεί φωσφορυλίωση δύο υπολειμμάτων αμινοξέων σερίνης (Ser), Ser177 και Ser181, που βρίσκονται εντός του βρόχου ενεργοποίησης της κινάσης-πρωτεΐνης IKK2/β. Μόλις ενεργοποιηθεί η IKK2/β φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη IκB. στις Ser32 και Ser36, ενώ παραμένει σε σύμπλοκο με τον NF-κB. Αυτή η πρόσφατα φωσφορυλιωμένη IκBα υφίσταται γρήγορα ουβικουτυλίωση στα υπολείμματα Lys21 και Lys22 που ακολουθείται από την αποικοδόμησή της μέσω του 26S πρωτεασώματος. Η αποικοδόμηση του IκBα, οδηγεί σε απελευθέρωση και ενεργοποίηση του NF-κB, συνήθως ένα ετεροδιμερές των υπομονάδων RelA (p65) και p50, το οποίο στη συνέχεια μετατοπίζεται γρήγορα στον πυρήνα όπου μπορεί να συνδεθεί σε συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA (γνωστές ως κB θέσεις ή κB DNA) που υπάρχουν στον προαγωγέα ή ενισχύουν τις περιοχές διακριτών γονιδίων-στόχων και αυξάνουν τα επίπεδα μεταγραφής τους [26]. Η σηματοδότηση του NF-κB απεικονίζεται

περιληπτικά παρακάτω στην εικόνα 5. Τα γονίδια πρωτογενούς απόκρισης περιλαμβάνουν εκείνα που κωδικοποιούν κυτοκίνες όπως ο TNF. Η απελευθέρωση αυτών των πρωτεϊνών οδηγεί σε αυτοκρινή σηματοδότηση μέσω των υποδοχέων κυτοκίνης. Αυτή, ή η συνεχιζόμενη σύνδεση PRR, δημιουργεί σε έναν βρόχο θετικής ανάδρασης όπου ο NF-κΒ ενεργοποιείται περιοδικά μέχρι να εξαλειφθούν αυτά τα σήματα [27].

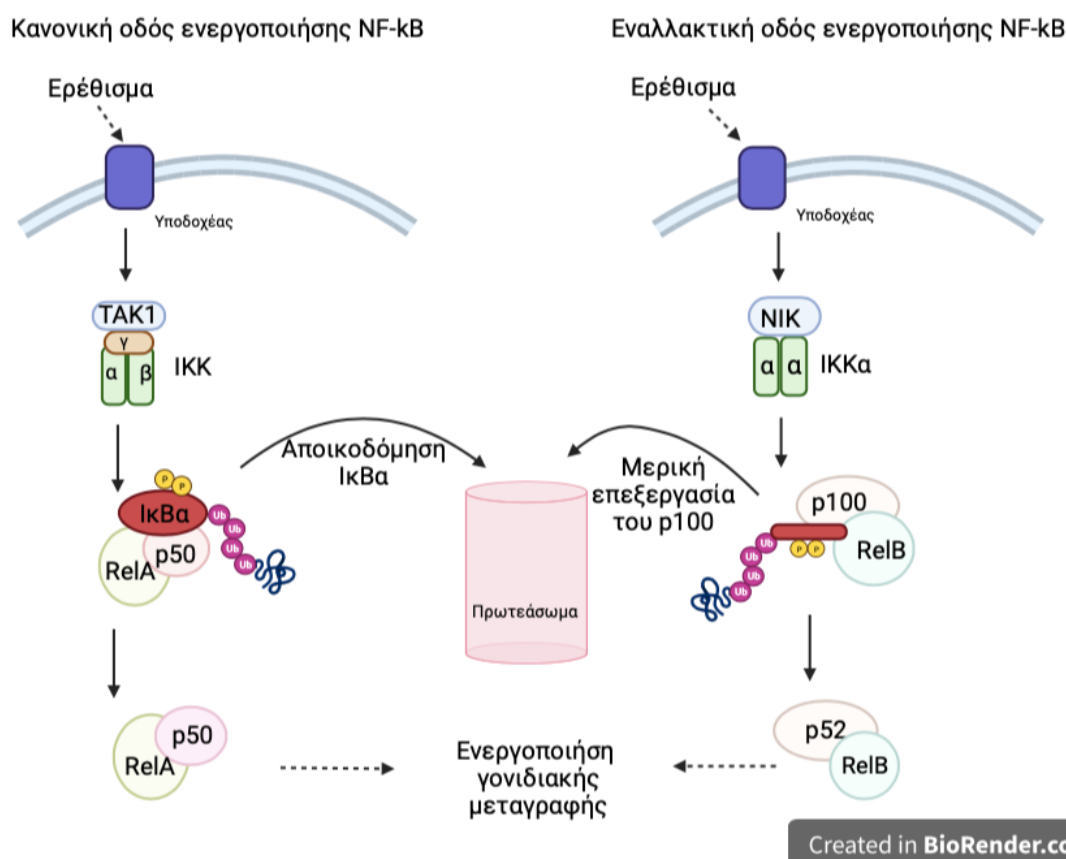
Αν και φαίνεται απλός, αυτός ο κλασικός κύκλος ενεργοποίησης NF-κΒ μπορεί να οδηγήσει σε αμέτρητες παραλλαγές στη γονιδιακή έκφραση ανάλογα με μια σειρά παραγόντων. Το πρώτο επίπεδο πολυπλοκότητας στη σηματοδότηση NF-κΒ προκύπτει από το πλήθος των προσδεμάτων και των υποδοχέων που διεγείρουν αυτό το μονοπάτι. Για παράδειγμα, η ενεργοποίηση του NF-κΒ μπορεί να προκύψει μέσω της διέγερσης πολλών υποδοχέων κυτοκίνης όπως οι TNFRs και IL1Rs, οι PRRs όπως οι TLRs, και οι υποδοχείς τύπου NOD, καθώς και υποδοχείς των T και B κυττάρων, μεταξύ πολλών άλλων.

Η αρνητική ρύθμιση της σηματοδότησης NF-κΒ μέσω της σύνθεσης νέων πρωτεϊνών IκΒ και η επακόλουθη επανενεργοποίηση της οδού μπορεί να οδηγήσει σε περιοδική ταλάντωση της ενεργού μετατόπισης του NF-κΒ στον πυρήνα, ρυθμίζοντας τη δυναμική έκφρασης των γονιδίων. Επειδή τα γονίδια IκΒ είναι στόχοι γονιδίων πρωταρχικής απόκρισης της μεταγραφικής δραστηριότητας NF-κΒ, αντιπροσωπεύουν έναν ισχυρό βρόχο αρνητικής ανάδρασης. Οι νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες IκΒ συνδέονται με ενεργά διμερή NF-κΒ, αφαιρώντας τα από τη δέσμευση του DNA και μεταφέροντάς τα πίσω στο κυτταρόπλασμα, όπου το σύμπλοκο μπορεί να επανενεργοποιηθεί και η IκΒ μπορεί και πάλι να ουμπικιτινοποιηθεί και να αποικοδομηθεί μέσω του πρωτεασώματος.

1.3.2. β Εναλλακτική οδός

Η εναλλακτική οδός σηματοδότησης μέσω του NF-κΒ χαρακτηρίζεται από την επαγόμενη φωσφορυλίωση της p100 από την IKKα, που οδηγεί στην ενεργοποίηση των ετεροδιμερών RelB/p52 (**Εικόνα 5B**). Η ανοδική κινάση που ενεργοποιεί την IKKα σε αυτό το μονοπάτι είναι η NIK (NF-κΒ inducing kinase). Η ενεργοποίηση του NF-κΒ μέσω της εναλλακτικής οδού γενικά επιδεικνύει καθυστερημένη κινητική και έχει ως αποτέλεσμα μια πιο επίμονη μεταγραφική απόκριση NF-κΒ. Τυπικά, η εναλλακτική οδός του NF-κΒ ενεργοποιείται από αναπτυξιακά σήματα μέσω συγκεκριμένων υποδοχέων, συμπεριλαμβανομένου του υποδοχέα β λεμφοτοξίνης (LTβR), του υποδοχέα του παράγοντα ενεργοποίησης των κυττάρων B (BAFF-R) ή του CD40. Η

εναλλακτική οδός δεν απαιτεί την καταλυτική δραστηριότητα της πρωτεϊνικής κινάσης του IKK2/β. Μάλλον, εξαρτάται από τις διαδοχικές δράσεις της κινάσης που προκαλεί τον NF-κB (NIK) και τις υπομονάδες IKK1/α να επάγουν φωσφορυλίωση στην πρόδρομη πρωτεΐνη IκB, p100 στα υπολείμματα Ser866 και Ser870. Με τρόπο παρόμοιο με αυτόν που περιγράφηκε προηγουμένως για το IκBa, η φωσφορυλίωση καθιστά το p100 ένα υπόστρωμα για ουβικιτυλίωση μέσω της στρατολόγησης της E3 ουβικιτίνης-πρωτεϊνικής λιγάσης β-TrCP1. Η ουβικουιτυλίωση του p100 οδηγεί στη μερική επεξεργασία του, δημιουργώντας την ώριμη υπομονάδα NF-κB p52, η οποία μπορεί είτε να παραμείνει ως ομοδιμερές είτε να συνδεθεί με την RelB για να σχηματίσει το μεταγραφικά ενεργό ετεροδιμερές NF-κB p52:RelB (Εικόνα 5). Είναι ενδιαφέρον ότι, σε αντίθεση με την κανονική οδό, η σηματοδότηση μέσω της εναλλακτικής οδού NF-κB δεν απαιτεί την υπομονάδα NEMO/IKKγ. Ωστόσο, παραμένει ασαφές εάν το IKK1/α που στοχεύεται από επαγωγείς της εναλλακτικής οδού αντιπροσωπεύει μια ξεχωριστή δεξαμενή ελεύθερου ενζύμου ή εάν είναι το ίδιο IKK1/α που σχετίζεται με το σύμπλεγμα IKK που εμπλέκεται στην κανονική οδό NF-κB [28].



Εικόνα 5: Κανονική και εναλλακτική οδός ενεργοποίησης NF-κB. (Α) Στο κανονικό μονοπάτι μετά από διέγερση και καταρράκτη διαφορετικών γεγονότων, το σύμπλεγμα IKK ενεργοποιείται. Η δράση κινάσης του IKK φωσφορυλώνει την IκBa, το οποίο βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα συνδεδεμένο με το ετεροδιμερές p50:RelA NF-κB. Μετά τη φωσφορυλίωση και την αποικοδόμηση του IκBa από το πρωτεάσωμα, το διμερές NF-κB απελευθερώνεται και

μετατοπίζεται στον πυρήνα. (B) Κατά την ενεργοποίηση του εναλλακτικού μονοπατιού, η κινάση NIK σταθεροποιείται και φωσφορυλιώνει την IKK1. Κατά την ενεργοποίηση του IKK1, η p100 φωσφορυλιώνεται και υποβάλλεται σε μερική επεξεργασία από το πρωτεάσωμα που δημιουργεί το p52. Στη συνέχεια, το ετεροδιμερές p52:RelB μετατοπίζεται στον πυρήνα και συνδέεται με προαγωγείς-στόχους για να ενεργοποιήσει τη γονιδιακή μεταγραφή [35].

1.4. Σύνδεση του NF-κB στο DNA

Ο NF-κB αναγνωρίζει 9-11 ζεύγη βάσεων συγκεκριμένων δίκλωνων στοιχείων γνωστών ως κB DNA που βρίσκονται εντός των προαγωγέων ή των ενισχυτών πολλών γονιδίων-στόχων. Η συναινετική αλληλουχία θέσης κB είναι η 5' -GGGRNWC-3', όπου R = A ή G/N = οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο, W = A ή T, και Y = C ή T. Το κρίσιμο χαρακτηριστικό των κB θέσεων είναι η παρουσία G:C bp και στα δύο άκρα 5', ενώ η κεντρική περιοχή εμφανίζει μεγαλύτερη διακύμανση αλληλουχίας. Οι θέσεις κB είναι ψευδοσυμμετρικές με δύο σχεδόν πανομοιότυπες ημι-θέσεις. Κάθε υπομονάδα σε ένα διμερές NF-κB μπορεί να συνδεθεί σε μια ημι-θέση. Οι υπομονάδες p50 και p52 έρχονται σε επαφή με ήμι-θέσεις 5 bp, ενώ οι υπομονάδες RelA, RelB και c-Rel δεσμεύονται σε ημι-θέσεις 4 bp. [20]. Οι εξαρτώμενες από την αλληλουχία διαμορφώσεις DNA παίζουν επίσης ζωτικό ρόλο στην αναγνώριση του κB DNA από τον NF-κB. Η παρουσία A:T είναι το προτιμώμενο κεντρικό bp, ενώ η παρουσία ενός G:C ή C:G bp σε αυτή την κεντρική θέση είναι εξαιρετικά ασυνήθιστη, αυτή η θέση δεν έρχεται ποτέ σε άμεση επαφή με άτομα από το διμερές NF-κB, γεγονός που δείχνει περαιτέρω τον ρόλο που παίζει η δομή του DNA στη διευκόλυνση του σχηματισμού του συμπλόκου. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι οι θέσεις κB DNA μπορεί να βρίσκονται είτε πολύ κοντά στη θέση έναρξης της μεταγραφής των γονιδίων-στόχων είτε σε απόσταση πολλών κιλοβάσεων. Επιπλέον, ορισμένα γονίδια περιέχουν μία μόνο θέση κB ενώ άλλα βασίζονται σε πολλαπλά αντίγραφα [21].

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Τα μονοκύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος είναι κρίσιμα για την προστασία του οργανισμού από ασθένειες και μολύνσεις, καθώς και για την αντιμετώπιση φλεγμονών και τραυματισμών. Η κατανόηση του ρόλου και της λειτουργίας τους είναι βασική για τη βελτίωση της ιατρικής πρακτικής και την ανάπτυξη θεραπευτικών προσεγγίσεων. Εξίσου σημαντικός είναι και ο μεταγραφικός παράγοντας ,NF-κB, καθώς διαδραματίζει σημαντικό ρόλο μεσολαβητή στα σηματοδοτικά μονοπάτια της φλεγμονής, ενώ φαίνεται να εμπλέκεται και στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, την απόπτωση, την κυτταρική επιβίωση, την απόκριση σε βλάβες του DNA, τη μετανάστευση και τη διήθηση των κυττάρων [39]. Ο NF-κB θεωρείται ότι είναι κρίσιμος παράγοντας για την ανθρώπινη υγεία μιας και δυσλειτουργίες στην ενεργοποίηση του συμβάλλουν στην ανάπτυξη διαφόρων αυτοάνοσων νοσημάτων, φλεγμονωδών και κακοήθων διαταραχών, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η αθηροσκλήρωση, οι φλεγμονώδεις ασθένειες του εντέρου, η σκλήρυνση κατά πλάκας και οι κακοήθειες όγκοι [40].

Στο πλαίσιο αυτό, σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν, η ανίχνευση και η καταμέτρηση των μονοκυττάρων σε δείγματα περιφερικού αίματος καθώς και η ανάπτυξη ένα πειραματικό πρωτόκολλο γρήγορης και εύκολης επεξεργασίας δειγμάτων αίματος από δότες προκειμένου να μελετηθεί ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB, άλλα και κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, συγκεκριμένα τα μονοκύτταρα.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Τα δείγματα αίματος που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τυχαία δείγματα ασθενών από επισκεπτήριο στο εξωτερικό ιατρείο του Εργαστηρίου Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας.

2.1 Λύση ερυθρών κυττάρων σε περιφερικό αίμα

Η λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων στο περιφερικό αίμα είναι ζωτικής σημασίας για διάφορες κλινικές και εργαστηριακές διαδικασίες, καθώς δρουν ως ένας μολυσματικός παράγοντας εμποδίζοντας την ακριβή αξιολόγηση άλλων συστατικών του αίματος, για αυτό και πρέπει να αφαιρεθούν. Η διαδικασία της λύσης των ερυθρών κυττάρων είναι γρήγορη και απλή, αλλά θα πρέπει να γίνεται με ακρίβεια και επαναληψιμότητα, ώστε να μην επηρεάζονται οι κυτταρικοί πληθυσμοί. Το ρυθμιστικό διάλυμα λύσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων συχνά περιλαμβάνει ένα υποτονικό διάλυμα για να διαταράξει την ακεραιότητα της μεμβράνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Αυτό το υποτονικό διάλυμα προκαλεί διόγκωση και έκρηξη των ερυθρών αιμοσφαιρίων, απελευθερώνοντας το περιεχόμενό τους στο διάλυμα. Άλατα όπως το χλωριούχο κάλιο (KCl) προστίθενται συνήθως στο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης για να βοηθήσουν στη διατήρηση της οσμωτικής ισορροπίας και στην πρόληψη της κυτταρικής βλάβης σε άλλους τύπους κυττάρων που υπάρχουν στο δείγμα, όπως τα λευκά αιμοσφαίρια. Μπορεί να προστεθεί και EDTA, το οποίο επιτρέπει την ομοιόμορφη λύση των ερυθροκυττάρων χωρίς να βλάπτει τα ανοσοκύτταρα και εμποδίζοντας την πήξη του δείγματος του αίματος.

Στη συγκεκριμένη εργασία ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία. Αναμειγνύουμε 200μl πλήρους αίματος με 2ml ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (NH_4Cl : 19,16M, KHCO_3 : 1,25M και 25μl 0.5M EDTA ανά 1 ml διαλύματος), και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 300 x g για να απομακρυνθεί το ρυθμιστικό διάλυμα λύσης και τα κύτταρα είναι έτοιμα για ανάλυση ή χρώση. Είναι σημαντικό τα λευκοκύτταρα να μην παραμείνουν στο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης για παρατεταμένες χρονικές περιόδους, καθώς η μορφολογία και η βιωσιμότητα των κυττάρων θα επηρεαστούν αρνητικά.

2.2 Χρώση May-Grunwald-Giemsa

Η χρώση May-Grunwald-Giemsa χρησιμοποιείται κυρίως για την οπτικοποίηση των κυτταρικών συστατικών σε δείγματα αίματος και μυελού των οστών. Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει ένα μείγμα από τρεις διαφορετικές χρωστικές:

1. Μπλε του μεθυλενίου, που είναι υπεύθυνο για την χρώση των όξινων συστατικών του κυττάρου και χαρακτηρίζεται από το μπλε της χρώμα.
2. Αζούρ, που είναι υπεύθυνο για την χρώση των βασικών συστατικών του κυττάρου και στα οποία δίνει ένα κόκκινο-μωβ χρώμα.
3. Εωζίνη ή ηωσίνη, που βοηθά στην οπτικοποίηση των αλκαλικών συστατικών του κυττάρου δίδοντας τους ένα κόκκινο-πορτοκαλί χρώμα.

Το μείγμα των χρωστικών καθιστά την τεχνική αυτή πανοπτική, καθώς όλα τα κυτταρικά συστατικά υφίστανται χρώση. Η βέλτιστη τιμή pH για την τεχνική αυτή κυμαίνεται μεταξύ 6.5-6.7 και οποιαδήποτε αλλαγή του pH μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένη αντίδραση χρώσης. Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε η χρωστική May-Grunwald (Merck) και διάλυμα χρωστικής Giemsa (Merck).

Πειραματική διαδικασία

- Αρχικά, πραγματοποιείται διαδικασία διήθησης της χρωστικής May-Grunwald. Τοποθετούμε το χωνί με το διηθητικό χαρτί στην κωνική φιάλη και ρίχνουμε σιγά σιγά την χρωστική στο χωνί. Αφού, φιλτραριστεί η χρωστική την μεταφέρουμε σε έναν πλαστικό ογκομετρικό κύλινδρο με βιδωτό πώμα.
- Τοποθετούμε την αντικειμενοφόρο πλάκα με το επίχρισμα αίματος στο στατώ, και με την βοήθεια μιας πιπέτας pasteur καλύπτουμε όλη την έκταση της πλάκα με την χρωστική May-Grunwald, που μόλις διηθήσαμε και την αφήνουμε για 6 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Κατά το χρονικό αυτό διάστημα προετοιμάζουμε το δεύτερο διάλυμα χρώσης. Συγκεκριμένα, προσθέτουμε 20 ml από το διάλυμα της χρωστικής Giemsa στην φιάλη με το χωνί ώστε να διηθηθεί, και μετά αραιώνουμε με 80 ml απιονισμένο νερό.
- Ξεπλένουμε την αντικειμενοφόρο πλάκα βυθίζοντας την μερικές φορές μέσα σε ένα δοχείο με νερό.
- Αφού ξεπλύνουμε καλά, χρησιμοποιούμε την πιπέτα pasteur για να καλύψουμε όλη την πλάκα με την αραιωμένη χρωστική Giemsa και την αφήνουμε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι.
- Ξεπλένουμε με τον ίδιο τρόπο και αφήνουμε την αντικειμενοφόρο πλάκα να στεγνώσει πριν την παρατηρήσουμε στο οπτικό μικροσκόπιο.

2.3 Ανοσοκυτταροχημεία

Η ανοσοκυτταροχημεία στηρίζεται στην χημική συγγένεια αντιγόνου-αντισώματος για την ανίχνευση αντιγόνων σε κυτταρικό επίπεδο με την χρήση μονοκλωνικών αλλά και πολυκλωνικών αντισωμάτων σε κύτταρα καλλιέργειας. Είναι μια τεχνική με ικανοποιητική ευαισθησία και ειδικότητα, και δίνει την δυνατότητα επανάληψής της διαδικασίας. Χωρίζεται σε άμεση και έμμεση, όπου στην άμεση γίνεται χρήση ενός μόνο σημασμένου αντισώματος ενώ στην έμμεση χρησιμοποιούνται 2 σημασμένα αντισώματα. Η σήμανση των αντισωμάτων μπορεί να γίνει με 3 τρόπους:

1. Με φθορίζουσα ουσία (ανοσοφθορισμός)
2. Με ένζυμο (αλκαλική φωσφατάση, υπεροξειδάση, οξειδάση γλυκόζης)
3. Με σωματίδια χρυσού

Η πειραματική διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη βασίστηκε στο πρωτόκολλο που περιγράφεται στο άρθρο *α π ό* τους Tsang M, Gantchev J, Ghazawi FM, Litvinov IV, με τίτλο 'Protocol for adhesion and immunostaining of lymphocytes and other non-adherent cells in culture,' που δημοσιεύτηκε στο περιοδικό *Biotechniques* τον Νοέμβριο του 2017 [55]

Πειραματική διαδικασία

- Προσθέτουμε σε επιλεγμένα πηγαδάκια του πιάτου καλλιέργειας μερικές σταγόνες από το διάλυμα ζελατίνης (0.1% ζελατίνη σε νερό) και το αφήνουμε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Αφαιρούμε το διάλυμα ζελατίνης με την βοήθεια μιας πιπέτας Pasteur.
- Τοποθετούμε σε κάθε πηγαδάκι πιάτου καλλιέργειας 16 οπών από μια γυάλινη καλυπτρίδα, όπου προσθέτουμε 1-2 σταγόνες δείγματος αίματος.
- Στην συνέχεια, προσθέτουμε διάλυμα PBS με μια πιπέτα Pasteur σε όλα τα πηγαδάκια του πιάτου καλλιέργειας και αφήνουμε τα κύτταρα να επωάσουν για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Αφαιρούμε την περίσσεια, και ακολουθεί 1 πλύση με PBS.
- Στην συνέχεια, για τη μονιμοποίηση των κυττάρων προσθέτουμε σε 8 πηγαδάκια διάλυμα 2% φορμαλδεΰδης (Sigma) και στα υπόλοιπα 8 διάλυμα 10% φορμαλδεΰδης και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 20 και 10 λεπτά, αντίστοιχα.

Το διάλυμα 10% φορμαλδεΰδης παρασκευάστηκε με την ανάμειξη 2.6ml PBS και 3.6ml φορμαλδεΰδης (Stock: 36% φορμαλδεΰδης) ενώ αυτό του 2% φορμαλδεΰδης με την ανάμειξη 3.2ml PBS και 0.8ml από το διάλυμα 10% φορμαλδεΰδης.

- Ακολουθήσαν άλλες 2 πλύσεις με PBS

- Συνεχίσουμε με την διαδικασία του Blocking, όπου επωάζουμε τα κύτταρα σε διάλυμα PBS με 1% BSA για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Αυτό γίνεται ώστε να μπλοκαριστούν οι μη ειδικές θέσεις δέσμευσης, αυξάνοντας την ειδικότητα του αντισώματος για το αντιγόνο
- Ακολουθεί επώαση με το πρώτο αντίσωμα έναντι του αντιγόνου σε 4°C για όλο το βράδυ
- Εκπλύση με PBS
- Επώαση με το δεύτερο αντίσωμα έναντι του πρώτου αντισώματος

2.3.1 Ανοσοφθορισμός

Στη συγκεκριμένη εργασία δοκιμάστηκε η τεχνική του ανοσοφθορισμού προκειμένου να εντοπιστούν τα μόρια του NF-κΒ σε κύτταρα περιφερικού αίματος. Ο ανοσοφθορισμός είναι τεχνική που χρησιμοποιεί ένα μικροσκόπιο φθορισμού για την βιολογική έρευνα και την διάγνωση. Είναι μια αποτελεσματική μέθοδος οπτικοποίησης ενδοκυτταρικών διεργασιών, δομών και συνθηκών. Βασίζεται στην ειδικότητα δέσμευσης μεταξύ αντιγόνου και αντισώματος. Χρησιμοποιούνται φθορίζουσες ουσίες, που απορροφούν τις ακτίνες φωτός σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος. Αρχικά είναι απαραίτητη η προετοιμασία του δείγματος, όπου το δείγμα προετοιμάζεται και στερεοποιείται σε πρότυπες συνθήκες ώστε να διατηρηθεί η δομή των αντιγόνων. Στην συνέχεια, προστίθεται το πρώτο αντίσωμα, στην δικιά μας περίπτωση για τον NF-κΒ/p65 και για τον NF-κΒ/p50, το οποίο ονομάζεται NF-κΒ1 p105/p50 (D4P4D, Cell signaling) και έχει παραχθεί σε οργανισμό κουνελιού. Για το πρώτο αντίσωμα η επώαση διαρκεί όλο το βράδυ στους 4°C. Ακολουθεί η διαδικασία της πλύσης όπου, απαιτούνται ρυθμιστικά διαλύματα πλύσης, όπως ο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7.4 (PBS). Αυτά τα ρυθμιστικά διαλύματα βοηθούν στην απομάκρυνση τυχόν μη δεσμευμένων αντισωμάτων, ελαχιστοποιώντας τον θόρυβο του περιβάλλοντος και ενισχύοντας την εξειδίκευση της δοκιμής. Αφού το πρώτο αντίσωμα δεν είναι δεσμευμένο με κάποια φθορίζουσα ουσία, είναι απαραίτητη η προσθήκη ενός δεύτερου αντισώματος (GF488A, Cell Signalling). Στο τελικό στάδιο στα κύτταρα προστίθεται διάλυμα που περιέχει DAPI (για χρώση των πυρήνων) και μονιμοποιητικό των κυττάρων (Thermofisher Scientific). Το δείγμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία 4oC και στο σκοτάδι και μπορεί να αναλυθεί κάτω από ένα μικροσκόπιο φθορισμού.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Κατά τη διάρκεια της παρούσας διπλωματικής εργασίας μελετήθηκαν διάφορες συνθήκες ώστε να αναπτυχθεί ένα πειραματικό πρωτόκολλο γρήγορης και εύκολης επεξεργασίας δειγμάτων του αίματος με σκοπό τη μελέτη των κυττάρων του περιφερικού αίματος δοτών με ανοσοκυτταροχημικές τεχνικές.

3.1 Κατακρήμνιση και μονιμοποίηση κυττάρων περιφερικού αίματος

Ελέγχθηκαν πολλές διαφορετικές συνθήκες, ώστε να δούμε ποια από αυτές θα μας έδινε τα καλύτερα αποτελέσματα για μελέτη. Χρησιμοποιήθηκαν διάφορες συνθήκες, όπως ολικό αίμα ή αίμα στο οποίο είχαν λυθεί τα ερυθρά αιμοσφαίρια. Τα δείγματα μας μονιμοποιήθηκαν είτε με 2% φορμαλδεΰδη είτε με 10%. Επιπλέον, στην αντικειμενοφόρο πλάκα είτε είχε προστεθεί ζελατίνη είτε όχι. (Πίνακας 3.1).

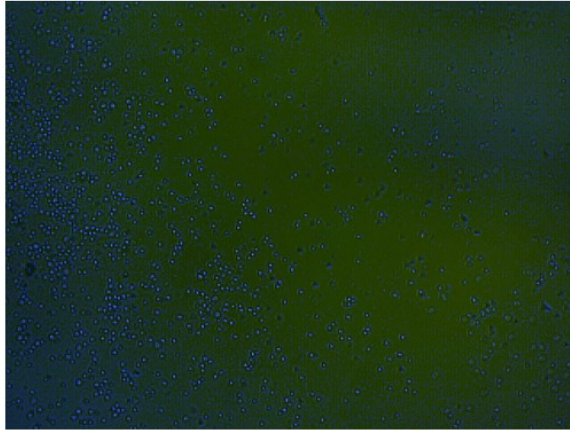
Πίνακας 3.1: Συνθήκες που δοκιμάστηκαν για την μονιμοποίηση λευκοκυττάρων αίματος σε αντικειμενοφόρους.

Sample	1	2	3	4	Gelatin
A. Whole Blood (100μl)	1	2	3	4	0.1%
B. Whole Blood (100μl)	5	6	7	8	-
C. Lysed RBC (50μl)	9	10	11	12	0.1%
D. Lysed Blood (50μl)	13	14	15	16	-
Fixation	2% formaldehyde-20min (fix)		10% formaldehyde- 10min (fix)		

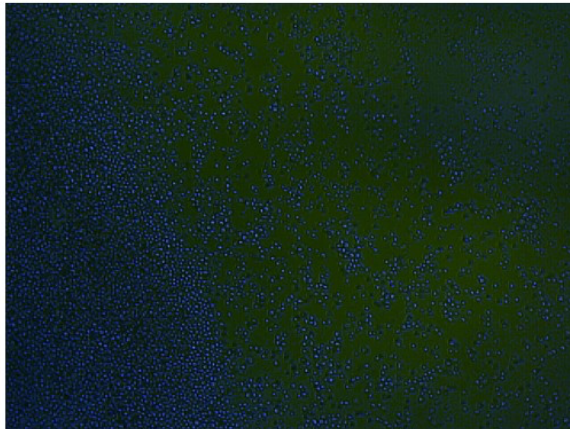
Τα δείγματα ελέγχθηκαν ως προς την παρουσία λευκοκυττάρων με τη βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου στο οποίο πάρθηκαν φωτογραφίες (Εικόνα 3.1).

Με βάση τις παρατηρήσεις μας, συμπεραίνουμε ότι το καθαρό αίμα (ελεύθερο ερυθρών αιμοσφαιρίων) έδωσε καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με το ολικό αίμα (Εικόνα 3.1 A-5 και B-9), καθώς η διάκριση των μονοκύτταρων ήταν πιο εύκολη (Εικόνα 3.1, B-9). Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι τα δείγματα στα οποία προστέθηκε ζελατίνη δεν απέδωσαν τόσο καλά, καθώς τα κύτταρα εξαπλώθηκαν/εκτοπίστηκαν και κόλλησε ένας μικρός μόνο αριθμός τους στις άκρες της καλυπτρίδας (Εικόνα 3.1, Γ-13). Αντίθετα, στα δείγματα που δεν προστέθηκε ζελατίνη, τα κύτταρα κολλήσαν στην μέση της καλυπτρίδας.

A-5



B-9



Γ-13

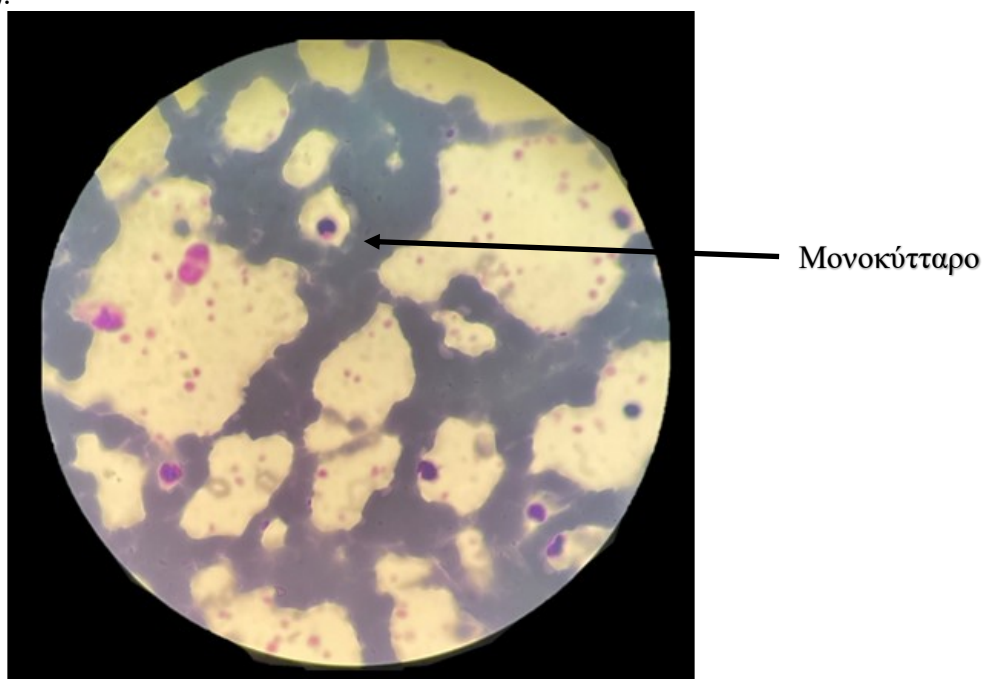


Εικόνα 3.1: Παρουσία λευκοκυττάρων όπως φωτογραφήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο κάτω από διαφορετικές συνθήκες κατακρήμνισης και μονιμοποίησης. (Α) Αίμα με λυμένα ερυθρά χωρίς χρήση ζελατίνης σε αντικειμενοφόρο πλάκα, (Β) Αίμα με λυμένα ερυθρά με 0.1% ζελατίνη σε αντικειμενοφόρο πλάκα και (Γ) Ολικό αίμα χωρίς ζελατίνη. Όλα τα δείγματα μονιμοποιήθηκαν με 2% φορμαλδεύδης για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Τα δείγματα που μονιμοποιήθηκαν με 2% φορμαλδεϋδη δεν παρουσίασαν κάποια ορατή διαφορά σε σχέση με τα δείγματα που μονιμοποιήθηκαν με 10% φορμαλδεϋδη. Δεδομένου ότι η μονιμοποίηση με 2% φορμαλδεϋδη, αν και διαρκεί περισσότερο από ότι η μονιμοποίηση με 10% φορμαλδεϋδη, έχει μικρότερη πιθανότητα να οδηγήσει υπερβολικής διασύνδεσης (cross-linking) μεταξύ των πρωτεϊνών και άλλων μακρομορίων του δείγματος (over-fixation) φαίνεται να είναι και η πιο ασφαλής επιλογή για το πείραμα μας μια και μειώνει την πιθανότητα να χαθεί η αντιγονικότητα των μορίων η οποία είναι απαραίτητη για τη βέλτιστη ανοσοανίχνευση τους σε μετέπειτα πείραμα ανοσοκυτταροχημείας. Το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές. Συνοψίζοντας, οι συνθήκες που μας έδωσαν τα καλύτερα αποτελέσματα ήταν το λυμένο αίμα, χωρίς προσθήκη ζελατίνης και με επεξεργασία με 2% φορμαλδεϋδη για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

3.2 Ανίχνευση μονοκυττάρων σε περιφερικό αίμα με χρώση May Grunwald-Giemsa

Εξίσου σημαντικό ήταν να εξασφαλιστεί η ικανότητα διάκρισης των μονοκυττάρων από τα υπόλοιπα κύτταρα του αίματος, για αυτό και έγινε χρώση δειγμάτων αίματος με May-Grunwald και Giemsa και παρατήρηση τους στο μικροσκόπιο (Εικόνα 3.2). Αφού πραγματοποιήθηκε η χρώση στα πλακάκια, αφέθηκαν να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια παρατηρήθηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο σε μεγέθυνση x 40 (με λάδι). Ο διαχωρισμός των λεμφοκυττάρων από τα μονοκύτταρα βασίστηκε σε χρωματικές και μορφολογικές διαφορές. Τα λεμφοκύτταρα παρουσίασαν ένα διαφανές ροζ κυτταρόπλασμα με έναν μεγάλο μπλε-μωβ πυρήνα και τα μονοκύτταρα είχαν ένα διαφανές ροζ κυτταρόπλασμα με μωβ-ροζ πυρήνα σε σχήμα πετάλου.(Εικόνα 3.2).

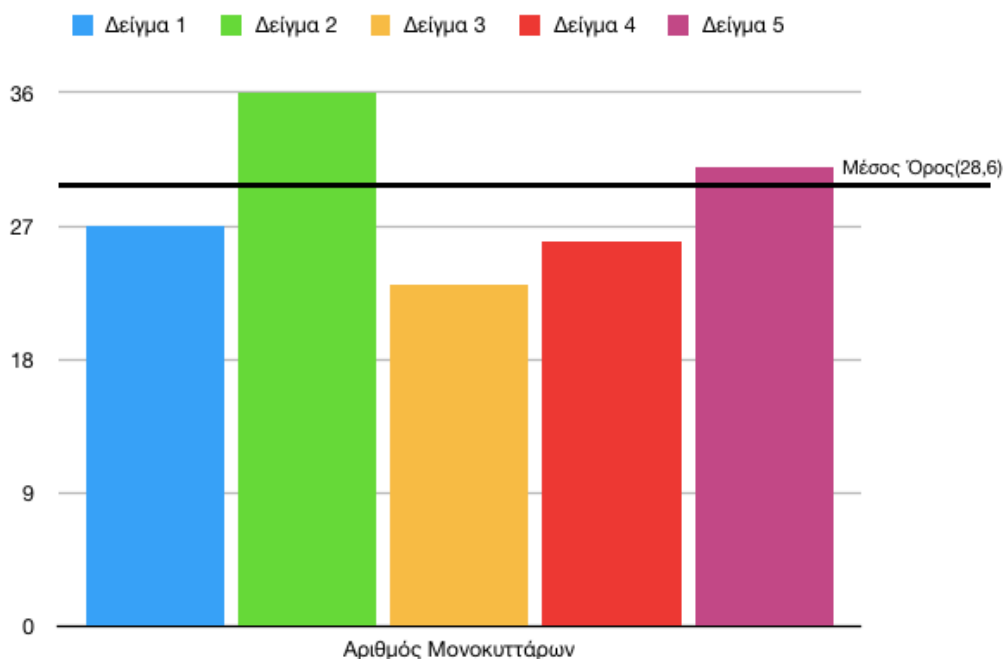


Εικόνα 3.2: Χρώση λευκοκυττάρων με May Grunwald-Giemsa μετά από μονιμοποίηση και ανίχνευση μονοκυττάρων.

Μετά την οριστικοποίηση του πρωτόκολλου κατακρήμνισης των κυττάρων, ακολούθησε μελέτη σε δείγματα περιφερικού αίματος. Σε κάθε δείγμα έγινε καταμέτρηση 100 λευκοκυττάρων (σύνολο πέντε δείγματα) με την βοήθεια πεδίων. Συγκεκριμένα, έγινε καταμέτρηση 3-5 πεδίων σε κάθε δείγμα, όπου κάθε πεδίο αποτελούταν από 15-20 εμφανή κύτταρα. Ο αριθμός των πεδίων που χρειάστηκε σε κάθε δείγμα ώστε να φτάσουμε στο επιθυμητό αριθμό κυττάρων (100 κύτταρα) διαφέρει λόγω των διαφορετικών μικροχειρισμών που έγιναν κατά την διάρκεια της επίστρωσης στο κάθε πλακάκι είτε λόγω της διαφορετικής σύστασης του αίματος. Στην συνέχεια, ξεχωρίσαμε με βάση τις μορφολογικές διαφορές των κυττάρων, πόσα από τα 100 λευκοκύτταρα είναι μονοκύτταρα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 3.2 και Εικόνα 3.3).

Πίνακας 3.2: Καταμέτρηση λευκοκυττάρων και μονοκυττάρων σε δείγματα δοτών περιφερικού αίματος (N=5).

	Αριθμός Λευκοκυττάρων	Αριθμός Μονοκυττάρων	Ποσοστό % Μονοκυττάρων
Δείγμα 1	104	27	26%
Δείγμα 2	103	36	35%
Δείγμα 3	100	23	23%
Δείγμα 4	102	26	25,5%
Δείγμα 5	108	31	29%



Εικόνα 3.3: Αριθμός μονοκυττάρων σε δείγματα περιφερικού αίματος μετά από κατακρήμνιση και μονιμοποίηση και χρώση με May Grunwald-Giemsa.

Όπως γνωρίζουμε τα μονοκύτταρα σε φυσιολογικές συνθήκες βρίσκονται στο περιφερικό αίμα σε ποσοστό 1-6% των ολικών λευκοκυττάρων. Στα δείγματα που μελετήθηκαν παρατηρούμε το ποσοστό των μονοκυττάρων ήταν αρκετά αυξημένα.

3.3. Ανίχνευση μορίων του NF-κB σε μονιμοποιημένα κύτταρα

Σε τυχαία δείγματα από δότες δοκιμάστηκε η χρώση για ανοσοφθορισμό μορίων NF-κB. Παρ' όλο που ανιχνεύθηκε κυτταροπλασματική χρώση, γεγονός αναμενόμενο, οι εικόνες δυστυχώς δεν ήταν ξεκάθαρες ώστε να παρουσιαστούν στα αποτελέσματα.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία δοκιμάστηκαν διάφορες συνθήκες ώστε να αναπτυχθεί ένα πειραματικό πρωτόκολλο γρήγορης και εύκολης επεξεργασίας δειγμάτων του αίματος δοτών. Οι δοκιμές οδήγησαν σε επιτυχή αποτελέσματα και σε ανάπτυξη συγκεκριμένου πρωτοκόλλου για την κατακρήμνιση και επικόλληση των κυττάρων σε αντικειμενοφόρους.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, υπάρχει αδυναμία κατακρήμνισης κυττάρων όταν χρησιμοποιείται πλήρες αίμα. Το πλήρες αίμα περιέχει διάφορα συστατικά, όπως πλάσμα, ερυθρά αιμοσφαίρια, λευκά αιμοσφαίρια και αιμοπετάλια. Η σύνθεση του πλήρους αίματος και η παρουσία αντιπηκτικών παραγόντων μπορούν πράγματι να αποτρέψουν την κατακρήμνιση των κυττάρων. Το πλάσμα βοηθά στη διατήρηση των κυττάρων του αίματος σε αιώρηση. Οι πρωτεΐνες του πλάσματος, ιδιαίτερα το ινωδογόνο, συμβάλλουν στην αύξηση του ιξώδους του αίματος, η οποία εμποδίζει την καθίζηση των κυττάρων [47]. Ένας ακόμα παράγοντας που συμβάλλει στην αποτροπή της κυτταρικής καθίζησης *in vitro* μπορεί να είναι οι αντιπηκτικοί παράγοντες. Όταν συλλέγεται αίμα για εργαστηριακούς ελέγχους ή ερευνητικούς σκοπούς, συνήθως προστίθενται σε αυτό αντιπηκτικοί παράγοντες για την πρόληψη δημιουργίας θρόμβων (πήξης). Οι αντιπηκτικοί παράγοντες, όπως η ηπαρίνη ή το EDTA (αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ), βοηθούν στη διατήρηση της υγρής κατάστασης του αίματος και αποτρέπουν την κατακρήμνιση πρωτεϊνών [48]. Εξίσου πιθανό είναι να υπάρχουν ενδοθηλιακά κύτταρα σε ένα δείγμα αίματος. Κατά τη διαδικασία της δειγματοληψίας αίματος, μπορεί μια μικρή ποσότητα από ενδοθηλιακά κύτταρα να αποκολληθούν από την στοιβάδα των ενδοθηλιακών κυττάρων (*Tunica Intima*) του αγγείου. Τα κύτταρα αυτά έχουν σημαντικό ρόλο στην πρόληψη της κατακρήμνισης των συστατικών του αίματος *in vivo*, παράγοντας οξειδωτικές ενώσεις, αντιπηκτικούς και οξυντικούς παράγοντες, δεν αποκλείεται, λοιπόν, να εμποδίζουν και την *in vitro* κατακρήμνιση [49]. Ένας ακόμα λόγος που μπορεί να παρεμποδίσει την σωστή και πλήρη κατακρήμνιση των κυττάρων είναι η ελλιπής τήρηση ενδεδειγμένων συνθηκών όπως η βέλτιστη θερμοκρασία συντήρησης και ο κατάλληλος χειρισμός των δειγμάτων. Τα δείγματα αίματος θα πρέπει να διατηρούνται στη σωστή θερμοκρασία και να χειρίζονται με ήπιο τρόπο για να αποφευχθεί η διαταραχή των κυτταρικών συστατικών του. Επιπλέον, η διάρκεια διατήρησης του δείγματος πρέπει να είναι μικρή [50].

Ένα πρόβλημα που διαπιστώθηκε στα πειράματά μας ήταν αυτό της χρήσης ζελατίνης: παρουσία ζελατίνης, τα κύτταρα αντί να κολλήσουν στο κέντρο της καλυπτρίδας, συγγεντρώθηκαν στις άκρες της, δίνοντας μας έναν πολύ μικρό αριθμό κυττάρων για μικροσκοπική ανάλυση. Παρότι η

ζελατίνη είναι μια απλή και εύκολη στην χρήση ουσία, είναι και σχετικά αδύναμη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μη-σταθερή προσκόλληση των κυττάρων πάνω στην καλυπτρίδα. Επιπλέον, η ζελατινοποίηση αίματος δεν είναι κοινή ή τυπική τεχνική στην εργαστηριακή πρακτική καθώς συνήθως δημιουργεί μια αδιαφανή ή ημι-στερεή ουσία (gel) και δεν είναι κατάλληλη για μικροσκοπική εξέταση [51].

Δυστυχώς υπάρχουν πολλοί παράγοντες που μπορεί να εμποδίσουν την σωστή ζελατινοποίηση του δείγματος. Η θερμοκρασία μπορεί να επηρεάσει τον σχηματισμό πρωτεϊνικών πηκτωμάτων με διάφορους τρόπους, τόσο τον ρυθμό μετουσίωσης όσο και τον ρυθμό αλληλεπίδρασης μεταξύ πρωτεϊνών. Πρέπει να επιλεγεί μια θερμοκρασία για το σχηματισμό της γέλης ζελατίνης που να εξισορροπεί τον ρυθμό αναδίπλωσης της πρωτεΐνης με αυτόν της συσσώρευσης της. Επιπλέον, η ζελατίνη απαιτεί τυπικά ένα ελαφρώς όξινο εύρος pH από περίπου 4,0 έως 7,0 για γίνει ζελατινοποίηση. Το pH από το δείγμα αίματός μας είναι ελαφρώς αλκαλικό (κυμαίνεται στα 7.3-7.4) και δεν αποτελεί βέλτιστη συνθήκη για τη διαδικασία της ζελατινοποίησης [52]. Εξίσου σημαντική είναι και η διασπορά του αίματος, είναι σημαντικό να εξαπλωθεί το αίμα δημιουργώντας σε ένα λεπτό, ομοιόμορφο στρώμα όπου θα ζελατινοποιηθεί σωστά, κάτι που δεν μπορεί να συμβεί σωστά πάνω στις μικρές οπές του πιάτου καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα μας [53,54].

Στα δείγματα των επικολλημένων κυττάρων μετρήθηκαν τα ποσοστά των μονοκυττάρων σε διαφορετικούς, τυχαίους δότες και παρατηρήθηκε μεγάλο εύρος στο ποσοστό των μονοκυττάρων. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν αυξημένα ποσοστά μονοκυττάρων, τα οποία ήταν σε συμφωνία με την αιματολογική εξέταση των συγκεκριμένων δοτών. Τα αυξημένα ποσοστά μονοκυττάρων έχει αναφερθεί ότι συσχετίζονται με την κλινική έκβαση σε διαφορετικούς τύπους αιματολογικών κακοηθειών αλλά και σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου. Αυτή η συσχέτιση μπορεί να σχετίζεται με μεταβολές στους κυκλοφορούντες υποπληθυσμούς μονοκυττάρων και στα μακροφάγα που διεισδύουν σε όγκους. Αξίζει να σημειωθεί βέβαια ότι, τα αυξημένα επίπεδα μονοκυττάρων μπορεί να είναι αποτέλεσμα κάποιας απλής λοίμωξης. Για το λόγο αυτό, είναι σημαντικό να ελεγχθεί το ιατρικό ιστορικό των δοτών μας για να διαπιστώσουμε αν τα αυξημένα ποσοστά των μονοκυττάρων είναι κάτι αναμενόμενο, καθώς και τον λόγο που συμβαίνει η αύξηση αυτή.

Από τον έλεγχο των ιατρικών ιστορικών των δοτών μας διαπιστώσαμε ότι, δύο από τα δείγματα προέρχονταν από ασθενείς που πάσχουν από χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία. Η Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία (ΧΛΛ) είναι ένας τύπος καρκίνου που επηρεάζει το αίμα και τον

μυελό των οστών, και χαρακτηρίζεται από τον ανώμαλο πολλαπλασιασμό των ώριμων Β λεμφοκυττάρων. Η ΧΛΛ δεν συνδέεται άμεσα με το αυξημένο ποσοστό των μονοκυττάρων, μία μικρή αύξηση του πληθυσμού των κυττάρων αυτών αναμένεται να υπάρχει δεν είναι όμως απαραίτητο [41]. Στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία έχει υποστηριχθεί η ιδέα ότι τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα (μονοκύτταρα και μακροφάγα), που προέρχονται από φλεγμονώδη μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος, στο μικροπεριβάλλον του όγκου ρυθμίζουν τη βιωσιμότητα, την επιβίωση και την αντίσταση των κυττάρων των ασθενών με ΧΛΛ στην απόπτωση που προκαλείται από φάρμακα. Αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι τα κυκλοφορούντα μονοκύτταρα μπορεί να συμβάλλουν στον πληθυσμό των μακροφάγων που σχετίζονται με ΧΛΛ στους λεμφαδένες, τον σπλήνα και τον μυελό των οστών. Τα αυξημένα επίπεδα κυκλοφορούντων μονοκυττάρων θα μπορούσαν να προάγουν την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων των ασθενών με ΧΛΛ, επιφέροντας χειρότερα κλινικά αποτελέσματα για ασθενείς [42]. Καθώς ο απόλυτος αριθμός μονοκυττάρων κατά τη διάγνωση σχετίζεται με τη συνολική επιβίωση των ασθενών δίνει και την δυνατότητα αναγνώρισης ασθενών υψηλού κινδύνου όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με το άλλες τεχνικές κλινικής διάγνωσης. Φαίνεται πως ένα αυξημένο ποσοστό μονοκυττάρων συνδέεται συνήθως και με ένα χαμηλό ποσοστό επιβίωσης [43]. Συμπερασματικά, είναι πιθανό η ΧΛΛ του ασθενούς να επηρεάζει έντονα την λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος.

Το δείγμα που παρουσίασε την υψηλότερη αύξηση μονοκυττάρων, προήλθε από ασθενή με οξεία μυελογενή λευχαιμία. Η οξεία μυελογενής λευχαιμία (ΟΜΛ) είναι μια κακοήθεια των προδρόμων βλαστοκυττάρων της μυελοειδής γενεαλογίας (ερυθρά αιμοσφαίρια, αιμοπετάλια και λευκά αιμοσφαίρια εκτός των Β και Τ κυττάρων) και προκύπτει από κλωνικό μετασχηματισμό αιμοποιητικών προδρόμων μέσω της απόκτησης χρωμοσωμικών ανακατατάξεων και πολλαπλών γονιδιακών μεταλλάξεων [44]. Καθώς λοιπόν, η ΟΜΛ τυπικά εμφανίζει αυξημένο ποσοστό ανώριμων λευκών αιμοσφαιρίων στο αίμα και στο μυελό των οστών, έτσι είναι και ένα αυξημένο ποσοστό μονοκυττάρων αναμενόμενο. Ο μυελός των οστών παράγει πάρα πολλά μονοκύτταρα ή κοκκιοκύτταρα, τα οποία βέβαια δεν έχουν αναπτυχθεί πλήρως και δεν μπορούν να λειτουργήσουν κανονικά.

Το τελευταίο δείγμα προέρχεται από ασθενή που παρουσιάζει λεμφοπενία. Η λεμφοπενία (γνωστή και ως λεμφοκυτταροπενία) εμφανίζεται όταν ο αριθμός των λεμφοκυττάρων στην κυκλοφορία του αίματος είναι χαμηλότερος από το κανονικό και υποδηλώνει πιθανή λοίμωξη, ή άλλη σημαντική ασθένεια. Λεμφοπενία έχει παρατηρηθεί σε πολλά αυτοάνοσα νοσήματα όπως η

ρευματοειδή αρθρίτιδα, ο ινσουλινοεξαρτώμενο σακχαρώδης διαβήτης, η νόσος του Crohn, ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος (ΣΕΛ) και τις πρωτοπαθής αγγειίτιδα. Η λεμφοπενία είναι επίσης ένας τυπικός δείκτης της γήρανσης του ανοσοποιητικού [45]. Δεν αναμένεται συνήθως αυξημένος αριθμός μονοκυττάρων στη λεμφοπενία, τουλάχιστον όχι ως άμεση συνέπεια της ίδιας της λεμφοπενίας. Ωστόσο, εάν υπάρχει μια υποκείμενη ιατρική κατάσταση ή λοίμωξη που προκαλεί τόσο λεμφοπενία όσο και αύξηση των μονοκυττάρων, είναι απαραίτητο να εντοπιστεί και να αντιμετωπιστεί η συγκεκριμένη υποκείμενη αιτία. Μερικά σενάρια στα οποία τα μονοκύτταρα μπορεί να είναι αυξημένα παρουσία λεμφοπενίας περιλαμβάνουν κάποια μόλυνση ή φλεγμονώδης διαταραχή ή ακόμα και κάποια διαταραχή του μυελού των οστών. Επίσης, κάποια φάρμακα, όπως τα κορτικοστεροειδή, μπορούν να καταστείλουν την παραγωγή ή τη λειτουργία των λεμφοκυττάρων, οδηγώντας σε λεμφοπενία. Ως απόκριση σε αυτό, το σώμα μπορεί να αυξήσει την παραγωγή ή την απελευθέρωση μονοκυττάρων ως αντισταθμιστικό μηχανισμό για τη διατήρηση της ανοσοποιητικής λειτουργίας [46].

Η παρουσία του αυξημένου αριθμού μονοκυττάρων που παρατηρήθηκε είναι πιθανό να προέρχεται από φάρμακα που χορηγούνται στον ασθενή. Είναι γνωστό ότι ένας μεγάλος αριθμός φαρμάκων μπορεί να οδηγήσουν σε αύξηση του αριθμού των μονοκυττάρων όπως για παράδειγμα κάποια αντιβιοτικά, κάποια ανοσοκατασταλτικά, διάφοροι αντιοξειδωτικοί παράγοντες καθώς και κάποια αντιφλεγμονώδη φάρμακα.

Τέλος, οι δοκιμασίες της ανοσοκυτταρικής χρώσης για τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κΒ σε επικολλημένα μονοκύτταρα έδωσαν αχνή εικόνα. Αυτό είναι ένα θετικό αποτέλεσμα και θα μας βοηθήσει να δοκιμαστούν περαιτέρω πειραματικές διαδικασίες (π.χ. αύξηση της συγκέντρωσης του αντισώματος έναντι του NF-κΒ) προκειμένου να μελετηθεί η ενεργοποίηση του μεταγραφικού αυτού παράγοντα σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και συγκεκριμένα στα μονοκύτταρα, ή και στα μακροφάγα.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. New York: Garland Science; 2001.
2. Brubaker S.W., Bonham K.S., Zano I., Kagan J.C. Innate immune pattern recognition: A cell biological perspective *Annu. Rev. Immunol.* 2015;33:257. doi: 10.1146/annurev-immunol-032414-112240.
3. O'Shea JJ, Ma A, Lipsky P. Cytokines and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:37–45.
4. Hayden MS, Ghosh S. NF- κ B in immunobiology. *Cell Res.* 2011 Feb;21(2):223-44. doi: 10.1038/cr.2011.13. Epub 2011 Jan 18. PMID: 21243012; PMCID: PMC3193440.
5. Beutler B. Innate immunity: an overview. *Mol Immunol.* 2004 Feb;40(12):845-59. doi: 10.1016/j.molimm.2003.10.005. PMID: 14698223.
6. Silva MT. When two is better than one: macrophages and neutrophils work in concert in innate immunity as complementary and cooperative partners of a myeloid phagocyte system. *J LeukocBiol.* 2010;87:93–106
7. Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J LeukocBiol.* 2003;73:209–12.
8. Verreck FA, de Boer T, Langenberg DML, van der Zanden L, Ottenhoff THM. Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN- γ - and CD40L-mediated costimulation. *J LeukocBiol.* 2006;79:285–93.
9. Volkman, A. & Gowans, J. L. The origin of macrophages from human bone marrow in the rat. *Br. J. Exp. Pathol.* 46, 62–70 (1965).
10. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2011 Oct 10;11(11):762-74. doi: 10.1038/nri3070. PMID: 21984070; PMCID: PMC3947780.
11. Hettinger J, Richards DM, Hansson J, et al. Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nat Immunol.* 2013;14:821–830.
12. Serbina NV, Pamer EG. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol.* 2006;7:311–317. doi: 10.1038/ni1309.

13. Serbina NV, Pamer EG. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol.* 2006;7:311–317. doi: 10.1038/ni1309.
14. Dal-Secco D, Wang J, Zeng Z, Kolaczowska E, Wong CH, Petri B, Ransohoff RM, Charo IF, Jenne CN, Kubes P. A dynamic spectrum of monocytes arising from the in situ reprogramming of CCR2⁺ monocytes at a site of sterile injury. *J Exp Med.* 2015;212:447–456. doi: 10.1084/jem.20141539.
15. J. L. & Hoffmann, J. A. Toll and Toll-like proteins: an ancient family of receptors signaling infection. *Rev. Immunogenet.* 2, 294–304 (2000).
16. Akira, S., Takeda, K. & Kaisho, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunol.* 2, 675–680 (2001).
17. Hayden, M. S., West, A. P., & Ghosh, S. (2006). NF- κ B and the immune response. *Oncogene*, 25(51), 6758–6780.
18. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell.* 2010 Mar 19;140(6):805-20. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.022. PMID: 20303872.
19. Silverman, N. & Maniatis, T. NF- κ B signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev.* 15, 2321–2342 (2001).
20. Carmody RJ, Ruan Q, Liou HC, Chen YH (2007) Essential roles of c-Rel in TLR-induced IL-23 p19 gene expression in dendritic cells. *J Immunol* 178(1):186–191.
21. Mulero MC, Huxford T, Ghosh G. NF- κ B, I κ B, and IKK: Integral Components of Immune System Signaling. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1172:207-226. doi: 10.1007/978-981-13-9367-9_10. PMID: 31628658.
22. Cohen, L.; Henzel, W.J. and Baeuerle, P.A. (1998) *Nature*, 395, 292-296.
23. Wang, C. et al. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 412, 346–351 (2001).
24. Kelliher, M. A. et al. The death-domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF- κ B signal. *Immunity* 8, 297–303 (1998).
25. Lawrence T. The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009 Dec;1(6):a001651. doi: 10.1101/cshperspect.a001651. Epub 2009 Oct 7. PMID: 20457564; PMCID: PMC2882124.
26. Jin, T., & Yin, Q. (Eds.). (2019). *Structural Immunology. Advances in Experimental Medicine and Biology.*

27. Dorrington MG, Fraser IDC. NF- κ B Signaling in Macrophages: Dynamics, Crosstalk, and Signal Integration. *Front Immunol.* 2019 Apr 9;10:705. doi: 10.3389/fimmu.2019.00705. PMID: 31024544; PMCID: PMC6465568.
28. Sun SC. The noncanonical NF- κ B pathway. *Immunol Rev.* 2012;246:125–140
29. Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 1999;11:115–22.
30. Guha, M., & Mackman, N. (2001). LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cellular Signalling*, 13(2), 85–94. doi:10.1016/s0898-6568(00)00149-2
31. HuangDB, HuxfordT, ChenYQ, GhoshG (1997) The role of DNA in the mechanism of NF- κ B dimer formation: crystal structures of the dimerization domains of the p50 and p65 subunits. *Structure* 5(11):1427–1436
32. Magnani, M., Crinelli, R., Bianchi, M., & Antonelli, A. (2000). The Ubiquitin-Dependent Proteolytic System and other Potential Targets for the Modulation of Nuclear Factor- κ B (NF- κ B). *Current Drug Targets*, 1 (4)
33. Yao M, Brummer G, Acevedo D, Cheng N. Cytokine Regulation of Metastasis and Tumorigenicity. *Adv Cancer Res.* 2016;132:265-367. doi: 10.1016/bs.acr.2016.05.005. Epub 2016 Aug 5. PMID: 27613135.
34. Papoutsopoulou S, Campbell BJ. Epigenetic Modifications of the Nuclear Factor Kappa B Signalling Pathway and its Impact on Inflammatory Bowel Disease. *Curr Pharm Des.* 2021;27(35):3702-3713. doi: 10.2174/1381612827666210218141847. PMID: 33602081.
35. Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol.* 2014 Sep 25;5:461. doi: 10.3389/fimmu.2014.00461. PMID: 25309543; PMCID: PMC4174766.
36. Baltimore D. Discovering NF- κ B. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009 Jul;1(1):a000026. doi: 10.1101/cshperspect.a000026. PMID: 20066072; PMCID: PMC2742082.
37. Epelman S, Lavine KJ, Randolph GJ. Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity.* 2014 Jul 17;41(1):21-35. doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.013. PMID: 25035951; PMCID: PMC4470379.
38. Jerala R. Structural biology of the LPS recognition. *Int J Med Microbiol.* 2007 Sep;297(5):353-63. doi: 10.1016/j.ijmm.2007.04.001. Epub 2007 May 3. PMID: 17481951.

39. Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest.* 2001 Jan;107(1):7-11. doi: 10.1172/JCI11830. PMID: 11134171; PMCID: PMC198552.
40. Park MH, Hong JT. Roles of NF-κB in Cancer and Inflammatory Diseases and Their Therapeutic Approaches. *Cells.* 2016 Mar 29;5(2):15. doi: 10.3390/cells5020015. PMID: 27043634; PMCID: PMC4931664
41. Arruga F, Gyau BB, Iannello A, Vitale N, Vaisitti T, Deaglio S. Immune Response Dysfunction in Chronic Lymphocytic Leukemia: Dissecting Molecular Mechanisms and Microenvironmental Conditions. *Int J Mol Sci.* 2020 Mar 6;21(5):1825. doi: 10.3390/ijms21051825. PMID: 32155826; PMCID: PMC7084946.)
42. Friedman DR, Sibley AB, Owzar K, Chaffee KG, Slager S, Kay NE, Hanson CA, Ding W, Shanafelt TD, Weinberg JB, Wilcox RA. Relationship of blood monocytes with chronic lymphocytic leukemia aggressiveness and outcomes: a multi-institutional study. *Am J Hematol.* 2016 Jul;91(7):687-91. doi: 10.1002/ajh.24376. Epub 2016 Apr 24. PMID: 27037726; PMCID: PMC5137369.
43. Wilcox RA, Ristow K, Habermann TM, Inwards DJ, Micallef IN, Johnston PB, Colgan JP, Nowakowski GS, Ansell SM, Witzig TE, Markovic SN, Porrata L. The absolute monocyte count is associated with overall survival in patients newly diagnosed with follicular lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 2012 Apr;53(4):575-80. doi: 10.3109/10428194.2011.637211. Epub 2012 Jan 3. PMID: 22098403
44. Rubnitz JE, Gibson B, Smith FO. Acute myeloid leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2010 Feb;24(1):35-63. doi: 10.1016/j.hoc.2009.11.008. PMID: 20113895.
45. Sheu TT, Chiang BL. Lymphopenia, Lymphopenia-Induced Proliferation, and Autoimmunity. *Int J Mol Sci.* 2021 Apr 16;22(8):4152. doi: 10.3390/ijms22084152. PMID: 33923792; PMCID: PMC8073364.
46. G Zini, CHAPTER 16 - Abnormalities in leukocyte morphology and number, Editor(s): Anna Porwit, Jeffrey McCullough, Wendy N. Erber, *Blood and Bone Marrow Pathology (Second Edition)*, Churchill Livingstone,2011, Pages 247-261,ISBN 9780702031472.
47. Basu D, Kulkarni R. Overview of blood components and their preparation. *Indian J Anaesth.* 2014 Sep;58(5):529-37. doi: 10.4103/0019-5049.144647. PMID: 25535413; PMCID: PMC4260297.

48. Banfi G, Salvagno GL, Lippi G. The role of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) as in vitro anticoagulant for diagnostic purposes. *Clin Chem Lab Med*. 2007;45(5):565-76. doi: 10.1515/CCLM.2007.110. PMID: 17484616.
49. Sbarbati R, de Boer M, Marzilli M, Scarlattini M, Rossi G, van Mourik JA. Immunologic detection of endothelial cells in human whole blood. *Blood*. 1991 Feb 15;77(4):764-9. PMID: 1993219.
50. Dagur PK, McCoy JP Jr. Collection, Storage, and Preparation of Human Blood Cells. *Curr Protoc Cytom*. 2015 Jul 1;73:5.1.1-5.1.16. doi: 10.1002/0471142956.cy0501s73. PMID: 26132177; PMCID: PMC4524540
51. Glime, J. M. and Wagner, D. M. 2017. Laboratory Techniques: Preservation and Permanent Mounts. Chapt. 2-4. In: Glime, J. M. *Bryophyte Ecology*. Volume 3. Methods. Ebook sponsored by Michigan Technological University and the International Association of Bryologists.
52. Karoyo AH, Wilson LD. Physicochemical Properties and the Gelation Process of Supramolecular Hydrogels: A Review. *Gels*. 2017; 3(1):1. <https://doi.org/10.3390/gels3010001>
53. Pal, A., Tripathi, K., Pathak, C. *et al*. Plasma-based fast-gelling biohybrid gels for biomedical applications. *Sci Rep* 9, 10881 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47366-3>
54. Nelson AZ, Wang Y, Wang Y, Margotta AS, Sammler RL, Izmitli A, Katz JS, Curtis-Fisk J, Li Y, Ewoldt RH. Gelation under stress: impact of shear flow on the formation and mechanical properties of methylcellulose hydrogels. *Soft Matter*. 2022 Feb 16;18(7):1554-1565. doi: 10.1039/d1sm01711j. PMID: 35107466.
55. Tsang M, Gantchev J, Ghazawi FM, Litvinov IV. Protocol for adhesion and immunostaining of lymphocytes and other non-adherent cells in culture. *Biotechniques*. 2017 Nov 1;63(5):230-233. doi: 10.2144/000114610. PMID: 29185924.