

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Β' ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ: ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Μ. ΤΣΟΛΙΑ

«Η ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΤΗΣ ΜΗ ΕΙΔΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ»

ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ Κ. ΓΕΩΡΓΟΥΝΤΖΟΥ

ΠΑΙΔΙΑΤΡΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2020

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Διδάκτορας: Αναστασία Κ. Γεωργούντζου

«Η ωρίμανση της μη ειδικής ανοσίας»

Ημερομηνία αίτησης του υποψηφίου: 03/01/2014

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 09/04/2014

Μέλη τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής

A. Σολδάτου, Επίκουρη Καθηγήτρια Παιδιατρικής, επιβλέπουσα

M. Τσολιά, Καθηγήτρια Παιδιατρικής

Π. Ξεπαπαδάκη, Επίκουρη Καθηγήτρια Παιδιατρικής

(σε αντικατάσταση του Ν.Γ. Παπαδόπουλου, Καθηγητή Αλλεργιολογίας, λόγω απουσίας του σε εκπαιδευτική άδεια)

Ημερομηνία ορισμού του θέματος: 23/05/2014

Ημερομηνία παρουσίασης διδακτορικής διατριβής: 10/03/2020

Μέλη επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής

A. Σολδάτου, Επίκουρη Καθηγήτρια Παιδιατρικής, επιβλέπουσα

M. Τσολιά, Καθηγήτρια Παιδιατρικής

Π. Ξεπαπαδάκη, Επίκουρη Καθηγήτρια Παιδιατρικής

A. Καδίτης, Αναπληρωτής Καθηγητής Παιδιατρικής

A. Γαρούφη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παιδιατρικής

N. Σπυρίδης, Επίκουρος Καθηγητής Παιδιατρικής

Γ. Βάρτζελης, Επίκουρος Καθηγητής Παιδιατρικής

Ημερομηνία κατάθεσης διδακτορικής διατριβής: 16/11/2020

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Αθηνών
δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα»

(Οργανισμός του Πανεπιστημίου Αθηνών, αρθρ. 202, παρ. 2, Ν. 5343/32)

**ΕΚ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟΥ ΟΡΚΟΥ
ΚΕΙΜΕΝΟ**



« ΟΜΝΥΜΙ ΤΟΝ ΘΕΟΝ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ. ΗΓΗΣΕΣΘΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΣΚΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ. ΔΙΑΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗ ΕΙΡΞΕΙΝ. ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ. ΟΥΔΕ ΥΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ. ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ. ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΙΩ, ΕΣΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ. Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ, Η ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΕΙΗΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ, ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΣ ΕΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΕΟΝΤΙ ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ. ΤΑΥΤΗΝ ΤΗΝ ΕΠΑΓΓΕΛΙΑΝ ΕΠΙΤΕΛΟΥΝΤΙ ΕΙΗ ΜΟΙ ΤΟΝ ΘΕΟΝ ΑΡΩΓΟΝ ΚΤΗΣΑΣΘΑΙ ΕΝ ΤΩ ΒΙΩ »

ΙΠΠΟΚΡΑΤΗΣ

ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟΣ ΟΡΚΟΣ

ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ

« ΟΡΚΙΖΟΜΑΙ ΣΤΟ ΘΕΟ ΟΤΙ ΘΑ ΕΚΠΛΗΡΩΣΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΜΟΥ ΑΥΤΟ ΚΑΙ ΤΟ ΣΥΜΒΟΛΑΙΟ ΑΥΤΟ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΗ ΔΥΝΑΜΗ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΡΙΣΗ ΜΟΥ ΟΤΙ ΘΑ ΘΕΩΡΩ ΕΚΕΙΝΟΝ ΠΟΥ ΜΟΥ ΔΙΔΑΞΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΑΥΤΗ ΙΣΟΝ ΜΕ ΤΟΥΣ ΓΟΝΕΙΣ ΜΟΥ . ΟΤΙ ΘΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΩ ΤΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΔΙΑΙΤΑ ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΩΦΕΛΕΙΑ ΤΩΝ ΑΡΡΩΣΤΩΝ, ΟΣΟ ΕΞΑΡΤΑΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗ ΔΥΝΑΜΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΡΙΣΗ ΜΟΥ, ΚΑΙ (ΥΠΟΣΧΟΜΑΙ ΟΤΙ) ΘΑ ΤΟΥΣ ΠΡΟΦΥΛΑΞΩ ΑΠΟ ΚΑΘΕ ΒΛΑΒΗ ΚΑΙ ΑΔΙΚΙΑ.

ΔΕΝ ΘΑ ΧΟΡΗΓΗΣΩ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟ ΦΑΡΜΑΚΟ ΣΕ ΚΑΝΕΝΑ, ΟΣΟ ΚΑΙ ΑΝ ΠΑΡΑΚΛΗΘΩ, ΟΥΤΕ ΘΑ ΥΠΟΔΕΙΞΩ ΤΕΤΟΙΑ ΣΥΜΒΟΥΛΗ. ΕΠΙΣΗΣ ΔΕΝ ΘΑ ΔΩΣΩ ΣΕ ΓΥΝΑΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΟ ΕΚΤΡΩΤΙΚΟ, ΑΓΝΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΗ ΘΑ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΤΗ ΖΩΗ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΜΟΥ. ΣΕ ΟΣΑ ΣΠΙΤΙΑ ΠΡΟΣΚΑΛΟΥΜΑΙ, ΘΑ ΜΠΑΙΝΩ ΓΙΑ ΤΟ ΚΑΛΟ ΤΩΝ ΑΡΡΩΣΤΩΝ, ΚΡΑΤΩΝΤΑΣ ΤΟΝ ΕΑΥΤΟ ΜΟΥ ΜΑΚΡΙΑ ΑΠΟ ΚΑΘΕ ΘΕΑΗΜΑΤΙΚΗ ΑΔΙΚΙΑ Η ΑΛΛΗ ΔΙΑΦΘΟΡΑ ΚΑΙ ΠΡΟ ΠΑΝΤΩΝ ΜΑΚΡΙΑ ΑΠΟ ΚΑΘΕ ΑΦΡΟΔΙΣΙΑΚΗ ΠΡΑΞΗ .

ΟΣΑ ΔΕ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΘΑ ΔΩ Η ΘΑ ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΠΕΡΑ ΑΠΟ ΤΙΣ ΑΣΧΟΛΙΕΣ ΜΟΥ ΣΤΗΝ ΚΑΘΗΜΕΡΙΝΗ ΖΩΗ, ΟΣΑ ΔΕΝ ΠΡΕΠΕΙ ΠΟΤΕ ΝΑ ΚΟΙΝΟΛΟΓΟΥΝΤΑΙ ΣΤΟΥΣ ΕΞΩ, ΘΑ ΤΑ ΑΠΟΣΙΩΠΩ, ΥΠΟΛΟΓΙΖΟΝΤΑΣ ΟΤΙ ΑΥΤΑ ΕΙΝΑΙ ΙΕΡΑ ΜΥΣΤΙΚΑ. ΟΣΟ ΛΟΙΠΟΝ ΘΑ ΘΗΡΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΜΟΥ ΑΥΤΟ, ΚΑΙ ΔΕΝ ΘΑ ΤΟΝ ΠΑΡΑΒΙΑΖΩ ΕΙΘΕ ΝΑ ΠΕΤΥΧΑΙΝΩ ΣΤΗ ΖΩΗ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΜΟΥ, ΕΧΟΝΤΑΣ ΚΑΛΟ ΟΝΟΜΑ ΠΑΝΤΟΤΕ ΑΝΑΜΕΣΑ ΣΤΟΥΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ ΕΑΝ ΟΜΩΣ ΤΟΝ ΠΑΡΑΒΩ ΚΑΙ ΓΙΝΩ ΕΠΙΟΡΚΟΣ, ΝΑ ΠΑΘΩ ΤΑ ΑΝΤΙΘΕΤΑ.

ΔΙΔΟΝΤΑΣ ΑΥΤΟ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΕΥΧΟΜΑΙ ΝΑ ΕΧΩ ΤΗ ΒΟΗΘΕΙΑ ΤΟΥ ΘΕΟΥ ΣΤΗ ΖΩΗ ΜΟΥ ».

ΙΠΠΟΚΡΑΤΗΣ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	10
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	18
ΠΡΟΛΟΓΟΣ - ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	20
<u>A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u>	
1. ΦΥΣΙΚΗ, ΕΜΦΥΤΗ Ή ΜΗ ΕΙΔΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑ	24
1.1 Γενικά - Χαρακτηριστικά της μη ειδικής ανοσίας	24
1.2 Συστατικά της μη ειδικής ανοσίας	25
1.2.1 Επιθηλιακοί φραγμοί	25
1.2.1.1 Δέρμα	26
1.2.1.2 Πεπτικός βλεννογόνος	28
1.2.1.3 Αναπνευστικός βλεννογόνος	30
1.2.2 Κύτταρα	32
1.2.2.1 Ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα	32
1.2.2.2 Μονοκύτταρα - Μακροφάγα	34
1.2.2.3 Δενδριτικά κύτταρα (Dendritic Cells, DCs)	37
1.2.2.4 Κύτταρα «φυσικοί φονείς» (Natural Killer Cells, NK-κύτταρα) και έμφυτα λεμφοειδή κύτταρα (Innate Lymphoid Cells, ILCs)	38
1.2.2.5 Ηωσινόφιλα	40
1.2.2.6 Βασεόφιλα και σιτευτικά κύτταρα	41
1.2.3 Διαλυτές ουσίες	44
1.2.3.1 Πρωτεΐνες πλάσματος - Συμπλήρωμα	44
1.2.3.2 Κυτταροκίνες	46
1.2.3.2.1 Κυτταροκίνες - γενικά	46
1.2.3.2.2 Κυτταροκίνες της μη ειδικής ανοσίας	49
1.3 Φάση αναγνώρισης - Υποδοχείς της μη ειδικής ανοσίας	53
1.4 Δραστική φάση της μη ειδικής ανοσίας	57
2. Η ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΤΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ Ή ΜΗ ΕΙΔΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ	59
2.1 Η μη ειδική ανοσία στη νεογνική ηλικία	59
2.2 Δεδομένα για την ωρίμανση της μη ειδικής ανοσίας	64

2.2.1 Ωρίμανση των επιθηλιακών φραγμών	65
2.2.1.1 Δέρμα	65
2.2.1.2 Πεπτικός βλεννογόνος	67
2.2.1.3 Αναπνευστικός βλεννογόνος	69
2.2.2 Μεταβολές των πληθυσμών και της λειτουργίας των κυττάρων της μη ειδικής ανοσίας	70
2.2.2.1 Ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηνα	70
2.2.2.2 Μονοκύτταρα - Μακροφάγα & Δενδριτικά κύτταρα	71
2.2.2.3 Κύτταρα «φυσικοί φονείς» (Natural Killer Cells)	72
2.2.2.4 Ηωσινόφιλα, Βασεόφιλα & Σιτευτικά κύτταρα	73
2.2.3 Ωρίμανση της βιοσύνθεσης διαλυτών ουσιών	74
2.2.3.1 Πρωτεΐνες πλάσματος - Συμπλήρωμα	74
2.2.3.2 Κυτταροκίνες	75
2.3 Ωρίμανση της μη ειδικής ανοσίας, αναπτυξιακά στάδια και λοιμώξεις	81
2.4 Ωρίμανση της μη ειδικής ανοσίας, αλλεργική νόσος και λοιμώξεις	83
2.5 Κενά στη βιβλιογραφία, προκλήσεις για μελλοντική έρευνα	93
2.6 Υπόθεση της μελέτης - Σκοπός - Όφελος	97
<u>B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u>	
3. ΥΛΙΚΑ - ΟΡΓΑΝΑ	100
3.1 Υλικά	100
3.1.1 Βιολογικό υλικό	100
3.1.2 Αναλώσιμα - Αντιδραστήρια - Λοιπά υλικά	100
3.2 Όργανα	103
3.3 Λογισμικό	103
4. ΜΕΘΟΔΟΙ	104
4.1 ΚΛΙΝΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ	104
4.1.1 Πληθυσμός της μελέτης	104
4.1.2 Κλινική εκτίμηση ως προς την παρουσία ατοπίας - αλλεργικού νοσήματος	106
4.1.3 Εισαγωγή στη μελέτη - Καταγραφή ιστορικού - Δειγματοληψίες	107
4.2 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ	
ex vivo	107
4.2.1 Προσδιορισμός λευκοκυτταρικών πληθυσμών	107

4.2.2 Καλλιέργεια μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMCs) παρουσία TLR διεγερτών	108
4.2.3 Προσδιορισμός κυτταροκινών στα υπερκείμενα των καλλιεργειών PBMCs με χρήση τεχνολογίας Luminex	109
4.3 Στατιστική ανάλυση	112
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	115
5.1 ΚΛΙΝΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ	115
5.1.1 Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης	115
5.1.2 Ανάλυση των δεδομένων καταγραφής των λοιμώξεων στον πληθυσμό της μελέτης	120
5.2 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ	131
5.2.1 Μελέτη των μεταβολών των λευκοκυτταρικών πληθυσμών	131
5.2.2 Μελέτη των μεταβολών της βιοσύνθεσης κυτταροκινών	136
5.2.2.1 Η ωρίμανση της μη ειδικής ανοσίας στους υγιείς από τη γέννηση έως την ενηλικίωση	138
5.2.2.1.1 Η ωρίμανση της μη ειδικής ανοσίας στους υγιείς – αυτόματη παραγωγή κυτταροκινών (χωρίς TLR διέγερση)	141
5.2.2.1.2 Η ωρίμανση της μη ειδικής ανοσίας στους υγιείς – διέγερση μιμούμενη ιογενείς λοιμώξεις (TLR3 & TLR7/8)	142
5.2.2.1.3 Η ωρίμανση της μη ειδικής ανοσίας στους υγιείς – διέγερση μιμούμενη βακτηριακές λοιμώξεις (TLR4)	144
5.2.2.2 Η ωρίμανση της μη ειδικής ανοσίας στους ατοπικούς- αλλεργικούς από τη γέννηση έως την ενηλικίωση	147
5.2.2.2.1 Η ωρίμανση της μη ειδικής ανοσίας στους ατοπικούς- αλλεργικούς – αυτόματη παραγωγή κυτταροκινών (χωρίς TLR διέγερση)	147
5.2.2.2.2 Η ωρίμανση της μη ειδικής ανοσίας στους ατοπικούς- αλλεργικούς – διέγερση μιμούμενη ιογενείς λοιμώξεις (TLR3 & TLR7/8)	147
5.2.2.2.3 Η ωρίμανση της μη ειδικής ανοσίας στους ατοπικούς- αλλεργικούς – διέγερση μιμούμενη βακτηριακές λοιμώξεις (TLR4)	148
6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	151
6.1 ΚΛΙΝΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ	151
6.2 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ	156

6.2.1 Μελέτη των μεταβολών των λευκοκυτταρικών πληθυσμών	156
6.2.2 Μελέτη των μεταβολών της βιοσύνθεσης κυτταροκινών	157
7. ΠΕΡΙΛΗΨΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	164
SUMMARY	
8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	166
9. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	183

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΕΠΩΝΥΜΟ: ΓΕΩΡΓΟΥΝΤΖΟΥ

ΟΝΟΜΑ: ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ

ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ: ΠΑΙΔΙΑΤΡΟΣ

ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ: ΟΜΗΡΟΥ 2, 14562, ΚΗΦΙΣΙΑ, ΑΤΤΙΚΗ, ΕΛΛΑΔΑ

ΦΕΙΔΙΠΠΙΔΟΥ 41, 11527, ΑΘΗΝΑ, ΕΛΛΑΔΑ

ΤΗΛΕΦΩΝΑ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΣ: +302108015727 (ΙΑΤΡΕΙΟ)

+302107776964 (ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ)

+306977411949 (ΚΙΝΗΤΟ)

E-MAIL: a.k.georgountzou@gmail.com

ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΟΙ ΤΙΤΛΟΙ

- Πτυχίο Ιατρικής, βαθμός «Λίαν Καλώς - Οκτώ», Ιατρική Σχολή του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (2004)
- Τίτλος Ειδικότητας Παιδιατρικής (2012)

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ & ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΠΡΟΫΠΗΡΕΣΙΑ

- Τρίμηνη εκπαίδευση στο Γ.Ν. Πύργου στη Χειρουργική, Παθολογία και Καρδιολογία (2006)
- Αγροτικός Ιατρός στο Π.Ι. Λεχαινών Ηλείας & Κ.Υ. Γαστούνης (2006-2007)
- Ειδικότητα Παιδιατρικής σε Πανεπιστημιακά Νοσοκομεία του «Ελεύθερου Πανεπιστημίου» στις Βρυξέλλες (Université Libre de Bruxelles) (2007-2010)
- Ειδικότητα Παιδιατρικής στην Α΄ Παιδιατρική Κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών στο Νοσοκομείο Παιδών «Αγία Σοφία» (2010-2012)

- Επιστημονικός συνεργάτης στην Α΄ Παιδιατρική Κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών στο Νοσοκομείο Παίδων «Αγία Σοφία» (2012)
- Ιδιώτης παιδίατρος (2013-σήμερα)
- Παιδίατρος ΙΑΣΩ Παίδων (2013-σήμερα)
- Επιστημονικός συνεργάτης Μονάδας Αλλεργιολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας της Β΄ Παιδιατρικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών (2013-σήμερα)

ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΑ ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ

Επιτυχής παρακολούθηση σεμιναρίων εξειδικευμένης υποστήριξης της ζωής στα νεογνά και τα παιδιά (Neonatal Life Support Course, NLS & Advanced Pediatric Life Support Course, APLS) (2008 & 2009)

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

Αγγλικά (Proficiency in English - Cambridge)

Γαλλικά (D.A.L.F)

ΕΡΕΥΝΑ

Επιστημονικός συνεργάτης στο Αλλεργιολογικό τμήμα της Β΄ Παιδιατρικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών- συμμετοχή σε ερευνητικά πρωτόκολλα ως κλινικός ερευνητής

- PreDicta project (Post-infectious immune reprogramming and its association with persistence and chronicity of respiratory allergic diseases)
- MIDAS (Maturation of Innate immunity: influence of infections and role in the Development of allergy and Asthma)

Εκπαίδευση στις ακόλουθες εργαστηριακές τεχνικές

- καλλιέργεια μονοκυττάρων περιφερικού αίματος (PBMCs)
- χρήση Luminex

ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

Διαλέξεις για την ωρίμανση της ανοσιακής απάντησης σε μεταπτυχιακούς φοιτητές του Π.Μ.Σ. «Παιδιατρική Λοιμωξιολογία» της Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Αθηνών (2017-2019)

ΒΡΑΒΕΙΑ

GA²LEN Junior Travel Grant for EAACI Barcelona 2015 - in honor of Carlos E. Baena-Cagnani

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1) Letter to the editor: Lethal multiple pterigium syndrome

Hatzissevastou-Loukidou H., Georgountzou A., Sotiriadou E.

Genet Couns 2006;17(2):249-5

2) Cancer and the Cellular Response to Hypoxia

Adamaki M., Georgountzou A., Moschovi M.

Pediatr Therapeut 2012;S1:002

3) Propranolol treatment for severe infantile hemangiomas: a single-centre 3-year experience

Georgountzou A., Karavitakis E., Klimentopoulou A., Xaidara A., Kakourou T.

Acta Paediatr 2012;101(10):e469-74

4) Airway basement membrane thickness in children with asthma

Lykogeorgou M., Panaghiotopoulou Gartagani P., Choulakis M., Kaditis A., Georgountzou A., Stefanaki K., Chrousos G., Gemou- Engesaeth V.

European Respiratory Journal 2013;42(Suppl 57) P1256

5) Food allergy profile in late adolescence in a tertiary healthcare facility

Georgountzou A., Karamouza A., Giavi S., Roumpedaki E., Douladiris N., Manousakis E., Papadopoulos N.G.

Clinical and Translational Allergy 2014;4(Suppl 1) P17

6) Postnatal Innate Immune Development: From Birth to Adulthood

Georgountzou A., Papadopoulos N.G.

Front Immunol 2017;8:957

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

Annual scientific meeting of European Society of Social Pediatrics, 12-16 July 2006, Cardiff, UK

- Geographic and socioeconomic factors that favor inequity in health care
Tsouana E., Papadopoulou E., Papathoma E., Anastasopoulou M., Georgountzou A., Koromilas C., Stamiris C., Allagiannis G.

25th International Congress of Pediatrics (ICP), 25-30 August 2007, Athens, Greece

- Effectiveness of vaccination program for Roma children in a rural area of Greece
Tassopoulos D., Kortsalioudaki C., Attilakos G., Georgountzou A., Koulouris D., Vasilikou A.

37ème Congrès annuel de la Société Belge de Pédiatrie, 13-14 mars 2009, Liège, Belgique

- Hyperglycinémie non cétosique néonatal: cas clinique, prise en charge et décisions éthiques
Georgountzou A., Hennequin Y., Aeby A., Vilain C., Ransy V., Balomenou S., Ridremont C., Vanden Eijnden S., Aminzoui M., Vermeylen D., Pardou A.

2nd Summer School of Pediatric Dermatology, 3-6 June 2011, Aegean Sea Cruise, Greece

- Propranolol treatment for severe infantile hemangiomas: A single centre 2 years experience
Georgountzou A., Karavitakis E., Klimentopoulou A., Xaidara A., Kakourou T.

ERS annual congress 2013, 7-11 September, Barcelona, Spain

- P1256. Airway basement membrane thickness in children with asthma
Lykogeorgou M., Panaghiotopoulou-Gartagani P., Choulakis M., Kaditis A., Georgountzou A., Stefanaki K., Chrousos G., Gemou-Engesaeth V.

3rd Pediatric Allergy and Asthma Meeting (PAAM), 17-19 October 2013, Athens, Greece

- Food allergy profile in late adolescence in a tertiary healthcare facility
Georgountzou A., Karamouza A., Giavi S., Roumpedaki E., Douladiris N., Manousakis M., Papadopoulos N.G.

EAACI Congress 2014, 7-11 June, Copenhagen, Denmark

- A rapid response in the cold stimulation time test is associated with anaphylactic reactions in children with cold urticaria

Georgountzou A., Konstantinou G.N., Tzeli K., Mitsias D., Manousakis M., Xepapadaki P., Douladiris N., Papadopoulos N.G.

EAACI Congress 2015, 6-10 June, Barcelona, Spain

- The effect of atopy on occurrence, type and duration of respiratory tract infections in children and adults

Georgountzou A., Maggina P., Kokkinou D., Taka S., Stamataki S., Roumpedaki E., Douladiris N., Xepapadaki P., Papaevangelou V., Andreakos E., Tsofia M., Papadopoulos N.G.

- TLR mediated changes of pro-inflammatory cytokine production in relation to atopy and age

Kokkinou D., Georgountzou A., Maggina P., Taka S., Megremis S., Roumpedaki E., Douladiris N., Xepapadaki P., Papadopoulos N.G.

- Nasal epithelium of different ages of atopic subjects present increased levels of oxidative stress and increased cell cytotoxicity upon rhinovirus infection

Taka S., Kokkinou D., Georgountzou A., Maggina P., Stamataki S., Andreakos E., Papadopoulos N.G.

- Persistent contact urticaria to raw potato in a child with a history of reactivity to ingested cooked potato and high potato-CAP levels: a case report

Georgountzou A., Tzeli K., Karantoumanis D., Douladiris N., Manousakis E., Papadopoulos N.G.

- Retrospective study of oral food challenges performed in children with history of FPIES in a tertiary hospital

Kostoudi S., Tzeli K., Tziotou M., Karantoumanis D., Manolaraki I., Michopoulou C., Georgountzou A., Maggina P., Kyriakakou M., Zisaki V., Georgiou A., Kapoula A., Roumpedaki E., Douladiris N., Manousakis E., Papadopoulos N.G.

4th Pediatric Allergy and Asthma Meeting (PAAM), 15- 17 October 2015, Berlin, Germany

- Nasal epithelium of different ages of atopic subjects present increased levels of oxidative stress and increased cell cytotoxicity upon rhinovirus infection

Taka S., Kokkinou D., Papakonstantinou A., Stefanopoulou P., Georgountzou A., Maggina P., Stamataki S., Papaevangelou V., Andreakos E., Papadopoulos N.G.

EAACI Congress 2016, 11-15 June, Vienna, Austria

- Age-related increase of interferon $\alpha 2$ production across life cycle and association to viral infections
Georgountzou A., Kokkinou D., Taka S., Maggina P., Kourkouni E., Stamataki S., Douladiris N., Xepapadaki P., Soldatou A., Papaevangelou V., Tsolia M., Papadopoulos N.G.
- Innate immunity changes in relation to age between atopic and non atopic subjects
Kokkinou D., Georgountzou A., Maggina P., Taka S., Megremis S., Roubmedaki E., Douladiris N., Xepapadaki P., Andreakos E., Papadopoulos N.G.
- Maturation of innate immune responses of the respiratory epithelium
Taka S., Kokkinou D., Maggina P., Stamataki S., Papakonstantinou A., Georgountzou A., Stefanopoulou P., Andreakos E., Papaevangelou V., Prokopakis E., Papadopoulos N.G.

EAACI Congress 2017, 17-21 June, Helsinki, Finland

- Differential innate antiviral responses between atopics and non atopics from birth to adulthood
Georgountzou A., Kokkinou D., Taka S., Maggina P., Sotirakoglou K., Douladiris N., Xepapadaki P., Papaevangelou V., Tsolia M., Papadopoulos N.G.
- Growth factors play major role in maturation process of airway epithelium in presence of atopy
Taka S., Kokkinou D., Georgountzou A., Maggina P., Stamataki S., Papakonstantinou A., Stefanopoulou P., Andreakos E., Papadopoulos N.G.

EAACI Congress 2018, 26-30 May, Munich, Germany

- Differential maturation of TLR7/8-mediated responses between atopics and non atopics
Georgountzou A., Kokkinou D., Taka S., Maggina P., Sotirakoglou K., Douladiris N., Xepapadaki P., Papaevangelou V., Tsolia M., Papadopoulos N.G.

EAACI Congress 2019, 1-5 June, Lisbon, Portugal

- Age-dependent changes in circulating leukocytes from birth to adulthood in healthy and atopic subjects
Georgountzou A., Kokkinou D., Taka S., Maggina P., Lakoumentas J., Michopoulou C., Douladiris N., Xepapadaki P., Papaevangelou V., Tsolia M., Papadopoulos N.G.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ - ΟΜΙΛΙΕΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

45^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, 25-27 Μαΐου 2007, Χαλκιδική

- ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΥ ΤΩΝ ΑΘΙΓΓΑΝΩΝ

Αττιλάκος Γ., Τσίρος Γ., Λεπίδα Α., Τόλης Κ., Γεωργούντζου Α., Πιστιώλη Α., Τασόπουλος Δ.

- ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΑΤΥΧΗΜΑΤΩΝ ΣΕ ΠΑΙΔΙΑ

Γιώργη Μ., Σπηλιόπουλος Α., Αττιλάκος Γ., Γεωργούντζου Α., Βασιλικού Α., Μαντή Φ., Πιστιώλη Α., Τασόπουλος Δ.

46^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, 13-15 Ιουνίου 2008, Κέρκυρα

- ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΕΣ ΑΠΕΝΑΝΤΙ ΣΤΗΝ ΗΛΙΑΚΗ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΙΣ ΓΝΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΤΙΣ ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΙΚΕΣ ΑΝΤΙΛΗΨΕΙΣ ΤΩΝ ΓΟΝΕΩΝ - Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΣΧΟΛΕΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΠΑΙΔΙΑΤΡΟΥ

Τζαβάρα Μ., Γεωργούντζου Α., Τσουάνα Ε., Τσεκουρά Μ., Αναστασοπούλου Μ., Κοντέλλη-Μπαχνά Ε., Αλλαγιάννης Γ., Παπαδοπούλου Ε.

- ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΕΙΣΑΓΩΓΩΝ ΣΤΗ ΝΕΟΣΥΣΤΑΤΗ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΠΑΡΧΙΑΚΟΥ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟΥ

Τζαβάρα Μ., Τσεκουρά Μ., Αναστασοπούλου Μ., Κοντέλλη-Μπαχνά Ε., Τσίτουρα Μ.-Ε., Γεωργιάδη Ε., Γεωργούντζου Α., Νάκου Δ., Αλλαγιάννης Γ., Παπαδοπούλου Ε.

49^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, 10-12 Ιουνίου 2011, Πύλος Μεσσηνίας

- ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΩΝ ΒΡΕΦΙΚΩΝ ΑΙΜΑΓΓΕΙΩΜΑΤΩΝ ΜΕ ΠΡΟΠΡΑΝΟΛΟΛΗ: Η ΕΜΠΕΙΡΙΑ ΜΑΣ ΑΠΟ ΤΟ 2009 (Ελεύθερη ανακοίνωση)

Γεωργούντζου Α., Καραβιτάκης Ε., Κλημεντοπούλου Α., Ξαϊδάρα Α., Τσιβτανίδου-Κάκουρου Τ.

6^ο Εντατικό Σεμινάριο Εφηβικής Ιατρικής, 12-13 Απριλίου 2013, Αθήνα

- ΑΛΛΕΡΓΙΟΛΟΓΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ ΕΦΗΒΩΝ ΜΕ ΤΡΟΦΙΚΗ ΑΛΛΕΡΓΙΑ ΣΤΗΝ ΑΛΛΕΡΓΙΟΛΟΓΙΚΗ ΜΟΝΑΔΑ ΤΗΣ Β' ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ

Γιαβή Σ., Καραμούζα Α., Γεωργούντζου Α., Ρουμπεδάκη Ε., Δουλαδέρης Ν., Μανουσάκης Ε, Παπαδόπουλος Ν.

51^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, 21-23 Ιουνίου 2013, Αλεξανδρούπολη

- ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΒΡΕΦΟΥΣ ΜΕ ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΚΑΣΑΒΑΧ-ΜΕΡΡΙΤΤ ΜΕ ΠΡΟΠΡΑΝΟΛΟΛΗ: ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗΣ

Γεωργούντζου Α., Πλατοκούκη Ε., Ξαϊδάρα Α., Τσιβιτανίδου- Κάκουρου Τ.

- ΕΡΕΘΙΣΤΙΚΗ ΔΕΡΜΑΤΙΤΙΔΑ ΠΕΡΙΓΕΝΝΗΤΙΚΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΥΠΟΥ JACQUET EROSIVE - ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΟΥ

Ιωαννίδου Λ., Τσίπου Χ., Φιλιππίδου Μ., Κάκκου Μ., Γεωργούντζου Α., Παλαμίδου Φ., Τσιβιτανίδου- Κάκουρου Τ.

18^ο Συνεδριακό Εργαστήριο «Αλλεργία: από τους μηχανισμούς στη διάγνωση και τη θεραπεία», 9-11 Μαΐου 2014, Πόρτο Χέλι, Αργολίδα

- Ομιλία με θέμα: «Η εξέλιξη της μη ειδικής ανοσίας από τη γέννηση στην ενηλικίωση»

16^η μετεκπαιδευτική διημερίδα: «Το αλλεργικό παιδί στην κλινική πράξη», 7-8 Φεβρουαρίου 2015, Αθήνα

- Ομιλία με θέμα «Ροόμετρα» στην ενότητα «Η σωστή χρήση των συσκευών στην Αλλεργιολογία: Πρακτική επίδειξη»

21^ο Συνεδριακό Εργαστήριο, 27-29 Νοεμβρίου 2015, Νεβρόπολη, Καρδίτσα

- Ομιλία με θέμα : «Πότε είναι η καλύτερη ηλικία για παιδικό σταθμό»

22^ο Συνεδριακό Εργαστήριο «Αλλεργίες: από την έρευνα στην κλινική πράξη», 13-15 Μαΐου 2016, Ερμιόνη, Αργολίδα

- Ομιλία με θέμα : «Η ωρίμανση της μη ειδικής ανοσίας στη διάρκεια της ζωής»

25^ο Συνεδριακό Εργαστήριο «Αλλεργιολογικές απαντήσεις σε νέα ερωτήματα», 1-3 Δεκεμβρίου 2017, Νεβρόπολη, Καρδίτσα

- Ομιλία με θέμα «Η ωρίμανση της αντι-ικκής απάντησης»

State of the Art: «Το Αλλεργικό Παιδί» και οι Εξελίξεις, Πανελλήνιο Συνέδριο, 07-10 Φεβρουαρίου 2019, Αθήνα

- Η ωρίμανση των TLR3 & 7/8 απαντήσεων της μη- ειδικής ανοσίας από τη γέννηση ως την ενηλικίωση σε υγιή και ατοπικά άτομα

Γεωργούντζου Α., Κοκκίνου Δ., Μαγγίνα Π., Τάκα Σ., Παπαευαγγέλου Β., Τσολιά Μ., Ξεπαπαδάκη Π., Ανδρεάκος Ε., Παπαδόπουλος Ν.Γ.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AMPs: Antimicrobial peptides = αντιμικροβιακά πεπτίδια

APC: Antigen presenting cell = αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο

CLRs: C-type lectin receptors = υποδοχείς λεκτίνης C-τύπου

CSFs: Colony stimulating factors = παράγοντες διέγερσης αποικιών

DC: Dendritic cell = δενδριτικό κύτταρο

DNA: Deoxyribonucleic acid = δε(σ)οξυριβο(ζο)νουκλεϊ(νι)κό οξύ

HLA: Human leukocyte antigen complex = ανθρώπινο σύμπλεγμα αντιγόνων λευκοκυττάρων

HRV: Human rhinovirus = ανθρώπινος ρινοϊός

IFN: Interferon = ιντερφερόνη

Ig: Immunoglobulin = ανοσοσφαιρίνη

IL: Interleukin = ιντερλευκίνη

ILCs: Innate lymphoid cells = έμφυτα λεμφοειδή κύτταρα

IP-10: Interferon γ -induced protein 10 = χημειοκίνη επαγόμενη από την IFN- γ

ISGs: IFN-stimulated genes = γονίδια που επάγονται από την ιντερφερόνη

KIR: Killer cell Ig-like receptors = ανοσοσφαιρινικοί υποδοχείς φόνευσης

LPS: Lipopolysaccharide = λιποπολυσακχαρίδη

MCP-3: Monocyte-chemotactic protein 3 = χημειοτακτική πρωτεΐνη των μονοκυττάρων 3

MDC: Macrophage-derived chemokine = χημειοκίνη προερχόμενη από τα μακροφάγα

MHC: Major histocompatibility complex = μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας

MIP-1 α : Macrophage inflammatory protein 1 α = φλεγμονώδης πρωτεΐνη των μακροφάγων 1 α

MIP-1 β : Macrophage inflammatory protein 1 β = φλεγμονώδης πρωτεΐνη των μακροφάγων 1 β

MyD88: Myeloid differentiation factor 88 = παράγων μυελικής διαφοροποίησης 88

NETs: Neutrophil extracellular traps = εξωκυττάρια παγίδες ουδετεροφίλων

NF κ B: Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells = πυρηνικός παράγοντας-ελαφράς-αλύσου-ενισχυτής ενεργοποιημένων B κυττάρων (σύμπλεγμα πρωτεϊνών που ελέγχουν τη μεταγραφή του DNA)

NK cells: Natural Killer cells = κύτταρα φυσικοί φονείς

NLRs: Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors = νουκλεοτιδιο-δεσμευτικοί υποδοχείς της φυσικής ανοσίας

PAMPs: Pathogen associated molecular patterns = μοριακά μοτίβα σχετιζόμενα με παθογόνα

PBMCs: Peripheral blood mononuclear cells = μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος

Poly:IC: Polyinosinic:polycytidylic acid = συνθετικό ανάλογο RNA διπλής έλικας, αγωνιστής του υποδοχέα TLR3

PRRs: Pattern recognition receptors = υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων

R848 (Resiquimod): = συνθετικό ανάλογο RNA μονής έλικας, αγωνιστής των υποδοχέων TLR7/8

RANTES: Regulated upon activation normal T cell expressed and secreted = φλεγμονώδης χημειοκίνη

RLRs: Retinoid acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptors = υποδοχείς τύπου RIG-I της φυσικής ανοσίας

RNA: Ribonucleic acid = ριβονουκλεϊκό οξύ

RSV: Respiratory syncytial virus = αναπνευστικός συγκυτιακός ιός

SPT: Skin prick tests = δερματικές δοκιμασίες δια νυγμού

TGF-β: Transforming growth factor β = μεταμορφωτικός αυξητικός παράγων

TIRAP: TIR-domain-containing adaptor protein = πρωτεΐνη διασύνδεσης που εμπλέκεται στην ενδοκυττάρια μετάδοση των TLR επαγόμενων σημάτων

TLR: Toll-like receptor = υποδοχέας τύπου Toll της φυσικής ανοσίας

TNF-α: Tumor Necrosis Factor α = παράγων νέκρωσης όγκων α

Treg: T regulatory cells = T ρυθμιστικά κύτταρα

TRIF: TIR domain-containing adaptor protein inducing interferon-β = πρωτεΐνη διασύνδεσης που εμπλέκεται στην ενδοκυττάρια μετάδοση των TLR επαγόμενων σημάτων και επάγει την IFN-β

TSLP: Thymic stromal lymphopoietin = θυμική στρωμ(ατ)ική λεμφοποιητίνη

ΠΡΟΛΟΓΟΣ - ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον για τη φυσική, έμφυτη ή μη ειδική ανοσία. Η ανακάλυψη των TLR υποδοχέων (Toll-Like Receptors) στα κύτταρα της μη ειδικής ανοσίας άνοιξε νέους ορίζοντες στην κατανόηση των μηχανισμών που ενεργοποιούνται με την εισβολή παθογόνων μικροοργανισμών στον ανθρώπινο οργανισμό και αποσκοπούν στην εξουδετέρωσή τους και παράλληλα, έδειξε ότι οι ίδιοι αυτοί μηχανισμοί ενδέχεται να συμμετέχουν στην παθογένεια αλλεργικών και αυτοάνοσων νοσημάτων. Μάλιστα, η έρευνα την τελευταία δεκαετία τεκμηρίωσε ότι το σύστημα της μη ειδικής ανοσίας είναι ανώριμο κατά τη γέννηση και επιχειρεί να προσεγγίσει τη διαδικασία της προοδευτικής ωρίμανσής του, αλλά και των παραγόντων που ενέχονται σε αυτήν. Η προοδευτική συσσώρευση γνώσης πάνω σε αυτόν τον τομέα μάς επιτρέπει να κατανοήσουμε καλύτερα την επιρρέπεια σε συγκεκριμένες λοιμώξεις σε διάφορες ηλικιακές ομάδες, αλλά παράλληλα μπορεί να συμβάλει στην ανακάλυψη μορίων κατάλληλων για διάγνωση και για φαρμακευτική χρήση. Τέλος, η πληρέστερη κατανόηση του τρόπου με τον οποίο η διαταραχή λειτουργιών της μη ειδικής ανοσίας ή η απορρύθμιση της φυσιολογικής της ωρίμανσης σχετίζεται με την παθογένεση διαφόρων νοσημάτων ενδέχεται να συντελέσει σε παρεμβάσεις για τον περιορισμό τους.

Πρωταρχικός στόχος της διατριβής είναι η περιγραφή της ωρίμανσης της μη ειδικής ανοσίας. Εξετάζεται συνεπώς η μεταβολή παραμέτρων της μη ειδικής ανοσιακής απάντησης σε φυσιολογικά άτομα από τη γέννηση μέχρι την ενηλικίωση, μέσω συγχρονικής διαστρωματοποιημένης μελέτης πληθυσμού.

Παράλληλα, εξετάζεται η επίδραση της ατοπίας στη διαδικασία ωρίμανσης της μη ειδικής ανοσίας, καθώς οι ίδιες ανοσολογικές παράμετροι μελετώνται και σε ατοπικά άτομα από τη γέννηση μέχρι την ενηλικίωση και συγκρίνονται με αυτές των υγιών.

Τέλος, επιχειρείται η αναγνώριση παραμέτρων της μη ειδικής ανοσιακής ωρίμανσης ως παραγόντων κινδύνου για αυξημένη ευαισθησία σε λοιμώξεις, μέσω της καταγραφής της επίπτωσης λοιμώξεων στον υπό μελέτη πληθυσμό και αναδεικνύονται διαφορές μεταξύ φυσιολογικών και ατοπικών ατόμων.

Η διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στα ερευνητικά εργαστήρια της Β΄ Παιδιατρικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών (Β΄ ΠΠΚ), υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Ν.Γ. Παπαδόπουλου και της Επίκουρης Καθηγήτριας Α. Σολδάτου.

Για τη συμβολή τους στην εκπόνηση της παρούσας διατριβής θέλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερα:

Τον Καθηγητή Ν. Γ. Παπαδόπουλο για τη συνεχή ενθάρρυνση, ακούραστη επίβλεψη και καθοδήγηση καθόλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής, από τη σύλληψη, την υλοποίηση της κλινικής μελέτης και των πειραμάτων μέχρι και την ανάλυση και καταγραφή των ευρημάτων. Πέραν της απόκτησης σημαντικών γνώσεων στον τομέα της παιδιατρικής Αλλεργιολογίας και Ανοσολογίας και τη συμμετοχή σε πολυάριθμες επιστημονικές εκδηλώσεις στην Ελλάδα και την Ευρώπη, κατά τη διάρκεια της συμπόρευσής μας στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, του οφείλω τη διεύρυνση όχι μόνο του επιστημονικού αλλά και του γενικότερου τρόπου σκέψης μου.

Την Επ. Καθηγήτρια Α. Σολδάτου για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε από την πρώτη στιγμή της συνεργασίας μας, την αισιοδοξία, τη στήριξη και τις στοχευμένες συμβουλές της για την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

Τις Καθηγήτριες Μ. Τσολιά και Β. Παπαευαγγέλου για την πολύτιμη βοήθεια τους, ώστε να πραγματοποιηθεί μέρος των δειγματοληψιών στη Β΄ και Γ΄ ΠΠΚ, αντίστοιχα. Παράλληλα, θα ήθελα να τις ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν, προκειμένου να μοιραστώ μέρος των γνώσεων που απέκτησα κατά την εκπόνηση της διατριβής αυτής συμμετέχοντας στο Π.Μ.Σ. «Παιδιατρική Λοιμωξιολογία».

Την Επ. Καθηγήτρια Π. Ξεπαπαδάκη και τους εκλεκτούς συναδέλφους αλλεργιολόγους Ν. Δουλαδίρη, Μ. Μανουσάκη και Ε. Ρουμπεδάκη για την αδιάκοπη και απλόχερη μετάδοση γνώσεων στο πεδίο της παιδιατρικής Αλλεργιολογίας και Ανοσολογίας και την αρωγή τους στην πραγματοποίηση του κλινικού μέρους της μελέτης.

Τη συνάδελφο παιδίατρο και φίλη Π. Μαγγίνα για την απρόσκοπτη συνεργασία μας αλλά και την καθοδήγηση στο κλινικό μέρος της μελέτης, καθώς και την ενθάρρυνση και συμπαράστασή της για την εκπόνηση της διατριβής.

Τους ιατρούς της ΩΡΛ κλινικής του Νοσοκομείου Παιδών «Π. & Α. Κυριακού» και ιδιαίτερα το Διευθυντή Μ. Τσακανίκο και τη Σ. Σταματάκη για τη βοήθεια στη στρατολόγηση μαρτύρων για την παρούσα μελέτη.

Τη συνάδελφο αλλεργιολόγο Μ. Πασιώτη και τις βιολόγους Δρ. Σ. Τάκα και Δ. Κοκκίνου, που με μύησαν στο θαυμαστό κόσμο της βασικής έρευνας και των ποικίλων εργαστηριακών τεχνικών. Ιδιαίτερα τη Δ. Κοκκίνου για την εξαιρετική συνεργασία στην πραγματοποίηση του εργαστηριακού μέρους της διατριβής και την ανάλυση των αποτελεσμάτων και τη Σ. Τάκα για την ενεργητική βοήθεια και συμβουλή που προσέφερε στο εργαστηριακό μέρος της μελέτης και την ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Το στατιστικό Ι. Λακουμέντα για τη βοήθειά του στην επεξεργασία και συστηματοποίηση των πολυάριθμων δεδομένων που προέκυψαν από την παρούσα ερευνητική εργασία.

Τις επισκέπτριες υγείας Ε. Στεργίου και Χ. Μιχοπούλου και τη νοσηλεύτρια Β. Ζησάκη για τη συνεχή βοήθειά τους σε πρακτικά ζητήματα καθόλη τη διάρκεια της παρουσίας μου στη Μονάδα Αλλεργιολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας.

Η παρούσα διατριβή είναι αφιερωμένη στους γονείς μου, Κωνσταντίνο και Νίκη, για την αστείρευτη αγάπη τους, τη συνεχή φροντίδα και υποστήριξη, την αδιάκοπη μεταλαμπάδευση γνώσεων και αξιών.

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΦΥΣΙΚΗ, ΕΜΦΥΤΗ Ή ΜΗ ΕΙΔΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑ

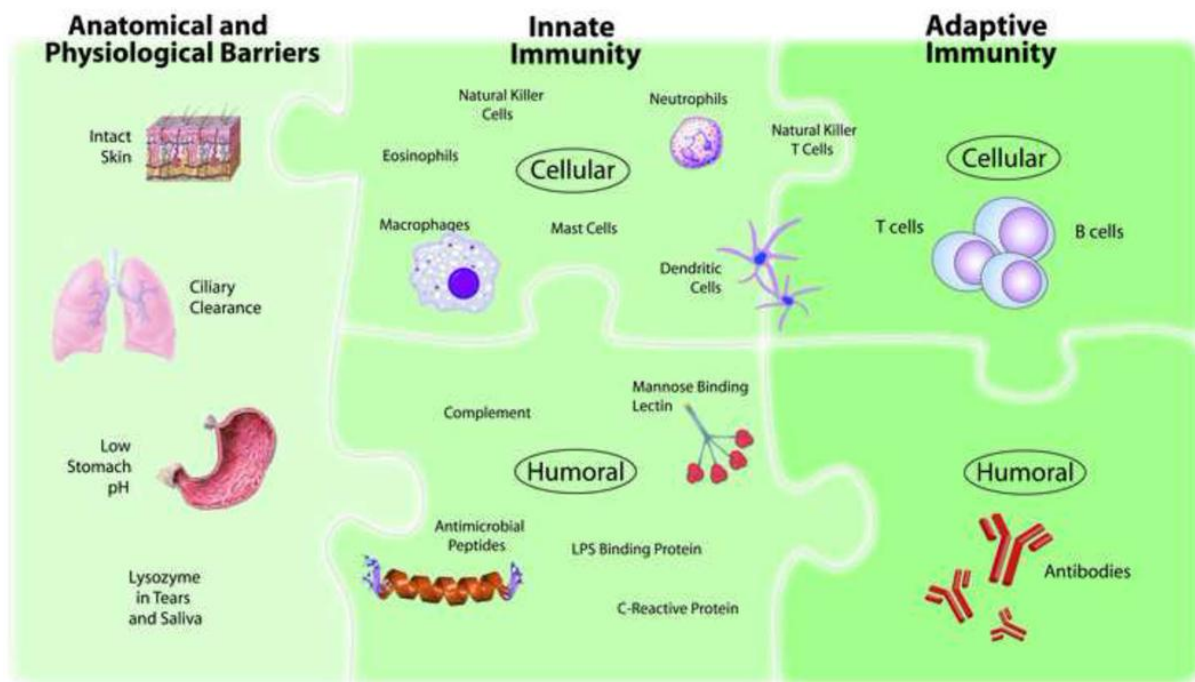
1.1 Γενικά - Χαρακτηριστικά της φυσικής ανοσίας

Η ανοσία διακρίνεται στη φυσική, έμφυτη ή μη ειδική (innate immunity) και στην ειδική ή επίκτητη ανοσία (adaptive immunity) (εικόνα 1). Η μη ειδική ανοσία είναι φυλογενετικά αρχαιότερη και στηρίζεται σε δομές/παράγοντες που καθορίζονται γενετικά, προϋπάρχουν στον οργανισμό πριν την όποια επαφή με μικρόβια και δρουν με περιορισμένη εκλεκτικότητα έναντι σχετικά μεγάλων ομάδων αντιγόνων ξένων βιολογικών παραγόντων. Κινητοποιείται άμεσα, εντός λίγων ωρών μετά την είσοδο ενός λοιμογόνου παράγοντα στον οργανισμό και αποσκοπεί στον περιορισμό του. Περιλαμβάνει ανατομικούς φραγμούς, κύτταρα και διαλυτές ουσίες, οι οποίες είτε είναι προσχηματισμένες, είτε παράγονται κατόπιν διέγερσης. Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στη δραστική φάση της μη ειδικής ανοσίας είναι η φλεγμονή, η φαγοκυττάρωση, η λύση κυττάρων- στόχων, η αυτοφαγία και η απόπτωση [1-3].

Η μη ειδική ανοσία, πέραν του ότι αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού έναντι των παθογόνων μικροβίων, φαίνεται να κατέχει πολύπλοκο ρόλο στο ανοσοποιητικό σύστημα. Έτσι, η διέγερση της προάγει την ενεργοποίηση των κυττάρων της επίκτητης ανοσίας και μάλιστα επιδρά στη διαμόρφωση των απαντήσεων της επίκτητης ανοσίας, κυρίως μέσω της παραγωγής κυτταροκινών που ευοδώνουν την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων και την ενεργοποίηση και διαφοροποίηση των λεμφοκυττάρων [4]. Επιπλέον, τα τελευταία χρόνια έχει διαφανεί ότι η ενεργοποίηση της μη ειδικής ανοσίας εμπλέκεται στην παθογένεση των αλλεργικών αλλά και αρκετών αυτοάνοσων νοσημάτων, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1, η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου και ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος [5].

Μέχρι πρότινος θεωρούσαμε ότι η φυσική ανοσία στερούνταν κάθε ειδικότητας και μνήμης. Εντούτοις, με την ανακάλυψη των Toll-Like Receptors (TLR) – υποδοχέων τύπου Toll φάνηκε ότι η φυσική ανοσία χωρίς να είναι αντιγονο-ειδική (“antigen-specific”), όπως η επίκτητη ανοσία, παρουσιάζει ειδικότητα στο βαθμό που κάθε παθογόνος παράγοντας, αναλόγως της δομής του, αναγνωρίζεται από συγκεκριμένο υποδοχέα (“pathogen-specific”) [3]. Επιπλέον, νέα δεδομένα δείχνουν ότι ανοσολογική μνήμη υπάρχει, τουλάχιστον σε

κάποιο βαθμό και σε αυτό το σκέλος της ανοσίας, αφού βρέθηκε ότι επαναλαμβανόμενα ερεθίσματα ενίοτε οδηγούν σε βελτιωμένες/ενισχυμένες επόμενες απαντήσεις (“trained immunity”), μέσω επιγενετικών μεταβολών [6].



Εικόνα 1

Σχηματική παρουσίαση του ανοσοποιητικού συστήματος (από Turvey & Broide [5])

Ο ανθρώπινος οργανισμός για την προστασία έναντι των παθογόνων μικροβίων διαθέτει τρία επίπεδα άμυνας α) τους επιθηλιακούς φραγμούς (αριστερά) β) τη φυσική ή μη ειδική ανοσία (μέση) γ) την επίκτητη ανοσία (δεξιά). Τόσο η φυσική, όσο και η επίκτητη ανοσία περιλαμβάνουν κύτταρα (cellular component) και διαλυτά μόρια (humoral component).

1.2 Συστατικά της μη ειδικής ανοσίας

1.2.1 Επιθηλιακοί φραγμοί

Πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού έναντι των παθογόνων μικροβίων αποτελούν οι φραγμοί του δέρματος, καθώς και του πεπτικού και αναπνευστικού βλεννογόνου. Καλύπτονται από συνεχή επιθήλια που παρέχουν φυσικούς και χημικούς φραγμούς ενάντια στη μόλυνση.

1.2.1.1 Δέρμα

Το δέρμα αποτελεί φραγμό έναντι φυσικών, χημικών και βιολογικών ερεθισμάτων και είναι βασικό συστατικό της φυσικής ανοσίας. Αποτελείται από έξω προς τα μέσα από την επιδερμίδα, το χόριο και τον υποδόριο ιστό. Κάθε στρώμα του είναι εξαιρετικά περίπλοκο και περιλαμβάνει μια σειρά δομών, όπως οι θύλακες των τριχών, οι ιδρωτοποιοί και σμηγματογόνοι αδένες, νεύρα, αιμοφόρα και λεμφικά αγγεία. Η επιδερμίδα και ιδίως η εξωτερική της στιβάδα, η κερατίνη, καθώς και το χόριο παίζουν το σημαντικότερο ρόλο στην αμυντική λειτουργία του φραγμού. Το πάχος και η ακεραιότητα της κερατίνης στιβάδας, το όξινο pH, το μικροβίωμα του δέρματος, ποικίλες αντιμικροβιακές ουσίες και τα ανοσιακά κύτταρα που αποικίζουν τις δύο ανώτερες στιβάδες συμβάλλουν στην αποτελεσματικότητα του δερματικού φραγμού. Η κερατίνη στιβάδα, στην οποία τα κερατινοκύτταρα είναι ενσωματωμένα σε μία πλούσια σε λιπίδια εξωκυττάρια ουσία και συνδέονται μεταξύ τους με τα τονικά ινίδια, προσομοιάζει με τείχος όπου οι λειτουργίες της άμυνας και της διαπερατότητας βρίσκονται σε διαρκή αλληλεπίδραση. Οι σύνθετες μεταβολικές διεργασίες που επιτελούνται σε αυτήν ρυθμίζουν μεταξύ άλλων την παραγωγή διαφόρων ουσιών με ωσμωτική και αντιμικροβιακή δράση, τη σύνθεση φίλτρων για την UV ακτινοβολία και την απόπτωση των κερατινοκυττάρων [7, 8].

Το όξινο pH της επιφάνειας της επιδερμίδας, που κυμαίνεται μεταξύ 4.5 και 6.7, επηρεάζει ποικίλες λειτουργίες, όπως τη διαπερατότητα του δέρματος, τη διαδικασία απολέπισης αλλά και τον πολλαπλασιασμό των βακτηριδίων της χλωρίδας, ενώ παράλληλα αποτρέπει τον αποικισμό από παθογόνα μικρόβια και γι' αυτό αποκαλείται συχνά και «όξινος μανδύας». Το pH του δέρματος διατηρείται όξινο χάρις στην παραγωγή γαλακτικού οξέος από τους ιδρωτοποιούς αδένες, ελεύθερων λιπαρών οξέων από διάσπαση ενδογενών φωσφολιπιδίων ή από υδρόλυση τριγλυκεριδίων του σμήγματος από μικρόβια της φυσιολογικής χλωρίδας και τέλος, μέσω καταβολισμού κεραμιδίων ή της δομικής πρωτεΐνης φιλαγγρίνης [9].

Μία ποικίλη, ειδική για κάθε σημείο του σώματος μικροβιακή χλωρίδα αποικίζει την επιφάνεια της επιδερμίδας και περιλαμβάνει βακτήρια, ιούς και μύκητες. Όπως δείχτηκε με μεταγενωμική ανάλυση βάσει της αλληλουχίας του 16S rRNA γονιδίου, η μικροχλωρίδα του δέρματος αποτελείται κυρίως από μικροοργανισμούς που ανήκουν στα φύλα *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* και *Proteobacteria*. Σε περιοχές με μεγαλύτερη

θερμοκρασία και υγρασία ευοδώνεται μεγαλύτερη σχετική ανάπτυξη μικροβίων όπως Gram αρνητικοί βάκιλοι, κορυνοβακτήρια και χρυσίζων σταφυλόκοκκος, ενώ σε περιοχές με μεγάλη πυκνότητα σμηγματογόνων αδένων ευοδώνεται η ανάπτυξη λιπόφιλων μικροβίων όπως *Propionibacterium spp.* και *Malassezia spp.* Γενικά, η ποικιλότητα της μικροχλωρίδας διαμορφώνεται από ένα συνδυασμό παραγόντων όπως η ηλικία, το φύλο, το περιβάλλον και οι συνθήκες διαβίωσης και οι συνήθειες του ατόμου, αλλά επηρεάζεται και από γενετικούς παράγοντες (π.χ. μεταλλάξεις σε γονίδια της δομικής πρωτεΐνης φιλαγγρίνης) και συγκεκριμένα νοσήματα (όπως π.χ. ο σακχαρώδης διαβήτης). Επίσης, έχει πρόσφατα αποδειχθεί ότι τα συμβιωτικά μικρόβια μπορούν να τροποποιήσουν τις ανοσολογικές αντιδράσεις του ξενιστή και να ενισχύσουν την προστασία έναντι των παθογόνων μικροβίων [10-12].

Πολλά από τα κύτταρα του δέρματος, συμπεριλαμβανομένων των κερατινοκυττάρων, των κυττάρων των σμηγματογόνων και ιδρωτοποιών αδένων αλλά και των ανοσιακών κυττάρων παράγουν αντιμικροβιακές πρωτεΐνες και πεπτίδια (Antimicrobial Peptides, AMPs). Περισσότερες από είκοσι ουσίες με αντιμικροβιακή δράση έχουν αναγνωριστεί στην επιφάνεια του δέρματος, μεταξύ των οποίων πιο γνωστές είναι οι καθελισιδίνες, οι β-ντεφενσίνες αλλά και η λακτοφερρίνη, η λυσοζύμη, η ντερμσιδίνη, η ψωριασίνη και η RNase 7. Οι AMPs θεωρούνται «ενδογενή αντιβιοτικά» με μικροβιοκτόνο δράση, αλλά παράλληλα δημιουργούν μία χημική ασπίδα στο δέρμα και αλληλεπιδρούν με συστατικά της φυσικής και επίκτητης ανοσίας. Έτσι, έχει δειχθεί ότι οι ντεφενσίνες και η καθελισιδίνη LL-37 ευοδώνουν τη χημειοταξία των πολυμορφοκυττάρων, των μονοκυττάρων, λεμφοκυττάρων και δενδριτικών κυττάρων, ενώ ταυτόχρονα επιδρούν στην ενεργοποίηση των TLR υποδοχέων και στην πρόκληση φλεγμονώδους απάντησης. Επίσης, συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και στη διαδικασία της επούλωσης. Οι AMPs μπορεί να εκκρίνονται σε μικρές συγκεντρώσεις σε φυσιολογικές συνθήκες, αλλά πολύ συχνά η παραγωγή τους πυροδοτείται από λοιμώξεις ή τραυματισμό του δέρματος [13, 14]. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι η λοίμωξη με ιούς οδηγεί στην τοπική παραγωγή ιντερφερονών (IFN) και μάλιστα, τα τελευταία χρόνια έχουν ανακαλυφθεί αρκετές πρωτεΐνες με αντι-ική δράση που επάγονται από τις IFN, όπως η oligoadenylate synthetase 2, οι myxovirus resistance (MX) proteins, οι GTPases, η IFN-stimulated gene 15 και οι Guanylate-Binding Proteins (GBPs) [15].

Το δέρμα περιέχει στην επιδερμίδα και το χόριο πλήθος ανοσιακών κυττάρων τα οποία ανήκουν στη μη ειδική ανοσία, όπως μακροφάγα, πολυμορφοπύρρηνα, δενδριτικά κύτταρα (στα οποία ανήκουν και τα ιστιοκύτταρα του Langerhans), μαστοκύτταρα, έμφυτα λεμφοειδή κύτταρα (Innate Lymphoid Cells, ILCs) και τέλος, γδ Τ-λεμφοκύτταρα. Εξάλλου, και τα κερατινοκύτταρα της επιδερμίδας συμμετέχουν ενεργά στη φυσική ανοσία, καθώς εκφράζουν διάφορους υποδοχείς αναγνώρισης παθογόνων μικροβίων και παράγουν πλήθος κυτταροκινών και χημειοκινών, αλλά και αντιμικροβιακά πεπτίδια. Τα μακροφάγα κατέχουν κεντρικό ρόλο στη φλεγμονώδη αντίδραση, δεδομένου ότι παράγουν ποικίλες κυτταροκίνες και χημειοκίνες και προσελκύουν στο σημείο της λοίμωξης ή του τραυματισμού του δέρματος συγκεκριμένους πληθυσμούς ανοσιακών κυττάρων, όπως π.χ. πολυμορφοπύρρηνα. Παράλληλα όμως, σε μεταγενέστερα στάδια, συμβάλλουν στη λύση της φλεγμονής και την επούλωση των πληγών. Τα δενδριτικά κύτταρα της επιδερμίδας και του χορίου συνεχώς προσλαμβάνουν αντιγόνα του περιβάλλοντος, τόσο σε κατάσταση ηρεμίας όσο και σε φάση λοίμωξης και ακολούθως μεταναστεύουν στους επιχώριους λεμφαδένες, όπου ξεκινά η ενεργοποίηση της επίκτητης ανοσιακής απόκρισης. Τέλος, τα ILCs φαίνεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανοσοεπιτήρηση και την επούλωση πληγών (ILC2), καθώς και την ανάπτυξη ανοχής στα συμβιωτικά μικρόβια (ILC3) [8, 16, 17].

1.2.1.2 Πεπτικός βλεννογόνος

Ο πεπτικός σωλήνας είναι ο επιθηλιακός φραγμός με τη μεγαλύτερη επιφάνεια στο ανθρώπινο σώμα και δέχεται συνεχή αντιγονικό ερεθισμό.

Ο βλεννογόμος του πεπτικού σωλήνα μέχρι και τον οισοφάγο καλύπτεται από πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο. Σημαντικό ρόλο στη φυσική άμυνα στο τμήμα αυτό έχουν οι διάφορες αντιμικροβιακές πρωτεΐνες που παράγονται από τους σιελογόνους αδένες ή άλλα κύτταρα του βλεννογόνου όπως η αμυλάση, η λυσοζύμη, η λακτοφερρίνη αλλά και η καθελισιδίνη LL-37, οι ντεφενσίνες, οι μουκίνες, οι συστατίνες, οι ιστατίνες, η σταθερίνη και η καλπροτεκτίνη. Επιπλέον, στο βλεννογόνο του στόματος απαντάται σημαντικός πληθυσμός αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, ενώ υπάρχει συνεχής ροή πολυμορφοπυρήνων διαμέσου της ουλοδοντικής σχισμής ακόμα και σε κατάσταση ηρεμίας [18, 19].

Στο στόμαχο σημαντικά συστατικά της μη ειδικής ανοσίας αποτελούν το όξινο pH, που δημιουργείται από την έκκριση υδροχλωρικού οξέος από τα καλυπτήρια κύτταρα και το πρωτεολυτικό ένζυμο πεψίνη. Σημαντικό φραγμό στην εισβολή μικροβίων συνιστά επίσης το προστατευτικό του βλεννογόνου φιλμ βλέννης που αποτελείται από νερό και γλυκοπρωτεΐνες που ονομάζονται μουκίνες. Τα τελευταία χρόνια έχουν επίσης ανιχνευτεί στο στόμαχο ουσίες όπως η κολλεκτίνη Surfactant Protein (SP) -D και η galectin-3 που εμπλέκονται στην τοπική μη ειδική ανοσιακή απάντηση [20, 21].

Ο βλεννογόνος του εντέρου αποτελείται από τα απορροφητικά εντεροκύτταρα, τα καλυκοειδή κύτταρα, τα κύτταρα του Paneth και εντεροενδοκρινή κύτταρα. Τα εντεροκύτταρα συνδέονται μεταξύ τους με ισχυρές συνδέσεις («σφιχτές» συνδέσεις και δεσμοσωμάτια) και δημιουργούν ένα εμπόδιο στη διέλευση μικροβίων και αντιγόνων, ενώ ο περισταλτισμός του εντέρου συμβάλλει στη συνεχή απομάκρυνση των βλαπτικών παραγόντων. Πέραν του επιθηλιακού φραγμού, σημαντικό ρόλο στη φυσική άμυνα του εντέρου παίζει η βλέννη, ένα μίγμα βλεννοπολυσακχαριτών που επαλείφει το επιθήλιο και λειτουργεί ως παγίδα για τα μικρόβια και για άλλες ενδεχομένως βλαπτικές ουσίες. Επιπρόσθετα, μια πλειάδα αντιμικροβιακών πρωτεϊνών και πεπτιδίων με συμβολή στη μη ειδική ανοσία εκκρίνονται και στο τμήμα αυτό του πεπτικού σωλήνα, όπως λυσοζύμη, α- και β- ντεφενσίνες, καθελιδίνη, λεκτίνες, RNAσες, φωσφολιπάση A2 κ.ά., με δράση κατά Gram (+) και (-) μικροβίων, ιών, πρωτοζώων και μυκήτων. Τα κύτταρα που συμμετέχουν στη φυσική ανοσία στο έντερο είναι κυρίως τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα, που βρίσκονται στο χόριο και διαθέτουν TLR και άλλους παρόμοιους υποδοχείς, μέσω των οποίων αναγνωρίζονται παθογόνοι εισβολείς και ξεκινά η ενεργοποίηση των αμυντικών μηχανισμών. Παράλληλα, οι υποδοχείς αυτοί συνεχώς αλληλεπιδρούν με τη φυσιολογική μικροχλωρίδα του εντέρου, με στόχο τη διατήρηση της ισορροπίας [22-25]. Σημαντικός για τη διατήρηση της ισορροπίας, την άμυνα έναντι των παθογόνων αλλά και την ανανέωση των επιθηλιακών κυττάρων στο έντερο φαίνεται να είναι και ο ρόλος των ILCs [26].

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον για τη μικροχλωρίδα του εντέρου. Περίπου 1000 διαφορετικά είδη μικροβίων συνιστούν τη χλωρίδα του εντέρου και είναι γνωστό ότι το ανώτερο τμήμα του πεπτικού έχει μικρότερο αριθμό μικροβίων σε σχέση με το κατώτερο πεπτικό (10^2 βακτήρια στο εγγύς λεπτό έντερο, 10^8 στον άπω ειλεό και 10^{12} στο κόλον). Τα κύρια μικρόβια που απαντώνται στο κατώτερο πεπτικό είναι αναερόβια, όπως *Bacteroides spp.*, *Bifidobacteria*, *Fusobacteria* και *Peptostreptococci*, ενώ

αερόβια όπως *Enterobacteriaceae* και *Lactobacilli* βρίσκονται σε χαμηλότερα ποσοστά, όμως η ποικιλότητα και τα ποσοστά των μικροβίων διαφοροποιούνται ανάλογα με την ηλικία, τη διατροφή, περιβαλλοντικούς παράγοντες και διάφορα νοσήματα. Φαίνεται ότι η μικροχλωρίδα του εντέρου επιτελεί έναν πολύπλοκο ρόλο καθώς επηρεάζει τον καταβολισμό των τροφών και την απορρόφηση θρεπτικών συστατικών, ενώ παράλληλα ανταγωνίζεται την εγκατάσταση παθογόνων μικροβίων και συντελεί στην ανάπτυξη του ανοσοποιητικού συστήματος του εντέρου (μέσω ευόδωσης της παραγωγής μουκινών και AMPs και της αύξησης των ρυθμιστικών T-λεμφοκυττάρων, Treg) [22, 27]. Μάλιστα, έχει διατυπωθεί η θεωρία ότι η διατροφή στην αρχή της ζωής και η εντερική μικροχλωρίδα που διαμορφώνει επηρεάζουν την ωρίμανση του ανοσοποιητικού, τον εντερικό φραγμό και την υγεία εφ' όρου ζωής, ενώ ανισορροπία- «δυσβίωση» επαγόμενη από δίαιτα μπορεί να σχετίζεται με την παθογένεια της φλεγμονώδους νόσου του εντέρου και μεταβολικά νοσήματα [28].

1.2.1.3 Αναπνευστικός βλεννογόνος

Το αναπνευστικό σύστημα έρχεται καθημερινά σε επαφή με ποικίλους βλαπτικούς παράγοντες. Το αντανακλαστικό του βήχα αλλά και η συγχρονισμένη κίνηση των κροσσών του ψευδοπολύστιβου κυλινδρικού κροσσωτού επιθήλιου, το οποίο απαντάται στο μεγαλύτερο μέρος της ανώτερης αναπνευστικής οδού, συμβάλλουν στην απομάκρυνση προς το φάρυγγα των ξένων εισπνεόμενων μορίων. Εξάλλου, στη βλέννη που εκκρίνεται από τα καλυκοειδή κύτταρα έχουν ανιχνευτεί σχεδόν 200 πρωτεΐνες, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται ουσίες με αντιμικροβιακή δράση που παράγονται από διάφορες πηγές, όπως η λυσοζύμη, η λακτοφερρίνη, ντεφενσίνες, η καθελιδίνη LL-37, ο εκκριτικός αναστολέας λευκοπρωτεάσης (Secretory Leukoprotease Inhibitor, SLPI) και οι επιφανειοδραστικές πρωτεΐνες (Surfactant Proteins) SP-D και SP-A [29-31].

Τα κύτταρα που συμμετέχουν στη φυσική άμυνα του πνεύμονα είναι κατά κύριο λόγο τα επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών, τα μονοκύτταρα- μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα αλλά και τα ουδετερόφιλα, τα NK-κύτταρα, τα ηωσινόφιλα, τα βασεόφιλα και τα μαστοκύτταρα. Τα επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών συνδέονται μεταξύ τους με «σφιχτές» συνδέσεις και δεσμοσωμάτια και στηρίζονται πάνω σε παχιά βασική μεμβράνη, έτσι ώστε να σχηματίζουν έναν αποτελεσματικό φραγμό. Παράλληλα,

παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση TLR υποδοχέων και έχειδειχθεί ότι στα πλαίσια της φυσικής ανοσιακής απάντησης μπορούν να παράξουν ταχύτατα ιντερφερόνες τύπου I και III, καθώς και άλλες ουσίες με αντιμικροβιακές ιδιότητες, όπως η λακτοφερρίνη και το μονοξείδιο του αζώτου (NO). Ειδικά οι ιντερφερόνες, που παράγονται από το επιθήλιο μετά από προσβολή του από ιούς, κατέχουν κεντρικό ρόλο στην αντι-ιική άμυνα, καθώς επάγουν τη σύνθεση μιας πλειάδας πρωτεϊνών που εμπλέκονται στον αναπαραγωγικό κύκλο των ιών. Επιπρόσθετα, λοιμώδη και μη ερεθίσματα προκαλούν την απελευθέρωση διαφόρων κυτταροκινών και χημειοκινών από τα επιθηλιακά κύτταρα, με αποτέλεσμα την προσέλκυση κυττάρων που συμμετέχουν στη δημιουργία φλεγμονής, όπως πολυμορφοπύρηνα, μακροφάγα και ηωσινόφιλα. Παράλληλα, έχειδειχθεί ότι η παραγωγή ουσιών όπως η interleukin (IL) -15 και η Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) εμπλέκονται στη διαδικασία της τοπικής διαφοροποίησης και ωρίμανσης των δενδριτικών κυττάρων των αεραγωγών. Πέραν των επιθηλιακών κυττάρων, σημαντικό ρόλο στην άμυνα του αναπνευστικού συστήματος έχουν τα μακροφάγα και ιδίως τα κυψελιδικά μακροφάγα. Βρίσκονται στο εσωτερικό των κυψελίδων και συχνά προβάλλουν προς τον αυλό των αεραγωγών, αλλά μπορούν επίσης να διασχίζουν το κυψελιδικό τοίχωμα προς τα λεμφικά αγγεία. Τα κυψελιδικά μακροφάγα φαγοκυτταρώνουν και αδρανοποιούν τα παθογόνα μικρόβια και μπορούν να ενεργοποιήσουν τη φλεγμονώδη διεργασία με την παραγωγή κυτταροκινών, όπως η IL-1β και ο Tumor Necrosis Factor α (TNF-α), αλλά και χημειοκινών, αυξητικών παραγόντων και μορίων προσκόλλησης. Η βιοσύνθεση των ανωτέρω ουσιών έχει επίσης ως αποτέλεσμα και την προσέλκυση και ενεργοποίηση άλλων ανοσιακών κυττάρων. Παράλληλα, έχειδειχθεί ότι τα κυψελιδικά μακροφάγα συμμετέχουν στη λύση της φλεγμονής μετά τον έλεγχο της λοίμωξης, φαγοκυτταρώνοντας κυτταρικά ράκη και εξιδρωματικά στοιχεία. Φαίνεται ότι στα κυψελιδικά μακροφάγα είναι περισσότερο αναπτυγμένη η λειτουργία της φαγοκυττάρωσης παρά η αντιγονοπαρουσίαση, ώστε να περιορίζεται η ανάπτυξη τοπικής φλεγμονής και συνεπώς η ιστική βλάβη στον πνεύμονα. Τέλος, τα δενδριτικά κύτταρα αποτελούν και στο αναπνευστικό σύστημα τον κύριο σύνδεσμο μεταξύ της φυσικής και της επίκτητης ανοσίας. Τα μυελοειδούς προέλευσης δενδριτικά κύτταρα (myeloid dendritic cells, mDCs) σχηματίζουν ένα πυκνό δίκτυο κάτω από τη βασική μεμβράνη, εκτείνουν τους δενδρίτες τους διαμέσου των επιθηλιακών κυττάρων του αναπνευστικού βλεννογόνου και αναγνωρίζουν τα ξένα αντιγόνα. Ακολούθως μεταναστεύουν στους επιχώριους λεμφαδένες, όπου αλληλεπιδρούν με τα T-λεμφοκύτταρα

και ξεκινά η ενεργοποίηση της επίκτητης ανοσίας. Τα πλασματοκυτταροειδούς προέλευσης δενδριτικά κύτταρα (plasmacytoid DCs, pDCs), που επίσης ανευρίσκονται στο αναπνευστικό σύστημα, παρόλο που δεν είναι τόσο αποτελεσματικά στην αντιγονοπαρουσίαση, συμβάλλουν στην άμυνα παράγοντας μεγάλες ποσότητες IFN-α [29, 30, 32].

1.2.2 Κύτταρα

Τα κύτταρα που συμμετέχουν τόσο στη φάση αναγνώρισης, όσο και στη δραστική φάση της μη ειδικής ανοσίας είναι τα φαγοκύτταρα, όπως τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα και τα μονοκύτταρα- μακροφάγα, τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (Antigen Presenting Cells, APCs), όπως τα δενδριτικά κύτταρα, τα κύτταρα «φυσικοί φονείς» (Natural Killer Cells, NK-κύτταρα) και τέλος, κύτταρα που προάγουν τον μηχανισμό της φλεγμονής όπως τα βασεόφιλα, τα ηωσινόφιλα και τα μαστοκύτταρα.

1.2.2.1 Ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα

Τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα αποτελούν το μεγαλύτερο κυτταρικό πληθυσμό μεταξύ των κυκλοφορούντων λευκοκυττάρων του ενήλικα και κατέχουν κεντρικό ρόλο στη μη ειδική ανοσιακή απάντηση, καθώς συμμετέχουν στην πρόκληση φλεγμονής. Προέρχονται από το αρχέγονο πολυδύναμο αιμοποιητικό κύτταρο, που διαφοροποιείται στο μυελό των οστών υπό την επίδραση ποικίλων αυξητικών παραγόντων σε μυελοβλάστη, προμυελοκύτταρο, ουδετερόφιλο μεταμυελοκύτταρο, ραβδοπύρρηνο και τελικά τα παραγόμενα πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα αποδίδονται στην κυκλοφορία, όπου ο χρόνος παραμονής τους είναι περίπου 8-12 ώρες. Υπό την επίδραση χημειοτακτικών παραγόντων που απελευθερώνονται από το ενδοθήλιο στα σημεία λοίμωξης ή άλλης ιστικής βλάβης, είναι τα πρώτα ανοσιακά κύτταρα που μεταναστεύουν από την κυκλοφορία στα σημεία αυτά, μέσω μίας διαδικασίας που περιλαμβάνει την προσκόλληση, την κύλιση και τελικά τη διαπίδυση δια μέσου του ενδοθηλίου στους ιστούς. Εκεί τα πολυμορφοπύρρηνα παραμένουν 1-3 ημέρες, φαγοκυτταρώνουν και αδρανοποιούν τους παθογόνους παράγοντες μέσω της έκλυσης δραστικών ριζών οξυγόνου (αναπνευστική έκρηξη), μονοξειδίου του αζώτου και διαφόρων μικροβιοκτόνων πρωτεϊνών. Οι μικροβιοκτόνες

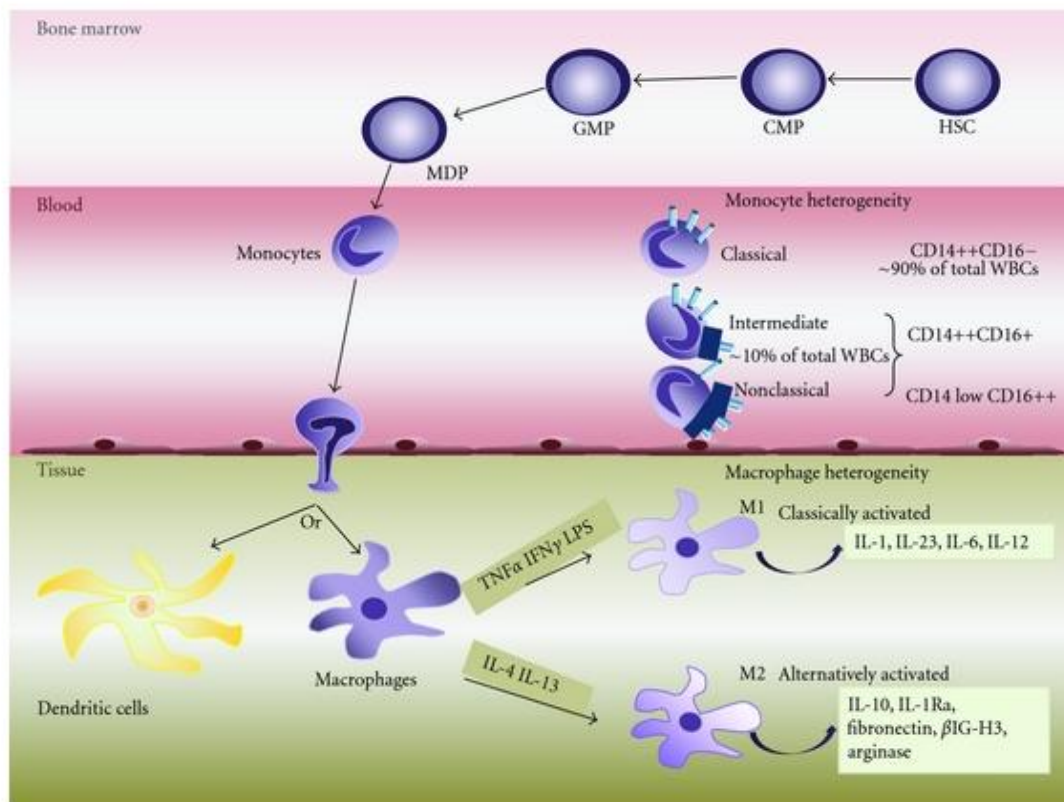
ουσίες περιέχονται στα χαρακτηριστικά κοκκία των ουδετεροφίλων. Τα πρωτογενή ή αζουρόφιλα κοκκία είναι λυσοσωμάτια που περιέχουν όξινες υδρολάσες, μυελοϋπεροξειδάση, λυσοζύμη, ντεφενσίνες, σεροσιδίνες, BPI (Bacterial Permeability Increasing protein- πρωτεΐνη που αυξάνει την διαπερατότητα των μικροβιακών μεμβρανών) κ.ά. Τα δευτερογενή ή ειδικά κοκκία περιέχουν λακτοφερρίνη, λυσοζύμη και μεταλλοπρωτεϊνάσες εξωκυττάρου δικτύου (Matrix Metalloproteinases, MMPs) και τα τριτογενή κοκκία περιέχουν MMP9-gelatinase. Τα δευτερογενή και τριτογενή κοκκία περιέχουν επίσης υπο-ομάδες της NADPH οξειδάσης, του ενζύμου που καταλύει την αναπνευστική έκρηξη. Μετά τη φαγοκυττάρωση των μικροοργανισμών, το φαγόσωμα συντήκεται με τα λυσοσώματα των ουδετεροφίλων και σχηματίζει το φαγολυσόσωμα, όπου επιτελείται η πέψη και καταστροφή των παθογόνων. Τα ουδετερόφιλα, όπως αποκαλύφθηκε πρόσφατα, μπορούν να απελευθερώνουν και εξωκυττάρια τις κυτταροτοξικές τους ουσίες και να σχηματίζουν εξωκυττάρια παγίδες (Neutrophil Extracellular Traps, NETs), όταν ενεργοποιούνται από ανοσοσυμπλέγματα. Τα NETs προκύπτουν μέσω της απελευθέρωσης από τα ουδετερόφιλα πυρηνικών συστατικών στον εξωκυττάριο χώρο και συνίστανται από ένα δίκτυο αποσυμπυκνωμένης χρωματίνης, κυτταροπλασματικών πρωτεασών και άλλων αντιμικροβιακών ουσιών. Παρέχουν υψηλή τοπική συγκέντρωση αντιμικροβιακών συστατικών, παγιδεύουν και σκοτώνουν τα μικρόβια ανεξάρτητα από τη φαγοκυτταρική πρόσληψη, χρησιμεύοντας ως εμπόδιο στην εξάπλωση των λοιμώξεων. Είναι επίσης γνωστό ότι τα ουδετερόφιλα αλληλεπιδρούν και με τα υπόλοιπα κύτταρα του ανοσιακού συστήματος. Έτσι, έχει π.χ. δειχθεί ότι συμμετέχουν στην προσέλκυση μονοκυττάρων και δενδριτικών κυττάρων στους μολυσμένους ιστούς και ενισχύουν τη λειτουργικότητά τους. Παράλληλα, εμπλέκονται και σε διαδικασίες της επίκτητης ανοσίας. Μπορούν να δράσουν ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και να παρουσιάζουν αντιγόνα στα CD8+ T-λεμφοκύτταρα. Επίσης, μέσω έκκρισης IL-12, συμμετέχουν στην ενεργοποίηση των T-κυττάρων. Τέλος, ουδετερόφιλα, δενδριτικά και NK-κύτταρα ενισχύουν το ένα τη δράση του άλλου μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ διαφόρων υποδοχέων τους και διαλυτών μεσολαβητών [33-35].

1.2.2.2 Μονοκύτταρα - Μακροφάγα

Τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα απαρτίζουν το μονοκυτταρικό- φαγοκυτταρικό σύστημα. Τα μονοκύτταρα παράγονται στο μυελό των οστών και το πρώτο άωρο αναγνωρίσιμο κύτταρο είναι η μονοβλάστη, η οποία διαφοροποιείται προς προμονοκύτταρο και ακολούθως μονοκύτταρο, που εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος και παραμένει περί τις 24 ώρες (προκειμένου για τα κλασικά μονοκύτταρα). Ακολούθως, τα μονοκύτταρα μεταναστεύουν μέσω του τοιχώματος των αιμοφόρων αγγείων σε διάφορα όργανα. Τα μονοκύτταρα του αίματος περιέχουν, όπως και τα πολυμορφοπύρρηνα, λυσοσώματα που έχουν μυελοϋπεροξειδάση και όξινες υδρολάσες σημαντικές για την ενδοκυττάρια θανάτωση των μικροοργανισμών. Έχουν αναγνωριστεί τρεις υποπληθυσμοί μονοκυττάρων στο ανθρώπινο σώμα, βάσει κυτταρομετρίας ροής (εικόνα 2). Τα CD14⁺⁺CD16⁻ αποτελούν πάνω από το 80% του συνόλου και είναι τα «κλασικά» φλεγμονώδη μονοκύτταρα (classical), τα οποία, μεταναστεύοντας στο σημείο της λοίμωξης ή ιστικής βλάβης, επιτελούν αντιμικροβιακές λειτουργίες και εμπλέκονται στη δημιουργία φλεγμονής, παράγοντας ποικίλες κυτταροκίνες. Επιδεικνύουν χαρακτηριστική πλαστικότητα και μπορούν να μετατραπούν, μεταναστεύοντας στους ιστούς, σε μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα. Επιπλέον, είναι δυνατόν να μετατραπούν σε μη κλασικά μονοκύτταρα, ενώ τελευταία έχει δειχθεί ότι σε φλεγμονώδεις καταστάσεις μπορούν να δώσουν γένεση και σε έναν ακόμα υποπληθυσμό, τα μονοκύτταρα που παράγουν TNF/iNOs. Τα CD14^{low}CD16⁺ ή «μη κλασικά» (nonclassical) μονοκύτταρα απαντώνται στον ενδοαγγειακό χώρο και έχουν κυρίως το ρόλο της επιτήρησης (patrolling) και της διαφύλαξης της ακεραιότητας του ενδοθηλίου, ενώ τα CD14⁺⁺CD16⁺ «ενδιάμεσα» (intermediate) μονοκύτταρα αντιπροσωπεύουν έναν ενδιάμεσο φαινότυπο, με ρόλο που δεν έχει αποσαφηνιστεί επαρκώς. Τα μακροφάγα στους διάφορους ιστούς έχουν διαφορετική μορφολογία και ονομασία και επιτελούν διαφορετικές λειτουργίες, ενώ ενδέχεται, ως ένα βαθμό, να έχουν και άλλη προέλευση, να μην προέρχονται δηλαδή από τα μονοκύτταρα. Έτσι, στο ήπαρ απαντώνται ως κύτταρα Kupffer, στο νευρικό σύστημα ως μικρογλοία, στους πνεύμονες ως κυψελιδικά μακροφάγα, στην επιδερμίδα ως κύτταρα Langerhans, ενώ μακροφάγα επίσης βρίσκονται στα αναπαραγωγικά όργανα, στις ορογόνες κοιλότητες καθώς και στο τοίχωμα του εντέρου και στο διάμεσο χώρο οργάνων όπως η καρδιά, το πάγκρεας και οι νεφροί. Εκτός από τα μακροφάγα των ιστών υπάρχουν και τα

μακροφάγα που στρατολογούνται στους ιστούς σε φλεγμονώδεις καταστάσεις (“infiltrating macrophages”). Τα τελευταία επιδεικνύουν αξιοσημείωτη πλαστικότητα και έχει δειχθεί ότι ενεργοποιούνται με διαφορετικό τρόπο αναλόγως του μικροβιακού ερεθίσματος, του σημείου της λοίμωξης και του κυτταρικού μικροπεριβάλλοντος και ως εκ τούτου, παράγουν διαφορετικές κυτταροκίνες και χημειοκίνες και ασκούν διαφορετικές λειτουργίες. Έτσι, έχουν αναγνωριστεί δύο υποκατηγορίες φλεγμονωδών μακροφάγων, τα κλασικά ενεργοποιημένα M1 μακροφάγα, τα οποία φαγοκυτταρώνουν μικρόβια, συνθέτουν φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και προάγουν τη φυσική και επίκτητη ανοσιακή απάντηση και τα M2, που ενεργοποιούνται υπό την επίδραση κυτταροκινών όπως η IL-4, IL-10 και IL-13 και επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την παραγωγή κολλαγόνου, συμβάλλοντας στην επούλωση των τραυμάτων και την ανάπλαση των ιστών.

Οι κυριότερες λειτουργίες μονοκυττάρων και μακροφάγων είναι ασφαλώς η φαγοκυττάρωση, η αντιγονοπαρουσίαση και η συμμετοχή τους στη φλεγμονή. Η απάντησή τους σε χημειοτακτικά ερεθίσματα είναι μεταγενέστερη και η κινητικότητά τους ασθενέστερη σε σχέση με τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηνα. Ο τρόπος φαγοκυττάρωσης και ενδοκυττάριας μικροβιοκτονίας είναι παρόμοιος με αυτόν των ουδετεροφίλων, με τη διαφορά ότι τα μονοκύτταρα δε διαθέτουν τη λειτουργία της αναπνευστικής έκρηξης. Τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα από την άλλη πλευρά έχουν την ικανότητα να φαγοκυτταρώνουν ογκωδέστερα σωματίδια απ’ ό,τι τα πολυμορφοπύρηνα, καθώς και πεπτικότερα κύτταρα. Η καταστροφή του αντιγονικού υλικού γίνεται με το ενζυμικό περιεχόμενο των λυσοσωματίων τους και με την παραγωγή NO. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, τα μονοκύτταρα έχουν την ικανότητα της αντιγονοπαρουσίασης, δηλαδή μπορούν να παρουσιάσουν μετά από κατάλληλη επεξεργασία ξένα αντιγόνα, συνδεδεμένα με μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, MHC) στα T-λεμφοκύτταρα. Κατόπιν αλληλεπίδρασης με τα βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα διεγείρονται και ενισχύεται η φαγοκυτταρική και κυτταροκτόνος δράση τους. Ταυτόχρονα, τα ενεργοποιημένα μονοκύτταρα- μακροφάγα έχουν τη δυνατότητα παραγωγής μιας πληθώρας φλεγμονωδών κυτταροκινών, οι οποίες στην οξεία φάση της φλεγμονής ευοδώνουν τη στρατολόγηση ανοσιακών κυττάρων στο σημείο της λοίμωξης και την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων. Έχει επίσης δειχθεί ότι σε μεταγενέστερο στάδιο απελευθερώνουν αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες και λιπιδικούς μεσολαβητές, με στόχο τον περιορισμό και τη λύση της φλεγμονής [33, 36-41].



Εικόνα 2

Σχηματική απλοποιημένη απεικόνιση του μονοκυτταρικού- φαγοκυτταρικού συστήματος (από Liaskou et al [42])

Τα μονοκύτταρα προέρχονται από το μυελό των οστών από το αρχέγονο πολυδύναμο αιμοποιητικό βλαστοκύτταρο (Hematopoietic Stem Cell, HSC) μέσω διαφόρων σταδίων διαφοροποίησης. Στο περιφερικό αίμα ανιχνεύονται τρεις υποτύποι: τα κλασικά CD14⁺⁺CD16⁻, τα ενδιάμεσα CD14⁺⁺CD16⁺, και τα μη κλασικά CD14^{low}CD16⁺⁺ μονοκύτταρα. Τα κυκλοφορούντα μονοκύτταρα μεταναστεύουν στους ιστούς, όπου μπορούν να διαφοροποιηθούν σε δενδριτικά κύτταρα ή μακροφάγα, συμπληρώνοντας τους υπάρχοντες πληθυσμούς. Σημαντική πλαστικότητα χαρακτηρίζει τα μακροφάγα. Τα κλασικά ενεργοποιημένα M1 μακροφάγα αναπτύσσονται σε απόκριση στις TNF-α και IFN-γ καθώς και κατόπιν έκθεσης σε μικροβιακά προϊόντα, όπως οι LPS και παράγουν με τη σειρά τους φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως IL-1, IL-23, IL-6 και IL-12. Τα εναλλακτικά ενεργοποιημένα μακροφάγα M2 αναπτύσσονται σε απόκριση στις IL-4 και IL-13 και διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους στη λύση της φλεγμονής και την ανάπλαση των ιστών, απελευθερώνοντας IL-10, τον ανταγωνιστή του υποδοχέα της IL-1 (IL-1Ra), αργινάση, ινωδονεκτίνη και πρωτεΐνη εξωκυτταρίου δικτύου β IG-H3.

1.2.2.3 Δενδριτικά κύτταρα (Dendritic Cells, DCs)

Τα δενδριτικά κύτταρα είναι τα ικανότερα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα του οργανισμού, τα οποία κατέχουν κεντρικό ρόλο στην έναρξη και τη διαμόρφωση των ειδικών ανοσιακών απαντήσεων, καθώς έχουν ως κύριο χαρακτηριστικό τη δυνατότητα ανίχνευσης, πρόσληψης και επεξεργασίας αντιγόνων και παρουσίασης αυτών στα T-λεμφοκύτταρα. Εντούτοις, έχουν αναγνωρισθεί διαφορετικοί υποπληθυσμοί DCs, που διαφέρουν μεταξύ τους τόσο στην προέλευση, όσο και στην εντόπισή τους και την εξειδικευμένη ανοσολογική τους λειτουργία. Μπορεί να προέρχονται από προγονικά αιμοποιητικά CD34+ κύτταρα του μυελού των οστών, αλλά επίσης από μονοκύτταρα ή και από πρόδρομα κύτταρα της λεμφικής σειράς. Έχουν αναγνωρισθεί τέσσερις τύποι δενδριτικών κυττάρων, βάσει έκφρασης αντιγόνων επιφανείας: δύο υποπληθυσμοί μυελοειδούς προέλευσης (myeloid) ή συμβατικών (conventional) DCs (mDCs ή cDCs), οι CD1c+ και CD141+ cDCs, ενώ στα μη συμβατικά DCs ανήκουν τα πλασματοκυτταροειδή (plasmacytoid) DCs (pDCs) και τα προερχόμενα από τα μονοκύτταρα DCs [monocyte-derived DCs, (mo-DCs)].

Τα cDCs απαντώνται στο αίμα, στους λεμφαδένες και το σπλήνα αλλά και σε μη λεμφαδενικούς ιστούς, όπως το δέρμα, το ήπαρ, τον πνεύμονα και το έντερο. Εξειδικεύονται στην πρόσληψη, ενδοκυττάρια επεξεργασία και παρουσίαση των αντιγόνων μετά από σύνδεσή τους με MHC II μόρια. Παράλληλα, μπορούν να παρουσιάζουν και αντιγόνα ιών μετά από σύνδεσή τους με MHC I μόρια. Σε απάντηση σε σήματα κινδύνου στην περιφέρεια, όπως π.χ. ιστική βλάβη, λοίμωξη ή έκθεση σε κυτταροκίνες ωριμάζουν και μεταναστεύουν στους λεμφικούς ιστούς, όπου αλληλεπιδρούν με CD4+ T-λεμφοκύτταρα για την έναρξη των ειδικών ανοσιακών απαντήσεων, αλλά επίσης ενεργοποιούν τα B- και τα NK-κύτταρα. Κατά την ωρίμανσή τους, τα DCs παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση MHC II μορίων καθώς και συνδιεγερτικών μορίων, που ευοδώνουν τον πολλαπλασιασμό των CD4+ T-λεμφοκυττάρων. Παράγοντες του μικροπεριβάλλοντος στο οποίο συντελείται η ωρίμανση των DCs καθορίζουν το είδος των κυτταροκινών που παράγονται, οι οποίες με τη σειρά τους κατευθύνουν τη διαφοροποίηση των CD4+ T-λεμφοκυττάρων και την ακόλουθη ανοσολογική απάντηση. Το προφίλ των κυτταροκινών που συντίθενται από τα DCs ποικίλει, αναλόγως των υποδοχέων τους που ενεργοποιούνται από κάθε αντιγονική διέγερση. Συχνότερα, οι διάφοροι λοιμογόνοι παράγοντες οδηγούν στην έκκριση IL-1α, IL-1β, IL-12 και

TNF- α , που επάγουν Th1 απαντήσεις, είναι όμως δυνατόν να ενεργοποιούνται Th2, Th17 αλλά και Treg απαντήσεις.

Τα pDCs ευρίσκονται στις T περιοχές των λεμφικών οργάνων και του θύμου αλλά και στο αίμα και εμπλέκονται κυρίως στην αντι-ιική άμυνα. Χαρακτηρίζονται από εκλεκτική έκφραση ενδοκυττάρων υποδοχέων TLR7 & 9 και έχουν την ικανότητα να εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες IFN- α/β αλλά και λ , μετά από διέγερσή τους από ιούς. Σε κατάσταση ηρεμίας έχουν περιορισμένη ικανότητα φαγοκυττάρωσης, αντιγονοπαρουσίασης και ενεργοποίησης των T-κυττάρων, ενώ φαίνεται ότι σχετίζονται με την προαγωγή T ρυθμιστικών απαντήσεων και την ανοχή σε αντιγόνα. Επίσης, έχει δειχθεί ότι εμπλέκονται στη διαφοροποίηση των ενεργοποιημένων B-λεμφοκυττάρων σε πλασματοκύτταρα, μέσω παραγωγής IFN τύπου I και IL-6.

Σε καταστάσεις φλεγμονής στους ιστούς και στα λεμφαδενικά όργανα ανευρίσκονται και DCs που προέρχονται από μονοκύτταρα (mo-DCs), αλλιώς αποκαλούμενα και «φλεγμονώδη» (“inflammatory”) DCs. Αυτά διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην έναρξη της φλεγμονής και την κάθαρση των μικροβίων, παράγοντας σε μεγάλη ποσότητα φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, κυρίως TNF- α , αλλά και NO και υποστηρίζουν τη λειτουργία των συμβατικών DCs. Επιπλέον, μπορεί να προάγουν την αλληλεπίδραση των παθογόνων μικροβίων με τα T-κύτταρα [43-48].

1.2.2.4 Κύτταρα «φυσικοί φονείς» (Natural Killer Cells, NK-κύτταρα) και έμφυτα λεμφοειδή κύτταρα (Innate Lymphoid Cells, ILCs)

Τα NK-κύτταρα είναι ένας υποπληθυσμός λεμφοκυττάρων που συμμετέχουν στη φυσική ανοσία και χαρακτηρίζονται από την επιφανειακή έκφραση των δεικτών CD16 και CD56. Τα ήρεμα NK-κύτταρα εκφράζουν και τη β αλυσίδα του υποδοχέα της IL-2, ώστε η άμεση διέγερση με IL-2 καταλήγει σε ενεργοποίησή τους. Στο κυτταρόπλασμά τους φέρουν αζουρόφιλα κοκκία με τα πρωτεολυτικά ένζυμα περφορίνη και γρανζύμη. Η κύρια λειτουργία των NK-κυττάρων είναι να αναγνωρίζουν και να σκοτώνουν κύτταρα μολυσμένα με ιούς, κύτταρα όγκων, καθώς και άλλα κύτταρα με ξένα ή τροποποιημένα MHC I μόρια, με απελευθέρωση του περιεχομένου των κοκκίων τους (κυτταρομεσολαβούμενη κυτταροτοξικότητα). Τα NK-κύτταρα σκοτώνουν επίσης στόχους καλυμμένους με αντισώματα IgG, ιδιότητα γνωστή ως κυτταρική κυτταροτοξικότητα εξαρτώμενη από

αντισώματα (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity, ADCC), επιτελούμενη μέσω του μορίου CD16, που αποτελεί υποδοχέα για το Fc κλάσμα των αντισωμάτων. Τα NK-κύτταρα, μετά την ενεργοποίησή τους, παράγουν IFN- γ και άλλες κυτταροκίνες σημαντικές για τη ρύθμιση ανοσολογικών απαντήσεων, όπως π.χ. οι TNF- α και GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor). Έχει δειχθεί ότι ενισχύουν τις αντιγονο-ειδικές απαντήσεις των T-κυττάρων και ότι αλληλεπιδρούν επίσης με τα πολυμορφοπύρρηνα και τα DCs για την προαγωγή ή και την καταστολή ανοσιακών απαντήσεων. Τα NK-κύτταρα βρίσκονται στο αίμα αλλά και στο ήπαρ, το σπλήνα, τον πνεύμονα, ενώ μικρός αριθμός ανευρίσκεται στους λεμφαδένες, όπου χαρακτηριστικά, μέσω αλληλεπίδρασης με τα DCs, ευοδώνεται η παραγωγή IFN- γ από τα T-κύτταρα και η αντι-ικκή άμυνα.

Αναλόγως της έκφρασης του CD56 αναγνωρίζονται δύο υποπληθυσμοί NK-κυττάρων, τα CD56dim και τα CD56bright. Τα CD56dim NK-κύτταρα αποτελούν σχεδόν το 90% του συνόλου των κυκλοφορούντων NK-κυττάρων, είναι πλήρως ώριμα και επιτελούν τις λειτουργίες της φυσικής και μεσολαβούμενης από αντίσωμα κυτταροτοξικότητας. Αντιθέτως, τα CD56bright επιδεικνύουν πιο «ανώριμο» φαινότυπο και υποδεέστερη δυνατότητα κυτταροτοξικών λειτουργιών και είναι κυρίως ανοσορρυθμιστικά κύτταρα, με δυνατότητα παραγωγής μεγάλης ποσότητας κυτταροκινών, όπως οι TNF- α , GM-CSF, IL-10, IL-13.

Τα τελευταία χρόνια έχει δειχθεί ότι η κυτταροτοξική δράση των NK-κυττάρων εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ διεγερτικών και ανασταλτικών σημάτων, που προέρχονται από αντίστοιχους υποδοχείς της κυτταρικής τους μεμβράνης, οι οποίοι αναγνωρίζουν μόρια MHC I ή παρόμοια στα κύτταρα-στόχους. Μεταξύ των υποδοχέων αυτών περιλαμβάνονται οι Killer cell Ig-like Receptors (KIR), οι τύπου λεκτίνης C υποδοχείς CD94 και NKG2A/B, καθώς και οι υποδοχείς φυσικής κυτταροτοξικότητας NKp30, NKp44 και NKp46 [49-51].

Τελευταία, τα NK-κύτταρα έχουν υπαχθεί στην οικογένεια των ILCs που ανακαλύφθηκε πρόσφατα. Τα ILCs είναι κύτταρα με λεμφοειδή μορφολογία, που όμως δεν διαθέτουν αναδιαταγμένους αντιγονικούς υποδοχείς, όπως τα υπόλοιπα λεμφοκύτταρα, ούτε δείκτες μυελοειδών και δενδριτικών κυττάρων και έχουν ταξινομηθεί σε τρεις ομάδες. Τα ILC1s, στα οποία ανήκουν και τα NK-κύτταρα, αναπτύσσονται υπό την επίδραση των IL-12 και IL-18 και χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να παράγουν IFN- γ , ενώ αδυνατούν να συνθέσουν Th2- και Th17- σχετιζόμενες κυτταροκίνες. Τα ILC2s παράγουν τις

Th2 τύπου κυτταροκίνες IL-5, IL-9 και IL-13, ως απάντηση στη σύνθεση IL-25, IL-33 και TSLP από τα επιθηλιακά κύτταρα και τα ILC3s παράγουν τις Th17- κυτταροκίνες IL-17 και IL-22, κατόπιν ενεργοποίησής τους από τις IL-1β και IL-23. Τα ILCs παρουσιάζουν σημαντική πλαστικότητα και μεταβάλλουν το φαινότυπο και τη λειτουργία τους, αναλόγως του μικροπεριβάλλοντος στο οποίο βρίσκονται. Έχει δειχθεί ότι είναι σημαντικά για την πρώιμη ανοσοαπόκριση έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών, ενώ συμβάλλουν στη διατήρηση της ακεραιότητας των ανατομικών φραγμών, την επούλωση και αναδόμηση των ιστών και την ανάπτυξη απαντήσεων ανοχής στα συμβιωτικά μικρόβια. Ταυτόχρονα όμως θεωρούνται και διαμορφωτές της ανοσιακής απάντησης, καθώς απαντούν σε ερεθίσματα που παράγονται από τα επιθηλιακά κύτταρα με σύνθεση μία πλειάδας κυτταροκινών που καθορίζουν τις επακόλουθες ανοσολογικές αποκρίσεις. Τελευταία έχει δειχθεί και η εμπλοκή τους σε φλεγμονώδη νοσήματα. Έτσι, τα ILC2s εμπλέκονται στην αιτιοπαθογένεια του άσθματος και της ατοπικής δερματίτιδας, τα ILC3s έχουν συσχετιστεί με την ψωρίαση και τα ILC1s με τη φλεγμονώδη νόσο του εντέρου και τη χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια [26, 52].

1.2.2.5 Ηωσινόφιλα

Τα ηωσινόφιλα πολυμορφοπύρρηνα παράγονται στο μυελό των οστών, υπό την επίδραση της IL-5 διαφοροποιούνται και απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος, όπου παραμένουν για λίγες ώρες και στη συνέχεια εισέρχονται στους ιστούς, σε τόπους που εξελίσσεται Th2 τύπου φλεγμονή ή σε κατάσταση ηρεμίας κυρίως στο πεπτικό σύστημα και το μαζικό αδένα. Τα ηωσινόφιλα φέρουν στο κυτταρόπλασμά τους ηλεκτρόχροα οξύφιλα ειδικά κοκκία, που περιέχουν τοξικές πρωτεΐνες, με κυριότερες τη μέγιστη βασική πρωτεΐνη (Major Basic Protein, MBP), την περοξειδάση ηωσινοφίλων (Eosinophil Peroxidase, EPO), την ηωσινοφιλική κατιονική πρωτεΐνη (Eosinophil Cationic Protein, ECP) και την ηωσινοφιλική νευροτοξίνη (Eosinophil-Derived Neurotoxin, EDN). Επίσης, φέρουν στην επιφάνειά τους διάφορους υποδοχείς, όπως TLRs, υποδοχείς ανοσοσφαιρινών, υποδοχείς για το συμπλήρωμα, για κυτταροκίνες και χημειοκίνες. Μετά από διέγερση των υποδοχέων τους, τα ηωσινόφιλα μπορούν να απελευθερώσουν τις πρωτεΐνες των κοκκίων τους, αλλά και μία πληθώρα βιοδραστικών ουσιών όπως προσταγλανδίνες, λευκοτριένια, παράγοντα

ενεργοποίησης αιμοπεταλίων, κυτταροκίνες και χημειοκίνες (TGF-β, IL-3, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-16, IL-18, TNF-α, CCL5, CCL11).

Τα ηωσινόφιλα επιτελούν στον οργανισμό διάφορες λειτουργίες. Καταρχάς εμπλέκονται στη μη ειδική άμυνα έναντι παρασίτων και μυκήτων, χρησιμοποιώντας τις τοξικές πρωτεΐνες των κοκκίων τους, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις μπορούν, σε συνεργασία με τα μακροφάγα, να εμφανίζουν αντι-ικκή δραστηριότητα. Στα πλαίσια της φυσικής ανοσίας μπορούν ακόμα να σχηματίζουν εξωκυττάρια παγίδες με MBP και ECP και να συμμετέχουν έτσι στην ακεραιότητα του επιθηλιακού φραγμού, ιδίως στο έντερο. Τα ηωσινόφιλα έχουν και φαγοκυτταρικές ιδιότητες, φαγοκυτταρώνοντας κυρίως ανοσοσυμπλέγματα, ενώ μπορούν και να παρουσιάζουν αντιγόνα σε παρθένα ή μνημονικά T-κύτταρα και να ξεκινούν ή να ενισχύουν την ειδική ανοσιακή απάντηση. Στην Th2 απάντηση τα ηωσινόφιλα στρατολογούνται στα σημεία φλεγμονής, όπου παράγουν μία ποικιλία λιπιδικών μεσολαβητών και κυτταροκινών, ενώ παράλληλα απελευθερώνουν και τις προαναφερθείσες τοξικές πρωτεΐνες των κοκκίων τους. Τα μόρια αυτά συμμετέχουν στη ρύθμιση της ανοσιακής απάντησης και στην αλληλεπίδραση με άλλα ανοσιακά κύτταρα, όπως τα μαστοκύτταρα. Επίσης, συμβάλλουν στην πρόκληση ιστικής καταστροφής, αλλά ενίοτε μπορεί να ευοδώνουν την επούλωση των ιστών. Είναι γνωστό ότι τα ηωσινόφιλα απελευθερώνουν ουσίες που απενεργοποιούν τα προϊόντα των μαστοκυττάρων και βασεοφίλων, όπως την ισταμινάση, που εξουδετερώνει την περίσσεια ισταμίνης και τη σουλφατάση, που αδρανοποιεί τη βραδέως αντιδρώσα ουσία της αναφυλαξίας (Slow Reactive Substance-A, SRS-A) και κατ' αυτό τον τρόπο μειώνεται η φλεγμονώδης απάντηση και η μετανάστευση κοκκιοκυττάρων στο σημείο της βλάβης. Φαίνεται πάντως ότι, ανεξάρτητα με την Th2 φλεγμονή, τα ηωσινόφιλα διαθέτουν ένα σύστημα αναγνώρισης ιστικής βλάβης και μπορούν να συνθέτουν μόρια που προάγουν την επούλωση των ιστών και αυξητικούς παράγοντες, συμβάλλοντας έτσι στην ομοίωση των επιθηλίων. Τέλος, υπάρχουν ενδείξεις ότι στο λιπώδη ιστό τα ηωσινόφιλα μπορεί να επηρεάζουν τη διαφοροποίηση των μακροφάγων και το μεταβολισμό της γλυκόζης [53-56].

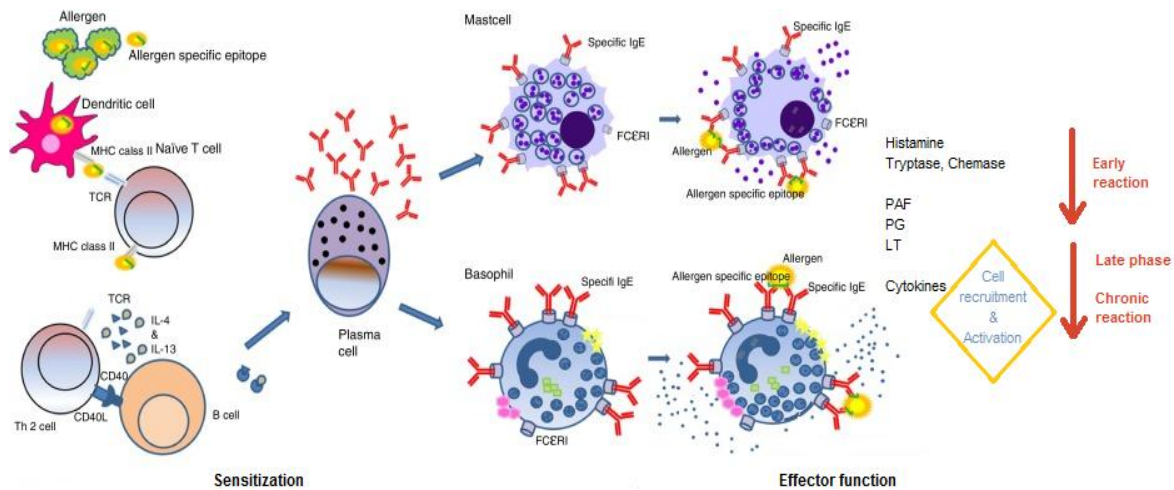
1.2.2.6 Βασεόφιλα και σιτευτικά κύτταρα

Τα βασεόφιλα πολυμορφοπύρρηνα και τα σιτευτικά κύτταρα ή μαστοκύτταρα είναι γνωστά για τον ρόλο τους στις φλεγμονώδεις απαντήσεις έναντι των παρασίτων και στις

αλλεργικές αντιδράσεις. Τα βασεόφιλα παράγονται στο μυελό των οστών από το προγονικό κύτταρο της μυελικής σειράς, εξέρχονται στην κυκλοφορία και μπορούν ακολούθως να μεταναστεύουν στους ιστούς, όπως χαρακτηριστικά παρατηρείται στα σημεία αλλεργικής φλεγμονής. Σε συνθήκες ομοιόστασης ο χρόνος ημίσειας ζωής των κυκλοφορούντων βασεοφίλων είναι περίπου δύο ημέρες. Τα μαστοκύτταρα ανευρίσκονται σε ιστούς που έρχονται σε άμεση επαφή με το εξωτερικό περιβάλλον, όπως το δέρμα, ο πεπτικός βλεννογόνος και ο πνεύμονας, σε συνάφεια με τα αιμοφόρα αγγεία. Τα προγονικά τους κύτταρα παράγονται στο μυελό των οστών, εισέρχονται από την κυκλοφορία στους ιστούς, όπου ολοκληρώνουν την ωρίμανσή τους και επιζούν για μήνες.

Τα τελευταία χρόνια διαφαίνεται ότι τα βασεόφιλα και σιτευτικά κύτταρα, εκτός του κεντρικού τους ρόλου στη γένεση και τη συντήρηση της αλλεργικής φλεγμονής, συμμετέχουν στη φυσική αλλά και την επίκτητη ανοσιακή απάντηση. Στην επιφάνειά τους φέρουν πολυάριθμους υποδοχείς, όπως TLRs, υποδοχείς για την IgE (υψηλής συγγένειας υποδοχείς FcεRI), την IgG, το συμπλήρωμα και την IL-1 . Μπορούν, κατόπιν διέγερσης των υποδοχέων αυτών, να απελευθερώσουν μία πληθώρα βιοδραστικών ουσιών όπως μεσολαβητές φλεγμονής, πρωτεάσες, μεταβολίτες του αραχιδονικού οξέος, κυτταροκίνες και χημειοκίνες, που δρουν στα αγγεία, τις λείες μυϊκές ίνες, το συνδετικό ιστό, τους βλεννοπαραγωγούς αδένες και σε άλλα ανοσιακά κύτταρα. Οι ουσίες αυτές μπορεί να είναι προσχηματισμένες και αποθηκευμένες στα κοκκία του κυτταροπλάσματος, όπως η ισταμίνη και η τρυπτάση ή να σχηματίζονται μετά την επίδραση συγκεκριμένων ερεθισμάτων, όπως οι προσταγλανδίνες και τα λευκοτριένια. Η ενεργοποίηση των βασεοφίλων και μαστοκυττάρων μέσω των FcεRI υποδοχέων στα πλαίσια της παθογένεσης της αλλεργικής αντίδρασης αμέσου τύπου έχει μελετηθεί εκτενώς. Σε άτομα που έχουν ευαισθητοποιηθεί σε κάποιο αλλεργιογόνο και έχουν μόρια ειδικής για αυτό IgE συνδεδεμένα στην επιφάνεια των βασεοφίλων και μαστοκυττάρων τους, κατά τη νέα έκθεση το αλλεργιογόνο συνδέεται και γεφυρώνει δύο γειτονικά μόρια IgE. Δίδεται έτσι σήμα ώστε να απελευθερωθούν οι προσχηματισμένοι και οι ταχέως νεοσχηματιζόμενοι λιπιδικοί μεσολαβητές που προκαλούν τα τυπικά συμπτώματα των οξέων αλλεργικών αντιδράσεων, όπως ερύθημα, οίδημα, κνησμό στο δέρμα, πταρμούς και ρινόρροια στο ανώτερο αναπνευστικό, βήχα, οίδημα λάρυγγα, βρογχόσπασμο και έκκριση βλέννης στο κατώτερο αναπνευστικό, ναυτία, έμετο, διάρροια και κωλικοειδή άλγη στο πεπτικό και τέλος, υπόταση στο καρδιαγγειακό. Παράλληλα, οι ποικίλες κυτταροκίνες και χημειοκίνες που απελευθερώνονται προκαλούν

οίδημα και λευκοκυτταρική διήθηση και ευθύνονται για την επιβραδυνόμενη φάση της αμέσου τύπου αλλεργικής αντίδρασης, αλλά και τη χρόνια φάση της αλλεργικής φλεγμονής. Τα μαστοκύτταρα ενέχονται περισσότερο στην οξεία αλλεργική αντίδραση, ενώ τα βασεόφιλα τόσο στην οξεία, όσο και στην επιβραδυνόμενη φάση της αμέσου τύπου αλλεργικής αντίδρασης, καθώς και στη χρόνια αλλεργική φλεγμονή (εικόνα 3).



Εικόνα 3

Σχηματική απεικόνιση του ρόλου μαστοκυττάρων και βασεοφίλων στις αλλεργικές αντιδράσεις (τροποποιημένο από Broekman et al [57])

Στη φάση της ευαισθητοποίησης (sensitization), τα αλλεργιογόνα αλληλεπιδρούν με τα δενδριτικά κύτταρα, τροποποιώντας τα προς ένα φαινότυπο που κατευθύνει την επίκτητη ανοσία (T-λεμφοκύτταρα) προς την Th2 κατεύθυνση και την παραγωγή από τα B-λεμφοκύτταρα ειδικών (specific) IgE, που προσδένονται στους υψηλής συγγένειας FcεRI υποδοχείς στην επιφάνεια των μαστοκυττάρων και των βασεοφίλων. Σε νέα έκθεση, το αλλεργιογόνο συνδέεται και γεφυρώνει δύο γειτονικά μόρια ειδικής γι' αυτό IgE και πυροδοτείται έτσι η απελευθέρωση προσχηματισμένων (ισταμίνη, πρωτεάσες) και νεοσχηματιζόμενων (προσταγλανδίνες- PG, λευκοτριένια- LT, παράγων ενεργοποίησης αιμοπεταλίων- PAF) μεσολαβητών και κυτταροκινών. Οι ουσίες αυτές ευθύνονται για τα συμπτώματα των οξέων αλλεργικών αντιδράσεων και την επιβραδυνόμενη φάση της αμέσου τύπου αλλεργικής αντίδρασης. Παράλληλα, ευοδώνεται η προσέλκυση και ενεργοποίηση κυττάρων (πολυμορφοκυττάρων, ηωσινοφίλων και Th2-λεμφοκυττάρων), που οδηγεί στη χρόνια αλλεργική φλεγμονή.

Επιπρόσθετα, φαίνεται ότι και τα δύο είδη κυττάρων, ιδίως όμως τα βασεόφιλα, έχουν αντιγονοπαρουσιαστικές ικανότητες και μάλιστα, σε συνδυασμό με την έκκριση IL-4,

μπορούν να κατευθύνουν την επικράτηση Th2 λεμφοκυτταρικών απαντήσεων έναντι αλλεργιογόνων και παρασίτων. Πρόσφατα δείχτηκε επίσης ότι τα βασεόφιλα μπορούν να απελευθερώνουν μια πλειάδα κυτταροκινών και χημειοκινών, μεταξύ άλλων IL-4, IL-13, IL-6, IL-9, RANTES, GM-CSF, MIP-1α, MIP-1β και MCP-1, ενώ τα μαστοκύτταρα IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, TNF, CCL2, CCL3, CCL5 και CXCL8, bFGF, SCF, VEGF και ως εκ τούτου ασκούν ανοσορρυθμιστικό ρόλο. Όσον αφορά τα μαστοκύτταρα, υπάρχουν ενδείξεις ότι ασκούν μικροβιοκτόνο δράση μέσω φαγοκυττάρωσης και επιπλέον, με μια σειρά ουσιών που απελευθερώνουν, συμβάλλουν στην έναρξη της δραστηρικής φάσης της φυσικής ανοσίας και ρυθμίζουν, έως ένα σημείο, το βαθμό και το είδος της λευκοκυτταρικής διήθησης στον τόπο της φλεγμονής. Ειδικά ο TNF και τα λευκοτριένια έχουν κεντρικό ρόλο στην προσέλκυση πολυμορφοπυρήνων, μακροφάγων και T-λεμφοκυττάρων στο σημείο της φλεγμονής. Μπορεί, τέλος, να περιορίζουν την τοξικότητα από ουσίες που απελευθερώνονται κατά τη μη ειδική ανοσιακή απάντηση στους ιστούς μέσω πρωτεόλυσης και να ασκούν θετική ή αρνητική παλίνδρομη ρύθμιση στη μετάβαση από την ειδική στην επίκτητη ανοσολογική απόκριση [53, 58-60].

1.2.3 Διαλυτές ουσίες

Η μη ειδική ανοσία περιλαμβάνει ένα σύνολο βιομορίων με βακτηριοκτόνες ή αντι-ικές ιδιότητες, ουσίες που ρυθμίζουν την επικοινωνία μεταξύ των ανοσιακών κυττάρων και τη λειτουργία τους, καθώς και μόρια που προσκολλώνται στους βλαπτικούς παράγοντες και διευκολύνουν την αναγνώριση (οψωνινοποίηση) και φαγοκυττάρωσή τους από τα φαγοκύτταρα. Στις διαλυτές ουσίες της φυσικής ανοσίας περιλαμβάνονται διάφοροι διαλυτοί υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων (fluid phase Pattern-Recognition Molecules, PRMs), οι πρωτεΐνες οξείας φάσης του πλάσματος, το συμπλήρωμα, αντιμικροβιακές πρωτεΐνες και πεπτίδια, οι ιντερφερόνες και οι κυτταροκίνες.

1.2.3.1 Πρωτεΐνες πλάσματος - Συμπλήρωμα

Μια πλειάδα πρωτεϊνών του πλάσματος συμμετέχουν στη μη ειδική ανοσιακή απάντηση. Στους διαλυτούς PRMs ταξινομούνται οι κολλεκτίνες, όπως οι SP-A & SP-D και η λεκτίνη που συνδέει τη μαννόζη (Mannose-Binding Lectin, MBL), οι φικολίνες και οι

πεντραξίνες (pentraxins), εκ των οποίων πιο γνωστές είναι η C- αντιδρώσα πρωτεΐνη (C-Reactive Protein, CRP) και το A αμυλοειδές του ορού (Serum Amyloid A, SAA). Οι δύο τελευταίες εξάλλου υπάγονται και στις πρωτεΐνες οξείας φάσης. Οι διαλυτοί PRMs παράγονται από τα ηπατοκύτταρα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα κύτταρα των κυψελίδων του πνεύμονα αλλά και τα μονοκύτταρα, μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα και πολυμορφοπύρρηνα. Η σύνθεση και απελευθέρωση PRMs τοπικά στους ιστούς αλλά και συστηματικά στην κυκλοφορία αυξάνει μαζικά μετά από ιστική βλάβη ή λοίμωξη. Έχειδειχθεί ότι, παρά τις διαφορές των επιμέρους μορίων, όλοι οι PRMs μοιράζονται κοινά χαρακτηριστικά και αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και με τα κύτταρα της μη ειδικής ανοσίας. Έτσι, αναγνωρίζουν παθογόνους μικροοργανισμούς και συμβάλλουν στην οψωνινοποίηση και τη φαγοκυττάρωσή τους απευθείας ή μέσω ενεργοποίησης του συμπληρώματος. Επίσης, μπορούν να συγκολλούν διάφορα μόρια και να αδρανοποιούν ιούς. Τέλος, έχειδειχθεί ότι ενισχύουν τη λειτουργία των κυτταρικών υποδοχέων και συμβάλλουν στη ρύθμιση διαφόρων λειτουργιών των κυττάρων της φυσικής ανοσίας [61-63].

Υπό τον όρο πρωτεΐνες οξείας φάσης ταξινομούνται οι πρωτεΐνες των οποίων η συγκέντρωση στο πλάσμα μεταβάλλεται σημαντικά κατά τη φλεγμονώδη αντίδραση. Η σύνθεσή τους ρυθμίζεται από κυτταροκίνες, όπως π.χ. οι IL-1 και IL-6 και από γλυκοκορτικοειδείς ορμόνες. Στην υπο-ομάδα των πρωτεϊνών οξείας φάσης που αυξάνονται κατά τη φλεγμονή ανήκουν η CRP και το SAA, που προαναφέρθηκαν, αλλά και μια πλειάδα μορίων όπως το ινωδογόνο, η προθρομβίνη, το πλασμινογόνο, η φερριτίνη, η σερουλοπλασμίνη, η απτογλομπίνη και η α1- αντιτρυψίνη. Υπάρχουν και πρωτεΐνες οξείας φάσης των οποίων τα επίπεδα μειώνονται κατά τη φλεγμονή, όπως η αντιθρομβίνη, η τρανσφερρίνη κ.ά. Οι λειτουργίες των πρωτεϊνών αυτών ποικίλλουν και περιλαμβάνουν την οψωνινοποίηση, τη χημειοταξία των λευκοκυττάρων στο σημείο της φλεγμονής, την ενεργοποίηση του συμπληρώματος, την ενίσχυση της φαγοκυττάρωσης, την πήξη, τη θρομβόλυση και τη ρύθμιση της διακίνησης ουσιών όπως ο σίδηρος. Έτσι, με πολλαπλούς μηχανισμούς επηρεάζουν τη λειτουργία των ανοσιακών κυττάρων και την κάθαρση των μικροβίων από τον οργανισμό [64].

Το συμπλήρωμα είναι ένα σύστημα που περιλαμβάνει περισσότερες από 30 πρωτεΐνες/ένζυμα του πλάσματος και των κυτταρικών μεμβρανών, που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και ενεργοποιούμενη καθεμία προκαλεί την ενεργοποίηση της επόμενης (καταρράκτης ενεργοποίησης), καθώς και ρυθμιστικές πρωτεΐνες. Αποτελεί βασικό

συστατικό της χυμικής φυσικής ανοσίας, με κύριες λειτουργίες την οψωνινοποίηση και επαγωγή της φαγοκυττάρωσης (μέσω του κλάσματος C3b), την αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας, τη χημειοταξία ουδετεροφίλων και μονοκυττάρων (μέσω των κλασμάτων C3a, C5a) και προαγωγή της φλεγμονής, τη λύση- καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης των παθογόνων (μέσω σχηματισμού του συμπλέγματος προσβολής μεμβράνης) και την κάθαρση του οργανισμού από ανοσοσυμπλέγματα. Το συμπλήρωμα ενεργοποιείται με τρεις τρόπους. Κατά την κλασική οδό η ενεργοποίηση του συμπληρώματος γίνεται από συμπλέγματα αντιγόνου- αντισώματος και επομένως απαιτεί την εμπλοκή της επίκτητης ανοσίας. Στην οδό της λεκτίνης η ενεργοποίηση γίνεται με την πρόσδεση της MBL με υδατανθρακικές δομές της επιφάνειας των μικροβίων και τέλος, στην εναλλακτική οδό το συμπλήρωμα ενεργοποιείται από μικρόβια και νεκρωτικά κύτταρα με τη συμβολή της προπεριδίνης. Ανεξαρτήτως του τρόπου ενεργοποίησης, ο καταρράκτης των διαδοχικών αντιδράσεων οδηγεί στο σχηματισμό των κλασμάτων C3a, C3b και των κομβερτασών του παράγοντα C5, που καταλύουν τη διάσπαση του τελευταίου σε C5a και C5b και την επακόλουθη ενεργοποίηση των παραγόντων C5-9, με τελικό αποτέλεσμα το σχηματισμό του συμπλέγματος προσβολής μεμβράνης (τελική οδός). Στη διαδικασία ενεργοποίησης παρεμβαίνουν κάποιες πρωτεΐνες- ανασταλτές, που ασκούν ρυθμιστικό ρόλο και καθορίζουν το βαθμό της ενεργοποίησης του συμπληρώματος, όπως οι παράγοντες H και I και η C4-binding protein [65-67].

1.2.3.2 Κυτταροκίνες

1.2.3.2.1 Κυτταροκίνες - γενικά

Οι κυτταροκίνες είναι μικρές διαλυτές πρωτεΐνες που εκκρίνονται κυρίως από τα μονοκύτταρα- μακροφάγα ή τα λεμφοκύτταρα, αλλά και άλλα εμπύρνηνα κύτταρα του οργανισμού, όπως επιθηλιακά και ενδοθηλιακά, σε απάντηση σε ποικίλα ερεθίσματα και ιδίως σε λοίμωξη, ιστικό τραυματισμό και φλεγμονή. Είναι υπεύθυνες για την επικοινωνία μεταξύ των λευκοκυττάρων και των άλλων κυττάρων του σώματος και δεσμευόμενες σε ειδικούς μεμβρανικούς υποδοχείς των κυττάρων- στόχων πυροδοτούν μηχανισμούς μεταγωγής μηνυμάτων και επηρεάζουν τη λειτουργία τους. Έχουν συνήθως αυτοκρινή ή παρακρινή δράση αλλά μπορούν να έχουν και ενδοκρινή δράση, μεταφερόμενες με την

κυκλοφορία του αίματος. Χαρακτηριστικές ιδιότητες των κυτταροκινών είναι ο πλειοτροπισμός, η ικανότητα δηλαδή μια κυτταροκίνη να ασκεί διαφορετική δράση σε διάφορες ομάδες κυττάρων και η αλληλοεπικάλυψη- πλεονασμός δράσης, έτσι ώστε η ίδια λειτουργία να ρυθμίζεται από δύο ή περισσότερες κυτταροκίνες. Είναι δυνατόν να υπάρχει συνέργεια, δηλαδή συνδυασμένη δράση δύο ή περισσότερων κυτταροκινών, ώστε να παράγεται ισχυρότερο αποτέλεσμα και επιπλέον η δράση μιας κυτταροκίνης να επάγει την παραγωγή μιας ή περισσότερων άλλων κυτταροκινών, οι οποίες με τη σειρά τους επάγουν άλλα κύτταρα- στόχους να εκτελέσουν μια λειτουργία. Ενδέχεται, τέλος, να υπάρχει ανταγωνισμός της δράσης των διαφόρων κυτταροκινών και τελικά το αποτέλεσμα σε κάθε ερέθισμα *in vivo* να είναι η συνισταμένη των αλληλεπιδράσεων των διαφορετικών κυτταροκινών που παράγονται.

Οι κυτταροκίνες εμπλέκονται στη ρύθμιση ποικίλων βιολογικών διεργασιών στο ανθρώπινο σώμα. Καταρχάς, κατέχουν κεντρικό ρόλο στην έναρξη των φλεγμονωδών ανοσιακών απαντήσεων και των συστηματικών αντιδράσεων οξείας φάσης, προσελκύοντας και ενεργοποιώντας τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Έτσι, εμπλεκόμενες στη γένεση της φλεγμονής, ενορχηστρώνουν τη μη ειδική ανοσιακή απάντηση. Πιο συγκεκριμένα, μετά την αναγνώριση ξένων εισβολέων ή ενδογενών σημάτων κινδύνου, παράγεται μία πλειάδα κυτταροκινών, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται οι IL-1, TNF- α , IL-6, IL-12, IL-18, G-CSF και GM-CSF. Αυτές ενεργοποιούν τοπικά τα ενδοθηλιακά κύτταρα και διάφορα λευκοκύτταρα, με αποτέλεσμα την παραγωγή χημειοκινών, την αύξηση της έκφρασης μορίων προσκόλλησης και την αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας, ώστε να ευοδωθεί η στρατολόγηση φαγοκυττάρων και άλλων λευκοκυττάρων της φυσικής ανοσίας, καθώς και η τοπική αύξηση της συγκέντρωσης αντιμικροβιακών πρωτεϊνών, συμπληρώματος, ανοσοσφαιρινών και πρωτεϊνών οξείας φάσης. Το τελικό αποτέλεσμα σε τοπικό επίπεδο είναι η φλεγμονή, ενώ η διάχυση στη συστηματική κυκλοφορία IL-1, IL-6 και TNF- α προετοιμάζει τον οργανισμό για γενικευμένη αμυντική λειτουργία. Παράλληλα, οι παραγόμενες IFN τύπου I ασκούν αντι-ική δράση. Ταυτόχρονα, ξεκινά η αντιγονοπαρουσίαση για την επακόλουθη έναρξη των ειδικών ανοσιακών απαντήσεων. Όσον αφορά τις τελευταίες, οι κυτταροκίνες ρυθμίζουν την ενεργοποίηση και τη διαφοροποίηση T- και B-λεμφοκυττάρων και μάλιστα έχει δειχθεί η σημασία τους στην αλληλεπίδραση της φυσικής με την επίκτητη ανοσία. Ειδικότερα, θεωρείται ότι το μικροπεριβάλλον που διαμορφώνεται από τις παραγόμενες από τα APCs κυτταροκίνες,

κατά την ενεργοποίηση της φυσικής ανοσίας, συμβάλλει καθοριστικά στην κατεύθυνση της διαφοροποίησης των παρθένων Th0 λεμφοκυττάρων. Εκτός της πολυδιάστατης εμπλοκής τους στην άμυνα του οργανισμού, οι κυτταροκίνες συμμετέχουν στην επούλωση των ιστών και τη λύση της φλεγμονής, στη ρύθμιση της αιμοποίησης και αγγειογένεσης, του πολλαπλασιασμού κυττάρων και της αύξησης των ιστών, καθώς και της απόπτωσης. Τέλος, στις κεντρικές δράσεις των κυτταροκινών συγκαταλέγονται η συμμετοχή τους στη ρύθμιση της θερμοκρασίας του σώματος, της διάθεσης και της όρεξης.

Στη μεγάλη οικογένεια των κυτταροκινών συμπεριλαμβάνονται οι ιντερλευκίνες (IL), οι ιντερφερόνες (IFN), παράγοντες νέκρωσης των όγκων (TNF), χημειοκίνες, διεγερτικοί παράγοντες αποικιών (Colony Stimulating Factors, CSF) και αυξητικοί παράγοντες (Growth Factors, GF). Σε πολλές περιπτώσεις οι κυτταροκίνες ομαδοποιούνται με βάση τη λειτουργία τους. Έτσι, διακρίνουμε τις φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως οι IL-1α, IL-1β, TNF-α, IL-12, IL-18, IL-32, IL-33 και τις αντιφλεγμονώδεις, με κύριους εκπροσώπους την IL-10 και τον Transforming Growth Factor β (TGF-β). Επιπλέον, αναλόγως της κατεύθυνσης διαφοροποίησης των T-λεμφοκυττάρων που αυτές επάγουν και της κυρίαρχης παραγωγής τους από τα αντίστοιχα διαφοροποιημένα T-λεμφοκύτταρα, διακρίνονται σε Th1, Th2, Treg, καθώς και τις νεότερες κατηγορίες Th9, Th17, Th22 και Th follicular. Στον πίνακα 1 φαίνονται ανά κατηγορία οι κύριες κυτταροκίνες που καθορίζουν την κατεύθυνση της διαφοροποίησης (τροφικές) και αυτές που παράγονται από τα αντίστοιχα διαφοροποιημένα T-λεμφοκύτταρα [68-72].

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ Th ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ	ΤΡΟΦΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ	ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ	ΚΥΡΙΑ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ
Th1	IL-12, IFN-γ	IFN-γ, TNF-α	Κυτταρική ανοσία
Th2	IL-4	IL-4, IL-5, IL-13 IL-25, IL-33	Χυμική ανοσία & IgE απαντήσεις
Treg	IL-10, TGF-β, IL-2	IL-10, TGF-β, IL-35	Ανοσολογική ανοχή
Th17	TGF-β, IL-6, IL-23	IL-17A-F, IL-21, IL-22, IL-23	Αυτοανοσία & Άμυνα σε εξωκυττάρια παθογόνα
Th9	TGF-β, IL-4	IL-9, IL-10, IL-17, IL-21, IL-22	Φλεγμονή των ιστών και παραγωγή βλέννης
Th22	TGF-α, IL-6	IL-22	Ομοιοστασία δέρματος
Th follicular	IL-6, IL-21	IL-21	Ωρίμανση B κυττάρων

Πίνακας 1

Κύριες κατευθύνσεις της διαφοροποίησης των T-λεμφοκυττάρων

1.2.3.2.2 Κυτταροκίνες της μη ειδικής ανοσίας

Κύριοι διαμεσολαβητές της μη ειδικής ανοσίας θεωρούνται κυρίως οι ιντερφερόνες, ο TNF-α και οι IL-1, -6, -10, -12, -18, κάποιες CSFs και οι χημειοκίνες. Επίσης, τα τελευταία χρόνια έχουν ανακαλυφθεί και άλλα μόρια που παράγονται από κύτταρα της μη ειδικής ανοσίας και έχουν σημαντική συμβολή στη φυσική άμυνα έναντι των παθογόνων, όπως η IL-15, η IL-23 και η IL-27.

Οι ιντερφερόνες έχουν κεντρικό ρόλο στην άμυνα έναντι των ιών και αναλόγως της δομής τους και του υποδοχέα που συνδέονται, διακρίνονται στις IFN τύπου I, τύπου II και τύπου III. Οι IFN τύπου I παράγονται μετά την αναγνώριση ιών από όλα τα κύτταρα του αίματος και των ιστών που φέρουν ειδικούς υποδοχείς αναγνώρισης ιικών προτύπων, μέσω ενδοκυττάριας ενεργοποίησης μεταγραφικών παραγόντων που ονομάζονται Interferon-Regulatory Factors (IRFs). Ειδικά τα pDCs, όπως προαναφέρθηκε, διαθέτουν την ικανότητα παραγωγής μεγάλης ποσότητας IFN-α/β. Η IFN-γ, που είναι ο μόνος εκπρόσωπος IFN τύπου II, παράγεται κυρίως από τα T-λεμφοκύτταρα, αλλά και από τα μακροφάγα, DCs και NK-κύτταρα (στα πλαίσια της μη ειδικής ανοσιακής απάντησης) και επάγεται από κυτταροκίνες όπως η IL-12 και η IL-18. Οι IFN τύπου III παράγονται από τα pDCs σε απάντηση σε ιογενή λοίμωξη στους επιθηλιακούς φραγμούς. Συνολικά οι IFN είναι μόρια με πολλαπλές βιολογικές δράσεις και μπορούν να παρεμβαίνουν εκτός από την άμυνα του οργανισμού και σε άλλες λειτουργίες όπως η αιμοποίηση, η αγγειογένεση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, μέσω ενεργοποίησης γονιδίων που συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και διαφοροποίησης, στο μεταβολισμό μορίων της κυτταρικής μεμβράνης και στην απελευθέρωση μεσολαβητών.

Στις IFN τύπου I ανήκουν η IFN-α (13 υπότυποι στον άνθρωπο), η IFN-β και οι λιγότερο γνωστές IFN-ε, IFN-κ, IFN-ω, IFN-δ, IFN-τ και IFN-ζ. Η σύνδεσή τους με τον υποδοχέα IFNα Receptor (IFNAR) ενεργοποιεί τη μεταγραφή εκατοντάδων γονιδίων [IFN-Stimulated Genes (ISGs)] και οδηγεί στη σύνθεση πρωτεϊνών που αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των ιών μέσω ποικίλων μηχανισμών, όπως η παρεμβολή στη μεταγραφή και τη μετάφραση του RNA, η παρεμβολή στην αναδόμηση του κρυοσκελετού και η επαγωγή απόπτωσης. Τέτοιες πρωτεΐνες είναι οι ISG15, η GTPase Mx1, η ριβονουκλεάση L (RNaseL) και η πρωτεϊνική κινάση R (PKR). Με τη συνδυασμένη λειτουργία τους περιορίζουν την αναπαραγωγή των ιών στα μολυσμένα κύτταρα και αποτρέπουν τη διασπορά των ιών

στα γειτονικά μη μολυσμένα κύτταρα και με τον τρόπο αυτό επάγουν μία «αντι-ική κατάσταση» (“antiviral state”). Παράλληλα, ασκούν και ανοσορρυθμιστική δράση, αφού η ενεργοποίηση κάποιων ISGs οδηγεί σε αυξημένη έκφραση MHC I μορίων, επιφανειακών υποδοχέων (π.χ. για χημειοκίνες) και συνδιεγερτικών μορίων και ευοδώνει την ωρίμανση και τη λειτουργικότητα μονοκυτάρων- μακροφάγων, DCs, NK-κυττάρων, T- & B-λεμφοκυττάρων. Εκτός της συμμετοχής τους στην άμυνα του οργανισμού, οι παραγόμενες πρωτεΐνες μπορεί να έχουν αντινεοπλασματική δράση, να καταστέλλουν την αύξηση των ιστών, να ευοδώνουν την απόπτωση των κυττάρων και να καταστέλλουν την αγγειογένεση.

Η IFN- γ ενεργοποιεί τον υποδοχέα IFN- γ Receptor (IFNGR) και μέσω των ISGs επίσης ασκεί ανοσορρυθμιστική δράση, αυξάνοντας την έκφραση MHC I & II μορίων και συνδιεγερτικών μορίων και συντελώντας στην ωρίμανση και ενεργοποίηση των DCs και λοιπών ανοσιακών κυττάρων, σε μεγαλύτερη μάλιστα κλίμακα από τις IFN τύπου I. Χαρακτηριστικά ευοδώνει την αντιγονοπαρουσίαση και την ενεργοποίηση των μακροφάγων και των NK-κυττάρων, καθώς και την κυτταροτοξικότητα. Επιπλέον, αποτελεί το κύριο προϊόν των Th1 λεμφοκυττάρων, που επιπρόσθετα κατευθύνει την ανοσιακή απάντηση προς την Th1 επικράτηση, επιδρώντας στη διαφοροποίηση των παρθένων T κυττάρων προς αυτή την κατεύθυνση. Η IFN- γ επίσης συμβάλλει στην αντι-ική άμυνα μέσω επαγωγής γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες με δράσεις έναντι των ιών, σε μικρότερη βέβαια κλίμακα σε σχέση με τις IFN τύπου I, αλλά θεωρείται απαραίτητη για την εδραίωση μίας πιο μακροχρόνιας αντι-ικής κατάστασης. Εμπλέκεται ακόμη στην άμυνα έναντι ενδοκυττάρων παθογόνων, όπως η λιστέρια και το τοξόπλασμα. Επιπλέον, είναι γνωστές οι κυτταροστατικές, κυτταροτοξικές, προ-αποπτωτικές και αντι-αγγειογενετικές της ιδιότητες, που συντελούν στην αντινεοπλασματική της δράση.

Στην ομάδα των IFN τύπου III ανήκουν οι IFN- λ 1, 2 και 3, επίσης γνωστές ως IL-29, IL-28A και IL-28B, αντίστοιχα. Ασκούν τη δράση τους, που ομοιάζει με αυτήν των IFN τύπου I, μετά τη σύνδεσή τους με τον υποδοχέα IFN- λ receptor, που ενεργοποιεί τη μεταγραφή ISGs. Φαίνεται ότι υποδοχείς για τις IFN τύπου III εκφράζονται κυρίως από επιθηλιακά κύτταρα και σε μικρότερη κλίμακα από κύτταρα του αίματος. Συνεπώς, οι IFN τύπου III ασκούν κυρίως την αντι-ική τους δράση στους επιθηλιακούς φραγμούς, αν και τελευταία έχει αναγνωριστεί ότι έχουν και ανοσορρυθμιστικό ρόλο, επιδρώντας στα πολυμορφοπύρρηνα, τα NK-κύτταρα και τα DCs [73-80].

Ο TNF-α παράγεται από πολλά και διαφορετικά κύτταρα του οργανισμού, όπως τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα, τα λεμφοκύτταρα, τα NK-κύτταρα, τα αστροκύτταρα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τις λείες μυϊκές ίνες, αλλά κυρίως από τα μακροφάγα. Ασκεί τις δράσεις του μέσω δύο υποδοχέων, του TNFR1 και του TNFR2. Έχει κεντρικό ρόλο στη γένεση και συντήρηση της φλεγμονής, καθώς πυροδοτεί την παραγωγή ενός καταρράκτη κυτταροκινών. Προκαλεί πυρετό και επιπρόσθετα ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων σημαντικών για την απάντηση του οργανισμού στη λοίμωξη, ενώ παράλληλα εμπλέκεται σε διάφορες λειτουργίες όπως η κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση, η επιβίωση και η απόπτωση. Η υπέρμετρη παραγωγή του έχει συσχετιστεί με την παθογένεια νοσημάτων όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η αθηροσκλήρωση, η ψωρίαση, ο διαβήτης, η νόσος Crohn αλλά και καταστάσεις όπως η παχυσαρκία και η σήψη [81, 82].

Οι IL-1α και IL-1β επίσης συγκαταλέγονται στις φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και εκκρίνονται από μία πλειάδα κυττάρων όπως μονοκύτταρα, μακροφάγα, πολυμορφοπύρρηνα, λεμφοκύτταρα, ινοβλάστες, κερατινοκύτταρα κ.ά. Στις παρακρινείς δράσεις της IL-1β, που είναι και η περισσότερο μελετημένη, περιλαμβάνεται η αγγειοδιαστολή, η χημειοταξία μονοκυττάρων και πολυμορφοπυρήνων και η επαγωγή ενζύμων που προάγουν την καταστροφή του αρθρικού χόνδρου και των οστών. Προκαλεί επίσης τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και επάγει την ενεργοποίηση μονοκυττάρων, πολυμορφοπυρήνων και T-λεμφοκυττάρων. Κύριες συστηματικές δράσεις της IL-1β είναι η πρόκληση πυρετού και η γένεση πόνου σχετιζόμενου με φλεγμονή. Στις μεταβολικές δράσεις της περιλαμβάνεται η απόπτωση των β κυττάρων του παγκρέατος και η αθηρωγένεση [83, 84].

Η IL-6, επίσης φλεγμονώδης κυτταροκίνη, παράγεται από ενδοθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες, μονοκύτταρα και μακροφάγα. Διεγείρει το ήπαρ προς σύνθεση πρωτεϊνών οξείας φάσης σε απάντηση στη λοίμωξη ή την ιστική βλάβη. Προάγει τη διαφοροποίηση και ενεργοποίηση των T- και B- λεμφοκυττάρων και λοιπών ανοσιακών κυττάρων, καθώς και την παραγωγή ανοσοσφαιρινών. Συμμετέχει επίσης στην αιμοποίηση, στην ενεργοποίηση του ενδοθελίου, στον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων, στη διαφοροποίηση των νευρώνων, ενώ τέλος, μπορεί να ενεργοποιεί τον άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια προς παραγωγή ACTH και κορτιζόλης και τον υποθάλαμο προς παραγωγή βαζοπρεσίνης και αυξητικής ορμόνης [83, 85].

Η IL-12 είναι ένα ετεροδιμερές που αποτελείται από δύο υπομονάδες, την p35 και την p40 και παράγεται κυρίως από τα μονοκύτταρα, τα DCs και τα Β-λεμφοκύτταρα. Θεωρείται ανοσορρυθμιστική κυτταροκίνη, που ευοδώνει την παραγωγή IFN- γ και ενεργοποιεί ένα κύκλωμα θετικής ανατροφοδότησης που οδηγεί στη διαφοροποίηση των παρθένων Τ-λεμφοκυττάρων προς την Th1 κατεύθυνση. Επίσης, προάγει την παραγωγή IFN- γ από τα NK-κύτταρα και ευοδώνει την κυτταροτοξικότητα τους. Στην οικογένεια της IL-12 ανήκουν επίσης οι IL-23 και IL-27. Η IL-23 παράγεται από τα DCs και τα μακροφάγα και κατά κύριο λόγο ευοδώνει τη διαφοροποίηση των παρθένων Τ-λεμφοκυττάρων προς την Th17 κατεύθυνση. Αντιθέτως, η IL-27 ευοδώνει τη διαφοροποίηση προς την Th1 κατεύθυνση και ασκεί επίσης ανασταλτικές δράσεις, συμμετέχοντας στην καταστολή και λύση της Th17-σχετιζόμενης φλεγμονής [83, 86].

Η IL-10 είναι μία αντιφλεγμονώδης κυτταροκίνη, που παράγεται από τα Τ- και Β-λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα, μακροφάγα και DCs. Ασκεί τον ανοσορρυθμιστικό της ρόλο επιδρώντας στην παραγωγή κυτταροκινών, μεσολαβητών και μορίων επιφανείας από τα κύτταρα μυελοειδούς προέλευσης. Η αντιφλεγμονώδης δράση της επιτελείται μέσω της αναστολής της παραγωγής κυτταροκινών όπως οι IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, TNF αλλά επίσης χημειοκινών και προσταγλανδινών. Επιπλέον, καταστέλλει την αντιγονοπαρουσίαση, μέσω μειωμένης έκφρασης MHC II και συνδιεγερτικών μορίων, αναστέλλει την ωρίμανση των DCs και ευοδώνει μία κατάσταση «ανεργίας» όσο αφορά την επαγωγή απαντήσεων σε αντιγόνα. Επίσης, έχειδειχθεί ότι μειώνει την ικανότητα ενδοκυττάριας μικροβιοκτονίας των φαγοκυττάρων. Μπορεί παράλληλα να έχει και ανοσοενισχυτική δράση, προάγοντας την επιβίωση και διαφοροποίηση των Β-λεμφοκυττάρων και τη μετατροφή των ισοτύπων των αντισωμάτων και διεγείροντας την παραγωγή IFN- γ από τα CD8+ Τ λεμφοκύτταρα [83, 87].

Οι χημειοκίνες είναι μικρά πρωτεϊνικά μόρια που εμπλέκονται στη μετανάστευση και την κατανομή των λευκοκυττάρων στους ιστούς. Ρυθμίζουν την απελευθέρωση των κυττάρων της μη ειδικής ανοσίας από το μυελό των οστών, τόσο σε κατάσταση ομοιόστασης, όσο και μετά από προσβολή των ιστών. Επιπλέον, σχετίζονται με την τοποθέτηση κυττάρων με ρόλο ανοσοεπιτήρησης σε διάφορους περιφερικούς ιστούς και τη μετανάστευση των κυττάρων αυτών, μετά από αντιγονικό ερεθισμό και ενεργοποίηση της φυσικής ανοσίας, στους επιχώριους λεμφαδένες. Από τις σημαντικότερες λειτουργίες τους είναι η χημειοταξία των λευκοκυττάρων και η μετανάστευσή τους προς το σημείο της

φλεγμονής. Ειδικά, οι CC χημειοκίνες επιδρούν κατά κύριο λόγο στα μονοκύτταρα, τα T-λεμφοκύτταρα και τα NK-κύτταρα, ενώ οι CXC χημειοκίνες εμπλέκονται κυρίως στη χημειοταξία των ουδετεροφίλων. Στις CC χημειοκίνες ανήκουν οι CCL2 (εναλλακτικά γνωστή ως Monocyte-Chemotactic Protein 1, MCP-1) και CCL7 (MCP-3), που συντελούν στην κινητοποίηση των μονοκυττάρων καθώς και οι CCL3 (Macrophage Inflammatory Protein 1α, MIP-1α), CCL4 (MIP-1β) και CCL5 (Regulated upon Activation Normal T cell Expressed and Secreted, RANTES), που εμπλέκονται στην κινητοποίηση των μακροφάγων και NK-κυττάρων, αλλά και σε αλληλεπιδράσεις των T-λεμφοκυττάρων με τα DCs. Στην ίδια ομάδα ανήκουν και η CCL22 (Macrophage-Derived Chemokine, MDC), που συμβάλλει στη μετανάστευση Th2 και Treg κυττάρων και η CCL11 (eotaxin-1), που συμβάλλει στη μετανάστευση ηωσινοφίλων και βασεοφίλων. Ο πιο γνωστός εκπρόσωπος της ομάδας των CXC χημειοκινών είναι η CXCL8 (IL-8), με κύριες δράσεις τη χημειοταξία των ουδετεροφίλων και την ενεργοποίηση της αποκοκκίωσης μικροβιοκτόνων ουσιών από τα κοκκία τους. Στην ομάδα αυτή ανήκουν επίσης οι CXCL9 (Monokine induced by Interferon-gamma, MIG) και CXCL10 (Interferon-γ-induced Protein 10, IP-10), που σχετίζονται με την προαγωγή Th1 απαντήσεων και εμπλέκονται στη μετανάστευση Th1 και κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων, καθώς και NK-κυττάρων [88, 89].

1.3. Φάση αναγνώρισης - Υποδοχείς της μη ειδικής ανοσίας

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, τα κύτταρα που συμμετέχουν στη φυσική ανοσιακή απάντηση διαθέτουν ειδικούς υποδοχείς, με τους οποίους αναγνωρίζουν δομές «ξένες» προς τον οργανισμό, κυρίως τα παθογόνα μικρόβια. Οι υποδοχείς αυτοί ονομάζονται PRR (Pattern Recognition Receptors), είναι γενετικά καθορισμένοι και αναγνωρίζουν αντίστοιχες στερεοχημικές δομές που δεν υπάρχουν στα θηλαστικά, αλλά αποτελούν οντογενετικά διατηρημένες δομές ή προϊόντα του μεταβολισμού των μικροβίων και είναι γνωστές ως PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns). Οι πιο κοινές PAMP δομές είναι οι βακτηριακές λιποπολυσακχαρίδες (lipopolysaccharides, LPS), οι πεπτιδογλυκάνες, τα λιποτεϊχοϊκά οξέα, οι μαννάνες, το βακτηριακό DNA, το RNA μονής και διπλής έλικας και οι γλυκάνες. Εκτός από μικροβιακές δομές, οι PRR αναγνωρίζουν και ενδογενή σήματα κινδύνου (Danger Associated Molecular Patterns, DAMPs), που προκύπτουν στον οργανισμό από μη φυσιολογικά μοριακά σύμπλοκα συνέπεια μόλυνσης,

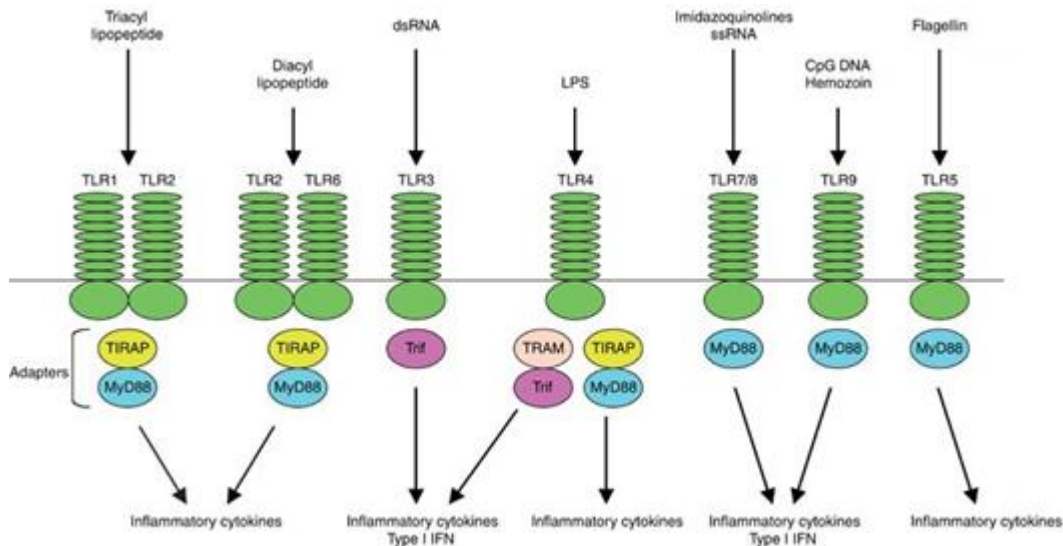
φλεγμονής ή άλλου τύπου κυτταρικού στρες. Η αναγνώριση των PAMP από τους PRR ενεργοποιεί ποικίλες οδούς μεταφοράς μηνυμάτων ενδοκυτταρίως και τελικά επάγει την έκφραση μιας πληθώρας γονιδίων και τη σύνθεση διαφόρων μορίων, συμπεριλαμβανομένων των κυτταροκινών, μορίων κυτταρικής προσκόλλησης και ανοσοϋποδοχέων, που ενορχηστρώνουν την πρόωμη απάντηση του ξενιστή στη λοίμωξη και ταυτόχρονα προετοιμάζουν την όψιμη επίκτητη ανοσιακή απάντηση.

Οι TLRs είναι οι σημαντικότεροι και καλύτερα μελετημένοι PRRs. Στον άνθρωπο, έχουν έως σήμερα αναγνωρισθεί δέκα διαφορετικοί τύποι λειτουργικών TLRs, που βρίσκονται στην επιφάνεια του κυττάρου ή ενδοκυτταρίως και αναγνωρίζουν λιπίδια, λιποπρωτεΐνες, πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα προερχόμενα από βακτήρια, ιούς, παράσιτα και μύκητες. Οι TLRs εκφράζονται κυρίως στα APCs, όπως μακροφάγα, DCs και Β-λεμφοκύτταρα, αλλά μελέτες έχουν δείξει την παρουσία τους, σε συνθήκες ηρεμίας ή σε λοίμωξη σχεδόν σε όλα τα κύτταρα του οργανισμού. Στον πίνακα 2 συνοψίζονται η εντόπιση και οι κύριοι φυσικοί και τεχνητοί συνδέτες για καθέναν από τους TLRs του ανθρώπου και στην εικόνα 4 οι κύριες ενδοκυτταρίες οδοί μετάδοσης σήματος και το κύριο προϊόν της ενεργοποίησης του αντίστοιχου TLR. Οι TLRs χρησιμοποιούν διάφορα μόρια για την ενδοκυτταρία μετάδοση σήματος, όπως την Myeloid Differentiation primary response protein 88 (MyD88), την Toll/Interleukin-1 Receptor (TIR) domain-containing Adapter Protein (TIRAP)/MAL, την TIR domain-containing adapter inducing IFN-β (TRIF) και το TRIF-related Adapter Molecule (TRAM). Τελικά, ενεργοποιούνται μόρια όπως ο Interferon Regulatory Factor (IRF3), ο Nuclear Factor (NF)-κB και η Activating Protein 1 (AP-1), που επάγουν αντι-ιικές και φλεγμονώδεις απαντήσεις. Συγκεκριμένα, οι TLR1/2 και TLR2/6 ενεργοποιούν τα μόρια MyD88 & TIRAP/MAL, ο TLR3 το TRIF, ο TLR4 τα MyD88, TIRAP/MAL, TRIF και TRAM, ενώ οι TLR7/8, TLR9, TLR5 μόνο το MyD88. Η MyD88-εξαρτώμενη οδός κατά κύριο λόγο επάγει φλεγμονώδεις αντιδράσεις, ενώ η εξαρτώμενη από το TRIF κυρίως αντι-ιικές απαντήσεις (IFN τύπου I). Σημειωτέον, η ενεργοποίηση των TLR7/8 και TLR9 στα pDCs προκαλεί την παραγωγή IFN τύπου I μέσω του MyD88 [90-93].

TLR	Εντόπιση	PAMP	Είδος μικροβίου	Συνθετικοί συνδέτες
TLR1/2	Κυτταρική μεμβράνη	Λιποπρωτεΐνες/ τριακυλιωμένα λιποπεπτίδια	Βακτήρια και μυκοβακτηρίδια	Pam3CSK4
TLR2	Κυτταρική μεμβράνη	Λιποπρωτεΐνες Πεπτιδογλυκάνη Λιποαραβινομαννάνη Πορίνες Γλυκοπρωτεΐνες GPI-mucin Φωσφολιπομαννάνη Zymosan Γλυκάνες	Βακτήρια Βακτήρια Μυκοβακτηρίδια Ναϊσσέριες Ιοί Πρωτόζωα Candida Μύκητες Μύκητες	Mycoplasmal Macrophage-activating lipopeptide-2 (MALP-2)
TLR3	Κυτταρόπλασμα	RNA διπλής έλικας (Double-stranded RNA, dsRNA)	Ιοί	Polyinosinic- polycytidylic acid [poly(I:C) ή poly:IC]
TLR4	Κυτταρική μεμβράνη	Λιποπολυσακχαρίδες (Lipopolysaccharides, LPS) RSV fusion protein Μαννάνη Heat Shock Proteins (HSPs)	Gram (-) βακτήρια Ιός RSV Candida	
TLR5	Κυτταρική μεμβράνη	Flagellin	Gram (-) βακτήρια	
TLR6	Κυτταρική μεμβράνη	Λιποτεϊχοϊκά οξέα Διακυλιωμένα λιποπεπτίδια	Gram (+) βακτήρια Μυκοβακτηρίδια	
TLR7	Κυτταρόπλασμα	RNA μονής έλικας (Single-stranded RNA, ssRNA)	RNA ιοί	Imiquimod/ Gardiquimod Resiquimod (R848) Loxoribine
TLR8	Κυτταρόπλασμα	ssRNA	RNA ιοί	R848
TLR9	Κυτταρόπλασμα	Μη μεθυλιωμένο CpG DNA	Βακτήρια και μυκοβακτηρίδια DNA ιοί	CpG ODNs, AT-ODNs
TLR10	?	?		

Πίνακας 2

Βασικά χαρακτηριστικά των ανθρώπινων TLR υποδοχέων (προσαρμοσμένο από Sandig & Bulfone-Paus [94] και Akira et al [95])



Εικόνα 4

Βασικές οδοί ενεργοποίησης TLR υποδοχών (προσαρμοσμένο από Kawai & Akira [90])

Εκτός των TLRs, τα τελευταία χρόνια έχει αναδειχθεί η σημασία και άλλων PRRs, που βρίσκονται στην κυτταρική επιφάνεια, όπως οι C-type Lectin Receptors (CLRs), αλλά και στο εσωτερικό των κυττάρων, όπως οι Retinoid acid-Inducible Gene I (RIG-I)-like Receptors (RLRs), οι Nucleotide-binding Oligomerization Domain (NOD)-like Receptors (NLRs), μέλη της οικογένειας Pyrin and HIN domain-containing (PYHIN) και ποικίλοι κυτταροπλασματικοί ανιχνευτές νουκλεϊκών οξέων (DNA sensors). Οι CLRs διακρίνονται σε διαλυτούς και σε προσδεμένους στην κυτταρική μεμβράνη και αναγνωρίζουν τη μαννόζη, τη φρουκτόζη και δομές γλυκάνης των μικροβίων. Οι RLRs είναι ενδοκυττάρια υποδοχείς για τους RNA ιούς, περιλαμβάνουν τον RIG-I, τον Melanoma Differentiation factor-5 (MDA5) και τον Laboratory of Genetics and Physiology 2 (LGP-2) και συμβάλλουν στην αντι-ιική άμυνα μέσω παραγωγής IFN τύπου I. Οι NLRs είναι επίσης ενδοκυττάρια υποδοχείς και σε συνεργασία με τους TLR επάγουν φλεγμονώδεις απαντήσεις και διαδικασίες απόπτωσης. Ειδικότερα, οι υποδοχείς NOD1 και NOD2 αναγνωρίζουν δομές πεπτιδογλυκάνης ενδοκυτταρίων βακτηρίων και επάγουν την ενεργοποίηση του μορίου NF-κB. Αντίθετα, ο υποδοχέας Nucleotide-binding domain-, Leucine-rich repeat- and Pyrin domain-containing Protein 3 (NALP3) εμπλέκεται στο σχηματισμό ενός μακρομοριακού συμπλόκου, του φλεγμονοσώματος (inflammasome), που μέσω ενεργοποίησης του μορίου κασπάσης -1, οδηγεί στην παραγωγή ενεργής IL-1β και IL-18 και προάγει την πυρόπτωση, μια μορφή λυτικού κυτταρικού θανάτου που περιορίζει τον πολλαπλασιασμό των παθογόνων μικροβίων στα μολυσμένα κύτταρα. Από

τους DNA sensors πιο γνωστοί είναι ο DNA-dependent Activator of IFN-regulatory factors (DAI), που επάγει την παραγωγή IFN αλλά και τον κυτταρικό θάνατο (νεκρόπτωση) και ο Absent In Melanoma 2 (AIM2), που συμμετέχει στο σχηματισμό του φλεγμονοσώματος [96-99].

1.4 Δραστική φάση της φυσικής ανοσίας

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η ενεργοποίηση των PRR υποδοχέων της μη ειδικής ανοσίας οδηγεί σε μία πρώτη γρήγορη, εντός ωρών, αντίδραση του οργανισμού σε κάθε ξένο εισβολέα, η οποία διαφέρει ανάλογα με το σημείο και το είδος της προσβολής. Κεντρικό ρόλο στην άμεση απάντηση της φυσικής ανοσίας διαδραματίζει η γένεση της φλεγμονής, που αποσκοπεί στην κάθαρση των εισβολέων και ακολούθως στην ενεργοποίηση της αποκατάστασης των προσβεβλημένων ιστών. Σε αδρές γραμμές, η ανίχνευση μικροβίων από τους PRR των ιστικών μακροφάγων και DCs οδηγεί στην παραγωγή κυρίως TNF- α , IL-1 και IL-6, κυτταροκινών που, μεταξύ άλλων, προκαλούν αγγειοδιαστολή και μεταβάλλουν την αγγειακή διαπερατότητα, συντελώντας έτσι στην προσέλκυση ανοσιακών κυττάρων στο σημείο της λοίμωξης, αρχικά πολυμορφοκυρήνων και ακολούθως μονοκυττάρων. Επίσης, η παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών επάγει τη σύνθεση πρωτεϊνών οξείας φάσης. Οι τελευταίες ενεργοποιούν το συμπλήρωμα και βοηθούν στην οψωνινοποίηση των μικροβίων και τη φαγοκυττάρωσή τους από τα μακροφάγα και τα πολυμορφοκύρηνα. Επιπρόσθετα, ενεργοποιούν τοπικά τον καταρράκτη της πήξης του αίματος, παρεμποδίζοντας έτσι την αιματογενή διασπορά των μικροβίων. Τα πολυμορφοκύρηνα, εκτός από τη φαγοκυττάρωση και ενδοκυττάρια μικροβιοκτονία των μικροβίων, που επιτελείται μέσω έκλυσης δραστικών ριζών οξυγόνου και μονοξειδίου του αζώτου καθώς και με τη βοήθεια διαφόρων μικροβιοκτόνων πρωτεϊνών, απελευθερώνουν στο σημείο της φλεγμονής πλειάδα τοξικών ουσιών, που καθιστούν το περιβάλλον αφιλόξενο για τους εισβολείς, αλλά παράλληλα προκαλούν ιστική βλάβη. Οι ανωτέρω διεργασίες έχουν ως αποτέλεσμα τα χαρακτηριστικά μακροσκοπικά ευρήματα της φλεγμονής: ερύθημα, οίδημα, θερμότητα, πόνο και απώλεια της λειτουργίας. Τα μονοκύτταρα που προσελκύνονται στο σημείο της λοίμωξης σε δεύτερο χρόνο επίσης συμμετέχουν στη φαγοκυττάρωση των μικροβίων, αλλά επιπλέον στην κάθαρση των αποπτωτικών πολυμορφοκυρήνων και των ιστικών υπολειμμάτων, στα πλαίσια της λύσης

της φλεγμονής και της επούλωσης των ιστών. Παράλληλα, η ενεργοποίηση των PRR επάγει τη σύνθεση αντιμικροβιακών πρωτεϊνών και AMPs, καθώς και μίας πλειάδας κυτταροκινών και ιντερφερονών, των οποίων οι κύριες δράσεις αναφέρθηκαν ήδη. Μεταξύ των δράσεων αυτών, η ενεργοποίηση και ωρίμανση των ανοσιακών κυττάρων όπως μακροφάγων, DCs και λεμφοκυττάρων και η εμπλοκή στην απόπτωση των μολυσμένων κυττάρων είναι εξέχουσας σημασίας για την αποτελεσματική άμεση ανοσιακή απάντηση, αλλά και για τη μετέπειτα ενεργοποίηση της επίκτητης ανοσίας [4, 93, 97, 100, 101].

2. Η ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΤΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ Ή ΜΗ ΕΙΔΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ

2.1 Η μη ειδική ανοσία στη νεογνική ηλικία

Κατά τη γέννηση το ανοσοποιητικό σύστημα θεωρείται ανώριμο, δηλαδή αδυνατεί να αναπτύξει πλήρως αποτελεσματικές ανοσιακές αποκρίσεις. Αυτό μέχρι πρότινος αποδιδόταν στην ανωριμότητα της ειδικής ανοσολογικής απόκρισης, καθώς η διαδικασία ωρίμανσής της προϋποθέτει και εξαρτάται από την έκθεση και αναγνώριση δομών και ουσιών του περιβάλλοντος. Όσον αφορά τις T- κυτταρικές απαντήσεις, στη νεογνική ηλικία επικρατεί η Th2 τύπου ανοσιακή απάντηση, ενώ υπάρχει σχετική αδυναμία για την εκδήλωση ικανοποιητικής Th1 απάντησης [102]. Σχετικά με τη B- κυτταρική απάντηση, πολλές μελέτες σε ανθρώπους και πειραματόζωα καταδεικνύουν ότι και αυτή είναι ανώριμη στα νεογνά. Συγκεκριμένα, η αντισωματική απάντηση στα νεογνά εκδηλώνεται καθυστερημένα σε σχέση με τους ενήλικες, τα επίπεδα των παραγόμενων ανοσοσφαιρινών είναι χαμηλότερα και ο τίτλος των αντισωμάτων πέφτει ταχύτερα. Υπάρχει διαφορά στην κατανομή των ισοτύπων, με τα νεογνά να παράγουν χαμηλότερο τίτλο IgG2, καθώς επίσης και στην ποιότητα των παραγόμενων αντισωμάτων, τα οποία είναι χαμηλότερης συγγένειας προς το αντιγόνο και μειωμένης ετερογένειας. Τέλος, σε βρέφη και νήπια ανεπαρκεί η παραγωγή αντισωμάτων όταν η απάντηση δεν εξαρτάται από το T-λεμφοκύτταρο, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τα πολυσακχαριδικά αντιγόνα. Η ωρίμανση επιμέρους στοιχείων του ανοσοποιητικού συστήματος φαίνεται να ακολουθεί διαφορετικούς ρυθμούς και να καθορίζεται από το βαθμό και το ρυθμό έκθεσης σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, την ταυτότητα των παραγόντων αυτών, αλλά και το γενετικό υπόστρωμα του οργανισμού [103, 104].

Μετέπειτα έρευνες έδειξαν ότι η ανωριμότητα του ανοσοποιητικού συστήματος αφορά και το σκέλος της μη ειδικής ανοσίας. Πολλαπλές βιβλιογραφικές αναφορές έχουν αναδείξει σημαντικές διαφορές μεταξύ νεογνών και ενηλίκων σε όλα τα επίπεδα της μη ειδικής άμυνας, από τους επιθηλιακούς φραγμούς μέχρι τον αριθμό αλλά και τη λειτουργικότητα των ανοσιακών κυττάρων.

Όσον αφορά τους φραγμούς, το δέρμα των νεογνών είναι λεπτότερο και ιδίως η επιδερμίδα και η εξωτερική της στιβάδα, η κερατίνη. Τα κερατινοκύτταρα είναι μικρότερα

και η περιεκτικότητα σε κολλαγόνο και ελαστίνη μειωμένη, ενώ συνυπάρχει και ανωριμότητα των δερμο-επιδερμικών συνδέσεων, καθώς και σημαντική διαφορά στη διαδερμική απώλεια και απορρόφηση ύδατος. Έτσι, το δέρμα των νεογνών καθίσταται πιο ευάλωτο σε διατομή και σε δυνάμεις έλξης. Επιπρόσθετα, τα νεογνά έχουν λιγότερο όξινο σε σχέση με τους ενήλικες pH δέρματος, κυμαινόμενο από 6.11 έως 7.5 (ανάλογα με το σημείο μέτρησης), στερούμενα ένα σημαντικό μηχανισμό άμυνας. Από την άλλη πλευρά, έχει δειχθεί αυξημένη παραγωγή περιγεννητικά αντιμικροβιακών ουσιών όπως η λυσοζύμη, η λακτοφερρίνη και η LL-37 και συνάμα βρέθηκε ότι τα κερατινοκύτταρα των νεογνών εκκρίνουν μεγαλύτερα ποσά IL-8, IP-10 και TNF- α σε σχέση με τους ενήλικες μετά από TLR3 διέγερση. Πιθανότατα, πρόκειται για αντιρροπιστικούς μηχανισμούς άμυνας του οργανισμού μέχρι ο επιδερμικός φραγμός να ισχυροποιηθεί [9, 105].

Ο φραγμός του πεπτικού συστήματος επίσης εμφανίζεται ανώριμος στην αρχή της ζωής. Στη γέννηση παρατηρείται αυξημένη διαπερατότητα τόσο του φραγμού του εντέρου όσο και του ανώτερου πεπτικού, οφειλόμενη σε ανεπάρκεια των «σφιχτών» συνδέσεων. Οι λάχνες και μικρολάχνες του εντερικού βλεννογόνου είναι ατελώς αναπτυγμένες, το γαστρικό pH είναι λιγότερο όξινο και η παραγωγή των περισσότερων αντιμικροβιακών πρωτεϊνών, όπως π.χ. της λυσοζύμης, της λακτοφερρίνης, της LL-37, των ντεφενσινών (Human Defensins, HDs) HD-5 και HD-6 υπολείπεται. Ο πληθυσμός των κυττάρων του Paneth και των DC του πεπτικού βλεννογόνου είναι μειωμένος. Τέλος, σε επίπεδο TLR, έχει δειχθεί μειωμένη έκφραση του TLR3, η οποία μάλιστα συμβαδίζει με αυξημένη επιρρέπεια σε λοίμωξη από ροταϊό, καθώς και μειωμένη έκφραση των TLR2 & 4. Ειδικά η μειωμένη έκφραση αλλά και η εξασθένιση της ενδοκυττάριας μετάδοσης του σήματος που αφορά τον TLR4 είναι γνωστή ως «ανοχή εντεροτοξίνης» και αντιπροσωπεύει σημαντικό μηχανισμό ανοχής, που προστατεύει τον πεπτικό βλεννογόνο από την ανεξέλεγκτη φλεγμονή που θα προέκυπτε από τον ταχύ μικροβιακό αποικισμό του εντέρου άμεσα μετά τον τοκετό. Η αναστολή της ενδοκυττάριας σηματοδότησης του TLR4 πραγματοποιείται μέσω ποικίλων μηχανισμών που επηρεάζουν την ενεργοποίηση του NF κ B, όπως η μειωμένη έκφραση των μορίων MyD88 και TRAF6 ή η αύξηση των ανασταλτικών μορίων I κ B, A20, Single Immunoglobulin IL-1 Receptor-related molecule (SIGIRR), interleukin 1 receptor associated kinase-M και toll-interacting protein (TOLLIP), με τελικό αποτέλεσμα τη μείωση της σύνθεσης φλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως η IL-8 [106-114].

Ομοίως, φαίνεται ότι σημαντικά ανοσολογικά ελλείμματα υπάρχουν και στον αναπνευστικό βλεννογόνο, αν και τα δεδομένα που αφορούν τους ανθρώπους σπανίζουν λόγω της δυσκολίας ανεύρεσης πειραματικού υλικού προς μελέτη. Σε τραχειακές εκκρίσεις νεογνών δείχθηκε μειωμένη παραγωγή AMPs, όπως η BPI και η HD-2. Επιπρόσθετα, στην αρχή της ζωής οι πληθυσμοί των ανοσιακών κυττάρων του πνεύμονα φαίνεται ότι υπολείπονται σημαντικά. Έτσι, δείχτηκε ότι κατά τη νεογνική περίοδο ξεκινά η μετανάστευση μακροφάγων στους αεραγωγούς, ενώ ο αριθμός των DC είναι σημαντικά μειωμένος και παραμένει σε όλη τη βρεφική ηλικία. Τέλος, υπάρχουν δεδομένα που συνηγορούν για τη μείωση της λειτουργικότητας των κυψελιδικών μακροφάγων μέχρι τον 2^ο τουλάχιστον χρόνο ζωής [111, 115-117].

Πέραν των φραγμών, έχουν αναδειχθεί σημαντικές διαφορές μεταξύ νεογνών και ενηλίκων στα κύτταρα του αίματος που συμμετέχουν στη μη ειδική ανοσιακή απάντηση, τόσο αριθμητικές, όσο και σε επίπεδο λειτουργικότητας. Τα νεογνά έχουν υψηλό αριθμό και ποσοστό (επί του συνόλου των λευκοκυττάρων) πολυμορφοπυρήνων, αλλά μειωμένο αριθμό ηρεμώντων κοκκιοκυττάρων και επακόλουθη αδυναμία κινητοποίησης ικανού αριθμού πολυμορφοπυρήνων σε καταστάσεις stress. Έτσι, συχνά σε συνθήκες γενικευμένης λοίμωξης απελευθερώνονται στην κυκλοφορία άωρες μορφές (ραβδοπύρηννα) και εμφανίζεται ουδετεροπενία. Παράλληλα, τα πολυμορφοπύρηννα των νεογνών παρουσιάζουν μειωμένη λειτουργικότητα, καθώς υπολείπεται η αντίδραση στα χημειοτακτικά ερεθίσματα, η ικανότητα προσκόλλησης στο αγγειακό ενδοθήλιο και κύλισης, η προβολή ψευδοποδίων και τέλος, η ενδοκυττάρια μικροβιοκτονία. Ειδικότερα, η μειωμένη ικανότητα μετανάστευσής τους από την κυκλοφορία στους ιστούς έχει συσχετιστεί με τη μειωμένη έκφραση επιφανειακών μορίων προσκόλλησης, όπως οι b2 ιντεγκρίνες και οι σελεκτίνες. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η ικανότητα φαγοκυττάρωσης βακτηρίων από τα νεογνικά πολυμορφοπύρηννα υπολείπεται, ιδιαίτερα σε συνθήκες υψηλού μικροβιακού φορτίου ή μειωμένης οψωνινοποίησης, ενώ και η φαγοκυττάρωση μυκήτων στη νεογνική ηλικία μειονεκτεί. Έχει επίσης δειχθεί ότι τα πολυμορφοπύρηννα των νεογνών περιέχουν μικρότερα ποσά λακτοφερρίνης (~50% σε σχέση με τους ενήλικες), ελαστάσης και BPI (~30% σε σχέση με τους ενήλικες) και μειονεκτούν στον σχηματισμό εξωκυττάρων παγίδων. Τέλος, και σε επίπεδο TLR απαντήσεων αναφέρεται μειωμένη επιφανειακή έκφραση TLR4, αλλά και μειωμένη ενδοκυττάρια μετάδοση σήματος μέσω του MyD88 μονοπατιού [113, 118-123].

Τα νεογνά παρουσιάζουν επίσης αυξημένο αριθμό κυκλοφορούντων μονοκυττάρων, αλλά μειωμένο αριθμό προγονικών μονοκυττάρων. Χαρακτηριστικές είναι και οι διαφορές στη λειτουργία. Έτσι, τα νεογνικά μονοκύτταρα παρουσιάζουν μειωμένη βασική έκφραση MHC II και συνδιεγερτικών μορίων CD86 & CD40, που συνεπάγεται μειονεκτική αντιγονοπαρουσίαση και αλληλεπίδραση με τα T-λεμφοκύτταρα, αντίστοιχα. Εμφανίζουν ακόμα μειωμένη ικανότητα μετανάστευσης στα σημεία φλεγμονής και φαγοκυττάρωσης, καθώς και μειωμένη ικανότητα διαφοροποίησης σε αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Τέλος, ενώ η βασική έκφραση TLR υποδοχέων στα νεογνικά μονοκύτταρα είναι παρόμοια με των ενηλίκων, η απόκριση στα ερεθίσματα, όπως αυτή καθορίζεται από το προφίλ των παραγόμενων κυτταροκινών, είναι διαφορετική [113, 118, 120-123]. Χαρακτηριστική είναι η μειωμένη παραγωγή TNF-α μετά από TLR1 - 7 διέγερση [124-126].

Αντίστοιχες διαφορές παρουσιάζουν και τα DCs. Σε ό,τι αφορά τον πληθυσμό των DCs, έχει δειχθεί ότι τα νεογνά έχουν αυξημένο αριθμό και αναλογία pDCs σε σχέση με τα mDCs. Πέραν των αριθμητικών διαφορών, έρευνες των τελευταίων ετών έχουν τεκμηριώσει σημαντικές ποιοτικές διαφορές, που έγκεινται στη μειωμένη βασική έκφραση MHC II και συνδιεγερτικών μορίων, στη μειωμένη ικανότητα ενδοκυττάρωσης, τη μειωμένη ικανότητα αλλογενών απαντήσεων και τέλος, στην ελαττωμένη απαντητικότητα στην TLR διέγερση και παραγωγή κυτταροκινών. Χαρακτηριστική είναι η μειωμένη παραγωγή IL-12 μετά TLR/CD40L διέγερση και IFN τύπου I από τα pDCs. Σε επίπεδο κυττάρου, τόσο τα νεογνικά μονοκύτταρα όσο και τα DCs έχουν χαρακτηριστεί ως λιγότερο «πολυλειτουργικά» (polyfunctional) και αυτό σχετίζεται με τη μειωμένη απαντητικότητά τους σε TLR διέγερση και κυρίως την αδυναμία ταυτόχρονης παραγωγής πολλών κυτταροκινών κατόπιν ενός συγκεκριμένου ερεθίσματος [122, 127-129].

Συνολικά, από μελέτες σε μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMCs), DCs ή και ολικό αίμα, η παραγωγή κυτταροκινών στη γέννηση χαρακτηρίζεται από τάση του ανοσοποιητικού συστήματος να ενεργοποιεί Th2, Th17 και Treg τύπου απαντήσεις, ενώ αντίθετα υπολείπονται οι αντι-ικές και οι Th1-υποστηρικτικές απαντήσεις. Συγκεκριμένα, πληθώρα μελετών καταδεικνύει ότι στη νεογνική ηλικία, μετά από TLR διέγερση, παρατηρείται αυξημένη παραγωγή IL-6, IL-23 και IL-10 και μειωμένη παραγωγή IFN τύπου I και TNF-α, IL-12, IFN-γ. Η χαρακτηριστική αυτή απαντητικότητα φαίνεται ότι είναι απαραίτητη κατά την ενδομήτρια ζωή, καθώς προστατεύει το κύημα από έκτρωση, πρόωρο τοκετό και αναστολή ενδομήτριας αύξησης,

καταστάσεις σχετιζόμενες με αυξημένη παραγωγή TNF-α. Στο νεογνό εξυπηρετεί την κάθαρση των μικροβίων και την παραγωγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων στις επιθηλιακές επιφάνειες (IL-6 και άξονας IL-23 & IL-17, αντίστοιχα), αποτρέποντας παράλληλα μία ανεξέλεγκτη φλεγμονώδη αντίδραση κατά τη μετάβαση από το άσηπτο ενδομήτριο περιβάλλον στο τεράστιο αντιγονικό φορτίο του έξω κόσμου (IL-10). Ταυτόχρονα όμως, ευθύνεται για την επιρρέπεια του νεογνού σε λοιμώξεις από ιούς (μειωμένη παραγωγή IFN-α) και ενδοκυττάρια παθογόνα, καθώς και τη μειωμένη απαντητικότητα στα εμβόλια (ανεπαρκής παραγωγή Th1 κυτταροκινών) [118, 120, 122, 123, 128-131]. Τα τελευταία χρόνια έχει δειχθεί ότι στο πλάσμα των νεογνών υπάρχουν περισσότεροι από 50 ανοσοκατασταλτικοί παράγοντες σε υψηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τους ενήλικες, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται οι IL-4, IL-13, TGF-β, αδενοσίνη και prostaglandin E2 (PGE2), οι οποίοι τροποποιούν την απαντητικότητα στην TLR διέγερση. Ειδικά η επίδραση των υψηλών επιπέδων της αδενοσίνης έχει μελετηθεί εκτενώς και φαίνεται πως αυξάνει την ενδοκυττάρια συγκέντρωση του κυκλικού AMP και μέσω του μηχανισμού αυτού αναστέλλει τη σύνθεση Th1 κυτταροκινών όπως οι TNF-α, IFN-γ και IL-12 [132].

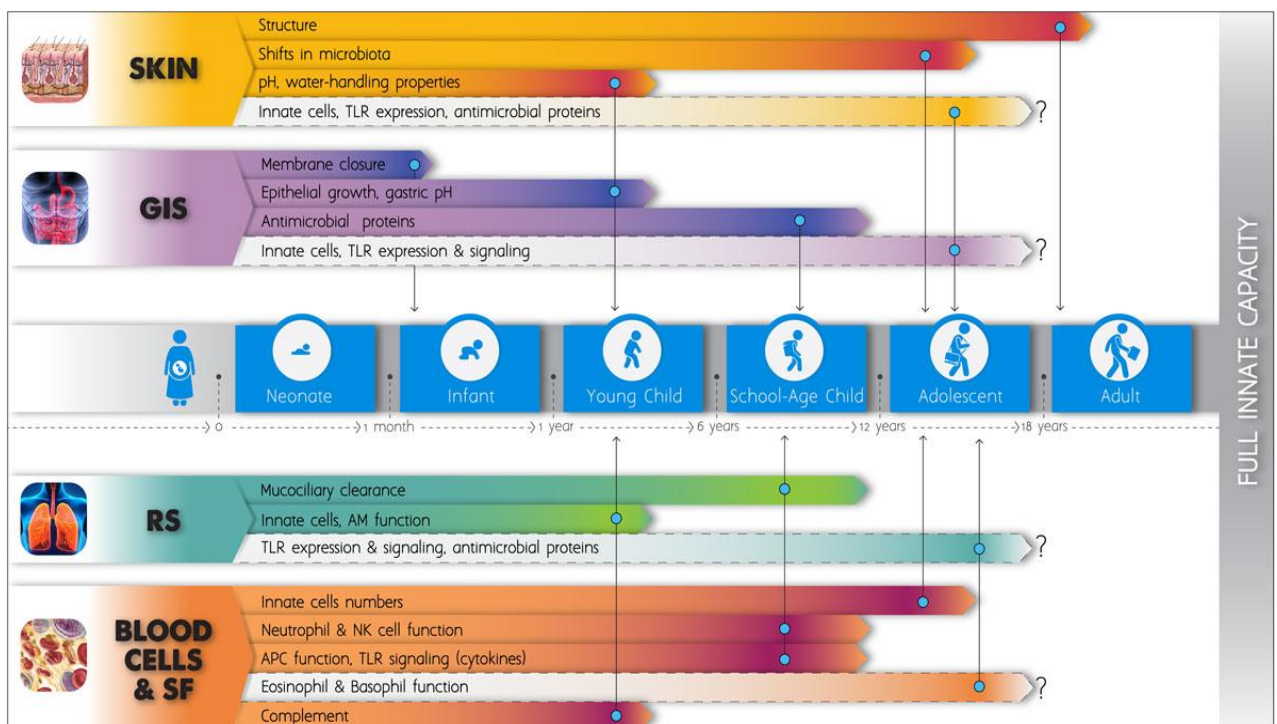
Σημαντικές διαφορές έχουν παρατηρηθεί και σε επίπεδο NK-κυττάρων. Τα νεογνά έχουν υψηλότερο αριθμό NK-κυττάρων σε σχέση με τους ενήλικες, τα οποία όμως μειονεκτούν λειτουργικά. Τα νεογνικά NK-κύτταρα παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση CD57 (δείκτης ωρίμανσης και κυτταροτοξικής ικανότητας), έκφραση μορίων προσκόλλησης L-selectin & ICAM-1 και σύνδεση με κύτταρα-στόχους. Έχουν μειωμένο αριθμό κυτταροπλασματικών κοκκίων και μειωμένη ικανότητα αποκοκκίωσης των πρωτεολυτικών ενζύμων τους. Έχει δειχθεί ότι υπολείπονται τόσο η φυσική όσο και η εξαρτώμενη από αντισώματα κυτταρομεσολαβούμενη κυτταροτοξικότητα, καθώς και η παραγωγή IL-12, IFN-γ και TNF-α. Η μειωμένη αυτή λειτουργικότητα των NK-κυττάρων στην αρχή της ζωής έχει συσχετιστεί με τη διαφορετική έκφραση και αναλογία ενεργοποιητικών και ανασταλτικών υποδοχέων στην επιφάνειά τους, όπως είναι ο KIR και ο NKG2A, αντίστοιχα. Έτσι, ο φαινότυπος KIR-NKG2A+ NK που επικρατεί στη νεογνική ηλικία ευνοεί την παραγωγή κυτταροκινών παρά την κυτταροτοξικότητα, ενώ ο KIR+NKG2A- NK φαινότυπος των ενηλίκων εκφράζει δείκτες που σχετίζονται με την πλήρη λειτουργική ωρίμανση [121, 123, 133-136].

Τέλος, στην ανοσολογική ανωριμότητα των νεογνών, όσον αφορά το σκέλος της φυσικής ανοσίας, συντελεί και η ανεπάρκεια του συστήματος του συμπληρώματος. Στα

νεογνά, τα επίπεδα των διαφόρων πρωτεϊνών του ανιχνεύονται σε ποσοστό 10-80% σε σχέση με αυτά των ενηλίκων. Ειδικά τα επίπεδα του C8 και του C9, ο οποίος είναι απαραίτητος για το σχηματισμό του συμπλέγματος προσβολής της μεμβράνης, είναι σημαντικά μειωμένα. Επίσης, τα επίπεδα της MBL έχουν βρεθεί ιδιαίτερα ελαττωμένα, γεγονός μάλιστα που συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο σήψης κατά τη διάρκεια του πρώτου μήνα ζωής. Τέλος, δοκιμασίες λειτουργικότητας του συμπληρώματος έχουν δείξει μειωμένη ικανότητα οψωνινοποίησης και σχετικά μειωμένη χημειοταξία και λυτική ικανότητα [120, 137-140].

2.2 Δεδομένα για την ωρίμανση της μη ειδικής ανοσίας

Μετά την ανάδειξη των πολυάριθμων ελλειμμάτων που αφορούν τη μη ειδική ανοσία στη νεογνική ηλικία, επόμενο ήταν η σύγχρονη έρευνα να στραφεί στη μελέτη του τρόπου με τον οποίο αυτή ωριμάζει. Τα τελευταία χρόνια σημαντικές μελέτες ανέδειξαν ποικίλες μεταβολές με την ηλικία σχεδόν σε όλα τα επίπεδα της φυσικής ανοσιακής απάντησης, από τους επιθηλιακούς φραγμούς μέχρι και τη λειτουργία των επιμέρους κυττάρων, οι οποίες και θα αναφερθούν στη συνέχεια. Τα έως τώρα βιβλιογραφικά δεδομένα συνοψίζονται σχηματικά στην εικόνα 5.



Εικόνα 5

Σχηματική απεικόνιση της ωρίμανσης της μη ειδικής ανοσίας (από Georgountzou & Paradopoulos [141])

Το μήκος κάθε βέλους υποδεικνύει το χρονικό σημείο, στο οποίο επιτυγχάνεται πλήρης λειτουργική ωρίμανση για κάθε συστατικό της μη ειδικής ανοσίας, σύμφωνα με τα μέχρι τώρα βιβλιογραφικά δεδομένα. Με ξεθωριασμένο χρώμα υποσημαίνονται τα πεδία που δεν έχουν διερευνηθεί επαρκώς. GIS: gastrointestinal system (γαστρεντερικό σύστημα), RS: respiratory system (αναπνευστικό σύστημα), SF: soluble factors (διαλυτοί παράγοντες), TLR: Toll-like receptors, AM: alveolar macrophages (κυψελιδικά μακροφάγα), NK: natural killer (φυσικοί φονείς), APCs: antigen-presenting cells (αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα).

2.2.1 Ωρίμανση των επιθηλιακών φραγμών

2.2.1.1 Δέρμα

Σε ό,τι αφορά το φραγμό του δέρματος, σημαντικές δομικές και λειτουργικές μεταβολές συμβαίνουν καθόλη τη διάρκεια των πρώτων ετών ζωής. Καταρχάς, το πάχος της επιδερμίδας φαίνεται ότι αυξάνεται προοδευτικά από τη γέννηση έως την ενηλικίωση και μάλιστα, με χρήση υπερήχων, δείχθηκε γραμμική αύξηση του πάχους του δέρματος με την ηλικία σε άτομα 1-20 ετών. Έχει επίσης βρεθεί ότι τα παιδιά τουλάχιστον μέχρι την ηλικία των 2 ετών έχουν μικρότερα κερατινοκύτταρα από τους ενήλικες και η κερατίνη στοιβάδα παραμένει έως και 30% λεπτότερη. Οι άρρνες τελικά αναπτύσσουν παχύτερη επιδερμίδα και χόριο σε σχέση με τα θήλεα. Η πυκνότητα ινών κολλαγόνου στο άνω μέρος του δέρματος επίσης αυξάνεται μέχρι την ηλικία των 30-40 ετών και στη συνέχεια αρχίζει να μειώνεται, ενώ η πυκνότητα των ελαστικών ινών αυξάνεται κατά την πρώτη δεκαετία, στη συνέχεια παροδικά μειώνεται, πριν φτάσει στα μέγιστα επίπεδά της με την ενηλικίωση.

Μεταβολές παρατηρούνται και στην περιεκτικότητα του δέρματος σε νερό. Το νεογνικό δέρμα είναι ξηρό και σχετικά τραχύ, αλλά η ενυδάτωση αυξάνεται προοδευτικά και υπερβαίνει μάλιστα το επίπεδο ενυδάτωσης των ενηλίκων κατά τα πρώτα 2 χρόνια ζωής. Η διαδερμική απώλεια ύδατος (Transepidermal Water Loss, TEWL) περιγράφει την ποσότητα απώλειας νερού μέσω της επιδερμίδας με εξάτμιση και είναι μία από τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της ποιότητας της λειτουργίας του

φραγμού του δέρματος. Υπάρχουν αποκλίσεις μεταξύ των μελετών που συγκρίνουν τα ποσοστά TEWL σε βρέφη, παιδιά και ενήλικες. Έτσι, σε κάποιες μελέτες σε βρέφη βρέθηκαν τιμές TEWL συγκρίσιμες με τα επίπεδα των ενηλίκων σε ανατομικές θέσεις όπως το στήθος, η πλάτη και η κοιλιά, ενώ σε άλλα σημεία (όπως ο βραχίονας, το αντιβράχιο, οι μηροί και οι γλουτοί) παρατηρήθηκαν μεγάλες διαφορές. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε ποικίλους παράγοντες που είναι γνωστό ότι επηρεάζουν την TEWL, όπως η τοπική αιμοδυναμική και η περιεκτικότητα της κερατίνης σε λιπίδια. Ωστόσο, η μεγάλη μεταβλητότητα μεταξύ των διάφορων ανατομικών θέσεων μπορεί να είναι ενδεικτική ενός ανώριμου φραγμού που αναπτύσσεται με διαφορετικό ρυθμό στα διάφορα σημεία κατά τη βρεφική ηλικία.

Όπως προαναφέρθηκε, τα νεογνά έχουν λιγότερο όξινο σε σχέση με τους ενήλικες pH δέρματος. Κατά τη διάρκεια της νεογνικής περιόδου, το pH της επιδερμίδας μειώνεται και μάλιστα, σημαντικές μεταβολές εμφανίζονται τις πρώτες 1-4 ημέρες μετά τον τοκετό. Στη συνέχεια, το pH συνεχίζει να μειώνεται κατά τους πρώτους 3 μήνες ζωής, παραμένοντας όμως και πάλι υψηλότερο σε σύγκριση με των ενηλίκων. Τα παρατηρούμενα επίπεδα pH στη βρεφική ηλικία διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των μελετών, ανάλογα με την ηλικία και την ανατομική περιοχή. Συνεπώς, η ηλικία κατά την οποία τα επίπεδα pH σταθεροποιούνται και γίνονται παρόμοια με αυτά των ενηλίκων δεν έχει ομόφωνα προσδιοριστεί [9, 105, 142-148].

Δεδομένα σχετικά με τη λειτουργική ωρίμανση των κυττάρων του δέρματος που συμμετέχουν στη φυσική ανοσιακή απάντηση, καθώς και τις αριθμητικές μεταβολές των κυτταρικών πληθυσμών σπανίζουν. Μία μελέτη έδειξε αυξημένη έκφραση TLR1 & 3 σε παιδιά ηλικίας 3-10 μηνών και 5-12 ετών σε σχέση με τους ενήλικες και αντίθετα, μειωμένη έκφραση του TLR6 [149]. Σε επίπεδο παραγωγής κυτταροκινών, υπάρχουν δεδομένα για τη νεογνική ηλικία, καθώς και την προοδευτική μείωση ιντερφερόνης τύπου I στη μεγάλη ηλικία, αλλά έως τώρα δεν έχουν μελετηθεί οι μεταβολές που ενδεχομένως εμφανίζονται από τη γέννηση μέχρι την ενηλικίωση. Ομοίως απουσιάζουν δεδομένα για τη σύνθεση των AMPs.

Η συμβιωτική μικροχλωρίδα του δέρματος συμβάλλει, όπως προαναφέρθηκε, στη μη ειδική άμυνα του οργανισμού και πρόσφατα αποκαλύφθηκε ότι αυτή διαφοροποιείται σημαντικά στην αρχή της ζωής. Καταρχάς, το είδος του τοκετού καθορίζει τον αρχικό αποικισμό του δέρματος του νεογνού. Τα παιδιά που γεννιούνται με φυσιολογικό τοκετό αποικίζονται με μικρόβια του κόλπου της μητέρας (*Lactobacilli*, *Streptococci*), ενώ αυτά που

γεννιούνται με καισαρική τομή αποικίζονται με μικρόβια που επικρατούν στην επιφάνεια του μητρικού δέρματος (*Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium spp*). Από κει και έπειτα ξεκινά, εντός του πρώτου τριμήνου και για όλο τον πρώτο χρόνο ζωής, μία μεταβολή της χλωρίδας, με προοδευτική αύξηση του αριθμού των ειδών και επικράτηση συγκεκριμένων ειδών σε κάθε σημείο του σώματος. Σημαντικές αλλαγές συμβαίνουν και αργότερα, ιδίως κατά την περίοδο της εφηβείας, υπό την επίδραση των ορμονών του φύλου [150-152].

2.2.1.2 Πεπτικός βλεννογόνος

Η ωρίμανση του φραγμού του πεπτικού συστήματος πραγματοποιείται υπό την επίδραση της σίτισης και του αποικισμού του εντέρου από τη μικροβιακή χλωρίδα. Καταρχάς άμεσα, εντός 7 ημερών από τη γέννηση, παρατηρείται μείωση της διαπερατότητας του εντέρου, διαδικασία που ενισχύεται από το πύαρ και τον αποικισμό από *Lactobacilli* και *Bifidobacteria* και ενορχηστρώνεται από μία πλειάδα ρυθμιστικών παραγόντων. Μάλιστα, σε απουσία σίτισης με πρωτόγαλα φαίνεται ότι η σύγκλειση του επιθηλιακού φραγμού καθυστερεί και η παρατεινόμενη περίοδος αυξημένης εντερικής διαπερατότητας έχει συνδεθεί με αυξημένη επίπτωση λοιμώξεων και τροφικής αλλεργίας στα μη θηλάζοντα νεογνά [153-155]. Προοδευτική μείωση της διαπερατότητας παρατηρείται και στο ανώτερο πεπτικό, αλλά συντελείται με βραδύτερο ρυθμό, κατά τους πρώτους 2 μήνες ζωής [107]. Κατά τη διάρκεια του πρώτου εξαμήνου παρατηρείται σημαντική εξέλιξη της αρχιτεκτονικής του εντέρου, με εμφάνιση υποεπιθηλιακών πτυχών, προοδευτική αύξηση του βάθους των κρυπτών, του αριθμού και του πάχους των λαχνών, ενώ περαιτέρω επίταση της ωρίμανσης παρατηρείται με τον απογαλακτισμό και την εισαγωγή στερεών τροφών στο διαιτολόγιο του βρέφους [156].

Μεταβολές έχουν διαπιστωθεί και στη σύνθεση αντιμικροβιακών πρωτεϊνών στο γαστρεντερικό σύστημα, η οποία φαίνεται να αυξάνεται με την πρόοδο της ηλικίας. Ειδικότερα, κάποιες μελέτες έδειξαν παροδική μείωση μετά τη γέννηση των συγκεντρώσεων της αμυλάσης, λυσοζύμης και λακτοφερρίνης του σιέλου, με επακόλουθη αύξηση από το 2^ο- 4^ο μήνα στις μέγιστες τιμές τους και μετά μικρή μείωση και σταθεροποίησή τους περί τον 6^ο μήνα ζωής. Αντιθέτως, άλλοι βρήκαν προοδευτική αύξηση της αμυλάσης σιέλου από τη γέννηση μέχρι την ενηλικίωση και η σημαντικότερη αύξηση

αφορούσε τη νηπιακή ηλικία. Πρόσφατα μία μελέτη έδειξε θετική συσχέτιση με την ηλικία της συγκέντρωσης της LL-37 στο σίελο παιδιών ηλικίας 2-18 ετών, ενώ μία δεύτερη είχε αντίστοιχα ευρήματα για την παραγωγή καλπροτεκτίνης και Human Neutrophil Peptides (HNPs) 1-3 του σιέλου σε παιδιά ηλικίας 1-3 ετών [106, 157-160]. Στο έντερο, έχει επίσης διαπιστωθεί αύξηση της παραγωγής λυσοζύμης, λακτοφερρίνης και LL-37 κατά τη νεογνική περίοδο [111, 161]. Γενικά, η αύξηση της έκκρισης των AMPs κατά τη διάρκεια της νεογνικής περιόδου αποδίδεται στην αύξηση του αριθμού των κυττάρων που τα παράγουν, αλλά και στην επαγωγή των υπεύθυνων γονιδίων από συστατικά τροφίμων ή από τα μικρόβια της μικροχλωρίδας του εντέρου. Παρά το γεγονός ότι δεν υπάρχουν ενδεδειγμένες πληροφορίες για την παραγωγή όλων των αντιμικροβιακών ουσιών στις διάφορες ηλικίες, οι μελετητές θεωρούν ότι υπάρχουν σημαντικές μεταβολές στη σύνθεση των AMP τουλάχιστον κατά τα πρώτα 2 χρόνια ζωής, καθώς στην περίοδο αυτή η εντερική επιθηλιακή ανάπτυξη είναι έντονη και επιτελείται η μετάβαση προς μία βακτηριακή μικροχλωρίδα παρόμοια με του ενήλικα [111]. Αντίθετα με τις περισσότερες AMPs που παρουσιάζουν τάση αύξησης με την ηλικία, η καλπροτεκτίνη του εντέρου είναι ιδιαίτερα αυξημένη τις πρώτες ημέρες ζωής και στη συνέχεια σταδιακά μειώνεται για να σταθεροποιηθεί σε επίπεδα ενήλικα περί τον 4^ο χρόνο ζωής [162-164].

Όπως προαναφέρθηκε, το pH του στομάχου είναι λιγότερο όξινο στα νεογνά και οι μελέτες δείχνουν ότι η παραγωγή υδροχλωρικού οξέος αυξάνεται προοδευτικά και πλησιάζει τα επίπεδα του ενήλικα μετά τον 1^ο χρόνο ζωής [165].

Όσον αφορά τα ανοσοϊκανά κύτταρα του πεπτικού βλεννογόνου, ο αριθμός των κυττάρων Paneth φαίνεται ότι αυξάνει στο έντερο μέχρι την ενηλικίωση, ενώ μετά τη γέννηση αυξάνεται και ο πληθυσμός των DC, παράλληλα με την αύξηση των λεμφικών ιστών [106, 110, 166]. Σχετικά με την αναγνώριση και ενεργοποίηση της μη ειδικής ανοσίας, πέραν των άμεσων μετά τη γέννηση προσαρμοστικών μηχανισμών, που αφορούν στην καταστολή της έκφρασης και την εξασθένιση της ενδοκυττάριας μετάδοσης του σήματος του TLR4, λίγα είναι γνωστά. Πρόσφατα, δείχθηκε ότι η έκφραση του TLR3 στο εντερικό επιθήλιο αυξάνεται σημαντικά μετά τον 5^ο χρόνο ζωής, γεγονός που μάλιστα συνοδεύεται από αύξηση της αντίστασης του οργανισμού σε λοίμωξη από ροταϊό [112].

2.2.1.3 Αναπνευστικός βλεννογόνος

Σχετικά λίγα είναι και τα δεδομένα που αφορούν την ωρίμανση του αναπνευστικού βλεννογόνου. Ο πολλαπλασιασμός των κυψελίδων και η ωρίμανση του τριχοειδικού δικτύου ολοκληρώνεται στον άνθρωπο περί το 2^ο χρόνο ζωής [167]. Η βλεννοκροσσωτή κάθαρση έχει μελετηθεί από κάποιους ερευνητές με το τεστ σακχαρίνης και διαπιστώθηκε ελαττωμένη σε παιδιά διαφόρων ηλικιών, κυρίως όμως προσχολικής ηλικίας. Παρόλα αυτά δεν υπάρχει ομοφωνία, καθώς σε μελέτες που χρησιμοποίησαν εναλλακτικές μεθόδους για την αξιολόγηση του βλεννοκροσσωτού μηχανισμού, όπως ραδιοϊσότοπα ή φωτομετρία σε κυτταροκαλλιέργειες υλικού βιοψίας, δε διαπιστώθηκε μεταβολή με την ηλικία [168-170].

Η μελέτη των αλλαγών στο αναπνευστικό επιθήλιο σε κυτταρικό επίπεδο ανά ηλικία καθώς και η επίδραση σε αυτή τη διαδικασία περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως οι λοιμώξεις, παρουσιάζει τεράστιο ερευνητικό ενδιαφέρον τελευταία, όμως υπάρχει δυσκολία λήψης υλικού προς μελέτη, ιδίως από υγιή παιδιά και ως εκ τούτου, περιορισμένα δεδομένα. Παρόλα αυτά, κάποιες μελέτες έχουν συνεισφέρει πολύτιμα δεδομένα για την παρουσία και τη λειτουργία διαφόρων κυττάρων στο αναπτυσσόμενο αναπνευστικό επιθήλιο. Φαίνεται λοιπόν ότι τα κύτταρα που συμμετέχουν στη φυσική ανοσία αποικίζουν τους αεραγωγούς στην αρχή της ζωής, με σημαντικές μεταβολές εντός των πρώτων 2 ετών, ενώ το προφίλ των λευκοκυττάρων του πνεύμονα δε μεταβάλλεται σημαντικά μετά τον 3^ο χρόνο ζωής [171]. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε απουσία HLA-DR μορίων στο αναπνευστικό επιθήλιο εμβρύων και σημαντική αύξηση της έκφρασής τους μεταξύ 1^{ης} και 2^{ης} εβδομάδας ζωής, γεγονός που αποδόθηκε στην εγκατάσταση μακροφάγων [117]. Επιπλέον, διάφορες ομάδες μελέτησαν την παρουσία ώριμων DC στο αναπνευστικό επιθήλιο κατά τη διάρκεια της πρώιμης παιδικής ηλικίας. Παλαιότερες μελέτες σε υλικό αυτοψίας (ιστών διατηρημένων σε παραφίνη) από βρέφη που είχαν πεθάνει από σύνδρομο αιφνίδιου θανάτου, τραύμα ή λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος και μεγαλύτερα άτομα (παιδιά και ενήλικες) είχαν δείξει ότι τα DCs εμφανίζονται στον ανθρώπινο τραχειοβρογχικό βλεννογόνο κατά το πρώτο έτος της ζωής και ότι η εισροή τους συμβαίνει σταδιακά, προκαλούμενη από λοιμογόνους παράγοντες. Ωστόσο, πιο πρόσφατες μελέτες σε άτομα με ή χωρίς αναπνευστική νόσο αποκάλυψαν ότι τα DCs είναι παρόντα στον βλεννογόνο της τραχείας και στην πρώιμη βρεφική ηλικία, αν και σημαντικά λιγότερα σε σύγκριση με μεγαλύτερα άτομα. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε μία από

τις μελέτες ο συνολικός αριθμός των HLA-DR+ κυττάρων, μεταξύ των οποίων περίπου 50% ήταν CD68+ μακροφάγα και τα υπόλοιπα διάφορα υποσύνολα DCs, αυξήθηκε σημαντικά μεταξύ του 4^{ου} και 23^{ου} μήνα ζωής [116, 172, 173]. Βέβαια, υπάρχουν και αναφορές για αυξημένους αριθμούς λευκοκυττάρων της φυσικής ανοσίας, όπως μακροφάγων και πολυμορφοπυρήνων στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα παιδιών <3 ετών σε σχέση με μεγαλύτερα παιδιά ή ενήλικες [115, 174]. Πέραν της νηπιακής ηλικίας, μικρές διαφοροποιήσεις παρατηρούνται στους κυτταρικούς πληθυσμούς του πνεύμονα. Έτσι, σε μελέτες με ηλικιακό εύρος από τα 3 έως και τα 14 έτη, δε βρέθηκαν διαφορές ούτε στο συνολικό αριθμό ούτε και τους επιμέρους υποπληθυσμούς των λευκοκυττάρων του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος. Επιπλέον, κάποιιοι μελέτησαν ειδικά την πυκνότητα και την κατανομή των APCs (CD68+ μακροφάγων και CD11c+ mDCs) στους αεραγωγούς παιδιών >2 ετών και διαπίστωσαν ότι δε διαφοροποιείται σημαντικά σε σχέση με τους ενήλικες [175-177]. Μόνο μία ομάδα έχει έως τώρα μελετήσει τη λειτουργία των κυψελιδικών μακροφάγων κατά την παιδική ηλικία. Φαίνεται λοιπόν, ότι τουλάχιστον μέχρι την ηλικία των 2 ετών η λειτουργικότητά τους είναι σημαντικά περιορισμένη, καθώς υπολείπεται η έκφραση HLA-DR μορίων, η ενδοκυττάρια μικροβιοκτονία είναι ελαττωμένη και η παραγωγή IL-1 και TNF-α μετά TLR4 διέγερση μειωμένη σε σχέση με τους ενήλικες [115].

2.2.2 Μεταβολές των πληθυσμών και της λειτουργίας των κυττάρων της μη ειδικής ανοσίας

2.2.2.1 Ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηνα

Οι μεταβολές του αριθμού των ουδετεροφίλων έχουν μελετηθεί επαρκώς από τη γέννηση μέχρι την ενηλικίωση. Έτσι, είναι γνωστό ότι αριθμός των ουδετεροφίλων κορυφώνεται 12 ώρες μετά τη γέννηση, στη συνέχεια μειώνεται και παραμένει σταθερός από την 5^η μέρα ζωής για όλη τη νεογνική περίοδο. Ακολούθως, κατά τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας, καθώς τα λεμφοκύτταρα κυριαρχούν σε ποσοστό, οι αριθμοί των ουδετεροφίλων μειώνονται σχετικά και αυξάνονται πάλι στην εφηβεία. Εντούτοις, οι μεταβολές των μέσων τιμών μεταξύ των ηλικιακών υποομάδων της παιδικής ηλικίας είναι λιγότερο σημαντικές από αυτές που παρατηρούνται στις πρώτες ημέρες ζωής [178, 179]. Όσον αφορά τη λειτουργική ωρίμανση των ουδετεροφίλων δεν υπάρχει ομοφωνία μεταξύ

των μελετών. Σχετικά με τη χημειοταξία, αρκετοί ερευνητές διαπίστωσαν ότι η ωρίμανση της σε επίπεδα ενήλικα επιτεύχθηκε ταχέως, από τη 2^η έως την 4^η εβδομάδα ζωής [180, 181], ενώ άλλοι βρήκαν ότι υπολείπεται ακόμα σημαντικά στην ηλικία των 6 ή των 12 μηνών [182, 183], των 2-5 ετών [184], ή ακόμα και στους εφήβους σε σύγκριση με τους ενήλικες [185]. Πιο πρόσφατα, μελετήθηκε η έκφραση σημαντικών μορίων προσκόλλησης στις διάφορες ηλικίες. Η έκφραση της ιντεγκρίνης Mac-1 βρέθηκε κατά 50% μειωμένη σε βρέφη ηλικίας 1-2 μηνών, ενώ στη συνέχεια αυξήθηκε σταθερά για να φθάσει στα επίπεδα των ενηλίκων έως το τέλος του πρώτου χρόνου ζωής [186]. Αντίθετα, η έκφραση της L-σελεκτίνης στα ουδετερόφιλα φαίνεται να ομαλοποιείται σε επίπεδα ενήλικα ταχύτερα, εντός μίας έως τεσσάρων εβδομάδων από τη γέννηση [187, 188]. Η φαγοκυττάρωση μυκήτων από τα ουδετερόφιλα αξιολογήθηκε με μια τεχνική που χρησιμοποιεί το μύκητα *S. Cerevisiae* και φαίνεται ότι προσεγγίζει τα φυσιολογικά επίπεδα ενηλίκων γύρω στο πρώτο έτος της ζωής [189].

2.2.2.2 Μονοκύτταρα - Μακροφάγα & Δενδριτικά κύτταρα

Τα νεογνά έχουν περισσότερα μονοκύτταρα από τους ενήλικες και μάλιστα, κατά τη διάρκεια του πρώτου μήνα της ζωής, παρατηρείται αύξηση του μέσου ποσοστού μονοκυττάρων (μέχρι 9%) επί του συνολικού αριθμού των λευκοκυττάρων. Ακολούθως, ο αριθμός τους ελαττώνεται ελαφρώς και φτάνει στα επίπεδα του ενήλικα μεταξύ 3^{ου}- 5^{ου} μήνα ζωής ή, κατ' άλλους, σε κάποια μεταγενέστερη χρονική στιγμή κατά τη διάρκεια της πρώιμης παιδικής ηλικίας, χωρίς αξιόλογες μεταβολές στη συνέχεια [179, 190, 191]. Η ωρίμανση της χημειοτακτικής ικανότητας των μονοκυττάρων έχει αξιολογηθεί από διάφορες μελέτες και φαίνεται ότι ολοκληρώνεται κατά τη σχολική ηλικία, δεδομένου ότι υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν μειονεκτική χημειοταξία έως την ηλικία των 5 ή 6 ετών ή ακόμα και μέχρι την ηλικία των 10 ετών. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι διαφορές μεταξύ ενηλίκων και παιδιών είναι περισσότερο εκσεσημασμένες πριν από την ηλικία των 12 μηνών [184, 192]. Έχει επίσης μελετηθεί η έκφραση των υποδοχέων προσκόλλησης LFA-1 και LFA-2 (CD2) σε μονοκύτταρα από αίμα ομφάλιου λώρου, παιδιών και ενηλίκων και βρέθηκε ότι αυξάνεται σε επίπεδα ενήλικα μετά την ηλικία των 6 μηνών [193]. Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί φαινοτυπική ωρίμανση των μονοκυττάρων με την ηλικία. Πρόσφατα, οι Nguyen et al αξιολόγησαν την επιφανειακή έκφραση των μορίων CD80 και HLA-DR, τα

οποία είναι σημαντικά για την ανοσολογική αλληλεπίδραση με T-λεμφοκύτταρα. Η έκφραση του CD80 μετά από διέγερση των TLR4 & 9 έφτασε τα επίπεδα των ενηλίκων κατά την ηλικία του τρίτου μήνα, ενώ η έκφραση του HLA-DR εξομοιώθηκε με αυτή των ενηλίκων μετά τον 6^ο μήνα ζωής [194]. Η ωρίμανση της φαγοκυτταρικής ικανότητας δεν έχει μελετηθεί επαρκώς στα μονοκύτταρα έως τώρα.

Αρκετές μελέτες της τελευταίας δεκαετίας αφορούν τις αριθμητικές και λειτουργικές μεταβολές των DCs με την ηλικία, αν και περιλαμβάνουν περιορισμένο αριθμό ατόμων. Σε μία πρόσφατη μελέτη ο συνολικός αριθμός των DC παρουσίασε μια αντίστροφη συσχέτιση με την ηλικία κατά τη μετάβαση από την παιδική ηλικία στην ενήλικη ζωή, όπως και οι απόλυτοι αριθμοί κυκλοφορούντων mDCs και pDCs [195]. Μεταξύ των ερευνών που επικεντρώνονται στην παιδική ηλικία υπάρχουν σημαντικές αποκλίσεις, που πιθανώς σχετίζονται με τη χρήση διαφορετικών ηλικιακών ομάδων και συνδυασμών δεικτών για την ταυτοποίηση των DCs και των υποπληθυσμών τους. Πάντως, σύμφωνα με τους περισσότερους ερευνητές φαίνεται ότι τα pDCs, που αρχικά είναι αυξημένα και ξεπερνούν σε αριθμό τα mDCs, μειώνονται σημαντικά με την ηλικία, έτσι ώστε η αναλογία pDC:mDC να αντιστρέφεται και τελικά, περί το 10^ο έτος να σταθεροποιείται σε επίπεδα 1:2, όπως στον ενήλικα [196-198]. Φαινοτυπική ωρίμανση, σχετιζόμενη με την έκφραση HLA-DR και συνδιεγερτικών μορίων έχει διαπιστωθεί και στα DCs, όπως και στα μονοκύτταρα. Κατόπιν TLR4 & 9 διέγερσης, βρέθηκε ότι τα mDCs παρουσιάζουν επίπεδα έκφρασης HLA-DR και CD80 όμοια με του ενήλικα από τον 3^ο μήνα ζωής, ενώ τα pDCs από τον 6^ο-9^ο μήνα [194]. Η λειτουργική ωρίμανση πάντως τόσο των DCs όσο και των μονοκυττάρων αποτυπώνεται στις μελέτες που, κατά την τελευταία δεκαετία, αποκάλυψαν πώς διαφοροποιείται η απαντητικότητά τους μετά από TLR διέγερση, με την πρόοδο της ηλικίας και παρά το γεγονός ότι η επιφανειακή έκφραση των TLRs στα κύτταρα του αίματος δε φαίνεται να αλλάζει. Οι μεταβολές στην TLR απαντητικότητα αντικατοπτρίζονται στο είδος και τα επίπεδα των παραγόμενων κυτταροκινών και θα αναφερθούν με λεπτομέρεια στη συνέχεια.

2.2.2.3 Κύτταρα «φυσικοί φονείς» (Natural Killer Cells)

Ο αριθμός των NK-κυττάρων μετά τη νεογνική περίοδο ελαττώνεται προοδευτικά σε όλη τη βρεφική και την πρώιμη παιδική ηλικία και σταθεροποιείται σε επίπεδα ενηλίκων

γύρω στον 5^ο χρόνο ζωής. Όσον αφορά τους επιμέρους υποπληθυσμούς τους, CD56bright και CD56dim, οι μελέτες έχουν δείξει ότι δε μεταβάλλονται ιδιαίτερα, με εξαίρεση μία ελαφρά υπεροχή των CD56bright στη νεογνική περίοδο. Σημειωτέον, τα CD56bright είναι λιγότερο κυτταροτοξικά σε σύγκριση με τα CD56dim, αλλά εκκρίνουν αποτελεσματικά κυτταροκίνες όπως οι IFN-γ και TNF-α [133, 199].

Σε επίπεδο λειτουργικής ωρίμανσης, όταν αξιολογήθηκε η κυτταροτοξικότητα των NK-κυττάρων έναντι των κυττάρων K562 κατά την παιδική ηλικία, βρέθηκε εξαιρετικά χαμηλή κατά τη νεογνική περίοδο, αλλά αυξήθηκε ταχέως μεταξύ 1^{ου} και 5^{ου} μήνα ζωής σε επίπεδα σχεδόν παρόμοια με του ενήλικα. Όπως προαναφέρθηκε, οι αποκρίσεις των NK-κυττάρων προσδιορίζονται από την ισορροπία μεταξύ ενεργοποιητικών και ανασταλτικών σημάτων από τους αντίστοιχους υποδοχείς επιφάνειας και αρκετές φαινοτυπικές μεταβολές όσον αφορά την έκφραση αυτών των υποδοχέων έχουν αναφερθεί κατά τα πρώτα έτη ζωής. Έτσι, η έκφραση του ανασταλτικού υποδοχέα NKG2A μειώνεται προοδευτικά από τη γέννηση μέχρι τη 2^η δεκαετία της ζωής, με παράλληλη αύξηση της έκφρασης του ενεργοποιητικού υποδοχέα KIR την 1^η δεκαετία ζωής και ιδίως κατά τα πρώτα δύο χρόνια ζωής. Οι προαναφερθείσες αλλαγές κατά τη διάρκεια των δύο πρώτων δεκαετιών της ζωής συσχετίζονται με την τελική διαφοροποίηση των NK-κυττάρων, που συνεπάγεται τη μείωση της ικανότητας πολλαπλασιασμού, τη βέλτιστη απόκριση στις κυτταροκίνες και την αυξημένη έκφραση δεικτών ενεργοποίησης που σχετίζονται με την ωριμότητα [199-202]. Σε αντίθεση με τα παραπάνω, κάποιοι ερευνητές διαπίστωσαν ότι τα NK-κύτταρα του αίματος ομφάλιου λώρου παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση του ανασταλτικού υποδοχέα Leukocyte Immunoglobulin-like Receptor 1 (LIR-1) και βρήκαν ότι η έκφρασή του αυξάνεται στα επίπεδα των ενηλίκων περίπου στην ηλικία των πέντε ετών. Επίσης, δείχτηκε ότι οι ενεργοποιητικοί υποδοχείς NKG2D, NKp30 and NKp46 παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση στη νεογνική σε σχέση με την παιδική ηλικία. Ενδεχομένως, οι υποδοχείς αυτοί να επιτρέπουν την εμπλοκή των NK-κυττάρων στις ανοσιακές απαντήσεις στην αρχή της ζωής, παρά τη λειτουργική τους ανωριμότητα [203].

2.2.2.4 Ηωσινόφιλα, Βασεόφιλα & Σιτευτικά κύτταρα

Οι αριθμοί των ηωσινοφίλων και βασεοφίλων είναι σχετικά αυξημένοι στην αρχή της ζωής και στη συνέχεια παρουσιάζουν μικρή μείωση μέχρι την ενηλικίωση. Όσον αφορά τη

λειτουργία τους, για τα ηωσινόφιλα έχει δειχθεί μείωση με την αυξανόμενη ηλικία της ικανότητας αποκοκκίωσης σε απάντηση στην IL-5 στους ενήλικες, όμως δεν υπάρχουν έως τώρα δεδομένα για την παιδική ηλικία. Ομοίως, δεν έχει μελετηθεί μέχρι σήμερα η λειτουργική ωρίμανση των βασεοφίλων [179, 190, 204, 205].

2.2.3 Ωρίμανση της βιοσύνθεσης διαλυτών ουσιών

2.2.3.1 Πρωτεΐνες πλάσματος - Συμπλήρωμα

Οι σχετιζόμενες με την ηλικία μεταβολές στις συγκεντρώσεις των συστατικών του συμπληρώματος έχουν ήδη μελετηθεί από τη δεκαετία του '70. Ειδικά τα επίπεδα των C3 και C4 στον ορό έχουν αξιολογηθεί από πολλές ομάδες και φαίνεται ότι φθάνουν σε επίπεδα ενηλίκων εντός 3-6 μηνών από τη γέννηση. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί για τις πρωτεΐνες C2, C6 και τον παράγοντα Β. Σχετικά με το C5 κάποιιο παρατήρησαν αύξηση, ενώ άλλοι ερευνητές έδειξαν προοδευτική μείωση με την ηλικία [206-209]. Τα επίπεδα της MBL φαίνεται ότι αυξάνονται ταχέως κατά τις πρώτες ημέρες ή μήνες της ζωής, αλλά η ηλικία στην οποία σταθεροποιούνται ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των μελετών, από τον 3^ο μήνα έως την εφηβική ηλικία [210-212]. Τα επίπεδα του C1q και της προπεριδίνης φαίνεται να φθάνουν στα επίπεδα των ενηλίκων μετά το πρώτο έτος της ζωής, περίπου μεταξύ 18-21 μηνών [208, 213]. Έχει αναφερθεί ότι η συγκέντρωση του CH50 ευρίσκεται στα επίπεδα των ενηλίκων από τον 6^ο μήνα και μελέτες που καλύπτουν ευρύτερο ηλικιακό φάσμα δεν έδειξαν σημαντικές μεταβολές από τη γέννηση ή τη νηπιακή ηλικία έως την εφηβεία [207, 209, 214]. Αξίζει να σημειωθεί ότι η μέτρηση των επιμέρους συστατικών του συμπληρώματος στις διάφορες ηλικίες δεν αρκεί για την πλήρη αξιολόγηση της ωρίμανσής του ως αμυντικού μηχανισμού. Παρόλα αυτά, μας επιτρέπει να προσεγγίσουμε εμμέσως τη διαδικασία της λειτουργικής ωρίμανσης, δεδομένου ότι η σύνθεση των πρωτεϊνών του συμπληρώματος φαίνεται να συμβαδίζει με την αιμολυτική ικανότητα. Τέλος, πιο πρόσφατα, αξιολογήθηκε η παραγωγή ορισμένων ρυθμιστικών πρωτεϊνών του συστήματος του συμπληρώματος, όπως ο παράγοντας Η (fH), ο παράγοντας Ι (fI), η πρωτεΐνη C4b και η βιτρονεκτίνη (επίσης γνωστή ως πρωτεΐνη S) και διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα των fH και fI αυξήθηκαν σε επίπεδα ενηλίκων κατά τον 1^ο χρόνο ζωής. Για την C4b, δειχθηκε σημαντική αύξηση της παραγωγής της μεταξύ 6 έως 13 ετών, όμως και

πάλι οι τιμές παρέμειναν χαμηλότερες συγκρινόμενες με τους ενήλικες. Η σύνθεση βιτρονεκτίνης φαίνεται ότι αυξάνεται σημαντικά κατά τη βρεφική ηλικία, παραμένει σχετικά σταθερή μέχρι και το τέλος της σχολικής ηλικίας και παρουσιάζει εκ νέου αύξηση στην εφηβεία σε επίπεδα ενηλίκων [213].

2.2.3.2 Κυτταροκίνες

Οι μεταβολές με την πρόοδο της ηλικίας στην απαντητικότητα των TLR υποδοχέων, όπως αυτές αποτυπώνονται από τις αλλαγές στις παραγόμενες κυτταροκίνες, έχουν τελευταία απασχολήσει πολλούς ερευνητές και έχουν προσδώσει νέο ενδιαφέρον στη μελέτη της ωρίμανσης της μη ειδικής ανοσίας. Από τα δεδομένα που έχουν προκύψει την τελευταία δεκαετία φαίνεται ότι η μη ειδική ανοσία δεν ακολουθεί ένα συνολικό γραμμικό αναπτυξιακό πρότυπο, αλλά οι απαντήσεις της διαφέρουν ανάλογα με την ηλικία και το (TLR) ερέθισμα, η δε εξέλιξη στο χρόνο της απαντητικότητας για κάθε ένα TLR μονοπάτι μπορεί να επηρεάζεται από γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Χαρακτηριστικά, οι Smolen et al σε μια συγκριτική μελέτη έδειξαν σημαντικές διαφορές στην παραγωγή κυτταροκινών μεταξύ παιδιών ηλικίας 2 ετών από διαφορετικές ηπείρους και παρατήρησαν ότι πιο έντονες διακυμάνσεις υπήρχαν μεταξύ των απαντήσεων των ατόμων από τη Ν. Αφρική έναντι των ατόμων από το Εκουαδόρ, το Βέλγιο και τον Καναδά [215]. Στην ίδια κατεύθυνση, σημαντικές διαφορές στην παραγωγή TNF-α και IL-10 διαπιστώθηκαν μεταξύ παιδιών σχολικής ηλικίας από την Ολλανδία και τη Γκαμπόν [216]. Επιπλέον, οι Tulic et al παρατήρησαν ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές στην ανοσολογική ωρίμανση μεταξύ αλλεργικών και μη αλλεργικών παιδιών από την ίδια χώρα, την Αυστραλία, καταδεικνύοντας έτσι την πολυπλοκότητα που χαρακτηρίζει την εξέλιξη της μη ειδικής ανοσίας [217].

Τα δημοσιευμένα δεδομένα είναι πλέον αρκετά και παρουσιάζουν σημαντικές, ενίοτε, αποκλίσεις. Αυτές μπορεί να οφείλονται σε διάφορους παράγοντες, όπως διαφορές στην προέλευση του πληθυσμού, το σχεδιασμό της μελέτης και την εργαστηριακή μεθοδολογία που κάθε φορά ακολουθείται (βιολογικό υλικό, τρόπος μετρήσεων). Τα χαρακτηριστικά από τις σημαντικότερες μελέτες που αξιολογούν την ωρίμανση της TLR απαντητικότητας/παραγωγής κυτταροκινών κατά την παιδική ηλικία παρουσιάζονται στον πίνακα 3.

Σύστημα καλλιέργειας	PRR μονοπάτι	Κυτταροκίνες	Ηλικιακό εύρος	Τόπος	Τύπος μελέτης	Βιβλιογραφικές αναφορές
PBMCs	TLR4	IL-10, IL-12	0-12 ετών, ενήλικες	Αυστραλία	Συγχρονική	Upham et al, 2002 [226]
Ολικό αίμα	TLR4	IL-12	1-96 μηνών, ενήλικες	Γερμανία	Συγχρονική	Hartel et al, 2005 [225]
PBMCs	TLR4	IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, TNF-α, IL-23, myxovirus resistance protein A (induced by type-I IFN), IFN-γ	0-13 ετών, ενήλικες 23-57 ετών	Αυστραλία	Συγχρονική	Yerkovich et al, 2007 [227]
Ολικό αίμα	TLR3, TLR4, TLR7, TLR9	IL-10, IL-12p70, IFN-α	0-1 μηνός, ενήλικες	Ολλανδία	Συγχρονική	Beiderbos et al, 2009 [221]
Ολικό αίμα	TLR4	IL-5, IL-8, IL-10, TNF-α, IFN-γ	0-1 έτους, ενήλικες μητέρες	Φινλανδία	Προοπτική	Lappalainen et al, 2009 [229]
PBMCs	TLR4, TLR9	IL-10, IFN-α	0-18 μηνών, ενήλικες	Βέλγιο	Προοπτική (στα παιδιά) & ενήλικες	Vosters et al, 2010 [219]
Ολικό αίμα	TLR4, TLR9	IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, TNF-α, IP-10, CXCL9 (MIG), IFN-γ	0-12 μηνών, ενήλικες	Βέλγιο	Προοπτική (στα παιδιά) & ενήλικες	Nguyen et al, 2010 [194]
PBMCs	TLR2/1, TLR3, TLR4, TLR7/8, TLR9	IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12p40 & p70, TNF-α, IL-23, IFN-α, IFN-γ	0-2 ετών, ενήλικες 23-48 ετών	Β. Αμερική	Προοπτική (στα παιδιά) & ενήλικες	Corbett et al, 2010 [220]
PBMCs	TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR2/6, TLR7/8, TLR9	IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, TNF-α, IFN-γ	0-5 ετών	Αυστραλία	Προοπτική (αλλεργικοί vs μη αλλεργικοί)	Tulic et al, 2011 [217]
Ολικό αίμα	TLR1/2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6/2, TLR7, TLR8, TLR9	IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, TNF-α, IFN-γ	6-60 μηνών	Εκουαδόρ	Συγχρονική	Teran et al, 2011 [232]
Ολικό αίμα	TLR1/2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR2/6, TLR7, TLR8, TLR9	IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α, IFN-γ	0-12 μηνών	Γκάμπια	Συγχρονική	Burl et al, 2011 [230]
Ολικό αίμα	TLR2&NOD1/2, TLR2/1, TLR3, TLR4, TLR7/8, TLR9	IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, TNF-α, IFN-α2, IP-10, IL-23, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, IFN-γ	0-12 μηνών, ενήλικες 24-47 ετών	Ν. Αφρική	Προοπτική (στα παιδιά) & ενήλικες	Reikie et al, 2012 [224]
Ολικό αίμα	TLR2, TLR3, TLR4, TLR7/8, NOD1, NOD2, NALP3	IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12, TNF-α, IFN-γ, IL-8 (CXCL8), MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, IP-10, eotaxin (Alum experiments)	1-18 μηνών	Παπούα Ν. Γουινέα	Συγχρονική	Liscandro et al, 2012 [228]
PBMCs	TLR1/2, TLR3, TLR4	IL-6, TNF-α	0-24 μηνών, ενήλικες 25-40 ετών	Ταϊβάν	Προοπτική (στα παιδιά) & ενήλικες	Liao et al, 2013 [231]
Ολικό αίμα	TLR4, TLR7/8, TLR9	IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, TNF-α, IFN-α2, IFN-γ, IP-10, MCP-1, MIP-1β, RANTES	0-6 μηνών, ενήλικες 18-40 ετών	Β. Αμερική	Συγχρονική	Van Haren et al, 2016 [222]
PBMCs	TLR3	Panel IFN 1 & 3	0-10 ετών	Αυστραλία	Προοπτική	Holt et al, 2019 [218]

Πίνακας 3

Συνοπτική παρουσίαση των μελετών που αξιολογούν την ωρίμανση της TLR απαντητικότητας (τροποποιημένο από Georgountzou & Papadopoulos [141])

Παρά τις διαφορές στη βιβλιογραφία, έχουν προκύψει αρκετά σημεία συναίνεσης σχετικά με την εξέλιξη στο χρόνο της TLR απαντητικότητας, τουλάχιστον από μελέτες που προέρχονται από χώρες του Δυτικού Κόσμου. Έτσι, φαίνεται ότι τους πρώτους μήνες ή

χρόνια ζωής υπάρχει αύξηση των αντι-ικών απαντήσεων IFN τύπου I, καθώς και των Th1 σχετιζόμενων κυτταροκινών, με παράλληλη μείωση των Th17 απαντήσεων. Σε αντιδιαστολή με τα παραπάνω, σε Αφρικανικό πληθυσμό έχουν δειχθεί αντίθετες τάσεις.

Ειδικότερα, σχετικά με την ωρίμανση των αντι-ικών απαντήσεων, οι Holt et al, μελετώντας προοπτικά την παραγωγή 17 ιντερφερονών τύπου 1 & 3 σε PBMCs από νεογνά και παιδιά ηλικίας 4 και 10 ετών, έδειξαν ότι με την αύξηση της ηλικίας αυξάνεται η ικανότητα ταυτόχρονης βιοσύνθεσης πολλών διαφορετικών μορίων IFN, μετά από TLR3 διέγερση [218]. Μια μελέτη σε βρέφη ηλικίας έως ενός έτους από το Βέλγιο έδειξε ότι η παραγωγή των IP-10 και MIG, δύο χημειοκινών επαγόμενων από την IFN τύπου I, αυξάνεται προοδευτικά με την ηλικία, μετά από διέγερση του TLR9, όμως παραμένει και πάλι χαμηλότερη σε σύγκριση με τους ενήλικες [194]. Στην ίδια κατεύθυνση οι Vosters et al έδειξαν σημαντική αύξηση της παραγόμενης, μετά από TLR9 διέγερση, IFN-α στην πρώιμη βρεφική ηλικία, αλλά και πάλι τα επίπεδα της παρέμειναν κάτω από τις τιμές των ενηλίκων έως την ηλικία των 18 μηνών [219]. Σε πληθυσμό 0-2 ετών από τη Βόρεια Αμερική παρατηρήθηκε ταχύτερη ωρίμανση των απαντήσεων IFN, κατόπιν TLR7/8 και TLR9 διέγερσης, περί το 12^ο μήνα ζωής, ενώ μετά από TLR3 διέγερση, η παραγωγή IFN-α φαίνεται να μειώνεται τα 2 πρώτα χρόνια ζωής, για να αυξηθεί αργότερα σε επίπεδα ενηλίκων [220]. Σημαντικά ταχύτερη αύξηση των επιπέδων της IFN-α παρατηρήθηκε σε μια προοπτική μελέτη στις Κάτω Χώρες, όπου τιμές παρόμοιες με των ενηλίκων διαπιστώθηκαν τον 1^ο μήνα ζωής, μετά από TLR3, 7 και 9 διέγερση περιφερικού αίματος [221]. Σε μία πιο πρόσφατη μελέτη από τη Βόρεια Αμερική, η οποία αξιολόγησε απαντήσεις σε ανοσοενισχυτικά μόρια που δυνητικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε εμβόλια, διαπιστώθηκε σημαντική αύξηση από τη νεογνική ηλικία μέχρι τον 6^ο μήνα ζωής στην παραγωγή IFN-α μετά από TLR7/8 διέγερση και μάλιστα σε υψηλότερα των ενηλίκων επίπεδα [222]. Πρόσφατα επίσης αξιολογήθηκε η επαγόμενη από τον ιό RSV παραγωγή IFN-α σε PBMC από νεογνά και παιδιά ηλικίας 12-59 μηνών και βρέθηκε σημαντικά χαμηλότερη σε σχέση με τους ενήλικες. Όπως αναμενόταν, τα pDCs ταυτοποιήθηκαν ως η κύρια κυτταρική πηγή της IFN-α και επιπλέον δείχθηκε ότι η παραγωγή IFN-α διαμεσολαβείται από την ενεργοποίηση του RIG-I υποδοχέα, γεγονός που αποδεικνύει ότι στην αρχή της ζωής διαφοροποιούνται, εκτός των TLR και οι μεσολαβούμενες από άλλους PRR αποκρίσεις [223]. Σε αντίθεση με όλα τα παραπάνω ευρήματα, μια προοπτική μελέτη σε βρέφη από τη Ν. Αφρική έδειξε αυξημένη παραγωγή IFN-α2 μετά από TLR7/8 και 9 διέγερση στους 6

πρώτους μήνες της ζωής, ακολουθούμενη από μείωση της παραγωγής σε επίπεδα ενήλικα το 12^ο μήνα ζωής [224].

Η παραγωγή της IL-12, μιας βασικής Th1- τροφικής κυτταροκίνης, έχει αξιολογηθεί από πολλούς ερευνητές και χαρακτηρίζεται από μια αργή αύξηση σε όλη την παιδική ηλικία. Οι Härtel et al έδειξαν ότι η επαγόμενη από LPS έκφραση της IL-12 στα μονοκύτταρα αυξάνεται με την ηλικία από τη γέννηση μέχρι τα 5 έτη, οι δε ενήλικες είχαν ακόμα υψηλότερες τιμές [225]. Σε μια συγχρονική μελέτη από την Αυστραλία διαπιστώθηκε ότι η ικανότητα των PBMCs να συνθέτουν IL-12p70 μετά από διέγερση με LPS ή *Staphylococcus aureus* ήταν μειωμένη σε παιδιά ηλικίας 5 και 12 ετών, σε σύγκριση με τους ενήλικες [226]. Η ίδια ομάδα έδειξε ότι η σύνθεση της IL-12p35 αυξάνεται σε επίπεδα ενήλικα σε κάποιο σημείο μεταξύ 4 και 13 ετών [227]. Ομοίως, οι van Haren et al βρήκαν αύξηση της IL-12p70 από τη γέννηση έως τον 6^ο μήνα ζωής (TLR7/8 διέγερση), χωρίς όμως οι τιμές της να προσεγγίζουν τα επίπεδα των ενηλίκων [222]. Στο ίδιο μήκος κύματος, οι Corbett et al παρατήρησαν αύξηση της παραγωγής IL-12p70 από τη γέννηση μέχρι το 2^ο χρόνο ζωής μετά από διέγερση TLR3, TLR4 και TLR7/8 και οι Liscianro et al αυξητική τάση της IL-12 με την ηλικία, μεταξύ 1 και 18 μηνών, σε πληθυσμό παιδιών από την Παπούα Νέα Γουινέα (ΠΝΓ), κατόπιν διέγερσης με TLR3 & TLR4/IFN γ [220, 228]. Μια πιο ταχεία ωρίμανση της σύνθεσης της IL-12, κατόπιν TLR4 διέγερσης, παρατηρήθηκε από τους Nguyen et al, καθώς στη μελέτη τους βρήκαν επίπεδα IL-12p70 παρόμοια με των ενηλίκων από τον 6^ο μήνα ζωής. Ομοίως, οι Belderbos et al έδειξαν ταχεία αύξηση της παραγωγής IL-12p70 σε επίπεδα ενηλίκων, εντός του πρώτου μήνα ζωής, μετά από TLR3, TLR7 και TLR9 (αλλά όχι TLR4) διέγερση. Τα ευρήματα από το νοτιοαφρικανικό πληθυσμό δείχνουν και πάλι μια αντίθετη τάση, καθώς η παραγωγή IL-12p70, μετά από TLR3 διέγερση ήταν υψηλότερη στα βρέφη ηλικίας <6 μηνών σε σχέση με τα παιδιά 1 έτους και τους ενήλικες, που είχαν παρόμοιες τιμές [194, 221, 224].

Τα δεδομένα σχετικά με την παραγωγή των φλεγμονωδών κυτταροκινών TNF- α και IL-1 β παρουσιάζουν ένα μεγαλύτερο βαθμό ετερογένειας. Οι περισσότεροι ερευνητές βρήκαν ότι η σύνθεσή τους, κατά την επαγωγή με TLR4 διεγέρτες, είναι ανεπαρκής στην αρχή της ζωής και ωριμάζει σε κάποιο χρονικό σημείο της βρεφικής ή της προσχολικής ηλικίας. Έτσι, οι Belderbos et al αναφέρουν ότι η παραγωγή του TNF- α mRNA είναι ανεπαρκής στη νεογνική ηλικία και σε τρεις μελέτες, δύο από τη Β. Ευρώπη και μία από τη Β. Αμερική, η δυνατότητα σύνθεσης του TNF- α σε επίπεδα ενηλίκων επιτεύχθηκε σε ηλικία 6-12 μηνών [194, 221, 222, 229]. Ένα λίγο διαφορετικό αναπτυξιακό πρότυπο διαπιστώθηκε

σε μία μελέτη από την Αυστραλία, όπου η παραγωγή TNF-α βρέθηκε μειωμένη στην ηλικία του ενός έτους, όμως τα επίπεδα της στο αίμα του ομφάλιου λώρου ήταν αυξημένα, σχεδόν όπως και στον ενήλικα, ενώ το ναδίρ παρατηρήθηκε στην ηλικία των 2 μηνών [227]. Στην κοόρτη της Β. Αμερικής τόσο ο TNF-α όσο και η IL-1β αυξήθηκαν σε επίπεδα ενηλίκων κατά το πρώτο έτος της ζωής, χωρίς ιδιαίτερη περαιτέρω διακύμανση μέχρι τα 2 έτη [220]. Σε πληθυσμό βρεφών από τη Γκάμπια, η παραγωγή TNF-α αυξήθηκε ραγδαία, εντός του πρώτου μήνα από τη γέννηση και τα επίπεδα του παρέμειναν σταθερά κατά τη βρεφική ηλικία, ενώ η παραγωγή IL-1β βρέθηκε υψηλή κατά τη γέννηση και παρέμεινε αμετάβλητη κατά τον 1^ο χρόνο ζωής [230]. Στον πληθυσμό της Ν. Αφρικής, οι Reikie et al παρατήρησαν μια αύξηση των επιπέδων τόσο του TNF-α όσο και της IL-1β ως ένα μέγιστο στους 12 μήνες, με επακόλουθη πτώση στα επίπεδα των ενηλίκων [224]. Αυξητική τάση στη σύνθεση της IL-1β παρατηρήθηκε επίσης στα βρέφη της ΠΝΓ έως την ηλικία των 18 μηνών, όμως η ίδια μελέτη είναι και η μοναδική που αναφέρει μείωση της παραγωγής TNF-α μετά από TLR4 διέγερση κατά τη διάρκεια του πρώτου έτους της ζωής [228]. Σε αντιδιαστολή με την προαναφερθείσα εξέλιξη στο χρόνο των TLR4 απαντήσεων, οι περισσότερες μελέτες που αξιολόγησαν την ωρίμανση φλεγμονωδών αποκρίσεων μετά από TLR ερεθίσματα που μιμούνται ιογενείς λοιμώξεις διαπίστωσαν διαφορετικό αναπτυξιακό πρότυπο. Πράγματι, μελέτες από διαφορετικά κέντρα έδειξαν μείωση στην παραγωγή TNF-α ή/και IL-1β, κατόπιν TLR7/8 και 9 διέγερσης, μεταξύ 1^{ου} και 12^{ου} μήνα [194, 220, 222, 224, 230]. Η χρήση του Poly:IC ως TLR3 συνδέτη σε αυτές τις μελέτες απέτυχε να διεγείρει αξιοσημείωτη παραγωγή TNF-α και IL-1β και μόνο οι Lisciandro et al αναφέρουν αύξηση των επιπέδων IL-1β, μετά από TLR3 διέγερση, κατά τη βρεφική ηλικία στον πληθυσμό τους [228]. Όσον αφορά τα υπόλοιπα TLR μονοπάτια που έχουν έως τώρα αξιολογηθεί, ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι σε παιδιά της Β. Αμερικής τα επίπεδα TNF-α και IL-1β αυξήθηκαν από τη γέννηση έως την ηλικία των 12 μηνών, κατόπιν διέγερσης TLR2/1, ενώ αντιθέτως στα βρέφη της Ν. Αφρικής μειώθηκαν μετά από επαγωγή με NOD1/2 και TLR2 [220, 224]. Τέλος, έχουν αξιολογηθεί οι φλεγμονώδεις αποκρίσεις της φυσικής ανοσίας στο αλουμίνιο, μία ανοσοενισχυτική ουσία που χρησιμοποιείται σε εμβόλια και βρέθηκαν ανεπαρκείς όσον αφορά την IL-1β κατά τους πρώτους 18 μήνες ζωής [228].

Τα επίπεδα της IL-6 έχουν βρεθεί στις περισσότερες περιπτώσεις υψηλότερα στη γέννηση και στη συνέχεια προοδευτικά μειώνονται, όμως το χρονικό σημείο που εξισώνονται με αυτά των ενηλίκων ποικίλλει, αναλόγως τη μελέτη και το TLR μονοπάτι.

Κάποιοι διαπίστωσαν ταχεία μείωση, κατόπιν TLR4 και 9 διέγερσης, από τον 3^ο μήνα [194], ενώ άλλοι βραδύτερη, από τον 6^ο μήνα (για TLR4 & 7/8 διέγερση) [222], τον 1^ο χρόνο ζωής (για TLR1/2, 3 & 4 ή NOD1/2, TLR2, TLR2/1 & TLR7/8 διέγερση) [224, 231], το 2^ο (για TLR2/1, 4, 7/8 διέγερση) ή και αργότερα (με TLR4 & 6 διέγερση) [220, 232]. Στη μελέτη της Yerkonich et al, που προσεγγίζει την ωρίμανση των TLR4 αποκρίσεων από τη γέννηση μέχρι και την εφηβεία, παρατηρήθηκε ότι η μείωση στην παραγωγή της IL-6 τον 1^ο χρόνο ήταν παροδική και ακολουθήθηκε από νέα αύξηση στη σχολική ηλικία [227]. Υπάρχουν βέβαια και έρευνες που δε βρήκαν μεταβολή στην παραγωγή της IL-6 [221, 230], ενώ τα δεδομένα από τον πληθυσμό της ΠΝΓ έδειξαν τάση αύξησης (με TLR2 & 3 ερεθίσματα) μέχρι την ηλικία των 18 μηνών [228].

Τα επίπεδα της σχετιζόμενης με Th17 τύπου απαντήσεις IL-23 έχουν επίσης αξιολογηθεί από αρκετούς ερευνητές, όμως τα αποτελέσματα παρουσιάζουν αρκετή ετερογένεια. Σε παιδιά της Β. Αμερικής, η παραγωγή της μειώθηκε μέχρι το 12^ο μήνα στα επίπεδα του ενήλικα, τόσο με TLR4 όσο και με 7/8 διέγερση [220], ενώ σε πληθυσμό της Ν. Αφρικής η ωρίμανση σχετίζεται με την TLR οδό. Έτσι, κατόπιν ερεθισμάτων που μιμούνται ιογενή λοίμωξη (TLR3 & TLR7/8) παρατηρήθηκε μείωση, ενώ κατόπιν TLR4 διέγερσης, η IL-23 παρουσίασε αύξηση κατά τον 1^ο χρόνο ζωής, για να μειωθεί σε κάποιο μεταγενέστερο χρονικό σημείο στα επίπεδα του ενήλικα [224]. Μία άλλη μελέτη έδειξε ότι η επαγόμενη από LPS υπομονάδα p19 της IL-23 αυξάνεται βραδέως μεταξύ 4 και 13 ετών [227].

Τέλος, η μεταβολή της σύνθεσης της αντιφλεγμονώδους IL-10 στο χρόνο έχει απασχολήσει αρκετούς ερευνητές. Σε πολλές από τις μελέτες διαπιστώθηκαν αυξημένα επίπεδα στη γέννηση αλλά και πέραν της νεογνικής περιόδου, έως και τα πρώτα 2 χρόνια ζωής, με μία πλειάδα TLR ερεθισμάτων (TLR4 αλλά και TLR1/2, 2/1, 3, 5, 6, 7/8, 8, 9 και NOD1/2) και μάλιστα σε πολύ διαφορετικούς γενετικά πληθυσμούς [194, 220-222, 224, 230, 232]. Επιπλέον, μελέτες που καλύπτουν μεγαλύτερο ηλικιακό εύρος της παιδικής ηλικίας έδειξαν ότι η παραγωγή της IL-10 μειώνεται σε επίπεδα παρόμοια ή και χαμηλότερα του ενήλικα κάποια στιγμή στη βρεφική ή τη νηπιακή ηλικία [220, 227]. Παρόλα αυτά, ούτε για την IL-10 υπάρχει πλήρης ομοφωνία στη βιβλιογραφία, αφού υπάρχουν έρευνες τόσο ευρωπαϊκές, όσο και από την ΠΝΓ, που έδειξαν μειωμένη παραγωγή της στη γέννηση και επακόλουθη προοδευτική ωρίμανση επαρκών απαντήσεων τύπου ενήλικα, τόσο για την TLR3 όσο και για την TLR4 οδό [219, 228, 229].

2.3 Ωρίμανση της μη ειδικής ανοσίας, αναπτυξιακά στάδια και λοιμώξεις

Η ανωριμότητα της μη ειδικής και της επίκτητης ανοσίας στην αρχή της ζωής έχει συσχετιστεί με την αυξημένη επιρρέπεια στις λοιμώξεις, η δε προοδευτική ωρίμανσή τους με την ευαισθησία σε συγκεκριμένους λοιμογόνους παράγοντες ανά ηλικιακή ομάδα. Έτσι, στη νεογνική ηλικία η οφειλόμενη σε λοιμώξεις νοσηρότητα και θνησιμότητα είναι αυξημένη και μάλιστα σε μεγαλύτερο βαθμό στα πρόωρα νεογνά. Κάθε χρόνο, οι λοιμώξεις ευθύνονται περίπου για το 1/3 από τα 4 εκατομμύρια νεογνικών θανάτων παγκοσμίως και η επίπτωση της πρώιμης νεογνικής σηψαιμίας στο Δυτικό Κόσμο είναι 0.90- 0.98 περιστατικά ανά 1000 γεννήσεις, ενώ στις αναπτυσσόμενες χώρες έως και 9.8/1000 γεννήσεις [233, 234]. Η επιρρέπεια στις λοιμώξεις μειώνεται ταχύτατα από το πρόωρο στο τελειόμηνο νεογνό και ακολούθως σημαντικά μετά τη νεογνική ηλικία, κατά τη βρεφική και νηπιακή ηλικία. Μετά τα 5 έτη ο κίνδυνος λοίμωξης είναι σχετικά χαμηλός, ενώ η κορύφωση της αντίστασης σε λοιμογόνους παράγοντες απαντάται περί τα 10 έτη. Χαρακτηριστικά, οι Gruber et al πρόσφατα έδειξαν ότι ο αριθμός των ανά έτος λοιμώξεων του αναπνευστικού, του συχνότερου τύπου λοίμωξης στον παιδιατρικό πληθυσμό, μειώνεται προοδευτικά μέχρι τον 5^ο χρόνο ζωής και έκτοτε σταθεροποιείται [235]. Επιπρόσθετα, τα τελευταία χρόνια, συγκεκριμένα ελλείμματα στο σκέλος της φυσικής ανοσίας έχουν ενοχοποιηθεί για λοιμώξεις μεγαλύτερης βαρύτητας ή για την επίπτωση λοιμώξεων από συγκεκριμένους λοιμογόνους παράγοντες, καθώς αποκρυπτογραφούνται συνεχώς οι ειδικοί μηχανισμοί που ενεργοποιούνται σε κυτταρικό επίπεδο για κάθε λοιμογόνο παράγοντα και εμπλέκονται στην αντιμετώπισή του.

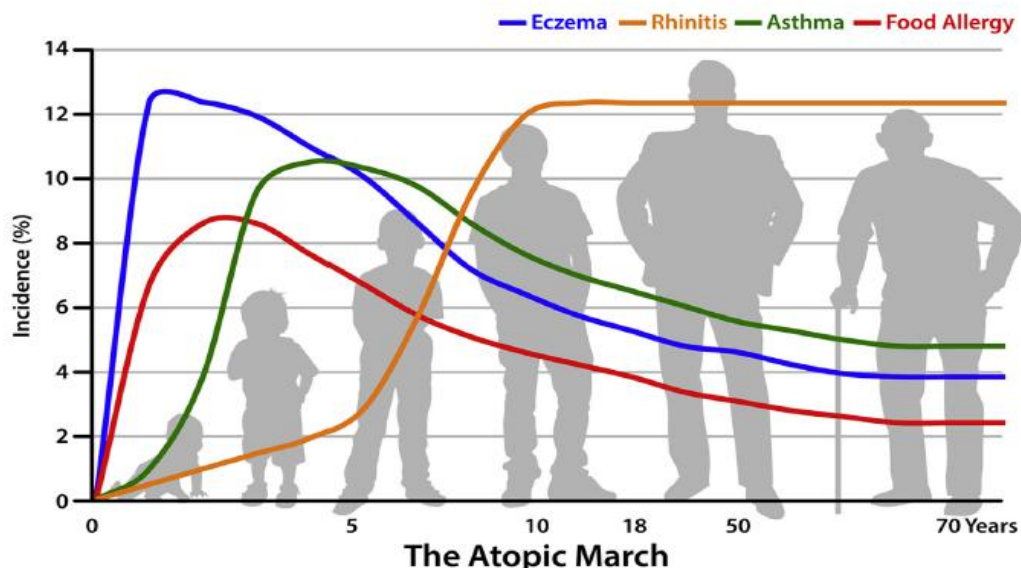
Στη νεογνική περίοδο, ο μειωμένος αριθμός ηρεμώντων κοκκιοκυττάρων στο μυελό οδηγεί σε αδυναμία κινητοποίησης ικανού αριθμού πολυμορφοκυττάρων σε λοίμωξη, έτσι ώστε συχνά κατά τη διαδρομή μικροβιακών λοιμώξεων εμφανίζεται ουδετεροπενία. Επιπλέον, εξαιτίας των διαταραχών στη χημειοταξία των φαγοκυττάρων, υπάρχει αδυναμία περιορισμού της λοίμωξης στο αρχικό σημείο της, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη γενικευμένων λοιμώξεων. Επιπρόσθετα, στα νεογνά και τα βρέφη έως 3 μηνών, η μειωμένη παραγωγή Th1 κυτταροκινών έχει συσχετιστεί με την αδυναμία αντιμετώπισης λοιμώξεων που οφείλονται σε ενδοκυττάρια παθογόνα, όπως η *Listeria monocytogenes*, το *Mycobacterium tuberculosis* και ο ιός HSV. Η μεγαλύτερη επίπτωση και η βαρύτερη εικόνα που παρουσιάζουν στην ηλικιακή αυτή ομάδα κάποιες ιογενείς λοιμώξεις, όπως από HSV,

VZV, HIV, CMV, EBV, εκτός των άλλων, έχει συσχετιστεί και με τη μειωμένη παραγωγή αντι-ικτών ιντερφερονών, καθώς και τη λειτουργική ανεπάρκεια των NK-κυττάρων. Τελευταία μάλιστα δείχθηκε ότι ο ιός της γρίπης προκαλεί αυξημένη απόπτωση των NK-κυττάρων στα μικρά βρέφη και αυτό συσχετίστηκε με την αυξημένη νοσηρότητα που εμφανίζεται στη συγκεκριμένη ηλικιακή ομάδα. Τέλος, η διαταραχή στη λειτουργία των φαγοκυττάρων ενοχοποιείται για την ευαισθησία σε λοιμώξεις από Gram (-) μικρόβια και *staphylococcus aureus*, ενώ οι χαμηλές συγκεντρώσεις των κλασμάτων του συμπληρώματος έχουν από παλιά συνδεθεί με την αυξημένη επίπτωση λοιμώξεων από πυογόνα μικρόβια, όπως ο group B *streptococcus*.

Σε λίγο μεγαλύτερη ηλικία, έως 2 ετών, η εμμένουσα ανεπάρκεια αντι-ικτών κυτταροκινών (IFN τύπου I) σχετίζεται με βαρύτερη κλινική εικόνα λοιμώξεων από ιούς όπως οι RSV, HSV, CMV και HIV. Έχει μάλιστα δειχθεί παρατεταμένος πολλαπλασιασμός για τους HBV και CMV σε σχέση με μεγαλύτερα παιδιά και ενήλικες. Η αυξημένη επίπτωση αλλά και βαρύτερη κλινική εικόνα του ιού RSV σε νεογνά και μικρά βρέφη, εκτός της ανεπαρκούς σύνθεσης IFN τύπου I, αποδίδεται και στη μειονεκτική ενεργοποίηση των DCs για την επαγωγή T-κυτταρικών απαντήσεων (κυτταροτοξικών και Th1). Επίσης, στις αναπτυσσόμενες χώρες, η ανεπαρκής παραγωγή Th1 κυτταροκινών έχει συνδεθεί με την αυξημένη επίπτωση λοιμώξεων από *M. tuberculosis* και *Pl. Falciparum*. Τέλος, σε παιδιά μέχρι 5 ετών η χαμηλή παραγωγή Th1 κυτταροκινών συσχετίστηκε με σοβαρές λοιμώξεις από *M.tuberculosis*, *Salmonella spp.* και *Burkholderia pseudomallei*, ενώ αντίθετα, η αύξηση της έκφρασης του TLR3 στο εντερικό επιθήλιο μετά τα 5 χρόνια σηματοδότησε την αύξηση της αντίστασης του οργανισμού σε λοίμωξη από ροταϊό. Αξίζει να σημειωθεί ότι η επιρρέπεια στις λοιμώξεις επηρεάζεται από το γενετικό υπόστρωμα αλλά και από πολυάριθμους άλλους παράγοντες, όπως περιγεννητικές επιδράσεις, τη διατροφή, τη ρύπανση, την έκθεση σε καπνό, το μέγεθος της οικογένειας, την ηλικία έναρξης παιδικού σταθμού, τους εμβολιασμούς κ.ά., που ενδεχομένως επιδρούν και στην ωρίμανση της φυσικής ανοσίας, τροποποιώντας το γενετικά καθορισμένο πρόγραμμα εξέλιξης της [112, 118, 128, 134, 236-238].

2.4 Ωρίμανση της μη ειδικής ανοσίας, αλλεργική νόσος και λοιμώξεις

Τα αλλεργικά νοσήματα έχουν εξελιχθεί σε μία σύγχρονη επιδημία, καθώς η επίπτωσή τους έχει αυξηθεί σημαντικά τις τελευταίες δεκαετίες, από το 1960 και έπειτα, ιδίως στο Δυτικό Κόσμο. Σε παγκόσμια κλίμακα υπολογίζεται ότι περίπου 1 δις άνθρωποι πάσχουν από αλλεργική ρινοεπιπεφυκίτιδα και 300 εκατομμύρια από άσθμα. Στην Ευρώπη εκτιμάται ότι έως και 30% του πληθυσμού πάσχει από ρινίτιδα, έως και 20% από άσθμα, 15% από αλλεργικές παθήσεις του δέρματος και 8% από τροφική αλλεργία. Παρόμοιες εκτιμήσεις έχουν αναφερθεί για την Αμερική και την Αυστραλία. Οι εκδηλώσεις των αλλεργικών νοσημάτων μπορεί σε ένα μεγάλο ποσοστό να είναι ήπιες, όμως εκτιμάται ότι ένα ποσοστό έως και 20% των ασθενών μπορεί να έχει σοβαρή νόσο, με σημαντικές συνέπειες στην ποιότητα ζωής και την εργασία τους, αλλά και σημαντικό οικονομικό κόστος [239-241]. Συχνά στους αλλεργικούς ασθενείς η εμφάνιση των αλλεργικών νοσημάτων και συμπτωμάτων ξεκινά από μικρή ηλικία και ακολουθεί μία συγκεκριμένη σειρά, με πρώτη συνήθως εκδήλωση την ατοπική δερματίτιδα και επόμενα διαδοχικά εμφανιζόμενα νοσήματα την τροφική αλλεργία, το άσθμα και την αλλεργική ρινίτιδα, φαινόμενο γνωστό ως «ατοπική παρέλαση» ή «ατοπική πορεία» [242, 243] (εικόνα 6).



Εικόνα 6

Σχηματική απεικόνιση του φαινομένου της «ατοπικής πορείας» κατά τη διάρκεια της ζωής (από Davidson et al [242])

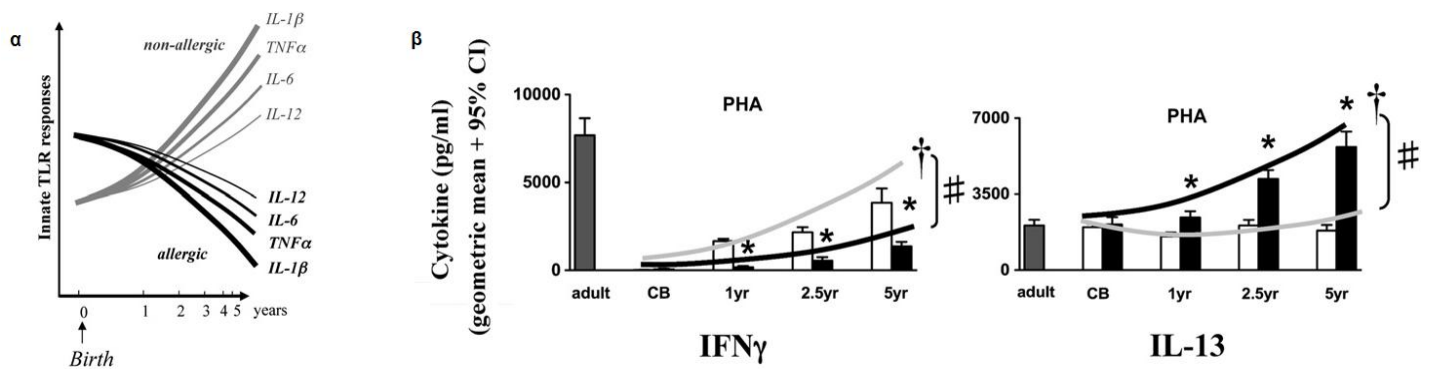
Σε αδρές γραμμές, η αλλεργική ευαισθητοποίηση χαρακτηρίζεται από την παρουσία ειδικών IgE ανοσοσφαιρινών έναντι διαφόρων, κατά κανόνα μη βλαπτικών για τον οργανισμό περιβαλλοντικών αντιγόνων και η έκθεση του ευαισθητοποιημένου ατόμου στο συγκεκριμένο αντιγόνο μπορεί να οδηγήσει στην εκδήλωση συμπτωμάτων ρινίτιδας, άσθματος, εκζέματος ή κνίδωσης, πεπτικών εκδηλώσεων ή ακόμα και αναφυλαξίας. Η κλασική αλλεργική φλεγμονή ενορχηστρώνεται από τα ειδικά Th2 κύτταρα, που ευοδώνουν τη σύνθεση ειδικών IgE, την ηωσινοφιλία, την υπερπαραγωγή βλέννης και τη σύσπαση των λείων μυϊκών ινών, μέσω της παραγωγής των IL-4, IL-5 και IL-13. Σύμφωνα με τη σύγχρονη έρευνα, η γένεση των αλλεργιών σχετίζεται με την παραμονή/επικράτηση των Th2 απαντήσεων έναντι των Th1, καθώς και την υπολειπόμενη Treg λειτουργία. Η ανοσολογική αυτή απορρύθμιση πιθανότατα συμβαίνει σε γενετικά προδιατεθειμένα άτομα, με την επίδραση συγκεκριμένων περιβαλλοντικών παραγόντων. Πρόκειται για ένα πολύπλοκο/πολυπαραγοντικό φαινόμενο που, έως ένα βαθμό εξαρτάται από την ενεργοποίηση της μη ειδικής ανοσίας και φαίνεται να επηρεάζεται από το χρόνο, τη δόση, τη θέση αλλά και το συνδυασμό της επίδρασης εξωγενών αντιγονικών ερεθισμάτων [244]. Τέτοια ερεθίσματα εκτός των αλλεργιογόνων αποτελούν κυρίως οι μικροοργανισμοί, τόσο οι παθογόνοι όσο και οι συμβιωτικοί, αλλά και ο καπνός, άλλοι οργανικοί ή ανόργανοι ρυπαντές, συστατικά της διατροφής κ.ά. [238]. Κεντρικό δε ρόλο στη διαδικασία αυτή φαίνεται ότι παίζουν τα επιθηλιακά κύτταρα, μέσω των κυτταροκινών που εκκρίνουν, όπως οι Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP), IL-33, IL-25, IL-1 και GM-CSF, οι οποίες και διαμορφώνουν το μικροπεριβάλλον μέσα στο οποίο συμβαίνει η ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων [244-246].

Αν και οι ακριβείς μηχανισμοί που εμπλέκονται στην παθογένεια των αλλεργικών νοσημάτων δεν είναι πλήρως κατανοητοί, υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι η ωρίμανση της μη ειδικής ανοσίας εξελίσσεται με διαφορετικό τρόπο στους αλλεργικούς. Έτσι, κάποιοι ερευνητές έδειξαν διαφορές που αφορούν τη φυσική ανοσία μεταξύ αλλεργικών και υγιών παιδιών διαφόρων ηλικιών. Οι Préfontaine et al έδειξαν ανεπαρκή απάντηση στην LPS (μετρώντας μόρια που εμπλέκονται στην ενδοκυττάρια μεταγωγή του σήματος του TLR4) στα μονοκύτταρα αλλεργικών παιδιών ηλικίας 2-18 ετών [247] και οι Amoudruz et al παρατήρησαν, επίσης σε μονοκύτταρα, μειωμένη ενεργοποίηση του TLR2 μετά από διέγερση με πεπτιδογλυκάνη σε αλλεργικά παιδιά ηλικίας 5 ετών [248]. Πιο πρόσφατα, οι Edwards et al σε μελέτη με βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα διαπίστωσαν σημαντική

ανεπάρκεια στην παραγωγή IFN-β και λ, σε απάντηση σε TLR3 διέγερση ή σε λοίμωξη με ρινοϊό, σε παιδιά ηλικίας 9-15 ετών με ανθεκτικό στη θεραπεία αλλεργικό άσθμα σε σχέση με υγιή παιδιά [249], ενώ παρόμοια ευρήματα έδειξαν οι Balardo et al σε ατοπικά ασθματικά και ατοπικά μη ασθματικά παιδιά μικρότερων ηλικιών [250]. Οι Durrani et al, μελετώντας την απάντηση IFN-α και λ, μετά από διέγερση PBMCs με ρινοϊό, επίσης βρήκαν σημαντικά μειωμένες απαντήσεις σε αλλεργικά ασθματικά παιδιά ηλικίας 9-12 ετών σε σχέση με υγιή παιδιά αντίστοιχης ηλικίας [251]. Οι διαφορές αυτές στη μη ειδική ανοσιακή απάντηση φαίνεται ότι επεκτείνονται και στην ενήλικη ζωή, όπως δείχνουν διάφορες μελέτες τόσο στο αίμα, όσο και στο βρογχικό επιθήλιο. Μελέτη του εργαστηρίου μας έδειξε ελαττωματικές επιθηλιακές απαντήσεις στη λοίμωξη από ρινοϊό σε ατοπικούς ασθματικούς ασθενείς, με μειωμένη παραγωγή IL-6, IL-8, RANTES αλλά και IFN-γ, που μάλιστα συσχετίστηκαν με αυξημένο ιικό πολλαπλασιασμό και αυξημένη κυτταρική βλάβη [252], ενώ έχει επίσης διαπιστωθεί σημαντική μείωση της παραγωγής της IFN-β και λ [253, 254]. Ανεπαρκείς μη ειδικές ανοσιακές απαντήσεις έχουν δειχθεί και σε ρινικά κύτταρα ασθενών με αλλεργική ρινίτιδα, μετά από μόλυνσή τους με παραϊνφλουέντζα και ρινοϊό, με σημαντικά μειωμένη παραγωγή IFN-λ1, IFN-β και RANTES σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες [255]. Τέλος, ανεπαρκής σύνθεση IFN-α έχει δειχθεί και σε δενδριτικά κύτταρα αλλεργικών ενηλίκων, κατόπιν TLR9 διέγερσης [256].

Ακόμα μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα ευρήματα από μελέτες που εστιάζουν στην εξέλιξη των απαντήσεων της μη ειδικής ανοσίας στο χρόνο, τόσο σε υγιείς όσο και σε αλλεργικούς. Έτσι, οι Itazawa et al έδειξαν διαφορετικό αναπτυξιακό προφίλ μεταξύ υγιών και αλλεργικών στην παραγωγή της IL-12, μίας Th1- τροφικής κυτταροκίνης, μετά από TLR4 διέγερση. Οι υγιείς παρουσίασαν μία προοδευτική αύξηση με την ηλικία στην παραγωγή της IL-12, ενώ αντίθετα στους αλλεργικούς δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διακυμάνσεις με την ηλικία. Σημειωτέον, οι αλλεργικοί μέχρι την ηλικία των 7 ετών εμφάνιζαν υψηλότερες τιμές IL-12 σε σχέση με τους υγιείς, εύρημα που αντιστράφηκε με την πρόοδο της ηλικίας [257]. Επιπλέον, οι Tulic et al σε μία προοπτική μελέτη σχετικά με την ωρίμανση της μη ειδικής ανοσίας από τη γέννηση μέχρι το 5^ο έτος ζωής έδειξαν σημαντικές διαφορές στην TLR απαντητικότητα και κατ' επέκταση στον τρόπο απάντησης στα μικροβιακά ερεθίσματα, μεταξύ αλλεργικών και μη αλλεργικών, όσον αφορά την παραγωγή IL-1β, IL-6, TNF-α και IL-12. Στην πολύ σημαντική αυτή μελέτη, οι μη αλλεργικοί-υγιείς παρουσίασαν προοδευτική αύξηση με την ηλικία της απαντητικότητας στους TLR

αγωνιστές, με αύξηση της παραγωγής των παραπάνω κυτταροκινών και παράλληλη αύξηση των Th1 απαντήσεων της επίκτητης ανοσίας, όπως αυτές αντικατοπτρίζονται στη σύνθεση IFN- γ . Αντιθέτως, οι αλλεργικοί εμφάνισαν υπεραπαντητικότητα στην TLR διέγερση στην αρχή της ζωής, με επακόλουθη μείωση των IL-1 β , IL-6, TNF- α και IL-12 και παράλληλη ελλιπή ωρίμανση της Th1 (IFN- γ) απάντησης, καθώς και προοδευτική αύξηση με την ηλικία των Th2 απαντήσεων, όπως αυτή αντανακλάται από την παραγωγή IL-13. Συνεπώς, είναι πιθανόν αυτή η διαταραχή στην ανάπτυξη των απαντήσεων της μη ειδικής ανοσίας στους αλλεργικούς να συμβάλλει και στην απορρύθμιση της ανάπτυξης των T- λεμφοκυτταρικών πληθυσμών και τη διαταραχή της Th1/Th2 σχέσης [217] (εικόνα 7).



Εικόνα 7

Η ωρίμανση του ανοσοποιητικού συστήματος σε αλλεργικούς και μη από τη γέννηση μέχρι την ηλικία των 5 ετών (από Tulic et al [217])

α. Σχηματική απεικόνιση της ωρίμανσης της μη ειδικής ανοσίας/TLR απαντήσεων

β. Ωρίμανση των T-κυτταρικών απαντήσεων της επίκτητης ανοσίας για την IFN- γ και την IL-13 μετά από διέγερση με τον πολυκλωνικό διεγέρτη PHA

Με γκρι χρώμα απεικονίζονται τα μη αλλεργικά και με μαύρο τα αλλεργικά άτομα.

CB: cord blood (αίμα ομφαλίου λώρου)

*P<0.05 υποδηλώνει σημαντικές διαφορές μεταξύ αλλεργικών- μη αλλεργικών

#P<0.05 υποδηλώνει σημαντικές διαφορές της αναπτυξιακής τροχιάς μεταξύ αλλεργικών και μη αλλεργικών

†P<0.05 υποδηλώνει σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών ηλικιών στην ίδια ομάδα

Οι διαφορετικές απαντήσεις της μη ειδικής ανοσίας στα μικροβιακά ερεθίσματα ενδέχεται να ευθύνονται, τουλάχιστον εν μέρει και για τη διαφορετική αντίσταση στις λοιμώξεις που έχει αναφερθεί στους αλλεργικούς. Οι Cirgrandi et al διαπίστωσαν ότι αλλεργικά παιδιά προσχολικής ηλικίας που πήγαιναν παιδικό σταθμό παρουσίασαν μεγαλύτερο αριθμό αλλά και διάρκεια λοιμώξεων αναπνευστικού σε σχέση με τα μη αλλεργικά [258], ενώ παρόμοια ευρήματα έδειξαν οι Cirillo et al σε ενήλικες [259]. Σε ενήλικες έχει ακόμα δειχθεί αυξημένος κίνδυνος λοιμώξεων ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού, συμπεριλαμβανομένης μάλιστα και της πνευμονίας, παρουσία IgE ευαισθητοποίησης σε αεροαλλεργιογόνα [260, 261], όπως επίσης και αυξημένος κίνδυνος σοβαρής πνευμονιοκοκκικής νόσου και στρεπτοκοκκικής λοίμωξης ανώτερου αναπνευστικού [262, 263]. Οι Olenec et al, αναλύοντας ρινικά εκπλύματα παιδιών με αλλεργικό ή μη άσθμα και καταγράφοντας τα κλινικά συμπτώματά τους, διαπίστωσαν ότι στα αλλεργικά ασθματικά παιδιά οι λοιμώξεις προκάλεσαν βαρύτερα συμπτώματα τόσο από το ανώτερο όσο και από το κατώτερο αναπνευστικό και πιο παρατεταμένη νόσο. Επίσης, έδειξαν ότι στα αλλεργικά παιδιά οι ιογενείς λοιμώξεις ήταν πιο πιθανό να οδηγήσουν σε απώλεια του ελέγχου του άσθματος και τέλος, τα παιδιά με μη αλλεργικό άσθμα είχαν διπλάσιο ποσοστό ασυμπτωματικής λοίμωξης [264]. Τέλος, οι Corne et al μελέτησαν τις λοιμώξεις από ρινοϊό σε ζευγάρια στα οποία ο ένας σύντροφος έπασχε από αλλεργικό άσθμα και ο άλλος ήταν υγιής. Στη μελέτη αυτή φάνηκε ότι ο κίνδυνος λοίμωξης και η βαρύτητα της νόσου από το ανώτερο αναπνευστικό ήταν παρόμοιος στους δύο συντρόφους, όμως οι ασθματικοί είχαν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης νόσου από το κατώτερο αναπνευστικό, πιο έντονα συμπτώματα και μεγαλύτερη διάρκεια νόσησης σε σχέση με τους υγιείς [265].

Σύμφωνα με τη σύγχρονη βιβλιογραφία, διάφοροι λοιμογόνοι παράγοντες μπορεί να υπεισέρχονται στην απορρύθμιση της ανοσολογικής ισορροπίας, ειδικά σε ευαίσθητα χρονικά σημεία κατά την ωρίμανση του ανοσοποιητικού συστήματος, γεγονός που πιθανώς συμβάλλει καθοριστικά στην εμφάνιση αλλεργικής νόσου. Ομοίως, άλλοι παράγοντες ενδέχεται να ασκούν προστατευτική δράση έναντι της ανάπτυξης αλλεργιών. Και στις δύο περιπτώσεις φαίνεται ότι εμπλέκεται καθοριστικά η αναγνώριση μέσω των PRR υποδοχέων, οι μη ειδικές αποκρίσεις κυτταροκινών που παράγονται και η επακόλουθη ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων, που θα καθορίσει τη διαφοροποίηση των Th0 λεμφοκυττάρων προς την Th1 ή Th2 κατεύθυνση. Καταρχάς, πολυμορφισμοί των TLR υποδοχέων που

σχετίζονται με διαταραχή της σηματοδότησής τους, έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης αλλεργικών νοσημάτων. Έως σήμερα οι περισσότεροι πολυμορφισμοί που έχουν συνδεθεί με το άσθμα αφορούν τους TLRs 1, 2, 4, 6 και 10, ενώ πολυμορφισμοί των TLR 2 & 9 με την ατοπική δερματίτιδα, χωρίς βέβαια να υπάρχει απόλυτη ομοφωνία στις μελέτες [266]. Επίσης, σε πειραματικά μοντέλα αλλεργικής ευαισθητοποίησης φαίνεται ότι η ενεργοποίηση των TLR υποδοχέων λειτουργεί ως απαραίτητος συμπαραγοντας του αλλεργιογόνου για την ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων [267, 268]. Καθοριστική σημασία έχει ο τύπος και η δόση του ερεθίσματος. Έτσι, η επανειλημμένη χορήγηση TLR αγωνιστών, όπως η LPS και το dsRNA, σε υψηλές δόσεις οδηγεί σε Th1 τύπου απάντηση, μετά την έκθεση σε αλλεργιογόνα, ενώ παρουσία χαμηλής δόσης TLR αγωνιστών παράγονται αποκρίσεις Th2 τύπου [269, 270]. Ιδιαίτερα κρίσιμο ρόλο στην αλλεργική ευαισθητοποίηση φαίνεται ότι διαδραματίζει και η οδός έκθεσης στο αντιγονικό ερέθισμα και ειδικά για το άσθμα η ενεργοποίηση των TLRs των επιθηλιακών κυττάρων στον αναπνευστικό βλεννογόνο, που μέσω παραγωγής κυτταροκινών οδηγεί στην προσέλκυση και την ενεργοποίηση των DCs [271]. Αντιθέτως, σε πειραματικά μοντέλα που η ευαισθητοποίηση πραγματοποιήθηκε με υποδόρια ή ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση του αλλεργιογόνου και του TLR4 αγωνιστή, δεν παρατηρήθηκε αλλεργική φλεγμονή στους πνεύμονες των πειραματοζώων. Τέλος, ο χρόνος επίδρασης του ερεθίσματος φαίνεται να είναι καθοριστικός για το είδος των απαντήσεων που παράγονται. Έτσι, η ταυτόχρονη έκθεση στο αλλεργιογόνο ovalbumin και την LPS στη νεογνική ηλικία οδήγησε σε απαντήσεις που προάγουν την ανοχή, με ανάπτυξη Tregs, αυξημένη παραγωγή IL-10 και καταστολή των Th2 απαντήσεων [272]. Εκτός του TLR4 που είναι και καλύτερα μελετημένος, έχει διερευνηθεί και η επίδραση της διέγερσης άλλων TLRs. Για τους TLR 1/2/6 τα πειραματικά δεδομένα είναι αντιφατικά, καθώς δείχνουν τόσο ευοδωτικό όσο και προστατευτικό για την ανάπτυξη αλλεργίας ρόλο. Όσον αφορά τους TLRs που ενεργοποιούνται από ιούς, για τον TLR3 δείχτηκε ότι ευοδώνει την ευαισθητοποίηση και αλλεργική φλεγμονή στους αεραγωγούς, αφού επάγει την ενεργοποίηση των APCs, την εμφάνιση ειδικών για το αλλεργιογόνο CD4+ & CD8+ T-λεμφοκυττάρων και την επακόλουθη ειδική ανοσιακή απόκριση [272, 273]. Αντιθέτως η ενεργοποίηση των TLR7 & 8 φαίνεται ότι έχει προστατευτικό ρόλο, καθώς ολοένα και περισσότερα πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι συμβάλλει στην καταστολή των Th2 απαντήσεων, μέσω αυξημένης παραγωγής IL-10, IFN- γ και TGF- β και μάλιστα για τους TLR7 αγωνιστές δείχθηκε ότι ασκούν αυτή τη δράση

όχι μόνο κατόπιν χορήγησής τους από την αναπνευστική οδό, αλλά και κατά την υποδόρια ή ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση [272].

Πέρα όμως από τα πειραματικά αυτά δεδομένα, μεγάλες επιδημιολογικές μελέτες υπονοούν ότι η αλληλεπίδραση των λοιμώξεων με την έκθεση στα αλλεργιογόνα νωρίς στη ζωή διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη γένεση της αλλεργικής νόσου, ιδίως του άσθματος.

Ειδικά κατά την προηγούμενη δεκαετία η έρευνα επικεντρώθηκε στη συσχέτιση της εμφάνισης ιογενούς βρογχιολίτιδας, κατά κύριο λόγο από τον ιό RSV (Respiratory Syncytial Virus), τα πρώτα χρόνια ζωής και του μελλοντικού κινδύνου εμφάνισης ατοπίας και άσθματος. Σε μία μελέτη βραχυχρόνιας παρακολούθησης βρεφών <9 μηνών με επιβεβαιωμένη RSV λοίμωξη δείχθηκαν αυξημένα ποσοστά ευαισθητοποίησης (αυξημένες specific IgE, sIgE) λίγους μήνες μετά τη νόσηση, περί την ηλικία των 12 μηνών [274]. Σύμφωνα με τις μεγάλες προοπτικές μελέτες, που καλύπτουν το ηλικιακό φάσμα από τη γέννηση μέχρι την εφηβεία, η βρογχιολίτιδα από RSV αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου για τη μετέπειτα εμφάνιση υποτροπιάζοντα συριγμού για την πρώτη δεκαετία της ζωής. Οι Stein et al (Tucson Children's Respiratory Study, μελέτη προοπτικής παρακολούθησης 826 βρεφών) έδειξαν ότι η λοίμωξη κατώτερου αναπνευστικού από RSV τα πρώτα 3 χρόνια ζωής αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα για την εμφάνιση επεισοδίων συριγμού μέχρι την ηλικία των 11 ετών, αλλά όχι αργότερα, στην ηλικία των 13 ετών [275]. Σημειωτέον, η συσχέτιση αυτή δε συνοδεύεται από αυξημένο κίνδυνο αλλεργικής ευαισθητοποίησης. Στην προοπτική μελέτη των Sigurs et al, που αφορούσε παιδιά που νοσηλεύτηκαν στη βρεφική ηλικία με σοβαρή RSV βρογχιολίτιδα, δείχτηκε όχι μόνο υψηλότερη επίπτωση άσθματος και υποτροπιαζόντων επεισοδίων συριγμού, αλλά και αλλεργικής ρινοεπιπεφυκίτιδας και ευαισθητοποίησης σε συνήθη αεροαλλεργιογόνα [276]. Η παρακολούθηση μάλιστα των παιδιών αυτών μέχρι την ενηλικίωση έδειξε ότι η συσχέτιση της νόσησης από RSV βρογχιολίτιδα και της υψηλότερης επίπτωσης αλλεργικού άσθματος επιμένει μέχρι την νεαρή ενήλικη ζωή [277]. Τα διαφορετικά αποτελέσματα μεταξύ των δύο αυτών μελετών ενδέχεται να οφείλονται στα διαφορετικά χαρακτηριστικά (διαφορετική βαρύτητα νόσου) των ασθενών με RSV βρογχιολίτιδα που καθεμιά περιέλαβε. Σε πρόσφατη συστηματική ανασκόπηση που περιέλαβε μελέτες που παρακολούθησαν για τουλάχιστον 18 μήνες παιδιά που νοσηλεύτηκαν λόγω RSV βρογχιολίτιδας, βρέθηκε ότι η σοβαρής μορφής νόσηση στη βρεφική ηλικία αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης άσθματος σε όλο το φάσμα της παιδικής ηλικίας, ιδίως στις ηλικιακές ομάδες 5-12 ετών [278]. Επίσης, οι Jackson

et al στη μελέτη COAST σε παιδιά υψηλού κινδύνου για εμφάνιση αλλεργίας και άσθματος, βρήκαν ότι μία λοίμωξη με συριγμό μέχρι τον 3^ο χρόνο ζωής από τον ιό RSV αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση άσθματος τον 6^ο χρόνο ζωής (Odds Ratio, OR=2.6) [279]. Πάντως, οι επιδημιολογικές μελέτες δε μπορούν να απαντήσουν στο κατά πόσο η RSV λοίμωξη απλά αποκαλύπτει τα παιδιά σε υψηλό κίνδυνο για ανάπτυξη αλλεργίας ή/και άσθματος ή ο ίδιος ο ιός πυροδοτεί βιολογικά φαινόμενα που επάγουν τη μετέπειτα εμφάνιση επεισοδίων συριγμού. Εξάιρεση ίσως αποτελούν δύο μελέτες που αξιολόγησαν την επίδραση της πρόληψης ή της αντι-ιικής αγωγής στην RSV βρογχιολίτιδα. Στην πρώτη, πρόωρα νεογνά που έλαβαν προφύλαξη με palivizumab παρουσίασαν σημαντικά χαμηλότερη επίπτωση συριγμού στην προσχολική ηλικία σε σχέση με αυτά που δεν έλαβαν προφύλαξη [280]. Στη δεύτερη, παιδιά <2 ετών που έλαβαν αγωγή με ριμπαβιρίνη παρουσίασαν άσθμα και αλλεργική ευαισθητοποίηση σε σημαντικά χαμηλότερο ποσοστό σε σχέση με τα παιδιά που δεν έλαβαν αγωγή (15% versus 34% για το άσθμα και 26% vs 75% την ευαισθητοποίηση) [281]. Πάντως, πρόσφατα πειραματικά δεδομένα, κυρίως σε πειραματόζωα, δείχνουν ότι ο RSV διαθέτει PAMPs που επάγουν μη ειδικές ανοσολογικές αποκρίσεις Th2 τύπου, όπως την παραγωγή IL-33, IL-25 και TSPL από τα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού. Η ιδιότητά του αυτή έχει ως αποτέλεσμα την περαιτέρω ενίσχυση των Th2 απαντήσεων, που ούτως ή άλλως επικρατούν στις μικρές ηλικίες στις οποίες και απαντάται η λοίμωξη και ακολούθως την ενεργοποίηση DCs, M2 μακροφάγων καθώς και NK-κυττάρων, την αυξημένη παραγωγή IL-4 και IL-13 και βρογχική υπεραντιδραστικότητα. Αυτή η επιπρόσθετη διαταραχή της ισορροπίας Th1/Th2 μπορεί να σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ευαισθητοποίησης σε αεροαλλεργιογόνα ταυτόχρονα ή σε κάποια απόσταση από τη λοίμωξη [282]. Εξάλλου έχει δείχθει ότι μετά τη λοίμωξη με RSV παράγονται ειδικές IgE έναντι του ιού, που ανιχνεύονται τόσο στο αίμα, όσο και στις ρινικές εκκρίσεις και μάλιστα ο τίτλος τους φαίνεται να συσχετίζεται με τη βαρύτητα της λοίμωξης και τη μελλοντική εμφάνιση συριγμού και άσθματος [283].

Ιδιαίτερη έμφαση έχει δοθεί τα τελευταία χρόνια και στο ρόλο του ρινοϊού (Human Rhinovirus, HRV) στην παθογένεση του άσθματος, καθώς δείχτηκε ότι είναι το πιο συχνά απαντούμενο αναπνευστικό παθογόνο και το συχνότερο αίτιο συριγμού σε όλες τις ηλικίες, από τη βρεφική μέχρι και την ενήλικη ζωή [284]. Έτσι, αρκετοί ερευνητές παρατήρησαν ότι οι λοιμώξεις από HRV αποτελούν ισχυρό προγνωστικό παράγοντα για τη μετέπειτα εμφάνιση άσθματος. Συγκεκριμένα οι Kotaniemi et al, σε μία προοπτική μελέτη

παρακολούθησης παιδιών <2 ετών που νοσηλεύτηκαν λόγω λοίμωξης αναπνευστικού με συριγμό, βρήκαν ότι ο κίνδυνος εμφάνισης άσθματος στη σχολική ηλικία ήταν 4πλάσιος στα παιδιά που είχαν νοσήσει από HRV [285]. Οι Jackson et al στη μελέτη COAST έδειξαν ότι η λοίμωξη κατώτερου αναπνευστικού από HRV με συριγμό στη βρεφική ηλικία αποτελεί το σημαντικότερο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση άσθματος στα 6 έτη (OR=9.8), αν και η αλλεργική ευαισθητοποίηση φαίνεται να προηγείται της σοβαρής ρινοϊκής λοίμωξης [279, 286]. Οι Kusel et al, επίσης σε προοπτική μελέτη βρεφών υψηλού κινδύνου, έδειξαν συσχέτιση επεισοδίων συριγμού ήπιας- μέτριας βαρύτητας από HRV με επίμονο συριγμό στην ηλικία των 5 ετών και ιδίως στα παιδιά με πρώιμη αλλεργική ευαισθητοποίηση, στα οποία ο κίνδυνος σχεδόν διπλασιάζεται [287]. Πέρα από τα επιδημιολογικά δεδομένα, υπάρχουν και για τον HRV πειραματικά δεδομένα που εξετάζουν τη συμβολή του στην παθογένεση του άσθματος. Αν και υπάρχουν δυσκολίες στην κατάρτιση πειραματικών μοντέλων λοίμωξης με HRV, τα λιγοστά διαθέσιμα συνηγορούν υπέρ της επίτασης των Th2 απαντήσεων στο αναπνευστικό μέσω παραγωγής TSLP, IL-25 και IL-33 [282]. Καλύτερα έχει μελετηθεί ο τρόπος που ο HRV συμβάλλει στην επιμονή του άσθματος. Έχει προταθεί ότι η παραμονή του HRV-RNA στους αεραγωγούς μετά την λοίμωξη μπορεί να οδηγήσει σε εμμένουσα φλεγμονή [288]. Επίσης, οι Bossios et al έδειξαν ότι ο ιός επάγει κυτταροτοξικότητα στο αναπνευστικό επιθήλιο ιδίως αν αυτό είναι ήδη διαταραγμένο, όπως στο άσθμα και αυτό συμβάλλει στη έναρξη ή την επιμονή της αναδόμησης των αεραγωγών (remodeling) [289]. Στην ίδια κατεύθυνση, παρατηρήθηκε ότι ο HRV προάγει, μέσω παραγωγής Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων και μάλιστα σε μεγαλύτερο βαθμό στους ατοπικούς [290]. Τελευταία, προτάθηκε ένας πολύ ενδιαφέρον μηχανισμός που, μέσω εμπλοκής της μη ειδικής ανοσίας, επεξηγεί την επιμονή του άσθματος μετά από ιογενή λοίμωξη του κατώτερου αναπνευστικού. Οι Subrata et al, σε PBMCs κατά τη λοίμωξη και τη φάση ανάρρωσης, διαπίστωσαν ότι οι παραγόμενες κατά τη λοίμωξη κυτταροκίνες ευοδώνουν την αύξηση της έκφρασης του υψηλής συγγένειας υποδοχέα για την IgE, FcεRI, στα κυκλοφορούντα μονοκύτταρα και δενδριτικά κύτταρα, που αποτελούν τους προδρόμους των APCs στους αεραγωγούς. Έτσι, θεώρησαν ότι αυξάνεται η ικανότητα πρόσληψης και αντιγονοπαρουσίασης αλλεργιογόνων στον πνεύμονα, οπότε αν κατά τη διάρκεια της αυξημένης αυτής δραστηριότητας των APCs υπάρχουν αλλεργιογόνα στα οποία το άτομο είναι ήδη ευαισθητοποιημένο, δρομολογείται ταυτόχρονα με τη λοίμωξη

και η έναρξη αλλεργικής φλεγμονής, οδηγώντας στην παράταση της νόσου και την επιβάρυνση των συμπτωμάτων [291]. Εξάλλου, οι Durrani et al βρήκαν ότι τα pDCs αλλεργικών ασθματικών παιδιών παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση FcεRI, γεγονός που συσχετίστηκε αντίστροφα με την παραγωγή IFN-α μετά από διέγερση με HRV. Επιπλέον, η πρότερη γεφύρωση των FcεRI receptors στα PBMCs είχε ως αποτέλεσμα την περαιτέρω μείωση των αντι-ιικών απαντήσεων στα αλλεργικά παιδιά [251]. Σημαντική συμβολή στην έρευνα της σχετιζόμενης με τον HRV παθογένεσης του άσθματος είχε η μελέτη των Caliskan et al, που ανέδειξαν την αλληλεπίδραση της HRV λοίμωξης κατώτερου αναπνευστικού με παρουσία συριγμού στην πρώτη παιδική ηλικία και του γονότυπου για την εμφάνιση μελλοντικού άσθματος. Η μελέτη αφορούσε τα παιδιά της κοόρτης COAST και έδειξε ότι ο συνδυασμός TT ομοζυγωτίας στο rs7216389 γονίδιο και πρώιμης ρινοϊκής συρίπτουσας νόσου αύξησε δραματικά τον κίνδυνο εμφάνισης άσθματος (OR=26.1 έναντι OR=2.3 για την ομοζυγωτία TT χωρίς ρινοϊκή λοίμωξη ή OR= 5.2 για τη ρινοϊκή λοίμωξη μόνο) [292].

Εκτός του RSV και του HRV που έχουν μελετηθεί σε σημαντικό βαθμό, φαίνεται ότι και άλλοι ιογενείς ή και βακτηριακοί λοιμογόνοι παράγοντες μπορεί να σχετίζονται με το άσθμα. Οι Midulla et al έδειξαν ότι και η σοβαρή βρογχιολίτιδα από άλλους ιούς, όπως π.χ. ο Bocavirus, αποτελεί παράγοντα κινδύνου για μετέπειτα υποτροπιάζοντα συριγμό [293]. Υπάρχουν επίσης πειραματικά δεδομένα που δείχνουν ότι η λοίμωξη με παραμυξοϊό μπορεί να πυροδοτήσει χρόνια βρογχική υπεραντιδραστικότητα, υπερπλασία καλυκοειδών κυττάρων και να ενεργοποιήσει γονίδια της μη ειδικής ανοσίας, προκαλώντας χρόνια δυσλειτουργία του αναπνευστικού επιθηλίου [294]. Στην ίδια κατεύθυνση οι Cheung et al έδειξαν σε επίμυες ότι η λοίμωξη από παραμυξοϊό οδηγεί σε αυξημένη έκφραση του υποδοχέα FcεRI στα APCs του πνεύμονα και επακόλουθη αυξημένη αντιγονοπαρουσίαση αντιγόνων μη μικροβιακής προέλευσης και ενεργοποίηση Th2 απαντήσεων καθόλη τη διάρκεια που παραμένουν ενεργοποιημένες οι ανοσολογικές αποκρίσεις στη λοίμωξη [295]. Ερευνητές από τη Δανία πρόσφατα αμφισβήτησαν το ρόλο συγκεκριμένου λοιμογόνου παράγοντα, είτε ιού, είτε βακτηρίου, καθώς έδειξαν ότι ο κίνδυνος εμφάνισης άσθματος στην ηλικία των 7 ετών σχετίζεται κατεξοχήν με τον αριθμό επεισοδίων λοίμωξης κατώτερου αναπνευστικού στη βρεφική ηλικία, ενώ όλοι οι λοιμογόνοι παράγοντες που ανιχνεύτηκαν, συγκρινόμενοι μεταξύ τους αυξάνουν τον κίνδυνο σε παρόμοιο βαθμό [296].

Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι δεν τεκμηριώνεται η αιτιολογική σχέση του πρώιμου ιογενούς συριγμού με τη γένεση της αλλεργικής νόσου και μάλιστα ενδέχεται η

παρουσία αποπίας ή προϋπάρχουσα δυσλειτουργία των αεραγωγών να προδιαθέτει σε ευαισθησία σε ιογενείς λοιμώξεις και εμφάνιση συριγμού. Παρόλα αυτά, είναι πολύ πιθανόν ότι ορισμένοι λοιμογόνοι παράγοντες, δρώντας ενδεχομένως και σε άτομα με γενετικό υπόστρωμα και σε νεαρή ηλικία, οδηγούν στην επίταση της ήδη παρούσας Th2 προδιάθεσης, με την αρωγή της μη ειδικής ανοσίας. Αποτελούν έτσι το πρώτο χτύπημα, οδηγούν σε μεταβολή των ανοσολογικών αποκρίσεων και δημιουργούν μία «προ-αλλεργική» κατάσταση, με υπερευαισθησία του ανοσοποιητικού συστήματος, που καθιστά τον οργανισμό πιο επιρρεπή στην αλλεργική ευαισθητοποίηση, εφόσον υπάρχει έκθεση σε αλλεργιογόνα και την εγκατάσταση, τελικά, αλλεργικής νόσου [297-299].

2.5 Κενά στη βιβλιογραφία, προκλήσεις για μελλοντική έρευνα

Όπως δείχθηκε από τα παραπάνω, οι δομές και οι λειτουργίες της μη ειδικής ανοσίας, από τους φραγμούς μέχρι και τα επιμέρους ανοσιακά κύτταρα, παρουσιάζουν βαθμό ανωριμότητας κατά τα πρώτα χρόνια της ζωής και μεταβάλλονται από τη γέννηση μέχρι την ενηλικίωση, οι σημαντικότερες δε αναπτυξιακές αλλαγές φαίνεται ότι συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της βρεφικής και της παιδικής ηλικίας. Οι εκτιμήσεις της ηλικίας στην οποία οι διάφορες λειτουργίες ωριμάζουν και σταθεροποιούνται στα επίπεδα των ενηλίκων διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των μελετών και αυτό ενδεχομένως οφείλεται στις διαφορετικές μεθοδολογίες, αλλά και στα ξεχωριστά χαρακτηριστικά των πληθυσμών που αφορούν. Οι ολοένα αυξανόμενες γνώσεις μας, ειδικά στο κομμάτι της αναγνώρισης των μικροβιακών δομών και των αποκρίσεων της φυσικής ανοσίας σε μεταγραφικό και μεταφραστικό επίπεδο έχουν συμβάλει στην καλύτερη κατανόηση της επιρρέπειας σε λοιμώξεις και των απαντήσεων στα εμβόλια στην αρχή της ζωής αλλά, παράλληλα, έχουν ανοίξει νέους ορίζοντες για την ανάπτυξη καινούργιων διαγνωστικών εργαλείων και φαρμάκων.

Είναι προφανές ότι παραμένουν σημαντικά ερωτηματικά σχετικά με την ωρίμανση των επιμέρους συστατικών της φυσικής ανοσίας. Οι μεταβολές των πληθυσμών των ανοσιακών κυττάρων στις επιθηλιακές επιφάνειες και η λειτουργική ωρίμανσή τους δεν έχουν διερευνηθεί επαρκώς έως τώρα. Επίσης, τα δεδομένα για τη σύνθεση αντιμικροβιακών ουσιών στους βλεννογόνους στα διάφορα στάδια της παιδικής ηλικίας είναι ελλιπή. Ακόμα, δεν έχουν έως τώρα διερευνηθεί οι μεταβολές της λειτουργίας των

ηωσινοφίλων και βασεοφίλων με την ηλικία. Οι μελέτες σχετικά με τις μεταβολές στο χρόνο της TLR απαντητικότητας στα ανοσιακά κύτταρα του αίματος έχουν ως επί το πλείστον εστιαστεί στους πρώτους μήνες ζωής. Τα δεδομένα που αφορούν παιδιά ηλικίας >2 ετών περιορίζονται κυρίως στην ωρίμανση του TLR4 μονοπατιού και μόνο δύο μελέτες έχουν επιχειρήσει να χαρακτηρίσουν τις αναπτυξιακές μεταβολές άλλων μονοπατιών μικροβιακής αναγνώρισης και αυτό πάλι σε περιορισμένη κλίμακα, μέχρι την προσχολική ηλικία. Οι αναφορές σχετικά με τις αποκρίσεις σε ερεθίσματα που μιμούνται ιογενείς λοιμώξεις είναι ελάχιστες, παρά το γεγονός ότι οι τελευταίες είναι σημαντικός παράγοντας νοσηρότητας ειδικά στην παιδική ηλικία.

Το πώς οι γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες υπεισέρχονται στην ωρίμανση των λειτουργιών του ανοσοποιητικού συστήματος και ειδικά της φυσικής ανοσίας έχει αρχίσει σταδιακά να αποκαλύπτεται. Πρόσφατα, οι Netea et al αμφισβήτησαν την παγιωμένη αντίληψη ότι η μη ειδική ανοσία στερείται μνήμης και διατύπωσαν τη θεωρία της «εκπαιδευμένης ανοσίας» (trained immunity). Σύμφωνα με αυτήν επαναλαμβανόμενα ερεθίσματα επιφέρουν επιγενετικές μεταβολές στη λειτουργία της φυσικής ανοσίας, οι οποίες συνεπάγονται βελτιωμένες απαντήσεις σε επόμενη ενεργοποίησή της [6]. Οι Garand et al σε μία προοπτική μελέτη έδειξαν ότι οι παρατηρούμενες στη γέννηση αποκλίσεις στην TLR απαντητικότητα μεταξύ δύο διαφορετικών φυλετικών ομάδων, Ασιατών και Καυκάσιων, που ζούσαν στο ίδιο περιβάλλον, σταμάτησαν να υφίστανται στον 1^ο ή το 2^ο χρόνο ζωής [300]. Συγκεκριμένοι περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως συστατικά τροφίμων, ρυπαντές, λοιμογόνοι παράγοντες έχουν συνδεθεί με μεταβολές στις λειτουργίες της μη ειδικής ανοσίας και μάλιστα κάποιες από αυτές έχουν περαιτέρω συσχετιστεί με την παθογένεση νοσημάτων που σχετίζονται με την απορρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως π.χ. οι αλλεργίες. Έτσι, η έκθεση σε κάποιες λοιμώξεις, ειδικά σε κρίσιμα στάδια, ενδέχεται να επηρεάζει σημαντικά την ανάπτυξη της ανοσολογικής απόκρισης. Καθώς μάλιστα τα περισσότερα αλλεργικά νοσήματα εμφανίζονται νωρίς στη ζωή, δηλαδή σε άμεση συσχέτιση με το στάδιο που ωριμάζουν και οι ανοσολογικοί μηχανισμοί, έχει πρόσφατα προταθεί ότι η αλλεργική προδιάθεση προκύπτει από τον αποσυντονισμό που επιφέρει ο ρυθμός έκθεσης σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα και το είδος αυτών σε σχέση με τον εγγενή ρυθμό ωρίμανσης του ανοσιακού συστήματος. Από την άλλη πλευρά, η έκθεση σε άλλους μικροβιακούς παράγοντες μπορεί να δρα προστατευτικά ως προς την ανάπτυξη αλλεργιών, πάλι μέσω παρεμβολής στους μηχανισμούς της μη ειδικής ανοσίας. Σε αυτή την

κατεύθυνση, οι μελέτες PASTURE και PARSIFAL, που διερεύνησαν την επίδραση του περιβάλλοντος φάρμας στο κύημα, είχαν σημαντικά ευρήματα. Οι Roudit et al έδειξαν ότι η επαφή της μητέρας με ζώα φάρμας και γάτες κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης έχει προστατευτική επίδραση στους απογόνους σε σχέση με την ανάπτυξη της ατοπικής δερματίτιδας και αυτό συσχετίζεται με χαμηλότερη έκφραση υποδοχέων κατά τη γέννηση [301]. Στα παιδιά της PARSIFAL τόσο η ατοπική ευαισθητοποίηση, όσο και η έκφραση κάποιων γονιδίων υποδοχέων της φυσικής ανοσίας βρέθηκαν να σχετίζονται αντίστροφα με την έκθεση της μητέρας σε περιβάλλον στάβλου κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης [302]. Ομοίως, διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες που δρουν μετά τη γέννηση, όπως π.χ. ο μητρικός θηλασμός ή η κατανάλωση μη παστεριωμένου γάλακτος φάρμας, επίσης προστατεύουν, εν μέρει και μέσω εμπλοκής μηχανισμών της μη ειδικής ανοσίας, από την ανάπτυξη αλλεργικών νοσημάτων [244, 303]. Αν και οι γνώσεις μας είναι ακόμα περιορισμένες, φαίνεται ότι στη διαδικασία αυτή μπορεί να εμπλέκονται επίσης τα DCs. Έτσι, δείχθηκε ότι η ζωή σε φάρμα μπορεί να συμβάλλει στην προστασία από άσθμα και αλλεργικά νοσήματα μέσω τροποποίησης των υποπληθυσμών των DCs και των λειτουργιών τους [304, 305]. Επίσης, η ενεργοποίηση των TLRs από ποικίλους μικροβιακούς παράγοντες που σχετίζονται με το περιβάλλον της φάρμας μπορεί να επιδρά στην ισορροπία των λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών προς όφελος των ρυθμιστικών Treg λεμφοκυττάρων και μέσω του μηχανισμού αυτού να ασκείται η προστασία σε σχέση με τη μελλοντική εμφάνιση αλλεργικών νοσημάτων [306, 307]. Τέλος, ένα μεγάλο μέρος της σύγχρονης έρευνας έχει επικεντρωθεί και στις επιδράσεις που ασκούνται από τη συμβιωτική μικροχλωρίδα, κυρίως στο έντερο. Έχειδειχθεί ότι μεταβολές στη μικροβιοκοινότητα μπορεί να επιδρούν στη λειτουργία του φραγμού, αλλά και κάποιων ανοσιακών κυττάρων και να επηρεάζουν όχι μόνο τις τοπικές, αλλά και τις συστηματικές ανοσολογικές απαντήσεις, μέσω επιγενετικών μεταβολών σε γονίδια που εμπλέκονται στις αποκρίσεις της φυσικής ανοσίας. Ειδικά οι παράγοντες που καθορίζουν τη σύσταση της χλωρίδας του εντέρου στην αρχή της ζωής, όπως το είδος του τοκετού και η σίτιση με μητρικό γάλα, ασκούν σημαντική επίδραση στην ωρίμανση του τοπικού ανοσοποιητικού συστήματος. Επιπλέον, μεταβολές που οδηγούν σε δυσβίωση στο έντερο έχουν συνδεθεί, μέσω ενεργοποίησης και της μη ειδικής ανοσίας, με την αλλεργική νόσο καθώς και τη φλεγμονώδη νόσο του εντέρου [308-310].

Από τα παραπάνω διαφαίνεται ότι οι σχέσεις μεταξύ μικροβιακών ερεθισμάτων, ανοσολογικών παραμέτρων της μη ειδικής ανοσίας και ατοπίας είναι πολύπλοκες. Μπορεί

σε ορισμένες περιπτώσεις να είναι ανατροφοδοτούμενες και αλληλοενισχυόμενες και να ευοδώνουν την εμφάνιση αλλεργικών εκδηλώσεων, ενώ σε άλλες περιπτώσεις να την αναστέλλουν. Το κατά πόσον η προοδευτική ωρίμανση της φυσικής ανοσίας μπορεί να αλληλεπιδρά με τις λοιμώξεις και να σχετίζεται με την ανάπτυξη αλλεργικών νοσημάτων δεν έχει διερευνηθεί επαρκώς. Πέραν των αλλεργιών, νοσήματα όπως ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου Ι, η κοιλιοκάκη, η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου, η ρευματοειδής αρθρίτιδα και η ψωρίαση έχουν συσχετιστεί με απορρύθμιση της μη ειδικής ανοσίας [311-315]. Συνεπώς, η ταυτοποίηση καθοριστικών για την ανοσολογική ωρίμανση περιβαλλοντικών παραγόντων και των κρίσιμων αναπτυξιακών περιόδων που οι παράγοντες αυτοί μπορεί να ασκούν το μέγιστο της επίδρασής τους, καθώς και των εμπλεκόμενων μηχανισμών αποτελεί πεδίο εντατικής έρευνας. Παράλληλα, απαντώντας στα παραπάνω ερωτήματα, ανοίγονται νέοι ορίζοντες προς την κατεύθυνση παρεμβάσεων και νέων θεραπευτικών σκευασμάτων που αποσκοπούν στην αντιμετώπιση των αλλεργιών αλλά και άλλων νοσημάτων. Στην εικόνα 8 απεικονίζονται οι κύριοι παράγοντες που έχουν συσχετιστεί με το άσθμα και οι αντίστοιχες παρεμβάσεις που θα μπορούσαν να οδηγήσουν στον περιορισμό του.

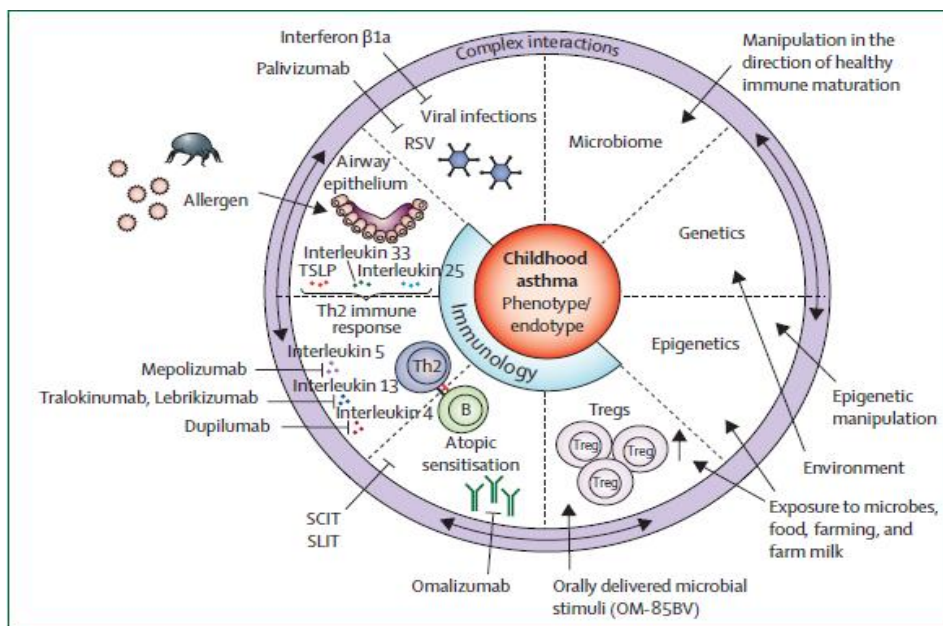


Figure 1: Schematic overview of selected determining factors on childhood asthma phenotypes and endotypes
 Determining factors in childhood asthma phenotypes and endotypes are presented as a pie chart. Close interactions in both directions are shown in the surrounding purple circle. Potential therapeutic interventions are depicted in black lines (—) and potential future preventive strategies are depicted by black arrows. RSV=respiratory syncytial virus. SCIT/SLIT=subcutaneous/sublingual immunotherapy. TSLP=thymic stromal lymphopoietin. Treg=regulatory T cell.

Εικόνα 8

Απεικόνιση επιλεγμένων παραγόντων που εμπλέκονται στο παιδικό άσθμα και της αντίστοιχης δυνατότητας παρέμβασης (από Raedler & Schaub [316])

2.6 Υπόθεση της μελέτης - Σκοπός - Όφελος

Υπόθεση

Υποθέτουμε ότι η μη ειδική ανοσία μεταβάλλεται/ωριμάζει από τη γέννηση μέχρι την ενηλικίωση και επιπλέον ότι η ατοπική νόσος σχετίζεται με διαταραχή της διαδικασίας αυτής. Δευτερευόντως, υποθέτουμε ότι η προοδευτική ωρίμανση του ανοσοποιητικού σχετίζεται με μείωση στην επίπτωση των παρατηρούμενων λοιμώξεων και ότι αποκλίσεις από τη φυσιολογική ανάπτυξη μπορεί να συμβάλλουν σε αυξημένη ευαισθησία στις λοιμώξεις.

Σκοπός

Πρωταρχικός στόχος της διατριβής είναι η περιγραφή της διαδικασίας της ωρίμανσης της μη ειδικής ανοσίας σε φυσιολογικά άτομα. Εξετάζεται συνεπώς η μεταβολή παραμέτρων της μη ειδικής ανοσιακής απάντησης σε υγιή άτομα από τη γέννηση μέχρι την ενηλικίωση, μέσω συγχρονικής διαστρωματοποιημένης μελέτης πληθυσμού. Οι παράμετροι που μελετώνται είναι οι μεταβολές στον αριθμό των κυκλοφορούντων λευκών αιμοσφαιρίων που συμμετέχουν στη φυσική ανοσία και οι μεταβολές της βιοσύνθεσης από τα κύτταρα επιλεγμένων κυτταροκινών που παράγονται αυτόματα ή μετά από διέγερση των TLR4, TLR3 και TLR7/8 υποδοχέων τους.

Παράλληλα, εξετάζεται η επίδραση της ατοπίας στη διαδικασία της ωρίμανσης της μη ειδικής ανοσίας, καθώς οι ίδιες ανοσολογικές παράμετροι μελετώνται και σε ατοπικά άτομα από τη γέννηση μέχρι την ενηλικίωση και συγκρίνονται με αυτές των υγιών.

Τέλος, επιχειρείται ανάλυση της επίπτωσης των ιογενών λοιμώξεων στον πληθυσμό της μελέτης και η αναγνώριση παραμέτρων της μη ειδικής ανοσιακής ωρίμανσης ως παραγόντων κινδύνου για αυξημένη ευαισθησία στις λοιμώξεις αυτές.

Όφελος

Η παρούσα μελέτη αποσκοπεί στην πληρέστερη κατανόηση της διαδικασίας ωρίμανσης της μη ειδικής ανοσιακής απάντησης, καθώς, σε σχέση με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, εξετάζει μεταβολές που συμβαίνουν καθόλη την παιδική ηλικία και μέχρι την ενήλικη ζωή, συμπεριλαμβάνοντας μάλιστα μόρια που δεν έχουν ως τώρα αξιολογηθεί.

Παράλληλα, καθώς η απορρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος έχει ενοχοποιηθεί για την παθογένεση και επιμονή της ατοπικής νόσου, η μελέτη αυτή επιχειρεί

να αναδείξει διαφοροποιήσεις στο επίπεδο της μη ειδικής ανοσιακής απάντησης, πεδίο στο οποίο τα έως τώρα δεδομένα σπανίζουν.

Τέλος, η ανάλυση της επίπτωσης των ιογενών λοιμώξεων, σε συνδυασμό με τα ανοσολογικά δεδομένα, θα μας επιτρέψει την καλύτερη κατανόηση της επιρρέπειας σε αυτές, τόσο στον υγιή όσο και τον αλλεργικό πληθυσμό.

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3. ΥΛΙΚΑ - ΟΡΓΑΝΑ

3.1 Υλικά

3.1.1 Βιολογικό υλικό

Το ολικό αίμα που χρησιμοποιήθηκε για τις αναλύσεις γενικής αίματος, το πλάσμα για τις μετρήσεις των ειδικών για αλλεργιογόνα IgE, καθώς και τα μονοπύρηνά κύτταρα του περιφερικού αίματος (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMCs) που χρησιμοποιήθηκαν για την ex vivo μελέτη των ανοσολογικών παραμέτρων προήλθαν από νεογνά, βρέφη, παιδιά και ενήλικες ηλικίας 0-45 ετών. Τα άτομα αυτά γεννήθηκαν ή προσήλθαν στις κλινικές και τα εξωτερικά ιατρεία των συνεργαζόμενων για την πραγματοποίηση της μελέτης νοσοκομείων, Παιδών «Π. & Α. Κυριακού» και Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου «Αττικών». Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν κατόπιν γραπτής και προφορικής ενημέρωσης από τους ιατρούς της μελέτης και έγγραφης συγκατάθεσης των δοτών ή των γονέων- κηδεμόνων τους και αφού η μελέτη έλαβε έγκριση από τις Επιτροπές Ηθικής και Δεοντολογίας των ανωτέρω νοσοκομείων.

Μετά την απομόνωση και καλλιέργεια των PBMCs παρουσία διαφόρων TLR αγωνιστών και τη λήψη των υπερκείμενων των καλλιεργειών για τη μελέτη των ανοσολογικών παραμέτρων, το γενετικό υλικό που προήλθε από τα PBMCs διατηρήθηκε στους -80° C για μελλοντικές γονιδιακές μελέτες. Η φύλαξη του γενετικού υλικού επίσης πραγματοποιήθηκε κατόπιν έγκρισης από τις Επιτροπές Ηθικής και Δεοντολογίας των συνεργαζόμενων νοσοκομείων και έγγραφης συγκατάθεσης των δοτών ή των γονέων- κηδεμόνων τους.

3.1.2 Αναλώσιμα - Αντιδραστήρια - Λοιπά υλικά

Για τη φλεβοκέντηση χρησιμοποιήθηκαν πεταλούδες BD Vacutainer® Safety-Lok™ Blood Collection Set από την εταιρεία Becton, Dickinson and Company (USA). Για τη συλλογή ολικού αίματος για τις αναλύσεις γενικής αίματος περιέκτες με αντιπηκτικό EDTA WEGO της εταιρείας Weigao Group Medical Polymer Company Limited (China), ενώ για τη συλλογή

ολικού αίματος για την απομόνωση PBMCs και πλάσματος χρησιμοποιήθηκαν περιέκτες φλεβικού αίματος των 10ml με αντιπηκτικό ηπαρίνη λιθίου (venous blood collection tubes with lithium heparin, BD Vacutainer 367526) της εταιρείας Becton, Dickinson and Company (USA).

Για τις κυτταροκαλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αναλώσιμα:

- Ορολογικές πιπέτες των 5, 10 & 25 ml, αποστειρωμένες και συσκευασμένες ανά μία από την Corning Incorporated, Costar (USA), Cat. No 4051, 4101 & 4251, αντίστοιχα.
- Σωλήνες πολυπροπυλενίου των 15 & 50 ml, αποστειρωμένοι, με διαβάθμιση και κωνικό πάτο Cellstar Tubes από την Greiner Bio-One (Austria), Cat. No 188271 & 227261, αντίστοιχα.
- Πλάκες καλλιέργειών 48 θέσεων Costar 3548 από την Corning Incorporated, Costar (USA).
- Σωληνίσκοι πολυπροπυλενίου eppendorf 1.7ml (nuclease-free, pyrogen-free, clear) από την Greiner Bio-One (Austria), Cat. No 616201.

Επιπλέον, για τις κυτταροκαλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια και λοιπά υλικά:

- Το διάλυμα φυκόλης (Biocoll separating solution 1.077g/ml) για την απομόνωση των PBMCs από την εταιρεία Biochrom AG (Germany).
- Το θρεπτικό υλικό RPMI-1640 supplement με 25 mM HEPES και L-Glutamine από την Gibco, Invitrogen (USA). Για την παρασκευή του πλήρους θρεπτικού υλικού για τις καλλιέργειες, εκτός του RPMI-1640, χρησιμοποιήθηκαν 10ml/L διαλύματος Penicillin-Streptomycin (τελική συγκέντρωση: 100IU/ml Penicillin και 100μg/ml Streptomycin), 50μl/L 1M β-mercaptoethanol (τελική συγκέντρωση: 50 μM), 20ml/L L-Glutamine + MEM Vitamin (10ml L-Glutamine + 10 ml MEM Vitamin, Final Concentration: 1% L-Glutamine 200mM, 1% MEM Vitamin), 20ml/L μη απαραίτητα αμινοξέα (10ml Non Essential aminoacids + 10 ml Sodium Pyruvate, τελική συγκέντρωση: 1% Non Essential aminoacids, 1% Sodium Pyruvate) και 10% εμβρυϊκός βόειος ορός (Fetal Bovine Serum, FBS) από την Sigma-Aldrich (USA).
- Το Trypan Blue Solution 0.4% για τη μέτρηση των κυττάρων μετά την απομόνωσή τους, ώστε να υπολογίζεται κάθε φορά ο αριθμός κυττάρων που θα τεθεί σε καλλιέργεια καθώς και να μπορεί να εκτιμηθεί η βιωσιμότητά τους, από την εταιρεία Sigma-Aldrich (USA).

- Οι παρακάτω διεγέρτες (αγωνιστές) των TLR υποδοχέων:
 - Polyinosinic-polycytidylic acid (Poly:IC, τελική συγκέντρωση 20μg/ml), συνθετικό ανάλογο του dsRNA, προσδένεται και διεγείρει τον υποδοχέα TLR3, από τη Sigma-Aldrich (USA).
 - Resiquimod (R848, τελική συγκέντρωση 4μg/ml), που ανήκει στην οικογένεια των ιμιδαζοκινολινών και λειτουργεί ως αγωνιστής των υποδοχέων TLR 7 και 8, από την InvivoGen (USA).
 - Lipopolysaccharide από E.Coli 0111:B4 (LPS, τελική συγκέντρωση 1μg/ml), μία ενδοτοξίνη που αποτελεί βασικό συστατικό του τοιχώματος των Gram αρνητικών βακτηρίων και ενεργοποιεί το σύμπλεγμα CD14/TLR4/MD2, από τη Sigma-Aldrich (USA).
- Το διάλυμα Lysis Buffer RP1 για τη φύλαξη στους -80° C του γενετικού υλικού που προέκυψε μετά τις κυτταροκαλλιέργειες και αφού ελήφθησαν τα υπερκείμενά τους από την εταιρεία Machery-Nagel GmbH & Co.KG (Germany).

Τα αντισώματα και λοιπά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση με ανοσοενζυμική μέθοδο με τη χρήση της τεχνολογίας Luminex των κυτταροκινών IFN-α2, IL-12p70, TNF-α, IL-1β, IL-10, IP-10, MCP-3, MIP-1β, MDC, IL-33, IL-23, IL-27, IL-28A και IFN-γ στα υπερκείμενα των καλλιεργειών των PBMCs προήλθαν από τα Milliplex Map Kits Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel (HCYTOMAG-60K) και Human Th17 Magnetic Bead Panel (HTH17MAG) της Millipore Corporation (USA).

Τέλος, για την πραγματοποίηση των δερματικών δοκιμασιών νυγμού (Skin Prick Tests, SPT), για την εκτίμηση της ευαισθητοποίησης στους συμμετέχοντες στη μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν τα εκχυλίσματα αλλεργιογόνων Alyostal: *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, cat dander, *Alternaria alternata*, Cockroach, 5 grasses mix, *Olea europaea*, *Parietaria officinalis*, egg white, καθώς και ισταμίνη 10% και φυσιολογικός ορός της Stallergenes, France. Στους ασθενείς που χρειάστηκε, βάσει ιστορικού, έλεγχος επιπλέον αλλεργιογόνων, χρησιμοποιήθηκαν επίσης εκχυλίσματα Alyostal. Στις περιπτώσεις που η ατοπία εκτιμήθηκε με μέτρηση των ειδικών IgE με τον αναλυτή IMMULITE® 2000 immunoassay system (Siemens, Germany) ή με τη μέθοδο ImmunoCap (Phadia AB, Sweden) χρησιμοποιήθηκαν τα αντίστοιχα αντιδραστήρια των εταιρειών.

3.2 Όργανα

- Οι καλλιέργειες των PBMCs πραγματοποιήθηκαν στο στείρο περιβάλλον του Laminar Flow II Microsafe SL Hood της Microflow (UK).
- Για τις επωάσεις των κυτταροκαλλιεργειών χρησιμοποιήθηκαν θερμοστατούμενοι κλίβανοι με 5% CO₂ της Forma Scientific Inc (USA).
- Οι παρατηρήσεις- μετρήσεις των κυττάρων έγιναν σε διοφθαλμικό μικροσκόπιο Carl Zeiss Kf2 πάνω σε πλάκα Neubauer.
- Η διατήρηση των υπερκείμενων των κυτταροκαλλιεργειών και του γενετικού υλικού έγινε σε βαθιά κατάψυξη στους -80° C σε καταψύκτες ULT Freezer της Forma Scientific Inc (USA).
- Οι φυγοκεντρήσεις πραγματοποιήθηκαν στην οριζόντια ψυχόμενη φυγόκεντρο τεσσάρων βραχιόνων 5415R της Eppendorf (Germany). Οι φυγοκεντρήσεις των σωληνίσκων eppendorf (όγκοι <1.7 ml) πραγματοποιήθηκαν στη μικροφυγόκεντρο 5804R της Eppendorf (Germany).
- Για τις μετρήσεις των ειδικών IgE χρησιμοποιήθηκαν οι αναλυτές IMMULITE® 2000 immunoassay system (Siemens, Germany) & Phadia 100 (ThermoFisher Scientific/Phadia AB, Sweden).
- Οι μετρήσεις των λευκοκυτταρικών πληθυσμών έγιναν στους αιματολογικούς αναλυτές XE-5000 και XT-1800i της εταιρείας Sysmex Corporation (Japan).
- Οι μετρήσεις των επιπέδων των κυτταροκινών στα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιεργειών έγιναν με τη χρήση τεχνολογίας Luminex, στο μηχάνημα Luminex® 200™ (Luminex Corporation, Austin, TX, USA).
- Για την αξιολόγηση της αναπνευστικής λειτουργίας στους ασθενείς με υποψία αναπνευστικής αλλεργίας πραγματοποιήθηκε σπιρομέτρηση, κατά την οποία χρησιμοποιήθηκε το σπιρόμετρο MIR Spirolab II της εταιρείας MIR (Italy).

3.3 Λογισμικό

Οι μετρήσεις των επιπέδων των κυτταροκινών στα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιεργειών έγιναν με τη χρήση του Luminex® 200™ System with xPONENT® Software της Invitrogen, LIFE technologies.

Η στατιστική ανάλυση και τα γραφήματα πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση των στατιστικών προγραμμάτων R (R Foundation for Statistical Computing).

4. ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 ΚΛΙΝΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Η παρούσα διατριβή βασίζεται σε μία συγχρονική (cross-sectional) διαστρωματοποιημένη μελέτη πληθυσμού ασθενών-μαρτύρων (case-control), για τον χαρακτηρισμό της ωρίμανσης της ανοσιακής απόκρισης. Ο πρωταρχικός στόχος της συγχρονικής διαστρωματοποιημένης πληθυσμιακής μελέτης ήταν η περιγραφή παραμέτρων της μη ειδικής ανοσιακής απάντησης σε φυσιολογικά άτομα από τη γέννηση μέχρι την ενηλικίωση. Παράλληλα, εξετάστηκε η επίδραση της ατοπίας στη διαδικασία της ωρίμανσης, με τη μελέτη των ίδιων ανοσολογικών παραμέτρων σε ατοπικούς-αλλεργικούς ασθενείς, αντίστοιχης ηλικίας και φύλου με τους υγιείς και σύγκριση μεταξύ των δύο ομάδων. Τέλος, μέσω καταγραφής και σύγκρισης επιδημιολογικών δεδομένων, ιδίως δε αυτών που αφορούσαν τον επιπολασμό των ιογενών λοιμώξεων μεταξύ των δύο ομάδων, επιχειρήθηκε η αναγνώριση παραμέτρων της μη-ειδικής ανοσιακής ωρίμανσης ως παραγόντων κινδύνου για αυξημένη ευαισθησία σε λοιμώξεις.

4.1.1 Πληθυσμός της μελέτης

Στη συγχρονική μελέτη συμμετείχαν άτομα Καυκάσιας φυλής διαφόρων ηλικιών, τα οποία νοσηλεύονταν ή προσήλθαν σε τακτικά ιατρεία των συνεργαζόμενων κέντρων για προγραμματισμένη κλινική εξέταση, προληπτικό έλεγχο ή μικροεπέμβαση. Συνεργαζόμενα κέντρα ήταν το Νοσοκομείο Παιδών «Π. & Α. Κυριακού» (Μονάδα Αλλεργιολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας, Παιδιατρική Κλινική, ΩΡΛ Κλινική) και το Νοσοκομείο «Αττικόν» (Μονάδα Νεογνών και Παιδιατρική Κλινική). Η μελέτη έλαβε έγκριση από τα επιστημονικά συμβούλια των ανωτέρω νοσοκομείων, αριθμοί πρωτοκόλλου 21826/26-11-2012 και ΕΒΔ 528/10-10-13, αντίστοιχα.

Καταρχάς, πραγματοποιήθηκε διαστρωμάτωση του πληθυσμού ως προς την ηλικία. Κατεβλήθη προσπάθεια ώστε σε κάθε ηλικιακή ομάδα να ενταχθούν τουλάχιστον 6 άτομα. Οι ηλικιακές ομάδες της συγχρονικής μελέτης φαίνονται στον πίνακα 4:

Νεογνά
Βρέφη 1-6 μηνών
Παιδιά 6-24 μηνών
Παιδιά 24-60 μηνών
Παιδιά 5-10 ετών
Έφηβοι 10-18 ετών
Ενήλικες >18 ετών

Πίνακας 4

Οι ηλικιακές ομάδες της συγχρονικής μελέτης

Κριτήρια αποκλεισμού από τη μελέτη ήταν τα ακόλουθα:

1. Υποκείμενο χρόνιο νόσημα, εκτός από αλλεργικές παθήσεις
2. Χρόνια λήψη φαρμακευτικής αγωγής
3. Ανοσοθεραπεία
4. Οξεία λοίμωξη ή άλλη οξεία νόσος ή εμβολιασμός εντός των τελευταίων 4 εβδομάδων
5. Πρόσφατη (<4 εβδομάδες) λήψη φαρμάκων που επηρεάζουν την ανοσιακή απάντηση (συστηματικά κορτικοστεροειδή και ανοσοκατασταλτικά φάρμακα)
6. Κάπνισμα
7. Ειδικά για τα νεογνά: προωρότητα <36 εβδομάδες, ενδείξεις δυστροφίας ή λοίμωξης κατά τη διάρκεια της ενδομήτριας ζωής ή εμφανείς συγγενείς ανωμαλίες κατά τον τοκετό

Περαιτέρω διαστρωμάτωση έγινε ως προς την παρουσία αλλεργικής νόσου, έτσι ώστε τα μισά δείγματα προήλθαν από «φυσιολογικό πληθυσμό» και τα υπόλοιπα από ατοπικά- αλλεργικά άτομα. Κατεβλήθη προσπάθεια ώστε να υπάρχει ισορροπία αρρένων/θηλέων στις επιμέρους ομάδες, καθώς επίσης και αρμονική συλλογή δειγμάτων ανά εποχές.

4.1.2 Κλινική εκτίμηση ως προς την παρουσία ατοπίας - αλλεργικού νοσήματος

Τα άτομα που παρουσίαζαν κλινικά συμπτώματα συμβατά με αλλεργικό νόσημα (αλλεργική ρινίτιδα, βρογχικό άσθμα, τροφική αλλεργία, ατοπική δερματίτιδα) και αντίστοιχες/συμβατές με το νόσημα IgE ευαισθητοποιήσεις χαρακτηρίστηκαν ως αλλεργικά. Πιο συγκεκριμένα, η διάγνωση της ατοπικής δερματίτιδας βασίστηκε στο ιστορικό της χρόνιας ή χρονίως υποτροπιάζουσας κνησμώδους δερματοπάθειας και την παρουσία δερματικών βλαβών χαρακτηριστικού τύπου και κατανομής, σύμφωνα με τα αναθεωρημένα κριτήρια των Hanifin και Rajka [317]. Η διάγνωση της αλλεργικής ρινίτιδας έγινε σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της ARIA (Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma organisation) [318] και του άσθματος σύμφωνα με τους ορισμούς της ICON (International Consensus on pediatric asthma) και της GINA (Global Initiative for Asthma) [319, 320]. Η διάγνωση της τροφικής αλλεργίας βασίστηκε στο ιστορικό αμέσου τύπου αντίδρασης σε ένα ή περισσότερα τρόφιμα σε συνδυασμό με αντίστοιχη IgE ευαισθητοποίηση ή/και θετική δοκιμασία πρόκλησης. Ο έλεγχος της αλλεργικής ευαισθητοποίησης πραγματοποιήθηκε με SPT σε 8 κοινά για τον Ελλαδικό χώρο εκχυλίσματα αεροαλλεργιογόνων (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, cat dander, *Alternaria alternata*, Cockroach, 5 grasses mix, *Olea europaea*, *Parietaria officinalis*), καθώς και σε ασπράδι αυγού. Σε κάποιες περιπτώσεις διενεργήθηκαν συμπληρωματικά SPT, καθοδηγούμενα από το κλινικό ιστορικό. Η ισταμίνη (10 mg/ml) και ο φυσιολογικός ορός χρησιμοποιήθηκαν ως θετικός και αρνητικός μάρτυρας, αντίστοιχα και το τεστ θεωρήθηκε θετικό όταν η μέγιστη διάμετρος του προκαλούμενου πομφού ήταν $\geq 3\text{mm}$ [321]. Στους δότες που δεν πραγματοποιήθηκαν SPT λόγω αδυναμίας συνεργασίας, εκτεταμένων εκζεματικών βλαβών ή λήψης αντισταμινικών, ο έλεγχος των ευαισθητοποιήσεων έγινε με μέτρηση των sIgE με τον αναλυτή IMMULITE® 2000 ή τη μέθοδο ImmunoCap. Τιμές >0.35 kU/L θεωρήθηκαν θετικές. Τέλος, όσον αφορά στα νεογνά ως «αλλεργικά» θεωρήθηκαν αυτά των οποίων οι γονείς (απαραιτήτως η μητέρα) έπασχαν από διαγνωσμένο από ιατρό αλλεργικό νόσημα και τουλάχιστον 1 θετικό SPT σε κάποιο από τα 9 αλλεργιογόνα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη. Ως φυσιολογικά- υγιή ορίστηκαν άτομα χωρίς ιστορικό/κλινικά ευρήματα αλλεργικής νόσου και χωρίς IgE ευαισθητοποίηση σε κάποιο εκ των 9 αλλεργιογόνων της μελέτης.

4.1.3 Εισαγωγή στη μελέτη - Καταγραφή ιστορικού - Δειγματοληψίες

Η συμμετοχή στη μελέτη έγινε μετά από ενημέρωση και ενυπόγραφη συγκατάθεση είτε του συμμετέχοντα, είτε του νόμιμου κηδεμόνα του στην περίπτωση ανηλίκων (βλέπε παραρτήματα 9.2, 9.3, 9.4).

Παράλληλα με τη λήψη ιστορικού και τη διενέργεια SPT πραγματοποιήθηκε εκτίμηση της αναπνευστικής λειτουργίας με σπιρομέτρηση, όπου υπήρχε ένδειξη. Ακολούθως, έγινε καταγραφή μιας πληθώρας επιδημιολογικών δεδομένων, βάσει τυποποιημένου ερωτηματολογίου, το οποίο περιελάμβανε μεταξύ άλλων καταγραφή συνηθειών, συνθηκών και περιβάλλοντος διαβίωσης, καθώς και του ιστορικού λοιμώξεων κατά το τελευταίο έτος (βλέπε παράρτημα 9.1). Ειδικότερα, σε ό,τι αφορούσε την καταγραφή των λοιμώξεων, δόθηκε ιδιαίτερη έμφαση στη λεπτομερή καταγραφή της εντόπισής τους ανά συστήματα, της διάρκειάς τους και επιχειρήθηκε ο διαχωρισμός τους σε βακτηριακές ή ιογενείς, βάσει του κριτηρίου της λήψης ή όχι, αντίστοιχα, αντιβιοτικής αγωγής.

Δείγματα αίματος για την εκτίμηση της ατοπίας, την ανάλυση γενικής αίματος και τη μελέτη της ανοσιακής απάντησης ελήφθησαν στα παιδιά κατά τη διάρκεια αιμοληψίας που πραγματοποιήθηκε για σκοπούς διαγνωστικούς ή προληπτικού ελέγχου. Η ποσότητα του αίματος ήταν η ελάχιστη απαιτούμενη για τον προσδιορισμό των υπό έρευνα παραμέτρων και ήταν προσαρμοσμένη στην ηλικία του ατόμου (2-3 ml σε νεογνά, 3-4 ml σε βρέφη, 4-5 ml σε παιδιά ηλικίας 2 ετών, 6-7 ml σε παιδιά ηλικίας 6 ετών, 10-15 ml σε μεγαλύτερα παιδιά και ενήλικες).

4.2 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ *ex vivo*

4.2.1 Προσδιορισμός λευκοκυτταρικών πληθυσμών

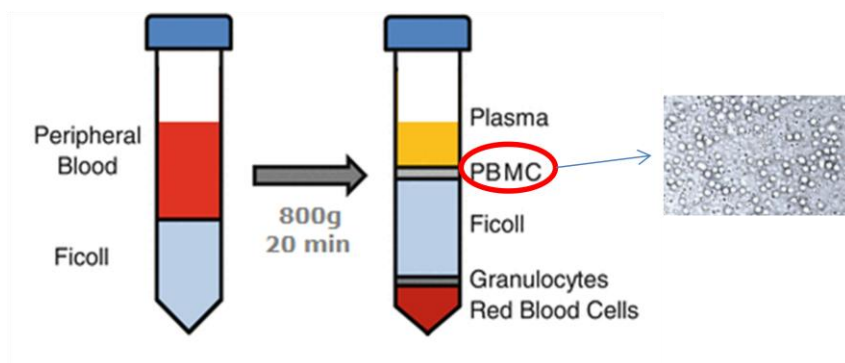
Από κάθε συμμετέχοντα στη μελέτη, υγιή ή αλλεργικό, ελήφθη δείγμα ολικού φλεβικού αίματος σε φιαλίδια με EDTA, ώστε να γίνει ανάλυση γενικής αίματος και καταγραφή, μεταξύ των υπόλοιπων παραμέτρων, του συνόλου των λευκών αιμοσφαιρίων, αλλά και του απόλυτου αριθμού καθώς και του ποσοστού % των βασικών υποπληθυσμών

του λευκοκυτταρικού διαφορικού τύπου, δηλαδή των ουδετεροφίλων, των λεμφοκυττάρων, των μονοκυττάρων, των ηωσινοφίλων και των βασεοφίλων. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τους αιματολογικούς αναλυτές ΧΕ-5000 και ΧΤ-1800i της εταιρείας Sysmex Corporation (Japan).

4.2.2 Καλλιέργεια μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMCs) παρουσία TLR διεγερτών

Από όλους τους συμμετέχοντες στη μελέτη ελήφθη δείγμα ολικού φλεβικού αίματος σε φιαλίδια με αντιπηκτικό Lithium Heparine για απομόνωση και καλλιέργεια μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος παρουσία TLR διεγερτών. Η επεξεργασία του περιφερικού αίματος γινόταν εντός 4-6 ωρών από την αιμοληψία.

Η απομόνωση των PBMCs από το δείγμα του περιφερικού αίματος πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του διαχωρισμού με φυγοκέντρηση με χρήση διαλύματος φυκόλης (εικόνα 9). Ειδικότερα, γινόταν προσεκτική επίθεση του ολικού αίματος επί του διαλύματος φυκόλης (ίσης ποσότητας με αυτήν του ολικού αίματος). Ακολουθούσε φυγοκέντρηση 800g για 20 λεπτά σε θερμοκρασία 18-20°C και κατόπιν λαμβανόταν με προσοχή η διαχωρισθείσα στιβάδα των PBMCs, που γινόταν διακριτή κάτωθεν του πλάσματος και άνωθεν της φυκόλης. Επίσης λαμβανόταν και το υπερκείμενο πλάσμα για προσδιορισμό των sIgE, όπου αυτό χρειαζόταν.



Εικόνα 9

Απομόνωση των PBMCs από το δείγμα του περιφερικού αίματος με τη μέθοδο του διαχωρισμού με φυγοκέντρηση με χρήση διαλύματος φυκόλης

Peripheral blood: περιφερικό αίμα, ficoll: διάλυμα φυκόλης, plasma: πλάσμα, granulocytes: πολυμορφοπύρηννα, red blood cells: ερυθρά αιμοσφαίρια

Ακολουθούσε πλύση των απομονωθέντων PBMCs, με διάλυση αυτών σε 40 ml RPMI και φυγοκέντρηση 350g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 8 °C και στη συνέχεια τα κύτταρα διαλύονταν εκ νέου σε 2 ml πλήρους θρεπτικού υλικού για καλλιέργειες. Ακολούθως γινόταν μέτρηση των κυττάρων και εκτίμηση της βιωσιμότητάς τους, κατόπιν χρώσης με Trypan Blue (10μL κυτταρικού διαλύματος αναμιγνύονταν με 90 μL Trypan Blue). Τελικώς, με βάση τις μετρήσεις, υπολογιζόταν η ποσότητα του καλλιεργητικού μέσου που απαιτείτο, ώστε να επιτευχθεί διάλυμα κυτταρικής συγκέντρωσης 1.5×10^6 PBMCs/ml.

Για την καλλιέργεια των κυττάρων χρησιμοποιούνταν πλάκες καλλιεργείων 48 θέσεων (wells), όπου ποσότητα κυτταρικού διαλύματος 500 μL ανά well αναμιγνυόταν με 10 μL ανά well:

- πλήρους καλλιεργητικού μέσου (αρνητικός μάρτυρας)
- Poly:IC (stock 1mg/ml) (τελική συγκέντρωση 20μg/ml)
- R848 (stock 0.2mg/ml) (τελική συγκέντρωση 4μg/ml)
- LPS (stock 0.05mg/ml) (τελική συγκέντρωση 1μg/ml).

Οι ανωτέρω συνθήκες διέγερσης ετίθεντο εις διπλούν.

Ακολουθούσε επώαση των κυττάρων σε επωαστικό κλίβανο, σε συνθήκες θερμοκρασία 37°C και 5% CO₂ για 24 ώρες και εν συνεχεία συλλογή των υπερκείμενων των κυτταροκαλλιεργείων. Ειδικότερα, μετά τη συλλογή των κυτταρικών διαλυμάτων από κάθε θέση της καλλιεργητικής πλάκας ακολουθούσε φυγοκέντρηση σε μικροφυγόκεντρο σε 300g για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, προς διαχωρισμό των υπερκείμενων των καλλιεργείων και των κυττάρων και λήψη των υπερκείμενων με προσεκτική αναρρόφηση. Τα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιεργείων αποθηκεύονταν στους -80°C έως τις μετρήσεις των ανοσολογικών παραμέτρων. Επίσης, τα κύτταρα τα οποία είχαν απομείνει μετά τη συλλογή των υπερκείμενων αποθηκεύονταν ομοίως στους -80°C, μετά από ομογενοποίησή τους με το διάλυμα RP1.

4.2.3 Προσδιορισμός κυτταροκινών στα υπερκείμενα των καλλιεργείων PBMCs με χρήση τεχνολογίας Luminex

Τα αποθηκευμένα στους -80°C υπερκείμενα των καλλιεργείων των PBMCs αποψύχονταν σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να πραγματοποιηθεί ο προσδιορισμός των επιπέδων των ακόλουθων κυτταροκινών: IFN- α 2, IL-12p70, TNF- α , IL-1 β ,

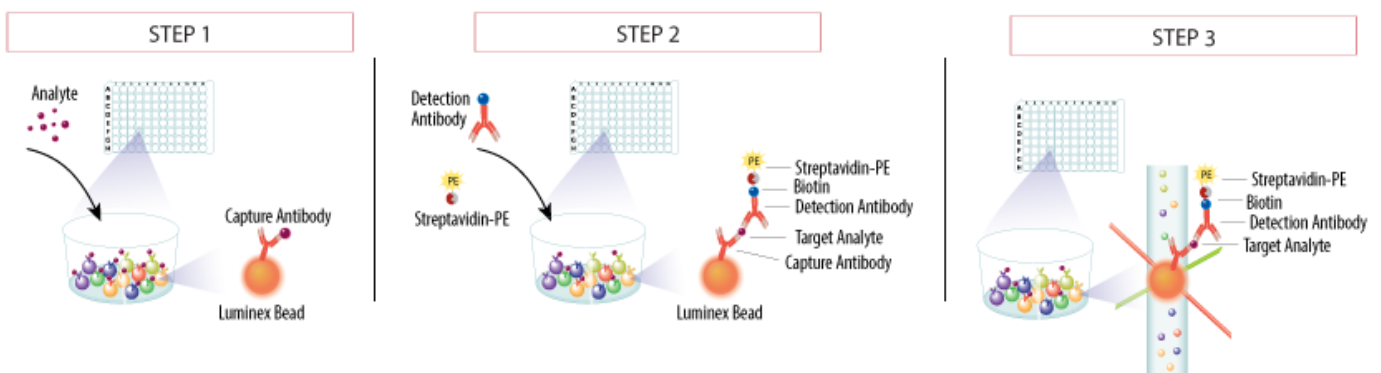
IL-10, IP-10, MCP-3, MIP-1β, MDC, IL-33, IL-23, IL-27, IL-28A και IFN-γ με χρήση τεχνολογίας Luminex.

Η συγκεκριμένη τεχνική δίνει τη δυνατότητα μέτρησης μέχρι εκατό διαφορετικών μορίων με τη χρήση πολύ μικρών όγκων δειγμάτων και συνδυάζει την ανοσοενζυμική μέθοδο sandwich ELISA με την κυτταρομετρία. Πιο συγκεκριμένα περιλαμβάνει:

- Μικροσφαιρίδια πολυστυρενίου βαμμένα με φθορίζουσες χρωστικές (beads), καθένα από τα οποία έχει συγκεκριμένο κωδικό χρώματος και φάσμα εκπομπής ακτινοβολίας (φθορίζον σήμα) που επιτρέπει την ακριβή διάκρισή του από το μηχάνημα Luminex® 200™. Με τον τρόπο αυτό καθίσταται εφικτή η ταυτόχρονη ανίχνευση περισσότερων από 100 διαφορετικών τύπων μορίων σε κάθε πηγαδάκι πλάκας 96 θέσεων. Στην επιφάνεια των μικροσφαιριδίων είναι συνδεδεμένα κατάλληλα αντιδραστήρια (αντισώματα), τα οποία δεσμεύουν ειδικά τα επιθυμητά προς μέτρηση μόρια και στη συνέχεια, με κατάλληλη φθορίζουσα χρωστική, εκπέμπουν φθορισμό σε συγκεκριμένο μήκος κύματος.
- Κυτταρόμετρο ειδικού τύπου με 2 laser και ειδικά διαμορφωμένο σύστημα οπτικής για την ποσοτική μέτρηση των διαφόρων μορίων που προσδένονται στην επιφάνεια των beads. Το ένα laser διεγείρει τη χρωστική που είναι ενσωματωμένη στα μικροσφαιρίδια, έτσι ώστε να κατηγοριοποιήσει το μικροσφαιρίδιο, ενώ το δεύτερο laser διεγείρει τη δεύτερη φθορίζουσα χρωστική (που συνδέεται με τα αντισώματα), προκειμένου να υπολογίσει την ποσότητα της προς ανάλυση ουσίας.
- Υψηλής ταχύτητας ψηφιακό ανιχνευτή του σήματος που εκπέμπεται από το σύστημα των φθορίζοντων μορίων με την επίδραση των laser του κυτταρομετρητή, ώστε να μετατρέπονται τα δεδομένα σε μετρήσιμες τιμές συγκέντρωσης.
- Ηλεκτρονικό υπολογιστή, που υπολογίζει τη συγκέντρωση της προς ανάλυση ουσίας μέσω ειδικού λογισμικού βάσει των προτύπων.

Κατά το πειραματικό της μέρος η τεχνική είναι ουσιαστικά ανοσοενζυμική μέθοδος τύπου ELISA, που όμως πραγματοποιείται παρουσία των beads και για πολλά μόρια ταυτόχρονα. Η αρχή της μεθόδου είναι ίδια με τη sandwich ELISA και περιλαμβάνει όμοια στάδια (εικόνες 10 & 11). Η κύρια διαφορά έγκειται στο ότι τα αντισώματα δέσμευσης (capture antibodies), που κατευθύνονται έναντι των μορίων που επιθυμούμε να ανιχνεύσουμε, προσδένονται πάνω στα beads. Τα συνδεδεμένα με αντισώματα δέσμευσης beads αντιδρούν με το δείγμα που περιέχει τα μόρια αυτά. Ακολουθεί μία σειρά πλύσεων

της πλάκας που πραγματοποιείται σε ειδικό μηχάνημα κενού αέρος, το οποίο αδειάζει την ειδική πλάκα της αντίδρασης από τα υγρά αντιδραστήρια από τον πάτο της, έτσι ώστε τα beads να παραμένουν στα πηγαδάκια ανέπαφα. Μετά από πλύσεις με σκοπό την απομάκρυνση πρωτεΐνης που δεν έχει δεσμευτεί από το σύμπλοκο bead – αντίσωμα δέσμησης, προστίθεται ένα μίγμα από βιοτινυλιωμένα αντισώματα ανίχνευσης (biotinylated detection antibody), προκειμένου να προκύψει το σύμπλοκο bead – αντίσωμα δέσμησης – μόριο προς ανίχνευση – αντίσωμα ανίχνευσης. Τελικώς προστίθεται στρεπταβιδίνη συζευγμένη με φθορίζουσα φυκοερυθρίνη (Streptavidin-Phycocerythrin, SA-PE) και ακολουθεί σύνδεση της στρεπταβιδίνης με τη βιοτίνη του αντισώματος ανίχνευσης (εικόνα 12). Η φυκοερυθρίνη λειτουργεί ως φθορίζον δείκτης και επιτρέπει την ποσοτικοποίηση του βιομορίου ενδιαφέροντος κατά τη διέλευσή του από τις ακτίνες laser του κυτταρομέτρου της Luminex (Luminex based reader). Πιο συγκεκριμένα, το laser κόκκινου χρώματος που εκπέμπει στα 635 nm διεγείρει τη χρωστική που είναι ενσωματωμένη στα beads, ώστε να κατηγοριοποιήσει το bead, ενώ το δεύτερο laser πράσινου χρώματος που εκπέμπει στα 532 nm διεγείρει τη φυκοερυθρίνη, παράγοντας ένα σήμα που ανιχνεύεται από τον φωτοπολλαπλασιαστή του συστήματος (Photomultiplier tube). Αυτά τα δεδομένα παραλαμβάνονται από τον υψηλής ταχύτητας ψηφιακό ανιχνευτή σήματος, ακολουθεί επεξεργασία τους με το ειδικό λογισμικό της Luminex και τελικά παρουσίασή τους στη μορφή μέσης πυκνότητας φθορίζουσας χρωστικής (MFI, Median Fluorescence Intensity). Οι τιμές αυτές, με τη χρήση της πρότυπης καμπύλης για κάθε μόριο ενδιαφέροντος, μετατρέπονται σε τιμές συγκέντρωσης, ανάλογης με την MFI του σήματος που λαμβάνεται.



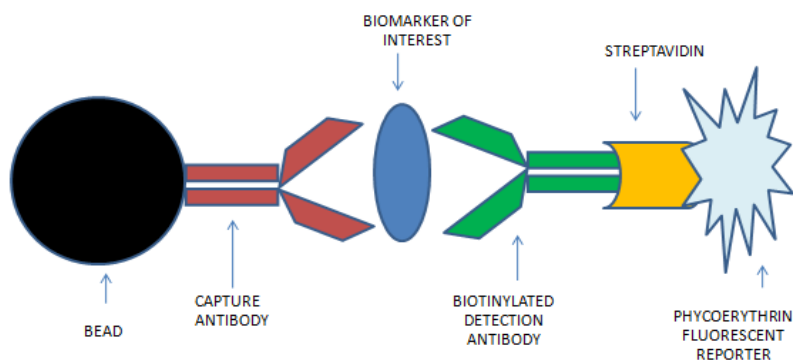
Εικόνα 10

Αρχή λειτουργίας - στάδια της τεχνικής Luminex

Prewet wells
Add beads
Wash
Add standards, controls and samples, 1hr
Wash
Add detection antibody, 30 min
Wash
Add streptavidin-PE, 10 min
Wash
Resuspend, acquire data

Εικόνα 11

Διαδοχικά βήματα κατά την πραγματοποίηση της τεχνικής Lumines



Εικόνα 12

Τελικό σύμπλοκο κατά την τεχνική Lumines

4.3 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων της κλινικής και εργαστηριακής μελέτης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της γλώσσας R.

Οι συγκρίσεις των επιδημιολογικών και κλινικών χαρακτηριστικών μεταξύ των δύο ομάδων, υγιών και αλλεργικών, έγιναν με χρήση του Wilcoxon's rank sum test για τα συνεχή δεδομένα και με το z-test για τα ποιοτικά δεδομένα (σύγκριση ποσοστών μεταξύ των ομάδων).

Για την ανάλυση των αιματολογικών και ανοσολογικών παραμέτρων, καταρχάς εκτιμήθηκε για κάθε μία η κανονικότητα της κατανομής με το Shapiro-Wilk test. Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των τιμών των κυτταροκινών των δοτών χωρίς και με διέγερση (με TLR αγωνιστές) ανά ζεύγη (unstimulated vs TLR3, TLR4 & TLR7/8), με το paired Wilcoxon's signed-rank test, ώστε να διαπιστωθεί αν υπήρξε ικανοποιητική επαγωγή της παραγωγής τους από τους TLR αγωνιστές.

Δεδομένου ότι οι τιμές δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή χρησιμοποιήθηκαν μη παραμετρικές δοκιμασίες. Ειδικότερα, ξεχωριστά για τους υγιείς και τους αλλεργικούς αξιολογήθηκε η αλληλεξάρτηση/μη παραμετρική συσχέτιση μεταξύ της ηλικίας και

- των τιμών των λευκών αιμοσφαιρίων και των υποπληθυσμών τους
- των τιμών κάθε κυτταροκίνης ξεχωριστά, για όλες τις συνθήκες των κυτταροκαλλιιεργειών (χωρίς διέγερση, κατόπιν TLR3, TLR4 & TLR7/8 διέγερσης)

με τον υπολογισμό του δείκτη συσχέτισης rho του Spearman.

Ο θετικός ή αρνητικός συντελεστής συσχέτισης υποδηλώνει αυξήσεις ή μειώσεις, αντίστοιχα, καθεμιάς αιματολογικής παραμέτρου ή κυτταροκίνης με την ηλικία, από τη γέννηση μέχρι την ενηλικίωση.

Στην ανάλυση των κυτταροκινών, προκειμένου για τα δεδομένα που αφορούσαν τις απαντήσεις μετά από TLR διέγερση, χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές που προέκυψαν από την αφαίρεση της τιμής που καταγράφηκε στο δείγμα χωρίς διέγερση (unstimulated) από την τιμή που μετρήθηκε κατόπιν διέγερσης με καθέναν από τους TLR αγωνιστές (για κάθε δότη και κάθε συνθήκη ξεχωριστά). Οι ακραίες τιμές που υπερέβαιναν τις τέσσερις τυπικές αποκλίσεις από τον μέσο όρο του δείγματος αντικαταστάθηκαν με παρακείμενες τιμές από τα υπόλοιπα δεδομένα, ενώ οι αρνητικές τιμές αντικαταστάθηκαν με μηδενικές.

Επιπλέον, για τα δεδομένα των λευκών αιμοσφαιρίων και των υποπληθυσμών τους πραγματοποιήθηκε ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης, ενώ για τα δεδομένα των κυτταροκινών πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις γραμμικής και πολυωνυμικής παλινδρόμησης, όπου η ηλικία θεωρήθηκε ανεξάρτητη μεταβλητή και οι τιμές των λευκοκυττάρων ή των κυτταροκινών εξαρτημένη. Το κατά πόσον η γραμμική ή η

πολυωνυμική ανάλυση προσεγγίζει καλύτερα το βιολογικό φαινόμενο της μεταβολής εκάστης κυτταροκίνης ανά TLR μονοπάτι με το χρόνο αξιολογήθηκε με τον προσαρμοσμένο συντελεστή R^2 .

Σε ό,τι αφορά το χαρακτηρισμό των αλλαγών με την ηλικία, πραγματοποιήθηκε, τέλος, ανάλυση των μεταβολών των λευκοκυττάρων και των υποπληθυσμών τους αλλά και των κυτταροκινών μέσω σύγκρισης των μέσων τιμών μεταξύ προκαθορισμένων, βάσει βιβλιογραφικών δεδομένων, ηλικιακών ομάδων με το Kruskal-Wallis test.

Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ υγιών και αλλεργικών όσον αφορά το αναπτυξιακό μοτίβο των λευκοκυτταρικών πληθυσμών ή των κυτταροκινών ανά TLR μονοπάτι, μέσω σύγκρισης των κλίσεων (slopes) των καμπυλών της γραμμικής παλινδρόμησης (με τη μεθοδολογία ANOVA). Για τη σύγκριση μεταξύ υγιών και αλλεργικών έγινε και διαχωρισμός των δοτών σε ηλικιακές ομάδες και αξιολογήθηκαν οι διαφορές των μέσων όρων των αιματολογικών και ανοσολογικών παραμέτρων ανά ηλικιακή ομάδα με το Wilcoxon rank-sum test.

Τέλος, για την ανάλυση των δεδομένων των λοιμώξεων του τελευταίου χρόνου στον πληθυσμό της μελέτης, πραγματοποιήθηκε καταρχάς ανάλυση μη παραμετρικής συσχέτισης (Spearman's correlation) και γραμμικής παλινδρόμησης μεταξύ ηλικίας και

- αριθμού ιογενών λοιμώξεων, ιογενών λοιμώξεων αναπνευστικού (συνολικά καθώς και ξεχωριστά ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού) και επεισοδίων γαστρεντερίτιδας
- διάρκειας των ανωτέρω λοιμώξεων

ξεχωριστά στους υγιείς και τους αλλεργικούς.

Επιπλέον και στις δύο ομάδες αξιολογήθηκαν οι μεταβολές με την ηλικία στην επίπτωση και τη συχνότητα των λοιμώξεων και μετά τη διαστρωμάτωση του πληθυσμού σε ηλικιακές ομάδες με το Kruskal-Wallis test.

Τέλος, έγινε σύγκριση των δεδομένων που αφορούσαν τις λοιμώξεις κατά το τελευταίο έτος μεταξύ υγιών και αλλεργικών με τα Wilcoxon's και Chi Squared tests.

Τιμές $p < 0.05$ θεωρήθηκαν σημαντικές.

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 ΚΛΙΝΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

5.1.1 Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης

Κατά την περίοδο Ιούνιος 2014 - Μάιος 2016 αξιολογήθηκαν περισσότερα από 500 άτομα και εντάχθηκαν στη μελέτη 163 δότες, 82 ασθενείς με αλλεργικό νόσημα/ατοπία και 81 υγιείς μάρτυρες, ηλικίας 0-80 ετών. Από αυτούς επελέγησαν τελικώς 78 δότες, 39 υγιείς-μη ατοπικοί και 39 ατοπικοί-αλλεργικοί, ηλικίας 0-45 ετών, στους οποίους πραγματοποιήθηκαν οι αναλύσεις των ανοσολογικών παραμέτρων. Η επιλογή έγινε με τέτοιο τρόπο, ώστε να υπάρχει αντιστοιχία ως προς την ηλικία, το φύλο και τα λοιπά χαρακτηριστικά μεταξύ των δύο ομάδων.

Η διαστρωμάτωση ανά ηλικία του πληθυσμού στον οποίον πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις ήταν η ακόλουθη:

ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ	ΥΓΙΕΙΣ	ΑΤΟΠΙΚΟΙ - ΑΛΛΕΡΓΙΚΟΙ
Νεογνά	3	3
Βρέφη 3-6 μηνών	3	3
Παιδιά 6-24 μηνών	6	6
Παιδιά 24-60 μηνών	7	7
Παιδιά 5-10 ετών	7	7
Έφηβοι 10-18 ετών	7	7
Ενήλικες 18-45 ετών	6	6
ΣΥΝΟΛΟ	39	39

Πίνακας 5

Διαστρωμάτωση του πληθυσμού της μελέτης ανά ηλικία και παρουσία ή μη ατοπικής νόσου

Τα κλινικά χαρακτηριστικά των δοτών, υγιών και ατοπικών-αλλεργικών παρατίθενται στον πίνακα 6.

	Υγιείς - Μη ατοπικοί	Ατοπικοί - Αλλεργικοί	P-value
Αριθμός δοτών, n	39	39	1
Ηλικία σε έτη, μέση τιμή (εύρος)	10.304 (0-43.25)	10.752 (0-45)	0.980
Φύλο (Θήλεα/Άρρενα, n)	21/18	19/20	0.656
Μητρικός Θηλασμός (% ναι)	79.5%	87.2%	0.742
Διάρκεια σε μήνες, μέση τιμή (εύρος)	2.82 (0-24)	5.564 (0-30)	0.012
Έκθεση σε καπνό στο σπίτι	61.5%	33.3%	0.012
ΜΟ τσιγάρων που καπνίζονται σπίτι (εύρος)	6.897 (0-30)	5.513 (0-40)	0.092
Διαμονή σε δρόμο μέτριας ή αυξημένης κυκλοφορίας	28.2%	43.6%	0.161
Αερόβια άσκηση >1 φορά/εβδομάδα >2 φορές/εβδομάδα (για άτομα >5 ετών, n=20 ανά ομάδα)	75% 35%	80% 50%	0.775 0.291
Κατοικίδια στο σπίτι	23.1%	23.1%	1
Γάτα ή σκύλος	12.8%	17.9%	
Υγρασία στο σπίτι	35.9%	35.9%	1
Μεγαλύτερα αδέρφια % ναι (>1)	64.1(17.9) %	61.5(15.4) %	0.818
Παρακολούθηση παιδικού σταθμού ή σχολείου (για άτομα 1 μηνός-18 ετών, n=30 ανά ομάδα)	66.7%	66.7%	1
Ατοπία στους γονείς	30.8%	69.2%	0.0005

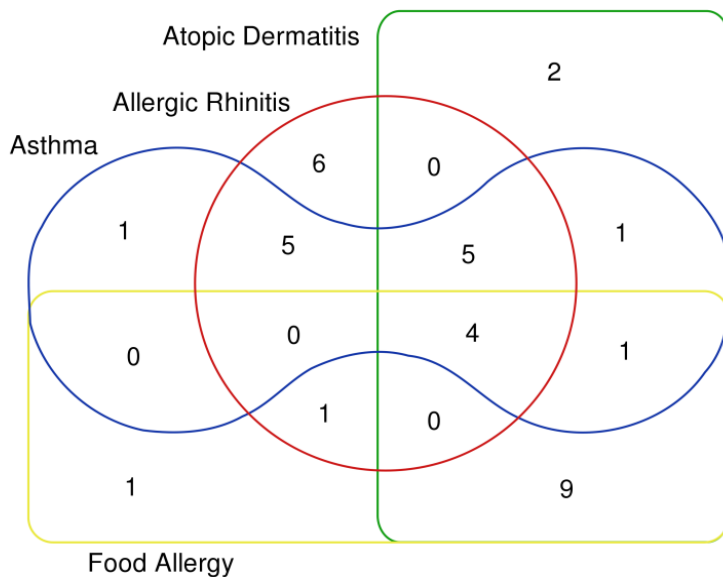
Πίνακας 6

Δημογραφικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης

Για τη σύγκριση των συνεχών δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το Wilcoxon's rank sum test και για τη σύγκριση ποσοστών μεταξύ των ομάδων το z-test.

Από τις ανωτέρω συγκρίσεις φαίνεται ότι οι δύο ομάδες της μελέτης, υγιείς και αλλεργικοί, είχαν παρόμοια δημογραφικά χαρακτηριστικά. Διαφοροποίηση, όπως και ήταν αναμενόμενο, υπήρχε στο οικογενειακό ιστορικό ατοπικής νόσου, καθώς οι αλλεργικοί είχαν σε υπερδιπλάσιο ποσοστό γονείς με ατοπία (69.2% έναντι 30.8% των υγιών). Επιπλέον, η διάρκεια του μητρικού θηλασμού ήταν μεγαλύτερη στους αλλεργικούς (5.6 μήνες έναντι 2.8 στους υγιείς), ενώ το ποσοστό των συμμετεχόντων στη μελέτη που θήλασαν ήταν παρόμοιο και στις δύο ομάδες. Τέλος, οι υγιείς εξετίθεντο σε καπνό τσιγάρου στο σπίτι σχεδόν σε διπλάσιο ποσοστό σε σχέση με τους αλλεργικούς (61.5% έναντι 33.3%), αν και ο αριθμός των τσιγάρων που καπνίζονταν κάθε μέρα στα σπίτια των εκτιθέμενων σε καπνό ήταν παρόμοιος.

Ο φαινότυπος των αλλεργικών ασθενών που περιελήφθησαν στη μελέτη συνοψίζεται στις εικόνες 13, 14 & 15 και στον πίνακα 7.

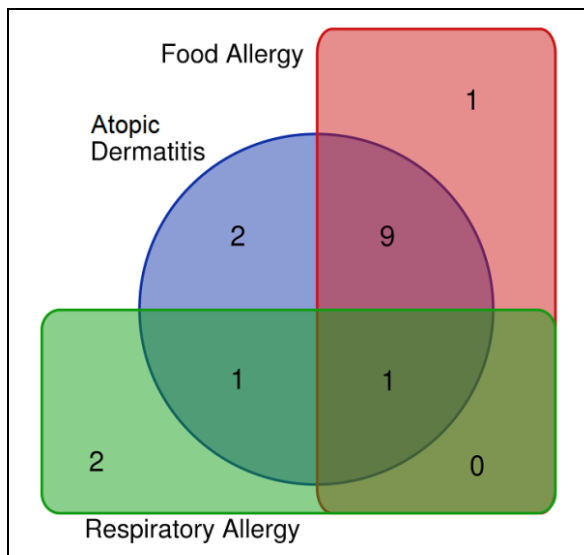


Εικόνα 13

Διάγραμμα τύπου Venn, όπου απεικονίζονται οι συνδυασμοί των αλλεργικών νοσημάτων των ατοπικών ασθενών της μελέτης, n=36 (τα νεογνά δεν περιλαμβάνονται)

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα της εικόνας 13, οι ατοπικοί ασθενείς που συμμετείχαν στη μελέτη παρουσίαζαν αλλεργική ρινίτιδα, άσθμα, ατοπική δερματίτιδα και τροφική αλλεργία, σε διάφορους συνδυασμούς. Τα πιο συχνά νοσήματα στον πληθυσμό μας ήταν η ατοπική δερματίτιδα (n=22) και η αλλεργική ρινίτιδα (n=21). Η πρώτη

συνυπήρχε συχνότερα με τροφική αλλεργία, ιδίως στα βρέφη και τα μικρά παιδιά. Στα μεγαλύτερα παιδιά και τους ενήλικες συχνότερο νόσημα ήταν η αλλεργική ρινίτιδα. Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα της εικόνας 14, τα βρέφη και τα μικρά παιδιά <5 ετών έπασχαν κατεξοχήν από ατοπική δερματίτιδα και τροφική αλλεργία, ενώ μετά από αυτή την ηλικία ξεκινούσαν οι αναπνευστικές αλλεργίες, ρινίτιδα και άσθμα. Μεταξύ των ατοπικών-αλλεργικών παιδιών 2 μηνών - 5 ετών (n=16), μόνο τα 4 είχαν αναπνευστική αλλεργία, αλλεργική ρινίτιδα ή/και άσθμα. Ο νεαρότερος ασθενής με αναπνευστική αλλεργία (άσθμα ή/και ρινίτιδα) στη μελέτη μας ήταν 2.83 ετών. Μετά τον 5^ο χρόνο ζωής σχεδόν όλοι οι ασθενείς (19/20) έπασχαν από αλλεργική ρινίτιδα.



Εικόνα 14

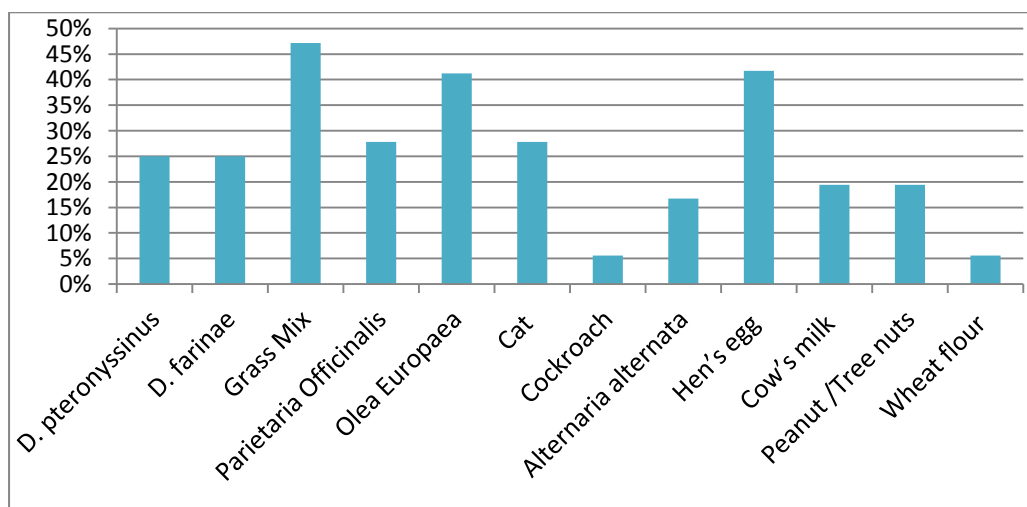
Διάγραμμα τύπου Venn, όπου απεικονίζονται οι συνδυασμοί των αλλεργικών νοσημάτων των ατοπικών ασθενών της μελέτης ηλικίας <5 ετών, n=16 (τα νεογνά δεν περιλαμβάνονται)

Όπως φαίνεται στον πίνακα 7, οι αλλεργικοί ασθενείς της μελέτης είχαν ως επί το πλείστον περισσότερες της μιας ευαισθητοποιήσεις και μάλιστα το 41.7% ήταν πολυευαισθητοποιημένοι, με θετικά SPT ή sIgE σε >4 αλλεργιογόνα. Συχνότερα απαντούμενες ευαισθητοποιήσεις στους ασθενείς με αναπνευστική αλλεργία ήταν το μίγμα γρασιδιών, ο ανθός της ελιάς, η γάτα και τα ακάρεα, ενώ σε ασθενείς με ατοπική δερματίτιδα ή τροφική αλλεργία η συχνότερη ευαισθητοποίηση ήταν το ασπράδι αβγού (πίνακας 7 & εικόνα 15).

Προφίλ ευαισθητοποίησης αλλεργικών ασθενών	%
Αριθμός ευαισθητοποιήσεων/ασθενή	
1	8.3%
2-4	39.4%
>4	41.7%
Ευαισθητοποιήσεις	
<u>Αερο-αλλεργιογόνα</u>	
Dermatophagoides pteronyssinus	25%
Dermatophagoides farinae	25%
Grass Mix	47.2%
Parietaria Officinalis	27.8%
Olea Europaea	41.2%
Cat	27.8%
Cockroach	5.6%
Alternaria alternata	16.7%
<u>Τροφικά αλλεργιογόνα</u>	
Hen's egg	41.7%
Cow's milk	19.4%
Peanut /Tree nuts	19.4%
Wheat flour	5.6%

Πίνακας 7

Προφίλ ευαισθητοποίησης ατοπικών - αλλεργικών ασθενών



Εικόνα 15

Ιστόγραμμα απεικόνισης των συχνότερων ευαισθητοποιήσεων των αλλεργικών ασθενών

5.1.2 Ανάλυση των δεδομένων καταγραφής των λοιμώξεων στον πληθυσμό της μελέτης

Όπως προαναφέρθηκε, η αρχική ανωριμότητα και η προοδευτική ωρίμανση της μη ειδικής και της επίκτητης ανοσίας έχουν συσχετιστεί με αυξημένη επιρρέπεια στις λοιμώξεις, ιδίως στην αρχή της ζωής, αλλά και με ευαισθησία σε συγκεκριμένους λοιμογόνους παράγοντες ανά ηλικιακή ομάδα. Παράλληλα, διαφορές στην ωρίμανση κάποιων λειτουργιών του ανοσοποιητικού συστήματος στους αλλεργικούς έχουν συσχετιστεί με μειωμένη αντίσταση σε ποικίλου τύπου λοιμώξεις.

Προκειμένου να διερευνηθεί το κατά πόσον στον πληθυσμό της μελέτης υπάρχουν μεταβολές στην επίπτωση, τον αριθμό και τη διάρκεια των λοιμώξεων από τη γέννηση μέχρι την ενηλικίωση, αλλά και διαφορές μεταξύ φυσιολογικών και ατοπικών- αλλεργικών ατόμων, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των δεδομένων που αφορούσαν τις ιογενείς λοιμώξεις και επιπρόσθετα τις ιογενείς λοιμώξεις του αναπνευστικού και πεπτικού συστήματος, καθώς αυτές ήταν και οι συχνότερα απαντούμενες στον πληθυσμό μας.

Καταρχάς πραγματοποιήθηκε ανάλυση μη παραμετρικής συσχέτισης (Spearman's correlation) και γραμμικής παλινδρόμησης μεταξύ ηλικίας και

- αναφερόμενου κατά το τελευταίο έτος αριθμού επεισοδίων ιογενών λοιμώξεων, ιογενών λοιμώξεων αναπνευστικού (συνολικά, καθώς και ξεχωριστά ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού) και ιογενούς γαστρεντερίτιδας
- διάρκειας των ανωτέρω λοιμώξεων (μέση διάρκεια μεγαλύτερου επεισοδίου) ξεχωριστά στους υγιείς και τους αλλεργικούς.

Όπως φαίνεται και στον πίνακα 8, όταν εξετάστηκε η μεταβολή των παραμέτρων αυτών με την ηλικία για όλο το ηλικιακό φάσμα 0-45 ετών δεν ανευρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ούτε στο φυσιολογικό πληθυσμό, ούτε στους ατοπικούς- αλλεργικούς.

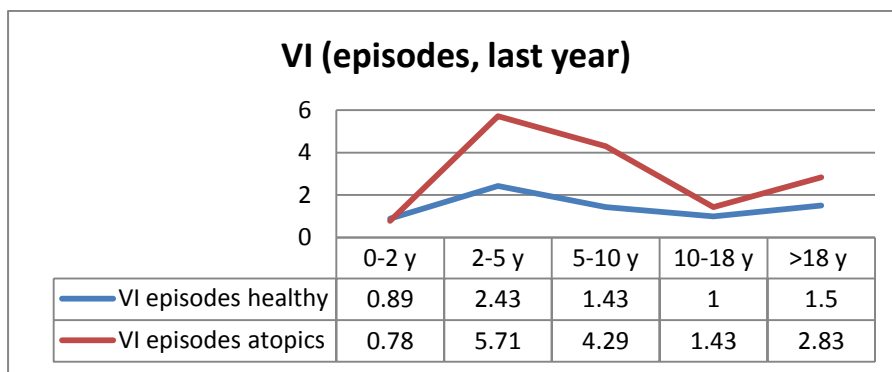
	Υγιείς		Ατοπικοί-Αλλεργικοί	
	r	p	r	p
Επεισόδια ιογενούς λοίμωξης	0.073	0.68	0.145	0.42
Μέση διάρκεια μεγαλύτερου επεισοδίου λοίμωξης	-0.033	0.85	-0.255	0.15
Επεισόδια ιογενούς λοίμωξης αναπνευστικού	-0.004	0.98	-0.174	0.33
Μέση διάρκεια μεγαλύτερου επεισοδίου λοίμωξης αναπνευστικού	-0.054	0.76	-0.260	0.14
Επεισόδια ιογενούς λοίμωξης ανώτερου αναπνευστικού	-0.038	0.83	-0.110	0.54
Μέση διάρκεια μεγαλύτερου επεισοδίου λοίμωξης ανώτερου αναπνευστικού	-0.042	0.81	-0.094	0.60
Επεισόδια ιογενούς λοίμωξης κατώτερου αναπνευστικού	0.036	0.84	-0.110	0.54
Μέση διάρκεια μεγαλύτερου επεισοδίου λοίμωξης κατώτερου αναπνευστικού	0.013	0.94	-0.193	0.28
Επεισόδια ιογενούς γαστρεντερίτιδας	0.283	0.1	0.098	0.59
Μέση διάρκεια μεγαλύτερου επεισοδίου γαστρεντερίτιδας	0.283	0.1	0.084	0.64

Πίνακας 8

Αποτελέσματα μη παραμετρικής συσχέτισης μεταξύ ηλικίας και ιογενών λοιμώξεων

Ακολούθως εξετάστηκαν οι μεταβολές στις ανωτέρω παραμέτρους των ιογενών λοιμώξεων μεταξύ προκαθορισμένων ηλικιακών ομάδων (0-2, 2-5, 5-10, 10-18, >18 ετών) με το Kruskal-Wallis test (σύγκριση μέσου όρου επεισοδίων και διάρκειας του μεγαλύτερου ανά ηλικιακή ομάδα). Όπως φαίνεται στις εικόνες 16, 17 & 18, τα περισσότερα επεισόδια ιογενούς λοίμωξης γενικά, ιογενούς λοίμωξης αναπνευστικού και ανώτερου αναπνευστικού απαντώνται στην ηλικιακή ομάδα 2-5 ετών, δηλαδή την προσχολική ηλικία, τόσο στους υγιείς, όσο και στους ατοπικούς-αλλεργικούς. Επιπρόσθετα, στην ίδια ηλικία παρουσιάζονται και τα περισσότερα επεισόδια λοίμωξης κατώτερου αναπνευστικού στους ατοπικούς. Στους υγιείς οι μεταβολές αυτές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Αντιθέτως, σημαντικές μεταβολές με την ηλικία στον αριθμό επεισοδίων κατ' έτος ιογενούς λοίμωξης γενικά, ιογενούς λοίμωξης αναπνευστικού και ιογενούς λοίμωξης ανώτερου αναπνευστικού συστήματος διαπιστώθηκαν στην ομάδα των ατοπικών-αλλεργικών ασθενών (πίνακας 9). Μάλιστα, από τις επιμέρους συγκρίσεις μεταξύ των ηλικιακών ομάδων φαίνεται ότι οι

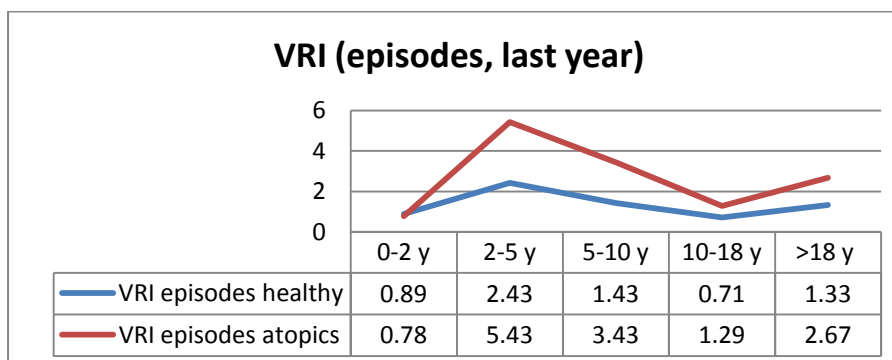
σημαντικότερες διαφορές υπήρχαν μεταξύ των ηλικιών 0-2 και 2-5 ετών προκειμένου για τις ιογενείς λοιμώξεις (0.78 έναντι 5.71 επεισόδια/έτος), μεταξύ των ηλικιών 0-2 και 2-5 ετών (0.78 έναντι 5.43 επεισόδια/έτος) και 2-5 και 10-18 ετών (5.43 έναντι 1.29 επεισόδια/έτος), προκειμένου για τις ιογενείς λοιμώξεις αναπνευστικού, καθώς και μεταξύ των ομάδων 0-2 και 2-5 ετών (0.56 έναντι 3.57 επεισόδια/έτος) και 2-5 και 10-18 ετών (3.57 έναντι 0.57 επεισόδια/έτος), προκειμένου για τις ιογενείς λοιμώξεις ανώτερου αναπνευστικού. Σε ό,τι αφορά στα επεισόδια ιογενούς γαστρεντερίτιδας, τα οποία ήταν λιγοστά στον πληθυσμό της μελέτης, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στις διάφορες ηλικίες (εικόνα 19).



Εικόνα 16

Αριθμός επεισοδίων ιογενούς λοίμωξης (μέσος όρος) ανά ηλικιακή ομάδα κατά το τελευταίο έτος σε υγιείς και ατοπικούς - αλλεργικούς

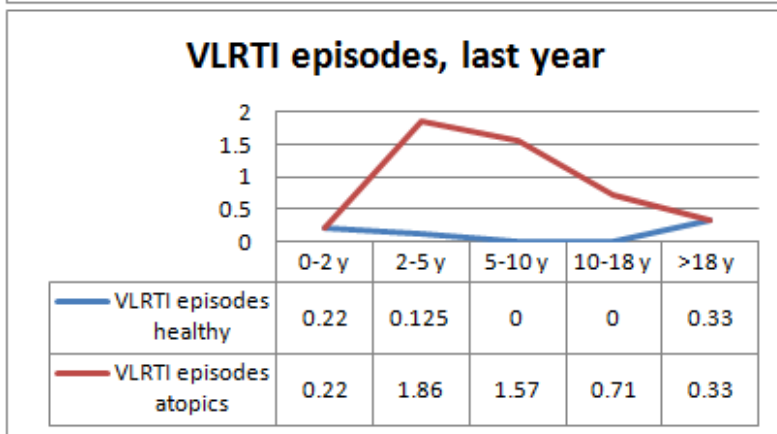
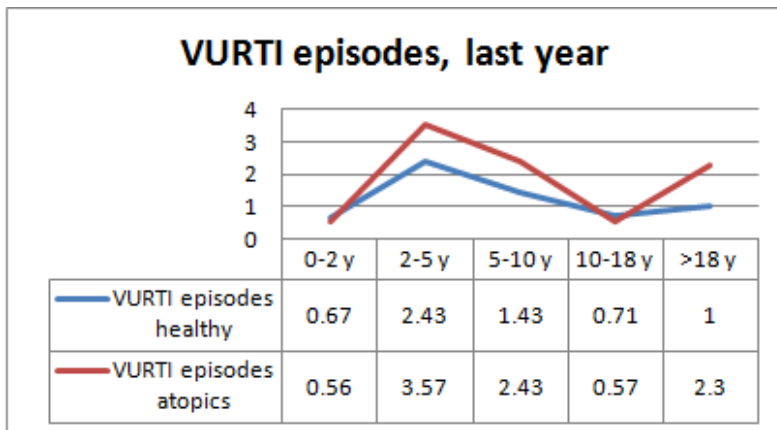
VI: viral infection (ιογενής λοίμωξη)



Εικόνα 17

Αριθμός επεισοδίων ιογενούς λοίμωξης αναπνευστικού (μέσος όρος) ανά ηλικιακή ομάδα κατά το τελευταίο έτος σε υγιείς και ατοπικούς - αλλεργικούς

VRI: viral respiratory infection (ιογενής λοίμωξη αναπνευστικού)

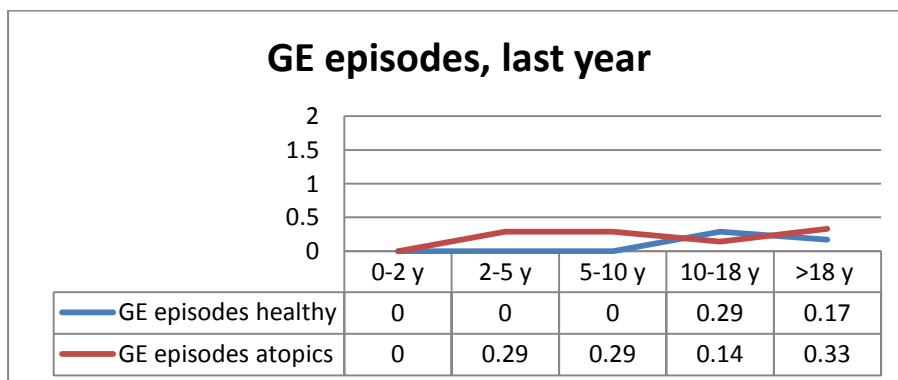


Εικόνα 18

Αριθμός επεισοδίων ιογενούς λοίμωξης ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού (μέσος όρος) ανά ηλικιακή ομάδα κατά το τελευταίο έτος σε υγιείς και ατοπικούς - αλλεργικούς

VURTI: viral upper respiratory tract infection (ιογενής λοίμωξη ανώτερου αναπνευστικού)

VLRTI: viral lower respiratory tract infection (ιογενής λοίμωξη κατώτερου αναπνευστικού)



Εικόνα 19

Αριθμός επεισοδίων ιογενούς γαστρεντερίτιδας (μέσος όρος) ανά ηλικιακή ομάδα κατά το τελευταίο έτος σε υγιείς και ατοπικούς - αλλεργικούς

	p total	0-2 vs. 2-5χ	0-2 vs. 5-10χ	0-2 vs. 10-18χ	0-2 vs. 18+χ	2-5 vs. 5-10χ	2-5 vs. 10-18χ	2-5 vs. 18+χ	5-10 vs. 10-18χ	5-10 vs. 18+χ	10-18 vs. 18+χ
Επεισόδια ιογενούς λοίμωξης	0.02	0.06	0.16	1	1	1	0.08	0.12	0.20	0.29	1
Μέση διάρκεια μεγαλύτερου επεισοδίου λοίμωξης	0.2	0.84	1	1	1	1	0.40	0.25	0.87	0.56	1
Επεισόδια ιογενούς αναπνευστικού	0.03	0.05	0.43	1	1	1	0.05	0.14	0.32	0.61	1
Μέση διάρκεια μεγαλύτερου επεισοδίου λοίμωξης αναπνευστικού	0.19	0.86	1	1	1	1	0.35	0.26	0.76	0.58	1
Επεισόδια ιογενούς λοίμωξης ανώτερου αναπνευστικού	0.05	0.05	0.44	1	1	1	0.05	0.87	0.10	1	1
Μέση διάρκεια μεγαλύτερου επεισοδίου λοίμωξης ανώτερου αναπνευστικού	0.03	0.05	0.61	1	1	1	0.03	0.57	0.43	1	1
Επεισόδια ιογενούς λοίμωξης κατώτερου αναπνευστικού	0.3	0.30	0.65	1	1	1	1	0.20	1	0.45	1
Μέση διάρκεια μεγαλύτερου επεισοδίου λοίμωξης κατώτερου αναπνευστικού	0.16	1	1	1	1	1	1	0.27	1	0.46	1
Επεισόδια ιογενούς γαστρεντερίτιδας	0.7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Μέση διάρκεια μεγαλύτερου επεισοδίου γαστρεντερίτιδας	0.67	1	0.93	1	1	1	1	1	1	1	1

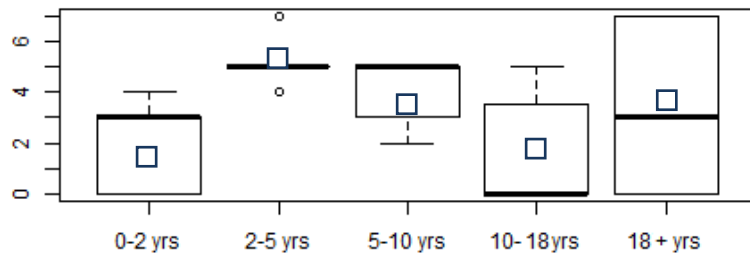
Πίνακας 9

Μεταβολές ανά ηλικιακή ομάδα σε παραμέτρους που αφορούν τις ιογενείς λοιμώξεις στους ατοπικούς - αλλεργικούς ασθενείς

Οι μεταβολές των μέσων τιμών μεταξύ προκαθορισμένων ηλικιακών ομάδων (0-2, 2-5, 5-10, 10-18, >18 ετών) αξιολογήθηκαν με το Kruskal-Wallis test.

Όσον αφορά στη διάρκεια των λοιμώξεων, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές με την ηλικία στη διάρκεια του μεγαλύτερου επεισοδίου για τους τύπους των λοιμώξεων που αξιολογήθηκαν (μέσος όρος/ηλικιακή ομάδα), με εξαίρεση τη

διάρκεια του μεγαλύτερου επεισοδίου λοίμωξης ανώτερου αναπνευστικού στους ατοπικούς (πίνακας 9, εικόνα 20). Μεγαλύτερης διάρκειας επεισόδια λοίμωξης ανώτερου αναπνευστικού σημειώθηκαν στην προσχολική ηλικία με μέση διάρκεια 5.14 μέρες, σημαντικά διαφοροποιούμενη της μέσης διάρκειας 1.44 ημερών στις ηλικίες 0-2 ετών και 1.71 ημερών στις ηλικίες 10-18 ετών.



Εικόνα 20

Μέση διάρκεια μεγαλύτερου επεισοδίου λοίμωξης ανώτερου αναπνευστικού στους ατοπικούς - αλλεργικούς ασθενείς ανά ηλικιακή ομάδα

Οι διάμεσες τιμές σημειώνονται με έντονες γραμμές και οι μέσες τιμές με □

Yrs = years (έτη)

Σημαντικές διαφορές αναδείχθηκαν κατά τη σύγκριση των αναφερόμενων ιογενών λοιμώξεων κατ' έτος μεταξύ φυσιολογικών και ατοπικών ατόμων τόσο στη σύγκριση που πραγματοποιήθηκε σε όλο το ηλικιακό φάσμα (0-45 έτη), όσο και στο υποσύνολο του παιδιατρικού πληθυσμού (0-18 έτη) (Wilcoxon's και Chi Squared tests).

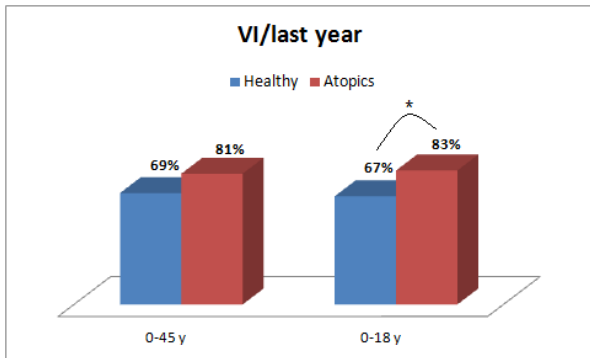
Όπως φαίνεται στον πίνακα 10 και στις εικόνες 21, 22 & 23, σημαντικές διαφορές μεταξύ υγιών και ατοπικών- αλλεργικών ατόμων βρέθηκαν:

- στη νόσηση (ποσοστό ατόμων που νόσησαν έστω μία φορά κατά το τελευταίο έτος επί του συνόλου) από ιογενή λοίμωξη στην παιδική ηλικία (67% έναντι 83%) (εικόνα 21)
- στη νόσηση από ιογενή λοίμωξη αναπνευστικού συστήματος στην παιδική ηλικία (60% έναντι 80%) (εικόνα 22)
- στη νόσηση από ιογενή λοίμωξη κατώτερου αναπνευστικού συστήματος στην παιδική ηλικία (10% έναντι 50%), αλλά και σε ολόκληρο το ηλικιακό φάσμα (11% έναντι 31%) (εικόνα 23).

	ΥΓΙΕΙΣ	ΑΤΟΠΙΚΟΙ	p	ΥΓΙΕΙΣ <18χρ	ΑΤΟΠΙΚΟΙ <18χρ	p
Νόσηση από ιογενείς λοιμώξεις τον τελευταίο χρόνο	25/36	29/36	0.10	20/30	25/30	0.03
Επεισόδια ιογενούς λοίμωξης /έτος	1.42	2.89	0.02	1.4	2.9	0.01
Μέγιστη διάρκεια ιογενούς λοίμωξης (μέρες)	3.47 (0-10)	4.61 (0-10)	0.03	3.57 (0-10)	4.87 (0-10)	0.02
Νόσηση από ιογενείς λοιμώξεις αναπνευστικού τον τελευταίο χρόνο	23/36	28/36	0.08	18/30	24/30	0.02
Επεισόδια ιογενούς λοίμωξης αναπνευστικού /έτος	1.33 (0-6)	2.61 (0-12)	0.02	1.33 (0-6)	2.6 (0-12)	0.01
Μέγιστη διάρκεια ιογενούς λοίμωξης αναπνευστικού (μέρες)	3.31 (0-10)	4.56 (0-10)	0.02	3.37 (0-10)	4.8 (0-10)	0.01
Νόσηση από ιογενείς λοιμώξεις ανώτερου αναπνευστικού τον τελευταίο χρόνο	20/36	25/36	0.17	16/30	21/30	0.11
Επεισόδια ιογενούς λοίμωξης ανώτερου αναπνευστικού /έτος	1.22 (0-6)	1.81 (0-10)	0.21	1.27 (0-6)	1.7 (0-10)	0.24
Μέγιστη διάρκεια ιογενούς λοίμωξης ανώτερου αναπνευστικού (μέρες)	2.78 (0-10)	3.03 (0-7)	0.36	2.9 (0-10)	2.97 (0-7)	0.39
Νόσηση από ιογενείς λοιμώξεις κατώτερου αναπνευστικού τον τελευταίο χρόνο	4/36	11/36	0.00	3/30	15/30	0.00
Επεισόδια ιογενούς λοίμωξης κατώτερου αναπνευστικού /έτος	0.14 (0-2)	0.92 (0-5)	0.00	0.1 (0-2)	1.03 (0-5)	0.00
Μέγιστη διάρκεια ιογενούς λοίμωξης κατώτερου αναπνευστικού (μέρες)	0.72 (0-10)	3.33 (0-14)	0.00	0.7 (0-10)	3.77 (0-14)	0.00

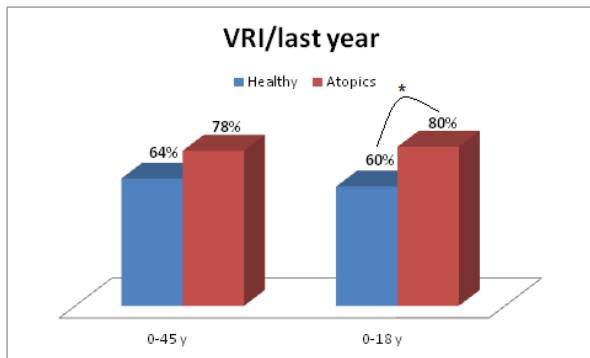
Πίνακας 10

Ιογενείς λοιμώξεις στον πληθυσμό της μελέτης κατά το τελευταίο έτος – σύγκριση μεταξύ υγιών και ατοπικών - αλλεργικών



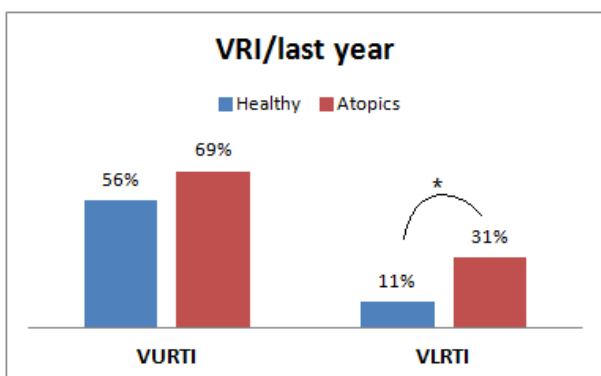
Εικόνα 21

Νόσηση από ιογενή λοίμωξη (Viral infection, VI) κατά το τελευταίο έτος σε υγιείς και ατοπικούς - αλλεργικούς



Εικόνα 22

Νόσηση από ιογενή λοίμωξη αναπνευστικού συστήματος (Viral Respiratory Infection, VRI) κατά το τελευταίο έτος σε υγιείς και ατοπικούς - αλλεργικούς



Εικόνα 23

Νόσηση από ιογενή λοίμωξη ανώτερου (Viral Upper Respiratory Tract Infection, VURTI) και κατώτερου (Viral Lower Respiratory Tract Infection, VLRTI) αναπνευστικού συστήματος κατά το τελευταίο έτος σε υγιείς και ατοπικούς - αλλεργικούς

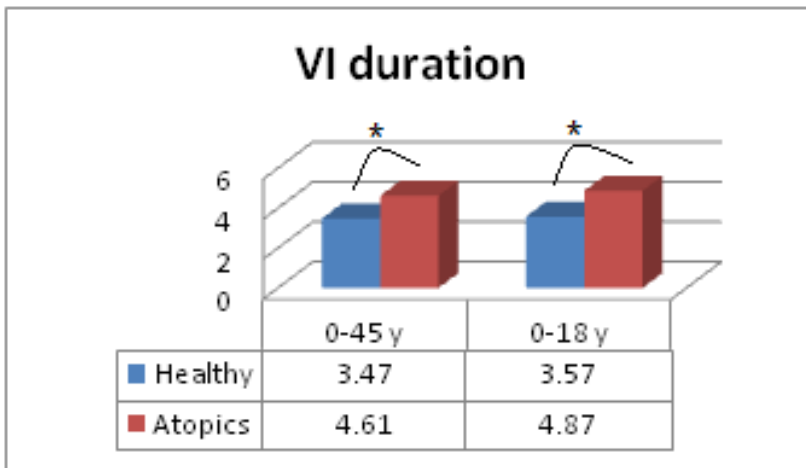
Επίσης αναδείχτηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ υγιών και ατοπικών- αλλεργικών:

- στον αριθμό (μέσο όρο) των επεισοδίων ιογενούς λοίμωξης κατά το τελευταίο έτος στην παιδική ηλικία (1.4 έναντι 2.9), αλλά και σε ολόκληρο το ηλικιακό φάσμα (1.42 έναντι 2.89)
- στον αριθμό των επεισοδίων ιογενούς λοίμωξης αναπνευστικού κατά το τελευταίο έτος στην παιδική ηλικία (1.33 έναντι 2.6), αλλά και σε ολόκληρο το ηλικιακό φάσμα (1.33 έναντι 2.61)
- στον αριθμό των επεισοδίων ιογενούς λοίμωξης κατώτερου αναπνευστικού κατά το τελευταίο έτος στην παιδική ηλικία (0.1 έναντι 1.03), αλλά και σε ολόκληρο το ηλικιακό φάσμα (0.14 έναντι 0.92).

Όπως φαίνεται και στις εικόνες 16-18, οι μεγαλύτερες αποκλίσεις στον αριθμό των επεισοδίων ιογενών λοιμώξεων μεταξύ υγιών και ατοπικών παρατηρούνται κατά κύριο λόγο στην προσχολική ηλικία, που αποτελεί και τη χρονική περίοδο έναρξης των αναπνευστικών αλλεργιών στον πληθυσμό μας.

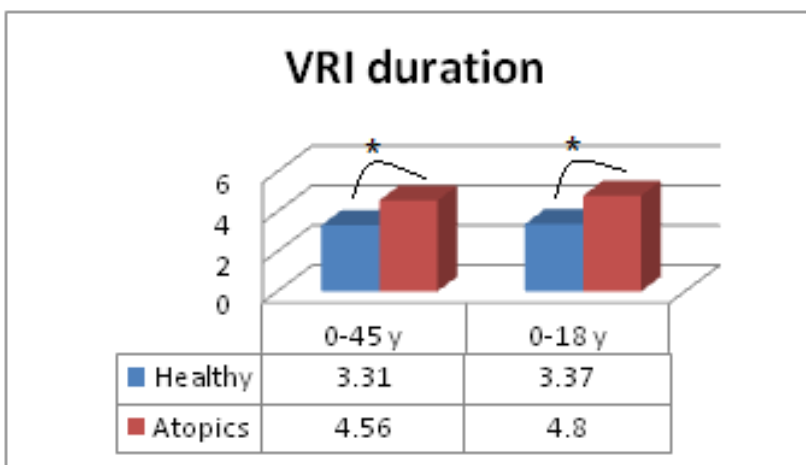
Τέλος, σημαντικές διαφορές μεταξύ υγιών και ατοπικών- αλλεργικών ατόμων, όπως φαίνεται στον πίνακα 10 και τις εικόνες 24, 25 & 26, βρέθηκαν επιπλέον:

- στη μέγιστη διάρκεια ιογενούς λοίμωξης στην παιδική ηλικία (3.57 έναντι 4.87 ημέρες), αλλά και σε ολόκληρο το ηλικιακό φάσμα (3.47 έναντι 4.61 ημέρες) (εικόνα 24)
- στη μέγιστη διάρκεια ιογενούς λοίμωξης αναπνευστικού στην παιδική ηλικία (3.37 έναντι 4.8 ημέρες), αλλά και στο σύνολο του πληθυσμού (3.31 έναντι 4.56 ημέρες) (εικόνα 25) και
- στη μέγιστη διάρκεια ιογενούς λοίμωξης κατώτερου αναπνευστικού τόσο στον παιδιατρικό (0.7 έναντι 3.77 ημέρες), όσο και στο συνολικό πληθυσμό (0.72 έναντι 3.33 ημέρες) (εικόνα 26).



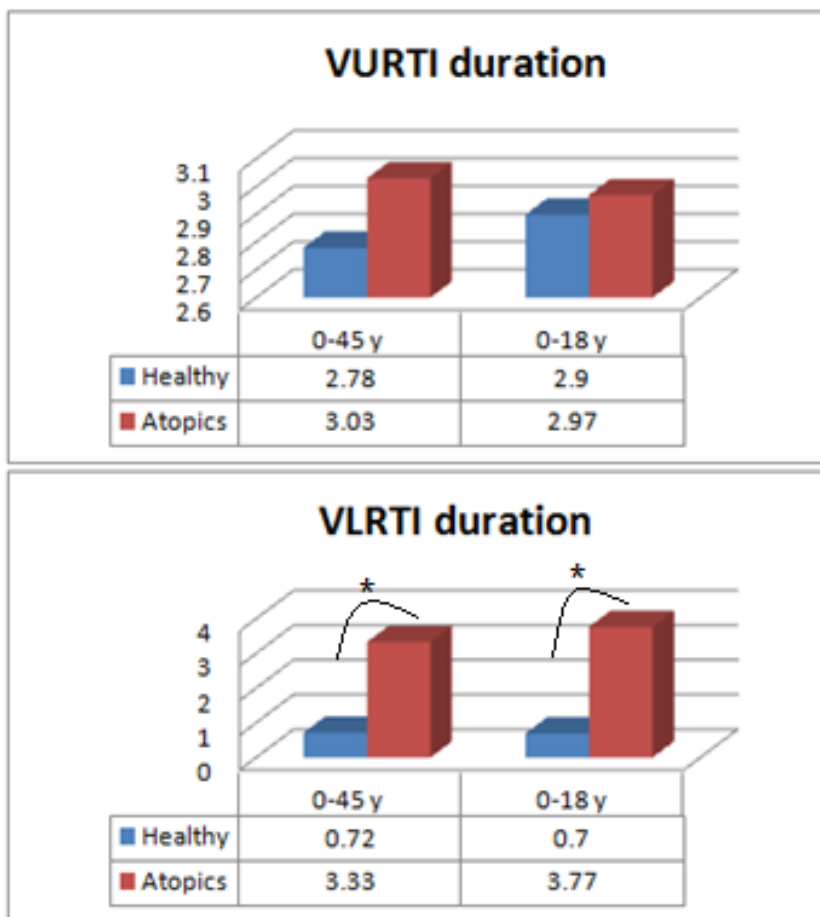
Εικόνα 24

Διάρκεια μεγαλύτερου (κατά μέσο όρο) επεισοδίου νόσησης από ιογενή λοίμωξη (Viral Infection, VI) κατά το τελευταίο έτος σε υγιείς και ατοπικούς - αλλεργικούς



Εικόνα 25

Διάρκεια μεγαλύτερου (κατά μέσο όρο) επεισοδίου νόσησης από ιογενή λοίμωξη αναπνευστικού (Viral Respiratory Infection, VRI) κατά το τελευταίο έτος σε υγιείς και ατοπικούς - αλλεργικούς



Εικόνα 26

Διάρκεια μεγαλύτερου (κατά μέσο όρο) επεισοδίου νόσησης από ιογενή λοίμωξη ανώτερου (VURTI) και κατώτερου (VLRTI) αναπνευστικού κατά το τελευταίο έτος σε υγιείς και ατοπικούς - αλλεργικούς

Αξίζει να σημειωθεί ότι στις συγκρίσεις μεταξύ ενηλίκων υγιών και ατοπικών για τις παραμέτρους των λοιμώξεων που μελετήθηκαν δεν αναδείχθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά. Ομοίως, δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές στις συγκρίσεις που αφορούσαν την ιογενή γαστρεντερίτιδα.

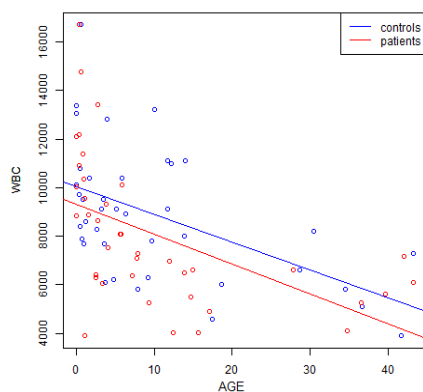
5.2 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

5.2.1 Μελέτη των μεταβολών των λευκοκυτταρικών πληθυσμών

Σε όλους τους συμμετέχοντες στη μελέτη πραγματοποιήθηκε ανάλυση γενικής αίματος και επεξεργασία των δεδομένων που αφορούσαν το συνολικό αριθμό των λευκοκυττάρων στο περιφερικό αίμα, αλλά και των κύριων υποπληθυσμών τους και συγκεκριμένα των μετρήσεων των ουδετεροφίλων, λεμφοκυττάρων, μονοκυττάρων, ηωσινοφίλων και βασεοφίλων.

Καταρχάς διερευνήθηκαν οι μεταβολές των λευκοκυττάρων και των υποπληθυσμών τους από τη γέννηση μέχρι την ενηλικίωση, με ανάλυση μη παραμετρικής συσχέτισης και γραμμικής παλινδρόμησης ξεχωριστά για τους υγιείς και τους αλλεργικούς.

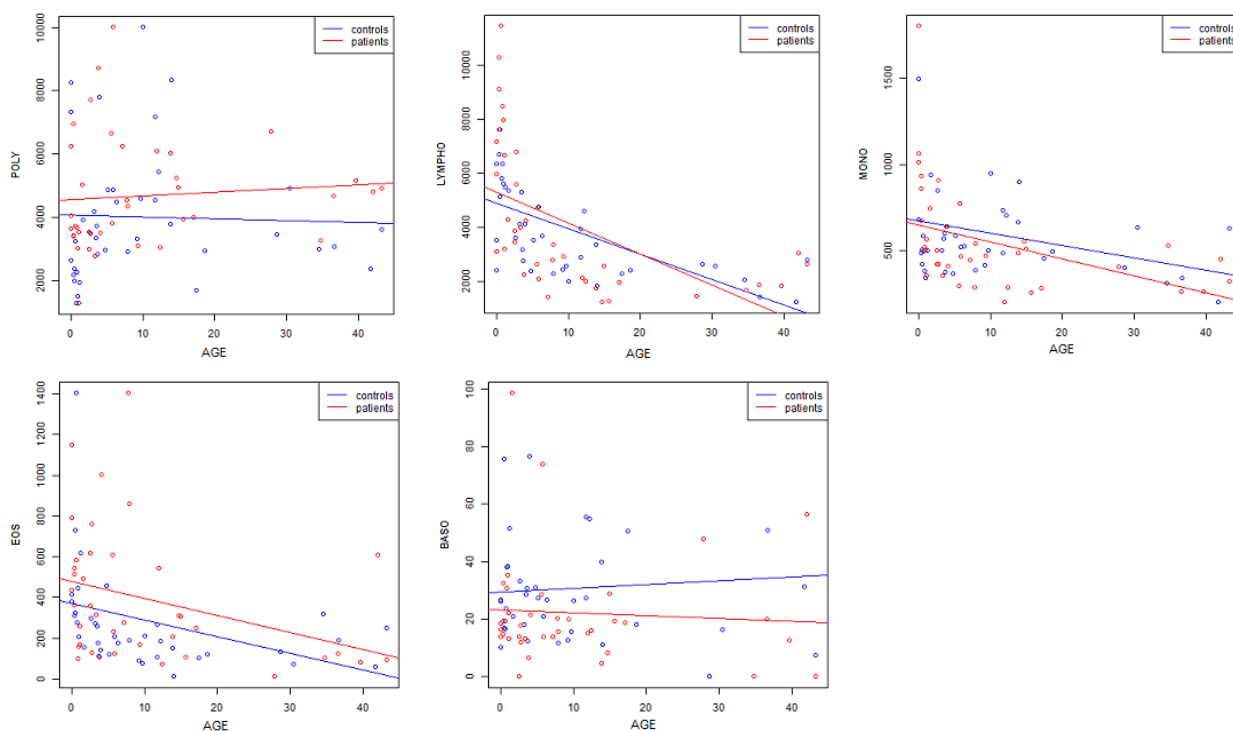
Όσον αφορά στο συνολικό αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων, παρατηρήθηκε μείωση με την ηλικία τόσο στους υγιείς ($p=0.00$, $r=-0.51$), όσο και τους ατοπικούς-αλλεργικούς ($p=0.00$, $r=-0.70$) (εικόνα 27). Ομοίως, μείωση με την ηλικία παρατηρήθηκε στον αριθμό των λεμφοκυττάρων ($p=0.00$, $r=-0.72$ στους υγιείς και $p=0.00$, $r=-0.81$ στους ατοπικούς) και των ηωσινοφίλων ($p=0.00$, $r=-0.66$ στους υγιείς και $p=0.00$, $r=-0.44$ στους ατοπικούς). Ο αριθμός των μονοκυττάρων μειώθηκε με την ηλικία μόνο στην ομάδα των ατοπικών ($p=0.00$, $r=-0.64$), ενώ δεν παρατηρήθηκε αξιόλογη μεταβολή με την ηλικία στον απόλυτο αριθμό των πολυμορφοπυρήνων και βασεοφίλων σε καμία από τις δύο ομάδες. (εικόνα 28).



Εικόνα 27

Συσχέτιση μεταξύ ηλικίας και αριθμού λευκών αιμοσφαιρίων (καμπύλη γραμμικής παλινδρόμησης)

WBC: white blood cells = λευκά αιμοσφαίρια, controls = υγιείς, patients = ατοπικοί - αλλεργικοί



Εικόνα 28

Συσχέτιση μεταξύ ηλικίας και λευκοκυτταρικών υποπληθυσμών πολυμορφοπυρήνων, λεμφοκυττάρων, μονοκυττάρων, ηωσινοφίλων και βασεοφίλων (καμπύλες γραμμικής παλινδρόμησης)

POLY: πολυμορφοπύρηνα, LYMPHO: λεμφοκύτταρα, MONO: μονοκύτταρα,

EOS: ηωσινόφιλα, BASO: βασεόφιλα

controls = υγιείς, patients = ατοπικοί - αλλεργικοί

Παρόμοια αποτελέσματα διαπιστώθηκαν και όταν αναλύθηκαν οι μεταβολές των λευκοκυττάρων και των υποπληθυσμών τους μεταξύ προκαθορισμένων, βάσει βιβλιογραφικών δεδομένων, ηλικιακών ομάδων (0-1, 1-4, 4-10, 10-18, >18 ετών) με το Kruskal-Wallis test (σύγκριση μέσων τιμών ανά ηλικιακή ομάδα). Στους πίνακες 11 και 12 φαίνονται οι διαφορές μεταξύ των ηλικιακών ομάδων στους λευκοκυτταρικούς πληθυσμούς για τους υγιείς και τους ατοπικούς, αντίστοιχα. Και στις δύο ομάδες οι μεταβολές συμβαίνουν κατά κύριο λόγο μετά τον 1^ο χρόνο ζωής, καθώς σημαντικές διαφορές απαντώνται κυρίως στις συγκρίσεις της ομάδας 0-1 ετών με κάποια/-ες από τις μεγαλύτερες σε ηλικία υπο-ομάδες, ιδίως κατά ή μετά τη σχολική ηλικία.

	ΥΓΙΕΙΣ										
	p total	0-1 vs. 1-4χ	0-1 vs. 4-10χ	0-1 vs. 10-18χ	0-1 vs. 18+χ	1-4 vs. 4-10χ	1-4 vs. 10-18χ	1-4 vs. 18+χ	4-10 vs. 10-18χ	4-10 vs. 18+χ	10-18 vs. 18+χ
Λευκά αιμοσφαίρια	0.025	1	0.508	1	0.005	1	1	0.138	1	0.440	0.194
Πολυμορφοπύρρηνα	0.153	0.766	0.126	0.178	1	1	1	1	1	1	1
Λεμφοκύτταρα	0.000	1	0.008	0.021	0.001	0.297	0.496	0.036	1	1	1
Μονοκύτταρα	0.271	1	1	1	0.728	1	1	0.265	1	1	0.2482
Ηωσινόφιλα	0.002	0.158	0.019	0.001	0.015	1	0.617	1	1	1	1
Βασεόφιλα	0.527	1	1	1	1	0.923	1	1	0.581	1	1

Πίνακας 11

Αποτελέσματα σύγκρισης λευκοκυττάρων και λευκοκυτταρικών υποπληθυσμών μεταξύ προκαθορισμένων ηλικιακών ομάδων στους υγιείς

Η σύγκριση των μέσων τιμών ανά ηλικιακή ομάδα πραγματοποιήθηκε με το Kruskal-Wallis test.

	ΑΤΟΠΙΚΟΙ - ΑΛΛΕΡΓΙΚΟΙ										
	p total	0-1 vs. 1-4χ	0-1 vs. 4-10χ	0-1 vs. 10-18χ	0-1 vs. 18+χ	1-4 vs. 4-10χ	1-4 vs. 10-18χ	1-4 vs. 18+χ	4-10 vs. 10-18χ	4-10 vs. 18+χ	10-18 vs. 18+χ
Λευκά αιμοσφαίρια	0.000	0.066	0.066	0.000	0.001	1	0.314	0.635	0.405	0.771	1
Πολυμορφοπύρρηνα	0.534	1	1	1	1	1	1	0.978	1	1	1
Λεμφοκύτταρα	0.000	0.557	0.019	0.000	0.000	0.879	0.013	0.058	0.486	1	1
Μονοκύτταρα	0.003	0.377	0.060	0.004	0.005	1	0.455	0.453	1	1	1
Ηωσινόφιλα	0.041	1	1	0.594	0.041	1	1	0.245	0.547	0.039	1
Βασεόφιλα	0.276	0.299	1	0.888	1	0.468	1	1	1	1	1

Πίνακας 12

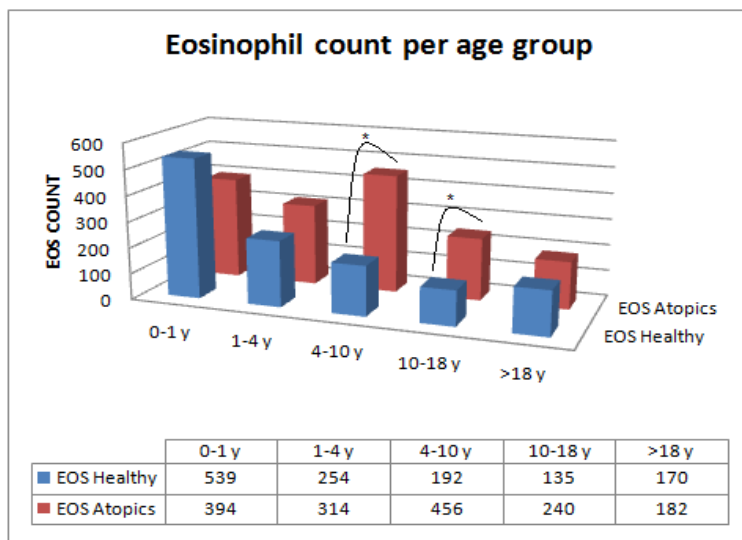
Αποτελέσματα σύγκρισης λευκοκυττάρων και λευκοκυτταρικών υποπληθυσμών μεταξύ προκαθορισμένων ηλικιακών ομάδων στους ατοπικούς - αλλεργικούς

Η σύγκριση των μέσων τιμών ανά ηλικιακή ομάδα πραγματοποιήθηκε με το Kruskal-Wallis test.

Ακολούθως διερευνήθηκαν οι διαφορές μεταξύ υγιών και ατοπικών- αλλεργικών. Όσον αφορά τη σύγκριση των αναπτυξιακών μοτίβων των λευκοκυτταρικών πληθυσμών μεταξύ γέννησης και ενηλικίωσης [διαφορά των κλίσεων (slopes) των καμπυλών της γραμμικής παλινδρόμησης], δεν αναδείχθηκαν σημαντικές αποκλίσεις μεταξύ των δύο ομάδων.

Αντιθέτως, στις συγκρίσεις των μέσων τιμών των ποικίλων αιματολογικών παραμέτρων μεταξύ υγιών και αλλεργικών ανά ηλικιακή ομάδα με το Wilcoxon rank-sum test, αναδείχθηκαν κάποιες σημαντικές διαφορές και συγκεκριμένα:

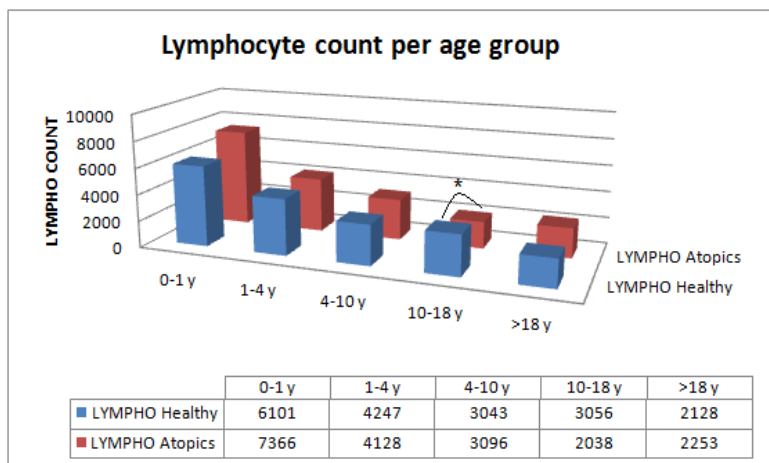
- αυξημένος αριθμός ηωσινοφίλων στους ατοπικούς- αλλεργικούς στις ηλικιακές ομάδες 4-10 ($p=0.03$) και 10-18 ετών ($p=0.05$) (εικόνα 29)
- αυξημένος αριθμός λεμφοκυττάρων ($p=0.03$) και μονοκυττάρων ($p=0.05$) στους υγιείς στην ηλικιακή ομάδα 10-18 ετών (εικόνες 30-31).



Εικόνα 29

Πληθυσμοί ηωσινοφίλων (μέσες τιμές) ανά ηλικιακή ομάδα στους υγιείς και τους ατοπικούς - αλλεργικούς

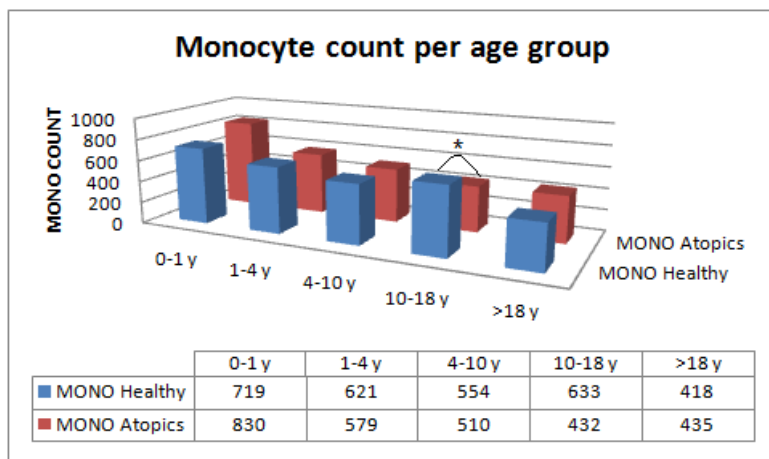
Η σύγκριση των μέσων τιμών ανά ηλικιακή ομάδα πραγματοποιήθηκε με το Wilcoxon rank-sum test.



Εικόνα 30

Πληθυσμοί λεμφοκυττάρων (μέσες τιμές) ανά ηλικιακή ομάδα στους υγιείς και τους ατοπικούς - αλλεργικούς

Η σύγκριση των μέσων τιμών ανά ηλικιακή ομάδα πραγματοποιήθηκε με το Wilcoxon rank-sum test.



Εικόνα 31

Πληθυσμοί μονοκυττάρων (μέσες τιμές) ανά ηλικιακή ομάδα στους υγιείς και τους ατοπικούς - αλλεργικούς

Η σύγκριση των μέσων τιμών ανά ηλικιακή ομάδα πραγματοποιήθηκε με το Wilcoxon rank-sum test.

5.2.2 Μελέτη των μεταβολών της βιοσύνθεσης κυτταροκινών

Από όλους τους συμμετέχοντες στη μελέτη, υγιείς και ατοπικούς-αλλεργικούς, ελήφθη δείγμα ολικού φλεβικού αίματος για απομόνωση και καλλιέργεια μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος (PBMCs) χωρίς διέγερση, καθώς και παρουσία TLR3, TLR4 και TLR7/8 διεγερτών. Στα υπερκείμενα των καλλιεργειών των PBMCs πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός των επιπέδων των ακόλουθων κυτταροκινών: IFN- α 2, IL-12p70, TNF- α , IL-1 β , IL-10, IP-10, MCP-3, MIP-1 β , MDC, IL-33, IL-23, IL-2, IL-28A και IFN- γ , με χρήση της τεχνολογίας Luminex.

Οι μετρήσεις της IL-28 ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης της Luminex στα υπερκείμενα όλων των κυτταροκαλλιεργειών (με ή χωρίς TLR διέγερση). Κατά την ανάλυση των δεδομένων των υπολοίπων κυτταροκινών, καταρχάς εκτιμήθηκε το κατά πόσον οι TLR αγωνιστές που χρησιμοποιήθηκαν κατόρθωσαν να επάγουν ικανοποιητικά την παραγωγή τους, με σύγκριση των τιμών των κυτταροκινών των δοτών χωρίς και με TLR διέγερση ανά ζεύγη (unstimulated vs TLR3, TLR4 & TLR7/8), με το paired Wilcoxon's signed-rank test. Διαπιστώθηκε ικανοποιητική επαγωγή για όλα τα μόρια, με εξαίρεση την IL-33.

Επιπρόσθετα, αξιολογήθηκε η κανονικότητα της κατανομής για κάθε κυτταροκίνη σε κάθε πειραματική συνθήκη με το Shapiro-Wilk test και δεδομένου ότι οι τιμές δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή, χρησιμοποιήθηκαν μη παραμετρικές δοκιμασίες στατιστικής ανάλυσης. Ειδικότερα, ξεχωριστά για τους υγιείς και τους αλλεργικούς αξιολογήθηκε η αλληλεξάρτηση/μη παραμετρική συσχέτιση μεταξύ της ηλικίας και των τιμών κάθε κυτταροκίνης, για όλες τις συνθήκες των κυτταροκαλλιεργειών (χωρίς διέγερση, κατόπιν TLR3, TLR4 & TLR7/8 διέγερσης), με τον υπολογισμό του δείκτη συσχέτισης rho του Spearman. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις γραμμικής και πολυωνυμικής παλινδρόμησης, όπου η ηλικία θεωρήθηκε ανεξάρτητη μεταβλητή και οι τιμές των κυτταροκινών εξαρτημένη. Το κατά πόσον η γραμμική ή η πολυωνυμική ανάλυση προσεγγίζει καλύτερα το βιολογικό φαινόμενο της μεταβολής εκάστης κυτταροκίνης ανά TLR μονοπάτι με το χρόνο αξιολογήθηκε με τον προσαρμοσμένο (adjusted) συντελεστή R-squared (r^2) και φάνηκε ότι στην πλειονότητα των περιπτώσεων η πολυωνυμική ανάλυση υπερτερεί (πίνακας 13). Επίσης, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των μεταβολών των κυτταροκινών με την ηλικία για κάθε TLR μονοπάτι, μέσω σύγκρισης των μέσων τιμών

μεταξύ προκαθορισμένων ηλικιακών ομάδων (0-2, 2-5, 5-10, 10-18, >18 ετών) με το Kruskal-Wallis test.

Feature	Healthy		Atopic	
	ar ² linear	ar ² polynomial	ar ² linear	ar ² polynomial
unstimulated.IFN-α2	0.00	0.09	0.05	0.16
R848.IFN-α2	-0.03	-0.01	0.02	0.04
pIC.IFN-α2	0.11	0.14	-0.03	0.02
LPS.IFN-α2	0.00	-0.02	-0.03	-0.01
unstimulated.IFN-γ	0.11	0.31	0.09	0.07
R848.IFN-γ	0.20	0.21	0.03	0.08
pIC.IFN-γ	0.14	0.14	-0.03	0.00
LPS.IFN-γ	0.05	0.06	-0.01	-0.01
unstimulated.IL-1β	-0.02	-0.03	-0.03	-0.05
R848.IL-1β	0.09	0.07	0.00	-0.01
pIC.IL-1β	0.09	0.16	-0.02	-0.05
LPS.IL-1β	-0.03	0.01	-0.03	0.03
unstimulated.MCP-3	0.00	-0.01	0.01	-0.02
R848.MCP-3	-0.01	-0.04	-0.03	-0.03
pIC.MCP-3	-0.02	0.00	-0.03	-0.05
LPS.MCP-3	-0.03	-0.04	-0.02	-0.05
unstimulated.IL-10	0.16	0.24	0.10	0.08
R848.IL-10	0.08	0.14	0.10	0.17
pIC.IL-10	0.46	0.49	0.08	0.06
LPS.IL-10	0.34	0.42	0.23	0.33
unstimulated.IL-12	0.07	0.06	-0.02	-0.04
R848.IL-12	0.04	0.05	-0.02	0.05
pIC.IL-12	-0.01	-0.03	-0.02	0.02
LPS.IL-12	0.05	0.03	-0.02	-0.05
unstimulated.IP-10	-0.02	0.16	0.17	0.15
R848.IP-10	0.04	0.09	-0.01	0.06
pIC.IP-10	-0.03	0.02	-0.01	0.04
LPS.IP-10	0.05	0.06	0.01	-0.01
unstimulated.TNF-α	-0.03	0.01	-0.02	-0.01
R848.TNF-α	0.13	0.11	-0.03	-0.04
pIC.TNF-α	0.06	0.05	-0.03	-0.04
LPS.TNF-α	-0.02	-0.04	-0.03	-0.03
unstimulated.MDC	0.00	0.03	-0.02	-0.03
R848.MDC	0.02	-0.01	-0.02	-0.04
pIC.MDC	0.06	0.04	0.03	0.00
LPS.MDC	0.13	0.15	0.16	0.22
unstimulated.MIP-1β	-0.02	-0.04	-0.01	-0.03
R848.MIP-1β	0.25	0.24	-0.02	0.00
pIC.MIP-1β	0.25	0.27	-0.01	-0.03

LPS.MIP-1β	0.11	0.10	-0.01	-0.03
unstimulated.IL-33	0.14	0.16	0.32	0.32
R848.IL-33	-0.01	-0.01	-0.02	-0.05
pIC.IL-33	-0.02	0.03	0.01	-0.01
LPS.IL-33	-0.01	-0.02	0.05	0.03
unstimulated.IL-23	0.02	0.00	-0.01	0.04
R848.IL-23	-0.02	-0.02	0.05	0.12
pIC.IL-23	0.04	0.06	0.00	0.08
LPS.IL-23	-0.02	-0.04	0.0	0.04
unstimulated.IL-27	0.01	-0.01	-0.01	-0.03
R848.IL-27	0.03	-0.02	-0.02	-0.01
pIC.IL-27	-0.02	0.00	0.02	0.12
LPS.IL-27	-0.03	0.01	-0.02	-0.01

Πίνακας 13

Σύγκριση μοντέλων γραμμικής και πολυωνυμικής 2^{ου} βαθμού παλινδρόμησης για την περιγραφή των μεταβολών των κυτταροκινών με την ηλικία σε υγιείς και ατοπικούς - αλλεργικούς με το κριτήριο adjusted R-squared (ar^2)

Τέλος, αξιολογήθηκαν οι διαφορές μεταξύ υγιών και αλλεργικών αφενός σε σχέση με το αναπτυξιακό μοτίβο των κυτταροκινών ανά TLR μονοπάτι, μέσω σύγκρισης των κλίσεων (slopes) των καμπυλών της γραμμικής παλινδρόμησης (με ANOVA) και αφετέρου ανά ηλικιακή ομάδα, μέσω σύγκρισης των μέσων τιμών για κάθε κυτταροκίνη με το Wilcoxon rank-sum test.

5.2.2.1 Η ωρίμανση της μη ειδικής ανοσίας στους υγιείς από τη γέννηση έως την ενηλικίωση

Οι αναλύσεις μη παραμετρικής συσχέτισης μεταξύ της ηλικίας και των τιμών των κυτταροκινών, καθώς και οι αναλύσεις γραμμικής και πολυωνυμικής παλινδρόμησης ανέδειξαν σημαντικά ευρήματα, τα οποία και περιγράφονται στη συνέχεια. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη σύγκριση των μέσων τιμών μεταξύ προκαθορισμένων ηλικιακών ομάδων με το Kruskal-Wallis test είναι παρόμοια, δεν προσφέρουν κάποια σημαντική επιπρόσθετη πληροφορία και, ως εκ τούτου, δε θα αναφερθούν. Πάντως, οι μέσες τιμές των κυτταροκινών ανά ηλικιακή ομάδα στον υγιή πληθυσμό και στους ατοπικούς- αλλεργικούς παρατίθενται στον πίνακα 14.

	CYTOKINES	AGE RANGE									
		0-2 yrs		2-5 yrs		5-10 yrs		10-18 yrs		18+ yrs	
		Healthy	Atopic	Healthy	Atopic	Healthy	Atopic	Healthy	Atopic	Healthy	Atopic
U N S T I M U L A T E D	IFN- α 2	3.5 (3.9)	6.5 (7.7)	4.4 (2.3)	3.9 (3.7)	18.2 (23.5)	12.4 (8.7)	15.3 (13.6)	18.5 (19.4)	8.3 (12.8)	15.9 (16.5)
	IFN- γ	1.8 (0.7)	1.7 (0.9)	0.5 (0.4)	0.6 (0.4)	1.6 (0.5)	1.7 (1.2)	0.9 (0.5)	1.2 (0.8)	2.4 (1)	2.9 (1.6)
	IL-1 β	1.9 (0.9)	5.7 (9.8)	1.9 (2.4)	2.7 (3.3)	3.4 (4.9)	1.4 (0.7)	1.6 (1.9)	2.5 (2.6)	1.5 (0.9)	6 (12.3)
	MCP-3	13.4 (7.9)	16.4 (6.1)	15.6 (4.4)	14.9 (4.8)	19.3 (17.6)	9.1 (7)	6.8 (5.1)	16* (6.6)	11.9 (20.5)	45 (75.5)
	IL-10	1.1 (0.9)	3.6* (3.9)	1.5 (0.9)	1.7 (1.1)	7.5 (5.5)	5.7 (4.4)	5.3 (5)	3.3 (4)	6.6 (1.7)	9.9 (8.8)
	IL-12	1.8 (0.9)	2.2 (1.4)	1.3 (0.6)	1.6 (0.4)	3 (3.4)	1.9 (1.2)	1.8 (0.8)	2 (1.1)	2.4 (1)	2 (1.1)
	IP-10	2.7 (4)	19.7* (27.8)	21.9 (24.7)	15.8 (15.1)	55.4 (67.7)	26.1 (22)	72.9 (102.6)	31 (43.9)	16.5 (15.2)	73.3 (90.2)
	TNF- α	3.5 (2.8)	7.1* (6.1)	2.8 (1.7)	5.1 (5.8)	10.5 (12.3)	4.1 (2.4)	4.5 (3.7)	10.7 (11.5)	3.5 (2.8)	14.1 (27.9)
	MDC	114.3 (149.7)	254.4 (438.6)	181.8 (149.7)	251.2 (207.7)	664.6 (927)	210.8 (139.3)	126.9 (93.3)	257.2 (329)	35.3 (19.3)	159.5 (213.8)
	MIP-1 β	22.3 (19.5)	45.1* (33.5)	18.4 (13.4)	28.5 (23.1)	35.7 (33.5)	26.4 (22.5)	28.7 (24.3)	42.9 (37.7)	21.9 (12.4)	26.3 (20.9)
	IL-33	4.2 (4.1)	2.3 (1.1)	0.9 (0.8)	0.45 (0.2)	2.1 (2.3)	2.2 (2)	3.2 (2.4)	3.3 (2.3)	5 (0.4)	4.8 (0.6)
	IL-23	0.2 (0.4)	0.1 (0)	0.1 (0)	0.1 (0)	0.1 (0)	0.1 (0.1)	0.2 (0.4)	0.1 (0.1)	0.1 (0)	0.1 (0)
	IL-27	0.27 (0.6)	0.1 (0.2)	0 (0)	0 (0)	0.1 (0)	0 (0)	0.1 (0.1)	0.1 (0.1)	0 (0)	0 (0)
	IL-28	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.6 (1.4)
TLR3	IFN- α 2	4.2 (4.7)	4.9 (5.5)	3.3 (5.4)	1.8 (1.6)	10.8 (9.1)	2.8 (3.4)	3.8 (3.8)	6.6 (7.6)	11 (10.9)	5.3 (10.2)
	IFN- γ	11.7 (21.7)	14.8 (34.6)	10.3 (20.9)	9.3 (10.9)	14.5 (19.1)	56.2 (92.4)	26.8 (41.1)	35.7 (42)	66.9 (92.1)	21.7 (26.3)
	IL-1 β	377.1 (395.6)	735.1 (1302.8)	204.3 (239.5)	298.3 (227)	512.7 (434.9)	594.5 (678.4)	1338.8 (1829.3)	692.3 (1537.1)	1397.3 (1799.4)	333.9 (361.6)
	MCP-3	258.7 (325.9)	743.1 (923.7)	558.8 (516.5)	607.6 (695.1)	774.4 (737)	1061.6 (834.1)	592.8 (732.2)	873.1 (912.8)	461.5 (421.3)	642.7 (538.7)
	IL-10	181.9 (302.1)	291.9 (354.2)	141 (131.1)	160 (156.9)	586.5 (708.8)	1167.8 (1385.3)	1003.4 (1041.2)	628.1 (779.1)	2353.5 (1114.5)	1081.9 (1311)
	IL-12	2.8 (2.8)	5.4 (10.2)	8.8 (8)	14.2 (16.2)	2.8 (3.5)	15.6 (26.7)	4 (4.8)	17.2 (28.2)	2.6 (2.6)	3.4 (4.1)
	IP-10	15.3 (23.4)	81.2 (129.2)	111.1 (177.7)	20.8 (25.5)	91 (236.8)	63.6 (88.8)	151 (288.8)	219.4 (265.8)	35.7 (57.5)	84.2 (118.8)
	TNF- α	628.3 (683.1)	450.4 (488.4)	332.2 (271.1)	396.6 (242.6)	470.6 (340.6)	556.8 (353.2)	906 (807.2)	398.8 (377.9)	1043.6 (700)	410.3 (352)
	MDC	907.5 (1120.7)	961 (1075)	1370.2 (1077)	818.1 (657.7)	766.94 (922.5)	1250.3 (1021.4)	459.8 (388.2)	596.9 (531)	186.7 (165.1)	456.2 (413.2)
	MIP-1 β	2136.3 (2851.2)	2851 (3315.4)	2079.2 (1394.7)	2897.8 (3728.4)	3007.5 (3065.4)	5869.5 (6163.8)	2635.4 (1976.6)	2369.6 (1913)	7437.6 (7356.1)	1797.6 (804.3)
	IL-33	0.1 (0.1)	0.4 (0.6)	0.1 (0.2)	0.1 (0.1)	0.4 (0.5)	0.5 (0.6)	0.3 (0.4)	0.3 (0.3)	0 (0)	0.1 (0.2)
	IL-23	0.2 (0.3)	0.1 (0.2)	0.3 (0.3)	0.3 (0.4)	0.2 (0.4)	0.3 (0.4)	0.1 (0.1)	0.3 (0.5)	0.5 (0.4)	0.4 (0.5)
	IL-27	0.0 (0.1)	0.1 (0.1)	0 (0)	0 (0.1)	0.2 (0.3)	0.2 (0.2)	0.1 (0.1)	0.1 (0.1)	0 (0)	0.2 (0.2)
	IL-28	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

	CYTOKINES	AGE RANGE									
		0-2 yrs		2-5 yrs		5-10 yrs		10-18 yrs		18+ yrs	
		Healthy	Atopic	Healthy	Atopic	Healthy	Atopic	Healthy	Atopic	Healthy	Atopic
TLR 7/8	IFN-α2	216.1 (197.6)	217.2 (205)	212.4 (128.9)	180.5 (201.9)	318.3 (307.7)	402.8 (435.5)	341.7 (389.8)	222.6 (156.8)	171.6 (199.1)	93.2 (103.8)
	IFN-γ	104.1 (141.5)	413.1 (673.1)	149.3 (163.7)	126.3 (153.9)	736 (999)	459.6 (514.6)	741.1 (754.2)	1047 (1107.2)	835.4 (708.8)	750.2 (1088.7)
	IL-1β	3129.1 (4972.6)	5164.2 (4932.2)	5807.3 (3886.6)	5017 (4630.9)	5012.1 (5146)	8346.1 (6335.3)	7368 (6097.9)	8328.8 (5650.9)	8663.4 (5789.7)	7495.5 (7117.7)
	MCP-3	1260.4 (2300.9)	1161.5 (1132.2)	419.6 (344.7)	1621.4 (1953.4)	1531.1 (2743.3)	2029.6 (2549.5)	1256.7 (565.6)	1578.7 (1711.6)	1830.2 (2263.5)	1064.9 (654.2)
	IL-10	441.6 (568.9)	646.3 (553.4)	1105.6 (1101.4)	984.8 (814.8)	2095.6 (2309.1)	2387.5 (2219.8)	2720.1 (2995.9)	3198.5 (3083.6)	2266.2 (1268.7)	2817.9 (2854.6)
	IL-12	9.9 (10.6)	19.9 (29.5)	20.5 (19.5)	17.1 (20.4)	22 (22.6)	15.1 (9.8)	33.4 (25.5)	46.3 (35.6)	21 (18.1)	20.9 (27.9)
	IP-10	609.6 (665.4)	1131.6 (998.1)	665.1 (316.6)	887.4 (866.6)	870.2 (713.9)	1070.4 (1038.1)	1808 (1987.4)	2546.9 (2294.7)	1043.9 (783.5)	1224.5 (1267.5)
	TNF-α	3586.1 (4164.9)	8668.1 (9391.8)	4400.8 (2862.4)	2769 (1471.8)	2979.1 (2110.2)	4902.3 (3406.6)	9901.9 (9844.6)	9765.9 (10143.2)	9074.1 (9848.3)	5863.4 (8857.5)
	MDC	119.5 (147.6)	199.2 (238)	251 (435.9)	132.1 (199.2)	123.6 (259.5)	372.5 (556.7)	94.2 (100.1)	181.4 (309.9)	40.7 (66.5)	89.7 (135)
	MIP-1β	2987.9 (3502.5)	6002.7 (8312.3)	4299.5 (2540)	8540.5 (13381.2)	5628 (3865)	7753.9 (5580.1)	10985.1 (12846.8)	10042 (12717.4)	15298.7 (18064.2)	3596.6 (2291.4)
	IL-33	0.1 (0.2)	0.4 (0.9)	0.5 (1.1)	0.1 (0.1)	0.8 (1.1)	0.6 (1.2)	0.1 (0.2)	0.3 (0.5)	0 (0)	0.2 (0.3)
	IL-23	0.1 (0.2)	0.1 (0.1)	0.1 (0.1)	0.1 (0.1)	0.1 (0.3)	0.2 (0.2)	0.2 (0.2)	0.3 (0.3)	0.1 (0.2)	0.3 (0.3)
	IL-27	0.1 (0.2)	0.2 (0.2)	0.1 (0)	0.1 (0.1)	0.2 (0.2)	0.2 (0.2)	0.1 (0.2)	0.2 (0.2)	0.1 (0)	0.2 (0.2)
	IL-28	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
TLR4	IFN-α2	5.4 (6.3)	5.4 (5.9)	0.5 (1.4)	1 (2.2)	2.1 (3.9)	1.5 (2)	4.8 (6.3)	2.8 (3.8)	1.1 (1.7)	3.7 (3.5)
	IFN-γ	9.5 (16.5)	52.1 (89.8)	12.1 (15.3)	15.2 (22.8)	71.8 (111.9)	29.3 (41)	39 (44.8)	78.3 (102.5)	62 (125.9)	68.9 (123.2)
	IL-1β	2408.3 (3260.5)	3108.4 (3472.7)	8362.2 (4402.3)	4332.1 (4280.9)	7355.9 (5045.5)	6592.1 (4239.3)	5370.7 (5400.8)	6152.9 (6247.8)	3760 (4357.2)	3091.2 (5180.6)
	MCP-3	149.7 (206.8)	452.4* (546.4)	122 (121.7)	162.9 (141.5)	463.7 (709)	464.8 (709.8)	211.4 (243.7)	371.8 (420.5)	232.7 (174.2)	205.8 (220.2)
	IL-10	680.8 (718.6)	1686.4* (1169.4)	2236.6 (2512)	1662.2 (1368.5)	4127.5 (2474.2)	4254.9 (3289.4)	4419.7 (3773.3)	5772.8 (3774.1)	6010.8 (1205.1)	5403.8 (2794.2)
	IL-12	4.1 (4.5)	6.3 (7.7)	5.2 (5.9)	5.4 (5.3)	3.4 (5.6)	2.1 (4.2)	2.3 (3.2)	4.6 (8.4)	0.9 (0.9)	5.8 (5.4)
	IP-10	9.7 (13.8)	75.5* (105.4)	30.8 (54.9)	53.1 (60.5)	33 (53.7)	43.1 (95.3)	76.6 (102.9)	125.4 (128)	68.2 (135.6)	109.8 (155.9)
	TNF-α	1398.8 (1465)	1708.7 (1167.6)	1577.6 (600)	965.2 (602.9)	1730.4 (968.6)	1510.2 (451.3)	1553 (1347)	1758.4 (1540.2)	1280.3 (857.5)	1712.6 (1324.5)
	MDC	1196 (1259.3)	1742.5 (1496.8)	1241.6 (1109.4)	936.4 (585)	453.4 (654.6)	966.2 (657.5)	259.2 (367.9)	244.1 (72.8)	128.8 (111.5)	268.7 (253.4)
	MIP-1β	3476.7 (4148.6)	11536.9* (13909.3)	9503.1 (10817.1)	7286.8 (7132.6)	12614.3 (17124.5)	9039.5 (5242.8)	13014.9 (16363.3)	11152.3 (16715.2)	17044 (20054.7)	4859.3 (5669.4)
	IL-33	0.1 (0.1)	0.7* (0.7)	0 (0.1)	0 (0)	0.3 (0.4)	0.6 (0.7)	0.1 (0.2)	0.2 (0.2)	0 (0)	0.1 (0.2)
	IL-23	0.3 (0.2)	0.3 (0.3)	0.3 (0.2)	0.1 (0.2)	0.4 (0.6)	0.2 (0.2)	0.4 (0.9)	0.7 (0.7)	0.4 (0.8)	0.5 (0.7)
	IL-27	0.1 (0.2)	0.2 (0.2)	0.1 (0.1)	0.1 (0.1)	0.3 (0.3)	0.3 (0.3)	0.2 (0.4)	0.2 (0.1)	0.1 (0.1)	0.3 (0.4)
	IL-28	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Πίνακας 14

Μέσες τιμές των κυτταροκινών ανά ηλικιακή ομάδα στον υγιή πληθυσμό (healthy) και στους ατοπικούς- αλλεργικούς (atopic) χωρίς TLR διέγερση, μετά από TLR3, TLR7/8 και TLR4 διέγερση.

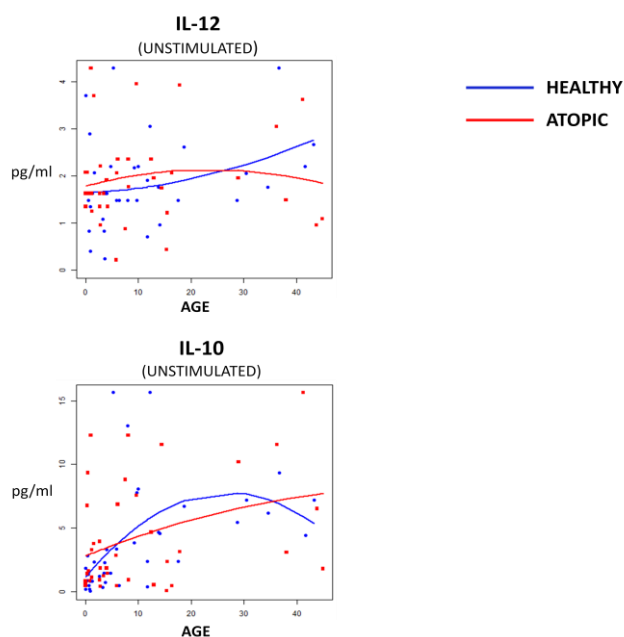
Η σύγκριση των μέσων τιμών ανά ηλικιακή ομάδα μεταξύ υγιών και ατοπικών - αλλεργικών πραγματοποιήθηκε με το Wilcoxon rank-sum test.

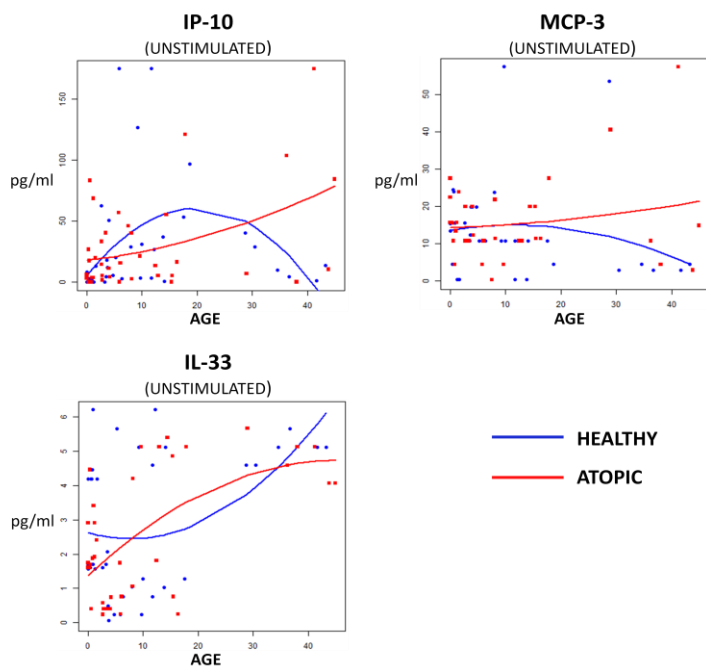
* $p < 0.05$ μεταξύ υγιών και ατοπικών της ίδιας ηλικιακής ομάδας.

5.2.2.1.1 Η ωρίμανση της μη ειδικής ανοσίας στους υγιείς – αυτόματη παραγωγή κυτταροκινών (χωρίς TLR διέγερση)

Στα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιιεργειών που δεν είχαν υποστεί διέγερση με TLR αγωνιστές παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση με την ηλικία στην έκκριση των IL-12 ($p=0.046$, $r=0.322$), IP-10 ($p=0.001$, $r=0.511$) και IL-10 ($p=0.000$, $r=0.685$), καθώς και μία σημαντική μείωση στη σύνθεση του MCP-3 ($p=0.005$, $r=-0.439$).

Από τις καμπύλες της πολυωνυμικής παλινδρόμησης φαίνεται ότι η παραγωγή της IL-12 παρουσιάζει μία ήπια αύξηση από τη γέννηση μέχρι την ενηλικίωση, ενώ η έκκριση των IP-10 και IL-10 χαρακτηρίζεται από προοδευτική αύξηση μέχρι την εφηβεία, ή τη νεαρή ενήλικη ζωή, αντίστοιχα και ακολούθως παρατηρείται πτώση των επιπέδων τους. Η αυτόματη παραγωγή MCP-3 παρουσιάζει προοδευτική μείωση από τη γέννηση μέχρι τα 45 έτη (εικόνα 32).





Εικόνα 32

Ωρίμανση με την ηλικία της αυτόματης παραγωγής κυτταροκινών στους υγιείς (healthy) και τους ατοπικούς - αλλεργικούς (atopic) – καμπύλες πολυωνυμικής παλινδρόμησης 2^{ου} βαθμού (επιλεγμένες κυτταροκίνες)

5.2.2.1.2 Η ωρίμανση της μη ειδικής ανοσίας στους υγιείς – διέγερση μιμούμενη ιογενείς λοιμώξεις (TLR3 & TLR7/8)

Όσον αφορά την ωρίμανση από τη γέννηση ως την ενηλικίωση του TLR3 μονοπατιού της μη ειδικής ανοσίας, που ενεργοποιείται με την αναγνώριση του RNA διπλής έλικας των ιών και στην παρούσα μελέτη με το συνθετικό αγωνιστή polyI:C, παρατηρήθηκαν τα ακόλουθα:

- i) σημαντική αύξηση με την ηλικία στην παραγωγή των φλεγμονωδών κυτταροκινών IL-1 β ($p=0.012$, $r=0.399$) και TNF- α ($p=0.055$, $r=0.310$). Οι καμπύλες της πολυωνυμικής παλινδρόμησης έδειξαν ότι η παραγωγή των μορίων αυτών φτάνει στο μέγιστο στην αρχή της ενήλικης ζωής και στη συνέχεια μειώνεται ελαφρώς.

- ii) προοδευτική αύξηση στην παραγωγή της CC χημειοκίνης MIP-1β ($p=0.013$, $r=0.395$). Η καμπύλη της πολυωνυμικής παλινδρόμησης επιβεβαιώνει την αύξηση αυτή μέχρι τη μέση ηλικία.
- iii) σημαντική αύξηση με την ηλικία στην παραγωγή της αντιφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-10 ($p=0.000$, $r=0.655$). Η σύνθεση IL-10 φαίνεται ότι αυξάνεται προοδευτικά και σταθεροποιείται στη μέση ηλικία.

Η ωρίμανση των απαντήσεων της μη ειδικής ανοσίας που αφορά τα ανωτέρω μόρια φαίνεται ότι συμβαδίζει με μία σημαντική αύξηση της IFN- γ (ειδική ανοσία) ($p=0.001$, $r=0.516$), παρά το γεγονός ότι η σύνθεσή της δε συνδέεται άμεσα με την ενεργοποίηση των TLR μονοπατιών. Η καμπύλη της πολυωνυμικής παλινδρόμησης για την IFN- γ στους υγιείς δείχνει ότι η παραγωγή της αυξάνεται μέχρι τα πρώτα χρόνια της ενήλικης ζωής και στη συνέχεια σταθεροποιείται.

Ωρίμανση από τη γέννηση ως την ενηλικίωση παρατηρήθηκε και για το TLR7/8 μονοπάτι της μη ειδικής ανοσίας, το οποίο ενεργοποιείται *in vivo* με την αναγνώριση του RNA μονής έλικας των ιών και στην παρούσα μελέτη με το συνθετικό αγωνιστή R848. Η ωρίμανση και για την οδό αυτή αφορούσε τις φλεγμονώδεις και αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, τις χημειοκίνες και τα αντι-ιικά μόρια. Έτσι, μετά από διέγερση με R848 διαπιστώθηκαν τα ακόλουθα:

- i) σημαντική αύξηση με την ηλικία στην παραγωγή της κυτταροκίνης IL-1β ($p=0.007$, $r=0.422$). Από την καμπύλη της πολυωνυμικής ανάλυσηςδείχθηκε ότι η σύνθεση IL-1β αυξάνεται προοδευτικά και σταθεροποιείται στη μέση ηλικία.
- ii) σημαντική αύξηση στην παραγωγή των χημειοκινών MIP-1β ($p=0.006$, $r=0.430$), MCP-3 ($p=0.020$, $r=0.371$) και IP-10 ($p=0.027$, $r=0.355$). Οι πολυωνυμικές καμπύλες έδειξαν προοδευτική αύξηση των MIP-1β και MCP-3 μέχρι τη μέση ηλικία, ενώ η σύνθεση IP-10 φτάνει στο ζενίθ της στην αρχή της ενήλικης ζωής και στη συνέχεια μειώνεται.
- iii) προοδευτική αύξηση στην παραγωγή των Th1 μορίων IL-12p70 ($p=0.009$, $r=0.415$) και IFN- γ ($p=0.000$, $r=0.563$) και σταθεροποίησή τους στη μέση ηλικία.
- iv) σημαντική αύξηση με την ηλικία στην παραγωγή της κυτταροκίνης IL-10 ($p=0.000$, $r=0.560$). Η σύνθεση IL-10 φαίνεται ότι αυξάνεται προοδευτικά μέχρι τα πρώτα χρόνια της ενήλικης ζωής και στη συνέχεια παρουσιάζει μικρή μείωση.

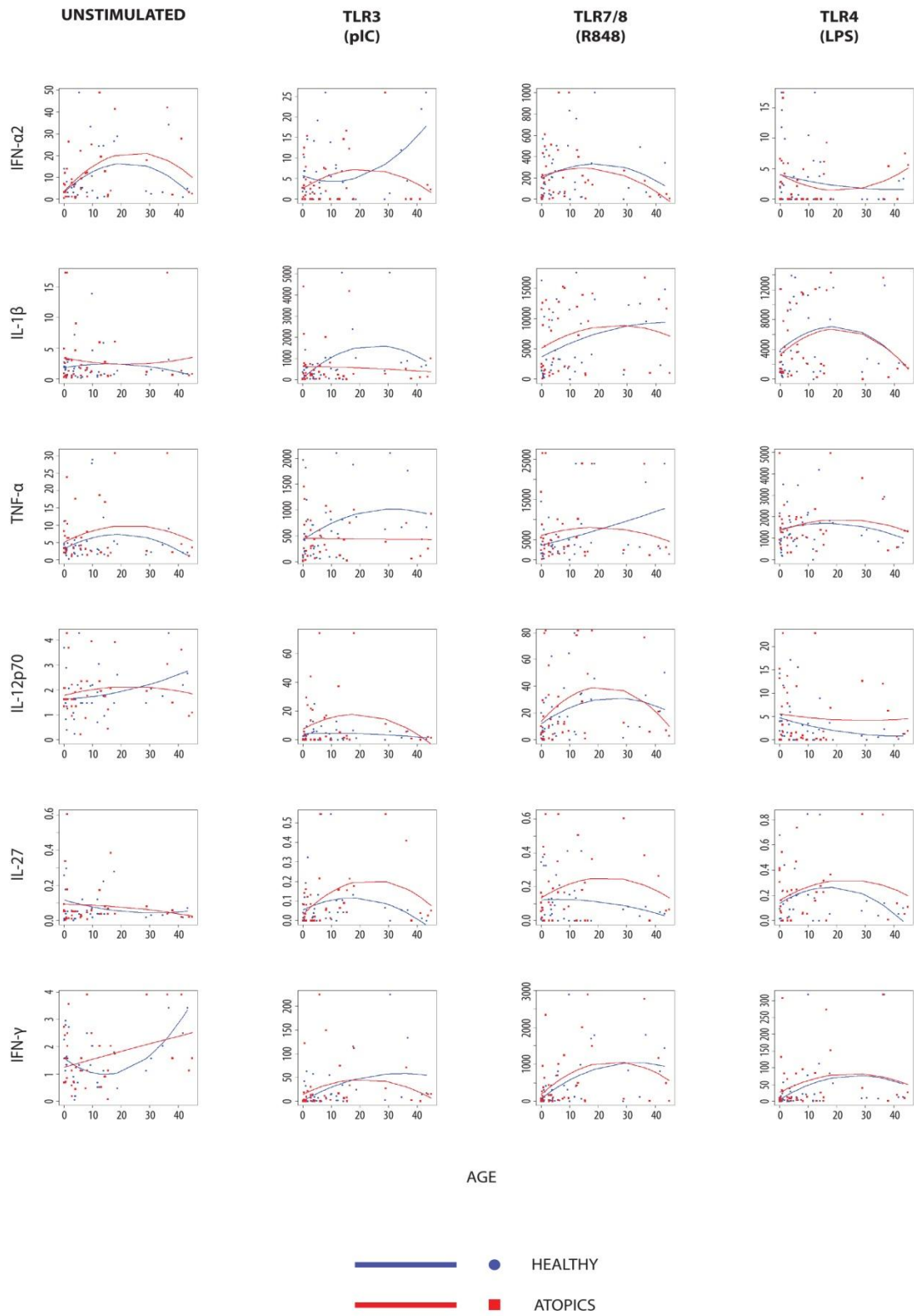
Αξίζει να σημειωθεί ότι παρατηρήθηκε ισχυρή επαγωγή της χημειοκίνης MDC και με τους δύο TLR αγωνιστές, όμως δεν παρατηρήθηκαν αξιόλογες μεταβολές στη σύνθεσή της με την ηλικία. Ομοίως, δεν υπήρξαν αξιόλογες μεταβολές στη σύνθεση IL-23 και IL-27 μετά από TLR3 και 7/8 διέγερση, με τη διαφορά ότι τα επίπεδά τους ήταν χαμηλά.

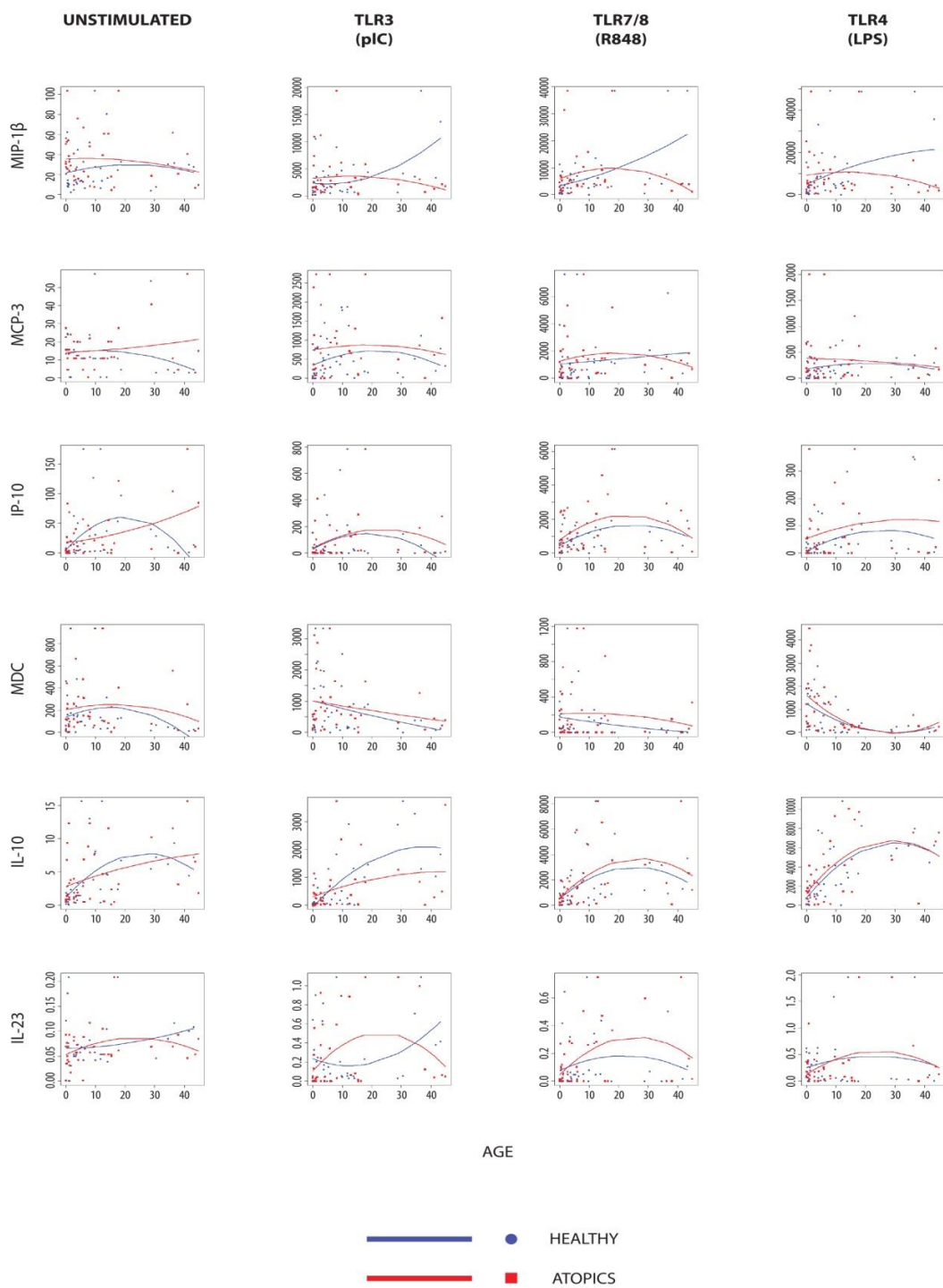
5.2.2.1.3 Η ωρίμανση της μη ειδικής ανοσίας στους υγιείς – διέγερση μιμούμενη βακτηριακές λοιμώξεις (TLR4)

Όσον αφορά την ωρίμανση από τη γέννηση ως την ενηλικίωση του TLR4 μονοπατιού της μη ειδικής ανοσίας, που ενεργοποιείται με την αναγνώριση των LPS των βακτηρίων παρατηρήθηκαν τα ακόλουθα:

- i) σημαντική αύξηση στην παραγωγή της χημειοκίνης MIP-1β ($p=0.008$, $r=0.419$). Σύμφωνα με την πολυωνυμική καμπύλη παρατηρείται αύξηση του MIP-1β μέχρι τη μέση ηλικία, όπου και φαίνεται να σταθεροποιείται.
- ii) σημαντική μείωση στη σύνθεση της χημειοκίνης MDC ($p=0.001$, $r=-0.509$), που σύμφωνα με την καμπύλη της πολυωνυμικής ανάλυσης ανακόπτεται στην αρχή της ενήλικης ζωής.
- iii) σημαντική αύξηση με την ηλικία στην παραγωγή της κυτταροκίνης IL-10 ($p=0.000$, $r=0.733$). Η σύνθεση IL-10 φαίνεται ότι αυξάνεται προοδευτικά μέχρι τα πρώτα χρόνια της ενήλικης ζωής και στη συνέχεια παρουσιάζει μικρή μείωση.
- iv) σημαντική αύξηση στην παραγωγή IFN-γ ($p=0.006$, $r=0.435$) και σταθεροποίησή της μετά την εφηβεία.

Οι καμπύλες που απεικονίζουν την εξέλιξη από τη γέννηση ως την ενηλικίωση των μονοπατιών TLR3, TLR4 & TLR7/8 σε υγιείς και ατοπικούς- αλλεργικούς, οι οποίες προέκυψαν από τις αναλύσεις πολυωνυμικής παλινδρόμησης 2^{ου} βαθμού, παρατίθενται στην εικόνα 33.





Εικόνα 33

Ωρίμανση με την ηλικία των μονοπατιών TLR3, TLR4 & TLR7/8 στους υγιείς (healthy) και τους ατοπικούς - αλλεργικούς (atopics) – καμπύλες πολυωνυμικής παλινδρόμησης 2^{ου} βαθμού

5.2.2.2. Η ωρίμανση της μη ειδικής ανοσίας στους ατοπικούς - αλλεργικούς από τη γέννηση έως την ενηλικίωση

Στους ατοπικούς ασθενείς διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές στην ωρίμανση της μη ειδικής ανοσίας σε σχέση με τους υγιείς και για τα τρία TLR μονοπάτια που αναλύθηκαν στην παρούσα μελέτη (εικόνες 32, 33 & 34). Όπως και για τον υγιή πληθυσμό, σημαντικά ευρήματα αναδείχθηκαν από τις αναλύσεις μη παραμετρικής συσχέτισης μεταξύ της ηλικίας και των τιμών των κυτταροκινών, καθώς και τις αναλύσεις γραμμικής και πολυωνυμικής παλινδρόμησης, τα οποία και περιγράφονται ακολούθως.

5.2.2.2.1 Η ωρίμανση της μη ειδικής ανοσίας στους ατοπικούς - αλλεργικούς – αυτόματη παραγωγή κυτταροκινών (χωρίς TLR διέγερση)

Στους ατοπικούς ασθενείς, στα υπερκείμενα των κυτταροκαλλιεργείων που δεν είχαν υποστεί διέγερση με TLR αγωνιστές, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση με την ηλικία μόνο στη σύνθεση της IL-33 ($p=0.012$, $r=0.404$). Όπως φαίνεται από τις καμπύλες της πολυωνυμικής παλινδρόμησης, η αυτόματη παραγωγή IL-33 σταθεροποιείται μετά την 3^η δεκαετία ζωής (εικόνα 32).

5.2.2.2.2 Η ωρίμανση της μη ειδικής ανοσίας στους ατοπικούς - αλλεργικούς – διέγερση μιμούμενη ιογενείς λοιμώξεις (TLR3 & TLR7/8)

Σε ό,τι αφορά την ωρίμανση των μονοπατιών TLR3 & TLR7/8, στους ατοπικούς-αλλεργικούς ασθενείς διαπιστώθηκαν σημαντικές αποκλίσεις συγκριτικά με τους υγιείς. Καταρχάς, μετά από TLR3 διέγερση δεν παρατηρήθηκε μεταβολή με την ηλικία στην παραγωγή των φλεγμονωδών κυτταροκινών IL-1 β και TNF- α . Η διαφορά που διαπιστώθηκε στις τροχιές ωρίμανσης των αποκρίσεων αυτών με την πάροδο του χρόνου μεταξύ υγιών και ατοπικών δείχθηκε περαιτέρω και από οριακές στατιστικές διαφορές στη σύγκριση των καμπυλών γραμμικής παλινδρόμησης για τις δύο κυτταροκίνες, IL-1 β ($p=0.061$) και TNF- α ($p=0.096$).

Ομοίως, δεν παρατηρήθηκαν στους ατοπικούς σημαντικές συσχετίσεις με την ηλικία στην παραγωγή των χημειοκινών MIP-1 β , MCP-3 και IP-10. Μάλιστα, η σύγκριση των

κλίσεων των καμπυλών γραμμικής παλινδρόμησης που χαρακτηρίζουν την ωρίμανση του MIP-1β τεκμηρίωσε τη σημαντική απόκλιση μεταξύ υγιών και ατοπικών ($p=0.002$). Επιπλέον, ούτε η παραγωγή Th1 μορίων, όπως η IL-12 και η IFN- γ , μεταβλήθηκε σημαντικά από τη γέννηση μέχρι την ενηλικίωση στους ατοπικούς. Ειδικά για την IFN- γ , διαπιστώθηκε και οριακή στατιστική διαφορά στη σύγκριση των καμπυλών γραμμικής παλινδρόμησης μεταξύ υγιών και ατοπικών ($p=0.095$).

Από τα μόρια που μελετήθηκαν, το μόνο που παρουσίασε ωρίμανση σε σχέση με την ηλικία στους ατοπικούς, μετά από TLR3 διέγερση, ήταν η αντιφλεγμονώδης IL-10 ($p=0.035$, $r=0.339$). Μολαταύτα, η σύγκριση της κλίσης της καμπύλης της γραμμικής συσχέτισης με αυτή των υγιών έδειξε ότι ο ρυθμός στην αύξηση της σύνθεσης IL-10 στους ατοπικούς υπολείπεται σημαντικά ($p=0.019$). Σύμφωνα με την καμπύλη πολυωνυμικής παλινδρόμησης η παραγωγή IL-10 στους ατοπικούς σταθεροποιείται στη μέση ηλικία.

Η εξέλιξη στο χρόνο των απαντήσεων που αφορούσαν το TLR7/8 μονοπάτι στους ατοπικούς ήταν παρόμοιες με αυτές που περιγράφηκαν παραπάνω για την TLR3 οδό. Έτσι, μόνο η παραγωγή IL-10 παρουσίασε σημαντική αύξηση από τη γέννηση μέχρι τα 45 έτη ($p=0.004$, $r=0.449$). Η πολυωνυμική ανάλυση έδειξε κορύφωση της παραγωγής της στην αρχή της ενήλικης ζωής και στη συνέχεια μικρή μείωση, όπως και στους υγιείς. Τέλος, και για το TLR7/8 μονοπάτι, η σύγκριση των κλίσεων των καμπυλών γραμμικής παλινδρόμησης που χαρακτηρίζουν την ωρίμανση της παραγωγής του MIP-1β τεκμηρίωσε σημαντική απόκλιση μεταξύ υγιών και ατοπικών ($p=0.004$). Οι καμπύλες γραμμικής παλινδρόμησης υγιών και ατοπικών για επιλεγμένα μόρια για τις οδούς TLR3 & 7/8 απεικονίζονται στην εικόνα 34.

5.2.2.2.3 Η ωρίμανση της μη ειδικής ανοσίας στους ατοπικούς - αλλεργικούς – διέγερση μιμούμενη βακτηριακές λοιμώξεις (TLR4)

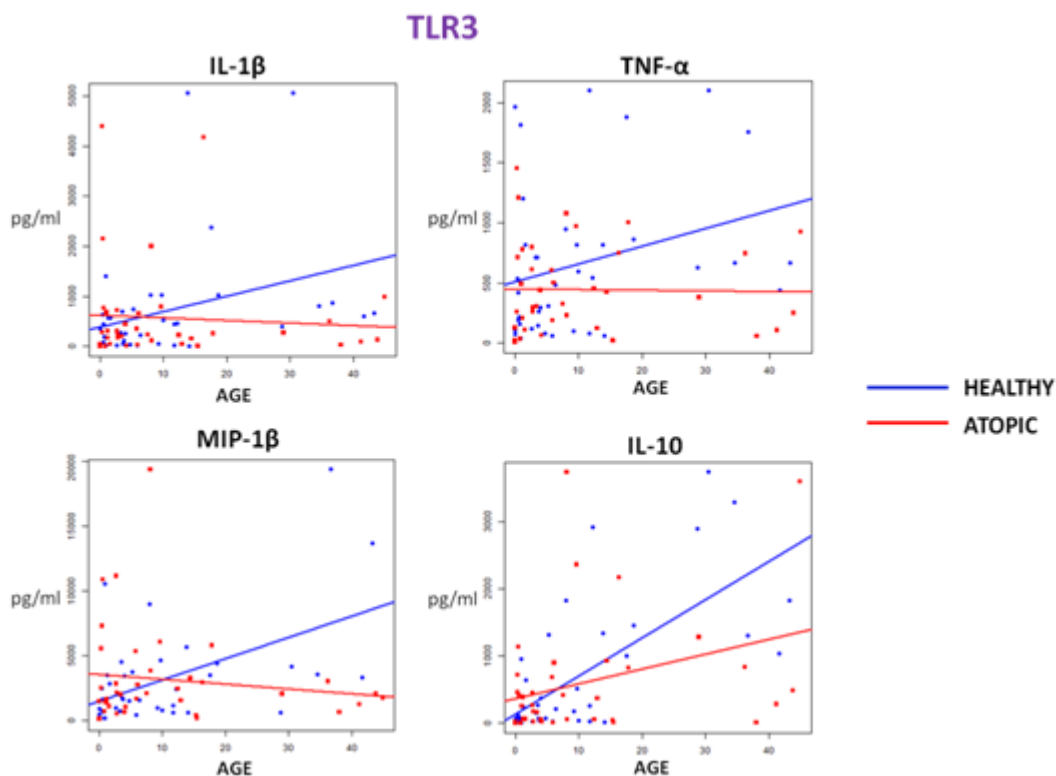
Σε ό,τι αφορά την ωρίμανση του TLR4 μονοπατιού της μη ειδικής ανοσίας στους ατοπικούς- αλλεργικούς από τη γέννηση μέχρι την ενηλικίωση παρατηρήθηκαν τα ακόλουθα:

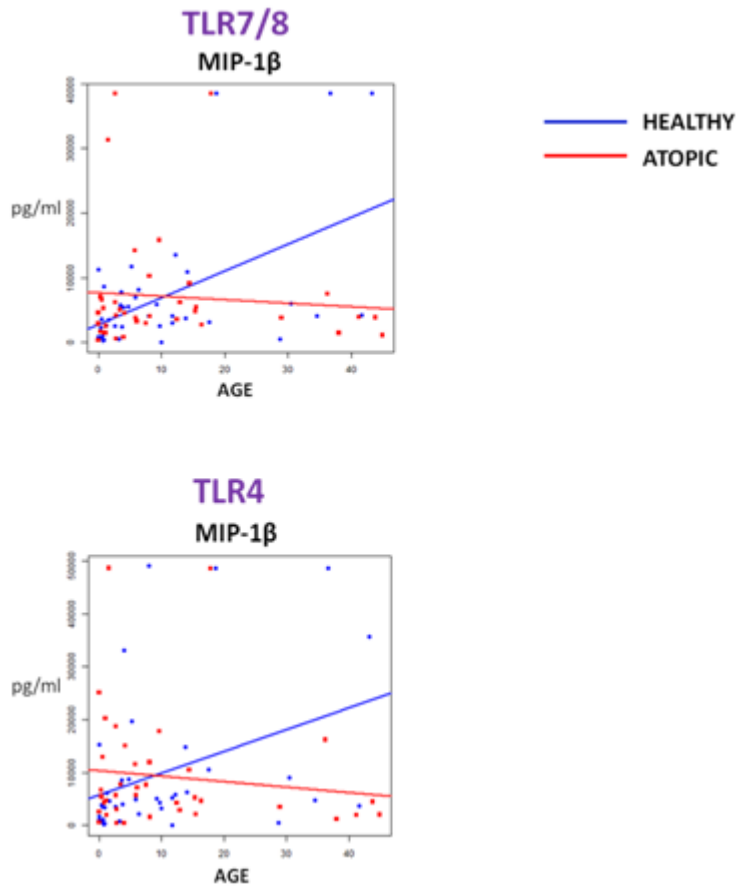
- i) σημαντική μείωση στη σύνθεση της χημειοκίνης MDC ($p=0.000$, $r=-0.559$) που, όπως και στους υγιείς, φαίνεται να ανακόπτεται στην αρχή της ενήλικης ζωής.

- ii) σημαντική αύξηση με την ηλικία στην παραγωγή της κυτταροκίνης IL-10 ($p=0.000$, $r=0.549$), όπως και στους υγιείς. Η σύνθεση IL-10 φαίνεται ότι αυξάνεται προοδευτικά μέχρι τα πρώτα χρόνια της ενήλικης ζωής και στη συνέχεια παρουσιάζει μικρή μείωση.

Σε αντίθεση με τον υγιή πληθυσμό, δε διαπιστώθηκε στους ατοπικούς ωρίμανση με την ηλικία στην παραγωγή IFN- γ και MIP-1 β . Η σημαντική μάλιστα απόκλιση των δύο πληθυσμών όσον αφορά την εξέλιξη στο χρόνο της ικανότητας σύνθεσης του MIP-1 β τεκμηριώνεται και από τη σημαντική διαφορά στις κλίσεις των καμπυλών γραμμικής παλινδρόμησης ($p=0.02$).

Οι διαφορές στις τροχιές ανάπτυξης μεταξύ υγιών και ατοπικών-αλλεργικών και για τις TLR4-επαγόμενες απαντήσεις φαίνονται στην εικόνα 34 (καμπύλες γραμμικής παλινδρόμησης για επιλεγμένες κυτταροκίνες).





Εικόνα 34

Ωρίμανση με την ηλικία των μονοπατιών TLR3, TLR4 & TLR7/8 στους υγιείς (healthy) και τους ατοπικούς - αλλεργικούς (atopic) - καμπύλες γραμμικής παλινδρόμησης (επιλεγμένες κυτταροκίνες)

6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

6.1 ΚΛΙΝΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Από τη σύγκριση των δημογραφικών/κλινικών χαρακτηριστικών των δύο ομάδων της μελέτης, υγιών και ατοπικών-αλλεργικών, διαπιστώθηκε καταρχάς διαφοροποίηση στο οικογενειακό ιστορικό ατοπικής νόσου. Οι ατοπικοί είχαν σε υπερδιπλάσιο ποσοστό γονείς με ατοπία, όπως και ήταν αναμενόμενο βάσει βιβλιογραφίας [322]. Είναι γνωστό από δεκαετίες ότι το θετικό οικογενειακό ιστορικό ατοπίας αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση ατοπικής νόσου στους απογόνους [323] και μάλιστα αναφέρεται ότι η πιθανότητα εμφάνισης νόσου μπορεί να αγγίζει το 60-80% σε παιδιά με δύο ατοπικούς γονείς [322, 324]. Παρόλο που τα αλλεργικά νοσήματα δεν ακολουθούν την κλασική μενδέλεια κληρονομικότητα [325], είναι σαφές ότι ενέχονται γενετικοί παράγοντες [326] και υπάρχουν ολοένα και περισσότερα δεδομένα που συνδέουν το θετικό οικογενειακό ιστορικό με την εμφάνιση εκζέματος [327, 328], βρογχικού άσθματος [329, 330], αλλεργικής ρινίτιδας [331] αλλά και τροφικής αλλεργίας [332]. Μάλιστα, για το άσθμα και το έκζεμα έχει ενοχοποιηθεί κυρίως η νόσηση της μητέρας από το αντίστοιχο νόσημα [330, 333], ενώ νεότερα δεδομένα δείχνουν ότι παίζει ρόλο και το φύλο του παιδιού [334]. Καταλυτική βέβαια, φαίνεται να είναι και η σημασία των περιβαλλοντικών επιδράσεων [325, 329, 335, 336].

Αξιοσημείωτο επίσης είναι το γεγονός ότι η διάρκεια του μητρικού θηλασμού ήταν μεγαλύτερη στους αλλεργικούς (5.6 μήνες έναντι 2.8 στους υγιείς), παρόλο που το ποσοστό των βρεφών που θήλασαν ήταν παρόμοιο και στις δύο ομάδες. Τα περισσότερα βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι ο μητρικός θηλασμός συντελεί στην πρόληψη ή την καθυστέρηση της εμφάνισης των αλλεργικών νοσημάτων, ιδίως σε βρέφη υψηλού κινδύνου και μάλιστα οι τελευταίες οδηγίες της Αμερικάνικης Ακαδημίας Παιδιατρικής, της Ευρωπαϊκής Ακαδημίας Αλλεργιολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας, της Ευρωπαϊκής Εταιρείας Παιδιατρικής Γαστρεντερολογίας, Ηπατολογίας και Διατροφής, καθώς και του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας συνιστούν για τουλάχιστον 4-6 μήνες σίτιση με μητρικό γάλα [337-340]. Το μητρικό γάλα περιέχει σύμπλοκους ολιγοσακχαρίτες, που ευοδώνουν την ανάπτυξη στο έντερο μίας συμβιωτικής μικροχλωρίδας πλούσιας σε *bifidobacteria*, τα

οποία προάγουν ρυθμιστικές T-κυτταρικές απαντήσεις και ενισχύουν τις Th1 έναντι των Th2 απαντήσεων. Επιπρόσθετα, στο μητρικό γάλα ανευρίσκονται διάφοροι παράγοντες με ανοσορρυθμιστική δράση όπως κυτταροκίνες, διαλυτοί υποδοχείς, ανοσοσφαιρίνες κ.ά, που επιδρούν στη λειτουργία του εντερικού επιθηλίου. Συνδυαστικά, φαίνεται ότι οι ανωτέρω παράγοντες προάγουν την ωρίμανση του εντερικού επιθηλίου, την εύρυθμη λειτουργία του, την προστασία από λοιμώξεις και την εγκατάσταση ανοχής στα αντιγόνα των τροφών [341-343]. Είναι πιθανό ότι οι ατοπικοί-αλλεργικοί γονείς, έχοντας ενημερωθεί για τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης αλλεργικού νοσήματος στους απογόνους τους καθώς και για την προστασία που μπορεί να προσφέρει το μητρικό γάλα, επιδιώκουν τη συνέχιση του μητρικού θηλασμού για μεγαλύτερο διάστημα σε σχέση με τους μη αλλεργικούς. Αλλά ακόμα και στις περιπτώσεις που οι γονείς δεν είναι αλλεργικοί και εκδηλώνεται στο παιδί νωρίς στη βρεφική ηλικία ατοπική δερματίτιδα, είναι πιθανό ότι ο μητρικός θηλασμός παρατείνεται, είτε κατόπιν πρωτοβουλίας των γονέων, είτε κατόπιν ιατρικής συμβουλευτικής, σε μία προσπάθεια αποτροπής της εξέλιξης της ατοπικής πορείας. Πράγματι, τα τελευταία χρόνια έχει δειχθεί από πληθώρα συγχρονικών και προοπτικών μελετών ότι η ατοπική δερματίτιδα προδιαθέτει σε τροφική αλλεργία, αλλά και άσθμα και αλλεργική ρινίτιδα, τόσο στο γενικό πληθυσμό, όσο και σε παιδιά υψηλού κινδύνου (απογόνους ατοπικών γονέων) και ενδεχομένως ο μητρικός θηλασμός αποτελεί μέσο δευτερογενούς πρόληψής τους [242, 344].

Εντύπωση προκαλεί επίσης το γεγονός ότι οι υγιείς εξετίθεντο σε καπνό τσιγάρου στο σπίτι σχεδόν σε διπλάσιο ποσοστό σε σχέση με τους αλλεργικούς (61.5 έναντι 33.3 %). Είναι γνωστό ότι τόσο το ενεργητικό, όσο και το παθητικό κάπνισμα έχουν συνδεθεί με την παθογένεση του άσθματος και αυξάνουν τη σχετιζόμενη με αυτό νοσηρότητα, κυρίως μέσω τροποποίησης της ανοσολογικής ισορροπίας στο αναπνευστικό επιθήλιο, αύξησης της επιρρέπειας σε λοιμώξεις και ευόδωσης της αλλεργικής ευαισθητοποίησης [345-347]. Είναι συνεπώς πιθανό ότι στις οικογένειες με αλλεργικό νόσημα, είτε στους γονείς είτε στα παιδιά, καταβάλλεται μεγαλύτερη προσπάθεια αποφυγής του καπνού, προκειμένου να μειωθεί ο κίνδυνος μελλοντικής νόσησης ή να περιοριστεί η επιβάρυνση που αυτός προκαλεί σε ήδη εγκατεστημένη νόσο.

Από τα κλινικά χαρακτηριστικά των ατοπικών-αλλεργικών ασθενών επιβεβαιώνεται και στη μελέτη μας η χαρακτηριστική των αλλεργικών νοσημάτων «ατοπική παρέλαση/πορεία», κατά την οποία η εμφάνιση αλλεργικών νοσημάτων και συμπτωμάτων

ακολουθεί μία συγκεκριμένη σειρά, με πρώτο νόσημα συνήθως την ατοπική δερματίτιδα και επόμενα την τροφική αλλεργία, το άσθμα και την αλλεργική ρινίτιδα [242]. Έτσι, τα βρέφη και τα μικρά παιδιά ηλικίας <5 ετών διαπιστώθηκε ότι πάσχουν κατεξοχήν από έκζεμα και τροφική αλλεργία, ενώ η έναρξη αλλεργικής ρινίτιδας παρατηρήθηκε μετά την ηλικία των 2.5 ετών. Στα μεγαλύτερα παιδιά και τους ενήλικες αυξήθηκε σημαντικά η νόσηση από άσθμα και αλλεργική ρινίτιδα, η οποία ήταν και το κυρίαρχο αλλεργικό νόσημα μετά τον 5^ο χρόνο ζωής στον πληθυσμό της μελέτης.

Τέλος, αναφορικά με τις αλλεργικές ευαισθητοποιήσεις, παρατηρήθηκε παρόμοιο προφίλ με αυτό που έχει αναφερθεί και σε άλλες μελέτες για τη Νότια Ευρώπη [348-350]. Πιο συχνά απαντούμενες ευαισθητοποιήσεις ήταν σε γρασίδια, τον ανθό της ελιάς και το περδικάκι, ενώ σημαντικό ποσοστό του πληθυσμού της μελέτης ήταν ευαισθητοποιημένο και στα ακάρεα, το επιθήλιο γάτας και το μύκητα *alternaria*. Σε ό,τι αφορά τα τροφικά αλλεργιογόνα, οι ασθενείς της μελέτης ήταν ευαισθητοποιημένοι κατά κύριο λόγο στο αβγό και σε χαμηλότερο ποσοστό στο γάλα και τους ξηρούς καρπούς. Αυτές είναι και οι συχνότερα αναφερόμενες ευαισθητοποιήσεις στον παιδιατρικό πληθυσμό [351-353]. Το υψηλό ποσοστό ευαισθητοποίησης σε αβγό αποδίδεται στο γεγονός ότι ένα σημαντικό ποσοστό των βρεφών και νηπίων της μελέτης έπασχαν από ατοπική δερματίτιδα και είναι γνωστό ότι σε αυτούς τους ασθενείς το αβγό αποτελεί την κυρίαρχη ευαισθητοποίηση, χωρίς απαραίτητα να σχετίζεται και με κλινική αντιδραστικότητα [354].

Από την ανάλυση των δεδομένων που αφορούσαν στις ιογενείς λοιμώξεις προέκυψαν αρκετές ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις, παρά το μικρό αριθμό ατόμων ανά ηλικιακή ομάδα και το σύντομο χρονικό διάστημα παρακολούθησης (1 έτος). Ενδεχομένως και το κριτήριο που χρησιμοποιήθηκε (λήψη ή όχι αντιβίωσης) για το διαχωρισμό των λοιμώξεων σε ιογενείς και βακτηριακές είναι επισφαλές, δεδομένης της κατάχρησης αντιβιοτικών στη χώρα μας. Καταρχάς, διαπιστώθηκε κορύφωση της νόσησης από ιογενή λοίμωξη γενικά, ιογενή λοίμωξη αναπνευστικού και ανώτερου αναπνευστικού στην ηλικιακή ομάδα 2-5 ετών, δηλαδή την προσχολική ηλικία, τόσο στους υγιείς όσο και στους ατοπικούς- αλλεργικούς και επιπρόσθετα λοίμωξης κατώτερου αναπνευστικού στους ατοπικούς- αλλεργικούς. Σημαντική συμβολή σε αυτό φαίνεται να έχει η έναρξη του παιδικού σταθμού, που στον πληθυσμό μας πραγματοποιήθηκε σε ηλικίες >1.5 ετών και σε ανάλογο ποσοστό στους ατοπικούς και μη. Πράγματι, οι βιβλιογραφικές αναφορές επιβεβαιώνουν το γεγονός ότι η έναρξη παιδικού σταθμού αυξάνει σημαντικά τη

νοσηρότητα από λοιμώξεις και ειδικά του αναπνευστικού συστήματος [355-359]. Από την ανάλυση και συνεκτίμηση των δεδομένων των αιματολογικών παραμέτρων και των κυτταροκινών στους συμμετέχοντες στη μελέτη μας δε διαπιστώθηκαν, παρόλα αυτά, συγκεκριμένα ανοσολογικά ελλείμματα κατά την προσχολική ηλικία στο σκέλος της μη ειδικής ανοσίας, κυτταρικά ή σε επίπεδο σύνθεσης πρωτεϊνών, ικανά να υποδείξουν υποκείμενο μηχανισμό υπεύθυνο για την αύξηση της νοσηρότητας.

Σημαντικές διαφορές αναδείχθηκαν από τη σύγκριση των αναφερόμενων ιογενών λοιμώξεων μεταξύ φυσιολογικών και ατοπικών ατόμων. Έτσι, τα ατοπικά παιδιά (<18 ετών) νόσησαν σε μεγαλύτερο ποσοστό κατά το τελευταίο έτος από ιογενή λοίμωξη γενικά, αλλά και από ιογενή λοίμωξη αναπνευστικού συστήματος και από ιογενή λοίμωξη κατώτερου αναπνευστικού συστήματος. Επιπλέον, οι ατοπικοί εμφάνισαν νόσηση από ιογενή λοίμωξη κατώτερου αναπνευστικού σε υψηλότερο ποσοστό σε σχέση με τους υγιείς και στην ανάλυση που περιελάμβανε ολόκληρο το ηλικιακό φάσμα. Επιπρόσθετα, οι ατοπικοί παρουσίασαν περισσότερα σε αριθμό επεισόδια ιογενούς λοίμωξης, ιογενούς λοίμωξης αναπνευστικού και ιογενούς λοίμωξης κατώτερου αναπνευστικού στην παιδική ηλικία και σε ολόκληρο το ηλικιακό φάσμα. Μάλιστα, οι μεγαλύτερες αποκλίσεις στον αριθμό των επεισοδίων ιογενών λοιμώξεων μεταξύ υγιών και ατοπικών παρατηρήθηκαν κατά κύριο λόγο στην προσχολική ηλικία. Τέλος, διαφορές μεταξύ υγιών και ατοπικών-αλλεργικών διαπιστώθηκαν και στη μέγιστη διάρκεια ιογενούς λοίμωξης, στη μέγιστη διάρκεια ιογενούς λοίμωξης αναπνευστικού και στη μέγιστη διάρκεια ιογενούς λοίμωξης κατώτερου αναπνευστικού, τόσο στον παιδιατρικό, όσο και στο συνολικό πληθυσμό. Η μειωμένη αντίσταση στις λοιμώξεις αναπνευστικού έχει αναφερθεί στους αλλεργικούς τόσο σε παιδιατρικό πληθυσμό [258], όσο και σε ενήλικες [259, 261]. Από την ξεχωριστή ανάλυση που πραγματοποιήθηκε για τις λοιμώξεις ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού, φαίνεται ότι οι παρατηρούμενες αποκλίσεις μεταξύ υγιών και ατοπικών στη νοσηρότητα από λοιμώξεις αναπνευστικού οφείλονται κυρίως στις λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού, δεδομένου ότι δεν αναδείχθηκαν σημαντικές διαφορές στα δεδομένα των λοιμώξεων του ανώτερου αναπνευστικού. Πράγματι, σε μελέτες ενηλίκων ο κίνδυνος λοίμωξης κατώτερου αναπνευστικού βρέθηκε αυξημένος στους ατοπικούς και μάλιστα έχει συσχετιστεί με τα επίπεδα των ειδικών σε αεροαλλεργιογόνα IgE [261]. Επίσης έχει δειχθεί ότι οι ασθματικοί παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης νόσου από το κατώτερο αναπνευστικό, αυξημένη βαρύτητα όσον αφορά τα συμπτώματα και μεγαλύτερη διάρκεια

νόσησης σε σχέση με τους υγιείς [265, 360]. Σε ό,τι αφορά τον παιδιατρικό πληθυσμό, είναι γνωστό ότι οι ιογενείς λοιμώξεις σχετίζονται με ασθματικούς παροξυσμούς στα ασθματικά παιδιά [361] και μάλιστα διαπιστώθηκε ότι τα αλλεργικά ασθματικά παιδιά νοσούν βαρύτερα και πιο παρατεταμένα με τις ιογενείς λοιμώξεις σε σχέση με τα παιδιά που πάσχουν από μη ατοπικό άσθμα [264]. Σε μία πολύ πρόσφατη μελέτη η παρουσία άσθματος ή αλλεργικής ρινίτιδας συσχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο επαναλαμβανομένων λοιμώξεων αναπνευστικού και κατώτερου αλλά όχι ανώτερου αναπνευστικού [362]. Πάντως, για τον παιδιατρικό πληθυσμό τα βιβλιογραφικά δεδομένα που συσχετίζουν την ατοπική νόσο με την επιρρέπεια σε λοιμώξεις είναι ελάχιστα. Στη μελέτη μας, σε ό,τι αφορά τα λευκοκύτταρα που εμπλέκονται στη μη ειδική ανοσιακή απάντηση έναντι των ιών, διαπιστώθηκε σημαντική μείωση με την ηλικία στον αριθμό των μονοκυττάρων μόνο στους ατοπικούς-αλλεργικούς ασθενείς. Μάλιστα, όπως φάνηκε από τις συγκρίσεις μεταξύ των επιμέρους ηλικιακών ομάδων, οι ατοπικοί είχαν σημαντικά μειωμένο αριθμό μονοκυττάρων έναντι των υγιών στην ηλικιακή ομάδα 10-18 ετών. Επιπλέον, αναδείχθηκαν σημαντικές αποκλίσεις μεταξύ υγιών και ατοπικών στην ανοσολογική ωρίμανση των οδών TLR3 & 7/8, που εμπλέκονται στην φυσική ανοσιακή απάντηση έναντι των ιών και μάλιστα αφορούσαν μόρια καίριας σημασίας στην αντι-ική άμυνα, όπως οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και οι χημειοκίνες. Κατά την ανάλυση των κυτταροκινών ανά ηλικιακές ομάδες, οι συγκρίσεις μεταξύ υγιών και ατοπικών ανά ηλικία δεν ανέδειξαν σημαντικό ανοσολογικό έλλειμμα σε κάποια από τις ομάδες. Μολαταύτα, είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον το γεγονός ότι οι μεγαλύτερες αποκλίσεις στον αριθμό των επεισοδίων ιογενών λοιμώξεων μεταξύ υγιών και ατοπικών παρατηρούνται κατά κύριο λόγο στην προσχολική ηλικία, που συμπίπτει με την έναρξη του παιδικού σταθμού, αλλά ταυτόχρονα αποτελεί και τη χρονική περίοδο έναρξης των αναπνευστικών αλλεργιών στον πληθυσμό μας. Ενδέχεται, επομένως η ανοσολογική απορρύθμιση που συνδέεται με την εγκατάσταση των αναπνευστικών αλλεργικών νοσημάτων να μοιράζεται κοινούς παθογενετικούς μηχανισμούς με τη μειωμένη αντίσταση στις ιογενείς λοιμώξεις. Η αυξημένη επιρρέπεια των ατοπικών παιδιών στις ιογενείς λοιμώξεις καθίσταται εμφανέστερη με την έναρξη του παιδικού σταθμού και την κατακόρυφη αύξηση της έκθεσης σε λοιμογόνους παράγοντες. Πιθανώς, η αδυναμία ανοσολογικής ερμηνείας του φαινομένου αυτού να οφείλεται στο σχετικά μικρό αριθμό του δείγματος στη μελέτη μας και τη σημαντική μεταβλητότητα των τιμών των κυτταροκινών.

6.2 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

6.2.1 Μελέτη των μεταβολών των λευκοκυτταρικών πληθυσμών

Από τις αναλύσεις γενικής αίματος και την επεξεργασία των δεδομένων που αφορούσαν τα λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος διαπιστώθηκε μείωση με την ηλικία στο συνολικό αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων, στον αριθμό των λεμφοκυττάρων και των ηωσινοφίλων σε υγιείς και ατοπικούς και των μονοκυττάρων στους ατοπικούς. Μάλιστα, από τη σύγκριση μεταξύ των ηλικιακών ομάδων φάνηκε ότι οι μεταβολές συμβαίνουν κατά κύριο λόγο μετά τον 1^ο χρόνο ζωής. Αντίστοιχες τάσεις έχουν δειχθεί σε διάφορες μελέτες, τόσο για το συνολικό αριθμό των λευκοκυττάρων [363-365], όσο και για τα λεμφοκύτταρα [366-369], τα μονοκύτταρα [179, 190, 191] και τα ηωσινόφιλα [179, 190, 370].

Επιπρόσθετα, η σύγκριση των ανωτέρω αιματολογικών παραμέτρων μεταξύ υγιών και ατοπικών- αλλεργικών ανά ηλικιακή ομάδα με το Wilcoxon rank-sum test ανέδειξε κάποιες σημαντικές διαφορές και συγκεκριμένα:

- αυξημένο αριθμό ηωσινοφίλων στους ατοπικούς- αλλεργικούς στις ηλικιακές ομάδες 4-10 και 10-18 ετών
- αυξημένο αριθμό λεμφοκυττάρων και μονοκυττάρων στους υγιείς στην ηλικιακή ομάδα 10-18 ετών.

Αυξημένος αριθμός ηωσινοφίλων και των πρωτεϊνών τους έχει δειχθεί σε παιδιά και ενήλικες με αλλεργικό νόσημα, όπως ατοπική δερματίτιδα, άσθμα και αλλεργική ρινίτιδα και μάλιστα σε αρκετές περιπτώσεις φαίνεται να συμβαδίζει με τη βαρύτητα της νόσου [371-379]. Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει αυξημένο αριθμό ηωσινοφίλων στα ατοπικά παιδιά ήδη από τη βρεφική ηλικία ή τη νηπιακή ηλικία [380, 381]. Στη μελέτη μας η υπεροχή των ηωσινοφίλων στους ατοπικούς γίνεται εμφανής από την ηλικιακή ομάδα των 4-10 ετών, δηλαδή από την προσχολική ηλικία και έπειτα, όπου παρατηρείται και η εμφάνιση των αλλεργικών νοσημάτων του αναπνευστικού.

Διαφοροποιήσεις έχουν δειχθεί παρουσία ατοπικής νόσου και για τους υπόλοιπους υποπληθυσμούς των λευκοκυττάρων σε παιδιατρικό πληθυσμό, αλλά συγκριτικά δεδομένα για όλους τους βασικούς λευκοκυτταρικούς υποπληθυσμούς ανά ηλικιακή ομάδα δεν υπάρχουν. Σε παιδιά με ατοπική δερματίτιδα διαπιστώθηκε από κάποιους αυξημένος αριθμός λευκοκυττάρων, πολυμορφοπυρήνων και λεμφοκυττάρων [382], ενώ άλλοι

ερευνητές δε διαπίστωσαν σημαντικές διαφορές στον αριθμό πολυμορφοπυρήνων, λεμφοκυττάρων και μονοκυττάρων [383]. Και στις 2 αυτές μελέτες ο αριθμός των λεμφοκυττάρων παρουσίαζε αντίστροφη συσχέτιση με τη βαρύτητα της νόσου. Επιπλέον, διαπιστώθηκε συσχέτιση των δεικτών πολυμορφοπύρηνα/λεμφοκύτταρα και ηωσινόφιλα/λεμφοκύτταρα με τη βαρύτητα της ατοπικής δερματίτιδας. Επίσης, ο δείκτης πολυμορφοπύρηνα/λεμφοκύτταρα έχει βρεθεί αυξημένος και σε παιδιά με άσθμα ή αλλεργική ρινίτιδα σε σχέση με υγιείς μάρτυρες [384, 385]. Σε ασθενείς με ατοπική δερματίτιδα έχουν επίσης δειχθεί μειωμένοι πληθυσμοί κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων [386, 387].

Στην παρούσα μελέτη ο πληθυσμός των ατοπικών δεν ήταν ομοιογενής, καθώς οι ασθενείς έπασχαν από ποικίλα αλλεργικά νοσήματα σε διάφορους συνδυασμούς και τη στιγμή της δειγματοληψίας δεν ελήφθη υπόψη αν βρίσκονταν σε φάση έξαρσης ή ύφεσης. Παρόλα αυτά, φαίνεται ότι η ατοπική νόσος σχετίζεται με διαταραχές στους κύριους λευκοκυτταρικούς υποπληθυσμούς, με αύξηση των ηωσινοφίλων εις βάρος των λεμφοκυττάρων και μονοκυττάρων. Ενδεχομένως, στις παρατηρούμενες διαφορές στα παιδιά σχολικής ηλικίας, που κατά κύριο λόγο έπασχαν από αναπνευστικές αλλεργίες, να παίζει ρόλο και η συσσώρευση κυττάρων όπως τα λεμφοκύτταρα και τα μονοκύτταρα στους αεραγωγούς [388-390], με αποτέλεσμα τη σχετική ένδειά τους από την περιφερική κυκλοφορία. Όπως ήδη αναφέρθηκε, η σημαντική μείωση των κυκλοφορούντων μονοκυττάρων στους ατοπικούς- αλλεργικούς πιθανώς συμβάλλει στην αυξημένη επιρρέπειά τους σε ιογενείς λοιμώξεις.

6.2.2 Μελέτη των μεταβολών της βιοσύνθεσης κυτταροκινών

Από τη μελέτη των μεταβολών της παραγωγής κυτταροκινών με την ηλικία προέκυψαν σημαντικά ευρήματα σχετικά με την ωρίμανση των οδών την μη ειδικής ανοσίας που σχετίζονται με την ανοσιακή απόκριση έναντι των ιογενών (οδοί TLR3 & TLR7/8) και των βακτηριακών (οδός TLR4) λοιμώξεων, τόσο στους υγιείς όσο και τους ατοπικούς.

Το πρώτο σημαντικό εύρημα είναι η ωρίμανση των αποκρίσεων της μη ειδικής ανοσίας έναντι των ιών σε ό,τι αφορά Th1-σχετιζόμενα μόρια (IL-12) και φλεγμονώδεις κυτταροκίνες (TNF-α και IL-1β). Η προοδευτική αύξηση με την ηλικία της παραγωγής των

ανωτέρω μορίων βρέθηκε ότι συμβαδίζει και με την παράλληλη ωρίμανση των Th1 απαντήσεων της επίκτητης ανοσίας, που υποδηλώνεται από την προοδευτική αύξηση της IFN- γ . Ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι ότι οι μεταβολές αυτές παρατηρήθηκαν μόνο στα υγιή άτομα και όχι στους ατοπικούς-αλλεργικούς ασθενείς. Οι παρατηρήσεις μας είναι συμβατές με ευρήματα από άλλες μελέτες που έχουν αξιολογήσει την ωρίμανση των οδών TLR3 και 7/8. Πράγματι, έχει βρεθεί ότι η παραγωγή IL-12 αυξάνεται μετά τον τοκετό, για να φθάσει σε επίπεδα ενήλικα νωρίς στη βρεφική ηλικία [221] ή σε λίγο μεταγενέστερο χρονικό σημείο [220, 222, 228]. Το ίδιο αναπτυξιακό πρότυπο έχει διαπιστωθεί και για τις φλεγμονώδεις κυτταροκίνες TNF- α και IL-1 β . Η μόνη αξιοσημείωτη εξαίρεση έχει βρεθεί σε ένα νοτιοαφρικανικό πληθυσμό [217], όπου όλες οι ανωτέρω αποκρίσεις μειώθηκαν με την ηλικία. Ως εκ τούτου, είναι πιθανό ότι διαφορετικοί γενετικοί ή/και περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορεί να επηρεάζουν την ανοσιακή ωρίμανση. Πάντως, το εγγενές πρόγραμμα της ανοσολογικής ωρίμανσης, παρόλο που φαίνεται να έχει κοινή κατεύθυνση στους περισσότερους πληθυσμούς, παρουσιάζει σημαντικές διακυμάνσεις στο ρυθμό με τον οποίο συμβαίνουν οι αλλαγές σε κάθε πληθυσμό. Οι παρατηρούμενες διαφορές μεταξύ των μελετών, πέραν των γενετικών και περιβαλλοντικών επιδράσεων, ενδεχομένως σχετίζονται και με μεθοδολογικές διαφορές (π.χ. στο σχεδιασμό της μελέτης, το βιολογικό υλικό κ.ά). Η επίδραση της ατοπίας στη διαδικασία ωρίμανσης της μη ειδικής ανοσίας έχει μελετηθεί μέχρι την ηλικία των 5 ετών από τους Tulic et al [217], οι οποίοι επίσης παρατήρησαν υπολειπόμενη ωρίμανση φλεγμονωδών και Th1-σχετιζόμενων μορίων στα ατοπικά άτομα. Τα δεδομένα μας υποδεικνύουν ότι αυτές οι ανεπαρκείς απαντήσεις επιμένουν σε όλη την παιδική ηλικία αλλά και την ενήλικη ζωή και μπορεί να συνδέονται όχι μόνο με την εμφάνιση και την επιμονή των αλλεργικών ασθενειών, αλλά και με την αυξημένη εμφάνιση ιογενών λοιμώξεων στους ατοπικούς. Ωστόσο, δεν μπορεί να προσδιοριστεί το κατά πόσον οι παρατηρούμενες διαφορές στις τροχιές της ανοσολογικής ωρίμανσης μεταξύ υγιών και ατοπικών είναι η αιτία ή το αποτέλεσμα της ατοπικής νόσου.

Προοδευτική ωρίμανση με την ηλικία των φλεγμονωδών (TNF- α , IL-1 β) και Th1 (IL-12, IFN- γ) απαντήσεων έχει διαπιστωθεί από πολλούς ερευνητές και για το TLR4 μονοπάτι της μη ειδικής ανοσίας [194, 217, 219-222, 226-230, 257]. Στην παρούσα μελέτη αναδείχθηκε σημαντική αύξηση με την ηλικία μόνο στην παραγωγή της IFN- γ και το εύρημα αυτό αφορούσε μόνο τον υγιή πληθυσμό. Παρομοίως, οι Tulic et al και οι Itazawa et al που αξιολόγησαν διαφορές στην αναπτυξιακή εξέλιξη του TLR4 μονοπατιού μεταξύ υγιών και

αλλεργικών, ανέδειξαν σημαντικές διαφοροποιήσεις στην ωρίμανση της παραγωγής των IL-12 και IFN- γ , με σημαντικά υπολειπόμενη σύνθεσή τους στους ατοπικούς [217, 257].

Το δεύτερο σημαντικό εύρημα της μελέτης μας είναι η αύξηση με την ηλικία στη σύνθεση των χημειοκινών MCP-3, MIP1- β και IP-10 κατόπιν διέγερσης με TLR3, 4 & 7/8 αγωνιστές. Δύο μόνο μελέτες έχουν έως τώρα αξιολογήσει την ωρίμανση της σύνθεσης χημειοκινών μετά από TLR διέγερση. Η πρώτη πραγματοποιήθηκε σε νοτιοαφρικανικό πληθυσμό [224] και, όπως παρατηρήθηκε και για άλλα μόρια, τα αποτελέσματα της ήταν αντίθετα από τα δικά μας, δείχνοντας μείωση στην παραγωγή των MCP-1, IP-10 (μετά από TLR3 & 7/8 διέγερση) και MIP-1 β (μετά από TLR7/8 διέγερση) από τη γέννηση μέχρι την ηλικία των 12 μηνών. Η παραγωγή του MIP-1 β μετά από TLR4 διέγερση παρουσίασε μικρή αύξηση από τη γέννηση μέχρι τον 1^ο χρόνο και μετά σημαντική πτώση σε χαμηλότερα σε σχέση με τα αρχικά επίπεδα μέχρι την ενηλικίωση. Πιθανότατα και σε ό,τι αφορά τις χημειοκίνες, το διαφορετικό αναπτυξιακό πρότυπο συνδέεται με το διαφορετικό γενετικό υπόστρωμα μεταξύ των δύο πληθυσμών, αλλά και τις διαφορετικές περιβαλλοντικές επιδράσεις μεταξύ των δύο ηπείρων (Ευρώπης έναντι Αφρικής). Η δεύτερη, πιο πρόσφατη μελέτη, συνέκρινε τις μεταβολές από τη νεογνική ηλικία με τον 6^ο μήνα ζωής και τους ενήλικες και ανέδειξε πτωτική πορεία για τα μόρια MCP-1 & RANTES (μετά από διέγερση των TLR4, 7/8 & 9) και αυξητική για την IP-10 (μετά από διέγερση του TLR4). Η χημειοκίνη MIP-1 β φάνηκε να μειώνεται από τη γέννηση μέχρι τον 6^ο μήνα και στη συνέχεια να παραμένει σχετικά σταθερή [222]. Παρόλα αυτά τα αποτελέσματά της έρευνας αυτής βασίζονται σε μικρό αριθμό παρατηρήσεων στη βρεφική ηλικία (n=8). Η μελέτη μας προσθέτει πολύτιμα δεδομένα σχετικά με την ωρίμανση της σύνθεσης χημειοκινών από τη γέννηση μέχρι την ενηλικίωση, ενώ παράλληλα για πρώτη φορά αξιολογούνται οι διαφορές μεταξύ υγιών και ατοπικών ατόμων. Τα μόρια αυτά εμπλέκονται στην κινητοποίηση των μονοκυττάρων, τη μετανάστευση των μακροφάγων και NK-κυττάρων και στην αλληλεπίδραση μεταξύ T-λεμφοκυττάρων και δενδριτικών κυττάρων [391]. Μάλιστα, η αυξημένη παραγωγή MIP-1 β έχει συσχετιστεί με καλύτερα κλινικά αποτελέσματα σε ιογενείς λοιμώξεις [392, 393]. Συνεπώς, μπορεί κανείς να υποθέσει ότι η ανεπαρκής ωρίμανση που παρατηρείται στη σύνθεση χημειοκινών στην ατοπική νόσο μπορεί επίσης να συνεισφέρει στην αυξημένη επιρρέπεια των ατοπικών σε ιογενείς, αλλά ενδεχομένως και βακτηριακές λοιμώξεις.

Ξεχωριστή περίπτωση φαίνεται να αποτελεί η χημειοκίνη MDC, της οποίας τα επίπεδα παρουσίασαν σημαντική πτώση τόσο στους υγιείς όσο και τους ατοπικούς, μετά από TLR4 διέγερση. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι η σύνθεση της MDC καταστέλλεται από Th1 κυτταροκίνες και ευοδώνεται από Th2 κυτταροκίνες, συμβάλλοντας μάλιστα στη μεγέθυνση των Th2 απαντήσεων μέσω δράσης σε δενδριτικά κύτταρα και Th2-λεμφοκύτταρα [394, 395]. Στη μελέτη μας η σημαντική μείωση της MDC στους υγιείς συνοδεύτηκε από την παράλληλη αύξηση της IFN- γ και μάλιστα φαίνεται ότι το ναδίρ των τιμών της πρώτης παρατηρείται στην ίδια ηλικία με το ζενίθ των τιμών της δεύτερης, κατά τη 2^η δεκαετία της ζωής. Εντύπωση προκαλεί η πτωτική με την ηλικία πορεία της MDC και στους ατοπικούς, παρά το γεγονός ότι σε αυτούς δεν παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στην παραγωγή Th1 μορίων. Ενδεχομένως πρόκειται για μόριο δευτερεύουσας σημασίας στην παθογένεση των αλλεργικών νοσημάτων. Παρόλα αυτά, αξίζει να σημειωθεί ότι στους ατοπικούς οι μέσες τιμές της MDC στις περισσότερες ηλικιακές ομάδες ήταν υψηλότερες σε σχέση με τους υγιείς.

Μία ακόμα ενδιαφέρουσα παρατήρηση είναι ότι οι μέσες τιμές των φλεγμονωδών κυτταροκινών αλλά και των χημειοκινών στην αρχή της ζωής είναι υψηλότερες στους ατοπικούς παρά στους υγιείς. Με την αύξηση της ηλικίας οι αποκρίσεις των ατοπικών δε μεταβάλλονται ιδιαίτερα, ενώ αντίθετα στους υγιείς παρατηρούνται σημαντικές αυξήσεις. Παρόμοια «υπεραντιδραστικότητα» στους ατοπικούς ανέδειξαν και οι Tulic et al στη μελέτη τους [217], η οποία φαίνεται να διατηρείται μέχρι περίπου την ηλικία των 2.5 ετών. Στη μελέτη μας η διάρκεια της υπεραντιδραστικότητας που χαρακτηρίζει τις αποκρίσεις της μη ειδικής ανοσίας στους ατοπικούς (όπως αυτή ορίζεται από το χρονικό σημείο/ηλικία που οι τιμές για κάθε κυτταροκίνη στους υγιείς υπερβαίνουν αυτές των ατοπικών και ως εκ τούτου τέμνονται οι καμπύλες που περιγράφουν τη μεταβολή κάθε μορίου σε σχέση με την ηλικία στις δύο ομάδες) ποικίλει μεταξύ των διαφόρων μορίων που μελετήθηκαν και μάλιστα φαίνεται να είναι μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή της μελέτης των Tulic et al.

Σε ό,τι αφορά την παραγωγή της αντιφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-10, διαπιστώθηκε ότι αυξάνεται με την ηλικία τόσο σε υγιή, όσο και σε ατοπικά άτομα. Παρόλα αυτά, μετά από διέγερση με TLR3, παρατηρήθηκε πιο απότομη αύξηση της παράγωγής της με την αύξηση της ηλικίας στους υγιείς (σύγκριση των κλίσεων των καμπυλών της γραμμικής παλινδρόμησης). Αύξηση στη σύνθεση της IL-10 κατόπιν TLR3, TLR 4 και TLR7/8 διέγερσης έχει δειχθεί από αρκετές μελέτες [219, 221, 227-229] κατά τη διάρκεια των

πρώτων μηνών της ζωής. Τα ευρήματά μας συμπληρώνουν τα μέχρι τώρα δεδομένα, προσθέτοντας παρατηρήσεις που αφορούν μεταγενέστερα χρονικά σημεία της παιδικής ηλικίας και μέχρι την ενηλικίωση. Στη μοναδική άλλη μελέτη που αξιολογεί τις διαφορές μεταξύ υγιών και αλλεργικών ατόμων βρέθηκε επίσης σημαντική διαφορά στην παραγωγή της IL-10 με την πάροδο του χρόνου μεταξύ των 2 ομάδων, με υψηλότερη έκκριση στους ατοπικούς μέχρι την ηλικία των 2.5 ετών και στη συνέχεια στους υγιείς [212]. Στη μελέτη μας, μετά από TLR3 διέγερση, προέκυψαν παρόμοια ευρήματα, με τη διαφορά ότι η παραγωγή της IL-10 στους υγιείς αυξάνεται σημαντικά και υπερβαίνει αυτή των ατοπικών λίγο μεταγενέστερα, περίπου στην ηλικία των 5 ετών. Τα τελευταία χρόνια έχει δειχθεί ότι η διέγερση του TLR3 μπορεί να εμπλέκεται στην παθογένεση του άσθματος σε πειραματικά μοντέλα [272, 396, 397] και μάλιστα περισσότερο σε σχέση με την ενεργοποίηση του TLR7/8 [273]. Από την άλλη πλευρά, σε μελέτες που έδειξαν προστατευτικό ρόλο του TLR3 σε σχέση με την παθογένεση του άσθματος φαίνεται ότι μεσολαβείται από την παραγωγή IL-12 και IL-10 [398]. Στη μελέτη μας φάνηκε ότι η ωρίμανση της παραγωγής IL-10 μετά από TLR3 διέγερση αρχίζει και μειονεκτεί στους ατοπικούς μετά την ηλικία των 5 ετών, που συμπίπτει με την ηλικία έναρξης των αναπνευστικών αλλεργιών. Σε συνδυασμό και με τα παραπάνω μπορεί κανείς να υποθέσει ότι η ωρίμανση της ικανότητας σύνθεσης IL-10 στους υγιείς ενδεχομένως συνδέεται με την προστασία από τα αλλεργικά νοσήματα του αναπνευστικού.

Τέλος, σε ό,τι αφορά την ωρίμανση στους υγιείς των τριών αυτών μονοπατιών της μη ειδικής ανοσίας που εμπλέκονται στην αναγνώριση ιών και βακτηρίων, αξίζει να σημειωθεί ότι, εκτός των ομοιοτήτων, βρέθηκαν και κάποιες διαφορές. Έτσι, η παραγωγή της IL-12p70 παρουσίασε σημαντική αύξηση με την ηλικία μόνο μετά από TLR7/8 διέγερση. Αύξηση στη σύνθεση φλεγμονωδών κυτταροκινών διαπιστώθηκε μόνο για τις οδούς TLR3 & TLR7/8. Μείωση στην παραγωγή MDC παρατηρήθηκε μόνο για το TLR4 μονοπάτι. Όπως φαίνεται από τις καμπύλες πολυωνυμικής παλινδρόμησης, η μέγιστη ικανότητα παραγωγής IL-1β και TNF-α κατά την ωρίμανση της TLR3 οδού παρατηρήθηκε νωρίτερα συγκρινόμενη με την TLR7/8 οδό. Για όλα τα TLR μονοπάτια που μελετήθηκαν βρέθηκε προοδευτική αύξηση παραγωγής της IL-10. Φαίνεται όμως ότι η ικανότητα σύνθεσής της ωριμάζει ταχύτερα για την TLR7/8 οδό σε σχέση με τις TLR3 & 4. Όντως, έχει δειχθεί ότι η ωρίμανση της μη ειδικής ανοσίας δεν είναι γραμμική και ποικίλλει για κάθε TLR μονοπάτι [141] και μάλιστα και στις δύο μελέτες που έχουν ως τώρα αξιολογήσει την ωρίμανση των TLR οδών που σχετίζονται με την αναγνώριση των ιών φαίνεται ότι υπάρχουν διαφορές μεταξύ των

TLR3- και TLR7/8- επαγόμενων αποκρίσεων [220, 224]. Παρόλα αυτά, η σχετική ένδεια δεδομένων πάνω σε αυτό το θέμα, καθώς και το γεγονός ότι τα μέχρι τώρα δημοσιευμένα στοιχεία αναφέρονται μόνο στα πρώτα χρόνια της ζωής, δεν επιτρέπει τη σύγκριση με τα δικά μας και την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων σχετικά με τις επιμέρους διαφορές στην ωρίμανση των τριών αυτών μονοπατιών.

Στη μελέτη μας υπήρξαν κάποιες αδυναμίες. Καταρχάς, πρόκειται για μία μελέτη διατομής (cross-sectional) και όχι προοπτική μελέτη, οπότε οι παρατηρούμενες αλλαγές στις ανοσολογικές παραμέτρους ενδεχομένως επηρεάζονται από την ποικιλιότητα μεταξύ των ατόμων αλλά και τις μεταβολές από γενιά σε γενιά. Προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν τουλάχιστον οι επιπτώσεις από άλλους παράγοντες που είναι γνωστό ότι επηρεάζουν τις αποκρίσεις των κυτταροκινών -όπως οι λοιμώξεις και η λήψη φαρμάκων- θεσπίστηκαν αυστηρά κριτήρια εισαγωγής στη μελέτη. Μία ακόμα αδυναμία της μελέτης είναι ότι δεν προσδιορίζεται η κυτταρική πηγή των κυτταροκινών που παράγονται μετά από διέγερση με TLR αγωνιστές, καθότι οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε υπερκείμενα καλλιέργειών PBMCs. Σαφώς, περαιτέρω παρατηρήσεις είναι απαραίτητες προκειμένου να αποσαφηνιστούν σε κυτταρικό επίπεδο οι υπεύθυνοι μηχανισμοί για τις αποκλίνουσες αποκρίσεις της μη ειδικής ανοσίας στους ατοπικούς- αλλεργικούς. Επιπρόσθετα, η μέτρηση των τιμών των κυτταροκινών μετά από 24 ώρες κυτταροκαλλιέργειας ενδεχομένως δεν ήταν ο βέλτιστος χρόνος για τη μελέτη των αποκρίσεων της μη ειδικής ανοσίας για όλα τα μόρια. Παρόλα αυτά ήταν απαραίτητη για πειραματικούς σκοπούς η επιλογή ενός χρονικού σημείου για τις μετρήσεις, σύμφωνα και με τα συναφή βιβλιογραφικά δεδομένα και με προηγούμενα πειραματικά δεδομένα του εργαστηρίου μας. Τέλος, καθώς οι μετρηθείσες τιμές για τις κυτταροκίνες IL-23, IL-27, IL-28A και IL-33 ήταν χαμηλές, τα δεδομένα που αφορούν σε αυτές θα πρέπει να αξιολογηθούν με προσοχή. Καθώς μάλιστα τελευταία αναγνωρίζεται ότι τα ανωτέρω μόρια είναι σημαντικά για τη διαμόρφωση των απαντήσεων της επίκτητης ανοσίας, επιβάλλεται η μελέτη της ωρίμανσής τους με άλλα, πιο κατάλληλα/ ευαίσθητα εργαλεία.

Παρά τους όποιους περιορισμούς της, η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που χαρακτηρίζει την ωρίμανση των TLR3, TLR4 και TLR7/8 οδών της μη ειδικής ανοσίας από τη γέννηση μέχρι την ενήλικη ζωή, περιγράφοντας τη συσχέτιση της βιοσύνθεσης πλήθους μορίων με την ηλικία τόσο σε υγιή, όσο και σε ατοπικά- αλλεργικά άτομα. Τα δεδομένα που προέκυψαν για την ωρίμανση με την ηλικία της παραγωγής Th1, φλεγμονωδών και

αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών καθώς και χημειοκινών σε υγιή άτομα συμπληρώνουν ή/και επεκτείνουν παρόμοια ευρήματα από μελέτες σε διαφορετικούς πληθυσμούς. Από την άλλη πλευρά, η διαπιστούμενη ελαττωματική ωρίμανση αυτών των αποκρίσεων στα ατοπικά άτομα συνδέει τον αλλεργικό φαινότυπο με μια γενικευμένη απόκλιση από τη φυσιολογική ανάπτυξη της μη ειδικής ανοσίας και μπορεί να συμβάλλει στην αυξημένη ευαισθησία των αλλεργικών υποκειμένων στις λοιμώξεις.

7. ΠΕΡΙΛΗΨΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μελέτη εξέτασε παραμέτρους που αφορούν την ωρίμανση της φυσικής ή μη ειδικής ανοσίας από τη γέννηση μέχρι την ενηλικίωση, τόσο σε υγιή όσο και σε ατοπικά-αλλεργικά άτομα.

Διαπιστώθηκαν καταρχάς σημαντικές με την ηλικία μειώσεις στο συνολικό αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων σε υγιείς και ατοπικούς, αλλά και στους πληθυσμούς κυττάρων που συμμετέχουν στη μη ειδική ανοσία, όπως τα ηωσινόφιλα (σε υγιείς και ατοπικούς) και τα μονοκύτταρα (στους ατοπικούς). Οι σημαντικότερες μεταβολές φαίνεται ότι συμβαίνουν κατά κύριο λόγο μετά τον 1^ο χρόνο ζωής. Επίσης, παρατηρήθηκε αυξημένος αριθμός ηωσινοφίλων στα ατοπικά-αλλεργικά παιδιά μετά την ηλικία των 4 ετών, γεγονός που συνέπεσε με την έναρξη των αναπνευστικών αλλεργιών. Αντιθέτως, βρέθηκε αυξημένος αριθμός μονοκυττάρων στους υγιείς στην ηλικιακή ομάδα 10-18 ετών.

Σε ό,τι αφορά τις TLR- επαγόμενες απαντήσεις κυτταροκινών σε μικροβιακά (TLR4) και ιογενή (TLR3 & TLR7/8) ερεθίσματα διαπιστώθηκε με την παρούσα μελέτη μεταβολή-ωρίμανση με την ηλικία στην ικανότητα σύνθεσης μιας πλειάδας μορίων από τη γέννηση μέχρι την ενηλικίωση. Το είδος της μεταβολής (αύξηση ή μείωση) και ο ρυθμός που αυτή επιτελείται φαίνεται ότι ποικίλλει ανάλογα με το TLR μονοπάτι και το μόριο που μελετάται.

Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ωρίμανση- αύξηση με την ηλικία στην παραγωγή

- **φλεγμονωδών κυτταροκινών (TNF-α – TLR3) (IL-1β – TLR3 & TLR7/8)**
- **Th1 κυτταροκινών (IL-12 – TLR7/8) (IFN-γ – TLR3, TLR4 & TLR7/8)**
- **χημειοκινών (MIP-1β – TLR3, TLR4 & TLR7/8) (MCP-3, IP-10 – TLR7/8)**
- **αντιφλεγμονωδών μορίων (IL-10 – TLR3, TLR4 & TLR7/8).**

Αντιθέτως, δείχθηκε μείωση με την ηλικία στην TLR4- επαγόμενη παραγωγή της χημειοκίνης MDC.

Οι παρατηρούμενες μεταβολές από τη γέννηση μέχρι την ενηλικίωση αφορούσαν κυρίως τους υγιείς, καθώς στα ατοπικά-αλλεργικά άτομα παρατηρήθηκε ωρίμανση μόνο στην ικανότητα σύνθεσης IL-10 για όλες τις TLR οδούς που μελετήθηκαν και μείωση στην παραγωγή MDC κατόπιν TLR4 διέγερσης. Συνεπώς, η ατοπία συσχετίστηκε με αποκλίσεις από τη φυσιολογική ωρίμανση των TLR3, TLR4 και 7/8- εξαρτώμενων απαντήσεων, γεγονός που φαίνεται να συμβαδίζει και με την παρατηρούμενη στη μελέτη μας αυξημένη επιρρέπεια των ατοπικών σε ιογενείς λοιμώξεις, ιδίως του αναπνευστικού συστήματος.

SUMMARY

The present study examined parameters related to the maturation of innate (or non-specific) immunity from birth to adulthood in both healthy and atopic individuals.

First, we observed significant decreases with age in the total white blood cell count in healthy and atopic subjects. Decreases with age were also found in the subpopulations of several leukocytes involved in non-specific immunity, such as eosinophils (in healthy and atopics) and monocytes (in atopics only). The most significant changes mainly occurred after the 1st year of life. Furthermore, our study revealed increased numbers of eosinophils in atopic-allergic children after the age of 4, which interestingly coincided with the onset of respiratory allergies. In contrast, increased numbers of monocytes were observed in healthy subjects in the age group of 10-18 years.

Regarding TLR-induced responses to microbial (TLR4) and viral (TLR3 & TLR7/8) stimuli, the present study revealed age-related maturation for a multitude of molecules from birth to adulthood. The type of change (increase or decrease) observed in the production of each molecule, as well as the rate/tempo at which these changes occur vary among different TLR pathways and/or different molecules. In specific, in our study age-related increases were found in the production of

- proinflammatory cytokines (TNF- α – TLR3) (IL-1 β – TLR3 & TLR7/8)
- Th1 cytokines (IL-12- TLR7/8) (IFN- γ – TLR3, TLR4 & TLR7/8)
- chemokines (MIP-1 β – TLR3, TLR4 & TLR7/8) (MCP-3, IP-10 – TLR7/8)
- anti-inflammatory molecules (IL-10 – TLR3, TLR4 & TLR7/8).

In contrast, there was a decrease with age in TLR4-induced production of chemokine MDC.

The aforementioned changes from birth to adulthood were mainly observed in healthy subjects, as atopics only presented an increase with age in the production of IL-10 (for all TLR pathways studied) and a decrease in LPS-induced MDC synthesis (TLR4 pathway). Consequently, the defective maturation of these responses in atopic subjects links the allergic phenotype with a generalized deviation from normal innate immune system development and may be an important contributing factor to the increased susceptibility of allergic subjects to viral infections (mainly respiratory), observed in our study.

8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr., *Innate immunity*. N Engl J Med, 2000. 343(5): p. 338-44.
2. Gasteiger, G., et al., *Cellular Innate Immunity: An Old Game with New Players*. J Innate Immun, 2017. 9(2): p. 111-125.
3. Riera Romo, M., D. Perez-Martinez, and C. Castillo Ferrer, *Innate immunity in vertebrates: an overview*. Immunology, 2016. 148(2): p. 125-39.
4. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Control of adaptive immunity by the innate immune system*. Nat Immunol, 2015. 16(4): p. 343-53.
5. Turvey, S.E. and D.H. Broide, *Innate immunity*. J Allergy Clin Immunol, 2010. 125(2 Suppl 2): p. S24-32.
6. Netea, M.G., J. Quintin, and J.W. van der Meer, *Trained immunity: a memory for innate host defense*. Cell Host Microbe, 2011. 9(5): p. 355-61.
7. Elias, P.M., *The skin barrier as an innate immune element*. Semin Immunopathol, 2007. 29(1): p. 3-14.
8. Heath, W.R. and F.R. Carbone, *The skin-resident and migratory immune system in steady state and memory: innate lymphocytes, dendritic cells and T cells*. Nat Immunol, 2013. 14(10): p. 978-85.
9. Stamatias, G.N., et al., *Infant skin physiology and development during the first years of life: a review of recent findings based on in vivo studies*. Int J Cosmet Sci, 2011. 33(1): p. 17-24.
10. Grice, E.A., et al., *A diversity profile of the human skin microbiota*. Genome Res, 2008. 18(7): p. 1043-50.
11. Nakamizo, S., et al., *Commensal bacteria and cutaneous immunity*. Semin Immunopathol, 2015. 37(1): p. 73-80.
12. Grice, E.A. and J.A. Segre, *The skin microbiome*. Nat Rev Microbiol, 2011. 9(4): p. 244-53.
13. Schaubert, J. and R.L. Gallo, *Antimicrobial peptides and the skin immune defense system*. J Allergy Clin Immunol, 2008. 122(2): p. 261-6.
14. Wiesner, J. and A. Vilcinskas, *Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system*. Virulence, 2010. 1(5): p. 440-64.
15. Handfield, C., J. Kwock, and A.S. MacLeod, *Innate Antiviral Immunity in the Skin*. Trends Immunol, 2018. 39(4): p. 328-340.
16. Tay, S.S., et al., *The Skin-Resident Immune Network*. Curr Dermatol Rep, 2014. 3: p. 13-22.
17. Bonefeld, C.M. and C. Geisler, *The role of innate lymphoid cells in healthy and inflamed skin*. Immunol Lett, 2016. 179: p. 25-28.
18. Fabian, T.K., et al., *Salivary defense proteins: their network and role in innate and acquired oral immunity*. Int J Mol Sci, 2012. 13(4): p. 4295-320.
19. Mori, M., et al., *Antimicrobial Peptides in Saliva and Salivary Glands: Their Roles in the Oral Defense System*. Oral Medicine & Pathology, 2006. 11(1): p. 1-17.
20. Yandrapu, H. and J. Sarosiek, *Protective Factors of the Gastric and Duodenal Mucosa: An Overview*. Curr Gastroenterol Rep, 2015. 17(6): p. 24.
21. Park, A.M., et al., *Galectin-3 Plays an Important Role in Innate Immunity to Gastric Infection by Helicobacter pylori*. Infect Immun, 2016. 84(4): p. 1184-1193.
22. Lievin-Le Moal, V. and A.L. Servin, *The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota*. Clin Microbiol Rev, 2006. 19(2): p. 315-37.
23. Gallo, R.L. and L.V. Hooper, *Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine*. Nat Rev Immunol, 2012. 12(7): p. 503-16.
24. Dann, S.M. and L. Eckmann, *Innate immune defenses in the intestinal tract*. Curr Opin Gastroenterol, 2007. 23(2): p. 115-20.
25. Santaolalla, R. and M.T. Abreu, *Innate immunity in the small intestine*. Curr Opin Gastroenterol, 2012. 28(2): p. 124-9.

26. Mjosberg, J. and H. Spits, *Human innate lymphoid cells*. J Allergy Clin Immunol, 2016. 138(5): p. 1265-1276.
27. Shreiner, A.B., J.Y. Kao, and V.B. Young, *The gut microbiome in health and in disease*. Curr Opin Gastroenterol, 2015. 31(1): p. 69-75.
28. Jain, N. and W.A. Walker, *Diet and host-microbial crosstalk in postnatal intestinal immune homeostasis*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2015. 12(1): p. 14-25.
29. Nicod, L.P., *Lung defences: an overview*. European Respiratory Review, 2005. 14(95): p. 45-50.
30. Vareille, M., et al., *The airway epithelium: soldier in the fight against respiratory viruses*. Clin Microbiol Rev, 2011. 24(1): p. 210-29.
31. Ganz, T., *Antimicrobial polypeptides in host defense of the respiratory tract*. J Clin Invest, 2002. 109(6): p. 693-7.
32. Crapo, J.D., et al., *Pulmonary immunobiology and inflammation in pulmonary diseases*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. 162(5): p. 1983-6.
33. Kantari, C., M. Pederzoli-Ribeil, and V. Witko-Sarsat, *The role of neutrophils and monocytes in innate immunity*. Contrib Microbiol, 2008. 15: p. 118-46.
34. Amulic, B., et al., *Neutrophil function: from mechanisms to disease*. Annu Rev Immunol, 2012. 30: p. 459-89.
35. Mayadas, T.N., X. Cullere, and C.A. Lowell, *The multifaceted functions of neutrophils*. Annu Rev Pathol, 2014. 9: p. 181-218.
36. Xiong, H. and E.G. Pamer, *Monocytes and infection: modulator, messenger and effector*. Immunobiology, 2015. 220(2): p. 210-4.
37. Lauvau, G., et al., *Inflammatory monocyte effector mechanisms*. Cell Immunol, 2014. 291(1-2): p. 32-40.
38. Epelman, S., K.J. Lavine, and G.J. Randolph, *Origin and functions of tissue macrophages*. Immunity, 2014. 41(1): p. 21-35.
39. Williams, M., A. Mildner, and S. Yona, *Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes*. Immunity, 2018. 49(4): p. 595-613.
40. Haniffa, M., V. Bigley, and M. Collin, *Human mononuclear phagocyte system reunited*. Semin Cell Dev Biol, 2015. 41: p. 59-69.
41. Collin, M. and V. Bigley, *Monocyte, Macrophage, and Dendritic Cell Development: the Human Perspective*. Microbiol Spectr, 2016. 4(5).
42. Liaskou, E., D.V. Wilson, and Y.H. Oo, *Innate immune cells in liver inflammation*. Mediators Inflamm, 2012. 2012: p. 949157.
43. Lipscomb, M.F. and B.J. Masten, *Dendritic cells: immune regulators in health and disease*. Physiol Rev, 2002. 82(1): p. 97-130.
44. McGovern, N., J.K. Chan, and F. Ginhoux, *Dendritic cells in humans--from fetus to adult*. Int Immunol, 2015. 27(2): p. 65-72.
45. Mildner, A. and S. Jung, *Development and function of dendritic cell subsets*. Immunity, 2014. 40(5): p. 642-56.
46. Kushwah, R. and J. Hu, *Complexity of dendritic cell subsets and their function in the host immune system*. Immunology, 2011. 133(4): p. 409-19.
47. Boltjes, A. and F. van Wijk, *Human dendritic cell functional specialization in steady-state and inflammation*. Front Immunol, 2014. 5: p. 131.
48. Hespel, C. and M. Moser, *Role of inflammatory dendritic cells in innate and adaptive immunity*. Eur J Immunol, 2012. 42(10): p. 2535-43.
49. Campbell, K.S. and J. Hasegawa, *Natural killer cell biology: an update and future directions*. J Allergy Clin Immunol, 2013. 132(3): p. 536-544.
50. Farag, S.S. and M.A. Caligiuri, *Human natural killer cell development and biology*. Blood Rev, 2006. 20(3): p. 123-37.
51. Caligiuri, M.A., *Human natural killer cells*. Blood, 2008. 112(3): p. 461-9.

52. Spits, H., et al., *Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature*. Nat Rev Immunol, 2013. 13(2): p. 145-9.
53. Stone, K.D., C. Prussin, and D.D. Metcalfe, *IgE, mast cells, basophils, and eosinophils*. J Allergy Clin Immunol, 2010. 125(2 Suppl 2): p. S73-80.
54. Kita, H., *Eosinophils: multifaceted biological properties and roles in health and disease*. Immunol Rev, 2011. 242(1): p. 161-77.
55. Wen, T. and M.E. Rothenberg, *The Regulatory Function of Eosinophils*. Microbiol Spectr, 2016. 4(5).
56. Shamri, R., J.J. Xenakis, and L.A. Spencer, *Eosinophils in innate immunity: an evolving story*. Cell Tissue Res, 2011. 343(1): p. 57-83.
57. Broekman, H.C.H., et al., *IgE – the main player of food allergy*. Drug Discovery Today: Disease Models, 2015. 17-18: p. 37-44.
58. Knol, E.F. and M. Olszewski, *Basophils and mast cells: Underdog in immune regulation?* Immunol Lett, 2011. 138(1): p. 28-31.
59. Cromheecke, J.L., K.T. Nguyen, and D.P. Huston, *Emerging role of human basophil biology in health and disease*. Curr Allergy Asthma Rep, 2014. 14(1): p. 408.
60. Gilfillan, A.M., S.J. Austin, and D.D. Metcalfe, *Mast cell biology: introduction and overview*. Adv Exp Med Biol, 2011. 716: p. 2-12.
61. Jaillon, S., et al., *Interplay between Myeloid Cells and Humoral Innate Immunity*. Microbiol Spectr, 2016. 4(6).
62. Bottazzi, B., et al., *An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm*. Annu Rev Immunol, 2010. 28: p. 157-83.
63. Vilahur, G. and L. Badimon, *Biological actions of pentraxins*. Vascul Pharmacol, 2015. 73: p. 38-44.
64. Ebersole, J.L. and D. Cappelli, *Acute-phase reactants in infections and inflammatory diseases*. Periodontol 2000, 2000. 23: p. 19-49.
65. Kolev, M., G. Le Friec, and C. Kemper, *Complement--tapping into new sites and effector systems*. Nat Rev Immunol, 2014. 14(12): p. 811-20.
66. Koenderman, L., W. Buurman, and M.R. Daha, *The innate immune response*. Immunol Lett, 2014. 162(2 Pt B): p. 95-102.
67. Varela, J.C. and S. Tomlinson, *Complement: an overview for the clinician*. Hematol Oncol Clin North Am, 2015. 29(3): p. 409-27.
68. Corwin, E.J., *Understanding cytokines. Part I: Physiology and mechanism of action*. Biol Res Nurs, 2000. 2(1): p. 30-40.
69. Dinarello, C.A., *Historical insights into cytokines*. Eur J Immunol, 2007. 37 Suppl 1: p. S34-45.
70. Haddad, J.J., *Cytokines and related receptor-mediated signaling pathways*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. 297(4): p. 700-13.
71. Arango Duque, G. and A. Descoteaux, *Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases*. Front Immunol, 2014. 5: p. 491.
72. Holdsworth, S.R. and P.Y. Gan, *Cytokines: Names and Numbers You Should Care About*. Clin J Am Soc Nephrol, 2015. 10(12): p. 2243-54.
73. Fensterl, V. and G.C. Sen, *Interferons and viral infections*. Biofactors, 2009. 35(1): p. 14-20.
74. Arpaia, N. and G.M. Barton, *Toll-like receptors: key players in antiviral immunity*. Curr Opin Virol, 2011. 1(6): p. 447-54.
75. Capobianchi, M.R., et al., *Type I IFN family members: similarity, differences and interaction*. Cytokine Growth Factor Rev, 2015. 26(2): p. 103-11.
76. Ank, N. and S.R. Paludan, *Type III IFNs: new layers of complexity in innate antiviral immunity*. Biofactors, 2009. 35(1): p. 82-7.
77. Bonjardim, C.A., P.C. Ferreira, and E.G. Kroon, *Interferons: signaling, antiviral and viral evasion*. Immunol Lett, 2009. 122(1): p. 1-11.

78. Schroder, K., et al., *Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions*. J Leukoc Biol, 2004. 75(2): p. 163-89.
79. Stetson, D.B. and R. Medzhitov, *Type I interferons in host defense*. Immunity, 2006. 25(3): p. 373-81.
80. Zanoni, I., F. Granucci, and A. Broggi, *Interferon (IFN)- λ Takes the Helm: Immunomodulatory Roles of Type III IFNs*. Frontiers in Immunology, 2017. 8(1661).
81. Dinarello, C.A., *Proinflammatory cytokines*. Chest, 2000. 118(2): p. 503-8.
82. Parameswaran, N. and S. Patial, *Tumor necrosis factor-alpha signaling in macrophages*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2010. 20(2): p. 87-103.
83. Akdis, M., et al., *Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: receptors, functions, and roles in diseases*. J Allergy Clin Immunol, 2011. 127(3): p. 701-21 e1-70.
84. Schett, G., J.M. Dayer, and B. Manger, *Interleukin-1 function and role in rheumatic disease*. Nat Rev Rheumatol, 2016. 12(1): p. 14-24.
85. Jawa, R.S., et al., *Analytic review: Interleukin-6 in surgery, trauma, and critical care: part I: basic science*. J Intensive Care Med, 2011. 26(1): p. 3-12.
86. Vignali, D.A. and V.K. Kuchroo, *IL-12 family cytokines: immunological playmakers*. Nat Immunol, 2012. 13(8): p. 722-8.
87. Moore, K.W., et al., *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor*. Annu Rev Immunol, 2001. 19: p. 683-765.
88. Sokol, C.L. and A.D. Luster, *The chemokine system in innate immunity*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015. 7(5).
89. Griffith, J.W., C.L. Sokol, and A.D. Luster, *Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity*. Annu Rev Immunol, 2014. 32: p. 659-702.
90. Kawai, T. and S. Akira, *TLR signaling*. Cell Death Differ, 2006. 13(5): p. 816-25.
91. Kawai, T. and S. Akira, *Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity*. Immunity, 2011. 34(5): p. 637-50.
92. Mogensen, T.H., *Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses*. Clin Microbiol Rev, 2009. 22(2): p. 240-73, Table of Contents.
93. Medzhitov, R., *Recognition of microorganisms and activation of the immune response*. Nature, 2007. 449(7164): p. 819-26.
94. Sandig, H. and S. Bulfone-Paus, *TLR signaling in mast cells: common and unique features*. Front Immunol, 2012. 3: p. 185.
95. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. Cell, 2006. 124(4): p. 783-801.
96. Pichlmair, A. and C. Reis e Sousa, *Innate recognition of viruses*. Immunity, 2007. 27(3): p. 370-83.
97. Takeuchi, O. and S. Akira, *Pattern recognition receptors and inflammation*. Cell, 2010. 140(6): p. 805-20.
98. Agier, J., J. Pastwinska, and E. Brzezinska-Blaszczyk, *An overview of mast cell pattern recognition receptors*. Inflamm Res, 2018.
99. Broz, P. and D.M. Monack, *Newly described pattern recognition receptors team up against intracellular pathogens*. Nat Rev Immunol, 2013. 13(8): p. 551-65.
100. Chen, L., et al., *Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs*. Oncotarget, 2018. 9(6): p. 7204-7218.
101. Modlin, R.L., *Innate immunity: ignored for decades, but not forgotten*. J Invest Dermatol, 2012. 132(3 Pt 2): p. 882-6.
102. Garcia, A.M., et al., *T cell immunity in neonates*. Immunol Res, 2000. 22(2-3): p. 177-90.
103. Strunk, T. and D. Burgner, *Genetic susceptibility to neonatal infection*. Curr Opin Infect Dis, 2006. 19(3): p. 259-63.
104. Adkins, B., C. Leclerc, and S. Marshall-Clarke, *Neonatal adaptive immunity comes of age*. Nat Rev Immunol, 2004. 4(7): p. 553-64.

105. Blume-Peytavi, U., et al., *Fragility of epidermis in newborns, children and adolescents*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2016. 30 Suppl 4: p. 3-56.
106. Gleeson, M. and A.W. Cripps, *Development of mucosal immunity in the first year of life and relationship to sudden infant death syndrome*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2004. 42(1): p. 21-33.
107. Gleeson, M., et al., *Ontogeny of the secretory immune system in man*. Aust N Z J Med, 1982. 12(4): p. 255-8.
108. Renz, H., P. Brandtzaeg, and M. Hornef, *The impact of perinatal immune development on mucosal homeostasis and chronic inflammation*. Nat Rev Immunol, 2011. 12(1): p. 9-23.
109. Nanthakumar, N., et al., *The mechanism of excessive intestinal inflammation in necrotizing enterocolitis: an immature innate immune response*. PLoS One, 2011. 6(3): p. e17776.
110. Fulde, M. and M.W. Hornef, *Maturation of the enteric mucosal innate immune system during the postnatal period*. Immunol Rev, 2014. 260(1): p. 21-34.
111. Kai-Larsen, Y., G.H. Gudmundsson, and B. Agerberth, *A review of the innate immune defence of the human foetus and newborn, with the emphasis on antimicrobial peptides*. Acta Paediatr, 2014. 103(10): p. 1000-8.
112. Pott, J., et al., *Age-dependent TLR3 expression of the intestinal epithelium contributes to rotavirus susceptibility*. PLoS Pathog, 2012. 8(5): p. e1002670.
113. Levy, O., *Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates*. Nat Rev Immunol, 2007. 7(5): p. 379-90.
114. Otte, J.M., E. Cario, and D.K. Podolsky, *Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells*. Gastroenterology, 2004. 126(4): p. 1054-70.
115. Grigg, J., et al., *Alveolar macrophage immaturity in infants and young children*. Eur Respir J, 1999. 14(5): p. 1198-205.
116. Tschernig, T., et al., *Dendritic cells in the mucosa of the human trachea are not regularly found in the first year of life*. Thorax, 2001. 56(6): p. 427-31.
117. Stoltenberg, L., P.S. Thrane, and T.O. Rognum, *Development of immune response markers in the trachea in the fetal period and the first year of life*. Pediatr Allergy Immunol, 1993. 4(1): p. 13-9.
118. Futata, E.A., et al., *The neonatal immune system: immunomodulation of infections in early life*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2012. 10(3): p. 289-98.
119. Goenka, A. and T.R. Kollmann, *Development of immunity in early life*. J Infect, 2015. 71 Suppl 1: p. S112-20.
120. Wynn, J.L. and O. Levy, *Role of innate host defenses in susceptibility to early-onset neonatal sepsis*. Clin Perinatol, 2010. 37(2): p. 307-37.
121. Dowling, D.J. and O. Levy, *Ontogeny of early life immunity*. Trends Immunol, 2014. 35(7): p. 299-310.
122. Philbin, V.J. and O. Levy, *Developmental biology of the innate immune response: implications for neonatal and infant vaccine development*. Pediatr Res, 2009. 65(5 Pt 2): p. 98R-105R.
123. Basha, S., N. Surendran, and M. Pichichero, *Immune responses in neonates*. Expert Rev Clin Immunol, 2014. 10(9): p. 1171-84.
124. Levy, O., et al., *Selective impairment of TLR-mediated innate immunity in human newborns: neonatal blood plasma reduces monocyte TNF-alpha induction by bacterial lipopeptides, lipopolysaccharide, and imiquimod, but preserves the response to R-848*. J Immunol, 2004. 173(7): p. 4627-34.
125. Levy, O., et al., *The adenosine system selectively inhibits TLR-mediated TNF-alpha production in the human newborn*. J Immunol, 2006. 177(3): p. 1956-66.
126. Angelone, D.F., et al., *Innate immunity of the human newborn is polarized toward a high ratio of IL-6/TNF-alpha production in vitro and in vivo*. Pediatr Res, 2006. 60(2): p. 205-9.

127. Willems, F., S. Vollstedt, and M. Suter, *Phenotype and function of neonatal DC*. Eur J Immunol, 2009. 39(1): p. 26-35.
128. Kollmann, T.R., et al., *Innate immune function by Toll-like receptors: distinct responses in newborns and the elderly*. Immunity, 2012. 37(5): p. 771-83.
129. Velilla, P.A., M.T. Rugeles, and C.A. Chougnet, *Defective antigen-presenting cell function in human neonates*. Clin Immunol, 2006. 121(3): p. 251-9.
130. De Wit, D., et al., *Blood plasmacytoid dendritic cell responses to CpG oligodeoxynucleotides are impaired in human newborns*. Blood, 2004. 103(3): p. 1030-2.
131. Goriely, S., et al., *Deficient IL-12(p35) gene expression by dendritic cells derived from neonatal monocytes*. J Immunol, 2001. 166(3): p. 2141-6.
132. Belderbos, M.E., et al., *Plasma-mediated immune suppression: a neonatal perspective*. Pediatr Allergy Immunol, 2013. 24(2): p. 102-13.
133. Guilmot, A., et al., *Natural killer cell responses to infections in early life*. J Innate Immun, 2011. 3(3): p. 280-8.
134. Lee, Y.C. and S.J. Lin, *Neonatal natural killer cell function: relevance to antiviral immune defense*. Clin Dev Immunol, 2013. 2013: p. 427696.
135. Lin, S.J., et al., *Evaluation of cytotoxic function and apoptosis in interleukin (IL)-12/IL-15-treated umbilical cord or adult peripheral blood natural killer cells by a propidium-iodide based flow cytometry*. Pediatr Allergy Immunol, 2004. 15(1): p. 79-85.
136. Kohl, S., *Human neonatal natural killer cell cytotoxicity function*. Pediatr Infect Dis J, 1999. 18(7): p. 635-7.
137. Firth, M.A., P.E. Shewen, and D.C. Hodgins, *Passive and active components of neonatal innate immune defenses*. Anim Health Res Rev, 2005. 6(2): p. 143-58.
138. Lassiter, H.A., et al., *Complement factor 9 deficiency in serum of human neonates*. J Infect Dis, 1992. 166(1): p. 53-7.
139. Cedzynski, M., A.S. Swierzko, and D.C. Kilpatrick, *Factors of the lectin pathway of complement activation and their clinical associations in neonates*. J Biomed Biotechnol, 2012. 2012: p. 363246.
140. McGreal, E.P., K. Hearne, and O.B. Spiller, *Off to a slow start: under-development of the complement system in term newborns is more substantial following premature birth*. Immunobiology, 2012. 217(2): p. 176-86.
141. Georgountzou, A. and N.G. Papadopoulos, *Postnatal Innate Immune Development: From Birth to Adulthood*. Front Immunol, 2017. 8: p. 957.
142. Stamatas, G.N., et al., *Infant skin microstructure assessed in vivo differs from adult skin in organization and at the cellular level*. Pediatr Dermatol, 2010. 27(2): p. 125-31.
143. Tan, C.Y., et al., *Skin thickness measurement by pulsed ultrasound: its reproducibility, validation and variability*. Br J Dermatol, 1982. 106(6): p. 657-67.
144. Tur, E., *Physiology of the skin--differences between women and men*. Clin Dermatol, 1997. 15(1): p. 5-16.
145. Vitellaro-Zuccarello, L., et al., *Stereological analysis of collagen and elastic fibers in the normal human dermis: variability with age, sex, and body region*. Anat Rec, 1994. 238(2): p. 153-62.
146. Hoeger, P.H. and C.C. Enzmann, *Skin physiology of the neonate and young infant: a prospective study of functional skin parameters during early infancy*. Pediatr Dermatol, 2002. 19(3): p. 256-62.
147. Nikolovski, J., et al., *Barrier function and water-holding and transport properties of infant stratum corneum are different from adult and continue to develop through the first year of life*. J Invest Dermatol, 2008. 128(7): p. 1728-36.
148. Ludriksone, L., et al., *Skin barrier function in infancy: a systematic review*. Arch Dermatol Res, 2014. 306(7): p. 591-9.

149. Iram, N., et al., *Age-related changes in expression and function of Toll-like receptors in human skin*. Development, 2012. 139(22): p. 4210-9.
150. Dominguez-Bello, M.G., et al., *Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. 107(26): p. 11971-5.
151. Capone, K.A., et al., *Diversity of the human skin microbiome early in life*. J Invest Dermatol, 2011. 131(10): p. 2026-32.
152. Oh, J., et al., *Shifts in human skin and nares microbiota of healthy children and adults*. Genome Med, 2012. 4(10): p. 77.
153. Robertson, D.M., et al., *Milk antigen absorption in the preterm and term neonate*. Arch Dis Child, 1982. 57(5): p. 369-72.
154. Bines, J.E. and W.A. Walker, *Growth factors and the development of neonatal host defense, in Immunology of Milk and the Neonate*. 1991, Springer. p. 31-39.
155. Gleeson, M., et al., *Breast feeding conditions a differential developmental pattern of mucosal immunity*. Clin Exp Immunol, 1986. 66(1): p. 216-22.
156. Cummins, A.G. and F.M. Thompson, *Effect of breast milk and weaning on epithelial growth of the small intestine in humans*. Gut, 2002. 51(5): p. 748-54.
157. Thrane, P.S., T.O. Rognum, and P. Brandtzaeg, *Ontogenesis of the secretory immune system and innate defence factors in human parotid glands*. Clin Exp Immunol, 1991. 86(2): p. 342-8.
158. Ben-Aryeh, H., et al., *Composition of whole unstimulated saliva of healthy children: changes with age*. Arch Oral Biol, 1990. 35(11): p. 929-31.
159. Davidopoulou, S., et al., *Salivary concentration of the antimicrobial peptide LL-37 in children*. Arch Oral Biol, 2012. 57(7): p. 865-9.
160. Malcolm, J., et al., *Salivary antimicrobial proteins associate with age-related changes in streptococcal composition in dental plaque*. Mol Oral Microbiol, 2014. 29(6): p. 284-93.
161. Mastromarino, P., et al., *Correlation between lactoferrin and beneficial microbiota in breast milk and infant's feces*. Biometals, 2014. 27(5): p. 1077-86.
162. Kapel, N., et al., *Faecal calprotectin in term and preterm neonates*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2010. 51(5): p. 542-7.
163. Li, F., et al., *Fecal calprotectin concentrations in healthy children aged 1-18 months*. PLoS One, 2015. 10(3): p. e0119574.
164. Zhu, Q., et al., *Fecal Calprotectin in Healthy Children Aged 1-4 Years*. PLoS One, 2016. 11(3): p. e0150725.
165. Lebenthal, E. and Y.K. Leung, *Feeding the premature and compromised infant: gastrointestinal considerations*. Pediatr Clin North Am, 1988. 35(2): p. 215-38.
166. Cummins, A.G. and F.M. Thompson, *Postnatal changes in mucosal immune response: a physiological perspective of breast feeding and weaning*. Immunol Cell Biol, 1997. 75(5): p. 419-29.
167. Schittny, J.C., S.I. Mund, and M. Stampanoni, *Evidence and structural mechanism for late lung alveolarization*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008. 294(2): p. L246-54.
168. Yadav, J., et al., *Nasal mucociliary clearance in healthy children in a tropical country*. Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 2001. 57(1): p. 21-4.
169. Karja, J., J. Nuutinen, and P. Karjalainen, *Radioisotopic method for measurement of nasal mucociliary activity*. Arch Otolaryngol, 1982. 108(2): p. 99-101.
170. Jorissen, M., T. Willems, and B. Van der Schueren, *Nasal ciliary beat frequency is age independent*. Laryngoscope, 1998. 108(7): p. 1042-7.
171. Grigg, J. and J. Riedler, *Developmental airway cell biology. The "normal" young child*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. 162(2 Pt 2): p. S52-5.
172. Tschernig, T., et al., *Density of dendritic cells in the human tracheal mucosa is age dependent and site specific*. Thorax, 2006. 61(11): p. 986-91.

173. Heier, I., et al., *Bronchial response pattern of antigen presenting cells and regulatory T cells in children less than 2 years of age*. Thorax, 2008. 63(8): p. 703-9.
174. Midulla, F., et al., *Bronchoalveolar lavage studies in children without parenchymal lung disease: cellular constituents and protein levels*. Pediatr Pulmonol, 1995. 20(2): p. 112-8.
175. Heaney, L.G., et al., *Investigating paediatric airways by non-bronchoscopic lavage: normal cellular data*. Clin Exp Allergy, 1996. 26(7): p. 799-806.
176. Ratjen, F., et al., *Differential cytology of bronchoalveolar lavage fluid in normal children*. Eur Respir J, 1994. 7(10): p. 1865-70.
177. Heier, I., et al., *Characterisation of bronchus-associated lymphoid tissue and antigen-presenting cells in central airway mucosa of children*. Thorax, 2011. 66(2): p. 151-6.
178. Manroe, B.L., et al., *The neonatal blood count in health and disease. I. Reference values for neutrophilic cells*. J Pediatr, 1979. 95(1): p. 89-98.
179. Aldrimer, M., et al., *Population-based pediatric reference intervals for hematology, iron and transferrin*. Scand J Clin Lab Invest, 2013. 73(3): p. 253-61.
180. Sacchi, F., et al., *Different maturation of neutrophil chemotaxis in term and preterm newborn infants*. J Pediatr, 1982. 101(2): p. 273-4.
181. Eisenfeld, L., et al., *Longitudinal study of neutrophil adherence and motility*. J Pediatr, 1990. 117(6): p. 926-9.
182. Raghunathan, R., et al., *Phagocyte chemotaxis in the perinatal period*. J Clin Immunol, 1982. 2(3): p. 242-5.
183. Yasui, K., et al., *An increase in polymorphonuclear leucocyte chemotaxis accompanied by a change in the membrane fluidity with age during childhood*. Clin Exp Immunol, 1990. 81(1): p. 156-9.
184. Yegin, O., *Chemotaxis in childhood*. Pediatr Res, 1983. 17(3): p. 183-7.
185. Al-Nakeeb, S. and E.N. Thompson, *Assessment of neutrophil chemotaxis and random migration in childhood. Comparison between leading-front and lower surface count methods*. Arch Dis Child, 1980. 55(4): p. 296-8.
186. Storm, S.W., M.M. Mariscalco, and M.F. Tosi, *Postnatal maturation of total cell content and up-regulated surface expression of Mac-1 (CD11b/CD18) in polymorphonuclear leukocytes of human infants*. J Leukoc Biol, 2008. 84(2): p. 477-9.
187. Moriguchi, N., et al., *Granulocyte functions and changes in ability with age in newborns; Report no. 1: flow cytometric analysis of granulocyte functions in whole blood*. Pediatr Int, 2006. 48(1): p. 17-21.
188. Kim, S.K., et al., *Comparison of L-selectin and CD11b on neutrophils of adults and neonates during the first month of life*. Pediatr Res, 2003. 53(1): p. 132-6.
189. Muniz-Junqueira, M.I., et al., *Novel microtechnique for assessment of postnatal maturation of the phagocytic function of neutrophils and monocytes*. Clin Diagn Lab Immunol, 2003. 10(6): p. 1096-102.
190. Taylor, M.R., et al., *Haematological reference ranges for schoolchildren*. Clin Lab Haematol, 1997. 19(1): p. 1-15.
191. Adeli, K., et al., *Complex biological profile of hematologic markers across pediatric, adult, and geriatric ages: establishment of robust pediatric and adult reference intervals on the basis of the Canadian Health Measures Survey*. Clin Chem, 2015. 61(8): p. 1075-86.
192. Klein, R.B., et al., *Decreased mononuclear and polymorphonuclear chemotaxis in human newborns, infants, and young children*. Pediatrics, 1977. 60(4): p. 467-72.
193. Muller, K., et al., *In vitro cytokine production and phenotype expression by blood mononuclear cells from umbilical cords, children and adults*. Pediatr Allergy Immunol, 1996. 7(3): p. 117-24.
194. Nguyen, M., et al., *Acquisition of adult-like TLR4 and TLR9 responses during the first year of life*. PLoS One, 2010. 5(4): p. e10407.

195. Orsini, G., et al., *Enumeration of human peripheral blood dendritic cells throughout the life*. *Int Immunol*, 2012. 24(6): p. 347-56.
196. Vakkila, J., et al., *Dendritic cell subsets in childhood and in children with cancer: relation to age and disease prognosis*. *Clin Exp Immunol*, 2004. 135(3): p. 455-61.
197. Teig, N., et al., *Age-related changes in human blood dendritic cell subpopulations*. *Scand J Immunol*, 2002. 55(5): p. 453-7.
198. Jyonouchi, H., et al., *Age-dependent changes in peripheral blood dendritic cell subsets in normal children and children with specific polysaccharide antibody deficiency (SPAD)*. *Eur J Pediatr*, 2010. 169(10): p. 1233-9.
199. Manser, A.R. and M. Uhrberg, *Age-related changes in natural killer cell repertoires: impact on NK cell function and immune surveillance*. *Cancer Immunol Immunother*, 2016. 65(4): p. 417-26.
200. Yabuhara, A., H. Kawai, and A. Komiyama, *Development of natural killer cytotoxicity during childhood: marked increases in number of natural killer cells with adequate cytotoxic abilities during infancy to early childhood*. *Pediatr Res*, 1990. 28(4): p. 316-22.
201. Le Garff-Tavernier, M., et al., *Human NK cells display major phenotypic and functional changes over the life span*. *Aging Cell*, 2010. 9(4): p. 527-35.
202. Bjorkstrom, N.K., et al., *Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education*. *Blood*, 2010. 116(19): p. 3853-64.
203. Sundstrom, Y., et al., *The expression of human natural killer cell receptors in early life*. *Scand J Immunol*, 2007. 66(2-3): p. 335-44.
204. Kato, K., *Leucocytes in infancy and childhood*. *The Journal of Pediatrics*. 7(1): p. 7-15.
205. Mathur, S.K., et al., *Age-related changes in eosinophil function in human subjects*. *Chest*, 2008. 133(2): p. 412-9.
206. Drossou, V., et al., *Concentrations of main serum opsonins in early infancy*. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 1995. 72(3): p. F172-5.
207. Fireman, P., D.A. Zuchowski, and P.M. Taylor, *Development of human complement system*. *J Immunol*, 1969. 103(1): p. 25-31.
208. Davis, C.A., E.H. Vallota, and J. Forristal, *Serum complement levels in infancy: age related changes*. *Pediatr Res*, 1979. 13(9): p. 1043-6.
209. Norman, M.E., et al., *Serum complement profiles in infants and children*. *J Pediatr*, 1975. 87(6 Pt 1): p. 912-6.
210. Terai, I. and K. Kobayashi, *Perinatal changes in serum mannose-binding protein (MBP) levels*. *Immunol Lett*, 1993. 38(3): p. 185-7.
211. Aittoniemi, J., et al., *Age-dependent variation in the serum concentration of mannan-binding protein*. *Acta Paediatr*, 1996. 85(8): p. 906-9.
212. Thiel, S., et al., *Ontogeny of human mannan-binding protein, a lectin of the innate immune system*. *Pediatr Allergy Immunol*, 1995. 6(1): p. 20-3.
213. de Paula, P.F., et al., *Ontogeny of complement regulatory proteins - concentrations of factor h, factor I, c4b-binding protein, properdin and vitronectin in healthy children of different ages and in adults*. *Scand J Immunol*, 2003. 58(5): p. 572-7.
214. Ferriani, V.P., J.E. Barbosa, and I.F. de Carvalho, *Complement haemolytic activity (classical and alternative pathways), C3, C4 and factor B titres in healthy children*. *Acta Paediatr*, 1999. 88(10): p. 1062-6.
215. Smolen, K.K., et al., *Pattern recognition receptor-mediated cytokine response in infants across 4 continents*. *J Allergy Clin Immunol*, 2014. 133(3): p. 818-26 e4.
216. Labuda, L.A., et al., *Differences in innate cytokine responses between European and African children*. *PLoS One*, 2014. 9(4): p. e95241.

217. Tulic, M.K., et al., *Differences in innate immune function between allergic and nonallergic children: new insights into immune ontogeny*. J Allergy Clin Immunol, 2011. 127(2): p. 470-478 e1.
218. Holt, P.G., et al., *Developmental regulation of type 1 and type 3 interferon production and risk for infant infections and asthma development*. J Allergy Clin Immunol, 2019. 143(3): p. 1176-1182 e5.
219. Vosters, O., et al., *The interferon-alpha and interleukin-10 responses in neonates differ from adults, and their production remains partial throughout the first 18 months of life*. Clin Exp Immunol, 2010. 162(3): p. 494-9.
220. Corbett, N.P., et al., *Ontogeny of Toll-like receptor mediated cytokine responses of human blood mononuclear cells*. PLoS One, 2010. 5(11): p. e15041.
221. Belderbos, M.E., et al., *Skewed pattern of Toll-like receptor 4-mediated cytokine production in human neonatal blood: low LPS-induced IL-12p70 and high IL-10 persist throughout the first month of life*. Clin Immunol, 2009. 133(2): p. 228-37.
222. van Haren, S.D., et al., *In vitro cytokine induction by TLR-activating vaccine adjuvants in human blood varies by age and adjuvant*. Cytokine, 2016. 83: p. 99-109.
223. Marr, N., et al., *Attenuation of respiratory syncytial virus-induced and RIG-I-dependent type I IFN responses in human neonates and very young children*. J Immunol, 2014. 192(3): p. 948-57.
224. Reikie, B.A., et al., *Ontogeny of Toll-like receptor mediated cytokine responses of South African infants throughout the first year of life*. PLoS One, 2012. 7(9): p. e44763.
225. Hartel, C., et al., *Cytokine responses correlate differentially with age in infancy and early childhood*. Clin Exp Immunol, 2005. 142(3): p. 446-53.
226. Upham, J.W., et al., *Development of interleukin-12-producing capacity throughout childhood*. Infect Immun, 2002. 70(12): p. 6583-8.
227. Yerkovich, S.T., et al., *Postnatal development of monocyte cytokine responses to bacterial lipopolysaccharide*. Pediatr Res, 2007. 62(5): p. 547-52.
228. Lisciandro, J.G., et al., *Ontogeny of Toll-like and NOD-like receptor-mediated innate immune responses in Papua New Guinean infants*. PLoS One, 2012. 7(5): p. e36793.
229. Lappalainen, M., et al., *Maturation of cytokine-producing capacity from birth to 1 yr of age*. Pediatr Allergy Immunol, 2009. 20(8): p. 714-25.
230. Burl, S., et al., *Age-dependent maturation of Toll-like receptor-mediated cytokine responses in Gambian infants*. PLoS One, 2011. 6(4): p. e18185.
231. Liao, S.L., et al., *Maturation of Toll-like receptor 1-4 responsiveness during early life*. Early Hum Dev, 2013. 89(7): p. 473-8.
232. Teran, R., et al., *Immune system development during early childhood in tropical Latin America: evidence for the age-dependent down regulation of the innate immune response*. Clin Immunol, 2011. 138(3): p. 299-310.
233. Bedford Russell, A.R. and R. Kumar, *Early onset neonatal sepsis: diagnostic dilemmas and practical management*. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2015. 100(4): p. F350-4.
234. Ganatra, H.A. and A.K. Zaidi, *Neonatal infections in the developing world*. Semin Perinatol, 2010. 34(6): p. 416-25.
235. Gruber, C., et al., *History of respiratory infections in the first 12 yr among children from a birth cohort*. Pediatr Allergy Immunol, 2008. 19(6): p. 505-12.
236. Tregoning, J.S. and J. Schwarze, *Respiratory viral infections in infants: causes, clinical symptoms, virology, and immunology*. Clin Microbiol Rev, 2010. 23(1): p. 74-98.
237. Pabst, H.F. and H.W. Kreth, *Ontogeny of the immune response as a basis of childhood disease*. J Pediatr, 1980. 97(4): p. 519-34.
238. MacGillivray, D.M. and T.R. Kollmann, *The role of environmental factors in modulating immune responses in early life*. Front Immunol, 2014. 5: p. 434.

239. Calderon, M.A., et al., *EAACI: A European Declaration on Immunotherapy. Designing the future of allergen specific immunotherapy*. Clin Transl Allergy, 2012. 2(1): p. 20.
240. Asher, M.I., et al., *Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys*. Lancet, 2006. 368(9537): p. 733-43.
241. Platts-Mills, T.A., *The allergy epidemics: 1870-2010*. J Allergy Clin Immunol, 2015. 136(1): p. 3-13.
242. Davidson, W.F., et al., *Report from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases workshop on "Atopic dermatitis and the atopic march: Mechanisms and interventions"*. J Allergy Clin Immunol, 2019. 143(3): p. 894-913.
243. Spergel, J.M., *From atopic dermatitis to asthma: the atopic march*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2010. 105(2): p. 99-106; quiz 107-9, 117.
244. Belderbos, M., O. Levy, and L. Bont, *Neonatal innate immunity in allergy development*. Curr Opin Pediatr, 2009. 21(6): p. 762-9.
245. Lambrecht, B.N. and H. Hammad, *The immunology of the allergy epidemic and the hygiene hypothesis*. Nat Immunol, 2017. 18(10): p. 1076-1083.
246. Ellenbogen, Y., et al., *The Initiation of Th2 Immunity Towards Food Allergens*. Int J Mol Sci, 2018. 19(5).
247. Prefontaine, D., et al., *Children with atopic histories exhibit impaired lipopolysaccharide-induced Toll-like receptor-4 signalling in peripheral monocytes*. Clin Exp Allergy, 2010. 40(11): p. 1648-57.
248. Amoudruz, P., et al., *Impaired Toll-like receptor 2 signalling in monocytes from 5-year-old allergic children*. Clin Exp Immunol, 2009. 155(3): p. 387-94.
249. Edwards, M.R., et al., *Impaired innate interferon induction in severe therapy resistant atopic asthmatic children*. Mucosal Immunol, 2013. 6(4): p. 797-806.
250. Baraldo, S., et al., *Deficient antiviral immune responses in childhood: distinct roles of atopy and asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2012. 130(6): p. 1307-14.
251. Durrani, S.R., et al., *Innate immune responses to rhinovirus are reduced by the high-affinity IgE receptor in allergic asthmatic children*. J Allergy Clin Immunol, 2012. 130(2): p. 489-95.
252. Xatzipsalti, M., et al., *Modulation of the epithelial inflammatory response to rhinovirus in an atopic environment*. Clin Exp Allergy, 2008. 38(3): p. 466-72.
253. Wark, P.A., et al., *Asthmatic bronchial epithelial cells have a deficient innate immune response to infection with rhinovirus*. J Exp Med, 2005. 201(6): p. 937-47.
254. Parsons, K.S., A.C. Hsu, and P.A. Wark, *TLR3 and MDA5 signalling, although not expression, is impaired in asthmatic epithelial cells in response to rhinovirus infection*. Clin Exp Allergy, 2014. 44(1): p. 91-101.
255. Globinska, A., et al., *Impaired virus replication and decreased innate immune responses to viral infections in nasal epithelial cells from patients with allergic rhinitis*. Clin Exp Immunol, 2017. 187(1): p. 100-112.
256. Tversky, J.R., et al., *Human blood dendritic cells from allergic subjects have impaired capacity to produce interferon-alpha via Toll-like receptor 9*. Clin Exp Allergy, 2008. 38(5): p. 781-8.
257. Itazawa, T., et al., *Developmental changes in interleukin-12-producing ability by monocytes and their relevance to allergic diseases*. Clin Exp Allergy, 2003. 33(4): p. 525-30.
258. Ciprandi, G., M.A. Tosca, and L. Fasce, *Allergic children have more numerous and severe respiratory infections than non-allergic children*. Pediatr Allergy Immunol, 2006. 17(5): p. 389-91.
259. Cirillo, I., et al., *Allergic patients have more numerous and prolonged respiratory infections than nonallergic subjects*. Allergy, 2007. 62(9): p. 1087-90.
260. Skaaby, T., et al., *IgE sensitization to inhalant allergens and the risk of airway infection and disease: A population-based study*. PLoS One, 2017. 12(2): p. e0171525.

261. Rantala, A., J.J. Jaakkola, and M.S. Jaakkola, *Respiratory infections in adults with atopic disease and IgE antibodies to common aeroallergens*. PLoS One, 2013. 8(7): p. e68582.
262. Juhn, Y.J., et al., *Streptococcus pyogenes upper respiratory infection and atopic conditions other than asthma: a retrospective cohort study*. Prim Care Respir J, 2012. 21(2): p. 153-8.
263. Jung, J.A., et al., *Increased risk of serious pneumococcal disease in patients with atopic conditions other than asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2010. 125(1): p. 217-21.
264. Olenec, J.P., et al., *Weekly monitoring of children with asthma for infections and illness during common cold seasons*. J Allergy Clin Immunol, 2010. 125(5): p. 1001-1006 e1.
265. Corne, J.M., et al., *Frequency, severity, and duration of rhinovirus infections in asthmatic and non-asthmatic individuals: a longitudinal cohort study*. Lancet, 2002. 359(9309): p. 831-4.
266. Tesse, R., R.C. Pandey, and M. Kabesch, *Genetic variations in toll-like receptor pathway genes influence asthma and atopy*. Allergy, 2011. 66(3): p. 307-16.
267. Eisenbarth, S.C., et al., *Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen*. J Exp Med, 2002. 196(12): p. 1645-51.
268. Willart, M.A. and H. Hammad, *Alarming dendritic cells for allergic sensitization*. Allergol Int, 2010. 59(2): p. 95-103.
269. Kim, Y.K., et al., *Airway exposure levels of lipopolysaccharide determine type 1 versus type 2 experimental asthma*. J Immunol, 2007. 178(8): p. 5375-82.
270. Jeon, S.G., et al., *TH2 and TH1 lung inflammation induced by airway allergen sensitization with low and high doses of double-stranded RNA*. J Allergy Clin Immunol, 2007. 120(4): p. 803-12.
271. Lambrecht, B.N. and H. Hammad, *Allergens and the airway epithelium response: gateway to allergic sensitization*. J Allergy Clin Immunol, 2014. 134(3): p. 499-507.
272. Zakeri, A. and M. Russo, *Dual Role of Toll-like Receptors in Human and Experimental Asthma Models*. Front Immunol, 2018. 9: p. 1027.
273. Reuter, S., et al., *TLR3 but not TLR7/8 ligand induces allergic sensitization to inhaled allergen*. J Immunol, 2012. 188(10): p. 5123-31.
274. Schauer, U., et al., *RSV bronchiolitis and risk of wheeze and allergic sensitisation in the first year of life*. Eur Respir J, 2002. 20(5): p. 1277-83.
275. Stein, R.T., et al., *Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years*. Lancet, 1999. 354(9178): p. 541-5.
276. Sigurs, N., et al., *Severe respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy and asthma and allergy at age 13*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. 171(2): p. 137-41.
277. Sigurs, N., et al., *Asthma and allergy patterns over 18 years after severe RSV bronchiolitis in the first year of life*. Thorax, 2010. 65(12): p. 1045-52.
278. Szabo, S.M., et al., *Elevated risk of asthma after hospitalization for respiratory syncytial virus infection in infancy*. Paediatr Respir Rev, 2013. 13 Suppl 2: p. S9-15.
279. Jackson, D.J., et al., *Wheezing rhinovirus illnesses in early life predict asthma development in high-risk children*. Am J Respir Crit Care Med, 2008. 178(7): p. 667-72.
280. Simoes, E.A., et al., *The effect of respiratory syncytial virus on subsequent recurrent wheezing in atopic and nonatopic children*. J Allergy Clin Immunol, 2010. 126(2): p. 256-62.
281. Chen, C.H., et al., *Ribavirin for respiratory syncytial virus bronchiolitis reduced the risk of asthma and allergen sensitization*. Pediatr Allergy Immunol, 2008. 19(2): p. 166-72.
282. Restori, K.H., et al., *Neonatal Immunity, Respiratory Virus Infections, and the Development of Asthma*. Front Immunol, 2018. 9: p. 1249.
283. Martorano, L.M. and M.H. Grayson, *Respiratory viral infections and atopic development: From possible mechanisms to advances in treatment*. Eur J Immunol, 2018. 48(3): p. 407-414.
284. Papadopoulos, N.G. and A. Kalobatsou, *Respiratory viruses in childhood asthma*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2007. 7(1): p. 91-5.
285. Kotaniemi-Syrjanen, A., et al., *Rhinovirus-induced wheezing in infancy--the first sign of childhood asthma?* J Allergy Clin Immunol, 2003. 111(1): p. 66-71.

286. Jackson, D.J., et al., *Evidence for a causal relationship between allergic sensitization and rhinovirus wheezing in early life*. Am J Respir Crit Care Med, 2012. 185(3): p. 281-5.
287. Kusel, M.M., et al., *Early-life respiratory viral infections, atopic sensitization, and risk of subsequent development of persistent asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2007. 119(5): p. 1105-10.
288. Jarthi, T., et al., *Persistence of rhinovirus and enterovirus RNA after acute respiratory illness in children*. J Med Virol, 2004. 72(4): p. 695-9.
289. Bossios, A., et al., *Rhinovirus infection induces cytotoxicity and delays wound healing in bronchial epithelial cells*. Respir Res, 2005. 6: p. 114.
290. Psarras, S., et al., *Vascular endothelial growth factor-mediated induction of angiogenesis by human rhinoviruses*. J Allergy Clin Immunol, 2006. 117(2): p. 291-7.
291. Subrata, L.S., et al., *Interactions between innate antiviral and atopic immunoinflammatory pathways precipitate and sustain asthma exacerbations in children*. J Immunol, 2009. 183(4): p. 2793-800.
292. Caliskan, M., et al., *Rhinovirus wheezing illness and genetic risk of childhood-onset asthma*. N Engl J Med, 2013. 368(15): p. 1398-407.
293. Midulla, F., et al., *Rhinovirus bronchiolitis and recurrent wheezing: 1-year follow-up*. Eur Respir J, 2012. 39(2): p. 396-402.
294. Walter, M.J., et al., *Viral induction of a chronic asthma phenotype and genetic segregation from the acute response*. J Clin Invest, 2002. 110(2): p. 165-75.
295. Cheung, D.S., et al., *Development of atopy by severe paramyxoviral infection in a mouse model*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2010. 105(6): p. 437-443 e1.
296. Bonnelykke, K., et al., *Association between respiratory infections in early life and later asthma is independent of virus type*. J Allergy Clin Immunol, 2015. 136(1): p. 81-86 e4.
297. Beigelman, A. and L.B. Bacharier, *The role of early life viral bronchiolitis in the inception of asthma*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2013. 13(2): p. 211-6.
298. Xepapadaki, P. and N.G. Papadopoulos, *Viral infections and allergies*. Immunobiology, 2007. 212(6): p. 453-9.
299. Sly, P.D. and P.G. Holt, *Role of innate immunity in the development of allergy and asthma*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2011. 11(2): p. 127-31.
300. Garand, M., B. Cai, and T.R. Kollmann, *Environment impacts innate immune ontogeny*. Innate Immun, 2017. 23(1): p. 3-10.
301. Roduit, C., et al., *Prenatal animal contact and gene expression of innate immunity receptors at birth are associated with atopic dermatitis*. J Allergy Clin Immunol, 2011. 127(1): p. 179-85, 185 e1.
302. Ege, M.J., et al., *Prenatal farm exposure is related to the expression of receptors of the innate immunity and to atopic sensitization in school-age children*. J Allergy Clin Immunol, 2006. 117(4): p. 817-23.
303. Loss, G., et al., *Prenatal and early-life exposures alter expression of innate immunity genes: the PASTURE cohort study*. J Allergy Clin Immunol, 2012. 130(2): p. 523-30 e9.
304. Kaario, H., et al., *Circulating Dendritic Cells, Farm Exposure and Asthma at Early Age*. Scand J Immunol, 2016. 83(1): p. 18-25.
305. Martikainen, M.V., et al., *Farm exposures are associated with lower percentage of circulating myeloid dendritic cell subtype 2 at age 6*. Allergy, 2015. 70(10): p. 1278-87.
306. Lluís, A., et al., *Increased regulatory T-cell numbers are associated with farm milk exposure and lower atopic sensitization and asthma in childhood*. J Allergy Clin Immunol, 2014. 133(2): p. 551-9.
307. Martin-Orozco, E., M. Norte-Munoz, and J. Martinez-Garcia, *Regulatory T Cells in Allergy and Asthma*. Front Pediatr, 2017. 5: p. 117.
308. Belkaid, Y. and T.W. Hand, *Role of the microbiota in immunity and inflammation*. Cell, 2014. 157(1): p. 121-41.

309. Thaiss, C.A., et al., *The microbiome and innate immunity*. Nature, 2016. 535(7610): p. 65-74.
310. Gensollen, T. and R.S. Blumberg, *Correlation between early-life regulation of the immune system by microbiota and allergy development*. J Allergy Clin Immunol, 2017. 139(4): p. 1084-1091.
311. Grieco, F.A., et al., *Innate immunity and the pathogenesis of type 1 diabetes*. Semin Immunopathol, 2011. 33(1): p. 57-66.
312. Kim, S.M., T. Mayassi, and B. Jabri, *Innate immunity: actuating the gears of celiac disease pathogenesis*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2015. 29(3): p. 425-35.
313. Elia, P.P., et al., *The role of innate immunity receptors in the pathogenesis of inflammatory bowel disease*. Mediators Inflamm, 2015. 2015: p. 936193.
314. Picerno, V., et al., *One year in review: the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. Clin Exp Rheumatol, 2015. 33(4): p. 551-8.
315. Sweeney, C.M., A.M. Tobin, and B. Kirby, *Innate immunity in the pathogenesis of psoriasis*. Arch Dermatol Res, 2011. 303(10): p. 691-705.
316. Raedler, D. and B. Schaub, *Immune mechanisms and development of childhood asthma*. Lancet Respir Med, 2014. 2(8): p. 647-56.
317. Eichenfield, L.F., et al., *Consensus conference on pediatric atopic dermatitis*. J Am Acad Dermatol, 2003. 49(6): p. 1088-95.
318. Bousquet, J., et al., *Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen)*. Allergy, 2008. 63 Suppl 86: p. 8-160.
319. Papadopoulos, N.G., et al., *International consensus on (ICON) pediatric asthma*. Allergy, 2012. 67(8): p. 976-97.
320. Reddel, H.K., et al., *A summary of the new GINA strategy: a roadmap to asthma control*. Eur Respir J, 2015. 46(3): p. 622-39.
321. Konstantinou, G.N., et al., *The longest wheal diameter is the optimal measurement for the evaluation of skin prick tests*. Int Arch Allergy Immunol, 2010. 151(4): p. 343-5.
322. Ownby, D.R., *Environmental factors versus genetic determinants of childhood inhalant allergies*. J Allergy Clin Immunol, 1990. 86(3 Pt 1): p. 279-87.
323. Lau, S., et al., *Allergy and atopy from infancy to adulthood: Messages from the German birth cohort MAS*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2019. 122(1): p. 25-32.
324. Chad, Z., *Allergies in children*. Paediatr Child Health, 2001. 6(8): p. 555-66.
325. Arruda, L.K., et al., *Risk factors for asthma and atopy*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2005. 5(2): p. 153-9.
326. Ferreira, M.A., et al., *Shared genetic origin of asthma, hay fever and eczema elucidates allergic disease biology*. Nat Genet, 2017. 49(12): p. 1752-1757.
327. Wadonda-Kabondo, N., et al., *Association of parental eczema, hayfever, and asthma with atopic dermatitis in infancy: birth cohort study*. Arch Dis Child, 2004. 89(10): p. 917-21.
328. Bohme, M., et al., *Family history and risk of atopic dermatitis in children up to 4 years*. Clin Exp Allergy, 2003. 33(9): p. 1226-31.
329. Withers, N.J., et al., *The natural history of respiratory symptoms in a cohort of adolescents*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. 158(2): p. 352-7.
330. Litonjua, A.A., et al., *Parental history and the risk for childhood asthma. Does mother confer more risk than father?* Am J Respir Crit Care Med, 1998. 158(1): p. 176-81.
331. Dold, S., et al., *Genetic risk for asthma, allergic rhinitis, and atopic dermatitis*. Arch Dis Child, 1992. 67(8): p. 1018-22.
332. Tan, T.H., et al., *The role of genetics and environment in the rise of childhood food allergy*. Clin Exp Allergy, 2012. 42(1): p. 20-9.
333. Lim, R.H., L. Kobzik, and M. Dahl, *Risk for asthma in offspring of asthmatic mothers versus fathers: a meta-analysis*. PLoS One, 2010. 5(4): p. e10134.

334. Arshad, S.H., et al., *The effect of parental allergy on childhood allergic diseases depends on the sex of the child*. J Allergy Clin Immunol, 2012. 130(2): p. 427-34 e6.
335. Upham, J.W. and P.G. Holt, *Environment and development of atopy*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2005. 5(2): p. 167-72.
336. Burbank, A.J., et al., *Environmental determinants of allergy and asthma in early life*. J Allergy Clin Immunol, 2017. 140(1): p. 1-12.
337. Fleischer, D.M., et al., *Primary prevention of allergic disease through nutritional interventions*. J Allergy Clin Immunol Pract, 2013. 1(1): p. 29-36.
338. Greer, F.R., et al., *Effects of early nutritional interventions on the development of atopic disease in infants and children: the role of maternal dietary restriction, breastfeeding, timing of introduction of complementary foods, and hydrolyzed formulas*. Pediatrics, 2008. 121(1): p. 183-91.
339. Muraro, A., et al., *EAACI food allergy and anaphylaxis guidelines. Primary prevention of food allergy*. Allergy, 2014. 69(5): p. 590-601.
340. Grimshaw, K., et al., *Modifying the infant's diet to prevent food allergy*. Arch Dis Child, 2017. 102(2): p. 179-186.
341. Heine, R.G., *Preventing atopy and allergic disease*. Nestle Nutr Inst Workshop Ser, 2014. 78: p. 141-53.
342. Hendaus, M.A., F.A. Jomha, and M. Ehlayel, *Allergic diseases among children: nutritional prevention and intervention*. Ther Clin Risk Manag, 2016. 12: p. 361-72.
343. Dawod, B. and J.S. Marshall, *Cytokines and Soluble Receptors in Breast Milk as Enhancers of Oral Tolerance Development*. Front Immunol, 2019. 10: p. 16.
344. Dharmage, S.C., et al., *Atopic dermatitis and the atopic march revisited*. Allergy, 2014. 69(1): p. 17-27.
345. Sly, P.D., *The early origins of asthma: who is really at risk?* Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2011. 11(1): p. 24-8.
346. Conrad, L. and M.S. Perzanowski, *The Role of Environmental Controls in Managing Asthma in Lower-Income Urban Communities*. Clin Rev Allergy Immunol, 2019.
347. Strzelak, A., et al., *Tobacco Smoke Induces and Alters Immune Responses in the Lung Triggering Inflammation, Allergy, Asthma and Other Lung Diseases: A Mechanistic Review*. Int J Environ Res Public Health, 2018. 15(5).
348. Burbach, G.J., et al., *GA(2)LEN skin test study II: clinical relevance of inhalant allergen sensitizations in Europe*. Allergy, 2009. 64(10): p. 1507-15.
349. D'Amato, G., et al., *Allergenic pollen and pollen allergy in Europe*. Allergy, 2007. 62(9): p. 976-90.
350. Gioulekas, D., et al., *Allergenic pollen records (15 years) and sensitization in patients with respiratory allergy in Thessaloniki, Greece*. Allergy, 2004. 59(2): p. 174-84.
351. Sicherer, S.H. and H.A. Sampson, *Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment*. J Allergy Clin Immunol, 2014. 133(2): p. 291-307; quiz 308.
352. Savage, J. and C.B. Johns, *Food allergy: epidemiology and natural history*. Immunol Allergy Clin North Am, 2015. 35(1): p. 45-59.
353. Nwaru, B.I., et al., *Prevalence of common food allergies in Europe: a systematic review and meta-analysis*. Allergy, 2014. 69(8): p. 992-1007.
354. Tsakok, T., et al., *Does atopic dermatitis cause food allergy? A systematic review*. J Allergy Clin Immunol, 2016. 137(4): p. 1071-1078.
355. Schuez-Havupalo, L., et al., *Daycare attendance and respiratory tract infections: a prospective birth cohort study*. BMJ Open, 2017. 7(9): p. e014635.
356. Nesti, M.M.M. and M. Goldbaum, *As creches e pré-escolas e as doenças transmissíveis*. Jornal de Pediatria, 2007. 83: p. 299-312.
357. Enserink, R., et al., *Infectious disease burden related to child day care in the Netherlands*. Pediatr Infect Dis J, 2013. 32(8): p. e334-40.

358. Rasmussen, F. and C. Sundelin, *Use of medical care and antibiotics among preschool children in different day care settings*. *Acta Paediatr Scand*, 1990. 79(8-9): p. 838-46.
359. Hagerhed-Engman, L., et al., *Day-care attendance and increased risk for respiratory and allergic symptoms in preschool age*. *Allergy*, 2006. 61(4): p. 447-53.
360. Fraenkel, D.J., et al., *Lower airways inflammation during rhinovirus colds in normal and in asthmatic subjects*. *Am J Respir Crit Care Med*, 1995. 151(3 Pt 1): p. 879-86.
361. Busse, W.W., R.F. Lemanske, Jr., and J.E. Gern, *Role of viral respiratory infections in asthma and asthma exacerbations*. *Lancet*, 2010. 376(9743): p. 826-34.
362. de Oliveira, T.B., E.A. Klering, and A.B.G. da Veiga, *Is recurrent respiratory infection associated with allergic respiratory disease?* *J Asthma*, 2019. 56(2): p. 160-166.
363. Bao, W., et al., *Normative distribution of complete blood count from early childhood through adolescence: the Bogalusa Heart Study*. *Prev Med*, 1993. 22(6): p. 825-37.
364. Zierk, J., et al., *Age- and sex-specific dynamics in 22 hematologic and biochemical analytes from birth to adolescence*. *Clin Chem*, 2015. 61(7): p. 964-73.
365. Riley, L.K. and J. Rupert, *Evaluation of Patients with Leukocytosis*. *Am Fam Physician*, 2015. 92(11): p. 1004-11.
366. Cheng, C.K., et al., *Complete blood count reference interval diagrams derived from NHANES III: stratification by age, sex, and race*. *Lab Hematol*, 2004. 10(1): p. 42-53.
367. Shearer, W.T., et al., *Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age: the Pediatric AIDS Clinical Trials Group P1009 study*. *J Allergy Clin Immunol*, 2003. 112(5): p. 973-80.
368. Comans-Bitter, W.M., et al., *Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte subpopulations*. *J Pediatr*, 1997. 130(3): p. 388-93.
369. Tosato, F., et al., *Lymphocytes subsets reference values in childhood*. *Cytometry A*, 2015. 87(1): p. 81-5.
370. De Kleer, I., et al., *Ontogeny of myeloid cells*. *Front Immunol*, 2014. 5: p. 423.
371. Youroukova, V.F., et al., *Blood eosinophilia and degree of sensitization to house dust mites in preschool and school children with asthma*. *J Asthma*, 1998. 35(6): p. 489-96.
372. Klonoff-Cohen, H. and M. Polavarapu, *Eosinophil protein X and childhood asthma: A systematic review and meta-analysis*. *Immun Inflamm Dis*, 2016. 4(2): p. 114-134.
373. Kartasamita, C.B., O. Rosmayudi, and M. Demedts, *Total serum IgE and eosinophil count in children with and without a history of asthma, wheezing, or atopy in an urban community in Indonesia. The Respiratory Disease Working Group*. *J Allergy Clin Immunol*, 1994. 94(6 Pt 1): p. 981-8.
374. Valent, P., et al., *Pathogenesis and classification of eosinophil disorders: a review of recent developments in the field*. *Expert Rev Hematol*, 2012. 5(2): p. 157-76.
375. Noh, G. and J.H. Lee, *Revision of immunopathogenesis and laboratory interpretation for food allergy in atopic dermatitis*. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2012. 11(1): p. 20-35.
376. Winther, L., et al., *Basophil histamine release, IgE, eosinophil counts, ECP, and EPX are related to the severity of symptoms in seasonal allergic rhinitis*. *Allergy*, 1999. 54(5): p. 436-45.
377. Kapp, A., *The role of eosinophils in the pathogenesis of atopic dermatitis--eosinophil granule proteins as markers of disease activity*. *Allergy*, 1993. 48(1): p. 1-5.
378. Ulrik, C.S., *Peripheral eosinophil counts as a marker of disease activity in intrinsic and extrinsic asthma*. *Clin Exp Allergy*, 1995. 25(9): p. 820-7.
379. Kumar, M.K., P.K. Singh, and P.K. Patel, *Clinico-immunological profile and their correlation with severity of atopic dermatitis in Eastern Indian children*. *J Nat Sci Biol Med*, 2014. 5(1): p. 95-100.
380. Kajosaari, M. and U.M. Saarinen, *Evaluation of laboratory tests in childhood allergy. Total serum IgE, blood eosinophilia and eosinophil and mast cells in nasal mucosa of 178 children aged 3 years*. *Allergy*, 1981. 36(5): p. 329-35.

381. Borres, M.P., et al., *Peripheral blood eosinophilia in infants at 3 months of age is associated with subsequent development of atopic disease in early childhood*. J Allergy Clin Immunol, 1995. 95(3): p. 694-8.
382. Jiang, Y. and W. Ma, *Assessment of Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio and Platelet-to-Lymphocyte Ratio in Atopic Dermatitis Patients*. Med Sci Monit, 2017. 23: p. 1340-1346.
383. Hon, K.L., et al., *Circulating immunoglobulins, leucocytes and complements in childhood-onset atopic eczema*. Indian J Pediatr, 2013. 80(2): p. 128-31.
384. Dogru, M. and R.G. Yesiltepe Mutlu, *The evaluation of neutrophil-lymphocyte ratio in children with asthma*. Allergol Immunopathol (Madr), 2016. 44(4): p. 292-6.
385. Dogru, M., M.F. Evcimik, and A.A. Cirik, *Is neutrophil-lymphocyte ratio associated with the severity of allergic rhinitis in children?* Eur Arch Otorhinolaryngol, 2016. 273(10): p. 3175-8.
386. Leonardi, S., et al., *IgE values and T-lymphocyte subsets in children with atopic eczema/dermatitis syndrome*. Allergy Asthma Proc, 2007. 28(5): p. 529-34.
387. Chiarelli, F., et al., *Humoral and cellular immunity in children with active and quiescent atopic dermatitis*. Br J Dermatol, 1987. 116(5): p. 651-60.
388. Lommatzsch, M., et al., *The course of allergen-induced leukocyte infiltration in human and experimental asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2006. 118(1): p. 91-7.
389. Eguiluz-Gracia, I., et al., *Monocytes accumulate in the airways of children with fatal asthma*. Clin Exp Allergy, 2018. 48(12): p. 1631-1639.
390. Eguiluz-Gracia, I., et al., *Rapid recruitment of CD14(+) monocytes in experimentally induced allergic rhinitis in human subjects*. J Allergy Clin Immunol, 2016. 137(6): p. 1872-1881 e12.
391. Murphy, P.M., et al., *International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors*. Pharmacol Rev, 2000. 52(1): p. 145-76.
392. Cocchi, F., et al., *Higher macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha and MIP-1beta levels from CD8+ T cells are associated with asymptomatic HIV-1 infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(25): p. 13812-7.
393. Bennett, B.L., et al., *Immunopathogenesis of respiratory syncytial virus bronchiolitis*. J Infect Dis, 2007. 195(10): p. 1532-40.
394. Mantovani, A., et al., *Macrophage-derived chemokine (MDC)*. J Leukoc Biol, 2000. 68(3): p. 400-4.
395. Yamashita, U. and E. Kuroda, *Regulation of macrophage-derived chemokine (MDC, CCL22) production*. Crit Rev Immunol, 2002. 22(2): p. 105-14.
396. Bezemer, G.F., et al., *Dual role of Toll-like receptors in asthma and chronic obstructive pulmonary disease*. Pharmacol Rev, 2012. 64(2): p. 337-58.
397. Torres, D., et al., *Double-stranded RNA exacerbates pulmonary allergic reaction through TLR3: implication of airway epithelium and dendritic cells*. J Immunol, 2010. 185(1): p. 451-9.
398. Sel, S., et al., *Immunomodulatory effects of viral TLR ligands on experimental asthma depend on the additive effects of IL-12 and IL-10*. J Immunol, 2007. 178(12): p. 7805-13.

9. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

9.1 Ερωτηματολόγιο κατά την ένταξη στη μελέτη

ΑΤΟΜΙΚΟ ΚΑΙ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ

Ατομικός κωδικός:

Ημερομηνία:

ΑΤΟΜΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

1. Ημερομηνία γέννησης :
2. Ηλικία:
3. Φύλο:
4. Βάρος:
5. Ύψος:
6. Εθνικότητα:
7. Επάγγελμα:
8. Τηλέφωνο:

ΑΤΟΜΙΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ

9. Ηλικία κύησης:

10. Εμβολιασμοί

ΕΜΒΟΛΙΟ	ΔΟΣΕΙΣ
Πνευμονιοκόκκου	
Αιμοφίλου της γρίπης	
Γρίπης προηγούμενου έτους	

11. Πάσχετε από κάποιο χρόνια νόσημα, εκτός από αλλεργικές παθήσεις;

α. Ναι

β. Όχι

11^α. Εάν ναι παρακαλώ προσδιορίστε το νόσημα:

12. Λαμβάνετε κάποια φαρμακευτική αγωγή σε καθημερινή βάση;

α. Ναι

β. Όχι

12^α. Εάν ναι, ποια φάρμακα λαμβάνετε;.....

13. Έχετε υποβληθεί ποτέ σε χειρουργική επέμβαση;

α. Ναι

β. Όχι

13^α. Εάν ναι, παρακαλώ προσδιορίστε:.....

14. Έχετε νοσηλευτεί ποτέ σε νοσοκομείο;

α. Ναι

β. Όχι

14^α. Εάν ναι, παρακαλώ προσδιορίστε το χρόνο και το λόγο της νοσηλείας:

ΧΡΟΝΟΛΟΓΙΑ	ΠΑΘΗΣΗ

ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

15. Τους τελευταίους 12 μήνες έχετε εμφανίσει ιογενή ή βακτηριακή λοίμωξη;

α. Ναι

β. Όχι

15^α. Εάν ναι, παρακαλώ προσδιορίστε:

Είδος λοίμωξης	Αριθμός Επεισοδίων	Μέγιστη διάρκεια	Χορήγηση αντιβιοτικών
Ανώτερου αναπνευστικού (κοινό κρυολόγημα/συνάχι)			
Κατώτερου αναπνευστικού (π.χ. πνευμονία, βρογχίτιδα)			
Μέση ωτίτιδα			
Γαστρεντερίτιδα			
Άλλη			

ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ/ΣΥΝΗΘΕΙΕΣ/ΔΙΑΤΡΟΦΗ

16. Πόσες φορές την εβδομάδα γυμνάζεστε σωματικά τόσο ώστε να λαχανιάζετε;

α. Ποτέ ή σπάνια

β. 1-2 φορές την εβδομάδα

γ. ≥ 3 φορές την εβδομάδα

17. Πόσες ώρες, κατά μέσο όρο, παρακολουθείτε τηλεόραση την ημέρα;
- α. < 1 ώρα
 - β. > 1 ώρα και < 3 ώρες
 - γ. > 3 ώρες και < 5 ώρες
 - δ. ≥ 5 ώρες
18. Παρακαλώ σημειώστε την ανώτερη βαθμίδα της εκπαίδευσής σας:
- α. Πρωτοβάθμια
 - β. Δευτεροβάθμια
 - γ. Τριτοβάθμια
19. Καπνίζετε;
- α. Ναι
 - β. Όχι
- 19^α. Εάν ναι, πόσα τσιγάρα, κατά μέσο όρο, ημερησίως;
20. Πόσα από τα άτομα που μένουν στο σπίτι σας καπνίζουν;
21. Κατά μέσο όρο, πόσα τσιγάρα καπνίζονται ημερησίως στο σπίτι σας;
22. Πώς θα χαρακτηρίζατε την κίνηση των αυτοκινήτων στην περιοχή που ζείτε;
- α. Πολύ αυξημένη
 - β. Αυξημένη
 - γ. Ήπια
 - δ. Σπάνια
23. Έχετε κάποιο κατοικίδιο;
- α. Ναι
 - β. Όχι
- 23^α. Εάν ναι, προσδιορίστε:
- α. Σκύλος
 - β. Γάτα
 - γ. Πουλί
 - δ. Ζώα της φάρμας
 - ε. Άλλο
24. Υπάρχουν σημάδια υγρασίας στους τοίχους του σπιτιού σας;
- α. Ναι
 - β. Όχι
25. Λαμβάνετε συμπληρώματα διατροφής;
- α. Ναι
 - β. Όχι
- 25^α. Εάν ναι, παρακαλώ προσδιορίστε :

Συμπληρώστε τις ερωτήσεις 26-31 στην περίπτωση που το ιστορικό αφορά παιδί ηλικίας <12 ετών

26. Πηγαίνετε το παιδί σας σε παιδικό σταθμό/νηπιαγωγείο/σχολείο;
α. Ναι
β. Όχι
27. Ποια είναι η ανώτερη βαθμίδα εκπαίδευσης του πατέρα του παιδιού;
α. Πρωτοβάθμια
β. Δευτεροβάθμια
γ. Τριτοβάθμια
28. Ποια είναι η ανώτερη βαθμίδα εκπαίδευσης της μητέρας του παιδιού;
α. Πρωτοβάθμια
β. Δευτεροβάθμια
γ. Τριτοβάθμια
29. Η μητέρα καπνίζει;
α. Ναι
β. Όχι
29^α. Εάν ναι, πόσα τσιγάρα ημερησίως;
30. Ο πατέρας καπνίζει;
α. Ναι
β. Όχι
30^α. Εάν ναι, πόσα τσιγάρα ημερησίως;.....
31. Το παιδί σας έλαβε μητρικό θηλασμό;
α. Ναι
β. Όχι
31^α. Εάν ναι, για πόσους μήνες;

ΑΣΘΜΑ

32. Εποχιακή κατανομή άσθματος

ΙΑΝ	ΦΕΒ	ΜΑΡ	ΑΠΡ	ΜΑΙ	ΙΟΥΝ	ΙΟΥΛ	ΑΥΓ	ΣΕΠΤ	ΟΚΤ	ΝΟΕ	ΔΕΚ
-----	-----	-----	-----	-----	------	------	-----	------	-----	-----	-----

33. Ημερήσια συμπτώματα τους τελευταίους 3 μήνες:
α. < 1/εβδομάδα
β. >1/εβδομάδα
γ. Καθημερινά
34. Νυκτερινά συμπτώματα τους 3 τελευταίους μήνες:
α. ≤ 2 /μήνα
β. > 2 /μήνα
γ. Σχεδόν καθημερινά

35. Τελευταία μέτρηση FEV1/PEF:

- α. $\geq 80\%$
- β. 60-80%
- γ. $\leq 60\%$
- δ. Χωρίς μέτρηση

36. Τελευταία μέτρηση της διακύμανσης της διακύμανσης της PEF:

- α. $<20\%$
- β. 20-30%
- γ. $>30\%$

37. Θεραπεία τους τελευταίους 3 μήνες:

- Ανακουφιστική θεραπεία κατ'επίκληση:
 - α. ≤ 2 μέρες/εβδομάδα
 - β. > 2 μέρες/εβδομάδα
- Καθημερινή θεραπεία:

	ΝΑΙ	ΟΥΣΙΑ	ΚΑΘΗΜΕΡΙΝΗ ΔΟΣΗ
Εισπνεόμενα στεροειδή			
Ανταγωνιστές λευκοτριενίων			
β2-αγωνιστές μακράς δράσης			
Άλλο			

38. Βαρύτητα άσθματος:

- α. Διαλείπον
- β. Ήπιο εμμένον
- γ. Μέτριο εμμένον
- δ. Σοβαρό εμμένον

39. Έχετε παρουσιάσει βήχα, συριγμό, ή δυσκολία στην αναπνοή κατά τη διάρκεια ή μετά από άσκηση, τους τελευταίους 12 μήνες;

- α. Ναι
- β. Όχι

40. Έχει περιοριστεί η δραστηριότητά σας λόγω του άσθματος;

- α. Ναι
- β. Όχι

40^α. Εάν ναι, αυτό συμβαίνει μόνο κατά τη διάρκεια των εξάρσεων;

- α. Ναι
- β. Όχι

41. Είστε/αισθάνεστε τελείως καλά μεταξύ των κρίσεων;

- α. Ναι
- β. Όχι

42. Είναι τα κρυολογήματα ο κύριος παράγοντας έξαρσης του άσθματός σας;
α. Ναι
β. Όχι
γ. Άγνωστο
43. Είναι η άσκηση ο μόνος ή ο κύριος παράγοντας έξαρσης του άσθματός σας;
α. Ναι
β. Όχι
γ. Άγνωστο
44. Έχετε αλλεργική ευαισθητοποίηση κλινικά σχετική με το άσθμα;
α. Ναι
β. Όχι
γ. Άγνωστο
45. Φαινότυπος άσθματος
α. Μεταλοιμώδες
β. Μετά από άσκηση
γ. Αλλεργικό
δ. Αδιευκρίνιστο
46. Αριθμός επεισοδίων άσθματος/συριγμού/βήχα τους τελευταίους 3 μήνες
47. Αριθμός επεισοδίων άσθματος/συριγμού/βήχα τους τελευταίους 12 μήνες.....
48. Αριθμός επεισοδίων άσθματος/συριγμού/βήχα τους τελευταίους 12 μήνες για το οποία χρειάστηκε νοσηλεία.....
49. Επίπεδο ελέγχου του άσθματος:
α. Ελεγχόμενο
β. Μερικώς ελεγχόμενο
γ. Μη ελεγχόμενο

RINITΙΔΑ

50. Έχετε διαγνωστεί ποτέ με ρινίτιδα;
α. Ναι
β. Όχι
51. Είχατε συμπτώματα ρινίτιδας τους τελευταίους 12 μήνες;
α. Ναι
β. Όχι

52. Εποχιακή κατανομή ρινίτιδας:

ΙΑΝ	ΦΕΒ	ΜΑΡ	ΑΠΡ	ΜΑΙ	ΙΟΥΝ	ΙΟΥΛ	ΑΥΓ	ΣΕΠΤ	ΟΚΤ	ΝΟΕ	ΔΕΚ
-----	-----	-----	-----	-----	------	------	-----	------	-----	-----	-----

53. Τα συμπτώματα της ρινίτιδας διαρκούν:

- α. ≤ 4 μέρες/εβδομάδα
- β. > 4 μέρες/εβδομάδα

54. Τα συμπτώματα της ρινίτιδας διαρκούν:

- α. ≤ 4 συνεχόμενες εβδομάδες
- β. > 4 συνεχόμενες εβδομάδες

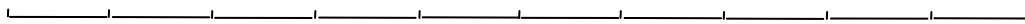
55. Τα συμπτώματα της ρινίτιδας σχετίζονται με:

- α. Διαταραχές στον ύπνο;
- β. Μείωση της καθημερινής δραστηριότητας/διασκέδασης/άθλησης;
- γ. Μειωμένη απόδοση στη δουλειά/σχολείο;
- δ. Ενοχλητικά συμπτώματα;

56. Σε κλίμακα από 1-10, όπου 1 είναι καμία ενόχληση και 10 ανυπόφορη ενόχληση, πόσο θα βαθμολογούσατε τη δυσφορία που σας προκαλούν τα συμπτώματα της ρινίτιδας;

Καμία ενόχληση

Ανυπόφορη ενόχληση



57. Ταξινόμηση της αλλεργικής ρινίτιδας:

- α. Ήπια διαλείπουσα
- β. Μέτρια-σοβαρή διαλείπουσα
- γ. Ήπια εμμένουσα
- δ. Μέτρια-σοβαρή εμμένουσα

58. Αριθμός επεισοδίων ρινίτιδας που χρειάστηκαν θεραπεία τους τελευταίους 12 μήνες:.....

59. Τους τελευταίους 12 μήνες είχατε κάποιο οφθαλμολογικό πρόβλημα;

- α. Ερύθημα επιπεφυκότος;
- β. Κνησμό;
- γ. Δακρύρροια;

60. Αριθμός επεισοδίων επιπεφυκίτιδας που χρειάστηκαν θεραπεία τους τελευταίους 12 μήνες:

ΑΤΟΠΙΚΗ ΔΕΡΜΑΤΙΤΙΔΑ

61. Σας έχει τεθεί πότε η διάγνωση της αλλεργικής δερματίτιδας;

- α. Ναι
- β. Όχι

62. Έχετε εμφανίσει συμπτώματα ατοπικής δερματίτιδας τους τελευταίους 12 μήνες;
α. Ναι
β. Όχι

63. Εάν υπάρχει ενεργός ατοπική δερματίτιδα, υπολογίστε το δείκτη SCORAD:

ΑΛΛΕΣ ΑΛΛΕΡΓΙΚΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ

64. Έχετε εμφανίσει ποτέ αλλεργική αντίδραση στο λάτεξ;
α. Ναι
β. Όχι

65. Έχετε εμφανίσει ποτέ αλλεργική αντίδραση σε δήγμα μέλισσας ή σφήγγας;
α. Ναι
β. Όχι

65^α. Εάν ναι τα συμπτώματα ήταν :
α. Τοπικά;
β. Συστηματικά;

66. Είχατε ποτέ αλλεργικές αντιδράσεις σε τροφές;
α. Ναι
β. Όχι

66^α. Εάν ναι, σε τι είδος τροφών;:.....

66^β. Εάν ναι, υπήρχαν αντιδράσεις σοβαρής αναφυλαξίας;
α. Ναι
β. Όχι

ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΑΤΟΠΙΑΣ

67. Ο πατέρας σας είχε/έχει άσθμα;
α. Ναι
β. Όχι

68. Ο πατέρας σας είχε/έχει αλλεργική ρινίτιδα;
α. Ναι
β. Όχι

69. Ο πατέρας σας είχε/έχει ατοπική δερματίτιδα/έκζεμα;
α. Ναι
β. Όχι

70. Ο πατέρας σας είχε/έχει αλλεργικές αντιδράσεις σε τρόφιμα;
α. Ναι
β. Όχι

71. Η μητέρα σας είχε/έχει άσθμα;

- α. Ναι
- β. Όχι

72. Η μητέρα σας είχε/έχει αλλεργική ρινίτιδα;

- α. Ναι
- β. Όχι

73. Η μητέρα σας είχε/έχει ατοπική δερματίτιδα/έκζεμα;

- α. Ναι
- β. Όχι

74. Η μητέρα σας είχε/έχει αλλεργικές αντιδράσεις σε τρόφιμα;

- α. Ναι
- β. Όχι

75. Εάν υπάρχουν αδέρφια εξ αίματος παρακαλώ συμπληρώστε την ηλικία και το φύλο τους, ξεκινώντας από το μεγαλύτερο:

Σειρά γέννησης	Ηλικία	Φύλο
Αδερφός/ή 1		
Αδερφός/ή 2		
Αδερφός/ή 3		

76. Εάν υπάρχουν αδέρφια εξ αίματος έχουν/είχαν κάποια από τις ακόλουθες παθήσεις;

	ΝΑΙ/ΟΧΙ	ΣΕΙΡΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ	ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΑΠΟ ΙΑΤΡΟ(ΝΑΙ/ΟΧΙ)
Άσθμα			
Αλλεργική ρινίτιδα			
Έκζεμα/ατοπική δερματίτιδα			
Τροφική αλλεργία			

Μελέτη “MIDAS”

Ωρίμανση της μη-ειδικής ανοσίας: Επιρροή των λοιμώξεων και ρόλος τους στην ανάπτυξη ατοπίας και άσθματος

Έντυπο Ενημέρωσης

Αγαπητή κυρία / αγαπητέ κύριε,

Καλείστε να συμμετέχετε στην παρούσα μελέτη που αφορά στα αλλεργικά νοσήματα του αναπνευστικού συστήματος. Στο σημείο αυτό δίνονται κάποιες σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τη μελέτη, τι θα συμβεί και τι θα σημαίνει για εσάς και το παιδί σας η συμμετοχή σας σε αυτό. Παρακαλούμε να μας ρωτήσετε οτιδήποτε ή αν χρειάζεστε περισσότερες πληροφορίες.

Τι είναι τα αλλεργικά νοσήματα του αναπνευστικού συστήματος;

Τα αλλεργικά νοσήματα του αναπνευστικού είναι κυρίως το άσθμα και η ρινίτιδα. Και τα δύο αυτά νοσήματα αποτελούν ένα σοβαρό και συνεχώς αυξανόμενο πρόβλημα δημόσιας υγείας για την Ευρώπη.

Σε ορισμένες χώρες, ένα στα τρία παιδιά υποφέρει από αυτά τα νοσήματα, αλλά δεν είναι ακόμα γνωστό τι είναι αυτό που κάνει μια φλεγμονώδη αντίδραση χρόνια και τι πυροδοτεί τις αλλεργίες.

Έχει φανεί ότι οι κατά τη γέννηση το ανοσοποιητικό σύστημα του νεογνού είναι ανώριμο και ότι η διαδικασία ωρίμανσης προϋποθέτει και εξαρτάται από την έκθεση του οργανισμού σε περιβαλλοντικούς

παράγοντες, σημαντική θέση μεταξύ των οποίων έχει η έκθεση σε μικροβιακούς παράγοντες (ιώσεις και βακτηριακές λοιμώξεις). Η ανωριμότητα αυτή είναι πιθανό να σχετίζεται με τη βαρύτητα και τη συχνότητα των λοιμώξεων σε διαφορετικές ηλικίες. Επίσης είναι πιθανό η ανοσιακή ωρίμανση να έχει κομβικό ρόλο στην ανάπτυξη ή την επιμονή αλλεργικών νοσημάτων, όπως το άσθμα και η ρινίτιδα και η επίδραση αυτή να εξαρτάται από την ηλικία.

Ποιος είναι ο σκοπός αυτής της μελέτης;

Αυτή η μελέτη, μέρος του προγράμματος MIDAS, θα διερευνήσει την πορεία ωρίμανσης του ανοσοποιητικού συστήματος από τη γέννηση μέχρι την ενήλικη ζωή και τη συσχέτιση του βαθμού ωρίμανσης του ανοσοποιητικού με την ευαισθησία απέναντι σε λοιμώξεις και/ή την εκδήλωση ατοπίας και άσθματος. Επιπλέον, θα μελετηθούν οι ανοσολογικοί μηχανισμοί που σχετίζονται με την αλλεργία και το άσθμα. Η μελέτη MIDAS έχει ως σκοπό να συμβάλει μέσω της επιστημονικής

κατανόησης, στην παροχή αποτελεσμάτων που θα μπορούν να βελτιώσουν τη ζωή ατόμων που υποφέρουν από αλλεργικά αναπνευστικά νοσήματα.

Η μελέτη MIDAS έχει σα σκοπό να βελτιώσει τις γνώσεις που έχουμε σχετικά με το ρόλο του βαθμού ωρίμανσης του ανοσοποιητικού συστήματος και των λοιμώξεων στην εμμονή της φλεγμονής. Συγκεκριμένα θέλουμε να απαντήσουμε στα παρακάτω ερωτήματα:

- Ποιες είναι η μεταβολές που συμβαίνουν στο ανοσοποιητικό σύστημα από τη γέννηση μέχρι την ενήλικη ζωή;
- Πώς ο βαθμός ωρίμανσης του ανοσοποιητικού συστήματος μπορεί να επηρεάσει την απάντηση του οργανισμού σε λοιμώξεις και την εκδήλωση συμπτωμάτων άσθματος και/ή αλλεργικής ρινίτιδας;
- Πώς αλλάζουν οι αποκρίσεις του οργανισμού κατά το χρονικό διάστημα παρακολούθησης και πώς αυτές οι αλλαγές σχετίζονται με τις λοιμώξεις του αναπνευστικού και με την επιμονή της νόσου;

Γιατί έχω επιλεγεί;

Στη μελέτη θα συμμετέχουν 100-150 άτομα διάφορων ηλικιών (από 0 έως >35ετών) τα οποία προσέρχονται σε τακτικά ή εξωτερικά ιατρεία των συνεργαζόμενων κέντρων για προγραμματισμένη κλινική εξέταση, προληπτικό έλεγχο ή μικροεπέμβαση.

Είμαι υποχρεωμένος να συμμετάσχω;

Η συμμετοχή σας στη μελέτη είναι εθελοντική και μόνο μετά από την έγγραφη συγκατάθεσή σας. Μπορείτε να αποσύρετε την συγκατάθεσή σας και να τερματίσετε την συμμετοχή σας στη μελέτη σε οποιαδήποτε χρονική φάση, χωρίς να είστε υποχρεωμένοι να αιτιολογήσετε την απόφασή σας και χωρίς συνέπειες για την περαιτέρω φροντίδα και θεραπευτική αντιμετώπισή σας. Θα λάβετε ένα αντίγραφο του υπογεγραμμένου εντύπου συγκατάθεσης.

Ποια είναι τα πλεονεκτήματα που προκύπτουν από την συμμετοχή μου στη μελέτη;

Όλοι όσοι συμμετέχουν στη μελέτη θα εξετασθούν από εξειδικευμένους γιατρούς στον τομέα των αναπνευστικών και αλλεργικών νοσημάτων. Θα εκτιμηθεί η ύπαρξη ή μη ατοπίας και θα αξιολογηθεί η αναπνευστική λειτουργία τους. Η συμμετοχή σας σε αυτή τη μελέτη σε θα έχει καμία απολύτως αρνητική επίδραση στην υγεία ή την καθημερινότητά σας.

Μπορώ να συμμετάσχω σε αυτή τη μελέτη;

Ο υπεύθυνος ιατρός της μελέτης θα καθορίσει αν εσείς ή το παιδί σας είναι κατάλληλο για τη μελέτη.

Τι θα συμβεί στην μελέτη;

Αφού δώσετε συγκατάθεσή για τη συμμετοχή σας στην μελέτη, θα απαντήσετε ερωτήσεις σχετικά με την υγεία σας ή την υγεία του παιδιού σας και αν υπάρχουν συμπτώματα που σχετίζονται με αλλεργικά νοσήματα σε οποιοδήποτε μέλος της οικογένειας και του περιβάλλοντος του σπιτιού σας. Θα γίνουν δοκιμασίες μέτρησης της αναπνευστικής λειτουργίας και της φλεγμονής στους αεραγωγούς. Θα ληφθεί αίμα, στα πλαίσια αιμοληψίας για διαγνωστικούς σκοπούς, ώστε να αξιολογηθεί η ατοπία και η ανοσολογική απόκριση. Όλα τα δείγματα θα χρησιμοποιηθούν για εργαστηριακές μετρήσεις και δεν θα επιστραφούν στο χώρο της μελέτης μετά την ολοκλήρωση αυτής.

Τα δεδομένα από τις συνεντεύξεις θα κωδικοποιηθούν με τον αριθμό μελέτης. Τα δεδομένα δεν θα προσδιορίζονται από το όνομά σας αλλά μόνο από έναν αριθμό. Τα κωδικοποιημένα δεδομένα θα είναι διαθέσιμα στο κέντρο της μελέτης.

Όλες οι μέθοδοι που διενεργούνται σε αυτή την μελέτη αποτελούν μεθόδους ρουτίνας στην κλινική πράξη. Αυτή η μελέτη δεν περιλαμβάνει τη δοκιμασία οποιασδήποτε νέας θεραπείας ή μεθόδου.

Τι είναι οι δερματικές δοκιμασίες νυγμού;

Οι δερματικές δοκιμασίες νυγμού αποτελούν απλή εξέταση για να

αξιολογηθούν οι αλλεργίες σας. Μια σταγόνα από διάφορα αλλεργιογόνα (διαλυμένα σε νερό) θα τοποθετηθούν στο δέρμα και στη συνέχεια θα γίνει νυγμός (μικρό «ξύσιμο») για να δούμε αν θα υπάρχει αντίδραση. Η δοκιμασία είναι θετική εάν 15 λεπτά μετά παρουσιαστεί στο δέρμα ένας μικρός πομφός. Αυτή η δοκιμασία αποτελεί μια ασφαλή εξέταση ρουτίνας.

Τι είναι οι δοκιμασίες της αναπνευστικής λειτουργίας;

Θα ζητηθεί από εσάς (ή το παιδί σας) να φυσήξετε δυνατά σε ένα μηχάνημα (σπιρόμετρο) ή να αναπνεύσετε φυσιολογικά σε ένα άλλο (ταλαντωσίμετρο), ώστε να εκτιμηθεί η παρουσία βρογχοσπασμού (άσθμα) και / ή φλεγμονής.

Ποιοι είναι οι κίνδυνοι από την μελέτη;

Οι προγραμματισμένες εξετάσεις έχουν ελάχιστους κινδύνους για τα άτομα που συμμετέχουν στη μελέτη. Κατά τη διάρκεια της αιμοληψίας, μπορεί να υπάρξει μια μικρή ενόχληση. Θα χρησιμοποιηθεί αναισθητική κρέμα ώστε να μουδιάσει το δέρμα. Μια μικρή εκχύμωση μπορεί να σχηματιστεί σε αυτή την περιοχή.

Ποιός είναι υπεύθυνος για την παρούσα μελέτη;

Το Νοσοκομείο Παίδων "Π&Α Κυριακού" και η Μονάδα Αλλεργιολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας της Β' Παιδιατρικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, είναι υπεύθυνο για την παρούσα μελέτη. Ο επικεφαλής ερευνητής είναι ο Αναπληρωτής Καθηγητής της Παιδιατρικής

Αλλεργιολογίας κ. Νικόλαος Παπαδόπουλος.

Με ποιο τρόπο θα προστατεύονται τα δεδομένα;

Τα προσωπικά και ιατρικά δεδομένα που αφορούν στα συμμετέχοντα άτομα θα είναι άκρως εμπιστευτικά. Θα τηρηθούν όλοι οι νόμοι προστασίας δεδομένων της Ελλάδας. Τα δείγματα, τα αποτελέσματα των αναλύσεων και το αρχείο πληροφοριών δεν θα δίδονται σε ασθενείς ή σε άλλα άτομα / ινστιτούτα που δε μετέχουν στη μελέτη. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης θα δίδονται μόνο στο κέντρο της μελέτης για να αναλυθούν στα πλαίσια της μελέτης “MIDAS” και θα φυλάσσονται ξεχωριστά από κάθε δεδομένο που προσδιορίζει την ταυτότητα κάθε συμμετέχοντα. Κανένα αποτέλεσμα δεν θα δοθεί σε οποιαδήποτε άλλη οντότητα, ιδιαιτέρως σε συγγενείς, εργοδότες ή ασφαλιστικές εταιρείες. Στο τέλος της μελέτης, η ανάλυση των δεδομένων στο σύνολό τους θα δημοσιευτεί ανώνυμα και αποκλειστικά με τη μορφή ομαδοποιημένων δεδομένων ώστε να μην είναι δυνατό να αναγνωριστεί ξεχωριστά κανένας συμμετέχων.

Τι θα συμβεί σε ότι αφορά στις απαντήσεις μου στις συνεντεύξεις και στα ιατρικά δεδομένα;

Θα σας δοθούν απαντήσεις από όλες τις εξετάσεις που θα γίνουν κατά τη διάρκεια της μελέτης. Τα προσωπικά δεδομένα του συμμετέχοντα (όνομα, διεύθυνση, ημερομηνία γέννησης, φύλο) θα συμπληρώνονται στο έντυπο ενυπόγραφης συγκατάθεσης και θα φυλάσσονται κλειδωμένα στο γραφείο της μελέτης, αφού

προηγουμένως καταχωρηθούν σε ηλεκτρονική μορφή σε μια ξεχωριστή ηλεκτρονική βάση δεδομένων, μαζί με τον αντίστοιχο για κάθε ασθενή αριθμό μελέτης. Μόνο κατονομασμένο προσωπικό της μελέτης θα έχει πρόσβαση σε αυτή τη βάση δεδομένων. Θα λάβετε ένα αντίγραφο του εντύπου συγκατάθεσης.

Ο αριθμός μελέτης για κάθε ασθενή καθώς και τα προσωπικά δεδομένα από το έγγραφο συγκατάθεσης θα διαγραφούν 4 έτη μετά το πέρας της μελέτης. Τα έγγραφα θα κρατηθούν για 20 έτη και τα δείγματα για 30 έτη μετά το πέρας της μελέτης και τότε θα καταστραφούν ή θα διαγραφούν.

Ποιος οργανώνει και χρηματοδοτεί την ερευνητική μελέτη;

Η ερευνητική μελέτη χρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση. Η μελέτη συντονίζεται από το Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών.

Ποιος επιθεωρεί την μελέτη;

Η μελέτη έχει επιθεωρηθεί και έχει εγκριθεί από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του Νοσοκομείου Παιδών “Π&Α Κυριακού”.

Σας ευχαριστούμε που αφιερώσατε χρόνο για να διαβάσετε αυτό το ενημερωτικό έντυπο.

9.3 Έντυπο λήψης έγγραφης συγκατάθεσης ενηλίκων δοτών

ΕΓΓΡΑΦΗ ΣΥΓΚΑΤΑΘΕΣΗ

για τη συμμετοχή στη μελέτη “MIDAS”:

Ωρίμανση της μη-ειδικής ανοσίας: Επιρροή των λοιμώξεων και ρόλος τους στην ανάπτυξη ατοπίας και άσθματος

Ο/Η κάτωθι υπογεγραμμένος/η _____
Επίθετο Όνομα

Ημερομηνία γέννησης: ____ | ____ | ____
ημέρα μήνας έτος

Διεύθυνση και τηλέφωνο

Οδός, Αριθμός Πόλη

T.K. Χώρα Τηλέφωνο

έχω λάβει πλήρη προφορική και γραπτή εξήγηση σχετικά με το σκοπό, την σημασία και τις συνέπειες της ανωτέρω επιστημονικής ερευνητικής μελέτης από τον κλινικό ιατρό της μελέτης

Επίθετο Όνομα

Γνωρίζω ότι η συμμετοχή στην μελέτη “MIDAS” είναι εθελοντική. Έχω λάβει, διαβάσει και κατανοήσει τις γραπτές διευκρινίσεις που αφορούν στη μελέτη και μου δόθηκε η δυνατότητα να κάνω σχετικές ερωτήσεις. Έχω λάβει ικανοποιητικές απαντήσεις και μου δόθηκε αρκετός χρόνος ώστε να κατανοήσω το αντικείμενο και να καταλήξω σε μια απόφαση.

Δίνω την συγκατάθεσή μου, ώστε να συμμετάσχω στην ανωτέρω επιστημονική ερευνητική μελέτη καθώς και τα ανώνυμα δεδομένα που θα συλλεγούν να μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν στη μελέτη. Διατηρώ το δικαίωμα να ανακαλέσω αυτή τη συγκατάθεση για τη συμμετοχή στην παρούσα μελέτη, καθώς και για τη χρήση των δεδομένων, σε οποιοδήποτε χρόνο, χωρίς να υφίσταται συγκεκριμένος λόγος και χωρίς καμία αρνητική συνέπεια προς το άτομό μου.

Προστασία δεδομένων

Δίνω την συγκατάθεσή μου ώστε όλα τα προσωπικά δεδομένα (όνομα, ημερομηνία γέννησης, διεύθυνση και αριθμός τηλεφώνου) που αναγράφονται ανωτέρω, να μπορούν να αποθηκευτούν ξεχωριστά από κάθε κλινικό δεδομένο στο γραφείο της μελέτης. Επιπλέον, συναινώ ώστε τα δεδομένα και τα δείγματα αίματος που συλλέγονται στα πλαίσια της μελέτης να κωδικοποιηθούν με έναν αριθμό μελέτης για κάθε ασθενή ώστε να καταστεί δυνατή η ανάλυση από τα ερευνητικά εργαστήρια και ινστιτούτα που συμμετέχουν στη μελέτη "MIDAS". Όλα τα δεδομένα που προέρχονται από κάθε συμμετέχοντα θα αναλυθούν επιστημονικά και ανώνυμα και τα αποτελέσματα της μελέτης θα δημοσιευτούν μόνο ομαδοποιημένα. Όλοι οι συμμετέχοντες κλινικοί ιατροί δεσμεύονται από το ιατρικό απόρρητο.

Έχω λάβει ένα αντίγραφο του εντύπου ενημέρωσης για τη συγκεκριμένη μελέτη και αυτής της συγκατάθεσης.

Πόλη, Ημερομηνία

Υπογραφή

Δηλώνω υπεύθυνα ότι έχω δώσει το έγγραφο ενημέρωσης στον ανωτέρω κατονομαζόμενο μαζί με μια πλήρη περιγραφή της μελέτης "MIDAS". Έχουν ακόμα δοθεί ικανοποιητικές απαντήσεις στις ερωτήσεις του σχετικά με την παρούσα μελέτη.

Πόλη, Ημερομηνία

Υπογραφή κλινικού ιατρού που μετέχει στην μελέτη

9.4 Έντυπο λήψης έγγραφης συγκατάθεσης γονέων και κηδεμόνων

ΕΓΓΡΑΦΗ ΣΥΓΚΑΤΑΘΕΣΗ

για τη συμμετοχή στη μελέτη "MIDAS":

Ωρίμανση της μη-ειδικής ανοσίας: Επιρροή των λοιμώξεων και ρόλος τους στην ανάπτυξη ατοπίας και άσθματος

Εγώ/Εμείς δηλώνω/δηλώνουμε ότι εγώ/εμείς,

Όνομα γονέα/νόμιμου κηδεμόνα * _____
Επίθετο Όνομα Επίθετο Όνομα

ως γονέας ή νόμιμος κηδεμόνας του **παιδιού**: _____
Επίθετο Όνομα

Ημερομηνία γέννησης: ____ | ____ | ____
ημέρα μήνας έτος

Διεύθυνση και τηλέφωνο μητέρας ή νόμιμου κηδεμόνα:

Οδός, Αριθμός	Πόλη
T.K.	Χώρα
	Τηλέφωνο

Διεύθυνση και τηλέφωνο πατέρα: Ίδια με τα ανωτέρω:

Οδός, Αριθμός	Πόλη
T.K.	Χώρα
	Τηλέφωνο

έχω/έχουμε λάβει πλήρη προφορική και γραπτή εξήγηση σχετικά με το σκοπό, την σημασία και τις συνέπειες της ανωτέρω επιστημονικής ερευνητικής μελέτης από τον κλινικό ιατρό της μελέτης

Επίθετο Όνομα
Γνωρίζω/Γνωρίζουμε ότι η συμμετοχή στην μελέτη "MIDAS" είναι εθελοντική. Έχω/Εχουμε λάβει, διαβάσει και κατανοήσει τις γραπτές διευκρινίσεις που αφορούν στη μελέτη και μου/μας δόθηκε η δυνατότητα να

κάνω/κάνουμε σχετικές ερωτήσεις. Έχω/Έχουμε λάβει ικανοποιητικές απαντήσεις και μου/μας δόθηκε αρκετός χρόνος ώστε να κατανοήσω/κατανοήσουμε το αντικείμενο και να καταλήξω/καταλήξουμε σε μια απόφαση.

Δίνω/Δίνουμε την συγκατάθεσή μου/μας ώστε το παιδί μου/μας να συμμετάσχει στην ανωτέρω επιστημονική ερευνητική μελέτη καθώς και τα ανώνυμα δεδομένα που θα συλλεγούν να μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν στη μελέτη. Διατηρώ/Διατηρούμε το δικαίωμα να ανακαλέσω/ανακαλέσουμε αυτή τη συγκατάθεση για τη συμμετοχή στην παρούσα μελέτη, καθώς και για τη χρήση των δεδομένων που προέρχονται από το παιδί μου/μας, σε οποιοδήποτε χρόνο, χωρίς να υφίσταται συγκεκριμένος λόγος και χωρίς καμία αρνητική συνέπεια για το παιδί μου/μας.

Προστασία δεδομένων

Δίνω/Δίνουμε την συγκατάθεσή μου/μας ώστε όλα τα προσωπικά δεδομένα (όνομα, ημερομηνία γέννησης, διεύθυνση και αριθμός τηλεφώνου) που αναγράφονται ανωτέρω, να μπορούν να αποθηκευτούν ξεχωριστά από κάθε κλινικό δεδομένο στο γραφείο της μελέτης. Επιπλέον, συναινώ/συναινούμε ώστε τα δεδομένα και τα δείγματα αίματος που συλλέγονται στα πλαίσια της μελέτης να κωδικοποιηθούν με έναν αριθμό μελέτης για κάθε ασθενή ώστε να καταστεί δυνατή η ανάλυση από τα ερευνητικά εργαστήρια και ινστιτούτα που συμμετέχουν και κατονομάζονται στην μελέτη "MIDAS". Όλα τα δεδομένα που προέρχονται από κάθε παιδί θα αναλυθούν επιστημονικά και ανώνυμα και τα αποτελέσματα της μελέτης θα δημοσιευτούν μόνο ομαδοποιημένα. Όλοι οι συμμετέχοντες κλινικοί ιατροί δεσμεύονται από το ιατρικό απόρρητο.

Έχω/Έχουμε λάβει ένα αντίγραφο του εντύπου ενημέρωσης για τη συγκεκριμένη μελέτη και αυτής της συγκατάθεσης.*

Πόλη, Ημερομηνία

Υπογραφή μητέρας/πατέρα*/νόμιμου κηδεμόνα

Δηλώνω υπεύθυνα ότι έχω δώσει το έγγραφο ενημέρωσης στον/στους γονέα/γονείς/νόμιμους κηδεμόνες του ανωτέρω κατονομαζόμενου παιδιού μαζί με μια πλήρη περιγραφή της μελέτης "MIDAS". Έχουν ακόμα δοθεί ικανοποιητικές απαντήσεις στις ερωτήσεις των γονέων/νόμιμων κηδεμόνων σχετικά με την παρούσα μελέτη.

Πόλη, Ημερομηνία

Υπογραφή κλινικού ιατρού που μετέχει στην μελέτη

*υπογραφή μόνο του ενός γονέα υποδηλώνει αποκλειστική κηδεμονία ή τίθεται κατόπιν συμφωνίας με τον έτερο γονέα