



**Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας &
Τμήμα Ιατρικής, ΣΕΥ, ΠΘ**

Διπλωματική εργασία

**Θέμα: «Μελέτη της ανοσοτροποποιητικής
δράσης της αλοΐνης σε ασθενείς με αυτοάνοσα
νοσήματα»**

Μόλτσα Μαριάννα Αποστολία του Αντωνίου

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Μαμούρης Ζήσης, Καθηγητής Γενετικής Ζωϊκών Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, ΠΘ, ΣΕΥ
- Μπόγδανος Δημήτριος, Καθηγητής Παθολογίας και Αυτοάνοσων Νοσημάτων, Τμήμα Ιατρικής, ΠΘ, ΣΕΥ
- Ζαφειρίου Ευτέρπη, Επίκουρος Καθηγήτρια Δερματολογίας, Τμήμα Ιατρικής, ΠΘ, ΣΕΥ

Λάρισα, Φεβρουάριος 2021



University of Thessaly
School of Health Science
Faculty of Biochemistry and Biotechnology &
Faculty of Medicine, SHS, UTH

Thesis

**Theme: “Study of immunomodulatory effect
of aloin in patients with autoimmune
diseases”**

Moltsa Marianna Apostolia

Tripartite committee:

- Mamuris Zisis, Professor of Animal Population Genetics
- Bogdanos Dimitrios, Professor of Medicine and Autoimmune Disease
- Zafeiriou Efterpi, Assistant Professor of Dermatology

Larisa, February 2021

Περίληψη

ΣΚΟΠΟΣ: Η μελέτη της *in vitro* δράσης της αλοΐνης στη παραγωγή της IFN- γ σε λεμφοκυτταρικούς υποπληθυσμούς περιφερικού αίματος.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ: Η αλοΐνη είναι μια πικρή και κίτρινη ουσία που αποτελεί ένα γλυκοσίδιο της ανθρακινόνης και έχει μοριακή μάζα 418,39 g/mol. Μπορεί να βρεθεί σε πολλά είδη του φυτού της *Aloe vera*, αποτελεί κύριο συστατικό εμπορικά διαθέσιμων σκευασμάτων αλόης (χυμών και gel) και χαρακτηρίζεται από αντι-ιικές, αντιβακτηριακές και ανοσοτροποιοτικές ιδιότητες. Η ακριβής ωστόσο επίδραση της *in vitro* χορήγησης αλοΐνης στην ανοσιακή απόκριση και λειτουργικότητα περιφερικών κυττάρων αίματος από υγιείς μάρτυρες και ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα, δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί .

ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ: Διερευνήθηκε ο *in vitro* ρόλος της κεκαθαρμένης αλοΐνης (Cayman Chemical, καθαρότητα $\geq 95\%$) αλλά και εμπορικά διαθέσιμων χυμών αλόης σε κύτταρα περιφερικού αίματος που απομονώθηκαν από 13 υγιείς μάρτυρες (HCs) και 7 ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα (2 με ψωρίαση, 2 με ψωριασική αρθρίτιδα (PsA), 2 με ANCA σχετιζόμενη αγγειίτιδα και 1 με υποτροπιάζουσα/διαλείπουσα πολλαπλή σκλήρυνση). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία ή απουσία ενός εύρους τελικών συγκεντρώσεων αλοΐνης (1, 10, 50, 100, 200, 300 $\mu\text{g} / \text{ml}$) ή πιτλοποιημένων αραιώσεων χυμών αλόης που χορηγήθηκαν για 30 λεπτά και 24 ώρες πριν από διέγερση με συνδυασμό PMA / ιονομυκίνης (PI) για 5 ώρες. Τα υποσύνολα λεμφοκυττάρων ταυτοποιήθηκαν φαινοτυπικά με κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά αντισώματα συζευγμένα με φθοριοχρώματα έναντι των επιφανειακών επιτόπων CD56, CD3, CD4 και CD8. Η ενδοκυτταρική έκφραση της προ-φλεγμονώδους κυτοκίνης Ιντερφερόνης- γ (IFN- γ) εξετάστηκε επίσης χρησιμοποιώντας εμπορικά διαθέσιμα πρωτόκολλα διαπερατότητας κυττάρων.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ: Η *in vitro* χορήγηση αλοΐνης πριν από επαγωγή με PI οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση της παραγωγής IFN- γ από τους T λεμφοκυτταρικούς υποπληθυσμούς υγιών μαρτύρων και ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα, σε σχέση με την ενεργοποίηση με PI μόνο. Ειδικότερα το ποσοστό της επαγόμενης από την αλοΐνη IFN- γ αυξάνεται στα CD4+ T κύτταρα στους υγιείς μάρτυρες κατά 30,31% για την συγκέντρωση των 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p \text{ value} < 0,05$) και 34,03% για τα 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αλοΐνης ($p \text{ value} < 0,005$), ενώ για τον πληθυσμό των CD8(+) κυττάρων 29,88% ($p \text{ value} < 0,0005$) και 33,78% ($p \text{ value} < 0,0005$) αντίστοιχα. Σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα η αύξηση του ποσοστού της IFN- γ από τον υποπληθυσμό των CD4(+) T-κυττάρων ήταν 17,84% για την συγκέντρωση των 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p \text{ value} < 0,05$) και 18,35% για τα 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αλοΐνης ($p \text{ value} > 0,05$) ενώ για τον πληθυσμό των CD8(+) κυττάρων 22,06% ($p \text{ value} < 0,005$) και 20,37% ($p \text{ value} > 0,05$) αντίστοιχα. Σε αντίθεση η παραγόμενη IFN- γ από τα NK και NK-T κύτταρα δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική μεταβολή παρουσία αλοΐνης σε καμία από τις ομάδες μελέτης.

Η *in vitro* χορήγηση πιτλοποιημένων αραιώσεων εμπορικών σκευασμάτων (χυμών) αλόης πριν από επαγωγή με PI οδήγησε σε στατιστικά σημαντική μείωση της παραγωγής IFN- γ . Πιο συγκεκριμένα για τον χυμό *Aloe juice A* στη συγκέντρωση 1:50 η μείωση του ποσοστού της IFN- γ ήταν 24,34% ($p \text{ value} > 0,05$) και για τη συγκέντρωση 1:5 ήταν 95,16% ($p \text{ value} < 0,05$) στα CD4(+) T- κύτταρα. Αντίστοιχα

στα CD8(+) T- κύτταρα στη συγκέντρωση 1:50 αυτού του χυμού η μείωση του ποσοστού της παραγόμενης IFN-γ σε σχέση με την ενεργοποίηση μόνο με PMA και ιονομυκίνη ήταν 8,81% ($p \text{ value} > 0,05$) και για τη συγκέντρωση 1:5 ήταν 97,25% ($p \text{ value} < 0,05$).

Για τον χυμό Aloe juice B στα CD4(+) T κύτταρα η μείωση του ποσοστού της IFN-γ για τη συγκέντρωση 1:50 ήταν 18,66% ($p \text{ value} > 0,05$) και για την 1:5 συγκέντρωση 96,05% ($p \text{ value} < 0,05$). Στα CD8(+) T κύτταρα η μείωση του ποσοστού της παραγόμενης IFN-γ στη συγκέντρωση 1:50 ήταν 10,60% ($p \text{ value} > 0,05$) και αντίστοιχα για τη συγκέντρωση 1:5 η μείωση ανέρχονταν στο ποσοστό του 96,45% ($p \text{ value} < 0,05$).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ: Παρουσία κεκαθαυμένης αλοΐνης παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση στην *in vitro* παραγωγή της IFN-γ από περιφερειακά κύτταρα του αίματος της επίκτητης αλλά όχι της έμφυτης ανοσίας στους υγιείς και στους ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα. Αντίθετα παρουσία τιτλοποιημένων αραιώσεων εμπορικά διαθέσιμων σκευασμάτων αλόης παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική ελάττωση της παραγωγής IFN-γ. Αυτά τα ευρήματα αναδεικνύουν την διαφορετική ανοσοτροποποιητική δράση της καθαρής αλοΐνης σε σχέση με τα εμπορικά διαθέσιμα σκευάσματα και υποδηλώνουν ότι προϊόντα πλούσια σε περιεκτικότητα αλοΐνης πιθανώς να μην ενδείκνυνται ως φυσικοί αντιφλεγμονώδεις παράγοντες.

Abstract

AIM: The study of the in vitro effect of aloin on IFN- γ production in peripheral blood lymphocyte subpopulations.

INTRODUCTION: Aloin is a bitter and yellow substance that is a glycoside of anthraquinone and has a molecular mass of 418.39 g / mol. It can be found in many species of the Aloe vera plant, is a major ingredient in commercially available aloe vera preparations (juices and gels) and is characterized by anti-viral, antibacterial and immunomodulatory properties. However, the exact effect of in vitro administration of aloin on the immune response and peripheral blood cell function of healthy controls and patients with autoimmune diseases has not been fully elucidated.

MATERIAS-METHODS: The in vitro role of purified aloe (Cayman Chemical, purity $\geq 95\%$) and commercially available aloe juices was investigated in peripheral blood cells isolated from 13 healthy controls (HCs) and 7 patients with autoimmune diseases (2 with psoriasis (PSO), 2 with psoriatic arthritis (PsA), 2 with ANCA-related vasculitis and 1 with Relapsing - Remitting Multiple Sclerosis(RRMS)). Cells were cultured in the presence or absence of a range of final aloin concentrations (1, 10, 50, 100, 200, 300 $\mu\text{g} / \text{ml}$) or titrated dilutions of aloe juice administered for 30 minutes and 24 hours prior to stimulation with a PMA / ionomycin (PI) combination for 5 hours. Lymphocyte subsets were phenotypically identified by flow cytometry using fluorochrome monoclonal antibodies conjugated against the surface epitopes CD56, CD3, CD4 and CD8. Intracellular expression of the pro-inflammatory interferon- γ (IFN- γ) pro-inflammatory cytokine was also examined using commercially available cell permeability protocols.

RESULTS: In vitro administration of aloin prior to PI induction resulted in a statistically significant increase in IFN- γ production by T lymphocyte subpopulations of healthy controls and patients with autoimmune diseases, compared with PI activation alone. In particular, the percentage of aloin-induced IFN- γ increases in CD4 + T cells in healthy controls by 30.31% for the concentration of 200 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (p value <0.05) and 34.03% for 300 $\mu\text{g} / \text{mL}$ of aloin (p value <0.005), while for the population of CD8 (+) cells 29.88% and 33.78% (p value <0.0005) respectively (p value <0.0005). In patients with autoimmune diseases the increase in the percentage of IFN- γ from the CD4 (+) T-cell subpopulation was 17.84% for the concentration of 200 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (p value <0.05) and 18.35% for 300 $\mu\text{g} / \text{mL}$ aloin (p value > 0.05), while for the population of CD8 (+) cells 22.06% (p value <0.005) and 20.37% (p value > 0.05) respectively. In contrast, IFN- γ produced by NK and NK-T cells did not show a statistically significant change in the presence of aloin in any of the study groups.

In vitro administration of titrated dilutions of commercial aloe preparations (juices) prior to PI induction resulted in a statistically significant reduction in IFN- γ production. More specifically for Aloe juice A at the concentration of 1:50 the reduction of the percentage of IFN- γ was 24.34% (p value > 0.05) and for the concentration 1: 5 it was 95.16% (p value < 0.05) in CD4 (+) T-cells. Respectively in CD8 (+) T-cells at the

concentration of 1:50 of this juice the reduction of the percentage of IFN- γ produced in relation to the activation only with PMA and ionomycin was 8.81% (p value > 0.05) and for the 1: 5 concentration was 97.25% (p value <0.05).

For Aloe juice B in CD4 (+) T cells the reduction of the percentage of IFN- γ for the concentration 1:50 was 18.66% (p value > 0.05) and for the 1: 5 concentration 96.05% (p value <0.05). In CD8 (+) T cells the decrease in the percentage of IFN- γ produced at the concentration of 1:50 was 10.60% (p value > 0.05) and respectively for the concentration 1: 5 the reduction was 96, 45% (p value <0.05).

CONCLUSIONS: In the presence of purified aloin, a statistically significant increase was observed in the in vitro production of IFN- γ by peripheral blood cells of acquired but not innate immunity in healthy and patients with autoimmune diseases. In contrast, in the presence of titrated dilutions of commercially available aloe preparations, a statistically significant decrease in IFN- γ production was observed. These findings highlight the different immunomodulatory effects of pure aloin compared to commercially available formulations and suggest that products rich in aloin may not be suitable as natural anti-inflammatory agents.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή

1.1. Σκοπός

1.2. Aloe Vera

1.3. Αλοΐνη

1.4. Κυτταρικοί πληθυσμοί

1.3.1. T - βοηθητικά (CD4(+)) κύτταρα

1.3.2. T - κυτταροτοξικά (CD8(+)) κύτταρα

1.3.3. NK (CD56(+)) και NK-T (CD56(+)-CD3(+)) κύτταρα

1.5. Γενικά στοιχεία ψωρίασης

1.6. Γενικά στοιχεία ψωριασικής αρθρίτιδας

1.7. Γενικά στοιχεία ANCA - σχετιζόμενης αγγειίτιδας

1.8. Γενικά στοιχεία υποτροπιάζουσας/διαλείπουσας πολλαπλής σκλήρυνσης (RRMS)

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1. Απομόνωση και κρυσυντήρηση μονοπύρηνων λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος (PBMCs)

2.2. Μέτρησης βιωσιμότητας κυττάρων μέσω χρώσης με trypan blue

2.3. Πρωτόκολλο Πολυπαραμετρικής Κυτταρομετρίας Ροής (Cell surface staining and Intracellular Cytokines Flow Cytometry)

2.3.1. Καλλιέργεια PBMCs

2.3.2. In vitro Επώαση των PBMCs με αλοΐνη

2.3.3. Επώαση με μονοκλωνικά αντισώματα

2.3.4. Κυτταρομετρία ροής

2.3.5. Στατιστική ανάλυση

3. Αποτελέσματα

3.1. Εισαγωγή

3.1.1. Δημογραφικά στοιχεία υγιών μαρτύρων

3.1.2. Δημογραφικά στοιχεία και κλινικές πληροφορίες ασθενών

3.2. Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων (dose response) κεκαθαρμένης (95%) αλοΐνης στην παραγωγή IFN-γ από T λεμφοκύτταρα έπειτα από διέγερση με PMA και ιονομυκίνη. Επιλογή βέλτιστου εύρους συγκεντρώσεων.

3.3. Επίδραση αλοΐνης προστιθέμενης σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα πριν τον διεγέρτη στην παραγωγή της IFN-γ από τα CD4+ και CD8+ T κύτταρα έπειτα από διέγερση με PMA και ιονομυκίνη. Επιλογή βέλτιστου χρονικού διαστήματος *in vitro* χορήγησης της αλοΐνης πριν από τον διεγέρτη.

3.4. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα του ρόλου της αλοΐνης στην παραγωγή της IFN-γ από διάφορους κυτταρικούς υποπληθυσμούς σε υγιείς μάρτυρες (HC)

3.5. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα του ρόλου της αλοΐνης στην παραγωγή της IFN-γ από διάφορους κυτταρικούς υποπληθυσμούς σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα

3.6. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της επίδρασης εμπορικά διαθέσιμων σκευασμάτων (2 χυμούς A & B από το φυτό της Aloe Vera) στην παραγωγή της IFN-γ από διάφορους κυτταρικούς υποπληθυσμούς σε υγιείς

4. Συζήτηση

5. Βιβλιογραφία

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

Αρκτικόλεξα	Επεξήγηση	
APC	<i>Allophycocyanin</i>	Αλλοφυκοκυανίνη
CD4 (+)	<i>T- helper cell</i>	T- βοηθητικό κύτταρο
CD8 (+)	<i>T- cytotoxic cell</i>	T- κυτταροτοξικό / κατασταλτικό κύτταρο
CD _x	<i>Cluster of Differentiation</i>	Αντιγόνα διαφοροποίησης
DMSO	<i>Dimethylsulfoxide</i>	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
FACS Buffer	<i>Flow Cytometry Staining Buffer</i>	Διάλυμα χρώσεως για κυτταρομετρία ροής
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>	Ορός εμβρύου μόσχου
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>	Ορός εμβρύου μόσχου
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>	Ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη
HLA-I/II	<i>Human Leukocyte Antigens</i>	Ανθρώπινα λευκοκυτταρικά αντιγόνα
IFN-g	<i>Interferon-γ</i>	Ιντερφερόνη-γ
IONO	<i>Ionomycin</i>	Ιονομυκίνη
JAK	<i>Janus Kinases</i>	Κινάσες Janus
MFI	<i>Mean Fluorescence Intensity</i>	Μέση Ένταση Φθορισμού
Mg	<i>Microgram</i>	Μικρογραμμάριο
MHC-I/II	<i>Major Histocompatibility Complex I/II</i>	Μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας I/II
mL	<i>Milliliter</i>	Χιλιοστόλιτρο
NF-κβ	<i>Nuclear Factor- κB</i>	Πυρηνικός παράγοντας- κB
NK cells	<i>Natural killer cells</i>	Φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα
PBMCs	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>	Μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>	
PE	<i>Phycoerythrin</i>	Φυκοερυθρίνη
PE-Cy7	<i>Phycoerythrin-cyanine 7 tandem</i>	Φυκοερυθρίνη-Κυανίνη-7
PFA	<i>Paraformaldehyde</i>	Παραφορμαλδεΐδη
PMA	<i>Phorbol 12-Myristate 13-Acetate</i>	
PSA	<i>Psoriatic Arthritis</i>	Ψωριασική Αρθρίτιδα
PSO	<i>Psoriasis</i>	Ψωρίαση
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>	Δραστικές μορφές οξυγόνου
STAT 1/3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription proteins 1/3</i>	Πρωτεΐνες μεταγωγής σήματος και ενεργοποίησης της μεταγραφής 1/3
Tbet	<i>Transcription Factor T-box</i>	Μεταγραφικός παράγοντας T- box
TCR	<i>T- Cell Receptor</i>	Υποδοχέας T- κυτάρων
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>	Μετασχηματιστικός αυξητικός παράγοντας -β
Th1	<i>T helper type 1 cell</i>	T βοηθητικό κύτταρο τύπου 1
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor- α</i>	Παράγοντας νέκρωσης όγκων- α
V	<i>Volume</i>	Όγκος
Mg	<i>Milligram</i>	Μιλιγραμμάριο
μl	<i>Microliter</i>	Μικρόλιτρο

Εισαγωγή

1.1. Σκοπός

Σκοπός αυτής της εργασίας ήταν να μελετηθεί η *in vitro* δράση της αλοΐνης στη παραγωγή της IFN- γ σε λεμφοκυτταρικούς υποπληθυσμούς περιφερικού αίματος.

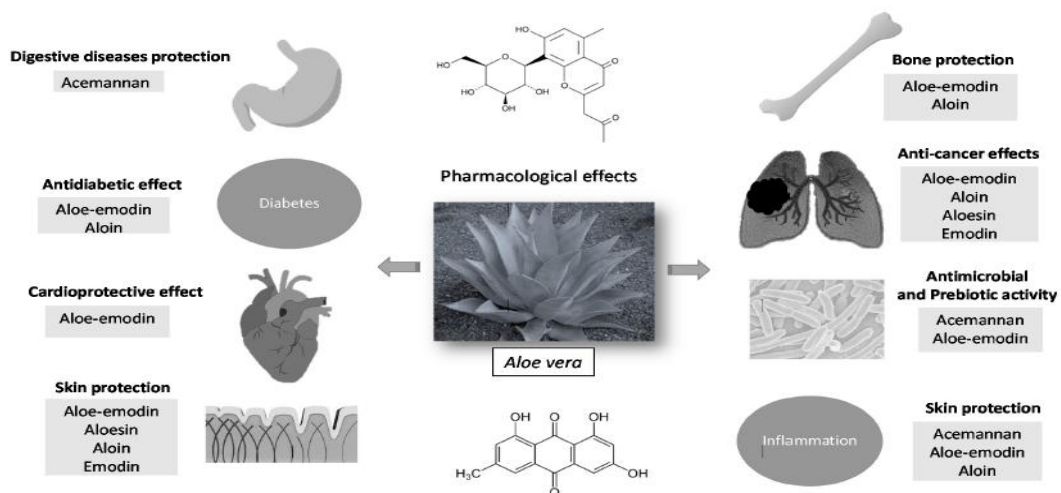
1.2. Aloe Vera



Ξυλογραφία της Aloe vera (Bock, Krauterbuch, 1565)

Η Aloe vera ή στα ελληνικά «Αλόη η γνήσια» είναι ένα φυτό που χρησιμοποιείται από την αρχαία έως και την σύγχρονη ιατρική αλλά και αλλού, όπως για λατρευτικούς σκοπούς. Το όνομα της προέρχεται είτε από την εβραϊκή λέξη «allal» είτε από την αραβική «alloe» που σημαίνουν «πικρό», σε συνδυασμό με την λατινική «vera»- γνήσια, που δόθηκε από τον Λινναίο, το 1753. Χρόνια αργότερα ονομάστηκε Aloe barbadensis από τον Phillip Miller και πλέον και οι δύο ονομασίες είναι αποδεκτές. (Upton, 2012)

Ανήκει στην κατηγορία των κρίνων, στην οικογένεια των Liliaceae και μπορεί να έχει βλαστό μέχρι 25 εκ. καθόλου. Φτάνει γύρω στα 60 έως 100 εκ. σε ύψος



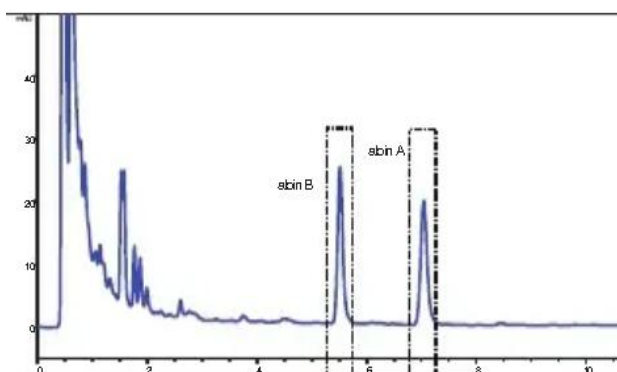
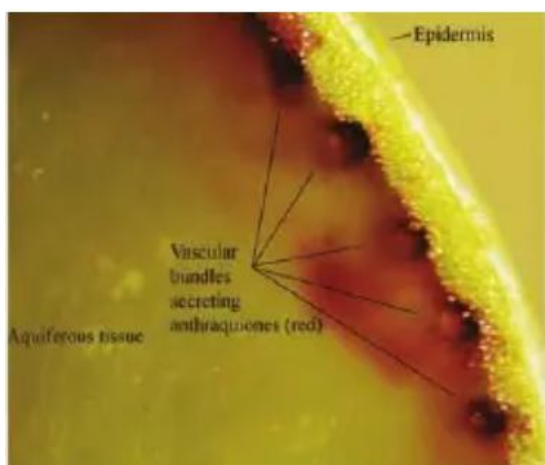
Φαρμακολογικές ιδιότητες των δραστικών ουσιών της Aloe vera ύστερα από *in vivo* και *in vitro* μελέτες (Sánchez et al., 2020)

με φύλλα που είναι παχιά και σαρκώδη, πράσινα προς το πράσινο-γκρι, με ορισμένες ποικιλίες να εμφανίζουν λευκά στίγματα στις επιφάνειες των φύλλων και έχουν ανκάθια. Χαρακτηρίζεται από μεγάλη περιεκτικότητα σε νερό 99 έως 99,5% ενώ το υπόλοιπο 0,5 έως 1% περιέχει 75 δραστικές ουσίες. Οι θετικές επιπτώσεις θεωρούνται ότι οφείλονται στην παρουσία στοιχείων όπως σάκχαρα (6-φωσφορική μαννόζη), πολυσακχαρίτες (γλυκομαννάνη), ανθρακινόνες (αλοΐνη) και άλλα (μέταλλα, σαπωνίνες, βιταμίνες) (Sánchez et al., 2020).

Πρώτες καταγραφές της χρησιμότητας της αλόης αναφέρονται ήδη από το 4000 π.Χ. στην Αίγυπτο ως δώρο με την ονομασία «ιερό φυτό της αθανασίας», σε κηδείες φαραώ (Long, 2016). Χρησιμοποιήθηκε για καλλωπιστικούς σκοπούς στην αρχαία Ρώμη, Βαβυλώνια, Κίνα και Ελλάδα, όπου αναφέρεται και από τον Διοσκουρίδη, και ως καθαρτικό στην δυσπεψία και για τις δερματικές παθήσεις, ανάμεσα στις 19 χρήσεις της. Από το 1650 άρχισε να καταγράφεται σαν συστατικό σε επίσημες συνταγές φαρμάκων, όπως στο London Pharmacopeia. Το 1912 τέθηκε σε λειτουργία η πρώτη φάρμα αλόης στην Φλόριντα, ενώ το 1959 εγκρίθηκε από τον FDA ως πρόσθετο τροφίμων. Σήμερα χρησιμοποιείται αρκετά συχνά, ως συστατικό σε πολλά σκευάσματα που προορίζονται για επούλωση πληγών ή για την τοπική θεραπεία δερματικών παθήσεων, ενώ μέσα από την έρευνα *in vitro* και *in vivo* (αλλά όχι ακόμα κλινικών μελετών) των δραστικών της ουσιών φαίνεται να έχει αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Upton, 2012).

1.3. Αλοΐνη

Η Aloe vera περιέχει τουλάχιστον 75 δραστικές ουσίες οι οποίες έχουν δυνητικά συσχετιστεί και μπορεί να έχουν κάποιο φαρμακευτικό αποτέλεσμα (Boudreau et al., 2017). Σε αυτές τις δραστικές ουσίες και πιο συγκεκριμένα στα φαινολικά συστατικά ανήκει η αλοΐνη.

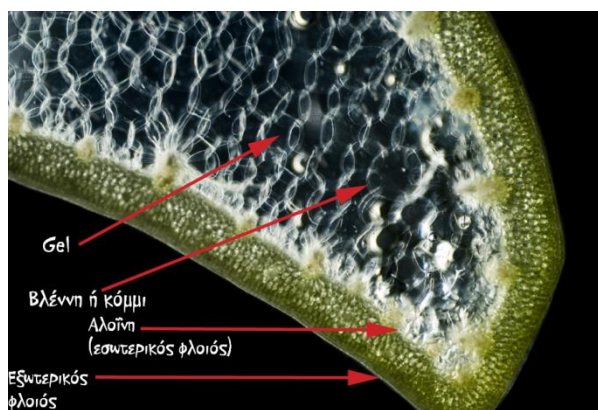


Απεικόνιση της αλοΐνης με HPLC χρωματογραφία (Upton, 2012)

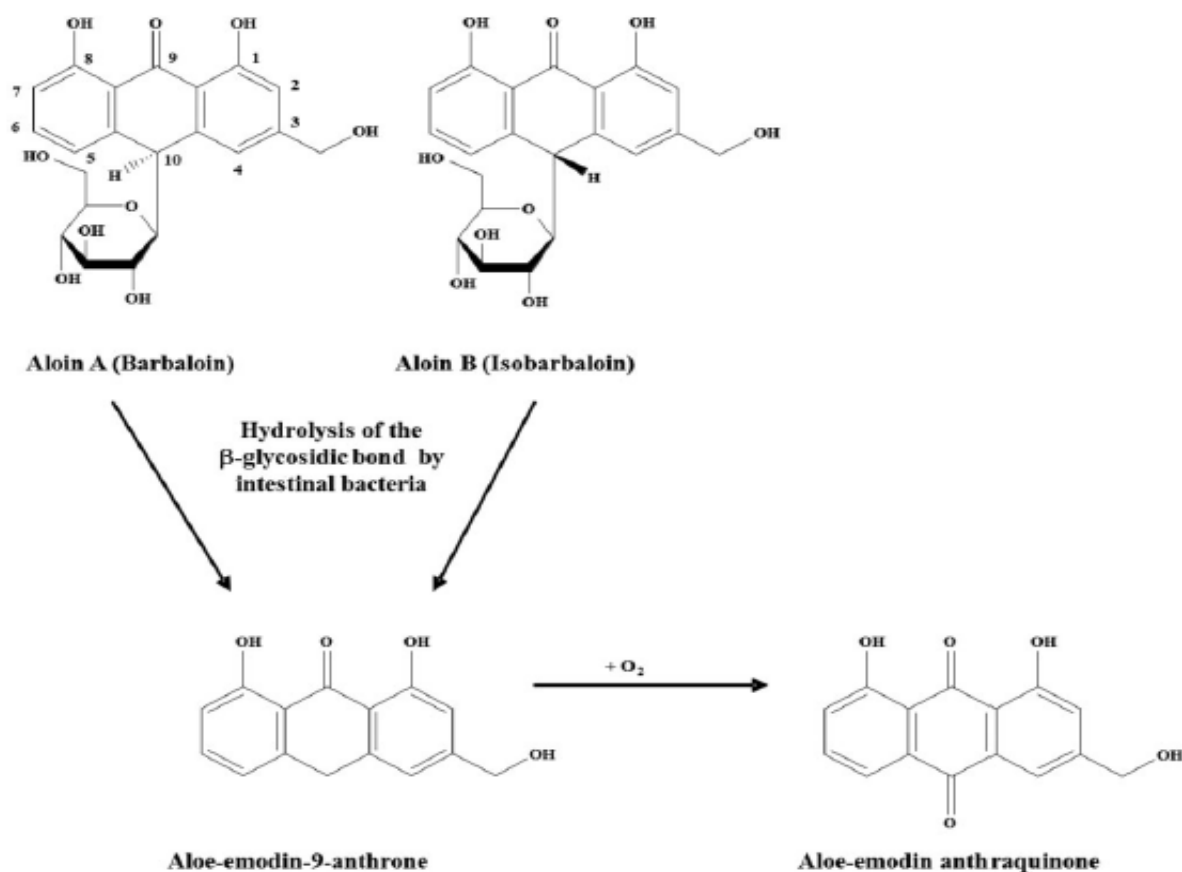
Εγκάρσια τομή του φύλλου. αγγειακές δέσμες που εκκρίνουν το εξίδρωμα, που περιβάλλει τους υδροφορείς ιστούς. Το εξίδρωμα χρωματίστηκε ερυθρό με διάλυμα υδροξειδίου του καλίου. (Upton, 2012)

Η αλοΐνη βρίσκεται στο δεύτερο στρώμα του εσωτερικού του φύλλου της αλόης. Πιο συγκεκριμένα βρίσκεται ανάμεσα στον εξωτερικό φλοιό και το στρώμα της κόλλας (latex) και παράγεται από κύτταρα τα

οποία ονομάζονται αλοητικά. Έχει κίτρινο χρώμα, ιδιαίτερα πικρή γεύση, ενώ αποκαλείται και «κίτρινο αίμα», διότι αυτό είναι το υγρό που τρέχει όταν κοπεί το φύλλο της Αλόης για να την επουλώσει και την προστατεύει αποτελεσματικά από ζώα και έντομα. Το latex της αλόης περιέχει καθαρικές ιδιότητες με κύριο υπεύθυνο για αυτό τα δύο στερεοϊσομερή της αλοΐνης. Δεν είναι όμως απευθείας υπεύθυνη η αλοΐνη A και B αλλά το μόριο στο οποίο μεταβολίζονται από τα βακτήρια του εντέρου και στη συνέχεια οξειδώνεται, το οποίο αναφέρεται ως αλοεμουδίνη.



Εγκάρσια τομή φύλλου αλόης



Μεταβολισμός της αλοΐνης από βακτήρια του εντέρου (Boudreau et al., 2017)

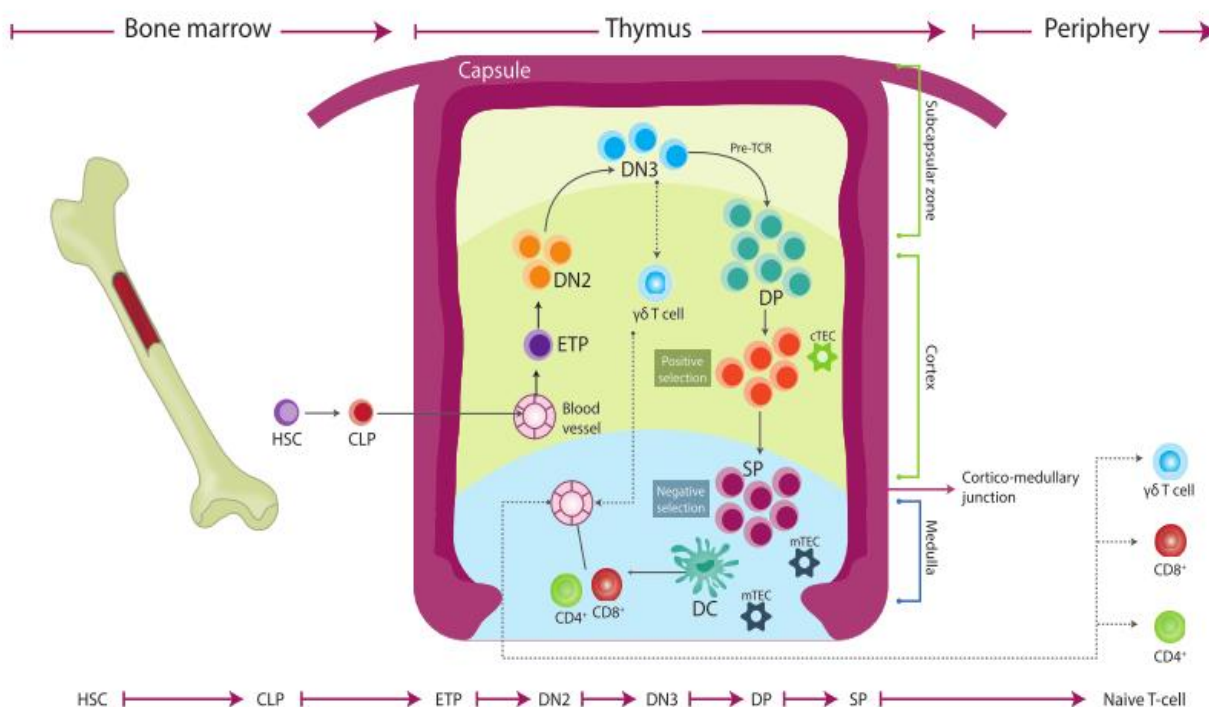
Η αλοΐνη έχει μοριακό βάρος 418.39 g/mol και αποτελεί ένα C-γλυκοσίδιο της ανθρακινόνης και εμφανίζεται σε δύο στερεοϊσομερή, την αλοΐνη A και την αλοΐνη B γνωστές και ως βαρβαλοΐνη και ισοβαρβαλοΐνη αντίστοιχα. Το μόριο σακχάρου στην αλοΐνη A και αλοΐνη B είναι μία D-γλυκόζη. Ο άνθρακας στη θέση C1 της D-γλυκόζης συνδέεται με τον άνθρακα C10 του δαχτυλιδιού της ανθρανόνης σε β -διάταξη. Ο β -(1-10) C-C δεσμός είναι ανθεκτικός και σε όξινο και σε αλκαλικό περιβάλλον και στις β -γλυκοσιδάσες των φυτών και των περισσότερων βακτηρίων (Boudreau et al., 2017).

Ωστόσο κάποια βακτήρια που αποτελούν το μικροβίωμα του εντέρου στους ανθρώπους και στα ζώα είναι ικανά να διασπάζουν τον β-C-γλυκοζιτικό δεσμό με διαφορετικό βαθμό ικανότητας.

In vitro και *in vivo* πειράματα στα οποία έχει χρησιμοποιηθεί αλοΐνη έχουν δείξει ότι μπορεί να εμποδίσει την ανάπτυξη στελεχών της *N. Gonorrhoea* και της *C. albicans* (Patel & Patel, 2013). Η αλοΐνη μείωσε σημαντικά τη λοίμωξη από όλα τα δοκιμασμένα στελέχη ιών της γρίπης και ιδιαίτερα σε ποντίκια που είχαν μολυνθεί από τον ιό της γρίπης H1N1. Η θεραπεία με αλοΐνη ελάττωσε το ιικό φορτίο στους πνεύμονες και σταμάτησε την απώλεια σωματικού βάρους, όπως και τη θνησιμότητα αναστέλλοντας την ιική νευραμινιδάση. Η αναστολή της ενεργοποίησης του TGF-β μέσω της νευραμινιδάσης, ενίσχυσε την παραγωγή κυτοκινών όπως η IFN-γ και TNF-α από τα CD4(+) και CD8(+) T κύτταρα και την αιμοσυγκολλητίνη στους πνεύμονες (Huang et al., 2019). Επίσης, άλλες θετικές επιπτώσεις της αλοΐνης παρατηρήθηκαν στο καρδιαγγειακό σύστημα καθώς και στο αντιοξειδωτικό σύστημα (Patel & Patel, 2013), ενώ έχει δοκιμαστεί σε κυτταρικές σειρές RAW264.7 καταστέλλοντας την επαγόμενη από λιποπολυσακχαρίτη φλεγμονή μέσω αναστολής της ενεργοποίησης JAK1, STAT1 / 3 και παραγωγής ROS (Ma et al., 2018) και της απόπτωσης αναστέλλοντας την ενεργοποίηση του NF-κB (Luo et al., 2018).

1.4. Κυτταρικοί πληθυσμοί

Τα T-λεμφοκύτταρα προκύπτουν αρχικά από τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα, που βρίσκονται στον ερυθρό μυελό των οστών. Τα κύτταρα αυτά είναι



Διαγραμματική απεικόνιση για τα στάδια διαφοροποίησης των λεμφοκυττάρων αρχικά στον ερυθρό μυελό των οστών και στη συνέχεια στο θύμο αδέν (Anaya et al., 2013).

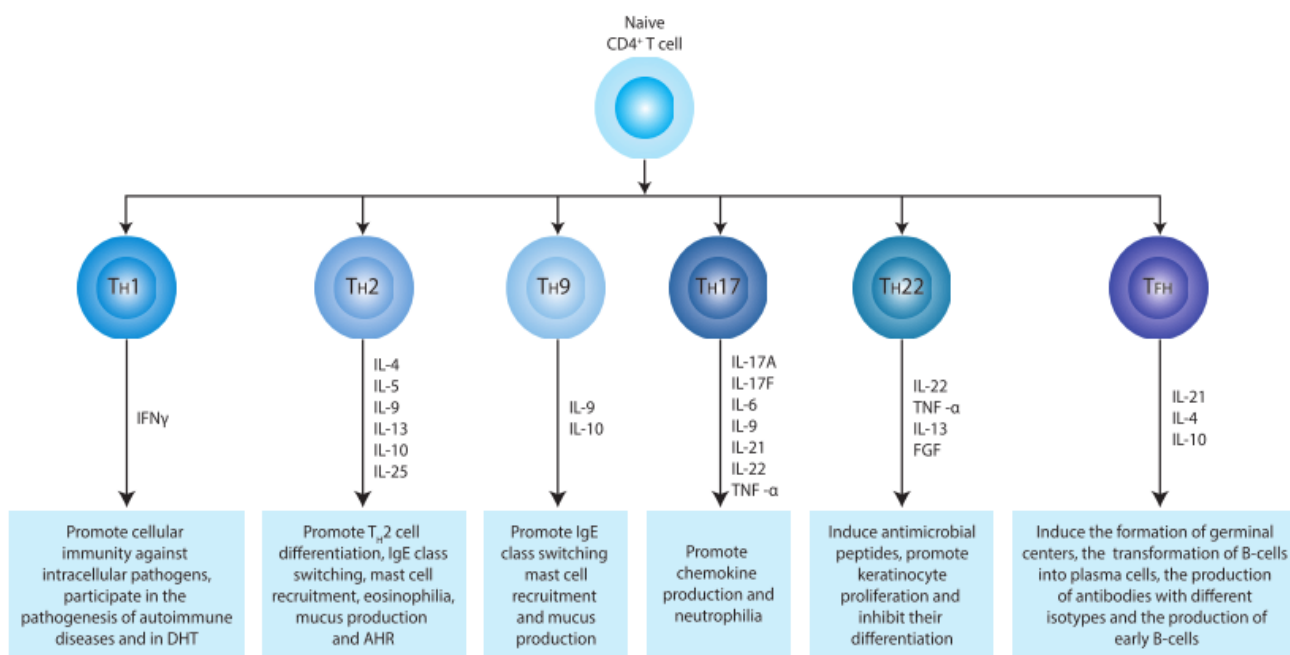
ολοδύναμα, δηλαδή έχουν την ιδιότητα να διαφοροποιούνται σε όλους τους τύπους κυττάρων του αίματος άλλα και να αναπαράγονται ώστε να διατηρούν σταθερό τον αριθμό τους. Το αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο δίνει γένεση στο πολυδύναμο αρχέγονο λεμφικό κύτταρο το οποίο εγκαθίσταται στη φλοιώδη μοίρα του θύμου αδένα, όπου πολλαπλασιάζεται και διαφοροποιείται από διπλά αρνητικό 2 (CD25(+)) και CD44(+) υποδοχείς). Έχοντας χάσει την ικανότητα να διαφοροποιηθεί σε Β κύτταρα, αρχίζει τη σύνθεση των υποδοχέων επιφάνειας (TCR) και άλλων απαραίτητων μορίων για την σηματοδότηση του TCR όπως την CD3 αλυσίδα. (Anaya et al., 2013)

Στη συνέχεια αν εκφράζουν την β αλυσίδα (αβ (+), γδ (-)) αρχίζουν να εκφράζουν ταυτόχρονα τα μόρια CD4 και CD8 και γίνονται διπλά θετικά. Έπειτα, όταν το θυμοκύτταρο ωριμάζει περισσότερο, επιλέγεται μόνο το ένα από τα δύο μόρια. Σε αυτή τη φάση το πρόθυμο κύτταρο έρχεται σε επαφή με πλήθος αντιγόνων. Τα αντιγόνα αυτά πρέπει να τους προσφερθούν με τη συμμετοχή των μορίων ιστοσυμβατότητας που εκφράζονται στην επιφάνεια όλων των κυττάρων του οργανισμού. Διπλά θετικά κύτταρα που δεν μπορούν να προσδεθούν σε HLA-I ή HLA-II καταλήγουν σε απόπτωση. Τα διπλά θετικά κύτταρα αναγνωρίζουν τα HLA-I διαφοροποιούνται σε CD4(-) CD8(+) ενώ αυτά που αναγνωρίζουν τα HLA-II διαφοροποιούνται σε CD4(+) CD8(-).

Επειδή αντιγονικές ιδιότητες μπορεί να έχει κάθε είδους μόριο, είναι ανάγκη ο κάθε οργανισμός να μπορεί να αναγνωρίσει και να ανεχθεί τα δικά του («ίδια», “self”) αντιγόνα. Για τη σημαντική αυτή λειτουργία θεμελιώδη σημασία έχουν τα μόρια ιστοσυμβατότητας τάξης II. Ο κανόνας είναι ότι, όταν “ίδια” αντιγόνα προσφέρονται στα προθυμοκύτταρα από «ίδια» μόρια MHC, τότε τα κύτταρα αυτά αποκλείονται από την περαιτέρω ωρίμανση και αποπίπτουν («αρνητική επιλογή»). Έχει υπολογισθεί ότι η αρνητική επιλογή μαζί με την απόπτωση λόγω αποτυχίας του ανασυνδυασμού των γονιδίων των υποδοχέων επιφέρουν τον θάνατο στο 95% και πλέον των κυττάρων που περνούν από το θύμα αδένα. Αντίθετα, τα κύτταρα που μπορούν αναγνωρίσουν τα «ξένα» αντιγόνα παρουσιασμένα σε σύνδεση με τα «ίδια» μόρια MHC επιλέγονται για περαιτέρω διαφοροποίηση («θετική επιλογή»). Με τον τρόπο αυτό («περιορισμός μέσω του συστήματος ιστοσυμβατότητας»), τα επιλεγμένα κύτταρα μαθαίνουν να ανέχονται τα αντιγόνα του οργανισμού από τον οποίο προέρχονται και εξέρχονται στην κυκλοφορία για να επιτελέσουν τις λειτουργίες τους. (Λουκόπουλος, Δ., 2015)

1.3.1.Τ- βοηθητικά (CD4(+)) κύτταρα

Η διαφοροποίηση ενός CD4(+) T-λεμφοκυττάρου στους διάφορους υποπληθυσμούς εξαρτάται από τη φύση και τη συγκέντρωση του αντιγόνου, τον τύπο του αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου, το μικροπεριβάλλον της κυτοκίνης, που συνοδεύει την παρουσίαση του αντιγόνου και την παρουσία άλλων συνδιεγερτικών μορίων. Αποτελούν το 31-53% του υποπληθυσμού των T-λεμφοκυττάρων.



Οι διάφοροι υποπληθυσμοί των CD4(+) T- κυττάρων , όπου φαίνονται οι κυτταροκίνες που παράγονται από κάθε υποπληθυσμό και συνοπτικά ο ρόλος τους (Anaya et al., 2013).

Τα CD4(+) T - λεμφοκύτταρα αποτελούν τα T-βοηθητικά κύτταρα του οργανισμού, τα οποία είναι επιφορτισμένα με την παραγωγή κυτοκινών και την ενεργοποίηση των B-λεμφοκυττάρων. Χωρίζονται σε Th1, Th2, Th17, Th9, Th22, TFH και T ρυθμιστικά κύτταρα ανάλογα με τις κυτταροκίνες που παράγουν . (Anaya et al., 2013).

Χαρακτηριστικό των Th1 είναι η έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων Tbet, STAT1, STAT4 καθώς και η παραγωγή IFN- γ η οποία προωθεί την ανοσία έναντι ενδοκυτταρικών παθογόνων (Berger, 2000), ενώ ενεργοποιούνται από την παρουσία IL-12, IL-18, TNFs και IFN- α και β .

Τα Th2 κύτταρα ενεργοποιούνται από εξωκυτταρικά παθογόνα και αλλεργιογόνα λόγω της έκκρισης IL-4, IL-25, IL-33 και IL-11 από μαστιτικά κύτταρα, ηωσινόφιλα και τα NKT κύτταρα. TH2 κύτταρα ενεργοποιούν την μετατροπή της ανοσοσφαιρίνη σε IgE μέσω ενός μηχανισμού που διαμεσολαβείται με την έκκριση της IL-4 (Anaya et al., 2013).

Χαρακτηριστικό των Th9 κυττάρων τα οποία ενεργοποιούνται από την έκκριση TGF- β και IL-4 είναι η παραγωγή IL-9 και IL-10 .Μέσω της παραγωγής IL-9 προάγουν την ανάπτυξη των μαστιτικών κυττάρων και στην περίπτωση αλλεργικής αντίδρασης ή μόλυνσης από έλμινθες προάγει την απελευθέρωση των προϊόντων των μαστιτικών κυττάρων καθώς και την παραγωγή βλέννας (Anaya et al., 2013).

Τα Th17 κύτταρα ενεργοποιούνται από τις IL-6, IL-21, IL-23 και TGF- β . Παράγουν κυρίως IL-17A και ενεργοποιούν την παραγωγή χημειοκινών, την παραγωγή ντεφενσινών, ενώ η παρουσία φλεγμονωδών αντιδράσεων από Th17 κύτταρα σχετίζεται με ασθένειες όπως ρευματοειδής αρθρίτιδα συστηματικός ερυθροματώδης λύκος και χρόνια άσθμα (Anaya et al., 2013).

Τα Th22 κύτταρα χαρακτηρίζονται από παραγωγή IL-22 και TNF- α . Ο υποπληθυσμός των CD4(+) κυττάρων μέσω της παραγωγής προφλεγμονωδών

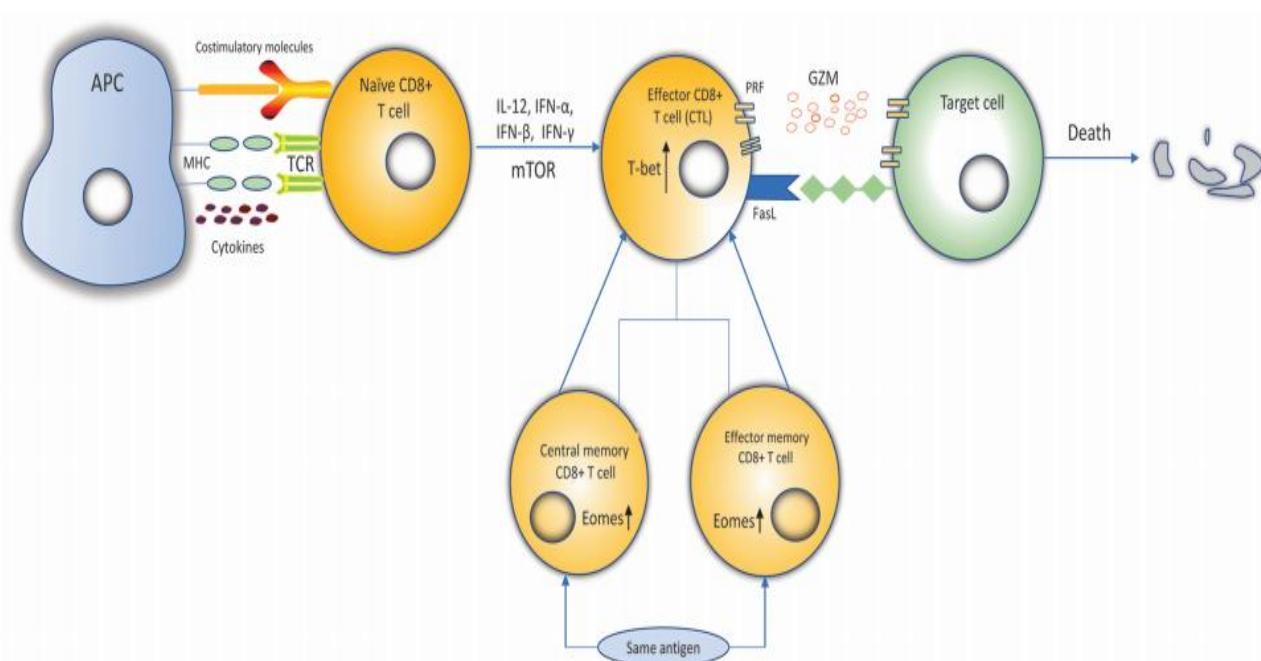
αυτών κυτοκινών εμπλέκεται στην παθογένεση φλεγμονών και αυτοάνοσων ασθενειών, όπως η ψωρίαση, η ρευματοειδής αρθρίτιδα (Azizi *et al.*, 2015, p. 22).

Τα Follicular T κύτταρα υποβοηθούν τα B κύτταρα να παραγάγουν αντισώματα, επάγουν τον σχηματισμό των βλαστικών κέντρων και την μετατροπή των B κυττάρων σε πλασματοκύτταρα. Παράγουν τον μεταγραφικό παράγοντα BCL-6 και κυτοκίνες όπως IL-21, IL-4 και IL-10 (Anaya *et al.*, 2013).

Τέλος τα ρυθμιστικά T κύτταρα που αποτελούν το 5 με 10% των CD4(+) T κυττάρων εκκρίνουν την IL-10, μία κυτοκίνη με ανοσοκατασταλτική λειτουργία, η οποία μέσω της διατήρησης της έκφρασης του FOXP3 μεταγραφικού παράγοντα στα T ρυθμιστικά κύτταρα τους προσδίδει την ιδιότητα να καταστέλλουν τη λειτουργία άλλων κυττάρων όπως τα αυτοδραστικά CD4 ή CD8 T κύτταρα, τα NK και NKT κύτταρα (Golubovskaya & Wu, 2016).

1.3.2. T- κυτταροτοξικά (CD8(+)) κύτταρα

Η ενεργοποίηση, η διαφοροποίηση και η ανάπτυξη των CD8(+) T κυττάρων μπορεί να επηρεαστεί από μια πληθώρα κυτοκινών μεταγραφικών παραγόντων (Anaya *et al.*, 2013) και χημειοκινών ενώ τα τελευταία χρόνια έρευνες δείχνουν ότι επιγενετικές τροποποιήσεις μπορούν να συμβάλουν σε μεγάλο βαθμό στην ενεργοποίηση ή την καταστολή των CD8(+) T κυττάρων. Αποτελούν το 17-35% επί του συνόλου των λεμφοκυττάρων.



Τρόπος ενεργοποίησης και δράσης των CD8(+) T-κυττάρων (Deng *et al.*, 2019)

Αρχικά ο ρόλος των CD8(+) T κυττάρων ή αλλιώς των κυτταροτοξικών T κυττάρων είναι κυρίως η καταστροφή κυττάρων που έχουν μολυνθεί με κάποιο ιό. Αυτό γίνεται με την έκκριση κυτταροτοξικών κοκκίων (PRF/GRMB) και κυτοκινών

όπως είναι η IFN- γ , ενώ οι τελεστές CD8(+) T κύτταρα έχουν ρυθμιστικό ρόλο για την παραγωγή της ανοσοκατασταλτικής κυτοκίνης ιντερλευκίνη 10 (IL-10) για να περιορίσουν την βλάβη των ιστών. Άλλος ένας ρόλος είναι ο έλεγχος της ανάπτυξης όγκων εμποδίζοντας τους να κάνουν μετάσταση με την έκκριση διάφορων κυτοκινών, mRNAs, microRNAs, χημειοκινών και TFs. Τελευταία δεδομένα δείχνουν ότι σε αυτούς τους ρόλους των κυτταροτοξικών T κυττάρων προστίθεται η συμβολή τους στην ανάπτυξη αυτοάνοσων νοσημάτων όπως η νόσος Grave's (Grave's Disease (GD)), σοβαρή απλαστική αναιμία (SSA), διαβήτη τύπου 1 (T1D), συστηματικός ερυθροματώδης λύκος (SLE), συστηματική σκλήρυνση (SSc) και πολλαπλή σκλήρυνση (MS) λόγω επιγενετικών τροποποιήσεων (Deng et al., 2019).

Πίνακας με τις επιπτώσεις των επιγενετικών τροποποιήσεων στον αριθμό των CD8(+) T- κυττάρων και συνεπώς σε διάφορες αυτοάνοσες ασθένειες (Deng et al., 2019).

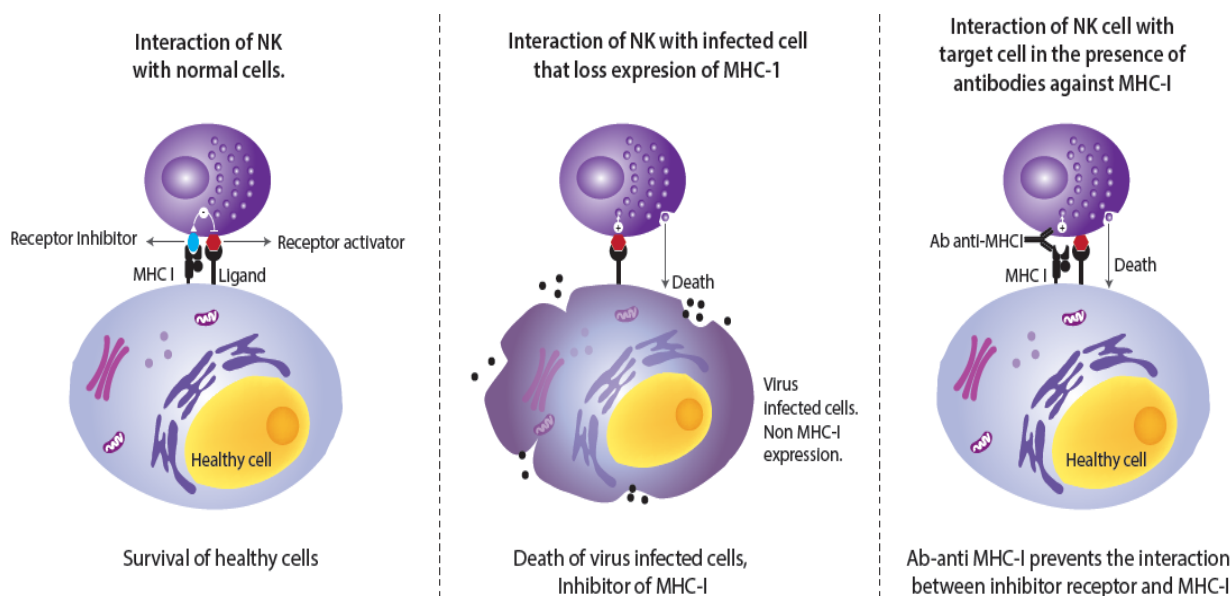
Diseases	Level of CD8+ T cells	Potential role of CD8+ T cells
GD	Decreased	Causes the production of intrathyroidal autoantibodies
MS	Increased	Mediates inflammation
SSc	Increased	Contributes to the skin fibrosis
T1D	Increased	Induces β -cell death
SLE	Increased	Induces autoantibody appearance and causing organ damage
SAA	Increased	Causes hematopoietic cell health
Vitiligo	Increased	Mediates the destruction of melanocytes

1.3.3.NK (CD56(+)) και NK-T (CD56(+)-CD3(+)) κύτταρα

Τα κύτταρα φυσικοί φονείς (NK-Natural Killers cells) παίζουν σπουδαίο ανοσοποιητικό ρόλο στην κυτταρική ανοσία λόγω της κυτταροτοξικής τους δραστηριότητας. Αποτελούν ένα σημαντικό υποσύνολο λεμφοκυττάρων περίπου 10-15% των μονοπύρηνων κυττάρων του αίματος. Βρίσκονται φυσιολογικά και σε λεμφικά όργανα, όπως στο σπλήνα, σε λεμφαδένες καθώς και σε όργανα εκτός του λεμφικού ιστού, όπως ο πλακούντας. (Vivier, Tomasello, Baratin, Walzer, & Ugolini, 2008) και είναι τμήμα του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος, δεδομένου ότι αυτά τα κύτταρα δεν αναδιατάσσουν το DNA τους για την απόκτηση ειδικότητας.

Τα κύτταρα φυσικοί φονείς εκφράζουν υποδοχείς ενεργοποίησης, ανασταλτικούς υποδοχείς και τον επίτοπο CD56 ωστόσο δεν εκφράζουν τον επίτοπο TCR. Τα NK κύτταρα ενεργοποιούνται όταν καρκινικά ή προσβεβλημένα από ιούς κύτταρα δεν εκφράζουν μόρια MHC κλάσης I, ή υπερεκφράζουν τον συνδέτη ενεργοποίησης. Δρουν απελευθερώνοντας περφορίνη και κυτοκίνες όπως η IFN- γ και κινητοποιώντας τα μακροφάγα για να καταστρέφουν τα κύτταρα-στόχους.

Συμμετέχουν στην άμυνα του οργανισμού έναντι των μικροβίων αλλά και στην διατήρηση της ανοσολογικής ομοιόστασης μέσω του ελέγχου ανάπτυξης όγκων.

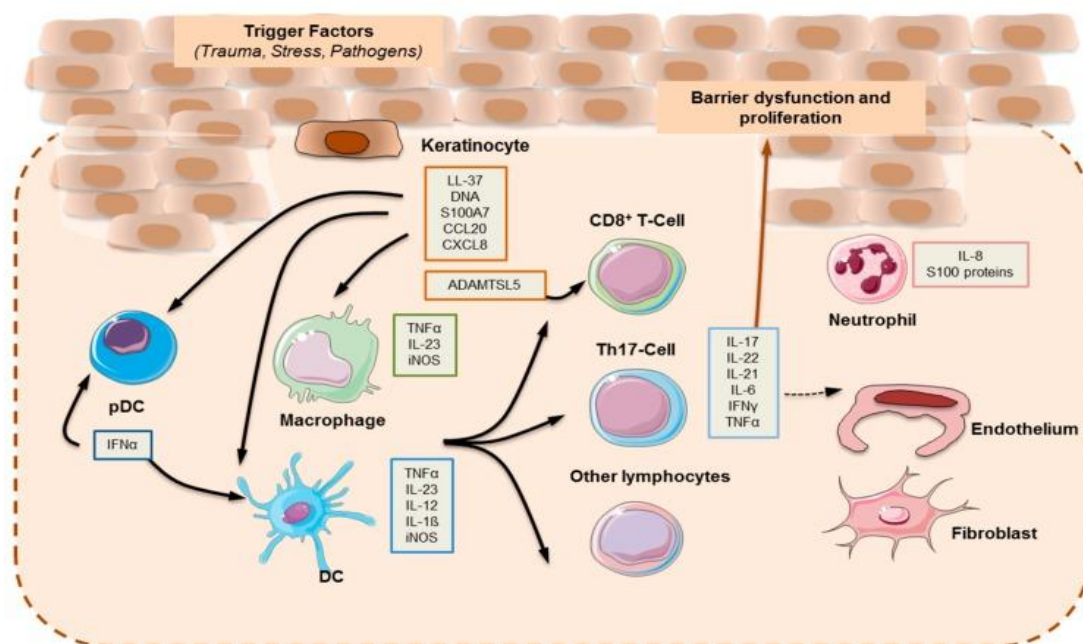


Τρόπος με τον οποίο αναγνωρίζουν τα NK κύτταρα τα υγιή κύτταρα (λόγω ύπαρξης MHC I) και τα αφήνουν να επιβιώσουν (αριστερή εικόνα), τρόπος αναγνώρισης των μολυσμένων κυττάρων (απουσία MHC I), που τα οδηγεί στον θάνατο (μεσαία εικόνα) και τέλος αλληλεπίδραση των NK κυττάρων με το κύτταρο στόχο παρουσία αντισωμάτων έναντι των των MHC I με αποτέλεσμα την θανάτωση του ηγιούς κυττάρου (Anaya et al., 2013).

Τα T-κύτταρα φυσικοί φονείς (Natural killer T-cells NKT), αποτελούν μια υποομάδα T λεμφοκυττάρων που αναγνωρίζουν αντιγόνα λιπιδίων ή γλυκολιπιδίων που παρουσιάζονται μέσω της πρωτεΐνης CD1d που σχετίζεται με την τάξη MHC I. Διακρίνονται από τα NK κύτταρα τα οποία ανήκουν στην φυσική ανοσία και διαθέτουν υποδοχείς KIR όπως τα NK για την αναστολή της καταστροφής ίδιων αντιγόνων μέσω της αναγνώρισης MHC μορίων επιφανείας. Τα φυσιολογικά επίπεδα των NKT κυττάρων στο αίμα δεν είναι σταθερά και μπορεί να ποικίλλουν από άτομο σε άτομο (Bendelac et al., 2007). Έχει δειχθεί ότι και τα κύτταρα αυτά μπορούν να παράγουν IFN- γ , συμμετέχοντας στην επαγωγή της φλεγμονής.

1.5. Γενικά στοιχεία ψωρίασης (PSO)

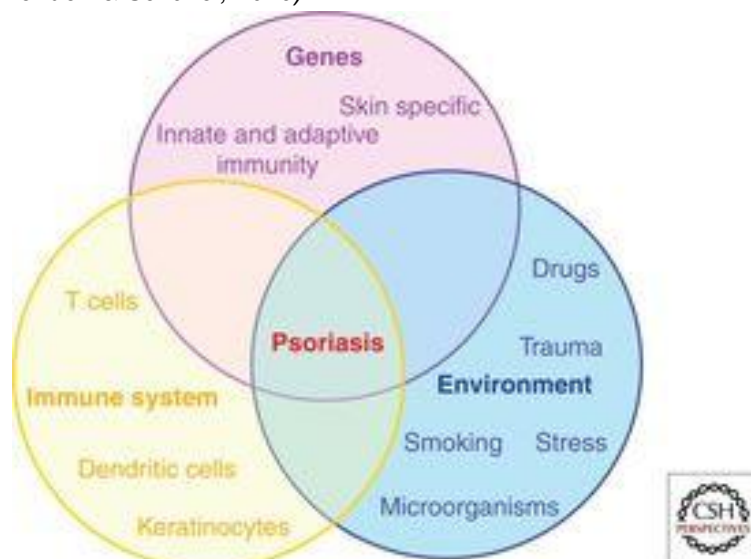
Η ψωρίαση είναι ένα χρόνια νόσημα και προσβάλλει το μεγαλύτερο όργανο του ανθρώπου, το δέρμα. Ιστορικά, συγχέονταν αρκετά συχνά με την λέπρα, με αποτέλεσμα οι ασθενείς να απομακρύνονταν από το κοινωνικό σύνολο, ενώ αναγνωρίστηκε επίσημα σαν ασθένεια στις αρχές του 19^{ου} αιώνα από τον Robert Willan και ονομάστηκε ψωρίαση το 1841 από τον Ferdinand Hebra (*Di Meglio et al., 2014*).



Το μονοπάτι που οδηγεί στην παθογένεια της ψωρίασης (Rendon & Schäkel, 2019)

Προκαλείται από παθολογική διέγερση των T-λεμφοκυττάρων, τα οποία μεταφέρονται μέσω του κυκλοφοριακού συστήματος σε κάποιο σημείο του δέρματος όπου και επάγουν την φλεγμονή. Το αποτέλεσμα είναι να παραχθούν διάφορες κυτοκίνες όπως οι ιντερλευκίνες 12 και 23 (IL-12 ΚΑΙ IL-23) κι στη συνέχεια η ιντερλευκίνη 17A (IL-17A) και ιντερφερόνη- γ (IFN- γ) από τα Th17 και Th1 κύτταρα αντίστοιχα (*Rendon & Schäkel, 2019*).

Καθώς οι ιντερλευκίνες, που αναφέρθηκαν, παράγονται, επιδρούν στο φυσιολογικό κύκλο των κερατινοκυττάρων κάνοντάς τα, να ωριμάζουν αλλά και μεταφέρονται στην επιφάνεια του δέρματος σε 3-4 μέρες αντί για το φυσιολογικό χρονικό περιθώριο των 28 ημερών. Ο υπέρμετρος



Αιτίες που συμβάλλουν στην εκδήλωση της ψωρίασης

πολλαπλασιασμός των κερατινοκυττάρων δημιουργεί σκληρές στην αφή περιοχές που ονομάζονται ψωριασικές πλάκες που μοιάζουν σαν λέπια όταν το σώμα προσπαθεί να τις απομακρύνει και παρουσιάζεται με εντονότατο κνησμό. Η ψωρίαση έχει ένα μεγάλο γενετικό υπόβαθρο, αλλά οφείλεται και σε περιβαλλοντικούς παράγοντες.

Η ψωρίαση κέντρισε το ενδιαφέρον πολλών κλινικών ιατρών και άλλων ερευνητών καθώς, είναι μια χρόνια φλεγμονή, με υφέσεις και εξάρσεις, η οποία έχει σημαντικό ψυχολογικό και κοινωνικό αντίκτυπο στους ανθρώπους που πάσχουν. Σύμφωνα με τις πιο πρόσφατες μελέτες επηρεάζει το 2-4% του πληθυσμού στις Δυτικές χώρες (Zangeneh & Shooshtary, 2013). Η συχνότητα εμφάνισης είναι μεγαλύτερη σε ενήλικες σε σχέση με παιδιά ενώ φαίνεται να εμφανίζεται σε ηλικίες 30 έως 39 ετών ή άνω των 60. Τέλος, είναι πιο συχνή στους καυκάσιους, σε σχέση με άλλους πληθυσμούς και εμφανίζεται εξίσου και στα δύο φύλα ,πιο συχνά σε γυναίκες άνω των 18 και άνδρες κάτω των 18 χρόνων.

Αναφέρονται οι εξής βασικές κατηγορίες ψωρίασης (Rendon & Schäkel, 2019):

- **Ψωρίαση κατά πλάκας**, είναι η πιο συνηθισμένη μορφή ψωρίασης (85-90% των περιπτώσεων) και χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό οβάλ ή ακανόνιστων ψωριασικών πλακών με συμμετρική κατανομή συνήθως στο τριχωτό της κεφαλής, στους αγκώνες και στα γόνατα, που καλύπτονται από «αργυρόχρωσα λέπια».
- **Σταγονοειδής ψωρίαση**, σπάνια μορφή της νόσου (<10%) χαρακτηρίζεται από μικρές ερυθρωματώδεις βλατίδες, με γενικευμένη κατανομή, κυρίως στον κορμό και τα άκρα



Περιστατικό ασθενούς με ψωρίαση κατά πλάκας (Zangeneh & Shooshtary, 2013)

- **Ερυθροδερμική ψωρίαση**, είναι μια σπάνια μορφή ψωρίασης (1 με 2%) και επηρεάζει μεγάλο μέρος του σώματος (>75%) ,με καθολική φλεγμονή και ερυθρότητα (γενικευμένο εξάνθημα). Χρήζει άμεσης θεραπείας και συνεχούς παρακολούθησης καθώς μπορεί να εμφανίσει επιπλοκές όπως διαταραχές στην θερμορύθμιση και απώλεια ηλεκτρολυτών λόγω της διαδερμικής απώλειας νερού
- **Φλυκταινώδης ψωρίαση**, , είναι μια σοβαρή μορφή ψωρίασης. Διακρίνεται σε δυο φαινοτύπους ανάλογα με το αν είναι εντοπισμένη ή γενικευμένη, η οποία είναι γνωστή και ως ψωρίαση von

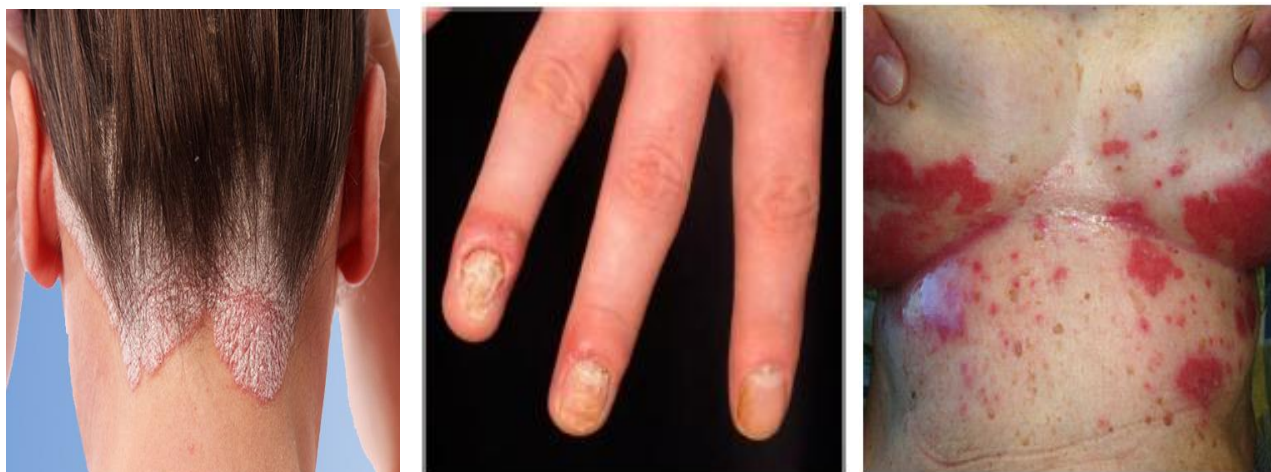


Περιστατικό ασθενούς με ερυθροδερμική ψωρίαση (Zangeneh & Shooshtary, 2013)

Zumbush και οφείλεται σε μεταλλάξεις στο γονίδιο IL36RN, το οποίο κωδικοποιεί για ένα ανταγωνιστή του αντιφλεγμονώδη υποδοχέα της IL-36, IL-36Ra .

ενώ ανάλογα με τη περιοχή στην οποία εντοπίζεται μπορεί να διακριθεί περεταίρω σε

- Ψωρίαση του τριχωτού της κεφαλής
- Ψωριασική ονυχία,
- Ψωρίαση γενετικών οργάνων,
- Ψωρίαση στις παλάμες και στα πέλματα ή
- Ανάστροφη στις πτυχές ψωρίαση.

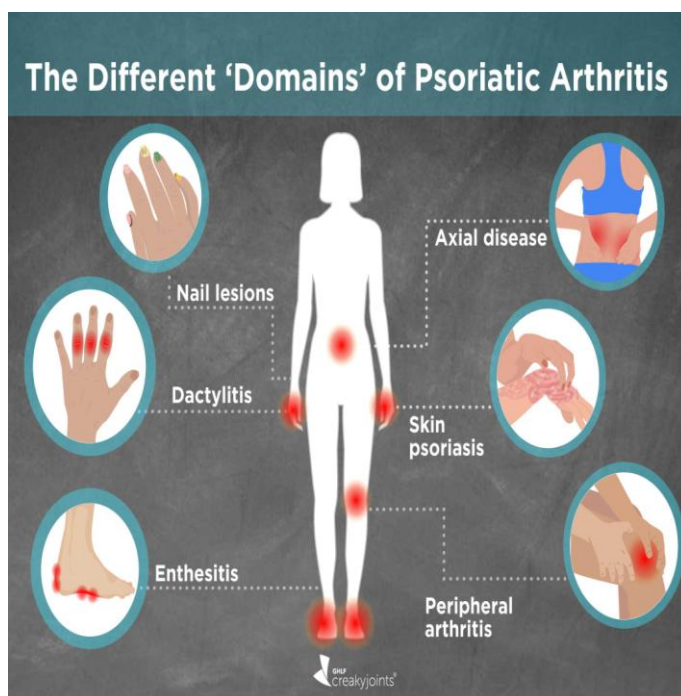


Περιστατικά ψωρίασης τριχωτού της κεφαλής (αριστερή εικόνα), των ονύχων (μεσαία εικόνα) και ανάστροφης στις πτυχές ψωρίασης (δεξιά εικόνα) (Zangeneh & Shooshtary, 2013).

Η θεραπεία της ψωρίασης κρίνεται ανάλογα με τη μορφή της, τη βαρύτητα αυτής και την έκταση του σώματος το οποίο προσβάλλει, ενώ πρέπει να συμφωνεί με τις διεθνείς και τοπικές κατευθυντήριες οδηγίες. Υπάρχουν τρεις βασικές κατευθύνσεις για την θεραπευτική αντιμετώπιση της ψωρίασης: 1) τοπική θεραπεία, 2) φωτοθεραπεία και τέλος, αν δεν είναι τα παραπάνω αποτελεσματικά, 3) συστηματική θεραπεία με χορήγηση φαρμάκων είτε από το στόμα είτε με τη χρήση ενέσιμων, όπως της μεθοτρεξάτης και βιολογικών παραγόντων που στοχεύουν στο ανοσοποιητικό σύστημα (κυρίως φάρμακα που αναστέλλουν την παραγωγή της IL-23 και της IL-17).

1.6. Γενικά στοιχεία ψωριασική αρθρίτιδα (PsA)

Η ψωριασική αρθρίτιδα (Psoriatic Arthritis - PsA) είναι μια περίπλοκη, ετερογενής, χρόνια αυτοάνοση πάθηση, η οποία προκαλεί φλεγμονή και συνεπώς πόνο μέσα ή γύρω από τις αρθρώσεις. Αναγνωρίστηκε το 1964 ως ξεχωριστή ασθένεια από το American College of Dermatology και ανήκει στο φάσμα των



Συνήθη συμπτώματα ψωριασικής αρθρίτιδας (Jara, n.d.)

τόσο άντρες όσο και γυναίκες, ενώ εμφανίζεται συχνότερα σε άτομα άνω των 40 χρόνων. Άτομα που έχουν στο οικογενειακό τους περιβάλλον ασθενή με ψωριασική αρθρίτιδα έχουν 30 έως 55 φορές μεγαλύτερο ρίσκο να αναπτύξουν ψωριασική αρθρίτιδα ενώ έχουν αναγνωριστεί πολλοί πολυμορφισμοί που μπορούν να παίζουν ρόλο στην εκδήλωση της νόσου και συμμετέχουν σε διάφορα μονοπάτια όπως αυτό της ιντερλευκίνης 17 (IL-17) και της ιντερλευκίνης 23 (IL-23) και του NF-κB (Solmaz et al., 2018).

Παρόλα αυτά είναι αρκετά δύσκολο να διαγνωστεί η ψωριασική αρθρίτιδα, σε ένα ποσοστό 4,2 έως 33,6 των περιπτώσεων, παρά την αύξηση της αναγνωσιμότητας της ασθένειας και την ανάπτυξη των απεικονιστικών μεθόδων υπάρχει μια μεγάλη καθυστέρηση στη διάγνωση της νόσου. Η καθυστέρηση της διάγνωσης από 6 έως 12 μήνες μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την μείωση των ευκαιριών για βελτίωση της πρόγνωσης της ασθένειας.

Η ψωριασική αρθρίτιδα είναι μια η οποία χαρακτηρίζεται τόσο από μυοσκελετικές παθήσεις όσο και από δερματικές. Τα πιο συνήθη συμπτώματα είναι τα παρακάτω:

- Η εμφάνιση των ψωριασικών ερυθρωματωδών πλακών
- Ο πόνος και η δυσκαμψία των αρθρώσεων (αναφέρεται ειδικά 30λεπτη πρωινή δυσκαμψία)



Περιστατικό ψωριασικής αρθρίτιδας (δακτυλίτιδα)

σπονδυλοαρθρίτιδων. Έχει μεγάλη επίπτωση στην ποιότητα της ζωής και στη λειτουργική ικανότητα των ασθενών (Coates & Helliwell, 2017).

Η συχνότητα εμφάνισης της ψωριασικής αρθρίτιδας σε ασθενείς, που ήδη πάσχουν από ψωρίαση είναι μεγαλύτερη, το 5,8% έως 40,9% των ασθενών με ψωρίαση θα εμφανίσει και ψωριασική αρθρίτιδα, σε σχέση με τη συχνότητα εμφάνισης στο γενικό πληθυσμό. Στον γενικό

πληθυσμό εμφανίζεται μόνο στο 0,1-0,25%. Προσβάλε

- Πάχυνση, δυσχρωμία και σκασίματα των νυχιών
- Οίδημα των δακτύλων των άνω ή των κάτω άκρων (δακτυλίτιδα), λόγω φλεγμονής που εκδηλώνεται ταυτόχρονα σε αρθρώσεις και τένοντες
- Πόνος στους γλουτούς, δυσκαμψία στη μέση ή στον αυχένα, λόγω φλεγμονής στη σπονδυλική στήλη (σπονδυλίτιδα)
- Πόνος σε άλλα σημεία του σώματος όπου οι τένοντες προσφύονται σε οστά (ενθεσίτιδα).

1.7. Γενικά στοιχεία ANCA - σχετιζόμενης αγγειίτιδας (AAV)

Οι ANCA - σχετιζόμενες αγγειίτιδες (AAV) αποτελούν μία ξεχωριστή ομάδα αγγειίτιδων. Οι αγγειίτιδες αυτές χαρακτηρίζονται από φλεγμονή και καταστροφή του ενδοθηλίου των μικρών και μεσαίου μεγέθους αρτηριών και σχετίζονται με τα αυτοαντισώματα ANCA (Antineutrophil Cytoplasmic Antibody- Αντισώματα έναντι συστατικών του Κυτταροπλάσματος των Ουδετερόφιλων κυττάρων).

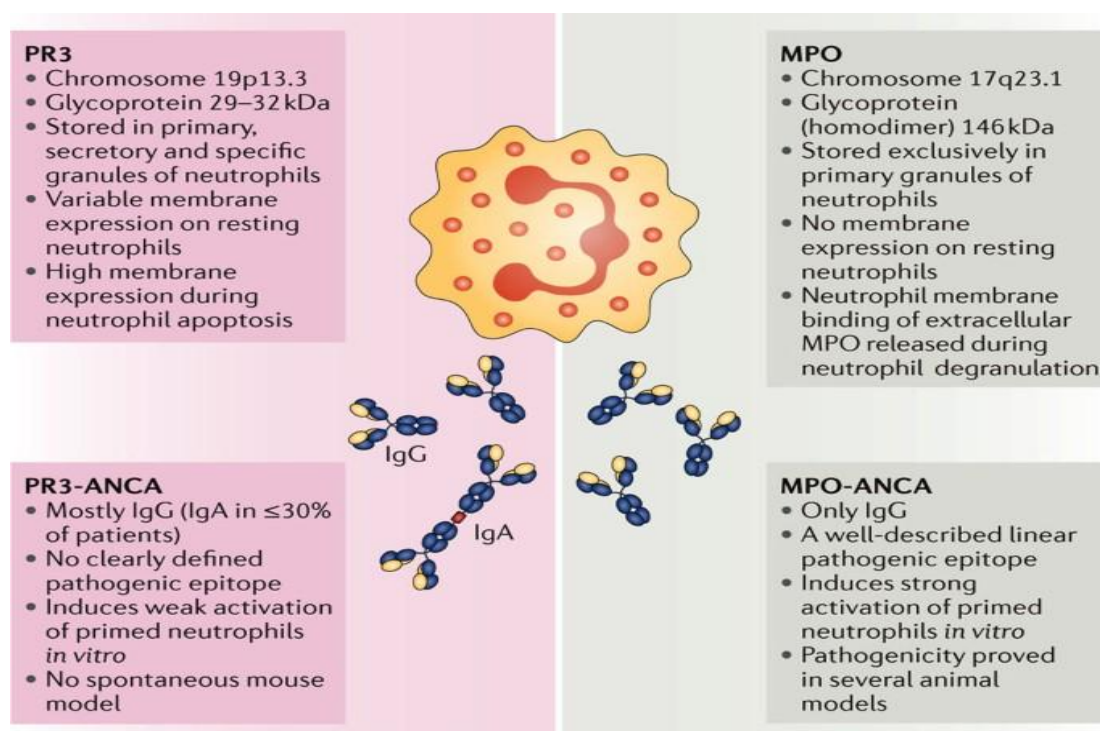
Στην κατηγορία αυτών των αγγειίτιδων ανήκουν :

- Η κοκκιωμάτωση με πολυαγγειίτιδα (Wegener's) : Νεκρωτική κοκκιωματώδης φλεγμονή που συνήθως περιλαμβάνει την άνω και κάτω αναπνευστική οδό, και νεκρωτική αγγειίτιδα που προσβάλλει κυρίως μικρά έως μεσαία αγγεία (π.χ. τριχοειδή αγγεία, φλεβίδες, αρτηρίδια, αρτηρίες και φλέβες).
- Το σύνδρομο Churg-Strauss: Πλούσια σε ηωσινόφιλα και κοκκώδη φλεγμονή με νέκρωση, που συχνά περιλαμβάνει την αναπνευστική οδό η νεκρωτική αγγειίτιδα προσβάλλει κυρίως μικρά έως μεσαία αγγεία και σχετίζεται με άσθμα και ηωσινοφιλία.
- Και η μικροσκοπική πολυαγγειίτιδα: Νεκρωτική αγγειίτιδα, με λίγες ή καθόλου ανοσολογικές εναποθέσεις, χωρίς κοκκιώματα, επηρεάζοντας κυρίως μικρά αγγεία (π.χ. τριχοειδή αγγεία, φλεβίδες ή αρτηρίες). Μπορεί να υπάρχει νεκρωτική αρτηρίτιδα που περιλαμβάνει μικρές και μεσαίες αρτηρίες (Yates & Watts, 2017).

Τα αυτοαντισώματα ANCA που διακρίνονται είναι :

- τα c-ANCA ή κυτταροπλασματικά ANCA που έχουν σαν κύριο στόχο τα πρωτοπαθή κοκκία που περιέχουν την πρωτεΐνωση 3 (Proteinase 3-PR3) και
- τα p-ANCA ή περιπυρηνικά που έχουν σαν στόχο την μυελοπεροξειδάση (Myeloperoxidase- MPO)

Το 90% των ασθενών με ενεργή κοκκιωμάτωση με πολυαγγειίτιδα Wegener's εμφανίζονται θετικοί για ANCA αυτοαντισώματα, χωρίς να αποκλείει μια αρνητική εξέταση την ύπαρξη της νόσου. Ειδικότερα ως επί το πλείστον έχουν PR3-ANCA, ενώ μόνο ένα 10% έχουν MPO-ANCA. Αντίθετα στην μικροσκοπική πολυαγγειίτιδα το 70% των ασθενών με θετική εξέταση για αυτοαντισώματα ANCA έχουν κατά 70-80% MPO-ANCA. Αυτοαντισώματα ANCA έναντι της πρωτεΐνης 3 και αυτοαντισώματα ANCA έναντι της μυελοπεροξειδάσης μπορεί να ανιχνεύονται και σε άλλες χρόνιες φλεγμονώδεις νόσους όπως είναι η ενδοκαρδίτιδα, HIV, ηπατίτιδα C όμως η παρουσία ταυτόχρονα και των δύο αυτοαντισωμάτων σε ασθενείς είναι πολύ σπάνιο και μπορεί να υποδηλώνει την ύπαρξη μιας φαρμακευτικά επαγόμενης αγγειίτιδας (Geetha & Jefferson, 2020).



Nature Reviews | Rheumatology

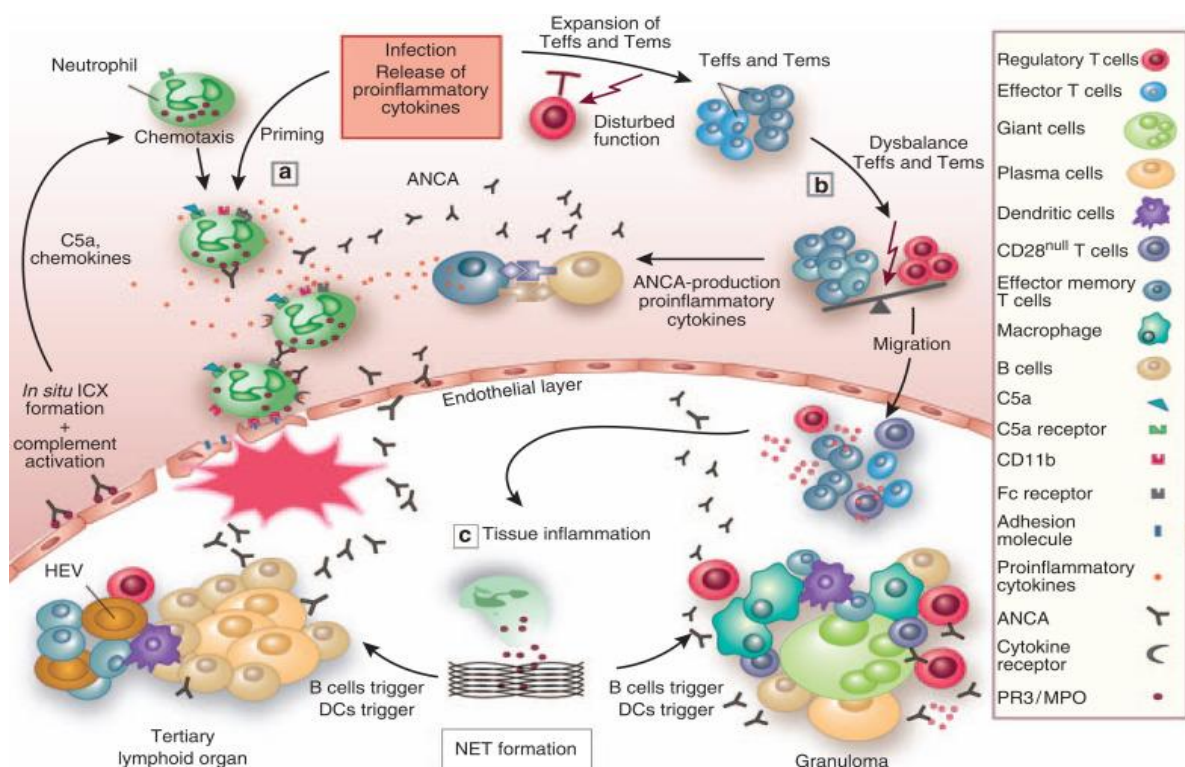
Διαφορές ανάμεσα στις πρωτεΐνες PR3 και MPO και στα αντισώματα ANCA που σχηματίζονται έναντι αυτών των πρωτεϊνών.

Δεν είναι γνωστές οι αιτίες της νόσου. Γενετικοί παράγοντες, όπως η έλλειψη α1-αντιθρυψίνης, φαίνονται να παίζουν ρόλο στην παθογένεια. Παράλληλα υπάρχουν ενδείξεις ότι λοιμώδεις παράγοντες, όπως λοιμώξεις από σταφυλόκοκκο, περιβαλλοντικοί παράγοντες, ή φάρμακα, παίζουν κάποιο ρόλο στην εμφάνιση των ANCA αγγειίτιδων.

Είναι μια σπάνια νόσος που χαρακτηρίζεται από φλεγμονή της ανώτερης και κατώτερης αναπνευστικής οδού, συστηματική αγγειίτιδα μικρού και μεσαίου μεγέθους αγγείων και νεκρωτική σπειραματονεφρίτιδα (φλεγμονή του σπειράματος των νεφρών). Οι ασθενείς εμφανίζουν μη ειδικά συμπτώματα, όπως πυρετός, καταβολή δυνάμεων, πόνος σε μύες και αρθρώσεις, χρόνια ρινίτιδα ή παραρρινοκολπίτιδα. Στο 85-90% των ασθενών παρατηρείται προσβολή πνευμόνων, που μπορεί ή να είναι ασυμπτωματική ή να εμφανίζει δύσπνοια, θωρακικό πόνο ή αιμόπτυση. Επίσης προσβολή των νεφρών, με την εμφάνιση σπειραματονεφρίτιδας, που μπορεί να

οδηγήσει ταχέως σε νεφρική ανεπάρκεια παρουσιάζεται στο 75-80% των ασθενών. Παράλληλα εμφανίζονται εκδηλώσεις από τους οφθαλμούς (επισκληρίτιδα, ραγοειδίτιδα), το δέρμα (οζίδια, εξελκώσεις), το νευρικό σύστημα (πολλαπλή μονονευρίτιδα) και σπάνια περικαρδίτιδα.

Η συνολική επίπτωση των ANCA αγγειίτιδων είναι περίπου 20 εκατομμύρια σε Ευρώπη και Βόρεια Αμερική. Η νόσος εμφανίζεται συνήθως σε ηλικία 65-74, αλλά μπορεί να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε ηλικία. Οι άντρες προσβάλλονται συχνότερα από τις γυναίκες, αλλά οι γυναίκες εμφανίζουν τη νόσο σε μικρότερη ηλικία.



Τα διάφορα μονοπάτια που οδηγούν στην παθογένεια της ANCA- αγγειίτιδας (Halbwachs & Lesavre, 2012)

Αναφέρονται δύο μονοπάτια (α και β) για την παθογένεια της νόσου με το δεύτερο μονοπάτι να είναι ακόμα υπό διερεύνηση. Όπως φαίνεται και στην παραπάνω εικόνα ή κοινή αρχή των δύο αυτών μονοπατιών είναι η ύπαρξη κάποιας μόλυνσης. Λοιμώξεις προκαλούν εκκίνηση ουδετερόφιλων (α), αύξηση της ρύθμισης των μορίων προσκόλλησης σε ενδοθηλιακά κύτταρα και επέκταση των κυκλοφορούντων τελεστικών Τ κυττάρων (β). Τα αρχικά ουδετερόφιλα δείχνουν αυξημένη επιφανειακή έκφραση αντιγόνων ANCA και μορίων προσκόλλησης. (Halbwachs & Lesavre, 2012)

Η δέσμευση ANCA ενεργοποιεί το ουδετερόφιλο με τους ακόλουθους τρόπους:

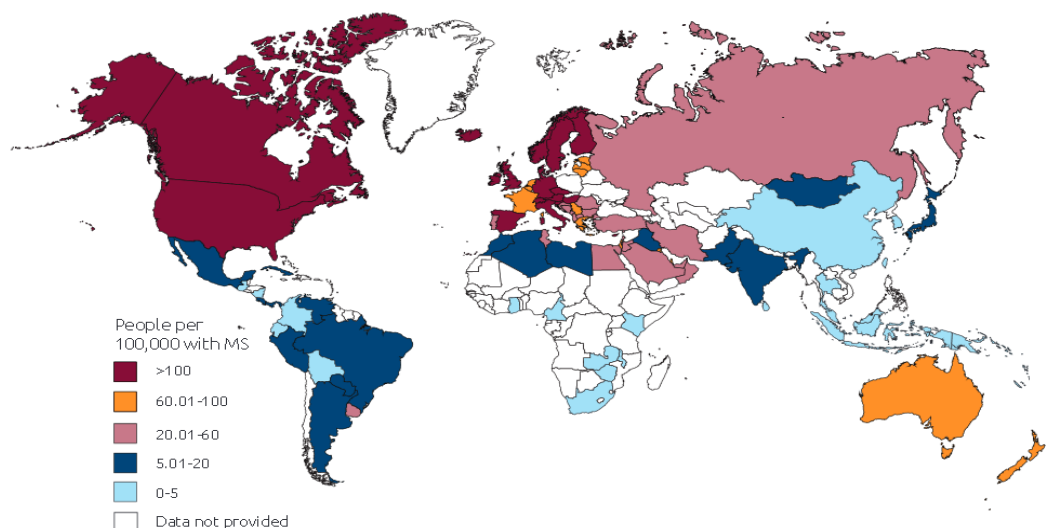
- 1) ενίσχυση της προσκόλλησης των τοιχωμάτων των αγγείων και της ικανότητας μετάδοσης.
- 2) παραγωγή και απελευθέρωση ριζών οξυγόνου, και
- 3) αποκοκκιοποίηση και απελευθέρωση ενζύμων συμπεριλαμβανομένης της μυελοϋπεροξειδάσης (MPO) και της πρωτεΐνης-3 (PR3) (α).

Τα παροδικά ανοσοσυμπλέγματα σχηματίζονται τοπικά με σύνδεση του ANCA σε PR3 / MPO που κολλά στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Στη συνέχεια, ενεργοποιείται το συμπλήρωμα, το οποίο προάγει περαιτέρω την αποκοκκιοποίηση των ουδετερόφιλων. Όλα αυτά προσθέτουν στην ανάπτυξη της νεκρωτικής αγγειίτιδας. Τα T κύτταρα μνήμης (Tems) δεν ρυθμίζονται επαρκώς από ρυθμιστικά T κύτταρα (Tregs, b). Αυτό οδηγεί σε ανισορροπία στην ομοιόσταση των Tregs και Tems, με αποτέλεσμα την περαιτέρω απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτοκινών που προάγουν την εκκίνηση ουδετερόφιλων (α). Επιπλέον, η παραγωγή ANCA ενισχύεται από περαιτέρω αλληλεπίδραση T-κυττάρων / B-κυττάρων. (γ) Τα εκτεταμένα κυκλοφορούντα Tems μεταναστεύουν σε όργανα-στόχους όπως οι πνεύμονες ή τα νεφρά. Μέσα στους ιστούς, τα Tems οδηγούν το σχηματισμό κοκκιώματος, ο οποίος θεωρείται «εκτελεστής» καταστροφής ιστών. Τα κοκκιώματα αποτελούνται από πολυάριθμους τύπους κυττάρων όπως T κύτταρα, B κύτταρα, γιγαντιαία κύτταρα και δενδριτικά κύτταρα (DCs). Επιπλέον, η παραγωγή ANCA συμβαίνει σε κοκκιώματα. Ενδεχομένως, τα τριτοταγή λεμφοειδή όργανα (TLOs) είναι «τοπικοί ελεγκτές» φλεγμονής ιστών, καθώς η επαγωγή Tregs θεωρείται ότι λαμβάνει χώρα σε TLOs. Ο σχηματισμός εξωκυτταρικής παγίδας ουδετερόφιλων (NET) εμφανίζεται σε βλάβες ως συνέπεια της απόπτωσης και της αποκοκκίωσης των ουδετερόφιλων. Οι πρωτεάσες DNA και σερίνης αναπτύσσονται σε αυτά τα NET. Τα προϊόντα που προέρχονται από NET ενεργοποιούν DC και B κύτταρα ανιχνεύοντας μέσω υποδοχέων τύπου Toll (TLR). Η παραγωγή ιντερφερόνης (IFN-α) από DC μπορεί να έχει αντίκτυπο στην τοπική ανοσολογική ρύθμιση. Έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τη λειτουργία των Treg.

Λόγω των ανεπιθύμητων παρενεργειών, κυρίως καταστολής του μυελού, αιμορραγική κυστίτιδα, λοιμώξεις, ψηλές δόσεις κορτικοστεροειδών και κυκλοφωσφαμίδη, χρησιμοποιούνται μόνο για την επαγωγή της ύφεσης της νόσου και έπειτα για την διατήρηση χρησιμοποιούνται άλλα φάρμακα με λιγότερες παρενέργειες όπως αζαθειοπρίνη και μεθοτρεξάτη.

1.8. Γενικά στοιχεία υποτροπιάζουσας/διαλείπουσας πολλαπλής σκλήρυνσης RRMS

Η σκλήρυνση κατά πλάκας διατυπώθηκε για πρώτη φορά το 19^ο αιώνα από τους Robert Carswell και τον Jean Cruveilhier ενώ αναγνωρίστηκε σαν ασθένεια το 1868 από την Jean-Martin Charcot. Προσβάλει 2 έως 3 φορές περισσότερο τις γυναίκες σε σχέση με τους άντρες. Συνήθως τα πρώτα συμπτώματα εμφανίζονται κατά την 3^η ή 4^η δεκαετία αλλά υπάρχει και νεανική σκλήρυνση κατά πλάκας που επηρεάζει άτομα από την ηλικία των 16 ετών (3 έως 10% των συνολικών περιπτώσεων). Σήμερα περισσότερα από 2,5 εκατομμύρια ανθρώπους έχουν την νόσο με μεγαλύτερη συχνότητα σε Βόρεια Αμερική, Βόρεια Ευρώπη και Νότια Αυστραλία και λιγότερο σε χώρες που βρίσκονται κοντά στον Ισημερινό π.χ. ο επιπολασμός της νόσου στη Σουηδία είναι 189 ανά 100000 ενώ στην Αλβανία 22 ανά 100000 (Msif.org, 2013).



Χάρτης επιπολασμού της πολλαπλής σκλήρυνσης (*Msisf.org, 2013*)

Η Πολλαπλή Σκλήρυνση αποτελεί μια ιδιοπαθή φλεγμονώδη νόσο του κεντρικού νευρικού συστήματος. Πιο συγκεκριμένα, αυτοδραστικά CD4(+) - κύτταρα μεταφέρονται μέσω του κυκλοφοριακού συστήματος και διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό CD4(+) - T λεμφοκυττάρων τύπου 1, τα οποία επιτίθενται εσφαλμένα σε ολιγοδενδροκύτταρα και στην συνέχεια την προσβολή της μυελίνης που σχηματίζεται από αυτά (*Sindic, 2002*).

Η μυελίνη δρα φυσιολογικά ως ένα ζωτικής σημασίας προστατευτικό και μονωτικό περίβλημα του νευράξονα των νευρικών ινών, καθώς βοηθά και την ενίσχυση της ταχύτητας μεταγωγής του σήματος από τον εγκέφαλο προς το σώμα και αντίστροφα, δημιουργώντας ειδικές δομές που ονομάζονται κόμβοι του Ranvier. Η απομυελίνωση των νευρικών ινών έχει σαν αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της ηλεκτρικής επικοινωνίας μεταξύ των νευρώνων ή κι την ολική διακοπή της.

Η παθογένεια της πολλαπλής σκλήρυνσης κατά πλάκας δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως αλλά υπάρχουν ενδείξεις ότι συντελείται τόσο από περιβαλλοντικούς όσο και από γενετικούς παράγοντες. Στους περιβαλλοντικούς παράγοντες ανήκουν η λοίμωξη από τον ιό Epstein-Barr (EBV) και η ανεπάρκεια της βιταμίνης D (*Garg & Smith, 2015*) καθώς και το κάπνισμα. Σε μελέτες που έγιναν σε μονοζυγωτικούς διδύμους υπάρχει μόνο 20 με 30% πιθανότητα να νοσήσει ο ένας όταν ο άλλος ήδη πάσχει (*Dobson & Giovannoni, 2019*), ενώ δεν είναι κληρονομήσιμη αλλά τα 2/3 των παιδιών ατόμων που πάσχουν με πολλαπλή σκλήρυνση είναι πιθανό να πάσχουν και αυτά στο μέλλον. Τα τελευταία χρόνια με την απόκτηση νέων μεθόδων έχει φανεί ότι επιγενετικές τροποποιήσεις όπως είναι η υπερμεθυλίωση CpG νησίδων σε HLA γενετικούς τόπους και άλλους 110 γενετικούς τόπους που δεν ανήκουν στα HLA παίζει μεγάλο ρόλο στην κληρονομησιμότητα της νόσου χωρίς όμως αυτό να μπορούν να το συσχετίσουν με τους διαφορετικούς φαινοτύπους της νόσου (*Hilven & Goris, 2015*).

Η μορφή της πολλαπλής σκλήρυνσης μπορεί να επηρεάσει τη συχνότητα εμφάνισης των συμπτωμάτων και την πρόγνωση της ασθένειας. Οι μορφές είναι οι εξής:

- **Υποτροπιάζουσα – Διαλείπουσα Πολλαπλή Σκλήρυνση (Relapsing - Remitting Multiple Sclerosis RRMS)**, η οποία αποτελεί την πιο συχνή μορφή πολλαπλής σκλήρυνσης (περίπου 85% των περιπτώσεων). Το σώμα είναι ικανό να αναστρέψει την καταστροφή της μυελίνης (επαναμυελίνωση) όμως η μυελίνη που παράγεται έχει διαφορετική σύσταση με αποτέλεσμα την δημιουργία «πλακών» ή απομυελινωτικών εστιών, ορατές στην MRI εγκεφάλου. Οι απομυελινωτικές εστίες μπορούν να αναπτυχθούν εντός μικρών ή μεγάλων χρονικών διαστημάτων με αποτέλεσμα την δημιουργία νέων ή την επιβάρυνση των ήδη υπαρχόντων συμπτωμάτων, το οποίο και αναφέρεται σαν υποτροπή ή ώση.
- **Δευτεροπαθώς προϊούσα μορφή Πολλαπλής Σκλήρυνσης (Secondary progressive Multiple Sclerosis)**, είναι ένας τύπος σκλήρυνσης κατά πλάκας που ακολουθεί την RRMS. Μέσα σε 10 με 15 χρόνια άτομα που διαγνώστηκαν με RRMS θα μεταβούν τελικά σε SPMS (μέχρι και το 80% των ατόμων) μετά από μια περίοδο υποτροπών και της ύφεσης έτσι εμφανίζεται μεγαλύτερη αξονική βλάβη και ατροφία τόσο σε λευκή όσο και σε γκρίζα ουσία.
- **Πρωτοπαθώς προϊούσα μορφή Πολλαπλής Σκλήρυνσης (Primary progressive Multiple Sclerosis)**, χαρακτηρίζεται από σταθερή επιδείνωση της νόσου χωρίς να υπάρχουν υποτροπές επηρεάζει το 10% των ασθενών και η επιδείνωση γίνεται αργά και σταθερά, αλλά ο ρυθμός και η βαρύτητα διαφέρει ανάμεσα στα άτομα.
- **Προϊούσα υποτροπιάζουσα σκλήρυνση κατά πλάκας** επηρεάζει μόνο το 5% των ασθενών με σκλήρυνση κατά πλάκας και χαρακτηρίζεται από σταθερή εξέλιξη της νόσου και επιδείνωση της μαζί με περιστασιακές υποτροπές.

Υλικά και μέθοδοι

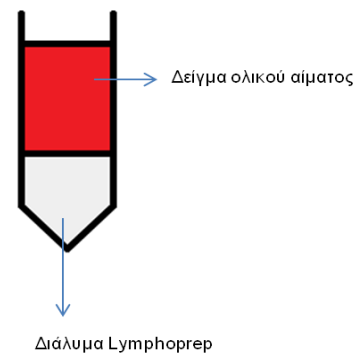
2.1. Απομόνωση και κρυσυντήρηση μονοπύρηνων λεμφοκυττάρων περιφερειακού αίματος (PBMC - Peripheral Blood Mononuclear Cells)

Υλικά- συσκευές και αντιδραστήρια

- Ηπαρινισμένη σύριγγα με λεπτή βελόνα των 20mL
- Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής
- Στείρα Falcon tube των 50mL
- Στείρα Falcon tube των 15mL
- Φυγόκεντρος
- Διάλυμα διαβάθμισης πυκνότητας Lymphoprep
- Θρεπτικό υλικό RPMI-1640
- Ορός εμβρύου μόσχου (FBS)
- Στείρες πιπέτες Pasteur
- Eppendorf tube των 2mL
- Διμεθυλοσουλφοξειδίο (DMSO)
- Cryovials
- Mr. Frosty Freezing δοχείο
- Ισοπροπανόλη
- Δεξαμενή υγρού αζώτου
- Υγρό άζωτο

Πειραματική διαδικασία

1. Η πειραματική διαδικασία ξεκινάει με την συλλογή και καταχώρηση βιολογικών δειγμάτων είτε από υγιείς ανθρώπους (δείγματα μάρτυρες- control), είτε από ασθενείς. Ειδικότερα λαμβάνονται 20mL αίματος χρησιμοποιώντας ηπαρινισμένη σύριγγα με λεπτή βελόνα (με πεταλούδα) και με αργή ροή.
2. Γίνεται μεταφορά των δειγμάτων σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής ώστε να αποφευχθεί η επιμόλυνση των δειγμάτων.





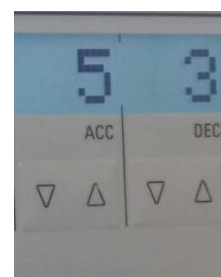
Επίστρωση αίματος

3. Σε ένα falcon tube των 50mL ,αφού αναγραφεί το σωστό ονοματεπώνυμο του δότη και ταυτοποιηθεί, προστίθενται 20mL διαλύματος Lymphoprep (αναλογία 1:1 ή 1:2 με 10 mL διαλύματος Lymphoprep) ώστε να υπάρχει καλός διαχωρισμός των συστατικών του αίματος.

4. Σιγά-σιγά προστίθενται και τα 20 mL αίματος σταγόνα-σταγόνα και προσεκτικά ώστε να μην διαρρηχτεί η επιφάνεια του διαλύματος Lymphoprep και αναμειχθεί με το αίμα. Αν αναμειχθούν τότε θα είναι αδύνατη η λήψη των λεμφοκυττάρων. Αυτό αποτελεί την διαδικασία της επίστρωσης.

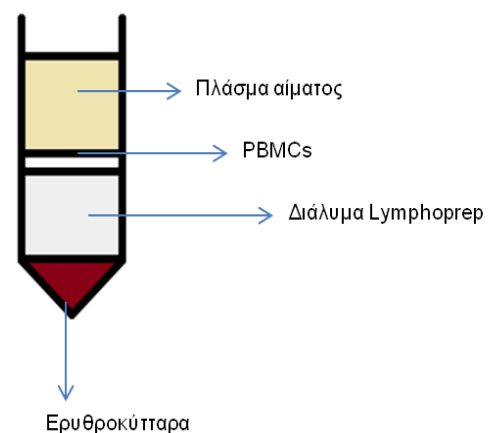
5. Το επόμενο βήμα είναι η τοποθέτηση των δειγμάτων στην φυγόκεντρο αντιδιαμετρικά και έχοντας τον ίδιο όγκο ή χρησιμοποιώντας αντίβαρα και η φυγοκέντρωση τους στις 1800-2000 στροφές/λεπτό για 20 λεπτά με χαμηλά φρένα (5/9 μέχρι να πιάσει τις κατάλληλες στροφές και 3/9 για να σταματήσει όσον το δυνατόν ομαλότερα ώστε να αποφευχθεί πιθανή διατάραξη στις στοιβάδας των λεμφοκυττάρων).

Σημείωση 1: Είναι απαραίτητα τα χαμηλά φρένα καθώς η απότομη λήξη της φυγοκέντρωσης μπορεί επίσης να οδηγήσει σε ρήξη της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων και αιμόλυση των δειγμάτων.

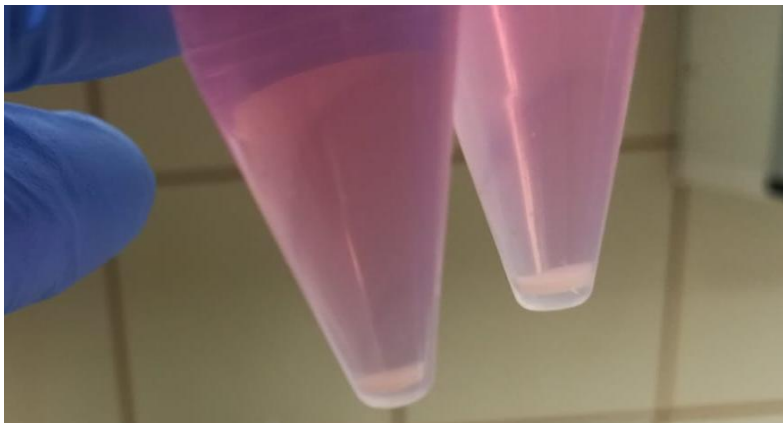


Συνθήκες φυγοκέντρωσης για την απομόνωση λεμφοκυττάρων

6. Κατά την διάρκεια αναμονής για την λήξη της φυγοκέντρωσης γίνεται αρχειοθέτηση των δειγμάτων (αύξοντας αριθμός, ονοματεπώνυμο, ημερομηνία, νόσημα αν υπάρχει ή όχι και άλλες κλινικές πληροφορίες) καθώς και αναγραφή του ονοματεπωνύμου στα tubes που θα χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια.



7. Απομάκρυνση των δειγμάτων από τη φυγόκεντρο και επιστροφή τους στο θάλαμο κάθετης νηματικής ροής.
8. Με μια στείρα πιπέτα Pasteur γίνεται η συλλογή του ορού σε 3 erpendorf tube των 2 mL και σε ένα falcon tube των 15 mL συλλέγεται την στοιβάδα των λεμφοκυττάρων (θολερή ζώνη) περίπου 3 έως 5 mL . Απορρίπτεται το περισσεύον διάλυμα Lymphorger σε ειδικό δοχείο για βιολογικά απόβλητα και τέλος συλλέγονται και τα ερυθροκύτταρα σε 1 erpendorf tube των 2mL.
9. Στο falcon tube που περιέχει τα λεμφοκύτταρα προστίθεται θρεπτικό υλικό RPMI μέχρι τα 15 mL και ξαναγίνεται φυγοκέντρηση ώστε να απορριφθούν τυχόν υπολείμματα του διαλύματος Lymphorger. Θεωρείται χρήσιμη η επανάληψη της πλύσης των κυττάρων για 1-2 φορές αλλά όχι παραπάνω ώστε να μην χαθούν πολύτιμα κύτταρα κατά τις πλύσεις. Η φυγοκέντρηση γίνεται στις 2500 στροφές /λεπτό για 5 λεπτά με φρένα 9 και 9



Ίζημα λεμφοκυττάρων μετά από πλύση με RPMI-1640 για να απομακρυνθεί το DMSO που περιέχονταν στο διάλυμα freezing

10. Απορρίπτεται το υπερκείμενο, χωρίς να επηρεαστεί το ίζημα που περιέχει τα λεμφοκύτταρα (pellet) που έχει σχηματιστεί. Μετά από αυτό το βήμα μπορούν τα κύτταρα να χρησιμοποιηθούν απευθείας σε πειράματα κυτταροκαλλιέργειας και κυτταρομετρίας ροής ή να αποθηκευτούν για μελλοντικά πειράματα.
11. Για την αποθήκευση των δειγμάτων προστίθεται διάλυμα κρυσυντήρησης (freezing medium) με σύσταση 70% FBS, 20% RPMI-1640, 10% DMSO για να επαναιωρηθούν τα κύτταρα. Ανάλογα αν υπάρχουν πολλά ή λίγα κύτταρα θα προστεθούν 3 έως 4mL.

Σημείωση 2: Το διάλυμα freezing είναι απαραίτητο για την ελαχιστοποίηση απόπτωσης και μακροπρόθεσμης συντήρησης βιώσιμων κυττάρων στο υγρό άζωτο, ενώ το DMSO σε αυτή τη μικρή συγκέντρωση έχει κρυσπροστατευτικό ρόλο.

Σημείωση 3: Το εμπορικά διαθέσιμο FBS εφόσον δεν αναγράφεται, απενεργοποιείται σε υδατόλουτρο στους 56°C για 30 λεπτά (heat inactivation). Στη συνέχεια, διαμοιράζεται σε αποστειρωμένα falcon tubes των 50mL σε στείρες συνθήκες, αφού πρώτα διηθηθεί από αποστειρωμένο φίλτρο. Φυλάσσεται στους -20°C.

12. Αφού επαναιωρήσουμε τα κύτταρα στο διάλυμα freezing, προσθέτουμε από 1 mL σε κάθε cryovial (διατηρούνται 3 έως 4 aliquots κατά μέσο όρο) και τα τοποθετούμε στο Mr. Frosty Freezing δοχείο.

Σημείωση 4: Το Mr. Frosty Freezing δοχείο είναι ένα ειδικό δοχείο που περιέχει ισοπροπανόλη, η οποία έχει την ιδιότητα να ρίχνει την θερμοκρασία $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ όταν τα τοποθετούμε αρχικά σε βαθιά καταψύξη στους -80°C (ελάχιστο χρονικό διάστημα 24 ωρών) και στην συνέχεια σε βαθμονομημένα κουτιά στη δεξαμενή του υγρού αζώτου. Η διαδικασία αυτή ελαχιστοποιεί την πιθανότητα τα κύτταρα να υποστούν σοκ και απόπτωση από την απότομη αλλαγή της θερμοκρασίας.

2.2. Μέτρησης βιωσιμότητας κυττάρων μέσω χρώσης με trypan blue

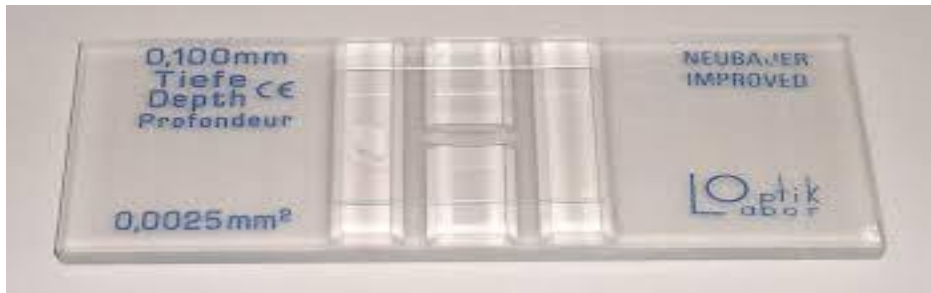
Υλικά-συσσκευές και αντιδραστήρια

- Θρεπτικό υλικό RPMI-1640
- Στείρα Falcon tube των 15mL
- Φυγόκεντρος
- Οπτικό μικροσκόπιο
- Διάλυμα 0,4% χρώση Trypan blue
- Αιματοκυτόμετρο Neubauer
- Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής
- Μικροπιπέτες (0.5-10.0 μL , 20-200 μL , 100-1000 μL)

Πειραματική διαδικασία

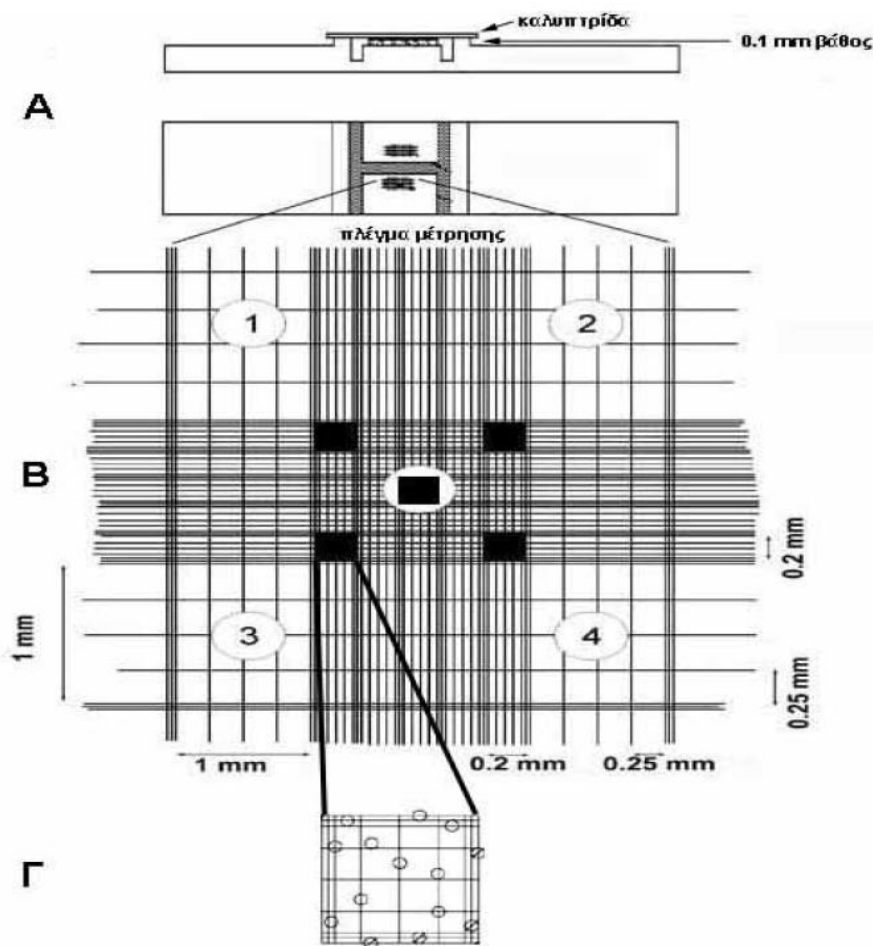
1. Αρχικά γίνεται η μεταφορά των κυττάρων από τη δεξαμενή του υγρού αζώτου στο θάλαμο κάθετης νηματικής ροής και σταδιακή απόψυξη τους.
2. Γίνεται πλύση των κυττάρων με 5 mL θρεπτικού υλικού RPMI-1640 σε ένα falcon tube των 15mL όπου αναγράφεται και το ονοματεπώνυμο του δότη και στη συνέχεια πραγματοποιείται φυγοκέντρηση του δείγματος στις 2500 στροφές/λεπτό για 5 λεπτά.
3. Αφαίρεση του υπερκείμενου και επαναιώρηση σε 1mL complete medium.
4. Χρησιμοποιώντας μια πιπέτα μεταφέρουμε 10 μL από τα κύτταρα σε ένα erpendorf και προσθέτουμε 90 μL από το trypan blue.

- Χρήση αντικειμενοφόρου πλάκας Neubauer και τοποθέτησης καλυπτρίδας από πάνω.



Αντικειμενοφόρος πλάκα Neubauer

- Φόρτωση 10μL του εναιωρήματος των κυττάρων όπου έχει γίνει χρώση στο αιματοκυτόμετρο Neubauer προσεκτικά στο χώρο ανάμεσα του πλέγματος και της καλυπτρίδας ύψους περίπου 0,1mm και παρατήρηση στο μικροσκόπιο.

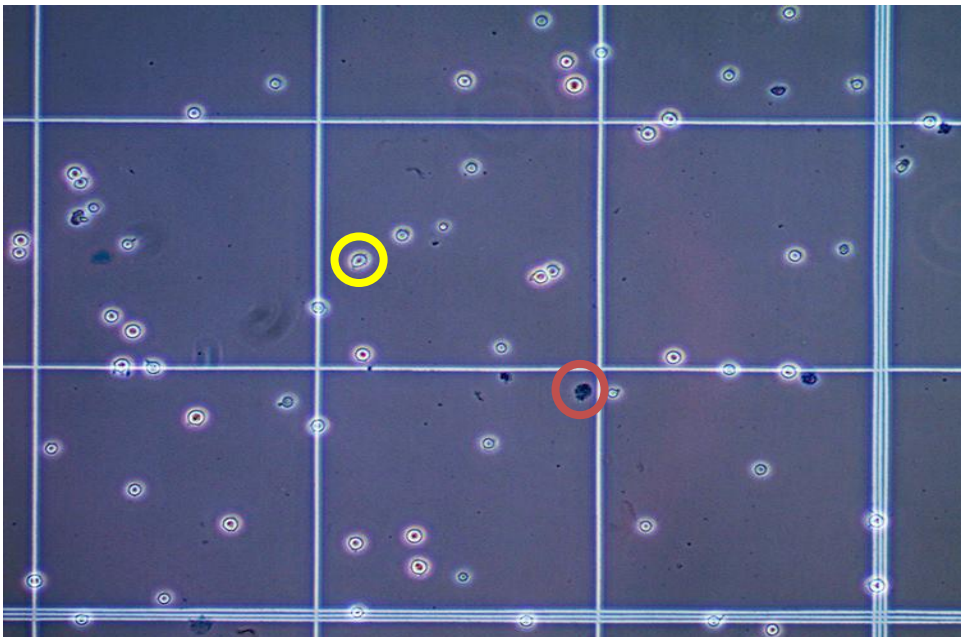


Εικόνα 1. Στην εικόνα (A) εμφανίζεται το αιματοκυτταρόμετρο Neubauer από την πλάγια όψη του καθώς και . Στην (B) εικόνα υπάρχει η μεγέθυνση του ώστε να διακρίνονται τα μεγάλα τετράγωνα 1,2,3,4 στα οποία μετριοούνται τα λεμφοκύτταρα λόγω του μεγάλου τους μεγέθους και τα μικρά μαύρα τετράγωνα, όπου μετριοούνται τα ερυθρά κύτταρα.

7. Γίνεται μέτρηση του αριθμού των κυττάρων στο μικροσκόπιο (εστίαση με φακό 10x ή 20x, μέτρηση με 40x). Καταγράφεται ο αριθμός των ζωντανών και νεκρών κυττάρων. Τα ζωντανά κύτταρα εμφανίζονται ως "φωτεινά" ενώ τα νεκρά χρωματίζονται μπλε.
8. Ο συνολικός αριθμός των κυττάρων του δείγματος υπολογίζεται ως εξής:

$$\text{Συνολικός αριθμός κυττάρων} = (\text{αριθμός κυττάρων}) \times (\text{αραίωση}) \times 10^4$$

Σημείωση 1: Η βαφή Trypan blue είναι υδρόφιλη και εισέρχεται στο κύτταρο μόνο όταν η κυτταρική μεμβράνη έχει σπές (νέκρωση κυττάρου). Η βαφή Trypan blue είναι τοξική και καρκινογόνος, για αυτό το λόγο πρέπει να χρησιμοποιούνται γάντια και μάσκα κατά τη χρήση της.



Σε αυτήν την εικόνα απεικονίζεται από μικροσκόπιο ένα από τα μεγάλα τετράγωνα της Neubauer . Με κίτρινη επισήμανση είναι ένα παράδειγμα ζωντανού κυττάρου , ενώ με κόκκινη ενός νεκρού.

2.3. Πρωτόκολλο Πολυπαραμετρικής Κυτταρομετρίας Ροής (Cell surface staining and Intracellular Cytokines Flow Cytometry)

2.3.1. Καλλιέργεια PBMCs

Υλικά-συσσκευές και αντιδραστήρια

- Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής

- Στείρα Falcon tubes των 15mL
- Θρεπτικό μέσο RPMI-1640
- Στείρες πιπέτες Pasteur
- Φυγόκεντρος
- Ορός εμβρύου μύσχου (FBS)
- Μικροπιπέτες (0.5-10.0 μ L, 20-200 μ L, 100-1000 μ L)
- Στείρο πιάτο καλλιέργειας με 24 θέσεις του 1mL

Πειραματική διαδικασία

1. Το πρώτο βήμα για το συγκεκριμένο πρωτόκολλο είναι η επιλογή του κατάλληλου δείγματος από την δεξαμενή του υγρού αζώτου με βάση τα κλινικά χαρακτηριστικά.
2. Γίνεται μεταφορά των δειγμάτων στον θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, όσο το δυνατόν πιο γρήγορα, ώστε να υπάρχουν στείρες συνθήκες. Μόλις τα δείγματα απομακρυνθεί από τη δεξαμενή του υγρού αζώτου πρέπει να ανοιχτεί ελάχιστα το φιαλίδιο cryovial στο οποίο περιέχεται και να απελευθερωθεί το υγρό άζωτο που πιθανώς έχει παγιδευτεί.
3. Ετοιμασία τόσων στείρων falcon tubes των 15 mL όσα και τα επιλεγμένα δείγματα γράφοντας το ονοματεπώνυμο του δότη ώστε να μην μπερδευτούν τα δείγματα.
4. Προστίθενται 5 mL από το θρεπτικό υλικό RPMI-1640 σε κάθε falcon tube το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για να αραιωθεί το DMSO που βρίσκεται στο διάλυμα, που είχε προστεθεί στο τελικό βήμα της διαδικασίας απομόνωσης και αποθήκευσης των λεμφοκυττάρων για να μειώσουμε τον κυτταρικό θάνατο. Σε υψηλές συγκεντρώσεις το DMSO από κρυοπροστατευτικό μετατρέπεται σε τοξικό για τα κύτταρα.
5. Απορρίπτονται με την βοήθεια μιας στείρας πιπέτας Pasteur 1mL από τα 5mL του RPMI-1640 σιγά σιγά στο cryovial και γίνεται ανάδευση με αργές κινήσεις.
6. Μεταφέρονται τα επαναιωρημένα κύτταρα στο falcon tube μαζί με τα άλλα 4 mL RPMI-1640 ($V_{\text{TEΛ}}$ περίπου 6 mL) και φυγοκεντρώνονται στις 2500 στροφές ανά λεπτό για 5 min.

Σημείωση 1: Για να πραγματοποιηθεί αξιόπιστη φαινοτυπική και λειτουργική ανάλυση των σπανίων κυτταρικών υποπληθυσμών είναι απαραίτητη η ύπαρξη τουλάχιστον 5×10^5 - 1×10^6 κυττάρων ανά δείγμα.

7. Αφαιρείται προσεκτικά το υπερκείμενο και προστίθενται 100 μ L από θρεπτικό υλικό RPMI στο οποίο έχουν προστεθεί (10% v/v FBS, 90% v/v RPMI-1640, 10 μ L διάλυμα πενικιλίνης και στρεπτομυκίνης-complete medium) επί των αριθμού των δειγμάτων που θα καλλιεργηθούν και γίνεται πάλι επαναιώρηση των κυττάρων.

8. Επίσης τοποθετούνται και από 900μL από το complete medium και στα πηγαδάκια που θα χρησιμοποιηθούν για να έχουν τελικό όγκο σε αυτά 1mL ($V_{TEΛ}=1mL$).

2.3.2. *In vitro* Επώαση των PBMCs με αλοΐνη

Υλικά-συσσκευές και αντιδραστήρια

- Διμεθυλοσουλφοξειδίο (DMSO)
- Αλοΐνη 500mg λυοφιλιωμένη (Cayman Chemical, $\geq 95\%$ καθαρότητα)
- Διάλυμα PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate)
- Διάλυμα ιονομυκίνης
- Διάλυμα Μπρεφελντίνης
- Θρεπτικό μέσο RPMI-1640
- Μικροπιπέτες (0.5-10.0 μ L, 20-200 μ L, 100-1000 μ L)
- Θάλαμος επώασης CO₂

Πειραματική διαδικασία

1. Αρχικά προετοιμάστηκαν διαφορετικές σειριακές αραιώσεις του αρχικού διαλύματος αλοΐνης (σημείωση 1) ώστε να μελετηθούν οι επιθυμητές *in vitro* τελικές συγκεντρώσεις

Σημείωση 1: Χρησιμοποιήθηκε διάλυμα αλοΐνης (master stock) με αρχική συγκέντρωση 30 mg/mL σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρίας (Cayman Chemical) για την διαλυτότητα αλοΐνης σε 1 mL DMSO.

Αρχική συγκέντρωσης αλοΐνης	Τελική συγκέντρωση αλοΐνης	Ποσότητα αλοΐνης σε μ L στο 1 mL καλλιέργειας
Διάλυμα stock αλοΐνης 33mg/mL σε DMSO	300 μ g/mL	9,99
	200 μ g/mL	6,66
	100 μ g/mL	3,33
	50 μ g/mL	1,66
Αραιωμένο διάλυμα stock αλοΐνης 1:100 σε RPMI-1640	10 μ g/mL	33,33
	1 μ g/mL	3,33

2. Γίνεται επώαση των PBMCs παρουσία αλοΐνης στις επιθυμητές τελικές συγκεντρώσεις για το επιλεγμένο χρονικό διάστημα (πχ 30 λεπτά) και στη συνέχεια δεύτερη ενεργοποίηση για 5 ώρες με στόχο την παραγωγή κυτοκινών. Για την δεύτερη ενεργοποίηση χρειαζόμαστε διάλυμα PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate) και Ionomycin (σημειώσεις 2 και 3).

Σημείωση 2: Το PMA έχει μια δομή ανάλογη προς την διακυλογλυκερόλη, το οποίο διαχέεται μέσω της κυτταρικής μεμβράνης στο κυτταρόπλασμα. Έτσι ενεργοποιεί άμεσα την πρωτεϊνική κινάση C (PKC) (αλλοστερικός ενεργοποιητής) και φωσφορικά της ινοσιτόλης, τα οποία ενεργοποιούν την Ca^{2+} -απελευθέρωση και κινητοποίηση, με αποτέλεσμα ένα καταρράκτη κυτταρικών αποκρίσεων που προκαλούν την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων (σηματοδότηση NFAT παραγωγή και έκκριση IL-2).

Αρχική συγκέντρωση PMA	Τελική συγκέντρωση PMA	Ποσότητα σε μ L
5 μ g/mL	20 ng/ML	4

Σημείωση 3: Η ιονομυκίνη είναι επίσης ένα αντιβιοτικό το οποίο δεσμεύει ιόντα ασβεστίου. Χρησιμοποιείται ευρέως στην έρευνα με σκοπό να αυξήσει τα ενδοκυτταρικά επίπεδα ασβεστίου, διαδικασία μεγάλης σημαντικότητας για τη μετάδοση του μηνύματος στα T λεμφοκύτταρα και την ολοκλήρωση επιτυχώς του σηματοδοτικού μονοπατιού που θα έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των κυττάρων αυτών.

Αρχική συγκέντρωση IONO	Τελική συγκέντρωση IONO	Ποσότητα σε μ L
1 mg/mL	1 μ g/mL	1

3. Κατά το χρονικό διάστημα των 5 ωρών επίσης προστίθεται και διάλυμα μπρεφελδίνης (σημείωση 4)

Σημείωση 4: Πρόκειται για μια αντι-ική λακτόνη που παράγεται από τον *Eurepicillium brefeldianum*. Η μπρεφελδίνη είναι αναστολέας πρωτεϊνικών μεταφορέων ,που αποκλείει την έκκριση πρωτεϊνών από τα κύτταρα μέσω της συσκευής Golgi ,προκαλώντας έτσι τη συσσώρευση κυτοκινών στο ενδοπλασματικό σύστημα.

Αρχική συγκέντρωση μπρεφελδίνης	Τελική συγκέντρωση μπρεφελδίνης	Ποσότητα σε μ L
5 mg/mL	5 μ g/mL	1

4. Το πιάτο της καλλιέργειας τοποθετείται για 5 ώρες στον θάλαμο επώασης στους 37°C και υπό συνθήκες 5% CO₂

2.3.3. Επώαση με μονοκλωνικά αντισώματα

Υλικά-συσσκευές και αντιδραστήρια

- Διάλυμα PBS (Phosphate Buffered Saline)
- Ορός εμβρύου μόσχου (FBS)
- Fixing buffer (1:4 fix concentrate & fix diluent)

- Permeabilization buffer 10X (Perm buffer)
- Μονοκλωνικά αντισώματα σημασμένα με φθοριοχρώματα
- Μικροπιπέτες (0.5-10.0 μL , 20-200 μL , 100-1000 μL)
- Eppendorf tubes σε αριθμό ανάλογο με τα points του εκάστοτε πειράματος
- Φυγόκεντρος
- Στείρα σύριγγα των 20 mL
- Διάλυμα παραφορμαλδεΐδης (PFA)

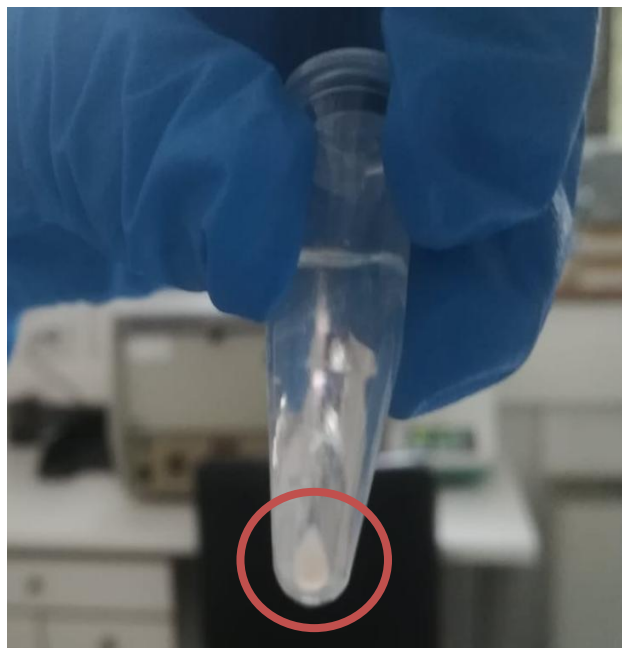
Πειραματική διαδικασία

1. Κατά την διάρκεια της ενεργοποίησης , ετοιμάζεται 50mL FACS buffer (1X PBS + 2% v/v FBS ή FCS).

Σημείωση 1: Στο FACS buffer (Flow Cytometry Staining Buffer) ως κύριο συστατικό χρησιμοποιείται το FBS ή FCS (Fetal Bovine ή Calf Serum) ως παράγοντας blocking agent ώστε να ελαχιστοποιηθεί η μη ειδική σύνδεση και να μεγιστοποιηθεί η ειδικότητα των προς χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων .

Σημείωση 2: Το PBS (Phosphate Buffered Saline) είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται συχνά σε βιολογικές εφαρμογές , όπως πλύσεις κυτάρων , μεταφορά ιστών και αραιώσεις . Το PBS μιμείται στενά τις συγκεντρώσεις των ιόντων , του pH και τις ακριβείς μοριακές συνθήκες του ανθρώπινου αίματος (pH περίπου ίσο με 7,4).

2. Μετά το πέρας της επώασης , γίνεται ανάδευση της καλλιέργειας των κυτάρων εντός των wells (πηγαδάκια) και μεταφέρεται όλος ο όγκος σε eppendorf tubes των 1,5mL.
3. Γίνεται φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 5000 στροφές ανά λεπτό για 4 λεπτά για να καθιζάνουν τα κύτταρα.
4. Απορρίπτεται το υπερκείμενο και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 800mL FACS buffer στα πλαίσια της πρώτης πλύσης. Γίνεται πάλι φυγοκέντρηση και απόρριψη του υπερκειμένου με την χρήση σύριγγας, ώστε να υπάρχει όσο το δυνατό μικρότερη απώλεια κυττάρων



Pellet κυττάρων ,από μια συνθήκη ,μετά απο φυγοκέντρηση, σε ένα από τα πειράματα που έγιναν

κατά τη πλύση.

5. Ακολουθείται δεύτερη πλύση με FACS buffer και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε τελικό όγκο 100μL στα tubes.
6. Τα επιλεγμένα μονοκλωνικά αντισώματα συζευγμένα με διαφορετικά φθοριοχρώματα προστίθενται σε βελτιστοποιημένες τελικές συγκεντρώσεις που έχουν προ-επιλεγεί μετά από πειράματα ειδικότητας και ευαισθησίας ανάλογα τον αριθμό των κυττάρων σε μικρό όγκο. Στη συνέχεια τα κύτταρα συμπληρώνονται με άλλα 100μL FACS buffer, γίνεται καλή επαναιώρηση και τοποθετούνται στους 4°C για τουλάχιστον 30 - 40 λεπτά.

Αντισώματα	Φθοριόχρωμα	Εταιρεία	Ποσότητα σε μL
Mouse anti-Human CD3	FITC	BD Biosciences, USA	4
Mouse anti-Human CD56	PE-Cy7	BD Biosciences, USA	1
Anti-Human CD4	PE	EMD Millipore, USA	1
Anti-IFNG/Interferon gamma mouse IgG1	APC	Origene Tech, GmbH Germany	1,5

Σημείωση 3: Anti-Human CD3: Αντιδρά με την υπομονάδα CD3ε του ανθρώπινου T-cell receptor που βρίσκεται στην επιφάνεια των ώριμων T-λεμφοκυττάρων, των Natural Killer T-cells και σε κάποια θυμοκύτταρα.

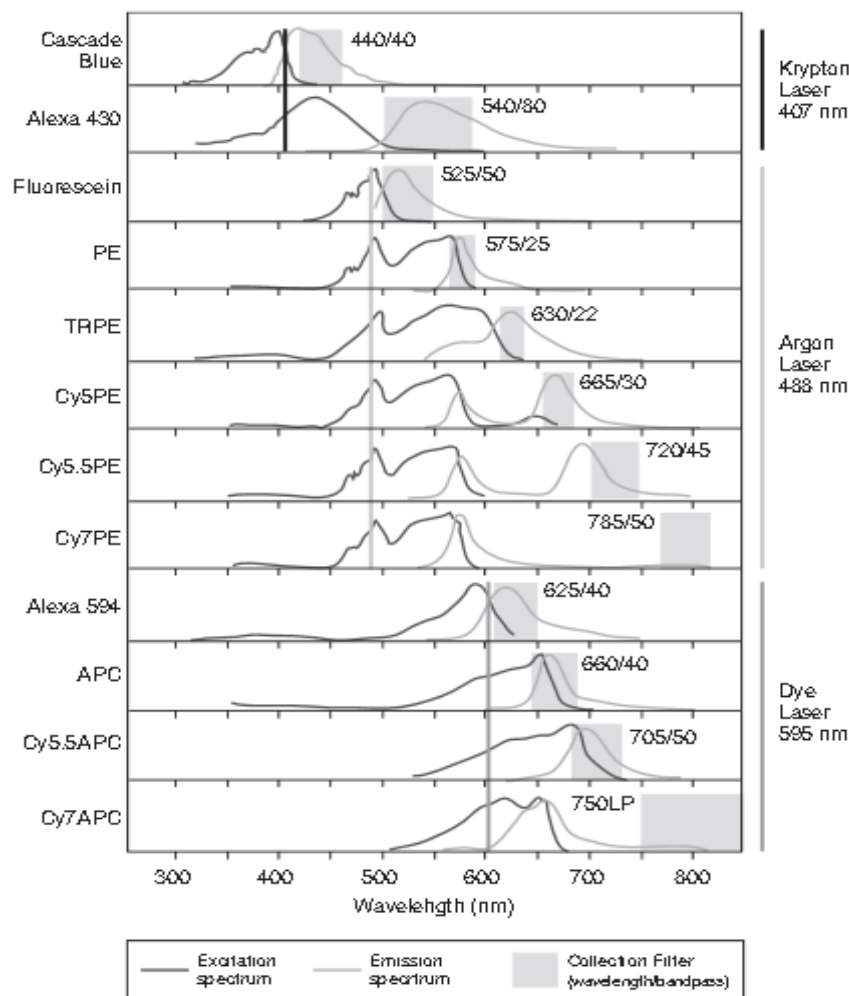
Σημείωση 4: Anti-Human CD56: Το CD56 είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη που είναι επίσης γνωστή ως NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule, μόριο προσκόλλησης νευρικών κυττάρων) ,Leu-19 ή NKH1. Είναι μέλος της υπερικογένειας Ig και εκφράζεται σε NK και NK-T κύτταρα.

Σημείωση 5: Anti-Human CD4: Το CD4 είναι γνωστό επίσης ως T4, μια γλυκοπρωτεΐνη, που εκφράζεται στα περισσότερα θυμοκύτταρα και ένα σύνολο των T-λεμφοκυττάρων (T-βοηθητικά) και στα μονοκύτταρα –μακροφάγα . Το CD4 ανήκει στην υπερικογένεια Ig και σχετίζεται με μόρια MHC τάξης II .Πρωταρχικός υποδοχέας του HIV και αλληλεπιδρά με την IL-16.

7. Μετά από 30 λεπτά συμπληρώνονται ξανά στα erpendorf tubes 800μL FACS buffer και γίνεται πλύση ώστε να απομακρυνθεί από τα κύτταρα η περίσσεια των αντισωμάτων που δεν έχουν συνδεθεί με τον επίτοπο. Φυγοκεντρούμε στις 5000 στροφές/λεπτό για 4 λεπτά .
8. Αφαιρείται το υπερκείμενο και γίνεται προσθήκη 150μL PFA (paraformaldehyde) 2% σε 1X PBS για να γίνει η μονιμοποίηση και αφήνονται σε ένα σκοτεινό μέρος / θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.

Σημείωση 6: Η μονιμοποίηση στοχεύει στην διατήρηση της επιφανειακής σύνδεσης των αντισωμάτων στους επιτόπους που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη ώστε στη συνέχεια να προχωρήσουμε στην διάτρηση των κυττάρων και την πρόσθεση του ειδικού αντισώματος για την ανίχνευση της ενδοκυττάριας ιντερφερόνης –γ.

9. Μετά από τα 10 λεπτά 700 μL FACS buffer εισάγονται για να απομακρυνθεί το PFA και γίνεται φυγοκέντρηση πάλι στις 4000 στροφές για 4 λεπτά.
10. Αφαιρείται το υπερκείμενο και γίνεται επαναιώρηση σε 200μL FACS buffer .
11. Σε αυτό το στάδιο μπορεί το πείραμα να σταματήσει και να γίνει αποθήκευση των δειγμάτων στους 4°C ,για το πέρας της νύχτας (τουλάχιστον 12 ώρες “overnight”) σε σκοτεινό μέρος ώστε να συνεχιστεί την επόμενη μέρα.



Χαρακτηριστικά των συνηθέστερων φθοριοχρωμάτων που χρησιμοποιούνται στην κυτταρομετρία ροής κι οι αντίστοιχες πηγές LASER (Herzenberg, 2004)

12. Το επόμενο πρωί αποσύρονται τα δείγματά από το ψυγείο και προστίθενται 700μL FACS buffer για γίνει πλύση.
13. Φυγοκεντρώνονται στις 5000 στροφές/λεπτό για 4 λεπτά και αφαιρείται το υπερκείμενο.

14. Για να γίνει διαπερατή η κυτταρική μεμβράνη σε αντισώματα για την ανίχνευση της ενδοκυττάριας κυτοκίνης ιντερφερόνης- γ προστίθενται 200 μ L από το εμπορικά διαθέσιμο permealization buffer (BD Biosciences) . Ακολουθεί επαναιώρηση ,ελαφρύ vortex και επώαση για 15 λεπτά στους 4^o C.

Σημείωση 7: Το permealization buffer περιέχει 0,4% σαπωνίνη, το οποίο χρησιμοποιείται σαν απορρυπαντικό που δημιουργεί πώρους στην κυτταρική μεμβράνη αντιστρέψιμα. Χρησιμοποιείται για τη διαπερατότητα των κυττάρων μετά την μονιμοποίηση. Παρέχεται σαν συμπυκνωμένο διάλυμα 10X και πρέπει να αραιώνεται σε απιονισμένο νερό πριν την χρήση του ή ιδανικότερα σε water for injection (wifi).

15. Στη συνέχεια συμπληρώνονται επιπλέον 300 μ L από το permealization buffer και φυγοκεντρούνται για 4 λεπτά στις 5000 στροφές/λεπτό.

Σημείωση 8: Συνεχίζουμε να χρησιμοποιούμε το permealization buffer ώστε να παραμένουν οι πώροι που έχουν δημιουργηθεί στην κυτταρική μεμβράνη ανοιχτές.

16. Γίνεται αφαίρεση του υπερκειμένου για άλλη μια φορά μέχρι τα 100 μ L στα tubes και προσθήκη του αντισώματος της ιντερφερόνης- γ . Γίνεται επαναιώρηση με επιπλέον 100 μ L permealization buffer και επωάζονται για 45 λεπτά ,σε θερμοκρασία δωματίου υπό σκότος .

Σημείωση 9: Η ιντερφερόνη γ είναι μια ισχυρή πολυλειτουργική κυτοκίνη, η οποία εκκρίνεται κυρίως από ενεργοποιημένα NK και T κύτταρα. Η παραγωγή IFN- γ ενεργοποιείται από ειδικά αντιγόνα ή μιτογόνα μέσω του υποδοχέα αντιγόνων του T κυττάρου. Η IFN- γ ανήκει στις ιντερφερόνες τύπου II που ονομάζεται επίσης ανοσοποιητική IFN. Παρουσιάζει αντί-ιική δραστηριότητα και έχει ανοσορυθμιστικές λειτουργίες. Είναι ισχυρός ενεργοποιητής των μακροφάγων και έχει αντιπλλασιαστικά αποτελέσματα. Ενεργοποιώντας τα μακροφάγα ενισχύει την ικανότητά τους να θανατώνουν τα βακτηρίδια, τα παράσιτα και τους όγκους, ενώ είναι απαραίτητη για την εξάλειψη των βακτηρίων που αναδιπλασιάζονται εντός των φαγοσωμάτων των μακροφάγων (π.χ. Mycobacteria και Lysteria monocytogenes). Η IFN- γ μπορεί επίσης να ενεργοποιήσει ουδετερόφιλα και NK κύτταρα και μπορεί να ρυθμίζει την έκφραση των αντιγόνων MHC τάξης I και II από κύτταρα που παρουσιάζουν το αντιγόνο. Η κύρια δράση της IFN- γ είναι η προαγωγή της διαφοροποίηση των Th κυττάρων προς Th-1 και η αναχαίτιση της επέκτασης του Th2 πληθυσμού, με την δράση αυτή να διεκπεραιώνεται μέσω αύξησης παραγωγής IL-12 από μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα που θα οδηγήσει σε ενεργοποίηση του υποδοχέα των T κυττάρων.

17. Μετά από 45 λεπτά επώασης με το αντίσωμα της ιντερφερόνης- γ προστίθενται 600 μ L permealization buffer για να απομακρυνθεί η περίσσεια του αντισώματος.

18. Φυγοκεντρούνται τα δείγματα στις 5000 στροφές ανά λεπτό για 4 λεπτά για να γίνει πάλι πλύση και αφαιρείται για τελευταία φορά το υπερκείμενο μέχρι να μείνουν περίπου 100-150 μ L ανάλογα με το μέγεθος του ιζήματος των κυττάρων .

19. Γίνεται προσθήκη περίπου 350-400μL PBS 1X ώστε να έχουμε τελικό όγκο 500μL ($V_{\text{ΤΕΛ}}=500\mu\text{L}$).
20. Το κυτταρόμετρο μπαίνει σε λειτουργία και ρυθμίζεται χρησιμοποιώντας λίγα μL δείγματος κυττάρων που είναι χωρίς ενεργοποίηση και χωρίς χρώση αντισωμάτων (untreated cells).
21. Το τελευταίο βήμα του πρωτοκόλλου είναι η ανάλυση των δειγμάτων στο κυτταρόμετρο.

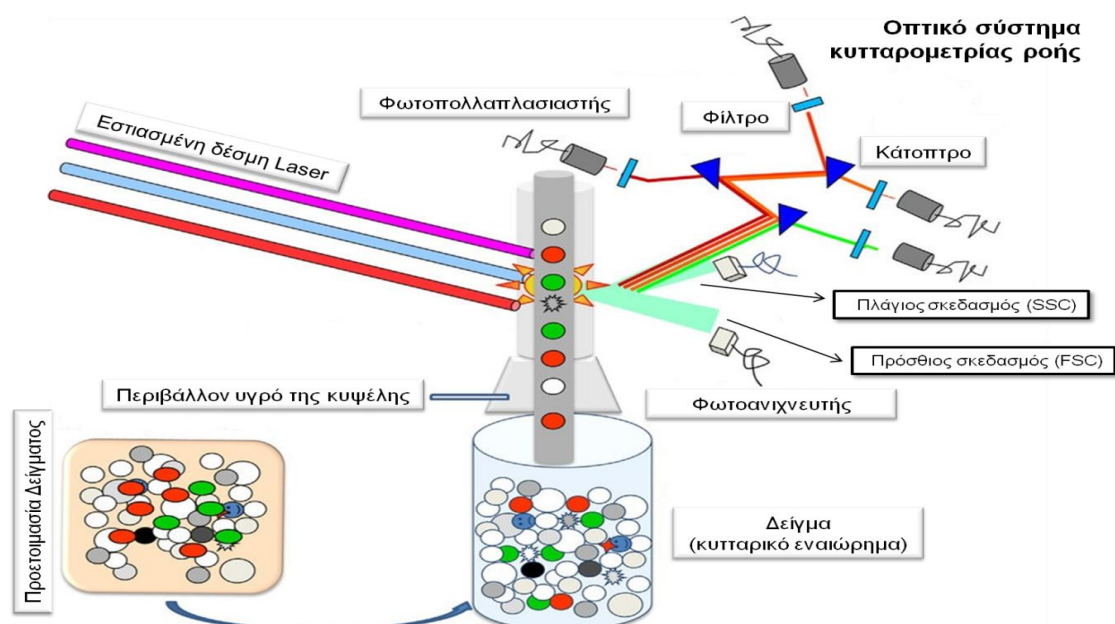
2.3.4. Κυτταρομετρία ροής

Η κυτταρομετρία ροής είναι μια εύκολη και σχετικά γρήγορη διαδικασία, η οποία επιτρέπει την πολυμετρική ανάλυση σωματιδίων από 0,5 έως 50μm. Χρησιμοποιείται πολλές φορές στη διάγνωση κάποιας νοσηρότητας ύστερα από την κλινική εξέταση, ενώ παράλληλα μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε ερευνητικά πειράματα όπως για τη μελέτη ευκαριωτικών κυττάρων (μέγεθος, ένταση φθορισμού (MFI – mean fluorescence intensity)), βακτηρίων ή και χρωμοσωμάτων.



Κυτταρόμετρο GUAVA, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα αυτής της εργασίας

Σχηματική απεικόνιση του διαχωρισμού των κυττάρων με βάση τα φθοριοχρώματα, με τα οποία είναι σημασμένα. Ο πρόσθιος σκεδασμός αφορά το μέγεθος-όγκο του κυττάρου ενώ ο πλάγιος την κοκκίωση και το σχήμα του κυττάρου.



Τα βασικά μέρη ενός κυτταρόμετρου ροής είναι (Shapiro, 2003):

- Σύστημα ροής υγρών (υδροδυναμικό σύστημα),
- το οπτικό σύστημα και
- το ηλεκτρονικό σύστημα.

Στο σύστημα ροής υγρών ανήκουν δύο υδραυλικά κυκλώματα. Το πρώτο υδραυλικό κύκλωμα αφορά την προσρόφηση του κυτταρικού εναιωρήματος υπό πίεση προς το θαλαμίσκο (κυψέλη) ροής και το δεύτερο αφορά την αναρρόφηση ενός ισότονου διαλύματος, του περιβάλλοντος υγρού της κυψέλης. Η ρύθμιση των σχετικών ταχυτήτων ροής των δύο αυτών κυκλωμάτων είναι απαραίτητη, ώστε να επιτυγχάνεται η μονήρης σωματιδιακή διάταξη του κυτταρικού εναιωρήματος (το ένα κύτταρο πίσω από το άλλο) και να επιτρέπεται η πρόσπτωση της δέσμης Laser σε κάθε κύτταρο, για να υπάρχει ακρίβεια στις μετρήσεις

Το οπτικό σύστημα αποτελείται από το σύστημα οπτικής διέγερσης και το οποίο αναφέρεται στην πηγή φωτός Laser και τα εξαρτήματα (οπτικές ίνες, φακούς και πρίσματα) που κατευθύνουν τη δέσμη laser στα κύτταρα για να τα διεγείρουν και να εκπέμψουν φθορίζουσα ακτινοβολία και το σύστημα οπτικής συλλογής το οποίο κατευθύνει την σκεδάζουσα και φθορίζουσα ακτινοβολία σε ανιχνευτές ακτινοβολίας. Μπορούν να υπάρχουν παραπάνω από μία πηγές φωτός, ενώ η ακτινοβολίες κυμαίνονται στο φάσμα του ορατού φωτός από 400 έως 700nm.

Τέλος το ηλεκτρονικό σύστημα αποτελείται από τους ανιχνευτές, του ενισχυτές και επεξεργαστές σήματος και έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή. Η λειτουργία του είναι η μετατροπή του φωτεινού σήματος που λαμβάνουν οι ανιχνευτές σε αριθμητικά δεδομένα (αντιστοιχώντας το φωτεινό σήμα από τα διάφορα laser σε ένα συγκεκριμένο κύτταρο αλλά και αποκλείοντας τον «θόρυβο» των μετρήσεων ή των κυτταρικών υπολειμμάτων με τον ορισμό μιας τιμής «κατώφλι» threshold) και η μετέπειτα επεξεργασία τους με διάφορους τρόπους όπως στατιστική ανάλυση.

2.3.5. Στατιστική ανάλυση

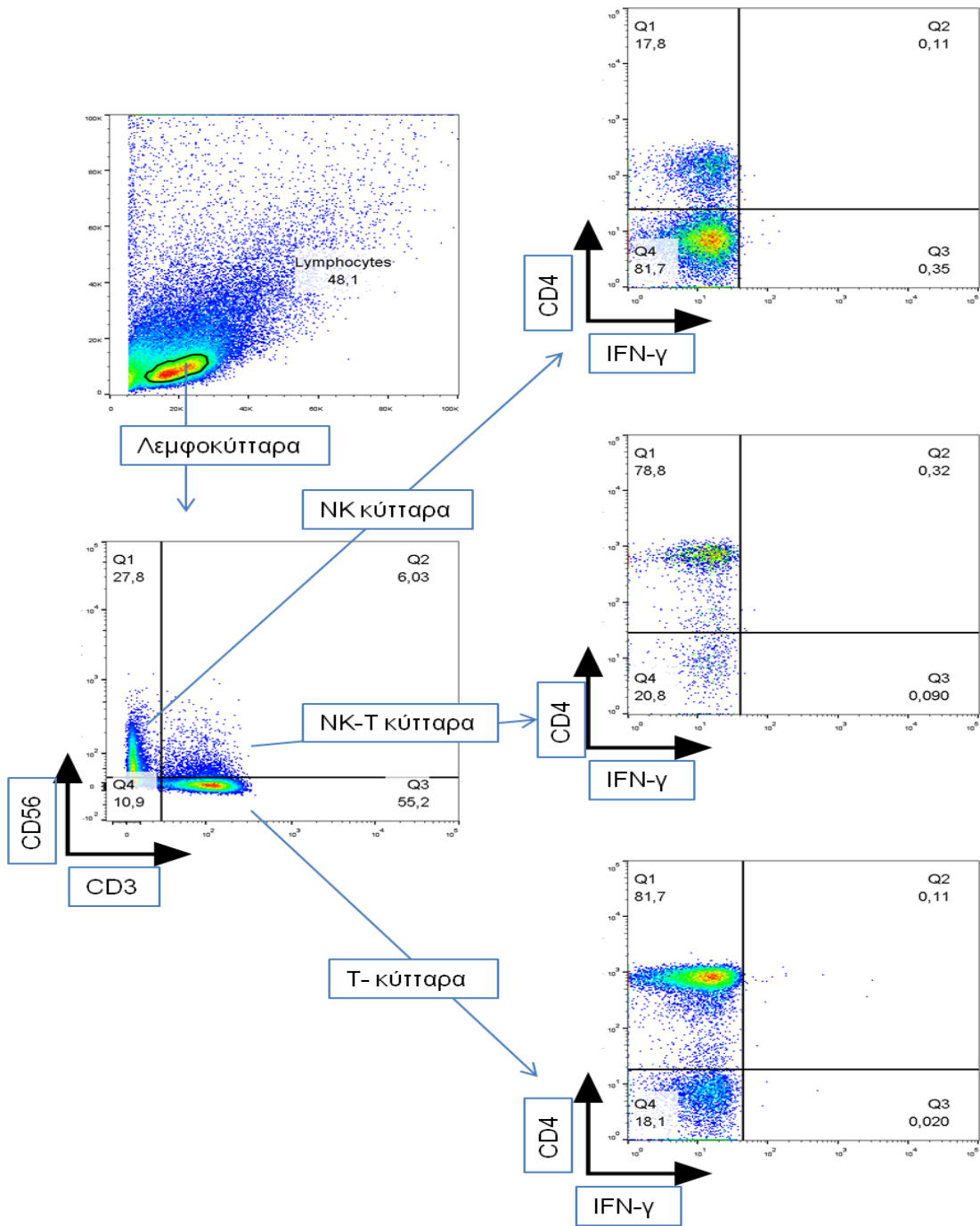
Για την κυτταρομετρική ανάλυση και στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα υπολογιστικά προγράμματα FlowJo V10 και GraphPad Prism 8 .

FlowJo V10

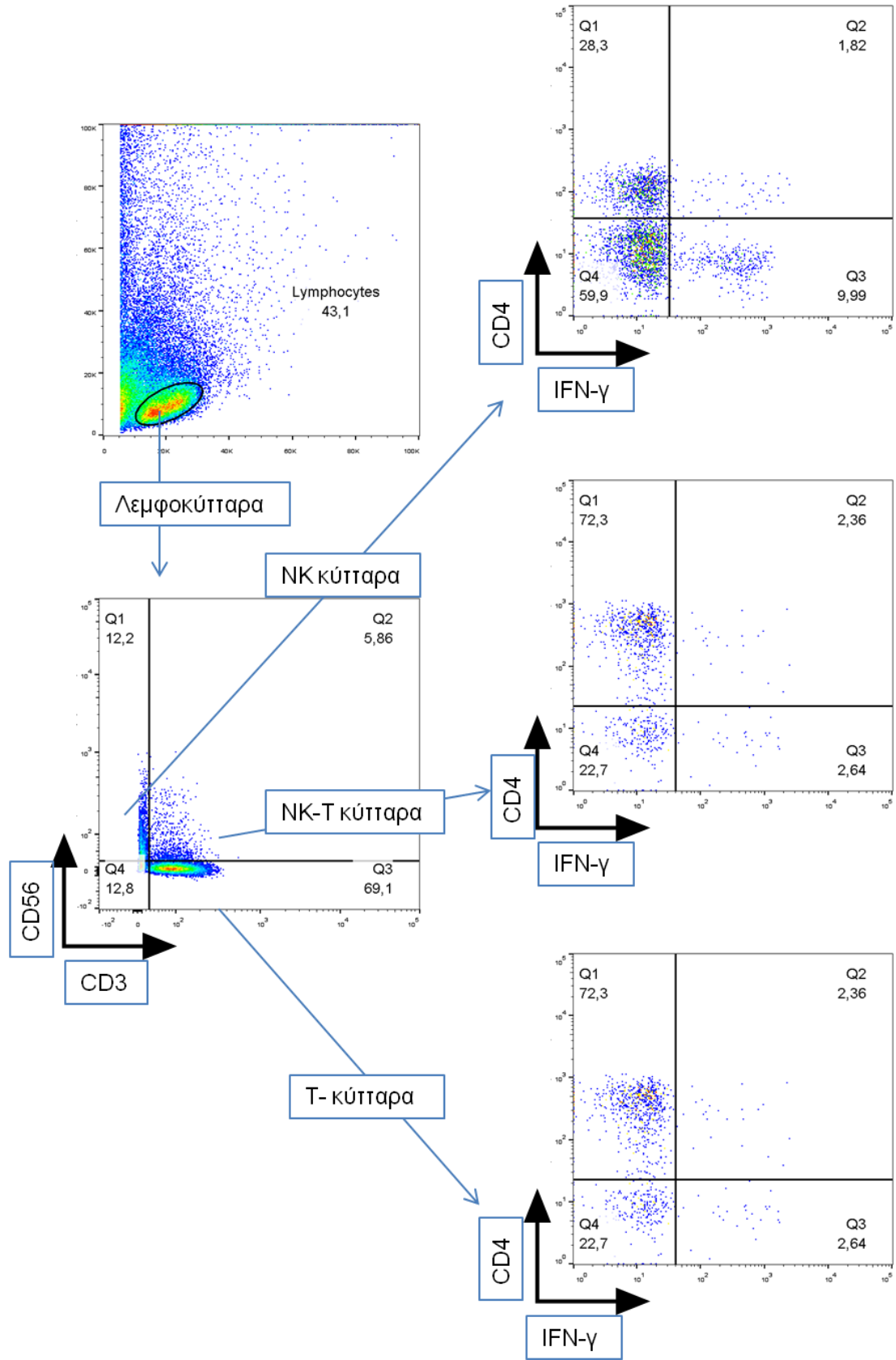
Το πρόγραμμα FlowJo V10 επιτρέπει την γραφική απεικόνιση και επεξεργασία των αποτελεσμάτων της κυτταρομετρίας ροής. Μπορεί να γίνει με το συγκεκριμένο πρόγραμμα ο διαχωρισμός των κυτταρικών υποπληθυσμών, να μετρηθεί η ένταση του φθορισμού όπως και επίσης να γίνουν μορφοποιήσεις (διαφορετικά χρώματα, διαφορετικό στυλ απεικόνισης dot plot, pseudocolour) ώστε να υπερτονίζονται αυτά, στα οποία θέλει ο ερευνητής να δώσει έμφαση.

Ενδεικτικός τρόπος απομόνωσης και γραφικής απεικόνισης κυτταρικών υποπληθυσμών περιφερικού αίματος με το FlowJo V10

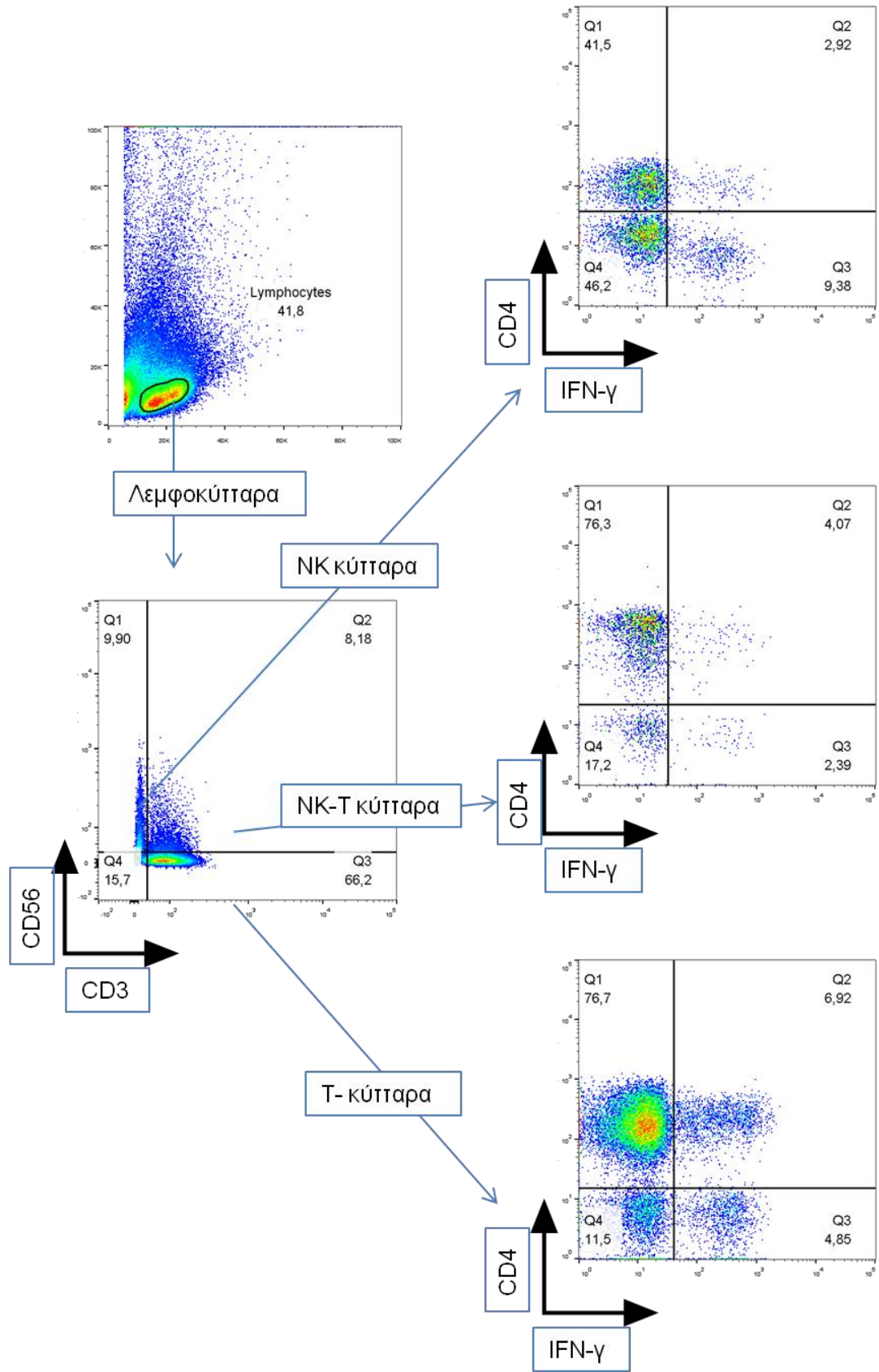
Στην παρακάτω φιγούρα παρατίθεται ενδεικτική γραφική απεικόνιση διαχωρισμού (gating) κυτταρικών πληθυσμών περιφερικού αίματος έπειτα από ενεργοποίηση ή όχι με PMA.ΙΟΝΟ παρουσία διαφορικών συγκεντρώσεων αλοΐνης.



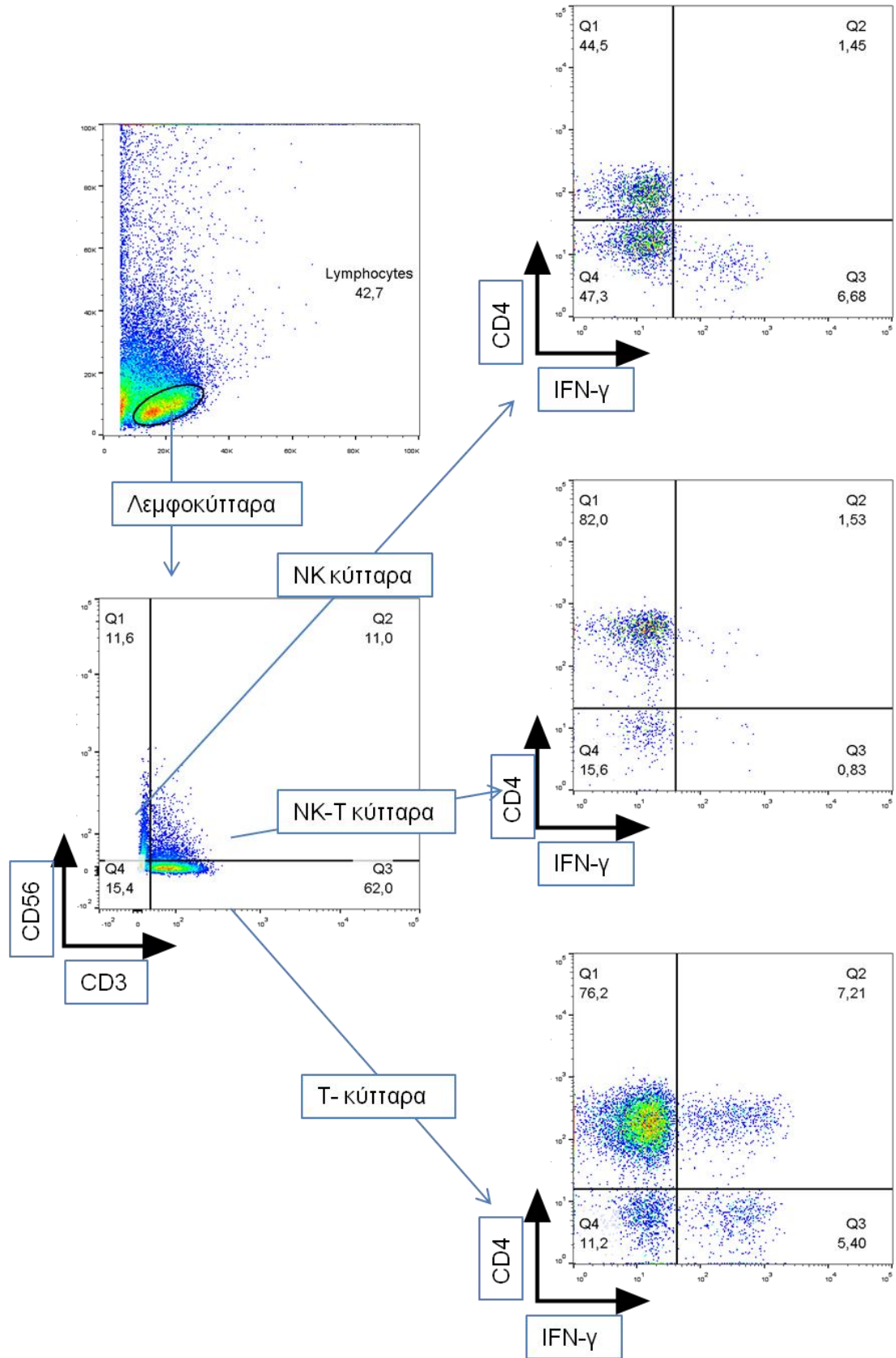
Unstimulated



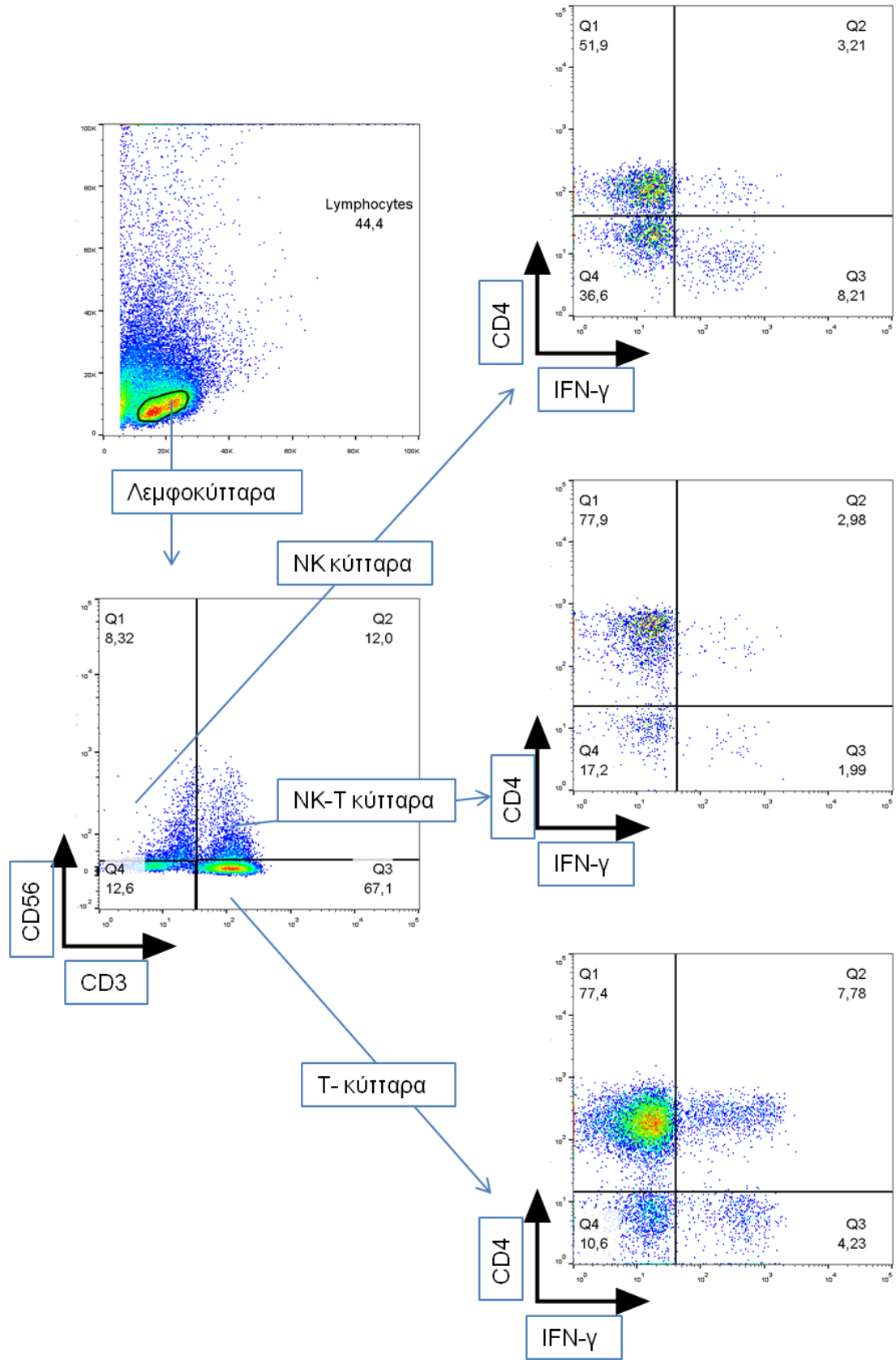
PMA-IONO



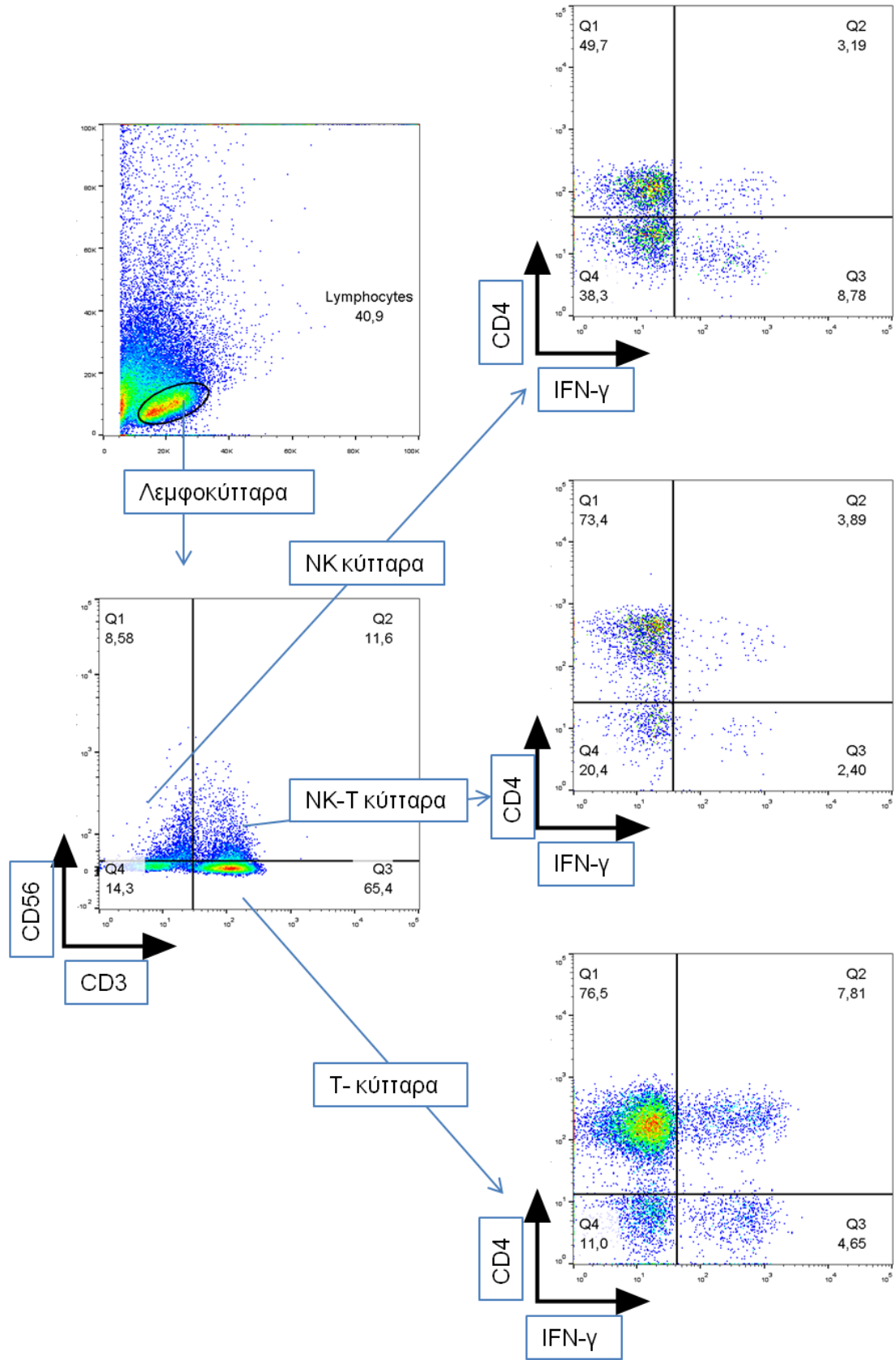
PMA-IONO/Aloin 50 µg/mL



PMA-IONO/Aloin 100 µg/mL



PMA-IONO/Aloin 200 µg/mL



PMA-IONO/Aloin 300 µg/mL

GraphPad Prism 8

Το Graphpad Prism 8 χρησιμοποιείται για την στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων (p-value, one-way ANOVA). Δίνει επίσης και τη δυνατότητα δημιουργίας διαγραμμάτων.

Ο στατιστικός έλεγχος με one-way ANOVA (Ανάλυση διακύμανσης ή Ανάλυση διασποράς) αναφέρεται στην σύγκριση μέσω τιμών μιας ποσοτικής μεταβλητής που ανήκουν σε τουλάχιστον τρεις διαφορετικές ομάδες δηλαδή ελέγχει αν οι μέσης τιμές μιας μεταβλητής διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σε τρεις ή περισσότερες ομάδες υποκειμένων. Έτσι έμμεσα καθορίζει αν υπάρχει συσχέτιση μιας ποσοτικής μεταβλητής και μιας κατηγορικής (η ταυτότητα της ομάδας) με τρεις ή περισσότερες κατηγορίες.

Η τιμή στατιστικής σημαντικότητας p-value δηλώνει το στατιστικό αποτέλεσμα της δοκιμής σε σχέση με ένα στατιστικό μοντέλο, το οποίο μετρά το πόσο ακραία είναι η παρατήρηση.

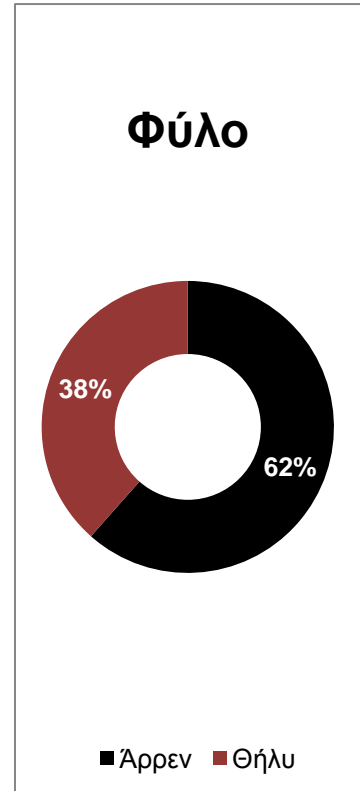
Παρατηρούμενο επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας (p-value) ορίζεται ως: η πιθανότητα να ισχύει στον πληθυσμό η τιμή της ελεγχουσυνάρτησης που υπολογίστηκε από το δείγμα ή να ισχύει στον πληθυσμό μια πιο ακραία από αυτή.. Η τιμή του p-value ορίζεται συνήθως ίση με 0,05 και συμβολίζεται με έναν αστερίσκο «*». Όσο μικρότερη είναι η τιμή του p-value από 0,05 τόσο πιο πολύ στατιστικώς σημαντικά είναι τα αποτελέσματα (συμβολίζεται με περισσότερους αστερίσκους «*»).

Αποτελέσματα

3.1. Εισαγωγή

3.1.1. Δημογραφικά στοιχεία υγιών μαρτύρων

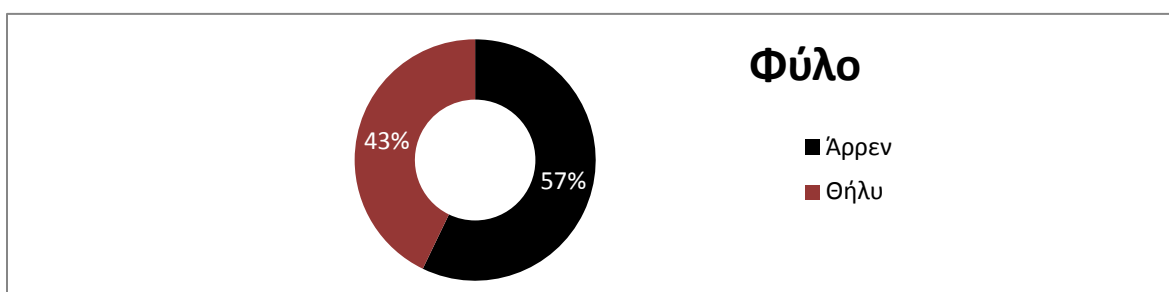
A/A	Φύλο	Ηλικία
1	Θήλυ	21
2	Θήλυ	21
3	Άρρεν	41
4	Θήλυ	52
5	Θήλυ	27
6	Άρρεν	30
7	Άρρεν	30
8	Άρρεν	47
9	Άρρεν	30
10	Θήλυ	24
11	Άρρεν	24
12	Άρρεν	42
13	Άρρεν	21



Αριθμός υγιών μαρτύρων	Φύλο		Μέσος όρος ηλικίας	
	12	8	Άρρεν	33
	5	Θήλυ	31	

3.1.2. Δημογραφικά στοιχεία και κλινικές πληροφορίες ασθενών

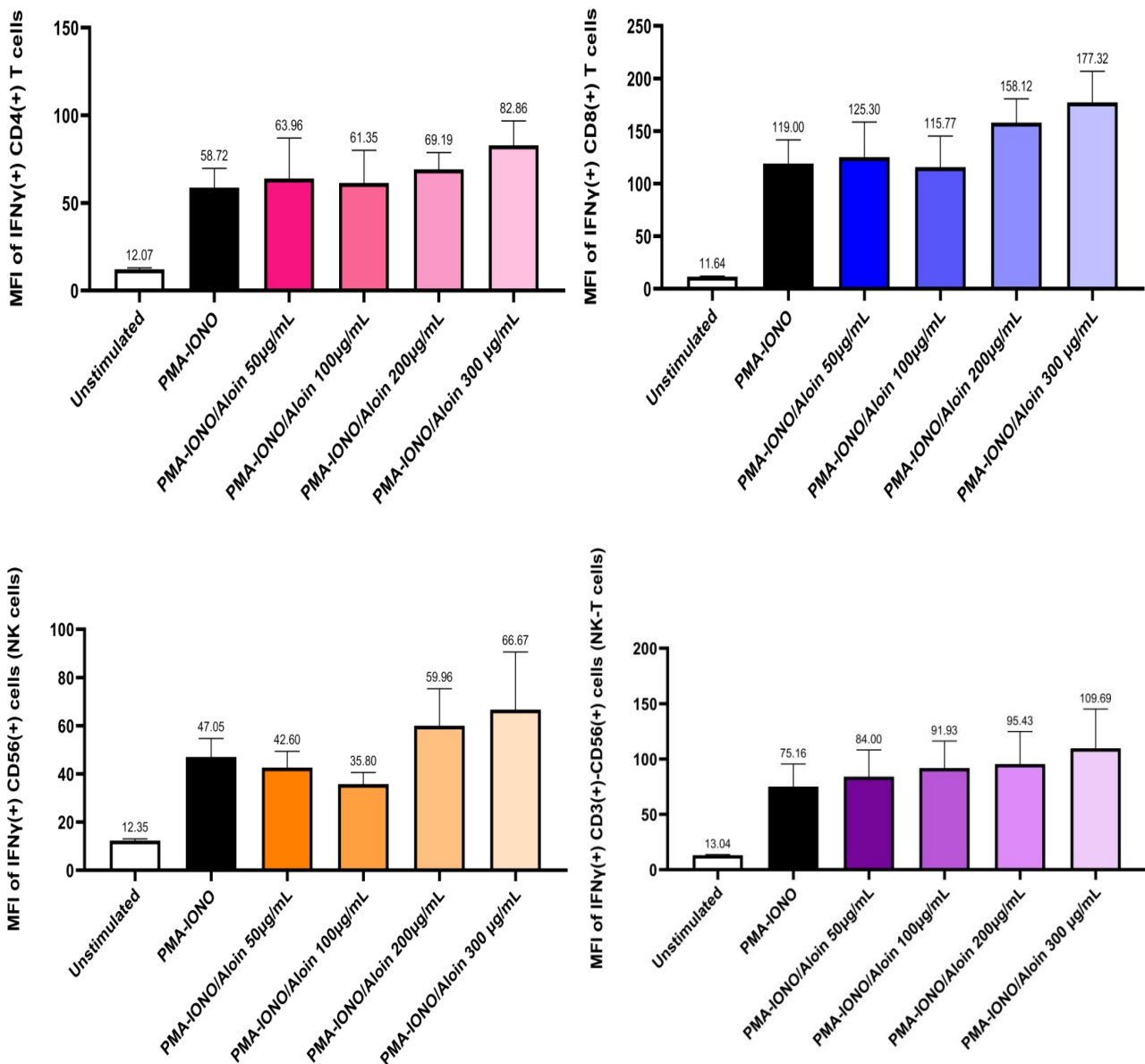
A/A	Ηλικία	Φύλο	Ασθένεια	Κλινική Πληροφορία
1	47	Άρρεν	PS	Ψωρίαση κατά πλάκας PASI: 13 Προ secukinumab, naïve
2	--	Θήλυ	RRMS σε έξαρση	--
3	53	Θήλυ	ANCA- Αγγειίτιδα	--
4	71	Άρρεν	PSA	Ψωρίαση κατά πλάκας υπό brodalumab από 29/01/2019 χωρίς μεθοτρεξάτη PASI: 28,7 Υπό secukinumab
5	35	Άρρεν	ANCA- Αγγειίτιδα	Πιθανή Wegener
6	46	Θήλυ	PSA	Ιερολαγονίτιδα
7	67	Άρρεν	PS	PASI: 2,0 Υπό secukinumab 150mg 1 μήνα



Αριθμός ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα	Φύλο		Μέσος όρος ηλικίας	
	7	4	Άρρεν	55
	3	Θήλυ	49	

3.2. Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων (dose response) κεκαθαρμένης (95%) αλοΐνης στην παραγωγή IFN- γ από λεμφοκύτταρα έπειτα από διέγερση με PMA και ιονομυκίνη. Επιλογή βέλτιστου εύρους συγκεντρώσεων

Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα *in vitro* πειραμάτων σε κυτταρικές σειρές (RAW264.7) η δοσολογία της αλοΐνης, σε κυμαίνεται μεταξύ των 50-300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [(Luo et al., 2018) & (Ma et al., 2018)]. Αρχικά πραγματοποιήθηκε πείραμα επαγωγής των περιφερικών λεμφοκυττάρων χρησιμοποιώντας διαφορετικές συγκεντρώσεις αλοΐνης και μετρήθηκαν τα επίπεδα παραγωγής IFN- γ με σκοπό τον προσδιορισμό της βέλτιστης συγκέντρωσης αλοΐνης, που θα έχει την μέγιστη επίδραση στα επίπεδα της παραγωγής κυτοκινών



Η αλοΐνη για τον έλεγχο της συνθήκης αυτής αρχικά προστέθηκε 30 λεπτά πριν την ενεργοποίηση των κυττάρων με τον διεγέρτη PMA και ιονομυκίνη.

Στα παραπάνω διαγράμματα παρουσιάζεται ο μέσος όρος (mean \pm SD) και το στατιστικό εύρος (error bars) τιμών των επιπέδων φθορισμού (MFI) παραγωγής IFN- γ σε κάθε κυτταρικό υποπληθυσμό υγιών μαρτύρων (N=7) έπειτα από διέγερση με PMA/Iono, παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων αλοΐνης για 30 λεπτά.

Ειδικότερα, στα διαγράμματα που φαίνεται η επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων αλοΐνης στους πληθυσμούς των

- a) CD4(+) T κυττάρων ,
- b) CD8 (+) T,
- c) NK κυττάρων καθώς και
- d) NKT κυττάρων,

σε κύτταρα υγιών μαρτύρων (N=7).

Σε αντίθεση με τα περιγραφόμενα αποτελέσματα από ένα μέρος της βιβλιογραφίας τα πειράματα αυτά αναδεικνύουν πως η επώαση των λεμφοκυττάρων με αλοΐνη και στη συνέχεια η ενεργοποίηση του με PMA και ιονομυκίνη οδηγεί στην αύξηση των επιπέδων παραγωγής IFN- γ . Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντικά αύξηση του ποσοστού του MFI της παραγόμενης IFN- γ ιδιαίτερα στις συγκεντρώσεις αλοΐνης των 200 και 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$, στους πληθυσμούς των CD8 (+) και των CD4 (+) T- λεμφοκυττάρων.

3.3. Επίδραση αλοΐνης προστιθέμενης σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα πριν τον διεγέρτη στην παραγωγή της IFN- γ από τα CD4⁺ και CD8⁺ T κύτταρα έπειτα από διέγερση με PMA και ιονομυκίνη. Επιλογή βέλτιστου χρονικού διαστήματος *in vitro* χορήγησης της αλοΐνης πριν από τον διεγέρτη

Μία δεύτερη παράμετρος που θα έπρεπε να μελετηθεί, όσον αφορά την συγκέντρωση της αλοΐνης πριν την ενεργοποίηση με την ουσία με την οποία θα διεγερθούν τα κύτταρα για να παραγάγουν IFN- γ , ήταν η εύρεση της μικρότερης δυνατής συγκέντρωσης που παρατηρείται αύξηση της παραγωγής κυτταροκίνης σε συνάρτηση με τον χρόνο επώασης των κυττάρων με την αλοΐνη.

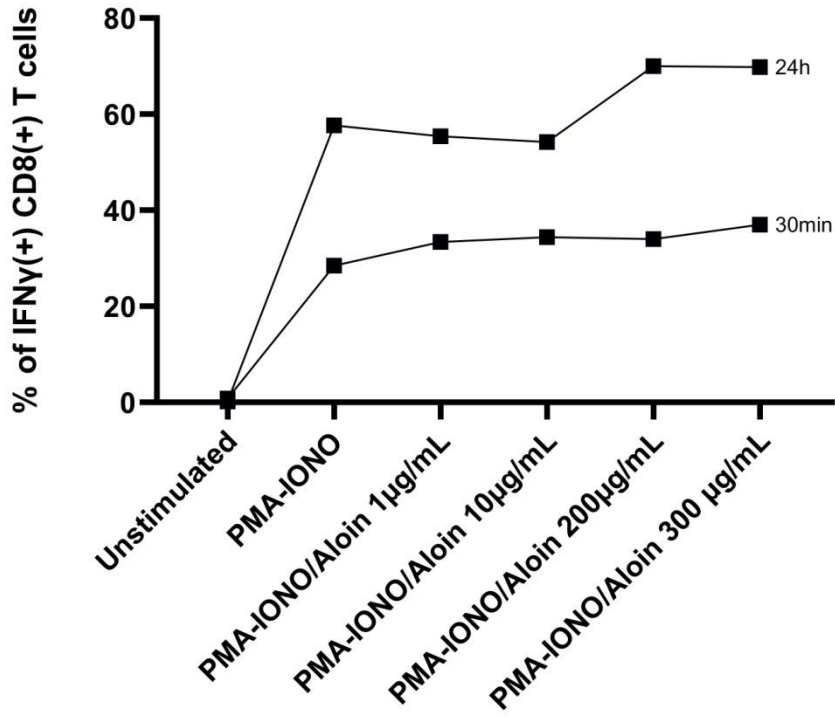
Για τον λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε πείραμα όπου χρησιμοποιήθηκε η αλοΐνη στα 200 και 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$, άλλα και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις 1 και 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, η οποία προστέθηκε σε διαφορετικές χρονικές περιόδους στην καλλιέργεια και στην συνέχεια έγινε ενεργοποίηση των κυττάρων με PMA και ιονομυκίνη.

Πρωταρχικός στόχος της επιλογής μικρών συγκεντρώσεων ήταν ελαχιστοποίηση της πιθανής τοξικότητας της επώασης των κυττάρων με αλοΐνη για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα. Παράλληλα, έπρεπε να εξακριβωθεί αν σε ένα τόσο μεγάλο χρονικό διάστημα μπορεί να αυξηθεί η παραγωγή IFN- γ σε πιο χαμηλές συγκεντρώσεις αλοΐνης.

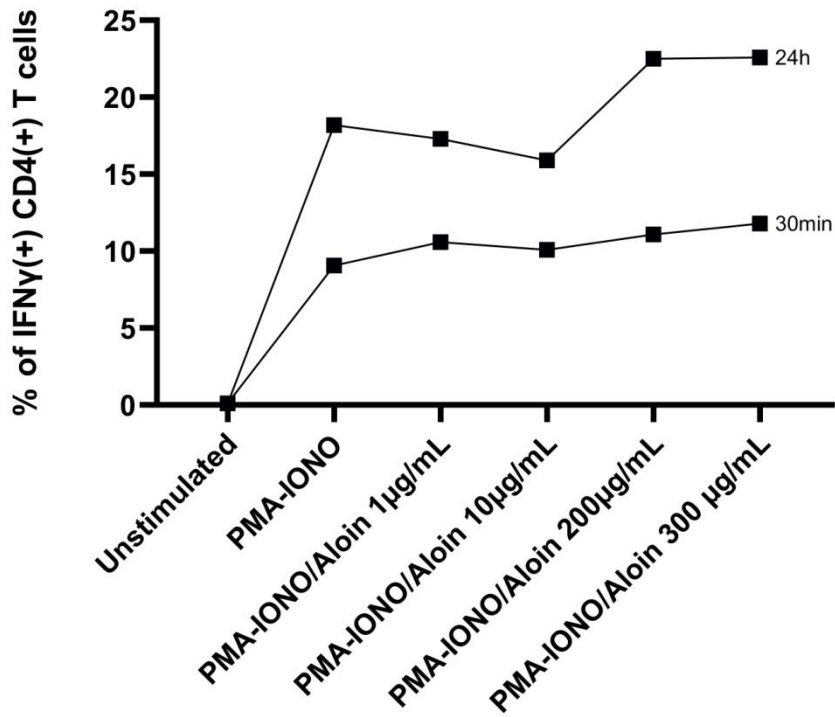
Στα παρακάτω πειράματα παρουσιάζονται σχηματικά ενδεικτικά δεδομένα σε υγιείς (N=3) όταν η αλοΐνη προστέθηκε μισή ώρα προτού του διεγέρτη και 24 ώρες προτού του διεγέρτη.

Στη διάρκεια των 30 λεπτών επώασης με αλοΐνη, παρατηρήθηκε μέγιστη αύξηση του ποσοστού της IFN- γ κατά 29,82% από τα CD8(+) T- κύτταρα στα 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αλοΐνης σε σχέση με την ενεργοποίηση μόνο με PMA και ιονομυκίνη. Παρομοίως, Η αύξηση του ποσοστού της IFN- γ από τα CD4(+) T-κυττάρων στα 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αλοΐνης ήταν 29,96%. Αντίστοιχα στην ίδια συγκέντρωση στις 24 ώρες η αύξηση του ποσοστού της IFN- γ από τα CD8(+) T- κύτταρα ήταν 21,32% και από τα CD4(+) T-κύτταρα ήταν 24,18%.

24h VS 30min

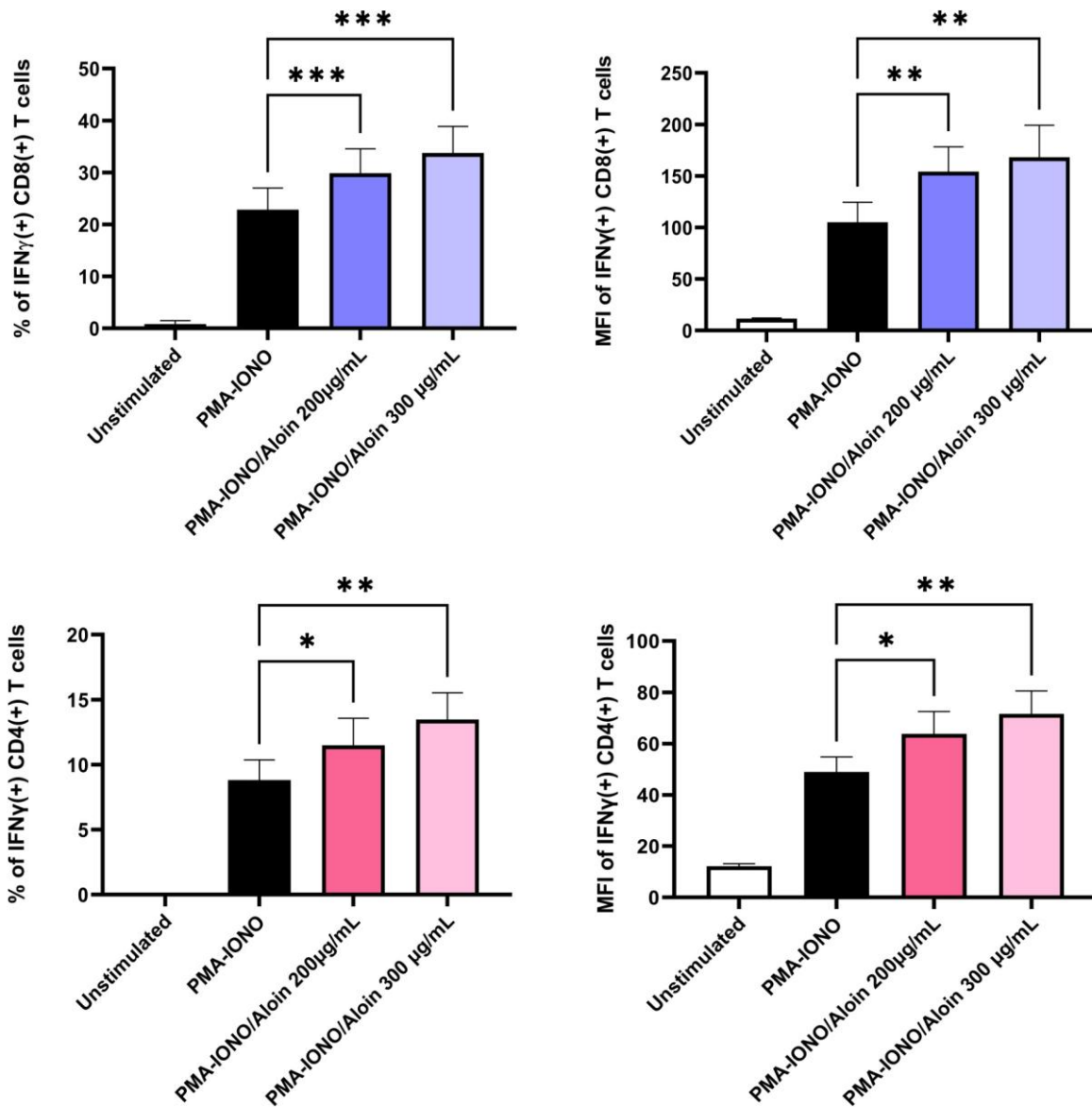


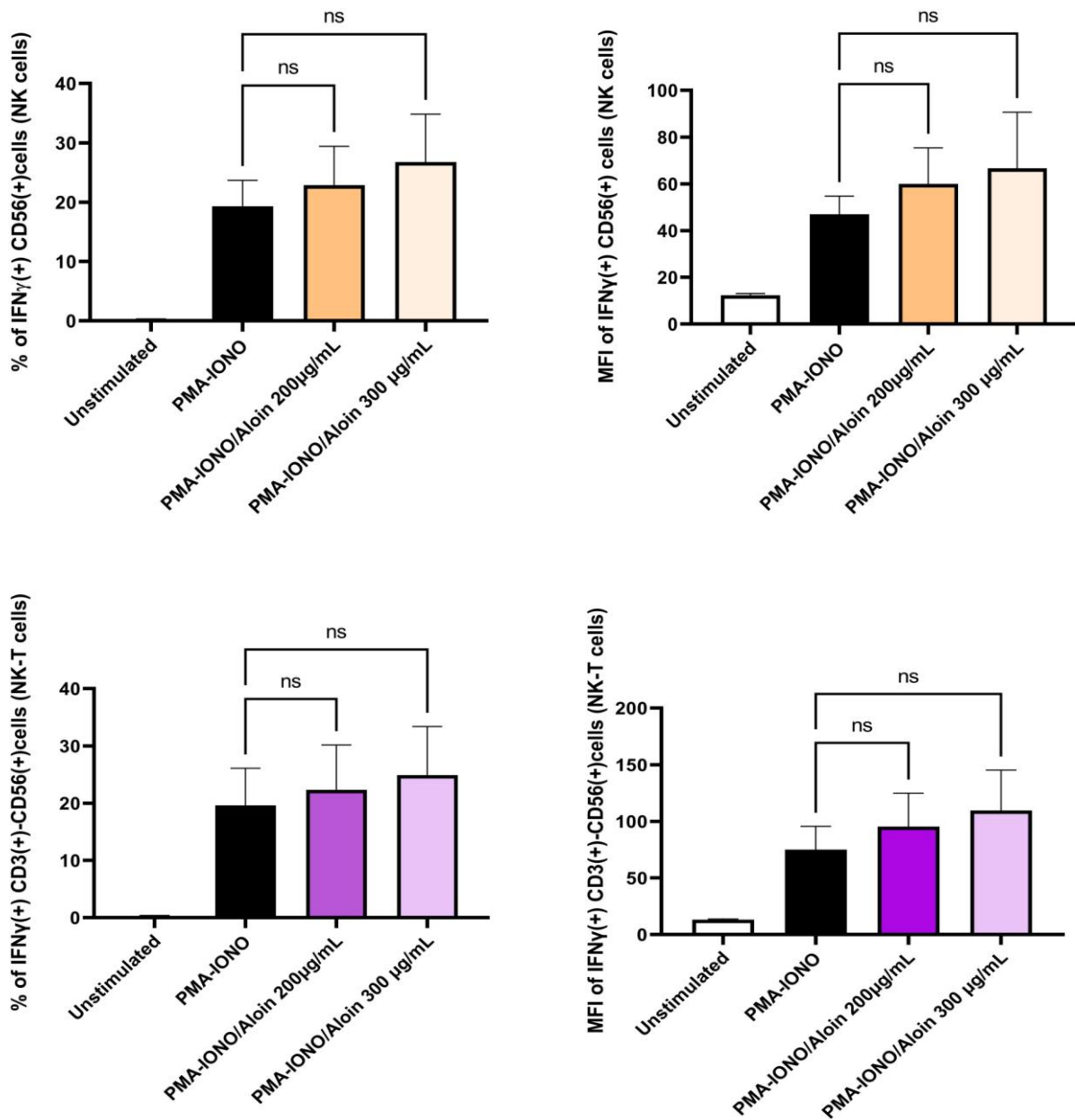
24h VS 30min



3.4. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα του ρόλου της αλοΐνης στην παραγωγή της IFN- γ από διάφορους κυτταρικούς υποπληθυσμούς σε υγιείς μάρτυρες (HC)

Έπειτα από τα πειράματα της διαβάθμισης συγκέντρωσης αλοΐνης επιλέχθηκαν οι συγκεντρώσεις 200 και 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ όπου φάνηκε η αλοΐνη να ασκεί καλύτερα την επίδραση της. Επίσης προτιμήθηκαν τα 30' ως το χρονικό διάστημα επώασης με την αλοΐνη πριν από διέγερση. Παρακάτω συνοψίζονται αποτελέσματα της επίδρασης της αλοΐνης στα λεμφοκύτταρα από υγιείς μάρτυρες (N=13). Έγινε ανάλυση στους T, NK και NKT λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς για την παραγωγή IFN- γ έπειτα από διέγερση με PMA και ιονομυκίνη.





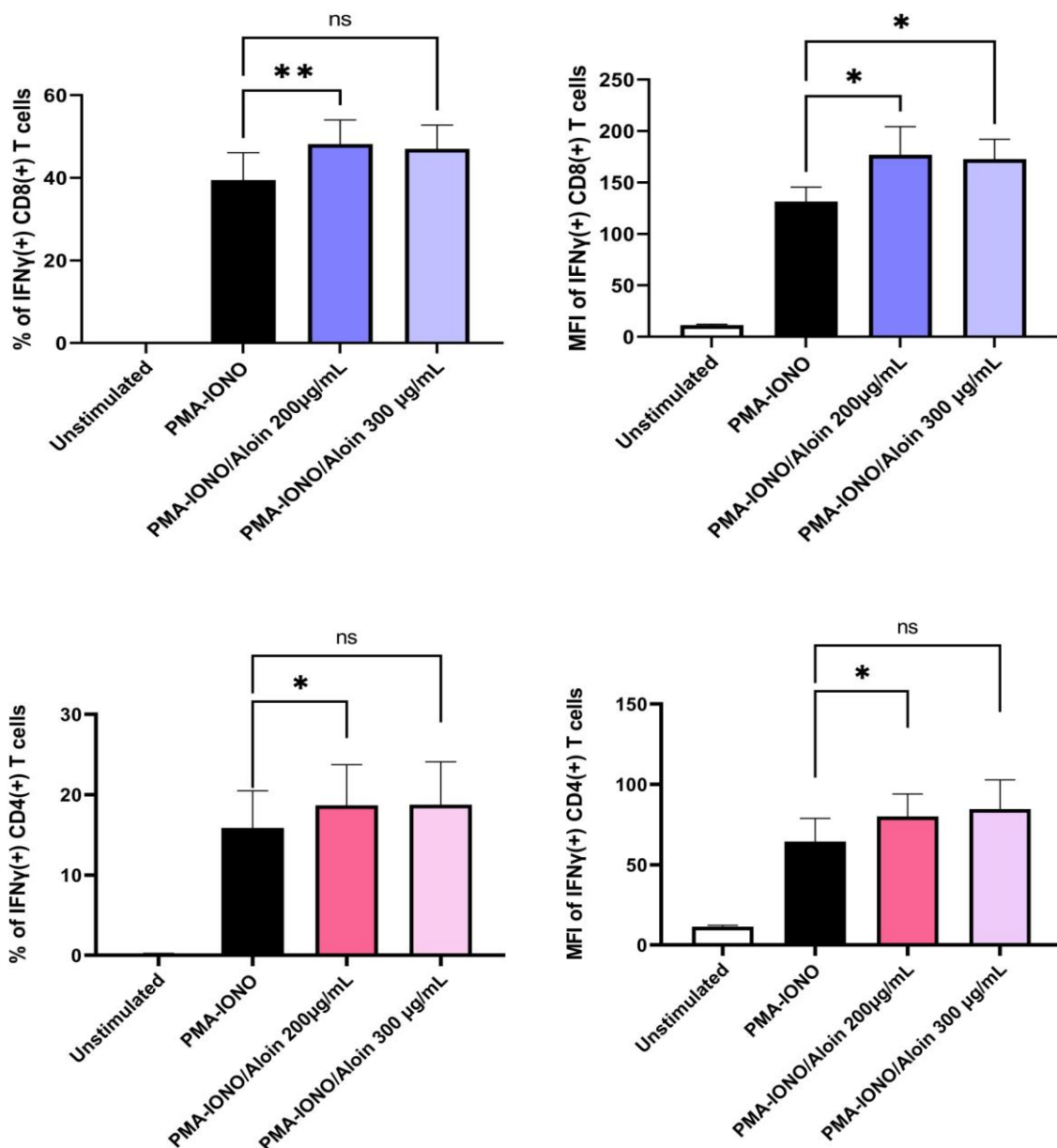
Σύμφωνα με τα παραπάνω διαγράμματα διακρίνεται μια στατιστικά σημαντική άνοδος της παραγωγής της IFN- γ μετά την επώαση με την αλοΐνη, σε σχέση με την ενεργοποίηση μόνο με PMA και ιονομυκίνη κυρίως από τους πληθυσμούς των CD4(+) και CD8(+). Πιο συγκεκριμένα η αύξηση από τον υποπληθυσμό των CD4(+) T- κυττάρων στους υγιείς μάρτυρες ήταν 30,31% για την συγκέντρωση των 200 µg/mL (p value<0,05) και 34,03% για τα 300 µg/mL αλοΐνης (p value<0,005), ενώ για τον πληθυσμό των CD8(+) κυττάρων 29,88% (p value<0,0005) και 33,78% (p value<0,0005) αντίστοιχα.

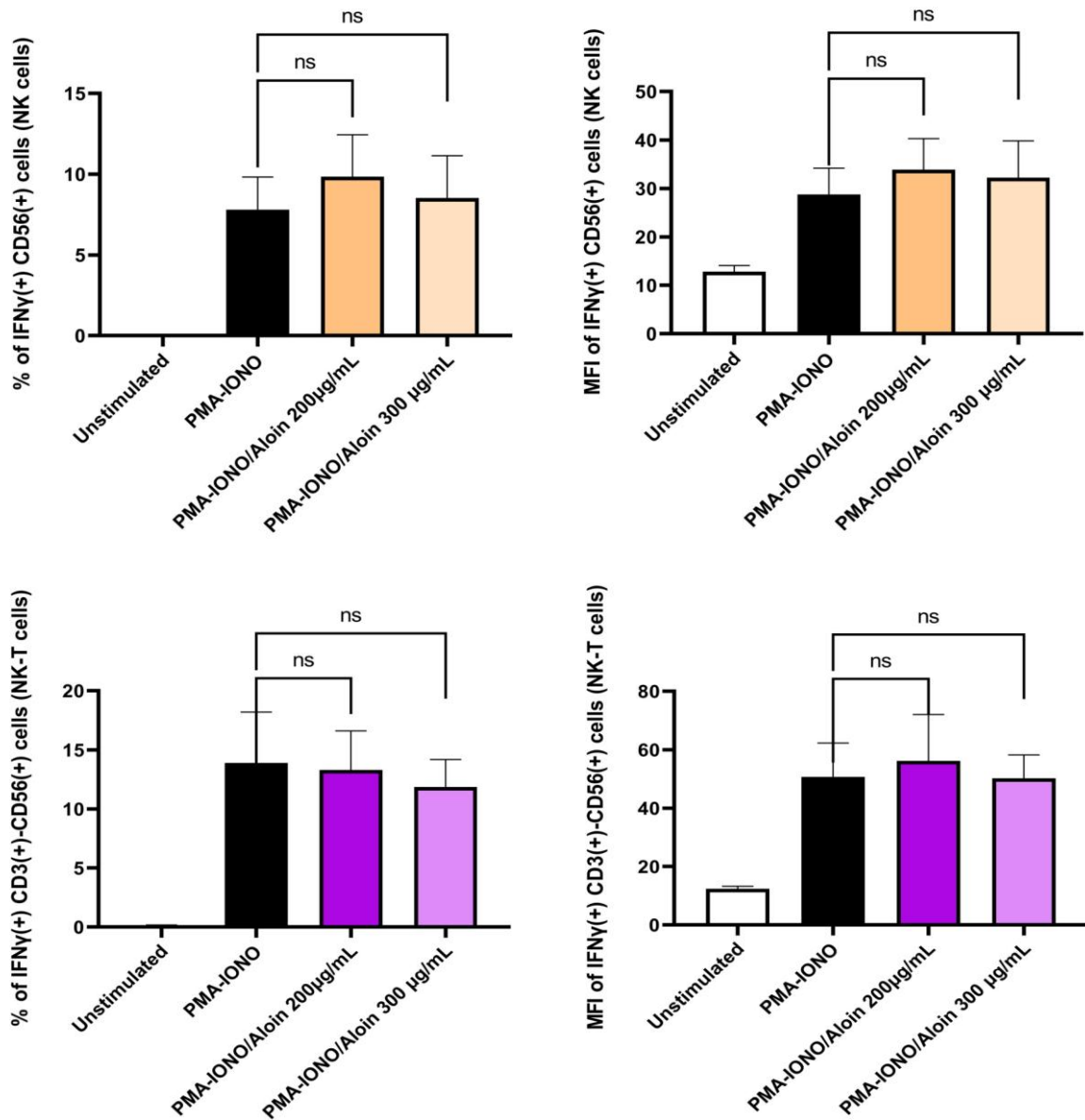
Στους πληθυσμούς των NK κυττάρων (CD56(+)) και NKT κυττάρων (CD3(+)-CD56(+)) δεν ήτανε στατιστικά σημαντική η αύξηση της IFN- γ .

3.5. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα του ρόλου της αλοΐνης στην παραγωγή της IFN- γ από διάφορους κυτταρικούς υποπληθυσμούς σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε κύτταρα ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα χρησιμοποιώντας την αλοΐνη *in vitro* για 30 λεπτά στις συγκεντρώσεις 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ και στα 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$, όπου φάνηκε να ασκεί καλύτερα την επίδραση της στα κύτταρα των υγιών μαρτύρων. Οι αναλύσεις έγιναν στους ίδιους λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς όσον αφορά την παραγωγή IFN- γ έπειτα από διέγερση με PMA και ιονομυκίνη.

Επιλέχθησαν ασθενείς με διάφορες αυτοάνοσες παθήσεις, με κοινή συνισταμένη να αναμένεται (λόγω έξαρσης της νόσου, πχ υψηλό PASI score για την ψωρίαση) ή να έχει κατά το παρελθόν εξακριβωθεί η υψηλή παραγωγή IFN- γ σε αυτούς τους ανθρώπους, ώστε να εξακριβωθεί κατά πόσο η αλοΐνη μπορεί να έχει περαιτέρω επίδραση στην παραγωγή της IFN- γ . (N=7)





Στα παραπάνω συγκεντρωτικά αποτελέσματα καταδεικνύεται το ποσοστό της IFN- γ (αριστερά διαγράμματα) και η μέση ένταση φθορισμού της IFN- γ (δεξιά διαγράμματα) που παράγουν οι πληθυσμοί των CD8(+) T, CD4(+) T, NK και NKT κυττάρων.

Όπως και με τους υγιείς μάρτυρες και στους ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα παρατηρήθηκε αύξηση του ποσοστού της παραγόμενης IFN- γ μετά την επώαση με αλοΐνη και την ενεργοποίηση με PMA και ιονομυκίνη. Πιο συγκεκριμένα η αύξηση από τον υποπληθυσμό των CD4(+) T- κυττάρων στους ασθενείς με αυτοάνοσα ήταν 17,84% για την συγκέντρωση των 200 μg/mL (p value<0,05) και 18,35% για τα 300 μg/mL αλοΐνης (p value>0,05) ενώ για τον πληθυσμό των CD8(+) κυττάρων 22,06% (p value<0,005) και 20,37% (p value>0,05) αντίστοιχα.

Ιδιαίτερη σημασία θα πρέπει να δοθεί και στην αύξηση του MFI της παραγόμενης IFN- γ στους πληθυσμούς αυτούς. Πιο συγκεκριμένα η αύξηση από τον υποπληθυσμό των CD4(+) T- κυττάρων ήταν 24,22% για την συγκέντρωση των 200 μg/mL (p value <0,05) και 31,32% (p value>0,05) για τα 300 μg/mL αλοΐνης, ενώ για

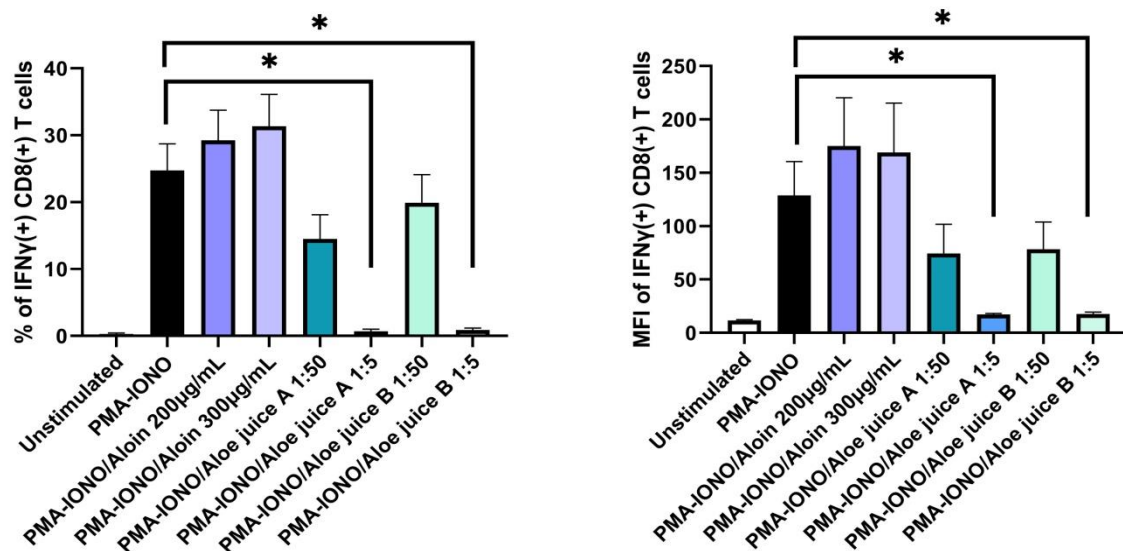
τον πληθυσμό των CD8(+) κυττάρων 34,60% (p value <0,05) και 31,37% (p value<0,05) αντίστοιχα.

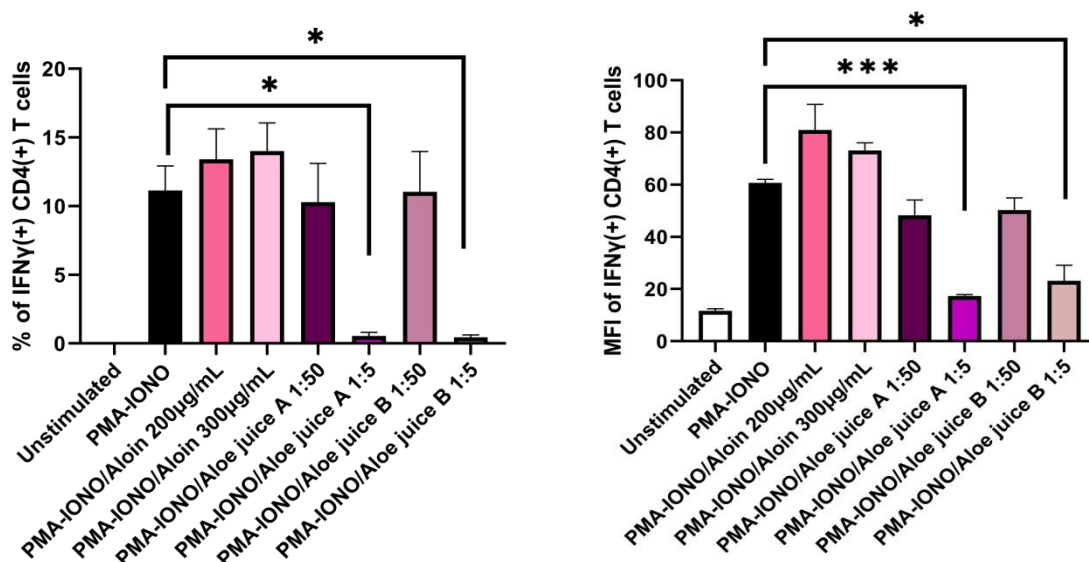
Όπως και στους υγιείς μάρτυρες, έτσι και στους ασθενείς τα αποτελέσματα για τους υποπληθυσμούς των NK και NKT κυττάρων δεν ήταν στατιστικά σημαντικά.

3.6. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της επίδρασης εμπορικά διαθέσιμων σκευασμάτων (2 χυμούς A & B από το φυτό της Aloe Vera) στην παραγωγή της IFN- γ από διάφορους κυτταρικούς υποπληθυσμούς σε υγιείς

Ο χυμός της αλόης είναι ένα προϊόν το οποίο χρησιμοποιείται εδώ και χιλιάδες χρόνια, ειδικά σήμερα υπάρχει μια τάση για την εύρεση φυσικών σκευασμάτων με φαρμακευτικές ιδιότητες. Στην συγκεκριμένη μελέτη υπήρχε το ενδιαφέρον να παρατηρηθεί αν εντός των σκευασμάτων του χυμού της Aloe vera μοιράζονταν την ίδια επίδραση με την καθαρή αλοΐνη.

Η τελευταία παράμετρος που εξετάστηκε στους πληθυσμούς που υπάρχουν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα, δηλαδή CD4(+), CD8(+) T κύτταρα ήταν η διέγερση των κυττάρων αρχικά με χυμό από το φυτό της Aloe vera, ο οποίος περιείχε αλοΐνη (Aloe juice A) και χυμό της Aloe vera, που αναφερόταν στην ετικέτα ότι η αλοΐνη είχε αφαιρεθεί (Aloe juice B) σε δύο συγκεντρώσεις 1:50 και 1:5 σε σχέση με τις βέλτιστες συγκεντρώσεις της αλοΐνης και στη συνέχεια ενεργοποίηση με PMA και ιονομυκίνη. (N=5)





Η συγκέντρωση 1:5 στους χυμούς επιλέχθηκε καθώς σύμφωνα με τους Jawade & Chavan, 2013 αντιστοιχεί στην συγκέντρωση, της αλοΐνης 300 µg/mL. Πιο συγκεκριμένα στην συγκεκριμένη μελέτη αναφέρεται, πως με την μέθοδο της εκχύλισης με υπερήχους, η μέγιστη ποσότητα αλοΐνης που μπορούσε να εξαχθεί ήταν 1,732 mg/mL. Συνεπώς οι χυμοί προστέθηκαν όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα μισή ώρα πριν την ενεργοποίηση με PMA και ιονομυκίνη όπως ακριβώς ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο και για την επώαση με αλοΐνη.

Χυμός Aloe vera	Συγκέντρωση χυμού	Ποσότητα σε µL
Aloe juice A (με αλοΐνη)	1:5	173,2
	1:50	17,32
Aloe juice B (χωρίς αλοΐνη)	1:5	173,2
	1:50	17,32

Τα αποτελέσματα αυτής της σειράς πειραμάτων ήταν ότι η επώαση με αλοΐνη στις συγκεντρώσεις 200 και 300 µg/mL είχε την αναμενόμενη αύξηση του ποσοστού της παραγόμενης IFN-γ σε σχέση με την ενεργοποίηση μόνο με PMA και ιονομυκίνη.

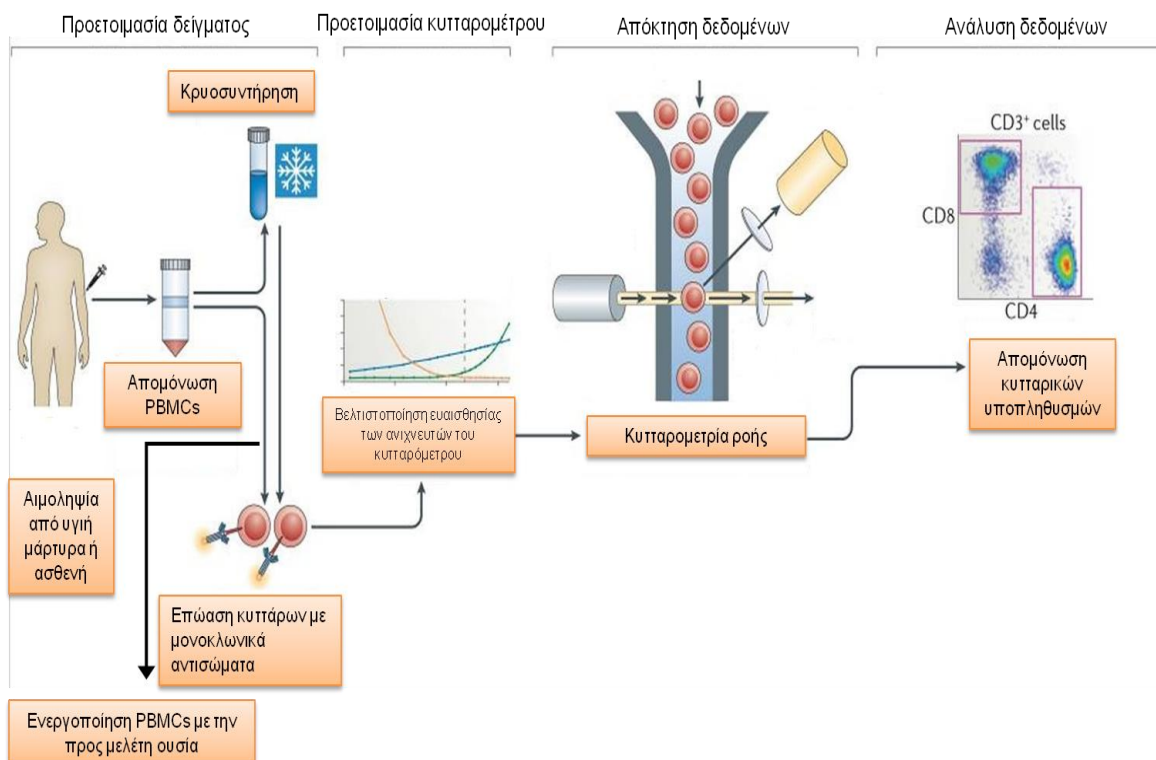
Αντίθετα στους χυμούς παρατηρήθηκε μείωση του ποσοστού της παραγόμενης IFN-γ σε σχέση με την ενεργοποίηση μόνο με PMA και ιονομυκίνη. Πιο συγκεκριμένα για τον χυμό Aloe juice A στη συγκέντρωση 1:50 η μείωση του ποσοστού της IFN-γ ήταν 24,34% ($p \text{ value} > 0,05$) και για τη συγκέντρωση 1:5 ήταν 95,16% ($p \text{ value} < 0,05$) στα CD4(+) T- κύτταρα. Αντίστοιχα στα CD8(+) T- κύτταρα στη συγκέντρωση 1:50 αυτού του χυμού η μείωση του ποσοστού της παραγόμενης IFN-γ σε σχέση με την ενεργοποίηση μόνο με PMA και ιονομυκίνη ήταν 8,81% ($p \text{ value} > 0,05$) και για τη συγκέντρωση 1:5 ήταν 97,25% ($p \text{ value} < 0,05$).

Για τον χυμό Aloe juice B στα CD4(+) T κύτταρα η μείωση του ποσοστού της IFN-γ για τη συγκέντρωση 1:50 ήταν 18,66% ($p \text{ value} > 0,05$) και για την 1:5 συγκέντρωση 96,05% ($p \text{ value} < 0,05$). Στα CD8(+) T κύτταρα η μείωση του ποσοστού της παραγόμενης IFN-γ στη συγκέντρωση 1:50 ήταν 10,60% ($p \text{ value} > 0,05$) και αντίστοιχα για τη συγκέντρωση 1:5 η μείωση ανέρχονταν στο ποσοστό του 96,45% ($p \text{ value} < 0,05$).

Συζήτηση

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της ανοσοτροποποιητικής δράσης της αλοΐνης στους κυτταρικούς υποπληθυσμούς υγιών μαρτύρων και ασθενών με αυτοανοσία. Η ουσία αυτή αποτελεί βασικό συστατικό εκχυλισμάτων και χυμών *aloe vera* και έχει πολλές βιολογικές επενέργειες με την αντιφλεγμονώδη επίδραση να είναι μία από αυτές σύμφωνα με ένα μέρος των βιβλιογραφικών δεδομένων, σε πειράματα που έγιναν κυρίως σε κυτταρικές σειρές μονοκυττάρων/ μακροφάγων (RAW264.7) [(Luo et al., 2018) & (Ma et al., 2018)].

Ωστόσο δεν υπάρχουν επαρκή βιβλιογραφικά δεδομένα όσον αφορά την πιθανή δράση της αλοΐνης σε υποσύνολα λεμφοκυτταρικών πληθυσμών που απαρτίζουν τόσο την εγγενή όσο και την επίκτητη ανοσία. Για τον λόγο αυτό μελετήθηκε η πιθανή ανοσορυθμιστική επίδραση της ουσίας στην παραγωγή της IFN- γ , η οποία είναι η κύρια φλεγμονώδης κυτοκίνη στα αυτοάνοσα νοσήματα, μεταξύ των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών των CD4(+) και CD8(+) T - λεμφοκυττάρων καθώς και στα NK και NKT κύτταρα. Η αρχική μας ερευνητική υπόθεση σύμφωνα και με μέρος βιβλιογραφικών αναφορών [(Luo et al., 2018) & (Ma et al., 2018)] εστιάστηκε στην αναμενόμενη πτώση των επιπέδων της IFN- γ στους λεμφοκυτταρικούς αυτούς πληθυσμούς όταν τα κύτταρα επωαστούν *in vitro* με αλοΐνη



Συνοπτική γραφική απεικόνιση με τις διεργασίες που έγιναν για την εκπόνηση αυτής της μελέτης (Maecker et al., 2012).

Το πρωτόκολλο που αποφασίστηκε ήταν με ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων με την χρήση του PMA και της ιονομυκίνης για 5 ώρες και προεπάωση των κυττάρων αυτών με διαφορετικές συγκεντρώσεις αλοΐνης. Το

συγκεκριμένο πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε καθώς η ενεργοποίηση με PMA και ιονομυκίνη, έχει την δυνατότητα να ενεργοποιεί την γρήγορη και επαρκή παραγωγή κυτοκινών, όπως η IFN- γ , που ήταν το ζητούμενο στην συγκεκριμένη εργασία και ιδιαίτερα από τα CD4(+) και CD8(+) T - κύτταρα.

Οι συγκεντρώσεις της αλοΐνης, που δοκιμάστηκαν αρχικά σε υγιείς δότες ήταν 50, 100, 200 και 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ με χρόνο επώασης με την ουσία 30 λεπτά και στην συνέχεια ενεργοποίηση με PMA και ιονομυκίνη. Από αυτά τα πειράματα επιλέχθηκαν σαν κύριες συγκεντρώσεις για τα επόμενα πειράματα οι 200 και 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αλοΐνης καθώς και πως πρέπει να εστιαστούν τα πειράματα στους πληθυσμούς CD4(+) και CD8(+) T-κυττάρων ενώ οι πληθυσμοί των NK και NKT κυττάρων δεν έδιναν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα.

Ο χρόνος προενεργοποίησης των κυττάρων με αλοΐνη μελετήθηκε επίσης σε δυο χρόνους, οι οποίοι ήταν 30 λεπτά και 24 ώρες. Στα πειράματα αυτά δοκιμάστηκαν και οι επιπλέον συγκεντρώσεις 1 και 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, οι οποίες δεν είχαν κάποια επίδραση. Όσον αφορά τον χρόνο προενεργοποίησης και στους δυο χρόνους υπήρχε η αύξηση του ποσοστού των επιπέδων IFN- γ από τους πληθυσμούς CD4(+) και CD8(+) T – κύτταρα, αλλά ήταν μεγαλύτερη στα 30 λεπτά πριν την ενεργοποίηση με PMA και ιονομυκίνη και συνεπώς αυξήθηκε ο αριθμός των δειγμάτων σε πειράματα με 30 λεπτά επώασης με αλοΐνη.

Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα των πειραμάτων σε υγιείς μάρτυρες από τους πληθυσμούς των CD4(+) T- κυττάρων και των CD8(+) T- κυττάρων στις συγκεντρώσεις 200 και 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ανέδειξαν στατιστικά σημαντική αύξηση του ποσοστού της IFN- γ . Αύξηση επίσης, του ποσοστού αυτού παρατηρήθηκε και σε ασθενείς με αυτοάνοσα και φλεγμονώδη νοσήματα, που καταδεικνύει πως η αύξηση της IFN- γ σε λεμφοκύτταρα ύστερα από επώαση με αλοΐνη, δεν σχετίζεται με κάποια ασθένεια αλλά είναι ένα γενικότερο βιολογικό φαινόμενο. Τα πειραματικά αυτά δεδομένα συμφωνούν με τους *Huang et al., 2019*, που έδειξαν ότι η αλοΐνη μείωσε σημαντικά τη λοίμωξη από όλα τα δοκιμασμένα στελέχη ιών της γρίπης και ιδιαίτερα σε ποντίκια που είχαν μολυνθεί από τον ιό της γρίπης H1N1 και πέραν άλλων ενίσχυσε την παραγωγή κυτοκινών όπως η IFN- γ και TNF- α από τα CD4(+) και CD8(+) T κύτταρα.

Τέλος υπήρχε το ενδιαφέρον να μελετηθεί ο ρόλος της αλοΐνης εντός των εμπορικά διαθέσιμων σκευασμάτων (χυμών aloe vera) πολλά από τα οποία υπόσχονται ισχυρή αντιφλεγμονώδη επίδραση. Ωστόσο σε κάποια σκευάσματα παρατηρήθηκε η αλοΐνη να αποτελεί κύριο συστατικό ενώ σε άλλα να έχει αφαιρεθεί. Έτσι, χρησιμοποιήθηκαν δύο εμπορικά σκευάσματα (χυμός A με περιεκτικότητα αλοΐνης) και χυμός B όπου η αλοΐνη είχε αφαιρεθεί. Έγινε επώαση των περιφερικών λεμφοκυττάρων υγιείς δότες με τους δυο χυμούς αλόης, στις συγκεντρώσεις 1:50 και 1:5, σε σύγκριση με την προενεργοποίηση με καθαρή αλοΐνη στις συγκεντρώσεις 200 και 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Η αραιώση 1:5 προσομοίαζε σε ίση περιεκτικότητα αλοΐνης στον χυμό με 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (*Jawade & Chavan, 2013*). Αντίθετα με τα πειραματικά δεδομένα της επώασης με καθαρή αλοΐνη όπου παρατηρήθηκε αύξηση του ποσοστού της παραγόμενης IFN- γ από τους CD4(+) T- και CD8(+) κυτταρικούς πληθυσμούς σε σχέση με την ενεργοποίηση μόνο με PMA και ιονομυκίνη, οι μετρήσεις στους ίδιους δότες έπειτα από την χορήγηση και των δυο χυμών στην αραιώση 1:5 ανέδειξαν

στατιστικά σημαντική μείωση του ποσοστού παραγωγής της IFN- γ άνω του 95% και στους δύο υπό μελέτη κυτταρικούς πληθυσμούς.

Φυσικά, από τα αποτελέσματα αυτά εγείρεται το ερώτημα γιατί η επώαση με κεκαθαρμένη αλοΐνη προκαλεί την άνοδο του ποσοστού της IFN- γ ενώ και οι δύο χυμοί που δοκιμάστηκαν, επάγουν την μείωση της παραγόμενης IFN- γ . Μείωση της IFN- γ παρατηρήθηκε και σε σειρά πειραματικών δεδομένων όπου χρησιμοποιήθηκε ένα καλά χαρακτηρισμένο προϊόν της Aloe vera το AVH200 πλούσιο σε ακεμαννάνη και χαμηλό σε συγκέντρωση αλοΐνης (Ahluwalia *et al.*, 2016). Επίσης σε άλλες μελέτες όπου δοκιμάστηκε μια πληθώρα βοτανικών διαλυμάτων όπως και εκχύλισμα αλόης παρατηρήθηκε μείωση στην IFN- γ από τα CD4(+) κύτταρα (Guidetti *et al.*, 2016) αλλά και σε ορό από πειραματικά μοντέλα ποντικών με πολλαπλή σκλήρυνση, όπου μειώθηκαν οι TGF- β , IFN- γ και IL-1 με δοσοεξαρτώμενο τρόπο χρησιμοποιώντας αλκοολούχο εκχύλισμα από τη γέλη της Aloe vera (Tanoomand *et al.*, 2019). Ωστόσο είναι επίσης γεγονός ότι η αλοΐνη αποτελεί ένα μόριο με υψηλή παρουσία πολυσακχαριτών (Boudreau *et al.*, 2017) οι οποίοι θα μπορούσαν να ευθύνονται μέσω της διεγερτικής τους επίδρασης κυρίως σε αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα για την αύξηση στην παραγωγή της IFN γ .

Η χρησιμοποίηση δύο χυμών αλόης (με η χωρίς αλοΐνη) και τα κοινά πειραματικά δεδομένα μείωσης της παραγωγής IFN γ , οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η συνολική ανοσοκατασταλτική δράση του χυμού της αλόης, είναι ανεξάρτητη από την παρουσία αλοΐνης. Εντούτοις έχει νόημα η περαιτέρω μελέτη των παραγώγων της αλοΐνης όπως η ακεμαννάνη και η διερεύνηση άλλων πιθανών συστατικών με ανοσοτροποποιητική δράση. Δυστυχώς σε πολλές μελέτες, τα προϊόντα της αλόης που χρησιμοποιούνται είναι είτε περίπλοκα εμπορικά σκευάσματα, είτε δεν είναι καλά χαρακτηρισμένα ως προς τα συστατικά τους, με αποτέλεσμα να μην γίνεται κατανοητό ποια ουσία της Aloe vera, ίσως είναι υπεύθυνη της μείωσης του ποσοστού της IFN- γ από τα 75 ενεργά συστατικά που εμπεριέχονται.

Συμπερασματικά η *in vitro* επώαση λευκοκυττάρων με κεκαθαρμένη αλοΐνη αυξάνει σημαντικά την παραγωγή της IFN- γ από περιφερειακά κύτταρα της επίκτητης ανοσίας και όχι της έμφυτης τόσο σε υγιείς όσο και σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι εμπορικά προϊόντα πλούσια σε αλοΐνη πιθανώς να μην είναι κατάλληλα για να χρησιμοποιηθούν σαν φυσικοί αντιφλεγμονώδεις παράγοντες.

Είναι απαραίτητο βέβαια, σαν μελλοντικός στόχος, να αυξηθεί ο αριθμός των δειγμάτων τόσο στους υγιείς μάρτυρες όσο και στους ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα και ίσως και σε ασθενείς άλλων νοσημάτων (όπως νεοπλασίες), ώστε να αποκτηθεί μια ευρύτερη εικόνα της ανοσοτροποποιητικής επίδρασης της αλοΐνης σε ένα μεγάλο φάσμα ασθενειών. Επίσης ένα άλλο σημαντικό ερώτημα που θα χρειαζόταν να απαντηθεί είναι ο τρόπος – το σηματοδοτικό μονοπάτι και οι κινάσες/ μεταγραφικοί παράγοντες στους οποίους η αλοΐνη πιθανώς δρα και οδηγεί την αύξηση των επιπέδων της IFN- γ από τους πληθυσμούς που αναφέρθηκαν.

Βιβλιογραφία

1. Ahluwalia, B., Magnusson, M. K., Isaksson, S., Larsson, F., & Öhman, L. (2016). Effects of Aloe barbadensis Mill. Extract (AVH200®) on human blood T cell activity in vitro. *Journal of Ethnopharmacology*, *179*, 301–309. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.01.003>
2. Anaya, J.-M., Shoenfeld, Y., Rojas-Villarraga, A., Levy, R. A., Cervera, R., Centro de Estudio de Enfermedades Autoinmunes (Universidad del Rosario), Universidad del Rosario, & Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud. (2013). *Autoimmunity: From bench to bedside*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459447/>
3. Azizi, G., Yazdani, R., & Mirshafiey, A. (2015). Th22 cells in autoimmunity: A review of current knowledge. *European Annals of Allergy and Clinical Immunology*, *47*(4), 108–117.
4. Bendelac, A., Savage, P. B., & Teyton, L. (2007). The biology of NKT cells. *Annual Review of Immunology*, *25*, 297–336. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141711>
5. Berger, A. (2000). Th1 and Th2 responses: What are they? *BMJ (Clinical Research Ed.)*, *321*(7258), 424. <https://doi.org/10.1136/bmj.321.7258.424>
6. Boudreau, M. D., Olson, G. R., Tryndyak, V. P., Bryant, M. S., Felton, R. P., & Beland, F. A. (2017). From the Cover: Aloin, a Component of the Aloe Vera Plant Leaf, Induces Pathological Changes and Modulates the Composition of Microbiota in the Large Intestines of F344/N Male Rats. *Toxicological Sciences*, *158*(2), 302–318. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx105>
7. Coates, L. C., & Helliwell, P. S. (2017). Psoriatic arthritis: State of the art review. *Clinical Medicine*, *17*(1), 65–70. <https://doi.org/10.7861/clinmedicine.17-1-65>
8. Deng, Q., Luo, Y., Chang, C., Wu, H., Ding, Y., & Xiao, R. (2019). The Emerging Epigenetic Role of CD8+T Cells in Autoimmune Diseases: A Systematic Review. *Frontiers in Immunology*, *10*, 856. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00856>
9. Di Meglio, P., Villanova, F., & Nestle, F. O. (2014). Psoriasis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *4*(8). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a015354>
10. Dobson, R., & Giovannoni, G. (2019). Multiple sclerosis—A review. *European Journal of Neurology*, *26*(1), 27–40. <https://doi.org/10.1111/ene.13819>
11. Garg, N., & Smith, T. W. (2015). An update on immunopathogenesis, diagnosis, and treatment of multiple sclerosis. *Brain and Behavior*, *5*(9), e00362. <https://doi.org/10.1002/brb3.362>
12. Geetha, D., & Jefferson, J. A. (2020). ANCA-Associated Vasculitis: Core Curriculum 2020. *American Journal of Kidney Diseases*, *75*(1), 124–137. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2019.04.031>

13. Golubovskaya, V., & Wu, L. (2016). Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. *Cancers*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/cancers8030036>
14. Grindlay, D., & Reynolds, T. (1986). The Aloe vera phenomenon: A review of the properties and modern uses of the leaf parenchyma gel. *Journal of Ethnopharmacology*, 16(2–3), 117–151. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(86\)90085-1](https://doi.org/10.1016/0378-8741(86)90085-1)
15. Guidetti, G., Di Cerbo, A., Giovazzino, A., Rubino, V., Palatucci, A. T., Centenaro, S., Fraccaroli, E., Cortese, L., Bonomo, M. G., Ruggiero, G., Canello, S., & Terrazzano, G. (2016). In Vitro Effects of Some Botanicals with Anti-Inflammatory and Antitoxic Activity. *Journal of Immunology Research*, 2016, 5457010. <https://doi.org/10.1155/2016/5457010>
16. Halbwachs, L., & Lesavre, P. (2012). Endothelium-neutrophil interactions in ANCA-associated diseases. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 23(9), 1449–1461. <https://doi.org/10.1681/ASN.2012020119>
17. Herzenberg, L. A. (2004). FACS innovation: A view from Stanford. *Clinical and Investigative Medicine. Medecine Clinique Et Experimentale*, 27(5), 240–252.
18. Hilven, K., & Goris, A. (2015). Genetic burden mirrors epidemiology of multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 21(11), 1353–1354. <https://doi.org/10.1177/1352458515596603>
19. Huang, C.-T., Hung, C.-Y., Hseih, Y.-C., Chang, C.-S., Velu, A. B., He, Y.-C., Huang, Y.-L., Chen, T.-A., Chen, T.-C., Lin, C.-Y., Lin, Y.-C., Shih, S.-R., & Dutta, A. (2019). Effect of aloin on viral neuraminidase and hemagglutinin-specific T cell immunity in acute influenza. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 64, 152904. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.152904>
20. Jara, S. (n.d.). *The Different 'Types' of Psoriatic Arthritis—And Why Knowing Your Type Matters*. <https://creakyjoints.org/symptoms/psoriatic-arthritis-types/>
21. Jawade, N. R., & Chavan, A. R. (2013). Ultrasonic-Assisted Extraction of Aloin from Aloe Vera Gel. *Procedia Engineering*, 51, 487–493. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2013.01.069>
22. Long, V. (2016). Aloe Vera in Dermatology-The Plant of Immortality. *JAMA Dermatology*, 152(12), 1364. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2016.0077>
23. Luo, X., Zhang, H., Wei, X., Shi, M., Fan, P., Xie, W., Zhang, Y., & Xu, N. (2018). Aloin Suppresses Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Response and Apoptosis by Inhibiting the Activation of NF-κB. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(3). <https://doi.org/10.3390/molecules23030517>
24. Ma, Y., Tang, T., Sheng, L., Wang, Z., Tao, H., Zhang, Q., Zhang, Y., & Qi, Z. (2018). Aloin suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation by inhibiting JAK1-STAT1/3 activation and ROS production in RAW264.7 cells. *International Journal of Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3796>

25. Maecker, H. T., McCoy, J. P., & Nussenblatt, R. (2012). Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nature Reviews Immunology*, 12(3), 191–200. <https://doi.org/10.1038/nri3158>
26. Msif.org. (2013). *ATLAS OF MS*. <https://www.msif.org/wp-content/uploads/2014/09/Atlas-of-MS.pdf>
27. Patel, K., & Patel, D. K. (2013). Medicinal importance, pharmacological activities, and analytical aspects of aloin: A concise report. *Journal of Acute Disease*, 2(4), 262–269. [https://doi.org/10.1016/S2221-6189\(13\)60141-9](https://doi.org/10.1016/S2221-6189(13)60141-9)
28. Rendon, A., & Schäkel, K. (2019). Psoriasis Pathogenesis and Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6). <https://doi.org/10.3390/ijms20061475>
29. Sánchez, M., González-Burgos, E., Iglesias, I., & Gómez-Serranillos, M. P. (2020). Pharmacological Update Properties of Aloe Vera and its Major Active Constituents. *Molecules*, 25(6), 1324. <https://doi.org/10.3390/molecules25061324>
30. Shapiro, H. M. (2003). In *Practical flow cytometry* (4th ed, pp. 21–85). Wiley-Liss.
31. Sindic, C. J. M. (2002). [Multiple sclerosis: From the immune system to inflammatory demyelination and irreversible neurodegeneration]. *Bulletin Et Memoires De l'Academie Royale De Medecine De Belgique*, 157(7–9), 391–398; discussion 398-400.
32. Solmaz, D., Eder, L., & Aydin, S. Z. (2018). Update on the epidemiology, risk factors, and disease outcomes of psoriatic arthritis. *Best Practice & Research. Clinical Rheumatology*, 32(2), 295–311. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2018.09.006>
33. Tanoomand, S., Hosseini, E., & Edalatmanesh, A. (2019). Investigating on Protective Effect of Aloe vera Alcoholic Extract Gel on Serum Levels of Interleukin-1, Interferon Gamma and TGF- β in Experimental Rat Models with Multiple Sclerosis. *Electronic Journal of General Medicine*, 16(2), em122. <https://doi.org/10.29333/ejgm/93482>
34. Upton, R. (Ed.). (2012). *Aloe Vera leaf, Aloe Vera leaf juice, Aloe Vera inner leaf juice, Aloe vera (L.) Burm. f: Standards of identity, analysis & quality control*. American Herbal Pharmacopoeia.
35. Yates, M., & Watts, R. (2017). ANCA-associated vasculitis. *Clinical Medicine (London, England)*, 17(1), 60–64. <https://doi.org/10.7861/clinmedicine.17-1-60>
36. Zangeneh, F. Z., & Shoostary, F. S. (2013). Psoriasis—Types, Causes and Medication. In H. Lima (Ed.), *Psoriasis—Types, Causes and Medication*. InTech. <https://doi.org/10.5772/54728>
37. Λουκόπουλος, Δ. (2015). *ΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ*. Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών. <http://hdl.handle.net/11419/3079>