
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

*ΕΠΠΕΛΑ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΩΝ ECP, ICAM-1 ΚΑΙ IL-4 ΣΕ ΟΡΟΥΣ
ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΙΔΙΟΠΑΘΗ ΚΝΙΔΩΣΗ. ΠΙΘΑΝΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ
ΑΞΙΑ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΑΥΤΩΝ ΣΤΗ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΗ ΝΟΣΟ.*

ΚΑΤΣΑΡΟΥ ΜΑΡΘΑ -ΣΠΥΡΙΔΟΥΛΑ

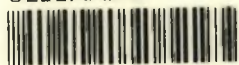
ΛΑΡΙΣΑ 2007



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 5421/1
Ημερ. Εισ.: 01-06-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2007
ΚΑΤ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087230

«Στους γονείς μου,
στον αδερφό μου,
και στον ερημίτη γέροντα Χρυσόστομο».

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πρώτα από όλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τον καθηγητή μου κύριο Ζήση Μαμούρη, καθηγητή του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας που μου έδωσε τη δυνατότητα να εκπονήσω αυτή την πτυχιακή εργασία.

Τίποτα δε θα είχε πραγματοποιηθεί χωρίς την αμέριστη βοήθεια του δόκτορος κυρίου Κυριάκου Ξένου, Βιοχημικού του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Δερματολογικών και Αφροδισιακών νοσημάτων «Αντρέας Συγγρός». Στο σημείο αυτό οι ευχαριστίες μου είναι διπλές, καθώς η σύλληψη και ο σχεδιασμός της μελέτης ήταν δικό του έργο. Επιπλέον, οι συμβουλές και η καθοδήγησή του έπαιξαν πρωταρχικό ρόλο καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας.

Ιδιαίτερη ευγνωμοσύνη θα ήθελα να εκφράσω στην καθηγήτρια της Κλινικής Φαρμακολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών, κυρία Σοφία Μαρκαντώνη-Κυρούδη, για την ουσιαστική συμβολή της στην περάτωση αυτού του πονήματος.

Επίσης δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω το τμήμα Επιδερμικών Δοκιμασιών του Νοσοκομείου Αντρέας Συγγρός, για τη συμμετοχή τους στην συλλογή δειγμάτων και στη λήψη στοιχείων.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ στους γονείς μου Γιώργο Κατσαρό και Άννα Κακουλάκη καθώς και στον αδερφό μου Ιωάννη Κατσαρό, ίσως να μην επαρκεί μετά από όσα μου έχουν προσφέρει..

Πριν το τέλος, να ευχαριστήσω τις φίλες μου Θάλεια, Ειρήνη και Σοφία για την υποστήριξή τους και όχι μόνο. Επιπλέον, την αδερφική μου φίλη και δερματολόγο Μαρία Σηφάκη, που κατά τη διάρκεια της εργασίας πήρε την ειδικότητα και το διδακτορικό της..

Τέλος, ευχαριστώ τον ερημίτη Γέροντα Χρυσόστομο, για την προσευχή του, την συμπαράστασή του και την παρουσία του σε κάθε δύσκολη στιγμή μου.

Ένα ευχαριστώ δε φτάνει...

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α' / ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΚΝΙΔΩΣΗ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	2
2. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ	4
2.1 ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ.....	4
2.2 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ.....	5
2.3 ΜΕΣΟΛΑΒΗΤΕΣ.....	6
2.3.1 ΙΣΤΑΜΙΝΗ.....	6
2.3.2 ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΚΟΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ.....	6
2.3.3 ΛΕΥΚΟΤΡΙΕΝΙΑ.....	7
2.3.4 ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΑ.....	7
2.3.5 ΠΡΩΤΕΑΣΕΣ.....	7
2.3.6 ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑ.....	8
3. ΑΙΤΙΑ ΚΑΙ ΗΛΗ ΚΝΙΔΩΣΕΩΝ.....	9
3.1 ΕΚΛΥΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ.....	9
3.2 ΤΥΠΟΙ ΚΝΙΔΩΣΗΣ-ΔΙΑΓΝΩΣΗ.....	9
3.2.1 ΟΞΕΙΕΣ ΚΝΙΔΩΤΙΚΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ.....	9
3.2.2 ΚΝΙΔΩΣΗ ΑΠΟ ΦΥΣΙΚΑ ΑΙΤΙΑ.....	9
3.2.3 ΧΡΟΝΙΑ ΚΝΙΔΩΣΗ.....	11
3.2.3.1 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ.....	13
3.2.3.2 ΟΡΟΘΕΤΙΚΗ/ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ.....	14
4. ΗΩΣΙΝΟΦΙΛΑ/ ECP.....	15
4.1 ΗΩΣΙΝΟΦΙΛΑ.....	16
4.1.1 ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΚΟΚΚΙΩΝ.....	16
4.1.2 ΧΡΟΝΟΣ ΖΩΗΣ.....	16
4.1.3 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ.....	17
4.1.4 ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗ ΗΩΣΙΝΟΦΙΛΩΝ ΚΑΙ ΑΠΟΚΟΚΚΙΩΣΗ.....	17
4.1.5 ΗΩΣΙΝΟΦΙΛΙΚΗ ΚΑΤΙΟΝΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ	18
5. ΜΟΡΙΑ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗΣ /ICAM-1.....	19
5.1 ΙΝΤΕΡΓΚΡΙΝΕΣ.....	20
5.2 ΣΕΛΕΚΤΙΝΕΣ.....	20
5.3 ΚΑΝΤΕΡΙΝΕΣ.....	21
5.4 ΥΠΕΡΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ.....	21
5.4.1 ICAM-1.....	21
6. ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ/ IL-4.....	23
6.1 ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ ΓΕΝΙΚΑ.....	24
6.2 ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ.....	25
6.2.1 ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗ-4.....	27
6.2.2 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ IL-4 ΚΑΙ ECP.....	29

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β' / ΣΚΟΠΟΣ

7. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	31
-----------------------------	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ' / ΜΕΘΟΔΟΙ ΥΛΙΚΑ

8. ΕΘΕΛΟΝΤΕΣ.....	35
9. ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΙΜΑΤΟΣ.....	36
10. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ECP.....	37
10.1 ΑΡΧΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥ.....	37
10.2 ΟΡΓΑΝΑ.....	38
10.3 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥ.....	39
11. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ICAM-1.....	41
11.1 ΑΡΧΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥ.....	41
11.2 ΟΡΓΑΝΑ.....	42
11.3 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥ.....	43

12. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ IL-4.....	45
12.1 ΑΡΧΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥ.....	45
12.2 ΟΡΓΑΝΑ.....	46
12.3 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥ.....	48

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Δ' ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

13. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ECP.....	52
14. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ICAM-1.....	54
15. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ IL-4.....	56

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ε' ΣΥΖΗΤΗΣΗ

16. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	58
-------------------	----

<u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</u>	64
---------------------------------	-----------

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α΄

ΕΝΟΤΗΤΑ 1^η, 2^η, 3^η

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η κνίδωση, περιγράφηκε αρχικά, το 1772, από τον *Heberden*, ως εξής «πρόκειται για μικρές ανυψώσεις του δέρματος, με τη μορφή ερεθιστικού εξανθήματος, που εμφανίζονται αθέλητα και απρόβλεπτα, ειδικά αν έχει προηγηθεί τριβή του δέρματος, και οι οποίες παραμένουν στο ίδιο σημείο συνήθως για λιγότερο από μερικά λεπτά και σπανιότερα μέχρι και αρκετές ώρες. Πέρα από την εμφάνιση του εξανθήματος, δεν υπάρχει καμία άλλη κλινική εκδήλωση, με εξαίρεση το μη ανεκτικό και εναγωνιάδες αίσθημα κνησμού». Η περιγραφή αυτή, αποτέλεσε τη βάση στην οποία στηρίχτηκε η περαιτέρω μελέτη της αλλεργικής αυτής αντίδρασης, χωρίς να μπορούν να προστεθούν πολλά στη σημερινή περιγραφή της νόσου, σύμφωνα με την οποία κνίδωση καλείται, η εμφάνιση στο δέρμα πολλαπλών, βραχύβιων και κνησμωδών ερυθματωδών και πομφωδών βλαβών (εικόνα 1.), όπου κάθε πομφός διαρκεί γενικά, λιγότερο από 24 ώρες, με εξαίρεση κάποιες ιδιαίτερες ποικιλίες της νόσου. Ανά πάσα στιγμή η μορφολογία ποικίλει, από τις στικτές ερυθματώδεις κηλίδες έως τις δακτυλιοειδείς ερυθματώδεις βλάβες, με ή χωρίς συνυπάρχοντες πομφούς. Οι πομφοί μπορεί να έχουν διάμετρο 1-2mm, αλλά μπορεί να φτάσουν και αρκετά εκατοστά.



εικόνα 1.

Εμφάνιση στο δέρμα πολλαπλών, βραχύβιων και κνησμωδών ερυθματωδών και πομφωδών βλαβών.

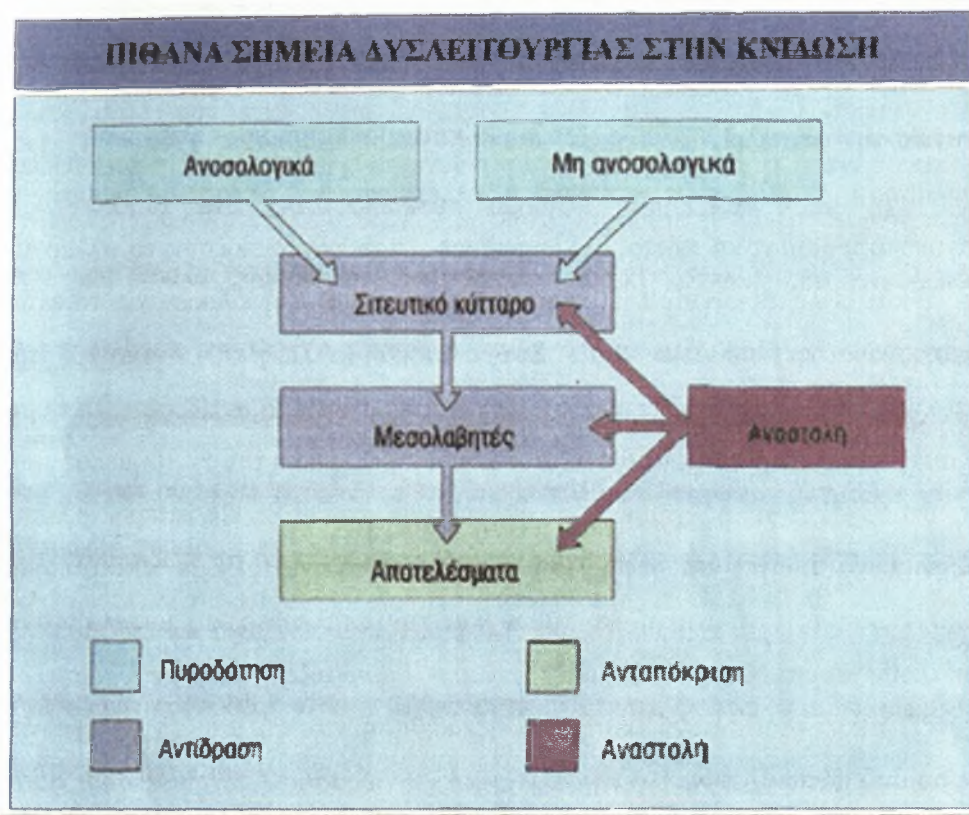


Οι κνιδώσεις, αποτελούν μια ετερογενή ομάδα διαταραχών. Πολλοί εκλυτικοί παράγοντες και μηχανισμοί, οδηγούν στην κοινή τελική οδό, που περιλαμβάνει την αποκοκκίωση των σιτευτικών κυττάρων και την παραγωγή επηρμένων, ερυθρών και κνησμοδών, αλλά παροδικών πομφών, ποικίλης διάρκειας, που αποτελούν τη χαρακτηριστική κλινική εικόνα της κνιδώσης. Παρά την ποικιλία των κνιδώσεων, όλοι οι τύποι έχουν πολλούς κοινούς παράγοντες, όπως την απελευθέρωση ισταμίνης, έτσι στοιχεία που λαμβάνονται από ένα τύπο κνιδώσης, συχνά οδηγούν στην κατανόηση των άλλων τύπων.

Ενώ σε μερικούς ασθενείς οποιαδήποτε από τις πολλές αιτίες, μπορεί να ευθύνεται για την ανάπτυξη κνιδώσης, *στην πλειονότητα των ασθενών δεν υπάρχει αναγνωρίσιμη υποκείμενη αιτία για τη νόσο.* Η κνιδωτική απάντηση, μπορεί να θεωρηθεί, *φυσιολογικά, ως μηχανισμός άμυνας έναντι ανεπιθύμητης εισβολής,* και μπορεί να συμβεί εξαιτίας διαταραχής, οπουδήποτε στην οδό απάντησης, από το ερέθισμα που την προκάλεσε μέχρι τη χημική απάντηση. Έτσι, η αντίδραση μπορεί να πυροδοτηθεί κατά λάθος, σε απουσία εκλυτικού παράγοντα, ή μπορεί να υπάρξει ανεπάρκεια στην προς τα κάτω ρύθμιση της απάντησης.¹

Πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις ανάμεσα σε σιτευτικά κύτταρα και άλλα κύτταρα, επεκτείνουν την περιοχή του ενδιαφέροντος, στα ρυθμιστικά αποτελέσματα των κυτταροκινών και την απελευθέρωση χημειοτακτικών παραγόντων, που με τη σειρά τους, προσελκύουν ουδετερόφιλα και *ηωσινόφιλα.* Οι κυτταρικές απαντήσεις, οδηγούν στην ενεργοποίηση χημικών οδών, που περιλαμβάνουν τα εικοσανοειδή, τα νευροπεπτίδια, το συμπλήρωμα και τις οδούς ινώδους και κίνινης, που μπορεί να ενισχύσουν την απάντηση, ή να παίξουν ρόλο στην πρόκληση αποκοκκίωσης των σιτευτικών κυττάρων.^{1,2}

Εικόνα 2: Πιθανά σημεία δυσλειτουργίας στην κνίδωση, προκαλούμενα από διαταραχές στην έκλυση, αντίδραση, απάντηση, αναστολή ή συνδυασμό αυτών των παραγόντων.



2. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

2.1. Ιστοπαθολογία

Το κύριο ιστολογικό εύρημα, στις περισσότερες μορφές κνίδωσης, είναι το οίδημα του δέρματος. Υπάρχει ποικίλη κυτταρική διήθηση, στην οποία επικρατούν συνήθως τα λεμφοκύτταρα, συνοδευόμενα από ουδετερόφιλα και ηωσινόφιλα πολυμορφοπύρρηνα. Με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, μπορούμε να δούμε αποκοκκισμένα σιτευτικά κύτταρα,

τα οποία μπορεί να συνοδεύονται από ενεργοποιημένα και αποκοκκιούμενα ηωσινόφιλα, που εναποθέτουν μείζονα βασική πρωτεΐνη.¹

2.2 Παθοφυσιολογία-μηχανισμός

Η κνίδωση αποτελεί αντίδραση άμεσης υπερευαισθησίας (τύπου I) με την μεσολάβηση IgE. Τα πιθανά αλλεργιογόνα, προσλαμβάνονται από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα Langerhans, που παρουσιάζουν το αλλεργιογόνο στα T και B λεμφοκύτταρα. Προκαλείται έτσι παραγωγή ειδικών για το εκάστοτε αλλεργιογόνο αντισωμάτων IgE. Στα ατοπικά (αλλεργικά) άτομα οι τοπικές κυττοκίνες (IL-4 και IL-13) πυροδοτούν περαιτέρω την IgE αντίδραση. Τα μόρια της IgE συνδέονται στην επιφάνεια σιτευτικών κυττάρων μέσω του Fc τμήματος τους, με τους υποδοχείς υψηλής χημικής συγγένειας για την IgE. Περαιτέρω έκθεση στο αλλεργιογόνο οδηγεί σε γεφύρωση των μορίων της IgE με αποτέλεσμα την αποκοκκίωση του σιτευτικού κυττάρου και την απελευθέρωση μεσολαβητών που προκαλούν συμπτώματα κνησμού (*πρώιμη φάση αλλεργικής αντίδρασης*). Στη συνέχεια ακολουθεί έντονη φλεγμονώδης διήθηση και επίταση της φλεγμονής και των συμπτωμάτων (*όψιμη φάση αλλεργικής αντίδρασης*). Στην πρώιμη φάση της αλλεργικής αντίδρασης κυριαρχούν τα σιτευτικά κύτταρα. Στις φλεγμονώδεις ουσίες που απελευθερώνονται περιλαμβάνονται η ισταμίνη, η προσταγλανδίνη D2, τα λευκοτριένια και πρωτεάσες. Στην πρώιμη φάση απαντώνται επίσης και άλλοι μεσολαβητές που σχετίζονται με την βαρύτητα των συμπτωμάτων. (νευροπεπτίδια, ουσία P). Στην όψιμη φάση της αλλεργικής αντίδρασης προέχουν τα ηωσινόφιλα κύτταρα. Επίσης αθροίζονται στην περιοχή της φλεγμονής ουδετερόφιλα, CD4+ και CD25+T λεμφοκύτταρα. Στην φάση αυτή απελευθερώνονται μεσολαβητές από τα ηωσινόφιλα όπως η ηωσινοφιλική κατιονική πρωτεΐνη (*ECP*) και η κύρια βασική πρωτεΐνη (*MBP*). Επιπλέον εκλύονται και άλλοι μεσολαβητές όπως οι κυττοκίνες IL-4 και IL-5 που ενεργοποιούν και διακινούν την φλεγμονώδη κυτταρική διήθηση στην περιοχή, αλλά και την έκφραση μορίων προσκόλλησης όπως *ICAM-1* και *VCAM-1* που με τη σειρά τους επιτείνουν την τοπική φλεγμονώδη διήθηση.

2.3. Μεσολαβητές

Κατά την ενεργοποίηση των σιτευτικών κυττάρων, απελευθερώνονται προσχηματισμένοι μεσολαβητές από τα κοκκία, αλλά και νεοσχηματιζόμενοι από τα φωσφολιπίδια των μεμβρανών. Σε μερικές κνιδώσεις, τα αποτελέσματα αυτών των μεσολαβητών, μπορούν να ενισχυθούν και να παραταθούν, από ενεργοποίηση της κίνινης και του συμπληρώματος, καθώς επίσης και από την απελευθέρωση περαιτέρω μεσολαβητών, που διηθούν τους ιστούς.¹

2.3.1 Ισταμίνη

Η *ισταμίνη* έχει κεντρικό ρόλο ως μεσολαβητής και όταν χορηγείται παρεντερικώς μόνη της, αναπαράγει την εικόνα της κνίδωσης με παροδικό, ερυθρό, επήρμενο και κνησμάδη πομφό, ενώ μερικές φορές προκαλεί και συστηματικές δράσεις όπως βρογχοσπασμό, διαστολή αρτηριολιών με επακόλουθα κεφαλαλγία και υπόταση. Ο μηχανισμός της σχετίζεται με την πρόσδεσή της στους υποδοχείς H1, H2, H3. Η διέγερση νευροποδοχέων στο δέρμα (πόνος, κνησμός) οφείλεται σε ενεργοποίηση κυρίως των H1 υποδοχέων. Αντιισταμινικά H1 έχουν ευεργετικές δράσεις σε τέτοιες περιπτώσεις, όμως ο ανεπαρκής αποκλεισμός της κνίδωσης από τα παραπάνω φάρμακα είναι ενδεικτικός της αθροιστικής σημασίας του πλήθους των μεσολαβητών. Σε διάφορα είδη κνίδωσης τα επίπεδα της ισταμίνης είναι εμφανώς αυξημένα. Σημαντικό είναι να αναφέρουμε ότι τα επίπεδα της ισταμίνης αυξάνονται και στις βλάβες στο φυσιολογικό δέρμα ασθενών με χρόνια κνίδωση.⁴

2.3.2 Φωσφολιπιδικοί μεσολαβητές

Οι νεοσχηματιζόμενοι φωσφολιπιδικοί μεσολαβητές, μεταβολίζονται ταχέως και επομένως, είναι δύσκολο να επιδειχθούν στην πειραματική κνίδωση. Η *προσταγλανδίνη D2*, είναι ο πιο συχνά παρουσιαζόμενος μεσολαβητής αυτής της ομάδας, αλλά η ποσότητα που απελευθερώνεται, είναι ανεπαρκής για να έχει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή πομφών, εκτός από τη μαστοκύτωση, όπου τα υψηλότερα επίπεδα που προκύπτουν από τον αυξημένο αριθμό των σιτευτικών

κυττάρων, συνεισφέρουν στην ερυθρότητα και στην υπόταση. Η προσταγλανδίνη D2 μπορεί, επίσης, να παίζει ρόλο στην αναφυλακτική απάντηση, σε νυγμούς μελισσών.⁵

2.3.3 Λευκοτριένια

Είναι παράγωγα αραχιδονικού οξέος της κυτταρικής μεμβράνης. Παράγονται από φλεγμονώδη κύτταρα, όπως σιτευτικά, βασεόφιλα, ηωσινόφιλα και μακροφάγα. Σχετίζονται με πολλές αλλεργικές αντιδράσεις όπως το άσθμα.⁶ Η απελευθέρωση λευκοτριένιων έχει αναζητηθεί στην κνίδωση αλλά τα στοιχεία για τη συμμετοχή τους περιορίζονται σε μελέτες κνίδωσης εκ πίεσεως, οι οποίες ενοχοποιούν τη LTB₄ και σε μια μελέτη του Lawler και συν⁷. Α, στην οποία η LTC₄ ήταν αυξημένη (αλλά όχι στατιστικά σημαντική).

2.3.4 Νευροπεπτίδια

Τα νευροπεπτίδια είναι μια μεγάλη οικογένεια ικανών μεσολαβητών που εκκρίνονται από τα νεύρα, στο δέρμα κυρίως από τους αισθητικούς νευρώνες. Οι ουσίες P, CGRP και NKA έχει βρεθεί ότι σχετίζονται με την ερυθρότητα του αξονικού αντανακλαστικού του δέρματος σε αλλεργικές αντιδράσεις. Η ουσία P προκαλεί ερύθημα, ενεργοποιώντας τα σιτευτικά κύτταρα, τα οποία ελευθερώνουν ισταμίνη, αλλά προκαλεί οίδημα και με άμεση δράση στα αιμοφόρα αγγεία. Τα CGRP και NKA δρουν απευθείας στα αιμοφόρα αγγεία. Η ουσία P έχει βρεθεί αυξημένη σε ασθενείς με φυσιολογικό δέρμα και κνίδωση σε ψύχους και δερμογραφισμό.¹³

2.3.5 Πρωτεάσες

Οι πρωτεάσες, *τροπτάση, χυμάση και καρβοξυπεπτιδάση* που προέρχονται από τα σιτευτικά κύτταρα, είναι επίσης σημαντικές, καθώς επάγουν περαιτέρω αποκοκκίωση των σιτευτικών κυττάρων και ενεργοποιούν το συμπλήρωμα, τις κινίνες και τον παράγοντα Hageman, ενισχύοντας με τον τρόπο αυτό την αντίδραση. Μπορούν, επίσης, να πέπτουν μερικώς κολλαγόνο και βασική ουσία, για να διευκολύνουν την κίνηση των φαγοκυττάρων μέσω του δέρματος και να αυξήσουν την αγγειακή διαπερατότητα. Σε υψηλές συγκεντρώσεις η χυμάση, μπορεί επίσης να οδηγήσει σε σχηματισμό φουσαλίδων, επιτρέποντας τοπική αποκόλληση της επιδερμίδας, ενώ άλλα

στοιχεία για τη δράση και τη συμμετοχή των πρωτεασών, προκύπτουν έμμεσα. Τέλος, τα επίπεδα των πρωτεασών αυξάνονται σε βλάβες μαστοκυττάρωσης.^{1,10}

2.3.6 Συμπλήρωμα

Το συμπλήρωμα, μπορεί να ενεργοποιηθεί με πολλούς τρόπους, στην κνίδωση. Στην κνιδωτική αγγειίτιδα, το συμπλήρωμα ενεργοποιείται μέσω της κλασσικής οδού με τις IgG και IgM ανοσοσφαιρίνες σε ανοσοσυμπλέγματα και ο ίδιος μηχανισμός, θα μπορούσε να είναι ενεργός σε ποικίλο βαθμό και σε άλλες μορφές κνίδωσης. Γενικά, η θρυψίνη προερχόμενη από τα σιτευτικά κύτταρα, διασπά το C3 για να σχηματίσει C3a και C3b. Μόλις ενεργοποιηθούν το συμπλήρωμα και οι C3a, C4a και C5a αφλατοξίνες, έχουν την ικανότητα να προκαλέσουν την απελευθέρωση της ισταμίνης από τα δερματικά σιτευτικά κύτταρα, και επομένως, είναι πιθανοί μεσολαβητές της κνίδωσης. Επιπρόσθετα, το C5a είναι ικανός χημειοτακτικός παράγοντας ουδετερόφιλων. Επίσης, αυτά τα πεπτίδια συσπών τους λείους μυς, ανεξάρτητα από την ισταμίνη, αν και αυτή η δράση, μπορεί να μεσολαβείται από τα εικοσανοειδή. Η ενεργοποίηση της κλασσικής ή της εναλλακτικής οδού του συμπληρώματος έχει περιγραφεί σε 0 έως 30% των ασθενών, με χρόνια ιδιοπαθή κνίδωση, αλλά οι πρώτες μελέτες, μπορεί να έχουν συμπεριλάβει και μερικούς ασθενείς, με κνιδωτική αγγειίτιδα.¹¹ Ανεπάρκεια των C4 και C2, έχει αναφερθεί σε μεμονωμένες περιπτώσεις κνίδωσης εκ ψύχους, και σε δύο περιπτώσεις εντοπισμένης κνίδωσης από θερμότητα, όπου ταυτόχρονα με τη μείωση των επιπέδων του C3 και του παράγοντα B, συμπεραίνεται ενεργοποίηση της εναλλακτικής οδού.¹

3. ΑΙΤΙΑ ΚΑΙ ΕΙΔΗ ΚΝΙΔΩΣΕΩΝ ¹²

3.1. ΕΚΛΥΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΝΙΔΩΤΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ

- Φάρμακα
- Τρόφιμα
- Latex
- Νυγμοί εντόμων
- Λοιμώξεις
- Συστηματικά νοσήματα
- Ψυχικά αίτια
- Περιβαλλοντικοί παράγοντες

3.2 ΤΥΠΟΙ ΚΝΙΔΩΣΗΣ-ΔΙΑΓΝΩΣΗ (πίνακας 1)

3.2.1 Οξείες κνιδωτικές αντιδράσεις

- ✓ Οξεία ιδιοπαθής κνίδωση
- ✓ Οξεία αλλεργική κνίδωση
- ✓ Ψευδοαλλεργικές κνιδωτικές αντιδράσεις
- ✓ Κνίδωση εξ» επαφής

3.2.2 Κνίδωση από φυσικά αίτια

3.2.3 Χρόνια Κνίδωση

ΟΙ ΚΝΙΔΩΣΕΙΣ – ΑΙΤΙΑ-ΔΙΑΓΝΩΣΗ

(Πίνακας 1)

Τύπος Κνίδωσης	Αιτίες	Κλινική Διερεύνηση
Οξεία Ιδιοπαθής	Άγνωστες	1.Ιστορικό και εξέταση αν ο ασθενής είναι καλά, δεν απαιτούνται εργαστηριακές εξετάσεις.
Μεσολαβούμενη από IgE	Τροφές, Φάρμακα	1.Ιστορικό 2.Περιστατικά/δερματικές δοκιμασίες
Ψευδοαλλεργική	Φάρμακα, Συντηρητικά, Τρόφιμα/ χρωστικές	1.Ιστορικό 2. Περιστατικά/δερματικές δοκιμασίες
Εξ επαφής	Τροφές(ανοσολογική κνίδωση εξ επαφής), Χημικά, Μέταλλα(μη ανοσολογική κνίδωση εξ επαφής)	1.Ιστορικό 2.Περιστατικά/δερματικές δοκιμασίες με την υπό διερεύνηση ουσία.
Χρόνια ιδιοπαθής	<i>Άγνωστες</i>	1.Ιστορικό και εξέταση <i>2.Δεν υπάρχουν διαγνωστικές δοκιμασίες</i>
Φυσικές κνιδώσεις	Μηχανικά ερεθίσματα, Αλλαγές στη θερμοκρασία, Φως, νερό.	1.Ιστορικό 2.Ειδική πρόκληση 3.Βιοψία δέρματος σε ορισμένες περιπτώσεις.

Πίνακας 1. Διάγνωση και αίτια κνιδώσεων

3.2.3 ΧΡΟΝΙΑ ΚΝΙΔΩΣΗ

Ο όρος, χρόνια κνίδωση, αναφέρεται όταν η κνίδωση ή το αγγειοοίδημα είναι παρόντα είτε καθημερινά, είτε επεισοδιακά για ένα χρονικό διάστημα, μεγαλύτερο των 6 έως 12 εβδομάδων. Αυτή η ομάδα ασθενών, είναι η μεγαλύτερη υποομάδα, αυτών που υποφέρουν από κνίδωση και παρακολουθούνται στα εξωτερικά ιατρεία. Το 70% όλων των ασθενών με κνίδωση, έχουν χρόνια ιδιοπαθή κνίδωση. Ο όρος, χρόνια ιδιοπαθής κνίδωση, εξάγεται από το γεγονός ότι στις περισσότερες περιπτώσεις που τίθεται ως διάγνωση η χρόνια κνίδωση, δεν είναι δυνατό να καθοριστεί ο αιτιολογικός παράγοντας.^{13,14} Από επιδημιολογικές μελέτες, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η χρόνια κνίδωση απαντάται περισσότερο σε ενήλικα άτομα, ενώ είναι διπλάσια η συχνότητα εκδήλωσης της νόσου στις γυναίκες, συγκριτικά με τους άντρες. Είναι αποδεδειγμένο ότι το 40% των ασθενών, με ενεργό χρόνια κνίδωση, για χρονικό διάστημα πέραν των έξι μηνών, θα εκδηλώνει τις

δερματικές βλάβες της χρόνιας κνίδωσης και 10 χρόνια αργότερα.¹⁵



Εικόνα 3. Χρόνια ιδιοπαθής κνίδωση (CIU)

Η μορφολογία του εξανθήματος της χρόνιας κνίδωσης, είναι παρόμοια με αυτή της οξείας κνίδωσης (εικόνα 2). Οι πομποί είναι μαλακοί, οίδηματώδεις και μπορούν να συνυπάρχουν με διάφορα στοιχεία κηλιδώδους ή βλατηδώδους ερυθρήματος. Οι βλάβες, συχνά είναι κνησμώδεις, χωρίς αυτό να είναι απόλυτο και μπορούν να εμφανιστούν οπουδήποτε στο δέρμα. Γενικά, η διάρκεια της παρουσίας τους είναι μικρότερη των 24 ωρών.



Urticaria

Και στη χρόνια κνίδωση, μετά την αποδρομή των βλαβών, το δέρμα καθίσταται και πάλι φυσιολογικό, εκτός από την εστιακή εμφάνιση πορφύρας, που μπορεί να προκαλείται από τον ξεσμό, των

κνησμοδών βλαβών. Η χρόνια κνίδωση, συνήθως, ακολουθεί υποτροπιάζουσα πορεία και η υποτροπή εκδηλώνεται κυρίως κατά τις βραδινές ώρες, ενώ βλάβες, οι οποίες παραμένουν για χρονικό διάστημα πέρα των 24 ωρών, εγείρουν την υποψία για άλλη υποκείμενη νόσο, και κυρίως για κνιδωτική αγγειίτιδα.

Λόγω της συσχέτισης, ανάμεσα στη χρόνια ιδιοπαθή κνίδωση και στις φυσικές κνιδώσεις, ιδιαίτερα την κνίδωση εκ πίεσεως επιβραδυνομένου τύπου, απαιτείται να εξετάζεται προσεκτικά η πιθανή συνύπαρξη, ενός ή περισσότερων φυσικών κνιδώσεων, σε όλους τους ασθενείς με χρόνια ιδιοπαθή κνίδωση.

Πολλές υποκείμενες παθήσεις έχουν σημειωθεί σε ασθενείς με χρόνια κνίδωση, αλλά στην οξεία νόσο, όπως ηπατίτιδα ή βρουκέλλωση, μπορεί να έχει κνίδωση, και ότι υπάρχει μεγαλύτερη συχνότητα αυτοάνοσης θυρεοειδικής νόσου σε αυτούς με χρόνια ιδιοπαθή κνίδωση, αν και αυτό δεν είναι συνήθως εμφανές. Είναι εξαιρετικά σπάνιο η εστιακή σήψη, η λοίμωξη από candida ή δερματόφυτα ή η παρασιτική μόλυνση της γαστρεντερικής οδού, να έχουν οποιαδήποτε επίδραση στην πορεία της χρόνιας ιδιοπαθούς κνίδωσης και η αναζήτηση των ανωτέρων λοιμώξεων ή μολύνσεων δεν είναι υποχρεωτική. Αν τα πρόσθετα των τροφών παίζουν κάποιο ρόλο στην παθογένεια της χρόνιας ιδιοπαθούς κνίδωσης, τότε θα πρέπει να θεωρηθούν, ως μη ανοσιακές κνιδωτικές αντιδράσεις.

3.2.3.1 Παθοφυσιολογία και μεσολαβητές χρόνιας κνίδωσης

Η κλινική ανταπόκριση των ασθενών, με χρόνια ιδιοπαθή κνίδωση, στα H1-αντιισταμινικά και η αυξημένη συγκέντρωση *ισταμίνης* στον επιδερμικό ιστό, αντικατοπτρίζουν τον ενεργό ρόλο της ισταμίνης, στην παθοφυσιολογία της νόσου, αποτελώντας τον κύριο μεσολαβητή. Ο Greaves και συν.,¹³ αναφέρει ότι από μελέτη που έγινε σε 13 δείγματα επιδερμικού ιστού, ασθενών με χρόνια κνίδωση, οι 12 είχαν αυξημένα επίπεδα ισταμίνης στα δείγματα που προέρχονταν από περιοχή βλαβών, όπου η μέση συγκέντρωση ισταμίνης ήταν 41 ng/ml¹, συγκρινόμενα με τα δείγματα που προέρχονταν από φυσιολογικό δέρμα, όπου η μέση συγκέντρωση ισταμίνης ήταν 19 ng/ml.¹³

Άλλοι μεσολαβητές που ενοχοποιήθηκαν ότι εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της νόσου, είναι οι *κινίνες*, τα *εικοσανοειδή* και τα *νευροπεπτίδια*, δεν έχουν γίνει όμως μετρήσεις των μεσολαβητών αυτών, σε δέρμα με βλάβες.

Σε ποσοστό, περίπου 50%, των ασθενών, με ενεργό χρόνια ιδιοπαθή κνίδωση, ένας άγνωστος παράγοντας του ορού, μοριακού βάρους μεγαλύτερου των 30kDa, προκαλεί πομφούς και ερύθημα, που μιμείται την απάντηση στην ένωση 48/80, που είναι παράγοντας αποκοκκίωσης των σιτευτικών κυττάρων. Η φύση αυτού του άγνωστου κυκλοφορούντος παράγοντα, που προκαλεί κνίδωση, παραμένει υποθετική, αλλά μπορεί να είναι παράγοντας απελευθέρωσης ισταμίνης, αντι-IgE, ή ακόμη και ένα αντιγόνο, που μπορεί να ποικίλει από ασθενή σε ασθενή. Η άποψη ότι ο παράγοντας μπορεί να είναι αυτοαντίσωμα, ενισχύεται από τη συσχέτιση που έχει παρατηρηθεί μεταξύ κνίδωσης και αυτοάνοσης νόσου του θυρεοειδούς.¹⁵ Ο Kaplan¹⁶ έχει πρόσφατα εντοπίσει IgG και IgM αυτοαντισώματα, κατευθυνόμενα εναντίον της IgE, σε πέντε από τους εννιά ασθενείς, με κνίδωση εκ ψύχους και σε τρεις από τους έξι ασθενείς, με κνιδωτική αγγειίτιδα και χρόνια κνίδωση.

3.2.3.2 Χρόνια Ιδιοπαθής κνίδωση- οροθετική ή αυτοάνοση

Σε ποσοστό 80% έως 90% των ασθενών με χρόνια κνίδωση δεν διαπιστώνεται εμφανές αίτιο πρόκλησης της νόσου και τίθεται η διάγνωση «χρόνια ιδιοπαθής κνίδωση».

Σήμερα είναι γνωστό ότι περίπου το 30% έως 50% των ασθενών διαθέτουν αυτοαντισώματα κατά των υποδοχέων υψηλής συνάφειας για την IgE (FcεRI) που μπορεί να αποτελούν το αίτιο της νόσου.¹⁷ Η ακριβής συχνότητα και ο ρόλος των εν λόγω αντισωμάτων είναι υπό διερεύνηση. Στη συγκεκριμένη εργασία τα δείγματα είναι CIU με αρνητικό ASST (test ομόλογου ορού).

Γενικά, ο διαχωρισμός δεν είναι απόλυτα ταυτοποιημένος και πολλές φορές συγχέεται η χρόνια ιδιοπαθής κνίδωση με την αυτοάνοση, για το λόγο αυτό γίνεται αυτός ο διαχωρισμός των ασθενών. Κατά καιρούς έχει μελετηθεί η CIU έχοντας ανάμεικτους ορούς ASST θετικούς και αρνητικούς.¹⁸

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α

ΕΝΟΤΗΤΑ 4^η

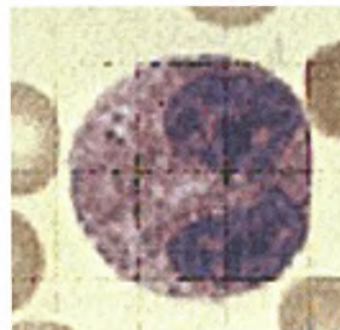
ECP ΚΑΙ ΗΩΣΙΝΟΦΙΛΑ

(Η ηωσινοφιλική κατιονική πρωτεΐνη είναι δείκτης της ύπαρξης των ηωσινόφιλων σε καταστάσεις φλεγμονής).

4. ECP ΚΑΙ ΗΩΣΙΝΟΦΙΛΑ

4.1 ΗΩΣΙΝΟΦΙΛΑ¹⁹

Τα ηωσινόφιλα έχουν ένα δίλοβο πυρήνα, είναι μεγαλύτερα από τα ουδετερόφιλα και αναγνωρίζονται από τα μεγάλα επιμηκυσμένα ειδικά κοκκία που χρωματίζονται έντονα ερυθρά με την ηωσίνη



Εικόνα 5. Ηωσινόφιλο

4.1.1 Περιεγόμενο των κοκκίων

- **Ηωσινόφιλη υπεροξειδάση**, η οποία συνδέεται με τους μικροοργανισμούς και διευκολύνει τη νέκρωσή τους από τα μακροφάγα.
- **Μείζων βασική πρωτεΐνη**, πλούσια σε αργινίνη, η οποία αποτελεί το κύριο συστατικό του κρυσταλλοειδούς του κοκκίου. Η ουσία αυτή συνδέεται με την μεμβράνη των παρασίτων και την καταστρέφει (η πρόσδεση γίνεται με τη διαμεσολάβηση του Fc υποδοχέα που φέρει το ηωσινόφιλο). Επίσης προκαλεί απελευθέρωση της ισταμίνης από τα βασεόφιλα με μηχανισμό εξαρτώμενο από τα ιόντα Ca²⁺
- **Ηωσινόφιλη κατιονική**, η οποία αδρανοποιεί την ηπαρίνη και μαζί με τη μείζονα βασική πρωτεΐνη προκαλεί την κατάτμηση των παρασίτων.
- Άλλα **λυσosomalικά ένζυμα** όπως αρυλσουλφατάση, ισταμινάση, όξινη φωσφατάση, ριβονουκλεάση, καθεψίνη, λυσοζύμη, πρωτεάσες, λυσοφωσφολιπάσες

4.1.2 Χρόνος ζωής

Ο αριθμός των ηωσινοφίλων εμφανίζει έντονη ημερήσια διακύμανση, είναι δε μέγιστος το πρωί και ελάχιστος το απόγευμα. Τα ηωσινόφιλα παραμένουν στο μυελό των οστών αρκετές ημέρες μετά την παραγωγή τους, κατόπιν *κυκλοφορούν για 6-10 ώρες* και ακολούθως η πλειοψηφία των ηωσινοφίλων μεταναστεύει κατά προτίμηση στο δέρμα, στους πνεύμονες και στο γαστρεντερικό σωλήνα. Τα ηωσινόφιλα μετά τη

μετανάστευσή τους στους ιστούς δεν επανεισέρχονται συνήθως στην κυκλοφορία και ο χρόνος ζωής τους στους ιστούς είναι περίπου 8-10 ημέρες.

4.1.3 Λειτουργία

Αυξημένος αριθμός κυκλοφορούντων ηωσινόφιλων (*ηωσινοφιλία*) παρατηρείται σε αρκετές παρασιτώσεις. Έτσι, η άμυνα του οργανισμού έναντι των παρασίτων αποτελεί μία από τις βασικές λειτουργίες των ηωσινόφιλων. Επίσης, *αύξηση* του αριθμού τους στους ιστούς (ρινικό και βρογχικό βλεννογόνο) *παρατηρείται και σε αλλεργικές καταστάσεις, όπως σε άσθμα, πυρετό από χόρτο και αντιδράσεις από φάρμακα.* Η μικροβιοκτόνος δράση τους είναι μικρότερη από αυτή των ουδετερόφιλων, επειδή φυσιολογικά δεν φαγοκυτταρώνουν βακτήρια, αλλά είναι ικανά να τα αποδομούν υπό την παρουσία αντιβακτηριακών αντισωμάτων. Για τούτο, μια από τις κύριες λειτουργίες των ηωσινόφιλων είναι η φαγοκυττάρωση και η αποδόμηση συμπλεγμάτων αντιγόνου-αντισώματος, τα οποία σχηματίζονται σε αλλεργικές καταστάσεις, όπως στο άσθμα και στον πυρετό του χόρτου.

4.1.4 Φαγοκυττάρωση ηωσινόφιλων και αποκοκκίωση

Τα ηωσινόφιλα –όπως και τα ουδετερόφιλα-μετακινούνται χημειοτακτικά σε περιοχές που παρατηρείται μεγάλη συγκέντρωση βακτηριακών προϊόντων και παραγόντων συμπληρώματος. Ειδικότερα, συγκεντρώνονται γύρω από ουσίες που απελευθερώνονται από τα σιτευτικά κύτταρα, όπως η *ισταμίνη* και ο *ηωσινοφιλικός παράγοντας αναφυλαξίας*, καθώς και από ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα. Η επιφάνεια των ηωσινόφιλων περιέχει ειδικούς υποδοχείς για την ανοσοσφαιρίνη IgE (δεν εντοπίζονται στα ουδετερόφιλα), που πιθανόν συνεπικουρεί στην καταστροφή των παρασίτων. Λίγα ηωσινόφιλα περιέχουν υποδοχείς για το τμήμα Fc της ανοσοσφαιρίνης IgG , οι οποίοι αυξάνουν σε σημαντικό βαθμό στις περιπτώσεις ηωσινοφιλίας. Η φαγοκυττάρωση επιτελείται με τη διαδικασία της ενδοκυττάρωσης. Σε περιπτώσεις που το μέγεθος του σωματιδίου είναι μεγάλο, το ηωσινόφιλο απελευθερώνει το περιεχόμενο των κοκκίων του στον εξωκυττάριο χώρο. Μια άλλη λειτουργία των ηωσινόφιλων είναι ο περιορισμός της καταστροφικής δράσης που

προκαλείται στους ιστούς απ' την απελευθέρωση του περιεχομένου των κοκκίων των σιτευτικών κυττάρων, που λαμβάνει χώρα στις αλλεργικές αντιδράσεις υπερευαισθησίας . Αυτό επιτυγχάνεται με:

- Αδρανοποίηση της ισταμίνης (παραγωγή ισταμινάσης)
- Παραγωγή ενός παράγοντα (αναστολέα που προέρχεται από τα ηωσινόφιλα), ο οποίος αποτελείται από τις προσταγλανδίνες E1 και E2 και εμποδίζει την αποκοκκίωση των σιτευτικών κυττάρων.
- Αδρανοποίηση από τα ενεργοποιημένα ηωσινόφιλα των αγγειοδραστικών ουσιών της φλεγμονής, όπως για παράδειγμα το μείγμα των **λευκοτριένιων LTC₄, LTD₄, LTE₄** που παλαιότερα ονομαζόταν «**βραδέως αντιδρώσα ουσία αναφυλαξίας-SRS-A** ». Οι ουσίες αυτές της φλεγμονής παράγονται από τα βασεόφιλα και σιτευτικά κύτταρα.

4.1.5 ECP²⁰

Η ECP (Eosinophil Cationic Protein) , η EDN (Eosinophil Derived Neuritoxin) και η MBC (Major Basic Protein) είναι οι βασικές πρωτεΐνες που εκκρίνονται από τα ηωσινόφιλα. Οι ECP και EDN βρίσκονται στη μήτρα των μεγαλοκυττάρων των ηωσινόφιλων ενώ η MBP στον πυρήνα. Η ECP είναι μέλος της υπερικογενείας ριβονουκλεασών. Έχει υψηλή κυτταροτοξικότητα. Η ενεργοποίηση των ηωσινόφιλων παίζει σημαντικό ρόλο στο άσθμα και στη φλεγμονή. *Η ECP μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν marker για τη δράση των ηωσινόφιλων, σε πολλές αλλεργικές αντιδράσεις.* Αποτελείται από μια μονή πολυπεπτιδική αλυσίδα. Έχει γίνει συσχέτιση με την IgE χωρίς αποτέλεσμα αλλά είναι αυξημένη διακριτά σε ασθένειες όπως ψωρίαση, acute, κνίδωση, ατοπική δερματίτιδα , porphyria cutanea .

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α

ΕΝΟΤΗΤΑ 5^η

ΜΟΡΙΑ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗΣ –

ICAM-1

(Τα μόρια προσκόλλησης λαμβάνουν χώρα στη φλεγμονή, ένα από αυτά είναι το ICAM-1. Έχει βρεθεί αυξημένο ανοσοϊστοχημικά σε ασθενείς με CIU.)

5. ΜΟΡΙΑ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗΣ

Η δημιουργία δεσμών προσκόλλησης μεταξύ των κυττάρων και με την εξωκυττάρια ουσία είναι βασική διαδικασία, η οποία διαδραματίζει πρωτεύοντα ρόλο τόσο κατά την αρχική φάση της εγκατάστασης και συγκρότησης των ιστών όσον και μετέπειτα για τη διατήρηση της αρχιτεκτονικής και της φυσιολογικής τους ανάπτυξης. Η ανάπτυξη και η φυσιολογική λειτουργία όλων των ιστών του οργανισμού ελέγχεται από ένα σύνολο αντιδράσεων που συμβαίνουν είτε μεταξύ των κυττάρων – αντιδράσεων κυττάρου προς κύτταρο (cell-cell), είτε μεταξύ των κυττάρων και του μεσοκυττάρου περιβάλλοντός τους αντίδραση κυττάρων με εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (cell matrix). Την τελευταία δεκαετία, με την έκρηξη γνώσεων στον τομέα της φυσιολογίας, της βιοχημείας και της γενετικής έγινε εμφανές ότι σε πολλές από τις αντιδράσεις αυτές μεσολαβούν ουσίες που ονομάζονται μόρια προσκόλλησης (adhesion moleulles). Τα μόρια αυτά δρουν σαν μόρια σηματοδότησης αλλά και ως υποδοχείς. Συνήθως είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που αποτελούνται από τρεις περιοχές: την ενδοκυτταρική περιοχή η οποία αντιδρά με τον κυτταροσκελετό, την διακυτταρική περιοχή η οποία αντιδρά με τον κυτταροσκελετό, την διακυτταρική περιοχή και την εξωκυτταρική περιοχή όπου αντιδρά είτε με μόρια προσκόλλησης ίδιου τύπου (ομοφιλική σύνδεση), είτε με την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (ετεροφιλική σύνδεση). Τα μόρια προσκόλλησης συμμετέχουν στις διαδικασίες της κανονικής ανάπτυξης των κυττάρων, της διαφοροποίησης, της εμβρυογένεσης, της πήξης του αίματος, της επούλωσης των τραυμάτων, της φλεγμονής αλλά και της καρκινικής διήθησης και των μεταστάσεων. Τα μόρια προσκόλλησης απαρτίζονται κυρίως από τέσσερις οικογένειες πρωτεϊνών: υπεροικογένεια ανοσοσφαιρικών, οικογένεια ιντεργκρινών, οικογένεια καντερινών και οικογένεια σελεκτινών.^{21,22}

5.1 Ιντεργκρίνες (Intergrins):

Ανήκουν στην οικογένεια των ετερόφιλων CAMS και συνδέονται με τα IgSF CAMS στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία. Είναι ετεροδιμερή και αποτελούνται από δύο υποομάδες που καλούνται άλφα και βήτα από δύο υποομάδες που καλούνται άλφα και βήτα. Η πιο γνωστή είναι η LFA-1 που συνδέεται με το ICAM-1.²²

5.2 Σελεκτίνες (selectins) :

Ανήκουν στην οικογένεια των ετεροφιλικών CAMs , συνδέονται με υδρογονάνθρακες, είναι εξαρτώμενες από το ασβέστιο. Διαθέτουν τρεις διαφορετικές κατηγορίες τις E-selectin (endothelial), τις L-selectin (leukocyte) και τις P-selectin (platelet).²²

5.3 Καντερίνες (Cadherins):

Ανήκουν στην οικογένεια των ομοφιλικών CAMS και είναι εξαρτώμενες από τη συγκέντρωση ασβεστίου. Τα πιο σημαντικά μέλη της οικογένειας είναι οι E-cadherins (epithelial), οι P-cadherins (placental) και οι N-cadherins (neural).²²

5.4 Υπεροικογένεια ανοσοσφαιρινών (IgSF) : είναι είτε ομοφιλικές είτε ετεροφιλικές οι συνδέσεις που κάνουν και συνδέονται με ιντεργκρίνες ή με διαφορετικά IgSF μόρια προσκόλλησης. Μερικά από τα μόρια της οικογένειας είναι:

- ✓ Intercellular adhesion molecules (*ICAMS*)
- ✓ Vascular Cell Adhesion Molecules (*VCAM-1*)
- ✓ Platelet-endothelial cell Adhesion Molecule (*PECAM-1*)
- ✓ L1
- ✓ CHL1
- ✓ MAG

5.4.1 ICAM-1

Το μόριο ενδοκυτταρικής προσκόλλησης -1 είναι μέλος της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών με 5 περιοχές τύπου Ig (περιοχές που μοιάζουν με τις ανοσοσφαιρίνες στο N- τελικό άκρο). Λειτουργεί σαν σύνδεσμος των LFA-1 (Lymphocyte Function- Associated-1) που είναι ένα μέλος της οικογένειας των ιντεργκρινών. Το ICAM-1 είναι μία γλυκοπρωτεΐνη μονής αλυσίδας της τάξεως των 55 Kda. Το γονίδιο του ICAM-1 στον άνθρωπο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19.

Εκφράζεται σε μη αιμοποιητικά κύτταρα (όπως αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες κ.α.) και σε αιμοποιητικά κύτταρα (όπως β-κύτταρα, δενδριτικά κ.α.). Η έκφραση του ICAM-1 στους ινοβλάστες και στα ενδοθηλιακά κύτταρα ρυθμίζεται από μόρια που λαμβάνουν μέρος στη φλεγμονή όπως IL-1, INF και IFN-γ. Το ICAM-1 φαίνεται πως είναι ένας από τους αρχικούς δείκτες σε αντιδράσεις φλεγμονής και ο ρόλος του έχει εκδηλωθεί σε μεγάλο αριθμό διαφορετικών παθολογικών καταστάσεων. Σε ότι αφορά περιστατικά αλλεργίας φαίνεται ότι το ICAM-1 σχετίζεται με τη στρατολόγηση των ενεργοποιημένων λευκοκυττάρων, με την παθογένεια της αλλεργικής ρινίτιδας και της αλλεργικής δερματίτιδας.

Στον καρκίνο τη ουροδόχου κύστης υπάρχει ένας άμεσος συσχετισμός μεταξύ του ICAM-1 και του βαθμού έκφρασης του όγκου. Το ICAM-1 έχει επιπλέον ανιχνευθεί σε HIV-1 προσβαλλόμενα άτομα, σε ασθενείς με ελονοσία (*malaria tropica*) και είναι καλός δείκτης για την ηπατίτιδα Β σε περιπτώσεις ασθενών που έχουν υποστεί θεραπεία με IFN-γ. Επιπλέον το ICAM φαίνεται να παραέχει ένα μηχανισμό απόρριψης μη συμβατών μοσχευμάτων του κερατοειδή χιτώνα. Η έκφρασή του επίσης αυξάνεται κατά την απόρριψη των τριχοειδών ενδοθηλιακών αγγείων, της μυοκαρδικής μεμβράνης και του ενδοκαρδίου σε μεταμοσχεύσεις καρδιάς. Το ICAM-1 βρίσκεται επίσης αυξημένο σε ασθενείς με οξεία απόρριψη ήπατος με ινσουλινοεξαρτώμενο διαβήτη με σαρκοείδωση με οξύ μυοκαρδικό έμφραγμα (12 πρώτες ώρες) και με μυοκαρδική ισχαιμία ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση. Το ICAM-1 συσχετίζεται με την προσκόλληση των ηωσινόφιλων κυττάρων στο άσθμα, με την ρευματοειδή αρθρίτιδα και με την ψωρίαση.²³

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α**ΕΝΟΤΗΤΑ 6^η****Κυτταροκίνες/ IL-4**

(Οι ιντερλευκίνες λαμβάνουν χώρα στη φλεγμονή και πιθανόν στην κνιδωτική απάντηση. Η ιντερλευκίνη-4 έχει βρεθεί αυξημένη ανοσοϊστοχημικά στη CIU.)

6.1 ΟΙ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ ΓΕΝΙΚΑ

Οι **κυτταροκίνες (cytokines)** είναι μικρού μοριακού βάρους διαλυτές πρωτεΐνες ή γλυκοπρωτεΐνες που παράγονται από ποικιλία κυττάρων και μπορούν να αλλάξουν την συμπεριφορά του ίδιου του κυττάρου που τις εκκρίνει, καθώς και άλλων κυττάρων. Ουσιαστική λειτουργία των κυτταροκινών είναι ο συντονισμός της λειτουργίας πολλών διαφορετικών κυττάρων που συμμετέχουν στην ανοσιακή απάντηση.

Πολλές κυτταροκίνες μπορεί να παράγονται διάφορα κύτταρα, παρά το γεγονός ότι ένας συγκεκριμένος τύπος κυττάρου μπορεί να αποτελεί την κυριώτερη πηγή μιας συγκεκριμένης κυτταροκίνης. Τα **μονοκύτταρα/μακροφάγα** και τα **T-λεμφοκύτταρα**, ειδικότερα τα βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα, αποτελούν τις κύριες κατηγορίες κυττάρων που παράγουν κυτταροκίνες. Έτσι, ο γενικός όρος «**κυτταροκίνες**» έχει καθιερωθεί για: τις λεμφοκίνες (εκκρίνονται από τα λεμφοκύτταρα, *lymphokines*), τις μονοκίνες (εκκρίνονται από τα μονοκύτταρα, *monokines*), τις ιντερλευκίνες (*interleukins*), τις ιντερφερόνες (*interferones*), καθώς και διάφορους αυξητικούς παράγοντες (*growth factors*).

Οι κυτταροκίνες μπορεί να συμβάλλουν στην ωρίμανση των κυττάρων, στη διαφοροποίηση ή πολλαπλασιασμό τους, στην μεταστροφή της τάξης των ανοσοσφαιρινών (εάν το κύτταρο στόχος είναι ένα B-λεμφοκύτταρο), στην διέγερση της διαδικασίας απόπτωσης, στην συγκέντρωση των λευκοκυττάρων στην περιοχή της φλεγμονής²⁴, καθώς και στην ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων και των δραστικών τους μηχανισμών. Επίσης, μερικές κυτταροκίνες αναστέλλουν την ανάπτυξη των κυττάρων, συμμετέχουν στην εξουδετέρωση του κυττάρου στόχου και έχουν αντική και αντιβακτηριδιακή δράση. Επίσης, οι κυτταροκίνες συμμετέχουν στην εμφύτευση του γονιμοποιημένου ωαρίου στο ενδοθήλιο της μήτρας, καθώς και στην ανάπτυξη του εμβρύου.

Μια κυτταροκίνη μπορεί να υποβοηθά ή να εμποδίζει τη δράση μιας άλλης κυτταροκίνης. Στη περίπτωση που δύο κυτταροκίνες ασκούν την ίδια δράση στο κύτταρο στόχο, τότε ασκούν **συνεργική (synergistic)** δράση (πίνακας 3), ενώ, όταν μια κυτταροκίνη εμποδίζει τη δράση μιας άλλης κυτταροκίνης, τότε οι δύο

κυτταροκίνες έχουν **ανταγωνιστική (antagonistic)** δράση. Φαίνεται λοιπόν, ότι οι δράσεις των κυτταροκινών επηρεάζεται συχνά από άλλες κυτταροκίνες. Επιπλέον, μερικές κυτταροκίνες μπορεί να παράγονται κατά τη διέγερση διαφόρων κυττάρων, από άλλες κυτταροκίνες.

6.2 Ανάλογα με την δομή τους οι κυτταροκίνες διακρίνονται σε:

- **Χημειοκίνες (chemokines).**
- **Ιντερφερόνες (interferons, IFNs).**
- Μέλη της οικογένειας του **παράγοντα νέκρωσης των όγκων (tumor necrosis factor, TNF)**. Τα σημαντικότερα μέλη της οικογένειας αυτής είναι ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων- α (TNF- α) και ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων- β (TNF- β) ή **λεμφοτοξίνη (lymphotoxin, LT-)**.
- **Παράγοντες διεγερτικοί αποικιών (colony stimulating factors, CSFs).**
- **Ιντερλευκίνες (interleukins, ILs).**

Κυτταροκίνες στην κνίδωση: Όπως έχει ήδη αναφερθεί ο ρόλος και οι επαγόμενες δράσεις των κυτταροκινών σε ασθενείς που πάσχουν από κνίδωση, δεν έχει διευκρινισθεί επαρκώς. Μέχρι σήμερα, δεν έχει διασαφηνισθεί άμεσα εάν κάποιο μέλος της οικογένειας των κυτταροκινών συμμετέχει στην παθογένεια της νόσου, αλλά η συμμετοχή τους υποδηλώνεται έμμεσα από την εύρεση του παράγοντα αναστολής της μετανάστευσης, στα ενδοθηλιακά και δενδριτικά κύτταρα του δέρματος ασθενών, που πάσχουν από οξεία και χρόνια κνίδωση και από το γεγονός ότι λαμβάνουμε την κνίδωση ως μία αντίδραση υπερευαισθησίας που ακολουθείται από φλεγμονώδη απάντηση.

Σε πολλούς τομείς της ιατρικής, οι κυτταροκίνες έχουν πρόσφατα αποκτήσει κρίσιμη σημασία, στην κατανόηση των μηχανισμών αλλεργικών αντιδράσεων και παθήσεων. Οι αιμοποιητικοί αυξητικοί παράγοντες, οι πεπτιδικοί αυξητικοί παράγοντες, οι ιντερλευκίνες, οι ιντερφερόνες συμπεριλαμβάνονται στην τάξη των κυτταροκινών, οι οποίες, πιθανώς, να κατέχουν σημαντικό ρόλο στην αλλεργική νόσο.²⁵

ΔΡΑΣΕΙΣ ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΩΝ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ
(πίνακας 2)

Κυτταροκίνη	Κυτταρική πηγή	M.B	Δράση
IL-1	Πολλά κύτταρα κυρίως μονοκύτταρα, μακροφάγα.	17 kDa	Ενεργοποιεί τα T λεμφοκύτταρα. Προφλεγμονώδης σε πολλά επίπεδα, αρχίζει την κυτταρική μεταγραφή πολλών γονιδίων.
IL-2	T λεμφοκύτταρα	14-16 kDa	Πολλαπλασιασμός των T λεμφοκυττάρων .
IL-3	T λεμφοκύτταρα	14-28 kDa	Διεγείρει την αύξηση και τη διαφοροποίηση των αρχέγονων κυττάρων των μονοκυττάρων / μακροφάγων.
IL-4	T λεμφοκύτταρα	20 kDa	Συμπαράγοντας στην ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων. Προάγει την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση, των B λεμφοκυττάρων και Αυξητικός συμπαράγοντας με την IL-3, των σιτευτικών κυττάρων του συνδετικού ιστού των τρωκτικών.
IL-5	T λεμφοκύτταρα	25-50 kDa	Διεγείρει την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση, των αρχέγονων κυττάρων των ηωσινοφίλων (και των βασεοφίλων). Ενεργοποιεί και επιμηκύνει την επιβίωση των ηωσινοφίλων.
IL-6	Πολλά κύτταρα κυρίως μακροφάγα, ινοβλάστες.	22-27 kDa	Παράγοντας διέγερσης των ηπατοκυττάρων. Προάγει την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των B λεμφοκυττάρων. Δρα ως ιντερφερόνη (β ₂). Διεγείρει τη μεταγραφή και τη σύνθεση πολλών γονιδίων προφλεγμονωδών πρωτεϊνών, κατά την απάντηση της οξείας φάσης.
IL-7	Κύτταρα στρώματος	15-25 kDa	Πρώιμη διαφοροποίηση των B λεμφοκυττάρων
IL-8	Μακροφάγα	10 kDa	Χημειοταξία των ουδετερόφιλων. Συμπαράγοντας στη διαφοροποίηση των κοκκιοκυττάρων
IL-9	T λεμφοκύτταρα	40 kDa	Προάγει την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των αρχέγονων κυττάρων της ερυθράς σειράς. Αυξάνει την ανάπτυξη των σιτευτικών κυττάρων.
IL-10	T λεμφοκύτταρα B λεμφοκύτταρα	20 kDa	Αναστέλλει τη σύνθεση των κυτταροκινών από τον Th ₁ -υπότυπο των T λεμφοκυττάρων. Αυξάνει την έκφραση του MHC II στα B λεμφοκύτταρα. Συμπαράγοντας στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των σιτευτικών κυττάρων, με την IL-3 και την IL-4. Δράση αυξητικού παράγοντα των T λεμφοκυττάρων.

ΣΥΝΕΡΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΩΝ	
(πίνακας 3)	
Συνέργια	Επιδράσεις
IL-1, IL-3, IL-5	Παραγωγή κοκκιοκυττάρων Παραγωγή ηωσινόφιλων
IL-3, IL-6	Αιμοποίηση
IL-4, IL-6	Αιμοποίηση
IL-2, IL-4 IL-3, IL-4, IL-10	Αύξηση των T λεμφοκυττάρων Διαφοροποίηση των B λεμφοκυττάρων Παραγωγή σιτευτικών κυττάρων
IL-3, IL-11	Παραγωγή μεγακαρυοκυττάρων

6.2.1 Ιντερλευκίνη 4 (IL-4)

Η ιντερλευκίνη 4, IL-4, αποτελεί μια *γλυκοπρωτεΐνη*, μοριακού βάρους 20 kDa. η συνίσταται από 129 αμινοξέα και αποτελεί μέλος του φάσματος των Th2 κυτταροκινών που συντίθενται στα CD4⁺ T βοηθητικά λεμφοκύτταρα.^{107,110} Ο Yanagihana Y και συν., μελετώντας τη σύνθεση της IL-4, in vitro, από T κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα, από ποντίκια, στα οποία χορηγήθηκαν ανθρώπινα περιφερειακά μονοκύτταρα :τοπικών ασθενών, αλλά και από άτομα με ανεπάρκεια της αδενοσινικής δεαμινάσης, ενός πουρινικού καταβολικού ενζύμου, το οποίο καταλύει την απαμίνωση της αδενοσίνης, προς ινοσίνη, που μετατρέπεται σε κυτταροτοξικά παράγοντα, παρατήρησε ότι τα CD8⁺ λεμφοκύτταρα, που προάγουν την παραγωγή της IL-4, αποτελούν σημαντικό ποσοστό, του πληθυσμού των T λεμφοκυττάρων, οι Reekers R και συν.,¹¹² αναφέρει ότι μελετώντας τις αλλεργικές αντιδράσεις σε παιδιά, τα οποία είχαν αλλεργία στο αγελαδινό γάλα, παρατήρησε ότι το 75%, των CD4⁺ T βοηθητικών λεμφοκυττάρων και το 44%, των CD8⁺ T κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων, συνθέτουν IL-4. Με βάση τα αποτελέσματα των πιο πάνω μελετών, είναι δυνατό να θεωρηθεί σίγουρο, ότι όχι μόνο τα T βοηθητικά CD4⁺ λεμφοκύτταρα, αλλά και τα T κυτταροτοξικά CD8⁺ λεμφοκύτταρα, έχουν την ικανότητα σύνθεσης IL-4 και πιθανό και των υπόλοιπων κυτταροκινών, ωστόσο απαιτείται περισσότερη ερευνητική μελέτη. Η βιολογική δράση της ιντερλευκίνης 4, συνίσταται στην επαγωγή του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των B λεμφοκυττάρων, αλλά και στην έκφραση των αντιγόνων CD40 και CD23, ενώ αποτελεί και συμπαράγοντα

στην ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων. Επίσης, προκαλεί αύξηση της παραγωγής και της έκκρισης των ανοσοσφαιρινών IgG και IgE, καθώς και έκκριση των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας, της τάξεως I και II. Επάγει και την έκφραση του μορίου προσκόλλησης VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1, στα ενδοθηλιακά κύτταρα, αναστέλλει την παραγωγή της INF- γ από τα T λεμφοκύτταρα, διεγείρει και τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε μακροφάγα, ενώ δρα και ως αυξητικός παράγοντας, σε συνδυασμό με την IL-3, των κυττάρων του συνδετικού ιστού, των τρωκτικών. Τέλος, η IL-4 προάγει τον πολλαπλασιασμό των θυμοκυττάρων και των σιτευτικών κυττάρων.

IL-4 στην κνίδωση: Η ανοσοσφαιρίνη IgE, θεωρείται ένας από τους κυριότερους μεσολαβητές της εκδήλωσης άμεσων αντιδράσεων υπερευαισθησίας, στις οποίες εκτός από τη κνίδωση, συμπεριλαμβάνονται η εποχιακή αλλεργία, το βρογχικό άσθμα και η αναφυλακτική αντίδραση. Η ιντερλευκίνη 4, IL-4, η οποία όπως ήδη αναφέρθηκε προέρχεται από τα Th₂ τα Tc₂ λεμφοκύτταρα, έχει χαρακτηριστεί ως η κύρια κυτταροκίνη, η οποία *επάγει τη σύνθεση της ανοσοσφαιρίνης IgE*,²⁶ ενώ άλλη σημαντική της δράση, είναι η μεσολάβηση στην ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων.^{27,28,29} Τα επίπεδα της IL-4 στο πλάσμα, σύμφωνα με τον Matsumoto και συν.,³⁰ κατά τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας, σχετίζονται πολύ καλά με τα επίπεδα της ανοσοσφαιρίνης IgE στον ορό όπως και καλή συσχέτιση υπάρχει και μεταξύ των επιπέδων της ηωσινοφιλικής κατιονικής πρωτεΐνης, ECP, και της δραστηριότητας των ηωσινοφίλων.³⁰

Είναι δεδομένο ότι η IL-4, είναι αυξημένη σε ασθενείς, οι οποίοι πάσχουν από ατοπική δερματίτιδα, μια χρόνια μορφή δερματίτιδας, η οποία υποτροπιάζει και υφιάται, με κύριο κλινικό χαρακτηριστικό τις εκζεματώδεις αλλοιώσεις του δέρματος, ενώ χαρακτηρίζεται και από αυξημένα επίπεδα ανοσοσφαιρίνης IgE και ηωσινοφίλων.³¹ Επιπλέον, μελέτες που έγιναν σε αλλεργικές εκδηλώσεις παιδιών, που παρουσίαζαν αλλεργία στο αγελαδινό γάλα, η οποία εκδηλωνόταν με τη μορφή κνίδωσης, παρατήρησαν αυξημένη συγκέντρωση της IL-4. Από τα παραπάνω είναι φανερό ότι η IL-4 κατέχει ένα ρόλο στην παθογένεια της κνίδωσης.³²

6.2.2 Συσχέτιση IL-4 και ECP

Ο Figue M και συν.,³³ σε μια *in vitro* εργασία, όπου συμμετείχαν 43 άτομα με ατοπική δερματίτιδα, 13 άτομα που έπασχαν από κνίδωση και 45 υγιείς εθελοντές, μελέτησε τόσο τα επίπεδα της IL-4, της IgE, της ECP και των ηωσινόφιλων, καθώς και τη σχέση που συνδέει τους παράγοντες αυτούς, στις πιο πάνω ομάδες ασθενών. Οι ασθενείς με κνίδωση, παρουσιάζουν χαμηλότερες συγκεντρώσεις ανοσοσφαιρίνης IgE, συγκριτικά με τους ασθενείς με ατοπική δερματίτιδα, αλλά σαφώς μεγαλύτερες από αυτές των υγιών εθελοντών, γεγονός το οποίο δικαιολογείται από την ίδια την παθοφυσιολογία της νόσου. Ο αριθμός των ηωσινόφιλων στο περιφερειακό αίμα, είναι και αυτός μικρότερος συγκριτικά με τον αριθμό στους ασθενείς με ατοπική δερματίτιδα, αλλά και πάλι μεγαλύτερος από τις φυσιολογικές τιμές. Τα επίπεδα της ECP δεν παρουσιάζουν σημαντική αύξηση συγκριτικά με τους υγιείς εθελοντές, σε αντίθεση με τα επίπεδα στους ασθενείς με ατοπική δερματίτιδα, όπου τα επίπεδα ήταν πολύ αυξημένα. Ο προσδιορισμός των επιπέδων της IL-4, στη μελέτη αυτή, παρουσίαζε πολλές διαφοροποιήσεις, όχι μόνο μεταξύ των διαφόρων ομάδων ασθενών, αλλά και μεταξύ των ασθενών της ίδιας ομάδας. Η IL-4, δεν ήταν ανιχνεύσιμη σε όλα τα μέλη, κάθε ομάδας, παρά μόνο σε ένα ποσοστό 30-50% του συνόλου των ασθενών, παρόλο που η ευαισθησία της μεθόδου έφτανε το 0,5pg/ml. Πιθανό, να είναι απαραίτητη η χρήση μιας πολύ πιο ευαίσθητης μεθόδου, για τη καλύτερη κατανόηση του ρόλου της IL-4, στις αλλεργικές αυτές νόσους. Η ECP, που αποτελεί καλό δείκτη του βαθμού ενεργοποίησης των ηωσινόφιλων, όπως και η συγκέντρωση των ηωσινόφιλων στο αίμα, αλλά και τα επίπεδα της E-selectin, τα οποία αντανακλούν την τάση πρόκληση φλεγμονώδους αντίδρασης, στον ορό ασθενών, που έπασχαν από κνίδωση ήταν μειωμένα, συγκριτικά με τις αντίστοιχες τιμές των παραμέτρων αυτών στους ασθενείς με ατοπική δερματίτιδα. Όλα αυτά, συνηγορούν στο γεγονός ότι το κύριο παθολογικό χαρακτηριστικό της κνίδωσης, είναι η εκδήλωση ενός παροδικού οιδήματος, με αραιή φλεγμονώδη διήθηση.

Οι Nicholson AG και συν.,³⁴ μελετώντας το προφίλ διαφόρων αλλεργικών και φλεγμονωδών νόσων, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η κνίδωση, όπως και η συστηματική μαστοκύττωση, παρουσιάζουν το ίδιο παθολογικό υπόστρωμα, το οποίο χαρακτηρίζεται από αύξηση του αριθμού των T λεμφοκυττάρων, αλλά και των

ηωσινόφιλων, όπως και αυξημένη γονιδιακή έκφραση της IL-4, δεδομένου ότι ανιχνεύθηκε μεγάλη ποσότητα πρωτεϊνικού mRNA. που κωδικοποιεί τη σύνθεση της IL-4.

Σε κλινικές μελέτες, που αποσκοπούσαν στη μελέτη της ικανότητας διαφόρων χημικών ή και φαρμακευτικών ουσιών, να προκαλούν αλλεργικές αντιδράσεις, όπως για παράδειγμα κνίδωση, ατοπική δερματίτιδα και αλλεργική ρινίτιδα, παρατηρήθηκε αυξημένη ικανότητα έκκρισης IL-4, από τα δερματικά κύτταρα, όταν οι ουσίες αυτές προκαλούσαν την εκδήλωση κνίδωσης.³⁴ Στην ίδια παρατήρηση, κατέληξαν και ο Reekers R και συν.,³² όταν μελέτησαν τις αλλεργικές εκδηλώσεις παιδιών, που παρουσίαζαν αλλεργία στο αγελαδινό γάλα. η οποία εκδηλωνόταν με τη μορφή κνίδωσης. Από τις πιο πάνω παρατηρήσεις, είναι φανερό ότι η IL-4 κατέχει κάποιο ρόλο στην παθογένεση της κνίδωσης, ο οποίος απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση για την πλήρη κατανόηση του.

Ο Cho BS και συν.,²⁶ μελετώντας το ρόλο της IL-4 στην παθογένεση του νεφρωσικού συνδρόμου ελαχίστων αλλοιώσεων, στα παιδιά, το οποίο σχετίζεται με την εκδήλωση αλλεργικών συμπτωμάτων, όπως για παράδειγμα άσθμα, ατοπική δερματίτιδα, κνίδωση, ρινίτιδα, αλλά και αυξημένες συγκεντρώσεις IgE, κατέληξε ότι το σύνδρομο αυτό, είναι συνέπεια δυσλειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος, όπου οι αυξημένες συγκεντρώσεις της ανοσοσφαιρίνης IgE, σχετίζονται με τη μεγάλη αύξηση των επιπέδων της IL-4, η οποία φθάνει την συγκέντρωση των 1200 U/ml, συγκριτικά με τους υγιείς, όπου τα επίπεδα είναι μόνο 4,5U/ml.

Οι Hatano και συν.,³⁶ αναφέρουν ότι κάποιες υποομάδες των ηωσινόφιλων έχουν την ικανότητα να συμμετέχουν στη σύνθεση των ιντερλευκινών, όπου σε πειράματα που έγιναν σε ηωσινόφιλα ασθενών, που έπασχαν από διάφορες νόσους, που χαρακτηρίζονται από ηωσινοφιλία, συμπεριλαμβανομένης και της κνίδωσης, παρατήρησε αυξημένη έκφραση του μεταφραστικού mRNA των διαφόρων κυτταροκινών, και συγκεκριμένα της IL-4 και της INF-γ. Από τη παρατήρηση αυτή συμπεραίνουμε ότι, όχι μόνο τα T βοηθητικά CD₄⁺ λεμφοκύτταρα, αλλά και τα ηωσινόφιλα, μέσω της συμμετοχής τους στη σύνθεση των κυτταροκινών, είναι δυνατό να εμπλέκονται στην παθογένεση δερματικών αλλεργικών παθήσεων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β'

ΕΝΟΤΗΤΑ 7^η

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

7. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η κνίδωση, αποτελεί μια ανοσολογική απάντηση του ανθρώπινου οργανισμού, παρουσιάζει όμως και στοιχεία φλεγμονώδους απάντησης. Για τη θεραπεία της νόσου δίδονται διάφορα φάρμακα, όπως αντιισταμινικά με ουσιαστικά και μη αποτελέσματα. Πιο συγκεκριμένη κατηγορία κνιδώσεως είναι η χρόνια ιδιοπαθής κνίδωση, η οποία δεν έχει ακόμη καθορισμένα αίτια.

Ακόμη πιο δυσάρεστο στον τομέα της ιατρικής επιστήμης όσον αφορά την κνίδωση είναι ότι δεν έχει βρεθεί ακόμα διαγνωστική μέθοδος ρουτίνας εργαστηρίου για την πιστοποίηση της συγκεκριμένης ασθένειας.

Σκοπός αυτής της εργασίας είναι η εξέταση της πιθανότητας οι συγκεντρώσεις των ECP, ICAM-1 και IL-4 στο αίμα να δίνουν κάποια διαγνωστικά στοιχεία για τη συγκεκριμένη νόσο.

Η επιλογή των παραπάνω ανοσολογικών παραμέτρων δεν έγινε τυχαία αλλά είναι απόρροια άλλων δημοσιευμένων εργασιών^{18,37,38,39,40,41}. Συγκεκριμένα η IL-4 και το ICAM-1 έχουν βρεθεί αυξημένα σε ασθενείς με χρόνια ιδιοπαθή κνίδωση ύστερα όμως από ανοσοϊστοχημικό προσδιορισμό.³⁷ Αυτού του είδους όμως ο προσδιορισμός είναι αδύνατον να λάβει χώρα σε ένα εργαστήριο ρουτίνας. Απ' την άλλη πλευρά ασθενείς που πάσχουν από μια τέτοια νόσο, είναι δύσκολο να ακολουθήσουν την παραπάνω μέθοδο προσδιορισμού (ανοσοϊστοχημικό).

Όσον αφορά την ECP είναι μια πρωτεΐνη δείκτης για την ύπαρξη των ηωσινόφιλων που είναι γνωστό ότι λαμβάνουν χώρα σε αντιδράσεις φλεγμονής και πιο συγκεκριμένα αυξάνονται ιδιαίτερα σε ανοσολογικές απαντήσεις έμμεσης υπερευαισθησίας. Επιπλέον, η ECP έχει βρεθεί αυξημένη στον ορό ασθενών με αλλεργικό άσθμα και αλλεργική ρινίτιδα.^{38,39}

Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι σε προηγούμενη εργασία έχει γίνει μελέτη για τα επίπεδα της ECP σε ορούς ασθενών με χρόνια ιδιοπαθή κνίδωση (CIU).¹⁸ Τα αποτελέσματα, όμως, δεν ήταν διαφωτιστικά διότι ανάμεσα στα δείγματα υπήρχαν και ασθενείς με θετικότητα στον ομόλογο ορό και ασθενείς αρνητικοί στο test ομόλογου ορού (ASST). Επίσης, στην εργασία που έγινε ανοσοϊστοχημική μέθοδος για την διερεύνηση του ICAM-1 καθώς και της IL-4, η οποία αναφέρθηκε παραπάνω είχαν χρησιμοποιηθεί οροί ασθενών που ήταν θετικοί στο test ομόλογου ορού.

Για το λόγο αυτό τέθηκε μια επιπλέον παράμετρος δηλαδή διαχωρίστηκαν τα δείγματα και αναλύθηκαν δείγματα που είναι αρνητικά στο ASST. Με αυτόν τον τρόπο ελαχιστοποιήσαμε την πιθανότητα να είχαμε συγχώνευση της αυτοάνοσης και της χρόνιας ιδιοπαθούς κνίδωσης.

Όλα τα παραπάνω καθιστούν αυτές τις παραμέτρους 'ύποπτες'. Έχοντας λοιπόν αυτά τα στοιχεία γίνεται μια προσπάθεια, μέσα από αυτή την εργασία, να δοθούν νέες πληροφορίες σχετικές με τη διάγνωση της νόσου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ΄

ΕΝΟΤΗΤΑ 8^η, 9^η, 10^η, 11^η, 12^η

ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

(Εθελοντές, Δειγματοληψία,

Προσδιορισμός ECP,

*IL-4 & ICAM-1 με τη μέθοδο της
ELISA).*

8. Εθελοντές

✓ *Επιλογή εθελοντών*

Οι ασθενείς που επιλέχθηκαν, ως εθελοντές, για να συμμετάσχουν στην παρούσα μελέτη, ήταν απαραίτητο να πληρούν τα κριτήρια εισαγωγής, όπως επίσης και να μην πληρούν κανένα, από τα κριτήρια αποκλεισμού. Τόσο τα κριτήρια εισαγωγής όσο και τα κριτήρια αποκλεισμού, καθορίστηκαν πριν από την έναρξη της διεξαγωγής της μελέτης, από το πρωτόκολλο μελέτης.

Με βάση τα κριτήρια εισαγωγής, επιλέχθηκαν ασθενείς που έπασχαν, από χρόνια ιδιοπαθή κνίδωση (σύμφωνα με τους θεράποντες ιατρούς του νοσοκομείου) και πιο συγκεκριμένα με ιστορικό εκδήλωσης κνησμώδους εξανθήματος, τουλάχιστον προ τετραμήνου.

Επίσης, όλοι οι ασθενείς που επιλέχθηκαν για να συμμετάσχουν στην παρούσα μελέτη, ήταν απαραίτητο, πριν από την επιλογή τους, να είχαν λάβει φαρμακοθεραπεία, με αντιϊσταμινικά φάρμακα, της κατηγορίας αποκλειστών των H₂ – υποδοχέων της ισταμίνης, για χρονική περίοδο 1 μηνός (30 ημερών) για την αντιμετώπιση της νόσου, χωρίς την αναμενόμενη αποτελεσματικότητα, την αντιμετώπιση της συμπτωματολογίας της κνίδωσης.

Το κνιδωτικό εξάνθημα, ήταν δυνατό να χαρακτηριζόταν είτε ως εντοπισμένο, δηλαδή να εκδηλωνόταν το πολύ σε δύο σημεία του σώματος, είτε γενικευμένο, δηλαδή να εκδηλωνόταν τουλάχιστον σε τρία σημεία του σώματος. Τέλος οι ασθενείς έπρεπε να είναι θετικοί στο test ομόλογου ορού ASST.

Σύμφωνα με τα κριτήρια αποκλεισμού αποκλείστηκαν ασθενείς των οποίων η ηλικία ήταν μεγαλύτερη των 60 ετών και ήταν αρνητικοί για το ASST.

9. Δείγματα αίματος

✓ *Δειγματοληψία – Φύλαξη δειγμάτων*

Η αιματοληψία έγινε από εξειδικευμένο νοσηλευτικό προσωπικό του νοσοκομείου. Τα δείγματα, τα οποία προέρχονταν από την κερκιδική ή βραχίονα φλέβα, του εμπρόσθιου τμήματος του αγκώνα του χεριού, λήφθηκαν μ' έσω βελόνας προσαρμοσμένης σε ειδικό σωληνάριο κενού αέρος. Στη συνέχεια το αίμα διαχωρίστηκε, ανά 3ml, σε τρεις σωλήνες με αντιπηκτικό EDTAK₃, ένα για τον προσδιορισμό της ECP, ένα για της IL-4 και ένα για το ICAM-1.

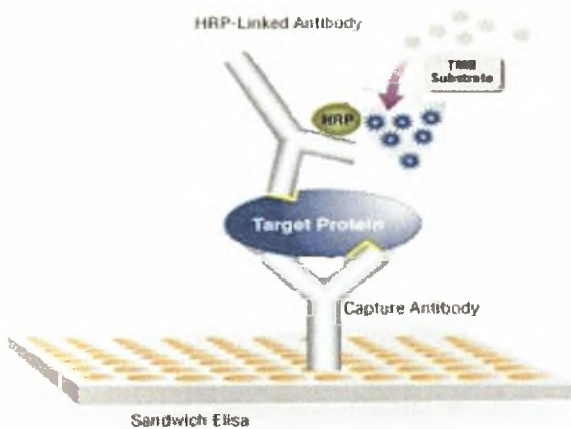
Εντός χρονικού διαστήματος 4 ωρών, τα δείγματα αίματος, φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά με σχετική φυγόκεντρο δύναμη, RCF, 1000 οπότε και ακολούθησε και διαχωρισμός του αίματος.

Στη συνέχεια τα σωληνάρια τοποθετήθηκαν στην κατάψυξη, στους -20⁰C από όπου και απομακρύνθηκαν, μόνο όταν επρόκειτο να γίνει ο εργαστηριακός προσδιορισμός των ανοσολογικών παραμέτρων.

10. Προσδιορισμός συγκεντρώσης ECP

10.1 Αργές μεθόδου

Οι προσδιορισμοί της συγκέντρωσης της ECP, στα δείγματα, έγινε με τη τεχνική του ετερογενούς ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού, EIA, Enzyme Immunoassay, και συγκεκριμένα με τη μέθοδο της τύπου *sandwich ELISA*, Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (εικόνα 6). Η τεχνική, αυτή, είναι μη συναγωνιστικού σχεδιασμού,



Εικόνα 6. sandwich elisa

τύπου sandwich για αντιγόνα, και της οποίας ο βασικός σχεδιασμός, στηρίζεται στην ακινητοποίηση, επί των τοιχωμάτων των σωληναρίων, μονοκλωνικού αντισώματος, ειδικού για την εκάστοτε προσδιοριζόμενη πρωτεΐνη. Η αρχή της τεχνικής ELISA, εντοπίζεται στην ανάμειξη της πρωτεΐνης που υπάρχει, τόσο στα δείγματα πλάσματος των

ασθενών, όσο και στα διαλύματα αναφοράς. Υπάρχει περίσσεια αντισώματος στερεάς φάσης, με επακόλουθο τη δέσμευση όλης της ποσότητας της πρωτεΐνης στο ειδικό, για αυτή, αντίσωμα. Ένα δεύτερο πολυκλωνικό αντι-ECP αντίσωμα, συνδεδεμένο με υπεροξειδάση (HRP) προσδένεται σε μια άλλη θέση της ECP και έτσι έχουμε σαν επακόλουθο τη δημιουργία μιας ακινητοποιημένης ακολουθίας, *αντίσωμα στερεάς φάσης / ECP / 2^ο αντίσωμα-HRP*. Απομάκρυνση της περίσσειας του αδέσμευτων συστατικών, μέσω έκπλυσης της στερεάς φάσης και προσθήκη ενός διαλύματος, που αποτελεί υπόστρωμα του ενζύμου (HRP/υπεροξειδάση), έχει σαν επακόλουθο, την αντίδραση με το ένζυμο και τη δημιουργία ενός χρωμογόνου προϊόντος. Σε αυτό το σημείο προστίθεται διάλυμα (οξύ) ώστε να σταματήσει η αντίδραση. Τέλος, η φασματοφωτομετρική μέτρηση, της έντασης της απορρόφησης του χρωμογόνου αυτού προϊόντος, είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση της εκάστοτε προσδιοριζόμενης κυτταροκίνης στο δείγμα.

10.2 Όργανα και αντιδραστήρια

- Αυτοματοποιημένος αναλυτής ELISA της εταιρείας HYCOR.: Με τη βοήθεια του αυτόματου αναλυτή της HYCOR και με το αντίστοιχο λογισμικό της εταιρείας έγιναν όλες οι μετρήσεις. Ο αναλυτής προγραμματίστηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του kit και ρύθμισε τη δοσολογία τις επωάσεις και τις πλύσεις στον χρόνο που απαιτούνταν από το πρωτόκολλο του kit.
- Mesacup ECP test της εταιρείας MBL(MEDICAN & BIOLOGICAL LABORATORIES CO.,LTD) : Το εργαστηριακό kit της, MBL Mesacup ECP test, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων της ECP, στα δείγματα πλάσματος, είναι ειδικό, για τον in vitro προσδιορισμό της ECP αυτής, σε δείγματα πλάσματος.
- Πρότυπα διαλύματα (standards) : Χρησιμοποιήθηκαν πέντε πρότυπα διαλύματα, Standards, για τη δημιουργία καμπύλης αναφοράς, κατά τη διαδικασία της βαθμονόμησης του αυτοματοποιημένου μηχανήματος της HYCOR και τα οποία υπήρχαν στο εργαστηριακό kit και ήταν έτοιμα προς χρήση.
- Διάλυμα έκλυσης στερεάς φάσης (Wash Buffer): Το διάλυμα έκλυσης, Wash Solution, το οποίο περιλαμβανόταν στο εργαστηριακό kit και το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την έκλυση της στερεάς φάσης, από τον αναλυτή, Diagnostics-pasteur LP₃₅ απαιτούσε αραιώση. Τοποθετήσαμε τα 100ml από το Wash Solution, που υπήρχε στο εργαστηριακό kit, σε ογκομετρικό σωλήνα και συμπληρώσαμε με αποστειρωμένο νερό, για παρεντερική χρήση, μέχρι τα 1000ml και τοποθετήθηκε στο ειδικό δοχείο του αναλυτή για να γίνει η έκλυση . Για την πλήρη ομογενοποίηση του μείγματος, χρησιμοποιήθηκε μαγνητικός αναδευτήρας.
- Διαλύματα ελέγχου (controls)²⁰ : Χρησιμοποιήθηκαν 2 διαλύματα ελέγχου, controls, για τον έλεγχο της βαθμονόμησης του αυτοματοποιημένου οργάνου ELISA READER και τα οποία επίσης, περιλαμβάνονταν στο εργαστηριακό kit.

	Θετικός Μάρτυρας	Αρνητικός Μάρτυρας
ECP(ng/ml)	20<, <40	<2

• Διάλυμα TMB: Το χρωμογόνο διάλυμα TMB, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία του χρωμογόνου προϊόντος, της στερεάς φάσης, και το οποίο αποτελείται από

Tetramethylbenzidine, υπήρχε στο εργαστηριακό kit και ήταν έτοιμο για χρήση.

• Διάλυμα Stop Solution : Το Stop Solution υπήρχε μέσα στο kit και ήταν έτοιμο προς χρήση. Το οξύ αυτό χρησιμοποιήθηκε στα δείγματα όταν το πρότυπο διάλυμα με την μεγαλύτερη συγκέντρωση απέκτησε ένα βαθύ σκούρο μπλε χρώμα.

10.3 Διαδικασία της μεθόδου προσδιορισμού των συγκεντρώσεων της ECP

2. Τα σωληνάρια με τα δείγματα ορού, κάθε ασθενή, τα οποία προορίζονταν για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων της ECP, τέθηκαν εκτός κατάψυξης και αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου, μέχρι την επίτευξη της πλήρους τήξεωσ τους. Το εργαστηριακό kit της MBL MESACUP ECP TEST, για μικρό χρονικό διάστημα, πριν την έναρξη της διαδικασίας της ανάλυσης, απομακρύνθηκε από το ψυγείο και αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου.

3. Τα σωληνάρια, τοποθετήθηκαν στη συσκευή vortex για χρονικό διάστημα 30 sec, τόσο για την ανάδευση, αλλά και για την πλήρη ομογενοποίηση, των υγροποιημένων δειγμάτων ορού.

4. Καθορίστηκε ο αριθμός των σειρών των σωληναρίων, που απαιτούνταν για την διεξαγωγή της ανάλυσης των διαλυμάτων αναφοράς και των μαρτύρων καθώς και των δειγμάτων ορού όλων των ασθενών. Όλα τα διαλύματα αναφοράς και ελέγχου, καθώς και τα δείγματα ορού των ασθενών, αναλύθηκαν εις διπλούν, για μεγαλύτερη ακρίβεια..

5. Σε κάθε σωληνάριο (δείγματα και controls) προστέθηκαν 200μl, από το diluent του kit με ρυθμιζόμενη πιπέττα Gilson (δείγματα και πρότυπα) πριν τοποθετηθούν στον αναλυτή

6. Εντός μικρού χρονικού διαστήματος, τοποθετήθηκαν 150μl, από κάθε πρότυπο διάλυμα καθώς και από κάθε δείγμα αίματος, στο αντίστοιχο σωληνάριο.

7. Τα σωληνάρια επώαστηκαν για χρονική περίοδο 60min, σε θερμοκρασία δωματίου, εντός του αναλυτή .

8. Μόλις ολοκληρώθηκε το στάδιο της επώασης, ακολούθησε το στάδιο της έκπλυσης της στερεάς φάσης (4 φορές) , με τη βοήθεια του αυτοματοποιημένου αναλυτή.

9. Εισάγουμε 100μl από το διάλυμα του δευτέρου αντισώματος, και τα αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 60 λεπτά.
10. Μόλις ολοκληρώθηκε το στάδιο της επώασης, ακολούθησε το στάδιο της έκπλυσης της στερεάς φάσης (4 φορές) , με τη βοήθεια του αυτοματοποιημένου αναλυτή.
11. Εισάγουμε 100μl χρωμογόνου TMB διαλύματος, και τα αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 10 λεπτά.
12. Σύμφωνα με τις οδηγίες του kit, προσθέσαμε σε όλα τα σωληνάρια από 100μl Stop Solution.
13. Καθορίστηκε η μέτρηση της απορρόφησης, στα μήκη κύματος 450nm. Ακολούθησε η διαδικασία της ανάλυσης, σύμφωνα με τη βαθμονόμηση του οργάνου, και τα διαλύματα αναφοράς που έγιναν στην αρχή.
14. Τα αποτελέσματα, δόθηκαν υπό μορφή συγκεντρώσεων σε μονάδες ng/ml, και τυπώθηκαν από τον ενσωματωμένο εκτυπωτή.

Σημείωση: Όλα τα παραπάνω βήματα έγιναν στον αυτόματο αναλυτή για μεθόδους elisa sandwich της HYCOR ο οποίος φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 7. Αυτοματοποιημένος αναλυτής ELISA της HYCOR.

11. Προσδιορισμός συγκέντρωσης ICAM-1

11.1 Αργές μεθόδου

Figure 1

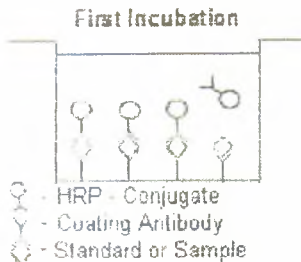


Figure 2

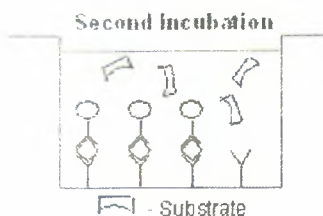
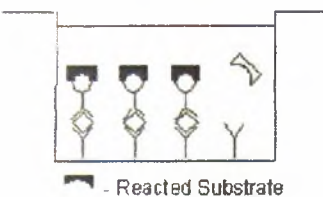


Figure 3



Εικόνα 8.
sandwich ELISA

Οι προσδιορισμοί της συγκέντρωσης του ICAM-1, στα δείγματα ορού, έγινε με τη τεχνική του ετερογενούς ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού, EIA, Enzyme Immunoassay, και συγκεκριμένα με τη μέθοδο της τύπου sandwich ELISA, Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (εικόνα 8) . Η τεχνική, αυτή, είναι μη συναγωνιστικού σχεδιασμού, τύπου sandwich για αντιγόνα, και της οποίας ο βασικός σχεδιασμός, στηρίζεται στην ακινητοποίηση, επί των τοιχωμάτων των σωληναρίων, μονοκλωνικού αντισώματος, ειδικού για την εκάστοτε προσδιοριζόμενη πρωτεΐνη. Η αρχή της τεχνικής ELISA, εντοπίζεται στην ανάμειξη της πρωτεΐνης που υπάρχει, τόσο στα δείγματα πλάσματος των ασθενών, όσο και στα διαλύματα αναφοράς με περίσσεια αντισώματος στερεάς φάσης, με επακόλουθο τη δέσμευση όλης της ποσότητας της πρωτεΐνης στο ειδικό, για αυτή,

αντίσωμα. Ένα δεύτερο μονοκλωνικό αντι-ICAM-1 αντίσωμα, συνδεδεμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση (HRP-conjugated monoclonal anti-sICAM-1 antibody) υπάρχει στα πηγάδια σε περίσσεια, το οποίο και είναι ειδικό για άλλη θέση του ICAM-1, έτσι έχουμε σαν επακόλουθο τη δημιουργία μιας ακινητοποιημένης ακολουθίας, *αντίσωμα στερεάς φάσης / ICAM-1 / 2^ο αντίσωμα-HRP*, οπότε και επιτυγχάνεται η ενζυμική επισήμανση της στερεάς φάσης. Απομάκρυνση της περίσσειας των αδέσμευτων συστατικών, μέσω έκπλυσης της στερεάς φάσης και προσθήκη ενός διαλύματος TMB, που αποτελεί υπόστρωμα του ενζύμου (HRP/υπεροξειδάση), έχει σαν επακόλουθο, την αντίδραση με το ένζυμο και τη δημιουργία ενός χρωμογόνου προϊόντος. Σε αυτό το σημείο προστίθεται διάλυμα (οξύ) ώστε να σταματήσει η αντίδραση. Τέλος, η φασματοφωτομετρική μέτρηση, της έντασης της απορρόφησης του χρωμογόνου αυτού

προϊόντος, είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση της εκάστοτε προσδιοριζόμενης κυτταροκίνης στο δείγμα.

11.2 Όργανα και αντιδραστήρια

- Φασματοφωτόμετρο ELISA READER Το αυτοματοποιημένο φωτόμετρο της BioSource, ELISA READER, καθώς και το συμβατό για το όργανο, λογισμικό πρόγραμμα, της εταιρείας Robert Maciel Associates, Inc., ELISA^{AID}™ Software χρησιμοποιήθηκαν για στις αναλύσεις προσδιορισμού των συγκεντρώσεων. Η εκτύπωση των αποτελεσμάτων των αναλύσεων του ποσοτικού προσδιορισμού, στα δείγματα, έγινε από τον ενσωματωμένο, με το αυτοματοποιημένο φασματοφωτόμετρο, εκτυπωτή.
- Συσκευή VORTEX. Η συσκευή vortex, χρησιμοποιήθηκε για την ανάδευση, αλλά και για την πλήρη ομογενοποίηση, των υγροποιημένων δειγμάτων αίματος, πριν από την διεξαγωγή του ποσοτικού προσδιορισμού των συγκεντρώσεων.
- Συσκευή επώασης. : Χρησιμοποιήθηκε ειδική συσκευή επώασης, για την επώαση των σωληναρίων, τόσο με τα πρότυπα διαλύματα, όσο με τα δείγματα αίματος. Η συσκευή επώασης, προκαλούσε οριζόντια ανακίνηση του πλαισίου με τα σωληνάρια, εντός σκοτεινού θαλάμου και η οποία ρυθμίστηκε, σε θερμοκρασία δωματίου και στις 200rpm.
- Diagnostics-pasteur LP₃₅. Το αυτοματοποιημένο όργανο έκπλυσης, Diagnostics-pasteur LP₃₅, χρησιμοποιήθηκε για την έκπλυση της στερεάς φάσης. Η διαδικασία της έκπλυσης, ρυθμίστηκε ώστε να πραγματοποιείται αρχικά απόχυση του περιεχομένου κάθε σωληναρίου και στη συνέχεια, να πραγματοποιούνται 3 επαναλαμβανόμενες πλύσεις της στερεάς φάσης, οι οποίες περιλάμβαναν την προσθήκη 400μl, Washing Solution, σε κάθε σωληνάριο, ακολουθούμενη από ανακίνηση των σωληναρίων και αναρρόφηση της υγρής φάσης, από το αυτοματοποιημένο όργανο.
- Bender MedSystems human sICAM-1 Instant ELISA kit : Το εργαστηριακό kit της Bender MedSystems, human sICAM-1_ Instant ELISA kit, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων του ICAM-1.
- Πρότυπα διαλύματα (standards) : Χρησιμοποιήθηκαν επτά πρότυπα διαλύματα, Standards, για τη δημιουργία καμπύλης αναφοράς όπως και στην ιντερλευκίνη-4.

A	Standard 1 (100.00 ng/ml)
B	Standard 2 (50.00 ng/ml)
C	Standard 3 (25.00 ng/ml)
D	Standard 4 (12.50 ng/ml)
E	Standard 5 (6.25 ng/ml)
F	Standard 6 (3.13 ng/ml)
G	Standard 7 (1.56 ng/ml)
H	Blank

Πίνακας 4.
Συγκεντρώσεις
πρότυπων διαλυμάτων
ICAM-1 του kit

Οι συγκεντρώσεις του ICAM-1 στα πρότυπα διαλύματα A,B,C,D,E,F,G,H καθώς και του τυφλού διαλύματος φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (4).

- Διαλύματα ελέγχου (controls) : Χρησιμοποιήθηκαν 2 διαλύματα ελέγχου, controls, για τον έλεγχο της βαθμονόμησης του αυτοματοποιημένου οργάνου ELISA READER και τα οποία επίσης, περιλαμβάνονταν στο εργαστηριακό kit. Τα διαλύματα αυτά βρίσκονταν υπό λυοφιλοποιημένη μορφή και απαιτούσαν ανασύσταση. Η ανασύσταση, έγινε με την προσθήκη, με αυτόματη πιπέττα,

200μl αποστειρωμένου εναίσιμου νερού. Ακολούθησε προσεκτική ανακίνηση, μέχρι την πλήρη διάλυση της

στερεάς ουσίας.

- Διάλυμα έκλυσης στερεάς φάσης (Wash Buffer) : (wash buffer concentrate 20x/phosphate-buffered saline with 1% tween 20). Το διάλυμα έκπλυσης, Wash Buffer, το οποίο περιλαμβανόταν στο εργαστηριακό kit και το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την έκπλυση της στερεάς φάσης, από το όργανο έκπλυσης, Diagnostics-pasteur LP₃₅ απαιτούσε αραιώση. Τοποθετήσαμε τα 25ml από το Wash Buffer, που υπήρχε στο εργαστηριακό kit, σε ογκομετρικό σωλήνα και συμπληρώσαμε με αποστειρωμένο νερό, για παρεντερική χρήση, μέχρι τα 500ml και τοποθετήθηκε στο ειδικό δοχείο του οργάνου έκπλυσης. Για την πλήρη ομογενοποίηση του μείγματος, χρησιμοποιήθηκε μαγνητικός αναδευτήρας. Πρέπει να σημειωθεί ότι πριν την εισαγωγή στο μηχάνημα μετρήθηκε το pH του διαλύματος ώστε να είναι κοντά στο 7.4.

- Διάλυμα TMB: Το χρωμογόνο διάλυμα TMB, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία του χρωμογόνου προϊόντος, της στερεάς φάσης, και το οποίο αποτελείται από

Tetramethylbenzidine, υπήρχε στο εργαστηριακό kit και ήταν έτοιμο για χρήση.

- Διάλυμα Stop Solution (1M Phosphoric Acid) : Το Stop Solution υπήρχε μέσα στο kit και ήταν έτοιμο προς χρήση.

11.3 Διαδικασία της μεθόδου προσδιορισμού των συγκεντρώσεων του ICAM-1

1. Τα σωληνάρια με τα δείγματα ορού, κάθε ασθενή, τα οποία προορίζονταν για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων, τέθηκαν εκτός κατάψυξης και αφέθηκαν σε θερμοκρασία

δωματίου, μέχρι την επίτευξη της πλήρους τήξεώς τους. Το εργαστηριακό Bender MedSystems human sICAM-1 Instant ELISA kit, για μικρό χρονικό διάστημα, πριν την έναρξη της διαδικασίας της ανάλυσης, απομακρύνθηκε από το ψυγείο και αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου.

2. Τα σωληνάρια, τοποθετήθηκαν στη συσκευή vortex για χρονικό διάστημα 30 sec, τόσο για την ανάδευση, αλλά και για την πλήρη ομογενοποίηση, των υγροποιημένων δειγμάτων .
3. Καθορίστηκε ο αριθμός των σειρών των σωληναρίων, που απαιτούνταν για την διεξαγωγή της ανάλυσης των διαλυμάτων αναφοράς, καθώς και των δειγμάτων όλων των ασθενών. Όλα τα διαλύματα αναφοράς και ελέγχου, καθώς και τα δείγματα ορού των ασθενών, αναλύθηκαν εις διπλούν, για μεγαλύτερη ακρίβεια..
4. Σε κάθε σωληνάριο προστέθηκαν 140μl, αποστειρωμένου νερού με ρυθμιζόμενη πιπέττα Gilson (δείγματα και πρότυπα).
5. Εντός μικρού χρονικού διαστήματος, τοποθετήθηκαν 10μl, από κάθε πρότυπο διάλυμα καθώς και από κάθε δείγμα ορού, στο αντίστοιχο σωληνάριο.
6. Τα σωληνάρια επώαστηκαν για χρονική περίοδο 2 ωρών, σε θερμοκρασία δωματίου, εντός της ειδικής συσκευής επώασης και στα 100 rpm .
7. Κατά τη διάρκεια του χρονικού διαστήματος της επώασης, ετοιμάστηκε το διάλυμα έκπλυσης Wash Buffer, όπως αναφέρεται παραπάνω.
8. Μόλις ολοκληρώθηκε το στάδιο της επώασης, ακολούθησε το στάδιο της έκπλυσης της στερεάς φάσης, με τη βοήθεια του αυτοματοποιημένου οργάνου Diagnostics-pasteur LP₃₅.. ακολουθώντας τη διαδικασία, που ήδη περιγράφηκε. πιο πάνω.
9. Με ρυθμιζόμενη, πιπέττα, Gilson, εισάγουμε 100μl χρωμογόνου TMB διαλύματος, και τα αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 10 λεπτά, ενώ ταυτόχρονα προσέχουμε να μην εκτίθονται στο φως..
10. Σύμφωνα με τις οδηγίες του kit όταν το πρότυπο A με την μεγαλύτερη συγκέντρωση απέκτησε ένα σκούρο μπλε χρώμα, προσθέσαμε σε όλα τα σωληνάρια από 100μl Stop Solution.
11. Το πλαίσιο με τα σωληνάρια, τοποθετήθηκε στην ειδική θέση του φασματοφωτόμετρου ELISA READER. και με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος, της εταιρίας Robert Maciel Associates, Inc., ELISA^{AID™} Software, καθορίστηκε η μέτρηση της απορρόφησης, στα μήκη κύματος 450nm. Ακολούθησε η

διαδικασία της ανάλυσης, η οποία αρχικά περιλάμβανε τη βαθμονόμηση του οργάνου, με βάση τα διαλύματα αναφοράς, με επακόλουθο τη δημιουργία καμπύλης αναφοράς και στη συνέχεια, τη μέτρηση των απορροφήσεων των διαλυμάτων ελέγχου και των δειγμάτων ορού.

12. Τα αποτελέσματα, δόθηκαν υπό μορφή συγκεντρώσεων ICAM-1, σε μονάδες ng/ml, και τυπώθηκαν από τον ενσωματωμένο στο φασματοφωτόμετρο εκτυπωτή.

Σημείωση: Στο συγκεκριμένο kit παραλείπονται κάποια αναμενόμενα στάδια καθότι στα πηγαδάκια υπάρχουν εξ αρχής όλα τα αντισώματα καθώς και το diluent solution. Η διαδικασία φαίνεται στην εικόνα 10.

περίσσειας του αδέσμευτων συστατικών, μέσω έκπλυσης της στερεάς φάσης και προσθήκη ενός διαλύματος, που αποτελεί υπόστρωμα του ενζύμου (HRP/υπεροξειδάση), έχει σαν επακόλουθο, την αντίδραση με το ένζυμο και τη δημιουργία ενός χρωμογόνου προϊόντος. Σε αυτό το σημείο προστίθεται διάλυμα (οξύ) ώστε να σταματήσει η αντίδραση. Τέλος, η φασματοφωτομετρική μέτρηση, της έντασης της απορρόφησης του χρωμογόνου αυτού προϊόντος, είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση της εκάστοτε προσδιοριζόμενης κυτταροκίνης στο δείγμα.

12.2 Όργανα και αντιδραστήρια

- Φασματοφωτόμετρο ELISA READER: Το αυτοματοποιημένο φωτόμετρο της BioSource, ELISA READER, καθώς και το συμβατό για το όργανο, λογισμικό πρόγραμμα, της εταιρείας, Robert Maciel Associates, Inc., ELISA^{AID}™ Software χρησιμοποιήθηκαν για στις αναλύσεις προσδιορισμού, των συγκεντρώσεων της ιντερλευκίνης - 4, IL-4, στα δείγματα ορού. Η εκτύπωση των αποτελεσμάτων των αναλύσεων του ποσοτικού προσδιορισμού της IL-4, στα δείγματα πλάσματος, έγινε από τον ενσωματωμένο, με το αυτοματοποιημένο φασματοφωτόμετρο, εκτυπωτή.
- Συσκευή VORTEX: Η συσκευή vortex, χρησιμοποιήθηκε για την ανάδευση, αλλά και για την πλήρη ομογενοποίηση, των υγροποιημένων δειγμάτων, πριν από την διεξαγωγή του ποσοτικού προσδιορισμού των συγκεντρώσεων της IL-4.
- Συσκευή επώασης: Χρησιμοποιήθηκε ειδική συσκευή επώασης, για την επώαση των σωληναρίων, τόσο με τα πρότυπα διαλύματα, όσο με τα δείγματα ορού. Η συσκευή επώασης, προκαλούσε οριζόντια ανακίνηση του πλαισίου με τα σωληνάρια, εντός σκοτεινού θαλάμου και η οποία ρυθμίστηκε, σε θερμοκρασία δωματίου και στις 200rpm.
- Diagnostics-pasteur LP₃₅: Το αυτοματοποιημένο όργανο έκπλυσης, Diagnostics-pasteur LP₃₅, χρησιμοποιήθηκε για την έκπλυση της στερεάς φάσης. Η διαδικασία της έκπλυσης, ρυθμίστηκε ώστε να πραγματοποιείται αρχικά απόχυση του περιεχομένου κάθε σωληναρίου και στη συνέχεια, να πραγματοποιούνται 3 επαναλαμβανόμενες πλύσεις της στερεάς φάσης, οι οποίες περιλάμβαναν την προσθήκη 400μl, Washing Solution, σε κάθε σωληνάριο, ακολουθούμενη από ανακίνηση των σωληναρίων και αναρρόφηση της υγρής φάσης, από το αυτοματοποιημένο όργανο.

- Bender MedSystems human IL-4 Instant ELISA kit : Το εργαστηριακό kit της Bender MedSystems, human IL-4 Instant ELISA kit, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων της IL-4, στα δείγματα πλάσματος, είναι ειδικό, για τον in vitro προσδιορισμό της ιντερλευκίνης αυτής, σε δείγματα ορού.
- Πρότυπα διαλύματα (standards) : Χρησιμοποιήθηκαν επτά πρότυπα διαλύματα, Standards, για τη δημιουργία καμπύλης αναφοράς, κατά τη διαδικασία της βαθμονόμησης του αυτοματοποιημένου φασματοφωτομέτρου της BioSource, ELISA READER και τα οποία υπήρχαν στο εργαστηριακό kit και ήταν έτοιμα προς χρήση. Οι συγκεντρώσεις της IL-4 στα πρότυπα διαλύματα A,B,C,D,E,F,G,H καθώς και του τυφλού διαλύματος φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

A	Standard 1 (500.0 pg/ml)
B	Standard 2 (250.0 pg/ml)
C	Standard 3 (125.0 pg/ml)
D	Standard 4 (62.5 pg/ml)
E	Standard 5 (31.3 pg/ml)
F	Standard 6 (15.6 pg/ml)
G	Standard 7 (7.8 pg/ml)
H	Blank

Πίνακας 5.
Συγκεντρώσεις πρότυπων
διαλυμάτων IL-4

- Διάλυμα έκλυσης στερεάς φάσης (Wash Buffer): (*wash buffer concentrate 20x/phosphate-buffered saline with 1% tween 20*). Το διάλυμα έκλυσης, Wash Buffer, το οποίο περιλαμβανόταν στο εργαστηριακό kit και το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την έκλυση της στερεάς φάσης, από το όργανο έκλυσης, Diagnostics-pasteur LP₃₅ απαιτούσε αραιώση. Τοποθετήσαμε τα 25ml από το Wash Buffer, που υπήρχε στο εργαστηριακό kit, σε ογκομετρικό σωλήνα και συμπληρώσαμε με αποστειρωμένο νερό, για παρεντερική χρήση, μέχρι τα 500ml και τοποθετήθηκε στο ειδικό δοχείο του οργάνου έκλυσης. Για την πλήρη ομογενοποίηση του μείγματος, χρησιμοποιήθηκε μαγνητικός αναδευτήρας. Πρέπει να σημειωθεί ότι πριν την εισαγωγή στο μηχάνημα μετρήθηκε το pH του διαλύματος ώστε να είναι κοντά στο 7.4.

- Διάλυμα TMB: Το χρωμογόνο διάλυμα TMB, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία του χρωμογόνου προϊόντος, της στερεάς φάσης, και το οποίο αποτελείται από Tetramethylbenzidine, υπήρχε στο εργαστηριακό kit και ήταν έτοιμο για χρήση.
- Διάλυμα Stop Solution(1M Phosphoric Acid) : Το Stop Solution υπήρχε μέσα στο kit και ήταν έτοιμο προς χρήση. Το οξύ αυτό χρησιμοποιήθηκε στα δείγματα όταν το πρότυπο διάλυμα με την μεγαλύτερη συγκέντρωση απέκτησε ένα βαθύ σκούρο μπλε χρώμα.

2.3 Διαδικασία της μεθόδου προσδιορισμού των συγκεντρώσεων της IL-4

15. Τα σωληνάρια με τα δείγματα αίματος, κάθε ασθενή, τα οποία προορίζονταν για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων της ιντερλευκίνης, IL,-4, τέθηκαν εκτός κατάψυξης και αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου, μέχρι την επίτευξη της πλήρους τήξεώς τους. Το εργαστηριακό Bender MedSystems human IL-4 Instant ELISA kit, για μικρό χρονικό διάστημα, πριν την έναρξη της διαδικασίας της ανάλυσης, απομακρύνθηκε από το ψυγείο και αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου.

16. Τα σωληνάρια, τοποθετήθηκαν στη συσκευή vortex για χρονικό διάστημα 30 sec, τόσο για την ανάδευση, αλλά και για την πλήρη ομογενοποίηση, των υγροποιημένων δειγμάτων .

17. Καθορίστηκε ο αριθμός των σειρών των σωληναρίων, που απαιτούνταν για την διεξαγωγή της ανάλυσης των διαλυμάτων αναφοράς, καθώς και των δειγμάτων όλων των ασθενών. Όλα τα διαλύματα αναφοράς και ελέγχου, καθώς και τα δείγματα πλάσματος των ασθενών, αναλύθηκαν εις διπλούν, για μεγαλύτερη ακρίβεια..

18. Σε κάθε σωληνάριο προστέθηκαν 100μl, αποστειρωμένου νερού με ρυθμιζόμενη πιπέττα Gilson (δείγματα και πρότυπα).

19. Εντός μικρού χρονικού διαστήματος, τοποθετήθηκαν 50μl, από κάθε πρότυπο διάλυμα καθώς και από κάθε δείγμα πλάσματος, στο αντίστοιχο σωληνάριο.

20. Τα σωληνάρια επώαστηκαν για χρονική περίοδο 3 ωρών, σε θερμοκρασία δωματίου, εντός της ειδικής συσκευής επώασης και στα 200 rpm .

21. Κατά τη διάρκεια του χρονικού διαστήματος της επώασης, ετοιμάστηκε το διάλυμα έκπλυσης Wash Buffer, όπως αναφέρεται παραπάνω.

22. Μόλις ολοκληρώθηκε το στάδιο της επώασης, ακολούθησε το στάδιο της έκπλυσης της στερεάς φάσης, με τη βοήθεια του αυτοματοποιημένου οργάνου Diagnostics-pasteur LP₃₅, ακολουθώντας τη διαδικασία, που ήδη περιγράφηκε. πιο πάνω.

23. Με ρυθμιζόμενη, πιπέττα, Gilson, εισάγουμε 100μl χρωμογόνου TMB διαλύματος, και τα αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 10 λεπτά, ενώ ταυτόχρονα προσέχουμε να μην εκτίθονται στο φως..

24. Σύμφωνα με τις οδηγίες του kit όταν το πρότυπο A με την μεγαλύτερη συγκέντρωση απέκτησε ένα σκούρο μπλε χρώμα, προσθέσαμε σε όλα τα σωληνάρια από 100μl Stop Solution.

25. Το πλαίσιο με τα σωληνάρια, τοποθετήθηκε στην ειδική θέση του φασματοφωτόμετρου ELISA READER. και με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος, της εταιρίας Robert Maciel Associates, Inc., ELISA^{AID™} Software, καθορίστηκε η μέτρηση της απορρόφησης, στα μήκη κύματος 450nm. Ακολούθησε η διαδικασία της ανάλυσης, η οποία αρχικά περιλάμβανε τη βαθμονόμηση του οργάνου, με βάση τα διαλύματα αναφοράς, με επακόλουθο τη δημιουργία καμπύλης αναφοράς και στη συνέχεια, τη μέτρηση των απορροφήσεων των διαλυμάτων ελέγχου και των δειγμάτων ορού.

26. Για αποτελέσματα, δόθηκαν υπό μορφή συγκεντρώσεων κυτταροκίνης IL-4, σε μονάδες

pg/ml, και τυπώθηκαν από τον ενσωματωμένο στο φασματοφωτόμετρο. εκτυπωτή.

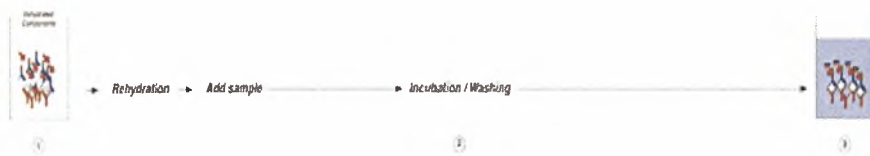
Σημείωση: Στο συγκεκριμένο kit παραλείπονται κάποια αναμενόμενα στάδια καθότι στα πηγαδάκια υπάρχουν εξ αρχής όλα τα αντισώματα καθώς και το diluent solution. Η διαδικασία φαίνεται στην εικόνα 10.

Bender MedSystems human IL-4 Instant ELISA kit

Classical
ELISA
Principle



Instant
ELISA
Principle



Εικόνα 10. Instant Human IL-4 ELISA.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Δ'

ΕΝΟΤΗΤΑ 13^η, 14^η 15^η**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

(Η IL-4 και το ICAM-1 βρέθηκαν στατιστικώς σημαντικά-αυξημένα στους ασθενείς με CIU/-ASST, ενώ η ECP είναι μέσα στα φυσιολογικά όρια).

ECP

(Πίνακας 6)

	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ng/ml	ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ 450nm
1	4,56	1,154
2	6,62	1,552
3	6,65	1,556
4	2,61	0,743
5	19,30	3,597
6	2,98	0,826
7	7,14	1,647
8	5,49	1,338
9	5,14	1,269
10	2,30	0,673
11	5,70	1,377
12	0,03	0,020
13	0,03	0,018
14	0,13	0,087
15	0,03	0,018
16	0,03	0,017
17	3,71	0,981
18	0,26	0,132
19	9,36	2,040
20	0,12	0,081
21	0,03	0,018
22	0,16	0,095
23	4,64	1,170
24	0,63	0,248
25	0,74	0,280
26	0,22	0,120
27	1,39	0,455
28	0,03	0,018
29	0,03	0,018
30	0,69	0,268
31	0,08	0,050
32	0,52	0,215
33	4,18	1,078
34	4,62	1,166
35	0,86	0,316
36	0,03	0,018
37	0,36	0,166
38	0,03	0,018

13. Αποτελέσματα της συγκέντρωσης της ECP.

Η συγκέντρωση της ηωσινοφιλικής κατιονικής πρωτεΐνης (ECP) εκφράζεται σε ng/ml και οι τιμές των ασθενών φαίνονται στον πίνακα (6). Τα φυσιολογικά όρια τιμών σε υγιείς ασθενείς είναι από 2-20 ng/ml σύμφωνα με τις πληροφορίες που δίνει το kit και η διεθνής βιβλιογραφία*. Με την ίδια τεχνική ELISA (MESACUP TEST MBL) μετρήθηκε η ECP σε 54 υγιείς ασθενείς με μέση τιμή 9.7 ng/ml και τυπική απόκλιση 7.3 ng/ml. Η μέγιστη τιμή ήταν 41.0 ng/ml και η ελάχιστη 0.5 ng/ml (πίνακας 7).

Στο διάγραμμα 1α φαίνονται οι τιμές της ECP στα δείγματα καθώς και στο διάγραμμα 2β η μέση τιμή των ασθενών που είναι 2.66 ng/ml και των φυσιολογικών μαρτύρων που είναι 9,7 ng/ml. Πρέπει να σημειωθεί ότι η διαφορά αυτή δεν έχει καμία σημασία καθότι είναι στα φυσιολογικά όρια της πρωτεΐνης και οι δυο τιμές.

ΥΓΙΕΙΣ ΜΑΡΤΥΡΕΣ ECP (ng/ml)

(Πίνακας 8)

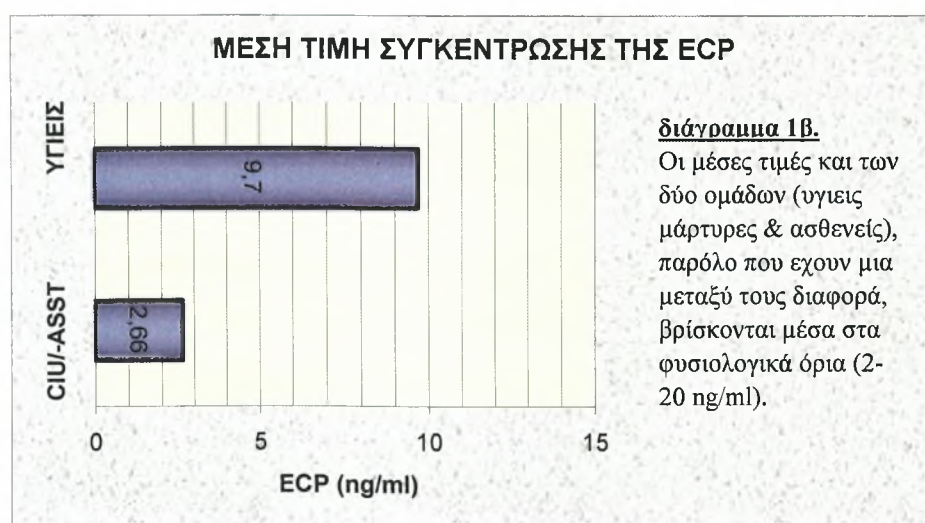
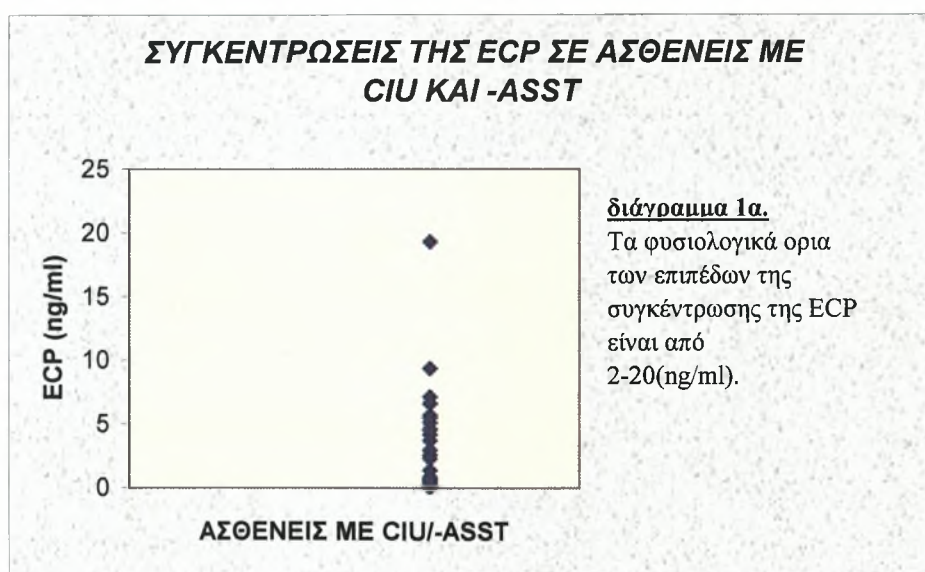
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	9.7 ng/ml
ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ	7.3 ng/ml
ΜΕΓΙΣΤΗ ΤΙΜΗ	41.0 ng/ml
ΕΛΑΧΙΣΤΗ ΤΙΜΗ	0.5 ng/ml

Εφόσον τα αποτελέσματα ήταν μέσα στα φυσιολογικά όρια δεν έγινε έλεγχος στατιστικής σημαντικότητας σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. Το γεγονός ότι η ECP δε βρέθηκε καθόλου αυξημένη στα

δείγματα ασθενών με χρόνια ιδιοπαθή κνίδωση και αρνητικότητα στο test ομολόγου

ορού ASST, δείχνει ότι η ECP δε μπορεί να είναι δείκτης για τη διάγνωση της ασθένειας. Παρόλο που τα αποτελέσματα ήταν φυσιολογικά, η μέτρηση αυτή είχε ένα μεγάλο επιστημονικό όφελος καθότι η ECP θεωρείται η πρώτη ύποπτη διότι έχει βρεθεί αυξημένη, όπως αναφέρθηκε νωρίτερα σε συγγενείς ασθένειες.

Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η ασθένεια αυτή δεν είναι μια απλή αντίδραση έμμεσης υπερευαισθησίας και χρήζει περαιτέρω έρευνας για το ρόλο των ηωσινόφιλων στη συγκεκριμένη νόσο και γενικά για το μηχανισμό της.



14. Αποτελέσματα της συγκέντρωσης της ICAM-1.

ICAM-1 (ng/ml) (Πίνακας 9)		
	CIU (A)	ΥΓΙΕΙΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ (B)
1	480,22	130,570
2	350,85	80,800
3	530,85	100,930
4	470,29	150,990
5	390,66	140,640
6	290,90	220,090
7	100,35	170,920
8	470,50	240,050
9	650,97	210,630
10	510,45	250,830
11	280,40	140,140
12	240,93	50,220
13	440,31	240,760
14	260,30	280,100
15	230,62	110,720
16	590,70	110,630
17	600,69	220,480
18	480,36	250,050
19	270,47	150,070
20	500,81	70,013
21	330,10	150,390
22	140,90	240,120
23		160,780
24		170,420
25		150,140

Η συγκέντρωση του μορίου προσκόλλησης ICAM-1 εκφράζεται σε ng/ml και οι τιμές των ασθενών καθώς και των υγιών μαρτύρων βρίσκονται στον πίνακα 9. Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου είναι 2.17 ng/ml. Τόσο οι ασθενείς όσο και οι υγιείς μάρτυρες μετρήθηκαν με την ίδια μέθοδο και τις ίδιες συνθήκες στο εργαστήριο.

Στο διάγραμμα (2) φαίνονται οι τιμές του ICAM-1 σε ασθενείς με CIU σε σχέση με τα controls.

Τα αποτελέσματα των δύο στηλών του πίνακα 9 ελέγχθηκαν για τη στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς τους με το Mann-Whitney Test. Ο πίνακας 10 δείχνει τα στατιστικά δεδομένα για την κάθε στήλη (ασθενείς - υγιείς). Το p value < 0.0001 δείχνει ότι υπάρχει πολύ

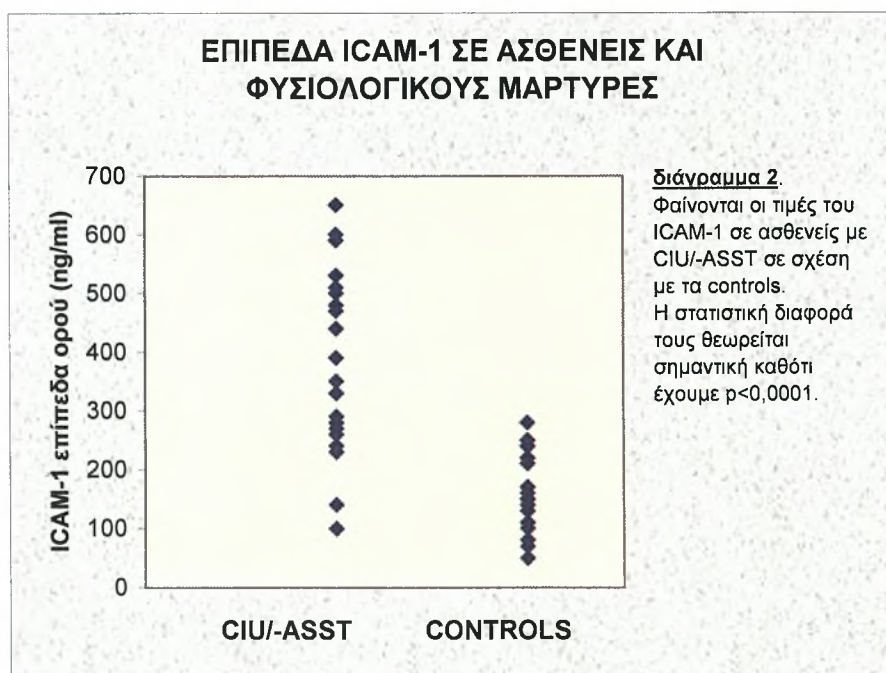
σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ των στηλών A και B.

Τα παραπάνω μας δείχνουν ότι το ICAM-1 μπορεί να είναι ένας διαγνωστικός δείκτης της συγκεκριμένης ασθένειας και ίσως να χρησιμοποιηθεί στο μέλλον σε εργαστήριο ρουτίνας γιατί από ότι φαίνεται συμμετέχει στο μηχανισμό της CIU. Φυσικά χρήζει περαιτέρω έρευνας.

✓ Πίνακες και διαγράμματα.

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ (ICAM-1 σε ng/ml)		
Mann-Whitney Test.		
(Πίνακας 10)		
	CIU(A)	ΥΓΙΕΙΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ (B)
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	391,48	167,66
ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ	151,62	63,083
ΜΕΓΙΣΤΗ ΤΙΜΗ	650,97	280,10
ΕΛΑΧΙΣΤΗ ΤΙΜΗ	100,35	50,220
ΔΙΑΜΕΣΟΣ	415,49	150,99
Διάστημα εμπιστοσύνης = 95% Βαθμοί ελευθερίας = 27 $t = 6.450$ $p \text{ value} < 0.0001$ σημαντική διαφορά		

Πίνακας 10. Τα αποτελέσματα των δύο στηλών του πίνακα 9 ελέγχθηκαν για τη στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς τους με το Mann-Whitney Test.



15. Αποτελέσματα της συγκέντρωσης της IL-4.

IL-4 (pg/ml) (Πίνακας 11)		
	CIU (A)	ΥΓΙΕΙΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ (B)
1	1,01	0,66
2	1,07	0,66
3	1,08	0,66
4	1,03	0,66
5	1,11	0,66
6	1,05	0,66
7	1,12	0,66
8	1,09	0,66
9	1,04	0,66
10	1,10	0,66
11	1,02	0,66
12	1,05	0,66
13	1,04	0,66
14	1,02	0,66
15	1,03	0,66
16	1,08	0,66
17	1,01	0,66
18	1,08	0,66
19	1,05	0,66
20	1,04	0,66
21	1,06	0,66
22	1,07	0,66

Η συγκέντρωση της ιντερλευκίνης -4 (IL-4) εκφράζεται σε pg/ml και οι τιμές των ασθενών φαίνονται στον πίνακα 11. Οι τιμές των υγιών μαρτύρων είναι όλες 0.66 pg/ml καθότι το όριο ανίχνευσης του kit είναι 0.66 pg/ml ενώ οι φυσιολογικές τιμές σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία είναι 0.20 pg/ml*.

Στο διάγραμμα 3 φαίνονται οι τιμές των υγιών μαρτύρων σε σχέση με τους ασθενείς με CIU.

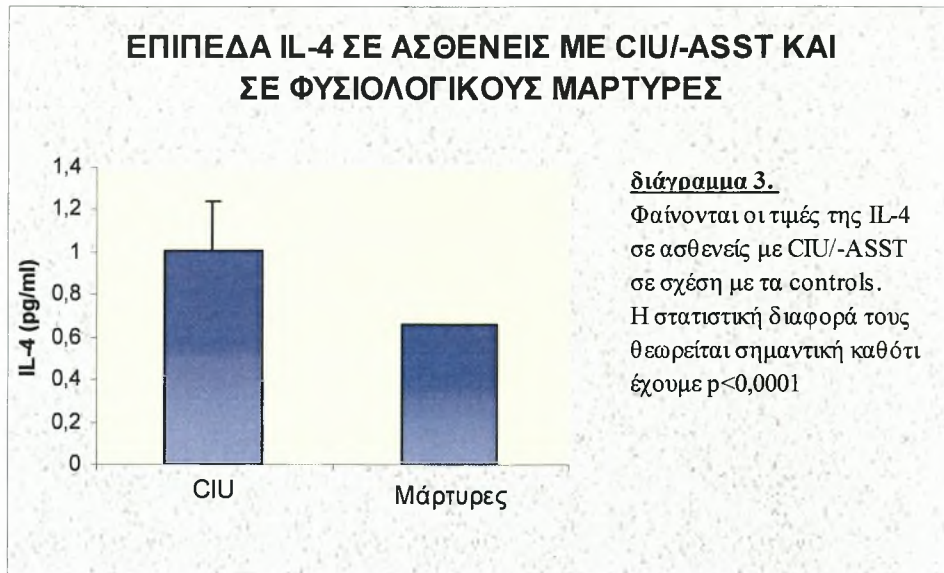
Τα αποτελέσματα των δύο στηλών (ασθενείς - υγιείς) του πίνακα 12 ελέγχθηκαν για τη στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς τους με το Paired t test. Τα στοιχεία αυτά φαίνονται στον πίνακα 13 και το p value ήταν μεγαλύτερο του 0.0001 το οποίο δείχνει ότι υπάρχει πολύ σημαντική στατιστική διαφορά.

Τα παραπάνω μας δείχνουν ότι η IL-4 μπορεί να είναι ένας διαγνωστικός δείκτης της συγκεκριμένης ασθένειας και ίσως να χρησιμοποιηθεί στο μέλλον σε εργαστήριο

ρουτίνας γιατί από ότι φαίνεται συμμετέχει στο μηχανισμό της CIU. Φυσικά χρήζει περαιτέρω έρευνας.

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ (IL-4 pg/ml) (Πίνακας 12)		
	CIU(A)	ΥΓΙΕΙΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ (B)
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	1.057	0.66
ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ	0.03183	0.66
ΜΕΓΙΣΤΗ ΤΙΜΗ	1.120	0.66
ΕΛΑΧΙΣΤΗ ΤΙΜΗ	1.010	0.66
ΔΙΑΜΕΣΟΣ	1.050	0.66
Διάστημα εμπιστοσύνης= 95% Βαθμοί ελευθερίας =21 t=58.473 p value<0.0001 <i>σημαντική διαφορά</i>		

Πίνακας 12. Τα αποτελέσματα των δύο στηλών του πίνακα 9 ελέγχθηκαν για τη στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς τους με το Paired t test.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ε΄

ΕΝΟΤΗΤΑ 16^η

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

16. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το 1772, πρώτος ο Heberden περιέγραφε την κνίδωση, ως «μικρές ανυψώσεις του δέρματος, με τη μορφή ερεθιστικού εξανθήματος, που εμφανίζονται στο δέρμα αθέλητα και απρόβλεπτα, παραμένοντας στο ίδιο σημείο για λιγότερο από 24 ώρες, συνοδευόμενες από ένα μη ανεκτικό και εναγωνιώδες αίσθημα κνησμού». Μέχρι και σήμερα, δεν υπάρχει δυνατότητα να προστεθούν πολλά στην αρχική κλινική περιγραφή, της συμπτωματολογίας της νόσου. Αντίθετα, η παθοφυσιολογία της κνίδωσης, αποτέλεσε και συνεχίζει να αποτελεί, ένα τεράστιο έναυσμα για έρευνα. Η κνιδωτική απάντηση, παρόλο που μπορεί να θεωρηθεί ως ένας φυσιολογικός μηχανισμός άμυνας του ανθρώπινου οργανισμού, έναντι μιας ανεπιθύμητης εισβολής, δεν παύει να αποτελεί και μια αλλεργική απάντηση, προς ένα αλλεργιογόνο ερέθισμα. Παρόλα αυτά, ενώ σε μερικούς ασθενείς οποιαδήποτε από τις πολλές αιτίες, μπορεί να ευθύνεται για την ανάπτυξη της κνίδωσης, στην πλειονότητα των ασθενών, δεν υπάρχει αναγνωρίσιμη υποκείμενη αιτία της νόσου. Σήμερα, είναι δεδομένο ότι τα λεμφοκύτταρα, καθώς και τα υπόλοιπα λευκοκύτταρα, εμπλέκονται στην παθογένεση της κνίδωσης, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η κνίδωση, πέρα από το ότι μπορεί να χαρακτηριστεί ως ανοσιακή απάντηση, παρουσιάζει και στοιχεία φλεγμονής, άρα μπορεί να χαρακτηριστεί και ως φλεγμονώδης απάντηση.¹

Στην παρούσα εργασία, επιχειρείται μια προσπάθεια προσέγγισης της σχέσης συγκεκριμένων παραγόντων όπως η ηωσινοφιλική κατιονική πρωτεΐνη (ECP), το μόριο προσκόλλησης ICAM-1 και η ιντερλευκίνη 4 (IL-4), με τη διάγνωση της χρόνιας ιδιοπαθούς κνίδωσης (CIU) σε ασθενείς με θετικό test ομολόγου ορού. Οι συγκεντρώσεις των παραγόντων αυτών μετριοούνται στον όρο του αίματος με σκοπό να χρησιμοποιηθούν ανάλογα με τα αποτελέσματά τους σε ένα βιοχημικό εργαστήριο σε κάποια διαγνωστική μέθοδο ρουτίνας για τη διάγνωση της παραπάνω ασθένειας.

Οι ανωτέρω παράγοντες, όπως έχει επισημανθεί και στο σκοπό της εργασίας (κεφάλαιο Β), επιλέχθηκαν μεταξύ πολλών άλλων. Πιο συγκεκριμένα, οι παραπάνω παράγοντες είχαν εντοπισθεί με ανοσοϊστοχημεία σε βιοψίες βλάβης δέρματος ασθενών με CIU. Οι προγενέστερες αυτές εργασίες που δήλωναν τα παραπάνω αποτελέσματα ήταν το έναυσμα για αυτή την πτυχιακή προσπάθεια.

Έχει αναφερθεί ότι η συγκέντρωση των ηωσινόφιλων σε βλάβη κνιδωτικού εξανθήματος σε ασθενείς με CIU ακολουθείται από έκκριση της ηωσινοφιλικής κατιονικής πρωτεΐνης (ECP) και πιο συγκεκριμένα της ισομορφής EG₂.³⁷

Αντίθετα όμως με την παραπάνω μέθοδο (ανοσοϊστοχημεία) με την μέθοδο ELISA στον ορό η ECP δεν είναι αυξημένη.

Από τα αποτελέσματα του διαγράμματος 1 φαίνεται ότι η συγκέντρωση της ECP στον ορό των ασθενών με CIU, καθώς και των υγιών μαρτύρων ήταν μέσα στα φυσιολογικά όρια (2-20 ng/ml) που δίνονται από τη βιβλιογραφία και από το kit.

Τα ανωτέρα αποτελέσματα που αφορούν την συγκέντρωση της ECP στον ορό αίματος είναι σε αντιστοιχία με εννέα άλλων ερευνητών που μελέτησαν την ανοσοϊστοχημική εντόπιση της ECP. Πιο συγκεκριμένα βρέθηκε ότι σε βιοψία δέρματος που αφορά υγιής μάρτυρες, ασθενείς με CIU, καθώς και επίδραση ASSI στους τελευταίους, η εντόπιση της ισομορφής EG₂ της ECP, δεν διαφέρει στατιστικά σημαντικά.³⁷

Επιπλέον, όσον αφορά στην ECP, το γεγονός ότι δεν βρέθηκε αυξημένη αποτέλεσε μία έκπληξη καθότι ήταν η πρώτη ‘‘ύποπτος’’ για τη νόσο αυτή, εφόσον θεωρείται μία αλλεργική απάντηση. Παρόλα αυτά, ο αποκλεισμός της θεωρείται διαφωτιστικός για την παραπέρα διερεύνηση της νόσου αυτής.

Άλλος παράγοντας που διαδραματίζει ρόλο στην προσκόλληση των λευκοκυττάρων στον ιστό του δέρματος είναι τα λεγόμενα μόρια προσκόλλησης. (CAM_s). Οι CAM_s, όπως ήδη έχει αναφερθεί, είναι επιφανειακές κυτταρικές πρωτεΐνες που ενεργούν σαν μεσολαβητές στην αλληλεπίδραση κυττάρου-κυττάρου. Ένα από αυτά είναι το ICAM-1 για το οποίο σε προηγούμενες μελέτες αναφέρεται αυξημένη εντόπιση σε βιοψία ασθενών με CIU (Caproni 2003 και 2005, Hans 1998).³⁷ Με την μεθοδολογία της ανοσοϊστοχημικής εντόπισης σε βιοψία δέρματος του ICAM-1 δεν προκύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ασθενών με CIU και υγιών μαρτύρων.

Από τα αποτελέσματα του διαγράμματος 2, όμως, φαίνεται μία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των συγκεντρώσεων ορού του ICAM-1 των ασθενών με CIU σε σχέση με αυτή των υγιών μαρτύρων, κάτι που θα μπορούσε να αποτελέσει έναυσμα επόμενων εργασιών για την σχέση του ICAM-1 με αλλεργικές νόσους.

Τέλος η IL₄ έχει αναφερθεί ότι σχετίζεται με αποκοκιοποίηση των μαστοκυττάρων). Σε βιοψία δέρματος υγιών μαρτύρων η IL-4 δεν εντοπίζεται ανοσοϊστοχημικά σε σχέση με βιοψία δέρματος ασθενών με CIU.³⁷

Στην παρούσα εργασία η συγκέντρωση της IL-4 σε ορό ασθενών με CIU βρέθηκε αυξημένη σε σχέση με τα επίπεδα συγκέντρωσης των υγιών μαρτύρων .

Η προσπάθεια σύγκρισης χρησιμοποιώντας τις συγκεντρώσεις των αποτελεσμάτων μας έδειξε μία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ υγιών μαρτύρων και CIU (βλέπε αποτελέσματα). Η παραπάνω διαφορά επιβεβαιώνεται και από άλλους ερευνητές οι οποίοι χρησιμοποίησαν ELISA με μεγαλύτερη ευαισθησία και βρήκαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ συγκέντρωσης ορού και IL-4 υγιών μαρτύρων 0.20 pg/ml και ασθενών με χρόνια κνίδωση 1,03 pg/ml.⁴⁰

Η μεγαλύτερη συγκέντρωση της IL-4 σε ορό ασθενών με CIU συμφωνεί και με τις αναφορές που υποστηρίζουν ότι η έκκριση της IL-4 από τα CD₄₊ ασθενών με CIU είναι στατιστικά σημαντικά μικρότερη από αυτή των υγιών μαρτύρων, πιθανόν λόγω της προηγούμενης απελευθέρωσης από κάποιο άγνωστο παράγοντα που σχετίζεται με τη νόσο.⁴²

Μέχρι σήμερα, παρόλο που τα T λεμφοκύτταρα, θεωρούνταν σημαντικά στην ανοσολογική ρύθμιση των φάσεων ευαισθητοποίησης, των κνιδωτικών αντιδράσεων, της IgE μεσολαβούμενης υπερευαισθησίας, τύπου I, ο ενεργός ρόλος της κατηγορίας των κυττάρων αυτών, στην παθοφυσιολογία της κνίδωσης, ήταν έμμεσα παραδεκτός, από την αύξηση των ενεργοποιημένων T βοηθητικών κυττάρων, στις περιοχές των κνιδωτικών βλαβών.³⁵ Από την παρούσα, όμως, μελέτη και από το συμπέρασμα που εξάγεται από αυτή, για την εμπλοκή της IL-4 στην παθογένεση της κνίδωσης, δεδομένου ότι ανήκει στο φάσμα των κυτταροκινών, των οποίων η σύνθεση, αλλά και η έκκριση, επάγεται από την υποομάδα Th2, των CD₄₊ T βοηθητικών λεμφοκυττάρων, εξάγεται ένα καθοριστικής σημασίας συμπέρασμα, το οποίο διασαφηνίζει το ρόλο των T λεμφοκυττάρων στην παθογένεση της κνίδωσης. Καθίσταται, λοιπόν, σαφές ότι τα T βοηθητικά λεμφοκύτταρα, και συγκεκριμένα η υποομάδα Th2, μέσω της επαγωγής της σύνθεσης και κατ' επέκταση της έκκρισης της IL-4, προάγει την άμεση αλλεργική απάντηση και την παραγωγή αντισωμάτων από τα B λεμφοκύτταρα, ρυθμίζοντας τη σύνθεση της ανοσοσφαιρίνης IgE από τα κύτταρα αυτά, αλλά και την εμπλοκή άλλων φλεγμονωδών μεσολαβητών και κυττάρων, όπως για παράδειγμα, την κατηγορία των ηωσινοφίλων.

Σε αυτό το σημείο, όμως, και σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μέτρησης της ηωσινοφιλικής κατιονικής πρωτεΐνης (βλέπε αποτελέσματα) βλέπουμε ότι δεν πρόκειται για μία κλασσική αντίδρασης υπερευαισθησίας τύπου I και προφανώς εκεί έγκειται το πρόβλημα για την ολική κατανόηση της παθογένειας της νόσου.

Τέλος πρέπει να επισημάνουμε ότι κανένας από τους παραπάνω παράγοντες δεν μπορεί να θεωρηθεί κατάλληλος για να χρησιμοποιηθεί από μόνος του ως

διαγνωστική μέθοδος. Για τη σωστή διάγνωση θα πρέπει να συσχετισθούν περισσότεροι από ένας παράγοντες.

Συμπερασματικά μπορούμε να συνοψίσουμε ότι για την IL₄ και το ICAM-1 υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ασθενών με CIU και υγιών μαρτύρων. Για να χρησιμοποιηθούν οι συγκεκριμένοι παράγοντες για διαγνωστική μέθοδο της CIU, πρέπει να εξετασθούν οι σχέσεις αυτών με άλλα νοσήματα στα οποία οι συγκεντρώσεις θα ήταν αυξημένες και σύμφωνα με το ιατρικό ιστορικό να προκύψει μία πιο εμπειριστατωμένη διάγνωση.

Εν κατακλείδι, και μετά το πέρας της εκπόνησης αυτής της εργασίας, αξίζει να αναφερθεί ότι η χρόνια κνίδωση είναι μια αρκετά διαδεδομένη αρρώστια και αν και δε συνδέεται με θανατηφόρα αποτελέσματα, δε μπορεί να παραληφθεί από το χώρο της έρευνας. Ο διαχωρισμός της σε υπότυπους, διαλευκάνει το πεδίο για μια πιο ολοκληρωμένη και έγκυρη έρευνα. Ευελπιστούμε αυτή η εργασία να συμβάλλει στην κατανόηση της νόσου αυτής, και ελπίζουμε να γίνει έναυσμα για άλλες παρόμοιες εργασίες.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Beltrani VS. Urticaria and angioedema. *Dermatologic Clinic* 1996; 14(1): 171 -198
2. Champion RH, Roberts SOB, Carpenter RG. Urticaria and angioedema: A review of 554 patients. *Br J Dermatol* 1969; 81: 588 - 597.
3. Αλλεργική ρινίτιδα στα παιδιά, Ε.Μιχαηλίδου 2002
4. Phanwphak P, Schocket AL, Arroyave CM. Skin histamine in patients with urticaria. *J Allergy Clin Immun* 1980; 65: 371 - 375
5. Kalpan AP, Horakova Z, Katz SI. Assessment of tissue fluid histamine levels in patients with urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 1978; 61: 350 - 354.
6. Ανταγωνιστές λευκοτριενίων, μια νέα κατηγορία αντιασθματικών φαρμάκων
Μ. Γκάγκα, Π. Λάτση
Πνευμονολογική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών Ν.Ν.Θ.Α. "Σωτηρία"
7. Lawlor F, Barr R, Kobza - Black A, Cronwell O, Isaacs J, Greaves MW.
Avachidonic acid transformation in not stimulated in delayed pressure urticaria.
Brit J Dem 1989; 121: 317 - 321.
8. Sibbald RG, Kobza - Black A. Aquagenic urticaria: Evidence of cholinergic and histaminergic basis. *Br J Dermatol* 1981; 105: 297 - 302.
9. Cappugi P, Lotti T, Tsampau D. Capsaicin treatment of different dermatological affections with itching. *Skin Pharmol* 1989; 4: 230.
10. Schwartz LB. Mast Cells: Function and contents. *Curr Opinion Immunol* 1994; 6: 91 - 97.

11. Gratlan CEH, Hamon CGB, Coman MA, I timing RJ. Preliminary identification of low molecular weight serological mediator in chronic idiopathic urticaria. *Brit J Derm* 1988; 119: 179- 183.
12. ΚΝΙΔΩΣΗ ΑΓΓΕΙΟΟΙΔΗΜΑ, Δημήτριος Παπαϊωάννου – Αλλεργιολόγος, *ΕΕΑΑΚΑ* 2006.
13. Greaves MW. Current concepts: Chronic urticaria. *New Engl J Med* 1995; 332 (26): 1767-1771.
14. Natbony SF, Philips ME, Elias JM, Godfrey HP, Kaplan AP. Histologic studies of chronic idiopathic urticaria. *J Allergy Clin Immun* 1983; 71: 177 - 183.
15. Lewis - Jones MS, Barnes RMR, Mecfarlane AW, Curlev RK, Johnstone FM, Finn R. Frequency and isotope distribution of serum antibodies reactive with dietary proteins in adults with chronic urticaria. *Clin & Exp Dem* 1987; 12: 419 423.
16. Kaplan AP. Urticaria: The relationship of duration of lesions to pathogenesis. *Allergy Proc* 1990; 11: 15- 18.
17. Αυτοαντισώματα στη χρόνια κνίδωση. Γαλαπιάς Δ. Ιωάννης , www.iatronet.gr 5/04/2006
18. Tae-Yoon Kim, Hong-Jin Park, Chung-Won Kim. Eosinophil cationic protein level and its correlation with eosinophil number or IgE level of peripheral blood in patients with various skin disorders. *Journal of dermatological science* 1997; 15: 89-94
19. http://emed.med.uoa.gr/application/syllabus_I/aimopiisi/aima/leukokitara/kokiokitara/iosinofila.htm
20. MBL MESACUP ECP TEST. Summary and explanation www.mbl.co.jp
21. Β. Παπαλιμναίου, Κ.Χαραλαμπίδουλος. Μόρια προσκόλλησης και καρκίνος του πνεύμονα. *Πνευμων* 2001; 14 (2): 109-117

22. <http://wikimediafoundation.org/celladhesionmolecule>
23. www.bendermedsystem.com, human sICAM-1 Instant ELISA kit, 2 summary.
24. O' Garra A. Interleukins and the immune system 1. *Lancet* 1989; 1: 943-944.
25. Balkwill RF, Burke F. The cytokine network. *Immunol Today* 1989; 10: 299-304.
26. Cho BS, Lee CE, Pyun KH. Studies on the role of interleukin - 4 and Fc epsilon RII in the pathogenesis of minimal change nephritic syndrome. *J Korean Med Sci* 1992; 7(4): 343-348
27. Corry DB, Kheradmand F. Induction and regulation of the IgE response. *Nature* 1999; 25 (402 - 6760 Suppl): B18 - B23.
28. Becherel PA, Chosidow O, Le Goff L, Frances C, Derbe P, Mossalayi VD, Arock M. Inducible nitric oxide synthase and proinflammatory cytokine expression by human keratinocytes during acute urticaria. *Mol Med* 1997; 3(10): 686 - 694.
29. Zahedi K, Prada AE, Davis AE. Structure and regulation of the CI Inhibitor gene. *Benring Inst Mitt* 1993; 93: 115 - 119.
30. Matsumoto T, Miike T, Yamaguchi K. Serum levels of soluble IL 2 receptor, IL - 4 and IgE - binding factors in childhood allergic disease. *Clin Exp Immunol* 1991; 85: 288-292.
31. Kanerva L, Hyry H, Jolanki R, Hytonen M, Estlander T Delayed and immediate allergy caused by methylhexahydrophthalic anhydride. *Contact Dermatitis* 1997; 36(1): 34 - 38.

32. Reekers R, Beyer K, Niggemann B, Wahn U, Freihorst J, Kapp A, Werfel T. The role of circulating food antigen - specific lymphocytes in food allergic children with atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 1996; 135(6): 935 - 941.
33. Furue M, Koga T, Yamashita N. Soluble E - selectin and eosinophil cationic protein are distinct serum markers that differentially represent clinical features of atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 1999; 140: 67 - 72.
34. Nicholson AG, Li D, Pastorino D, Goldstraw P, Jeffery PK. Full thickness eosinophilia in oesophageal leiomyomatosis and idiopathic eosinophilic oesophagitis. A common allergic inflammatory profile?. *J Pathol* 1997; 183(2): 233 - 236.
35. Rosenstreich DL. Chronic urticaria, activated T cells and mast cell releasability. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 78: 1099-1102.
36. Hatano Y, Katagiri K, Takayasu S. Heterogeneity in expression of cytokine mRNA in freshly isolated peripheral blood eosinophils of patients with cutaneous - disease - associated eosinophilia. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 120 (Suppl 1):86-90.
37. Caproni M, Giomi B, Volpi W, Melani L, Schincaglia E, Macchia D, Manfredi M, D'Agata A, Fabbri P. Chronic idiopathic urticaria: infiltrating cells and related cytokines in autologous serum-induced wheals. *Clin Immunol*. 2005 Mar;114(3):284-92.
38. Kondo N, Shinoda S, Fukutomi O, Agata H, Terada T, Shikano H, Montano AM, Sakaguchi H, Watanabe M, Komiyama K, Yokoyama Y, Morimoto N. Eosinophils are neither migrated nor activated in the skin lesions of atopic dermatitis in infants. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 2000 Jan-Feb;10(1):11-3.
39. Kapp A. The role of eosinophilic granulocytes for the pathogenesis of atopic dermatitis /neurodermatitis. Eosinophilic products as markers of disease activity] *Hautarzt*. 1993 Jul;44(7):432-6. Review. German.

40. Ferrer M, Luquin E, Sanchez-Ibarrola A, Moreno C, Sanz ML, Kaplan AP. Secretion of cytokines, histamine and leukotrienes in chronic urticaria.
Int Arch Allergy Immunol. 2002 Nov;129(3):254-60.
41. Juhlin L, Venge P. Eosinophilic cationic protein (ECP) in skin disorders.
Acta Derm Venereol. 1991;71(6):495-501.
42. Confino-Cohen R, Goldberg A, Aharoni D, Naiman L, Buchs A, Weiss M, Weissgarten J, Rapoport MJ. Low stimulated IL-4 secretion in PBMC from patients with chronic idiopathic urticaria.
Cytokine. 2004 Jul 21-Aug 7;27(2-3):74-80.
43. F. Wantke, C. M. Demmer, M. Götz, R. Jarisch (1994)
Changes in serum ECP levels after storage at room temperature
Allergy 49 (6), 483–484.

