



# ΙΔΡΥΜΑ ΙΑΤΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ ΑΚΑΔΗΜΙΑΣ ΑΘΗΝΩΝ

---

**ΜΑΡΙΑ ΣΑΛΑΓΙΑΝΝΗ BSc MPhil PhD**

Εργαστήριο Ανοσολογίας (Δρ. Ε. Ανδρεάκου)  
Κλινική, Πειραματική Χειρουργική & Μεταφραστική Έρευνα

**ΠΜΣ «ΚΑΡΔΙΟΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ»**  
«Ανοσολογικοί μηχανισμοί της αθηροσκλήρυνσης »

Δευτέρα 14 Οκτωβρίου, 2024

ΑΚΑΔΗΜΙΑ



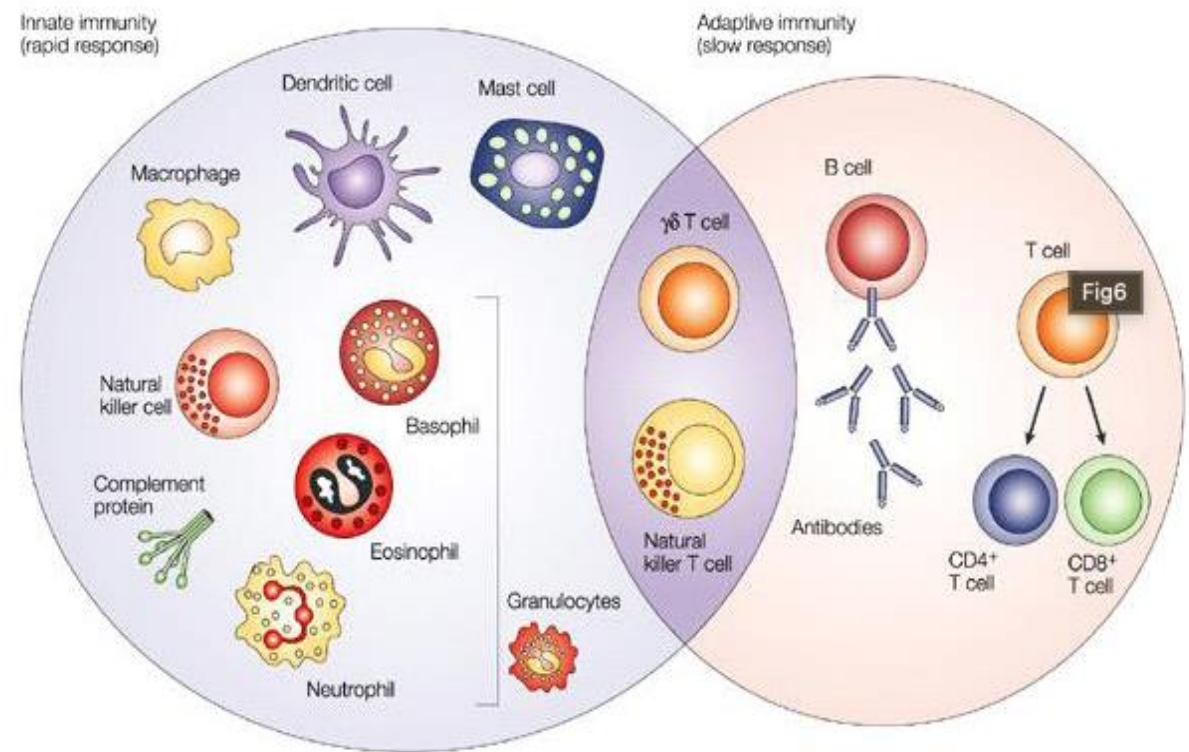
ΑΘΗΝΩΝ



# Το ανοσοποιητικό σύστημα έχει δυο γραμμές άμυνας

➤ Μια **πρώτη, άμεσης, μη εξειδικευμένης άμυνας**, που το ονομάζουμε **ΕΓΓΕΝΕΣ** ή έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα (innate immune response) που εξαρτάται απολύτως από τα **γονίδια που κληρονομήσαμε** από τους προγόνους μας, αντιδρά πάντα με τον **ίδιο τρόπο** και **δεν αντιδρά εναντίον των κυττάρων μας**.

➤ Μια **δεύτερη, πιο εξειδικευμένη άμυνα**, το **ΕΠΙΚΤΗΤΟ προσαρμοστικό** ανοσοποιητικό σύστημα (adaptive immune response), που στοχεύει τον **συγκεκριμένο εισβολέα** (σαν τη σχέση κλειδιού-κλειδαριάς) και χρειάζεται **λίγες μέρες** για να δημιουργηθεί (Σ' αυτό συμμετέχουν τα **λεμφοκύτταρα T** και τα **λεμφοκύτταρα B**).



Nature Reviews | Cancer

Used with permission from Macmillan Publishers Ltd: *Nature Reviews Cancer*, 4, 11-22, copyright 2004.

# Το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα αποτελείται από:

---

A. Αμυντικούς Φραγμούς

B. Αμυντικά κύτταρα (Κύτταρα εγγενούς ή έμφυτης ανοσίας, Innate Immunity)

Γ. Αντιμικροβιακές ουσίες



- i. Το σύστημα του συμπληρώματος
- ii. Η C αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP)
- iii. Ιντερφερόνες (κυτταροκίνες)

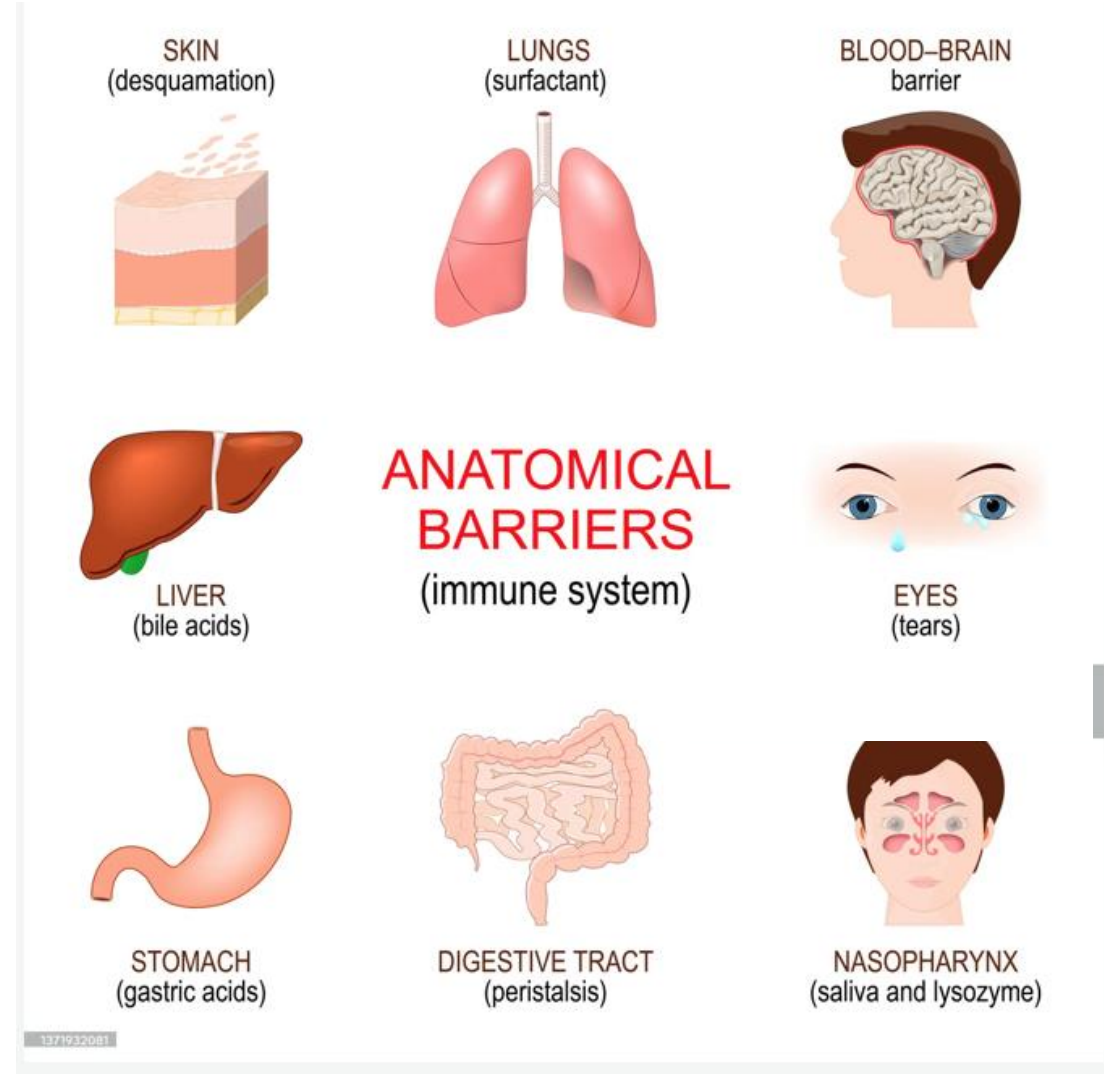
# A. Οι Αμυντικοί Φραγμοί

Οι **αμυντικοί φραγμοί** βρίσκονται εκεί όπου το σώμα έρχεται σε επαφή με το **περιβάλλον**, όπου μπορούν να εισβάλουν τα παθογόνα και είναι το **δέρμα** και οι **βλεννογόνοι**.

Οι **βλεννογόνοι** βρίσκονται στα ανοίγματα του σώματος όπως στη μύτη, στο στόμα, τους αεραγωγούς, τον πρωκτό, την ουρήθρα, τον κόλπο, τα μάτια κλπ.

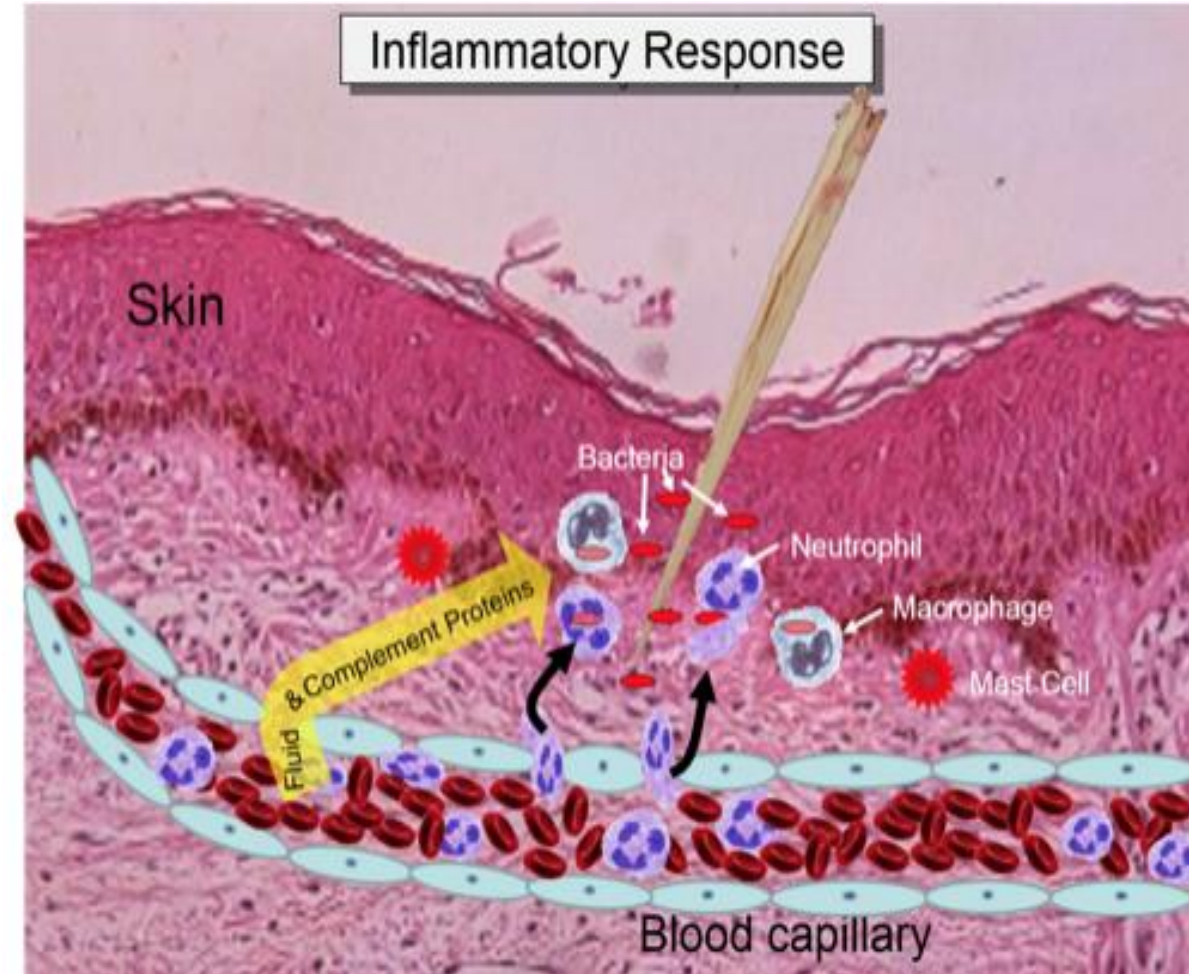
Οι βλεννογόνοι εκκρίνουν **βλέννα**, **σάλιο**, **δάκρυα** κλπ. και προστατεύουν τόσο από εισβολείς όσο και από αφυδάτωση.

Άλλοι αμυντικοί μηχανισμοί των **φραγμών** προς το εξωτερικό περιβάλλον είναι στο στομάχι το **γαστρικό οξύ** (υδροχλωρικό οξύ), στο αναπνευστικό σύστημα το **κροσσωτό επιθήλιο**, στο έντερο η **φυσιολογική** χλωρίδα των μικροοργανισμών που συμβιώνουν μαζί μας κλπ.



## B. Τα Κύτταρα της Έμφυτης Ανοσίας (Innate Immunity)

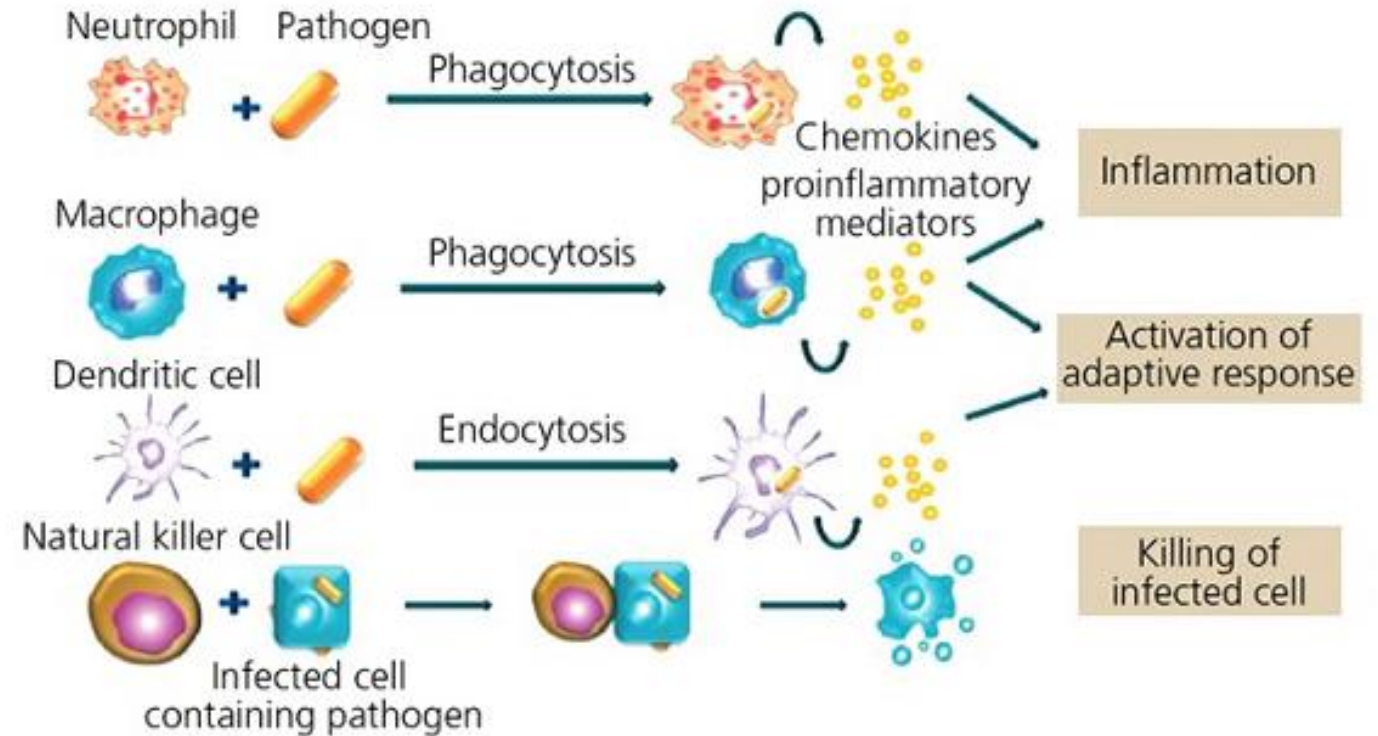
- Από τα πρώτα κύτταρα της εγγενούς ανοσίας τα **ΚΥΤΤΑΡΑ ΦΡΟΥΡΟΥΣ** που τα αναγνωρίζουν μέσω ειδικών υποδοχέων
- 2) Από άλλα αμυντικά κύτταρα που επιστρατεύονται από το **ΑΙΜΑ**
- Από τη διαδικασία της εξόντωσης των παθογόνων δημιουργείται η **ΟΞΕΙΑ ΦΛΕΓΜΟΝΗ** (με ερυθρότητα, οίδημα, πόνο και αύξηση θερμοκρασίας).
- # Τα **νεκρά κύτταρα** από τον ιστό της φλεγμονής μαζί με τα **νεκρά αμυντικά κύτταρα** (κυρίως τα ουδετερόφιλα) και τους νεκρούς μικροοργανισμούς σχηματίζουν το **ΠΥΟΝ**.
- Οι **παθογόνοι μικροοργανισμοί** έχουν τα **μόρια (PAMPs)** που αναγνωρίζονται σαν **ξένα προς το σώμα** και που ενεργοποιούν τους αισθητήρες των **αμυντικών κυττάρων** (υποδοχείς αναγνώρισης Προτύπων, **PRRs**) και τις **πρωτεΐνες του συμπληρώματος**, για να εξοντωθούν.
- Οι αισθητήρες **PRRs** που αναγνωρίζουν τους μικροοργανισμούς υπάρχουν και στα **ενδοθηλιακά κύτταρα** του αναπνευστικού, γαστρεντερικού κλπ.



## B. Τα Κύτταρα της Έμφυτης Ανοσίας (Innate Immunity)

### ΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΦΡΟΥΡΟΙ

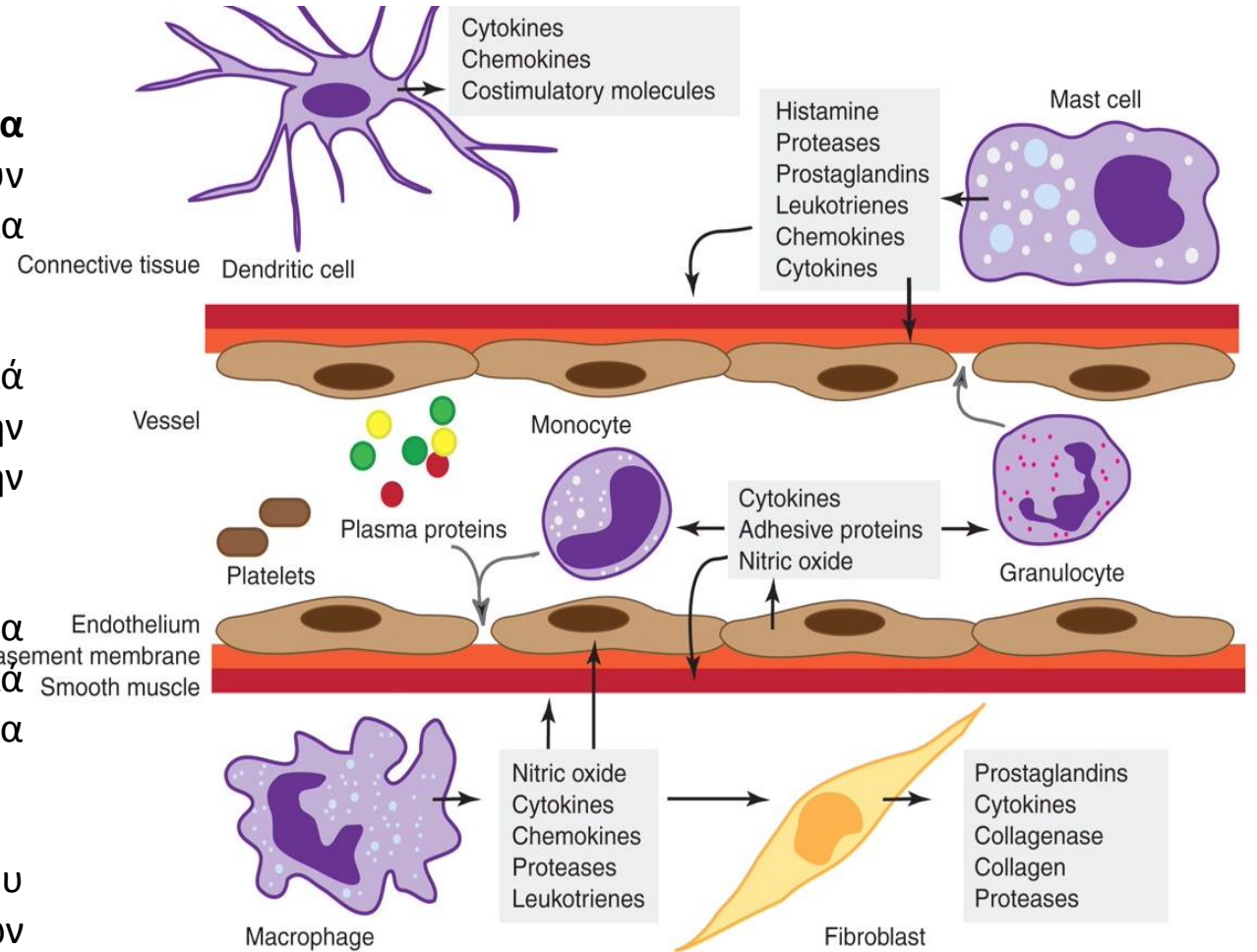
- Κάτω από τα **επιθηλιακά κύτταρα** του δέρματος και των βλεννογόνων βρίσκεται η **πρώτη σειρά** των αμυντικών **κυττάρων φρουρών** (sentinel cells) που καταπολεμούν τους εισβολείς με **φαγοκυττάρωση**.
- Αυτά είναι τα **ΔΕΝΔΡΙΤΙΚΑ κύτταρα** και τα **ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ των ιστών** που προέρχονται από τα **ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ** που κυκλοφορούν στο **αίμα**.
- Τα **δενδριτικά κύτταρα** και τα **μακροφάγα των ιστών** επίσης **ενεργοποιούν την επίκτητη ανοσία**.
- Επιπλέον υπάρχουν και ορισμένα κύτταρα της επίκτητης ανοσίας που συμπεριφέρονται σαν κύτταρα άμεσης άμυνας. Αυτά βρίσκονται κάτω από τους φραγμούς και είναι τα **γδ Τ λεμφοκύτταρα**, τα **B1 Β λεμφοκύτταρα** και τα **B λεμφοκύτταρα της περιθωριακής ζώνης**.



## B. Τα Κύτταρα της Έμφυτης Ανοσίας (Innate Immunity)

### ΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΦΡΟΥΡΟΙ

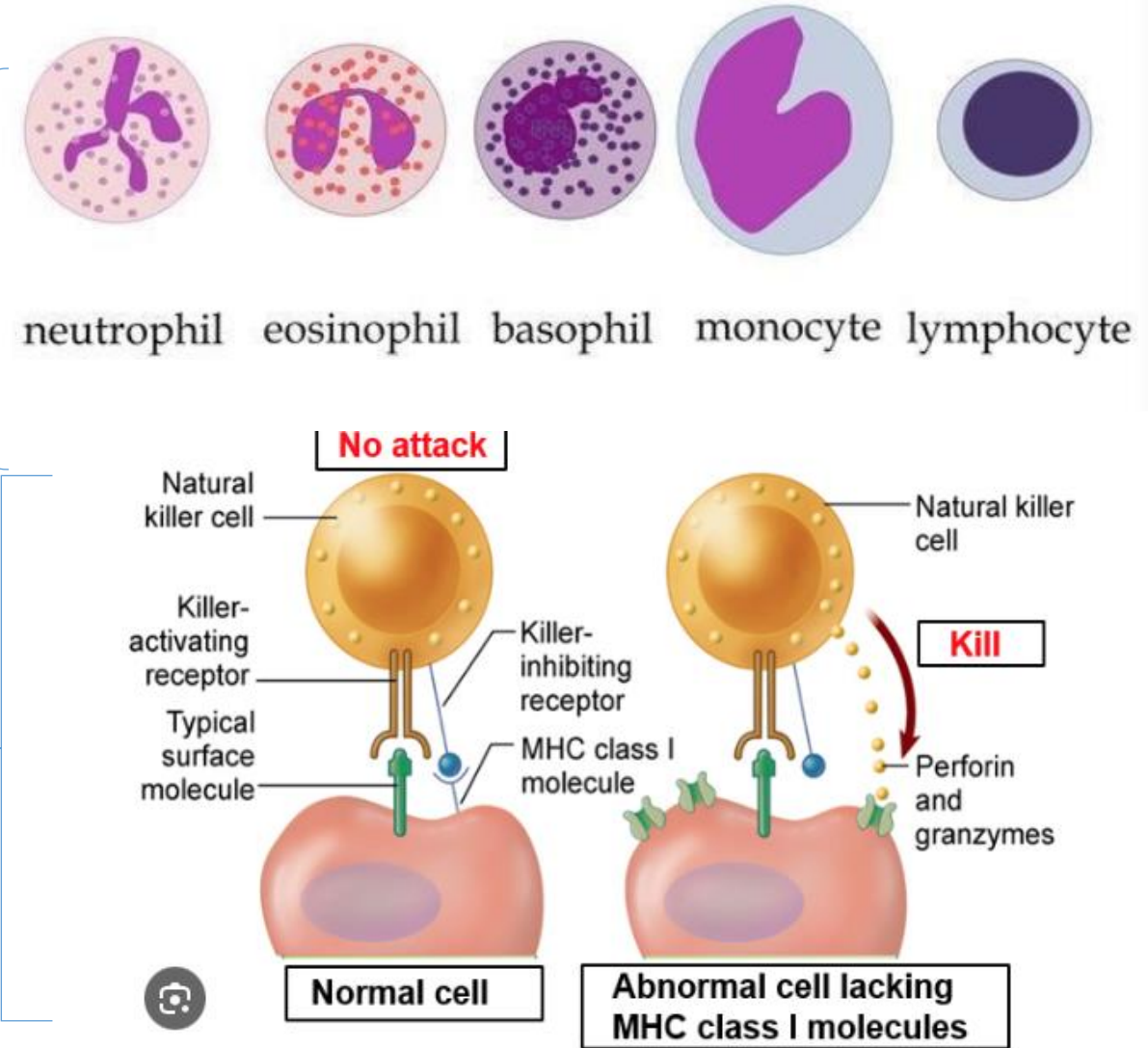
- Τα **ΜΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΑ** βρίσκονται και αυτά **κάτω από τα επιθηλιακά κύτταρα** και όταν αντιληφθούν κυρίως **παράσιτα** ή **αλλεργιογόνα**, εκκρίνουν από τα κοκκία τους **Ισταμίνη**, **Ηπαρίνη** και **Κυτταροκίνες**.
- Τα κύτταρα φρουροί λέγονται και αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα γιατί εμφανίζουν αμινοξέα των παθογόνων στην επιφάνεια τους ενωμένα με την πρωτεΐνη MHC II για την ενεργοποίηση της επίκτητης ανοσίας.
- Οι κυτταροκίνες επιστρατεύουν και άλλα αμυντικά κύτταρα από το αίμα και με την δράση τους στα ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών αγγείων δημιουργούν περάσματα ανάμεσα τους.
- Τα επόμενα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας που προσκαλούνται στο σημείο εισβολής των μικροοργανισμών είναι τα **πολυμορφοπύρρηνα**.



## B. Τα Κύτταρα της Έμφυτης Ανοσίας (Innate Immunity)

### ΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΦΡΟΥΡΟΙ

- Τα πολυμορφοπύρρηνα είναι τα ουδετερόφιλα, τα βασεόφιλα και τα ηωσινόφιλα.
- Τα ουδετερόφιλα είναι φαγοκύτταρα όπως είναι τα μονοκύτταρα, τα δενδριτικά κύτταρα και τα μακροφάγα των ιστών.)
- Τα βασεόφιλα και τα ηωσινόφιλα καταπολεμούν παράσιτα και αλλεργιογόνα.
- Τα ΦΥΣΙΚΑ ΦΟΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (Natural killer ή NK cells) ανιχνεύουν τα μολυσμένα από ιούς κύτταρα και ορισμένα καρκινικά κύτταρα και τα εξοντώνουν με την έκκριση της Perforin που τρυπά την επιφάνεια του κυττάρου και τα Granzymes που το σκοτώνουν.
- Τα NK cells εξοντώνουν όσα κύτταρα μας ΔΕΝ εμφανίζουν την πρωτεΐνη MHC I στην επιφάνειά τους λόγω βλάβης τους από ιούς ή από καρκίνο.





# Το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα αποτελείται από:

---

A. Αμυντικούς Φραγμούς

B. Αμυντικά κύτταρα (Κύτταρα εγγενούς ή έμφυτης ανοσίας, Innate Immunity)

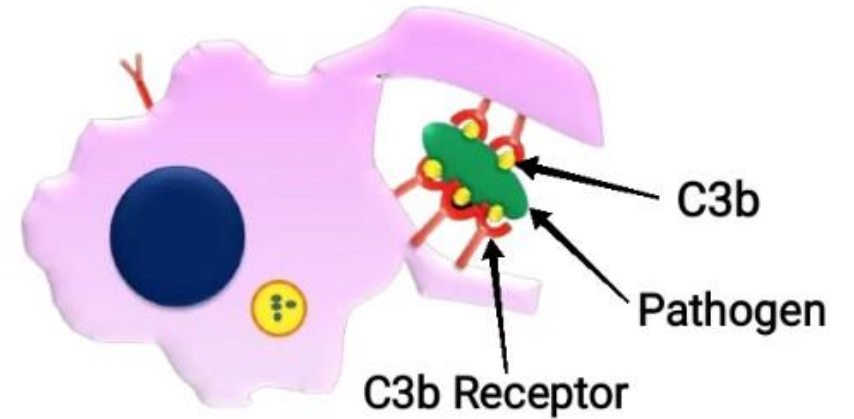
Γ. Αντιμικροβιακές ουσίες



- i. Το σύστημα του συμπληρώματος
- ii. Η C αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP)
- iii. Ιντερφερόνες (κυτταροκίνες)

## Γ. Οι Αντιμικροβιακές Ουσίες

- Το σύστημα του συμπληρώματος είναι σύστημα υποδοχέων Αναγνώρισης Προτύπων (PRRs) που βασίζεται σε πρωτεΐνες που κυκλοφορούν στο αίμα σε ανενεργή μορφή.
- Οι πρωτεΐνες του συμπληρώματος συντίθενται κυρίως από το ήπαρ και ενεργοποιούνται από παθογόνα (PAMPs), από ξένα υλικά και από κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβη (DAMPs) (Επιπλέον ενεργοποιούνται και από το σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος).
- Αυτές λέγονται πρωτεΐνες του συμπληρώματος γιατί συμπληρώνουν – ενισχύουν την ικανότητα των αντισωμάτων και των φαγοκυττάρων να εξουδετερώσουν μικροοργανισμούς και φθαρμένα κύτταρα, μέσω 3 μηχανισμών:



- α) Βοηθούν στη άμυνα – φλεγμονή με την ενεργοποίηση των **μαστοκυττάρων** για έκκριση Ισταμίνης και την επιστράτευση και άλλων **Μακροφάγων** και **Ουδετεροφίλων**.
- β) Προκαλούν **καταστροφή της μεμβράνης** από το **σύμπλεγμα επίθεσης στη μεμβράνη (MAC)**
- γ) Χρησιμεύουν σαν **ενδιάμεσα υποβοηθητικά μόρια “μαρκαρίσματος”** της **επιφάνειας των μικροβίων ενισχύοντας τη φαγοκυττάρωση** τους από τα **Μακροφάγα** και τα **Ουδετερόφιλα**

# Το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα αποτελείται από:

---

A. Αμυντικούς Φραγμούς

B. Αμυντικά κύτταρα (Κύτταρα εγγενούς ή έμφυτης ανοσίας, Innate Immunity)

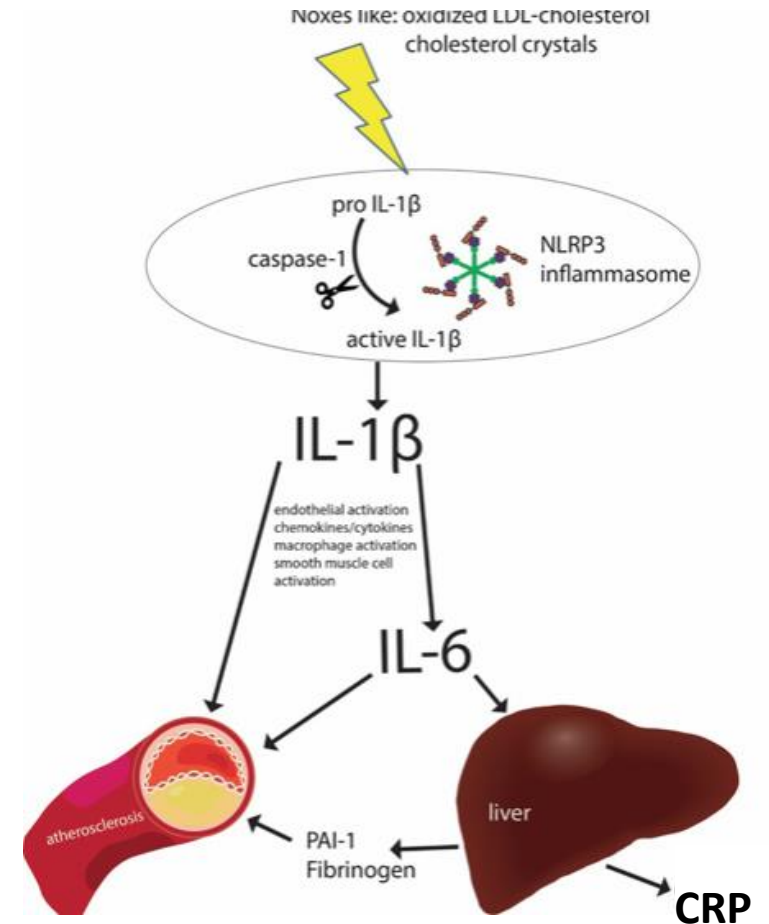
Γ. Αντιμικροβιακές ουσίες



- i. Το σύστημα του συμπληρώματος
- ii. Η C αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP)
- iii. Ιντερφερόνες (κυτταροκίνες)

## Γ. Οι Αντιμικροβιακές Ουσίες

- Όταν τα **μακροφάγα** κλπ. διεγερθούν από τα **PAMPs** (παθογόνα) ελευθερώνουν **Ιντερλευκίνη-1β (IL-1β)** και **Ιντερλευκίνη-6 (IL-6)** που προκαλεί την **έκκριση C αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP)** κυρίως από το **ήπαρ**, οπότε η ποσότητα της στο αίμα αυξάνεται μέχρι και 1000 φορές σε περίπτωση φλεγμονής.
- Έτσι η **CRP** πέρα από **δείκτης χρόνιας φλεγμονής** για τα καρδιαγγειακά νοσήματα (π.χ. **στεφανιαία νόσος**) είναι και **δείκτης οξείας φλεγμονής** (λοίμωξης) και **συστατικό του εγγενούς ανοσοποιητικού συστήματος**.
- Η **CRP** ενώνεται στα **φθαρμένα κύτταρα** και σε ορισμένα **βακτήρια** ώστε να ξεκινήσει η **ενεργοποίηση του συστήματος του συμπληρώματος**, η **αύξηση της φαγοκυττάρωσης των παθογόνων** και η **απόπτωση** (προγραμματισμένος θάνατος) των **φθαρμένων κυττάρων**.
- Επιπλέον χρησιμεύει για την επιστράτευση των **λευκοκυττάρων του αίματος** στο σημείο της **φλεγμονής**.



# Το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα αποτελείται από:

---

A. Αμυντικούς Φραγμούς

B. Αμυντικά κύτταρα (Κύτταρα εγγενούς ή έμφυτης ανοσίας, Innate Immunity)

Γ. Αντιμικροβιακές ουσίες

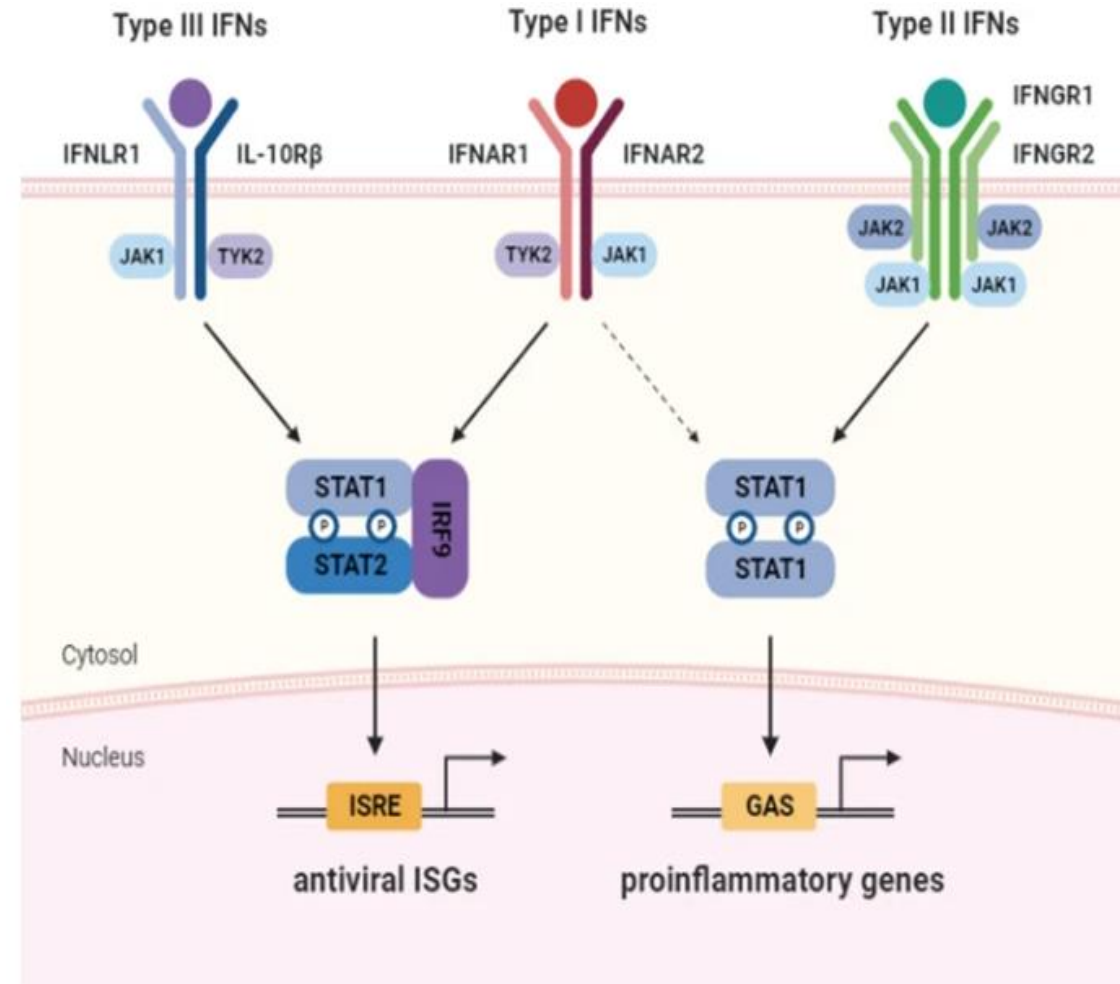


- i. Το σύστημα του συμπληρώματος
- ii. Η C αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP)
- iii. **Ιντερφερόνες (κυτταροκίνες)**

# ΟΙ ΙΝΤΕΡΦΕΡΟΝΕΣ

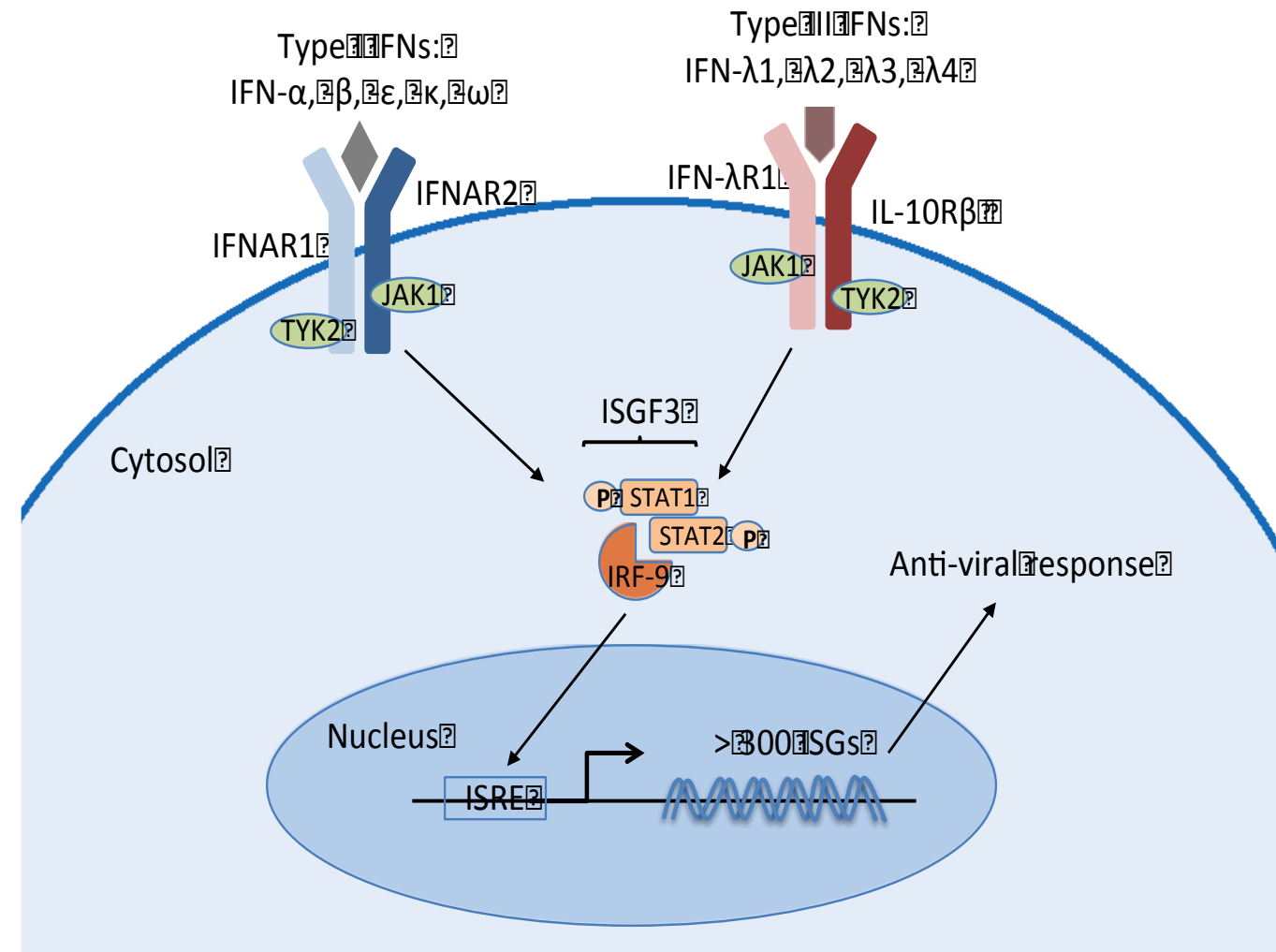
## ΔΡΑΣΕΙΣ

- Σταματούν τον πολλαπλασιασμό ιών στα μολυσμένα κύτταρα (διεγείρουν τα μολυσμένα και τα γειτονικά τους κύτταρα να παράγουν πρωτεΐνες που εμποδίζουν την αντιγραφή των ιών).
- Προκαλούν την παραγωγή πρωτεϊνών μέσω 100άδων γονιδίων που διεγείρουν και λέγονται interferon stimulated genes (ή ISGs).
- Δρουν εναντίον όλων των σταδίων του ιού (από την είσοδο, την αντιγραφή και την έξοδο του από το μολυσμένο κύτταρο)
- Επιπλέον από τις Ιντερφερόνες αυξάνεται και η παραγωγή της πρωτεΐνης του γονιδίου p53, οπότε προκαλείται **θάνατος των μολυσμένων κυττάρων**]
- Δρουν σαν αγγελιοφόροι στα γειτονικά κύτταρα ώστε αυτά να αυξήσουν την άμυνα τους απέναντι στους ιούς
- Αυξάνουν την προσέλευση και ενισχύουν τη λειτουργία αμυντικών κυττάρων της εγγενούς και της επίκτητης ανοσίας (π.χ. των Τ λεμφοκυττάρων και των φυσικών φονικών κυττάρων).



## Type III IFN or IFN-λ

- Latest addition to the IFN family of anti-viral cytokines.
- First described in 2003 by two labs (Kotenko et al. Nat Immunol. 2003 Jan;4(1):69-77; Sheppard et al. Nat Immunol. 2003 Jan;4(1):63-8).
- All members bind to the same receptor, IL-28R, consisting of two subunits: IL-10R2, a common subunit for the receptors of all IL-10 superfamily members, and IL-28R1 (IFNLR1), a unique subunit.
- Their expression is induced upon viral infection.
- Amino acid identity between type I and III IFNs ranges up to 22%.
- Both type I and III IFNs activate the canonical Jak/Stat pathway.



Galani et al. Adv Exp Med Biol. 2015;850:1-15.

Antiviral  
Immunity

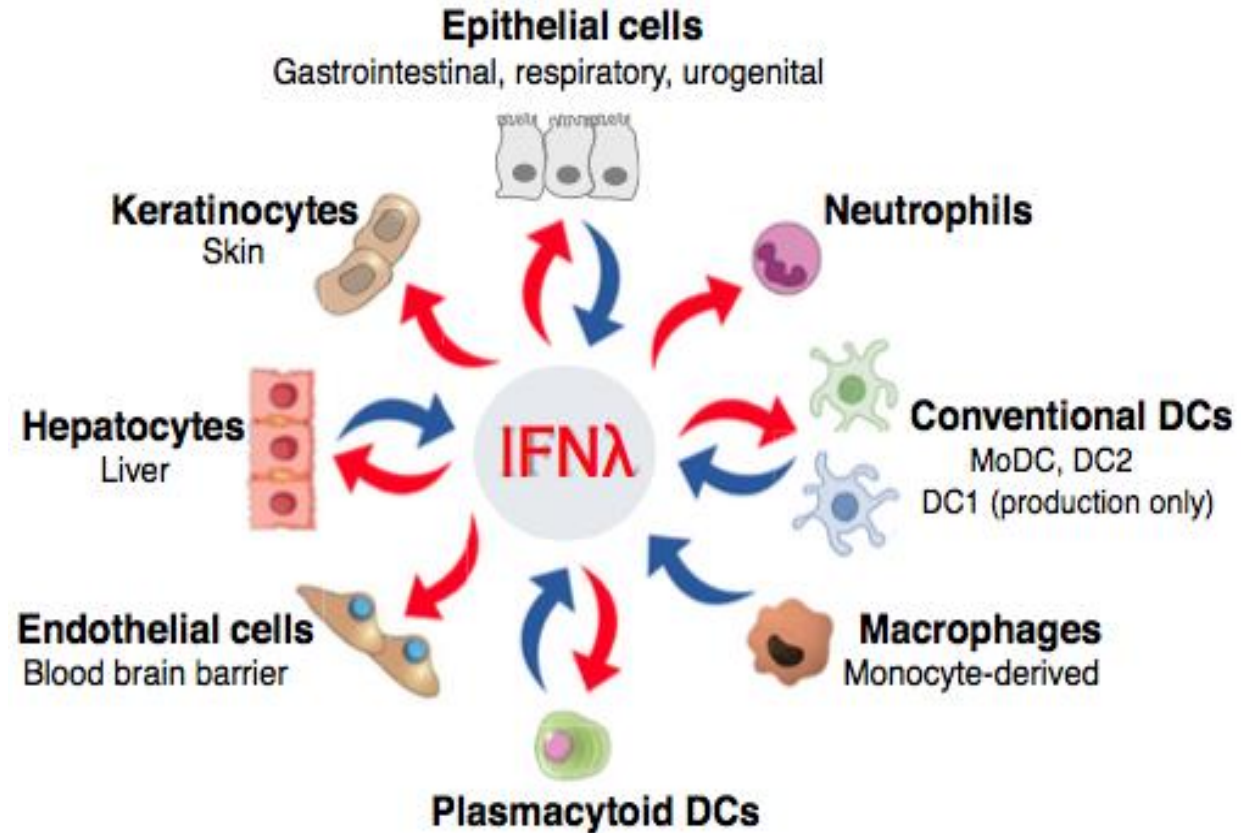
Airway  
Inflammation

Anti-tumor  
Immunity

Anti-fungal  
Immunity

Autoimmunity

Immune and non-immune cell populations



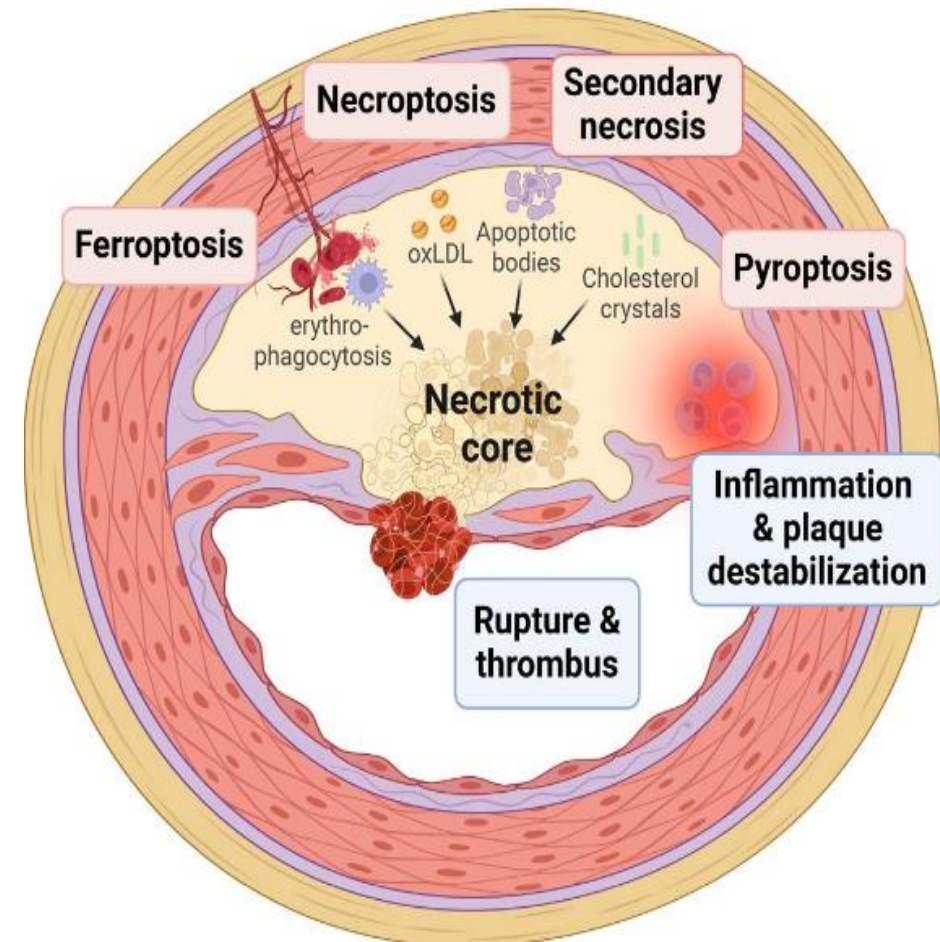
*Andreacos et al 2019; Current Opinion in Immunology*



**Τι γνωρίζουμε για την αθηροσκλήρυνση ;**

# ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΥΝΣΗ

- Είναι μια χρόνια φλεγμονή του αγγειακού τοιχώματος.
- Είναι μια **εξελισσόμενη νόσος** που επηρεάζει τις αρτηρίες. Είναι μια αργή και προοδευτική ασθένεια που μπορεί να προσβάλει οποιαδήποτε αρτηρία του σώματος που μπορεί να οδηγήσει σε οξεία καρδιοαγγειακά επεισόδια.
- Ονομάζεται και «σκλήρυνση των αρτηριών», εμφανίζεται όταν λίπος (χοληστερόλη) και ασβέστιο συσσωρεύονται στο εσωτερικό τοίχωμα (intima) των αρτηριών, σχηματίζοντας την αθηρωματική πλάκα. Με την πάροδο του χρόνου, η συσσώρευση λίπους και ασβεστίου γίνεται εντονότερη και έτσι στενεύει η αρτηρία και φράσσει – μειώνοντας την ροή του αίματος μέσα από την αρτηρία.
- Αποτελείται από έναν πυρήνα λιπιδίων και καλύπτεται από ινώδη μανδύα. Ο νεκρωτικός πυρήνας συντίθεται από κρυστάλλους χοληστερόλης σε σύμπλεγμα με πρωτεΐνες και εστέρες χοληστερόλης, αφρώδη κύτταρα, υπολείμματα κυττάρων και άλατα ασβεστίου.
- Ο ινώδης μανδύας αποτελείται από εναλλασσόμενες στιβάδες τροποποιημένων λείων μυικών κυττάρων, λεμφοκύτταρα, αφρώδη κύτταρα, κολλαγόνο, ελαστίνη και πρωτεογλυκάνες.



- Οι **Αθηροσκληρωτικές Πλάκες** στενεύουν τον αυλό κυρίως των **μεσαίου μεγέθους αρτηριών** και προκαλούν τη **σταθερή στεφανιαία νόσο**, την **αποφρακτική αρτηριοπάθεια των κάτω άκρων**, στενώσεις σε αρτηρίες του εγκεφάλου και τη **στένωση των έσω καρωτίδων**.
- Από την **ρήξη** τους προκαλούνται τα **οξέα Καρδιαγγειακά νοσήματα**, δηλαδή το **οξύ έμφραγμα μυοκαρδίου (STEMI ή NSTEMI)**, το **ισχαιμικό εγκεφαλικό** επεισόδιο, ή και ο θάνατος από αυτά.
- Η αθηροσκλήρωση είναι η κύρια αιτία **εμφράγματος του μυοκαρδίου (EM)**, δημιουργώντας έναν φαύλο κύκλο που αυξάνει την αθηροσκλήρωση και τον κίνδυνο για περισσότερα εμφράγματα.

## DYING FROM CARDIOVASCULAR DISEASE (EU)

**1.8** MILLION  
Cardiovascular Disease deaths per year

=

**5000**  
Cardiovascular Disease deaths per day

**36%** Cardiovascular Disease



**26%** Cancer

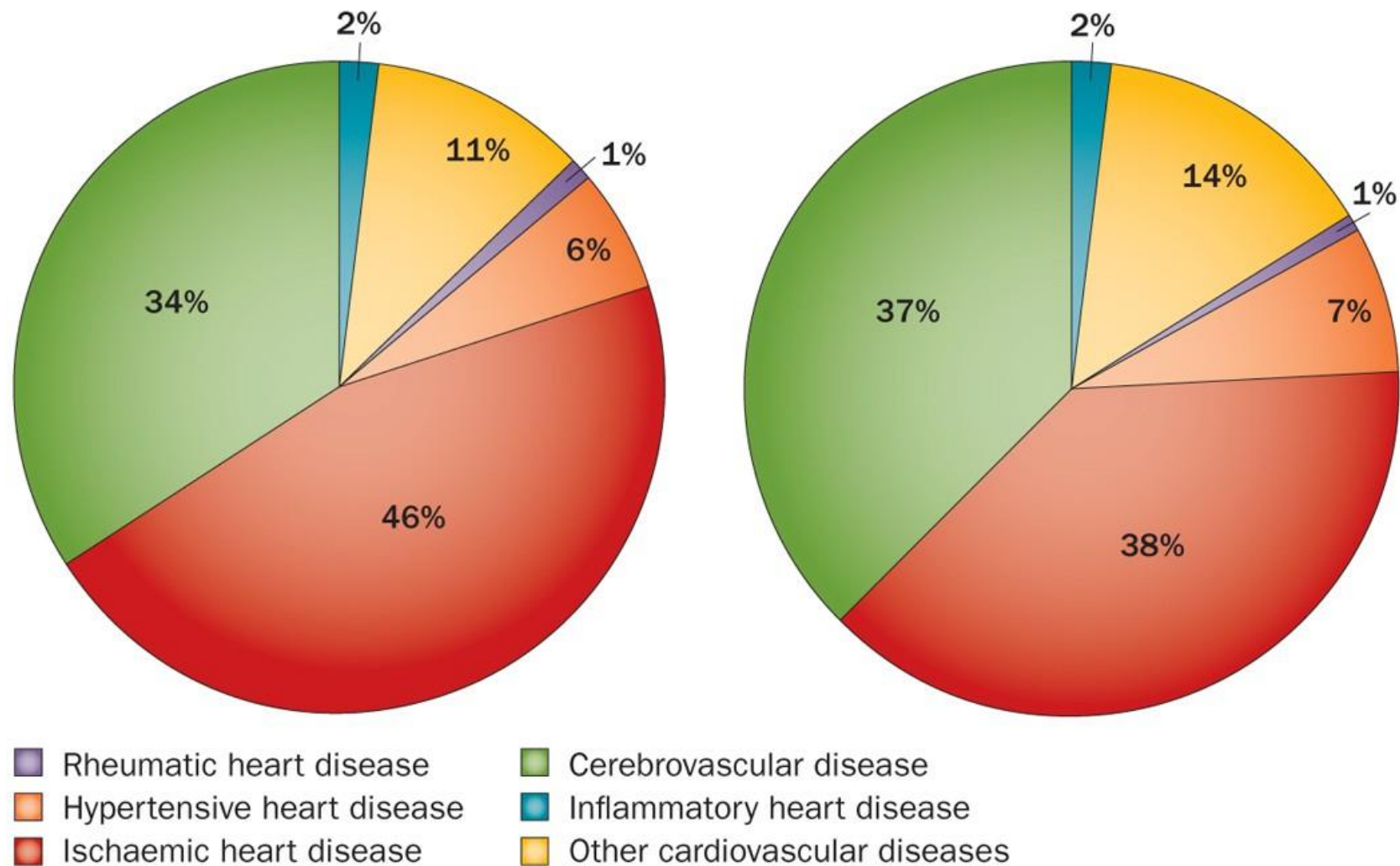


**8%** Respiratory



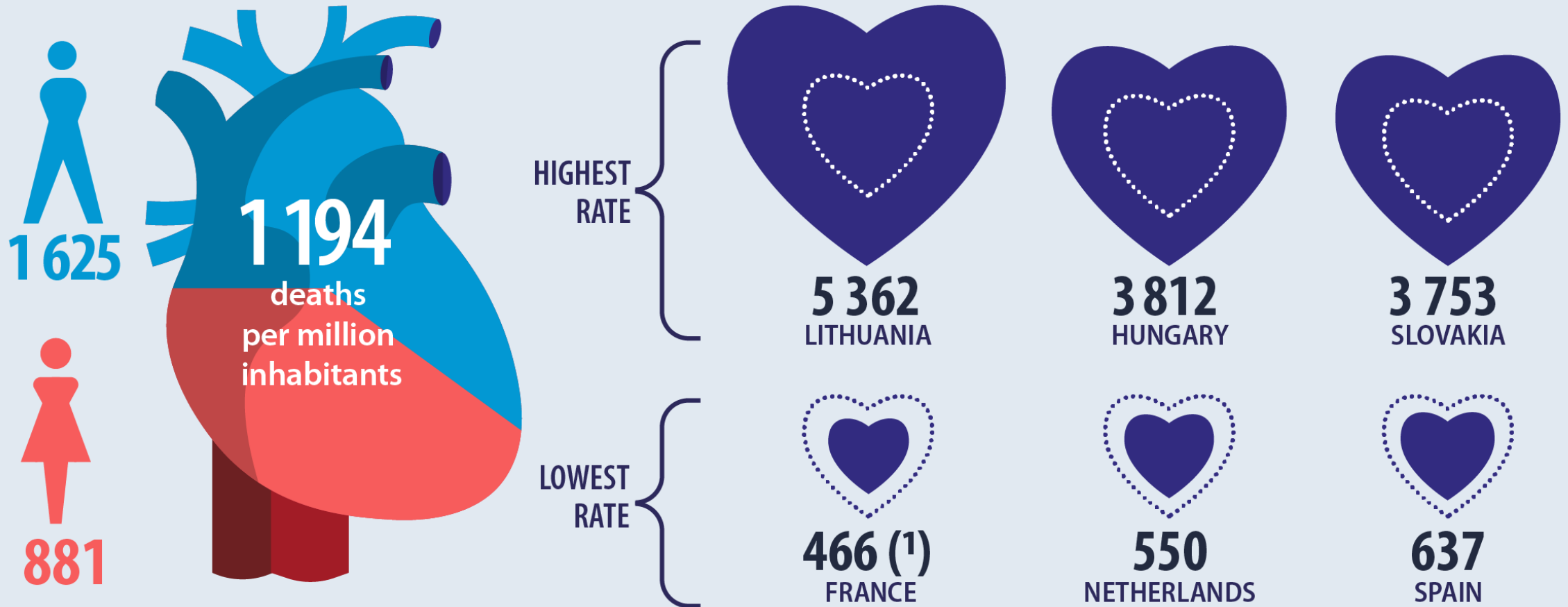
**2%** Diabetes



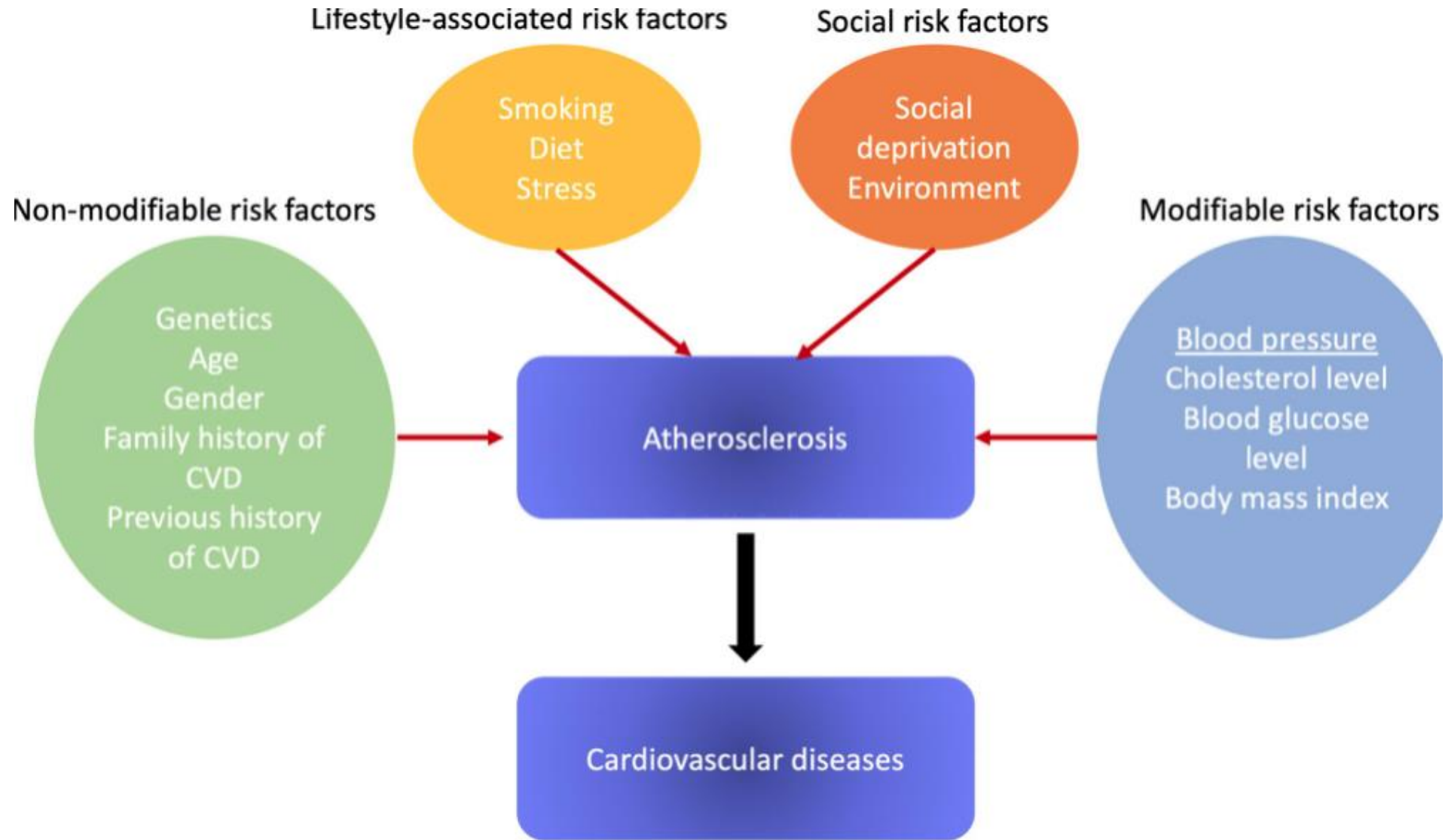


# Standardised rate of deaths from coronary heart diseases in the EU

(per million inhabitants, 2017 data)  EU value = 1 194 <sup>(1)</sup>

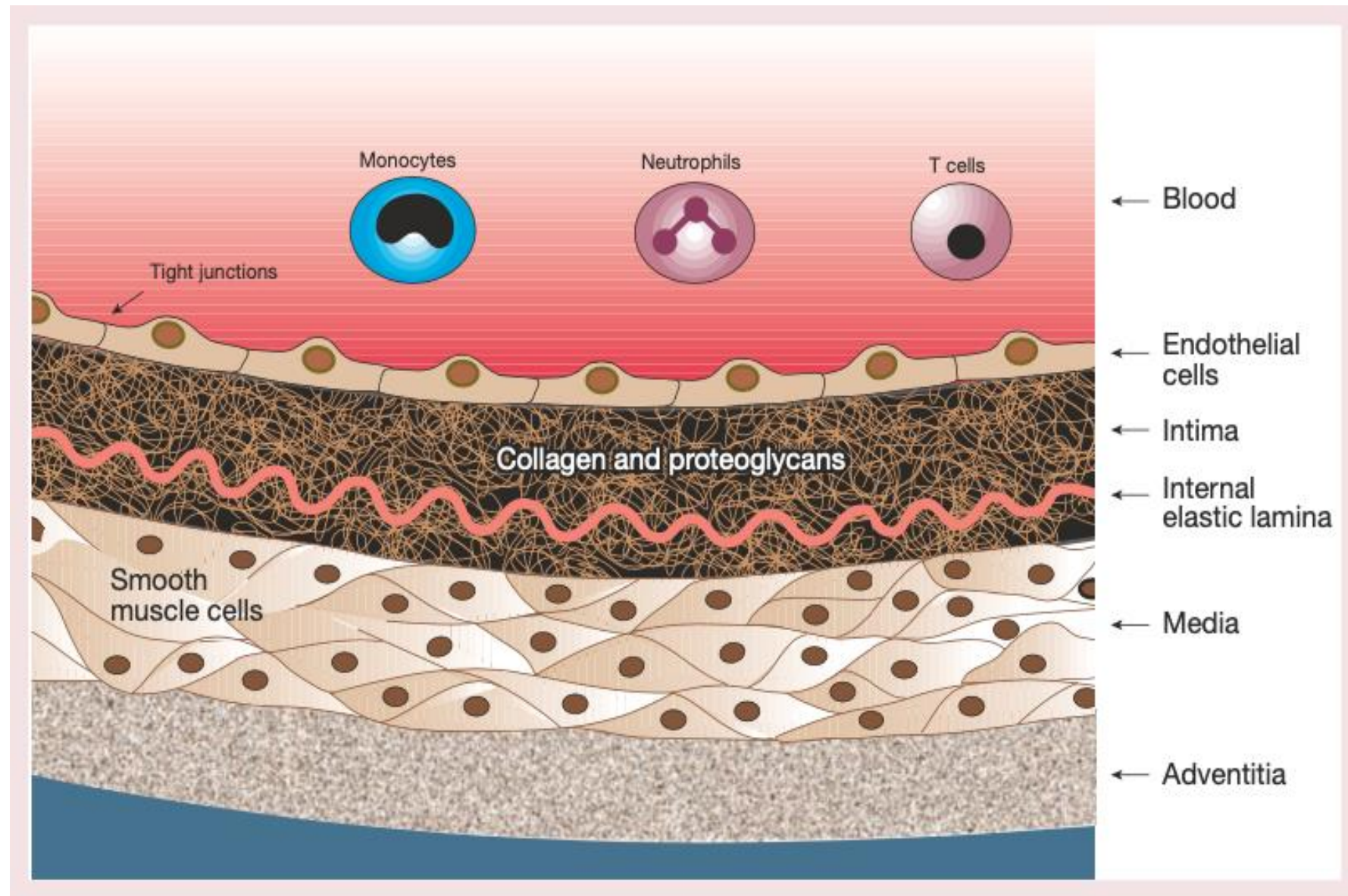


<sup>(1)</sup> 2016 data.



# Δομή φυσιολογικής αρτηρίας

- Αποτελείται από τρεις διακριτούς χιτώνες.
- Το ενδοθήλιο, το μονό στρώμα των κυττάρων της αρτηρίας που έρχεται σε επαφή με το αίμα και μοιάζει με πλακόστρωτο και περιβάλλεται από εξωκυττάρια θεμέλια ουσία κυρίως πρωτεογλυκάνες και κολλαγόνο.
- Τον μέσο χιτώνα που αποτελείται από λεία μυϊκά κύτταρα (SMCs)
- Τον έξω χιτώνα που αποτελείται συνδετικό ιστό, ινοβλάστες και λεία μυϊκά κύτταρα





# Αρτηριακό Τοίχωμα

---

Το ενδοθήλιο ελέγχει :

- Την ικανότητα των αιμοφόρων αγγείων να διαστέλλονται (αγγειοδιαστολή)
- Την ικανότητα των αιμοφόρων αγγείων να συστέλλονται (αγγειοσυστολή)
- Ρυθμίζει τη ροή του αίματος στους ιστούς και τα όργανα.

Το ενδοθήλιο απελευθερώνει διάφορες ουσίες για τον έλεγχο της αγγειοκινητικότητας

- ❖ προστακυκλίνες
- ❖ υπερπολωτικός παράγοντας
- ❖ ενδοθηλίνη
- ❖ Μονοξείδιο του Αζώτου (NO)

Η άσκηση είναι ένα σημαντικό μηχανικό ερέθισμα που συντελεί στην αύξηση της ροής του αίματος μέσω του **shear stress**.

Το shear stress— αντιπροσωπεύει τη δύναμη τριβής που ασκεί η ροή του αίματος στην ενδοθηλιακή επιφάνεια του τοιχώματος του αγγείου.

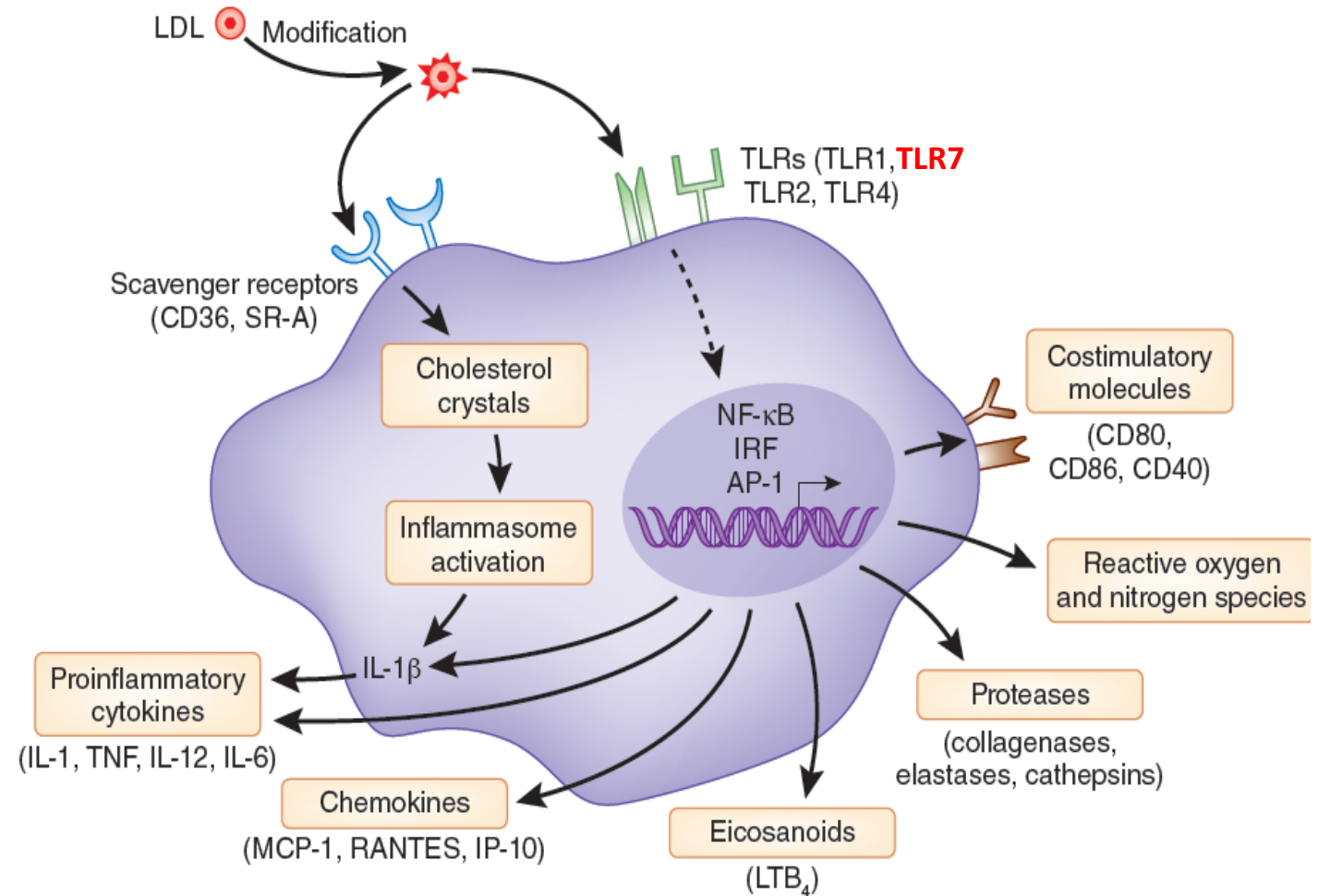
## Βλάβη στο ενδοθήλιο:

- Το καθιστά πιο διαπερατό στις λιποπρωτεΐνες
- Οι λιποπρωτεΐνες κινούνται κάτω από το ενδοθηλιακό στρώμα (στον έσω χιτώνα)
- Το ενδοθήλιο χάνει την κυτταροαπωθητική του ιδιότητα
- Τα φλεγμονώδη κύτταρα κινούνται εκτός του αγγειακού τοιχώματος.

# Συμμετοχή ανοσολογικών κυττάρων και μορίων στην ενεργοποίηση αμυντικών μηχανισμών

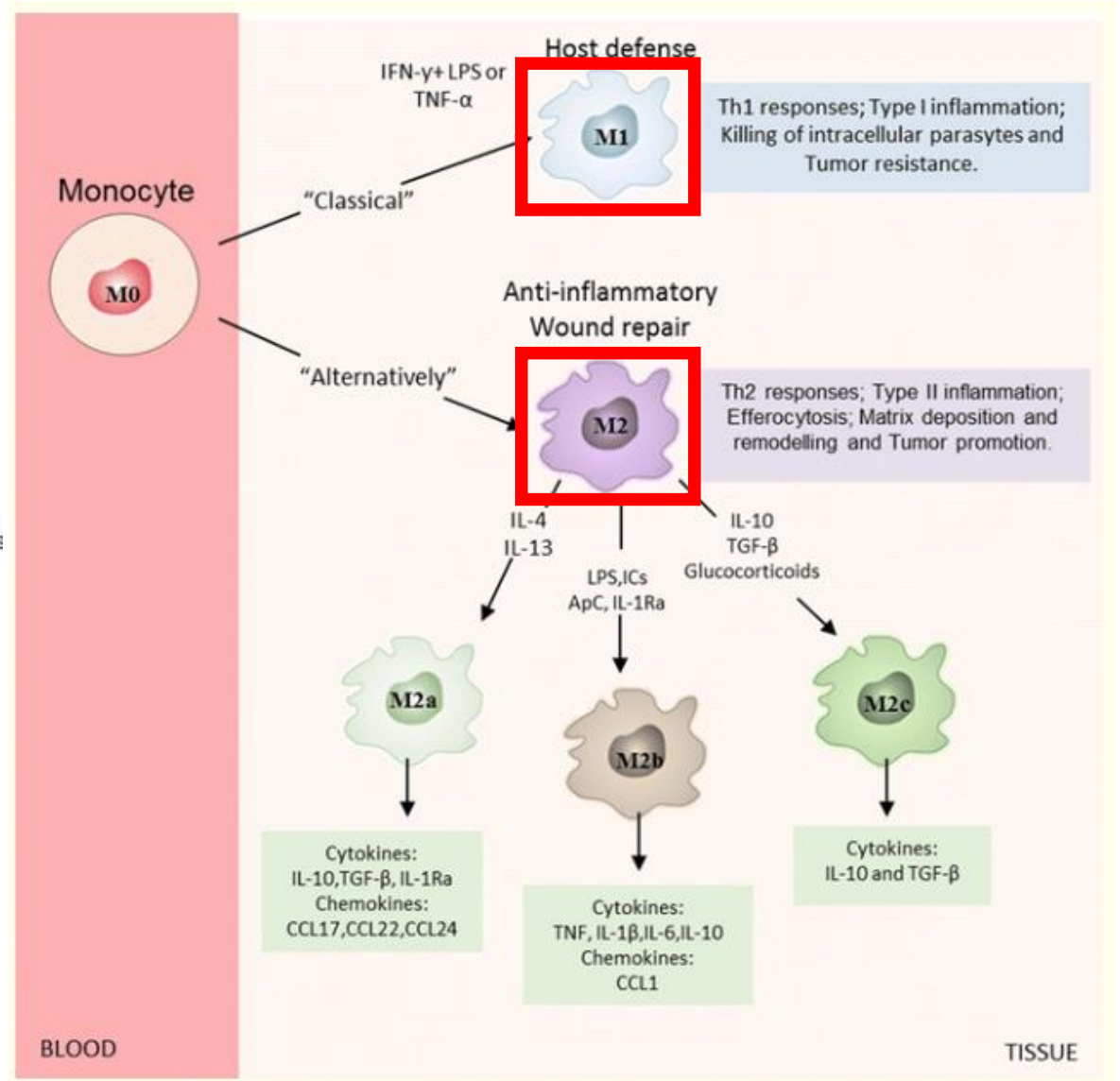
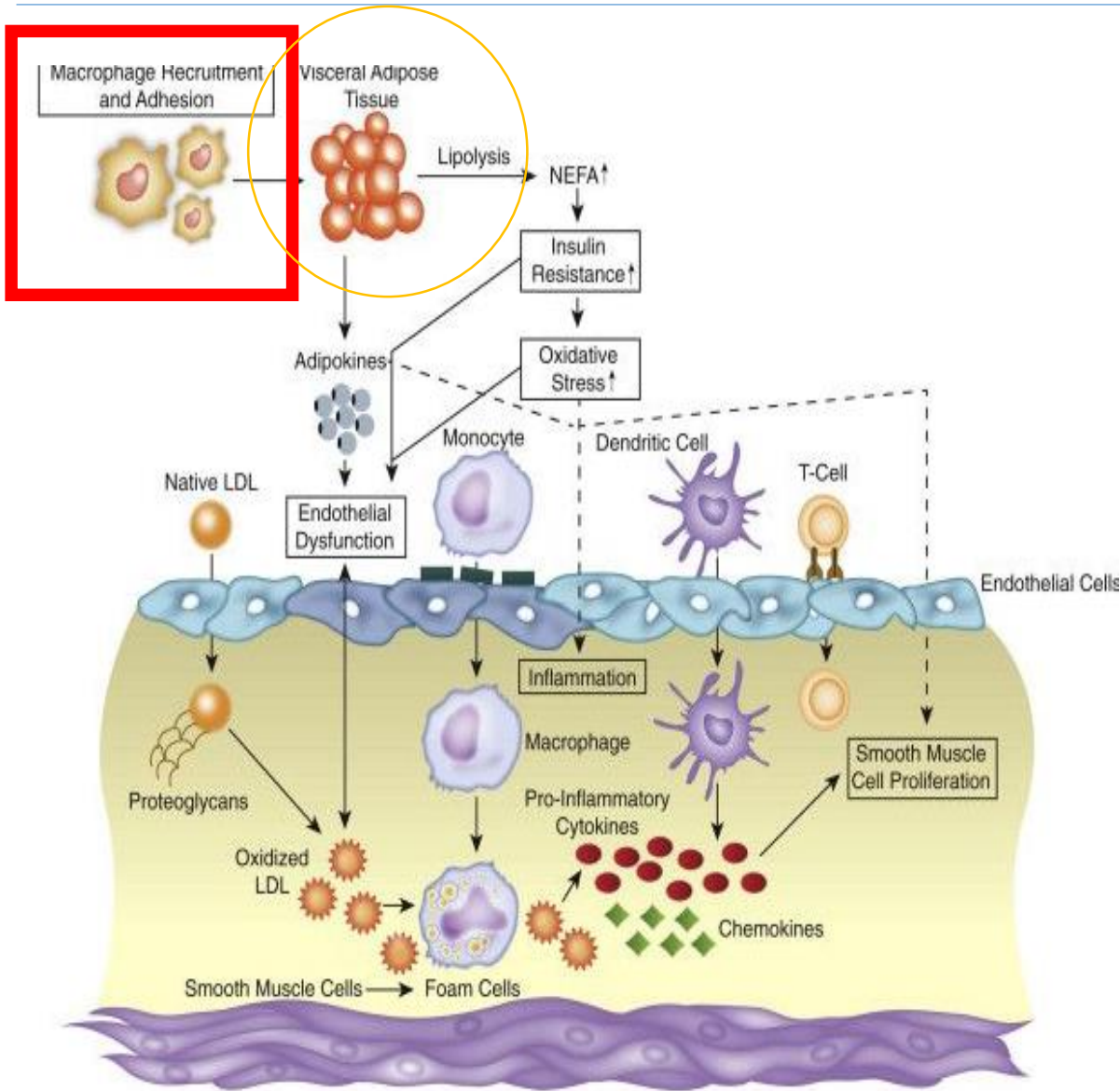
## A. Έναρξη βλάβης

- Δημιουργείται από την **φλεγμονή** που προκαλεί η **είσοδος LDL χοληστερίνης** κάτω από το **ενδοθήλιο** και η μετατροπή- οξείδωση της, τοπικά σε **ox-LDL**
- Επίσης η είσοδος των **Υπολειμμάτων (Remnants) των VLDL και των Χυλομικρών** κάτω από ενδοθήλιο συμμετέχει στη δημιουργία της **αθηρωματικής πλάκας**. Αυτά εξουδετερώνονται (όπως και η ox-LDL) από τα Μακροφάγα κύτταρα M1 (με φαγοκύτωση) χωρίς να χρειάζεται να οξειδωθούν.
- Επιπλέον στη δημιουργία της αθηρωματικής πλάκας συμμετέχουν και τα **ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA)**
- Η **φλεγμονή** στην **αρχή** είναι **προστατευτική** ώστε να εξουδετερωθεί από τα **μακροφάγα**, ο "εισβολέας" **ox LDL**, όμως αργότερα στην πορεία μπορεί να εξελιχθεί σε **συνεχή- χρόνια φλεγμονή**.



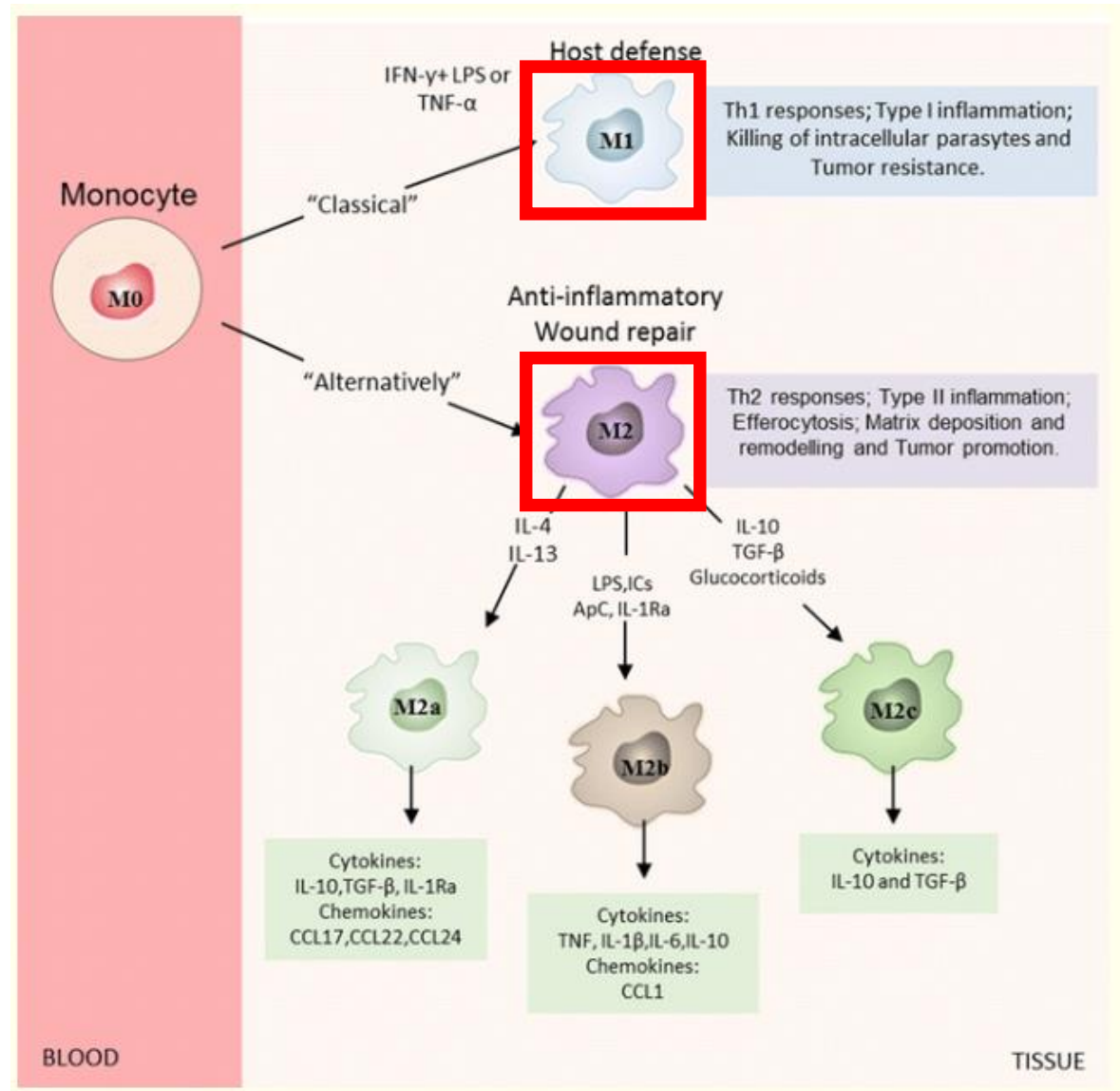
Libby P. *Nature* 2002

# Επιστράτευση ανοσολογικών κυττάρων

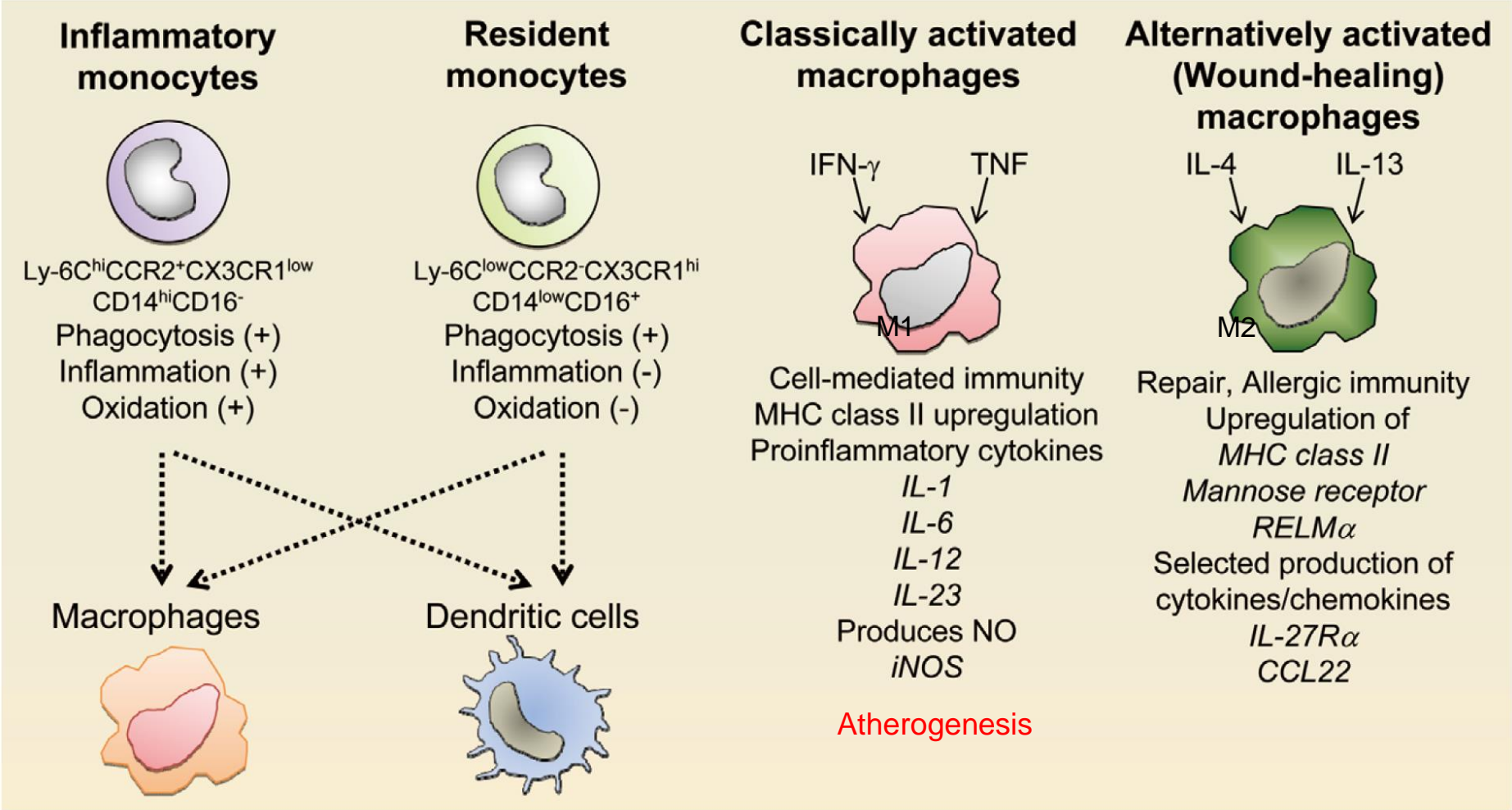


# Επιστράτευση ανοσολογικών κυττάρων

- Έτσι επιστρατεύονται **μονοκύτταρα** από το αίμα που μετατρέπονται σε **Μακροφάγα (M1)** κύτταρα για να εξουδετερώσουν την οx-LDL “τρώγοντας” την. Η οx-LDL που φαγοκυτώθηκε από τα Μακροφάγα μετατρέπεται σε **κρυστάλλους χοληστερίνης**.
- Τα Μακροφάγα διαμορφώνονται ανάλογα με τις κυτοκίνες που υπάρχουν τοπικά στα “βλαβερά”-αθηρογόνα M1 και στα εναντίον της φλεγμονής (αντι-αθηρογόνα) M2.
- Τα μακροφάγα M1 δημιουργούνται από τη δράση της IL-1β και της IFN-γ και παράγουν την IL-6, τον TNFα και ROS.
- Τα M2 δημιουργούνται από αντι-φλεγμονώδεις κυτοκίνες IL-4 και IL-13 και παράγουν τις IL-10 και TGF-β (transforming growth factor-β). Η αποστολή τους είναι η επιδιόρθωση και διάλυση της φλεγμονής.



# Monocyte/macrophage heterogeneity and plasticity

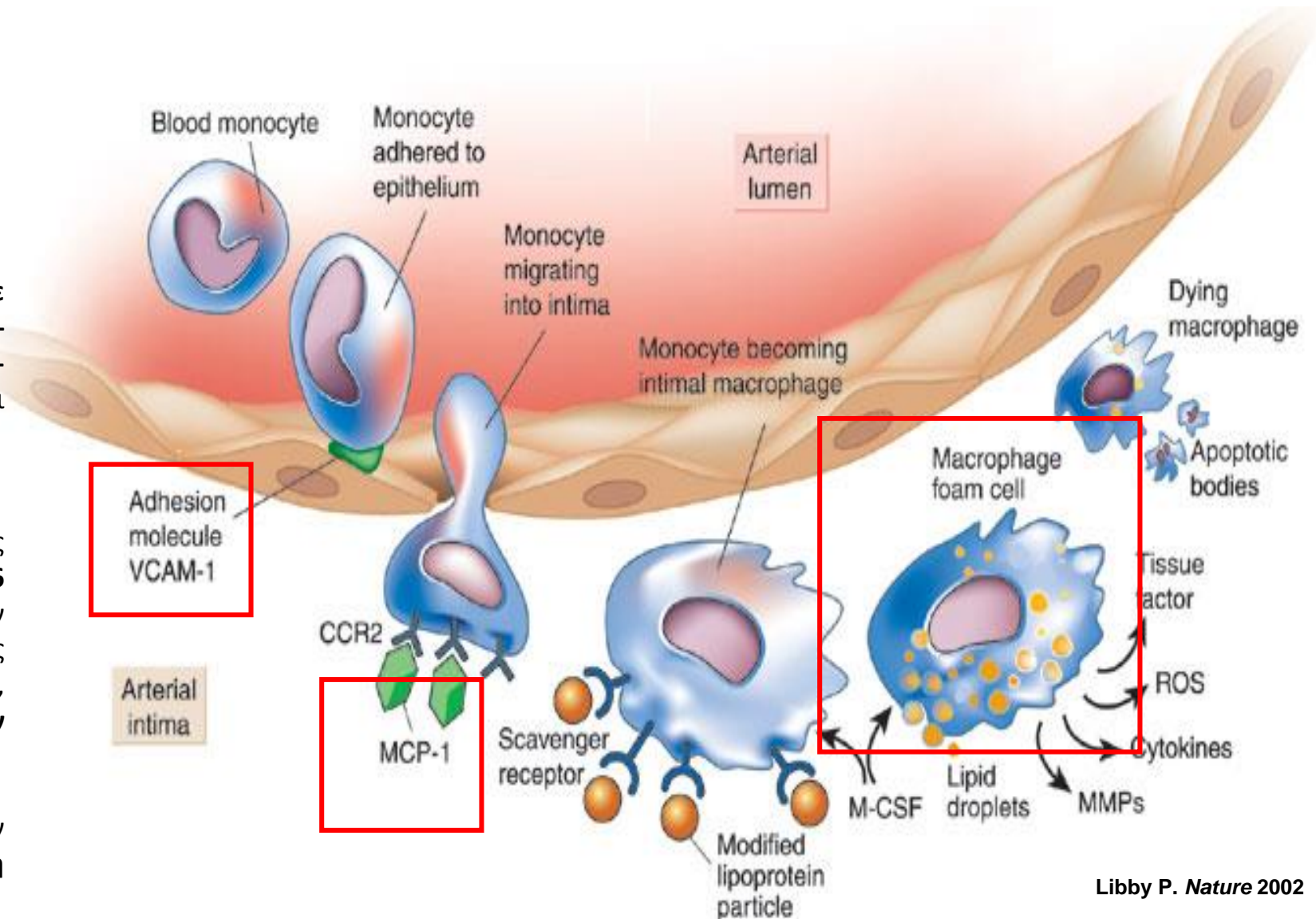


Atherogenesis

K. Shimadat *Circ Res* 2009

# Συμμετοχή ανοσολογικών κυττάρων και μορίων στην ενεργοποίηση αμυντικών μηχανισμών

- Τα **μονοκύτταρα** που **επιστρατεύονται** προέρχονται από τον μυελό των οστών. Αυτά αρχικά **έλκονται** στο σημείο της “βλάβης”, μέσω της **Κυτοκίνης CCL2 ή MCP-1** (monocyte chemoattractant protein) και της **IL 8**.
- Τα **μονοκύτταρα** στη συνέχεια **ενώνονται με τα ενδοθηλιακά** κύτταρα, μέσω των μορίων **ICAM-1** (inter-cellular adhesion molecule-1) και **VCAM-1** (vascular-cell adhesion molecule-1) και αργότερα **εισχωρούν κάτω από αυτά**.
- Τα **μακροφάγα** εκφράζουν στην επιφάνεια τους **υποδοχείς καθαριστές (SR)** όπως ο **SRA**, ο **CD36** και ο **CD68** που διαθέτουν θέσεις πρόσδεσης των LDL. Επιτρέπουν την ενδοκυττάρωση της χοληστερόλης και των οξειδωμένων μορφών, οδηγώντας στον σχηματισμό των **αφρωδών κυττάρων (foam cells)**.
- Τα **αφρώδη** κύτταρα εκκρίνουν την **απολιποπρωτεΐνη E (apoE)** η οποία διευκολύνει τη μετακίνηση της χοληστερόλης.

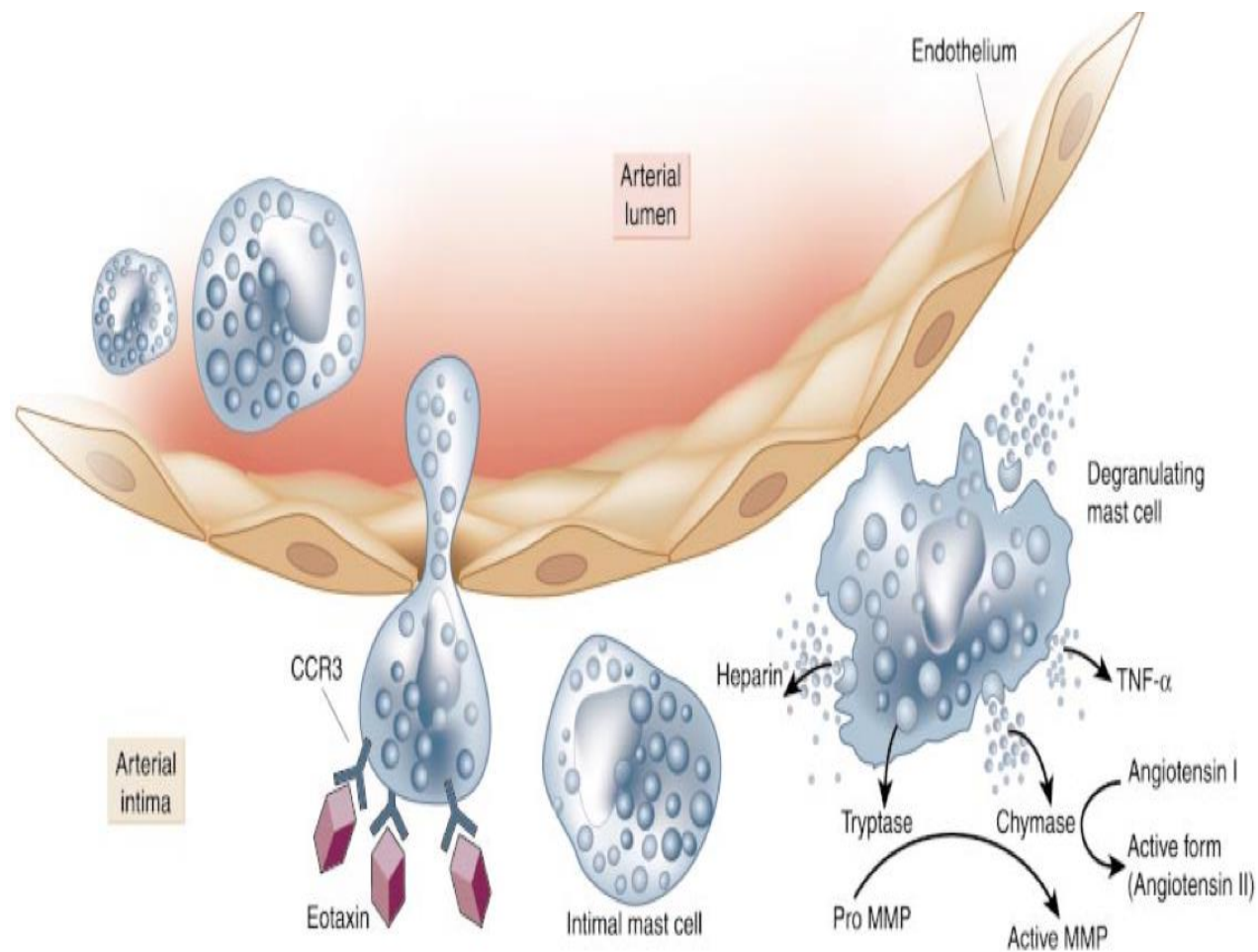


Libby P. *Nature* 2002



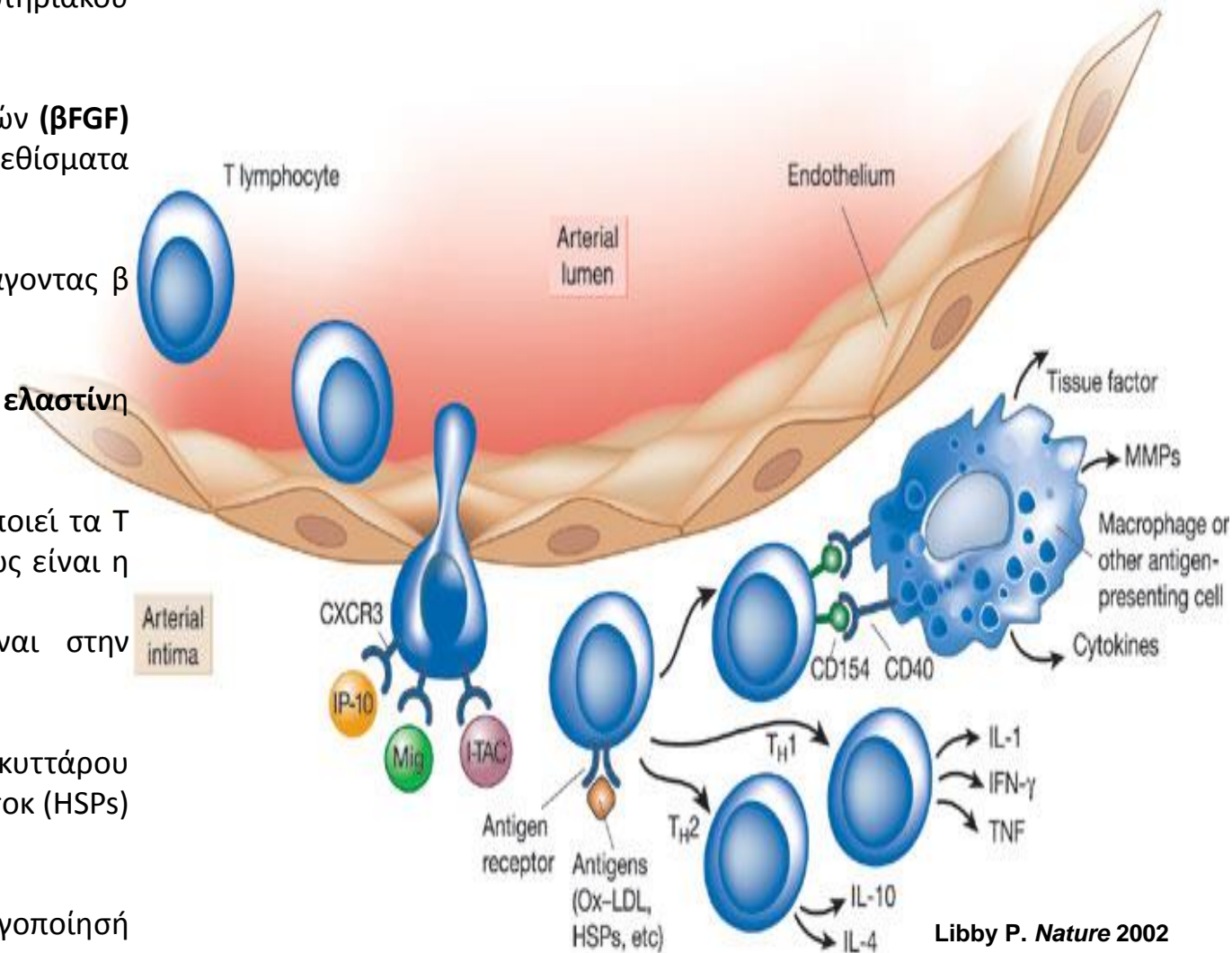
# Συσσώρευση και λειτουργίες μαστοκυττάρων

- Τα ενεργοποιημένα μονοκύτταρα/μακροφάγα παρέχουν τον ιστικό παράγοντα και τον αναστολέα του πλασμινογόνου.
- Επιπλέον, παράγουν μεταλλοπρωτεάσες υπεύθυνες για την αποικοδόμηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και την ρήξη της αθηρωματικής πλάκας.
- Ο παράγοντας των αποικιών κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (**GM-CSF**) προάγει τη φλεγμονή στην αθηρωματική πλάκα.
- Ο **GM-CSF** βοηθά την επιβίωση ενός πληθυσμού μονοπύρηνων φαγοκυττάρων πλούσια σε **μυελοπεροξειδάση**. Το ένζυμο αυτό εγείρει το σχηματισμό του υποχλωρικού οξέος, δυνητικής πηγής του οξειδωτικού stress και της φλεγμονής.
- Ο χημειοτακτισμός των μαστοκυττάρων εξαρτάται από την **ηωταξίνη** η οποία αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα χημειοκίνων 3 (**CCR3**) που βρίσκεται στην επιφάνεια των μαστοκυττάρων.
- Την εγκατάστασή τους στον έσω χιτώνα ακολουθεί η αποκοκκίωσή τους, απελευθερώνοντας τον **TNF-α**, την **ηπαρίνη** και τις serines πρωτεϊνάσες **τριπτάση** και **χυμάση**.
- Οι πρωτεϊνάσες αυτές, μετατρέπουν τις ζυμογόνες μεταλλοπρωτεϊνάσες από την ανενεργή τους μορφή στην ενεργή τους. Επιπλέον, η χυμάση μετατρέπει την αγγειοτενσίνη I σε αγγειοτενσίνη II.

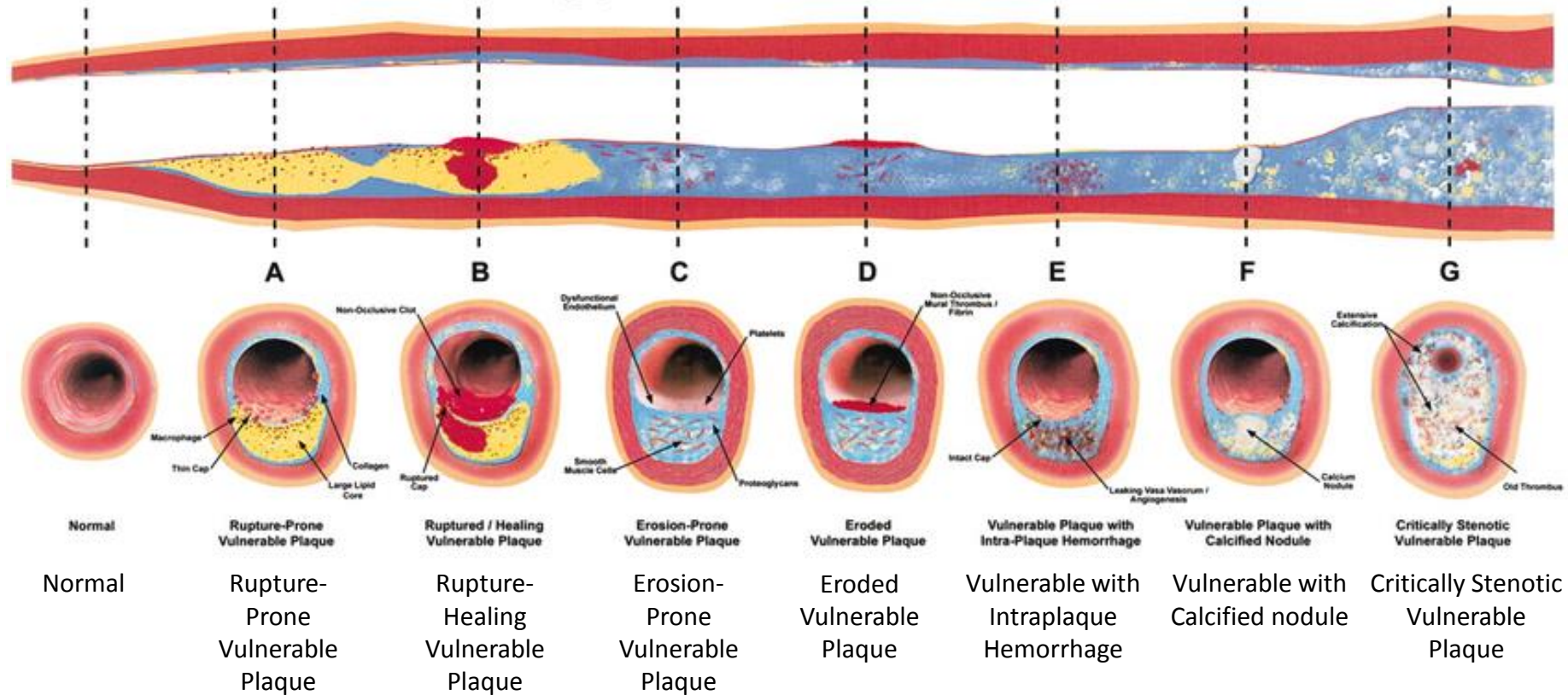


# Ο ρόλος των T λεμφοκυττάρων στην αθηρωματική πλάκα

- Τα λεία μυϊκά κύτταρα, κυρίαρχο κυτταρικό συστατικό του αρτηριακού τοιχώματος.
- Η **αγγειοτενσίνη II**, ο βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (**βFGF**) και τα αυξημένα επίπεδα **ομοκυστεΐνης** αποτελούν τα μιτογόνα ερεθίσματα των λείων μυϊκών κυττάρων.
- Η **ηπαρίνη**, η **γ-ιντερφερόνη** και ο μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας β (**TGF-β**) δρουν ανταγωνιστικά.
- Τα λεία μυϊκά κύτταρα παράγουν **πρωτεογλυκάνες, κολλαγόνο και ελαστίνη** που αποτελούν συστατικά της πλάκας.
- Η αλληλεπίδραση του CD40 με τον υποδοχέα του (**CD40L**) ενεργοποιεί τα T λεμφοκύτταρα και τα μακροφάγα να εκφράσουν κυτταροκίνες όπως είναι η **IFN-γ**
- Τα παρόντα T λεμφοκύτταρα στις αθηρωματικές πλάκες είναι στην πλειοψηφία τους **CD3+ και CD4+**
- Στην προκειμένη περίπτωση ρόλο αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου αναλαμβάνουν τα μακροφάγα και αντιγόνα οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSPs) και η οξειδωμένη LDL.
- Το Th1 κύτταρο συνδέεται με το σύμπλεγμα αυτό και ξεκινά η ενεργοποίησή του.



## Different Types of Vulnerable Plaque



# Πίνακας Κυτταροκινών που επηρεάζουν την αθηρογένεση

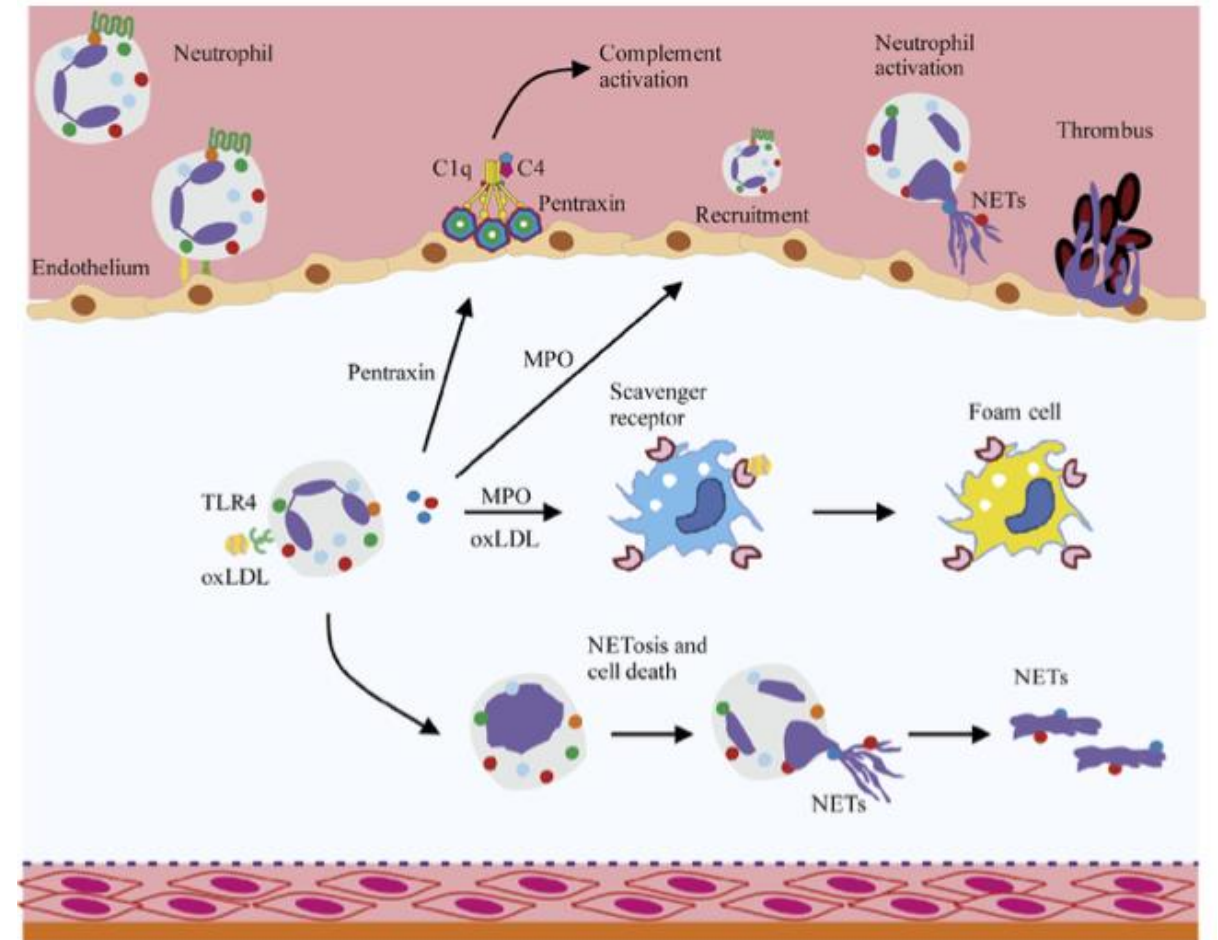
γονίδιο	κυτταροκίνη	κύτταρο παράγων	κύτταρο στόχος	αποτέλεσμα
VCAM-1	IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-4	MΦ, Th2, $\Lambda$ ΜΚ, ΕΚ	ΕΚ, $\Lambda$ ΜΚ	προσκόλληση
ICAM-1	IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$	MΦ, Th1, $\Lambda$ ΜΚ, ΕΚ	ΕΚ	προσκόλληση
CD36	IL-4	Th2 MΦ	πρόσληψη OxLDL	
SR-A	IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$	MΦ, Th1, $\Lambda$ ΜΚ	MΦ	↓πρόσληψη OxLDL
NOS2	IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$	MΦ, Th1, $\Lambda$ ΜΚ, ΕΚ	MΦ, $\Lambda$ ΜΚ, ΕΚ	↑NO
NOS2	IL-4	Th2	MΦ, ΕΚ	↓NO
COX2	FN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1	MΦ, Th1, $\Lambda$ ΜΚ, ΕΚ	MΦ, $\Lambda$ ΜΚ, ΕΚ	↑εικοσανοειδή
COX2	IL-4	Th2	MΦ, $\Lambda$ ΜΚ, ΕΚ	↓εικοσανοειδή
15-LO	IL-4, IL-13	Th2	MΦ, $\Lambda$ ΜΚ	οξείδωση
λευκοτρίενα				
IL-1, TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$	Th1	MΦ	ενεργοποίηση
IL-6	IL-1	MΦ, ΕΚ, $\Lambda$ ΜΚ	$\Lambda$ ΜΚ	B-κύτταρα & ενεργοποίηση
PTX προϊόντα				
MMPs	TNF- $\alpha$ , IL-1, CD40L	MΦ	MΦ, $\Lambda$ ΜΚ, ΕΚ	πρωτεόλυση
MMPs	IFN- $\gamma$	Th1	MΦ, $\Lambda$ ΜΚ, ΕΚ	↓πρωτεόλυση
tPA, uPA	TNF- $\alpha$ , IL-1	MΦ, ΕΚ, $\Lambda$ ΜΚ	ΕΚ	↑νωδόλυση
uPA	IFN- $\gamma$	Th1	ΕΚ	↓νωδόλυση
PAI-1, PAI-2	IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1	MΦ, Th1	ΕΚ	αντι-νωδόλυση
PPAR- $\gamma$	IL-4	Th2	MΦ	↑CD36 έκφραση
ApoA-IV	IFN- $\gamma$	Th1	ηπατοκύτταρα	↓HDL
ABCA1	IFN- $\gamma$	Th1	MΦ,	
sPLA2	IFN- $\gamma$	Th1	αφρώδη κύτταρα	↓χοληστερόλη
PAF, λυσοPC			$\Lambda$ ΜΚ	↑εικοσανοειδή
LPL	IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1	MΦ, Th1	MΦ	↓λιπόλυση

NOS: συνθετάση του οξειδίου του αζώτου; COX: κυκλοξυγενάση; LO: λιποξυγονάση; MMPs: μεταλλοπρωτεάσες εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας; tPA: ιστικός ενεργοποιητής πλασμινογόνου; PAI: αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου; PPAR: υποδο- χείς υπεροξειωμάτων ενεργοποιούμενοι από πολλαπλασιαστές; LPL: λιποπρωτεϊκή λιπάση; MΦ: μακροφάγα; ΕΚ: ενδοθηλιακά κύτταρα; PTX: πεντραξίνες; lypoPC: λυσοφω- σφατιδυλοχολίνη;  $\Lambda$ ΜΚ: λεία μυικά κύτταρα.

**Ποιος είναι ο ρόλος άλλων κυττάρων στην αθηρωμάτωση;**

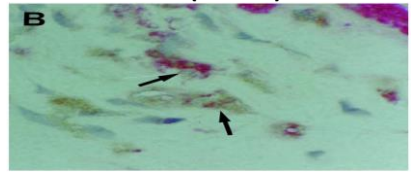
# Ουδετερόφιλα

- Ο ρόλος των ουδετεροφίλων είναι πολύ σημαντικός στην αθηρωσκλήρυνση.
- Επίσης εκκρίνουν αντιμικροβιακά μόρια όπως οι ελεύθερες ρίζες Οξυγόνου (ROS)
- Δημιουργούν παγίδες έξω από αυτά (Neutrophil Extracellular Traps ή NETs) για τον εγκλωβισμό και την καταστροφή εξωκυττάρων μικροβίων.
- Τα NETs αποτελούνται από ίνες που προεξέχουν από το ουδετερόφιλο και αποτελούνται κυρίως από Ιστόνες και DNA του πυρήνα και ίσως και των μιτοχονδρίων. Όμως αυτές δυστυχώς προδιαθέτουν για θρομβώσεις και αυτοάνοσες παθήσεις.
- Προσελκύονται από κυτταροκίνες των μακροφάγων, μαστοκυττάρων, ενδοθηλιακών κυττάρων κλπ. από το σημείο φλεγμονής. Επιπλέον εκκρίνουν και αυτά κυτοκίνες για τον πολλαπλασιασμό της άμυνας και από άλλα κύτταρα.

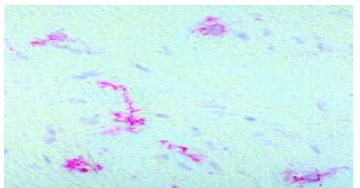


# Evidence for dendritic cell presence in human atherosclerotic plaques

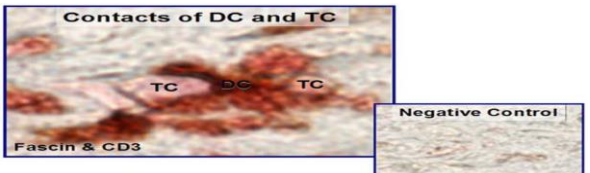
S-100+ cells (brown) and CD68+ cells (rose) underlying



S-100+ DC in Intima of healthy carotid artery



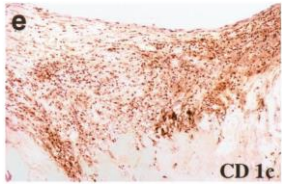
DC-T cell clusters



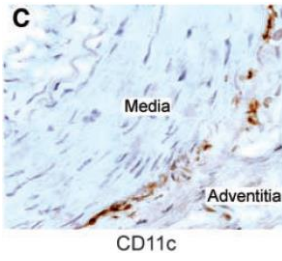
- HLA-DR<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup> S-100<sup>+</sup> DCs are present in normal human aorta, carotid arteries and in atherosclerotic plaques (Bobryshev and Lord. Cardiovasc Res 1995).
- HLA-DR<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup> S-100<sup>+</sup> DCs are primarily located in the under-plaque media and the adventitia around the vasa vasorum in the shoulder regions of human atherosclerotic lesions (Bobryshev YV, Lord RS. Cardiovasc Res 1998).
- CD1c<sup>+</sup> (BDCA1<sup>+</sup>) cells, many lipid-laden, are found in human atherosclerotic plaques. They were initially considered to be macrophages (Melian et al. Am J Pathol 1999).
- CD1a<sup>+</sup> S-100<sup>+</sup> Lag<sup>+</sup> CD31<sup>-</sup> SMA<sup>-</sup> CD83<sup>-</sup> CD86<sup>-</sup> (immature) DCs accumulated in the arterial intima of healthy young individuals (Millonig et al. ATVB 2001).
- CD11c<sup>+</sup> S-100<sup>+</sup> fascin<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> DCs are present at the adventitia–media border in normal human arteries (Ma-Krupa et al. JEM 2004).
- HLA-DR<sup>+</sup> CD (Mature CD83<sup>+</sup>) DCs were observed in rupture-prone plaque regions in human carotid arteries. Also, there was increased heterogeneity of the DC population with plaque progression (Yilmaz et al. Atherosclerosis 2004).
- DCs and T cells are often seen in clusters in the shoulder and rupture prone regions of the plaque (Yilmaz et al., 2004; Bobryshev, 2005; Erbel et al., 2007).

Interestingly, alterations in circulating cDC and/or pDC numbers is also linked to the severity of atherosclerosis (e.g. angina, AMI) (Yilmaz et al. JACC 2006; Van Vre et al. Coron Artery Dis 2006; Shi et al. Am J Cardiol 2007)

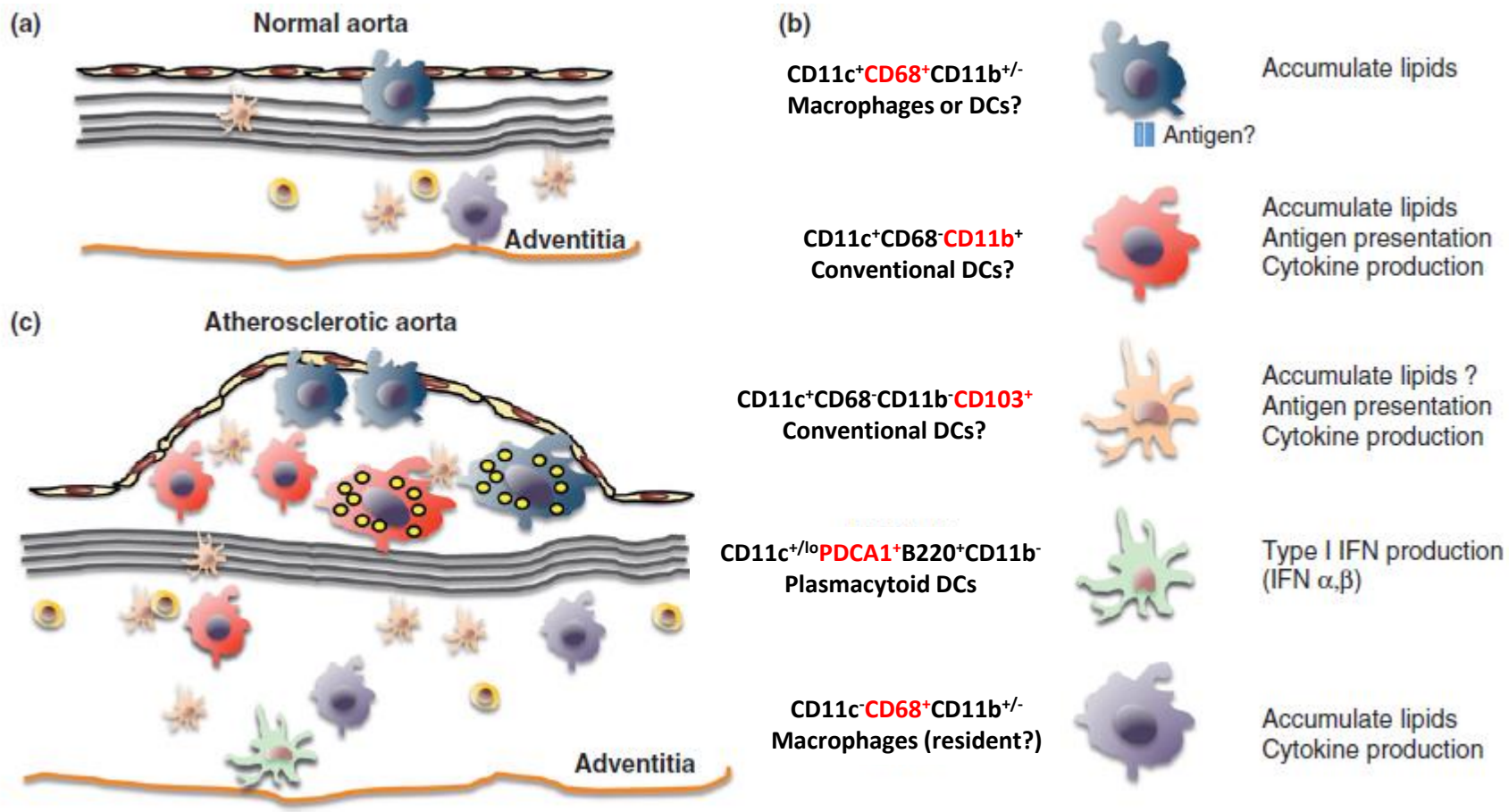
Lipid-laden CD1c+ (BDCA1+) DC in plaques



Lipid-laden CD11c+ S-100+ DC in plaques



# Macrophage and DC heterogeneity in mouse atherosclerotic plaques

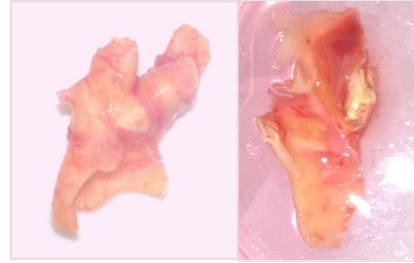


Modified from Koltsova and Ley. *Trends Immunol* 2011



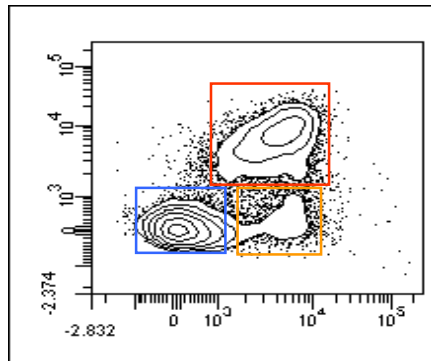
# Defining the immune cell landscape of human atherosclerotic plaques Characterizing plaque endophenotypes

## Carotid endarterectomy

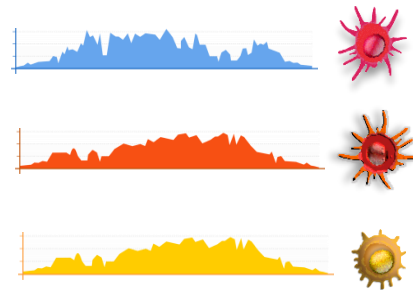


Enzymatic digestion within 1hr

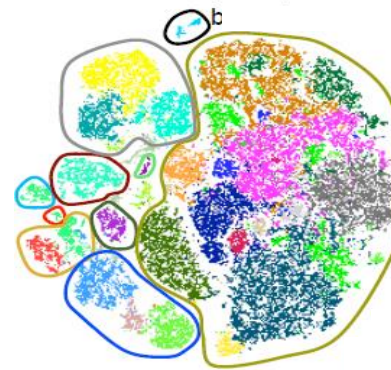
### 1. Flow cytometry of DC and MΦ subsets 8-colour staining



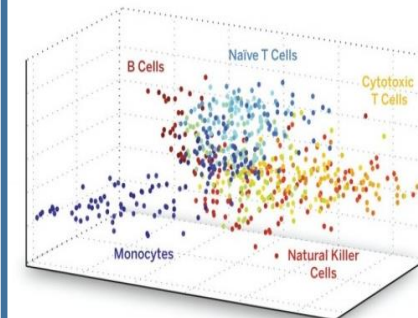
### 2. Sorting of DC/MΦ subsets for RNAseq analysis 4-way sorting



### 3. Mass Cytometry (CyTOF) analysis of single cell suspensions Panel of 40 markers

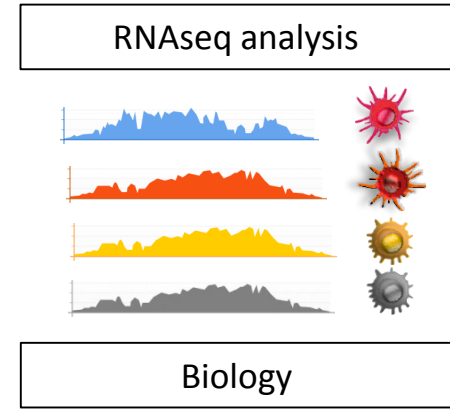
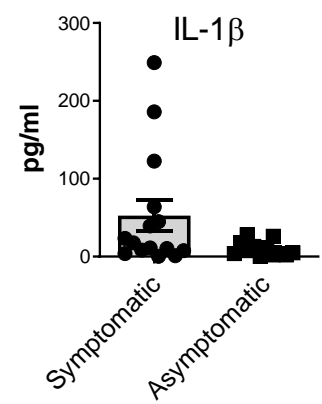
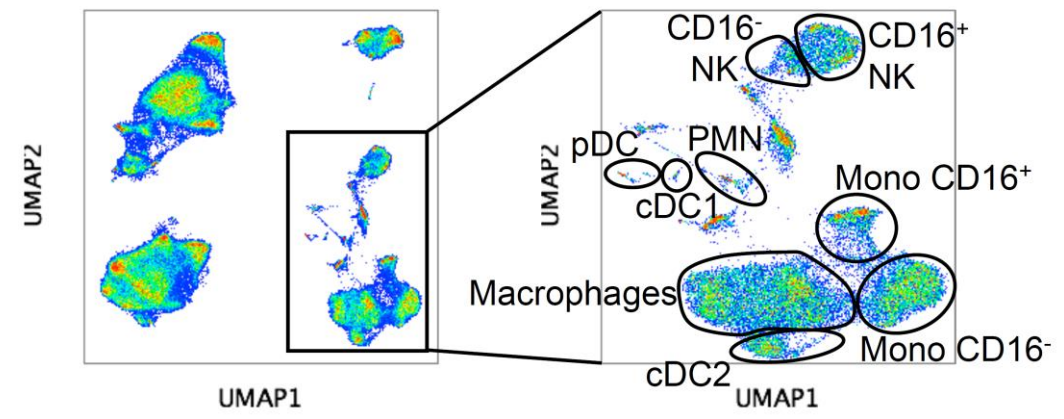
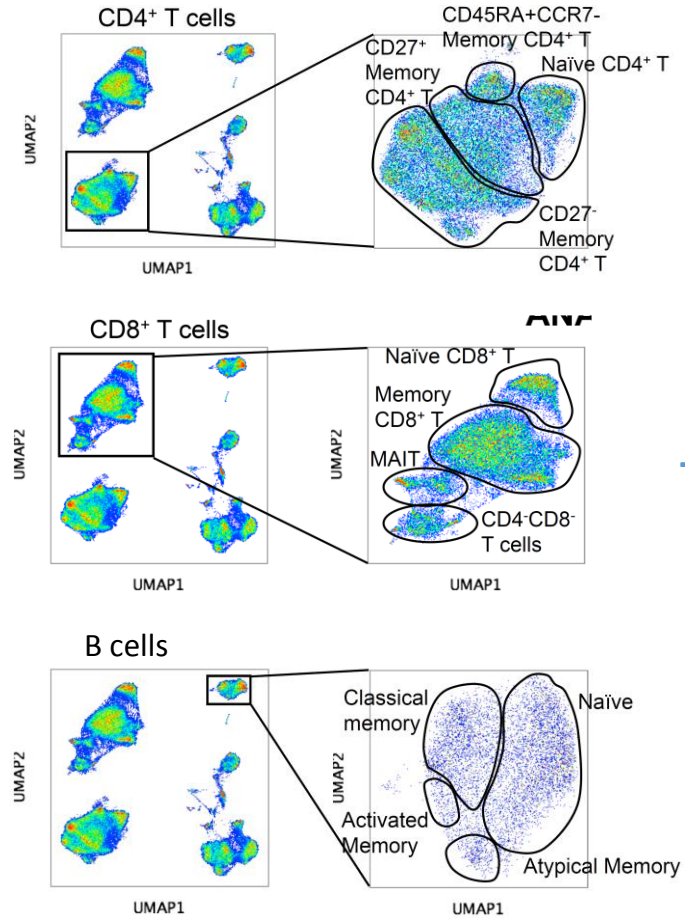


### 4. Single cell and whole plaque RNAseq analysis CD45+ sorted cells



CytoSeq: Single-Cell Gene Expression Profile

# Unravelling the immune cell landscape and gene expression profile of human atherosclerotic carotid plaques: Sorting and RNAseq



# Ετερογένεια των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος

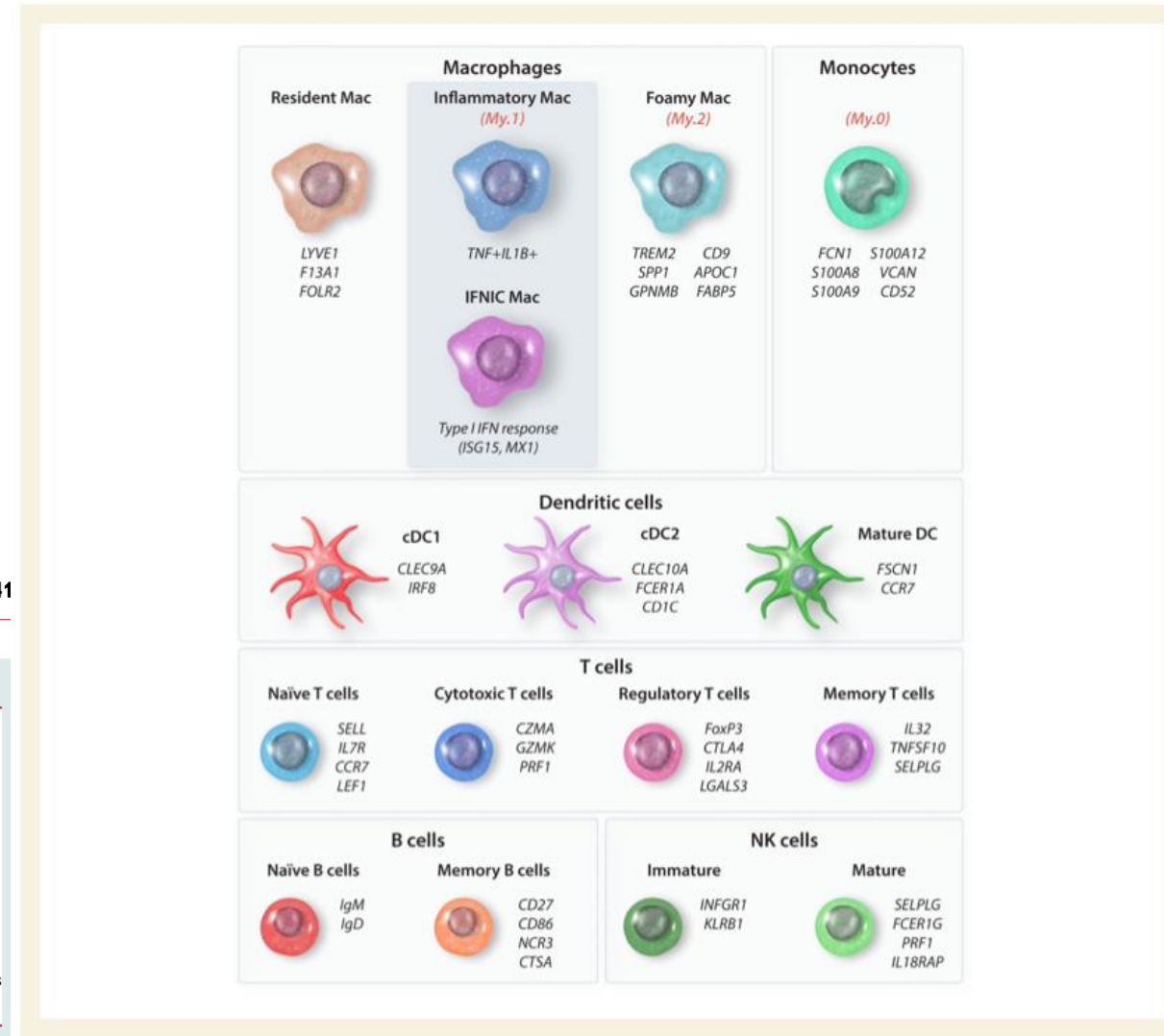
Heterogeneity of immune cells in human atherosclerosis revealed by scRNA-Seq

2541

**Table 2** Immune cell subsets detected by human scRNA-Seq

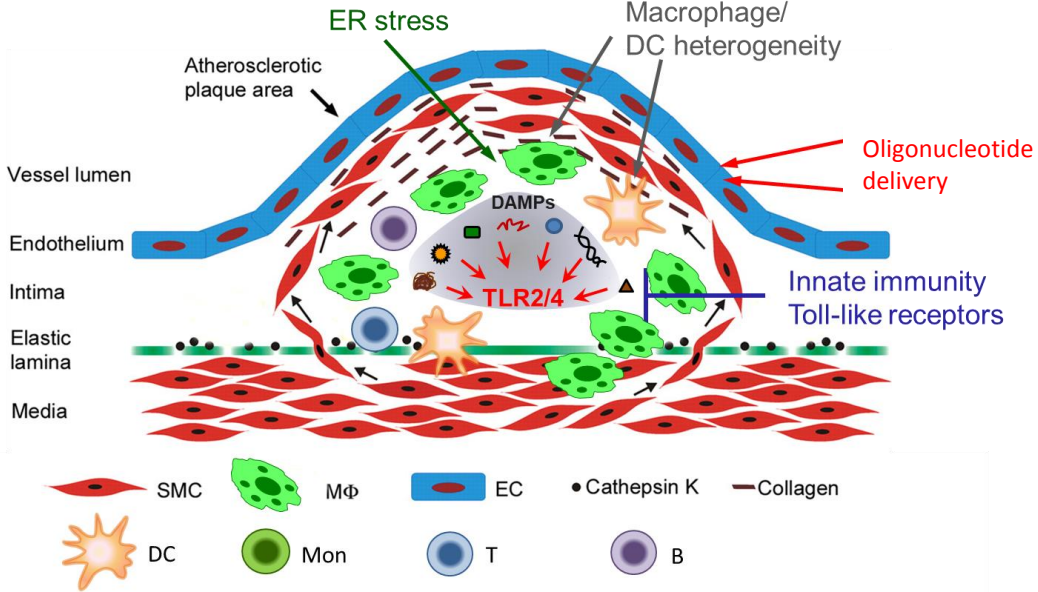
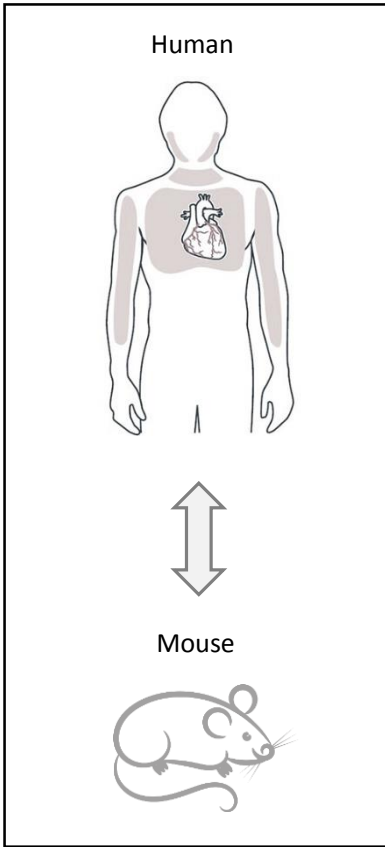
Immune subsets → Study ↓	T cells	B/plasma	NK cells	Macrophages	Monocytes	Other
Fernandez <sup>17</sup> Endarterectomy	16	2	1	5	0	2 DC 1 NKT
Fernandez <sup>17</sup> PBMCs	16	1	1	0	1	NA
Wirka <sup>18</sup> Coronary	1	3	1	1	0	1 mast
Depuydt <sup>19</sup> Endarterectomy	8	1	0	5	0	1 mast 1 DC
Vallejo <sup>20</sup> PBMCs	30	6	6	0	16	DC, γδ T cells

DC, dendritic cell; NA, not available.

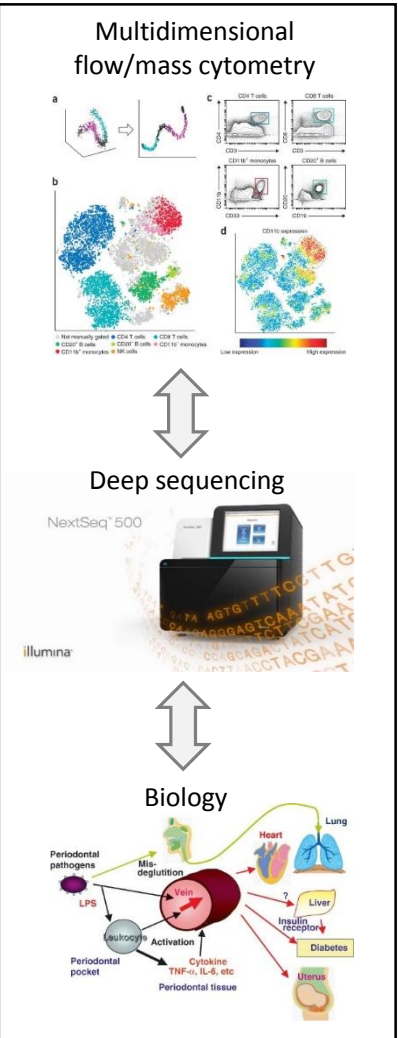


Key marker genes for major immune cell subsets in human atherosclerotic arteries.

# Φλεγμονή και αθηροσκλήρυνση

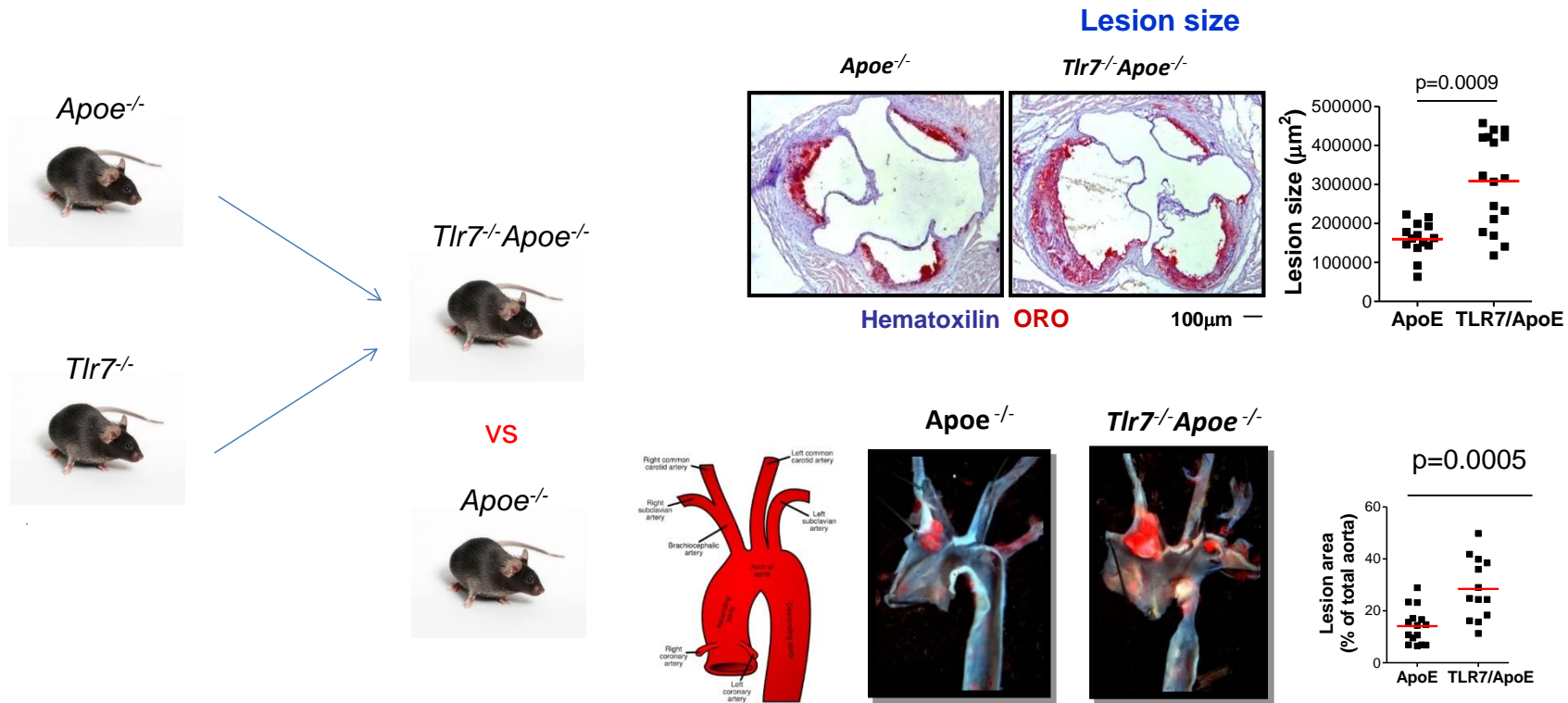


- Immune cell landscape of atherosclerotic plaques
- Mechanisms leading to symptomatic plaques
- Identification of high risk patients
- Personalized medicine



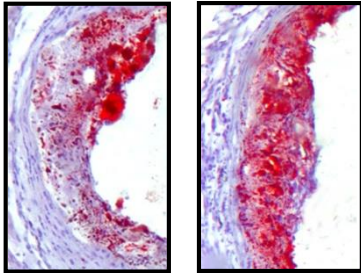
# Toll-Like Receptor 7 Protects From Atherosclerosis by Constraining “Inflammatory” Macrophage Activation

Maria Salagianni, PhD; Ioanna E. Galani, PhD; Anna M. Lundberg, PhD; Constantinos H. Davos, MD, PhD; Aimilia Varela, BSc; Ariana Gavriil, PhD; Leo-Pekka Lyytikäinen, MD; Terho Lehtimäki, MD, PhD; Fragiska Sigala, MD; Lasse Folkersen, PhD; Vassilis Gorgoulis, MD, PhD; Sébastien Lenglet, PhD; Fabrizio Montecucco, MD, PhD; François Mach, MD, PhD; Ulf Hedin, MD, PhD; Göran K. Hansson, MD, PhD; Claudia Monaco, MD, PhD; Evangelos Andreakos, PhD

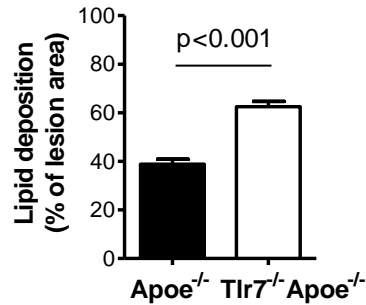


# Tlr7<sup>-/-</sup>Apoe<sup>-/-</sup> mice exhibit characteristics of a more 'vulnerable' plaque phenotype

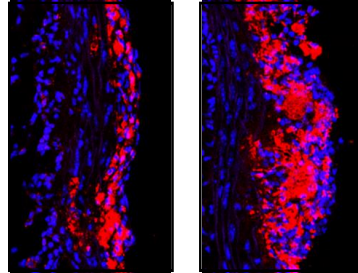
Lipid deposition (ORO)



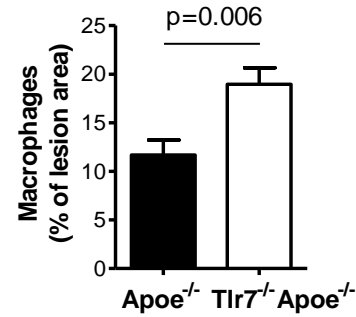
Apoe<sup>-/-</sup>Tlr7<sup>-/-</sup>Apoe<sup>-/-</sup>



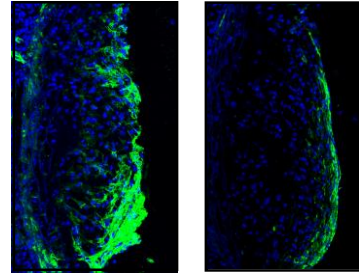
Macrophage presence (CD68+)



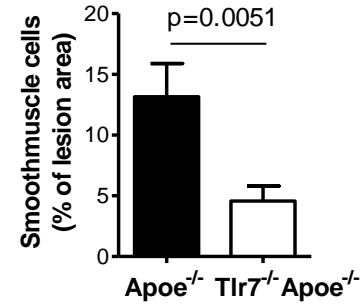
Apoe<sup>-/-</sup>Tlr7<sup>-/-</sup>Apoe<sup>-/-</sup>



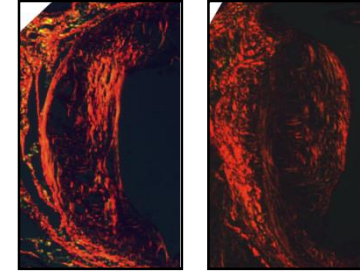
SMC presence and Fibrous cap formation ( $\alpha$ SMA+)



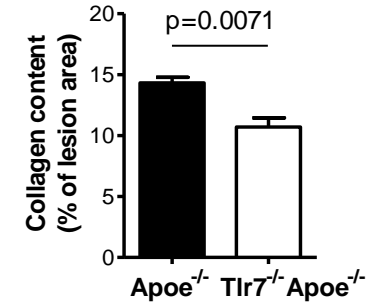
Apoe<sup>-/-</sup>Tlr7<sup>-/-</sup>Apoe<sup>-/-</sup>



Collagen deposition (Sirius red)



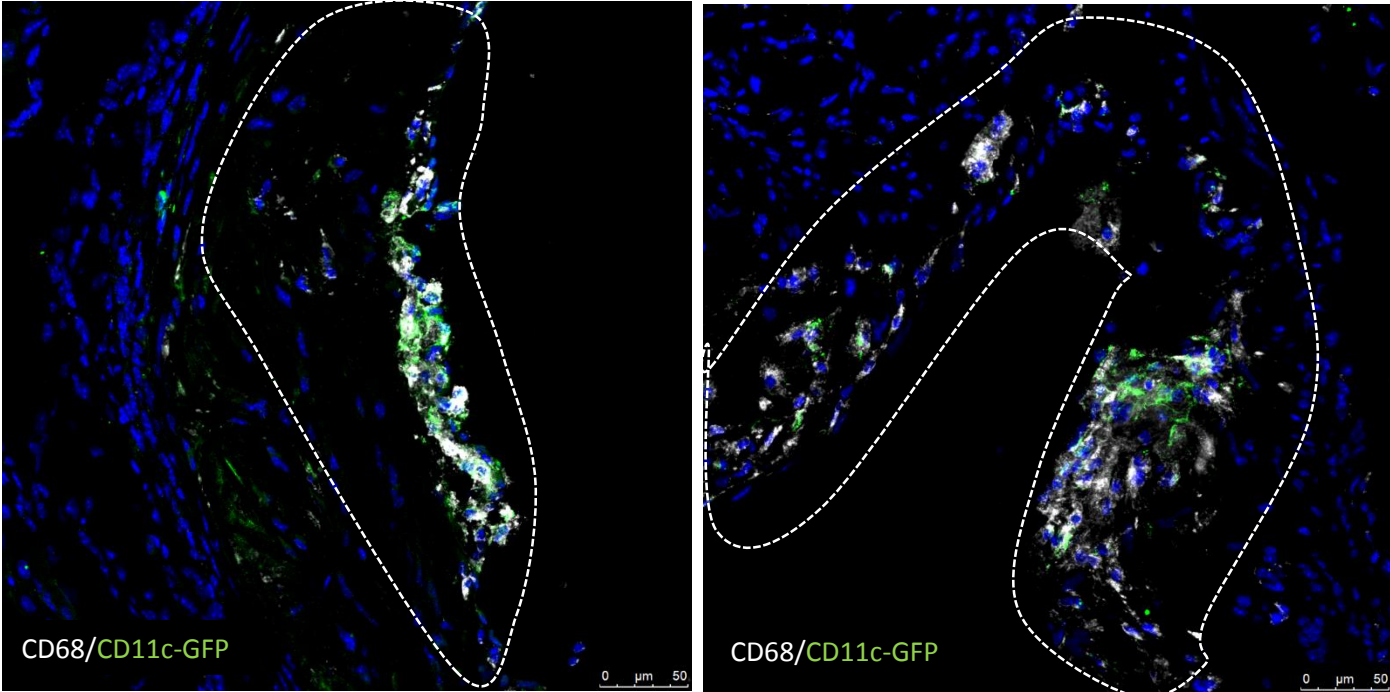
Apoe<sup>-/-</sup>Tlr7<sup>-/-</sup>Apoe<sup>-/-</sup>





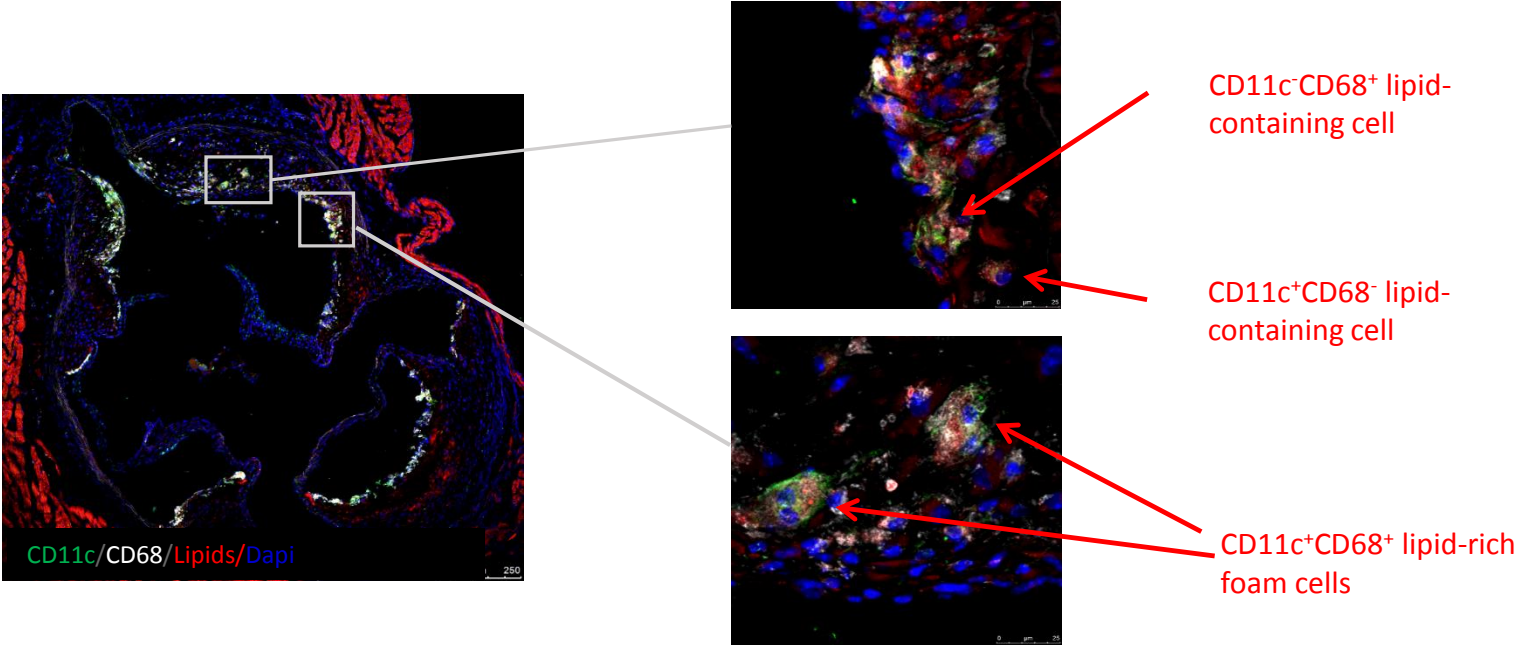
# Έκφραση του CD68 και του CD11c σε αθηρωματικές πλάκες μυών

Aortic valve





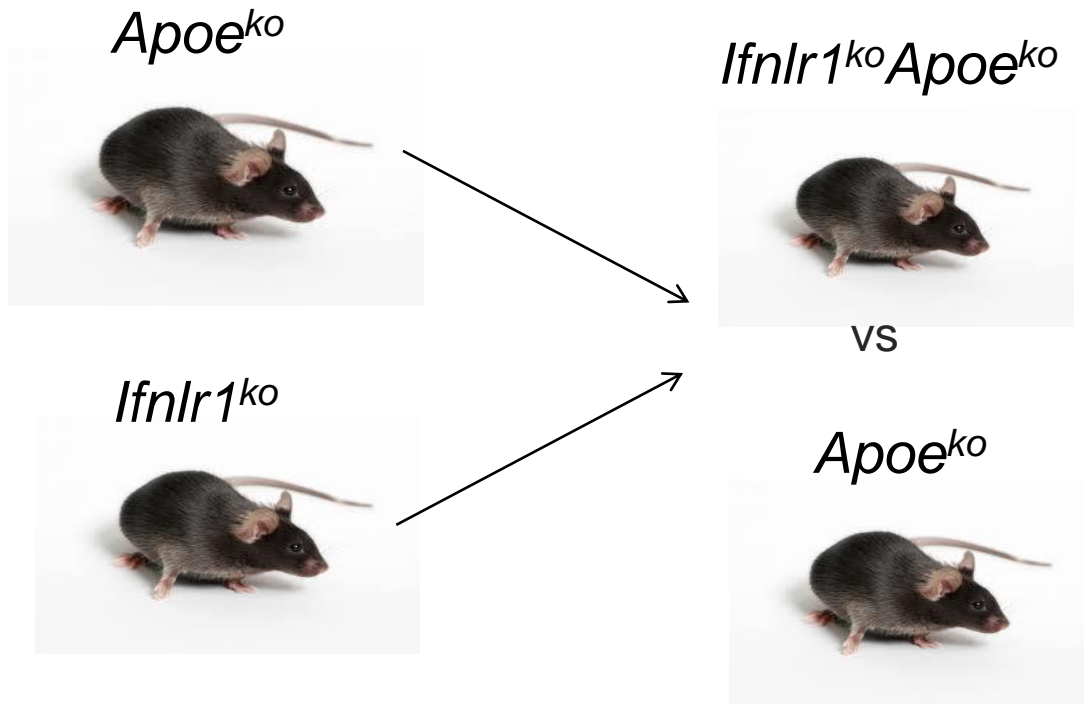
# Uptake of lipid from CD11c+ and CD68+ cells in mouse plaques



## QUESTION:

Is IFN $\lambda$  involved in the development or progression of atherosclerosis?

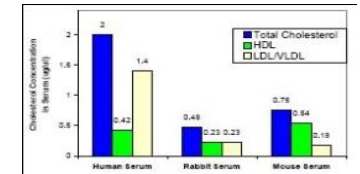
# Experimental Mouse Model



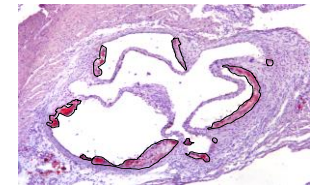
Normal chow diet: 53.5% carbohydrates 18.5% protein 5.5% fat

Salagianni et al. 2012; Circulation

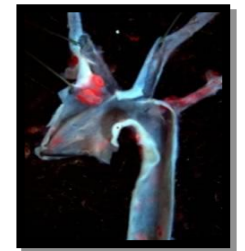
Biochemical analysis



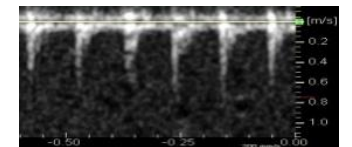
Histological analysis



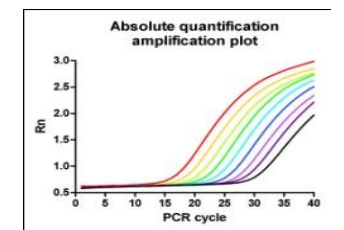
'En face' staining



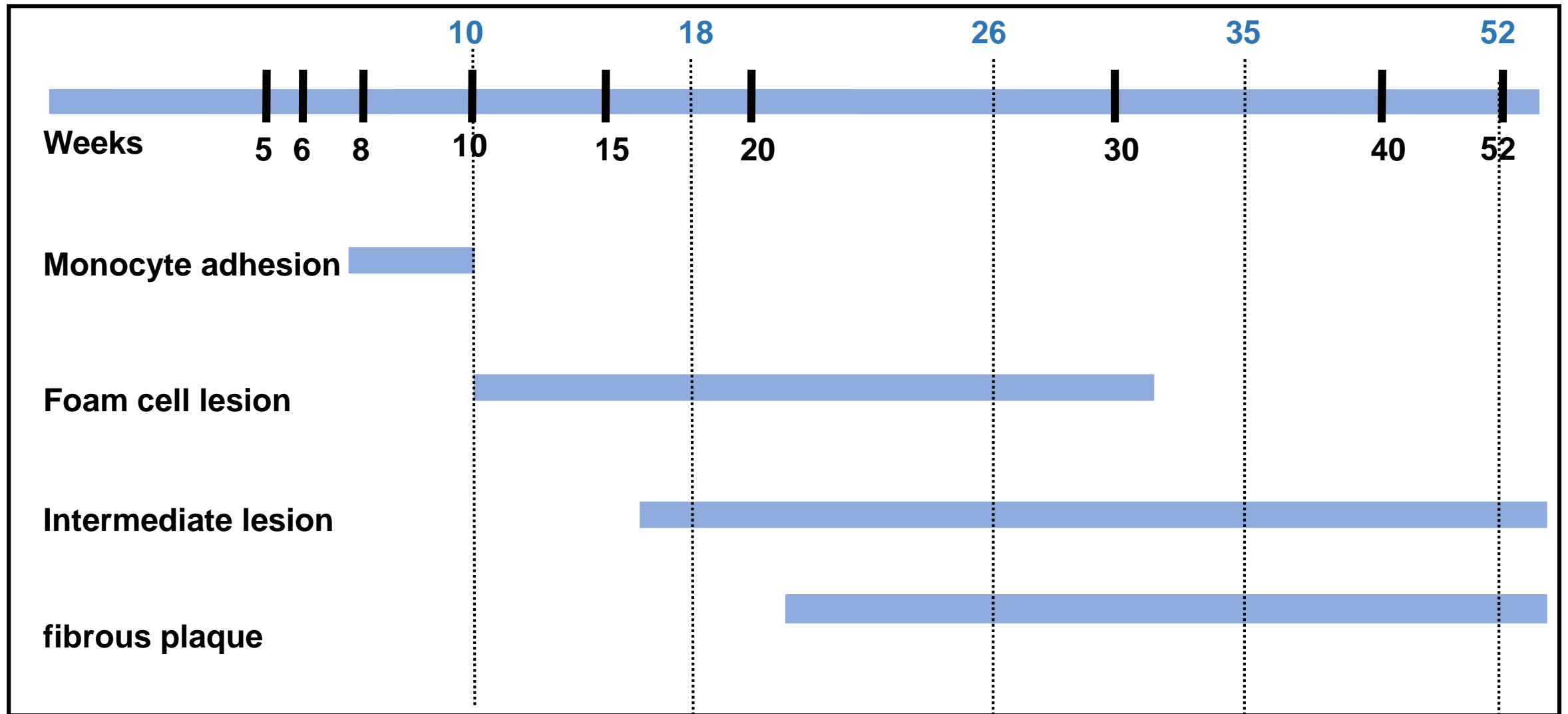
Doppler ultrasound



Molecular analysis

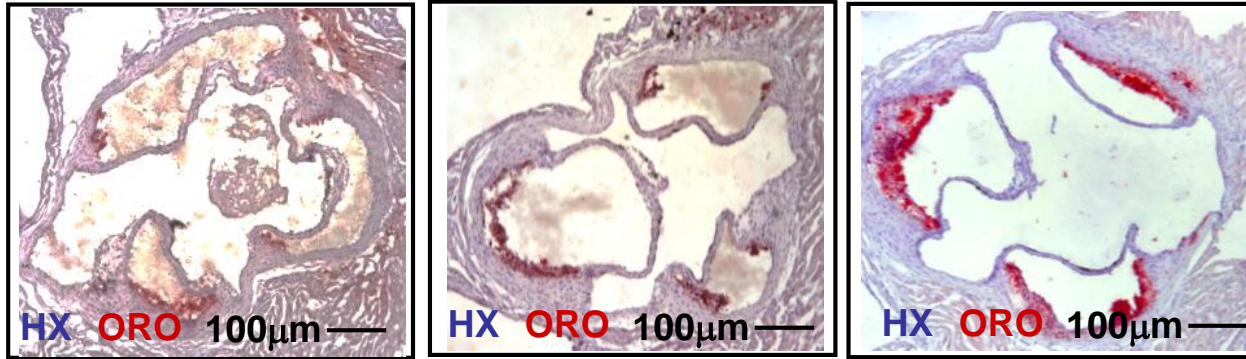


# Lesion Formation in Chow Fed *Apoe<sup>ko</sup>* mice

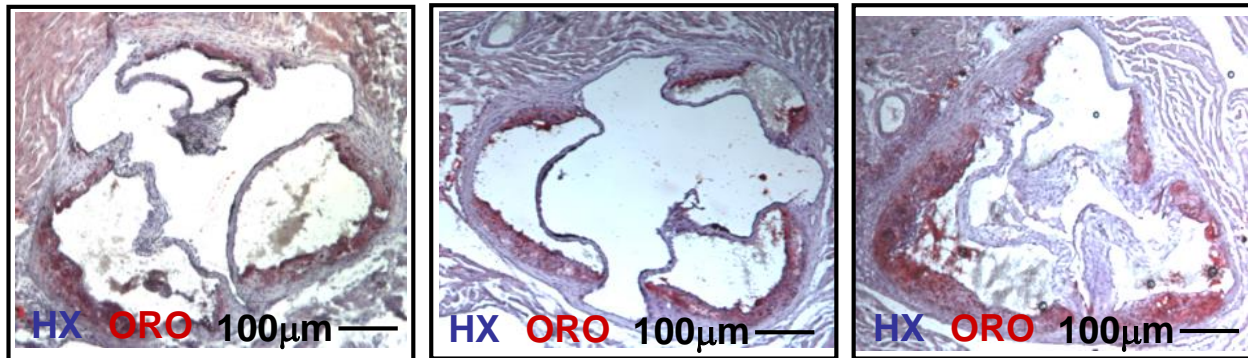


# *Ifnlr1*<sup>ko</sup>*Apoe*<sup>ko</sup> mice exhibit enhanced atherosclerotic lesions at the level of the aortic valve

*Apoe*<sup>ko</sup>



*Ifnlr1*<sup>ko</sup>*Apoe*<sup>ko</sup>

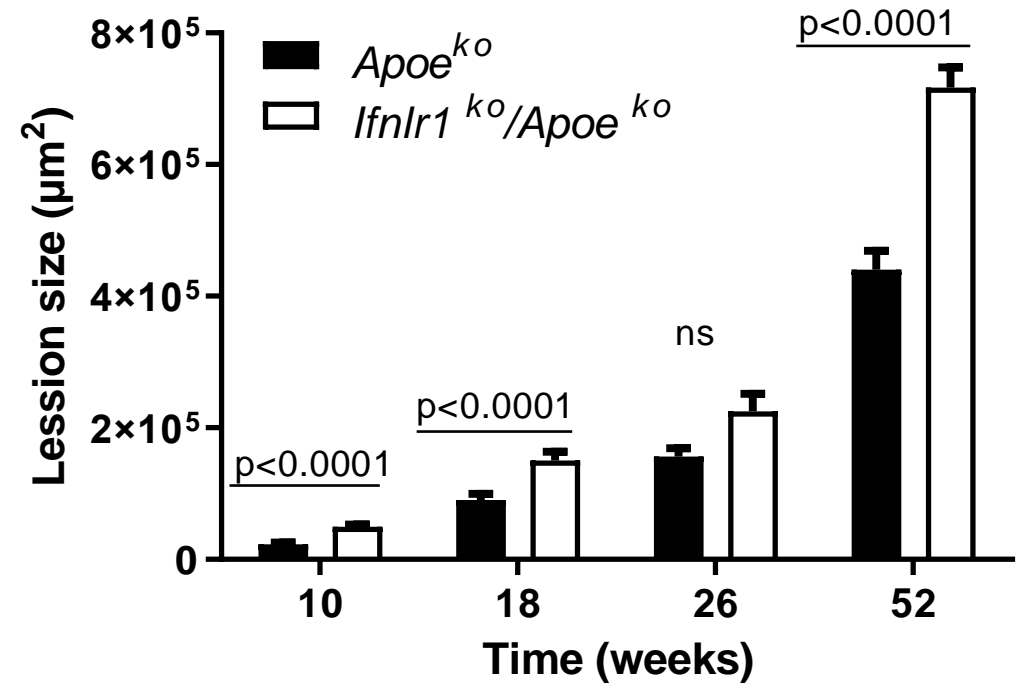


10-week

18-week

26-week

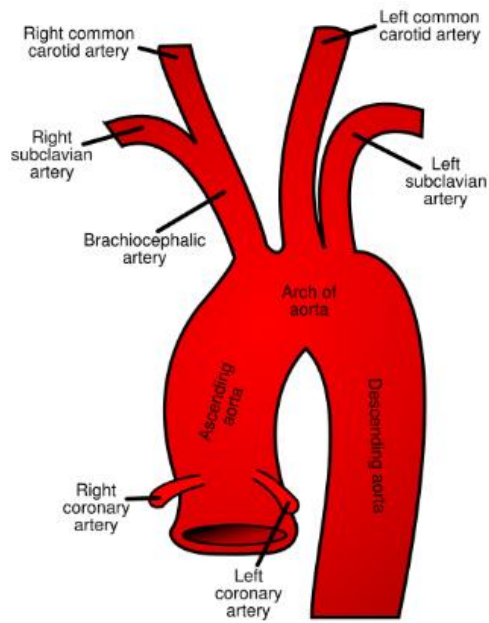
Lesion size



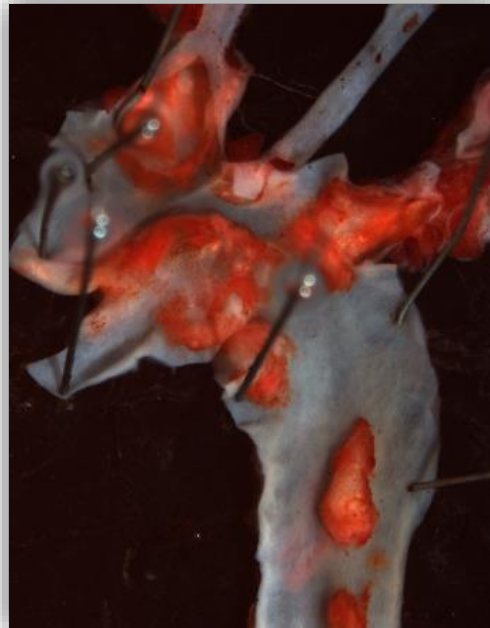
Unpublished data

# *Ifnlr1*<sup>ko</sup>*Apoe*<sup>ko</sup> mice have severe atherosclerosis in the aortic arch

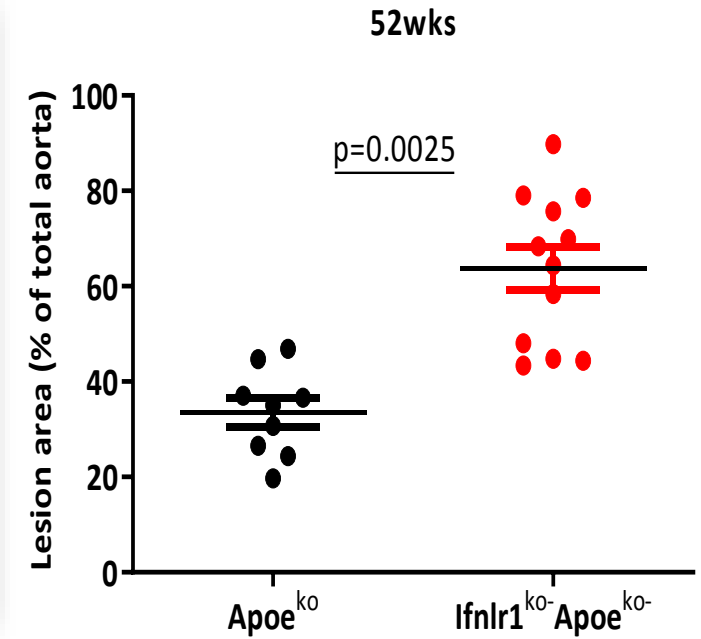
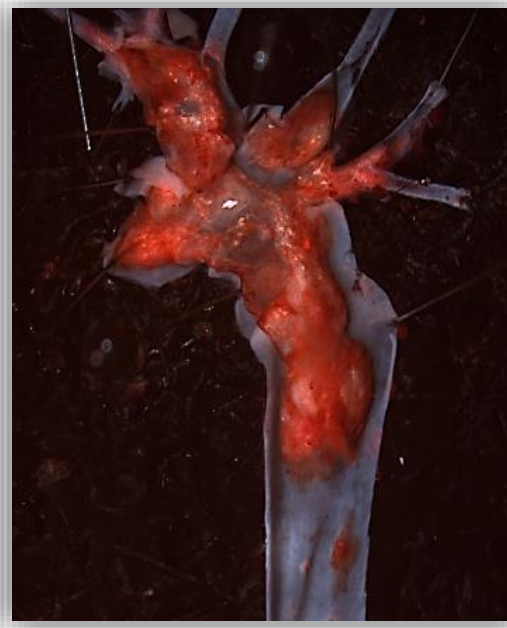
## Macroscopic evaluation ('En face' staining)



*Apoe*<sup>ko</sup>

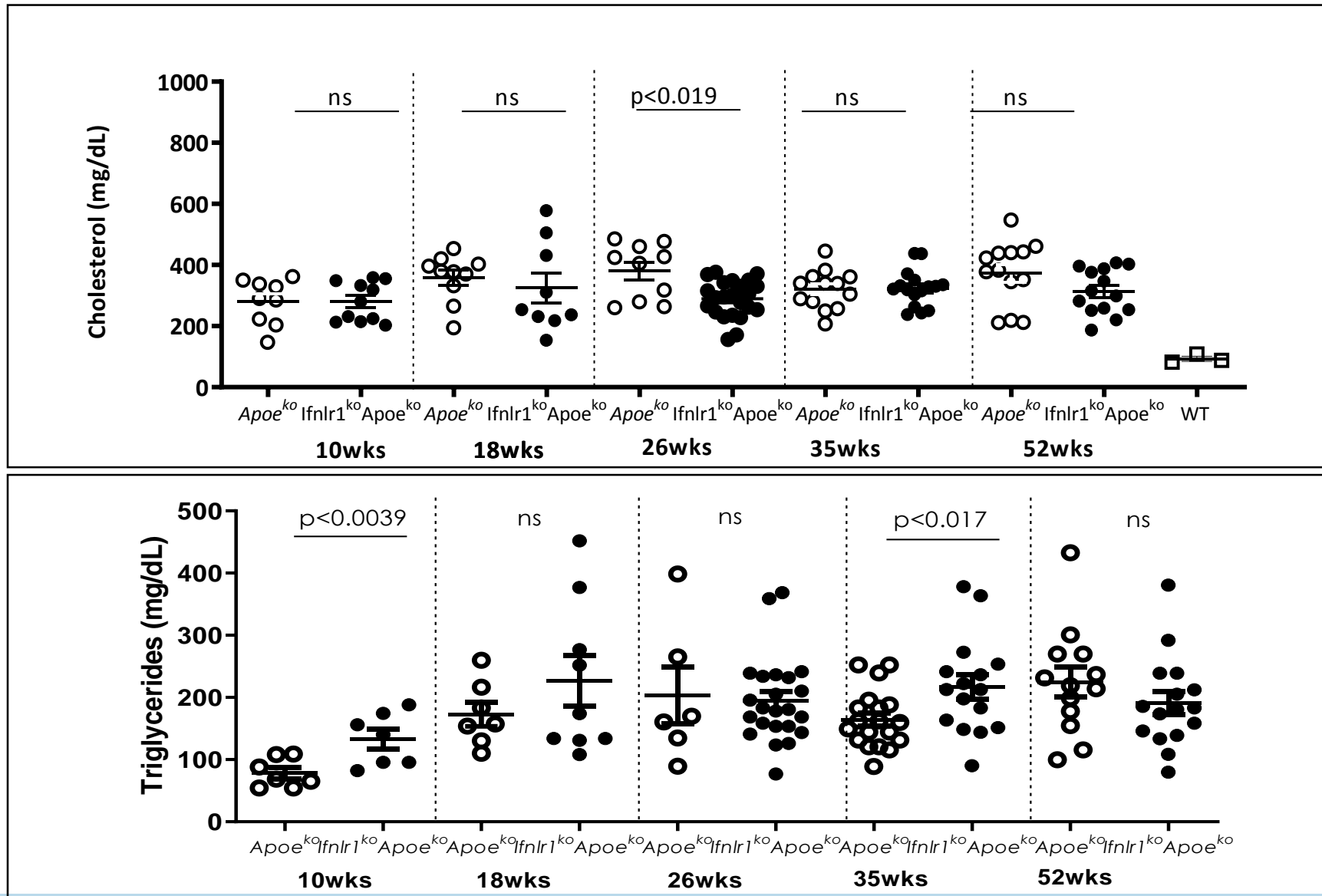


*Apoe*<sup>ko</sup> *Ifnlr1*<sup>ko</sup>



Unpublished data

# Cholesterol and Triglyceride levels had no apparent changes

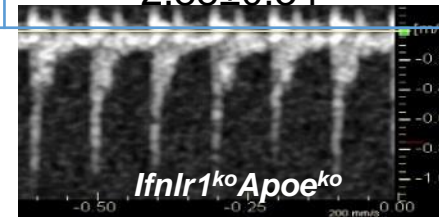
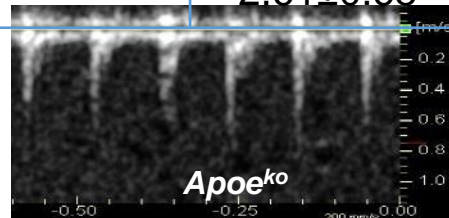
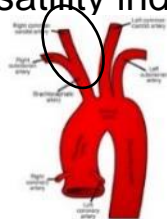


Unpublished data

# Increased atherosclerosis in carotid arteries in *Ifnlr1<sup>ko</sup>Apoe<sup>ko</sup>* mice

## DOPPLER ULTRASOUND

	<i>Apoe<sup>ko</sup></i>	<i>Ifnlr1<sup>-/-</sup>Apoe<sup>ko</sup></i>	P value
n	15	12	
Heart Rate (beats/min)	607±38	619±43	0.4401
EDD (mm)	3.20±0.31	3.29±0.24	0.4162
ESD (mm)	1.89±0.26	1.75±0.17	0.1263
FS (%)	41.17±4.17	46.90±2.30	0.0003
PWT (mm)	0.70±0.07	0.76±0.03	0.0117
r/h	2.30±0.34	2.18±0.18	0.2602
Peak aortic velocity (cm/s)	96.86±13.56	102.56±15.85	0.3329
Mean aortic velocity (cm/s)	54.05±13.94	56.83±8.75	0.5558
Peak aortic acceleration (m/s <sup>2</sup> )	119.51±8.09	114.36±9.33	0.1448
Peak carotid velocity (cm/s)	69.00±9.06	75.45±6.23	0.0535
Mean carotid velocity (cm/s)	30.60±7.19	32.91±4.69	0.3625
Carotid pulsatility index	2.61±0.68	2.88±0.34	0.2469



Peak carotid velocity (cm/s)

Unpublished data



**Σας ευχαριστώ!**