

Φλεγμονές και Βιοϋλικά

5

- Η εμφύτευση μιας συσκευής προκαλεί αντιδράσεις.
- Οι αντιδράσεις αυτές είναι εξέλιξη αντιδράσεων του οργανισμού σε απλά τραύματα και μικρόβια (όχι σε συσκευές ή τεχνητές επιφάνειες).
- Κάθε συσκευή που έχει εμφυτευθεί προκαλεί σίγουρα κάποια φλεγμονή (ακόμα και «αδρανή» υλικά).
- Η έκταση της φλεγμονής είναι ένας σημαντικός παράγοντας στην αξιολόγηση των επιδόσεων της συσκευής.
- Ένα σημαντικό θέμα σε σχέση με τα εμφυτευόμενα υλικά είναι αν ο οργανισμός τα «ανέχεται» σε τέτοιο βαθμό ώστε να επιτελέσουν τη λειτουργία τους χωρίς να προκαλούν ανεπιθύμητες ενέργειες.
- Η ιδιότητα αυτή διαφέρει από συσκευή σε συσκευή.
- Το όριο της ανεκτικότητας για μια τεχνητή βαλβίδα καρδιάς, ένα τεχνητό ισχίο και ένα χρόνια μικρο-ηλεκτρόδιο είναι διαφορετικό.

Τι είναι η φλεγμονή;

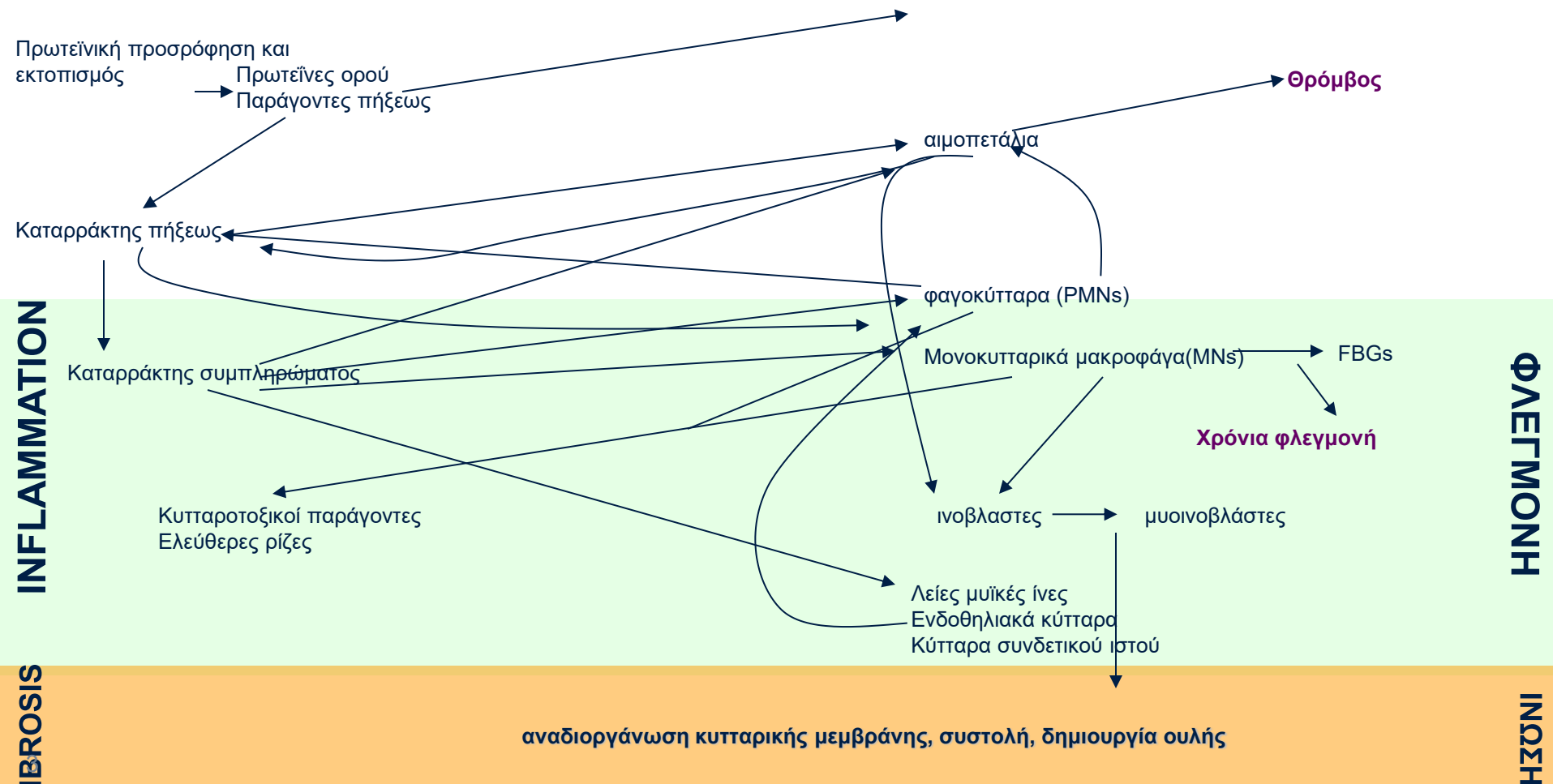
**ΕΙΣΑΓΩΓΗ
ΥΛΙΚΟΥ**

Διεισδυτικό τραύμα

αδυνάτισμα ιστού, αιμορραγία

Μη - κυτταρικά

Κυτταρικά γεγονότα





Έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα

- Το συμπλήρωμα και τα λευκοκύτταρα είναι μέρος του ανοσοποιητικού συστήματος.
- Φυλογενετικά αρχαίο ανοσοποιητικό σύστημα.
- Σχεδιασμένο κυρίως να εξολοθρεύει βακτηριακούς εισβολείς
- Όπως και η πήξη του αίματος, το συμπλήρωμα είναι ένας καταρράκτης προενζύμων, σερινικών πρωτεασών με τοπικές δράσεις όταν ενεργοποιείται.
- Τα λευκά αιμοσφαίρια παίρνουν μέρος στη φαγοκυττάρωση σωματιδίων που έχουν ανοσοποιηθεί (αντισώματα ή σωματίδια ενωμένα με αντισώματα).

Table 12-3. Components of Innate Immunity

Components	Principal functions
Barriers	
Epithelial layers	Prevent microbial entry
Defensins	Microbial killing
Intraepithelial lymphocytes	Microbial killing
Circulating effector cells	
Neutrophils	Early phagocytosis and killing of microbes
Macrophages	Efficient phagocytosis and killing of microbes, secretion of cytokines that stimulate inflammation
NK cells	Lysis of infected cells, activation of macrophages
Circulating effector proteins	
Complement	Killing of microbes, opsonization of microbes, activation of leukocytes
Mannose-binding lectin (collectin)	Opsonization of microbes, activation of complement (lectin pathway)
C-reactive protein (pentraxin)	Opsonization of microbes, activation of complement
Coagulation factors	Walling off infected tissues
Cytokines	
TNF, IL-1, chemokines	Inflammation
IFN- α , - β	Resistance to viral infection
IFN- γ	Macrophage activation
IL-12	IFN- γ production by NK cells and T cells
IL-15	Proliferation of NK cells
IL-10, TGF- β	Control of inflammation

Η **φλεγμονή** είναι μια περίπλοκη αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος που περιλαμβάνει αγγειοποιημένο ιστό.

Τι συμβαίνει πραγματικά:

1. Αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα
2. Διείσδυση πρωτεϊνών πλάσματος και λευκών αιμοσφαιρίων
3. Αντισωματοποίηση και φαγοκυττάρωση ξένων υλικών

Συμπτώματα:

1. Πρήξιμο, οίδημα
2. Αύξηση θερμοκρασίας
3. Πόνος

Η φλεγμονή επέρχεται όταν εμφυτεύεται ένα βιοϋλικό.

Μη ολοκληρωμένη απάντηση ή κακή ρύθμιση στην απόκριση για το τραύμα μπορεί να οδηγήσει σε τραυματισμό του ιστού και αστοχία της συσκευής

Τραύμα, εμφύτευση συσκευής



Πρωτεϊνική προσρόφηση, προσκόλληση αιμοπεταλίων και αποκοκκοποίηση, καταρράκτης θρόμβου



Απόθεση και ενεργοποίηση του συμπληρώματος, αύξηση αγγειακής διαπερατότητας, φαγοκύτταρα



Λύση σωματιδίων που ενεργοποιούνται από το συμπλήρωμα και ενεργοποίηση φαγοκυττάρωσης, προσάρτηση φαγοκυττάρων



Ενεργοποίηση ινοβλαστών, αγγειογέννεση, απελευθέρωση κυτοκινών



Φλεγμονή ή χρόνια φλεγμονή, φαγοκύτωση, δημιουργία σωματικών γιγαντιαίων κυττάρων



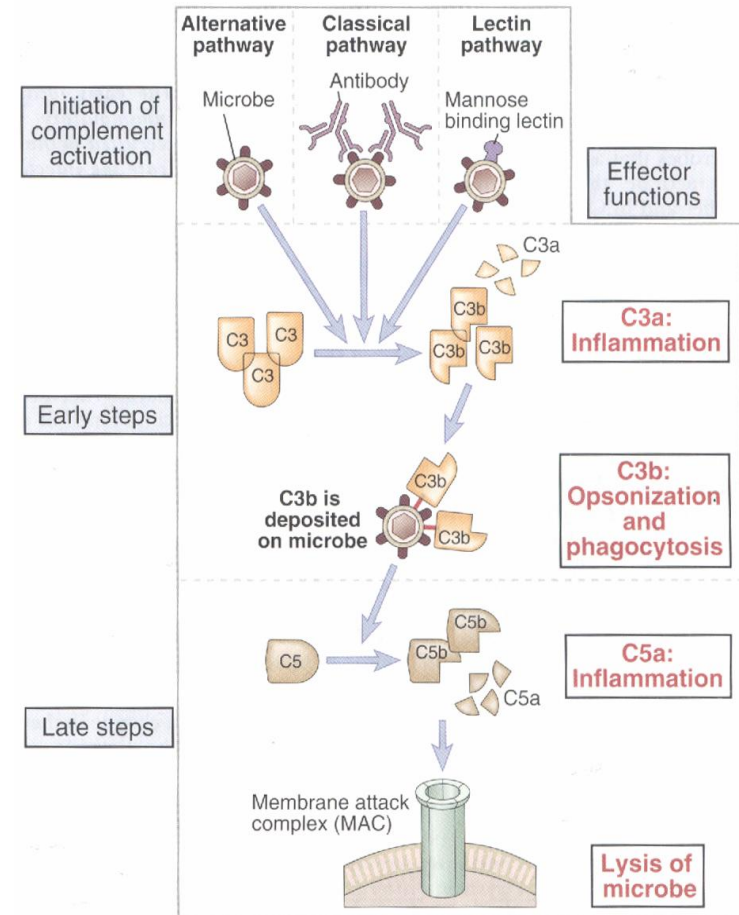
Ίνωση, ισχυρή επανατοποθέτηση και συστολή κυτταρικής μεμβράνης

Συμπλήρωμα:

- λύση βακτηρίων μέσω ορού
- θέρμανση στους 56 °C ή περισσότερο κάνει τον ορό να χάνει τις λυτικές του ιδιότητες
- τα αντισώματα του ορού είναι ακόμη λειτουργικά (μπορούν να συγκολλήσουν)
- ο ορός λοιπόν περιέχει ένα στοιχείο που ενισχύει τη λυτική ικανότητα των αντισωμάτων
- ξέρουμε σήμερα ότι αποτελείται από 12 πρωτεΐνες πλάσματος οι περισσότερες από τις οποίες είναι συνένζυμα

Γενικά χαρακτηριστικά:

- **ΕΝΙΣΧΥΣΗ:** ένα σύστημα πολλών συστατικών που περιλαμβάνει διαδοχική πρωτεόλυση πρωτεϊνών για να δημιουργηθεί μια πρωτεάση (καταρράκτης συνενζύμων)
- **ΣΤΕΡΕΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ:** πολυπρωτεϊνικό σύμπλεγμα που παραμένει προσδεμένο στο στόχο, και αυξάνει την τοπική συγκέντρωση των πρωτεϊνών
- **ΔΙΑΛΥΤΑ ΣΗΜΑΤΑ:** σπασμένα κομμάτια επιδρούν σαν μόρια σηματοδότες τα οποία ενισχύουν και ρυθμίζουν τη φλεγμονή
- **ΠΟΛΛΑΠΛΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ:** τα κύτταρα ξενιστές περιέχουν αρκετούς αναστολείς, ενώ οι αναστολείς είναι επίσης παρόντες στον ορό της κυκλοφορίας



Ανεπάρκεια συμπληρώματος



Επανεμφάνιση βακτηριακών μολύνσεων

Γενικότερα στις μέρες μας το υπερ-ενεργό συμπλήρωμα φαίνεται ότι έχει χειρότερες συνέπειες από το μη ενεργό

Εσφαλμένη λειτουργία, υπερ – ενεργοποίηση, έλλειψη ρυθμιστών συμπληρώματος



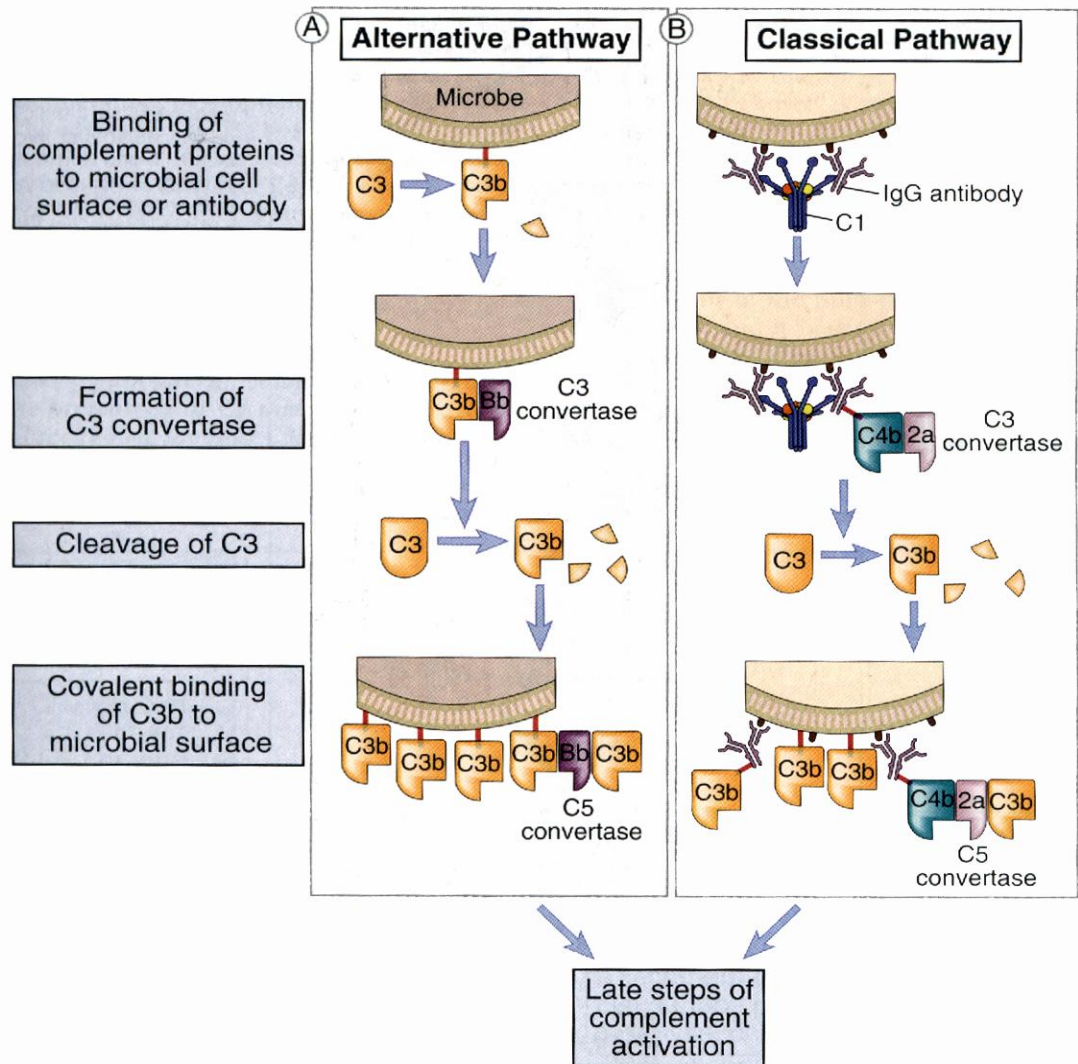
Inflammatory disorders associated with complement activation

Severe trauma, burn, sepsis
Systemic inflammatory reaction syndrome (SIRS)
Adult respiratory distress syndrome (ARDS),
multiple organ dysfunction syndrome
Ischemia reperfusion injury
Angioedema, capillary leak syndrome
Hyperacute graft rejection

Vasculitis, nephritis
Autoimmune disorders: systemic lupus erythematosus,
rheumatoid arthritis, multiple sclerosis
Alzheimer's disease

Reaction to dialysis, cardiopulmonary bypass

- Το κύριο στοιχείο και των δύο μονοπατιών είναι η πρωτεόλυση του C3, που είναι και η πρωτεΐνη που απαντάται στο συμπλήρωμα περισσότερο.
- Εναλλακτική:
 - πολύ παλιά φυλογενετικά,
 - η C3 διασπάται για να σχηματίσει C3a και C3b,
 - η C3b συνάπτεται στην «επιφάνεια»,
 - η C3a απελευθερώνεται σαν μικρό διαλυτό μόριο σηματοδότησης.



Στοιχεία του εναλλακτικού μονοπατιού είναι σε πλεόνασμα στον ορό του αίματος



Στο σημείο του τραύματος, οι πλεονάζουσες πρωτεΐνες του συμπληρώματος γίνονται άμεσα διαθέσιμες.

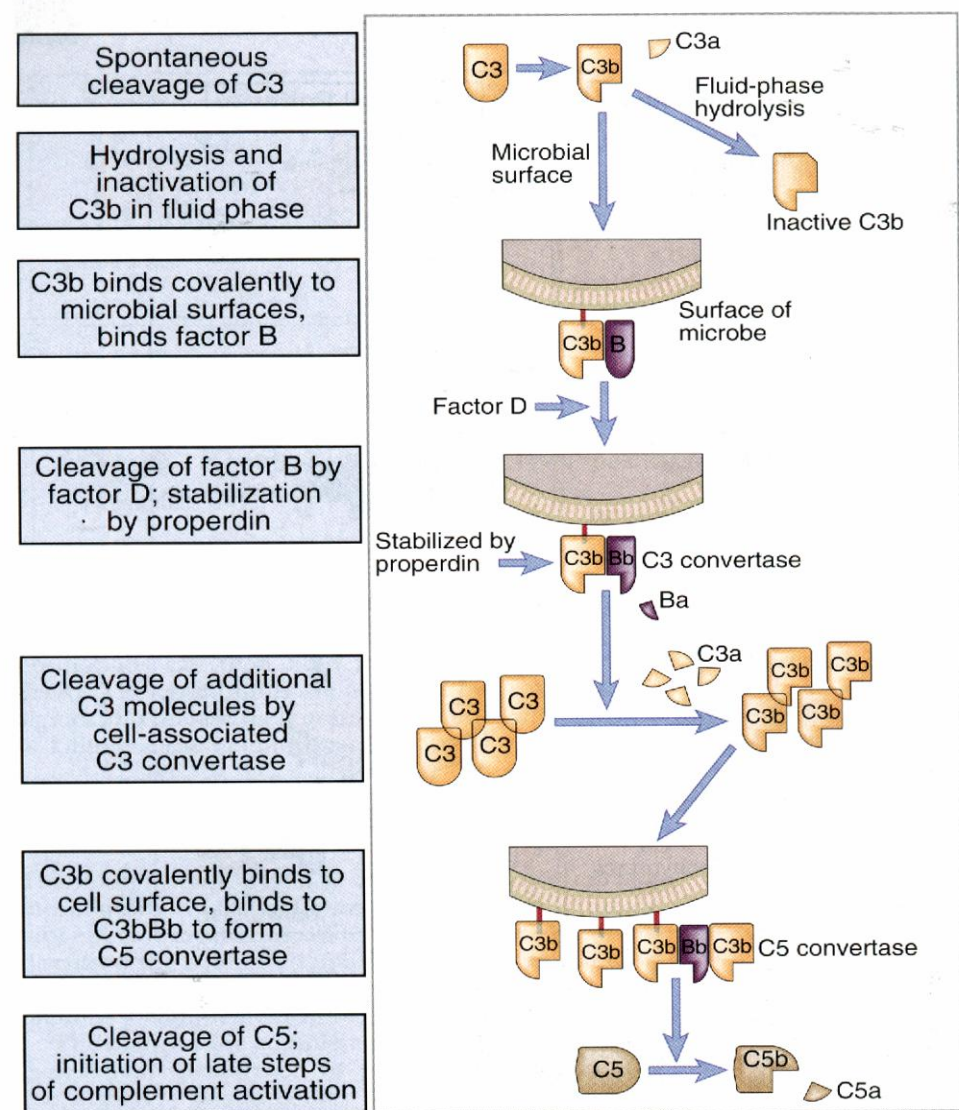
Table Proteins of the Alternative Pathway of Complement

Protein	Structure	Serum concentration (μg/mL)	Function
C3	185 kD (α-subunit, 110 kD; β-subunit, 75 kD)	1000-1200	C3b binds to the surface of the microbe, where it functions as an opsonin and as a component of C3 and C5 convertases C3a stimulates inflammation (anaphylatoxin)
Factor B	93-kD monomer	200	Bb is a serine protease and the active enzyme of the C3 and C5 convertases
Factor D	25-kD monomer	1-2	Plasma serine protease, cleaves factor B when it is bound to C3b
Properdin	Composed of up to four 56-kD subunits	25	Stabilizes C3 convertases (C3bBb) on microbial surfaces

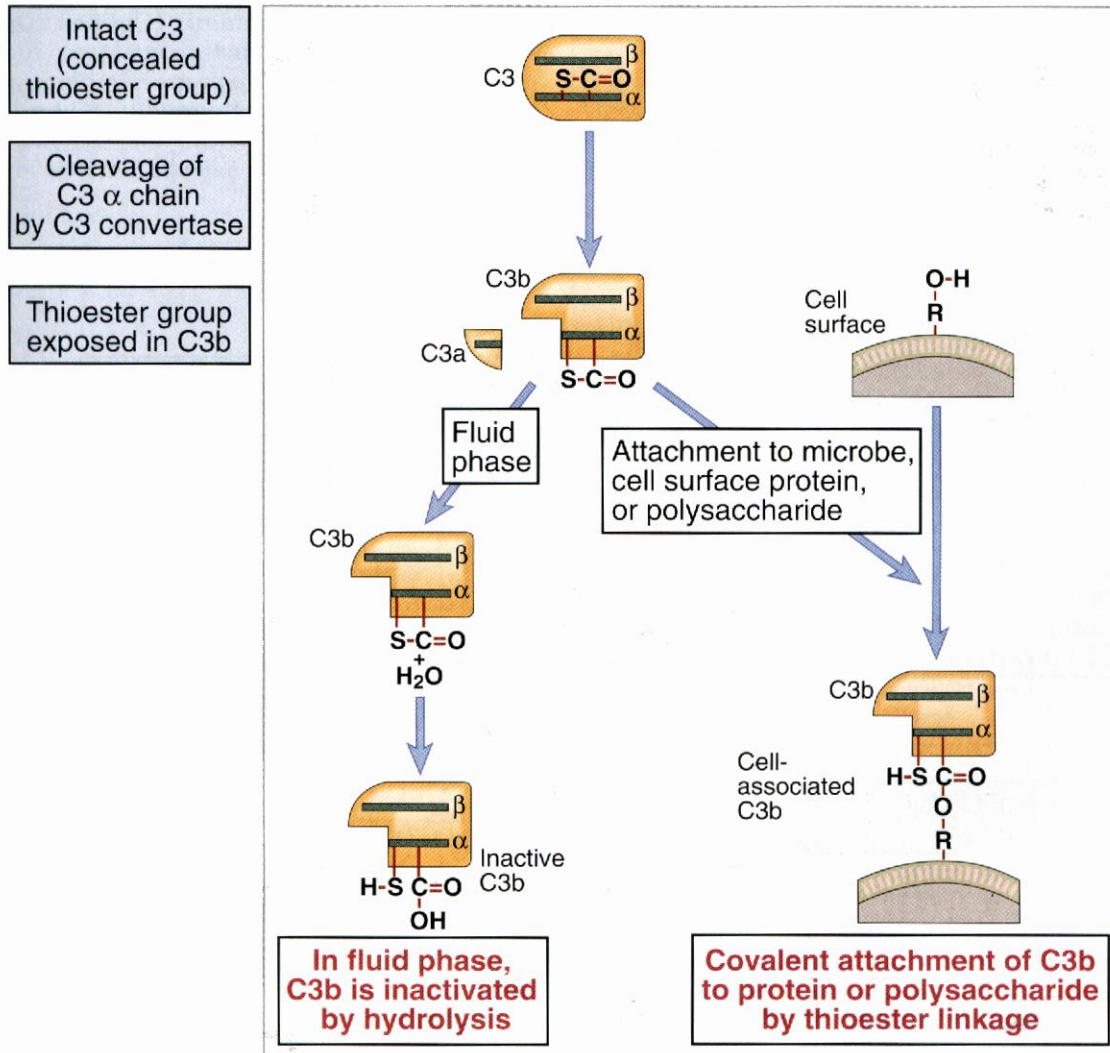
Εναλλακτικό μονοπάτι



- η C3 διαχωρίζεται από μόνη της με χαμηλό ρυθμό για να σχηματίσει C3b – Tick over,
- η C3b «κολλάει» - ο εσωτερικός ασταθής θειοεστέρας αντιδράει με εκτεθειμένες αμινο- ή υδόξυλ- ομάδες σε πρωτεΐνες ή σάκχαρα,
- η αντίδραση του θειοεστέρα είναι σύντομη, υδrolύεται γρήγορα,
- η C3b η οποία βρίσκεται στην επιφάνεια δεσμεύει τον παράγοντα B, ο οποίος αμέσως μετά διασπάται για να σχηματίσει Bb,
- μένει συνδεδεμένη με την C3b,
- δημιουργεί C3bBb = εναλλακτικό μονοπάτι C3 κονβερτάση,
- το μονοπάτι του C3bBb σχηματίζει περισσότερη C3 (ενίσχυση),
- Ο σχηματισμός του συμπλέγματος C3bBb3b (με απ' ευθείας σύνδεση του νεοσχηματιζόμενου C3b με την κονβερτάση) καταλήγει σε κονβερτάση C5.
- η κονβερτάση C5 διασπά το C5 για να δημιουργήσει C5b και C5a,
- ξεκινάει πιο προχωρημένα βήματα ενεργοποίησης.



Ο ασταθής θειοεστέρας της C3b προκαλεί το δέσιμο της C3b στον στόχο



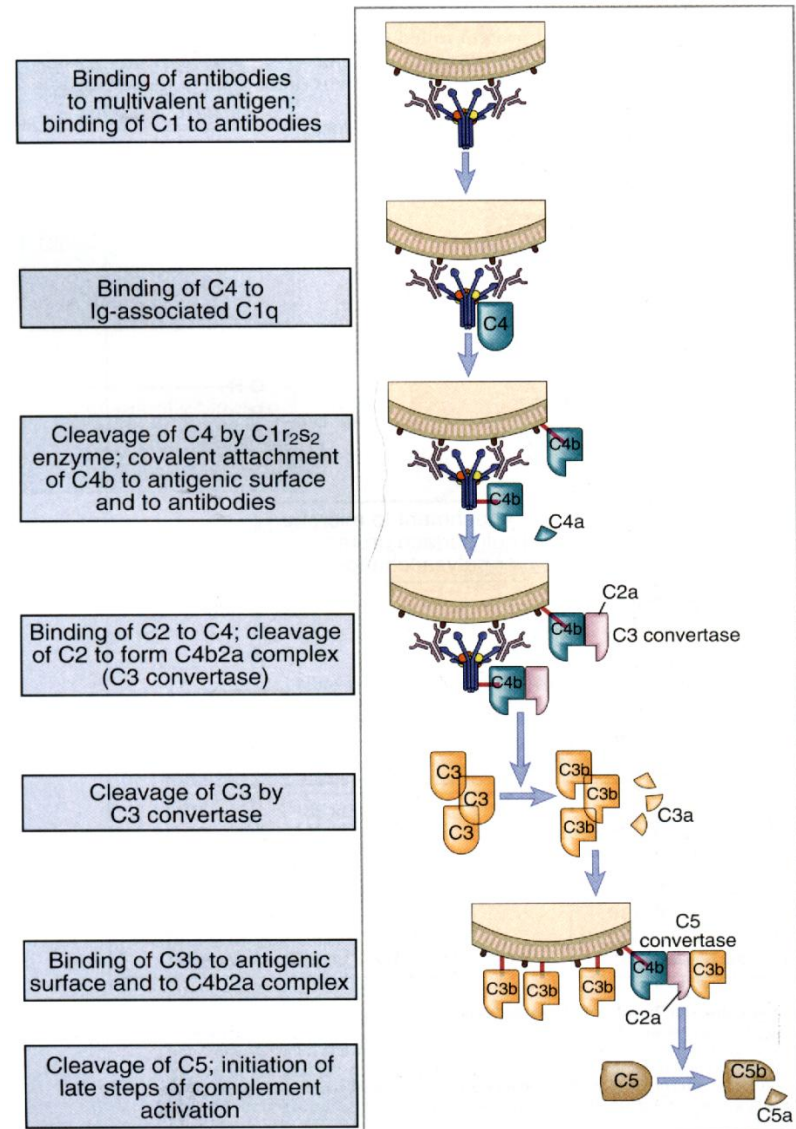
- ο δεσμός του θειοεστέρα θεωρούμε ότι είναι κρυμμένος σε μια υδρόφοβη κοιλότητα σε συνθήκες μη ενεργοποίησης,
- η αυτόματη υδρόλυση του θειοεστερικού δεσμού είναι πολύ αργή κάτω από φυσιολογικές συνθήκες,
- όταν η C3 διασπάται από την κονβερτάση σε C3b, ο θειοεστερικός δεσμός εκτίθεται,
- πολύ μικρή ημίσεια ζωή (περίπου 100 μ s),
- η μικρή ημίσεια ζωή είναι πιθανότατα σημαντική στο να αποτρέπει την υπερβολική προσκόλληση του συμπληρώματος σε επιφάνειες.

- Τις περισσότερες φορές το μονοπάτι καταλήγει σε εναλλακτικό μονοπάτι.

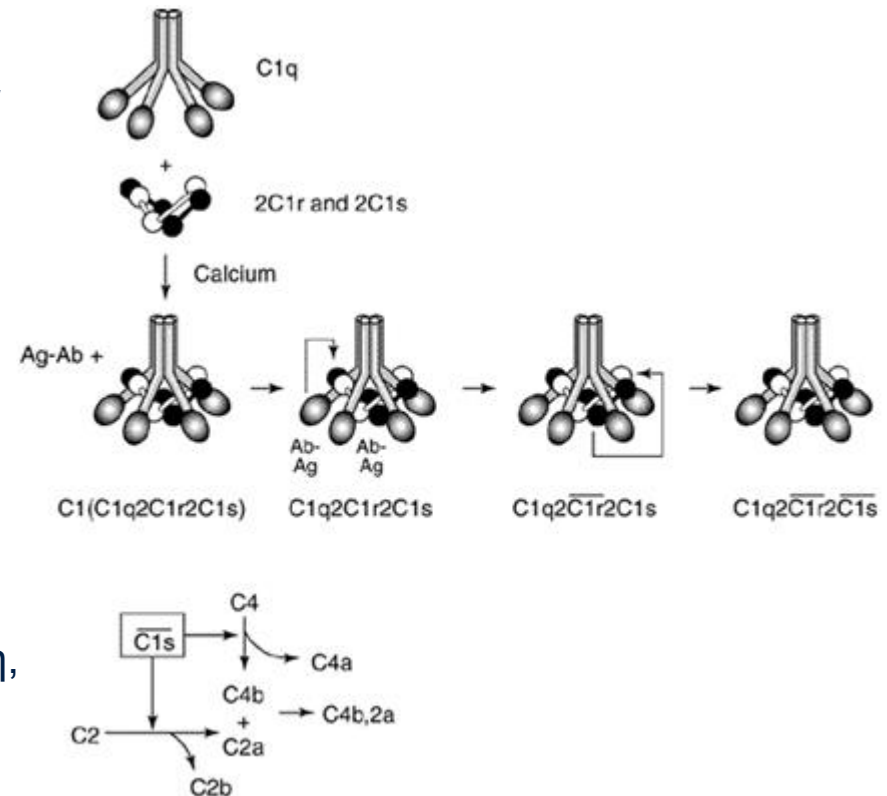
Table 14-4. Proteins of the Classical Pathway of Complement

Protein	Structure	Serum concentration (μg/mL)	Function
C1 (C1qr ₂ s ₂)	750 kD		Initiates the classical pathway
C1q	460 kD; hexamer of three pairs of chains (22, 23, 24 kD)	75-150	Binds to the Fc portion of antibody that has bound antigen
C1r	85-kD dimer	50	Serine protease, cleaves C1s to make it an active protease
C1s	85-kD dimer	50	Serine protease, cleaves C4 and C2
C4	210 kD, trimer of 97-, 75-, and 33-kD chains	300-600	C4b covalently binds to the surface of a microbe or cell, where antibody is bound and complement is activated C4b binds C2 for cleavage by C1s C4a stimulates inflammation (anaphylatoxin)
C2	102-kD monomer	20	C2a is a serine protease and functions as the active enzyme of C3 and C5 convertases to cleave C3 and C5
C3	See Table 14-3		

- η C1 συνδέεται στην Fc περιοχή των αντισωμάτων IgG ή IgM ,
- η C1 ενεργοποιείται και διασπά την C4 (ομόλογη της C3) και δημιουργείται η C4b,
- η C4b δεσμεύεται στο σύμπλεγμα αντισώματος/αντιγόνου με θειοεστερικό δεσμό ή στην επιφάνεια στόχο,
- η C4b προσδένεται στη C2, η C2 διασπάται από την C1 που βρίσκεται δίπλα της και απελευθερώνει C2b και C2a οι οποίες παραμένουν προσδεμένες στη C4b,
- αποτέλεσμα είναι η δημιουργία του συμπλέγματος C4bC2a = κλασικό μονοπάτι C3 κονβερτάσης,
- δεσμεύεται από τη C3 και τη διασπά για να δημιουργήσει C3b,
- η C3b δεσμεύει την B και το μονοπάτι συνεχίζει σαν εναλλακτικό,
- ενίσχυση: μία C3 κονβερτάση μπορεί να αποφέρει χιλιάδες C3b στην επιφάνεια μικροβίων.



- Η C1 είναι μια πολυσύνθετη πρωτεΐνη:
 - ✓ 6 C1q υποομάδες δεσμεύουν το αντίσωμα Fc,
 - ✓ 2 C1r και 2 C1s – και οι δύο εστεράσες σερίνης.
- Κάθε περιοχή βαριάς αλυσίδας του Ig έχει ένα και μοναδικό μέρος δέσμευσης του C1q,
- Για να δεθεί αποτελεσματικά η C1q πρέπει να χρησιμοποιήσει τουλάχιστον 2 C1q θέσεις δέσμευσης, οι οποίες είναι διαθέσιμες μόνο όταν τα IgG είναι δεμένα μεταξύ τους:
 - ✓ όπως σε ένα αντιγόνα με πολλά σθένη,
 - ✓ όχι αν κυκλοφορούνε ελεύθερα στο πλάσμα.
- Η C1r ενεργοποιείται όταν η C1q προσδένει τουλάχιστον 2 Fc's (πως;).
- Η C1r διασπάται και ενεργοποιεί C1s.
- Η C1s διασπά την C4 για να δημιουργήσει C4b.

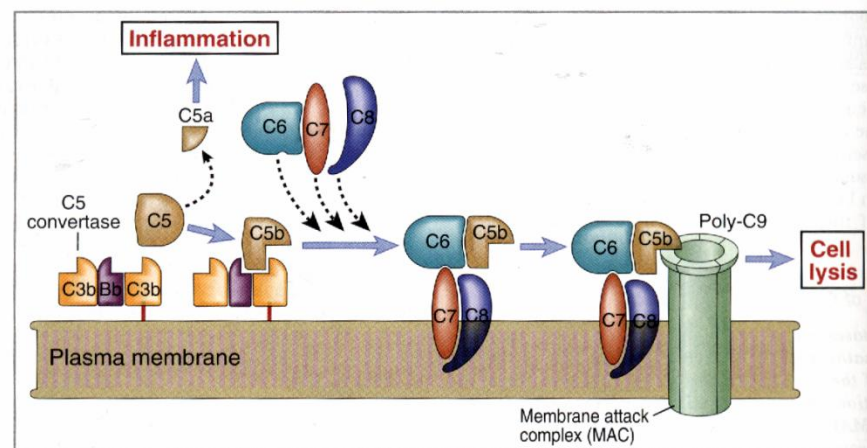


Ισχυρός διαμεσολαβητής φλεγμονής

- C5 κονβερτάση διασπά την C5, απελευθερώνει C5a, ενώ η C5b παραμένει προσδεμένη,
- η C5b παροδικά διατηρεί τη δομή η οποία δεσμεύει τις C6 και C7,
- Το σύμπλοκο C5bC6C7 είναι πολύ υδρόφοβο και εισέρχεται στην διπλή λιπoστοιβάδα.
- Δεσμεύει τη C8, σταθεροποιεί την εισχώρηση του συμπλέγματος στη μεμβράνη.
- Η C9 καταμερίζεται σε τμήματα του συμπλέγματος C5b – C8:
 - ✓ δημιουργεί πόρους (100 angstrom), σχηματίζει κανάλια,
 - ✓ οσμωτική λύση,
 - ✓ γρήγορη είσοδος ασβεστίου → ενεργοποιεί τις καψάσες → απόπτωση.

Table 14-5. Proteins of the Late Steps of Complement Activation

Protein	Structure	Serum concentration (μg/mL)	Function
C5	190-kD dimer of 115- and 75- kD chains	80	C5b initiates assembly of the MAC C5a stimulates inflammation (anaphylatoxin)
C6	110-kD monomer	45	Component of the MAC: binds to C5b and accepts C7
C7	100-kD monomer	90	Component of the MAC: binds to C5b,6 and inserts into lipid membranes
C8	155-kD trimer of 64-, 64-, and 22-kD chains	60	Component of the MAC: binds to C5b,6,7 and initiates the binding and polymerization of C9
C9	79-kD monomer	60	Component of the MAC: binds to C5b,6,7,8 and polymerizes to form membrane pores



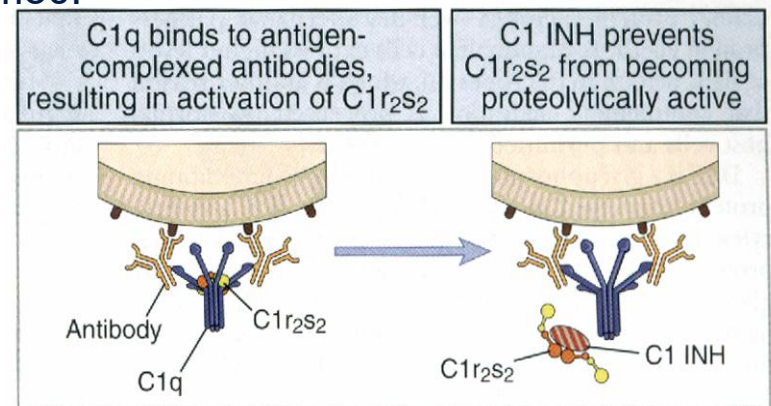
- Οι ρυθμίστηκες πρωτεΐνες του συμπληρώματος – διαλυτές και προσαρτώμενες στη μεμβράνη
- Η σημασία της γρήγορης ρύθμισης του συμπληρώματος – διαλυτοί αναστολείς άφθονοι στον ορό
- Τα προϊόντα που προέρχονται από διάσπαση είναι αντιδραστήρια για μικρό χρονικό διάστημα – εξασφαλίζουν περιορισμένη διάχυση και τοπική συγκέντρωση
- π.χ. Ο C3b θειοεστέρας αντιδράει για μικρό χρονικό διάστημα

Table Regulators of Complement Activation

Receptor	Structure	Distribution	Interacts with	Function
C1 inhibitor (C1 INH)	104 kD	Plasma protein; conc. 200 µg/mL	C1r, C1s	Serine protease inhibitor; binds to C1r and C1s and dissociates them from C1q
Factor I	88-kD dimer of 50- and 38-kD subunits	Plasma protein; conc. 35 µg/mL	C4b, C3b	Serine protease; cleaves C3b and C4b by using factor H, MCP, C4BP, or CR1 as cofactors
Factor H	150 kD; multiple CCPRs	Plasma protein; conc. 480 µg/mL	C3b	Binds C3b and displaces Bb Cofactor for factor I-mediated cleavage of C3b
C4-binding protein (C4BP)	570 kD; multiple CCPRs	Plasma protein; conc. 300 µg/mL	C4b	Binds C4b and displaces C2 Cofactor for factor I-mediated cleavage of C4b
Membrane cofactor for protein (MCP, CD46)	45-70 kD; four CCPRs	Leukocytes, epithelial cells, endothelial cells	C3b, C4b	Cofactor for factor I-mediated cleavage of C3b and C4b
Decay-accelerating factor (DAF)	70 kD; GPI linked, four CCPRs	Blood cells, endothelial cells, epithelial cells	C4b2b, C3bBb	Displaces C2b from C4b and Bb from C3b (dissociation of C3 convertases)
CD59	18 kD; GPI linked	Blood cells, endothelial cells, epithelial cells	C7, C8	Blocks C9 binding and prevents formation of the MAC

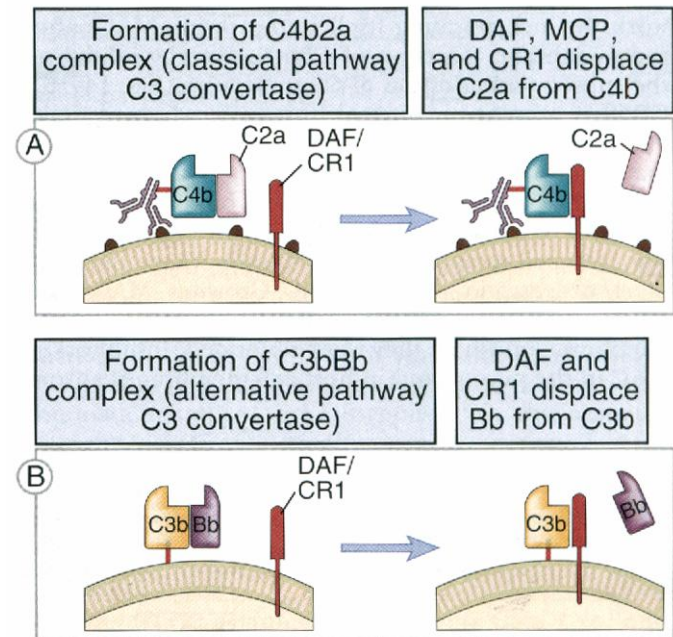
Abbreviations: CCPR, complement control protein repeat; conc., concentration; GPI, glycosylphosphatidylinositol; MAC, membrane attack complex.

- C1 INH είναι ένας αναστολέας σερινικής πρωτεάσης (τύπου σερπίνης).
- Μιμείται το κανονικό υπόστρωμα του C1r και C1s.
- Η C1q δεσμεύει αντισώματα και ενεργοποιούνται τα C1r και C1s.
- Το C1 INH συναγωνίζεται με τα κανονικά υποστρώματα (C4).
- Διασπάται και προσάπτεται στο σύμπλεγμα C1.
- Το τετραμερές C1r-C1s διαχωρίζεται από το C1q,
- Περιορίζει την ενεργοποίηση του κλασικού μονοπατιού.
- Κληρονομικό αγγειονευρωτικό οίδημα.
- Ανεπάρκεια του C1 INH.
- Έντονο οίδημα στο δέρμα και στο βλεννογόνο.
- Γαστρικός πόνος, έμετος, διάρροια.
- Απόφραξη αεροφόρων οδών.
- Υπερ – παραγωγή των C2 τμημάτων (C2 κινίνες).
- Ας θυμηθούμε ότι το C1 διασπά το C2 όταν δεσμεύεται στο C4b,
- permeability προκαλεί αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα.



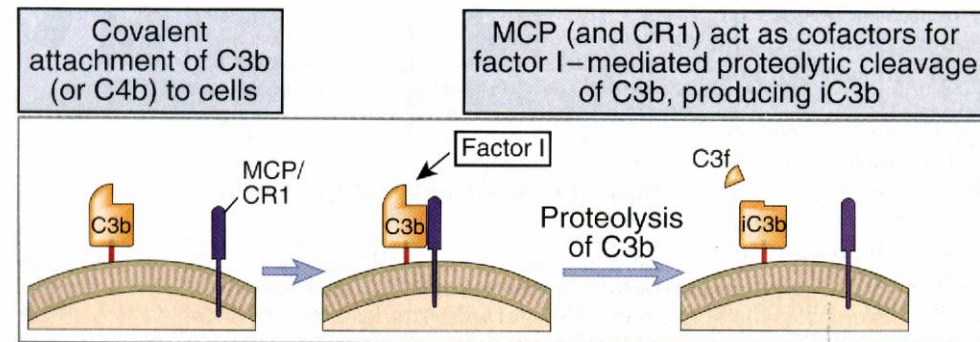
Η C3b εναποτίθεται σε κανονικά κύτταρα ξενιστές.

- Ας θυμηθούμε, ότι η C3b δημιουργείται με χαμηλό ρυθμό, αν δεν αναχαιτιστεί γρήγορα, το συμπλήρωμα καταστρέφει τον ιστό του κανονικού ξενιστή.
- Το συνένζυμο μεμβράνης (MCP/CD46), Τύπου I υποδοχέας συμπληρώματος (CR1), Decay Accelerating Factor (DAF), C4-Binding Protein (C4BP) δεσμεύει το C3b στην κυτταρική επιφάνεια ανταγωνιστικά αναστέλλει και/ή εκτοπίζει τη δέσμευση άλλων στοιχείων της C3 κονβερτάσης – Bb (εναλλακτικό μονοπάτι) ή C2a (κλασικό μονοπάτι) το τεχνητά κατασκευασμένο CR1 χρησιμοποιείται σαν φάρμακο.
- Ο παράγοντας H είναι σε πλεόνασμα σαν διαλυτή πρωτεΐνη του πλάσματος (0.5mg/mL). Αναστέλλει τη δέσμευση του Bb στην C3b.
- Ο παράγοντας H έχει υψηλότερη συγγένεια για επιφάνειες πλούσιες σε σιαλικό οξύ και έχει τοποθετηθεί σε επιφάνειες βιοϋλικών.



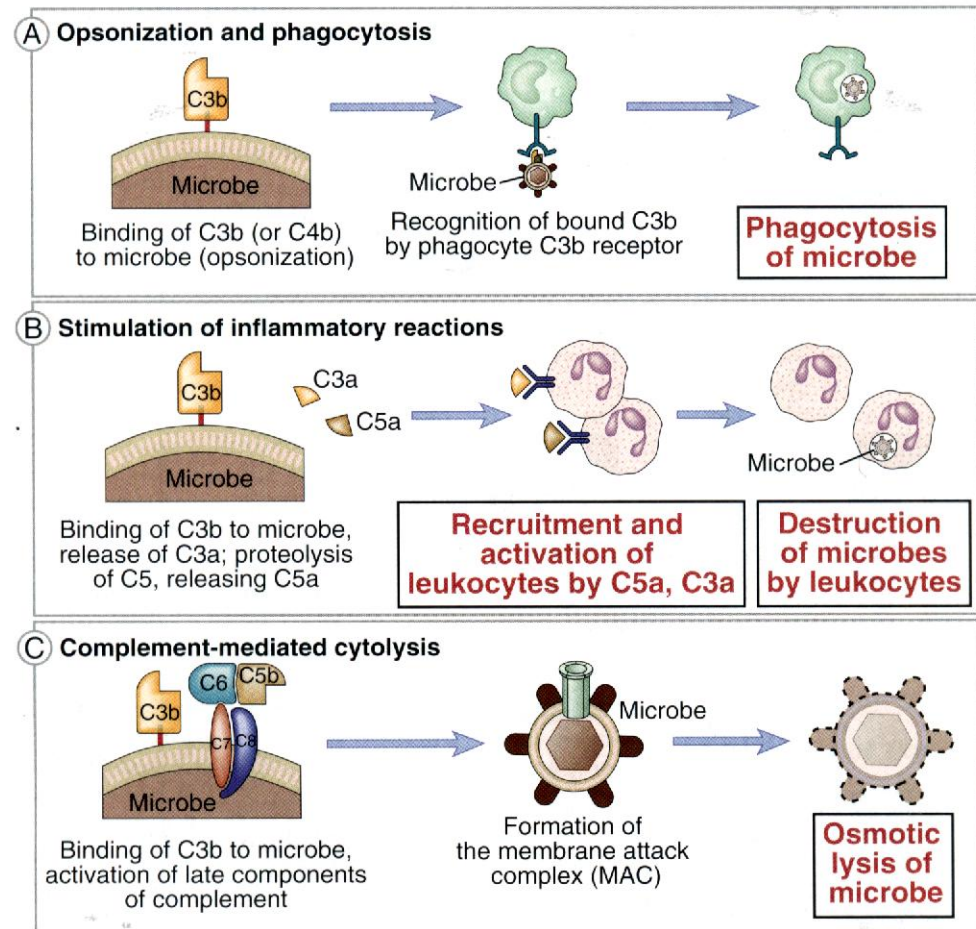
Σερινική πρωτεάση

- MCP, Factor H, C4BP, and CR1 συνένζυμα του παράγοντα I διάσπαση των C3b ή C4b.
- Δημιουργούνται τα κομμάτια από τη διάσπαση του C3b:
 - ✓ iC3b, C3d, and C3dg,
 - ✓ δεν ενεργοποιούν το συμπλήρωμα,
 - ✓ αναγνωρίζονται όμως από τα φαγοκύτταρα.
- Επομένως, η περαιτέρω ενεργοποίηση του συμπληρώματος σταματάει χωρίς να επηρεάζει την ικανότητα των λευκών αιμοσφαιρίων να απομακρύνουν ξένα σώματα.
- Οι αναστολείς του συμπληρώματος μπορεί να είναι σε πλεόνασμα:
 - ✓ η υπερ-παραγωγή συμπληρώματος μπορεί να ξεπεράσει το σύστημα αναστολέων,
 - ✓ έχει σαν αποτέλεσμα πολλαπλές ασθένειες.



Οι κύριοι ρόλοι του συμπληρώματος:

1. Προετοιμάζουν σωματίδια για φαγοκυττάρωση (πρέπει να φτάσουμε μέχρι το στάδιο C3b)
2. Εξάγει αντίδραση φλεγμονής δρώντας στα λευκά αιμοσφαίρια, στα κύτταρα συνδετικού ιστού, στο ενδοθήλιο
3. Λύση κυττάρων μέσω συμπληρώματος



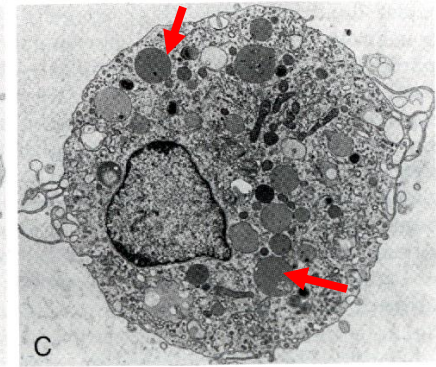
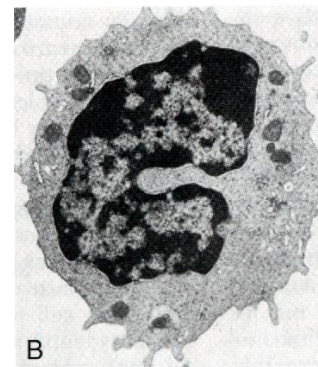
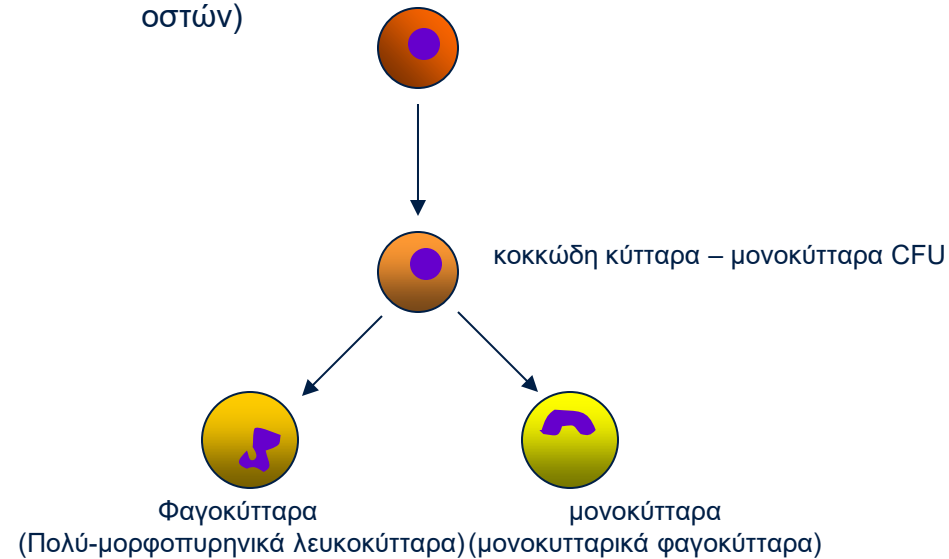
Φαγοκυτταρικά κύτταρα αίματος:

- πολυμορφοπύρρηνα λευκά αιμοσφαίρια,
- τα λευκά αιμοσφαίρια με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στην κυκλοφορία,
- 2 τύποι ενδοκυτταρικών κόκκων:
 - ✓ ειδικοί (λυσοζύμες, κολλαγονογενάσες, ελαστάσες),
 - ✓ azurophilic (διάφορα ένζυμα, microbicide).
- κοινοί πρόγονοι με μονοκύτταρα,
- ο ενήλικος παράγει περίπου 10^{11} ανά μέρα,
- μικρή διάρκεια ζωής (6 ώρες και μετά απόπτωση).

Μονοκύτταρα (μακροφάγα)

- φυλογενετικά το πιο αρχαίο κύτταρο στο ανοσοποιητικό σύστημα,
- κυκλοφορούν σαν ανενεργά μονοκύτταρα, εισέρχονται στους ιστούς και γίνονται ενεργοποιημένα μακροφάγα (αυξημένα κενοτόπια, κυτταροπλασματικά οργανίδια),
- καταλαμβάνουν θέσεις μικροβιακής εισόδου:
 - ✓ υποεπιθηλιακοί συνδετικοί ιστοί.
 - ✓ παρεγχυματικά όργανα ή όργανα μέσα σε διάκενο.
 - ✓ εσωτερικές επενδύσεις σε όργανα όπως ο σπλήνας και το ήπαρ.
 - ✓ κόμβοι του λεμφικού δικτύου.
- η ανταπόκριση έρχεται αργότερα στα κέντρα φαγοκυττάρωσης σε τραύμα/φλεγμονή,
- παίζουν κυρίαρχο ρόλο στο ανοσοποιητικό σύστημα.

πρόγονοι μυελοειδών κυττάρων (μυελός των οστών)



Μονοκύτταρα στην κυκλοφορία → Ενεργοποιημένα μακροφάγα

Τα λευκοκύτταρα ανταποκρίνονται στα ερεθίσματα από φλεγμονή

- Ο κυριότερος «σκοπός» των φαγοκυττάρων → να καθαρίζουν τους οργανισμούς που εισβάλουν, και τα ξένα υλικά.
- Το συμπλήρωμα είναι ένα μέρος τους συστήματος που αξιοποιεί τα λευκά αιμοσφαίρια και ξεκινάει τη φλεγμονή.
- Οι μηχανισμοί των φαγοκυττάρων – βοηθούν στον καθαρισμό τραυμάτων:

ΣΤΡΑΤΟΛΟΓΗΣΗ: πρωτεΐνες προσκόλλησης που πραγματοποιούν την πρόσδεση στο ενδοθήλιο.

ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΣΗ: υποδοχείς που προκαλούν χημειοτακτικότητα στο στόχο.

ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΚΑΙ ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗ: ειδικοί υποδοχείς μικροβίων και «οψονοποιημένων» υλικών – φαγοκυττάρωση – Οι Fc υποδοχείς και οι C3 υποδοχείς βοηθούν σημαντικά στην προσκόλληση.

ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ ΚΥΤΑΡΟΤΟΞΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ: είδη που αντιδρούν στο οξυγόνο και στο άζωτο.

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ: έκκριση πολυάριθμων κυτταροκινών και χημειοκινών με τοπική δραστηριότητα και δραστηριότητα όλου του σώματος:

✓ αυξάνει την ενεργοποίηση των μακροφάγων, την στρατολόγησή τους και διεγείρουν την προσαρμοστικότητα του ανοσοποιητικού συστήματος,

✓ αρνητικοί παράγοντες – αναστέλλουν την ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό,

✓ έκκριση παραγόντων που προάγουν την ανάπτυξη του τραύματος, την αγγειογένεση και την παραγωγή κυτταρικής μεμβράνης.

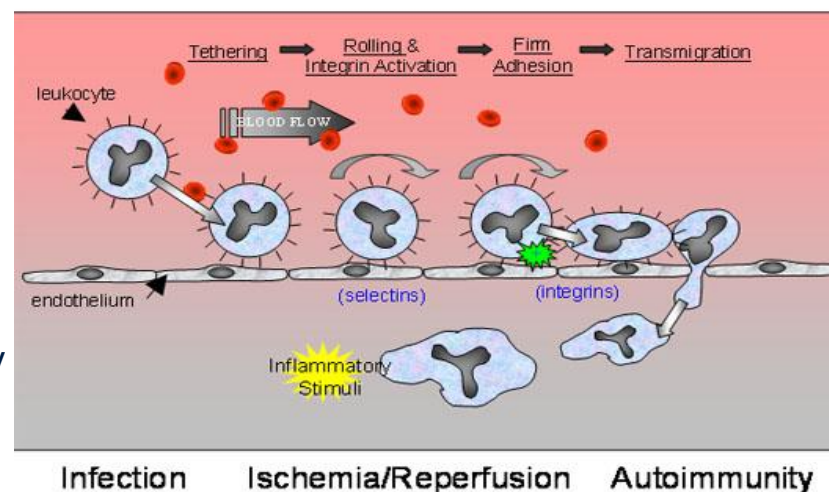
- Οι παράγοντες που εκκρίνονται παίρνουν μέρος στον θετικό πολλαπλασιασμό της φλεγμονώδους απόκρισης αλλά εκκρίνονται και παράγοντες που δρουν ως περιοριστές της φλεγμονής και ξεκινούν τα τελευταία στάδια της ανάπτυξης του τραύματος.
- Η αποτυχία καθαρισμού ξένου υλικού μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα τη χρόνια φλεγμονή.
- Τα μακροφάγα κυριαρχούν στην επιφάνεια αλληλεπίδρασης βιοϋλικών και ιστών και συνήθως είναι παρόντα για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Υποθέτουμε μία βακτηριακή μόλυνση σε ένα τραύμα που συμβαίνει για πρώτη φορά.

1. Καταρράκτες πήξεως και συμπληρώματος:
 - απελευθέρωση C3a και C5a, ινογένεση, θρομβίνη,
 - ενεργοποίηση μακροφάγων.
2. Τα μακροφάγα των ιστών δεσμεύουν το συμπλήρωμα που εναποτίθεται, τα βακτήρια και τους ινοβλάστες.
3. Ενεργοποίηση τοπικών μακροφάγων.
4. Απελευθέρωση κυτοκινών +κομμάτια συμπληρώματος.
5. Ενεργοποίηση κυττάρων συνδετικού ιστού, απελευθέρωση ισταμίνης – αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα.
6. Μέσω του TNF – alpha έχουμε αύξηση της προσκόλλησης των μονοκυττάρων στο ενδοθήλιο.
7. Στρατολόγηση περισσότερων μακροφάγων στο σημείο του τραύματος.

- Οι εκκρινόμενοι παράγοντες TNF - alpha, IL - 1 αυξάνονται από τα τοπικά μακροφάγα.
- Αύξηση στο ενδοθηλιακό VCAM, ICAM - 1 και της E - σελεκτίνης.
- Τα μονοκύτταρα της κυκλοφορίας προσδένονται αλλά η συγγένεια δεν είναι αρκετή για να αντισταθούν στην αιματική ροή → αποτέλεσμα να κυλάνε πάνω στο αγγειακό τοίχωμα.
- Οι χημειοκίνες οι οποίες εκκρίνονται από τα τοπικά ενεργοποιημένα μακροφάγα προσδένονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα και αυξάνουν την τοπική συγκέντρωση.
- Οι χημειοκίνες αυξάνουν την συγγένεια των λευκοκυτταρικών υποδοχέων ιντεγκρίνης για τα ενδοθηλιακά κύτταρα.
- Τα μονοκύτταρα γίνονται επίπεδα αποκρινόμενα στο σήμα των χημειοκινών, μεταναστεύουν μέσω του ενδοθηλίου στο σημείο του τραύματος με χημικά σήματα και ενεργοποιούνται.
- Η αγγειακή διαπερατότητα αυξάνεται μέσω απελευθέρωσης ισταμινών από τα κοντινά κύτταρα συνδετικού ιστού (μέσω C3a και C5a).

The Leukocyte Recruitment Cascade



1. Υποδοχείς στις βακτηριακές μανόζες.
2. Υποδοχείς σκοτωμένων οργανισμών AcLDL (δεσμεύουν και βακτήρια).
3. Υποδοχείς οψωνίνης – η εμπλοκή τους αυξάνει την παραγωγή κυτοκινών, αυξάνονται τα ένζυμα οξείδωσης:
 - ✓ FcR,
 - ✓ Υποδοχείς συμπληρώματος (CR1-CR4).
4. Υποδοχείς ιντεγκρίνης:
 - ✓ Υποδοχείς ινωδογόνου (μέσω ιντεγκρινών) → κλειδί στην απόκριση πολλών επιφανειών (βιοϋλικά),
 - ✓ Φιμπρονεκτίνες.
5. Υποδοχείς που μοιάζουν με καμπάνες:
 - ✓ Οικογένεια υποδοχέων, κάθε ένας εκ των οποίων είναι ειδικός για ένα συγκεκριμένο τύπο χημικού προϊόντος (LPS, βακτηριακά σάκχαρα, μη μεθυλιωμένη CpG),
 - ✓ Καταρράκτης σήματος που τελειώνει με την ενεργοποίηση NF-kB → αύξηση TNF α , αύξηση E – σελεκτίνης.
6. Υποδοχείς G πρωτεϊνών διεγείρουν κινητικότητα, αποκοκκοποίηση φαγοκυττάρων αίματος, απελευθέρωση πρωτεολυτικών ενζύμων:
 - ✓ Υποδοχείς C5a, υποδοχείς C3a,
 - ✓ Υποδοχείς προσταγλανδίνης, υποδοχέας λευκοτριενίων B4 (παράγοντες μονοπατιών COX και LOX που διεγείρονται από τον παράγοντα NF-kB).
7. Υποδοχείς κυτοκινών (TNF α , IFN γ , IL1b και άλλοι):
 - ✓ Σημαντικός ρόλος στην ενεργοποίηση του NFkB.

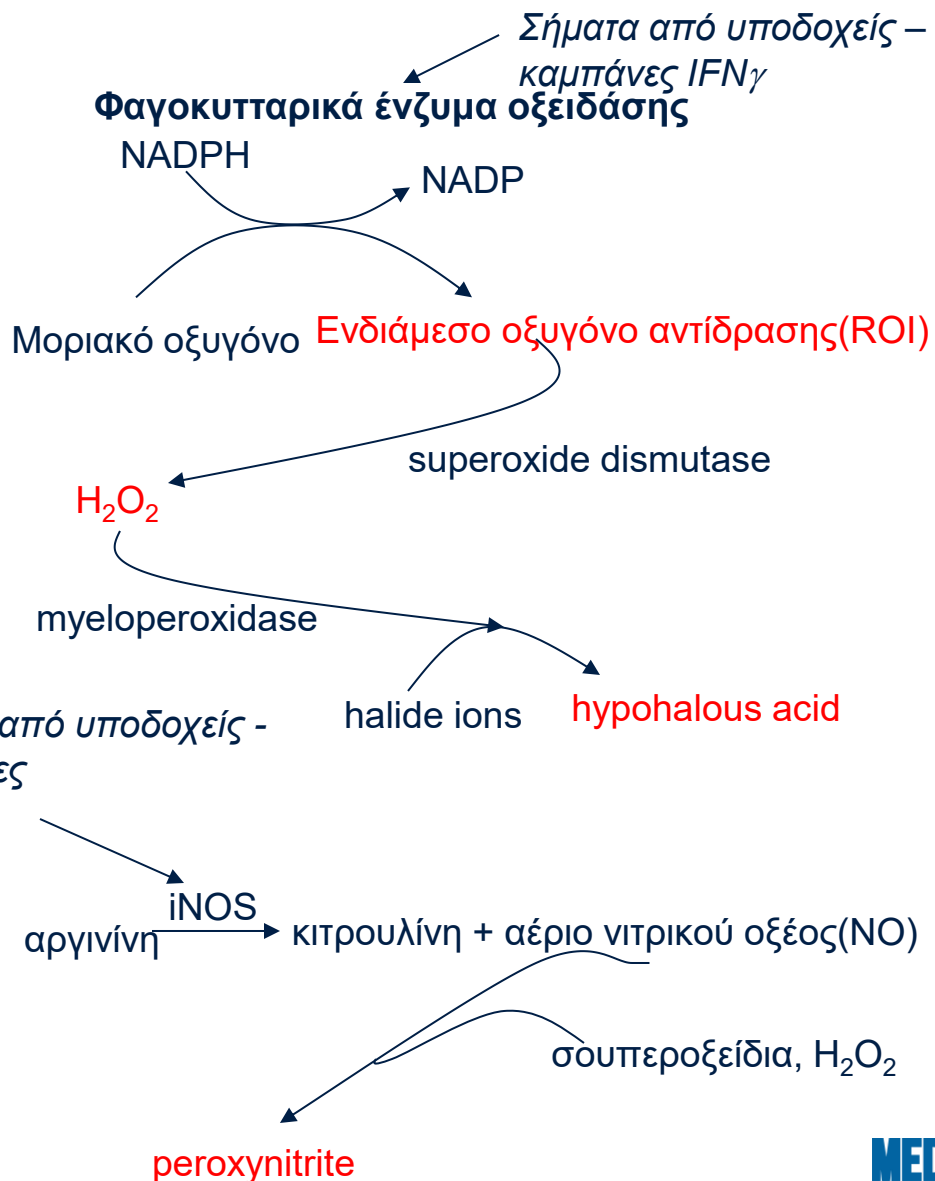
- Σύνηθες φαινόμενο: σύνδεση σε C3b ή iC3b, μεσολαβούν στη φαγοκυττάρωση οψονοποιημένων σωματιδίων.
- Η φαγοκυττάρωση μεσολαβεί στην παραγωγή κυτταροκινών, αυξάνοντας τα ένζυμα οξείδωσης.

Table 14-6. Receptors for Fragments of C3

Receptor	Structure	Ligands	Cell distribution	Function
Type 1 complement receptor (CR1, CD35)	160-250 kD; multiple CCPRs	C3b > C4b > iC3b	Mononuclear phagocytes, neutrophils, B and T cells, erythrocytes, eosinophils, FDCs	Phagocytosis Clearance of immune complexes Promotes dissociation of C3 convertases by acting as cofactor for cleavage of C3b,C4b
Type 2 complement receptor (CR2, CD21)	145 kD; multiple CCPRs	C3d, C3dg > iC3b	B lymphocytes, FDCs, nasopharyngeal epithelium	Coreceptor for B cell activation Trapping of antigens in germinal centers Receptor for EBV
Type 3 complement receptor (CR3, Mac-1, CD11b/ CD18)	Integrin, with 165-kD α chain and 95-kD β_2 chain	iC3b, ICAM-1; also binds microbes	Mononuclear phagocytes, neutrophils, NK cells	Phagocytosis Leukocyte adhesion to endothelium (via ICAM-1)
Type 4 complement receptor (CR4, p150/95, CD11c/CD18)	Integrin, with 150-kD α chain and 95-kD β_2 chain	iC3b	Mononuclear phagocytes, neutrophils, NK cells	Phagocytosis, cell adhesion?

Abbreviations: CCPR, complement control protein repeat; FDC, follicular dendritic cell; ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1.

- Τα οφονοποιημένα σωματίδια εισέρχονται στα λυσοσώματα.
- Τα φαγοκυτταρικά κενοτόπια ενσωματώνονται στο λυσόσωμα και σχηματίζουν ένα φαγολυσόσωμα.
- Το φαγολυσόσωμα είναι τοποθεσία τοξικών συστημάτων οξείδωσης.
- Η σύνθεση οξειδοτικών ενζύμων αυξάνεται από τον παράγοντα $IFN\gamma$ (παράγεται από T – κύτταρα σε περίπτωση φλεγμονής και σημάτων TLR).
- Τα αντιδρώντα οξειδώνουν πρωτεΐνες και λιπίδια.
- Αυτά τα προϊόντα συχνά απελευθερώνονται στον εξωκυτταρικό χώρο.
 - ✓ Βλάπτουν τους κοντινούς ιστούς.
 - ✓ Επιδρούν στα βιοϋλικά.
- Τα περισσότερα εμφυτευμένα υλικά είναι πολύ μεγάλα για υποστούν φαγοκυττάρωση, ακόμη και αν είναι οφονοποιημένα.

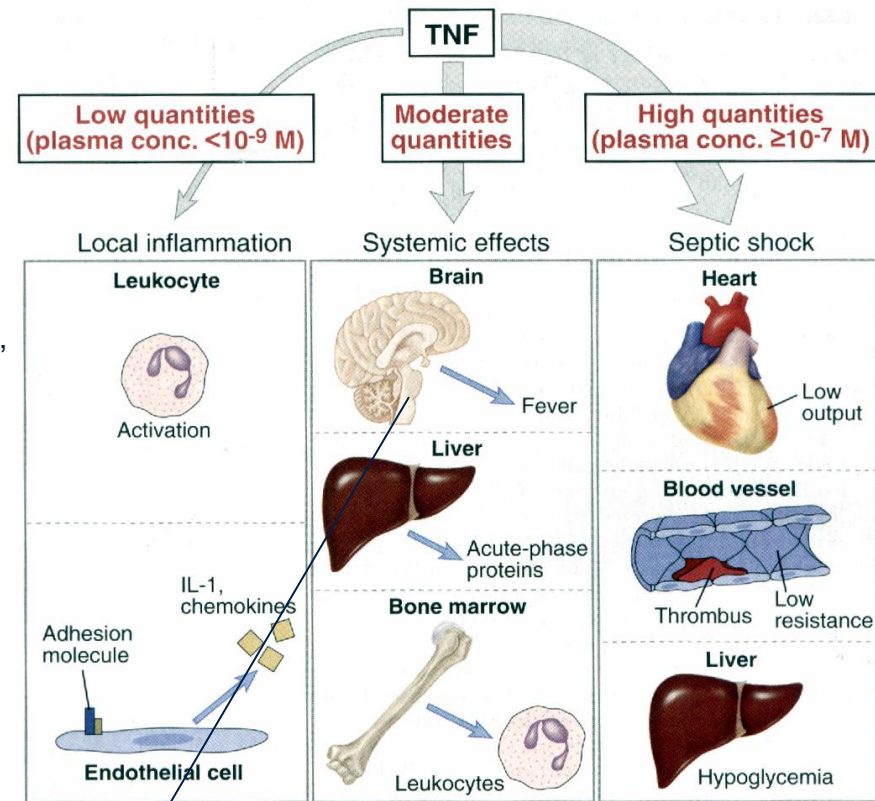


Τα μακροφάγα απελευθερώνουν κυτταροκίνες

- Τα μακροφάγα είναι ικανοί παραγωγοί κυτταροκινών (όχι όπως τα φαγοκύτταρα του αίματος).
- Η απελευθέρωση κυτταροκινών είναι σημαντική για την φλεγμονώδη αντίδραση και για την υποχώρηση της φλεγμονής.
- Γενικές ιδιότητες κυτταροκινών:
 - ✓ Η έκκρισή τους είναι σύντομη, ασταθές mRNA, de novo σύνθεση, γρήγορη έκκριση.
 - ✓ Οι κυτταροκίνες είναι συχνά σε περίσσεια.
 - ✓ Οι κυτταροκίνες συχνά επηρεάζουν την παραγωγή και την δράση άλλων κυτταροκινών (μερικές φορές και των ίδιων).
 - ✓ Η δράση τους είναι συνήθως τοπική, αλλά σε υψηλές δόσεις μπορεί να επηρεάζει όλο το σύστημα (TNFα, προσταγλανδίνες).
 - ✓ Οι υποδοχείς πρόσδεσης έχουν υψηλή συγγένεια (K_d 10^{-10} μέχρι 10^{-12} M) – απαραίτητες μικρές μόνο ποσότητες.
 - ✓ Άλλα σήματα ρυθμίζουν την ευαισθησία στις κυτταροκίνες:
 - αριθμός υποδοχέων στην επιφάνεια των κυττάρων,
 - συχνά οι κυτταροκίνες αυξάνουν την παραγωγή του ίδιου του υποδοχέα τους.

TNF α

- Κύριος διαμεσολαβητής οξείας φλεγμονής.
- Κυρίαρχη πηγή: μακροφάγα.
- Η LPS είναι μια ισχυρή πηγή διέγερσης (μέσω του TLR).
- Κύριο αποτέλεσμα: ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF κ B.
- Κύριες δράσεις:
 - ✓ αύξηση ενδοθηλιακής έκφρασης σελεκτινών και ιντεγκρινών,
 - ✓ αύξηση παραγωγής χημειοκινών στα ενδοθηλιακά κύτταρα και αύξηση των μακροφάγων,
 - ✓ αυξάνει τις κυκλοξυγενάση και λιποξυγενάση
 - αυξημένος μεταβολισμός αριχοδυνάτης,
 - παραγωγή προσταγλανδινών και λευκοτριενίων (πυρογενετικά, χημειοτακτικά),
 - ✓ επηρεάζει την έκφραση προστακυκλινών στο ενδοθήλιο – αυξάνει την τοπική κυκλοφορία αίματος,
 - ✓ αυξάνει την παραγωγή IL -1 στα μακροφάγα,
 - ✓ προτρέπει την απόπτωση κάποιων κυττάρων (μέσω του p55 υποδοχέα – ενεργοποιεί την κασπάση),
 - ✓ σε υψηλές συγκεντρώσεις στο αίμα μπορεί να προκαλέσει σηψαιμικό σοκ, δυσλειτουργία οργάνων, θρόμβωση, υψηλή θνησιμότητα.



Οι προσταγλανδίνες μέσω του μονοπατιού COX αναχαιτίζονται από την ασπιρίνη.



Κυριότερες κυτταροκίνες και αυξητικοί παράγοντες των μακροφάγων

IL-1 β

- Παρόμοια δράση με τον TNFa.
- Κυριότερη πηγή: μακροφάγα, ενδοθηλιακά κύτταρα, επιθηλιακά κύτταρα.
- Ενεργοποιεί NFkB.
- Δεν προκαλεί απόπτωση ή σηψαιμικό σοκ σε υψηλές συγκεντρώσεις.

PDGF and FGF

- Προκαλούν μίτωση στους ινοβλάστες και στα ενδοθηλιακά κύτταρα.
- Σημαντικός ρόλος για την αναδόμηση του τραύματος από ινοβλάστες και ενδοθηλιακά κύτταρα στα μεταγενέστερα στάδια και στην αγγειογένεση.

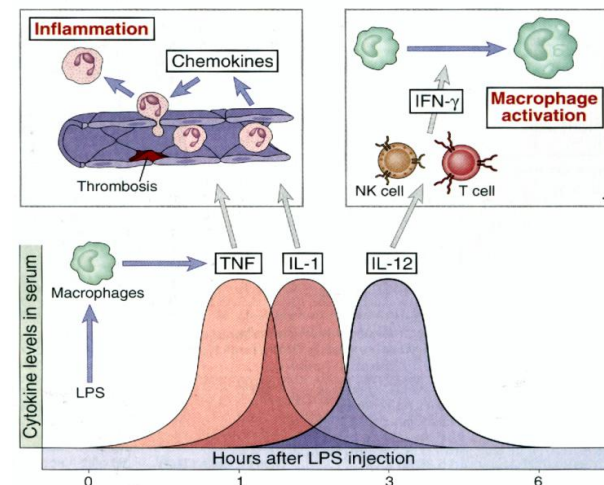
- Χημειοτακτικές χημειοκίνες.
- Πολλές κυτταρικές πηγές κατά τη διάρκεια της φλεγμονής.
- 8-12 Kda υποδοχείς: μαζί με G πρωτεΐνες
- Συνδέονται με την ηπαρίνη με θειϊκές προτεογλυκάνες στο ενδοθήλιο και αυξάνεται η συγκέντρωσή τους.
- Αρνητική ανάδραση – πολλοί υποδοχείς χημειοκινών όταν διεγείρονται μειώνουν γρήγορα την αντίδρασή τους.
- Κύριες ενέργειες:
 - ✓ επιστρατεύουν λευκά αιμοσφαίρια,
 - ✓ αυξάνουν τη συγγένεια των ιντεγκρινων,
 - ✓ προκαλούν κυτταροσκελετική κινητικότητα μέσω ακτίνης.

Ιντερλευκίνη -12 (IL-12)

- κυριότερη πηγή τα μακροφάγα,
- δεσμεύονται στα βοηθητικά T – κύτταρα, διεγείρουν την παραγωγή IFN γ ,
- ο IFN γ ενεργοποιεί τα μακροφάγα, αυξάνει την παραγωγή χημειοκινών (συμπεριλαμβάνοντας την IL-12), διεγείρει τη φαγοκυττάρωση.

Ιντερλευκίνη - 10 (IL-10)

- Αρνητικός ρυθμιστής φλεγμονής,
- Αναστέλλει την ενεργοποίηση των μακροφάγων,
- αναστέλλει την παραγωγή IL-12, σταματάει την κύρια πηγή παραγωγής IFN γ .





Μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας Βήτα (TGFβ)

- Κύριος αναστολέας της φλεγμονής,
- εκκρίνεται από τα T – κύτταρα και ενεργοποιείται από τα μακροφάγα (ειδικά αν διεγερθεί από την LPS),
- αναστέλλει τη διαίρεση των μακροφάγων,
- προάγει την έκφραση των ενζύμων που βοηθούν στη σύνθεση κυτταρικής μεμβράνης και των σχετικών γονιδίων:
 - ✓ κολλαγόνο, φιβρονεκτίνη, αυξητικός παράγοντας συνδετικού ιστού,
 - ✓ ξεκινάει τον κύκλο για επαναδιαμόρφωση του τραύματος.



Οι παράγοντες πήξεως διεγείρουν και τη δημιουργία φλεγμονής

Ινωδογόνο → υποκατάστατο του Mac -1, παρουσία του TNFa προάγει ένα ξέσπασμα οξειδώσεως και απελευθερώνει IL-1β.

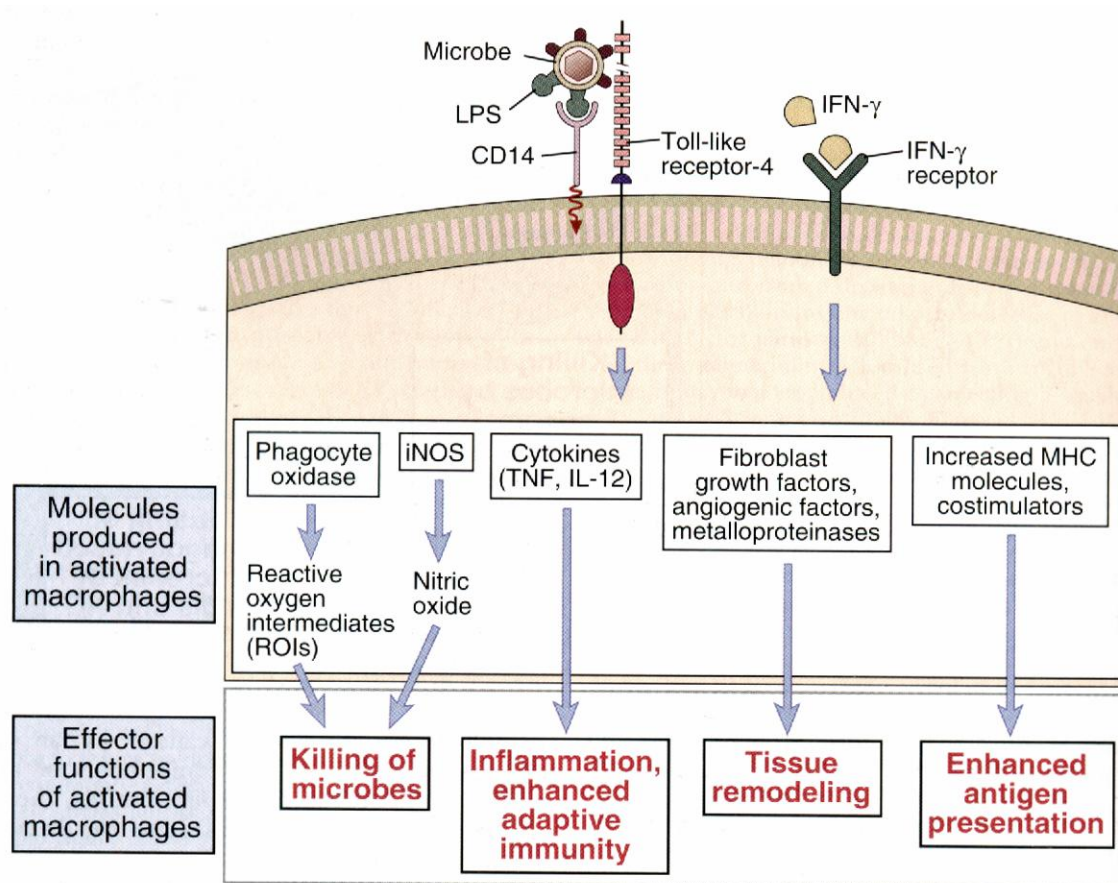
Ο ινώδης θρόμβος λειτουργεί σαν ένα πλαίσιο στήριξης για τη μετανάστευση των μακροφάγων.

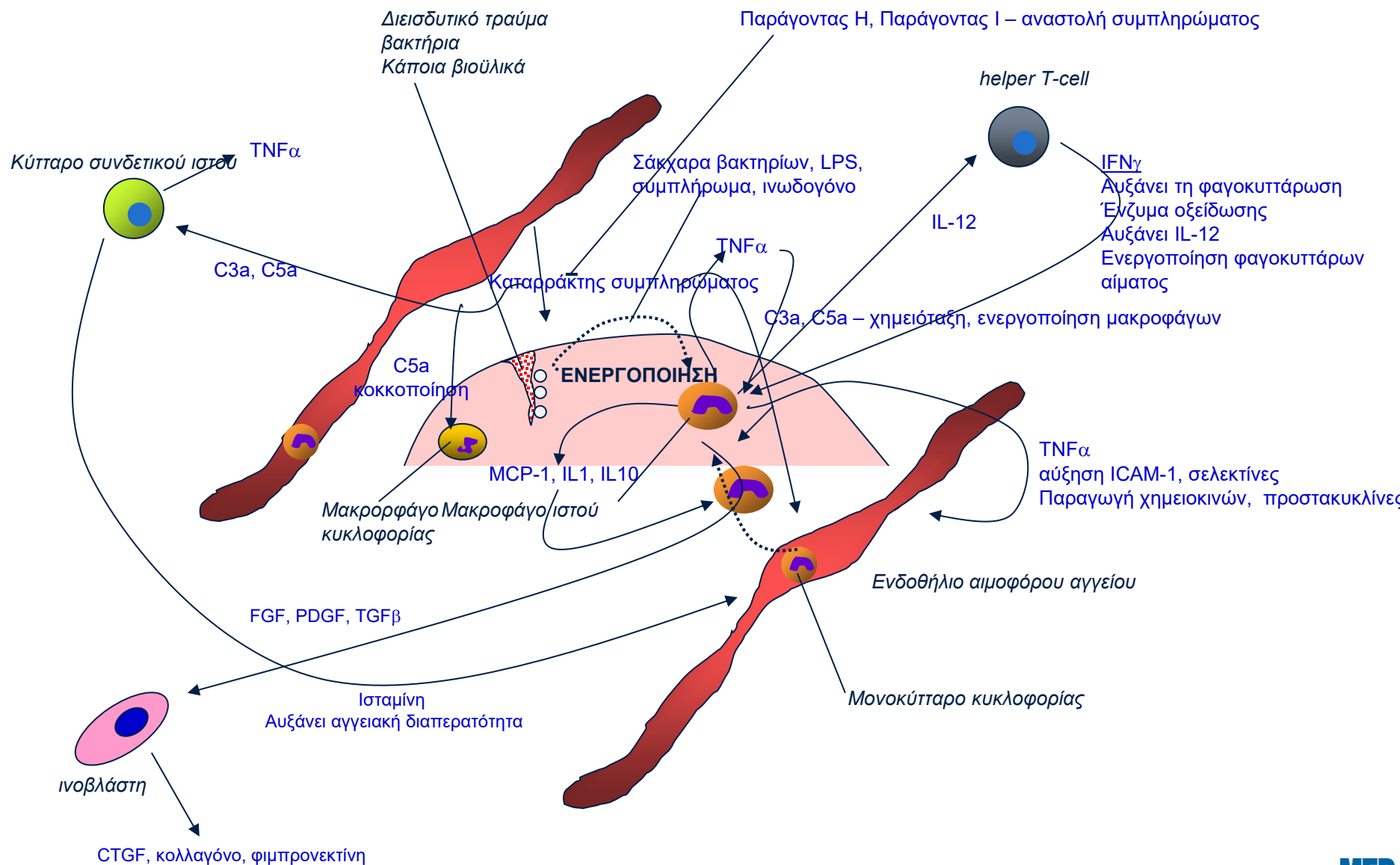
Θρομβίνη -> δεσμεύει μακροφάγα:

- προκαλεί φαγοκυττάρωση,
- χημειοταξία λευκών αιμοσφαιρίων,
- προάγει την απελευθέρωση IL-8 και MCP-1 (χημειοκίνες) από τα μακροφάγα και προσελκύουν περισσότερα μακροφάγα,
- αυξάνει την έκφραση της P – σελεκτίνης και του ICAM -1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα.



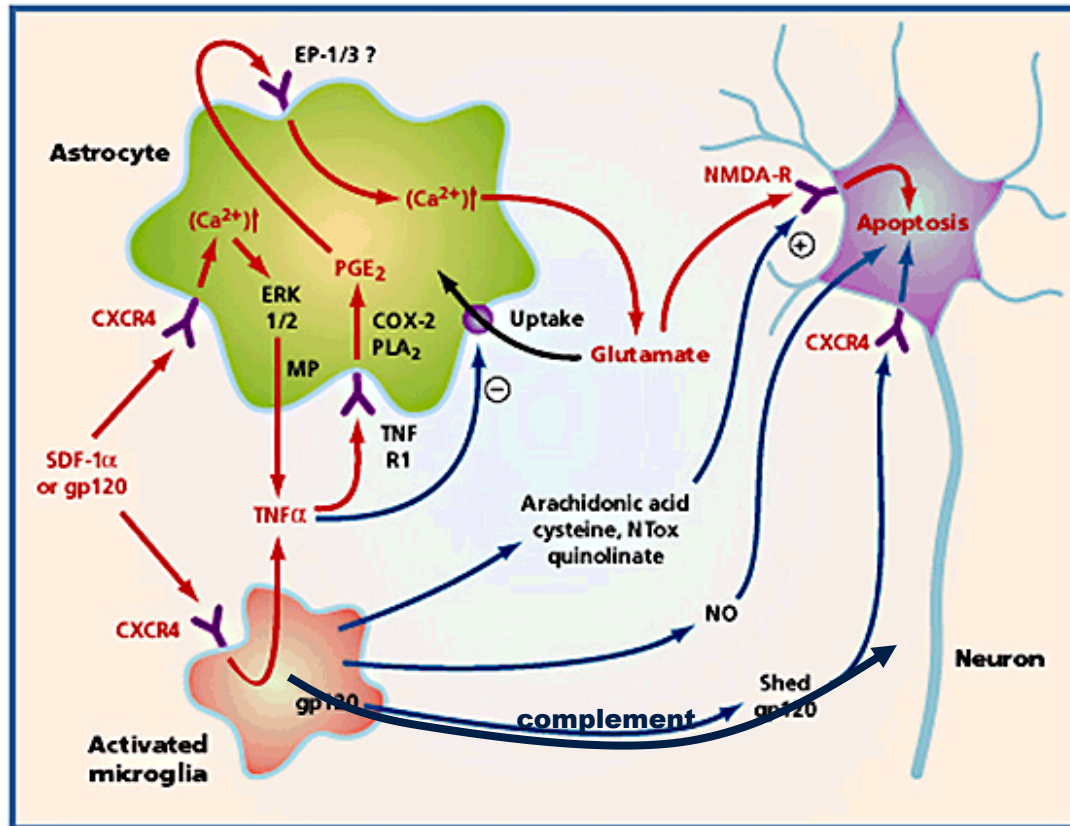
Κύριες δραστηριότητες παραγόντων που εκκρίνονται από τα λευκά αιμοσφαίρια





- Αν η μόλυνση συνεχίζει να υφίσταται (π.χ. Biofilms).
- Διαταραχή/ανεπάρκεια φλεγμονής ή σε κάποια ρύθμιση.
- Κάποιες βιοϊατρικές συσκευές (που συμπεριλαμβάνουν τοξικά υλικά).
- Συνεχής παραγωγή κυτταροκινών.
- Υψηλός βαθμός ίνωσης συχνά παρατηρείται γύρω από υψηλή φλεγμονή.
- Η εμφάνιση των μακροφάγων αλλάζει και γίνεται σαν αυτή του επιθηλίου.
- Σύντηξη με γιγάντια κύτταρα ξένων σωμάτων.
- Χρόνια έκκριση κυτταροτοξικών παραγόντων.
- Κοκκώδης ιστός:
 - ✓ Ομάδες χρόνιων ενεργοποιημένων μακροφάγων περιβάλλονται από υψηλά ποσοστά ίνωσης.
 - ✓ Νέκρωση στο κέντρο του ιστού.
 - ✓ Συχνά επεμβαίνει στη λειτουργία των ιστών και έχει αντίκτυπο στην απόδοση των βιοϋλικών.
- Παραδείγματα: χρόνια ενεργοποιημένα μακροφάγα προκαλούν οστεόλυση στα οστά, καταστροφή χόνδρου των αρθρώσεων, και σχετίζονται με την τοξικότητα των νευρώνων στις διαταραχές CNS φλεγμονών.

Νευροτοξικότητα μέσω μακροφάγων στην ιογενή σχιζοφρένεια



Allen & Attwell (p676-678)
and Bezzi et al. Nat Neurosci 4:702-710 (2001)

TABLE 1 Properties of the "Big 12" Plasma Proteins V

Protein	Plasma concentration		Molecular weight (kDa)
	g/l-mg/ml	μmol	
Albumin	40	600	66
IgG	8-17	53-113 100*	150
LDL	4.0	2	2,000
HDL	3	18	170
α-Macroglobulin	2.7	3.3	725
Fibrinogen	2-3	6-9 7.5	340
Transferrin	2.3	30	77
α-Antitrypsin	2	40	(51) 54 (45)
Haptoglobins	2.0	20	100
	1.6-3.0	8-1.5	200
	1.2-2.6	3-6.6	400
C3	1.6	9	180
IgA	1-4	7-27 15*	150
IgM	0.05-2	0.06-2 1*	900

Note: Numbers used for calculation of $CD^{1/2}$ are indicated t

Adapted from Amrade, J. D. and Hlady, V., *Ann. N.Y. Ac*

TABLE 2 Quantitation of Absorbed Proteins by Point Counting Method^a

Protein	Dacron [®]	ePTFE ^b	PDMS ^c	PE ^d
Albumin	227 ± 22	268 ± 27	408 ± 40	396 ± 300
Fibrinogen	145 ± 12	230 ± 20	125 ± 13	369 ± 35
IgG	174 ± 16	270 ± 41	332 ± 28	341 ± 35
Hemoglobin	205 ± 26	32 ± 2	219 ± 39	149 ± 20
Fibronectin	62 ± 14	78 ± 10	182 ± 13	369 ± 35
Factor VIII	60 ± 10	81 ± 22	56 ± 10	124 ± 10
Hageman factor	79 ± 12	106 ± 12	79 ± 13	83 ± 8
PBS control	26 ± 2	10 ± 5	76 ± 10	24 ± 4
Herpes virus	59 ± 16	29 ± 2	95 ± 16	25 ± 3
A-fetoprotein	25 ± 2	14 ± 2	37 ± 9	26 ± 2

^a Number of beads × 10⁷/cm².

^b Expanded polytetrafluoroethylene.

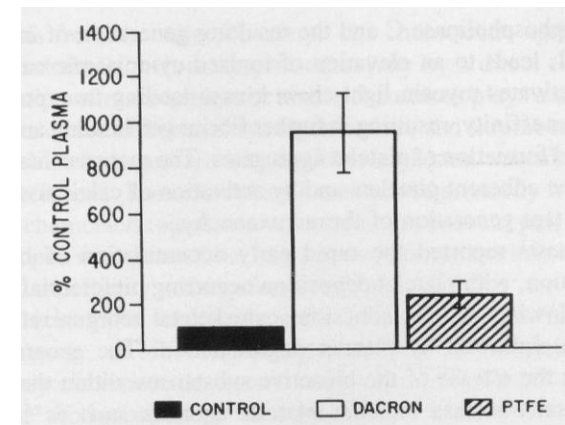
^c Polydimethylsiloxane.

^d Polyethylene.

Adapted from Pankowsky, D. A., Ziats, N. P., Topham, N. S., Ratnoff, O. D., and Anderson, J. M., *J. Vasc. Surg.*, 11, 599, 1990.

- Σοβαρό πρόβλημα η αιμοδιάλυση, στις εξωσωματικές συσκευές με μεγάλες επιφάνειες.
- Προκαλεί φλεγμονώδη γεγονότα στο σύστημα και ελάττωση φαγοκυττάρων αίματος.
- Η έκταση της προσρόφησης του συμπληρώματος διαφέρει στις τεχνητές επιφάνειες.
- Η ενεργοποίηση φαίνεται να γίνεται μέσω εναλλακτικού μονοπατιού.
- Υποθέτουμε ότι μετά την απορρόφηση του C3 έχουμε υδρόλυση του θειοεστέρα.
- Ο σχηματισμός C3 κονβερτάσης δεν απαιτεί υδροξυλικές ή αμινοομάδες στα βιοϋλικά (διαφέρει σε σχέση με τα βιολογικά υλικά).
- Η δέσμευση των παραγόντων B και H είναι ανεξάρτητη από την ενεργοποίηση του συμπληρώματος.
- Οι υδρόφοβοι προτιμούν τον παράγοντα H και οι υδρόφιλοι τον παράγοντα B, επομένως κάποιες υδρόφιλες επιφάνειες είναι στην πραγματικότητα ισχυροί καταλύτες της ενεργοποίησης του συμπληρώματος.
- Το στρώμα ινωδογόνου είναι αρκετό για να επιφέρει την προσκόλληση και την ενεργοποίηση των μακροφάγων χωρίς προσροφημένου συμπληρώματος ή IgG.

Επίπεδα απελευθέρωσης C5a





Βιβλιογραφικές αναφορές

- J. Park and R.S. Lakes, Biomaterials an Introduction, 3rd Edition, Springer, New York, 2007.
- B.D. Ratner, A.S. Hoffman, Biomaterials Science, 2nd Edition: An Introduction to Materials in Medicine, Elsevier Academic Press, San Diego, 2004.
- Biomaterials, Edited by J.Y. Wang and J.D. Bronzino, CRC Press, Boca Raton, 2007.
- Patric Tresco, Biomaterials course, University of Utah
- Materials Science and Engineering - An Introduction, 4th Ed, WD Callister, Jr.
- Cellular and Molecular Immunology, 5th ed 2003, Berry, Michael J
- Abbas, Cellular and Molecular Immunology, 5th ed 2003
- www.centreforcancerbiology.org.au
- Allen & Attwell (p676-678) and Bezzi et al. Nat Neurosci 4:702 – 710 (2001)
- Greco, Implantation Biology, 1994