

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ  
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΟΡ. ΤΣΟΛΑΣ

ΚΑΙ

ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΟ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΟ-ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΟ  
ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΘΗΝΩΝ "Ο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ"  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ  
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΔΡ. Μ. ΠΑΠΑΜΙΧΑΗΛ

---

**Μελέτη της Αντικαρκινικής δράσης της  
Προθυμοσίνης α: Ανάλυση των επιμέρους  
ενισχυτικών φαινομένων σε ρυθμιστικές και  
κυτταροτοξικές λειτουργίες του  
Ανοσολογικού Συστήματος**

**Άγγελος Δ. Γκριτζάπης  
Βιολόγος**

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 1996



ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



02600345708



## ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

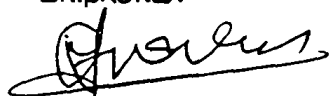
Εγινε σύσκεψη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής στις 18 Μαρτίου 1997 και ώρα 18:00, στην αίθουσα της βιβλιοθήκης του Εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας, μετά από πρόσκληση του Διευθυντού του Εργαστηρίου και επιβλέποντος Καθηγητή Ορ. Τσόλα, για την διαδικασία αξιολόγησης και κρίσης της διδακτορικής διατριβής του κ. Αγγελου Γκριτζάπη, με τίτλο: "Μελέτη της Αντικαρκινικής δράσης της Προθυμοσίνης α: Ανάλυση των επιμέρους ενισχυτικών φαινομένων σε ρυθμιστικές και κυτταροτοξικές λειτουργίες του Ανοσολογικού Συστήματος".

Προσήλθε ο κος Αγγελος Γκριτζάπης, ο οποίος ανέπτυξε το θέμα της διατριβής του, του έγιναν ερωτήσεις από την Επιτροπή και απεχώρησε. Στην συνέχεια η Επιτροπή έκρινε το πρωτότυπο του περιεχομένου της διατριβής, την ουσιαστική συμβολή στην επιστήμη, καθώς και την επάρκεια του υποψήφιου στο γνωστικό αντικείμενο της διατριβής του. Ακολούθησε ψηφοφορία, όπου εγκρίθηκε παμψηφεί η διδακτορική διατριβή με βαθμό "ΑΡΙΣΤΑ"

### ΤΑ ΜΕΛΗ

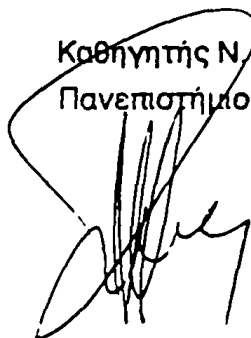


Καθηγητής Ορ. Τσόλας  
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων  
Επιβλέπων

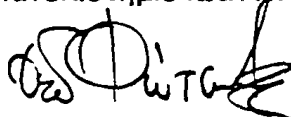


Καθηγητής Ν. Αγκάντη  
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

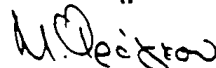
Καθηγητής Ν. Παυλίδης  
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων



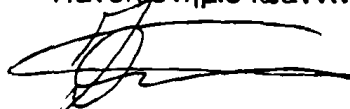
Αναπλ. Καθηγητής Κ. Σεφεριάδης  
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων



Αναπλ. Καθηγητής Θ. Φώτης  
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων



Επικ. Καθηγήτρια Μ. Φράγκου  
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων



Επικ. Καθηγητής Δ. Γαλάρης  
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων



Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Ιωαννίνων  
Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας  
Διευθυντής: Καθηγητής Ορ. Τσόλας

και

Περιφερειακό Αντικαρκινικό - Ογκολογικό Νοσοκομείο  
Αθηνών, "Ο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ" Εργαστήριο Ανοσολογίας  
Διευθυντής: Δρ. Μ. Παπαμιχαήλ

**Μελέτη της Αντικαρκινικής δράσης της  
Προθυμοσίνης α: Ανάλυση των επιμέρους  
ενισχυτικών φαινομένων σε ρυθμιστικές και  
κυτταροτοξικές λειτουργίες του  
Ανοσολογικού Συστήματος**

**Αγγελος Δ. Γκριτζάπης**  
Βιολόγος

Ιωάννινα 1996



Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή  
δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα.

*(Νόμος 5343/32, άρθρο 202, παράγραφ.2).*



---

*Στους γονείς μου  
και στον αδελφό μου*



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η προθυμοσίνη α είναι ένα πολυπεπτίδιο που δείχνει βιολογική ενεργότητα. Πρώτα απομονώθηκε από θύμο επίμου στη συνέχεια βρέθηκε και σε άλλους ιστούς. Επίσης βρέθηκε στον ανθρώπινο θύμο όπως και στα ανθρώπινα λευκοκύτταρα. Το πολυπεπτίδιο αποτελείται από μια αλληλουχία 109 αμινοξέων, όπου στο αμινοτελικό της άκρο στον άνθρωπο και στον επίμου είναι ίδιο με αυτό της θυμοσίνης α1, ένα πεπτίδιο 28 αμινοξέων που είναι επίσης βιολογικά ενεργό και έχει απομονωθεί από εκχύλισμα θύμου.

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η επίδραση της ProTa στην ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των βοηθητικών T<sub>H</sub> λεμφοκυττάρων σε *in vitro* σύστημα ενεργοποίησης παρουσία τοξοειδούς του τετάνου, η ενισχυτική της επίδραση στις δυσλειτουργίες λεμφοκυττάρων από καρκινοπαθείς όπως αύξηση στην ΕΜΛΑ, αύξηση της CML και NK κυτταροτοξικότητας, ενίσχυση της LAK κυτταροτοξικότητας, η επαγωγή της LAK κυτταροτοξικότητας σε μυς μετά την *in vivo* χορήγηση ProTa και η αύξηση της δια των CD8+ λεμφοκυττάρων επιτελούμενης κυτταροτοξικότητας εναντίον αυτόλογων καρκινικών κυττάρων μετά την *in vivo* χορήγηση λευχαιμικών κυττάρων και ProTa σε μυς.

Η εργασία αυτή άρχισε το 1992 και ολοκληρώθηκε στο εργαστήριο Ανοσολογίας του Κέντρου Ογκολογικής Έρευνας "Γ. Παπανικολάου" του Ελληνικού Αντικαρκινικού Ινστιτούτου.

Ευχαριστώ τον Διευθυντή του τμήματος Ανοσολογίας Δρ. Μ. Παπαμιχαήλ για τις πολύτιμες υποδείξεις του κατά τη διάρκεια της μελέτης καθώς και την καθοδήγηση κατά τη διάρκεια της συγγραφής του παρόντος.

Ευχαριστώ θερμά το συνεργάτη Δρ. Κ. Μπαξεβάνη για την ανεκτίμητη βοήθεια του στην διάρκεια εκπόνησεως και συγγραφής της μελέτης αυτής.



Ευχαριστώ τον επιβλέποντα της διατριβής μου, Διευθυντή του Εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Καθηγητή Ορέστη Τσόλα για το ενδιαφέρον του και την ειλικρινή βοήθεια του για την περάτωση της εργασίας αυτής. Επίσης τον ευχαριστώ για τα δείγματα της ProTa που μου παρείχε. Ευχαριστώ τον κ. Κ.Σεφεριάδη, Αναπληρωτή Καθηγητή Βιολογικής Χημείας και τον κ. Δ.Γαλάρη, Επίκουρο Καθηγητή Βιολογικής Χημείας, για την συμμετοχή τους στην Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή ως και τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής κ. Ν.Ι. Αγνάντη Καθηγητή Παθολογικής Ανατομίας, κ. Ν.Παυλίδη Καθηγητή Παθολογίας/Ογκολογίας, κ. Θ.Φώτση, Αναπληρωτή Καθηγητή Βιολογικής Χημείας και Μ. Φράγκου-Λαζαρίδη, Επίκουρου Καθηγήτριας Βιολογικής Χημείας, για τις παρατηρήσεις τους.

Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Αναπληρωτή Καθηγητή του Τομέα Ζωολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Α. Χαρίτο και ιδιαίτερα τη συνεργάτιδα του Δρ.Ράνια Τσιτσιλώνη για τα δείγματα της ProTa που μου παρείχαν.

Επίσης ευχαριστώ τον Δρ. Ιωάννη Μισιτζή για τα δείγματα βιολογικών υλικών που μου παρείχε καθώς και τους φίλους και συναδέλφους Δρ. Σπανάκο Γρηγόρη, Δρ. Δεδούση Γεώργιο και Δρ. Παπαδόπουλο Νίκο για τις εποικοδομητικές τους συμβουλές κατά την εξέλιξη των πειραμάτων μας.

Περισσότερο απ' όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου για την αμέριστη συμπαράσταση τους στις δύσκολες περιόδους που πέρασα κατά τη διάρκεια της εργασίας αυτής καθώς και την κ. Αναστασία Κρέζου για την συμβολή της στην συγγραφή της παρούσης διατριβής.





## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

### ▣ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

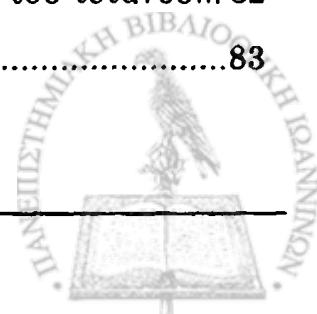
1.1	Γενικά περί ανοσολογικού συστήματος.....	1
1.2	Το λεμφικό σύστημα.....	3
1.3	Λεμφική κυκλοφορία.....	4
1.4	T κύτταρα.....	6
1.4.1	T λεμφοκύτταρα και υποπληθισμοί.....	9
1.4.2	Ο υποδοχέας των T κυττάρων.....	12
1.4.3	Κυτταροτοξικότητα εκδηλούμενη απο λεμφοκύτταρα (Lymphocyte-mediated cytotoxicity).....	13
1.5	B λεμφοκύτταρα.....	14
1.6	Σύστημα μακροφάγων/μονοκυττάρων (Ma/Mo).....	15
1.7	Προϋποθέσεις για την εκδήλωση της ανοσολογικής απάντησης.....	17
1.7.1	Αντιγόνα του Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας.....	17
1.7.2	Αντιγόνα ιστοσυμβατότητας τάξεως I.....	18
1.7.3	Αντιγόνα Ιστοσυμβατότητας τάξεως II.....	20
1.8	Κυτταροκίνες.....	22
1.9	Ανοσολογία και καρκίνος.....	26
1.10	Λεμφοειδή κύτταρα με ενεργότητα ενάντια στον καρκίνο και μηχανισμοί ενεργοποίησής τους.....	27
1.10.1.1	Ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων.....	28
1.10.1.2	Μετάφραση των μηνυμάτων στα λεμφοκύτταρα.....	31
1.10.2.1	Κύτταρα φυσικοί φονείς.....	33
1.10.2.2	Επιφανειακοί δείκτες που χαρακτηρίζουν τα NK κύτταρα.....	35
1.10.2.3	Υποπληθυσμοί των NK κυττάρων.....	36
1.10.2.4	Μεταφορά των μηνυμάτων στα NK κύτταρα.....	38
1.10.2.5	Ρύθμιση της ενεργοποίησης των NK κυττάρων.....	40
1.10.2.6	Ο ρόλος των NK κυττάρων στην ανοσοεπιτήρηση των όγκων.....	41



1.10.4.	Μηχανισμοί καταστροφής των κυττάρων στόχων .....	45
1.11	Καρκινικά Κυττάρικα Αντιγόνα (ΚΚΑ, tumor associated antigens) .....	47
1.12	Ειδικές ανοσοαπαντήσεις λεμφοκυττάρων σε ανθρώπινες νεοπλασίες .....	49
1.13	TIL .....	55
1.14	Προθυμοσίνη α (Prothymosin α, ProTa) .....	58
1.15	Προθυμοσίνη α και θυμοσίνη α1 .....	59
1.16	Κατανομή στους ιστούς και βιολογικές ιδιότητες.....	62
1.17	Σκοπός της διατριβής .....	64

## ▣ ΥΛΙΚΑ και ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1	Υλικά .....	67
2.2	Διαλύματα.....	69
2.3	Κατάψυξη και απόψυξη κυττάρων .....	70
2.4	Μέτρηση βιωσιμότητας.....	70
2.5	Ανοσοφθορισμός .....	71
2.6	Απομόνωση μονοπυρήνων λεμφοκυττάρων από περιφερικό αίμα ανθρώπου .....	71
2.7	Απομόνωση μονοκυττάρων .....	72
2.8	Απομόνωση T λεμφοκυττάρων .....	73
2.9	Απομόνωση CD4+ και CD8+ λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών.....	74
2.10	Κυτταρικές σειρές.....	76
2.11	Ετερόλογη μικτή λεμφοκυτταρική αντίδραση .....	76
2.12	CML δοκιμασία .....	80
2.13	NK δοκιμασία.....	81
2.14	Συλλογή υπερκείμενων από in vitro καλλιέργειες ΕΜΛΑ και NK.....	82
2.15	In vitro ανοσολογική απάντηση παρουσία τοξοειδούς του τετάνου... 82	
2.16	Καλλιέργειες LAK κυττάρων.....	83



2.17	Απομόνωση και καλλιέργεια των TIL .....	84
2.18	Απομόνωση και καλλιέργεια EAMNC .....	85
2.19	Έλεγχος της κυτταροτοξικής δράσης .....	86
2.20	Απομόνωση μονοπυρήνων λεμφοκυττάρων από σπλήνα μυός.....	86
2.21	Συλλογή υπερκείμενων από in vitro καλλιέργειες σπληνοκυττάρων μυός .....	87
2.22	Μέτρηση του ποσοστού των σπληνοκυττάρων με ανοσοφθορισμό	87
2.23	Απομόνωση υποπληθυσμών CD4+ και CD8+ λεμφοκυττάρων από σπληνοκύτταρα μυός.....	88
2.24	Απομόνωση NK+ κυττάρων από σπληνοκύτταρα μυός.....	89
2.25	Πολλαπλασιασμός CD4+ ή CD8+ εναντίον καρκινικών σειρών ...	90
2.26	Ποσοτικός προσδιορισμός της παραγωγής IL-2, IL-4, IL-6, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , PGE-2.....	90
2.27	Ασθενείς.....	91
2.28	Πειραματόζωα.....	92

## ▣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

In vitro σύστημα ενεργοποίησης του ανοσολογικού συστήματος παρουσία τοξοειδούς του τετάνου .....	93
Η ProTa εκδηλώνει τη δράση της μέσω της αύξησης των κυτταροκινών IL-2, TNF $\alpha$ και IL-1 $\beta$ .....	102
Ο ασθενείς με καρκίνο παρουσιάζουν ελαττωμένη MAA και χαμηλή κυτταροτοξική ικανότητα. Συσχέτιση με τα επίπεδα IL-2 και PGE-2 και δράση της ProTa .....	108
Κατάταξη των ασθενών με βάση τον τύπο και το στάδιο της νόσου.....	109
Ανάλυση της ετερόλογης T εκδηλούμενης κυτταροτοξικότητας CML σε υγιείς δότες και καρκινοπαθείς.....	115
Σύγκριση της NK ενεργότητας που εκδηλώνεται από καρκινοπαθείς και υγιείς. Δράση της ProTa .....	119
Εμμεσος μηχανισμός δράσης της ProTa.....	122



Σύγκριση μεταξύ της δράσης της ProTa, IL-2, ινδομεθακίνης στην NK κυτταροτοξικότητα και στη CML.....	125
Συnergιστική δράση της ProTa και IL-2 στην ενίσχυση της κυτταροτοξικότητας των TIL και EAMNC.....	128
Συnergιστική δράση ProTa στα LAK κύτταρα .....	158
Κυτταροτοξικότητα εναντίον καρκινικών κυττάρων και δράση της ProTa.....	172
Πρωτόκολλο χορήγησης ProTa σε DBA/2 μυσ .....	173
Η επίδραση της ProTa σε DBA/2 μυσ αυξάνει την NK και LAK κυτταροτοξικότητα .....	173
Επίδραση της ProTa στο φαινότυπο των σπληνοκυττάρων .....	175
In vitro επίδραση της ProTa σε σπληνοκύτταρα DBA/2 μυών.....	176
Εμμεση in vitro δράση της ProTa σε σπληνοκύτταρα DBA/2 μυών.....	181
Πρωτόκολλο ταυτόχρονης χορήγησης ProTa και L1210 κυττάρων με σκοπό την ανίχνευση CTL κυτταροτοξικότητας.....	183
Μελέτη της εμφάνισης ασκίτη στις διάφορες ομάδες μυών.....	185
Κυτταροτοξικότητα που εκδηλώνεται από τα σπληνοκύτταρα .....	187
T κυτταροτοξικότητα (CML).....	191
Κυτταροτοξικότητα από NK κύτταρα.....	193
Περιορισμός της T ενεργότητας από τάξης I μόρια του MΣΙ .....	196
Συμμετοχή των CD4+ κυττάρων στη ρύθμιση της κυτταροτοξικότητας.....	198
Τα ΚΤΛ κύτταρα είναι CD8+ .....	201
Συnergασία των CD4+ και CD8+ κυττάρων για την εκδήλωση κυτταροτοξικότητας.....	204
<b>▣ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>207</b>
<b>▣ ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>	<b>215</b>
<b>▣ SUMMARY.....</b>	<b>217</b>
<b>▣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	



## ΣΧΗΜΑΤΑ

Σχήμα	1	Λεμφική κυκλοφορία.....	5
Σχήμα	2	Αλληλουχία αμινοξέων ProTa.....	61
Σχήμα	3	Σχηματική παράσταση ΕΜΛΑ.....	79
Σχήμα	4	Σύγκριση ετερόλογης κυτταροτοξικότητας εναντίον μονοπύρηνων κυττάρων, μεταξύ υγιών δοτών και καρκινοπαθών .....	116
Σχήμα	5	Ετερόλογη CML ενεργότητα των μονοπυρήνων κυττάρων υγιών δοτών και καρκινοπαθών, παρουσία ή απουσία ProTa .....	118
Σχήμα	6	Σύγκριση της NK κυτταροτοξικότητας μεταξύ υγιών δοτών και καρκινοπαθών Δράση της ProTa .....	121
Σχήματα	7-9	Κυτταροτοξική δράση TIL από Ca πνεύμονα. Δράση της ProTa .....	129
Σχήμα	10	Κυτταροτοξική δράση TIL από Ca νεφρού. Δράση της ProTa .....	132
Σχήματα	11-13	Κυτταροτοξική δράση TIL από μελάνωμα. Δράση της ProTa .....	133
Σχήματα	14-27	Κυτταροτοξική δράση TIL από Ca μαστού. Δράση της ProTa .....	136
Σχήματα	28-31	Κυτταροτοξική δράση ΕΑΜΝC από Ca πνεύμονα. Δράση της ProTa .....	151
Σχήματα	32-34	Κυτταροτοξική δράση ΕΑΜΝC από Ca ωοθήκης. Δράση της ProTa .....	155
Σχήματα	35-41	Κυτταροτοξική δράση LAK από Ca μαστού. Δράση της ProTa .....	159
Σχήματα	42-44	Κυτταροτοξική δράση LAK από Ca πνεύμονα. Δράση της ProTa .....	166
Σχήματα	45-47	Κυτταροτοξική δράση LAK από Ca ωοθήκης. Δράση της ProTa .....	169

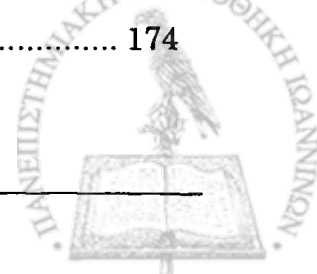


Σχήμα	48	NK και LAK κυτταροτοξικότητα σε DBA/2 μύς. In vivo δράση της ProTa.....	177
Σχήμα	49	Φαινοτυπικές αλλαγές σε σπληνοκύτταρα DBA/2 μυών απουσία ή παρουσία ProTa .....	179
Σχήμα	50	Σύγκριση της in vitro δράσης της ProTa και IL-2 στην NK και LAK κυτταροτοξικότητα σε σπληνοκύτταρα DBA/2 μυών .....	180
Σχήμα	51	Σύγκριση παραγωγής IL-2, TNFα σε καλλιέργειες σπληνοκυττάρων DBA/2 μυών, παρουσία ή απουσία ProTa .....	182
Σχήμα	52	Σύγκριση NK και LAK κυτταροτοξικότητας από σπληνοκύτταρα μεταξύ διαφορετικών ομάδων DBA/2 μυών .....	188
Σχήμα	53	Κυτταροτοξικότητα από T λεμφοκύτταρα .....	192
Σχήμα	54	Κυτταροτοξικότητα από NK 1.1+ κύτταρα απομονωμένα από σπληνοκύτταρα DBA/2 μυών .....	195



## ΠΙΝΑΚΕΣ

<b>Πίνακας</b>	<b>1</b>	Επίπεδα άμυνας του ΑΣ.....	2
<b>Πίνακας</b>	<b>2</b>	Οργάνωση ανασυνδυασμένου TCR γονιδίου.....	8
<b>Πίνακας</b>	<b>3</b>	Κυριότερες κυτταροκίνες.....	25
<b>Πίνακας</b>	<b>4</b>	Επίδραση του ΤΤ στη διέγερση των CD4+ λεμφοκυττάρων.....	95
<b>Πίνακες</b>	<b>5-7</b>	Ομαδοποιημένα αποτελέσματα δράσης της ProTa σε CD4+ λεμφοκύτταρα παρουσία ΤΤ.....	99
<b>Πίνακας</b>	<b>8</b>	Επίπεδα της IL-2 σε κυτταροκαλλιέργειες παρουσία ή απουσία ProTa.....	105
<b>Πίνακας</b>	<b>9</b>	Επίπεδα της IL-1β σε κυτταροκαλλιέργειες παρουσία ή απουσία ProTa.....	105
<b>Πίνακας</b>	<b>10</b>	Επίπεδα της TNFα σε κυτταροκαλλιέργειες παρουσία ή απουσία ProTa.....	106
<b>Πίνακας</b>	<b>11</b>	Επίπεδα της IFN-γ σε κυτταροκαλλιέργειες παρουσία ή απουσία ProTa.....	106
<b>Πίνακας</b>	<b>12</b>	Επίπεδα της IL-6 σε κυτταροκαλλιέργειες παρουσία ή απουσία ProTa.....	107
<b>Πίνακας</b>	<b>13</b>	Συνολικά αποτελέσματα της δράσης της ProTa στα επίπεδα παραγωγής κυτταροκινών κατά την ημέρα της μέγιστης παραγωγής τους.....	107
<b>Πίνακας</b>	<b>14</b>	Καρκινοπαθείς που εξετάστηκαν στη CML δοκιμασία.....	110
<b>Πίνακας</b>	<b>15</b>	ΕΜΛΑ σε υγιείς και καρκινοπαθείς. Δράση της ProTa.....	113
<b>Πίνακας</b>	<b>16</b>	Ομαδοποίηση κατανομής ιδανικών δόσεων ProTa σε καρκινοπαθείς και υγιείς.....	114
<b>Πίνακας</b>	<b>17</b>	Μέτρηση της IL-2 και PGE-2 σε καλλιέργειες ΕΜΛΑ και κατά τη διάρκεια της NK κυτταροτοξικότητας.....	124
<b>Πίνακας</b>	<b>18</b>	Επίδραση της ProTa στη CML και NK κυτταροτοξικότητα μέσω αύξησης επιπέδων IL-2 και μείωσης των επιπέδων PGE-2.....	127
<b>Πίνακας</b>	<b>19</b>	Πρωτόκολλο χορήγησης ProTa σε DBA/2 μύς.....	174



<b>Πίνακας 20</b>	Ομάδες DBA/2 μυών σύμφωνα με το πρωτόκολλο χορήγησης ProTa και L1210 κυττάρων .....	184
<b>Πίνακας 21</b>	Εμφάνιση ασκίτη στις διάφορες ομάδες μυών .....	186
<b>Πίνακας 22</b>	Περιορισμός από το τάξης I ΜΣΙ αντιγόνο H2K <sup>d</sup> της επαγόμενης από ProTa T κυτταροτοξικότητας .....	197
<b>Πίνακας 23</b>	Πολλαπλασιασμός και περιορισμός μέσω της τάξης II ΜΣΙ αντιγόνου IA CD4+ λεμφοκυττάρων κατόπιν in vivo και in vitro διέγερσης με L1210 .....	200
<b>Πίνακας 24</b>	Η παρατηρούμενη κυτταροτοξικότητας από CD8+ λεμφοκύτταρα είναι ειδική για L1210 κύτταρα .....	203
<b>Πίνακας 25</b>	Ρύθμιση της CD8+ εκδηλούμενης κυτταροτοξικότητας εναντίον των L1210 κυττάρων από CD4+ λεμφοκύτταρα .....	206





## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

<b>ΑΜΛΑΑ</b>	Αυτόλογη Μικτή Λεμφοκυτταρική Αντίδραση
<b>ΑΣ</b>	Ανοσολογικό Σύστημα
<b>ΑΡC</b>	Antigen Presenting Cell, Κύτταρα Παρουσιαστές του Αντιγόνου
<b>ΑDCC</b>	Antibody Dependent Cytotoxicity
<b>B7</b>	CD80 Ατιγόνο των Β κυττάρων και των Μα/Μο
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumin, Αλβουμίνη Ορού Μόσχου
<b>CD2</b>	Cluster of designation 2
<b>CD3</b>	Cluster of designation 3
<b>CD4</b>	Cluster of designation 4
<b>CD8</b>	Cluster of designation 8
<b>CD11a/CD18</b>	Cluster of designation 11a/18
<b>CD16</b>	Cluster of designation 16
<b>CD19</b>	Cluster of designation 19
<b>CD28</b>	Cluster of designation 28
<b>CD29</b>	Cluster of designation 29
<b>CD43</b>	Cluster of designation 43
<b>CD44</b>	Cluster of designation 44
<b>CD45RA</b>	Cluster of designation 45RA
<b>CD45RO</b>	Cluster of designation 45RO
<b>CD57</b>	Cluster of designation 57
<b>cpm</b>	counts per minute, κρούσεις ανά λεπτό
<b>CML</b>	Cell Mediated Lymplolysis
<b>CTL, ΚΤΑ</b>	Cytotoxic T lymphocytes, Κυτταροτοξικά Τ Λεμφοκύτταρα
<b>DAG</b>	Διακυλογλυκερόλη
<b>EAMNC</b>	Effusion Associated Mononuclear Cells
<b>ΕΜΛΑΑ</b>	Ετερόλογη Μικτή Λεμφοκυτταρική Αντίδραση



<b>FcγR</b>	Fragment Complement gamma Receptor, υποδοχέας του τμήματος γ του συμπληρώματος
<b>FCS</b>	Foetal Calf Serum, Εμβρυϊκός Ορός Μόσχου
<b>GTP</b>	Τριφωσφορική Γουανοσίνη
<b>HEPES</b>	N-2-υδροξυαιθυλοπιπεραζινο-N-2-αιθανοσουλφονικό οξύ
<b>HLA</b>	Human Leukocyte Antigen
<b>HBSS</b>	Hanks' Balanced Salt Solution, Εξισορροπημένο Διάλυμα Αλάτων του Hanks
<b>ICAM</b>	InterCellular Adhesion Molecule
<b>IgG</b>	Immunoglobulin G, ανοσοσφαιρίνη γ
<b>IFNα, γ</b>	Ιντερφερόνη α, γ.
<b>IP3</b>	Τριφωσφορικός Ινοσίτης
<b>IL-1</b>	Ιντερλευκίνη 1
<b>IL-2</b>	Ιντερλευκίνη 2
<b>IL-4</b>	Ιντερλευκίνη 4
<b>IL-6</b>	Ιντερλευκίνη 6
<b>IL-7</b>	Ιντερλευκίνη 7
<b>KKA</b>	Καρκινικά Κυτταρικά Αντιγόνα
<b>KTA</b>	Κυτταροτοξικά Τ Λεμφοκύτταρα
<b>LFA1,3</b>	Lymphocyte Function Antigen 1,3
<b>LAK</b>	Lymphokine Activated Killers
<b>LGL</b>	Large Granular Lymphocytes
<b>Μα/Μο</b>	Μακροφάγα/Μονοκύτταρα.
<b>MALT</b>	Mucosa Associated Lymphoid Tissue
<b>MHC, ΜΣΙ</b>	Major Histocompatibility Complex, Μείζον Σύστημα Ιστοσυμβατότητας
<b>ΜΣΙ</b>	Μείζον Σύστημα Ιστοσυμβατότητας
<b>MLTC</b>	Mixed Lymphocyte Tumor Culture
<b>NCAM</b>	Neural Cell Adhesion Molecule



---

<b>NK</b>	Natural Killer cell(s), κύτταρα φυσικοί φονείς
<b>πΚΤΛ</b>	Πρόδρομα Κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>p56lck</b>	πρωτεϊνική κινάση 56lck
<b>PKC</b>	πρωτεϊνική κινάση C
<b>PLC</b>	Φωσφολιπάση C
<b>ProTα, Προ-α</b>	Prothymosin α, Προθυμοσίνη α
<b>TAA, ΚΚΑ</b>	Tumor Associated Antigen,Καρκινικά Κυτταρικά Αντιγόνα
<b>TAP 1,2</b>	Transporter and Antigen Presentation 1,2
<b>Tα1</b>	Thymosin α1,θυμοσίνη α1
<b>Tα11</b>	Thymosin α11,θυμοσίνη α11
<b>Tβ4</b>	Thymosin β4,θυμοσίνη β4
<b>TF5</b>	Thymosin Fraction 5
<b>Th</b>	T helper,Τ βοηθητικά λεμφοκύτταρα
<b>TT</b>	Tetanus Toxoid, Τοξοειδές του Τετάνου
<b>TIL</b>	Tumor Infiltrating Lymphocytes, κύτταρα που διηθούν τον όγκο
<b>VLA</b>	Very Late Antigen

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

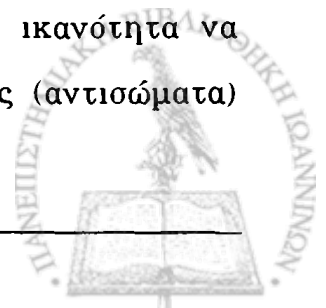
### 1.1 Γενικά περί ανοσολογικού συστήματος.

Το ανοσολογικό σύστημα των σπονδυλωτών έχει αναπτυχθεί για την προστασία των ανώτερων οργανισμών από ένα μεγάλο αριθμό παραγόντων που υπάρχουν στο περιβάλλον. Παρέχει τη δυνατότητα στους ανώτερους οργανισμούς να διακρίνουν τα "ξένα" μόρια από τα μόρια που ενυπάρχουν σε αυτούς. Τα "ξένα" μόρια αναγνωρίζονται από το ανοσολογικό σύστημα και προκαλούν την ενεργοποίησή του. Υπάρχουν δύο επίπεδα άμυνας, απέναντι σε εξωτερικούς παράγοντες: η μη ειδική ανοσολογική απάντηση και η ειδική ανοσολογική απάντηση. Η βασική διαφορά τους συνίσταται στο ότι η δεύτερη χαρακτηρίζεται από ειδικότητα και από ανοσολογική μνήμη.

Η μη ειδική ανοσολογική απάντηση περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό παραγόντων. Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος έχει σαν αποτέλεσμα τη σύνδεση των στοιχείων του με εισβάλλοντα βακτήρια και των καταστροφή των τελευταίων είτε από μακροφάγα είτε από τα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα. Η μη ειδική ανοσολογική απάντηση εναντίον ιικών σωματιδίων κυρίως εκδηλώνεται μέσω των κυττάρων φυσικών φονέων (NK cells). Τα παραπάνω κύτταρα ενεργοποιούνται από τις ιντερφερόνες α και β, που εκκρίνονται από λευκοκύτταρα και από μολυσμένα με ιούς κύτταρα.

Στην ειδική ανοσολογική απάντηση το ερέθισμα προκαλεί την παραγωγή ειδικών κυτταρικών προϊόντων από εξειδικευμένα κύτταρα του οργανισμού και είναι παρούσα μόνο στα σπονδυλόζωα. Οι βασικοί κυτταρικοί τύπου που συμμετέχουν στο παραπάνω φαινόμενο είναι τα Β και Τ λεμφοκύτταρα και τα κύτταρα που έχουν τη δυνατότητα παρουσίασης αντιγόνου (Antigen presentings cell, APC).

Ο όρος αντιγόνο χαρακτηρίζει ένα μόριο που έχει την ικανότητα να συνδέεται με προϊόντα της ειδικής ανοσολογικής απάντησης (αντισώματα)



χωρίς όμως απαραίτητα να προκαλεί τη δημιουργία τους. Στη δεύτερη περίπτωση χρησιμοποιείται ο όρος ανοσογόνο (immunogen).

**ΠΙΝΑΚΑΣ 1** Επίπεδα άμυνας του ΑΣ

	Μη ειδική ανοσολογική απάντηση	Ειδική ανοσολογική απάντηση
Φυσικοί φραγμοί	Δέρμα, βλεννογόνοι	
Διαλυτοί παράγοντες	Ενζυμα (λύσοζύμη συμπλήρωμα) α & β ιντερφερόνες, πρωτεΐνες οξειάς φάσης	Αντισώματα, Λεμφοκίνες
Κύτταρα	Μακροφάγα, πολυμορφοπύρηνα, ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα, κύτταρα φυσικοί φονείς.	Τ και Β λεμφοκύτταρα
Διάκριση	Ναι	Ναι
Ειδικότητα	Όχι	Ναι
Μνήμη	Όχι	Ναι

Η ενεργοποίηση του ανοσολογικού συστήματος, εκδηλώνεται μέσω χυμικών (humoral) και κυτταρικών διαδικασιών. Οι χυμικές διαδικασίες σχετίζονται κυρίως με την παραγωγή αντισωμάτων από τα Β λεμφοκύτταρα ενώ οι κυτταρικές διαδικασίες χαρακτηρίζουν τις αντιδράσεις που προκαλούνται από τα Τ λεμφοκύτταρα.

Σε κατάσταση ηρεμίας όλοι οι παράγοντες του ανοσολογικού συστήματος βρίσκονται σε μία δυναμική ισορροπία εξασφαλίζοντας την ομοιότητα.



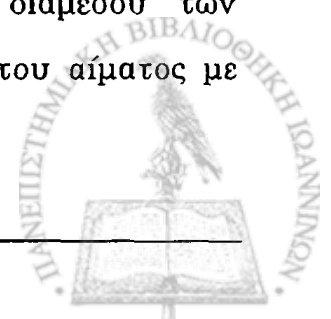
## **1.2 Το λεμφικό σύστημα.**

Τα κύτταρα που εμπλέκονται στην εκδήλωση της ανοσολογικής απάντησης βρίσκονται οργανωμένα σε δομές με σκοπό να επιτελούν τις λειτουργίες τους περισσότερο αποτελεσματικά. Οι δομές αυτές συνιστούν το λεμφικό σύστημα, το οποίο διαιρείται σε πρωτεύοντα και δευτερεύοντα λεμφικά όργανα. Στα πρωτεύοντα όργανα περιλαμβάνονται ο θύμος και μυελός των οστών. Τα T κύτταρα παράγονται στο θύμο από αρχέγονα κύτταρα τα οποία προέρχονται από το μυελό των οστών. Τα κύτταρα φυσικοί φονείς (NK cells) που αποτελούν υποπληθυσμό των λεμφοκυττάρων προέρχονται από αρχέγονα κύτταρα στο μυελό των οστών. Τα μονοκύτταρα προέρχονται από αρχέγονα κύτταρα του μυελού των οστών τα οποία έχουν τη δυνατότητα να διαφοροποιηθούν σε πολυμορφοπύρρηνα, ερυθροκύτταρα ή μονοκύτταρα, ανάλογα με τους παράγοντες που επιδρούν. Τα μονοκύτταρα των ιστών διαφοροποιούνται σε μακροφάγα όταν διεγείρονται από ποικίλους παράγοντες. Τα B λεμφοκύτταρα προέρχονται από αρχέγονα κύτταρα του μυελού των οστών. Στα δευτερεύοντα λεμφικά όργανα, περιλαμβάνονται ο σπλήνας, οι λεμφαδένες, οι αμυγδαλές καθώς και συγκεντρώσεις λεμφικού ιστού που συνδέονται με επιθηλιακές επιφάνειες (MALT).

Ο σπλήνας αποτελείται από δύο τύπους ιστού εκ των οποίων μόνο ο ένας - λευκός πολτός- επιτελεί ανοσολογικό έργο. Υπάρχουν νησίδες λεμφικού ιστού που αποτελούνται κυρίως από B λεμφοκύτταρα ενώ περιφερειακά επικρατούν T λεμφοκύτταρα.

Η αρχιτεκτονική των αμυγδαλών παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με αυτή του σπλήνα όπου 40-50% των λεμφοκυττάρων αποτελούν B κύτταρα.

Οι λεμφαδένες είναι το τμήμα του λεμφικού συστήματος όπου επιτυγχάνεται το φιλτράρισμα της διερχόμενης λέμφου διαμέσου των λεμφοκόλπων από τα πιθανά αντιγόνα και ο εμπλουτισμός του αίματος με

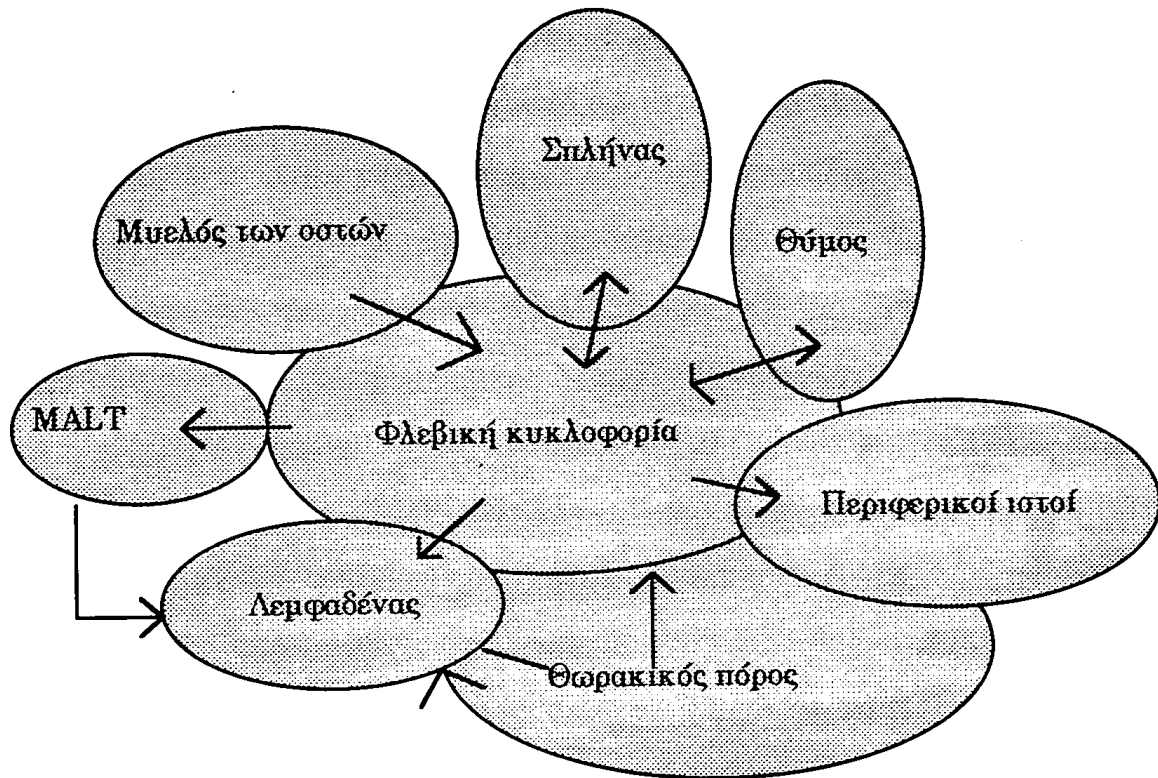


λεμφοκύτταρα. Η σημαντικότερη λειτουργία του λεμφικού συστήματος είναι η εξασφάλιση της μεταφοράς των αντιγόνων προς τα λεμφοκύτταρα ώστε να αναγνωριστούν και να εκδηλωθεί η ανοσολογική απάντηση.

### **1.3 Λεμφική κυκλοφορία.**

Εκατομμύρια από νεοσύστατα λεμφοκύτταρα σχηματίζονται από το μυελό των οστών καθημερινά. Κάθε ένα από τα κύτταρα αυτά πολλαπλασιάζεται και διαφοροποιείται ή πεθαίνει ανάλογα με τη φύση των αλληλεπιδράσεων που θα υποστεί. Μετά την παραγωγή τους από τα πρωτεύοντα λεμφικά όργανα τα λευκοκύτταρα μεταναστεύουν μέσω της αρτηριακής και λεμφικής κυκλοφορίας στα δευτερεύοντα λεμφικά όργανα. Η έξοδος των λεμφοκυττάρων από τη φλεβική κυκλοφορία πραγματοποιείται συνήθως δια διαπηδήσεως διαμέσου του ενδοθηλίου τριχοειδών αγγείων γνωστών ως φλεβιδίων με υψηλό ενδοθήλιο. Τα τριχοειδή αυτά χαρακτηρίζονται από κυβοειδή ενδοθηλιακά κύτταρα. Χαρακτηριστική είναι η απουσία τέτοιων ιδιαίτερων αγγείων από το σπλήνα, με αποτέλεσμα να είναι άγνωστη η διαδικασία εξόδου των λεμφοκυττάρων απ'αυτόν. Από τους λεμφαδένες όλα τα λεμφοκύτταρα επιστρέφουν μέσω των απαγωγών λεμφαγγείων και του θωρακικού πόρου στη φλεβική κυκλοφορία. Μερικά λεμφοκύτταρα, κατά πλειοψηφία T κύτταρα, κύτταρα παρουσιαστές του αντιγόνου και αντιγόνα, αφού συλλεγούν από την συγκεκριμένη επιτηρούμενη περιοχή οδηγούνται μέσω των προσαγωγών λεμφαγγείων στους επιχώριους λεμφαδένες. Περίπου  $10^9$  λεμφοκύτταρα σχηματίζονται καθημερινά και διανύουν κατά μέσο όρο ένα κύκλο κυκλοφορίας σε 1-2 ημέρες. Πειράματα σήμανσης δείχνουν ότι λεμφοκύτταρα μεταναστεύουν από το θύμο σε περιφερειακούς λεμφαδένες σε 30 λεπτά, καθώς και ότι η μετανάστευση από ένα προσαγωγό λεμφαγγείο στο λεμφαδένα και στη συνέχεια στο απαγωγό λεμφαγγείο, διαρκεί περίπου 6 ώρες. Έτσι περίπου το 1% των συνολικών λεμφοκυττάρων είναι παρόν στη φλεβική και αρτηριακή κυκλοφορία.





ΣΧΗΜΑ 1

Λεμφική κυκλοφορία

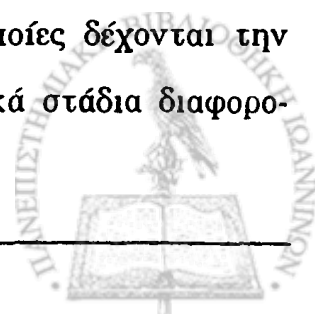




#### **1.4 Τ κύτταρα.**

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, μέρος από τα αρχέγονα λεμφοειδή κύτταρα του μυελού των οστών που μεταναστεύουν στο θύμο δημιουργούν τον πληθυσμό των θυμοκυττάρων. Τα θυμοκύτταρα μέσω των διεργασιών της διαφοροποίησης και κάτω από την επίδραση θυμικών παραγόντων θα διαφοροποιηθούν σε Τ λεμφοκύτταρα, που έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν αντιγόνα σε συνδυασμό με τα μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex - MHC), μέσω του Τ κυτταρικού υποδοχέα (T cell receptor TCR). Σε ένα πρώτο στάδιο διαφοροποίησης γίνεται ανακατάταξη των γονιδίων που κωδικοποιούν για τον TCR - θα αναφερθούμε στην συνέχεια στη διαδικασία αυτή. Μετά το στάδιο αυτό, θυμοκύτταρα τα οποία εκφράζουν αναδιαταγμένους υποδοχείς TCR οι οποίοι αναγνωρίζουν σαν αντιγόνα πρωτεΐνες του ίδιου του οργανισμού καταστρέφονται ενώ εκείνα των οποίων το TCR μπορεί να αναγνωρίσει "ξένες" πρωτεΐνες ως αντιγόνα διαφοροποιούνται σε Τ κύτταρα.

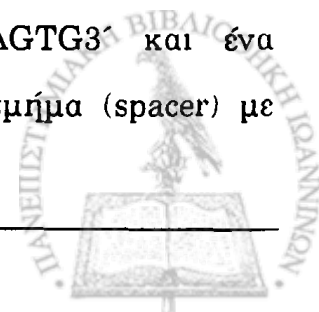
Ο TCR είναι ένας ετεροδιμερής υποδοχέας που αποτελείται από δύο γλυκοπρωτεϊνικές αλυσίδες (α και β μοριακού βάρους 40.000 - 50.000) οι οποίες είναι συνδεδεμένες μεταξύ τους με γέφυρες θείου. Ο υποδοχέας TCR συνδέεται μη ομοιοπολικά με τον επιφανειακό δείκτη CD3 (ένα σύμπλοκο από πέντε πολυπεπτίδια) και συμμετέχει στη διαδικασία μεταγωγής του σήματος ενεργοποίησης (signal transduction pathway). Ένας δεύτερος TCR υποδοχέας εμφανίζεται στα πρώιμα θυμοκύτταρα και σε ένα μικρό υποπληθυσμό των ώριμων Τ λεμφοκυττάρων που κυκλοφορούν στο αίμα. Είναι επίσης ετεροδιμερής και αποτελείται από από μία γ και μια δ αλυσίδα, οι οποίες συνδέονται επίσης με γέφυρες θείου. Η λειτουργία αυτών των γ/δ Τ κυττάρων παραμένει άγνωστη, εντούτοις η ύπαρξη τους σε διάφορα επιθήλια προτείνει ένα ρόλο στην ανοσολογική απάντηση σε περιοχές οι οποίες δέχονται την εισβολή διαφόρων παθογόνων μικροοργανισμών. Στα αρχικά στάδια διαφορο-



ποίησης τα θυμοκύτταρα εκφράζουν τον υποδοχέα TCR $\gamma\delta$  και στη συνέχεια εκφράζουν τον TCR $\alpha\beta$  με ταυτόχρονη μείωση των κυττάρων εκείνων που εκφράζουν το TCR $\gamma\delta$ . Επίσης η ανακατάταξη και η έκφραση των  $\alpha$  και  $\delta$  γονιδίων εξαρτάται από την κυτταρική γραμμή με συνέπεια το γονίδιο  $\alpha$  να είναι αναδιαταγμένο μόνο στα TCR  $\alpha/\beta$  κύτταρα ενώ το  $\delta$  αναδιατάσσεται μόνο στα  $\gamma/\delta$  T κύτταρα.

Έχουν βρεθεί τα αγγελιοφόρα RNAs (mRNAs) που οδηγούν στη σύνθεση των αντίστοιχων TCRs να είναι αποτέλεσμα γονιδιακού ανασυνδυασμού που συμβαίνει στο γενετικό υλικό των T κυττάρων. Έτσι έχουν βρεθεί οι γενετικές θέσεις για τα γονίδια των αλυσίδων  $\alpha$ ,  $\beta$  και  $\gamma$  που παρουσιάζουν ένα παρόμοιο τρόπο οργάνωσης (πίνακας 2). Το  $\delta$  γονίδιο του TCR βρίσκεται στο μεταξύ  $V\alpha$  και  $J\alpha$  τμήματος του γονιδίου  $\alpha$  (Chien *et al.*, 1984).

Κάθε γενετική θέση αποτελείται από μια ομάδα μεταβλητών γονιδίων (V γονίδια) που βρίσκονται στο αμινοτελικό άκρο και από μια ομάδα σταθερών γονιδίων που βρίσκονται στο καρβοξυτελικό άκρο (C γονίδια). Μεταξύ των τμημάτων του DNA που κωδικοποιούν για τις μεταβλητές (V) περιοχές και τις σταθερές (C) περιοχές άλλα τμήματα DNA που παρεμβάλλονται μεταξύ των δύο τμημάτων. Τα τμήματα αυτά είναι το J (joining) για τις τέσσερις αλυσίδες του TCR ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) και επιπλέον το D (diversity) για τη  $\beta$  και  $\delta$  αλυσίδα. Συνεπώς γονιδιακά τμήματα V, D & J των διαφόρων αλυσίδων είναι σε ξεχωριστές θέσεις στο αντίστοιχο χρωμόσωμα και συρράπτονται με ανακατάταξη του DNA κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαφοροποίησης για να σχηματίσουν ένα πλήρες γονίδιο. Η ανακατάταξη του DNA επιτυγχάνεται χάρη στην ύπαρξη ειδικών αλληλουχιών σινιάλων οι οποίες βρίσκονται στο 3 άκρο των V γονιδίων, στο 5 άκρο των J γονιδίων και στα δύο άκρα των D γονιδίων (Chien *et al.*, 1984, Hayday *et al.*, 1985). Αυτές οι αλληλουχίες αποτελούνται από ένα συντηρητικό επταμερές 5'CACAGTG3' και ένα εννιαμερές μη συντηρητικό που διαχωρίζονται από ένα τμήμα (spacer) με



μήκος 12 ή 23 ζευγάρια βάσεων (Ja). Ο ανασυνδυασμός γίνεται πάντοτε ανάμεσα σε δύο γονιδιακά τμήματα που συνορεύουν με αλληλουχίες σινιάλα που έχουν αντίθετους προσανατολισμούς επταμερών-εννιαμερών και διαφορετικές μη συντηρητικές αλληλουχίες γι' αυτό χαρακτηρίζεται σαν ανασυνδυασμός ειδικής θέσης (site specific recombination), δηλ. το ένα γονιδιακό τμήμα έχει ένα σινιάλο ανασυνδυασμού με ένα spacer μήκους 12 ζευγαριών βάσεων (όσο περίπου ζευγάρια βάσεων αποτελεί μια πλήρη στροφή της διπλής έλικας του DNA και έτσι δηλώνεται σαν one turn signal) και το άλλο γονιδιακό κομμάτι έχει ένα σινιάλο ανασυνδυασμού 23 ζευγάρια βάσεων (όσο περίπου ζευγάρια βάσεων αποτελούν δύο στροφές του DNA) και ονομάζεται two turn signal.

Η οργάνωση ενός ανασυνδυασμένου γονιδίου είναι αυτή που φαίνεται στον πίνακα 2.

## ΠΙΝΑΚΑΣ 2

<u>Αλληλουχίες</u>	<u>Αμινοξέα (aa)</u>
Πεπτίδιο οδηγός	18-29
V περιοχή	88-98
J περιοχή	14-21
C τμήμα	87-113
συνδετικό πεπτίδιο	20-30
Διαμεμβρανικό τμήμα	20-24
Κυτταροπλασματικό τμήμα	5-12

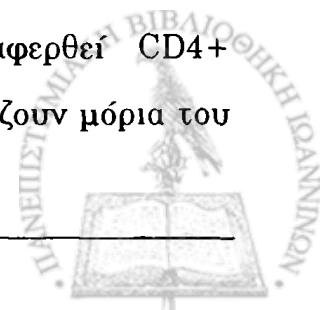
Η γενετική ποικιλότητα δημιουργείται με τους ίδιους μηχανισμούς που ισχύουν και στην περίπτωση των ανοσοσφαιρινών. Έτσι η ποικιλότητα των διαφόρων TCRs οφείλεται στην ανακατάταξη των διαφόρων τμημάτων και την ποικιλότητα των θέσεων σύνδεσης με την εισαγωγή νέων αλληλουχιών μεταξύ αυτών των τμημάτων. Επίσης μερικά TCR γονίδια ενσωματώνουν δύο D



τμήματα δημιουργώντας D-D συνδέσεις. Μια διαφορά μεταξύ των ανοσοσφαιρινών και των TCRs είναι ότι στην περίπτωση των TCRs δεν συμβαίνουν σωματικές μεταλλάξεις που να αφορούν σε υποκαταστάσεις ζευγαριών βάσεων (υπερμεταλλαξιμότητα) (*Chien et al., 1984*).

#### **1.4.1. T λεμφοκύτταρα και υποπληθυσμοί**

Τα T-λεμφοκύτταρα αναπτύσσονται και διαφοροποιούνται στο θύμο αδένα πριν να κυκλοφορήσουν στους περιφερικούς λεμφικούς ιστούς (*Picker, 1992*). Τα T λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν το αντιγόνο μόνο όταν αυτό είναι συνδεδεμένο με τα μόρια του ΜΣΙ. Η αλληλεπίδραση του συμπλόκου TCR/CD3 με το σύμπλοκο ΜΣΙ-αντιγόνο έχει σαν αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό τους και την επαγωγή διαφόρων λειτουργιών τους όπως παραγωγή λεμφοκινών και κυτταροτοξικότητα (*Janeway and Golstein, 1991*). Αλλα αντιγόνα τα οποία επάγουν τον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων είναι τα CD2 και CD43 (*Liu and Linsley, 1992*). Τα ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα εκφράζουν μόρια του ΜΣΙ τάξης II καθώς και υποδοχείς για την IL-2 με αποτέλεσμα να απαντάνε στα μηνύματα προερχόμενα από άλλα T λεμφοκύτταρα. Το ΜΣΙ τάξης II και οι υποδοχείς για την IL-2 δεν εκφράζονται στην επιφάνεια των T ανενεργών λεμφοκυττάρων (*Van Severter et al., 1991*) Μπορούμε να διακρίνουμε τρεις κύριους τύπους T λεμφοκυττάρων με βάση την λειτουργία και τους αντιγονικούς δείκτες που διαθέτουν: Τα βοηθητικά T λεμφοκύτταρα (helper T cells, Th), τα κατασταλτικά T λεμφοκύτταρα (suppressor T cells, Ts) και τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (cytotoxic T cells, Tc). Τα Th χαρακτηρίζονται από την έκφραση του CD4 μορίου επιφανείας ενώ τα Tc εκφράζουν το CD8 (*Rudd et al., 1989 Janeway, 1989*). Τα CD4+ Th αλληλεπιδρούν με τα κύτταρα που εκφράζουν ΜΣΙ τάξης II μόρια ενώ τα T8 Tc αλληλεπιδρούν με τα κύτταρα που εκφράζουν τα μόρια του ΜΣΙ τάξης I (*Meuer et al., 1982*). Εξαιρέσεις στον κανόνα υπάρχουν καθ' όσον έχουν αναφερθεί CD4+ λεμφοκύτταρα με κυτταροτοξική δράση και τα οποία αναγνωρίζουν μόρια του



ΜΣΙ τάξης I ή II (Wang et al., 1992, Mitchel, 1991, Strassman et al., 1984). Κατά προσέγγιση το 10% της κυτταρικής επιφάνειας των λεμφοκυττάρων αποτελείται από ένα ή περισσότερα ισόμορφα μόρια του κοινού λευκοκυτταρικού αντιγόνου CD45. Αυτοί προκύπτουν από διαφορετικό "splicing" του ειδικού mRNA για το CD45 (Thomas and Lefrancois, 1988). Για τον διαχωρισμό ξεχωριστών λειτουργικά υποομάδων χρησιμοποιούνται μονοκλωνικά αντισώματα έναντι των διαφόρων ισομόρφων του CD45. Κατά αυτόν τον τρόπο διαιρούμε τα περιφερικά T λεμφοκύτταρα σε υποπληθυσμούς με βάση την έκφραση ισομόρφων υψηλού μοριακού βάρους (200-245 kd) σε CD45RA ή χαμηλού μοριακού βάρους (180 kd) σε CD45RO (Sanders et al., 1988). Τα CD4+CD45RO+ T λεμφοκύτταρα εκφράζουν σε αυξημένα ποσοστά μόρια προσκόλλησης συμπεριλαμβανομένων το CD2, αντιγόνα που σχετίζονται με λεμφοκυτταρικές λειτουργίες όπως LFA-1, LFA-3 (λευκοκυτταρικοί υποδοχείς της υπεροικογένειας των ιντεγκρινών που συμμετέχουν στην προσκόλληση στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα), CD44, το διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης ICAM-1 και άλλα αντιγόνα όπως VLA-4,-5 και -6 (μέλη της υπεροικογένειας των ιντεγκρινών με διαφορετική έκφραση στα λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα, αιμοπετάλια και στα πρόδρομα αιμοποιητικά κύτταρα) (Mackay, 1991 Beverly, 1991 Akbar et al., 1991). Στα περισσότερα T λεμφοκύτταρα κατόπιν ενεργοποίησης τους in-vitro παρατηρείται μετάβαση της αντιγονικής έκφρασης από CD45RA σε CD45RO (Akbar et al., 1991). Εκτενείς μελέτες στον άνθρωπο, έδειξαν ότι τα κύτταρα CD4+CD45RO+ παρουσία αντιγόνων πολλαπλασιάζονται, ενισχύουν την δευτερογενή παραγωγή αντισώματος και παράγουν επίσης μεγαλύτερη ποικιλία κυτταροκινών απ'ότι ο υποπληθυσμός CD4+CD45RA+. Επίσης τα CD4+CD45RO+ κύτταρα πολλαπλασιάζονται σε δευτερογενείς in vitro καλλιέργειες ματόπιν ανοσοποίησης in vivo. Σαν αποτέλεσμα όλων αυτών των ιδιοτήτων τους τα CD4+CD45RO+ κύτταρα χαρακτηρίζονται σαν ενεργοποιημένα T κύτταρα μνήμης ενώ ο κυτταρικός



πληθυσμός CD4+CD45RA+ περιλαμβάνει παρθένα (naive) κύτταρα μη ενεργοποιημένα . Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι ενώ κατόπιν διέγερσης με χαμηλές δόσεις διαλυτού anti-CD3 τα CD4+CD45RO+ απαντούν καλύτερα απ'ότι τα CD4+CD45RA+, σε υψηλές δόσεις anti-CD3 και οι δύο υποπληθυσμοί πολλαπλασιάζονται κατά τον ίδιο βαθμό. Στην αυτόλογη μικτή λεμφοκυτταρική αντίδραση κατά κύριο λόγο πολλαπλασιάζονται τα παρθένα κύτταρα και περιέχουν πρόδρομα T- κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα. Σε αντίθεση με ότι συμβαίνει με τα ειδικά αντιγόνα τα κύτταρα CD45RO+ και CD45RA+ πολλαπλασιάζονται και δείχνουν κυτταροτοξική δράση στον ίδιο βαθμό κατόπιν διέγερσης τους από αλλοαντιγόνα. Όσον αφορά τα επίπεδα λεμφοκινών τόσο τα CD4+CD45RA+ όσο και τα CD4+CD45RO+ κύτταρα παράγουν ιντερλευκίνη-2 ενώ για την παραγωγή IL-4 και ινερφερόνης-γ (IFN-γ) υπεύθυνα είναι κυρίως τα CD4+CD45RO+ κύτταρα (*Bell and Sparshitt, 1990*). Παρόμοια υποδιαίρεση σε CD45RA+ και CD45RO+ υποομάδες κυττάρων παρατηρείται και στον υποπληθυσμό των CD8 T κυττάρων. Έτσι λοιπόν έχει δειχθεί ότι στα κύτταρα μνήμης CD8+CD45RO+ περιέχονται πρόδρομα κυτταροτοξικά T κύτταρα ειδικά για ιούς που χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοποιήσεις in vivo σε αντίθεση με τον υποπληθυσμό CD8+CD45RA+ όπου η συχνότητα αυτών των πρόδρομων κυττάρων είναι πολύ χαμηλή (*Salmon et al., 1989*). Επιπλέον κατόπιν διέγερσης των T λεμφοκυττάρων με μη βέλτιστη δόση ακινητοποιημένου anti-CD3 αντισώματος επάγεται ο πολλαπλασιασμός και η αύξηση της κυτταροτοξικότητας σε υψηλά επίπεδα στα CD8+CD45RO+ κύτταρα απ'ότι στα CD8+CD45RA+. Αντίθετα σε βέλτιστη δόση anti-CD3 και οι δύο προαναφερθείσες λειτουργίες επάγονται κατά τον ίδιο βαθμό και στους δύο κυτταρικούς υποπληθυσμούς (*Yamashita and Clement, 1989*).



#### 1.4.2 Ο υποδοχέας των T κυττάρων

Τα ανθρώπινα T λεμφοκύτταρα εκφράζουν τον T Cell Receptor (TCR) υποδοχέα με αντιγονική εξιδείκευση ο οποίος είναι συνδεδεμένος σε ένα μοριακό σύμπλοκο σε CD3 πρωτεΐνες επιφανείας. Στις περισσότερες περιπτώσεις ο TCR αποτελείται από δύο αλυσίδες διαφορετικού μοριακού βάρους: την α αλυσίδα 49kd και την β αλυσίδα 42kd οι οποίες συνδεόμενες με δισουλφιδικό δεσμό σχηματίζουν ένα ετεροδιμερές 80-90 kd (*Jong et al., 1991*). Αν και το 90% των TCR αποτελούνται από α/β αλυσίδες τόσο στα CD4 όσο και στα CD8 κύτταρα, υπάρχει ένας T λεμφοκυτταρικός υποπληθυσμός (1-10%) στο περιφερικό αίμα που δεν εκφράζει τόσο το CD4 όσο και το CD8 αντιγόνα διαφοροποίησης, ενώ εκφράζει τις αλυσίδες επιφανείας γ/δ του TCR συνδεδεμένες με τις CD3 πρωτεΐνες (*Chan et al., 1992 Clayton et al., 1992*). Ο TCR γ/δ υπάρχει σε διαφορετικές μορφές ετεροδιμερών συνδεδεμένων ή μή με δισουλφιδικό δεσμό. Το συνολικό σύμπλοκο TCR-CD3 περιλαμβάνει τουλάχιστον 8 υπομονάδες (αβγδεεζζ ή γδγδεεζζ) οι οποίες είναι όλες απαραίτητες για να εξασφαλίζεται η σταθερότητα και η μεγαλύτερη μεμβρανική έκφραση του συμπλόκου (*Moretta et al., 1991*). Οι περισσότερες από τις αλυσίδες των TCR και CD3 συντίθενται σε πλεόνασμα και μόνο το 10% από αυτές καταφέρνει να φθάσει στην κυτταρική επιφάνεια. Ένας από τους πιθανούς λόγους αυτού του γεγονότος είναι η περιορισμένη σύνθεση της ζ υπομονάδας η οποία οδηγεί σε ατελή και λανθασμένο ταίριασμα των TCR-CD3 συμπλόκων με αποτέλεσμα να αποικοδομούνται ενδοκυτταρικά (*Koning, 1990*). Οι μη πολυμορφικές αλυσίδες του CD3-συμπλόκου και του ζ διμερή συμπλόκου μπορούν να συνενωθούν με διαφορετικούς τρόπους. Έτσι η ζ αλυσίδα μπορεί να συμμετέχει σε σύμπλοκα διμερών όπως ζ-ζ, ζ-η ή ζ-Fcγ υποδοχέα (*Konig et al., 1990*). Επιπλέον για τη δημιουργία σταθερού συμπλόκου TCR-CD3 πρέπει να προηγείται ενδοκυτταρικό ταίριασμα των αβ ή των γδ αλυσίδων και των γε, δε και ζζ αλυσίδων. Οι βασικές ανοσολογικές απαντήσεις εξαρτώμενες από το μείζον



σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας όπως ειδικός αντιγονικός πολλαπλασιασμός, παραγωγή κυτταροκινών και κυτταροτοξικότητα έχουν αποδοθεί σε T-κυτταρικούς υποπληθυσμούς με φαινότυπο TCR  $\alpha/\beta+$  (Chan et al., 1992). Η λειτουργικότητα των  $\gamma/\delta+$  T κυττάρων έχει περιορισθεί σε ανοσοαπαντήσεις έναντι μυκοβακτηριακών αντιγόνων (Orlof et al., 1990). Σε αντίθεση με τα TCR  $\alpha/\beta+$  T λεμφοκύτταρα, φαίνεται ότι τα ανθρώπινα  $\gamma/\delta+$  T-κύτταρα δεν αναγνωρίζουν το αντιγόνο σε συνδυασμό με τα πεπτιδία από το ΜΣΙ και δεν ενεργοποιούνται παρουσία ετερόλογων μορίων επιφανείας του ΜΣΙ (Fisch et al., 1990, 1992). Σε ελάχιστες περιπτώσεις (Kabelitz et al., 1990) έχει δειχθεί ότι τα  $\gamma/\delta+$  T-κύτταρα παρουσιάζουν λύση καρκινικών κυττάρων στόχων που σχετίζεται με το ΜΣΙ. Φαίνεται λοιπόν ότι τα  $\gamma/\delta+$  T-κύτταρα διαφέρουν από τα  $\alpha/\beta+$  T-κύτταρα στο γεγονός ότι η πλειοψηφία των  $\gamma/\delta+$  T-κυττάρων δεν αναγνωρίζει αντιγόνα του τάξης I ή τάξης II του μείζων συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας.

#### **1.4.3 Κυτταροτοξικότητα εκδηλούμενη από λεμφοκύτταρα**

*(Lymphocyte-mediated cytotoxicity).*

Τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (ΚΤΛ) αποτελούν τα στοιχεία του ΑΣ που λύουν τα κύτταρα στόχους με μηχανισμό όπου αναγνωρίζουν μόρια του ΜΣΙ πάνω σ' αυτά. Η ενεργοποίηση των ΚΤΛ επιτυγχάνεται με ταυτόχρονη σύνδεση του CD8+ μορίου και του TCR καθότι μια μεγάλη ποικιλία τεχνητών μικρών πεπτιδίων δεν υποκινεί την ενεργοποίησή τους όπως αυτή γίνεται παρουσία μεγάλων μορίων (Mescher, 1992). Τα CD8+ μόρια είναι πολύ σημαντικά για την ενίσχυση της επαφής ανάμεσα στα ΚΤΛ και τα κύτταρα στόχους όταν αυτά εκφράζουν σε χαμηλό επίπεδο τα τάξης I μόρια ή όταν υπάρχει μικρή συγγένεια ανάμεσα στο TCR και στο αντιγόνο (O'Rourke and Mescher, 1992, O'Rourke et al., 1990). Οι πρόδρομοι του ΚΤΛ (πΚΤΛ) αναγνωρίζουν ΚΚΑ ή αντιγόνα που κωδικοποιούνται από ιικό γένωμα σε





σύνδυασμό με τάξης I μόρια του ΜΣΙ και απαιτούν βοήθεια από τα βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα (ΤΗ) για να διαφοροποιηθούν σε ΚΤΛ (*Melief, 1992*).

Αν και ο ακριβής μηχανισμός της παραπάνω συνεργασίας δεν είναι γνωστός, εν τούτοις φαίνεται ότι τα Τη κύτταρα και πΚΤΛ συνδέονται στο ίδιο APC κύτταρο το οποίο εκφράζει το αντιγόνο σε σύνδυασμό τόσο με τάξης I όσο και με τάξης II του ΜΣΙ (*Roit, 1991*). Τα συμπλέγματα αντιγόνο - τάξης I και αντιγόνο τάξης II αναγνωρίζονται από τα ΤΗ και τα ΚΤΛ αντίστοιχα. Τα ενεργοποιημένα ΤΗ παράγουν κυτταροκίνες (IL2-2, IL-6) που βοηθούν στη διαφοροποίηση και το πολλαπλασιασμό των πΚΤΛ σε ΚΤΛ. Παρόμοια γεγονότα συμβαίνουν όταν το APC έχει μολυνθεί από ιό ή όταν τα Τη και πΚΤΛ αναγνωρίζουν ΚΚΑ σε τάξης I, τάξης II θετικά καρκινικά κύτταρα (*Roit, 1991*).

### **1.5 Β λεμφοκύτταρα.**

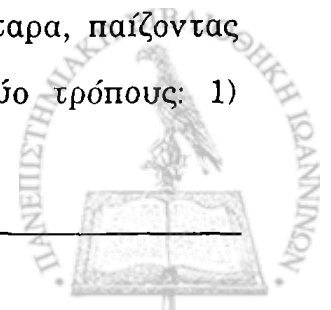
Τα Β λεμφοκύτταρα είναι τα κύτταρα που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή αντισωμάτων. Προέρχονται από αρχέγονα κύτταρα στο μυελό των οστών από όπου μεταναστεύουν στα λεμφοειδή όργανα μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Τα Β λεμφοκύτταρα στα λεμφοειδή όργανα απαντούν σε μιτογονική διέγερση με πολλαπλασιασμό και μιτογονική διαφοροποίηση προς πλασματοκύτταρα, δηλ. κύτταρα με μικρό χρόνο ζωής που εκκρίνουν ανοσοσφαιρίνη. Κάθε Β λεμφοκύτταρο παράγει ένα είδος ανοσοσφαιρίνης (ιδιότυπο). Εκτός από επιφανειακή ανοσοσφαιρίνη, τα ώριμα Β λεμφοκύτταρα συνεχίζουν να έχουν ΑΙ, ΑΙΙ αντιγόνα και υποδοχείς για τα ερυθροκύτταρα του ποντικού, ενώ αποκτούν και υποδοχείς για το Fc τμήμα της Ig (FcγR), για τον τρίτο παράγοντα του συμπληρώματος (C3b) και για τον ιό Epstein-Barr (EBV-R). Το τελευταίο στάδιο διαφοροποίησης των Β λεμφοκυττάρων, είναι το πλασματοκύτταρο που χαρακτηρίζεται από κυτταροπλασματική ανοσοσφαιρίνη και έκκριση ανοσοσφαιρίνης, ενώ όλοι οι προηγούμενοι δείκτες εξαφανίζονται (*Lachman and Peters, 1981*).



### 1.6 Σύστημα μακροφάγων/μονοκυττάρων (Μα/Μο).

Το σύστημα μακροφάγων/μονοκυττάρων (Μα/Μο) περιλαμβάνει τα μονοκύτταρα του αίματος και τα μακροφάγα που βρίσκονται σε διάφορους ιστούς του σώματος. Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη παράγραφο τα μονοκύτταρα προέρχονται από ένα αρχέγονο κύτταρο στο μυελό των οστών το οποίο ωριμάζει προς μονοβλάστη-προμονοκύτταρο-μονοκύτταρο οπότε και μεταφέρεται στο αίμα. Μετά από μία μικρή περίοδο στο αίμα (μία ή δύο ημέρες περίπου) τα μονοκύτταρα μεταναστεύουν στους ιστούς (τον κύριο τόπο δράσης τους) και διαφοροποιούνται παραπέρα προς μακροφάγα. Τα μακροφάγα διατηρούν περιορισμένη δυνατότητα κυτταρικής διαίρεσης. Η μετατροπή του μονοκυττάρου σε μακροφάγο συνοδεύεται από μορφολογικές βιοχημικές και λειτουργικές μεταβολές. Τα μονοκύτταρα φαγοκυτταρώνουν αλλά έχουν μικρότερη δυνατότητα να σκοτώνουν τα προσλαμβανόμενα βακτήρια απ' ό,τι τα μακροφάγα. Απαντούν όμως καλύτερα από τα μακροφάγα σε χημειοτακτικούς παράγοντες. Τα μακροφάγα μπορεί να είναι ελεύθερα ή σταθεροποιημένα στους ιστούς. Επίσης έχουν τη δυνατότητα άνοσης και μη άνοσης φαγοκυττάρωσης. Στην επιφάνεια τους υπάρχουν τρεις τύποι υποδοχέων για το Fc τμήμα των ανοσοσφαιρινών IgG οι οποίοι ονομάζονται FcγRI, FcγRII και FcγRIII. Ο FcγRI αποτελεί υποδοχέα υψηλής συγγένειας, ο FcγRII υποδοχέα ενδιάμεσης συγγένειας και ο FcγRIII υποδοχέα χαμηλής συγγένειας. Τα μακροφάγα έχουν επίσης τη δυνατότητα πινοκύττωσης, δηλαδή της ενδοκυττάρωσης σταγονιδίων υγρού. Ακόμα τα μακροφάγα παράγουν και εκκρίνουν διάφορες ουσίες: διάφορα ένζυμα, παράγοντες του συμπληρώματος, παράγοντες πήξης V, VII, X προθρομβίνη και θρομβίνη, α<sub>2</sub>-μακροσφαιρίνη και άλλες χωρίς όμως να αποτελούν τη μοναδική πηγή προέλευσης όλων αυτών των πρωτεϊνών (Roit, 1991).

Τα μακροφάγα αλληλεπιδρούν με τα Β και Τ λεμφοκύτταρα, παίζοντας πολύ σημαντικό ρόλο στις ανοσολογικές απαντήσεις, με δύο τρόπους: 1)



ενδοκυτταρώνοντας μια ποικιλία εξωκυτταρικών μορίων (πρωτεϊνών και πολυσακχαριτών) τις οποίες διασπούν σε πεπτίδια ώστε αυτά να μπορούν να σχηματίσουν σύμπλοκο με μόρια του ΜΣΙ (βλ. παρακάτω παράγραφο) και να παρουσιαστούν στην κυτταρική επιφάνεια και 2) εκκρίνοντας κυτταροκίνες που διαφοροποιούν τα Τ λεμφοκύτταρα. Επίσης είναι και τα ίδια δείκτες κυτταροκινών που τα διαφοροποιούν με αποτέλεσμα να αποκτούν καινούργιες ιδιότητες που περιγράφονται κάτω από τον όρο "ενεργοποίηση" (*Unanue and Allen, 1987*). Μη ενεργοποιημένα μακροφάγα δεν μπορούν να ενεργοποιήσουν CD8+ λεμφοκύτταρα (*Inaba and Steinman, 1984*) και να τα διαφοροποιήσουν προς CTL. Αντίθετα μπορούν να ενεργοποιηθούν ενδοκυτταρώνοντας εξωκυττάρια πρωτεΐνες, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, με αποτέλεσμα την παρουσίαση τμημάτων της πρωτεΐνης σε σύμπλοκο με τα τάξης II μόρια του ΜΣΙ και την ενεργοποίηση των CD4+ υποπληθυσμών των Τ λεμφοκυττάρων. Τα τελευταία μπορούν να είναι είτε CD4+ επαγωγικά βοηθητικά (helper/inducer) ή CD4+ επαγωγικά κατασταλτικά (suppressor/inducer). Παρόλο που η παρουσίαση εξωκυττάρια πρωτεϊνών συμβαίνει μέσω της τάξης II μορίων του ΜΣΙ εν τούτοις υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν ότι η παρουσίαση τέτοιων πρωτεϊνών μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω της τάξης I μορίων του ΜΣΙ (*Kousscovics-Bankowski and Rock, 1994*) με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των CD8+ υποπληθυσμών των Τ λεμφοκυττάρων προς CTL. Η κυτταρική συνεργασία των Τ υποπληθυσμών με τα μονοκύτταρα προσδιορίζεται με τη μικτή λεμφοκυτταρική αντίδραση όπου τα κυτταρικά αντιγόνα που προκαλούν τη διαφοροποίηση Τ υποπληθυσμών μπορούν να είναι είτε αυτόλογα (αυτόλογη μικτή λεμφοκυτταρική αντίδραση ΑΜΛΑ) ή ετερόλογα (ετερόλογη μικτή λεμφοκυτταρική αντίδραση ΕΜΛΑ). Κατά την ΑΜΛΑ παρατηρείται ενεργοποίηση και πολλαπλασιασμός ως επί το πλείστον των επαγωγικών κατασταλτικών λεμφοκυττάρων αλλά για να εκδηλωθεί κατασταλτική δράση είναι απαραίτητη η παρουσία CD8+ λεμφοκυττάρων



(Takeuchi et al., 1987, Gupta et al., 1987). Η δημιουργία κυτταρικών σειρών που ρυθμίζουν κατασταλτικά in vivo ανοσολογική απάντηση και η μελέτη τους θα δώσει περισσότερες πληροφορίες που αφορούν στις κατασταλτικές ρυθμίσεις. Οι σειρές αυτές ανήκουν τόσο στα CD4+ όσο και στα CD8+ λεμφοκύτταρα (Mukasa et al., 1994) και ρυθμίζουν με διαφορετικό τρόπο την καταστολή της ανοσολογικής απάντησης. Στην ΕΜΛΑ πολλαπλασιάζονται τόσο CD4+ όσο και CD8+ λεμφοκύτταρα. Τα πρώτα διεγείρονται πολύ περισσότερο από τα δεύτερα, χρησιμοποιώντας τόσο αυτόλογα όσο και ετερόλογα μονοκύτταρα ενώ τα CD8+ λεμφοκύτταρα χρησιμοποιούν για τη διέγερση τους ετερόλογα μονοκύτταρα (Via et al., 1990).

### **1.7 Προυποθέσεις για την εκδήλωση της ανοσολογικής απάντησης.**

Εκτός από τα κυτταρικά στοιχεία του Α.Σ. υπάρχουν και διάφοροι άλλοι παράγοντες αναγκαίοι για την εκδήλωση της ανοσολογικής απάντησης. Οι σημαντικότεροι είναι α) τα μόρια του Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας που εξασφαλίζουν την αποτελεσματική αναγνώριση του αντιγόνου και β) οι κυτταροκίνες που εξασφαλίζουν την επικοινωνία μεταξύ των διαφόρων, στενά συνεργαζόμενων, κυτταρικών στοιχείων του Α.Σ.

#### **1.7.1 Αντιγόνα του Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας.**

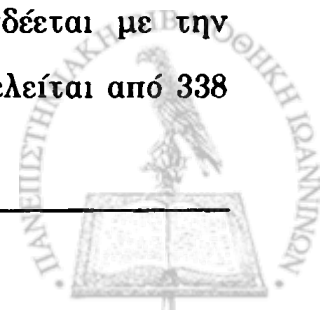
Η ικανότητα διαχωρισμούς του "ίδιου" από το "ξένο" ("self"- "non self" discrimination) είναι μία βασική ιδιότητα όλων των πολυκύτταρων οργανισμών έτσι, ώστε να εξασφαλιστεί ότι η άμυνα του οργανισμού θα κατευθυνθεί αποκλειστικά εναντίον του εισβολέα και δεν θα προκαλέσει βλάβη στον ίδιο τον οργανισμό. Η ιδιότητα αυτή προσδιορίστηκε πρώτα στο μύ και βρέθηκε ότι οφείλεται σε ένα σύνολο πρωτεϊνικών παραγόντων που κωδικοποιούνται σε μία περιοχή του χρωμοσώματος 17 που ονομάστηκε H-Z και μετέπειτα έγινε γνωστή σαν Μείζον Σύστημα Ιστοσυμβατότητας (ΜΣΙ, Major Histocompatibility Complex) (Klein, 1979). Ακολουθώντας τις ίδιες



διαδικασίες προσδιορίστηκε και η αντίστοιχη ανθρώπινη περιοχή που βρέθηκε στο χρωμόσωμα 6 και ονομάστηκε Σύστημα του Αντιγόνου των Ανθρώπινων Λευκοκυττάρων (Human Leukocyte Antigen, HLA) (Ploegh et al., 1979). Στο σύστημα αυτό αναγνωρίστηκαν τρεις διαφορετικές περιοχές που κωδικοποιούσαν τρεις διαφορετικές ομάδες πρωτεϊνικών μορίων που ονομάστηκαν αντίστοιχα τάξεις I, II και III. Τα μόρια της τάξης I αναγνωρίζονται κυρίως από τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (Mc Laughlin-Taylor et al., 1984) ενώ τα μόρια τάξης II από τα βοηθητικά επαγωγικά T λεμφοκύτταρα αν και αυτό δεν είναι απόλυτο. Τα γονίδια της τάξεως III δίνουν πληροφορίες για τα συστατικά του συμπληρώματος. Επειδή δεν υπάρχουν ούτε λειτουργικές ούτε δομικές ομοιότητες μεταξύ των προϊόντων της τάξεως III και των τάξεων I και II είναι καλύτερο να θεωρούμε τα γονίδια αυτά (τάξεως III) σαν στενά συνδεδεμένα με το σύστημα HLA παρά σαν μέρος του. Τότε θα μπορούσε να ειπωθεί ότι το σύστημα των HLA αντιγόνων επιφανείας είναι υπεύθυνο για την ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων. Τα μόρια της τάξεως I του συστήματος HLA (αντιγόνα ιστοσυμβατότητας I, AI-I είναι τα HLA -A, -B, -C. Τα μόρια της τάξεως II του ίδου συστήματος (AI-II) είναι τα HLA -DR, -DP, -DQ.

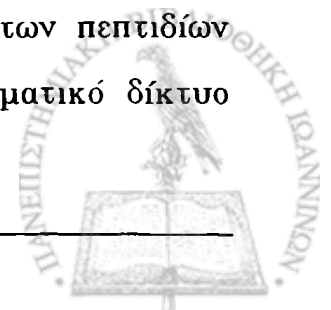
### **1.7.2 Αντιγόνα ιστοσυμβατότητας τάξεως I.**

Κάθε ένα από τα τρία μόρια τάξης I (HLA -A, -B, -C) αποτελείται από δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Η βαριά αλυσίδα ή α αλυσίδα (MB 44000) είναι μια πολυμορφική γλυκοπρωτεΐνη που κωδικοποιείται από πολλαπλά αλληλόμορφα γονίδια που βρίσκονται στο χρωμόσωμα 6. Αντίθετα η δεύτερη αλυσίδα είναι μη πολυμορφική, MB 12000 και κωδικοποιείται από γονίδιο που ανήκει στο χρωμόσωμα 15. Πρέπει να τονισθεί ότι η  $\beta_2$  μικροσφαιρίνη κωδικοποιείται από γονίδιο που δεν ανήκει στο σύστημα HLA. Επίσης οι δύο αλυσίδες συνδέονται με μη ομοιοπολικούς δεσμούς και ολόκληρο το μόριο συνδέεται με την κυτταρική μεμβράνη μέσω της α αλυσίδας. Η α αλυσίδα αποτελείται από 338



αμινοξικά κατάλοιπα και διαιρείται σε τρεις περιοχές. Αρχίζοντας από το αμινοξικό άκρο της αλυσίδας αυτές οι περιοχές είναι μία εξωκυτταρική (κατάλοιπα 1-281) υδρόφιλη περιοχή, μια διαμεμβρανική (κατάλοιπα 281-306) υδρόφοβη περιοχή και μια ενδοκυτταρική (κατάλοιπα 307-338) υδρόφιλη περιοχή. Το εξωκυτταρικό τμήμα του μορίου διαιρείται σε τρεις αυτοτελείς περιοχές (domains), την α1, α2, α3 που αποτελούνται τα αμινοξικά κατάλοιπα 1-90, 91-180 και 181-271 αντίστοιχα.

Τα αντιγόνα τάξης I του ΜΣΙ βρίσκονται στην επιφάνεια όλων σχεδόν των σωματικών κυττάρων του οργανισμού και ο κύριος ρόλος τους έγκειται στην δια των κυττάρων επιτελούμενη κυτταροτοξικότητα (Mellor, 1986). Η παραπάνω λειτουργία τάξης I μορίων του ΜΣΙ έγκειται στην παρουσίαση των αντιγόνων περιορισμένου μήκους (8 έως 11 αμινοξικά κατάλοιπα) (Falk et al., 1991) στα κυτταροτοξικά κύτταρα. Δεν είναι ακόμα ξεκάθαρο αν το παρουσιαζόμενο πεπτιδίο συνδέεται με το διμερές  $\alpha/\beta_2$  μικροσφαιρίνη ή πρώτα συνδέεται με την  $\alpha$  αλυσίδα και κατόπιν σχηματίζεται το τριμερές  $\alpha$  αλυσίδα,  $\beta_2$  μικροσφαιρίνη, πεπτιδίο αν και είναι πιθανό να ακολουθούνται και οι δύο αυτοί δρόμοι (Townsend et al., 1990). Κατά τη σύνδεση του πεπτιδίου με το τάξης I μόριο απελευθερώνονται πρωτεΐνες οι οποίες πιθανώς συμμετέχουν στη διαδικασία του διπλώματος της πρωτεΐνης, σημαντικότερη από τις οποίες είναι μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη 88 KD. Το γεγονός ότι έχουν βρεθεί πεπτιδία που παρουσιάζονται μαζί με τα τάξης I μόρια του ΜΣΙ τα οποία προέρχονται από κυτταροπλασματικές και πυρηνικές πρωτεΐνες οδήγησε στην υπόθεση ενός μηχανισμού που διασπά τις πρωτεΐνες αυτές στο κυτοσόλιο και στη συνέχεια μεταφέρονται στο εσωτερικό του ενδοπλασματικού δικτύου μέσω κάποιας πρωτεΐνης. Στη συνέχεια χαρακτηρίστηκαν δύο πρωτεΐνες που ονομάστηκαν TAP1 και TAP2 οι οποίες σχηματίζουν ένα ετεροδιμερές σύμπλεγμα μέσω του οποίου πραγματοποιείται η μεταφορά των πεπτιδίων (Spies et al., 1992, Monaco et al., 1990). Μέσα στο ενδοπλασματικό δίκτυο



πραγματοποιείται ο σχηματισμός του τριμερούς συμπλόκου μεταξύ της αλυσίδας της  $\beta_2$  μικροσφαιρίνης και του πεπτιδίου. Στη συνέχεια το τριμερές σύμπλεγμα μεταφέρεται στη συσκευή Golgi και από εκεί στην επιφάνεια του κυττάρου (Neeffjes and Ploeght, 1988). Σε πολλές περιπτώσεις είναι δυνατό να μεταφερθεί στην επιφάνεια του κυττάρου το διμερές σύμπλεγμα (α αλυσίδα,  $\beta_2$  μικροσφαιρίνη) και στη συνέχεια εξαιτίας του ότι το σύμπλεγμα αυτό είναι ασταθές (Townsend et al., 1990) να ανιχνευθούν στην κυτταρική επιφάνεια α αλυσίδες (Ortiz-Navarrete and Hammerling, 1991). Σε περιπτώσεις που το πεπτίδιο παρουσιάζει χαμηλή συγγένεια με το διμερές είναι δυνατό στην επιφάνεια του κυττάρου να διαχωριστεί από το τριμερές σύμπλοκο και κατά συνέπεια να διασπαστεί και το διμερές α αλυσίδας/ $\beta_2$  μικροσφαιρίνης με αποτέλεσμα να ανιχνεύεται στην κυτταρική επιφάνεια μόνο η α αλυσίδα (Neeffjes et al., 1992). Είναι επίσης δυνατό η α αλυσίδα να ξανασυνδεθεί με  $\beta_2$  μικροσφαιρίνη και το πεπτίδιο όπου προέρχονται από τον περιβάλλοντα χώρο. Ο χρόνος ημιζωής της ελεύθερης α αλυσίδας είναι μικρός. Με τον τρόπο αυτό φαίνεται να ελαχιστοποιείται η πιθανότητα δημιουργίας συμπλόκου μεταξύ της α αλυσίδας, της  $\beta_2$  μικροσφαιρίνης και του πεπτιδίου, το οποίο βρίσκεται στον εξωκυττάριο χώρο χωρίς να έχει προηγηθεί η ευαισθητοποίηση του κυττάρου με το συγκεκριμένο πεπτίδιο (Neeffjes et al., 1992).

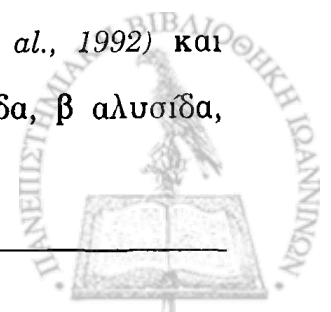
### **1.7.3. Αντιγόνα Ιστοσυμβατότητας τάξεως II.**

Κάθε τάξης II μόριο είναι ένα ετεροδιμερές που αποτελείται από δύο γλυκοπρωτεϊνικές αλυσίδες, τις α και β με μοριακά βάρη 34 KD και 29 KD αντίστοιχα, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με μη ομοιοπολικούς δεσμούς. Όλα τα τάξης II μόρια είναι όμοια στη δομή τους. Η α και β αλυσίδα του HLA-DR μορίου αποτελούνται αντίστοιχα από 229 και 237 αμινοξέα. Όπως η βαριά αλυσίδα του τάξης I μορίου κάθε αλυσίδα αποτελείται από τρεις περιοχές: μια εξωκυτταρική υδρόφιλη περιοχή, μια διαμεμβρανική υδρόφοβη και μια ενδοκυτταρική υδρόφιλη.



Η εξωκυτταρική υδρόφιλη περιοχή της  $\alpha$  αλυσίδας σχηματίζει δύο αυτοτελείς περιοχές (κατάλοιπα 1-84 και 84-178 αντίστοιχα) που ονομάζονται  $\alpha 1$  και  $\alpha 2$  αντίστοιχα. Η αντίστοιχη περιοχή της  $\beta$  αλυσίδας σχηματίζει επίσης δύο αυτοτελείς περιοχές, τις  $\beta 1$  (κατάλοιπα 1-91) και  $\beta 2$  (κατάλοιπα 92-192). Τόσο η  $\alpha 2$  όσο και  $\beta 2$  αυτοτελείς περιοχές δείχνουν σημαντική ομολογία με τις αυτοτελείς περιοχές της σταθερής περιοχής των ανοσοσφαιρινών. Οι  $\alpha$  και  $\beta$  αλυσίδες του DQ μορίου αποτελείται από 234 και 229 αμινοξικά κατάλοιπα ενώ τόσο η  $\alpha$  όσο και η  $\beta$  αλυσίδα του DQ μορίου αποτελείται από 229 κατάλοιπα.

Η βασική διαφορά μεταξύ της τάξης I και τάξης II μορίων βρίσκεται στην παρουσία μιας πρωτεϊνικής αλυσίδας (σταθερή αλυσίδα, invariant chain) όταν το μόριο βρίσκεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η  $\alpha$  και  $\beta$  αλυσίδες συνδέονται μεταξύ τους στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στη συνέχεια προστίθεται η σταθερή αλυσίδα αν και δεν είναι εντελώς ξεκάθαρη η διαδοχή των γεγονότων (*Lamb and Cressswell, 1992*). In vitro μελέτες δείχνουν ότι τα τάξης II μόρια συνδέονται με πεπτιδίο κατά την απομάκρυνση της σταθερής αλυσίδας (*Roche and Cressswell, 1990*). Η σύνδεση του πεπτιδίου με το τάξης II μόριο έχει σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό σταθερού τριμερούς συμπλόκου (*Stern and Willey, 1992*). Σε πειράματα όπου το γονίδιο της σταθερής αλυσίδας ήταν απενεργοποιημένο παρατηρήθηκε ότι τα τάξης II μόρια δεν μπορούσαν να σχηματίσουν σύμπλοκα με πεπτιδία (*Neeffjes and Momburg, 1993*). Συνεπώς ο σχηματισμός του τριμερούς συμπλόκου ( $\alpha$  αλυσίδα,  $\beta$  αλυσίδα, πεπτιδίο) δεν μπορεί να συμβεί απουσία της σταθερής αλυσίδας. Στο ενδοπλασματικό δίκτυο φαίνεται να σχηματίζεται ένα εννιαμερές αποτελούμενο από τρία τριμερή ( $\alpha$  αλυσίδα,  $\beta$  αλυσίδα, σταθερή αλυσίδα) που στη συνέχεια μεταφέρεται στη συσκευή Golgi (*Roche et al., 1991*). Μετά την έξοδό τους από τη συσκευή Golgi και πιθανότερα στα λυσοσωμάτα (*Peters et al., 1991*) γίνεται η σύνδεση του πεπτιδίου και η διάσπαση της σταθερής αλυσίδας (*Neeffjes et al., 1992*) και ακολουθεί η παρουσίαση του τριμερούς συμπλόκου ( $\alpha$  αλυσίδα,  $\beta$  αλυσίδα,





πεπτιδίο) στην κυτταρική επιφάνεια. Είναι επίσης δυνατή η ύπαρξη ενός μικρού ποσοστού α β διμερών στην κυτταρική επιφάνεια τα οποία μπορούν να συνδεθούν με ένα πεπτιδίο εξωκυτταρικά. Η ανακύκλωση των τριμερών (α αλυσίδα, β αλυσίδα, πεπτιδίο) δεν φαίνεται δυνατή καθ' ότι ο χρόνος ημιζωής του διμερούς α β αλυσίδας και του συνδεδεμένου πεπτιδίου είναι ίδιος (Davidson et al., 1991) και συνεπώς η σύνδεση ενός πεπτιδίου γίνεται μόνο κατά το σχηματισμό ενός νεοσυντιθέμενου τριμερούς. Τα πεπτιδία τα οποία παρουσιάζονται από τα τάξης II μόρια προέρχονται ως επί το πλείστον από πρωτεΐνες οι οποίες έχουν ενδοκυτταρωθεί. Η ενδοκυττάρωση πρωτεϊνών μπορεί να συμβεί με διάφορους τρόπους, όπως σύνδεση πρωτεΐνης με ανοσοσφαιρίνη με σύνδεση του συμπλέγματος αντιγόνου-αντισώματος σε ένα Fc υποδοχέα ή με ενδοκύττωση. Το περιβάλλον του ενδοσώματος/λυσσοσώματος π.χ. με τη δράση πρωτεασών, είναι υπεύθυνο για τη διάσπαση της πρωτεΐνης.

### **1.8 Κυτταροκίνες.**

Οι κυτταροκίνες είναι πρωτεΐνες οι οποίες ρυθμίζουν τα περισσότερα από τα ενδοκυτταρικά μηνήματα που απαιτούνται για μια ολοκληρωμένη απάντηση σε μια ποικιλία εξωγενών διεγέρσεων. Έχειδειχθεί ότι συμμετέχουν στη ρύθμιση της αιματοποίησης, λεμφοποίησης, επηρεάζουν τη λειτουργία όλων των κυτταρικών τύπων που συμμετέχουν στην ανοσολογική απάντηση και έχουν αναμιχθεί σε ένα μεγάλο εύρος ασθενειών. Συνήθως μια κυτταροκίνη παράγεται σε περισσότερους από ένα κυτταρικούς τύπους και έχει ποικίλλα αποτελέσματα σε διαφορετικούς στόχους. Στις πρωταρχικές μελέτες που έγιναν σε αυτούς τους παράγοντες χρησιμοποιήθηκαν υπερκείμενα καλλιέργειών. Εξ' αιτίας της συμμετοχής των μορίων αυτών σε διαφορετικά συστήματα στο σώμα η πρωταρχική ονοματολογία δόθηκε με βάση τη λειτουργική τους δράση, π.χ. η ιντερλευκίνη-1 έγινε γνωστή σαν ενδογενής πυρετογόνος ουσία από μία ομάδα ερευνητών, λόγω της ιδιότητάς της να



προκαλεί πυρετό, ή σαν ενεργοποιητικός παράγοντας οστεοκλαστών από μια άλλη ερευνητική ομάδα (Roitt et al., 1990). Κατά τη διάρκεια των τελευταίων πέντε χρόνων, η κλωνοποίηση των κυτταροκινών οδήγησε στη διαθεσιμότητα ανασυνδυασμένου υλικού για μελέτη. Αυτό σε συνδυασμό με την ανάπτυξη ειδικών αντισωμάτων και κυτταρικών γραμμών που χρειάζονταν για τον πολλαπλασιασμό τους την παρουσία κάποιων κυτταροκινών οδήγησε σε κάποια αποσαφήνιση των ρόλων αυτών των μορίων σε μια ποικιλία πολύπλοκων βιολογικών συστημάτων, συμπεριλαμβανομένου και του ανοσολογικού συστήματος. Οι κυτταροκίνες είναι εξαιρετικά ισχυροί μεσολαβητές οι οποίες αλληλεπιδρούν με ειδικούς υποδοχείς υψηλής συγγένειας στην κυτταρική μεμβράνη. Αποτελούν επαγωγίμες πρωτεΐνες των οποίων η παραγωγή είναι συχνά προσωρινή. Ανάλυση της αλληλουχίας στο 5' άκρο των μή μεταφρασμένων τμημάτων των mRNA των γονιδίων που κωδικοποιούν τις κυτταροκίνες αποκάλυψε την ύπαρξη συντηρητικών περιοχών οι οποίες αποτελούν στόχους για την προσύνδεση πυρηνικών πρωτεϊνών που ελέγχουν την γονιδιακή ενεργοποίηση. Τα mRNAs για κάποιες από τις κυτταροκίνες (π.χ. IFN $\beta$ , IFN $\gamma$ , GM-CSF και G-CSF) έχουν εξαιρετικά μικρούς χρόνους ημιζωής (<30 λεπτά) ενώ οι χρόνοι ημιζωής άλλων (π.χ. IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, TNF- $\alpha$ ) είναι μεγαλύτεροι (1-2 ώρες), αλλά εξακολουθούν να παραμένουν μικροί σε σχέση με τα περισσότερα mRNAs των θηλαστικών. Αυτός ο χαμηλός χρόνος ημιζωής έχει αποδοθεί στην παρουσία μιας πολυ (UAUU) περιοχής μέσα στο 3' άκρο του μή μεταφρασμένου τμήματος των mRNAs κάτι το οποίο κάνει το μήνυμα της κυτταροκίνης ευάλωτο στις κυτταρικές νουκλεάσες, ελέγχοντας έτσι αυστηρά την παραγωγή των κυτταροκινών. Άλλοι τρόποι ελέγχου περιλαμβάνουν την παραγωγή αναστολέων των κυτταροκινών και την απελευθέρωση διαλυτών μορφών των υποδοχέων τους (Cherwinski et al., 1987).



Ο πίνακας 3 μας παρέχει πληροφορίες για μερικές από αυτές τις κυτταροκίνες και είναι αξιοσημείωτο να αναφέρουμε ότι πολλά από τα γονίδια των κυτταροκινών κωδικοποιούνται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 5 (στο χρωμόσωμα 11 του μυός).

1



**ΠΙΝΑΚΑΣ 3** Κυριότερες κυτταροκίνες

Κυτταροκίνες	IFN-α	IFN-β	IFN-γ	TNF-α	IL-1β	IL-1α	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-9	IL-10	IL-11	IL-12
Μοριακό βάρος (KDa)	16-27	20	20-24	3-17	17.5	17.5	15.5	17.5	17.5	43	21-28	25	32-39	19	23	35.4
Χρωμόσωμα	9q	9q	12q	6p	2q	2q	4q	5q	5q	5q	7q	8q	5	1		
Μιτογένεση			ναι	ναι	ναι	ναι	ναι	ναι	ναι	ναι	ναι	ναι	ναι	ναι	ναι	ναι
Κυτταροστατικότητα-Κυτταροτοξικότητα	ναι	ναι	ναι	ναι	ναι	ναι			ναι		ναι					
Κύτταρα φυσικοί φονείς	ναι	ναι	ναι	ναι	ναι	ναι	ναι	ναι		ναι	ναι					ναι
LAK-κυτταροτοξικότητα	ναι	ναι	ναι	ναι/όχι			ναι	ναι	ναι		ναι	ναι		ναι		ναι
MHC τάξης I/II	I/II	I/II	I/II	I			II	II	I					II		
Ενεργοποίηση Β κυττάρων			ναι	ναι	ναι	ναι			ναι	ναι						
Πολλαπλασιασμός Β κυττάρων	ναι	ναι	ναι	ναι/όχι	ναι	ναι	ναι	ναι	ναι	ναι/όχι		ναι				
Διαφοροποίηση Β κυττάρων	ναι		ναι	ναι/όχι	ναι	ναι	ναι	ναι	ναι	ναι/όχι	ναι	ναι		ναι		
Ενεργοποίηση Τ κυττάρων					ναι	ναι	ναι		ναι		ναι	ναι				
Διαφοροποίηση Τ κυττάρων							ναι		ναι		ναι	ναι				
Χημειόταξη	ναι		ναι	ναι	ναι	ναι	ναι	ναι	ναι	ναι				ναι		
Αιματοποίηση				ναι	ναι	ναι		ναι	ναι		ναι				ναι	
Μόρια προσκόλλησης			ναι	ναι	ναι	ναι	ναι	ναι	ναι	ναι	ναι	ναι				
Παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO)			ναι	ναι	ναι	ναι	ναι		ναι					ναι		
Πυρετογενή	ναι	ναι	ναι	ναι	ναι	ναι	ναι									
Αγγειογένεση				ναι												
Αντινεοπλασματική δράση	ναι	ναι	ναι	ναι	ναι	ναι	ναι		ναι		ναι					



### 1.9 Ανοσολογία και καρκίνος.

Η πρόοδος της έρευνας τα τελευταία χρόνια έχει προσφέρει σημαντική γνώση στην κατανόηση των μηχανισμών του ανοσολογικού συστήματος και στη συσχέτιση του με την άμυνα ενάντια στον καρκίνο. Επιπλέον η διαθεσιμότητα των ανασυνδυασμένων κυτταροκινών σε μεγάλες ποσότητες έχει επιτρέψει την ακριβή ανάλυση του τρόπου δράσης τους στο ανοσολογικό σύστημα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία *in vitro* πειραματικών πρωτοκόλλων που στοχεύουν στην αύξηση της δράσης κυτταροτοξικών κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος κατά του όγκου. Με αυτόν τον τρόπο και ύστερα από κατάλληλους χειρισμούς έχει δειχθεί ότι τα λεμφοειδή κύτταρα μπορούν να προκαλέσουν τη λύση οποιουδήποτε είδους καρκινικού κυττάρου. Κατά την τελευταία δεκαετία πολλά εργαστήρια έχουν δημοσιεύσει ότι η χορήγηση υψηλής δόσης ανασυνδυασμένης ιντερλευκίνης 2 (IL-2) με ή χωρίς την ταυτόχρονη έγχυση ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση του όγκου σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο. Εκτός από την IL-2 και άλλες κυτταροκίνες (π.χ. ιντερφερόνες) έχουν δειχθεί να διαδραματίζουν σημαντικό αντικαρκινικό ρόλο *in-vivo*. Επιπροσθέτως υπάρχουν αρκετές ενδείξεις που ενισχύουν την άποψη για την αύξηση της κυτταροτοξικής δράσης των λεμφοκυττάρων ενάντια στον όγκο κατόπιν καλλιέργειας τους με διαφορετικούς συνδυασμούς IL-2 και άλλων κυτταροκινών. Δεδομένου δε ότι η ανοσοαπάντηση ενάντια καρκινικών κυττάρων επιτυγχάνεται με μηχανισμούς της κυτταρικής ανοσίας μελέτες που θα αναλύσουν την δια των λεμφοκυττάρων εκδηλούμενη ανοσοαπάντηση στον όγκο, θα βοηθήσουν στη βελτίωση της ανοσοθεραπείας στον καρκίνο.

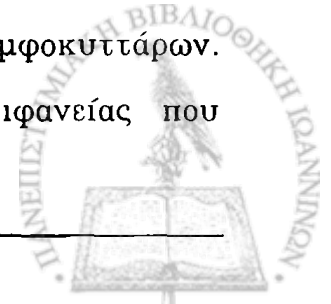
Παρά το γεγονός ότι διαφορετικοί κυτταρικοί πληθυσμοί φαίνεται ότι συμμετέχουν στην άμυνα έναντι του καρκίνου οι ανοσοποιητικοί μηχανισμοί που δραστηριοποιούνται μπορούν να διαιρεθούν σε δύο κύριες κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία αντιπροσωπεύεται κυρίως από ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα



τα οποία κατόπιν αλληλεπίδρασης τους με τα καρκινικά κύτταρα (πιθανόν μέσω αναγνώρισης καρκινικών κυτταρικών αντιγόνων, ΚΚΑ) ενεργοποιούνται και τροποποιούν τη δράση των κυτταροτοξικών εκτελεστικών κυττάρων, τα οποία ανήκουν στη δεύτερη κατηγορία. Στα κύτταρα αυτά συμπεριλαμβάνονται μια ομάδα από Τ λεμφοκύτταρα και κύτταρα φυσικοί φονείς (natural killer cells, NK). Το λειτουργικό πρόγραμμα των κυττάρων αυτών μπορεί να επηρεασθεί ποικιλόμορφα από την παρουσία αυτόλογων καρκινικών κυττάρων. Έτσι η ελαττωμένη αντιγονικότητα των καρκινικών κυττάρων (πιθανόν λόγω χαμηλής ή ελλειπούς έκφρασης των ΚΚΑ) ανταστέλλει τη διέγερση βοηθητικών καί κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων και κατά συνέπεια αναχαιτίζει την ειδική ανοσολογική απάντηση εναντίον αυτών. Επίσης η ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να παράγουν ανοσοκατασταλτικούς παράγοντες ή να συντελούν στην επαγωγή ενεργοποιημένων κατασταλτικών κυττάρων έχει σαν αποτέλεσμα την άμεση ή έμμεση αντίστοιχα καταστολή κάθε αναπτυσσόμενης ειδικής ανοσολογικής απάντησης. Κατά συνέπεια για να ελέγχονται ανοσολογικά διάφοροι τύποι καρκίνου απαιτείται: η έκφραση στα καρκινικά κύτταρα των ΚΚΑ, η παρεμπόδιση της καταστολής από τα καρκινικά κύτταρα, και η σχεδίαση in vitro πρωτοκόλλων τα οποία θα προάγουν την ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό λεμφοκυττάρων που θα αναγνωρίζουν αυτόλογα καρκινικά κύτταρα με σκοπό τη χρησιμοποίησή τους σε κλινικές προσπάθειες ανοσοθεραπείας.

### **1.10 Λεμφοειδή κύτταρα με ενεργότητα ενάντια στον καρκίνο και μηχανισμοί ενεργοποίησης τους.**

Οι κυτταρολυτικοί μηχανισμοί ενάντια καρκινικών κυττάρων διαιρούνται σε δύο βασικές κατηγορίες. Η πρώτη περιλαμβάνει την αναγνώριση των ΚΚΑ στα καρκινικά κύτταρα από το σύμπλεγμα CD3+/TCR των Τ-λεμφοκυττάρων. Το σύμπλεγμα αυτό αποτελείται από γλυκοπρωτεΐνες επιφανείας που



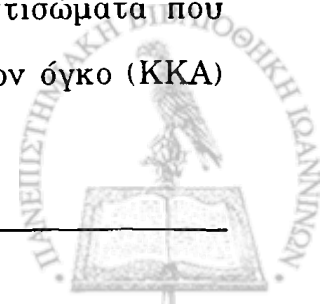
κωδικοποιούνται από γονίδια του Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας [major histocompatibility complex, (ΜΣΙ)]. Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει τα κύτταρα φυσικούς φονείς (NK). Τα κύτταρα αυτά δεν εκφράζουν το CD3 ή οποιαδήποτε από τις αλυσίδες του TCR και παρουσιάζουν κυτταροτοξικότητα έναντι καρκινικών κυττάρων η οποία δεν σχετίζεται με το ΜΣΙ. Παρ' όλα αυτά, όπως θα αναλυθεί στις επόμενες παραγράφους, κυτταροτοξικότητα μη σχετιζόμενη με το ΜΣΙ έχει επίσης αποδοθεί σε μερικά CD3+TCR αβ+ ή γδ+ ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα.

#### **1.10.1.1 Ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων**

Η ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων από αντιγόνα προαπαιτεί τη σύνδεση του TCR με ένα διμοριακό σύμπλοκο αποτελούμενο από αντιγόνο και από πεπτίδια του ΜΣΙ τάξης I ή II (*Janeway and Golstein, 1991*). Πιστεύεται ότι το μήνυμα για την ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων δίνεται μέσω του T3 συμπλόκου. Παρ' όλα αυτά μόρια επιφανείας των Τ λεμφοκυττάρων συνεργούν σε πολλές βοηθητικές αλληλεπιδράσεις με το σύμπλοκο TCR/CD3 στην ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων (*Sturm et al., 1990 June, 1991, Van Seventer et al., 1991*). Αυτές αναφέρονται κυρίως στην συγκόλληση των Τ κυττάρων με τα κύτταρα που παρουσιάζουν το αντιγόνο (cell-adhesion) και στην ενίσχυση του μηνύματος ενεργοποίησης που προέρχεται από την σύνδεση του TCR/CD3 με το αντιγόνο/MHC σύμπλεγμα (co-activation). Το CD2 ήταν το πρώτο μόριο των Τ λεμφοκυττάρων στο οποίο αποδόθηκε ο διπλός ρόλος της συγκόλλησης και της ενεργοποίησης. Η προσκόλληση του CD2 στο LFA-3 έχει σαν αποτέλεσμα την επερχόμενη αύξηση της ειδικής αντιγονικής ανοσοαπάντησης (*Shaw and Shimozu, 1988*). Η σύνδεση του CD11a/CD18 (LFA-1) στο ICAM-1 ή στο ICAM-2 έχει επίσης αναφερθεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην προσκόλληση και ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων (*Moingeon et al., 1989, Springer, 1990*). Σε ένα σύστημα όπου η ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων εξαρτάται από την παρουσία μονοκυττάρων, παρατηρείται μια χαμηλής



συγγένειας προσύνδεση του LFA-1 με το ICAM-1 η οποία ακολουθείται από την προσκόλληση των συμπλόκων TCR/CD3 με το ΜΣΙ-αντιγόνο. Στο Τ-λεμφοκύτταρο, η διέγερση του TCR/CD3 έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του υψηλής αγγιστείας μορίου LFA-1 (Kuhlman et al., 1991) το οποίο ισχυροποιεί την αλληλεπίδραση Τ λεμφοκυττάρου-μονοκυττάρου με επακόλουθο, την προσκόλληση CD2-LFA-3 και την παραγωγή IL-1 από τα μονοκύτταρα (Dustin et al., 1989). Η IL-1 επάγει την παραγωγή IFN-γ από τα Τ-λεμφοκύτταρα και η IFN-γ με τη σειρά της επάγει την έκφραση των ICAM-1 και LFA-3 στα μονοκύτταρα με αποτέλεσμα την ισχυρή σύνδεση των μορίων αυτών με τα σύνδεμα LFA-1 και CD2 αντίστοιχα των λεμφοκυττάρων. Αυτή η αλληλεπίδραση προσκόλλησης επάγει την παραγωγή IL-6 από τα μονοκύτταρα η οποία παραπέρα διεγείρει τα Τ λεμφοκύτταρα να παράγουν IL-2 και -4 και έτσι να διαφοροποιηθούν σε εκτελεστικά κύτταρα (Mourad et al., 1990). Μια άλλη αλληλεπίδραση στην οποία συμμετέχουν μηνύματα συνδιέγερσης για την ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων είναι μεταξύ του CD28 και του B7. Ο ρόλος αυτών των μορίων στην προσκόλληση και στην συνδιέγερση έχει δειχθεί: (i) από την αύξηση της μεταγραφής της IL-2 και του πολλαπλασιασμού των Τ λεμφοκυττάρων κατόπιν αλληλεπίδρασης τους με ακινητοποιημένες B7 πρωτεΐνες απουσία άλλων παραγόντων διέγερσης (Kawakami et al., 1989) και (ii) από πειράματα αναστολής της αλλο-ενεργοποίησης των Τ λεμφοκυττάρων με μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του CD28 ή του B7 που εκφράζεται στα ενεργοποιημένα Β λεμφοκύτταρα (June et al., 1990, Koulouva et al., 1991). Η πρώτη ένδειξη για την μέσω CD28 συνδιέγερσης της Τ λεμφοκυτταρικής κυτταροτοξικότητας προήλθε από μελέτες των Jung και των συνεργατών του οι οποίοι κατάφεραν να ενεργοποιήσουν περιφερικά λεμφοκύτταρα αίματος (PBL: peripheral blood lymphocytes) να λύσουν καρκινικά κύτταρα μελανώματος μετά από προεπάση με διπλής ειδικότητας μονοκλωνικά αντισώματα που ήταν anti-CD3 anti-melanoma αντιγόνων συσχετιζόμενων με τον όγκο (ΚΚΑ)





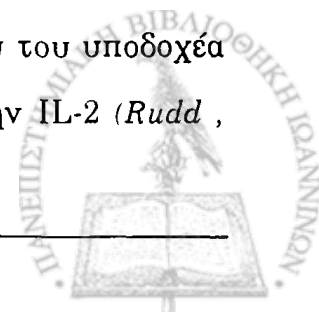
και anti-CD28 anti-melanoma (ΚΚΑ) αντισωμάτων. Σε μια πρόσφατη αναφορά ο Azuma και οι συνεργάτες του (Azuma et al., 1992) έδειξαν ότι απομονωμένα PBL συνδιεγέρθηκαν μέσω του CD28, και έλυσαν καρκινικά κύτταρα στόχους P815 (στα οποία είχαν ενσωματώσει το cDNA για το B7) μέσω του Fc υποδοχέα τους. Αναστολή της κυτταροτοξικότητας παρατηρήθηκε κατόπιν προεπώασης των T λεμφοκυττάρων ή των κυττάρων στόχων με anti-CD28 ή με anti-B7 μονοκλωνικά αντισώματα αντίστοιχα. Αυτά τα ευρήματα πιστοποιούν τη συμμετοχή του CD28 στη κυτταροτοξικότητα των T-λεμφοκυττάρων. Εκτός από την αλληλεπίδραση CD28-B7 έχειδειχθεί ότι και η δημιουργία των συμπλόκων CD3-LFA3 και LFA-1-ICAM1 ενισχύουν τη κυτταροτοξικότητα από ειδικά CD8 κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα. Σε μία πρόσφατη δημοσιευμένη μελέτη ο Malefyt και οι συνεργάτες του (Malefyt, et al., 1993) έδειξαν ότι T-κυτταροτοξικοί κλώνοι, έλυσαν L-κύτταρα στα οποία είχαν ενσωματωθεί τα γονίδια για το LFA3 ή το ICAM1 καθώς επίσης αναστολή της κυτταροτοξικότητας επετεύχθη με τη χρήση anti-LFA-1 ή anti-ICAM-1 αντισώματα. Ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων επιτυγχάνεται επίσης με τη προσκόλληση σε εξωτερικές πρωτεΐνες. Οι υποδοχείς αυτών των μορίων βρίσκονται στην επιφάνεια των T-λεμφοκυττάρων και αποτελούν μέλη του (VLA) ή της β1 (CD29) υποοικογένειας και περιλαμβάνουν το VLA-3 που προσκολλάται στο κολλαγόνο το VLA-4 που προσκολλάται στην φιβρονεκτίνη και το VLA-6 που προσκολλάται στην λαμινίνη (Dang et al., 1990, Shimizu et al., 1990, Nojima et al., 1990, Yamada et al., 1991). Ο μηχανισμός με τον οποίο οι υποδοχείς αυτοί συμμετέχουν στην ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων παραμένει άγνωστος αν και πιστεύεται ότι το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης υποδοχέα-εξωκυτταρικών πρωτεϊνών είναι η επαγωγή του μεταγραφικού παράγοντα AP-1, ο οποίος ενεργοποιεί την μετεγραφή του γονιδίου της ιντερλευκίνης-2 διαμέσου διαφορετικού μονοπατιού από αυτό που ακολουθεί η ενεργοποίηση με αντίσωμα εναντίον του CD3 μορίου (Yamada et al., 1991).



Μόρια συνδιέγερσης αποτελούν και τα CD4 και τα CD8, όπου κατά τη διάρκεια της αντίγονικής παρουσίασης αναγνωρίζουν δομές τετραμοριακών συμπλόκων. Τα CD4 και CD8 αναγνωρίζουν σταθερές περιοχές των μορίων του ΜΣΙ τάξης II και τάξης I αντίστοιχα ενώ στην υπερμεταβλητή περιοχή του συμπλόκου CD3/TCR προσδέεται το αντιγονικό πεπτίδιο (Rudd, 1990). Πολλές αναφορές έχουν γίνει για το ρόλο των CD4 και CD8 στην ενεργοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων συμμετέχοντας όχι μόνο σαν μόρια συν-διέγερσης αλλά και σαν συν-υποδοχείς. Επιβεβαίωση αυτών των προτάσεων αποτελούν πειράματα i) αναστολής σύνδεσης του CD4 και CD8 στα μόρια του ΜΣΙ με τη χρήση anti-CD4 ή anti-CD8 με τελικό αποτέλεσμα τη μη ενεργοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων και ii) ενδοθυμικής διαφοροποίησης των Τ-λεμφοκυττάρων όπου παρατηρήθηκε άμεση συσχέτιση της έκφρασης του CD4 ή του CD8 με την ειδικότητα του Τ-υποδοχέα με τα τάξης II του ΜΣΙ (Janeway, 1989).

#### **1.10.1.2 Μετάφραση των μηνυμάτων στα λεμφοκύτταρα.**

Ο όρος μετάφραση των μηνυμάτων αναφέρεται στα βιοχημικά γεγονότα που οδηγούν στο ξεκίνημα της μεταγραφής του γονιδίου για την IL-2 κατόπιν προσύνδεσης του αντιγόνου με τον Τ-υποδοχέα ή σύνδεση των μορίων επιφανείας (όπως TCR-CD3, CD2 και CD28) από ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα. Τα μηνύματα που μεταφράζονται κατόπιν ενεργοποίησης του TCR-CD3 και CD2 περιλαμβάνουν ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C (phospholipase C=PLC) η οποία επιτελεί την υδρόλυση της 4,5 διφωσφορικής φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (Mentzer et al., 1987, Van Severter et al., 1991) σε τριφωσφορική ινοσιτόλη (inositole triphosphate=IP3) και σε διακυλογλυκερόλη (diacylglycerol=DAG). Τα δευτερογενή αυτά μηνύματα με τη σειρά τους ενεργοποιούν τη κυτταροπλασματική πρωτεϊνική κινάση C (cytoplasmic protein kinase C=PKC) και προκαλούν μια αύξηση της συγκέντρωσης ασβεστίου  $Ca^{2+}$ . Στη συνέχεια επέρχεται έκφραση του γονιδίου του υποδοχέα για την IL-2 και τελικά κυτταρική αύξηση εξαρτώμενη από την IL-2 (Rudd ,



1990, June, 1991). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η διαδικασία της μετάφρασης των μηνυμάτων σαν αποτέλεσμα της ενεργοποίησης μέσω της PLC προϋποθέτει προηγούμενη ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης των τυροσινών (protein tyrosine kinase=PTK) ύστερα από διέγερση του TCR-CD3 ή του CD2. Η ανίχνευση της φωσφορυλίωσης τυροσινικών καταλοίπων διαφορετικών υποστρωμάτων έγινε δευτερόλεπτα μετά τη διέγερση του TCR και προηγήθηκε του σήματος της PLC ενεργοποίησης (June et al., 1990). Επιπλέον αναστολή της PTK ενεργότητας εμπόδισε την ενεργοποίηση της PLC και τη μετάφραση των μηνυμάτων μέσω του TCR (Mustelin et al., 1990) πιστοποιώντας ότι η φωσφορυλίωση των τυροσινικών καταλοίπων προαπαιτείται της ενεργοποίησης του PLC. Η κινάση των τυροσινών p59fyn έχει δειχθεί ότι συνδέεται με το TCR-CD3 και αποτελεί το βασικό υποψήφιο αυτής της ενεργότητας (June et al., 1990). Η σπουδαιότητα της φωσφορυλίωσης των τυροσινών στη μετάφραση των μηνυμάτων ύστερα από διέγερση του TCR έχει δειχθεί επίσης μέσω της ενεργότητας άλλων κινάσεων των τυροσινών: σύνδεση του TCR-CD3 με το CD4 ή το CD8 αυξάνει την ενεργότητα της φωσφορυλίωσης τυροσινών με την ενεργοποίηση της P56lck κινάσης. Το γεγονός αυτό συνδέεται με την TCR/T3 ενεργοποίηση της PI-PLC, τη ροή του ενδοκυτταρικού  $[Ca^{2+}]$ , τη μεταγραφή του γονιδίου για την IL-2 και τον πολλαπλασιασμό των Τ-λεμφοκυττάρων (Rudd et al., 1989). Οπως προαναφέρθηκε οι διαφορετικοί ισόμορφοι του CD45 ελέγχουν διαφορετικούς υποπληθυσμούς των CD4 και CD8 λεμφοκυτταρικών υποομάδων με διαφορετικές ενεργειακές απαιτήσεις και λειτουργίες. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν τη φυσική σύνδεση του CD45 με τα TCR-CD3 και CD2 και τη συνεργιστική του δράση με αυτά τα μόρια στη Τ-λεμφοκυτταρική ενεργοποίηση (Van Seventer et al., 1991, Turka et al., 1992). Οι ενδοκυτταρικές περιοχές του CD45 δείχνουν ενζυμική δράση σαν φωσφατάσεις των τυροσινών (Van Seventer et al., 1991, Turka et al., 1992, Biever et al., 1991, Koretzky et al., 1990).



Από τις παρατηρήσεις αυτές προτείνεται η συσχέτιση μεταξύ δημιουργίας μηνύματος μέσω των CD4/CD8-CD3 και p56lck και η τροποποίηση του μέσω της περιοχής με δράση φωσφατάση του CD45. Η ικανότητα του CD45 να τροποποιεί μεταφρασμένα μηνύματα μέσω των TCR/CD3 και CD2 συσχετίζεται με τη δράση του να αναστέλλει τη φωσφορυλίωση των τυροσινών σε διαφορετικά ενδοκυτταρικά υποστρώματα (*Ledbetter et al., 1991*). Κατά συνέπεια η ενζυμική ενεργότητα φωσφατάσης του CD45 μπορεί να δρα αναστέλλοντας κάποια στάδια της μετάφρασης μηνυμάτων στη T-λεμφοκυτταρική ενεργοποίηση η οποία άρχισε με τη σύνδεση του TCR ή του CD2. Η διέγερση του CD28 οδηγεί στη σταθεροποίηση και στην ενίσχυση της μετάφρασης του mRNA της IL-2, μετά της επαγωγή της μεταγραφής του γονιδίου της IL-2 μέσω του TCR μονοπατιού μετάφρασης μηνυμάτων (PI-PLC ενεργοποίηση) (*June, 1991, Linsley et al., 1990*). Επιπλέον έχει δειχθεί ότι η διέγερση του CD28 προκαλεί το σχηματισμό ενός πρωτεϊνικού συμπλόκου το οποίο προσδένεται σε μία θέση του γονιδίου της IL-2 (μεταξύ 164 και 154 ζευγάρια βάσεων από την αφετηρία της μεταγραφής) και πενταπλασιάζει την ενεργότητα της IL-2 (*Mustelin et al., 1990*).

#### **1.10.2.1 Κύτταρα φυσικοί φονείς.**

Τα κύτταρα φυσικοί φονείς (natural killers=NK) είναι ένας υποπληθυσμός των λεμφοκυττάρων ο οποίος αποτελεί το 20% των περιφερικών λεμφοκυττάρων του αίματος. Διακρίνεται τόσο από τα T όσο και από τα B λεμφοκύτταρα με βάση την μορφολογία τους (χαρακτηρίζονται σαν μεγάλα κοκκιώδη λεμφοκύτταρα: large granuloocytes lymphocytes=LGL) και από την ιδιότητα τους να λύνουν καρκινικά κύτταρα και κύτταρα προσβεβλημένα από ιούς χωρίς προηγούμενη ευαισθητοποίηση τους ή συσχέτιση τους με προϊόντα του ΜΣΙ τάξης I ή II (*Trinchieri, 1989*).



Στα κύτταρα φυσικοί φονείς δεν προκαλείται αναδιάταξη ούτε μεταγραφή του TCR ή γονιδίων ανοσοσφαιρινών (Ig) και γι' αυτόν τον λόγο είναι CD3- και Ig- αρνητικά (*Whiteside and Herberman, 1990*). Αν και η έκφραση των μορίων προσκόλλησης, στα οποία συμπεριλαμβάνονται ιντεγκρίνες β1, β2 και β3, CD44 και L-σελεκτίνη, CD2 και CD58, δεν είναι σημαντική σε απομονωμένα κύτταρα φυσικούς φονείς, μεγιστοποιείται κατά τη διάρκεια επώασης τους με IL-2 (*Maengaa et al., 1993*). Το CD44 είναι ένα από τα μόρια που οδηγεί στην ενεργοποίηση των NK-κυττάρων αφού προσύνδεση του με μονοκλωνικά αντισώματα έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της λύσης NK-ευαίσθητων κυττάρων στόχων χωρίς αντίστοιχη αύξηση της κυτταροτοξικότητας αναντίον ανθεκτικών, στην NK λύση, κυτταρικών σειρών (*Tan et al., 1993*). Εκτός από την ικανότητα τους να προκαλούν λύση μη ΜΣΙ-συσχετιζόμενη, τα NK-κύτταρα εκτελούν και διάφορες άλλες λειτουργίες όπως: (i) ρυθμιστικές ιδιότητες στο ανοσολογικό σύστημα στην αιματοποίηση και στην φυσική άμυνα έναντι μικροβιακών μολύνσεων που πιθανότατα μεσολαβούνται μέσω της έκκρισης κυτταροκινών (*Trinchieri, 1989, Trinchieri and Perussia, 1984, Whiteside and Herberman, 1990*), (ii) λειτουργούν σαν παρουσιαστές αντιγόνου με το να αδρανοποιούν, να εγκολπώνουν και να παρουσιάζουν διαλυτά πρωτεϊνικά αντιγόνα στα T-βοηθητικά (*Roncarolo et al., 1991*), (iii) επιδεικνύουν την κυτταρική δι' αντισώματος εξαρτώμενη κυτταροτοξικότητα μέσω του υποδοχέα για το Fcγ τμήμα των IgG (*Ravetch and Kinet, 1991*), (iv) τα NK-κύτταρα είναι οι βασικοί προγεννήτορες στο περιφερικό αίμα στη δημιουργία των κυττάρων ενεργοποιημένων με λεμφοκίνες (LAK κύτταρα) ικανών να λύουν NK-ευαίσθητα κύτταρα στόχους, (v) πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι τα NK-κύτταρα εκφράζουν μόρια επιφανείας τα οποία όχι μόνο ενεργοποιούν την κυτταροτοξικότητα, αλλά και αναστέλλουν τη διαδικασία της κυτταρικής λύσης.



### 1.10.2.2 Επιφανειακοί δείκτες που χαρακτηρίζουν τα NK-κύτταρα.

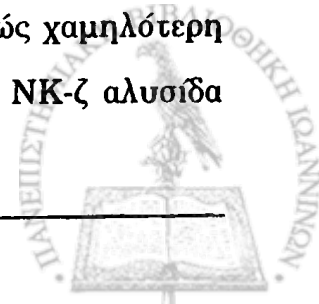
Τα NK κύτταρα εκφράζουν το CD56 επιφανειακό αντιγόνο. Το CD56 φαίνεται να είναι ένας ισόμορφος του μορίου προσκόλλησης των νευρικών κυττάρων (neural cell adhesion molecules=NCAM) σε ομοτυπικά μυικά κύτταρα (Lanier et al., 1991). Το NCAM είναι μέλος της Ig υπεργονιδιακής οικογένειας και αποτελείται από πέντε Ig-παρόμοιες περιοχές και δύο περιοχές τύπου III ινωδεσμινών (Edelman, 1988). Το NCAM όπως και το CD45 μόριο, μπορεί να εκφραστεί με διαφορετικούς ισόμορφους οι οποίοι δημιουργούνται από εναλλακτικό mRNA-μάτισμα (mRNA splicing). Έχουν απομονωθεί μέχρι σήμερα σε νευρικό και μυικό ιστό τρία διαμεμβρανικά πολυπεπτίδια μοριακών βαρών 120 140 και 180 kd (Cunningham et al., 1987). Αυτοί οι διαφορετικοί ισόμορφοι διαφέρουν κατά κύριο λόγο στις διαμεμβρανικές και κυτταροπλασματικές περιοχές τους. Επίσης έχουν αναφερθεί διαφορές στις εξωκυτταρικές περιοχές σαν αποτέλεσμα εναλλακτικού "splicing" των μηνυμάτων μεταγραφής που κωδικοποιούνται από διάφορα μικρά εξόνια (exons) (Hemperly et al., 1990). Το CD56 εκφράζεται στο 5% των περιφερικών T λεμφοκυττάρων (Lanier et al., 1986). Τα κύτταρα στόχους στα οποία έχουν προσδεθεί Ig μόρια, αποτελούν θέσης προσκόλλησης του υποδοχέα χαμηλής συγγένειας των NK κυττάρων για το Fc τμήμα των Ig (FcγR IIIA ή CD16) με αποτέλεσμα την λύση των κυττάρων στόχων. Αυτή η διαδικασία αποτελεί τη δι' αντισώματος εξαρτώμενη κυτταροτοξικότητα (ADCC). Όπως και ο TCR, ο NK FcR είναι ένα πολυμοριακό σύμπλοκο αποτελούμενο από J και Fcεγ αλυσίδες εκτός από το διαμεμβρανικό μόριο σύνδεσης που κωδικοποιείται από το γονίδιο του FcγRIIIA. Έχουν περιγραφεί δύο διαφορετικές μορφές του FcγR III (FcγRIIIA και FcγRIIIB). (Ravetch and Kinet, 1991, Anderson et al., 1987). Η FcγRIIIB η οποία εκφράζεται στα ουδετερόφιλα εντοπίζεται στην εξωτερική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης, ενώ η μορφή του υποδοχέα που εκφράζεται στα NK-κύτταρα, η FcγRIIIA είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη



αποτελούμενη από μια διακριτή κυτταροπλασματική περιοχή (*Ravetch and Kinet, 1991, Letourneur et al., 1991*). Τα CD3+ T-κύτταρα στο περιφερικό αίμα που εκφράζουν τον FcγRIIIA αποτελούν ποσοστό λιγότερο του 1% (*Lanier et al., 1986*).

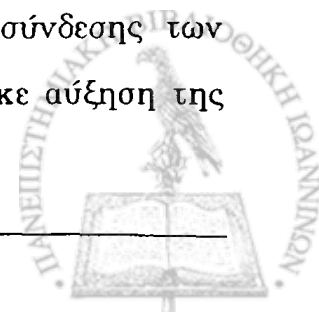
### **1.10.2.3 Υποπληθυσμοί των NK-κυττάρων.**

Με βάση την πυκνότητα των CD56 μορίων στην κυτταρική επιφάνεια τα NK-κύτταρα διαιρούνται σε δύο υποπληθυσμούς: α) Αυτά που εκφράζουν το CD56 σε χαμηλή πυκνότητα και που αποτελούν το 90% των NK-κυττάρων και β) σε εκείνα όπου η έκφραση του CD56 είναι υψηλή και που αποτελούν το 10% περίπου των NK κυττάρων (*Caligiuri et al., 1990*). Οι φαινοτυπικά διαφορετικοί NK κυτταρικοί υποπληθυσμοί χαρακτηρίζονται επίσης και από λειτουργικές διαφορές. Κατόπιν έκθεσης σε εξωγενή IL-2 τα CD56 υψηλής πυκνότητας (ΥΠ) κύτταρα πολλαπλασιάζονται περισσότερο απ'ότι τα CD56 χαμηλής πυκνότητας (ΧΠ) κύτταρα (*Baume et al., 1992*). Σαν επακόλουθο της προηγούμενης παρατήρησης τα CD56 ΧΠ NK- κύτταρα εκφράζουν τον IL-2 υποδοχέα ενδιάμεσης συγγένειας (IL-2R p75) με ταυτόχρονη απουσία έκφρασης του IL-2R p55, ενώ τα CD56 ΥΠ κύτταρα εκφράζουν τον υποδοχέα υψηλής συγγένειας της IL-2 p75/p55 IL-2R (*Caligiuri et al., 1990*). Για αυτόν τον λόγο έχει προταθεί ότι ο NK-κυτταρικός πολλαπλασιασμός απαιτεί την επαγωγή της έκφρασης του IL-2 p55 και στην συνέχεια τον σχηματισμό του συμπλόκου υψηλής συγγένειας IL-2R p55/p75 (*Caligiuri et al., 1990, Baume et al., 1992, Siegel et al., 1987*). Οπωσδήποτε υπάρχουν και άλλα μόρια τα οποία ελέγχουν τον δια μέσω IL-2 πολλαπλασιασμό των CD56 ΧΠ NK κυττάρων. Η συντριπτική πλειοψηφία των CD56 ΧΠ NK κυττάρων (>90%) συνεκφράζουν CD16 μόρια σε υψηλά επίπεδα, σε αντίθεση με το ποσοστό των CD56 ΥΠ κυττάρων που εκφράζουν το CD16 σε ένα ποσοστό <50% του συνόλου τους. Αντίθετα στα CD56 ΧΠ η πυκνότητα έκφρασης των CD16 μορίων είναι σαφώς χαμηλότερη απ'ότι στα CD56 ΥΠ κύτταρα (*Nagler et al., 1990*). Επιπλέον η NK-ζ αλυσίδα



εκφράζεται σε μεγαλύτερο βαθμό στα CD56 ΧΠ κύτταρα απ'ότι στα CD56 ΥΠ κύτταρα (Nagler et al., 1990). Τα CD56 ΧΠ κύτταρα κατόπιν διέγερσης τους με κύτταρα στόχους στα οποία έχουν προσδεθεί αντισώματα παρουσίασαν ισχυρή κυτταροτοξικότητα και έκφραση του υψηλής συγγένειας IL-2R. Η ενεργοποίηση αυτή προϋποθέτει τη δημιουργία του συμπλόκου CD16/ζ αλυσίδα και φωσφορυλίωση της NK-ζ αλυσίδας. Αντίθετα η ενεργοποίηση αυτή απέτυχε να αυξήσει τον πολλαπλασιασμό των CD56 ΧΠ κυττάρων σε απάντηση στην παρουσία της IL-2 (Baume et al., 1992). Παρ'όλα αυτά ο χαμηλός πολλαπλασιασμός αυτών των κυττάρων δεν σημαίνει απαραίτητα και χαμηλή NK-ενεργότητα (Cunningham et al., 1987). Από την στιγμή λοιπόν που τα CD56 ΧΠ κύτταρα αποτελούν την πλειονότητα των NK-κυττάρων του περιφερικού αίματος και εκδηλώνουν ισχυρή κυτταροτοξικότητα κατόπιν ενεργοποίησης τους, θεωρείται αναγκαίο η ανεύρεση εκείνων των παραγόντων που αυξάνουν τον πολλαπλασιασμό τους παρουσία IL-2. Η διασαφήνιση αυτών των μηχανισμών θα βοηθήσει την επίτευξη του μέγιστου πολλαπλασιασμού και αύξησης σε σημαντικούς αριθμούς των κυττάρων αυτών με στόχο να χρησιμοποιηθούν σε κλινικές εφαρμογές στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου.

Η ετερογένεια των NK-κυττάρων δείχθηκε επίσης με την χρησιμοποίηση του μονοκλωνικού αντισώματος GL138 το οποίο επέτρεψε την ταυτοποίηση δύο φαινοτυπικά διαφορετικών NK υποπληθυσμών. Το αντίσωμα αυτό προήλθε κατόπιν ανοσοποίησης ποντικών BALB/C μ' ένα κλώνο προερχόμενο από περιφερικά NK-κύτταρα και ο οποίος είχε τον φαινότυπο CD3-CD16+CD56+. Το αντίσωμα αυτό αναγνωρίζει ετεροδιμερή αποτελούμενα από δύο ομοιοπολικά συνδεδεμένες αλυσίδες μοριακού βάρους 55 και 58 kd (Moretta et al., 1990). Τα GL183+ κύτταρα αποτελούν το 40% ανάμεσα στα CD56+CD16+ NK-κύτταρα και παρουσιάζουν χαμηλότερη κυτταροτοξικότητα απ'ότι τα GL183- NK-κύτταρα. Σε πειράματα προσύνδεσης των GL183+ κυττάρων με το μονοκλωνικό αντίσωμα παρατηρήθηκε αύξηση της

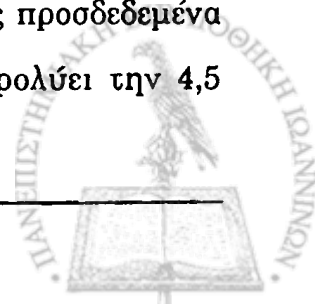




ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης του  $[Ca^{2+}]$  και της παραγωγής κυτταροκινών, γεγονός που συνδυάστηκαν με ισχυρή αύξηση της κυτταροτοξικής τους δράσης. Τα ευρήματα αυτά χαρακτηρίζουν τα GL-183 μόρια επιφανείας σαν μεταβιβαστές σημάτων ενεργοποίησης σε NK κύτταρα. Η ετερογένεια των NK κυττάρων δημιούργησε πολλές δυσκολίες στην κατανόηση της ακολουθίας των γεγονότων που χαρακτηρίζουν την NK-κυτταρική ωρίμανση. Σε μια πρόσφατη αναφορά ο Lebow και οι συν. (Lebow et al., 1993, επέτυχαν χρησιμοποιώντας μια τεχνική κυτταρομετρίας ροής να απομονώσουν και να χαρακτηρίσουν λειτουργικά καθορισμένους κυτταρικούς υποπληθυσμούς. Οι υποπληθυσμοί αυτοί καταχωρήθηκαν σε: α) εκείνους που συνδέονται με κύτταρα στόχους και τα λύουν (λυτικοί υποπληθυσμοί), β) εκείνους που συνδέονται με κύτταρα στόχους αλλά δεν παρουσιάζουν λυτική λειτουργικότητα (συνδεδεμένοι μη λυτικοί υποπληθυσμοί), και γ) εκείνους που δεν έχουν την ικανότητα σύνδεσης με κύτταρα στόχους (ελεύθεροι υποπληθυσμοί). Αυτοί οι υποπληθυσμοί αποδείχθηκε ότι αντιπροσωπεύουν κύτταρα σε διαφορετικά στάδια της NK- διαφοροποίησης και που απαιτούν την παρουσία της IL-2 για να ωριμάσουν. Η αλληλουχία των σταδίων ωρίμανσης μπορεί να χαρακτηριστεί ως ακολούθως: NK κύτταρα αποκτούν την κυτταροτοξική τους λειτουργία πριν αρχίσουν να πολλαπλασιάζονται και στην συνέχεια αφού αλληλεπιδράσουν με κύτταρα στόχους επάγεται ο πολλαπλασιασμός τους και διαφοροποιούνται σε ειδικούς NK-κλώνους. Η παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι ειδικών NK-κλώνων θα βοηθήσει περαιτέρω στην αποσαφήνιση των μηχανισμών διαφοροποίησης και ενεργοποίησης των NK-κυττάρων.

#### **1.10.2.4 Μεταφορά των μηνυμάτων στα NK-κύτταρα.**

Με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι του FcR3 (CD16) στα NK-κύτταρα ή διαφορετικά χρησιμοποιώντας κύτταρα στόχους προσδεδεμένα με αντισώματα, επάγεται η ενεργοποίηση της PLC η οποία υδρολύει την 4,5



διφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη η οποία προκαλεί με τη σειρά της την γένεση των IP3 και DAG σαν δευτερογενή μηνύματα και στην συνέχεια αύξηση της κινητοποίησης των ιόντων του  $Ca^{2+}$  και ενεργοποίηση της PKC (Kennedy et al., 1991). Επίσης ενεργοποιώντας το CD16 επάγεται φωσφορυλίωση σ'ένα αριθμό πρωτεϊνών συμπεριλαμβανομένου της ζ-αλυσίδας (O'Shea et al., 1991). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι ειδικοί αναστολείς της PTK , αναστέλλουν τόσο το σχηματισμό των CD16 επαγόμενων φωσφορικών της ινοσιτόλης όσο και την κυτταροτοξικότητα (συμπεριλαμβανομένης της ADCC και της NK και LAK κυτταροτοξικής δράσης (Stahls et al., 1992, Ting et al., 1991, O'Shea et al., 1992). Οι παρατηρήσεις αυτές οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η ενεργότητα της PLC στα NK-κύτταρα μετά την προσύνδεση της με το CD16 ρυθμίζεται μέσω φωσφορυλίωσης πρωτεϊνικών τυροσινών. Με αυτό το τρόπο φαίνεται ότι η PTK αναμιγνύεται στα πρώτα στάδια της μετάφρασης των μηνυμάτων προερχόμενα από εξωκυτταρικούς υποδοχείς (π.χ. CD16) σε ενδοκυτταρικούς επαγωγείς όπως η PLC παρότι έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία και άλλοι μηχανισμοί (π.χ. μετάφραση των μηνυμάτων μέσω των πρωτεϊνών που συνδέονται με το GTP) γι'αυτό το φαινόμενο (Procopio et al., 1991).

Από την άλλη μεριά όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, φαίνεται ότι η πρωτογενής ρύθμιση της ενεργότητας της PLC σε NK και T- διεγερμένα κύτταρα γίνεται μέσω της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνικών τυροσινών. Κατά συνέπεια ο ρόλος των G-πρωτεϊνών στην ενεργοποίηση της PLC στα NK και T- κύτταρα απαιτείται περαιτέρω αποσαφήνισης. Εξάλλου λεπτομερείς μελέτες στη μελέτη του κύκλου της φωσφοϊνοσιτόλης στα λεμφοκύτταρα προτείνουν πολλαπλές θέσεις ενεργοποίησης διαφορετικές από την ενεργότητα της PLC (Inocuchi and Imboden, 1990).



### 1.10.2.5 Ρύθμιση της ενεργοποίησης των NK-κυττάρων

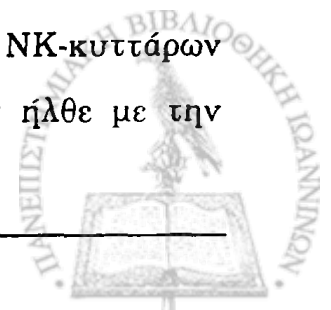
Μελέτες ετερογενών πληθυσμών NK-κυττάρων, προτείνουν ότι η ενεργότητα των NK-κυττάρων μπορεί να συνδέεται με τη παρουσίαση ειδικών αντιγόνων του ΜΣΙ στα κύτταρα στόχους. Ειδικότερα φαίνεται ότι υπάρχει μια αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης μερικών μορίων του ΜΣΙ τάξης I στα κύτταρα στόχους και της NK-κυτταροτοξικής δράσης. Έτσι δείχθηκε ότι μεταλλαγμένες κυτταρικές σειρές που δεν εκφράζουν τα μόρια του τάξης I του ΜΣΙ είναι πιο ευαίσθητες στην NK-κυτταρική λύση από ότι οι μη μεταλλαγμένες (Renzo et al., 1991). Επιπλέον η επιμόλυνση κυτταρικών σειρών, αρνητικών όσον αφορά την έκφραση των μορίων τάξης I του ΜΣΙ, με το γονίδιο της  $\beta_2$  μικροσφαιρίνης οδήγησε στην έκφραση των μορίων τάξης I του ΜΣΙ στην επιφάνεια των κυτταρικών αυτών σειρών και ταυτόχρονα κατέστησε αυτές ανθεκτικές στην NK λυτική δραστηριότητα (Shimizu et al., 1989, Carlow et al., 1991). Παρόμοιες μελέτες έχουν δείξει σύμφωνα αποτελέσματα: έτσι η επιμόλυνση κυττάρων με τα ίδια τα γονίδια που κωδικοποιούν για συγκεκριμένα μόρια της τάξης I του ΜΣΙ (και όχι πλέον για το γονίδιο της  $\beta_2$  μικροσφαιρίνης που οδηγεί έμμεσα στην συνέκφραση των μορίων τάξης I του ΜΣΙ) οδήγησε σε ενισχυμένη NK-κυτταροτοξικότητα όταν τα κύτταρα αυτά χρησιμοποιήθηκαν σαν κύτταρα στόχοι (Versteeg, 1991). Αυτά τα ευρήματα επιβεβαιώθηκαν και από in vivo μελέτες σε μυσ που δεν εκφράζουν την  $\beta_2$  μικροσφαιρίνη ( $\beta_2$  ελαττωματικά διαγενετικοί μυσ: transgenic mice) και κατά συνέπεια δεν εκφράζουν τα τάξης I μόρια του ΜΣΙ στην επιφάνεια των κυττάρων τους. Σπληνοκύτταρα από  $\beta_2$  ελαττωματικούς-διαγενετικούς BALB/c μυσ απεδείχθησαν κατά πολύ ανθεκτικότερα σαν κύτταρα στόχοι έναντι στην NK-κυτταροτοξικότητα σε σύγκριση με σπληνοκύτταρα από BALB/c μυσ που εξέφραζαν τα τάξης I ΜΣΙ μόρια (Baxevanis and Paramichail, 1994). Λαμβάνοντας λοιπόν υπόψη αυτές τις μελέτες συμπεραίνουμε ότι τα τάξης I μόρια του ΜΣΙ παρουσιάζουν πεπτιδία στα NK-



κύτταρα όπως γίνεται και με τα κυτταροτοξικά Τ-λεμφοκύτταρα αλλά με αντίθετες λειτουργικές συνέπειες, καθότι σε αντίθεση με τα κυτταροτοξικά Τ-κύτταρα, τα ΝΚ-κύτταρα είναι λιγότερο κυτταροτοξικά έναντι στόχων που εκφράζουν μόρια του τάξης I ΜΣΙ ενώ είναι περισσότερο ικανά να λύουν κύτταρα στόχους που δεν έχουν έκφραση μορίων του ΜΣΙ. Για να εξηγηθεί το φαινόμενο της αντίστροφης συσχέτισης μεταξύ της έκφρασης των αντιγόνων στα τάξης I μόρια του ΜΣΙ και της ικανότητας για ΝΚ-λύση προτάθηκαν δύο μηχανισμοί (Karre et al., 1986). Το μόριο τάξης I του ΜΣΙ μπορεί να καλύπτει το αντιγόνο στο κύτταρο στόχο πάνω στο οποίο αναγνωρίζεται από το ΝΚ-κύτταρο. Με αυτό το τρόπο εμποδίζεται η προσκόλληση των ΝΚ-κυττάρων στα κύτταρα στόχους. Σύμφωνα με τη δεύτερη υπόθεση το μόριο τάξης I του ΜΣΙ μπορεί να αναγνωρίζεται ειδικά από ένα υποδοχέα του ΝΚ-κυττάρου το οποίο μεταφέρει ένα αρνητικό μήνυμα. Σύμφωνα με το πρώτο μοντέλο ή αλλιώς μοντέλο αμφίεσης (masking model) απαιτείται τουλάχιστον ένας υποδοχέας στο ΝΚ-κύτταρο ο οποίος προσκολλάται σε δομές του κυττάρου στόχου ενώ με βάση το δεύτερο μοντέλο αρνητικής τροφοδοσίας (negative signalling model) απαιτούνται δύο υποδοχείς, ένας για ενεργοποίηση και ένας για αναστολή. Από τους δύο προτεινόμενους μηχανισμούς αν και η θεωρία μεταμφίεσης δεν έχει απορριφθεί, μελέτες των τελευταίων χρόνων υποστηρίζουν το μοντέλο της αρνητικής τροφοδοσίας.

#### **1.10.2.6 Ο ρόλος των ΝΚ-κυττάρων στην ανοσοεπιτήρηση των όγκων.**

Ο ρόλος των ΝΚ-κυττάρων στην ανοσοεπιτήρηση έναντι νεοπλασματικών κυττάρων πρωτοδείχθηκε σε πειραματικά ζωικά μοντέλα και αργότερα στον άνθρωπο όπου η βράχυνση της επιβίωσης ή η σμίκρυνση του χρόνου εκδήλωσης μεταστάσεων σε ασθενείς με συμπαγείς όγκους συσχετίστηκε με ελλειψωμένη ΝΚ-κυτταροτοξική δράση (Trinchieri, 1989, Whiteside et al., 1986, Balch et al., 1983). Αλλά η άμεση απόδειξη για την εμπλοκή των ΝΚ-κυττάρων στην άμυνα του οργανισμού έναντι καρκινικών κυττάρων ήλθε με την



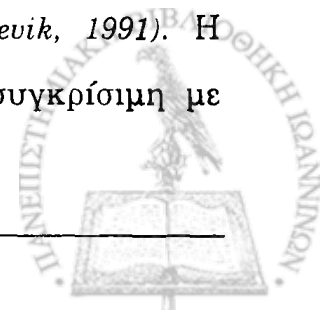
ανάπτυξη του LAK-φαινομένου, Έτσι λοιπόν στις αρχές της δεκαετίας του 1980 ο Rosenberg και συν. (*Grimm et al., 1982*) παρατήρησαν ότι μονοπύρηννα περιφερικού αίματος κατόπιν καλλιέργειας με IL-2 απέκτησαν κυτταροτοξική δράση έναντι ενός ευρέος φάσματος καρκινικών κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά ονομάσθησαν lymphokine-activated killer (LAK) κύτταρα και μετέπειτα χρησιμοποιήθηκαν με IL-2 σε ανοσοθεραπευτικά κλινικά σχήματα σε ασθενείς με καρκίνο (*Rosenberg et al., 1985*). Παρά το γεγονός ότι τα μέχρι στιγμής αποτελέσματα από τέτοιου είδους κλινικές μελέτες κυμαίνονται σε μέτρια επίπεδα (30-40% αντικειμενικές κλινικές απαντήσεις σε ασθενείς με μελάνωμα και καρκίνο του νεφρού) (*Rosenberg et al., 1987*) πιστεύεται ότι η βελτίωση των συνθηκών ενεργοποίησης των LAK in-vitro θα επιφέρει καλύτερα κλινικά αποτελέσματα. Η δράση των LAK κυττάρων in-vitro και in-vivo αποδόθηκε, σε μετέπειτα μελέτες, σε ενεργοποιημένα NK-κύτταρα τα οποία και αποτελούν την πλειονότητα (>90%) των προδρόμων κυττάρων που παρουσία IL-2 ενεργοποιούνται και αποκτούν LAK δραστηριότητα (*Ortaldo et al., 1986*).

Εκτός από την IL-2 και άλλες κυτταροκίνες φαίνεται ότι συνεργάζονται άμεσα ή έμμεσα για την ενεργοποίηση των NK-κυττάρων. Η IFN- $\gamma$  φαίνεται να δρά συνεργιστικά με χαμηλές συγκεντρώσεις IL-2, και να προάγει την διαφοροποίηση των PBL σε LAK κύτταρα τα οποία μπορούν και λύνουν NK-ανθεκτικές κυτταρικές γραμμές και καρκινικά κύτταρα από μελάνωμα (*Kaufmann et al., 1991, Paramichail and Baxevanis, 1992*). Η IL-2 με την 5-φλουουρακίλη (5-FU) ή η IFN- $\alpha$  με την 5-FU ενισχύουν σημαντικά την NK-κυτταροτοξικότητα έναντι διαφορετικών καρκινικών σειρών όπως καρκίνου τραχήλου μήτρας, χρόνιας λευχαιμίας, λευχαιμίας εκ τριχωτών κυττάρων και κυττάρων σαρκώματος Kaposi (*Reiter et al., 1992*). Εκτός από την IL-2, και οι IFN- $\alpha$  ή IFN- $\gamma$  ή ο TNF- $\alpha$  έχουν δειχθεί να αυξάνουν (απουσία IL-2) την LAK-κυτταροτοξικότητα όχι όμως σε τέτοιο βαθμό όπως η IL-2 μόνη της (*Jackson et al., 1992*). Η καλύτερη συνεργασία IL-2 και TNF- $\alpha$  επιτεύχθηκε όταν



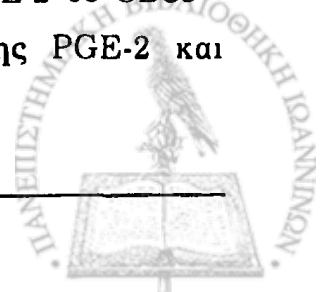
χρησιμοποιήθηκαν χαμηλές συγκεντρώσεις IL-2 οι οποίες από μόνες τους ήταν ανενεργές στην δημιουργία LAK-κυτταροτοξικότητας (*Jackson et al., 1992, Chouaib et al., 1988, Matossian-Rogers et al., 1989*). Η λειτουργική αυτή αλληλεπίδραση μεταξύ IL-2 και TNF-α εμπρικλείει την επαγωγή του υποδοχέα του TNF-α στα NK-κύτταρα ακολουθόμενο από την έκφραση των υψηλής συγγένειας συμπλόκων του υποδοχέα της IL-2 στα ίδια κύτταρα.

Η IL-6 έχει δειχθεί να συμμετέχει στην διαφοροποίηση των κυτταροτοξικών Τ-κλώνων (CTL) (*Takai et al., 1988*) και πιο πρόσφατα αναφέρθηκε ότι η IL-6 επάγει την NK-ενεργότητα σε ανενεργά CD3-CD56+ κύτταρα (*Smyth et al., 1991, Luger et al., 1989*) και αυξάνει την LAK-κυτταροτοξικότητα σε PBL καλλιεργημένα με IL-2 (*Smyth et al., 1991, Gallacher et al., 1990*). Επιπλέον όταν η IL-6 συνδυαστεί με κυκλοφωσφαμίδη προκαλεί υποχώρηση των πνευμονικών μεταστάσεων σε μυς με όγκο δημιουργώντας CTL ειδικών για τον όγκο (*Mule et al., 1992*). Η IL-6 συμμετέχει στην γένεση TIL με αυξημένη in-vivo αντικαρκινική δράση σε ανθρώπους (*Mulle et al., 1992*). LAK-δραστηριότητα έχει επίσης εντοπιστεί σε απομονωμένα CD3-CD16+ με χαμηλές συγκεντρώσεις IL-2 και IL-10 (*Spagnoli et al., 1993*). Στην ίδια αναφορά η IL-10 φάνηκε να αναστέλλει την παραγωγή IFN-γ και TNF-α χωρίς να επηρεάζει την επαγωγή και τα επίπεδα της LAK-ενεργότητας. Κατά συνέπεια η IL-10 θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε ανοσοθεραπευτικά πρωτόκολλα για να ελαττώσει την τοξικότητα από την έγχυση IL-2. Αυτό θα μπορούσε να επιτευχθεί είτε με αναστολή της παραγωγής των IL-2 επαγμένων κυτταροκινών που προκαλούν τις παρενέργειες της θεραπείας όπως είναι οι IFN-γ και TNF-α (*Parkinson, 1990*), ή προκαλώντας την επαγωγή ισχυρής LAK ενεργότητας in vivo όταν συνχορηγείται με χαμηλές μή τοξικές δόσεις IL-2. Εκτός από την IL-2, η IL-7 σε καλλιέργειες διαχωρισμένων πληθυσμών CD56+ κυττάρων επάγει την LAK δραστηριότητα (*Naume and Espevik, 1991*). Η επαγωγή της LAK ενεργότητας από την IL-7 ήταν σχεδόν συγκρίσιμη με



αυτήν που δημιουργείται παρουσία IL-2, και συνοδεύεται από έκφραση των υποδοχέων για την IL-2 και τον TNF-α σε CD56+ κύτταρα. Έχει επίσης περιγραφεί ότι η IL-7 απουσία IL-2 προκαλεί in-vitro δευτερογενείς T κυτταροτοξικές δράσεις ειδικές για κάποιο αντιγόνο (*Kos and Mullbacher, 1993*). Παρόμοια δράση με την IL-7 σε καθαρούς πληθυσμούς NK-κυττάρων έχει πρόσφατα αποδοθεί στην IL-12 (*Naume et al., 1992*). Τα αποτελέσματα της δράσης της IL-7 και IL-12 σε CD56+ NK κύτταρα αναστάλησαν όταν προστέθηκε στην καλλιέργεια ένα αντίσωμα anti-TNF-α, κάτι που σημαίνει ότι η ενδογενής παραγωγή του TNF-α δρά συνεργιστικά για την ενεργοποίηση των NK-κυττάρων. Εξωγενή IL-1 έχει δειχθεί ότι σε συνδυασμό με την IL-2 αυξάνει την LAK-κυτταροτοξικότητα (*Crumpp, 1989*). Μάλιστα σε μια πρόσφατη αναφορά οι Fujiwara και Grimm (*1992*) έδειξαν ότι η επαγωγή της LAK-ενεργότητας εφαρμόζοντας ένα συνδυασμό IL-2 και IL-1 θα μπορούσε να ανασταλεί από την παρουσία ενός ανταγωνιστή για τον υποδοχέα της IL-1 (IL-1aR). Ο IL-1aR εμποδίζει την σύνδεση της ενδογενούς παραγόμενης IL-1 στον υποδοχέα της με αποτέλεσμα την αναστολή της έκφρασης του m-RNA για τον TNF-α. Τα πειραματικά αυτά δεδομένα ενισχύουν την σπουδαιότητα της ενδογενής δράσης της IL-1 στην διαδικασία γέννησης της LAK-ενεργότητας, κάτι το οποίο φαίνεται να επιτυγχάνεται μέσω της IL-1 εξαρτώμενης απελευθέρωσης του TNF-α σε NK-κύτταρα καλλιεργημένα με IL-2.

Άλλοι παράγοντες που συμμετέχουν στην ρύθμιση της LAK-ενεργότητας σε ανθρώπινα PBL είναι ο TGF-β (*Smyth and Ortaldo, 1991*), πεπτιδία που ενεργοποιούν τα ουδετερόφιλα (*Klein-Struckmeir et al., 1991*) και η προσταγλανδίνη-E2 (PGE-2) που παράγεται από περιφερικά μονοκύτταρα (*Baxevanis et al., 1993*). Σε μια πρόσφατη αναφορά η PGE-2 δείχθηκε ότι καταστέλλει την δημιουργία της LAK-κυτταροτοξικότητας. Αυτό πραγματοποιείται με τη ελάτωση της έκφρασης του υποδοχέα της IL-2 σε CD56+ κύτταρα καλλιεργημένα με IL-2. Αναστολή της δράσης της PGE-2 και



επιβεβαιώθηκε η LAK-ενεργότητα σε φυσιολογικά επίπεδα επιτεύχθηκε με την χρήση ινδομεθακίνης ή IFN- $\gamma$  (Baxeuanis et al., 1993). Υπερκείμενα καλλιέργειών καρκινικών κυτταρικών σειρών (Guillon et al., 1989) καθώς και μερικών ομάδων λεμφοκυττάρων που διηθούν όγκους από καρκίνο νεφρού και μελάνωμα (Chakraborty et al., 1991) κατέστειλαν επίσης την LAK-ενεργότητα. Τέλος ο Sone και οι συνεργάτες του (Sone et al., 1988) βρήκαν ότι συνκαλλιέργεια IFN- $\alpha$  και IFN- $\beta$  με IL-2 σε καλλιέργειες PBL ανέστειλλαν τη δημιουργία της LAK-ενεργότητας επεμβαίνοντας αρνητικά στην έκφραση του υποδοχέα της IL-2.

#### 1.10.4 Μηχανισμοί καταστροφής των κυττάρων στόχων.

Εχουν αναφερθεί μέχρι τώρα διάφορες θεωρίες που εξηγούν τους μηχανισμούς με τους οποίους τα NK-κύτταρα σκοτώνουν τους στόχους τους. Η θεωρία της λύσης των κυττάρων μέσω της περφορίνης βασίζεται στην παρατήρηση ότι τα NK-κύτταρα διαθέτουν κυτταροπλασματικά λυτικά κοκκία που περιέχουν κυτταρολυσίνη ή πιο γνωστή σαν περφορίνη, καθώς επίσης και εστεράσες της σερίνης (Berke, 1991). Η περφορίνη παρουσιάζει ομολογία για το C9 συστατικό του συμπληρώματος και πιστεύεται ότι λειτουργεί με τον ίδιο τρόπο στην ρήξη των βιολογικών μεμβρανών μέσω του σχηματισμού διαμεμβρανικών πόρων. Ο σχηματισμός των πόρων επιτυγχάνεται κατόπιν πολυμερισμού της περφορίνης παρουσία ιόντων  $Ca^{2+}$  σε πολυπερφορίνη. Τα ιόντα  $Ca^{2+}$  καθίστανται απαραίτητα για την ρύθμιση της έκκρισης της περφορίνης και των εστερασών της σερίνης (Kawasaki et al., 1992, Tschopp and Nabholz, 1990).

Εναλλακτικά με το μοντέλο της περφορίνης έχει προταθεί το μοντέλο της "εσωτερικής διάσπασης" του κυττάρου στόχου μέσω μιας αυτολυτικής διαδικασίας (Berke, 1991). Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή τα μηνύματα λύσης που προκύπτουν ύστερα από την σύνδεση του κυτταροτοξικού κυττάρου με το





κύτταρο στόχο επάγουν την καταστροφή του κυττάρου στόχου. Το μήνυμα θανάτωσης μεταφέρεται από το εκτελεστικό κύτταρο στο κύτταρο στόχος, μέσω της σύνδεσης του υποδοχέα (στο φονικό κύτταρο) στο συμπληρωματικό του μόριο στο κύτταρο στόχος και στην συνέχεια ακολουθεί η μετάφραση του μηνύματος αυτού. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αλλαγή στην διαπερατότητα των μεμβρανών των κυττάρων στόχων στα ιόντα  $Ca^{2+}$  κάτι το οποίο ενεργοποιεί ενδονουκλεάσες και πρωτεάσες που καταστρέφουν τελικά το κύτταρο στόχος (*Squier and Cohen, 1994*).

Επιπρόσθετοι μηχανισμοί λύσης που έχουν προταθεί περιλαμβάνουν προσύνδεση στην μεμβράνη του κυττάρου στόχου, του παράγοντα νέκρωσης όγκων (*Liu et al., 1989*) και της εκλυόμενης τριφωσφορικής αδενοσίνης (*Fillipini, 1990*) σαν μεσολαβητές της κυτταρικής λύσης. Πρόσφατα δημοσιεύτηκε (*Tachinaba et al., 1992*) ότι η NK-λύση των καρκινικών κυττάρων στόχων επιτυγχάνεται μέσω της παραγωγής και της έκκρισης ενός κυτταροτοξικού παράγοντα μοριακού βάρους 57kDa. Το εύρημα αυτό φαίνεται να επιβεβαιώνεται και από άλλη ερευνητική ομάδα (*Hersh et al., 1989*) τα αποτελέσματα της οποίας δείχνουν ότι διεγερμένα με IL-2 μονοκύτταρα παράγουν ένα παράγοντα 50 kDa ο οποίος καταστέλλει την ανάπτυξη των καρκινικών κυτταρικών σειρών όχι όμως και των λεμφοκυττάρων.

Συμπερασματικά θα λέγαμε ότι η κυτταροτοξικότητα των NK-λεμφοκυττάρων επάγεται και ρυθμίζεται από ένα διαφορετικό αριθμό διαλυτών χημικών μεσολαβητών που αλληλεπιδρούν κατά ένα τρόπο περίπλοκο και μερικές φορές άγνωστο. Αυτές οι ανοσορυθμιστικές κυτταροκίνες μπορούν να ενισχύσουν την επαγωγή διαφόρων εκτελεστικών κυτταρικών τύπων όταν προστίθενται εξωγενώς σε καλλιέργειες παρουσία ή απουσία IL-2. Οι πληροφορίες λοιπόν που προέρχονται από την *in vitro* ρύθμιση της LAK δραστηριότητας των NK-κυττάρων αποκτούν μεγάλο



ενδιαφέρον για την *in situ* ρύθμιση της κυτταροτοξικής λειτουργίας έναντι νεοπλασμάτων.

### **1.11 Καρκινικά Κυτταρικά Αντιγόνα**

**(ΚΚΑ, *tumor associated antigens*).**

Τα καρκινικά κύτταρα για να προκαλούν διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος πρέπει να εκφράζουν "καρκινικά αντιγόνα" δεσμευμένα στα τάξης I ή τάξης II προϊόντα του ΜΣΙ. Τα Τ-λεμφοκύτταρα που εκφράζουν τον TCR και μπορούν να αναγνωρίσουν τέτοιου είδους σύμπλοκα ΚΚΑ/ΜΣΙ ενεργοποιούνται και αναπτύσσουν αντικαρκινική δράση. Υπάρχουν πολλές αναφορές προερχόμενες από ζωικά μοντέλα στα οποία έχει επαχθεί με χημικό τρόπο ή με UV η έκφραση τέτοιων ΚΚΑ έτσι ώστε να επάγεται ανοσολογική απάντηση με τη δραστηριοποίηση CD4 και CD8 λεμφοκυττάρων και την τελική απόρριψη του όγκου (*Tschopp and Nabholz, 1990*).

Στους ανθρώπους πιστεύεται ότι τα ΚΚΑ προέρχονται από δομικά μη φυσιολογικές πρωτεΐνες. Έχει προταθεί ότι οι πρωτεΐνες οι οποίες έχουν μεταβληθεί δομικά κατόπιν μετασχηματισμού, εκφράζουν επίτοπους που προκαλούν διέγερση των Τ-λεμφοκυτταρικών απαντήσεων. Υπάρχουν δεδομένα (*Jerome et al., 1991*) που δείχνουν ότι CTL από ασθενείς με καρκίνο μαστού ή παγκρέατος μπορούσαν να λύσουν διάφορα καρκινικά κύτταρα που εκφράζουν μουκίνες (γλυκοπρωτεΐνες εκφρασμένες σε υγιή επιθηλιακά κύτταρα και στους αντίστοιχους όγκους) όχι όμως και φυσιολογικά κύτταρα που εκφράζουν μουκίνες. Αυτή η μουκίνη-κατευθυνόμενη κυτταροτοξικότητα αναστάλθηκε από ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει ένα επίτοπο της πρωτεΐνης που εκφράζεται κατά προτίμηση σε νεοπλασματικά κύτταρα (*Barnid et al., 1989*). Γι αυτό το λόγο οι συγγραφείς προτείνουν ότι δεν εμφανίζεται αυτός ο επίτοπος (*masking effect*) στα φυσιολογικά κύτταρα (κατά πάσα



πιθανότητα λόγω της ισχυρής γλυκοσυλίωσης της μουκίνης) και εμφανίζεται στα μετασχηματισμένα καρκινικά κύτταρα δημιουργώντας έτσι ΚΚΑ.

Μεταλλαγμένοι καθοριστές πρωτοογκογονιδίων δύνανται επίσης να ενεργοποιήσουν Τ λεμφοκύτταρα επάγοντας έτσι ανοσοαπάντηση έναντι νεοπλασματικών κυττάρων που φέρουν τα μεταλλαγμένα αυτά ογκογονίδια. Έχει δειχθεί ότι συνθετικά πεπτίδια που αντιπροσωπεύουν τα αμινοξέα 5-16 της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης του ογκογονιδίου p21ras επάγει την δημιουργία in-vitro ειδικών για το πεπτίδιο T4 κυτταρικών σειρών (*Jung and Schluesener, 1991*). Τέτοιες μεταλλαγμένες ras πρωτεΐνες παρατηρήθηκαν σε πολλές νεοπλασίες (*Peace et al., 1991, Chen et al., 1992*) και μπορεί να αντιπροσωπεύουν ένα κοινό ΚΚΑ έναντι του οποίου μπορεί να κατευθυνθεί η ανοσοαπόκριση

Έχουν απομονωθεί κυτταροτοξικές Τ λεμφοκυτταρικές σειρές και κλώνοι από μονοπύρηννα κύτταρα ασκίτικου υγρού ασθενών με καρκίνο ωοθήκης και έχει δειχθεί ότι αναγνωρίζουν πολλαπλούς επίτοπους στα αυτόλογα καρκινικά κύτταρα (*Ioannides et al., 1991a*). Οι επίτοποι πιθανότατα κωδικοποιούνται από το HER2/new ογκογονίδιο (το οποίο υπερεκφράζεται στον καρκίνο ωοθήκης) και επάγει ανθεκτικότητα σε κυτταρικές σειρές ωοθήκης έναντι της δράσης κυτταροτοξικών μακροφάγων και ενεργοποιημένων ΝΚ-κυττάρων (*Hudziak et al., 1988, Lichtenstein et al., 1990*). Σε σχέση με αυτά τα ευρήματα έχει δειχθεί ότι συνθετικά πεπτίδια που αντιπροσωπεύουν προϊόντα κωδικοποίησης περιοχών του HER2/new καθιστούν κύτταρα στόχους ευάλωτα στη λύση από τους ίδιους CTL κλώνους (*Ioannides et al., 1993 & 1992*).

Η δημιουργία κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυτταρικών κλώνων για ΚΚΑ συνέβαλε στην υποβολή καρκινικών κυττάρων σε ανοσοεπιλογή in vitro και έτσι στην απομόνωση ανθεκτικών καρκινικών κλώνων. Πολλοί τέτοιοι καρκινικοί κλώνοι δείχθηκαν να λύονται από άλλους CTL κλώνους οι οποίοι προέρχονταν από τον ίδιο όγκο, έτσι ώστε ήταν δυνατό ο καθορισμός



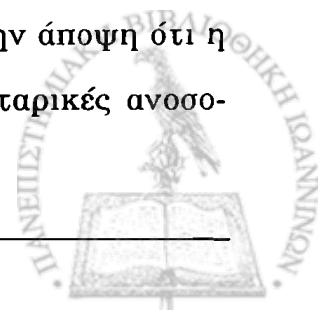
διαφορετικών ΚΚΑ σε αυτά τα καρκινικά κύτταρα (*Knuth et al., 1989, Van den Eynde et al., 1989*). Τα αντιγόνα αυτά παρουσιάζονταν από ένα συγκεκριμένο αλληλόμορφο του ΜΣΙ τάξης Ι (το ΜΣΙ-Α) με αποτέλεσμα οι καρκινικές ποικιλίες που δεν είχαν αυτό το ποικιλόμορφο παρά το γεγονός ότι εξέφραζαν το ΚΚΑ, μπορούσαν να ξεφύγουν από την ανοσοαναγνώριση (*Knuth et al., 1989, Van den Eynde et al., 1989, Topalian and Rosenberg, 1990*). Μια γενετική προσέγγιση επέτρεψε την πρώτη διεθνώς κλωνοποίηση ενός γονιδίου ονομαζόμενου ΜΑΓΕ - 1, που κωδικοποιεί ένα αντιγόνο ανθρώπινου μελανώματος (*Van der Bruggen et al., 1991*) το οποίο αναφέρθηκε από τις προαναφερθείσες διαδικασίες ανοσοεπιλογής. Το γονίδιο αυτό ΜΑΓΕ-1 κωδικοποιεί την έκφραση του αντιγόνου ΜΖ2-Ε που είναι μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 30kd η οποία δεσμεύεται στο ΜΣΙ-Α1 αλληλόμορφο και το σύμπλοκο αυτό αναγνωρίζεται από ειδικούς CTL κλώνους (*Boon, 1993*). Το ΜΑΓΕ-1 ανήκει σε μια οικογένεια στενά συνδεδεμένων γονιδίων τα οποία δεν εκφράζονται σε φυσιολογικά κύτταρα και εκφράζονται (εκτός από τα μελανώματα) σε διάφορες άλλες μορφές καρκίνου, όπως ο καρκίνος του πνεύμονα (*Van der Bruggen and Van den Eynde, 1992*).

Η ταυτοποίηση τέτοιων αντιγόνων σχετιζόμενων με τον όγκο και την αντιστοίχιση γονιδίων τους μπορεί να έχει σημαντικές εφαρμογές στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου από τη στιγμή που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν εμβόλια στην θεραπεία του καρκίνου.

### **1.12 Ειδικές ανοσοπαντήσεις λεμφοκυττάρων σε ανθρώπινες νεοπλασίες**

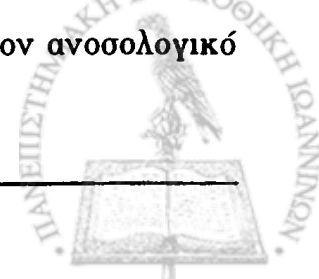
#### ***A. Ειδικός πολλαπλασιασμός Τ (βοηθητικών) κυττάρων εναντίον αυτόλογων καρκινικών κυττάρων.***

Τα τελευταία χρόνια πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν την άποψη ότι η επαγωγή νεοπλασίας προκαλεί στο ξενιστή φορέα ειδικές κυτταρικές ανοσο-



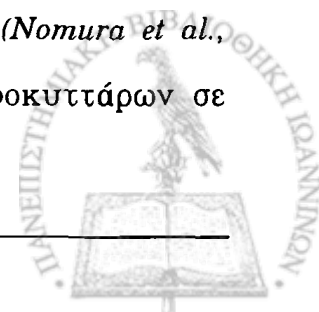
απαντήσεις έναντι των νεοπλασματικών κυττάρων που εκδηλώνονται μέσω διαφορετικών μηχανισμών και που συμπεριλαμβάνουν ρυθμιστικές (βοηθητικές και κατασταλτικές) και κυτταροτοξικές λειτουργίες. CD4+Th έχουν περιγραφεί να εκδηλώνουν ειδική απάντηση έναντι αυτόλογων καρκινικών κυττάρων που εντοπίζεται με την έκφραση IL-2 ειδικών υποδοχέων στα Th και εκφράζεται σαν πολλαπλασιασμός (μικτή λεμφοκυτταρική-νεοπλασματική καλλιέργεια, mixed lymphocytes tumor culture MLTC) (Allarena et al., 1988). Αυτός ο πολ/σμός ειδικά για τον όγκο πιθανότατα επάγεται κατόπιν αναγνώρισης των ΚΚΑ στα νεοπλασματικά κύτταρα από τα T-λεμφοκύτταρα (Browning and Bobmer, 1992)

Μέχρι τώρα υπάρχουν πολλά πειραματικά ευρήματα που υποστηρίζουν την άποψη ότι τα T-λεμφοκύτταρα σε MLTC καλλιέργειες πολλαπλασιάζονται αφού πρώτα αναγνωρίσουν προϊόντα του ΜΣΙ εκφρασμένα στα νεοπλασματικά κύτταρα. Κατά πάσα πιθανότητα μόρια του ΜΣΙ λειτουργούν σαν στοιχεία περιορισμού για τον ειδικό πολλαπλασιασμό των T-λεμφοκυττάρων έναντι των ΚΚΑ. Έτσι έχει αναφερθεί ότι ο ειδικός πολλαπλασιασμός των T-λεμφοκυττάρων σε MLTC καλλιέργειες από ασθενείς με μελάνωμα ήταν μεγαλύτερος παρουσία νεοπλασματικών κυττάρων απομονωμένα από την πρωτογενή εστία απ'ότι χρησιμοποιώντας καρκινικά κύτταρα μελανώματος προερχόμενα από μετάσταση. Η εξήγηση στο φαινόμενο αυτό έχει να κάνει με την αυξημένη έκφραση των τάξης II μορίων του ΜΣΙ στον πρωτογενή όγκο (Anichini, 1989). Μια άλλη απόδειξη η οποία συνδέει την έκφραση των αντιγόνων του ΜΣΙ και την απάντηση στον όγκο προέρχεται από μελέτες σε καρκίνο ωοθήκης και πνεύμονα (Vanky et al., 1988). Τα πειράματα που έγιναν επιβεβαίωσαν ότι η έκφραση των προϊόντων του τάξης II ΜΣΙ συνδέεται in vivo με την παρουσία λεμφοκυττάρων που διηθούν τον όγκο και in vitro με την ικανότητα διέγερσης από τα καρκινικά κύτταρα σε MLTC καλλιέργειες. Αυτά τα ευρήματα βέβαια δεν αποτελούν άμεση απόδειξη για τον ανοσολογικό



ρόλο των αντιγόνων τάξης II του ΜΣΙ σε νεοπλασματικά κύτταρα. Έτσι παρά το γεγονός ανίχνευσης υψηλών MLTC απαντήσεων σε ασθενείς με καρκίνο ωοθήκης, δεν βρέθηκε αξιόλογη συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του HLA-DR στα καρκινικά κύτταρα και του ειδικού για τη νεοπλασία πολλαπλασιασμού των Τ-λεμφοκυττάρων (Allavena *et al.*, 1988). Επιπλέον ο Wang και οι συνεργάτες του (Wang *et al.*, 1992) δημοσίευσαν πρόσφατα την απομόνωση και τον χαρακτηρισμό αυτονεοπλασματικών αντιδρώντων CD4+ και CD8+ κλώνων από ασθενείς των οποίων τα νεοπλάσματα δεν εξέφραζαν μόρια του τάξης II ΜΣΙ. Το μεγαλύτερο ποσοστό των CD8+ κλώνων ήταν κυτταροτοξικά κύτταρα ενώ οι CD4+ κλώνοι οι οποίοι μπορούσαν σε μικρότερο βαθμό να λύσουν και αυτόλογα και ετερόλογα καρκινικά κύτταρα-στόχους. Σε μια περίπτωση κακοήθους μελανώματος απομονώθηκαν ειδικοί CD8+ κυτταροτοξικοί κλώνοι που ενεργοποιούνται απουσία αυτολόγων Th (Fossati *et al.*, 1988). Αυτό αποτελεί ένδειξη για την παρουσία βοηθητικά -ανεξάρτητων κυτταροτοξικών κλώνων που ενεργοποιούνται με διαφορετικά λειτουργικά προγράμματα από καθοριστές των ίδιων των καρκινικών κυττάρων .

Όλα αυτά τα δεδομένα υποστηρίζουν την άποψη ότι ειδικός πολλαπλασιασμός των CD4+ Τ-κυττάρων σε απάντηση προς αυτόλογα καρκινικά κύτταρα δε μπορεί να θεωρηθεί ότι προέρχεται από Th μέχρι τη στιγμή που αυτό το δυνητικό βοηθητικό CD4+ Τ-κύτταρο μπορεί να παράγει όλους τους απαραίτητους παράγοντες (π.χ. IL-2) για την επαγωγή εκτελεστικών κυτταροτοξικών κυττάρων με ειδικότητα προς τον όγκο. Αυτό έχει μερικώς δειχθεί σε ασθενείς με καρκίνο του λάρυγγα και της ουροδόχου κύστης (Cozzolino *et al.*, 1987) όπου Τ-λεμφοκύτταρα από διηθημένους λεμφαδένες παράγουν IL-2 σε απάντηση προς τον αυτόλογο όγκο, προτείνοντας έτσι την ύπαρξη ειδικών για τον όγκο αυτόλογων Τ-βοηθητικών λεμφοκυττάρων. Επιπλέον ο Nomura και οι συνεργάτες του (Nomura *et al.*, 1992) αναλύοντας μηχανισμούς ελέγχου διήθησης των Τ-λεμφοκυττάρων σε



νεοπλασματικούς ιστούς, ανακάλυψαν ένα παράγοντα που παράγεται από ειδικά για τον όγκο CD4+ κύτταρα ο οποίος ήταν χημειοτακτικά ειδικός για τα CD8+ κύτταρα. Ο παράγοντας αυτός αύξησε την CD8+ κυτταρική σύνδεση στα ενδοθηλιακά κύτταρα αυξάνοντας έτσι την δυνητική διήθηση τους στην νεοπλασματική μάζα.

Οι μελέτες αυτές αποτελούν έμμεση απόδειξη για την ύπαρξη βοηθητικών T-λεμφοκυττάρων ειδικών για τον όγκο. Άμεση απόδειξη για την επαγωγή βοηθητικής T-κυτταρικής λειτουργίας ειδικής για τον όγκο προέρχεται από πειράματα στα οποία αναλύθηκε στο επίπεδο κλώνων η ανάπτυξη ειδικής απάντησης εναντίον αυτόλογων καρκινικών κυττάρων. Με αυτή τη βάση ο Mukherji και οι συνεργάτες του (*Mukherji et al., 1990, Chakraborty et al., 1990*) ανακοίνωσαν την απομόνωση CD4+, TCR α/β+ T-κυτταρικών κλώνων οι οποίοι αύξησαν των κυτταροτοξική απάντηση εναντίον αυτόλογων καρκινικών κυττάρων σε αυτόλογα PBL απελευθερώνοντας IL-2 και IFN-γ. Αυτοί οι βοηθητικοί T-κυτταρικοί κλώνοι μπορούσαν να πολλαπλασιαστούν κατόπιν έκθεσής τους σε αυτόλογα καρκινικά κύτταρα. Χρειάζεται βέβαια περαιτέρω έρευνα για το αν υπάρχουν και in vivo T-κυτταρικοί υποπληθυσμοί με λειτουργία παρόμοια με αυτή που βρέθηκε στα in-vitro πειράματα ή η εύρεση in-vitro τέτοιων κυτταρικών πληθυσμών οφείλεται στη διαρκή διέγερση των T-κυτταρικών κλώνων με καρκινικά κύτταρα και IL-2.

### **B. Ογκο-εξαρτώμενη καταστολή.**

Εξαιτίας του γεγονότος ότι πολλοί καρκίνοι συχνά ξεφεύγουν από την ανοσοαπάντηση του ξενιστή, η θεωρία της καταστολής της ανοσοαπάντησης εναντίον καρκινικών κυττάρων έχει απασχολήσει σημαντικά τους ερευνητές τα τελευταία χρόνια. Ο Miesler και οι συνεργάτες του 1986, ανέφεραν ότι οι ιδιότητες πολλαπλασιασμού των σε καλλιέργειες με μιτογόνα, καταστέλλονται ισχυρά όταν προηγηθεί προεπώαση των με ζωντανά καρκινικά κύτταρα ή με



υπερκείμενα προερχόμενα από καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων. Έχει επίσης δημοσιευθεί ότι καρκινικά κύτταρα εκφράζουν το mRNA για τον αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού (TGF-β) (*Dernyk et al., 1987*) που ως γνωστό καταστέλλει τη παραγωγή κυτταροκινών από τα βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα (*Tada et al., 1991*). Επιπλέον καρκινικά κύτταρα από επαγόμενους όγκους σε μυς που ως γνωστό είναι ισχυρά αντιγονικοί, και έτσι απορρίψιμοι *in-vivo*, μπορούν να μεταμοσχευθούν με επιτυχία κατόπιν επιμόλυνσης τους με το γονίδιο του TGF-β έχοντας καταστείλλοντας με τον τρόπο αυτό το ανοσολογικό σύστημα του ξενιστή (*Torr-Amione et al., 1990*). Σε μια πρόσφατη μελέτη (*Yoshino et al., 1992*) ανακοινώθηκε ότι T λεμφοκύτταρα από καρκίνο του πνεύμονα, καλλιεργήθηκαν πολλαπλασιάστηκαν παρουσία ακτινοβολημένων ετερόλογων καρκινικών κυττάρων, αφού πρώτα αφαιρέθηκαν τα αυτόλογα καρκινικά κύτταρα που ήταν παρόντα αρχικά στην καλλιέργεια. Ο πολλαπλασιασμός αυτός καταστάληκε όταν ξαναπροστέθηκαν στις καλλιέργειες ετερόλογα καρκινικά κύτταρα. Οι ίδιοι συγγραφείς έδειξαν ότι υπερκείμενα προερχόμενα από καλλιέργειες καρκινικών κυτταρικών σειρών πνεύμονα, ή από φρεσκοαπομονωμένα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα, μπορούσαν να καταστείλουν τον πολλαπλασιασμό λεμφοκυττάρων διεγερμένων με το anti-CD3. Παρά το γεγονός ότι έχει αναφερθεί η έκφραση mRNA του TGF-β σε ανθρώπινο καρκίνο του πνεύμονα (*Mukherji et al., 1990*), η κατασταλτική ιδιότητα των υπερκειμένων προερχόμενα από καρκίνο του πνεύμονα δεν αποδόθηκε μόνο στην ύπαρξη TGF-β. Εκτός λοιπόν από τον TGF-β, υπάρχουν και άλλοι παράγοντες με ανοσοκατασταλτική ενεργότητα, εκκρινόμενοι από καρκινικά κύτταρα όπως π.χ. οι πρωτεάσες, οι οποίες καταστρέφουν τις κυτταροκίνες που παράγονται από τα κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος (*Ebert et al., 1987*).





Άλλοι ανοσοκατασταλτικοί παράγοντες προερχόμενοι από καρκινικά κύτταρα, έχουν αναφερθεί σε διάφορους τύπους καρκίνου όπως καρκίνο του εντέρου (*Jones and De Clark, 1980*) και σε μελάνωμα (*Hersey et al., 1983*).

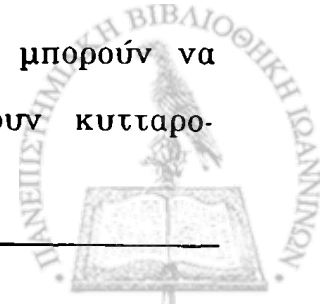
Εκτός της καταστολής που προέρχεται από τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα έχει αναφερθεί επίσης καταστολή από κατασταλτικά T λεμφοκύτταρα ενεργοποιημένα από τον όγκο. Λεμφοκύτταρα από διηθημένους λεμφαδένες ασθενών με καρκίνο στην ουροδόχο κύστη και στον λάρυγγα μπορούν να πολλαπλασιαστούν σε απάντηση στην παρουσία αυτόλογων καρκινικών κυττάρων, μόνο κατόπιν απομάκρυνσης ενός κατασταλτικού υποπληθυσμού με φαινότυπο CD57+CD11b+ (*Cozzolino et al., 1987*). Σε ανθρώπινο μελάνωμα έχουν δειχθεί T λεμφοκύτταρα που καταστέλλουν την αντι-καρκινική ανοσοαπάντηση (*Mukherji et al., 1990, Chakraborty et al., 1990*). Έτσι λοιπόν κατόπιν διέγερσης αποδεικνύεται ότι κατόπιν διέγερσης με αυτόλογα καρκινικά κύτταρα ή με αυτόλογα μονοκύτταρα ενεργοποιημένα με καρκινικά κύτταρα, τα ρυθμιστικά CD4+ λεμφοκύτταρα ήταν ικανά να καταστείλουν την αυτόλογη κυτταροτοξικότητα ενάντια αυτόλογων καρκινικών κυττάρων. Τα CD4+ αυτά λεμφοκύτταρα δεν ήταν κυτταροτοξικά, εξέφραζαν IL-2 ειδικούς υποδοχείς και ασκούσαν την κατασταλτική τους δράση μέσω της επίδρασης ενός κατασταλτικού παράγοντα που διέφερε από τον TGF-β. Μελέτες στο επίπεδο των κλώνων (*Mukherji et al., 1990*) αποκάλυψαν ότι ο παράγοντας αυτός εμποδίζει την έκφραση του υποδοχέα της IL-2 στα T κυτταροτοξικά κύτταρα κατά την διάρκεια της φάσης ενεργοποίησης. Όλα αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να καταστείλουν το ανοσολογικό σύστημα του ξενιστή είτε άμεσα με την απελευθέρωση κατασταλτικών παραγόντων, είτε έμμεσα επάγοντας κατασταλτική δράση σε T λεμφοκύτταρα. Κατά συνέπεια η αναχαίτηση της ογκο-επαγόμενης καταστολής, θα μπορούσε να βελτιώσει τα κλινικά αποτελέσματα από διάφορα πρωτόκολλα ανοσοθεραπείας του καρκίνου. Αυτό



θα προϋποθέτει την *in vivo* εξουδετέρωση του TGF-β ή άλλων ανοσοκατασταλτικών παραγόντων.

### 1.13 TIL.

Τ λεμφοκύτταρα που διηθούν συμπαγείς όγκους (tumor infiltrating lymphocytes=TIL) έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται *in vitro* παρουσία IL-2 και να αποκτούν κυτταροτοξική λειτουργικότητα έναντι ενός ευρέως φάσματος ετερόλογων καρκινικών κυττάρων, καρκινικών σειρών καθώς επίσης και εναντίον αυτόλογων καρκινικών κυττάρων (Rosenberg *et al.*, 1986). Τα TIL πρέπει να αποτελούν μια ενεργό ανοσοαπάντηση του ξενιστή ενάντια στον όγκο και παρά το γεγονός ότι η παρουσία τους σε μεγάλους αριθμούς έχει συσχετιστεί σε ορισμένους όγκους με ευνοϊκή πρόγνωση, ο ρόλος τους στην ανάπτυξη και στην μετάσταση του καρκίνου παραμένει αδιευκρίνιστος. Ενεργοποιημένα CD3+,TCR α/β+, CD4+ ή CD8+ T λεμφοκύτταρα αποτελούν τους κατ'έξοχήν πληθυσμούς μεταξύ των TIL (Itoh *et al.*, 1988, Topalian *et al.*, 1989, Nouri *et al.*, 1991). Τα απομονωμένα από όγκους TIL είναι σε καταστολή, και η καταστολή αυτή επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό τους, παρουσία μιτογόνων, ακινητοποιημένων anti-CD2 αντισωμάτων και κυτταρικών αντιγόνων (Miescher *et al.*, 1986). Η αναστολή αυτή επηρεάζει επίσης και την κυτταροτοξική τους δράση έναντι των αυτόλογων καρκινικών κυττάρων (Miescher *et al.*, 1986, Momura *et al.*, 1992). Εκτός από τα TIL, και τα PBL ασθενών σε προχωρημένο στάδιο καρκίνου έχουν μειωμένη κυτταρική ανοσοαπάντηση και διαταραγμένη παραγωγή κυτταροκινών (Baxevanis *et al.*, 1993a, Anastasopoulos *et al.*, 1992, Kosmidis *et al.*, 1992). Για την ερμηνεία της καταστολής αυτής έχουν προταθεί κατασταλτικοί παράγοντες προερχόμενοι από τον όγκο, όπως TGF-β ή προσταγλανδίνες (Tada *et al.*, 1991, Derynck *et al.*, 1987, Torr-Amione *et al.*, 1990). Οι κατασταλτικές αυτές ιδιότητες των TIL είναι αναστρέψιμες σε *in-vitro* καλλιέργειες, όπου παρουσία IL-2 μπορούν να πολλαπλασιασθούν σε μεγάλους αριθμούς και να επιδείξουν κυτταρο-



τοξικότητα έναντι καρκινικών κυττάρων (Yoo et al., 1990, Numata et al., 1991). Σε μια πρόσφατη αναφορά αυξημένη έκφραση της p55 αλυσίδας του υποδοχέα της IL-2 σε απομονωμένα TIL συνδυάστηκε με αύξηση της αυτόλογης κυτταροτοξικότητας κατόπιν in-vitro καλλιέργειας (Becker et al., 1993). Αυτόλογη κυτταροτοξικότητα παρουσιάζουν κατά κύριο λόγο τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (ΚΤΛ) με φαινότυπο TCR α/β+ CD8+. Έχουν απομονωθεί CTL κλώνοι και κυτταρικές σειρές με αυτόλογη κυτταροτοξικότητα έναντι του όγκου, από λεμφοκύτταρα που διηθούν τον όγκο ή από κακοήθη εξιδρώματα ασθενών με μεταστατικό μελάνωμα (Itoh et al., 1988, Topalian et al., 1989 & 1990), με καρκίνο ωοθήκης (Ioannides et al., 1991b) ή με καρκίνο μαστού (Baxevanis et al., 1994b). Αυτά τα CTL εκδήλωσαν ειδική κυτταροτοξικότητα έναντι αυτολόγων καρκινικών κυττάρων και όχι έναντι ετερόλογων καρκινικών στόχων διαφορετικών ιστολογικών τύπων. Ορισμένες κυτταρικές σειρές προερχόμενες από TIL αναφέρθηκε ότι παράγουν IL-2 και εκφράζουν ειδικούς υποδοχείς για την IL-2 σαν απάντηση στην παρουσία αυτολόγων και όχι ετερόλογων καρκινικών κυττάρων (Ioannides et al., 1991a, Baxevanis et al., 1994b). CTL κλώνοι με εξιδείκευση στον αυτόλογο όγκο πολλαπλασιάστηκαν για μεγάλα χρονικά διαστήματα χωρίς να χάσουν την ειδική κυτταροτοξική τους δράση (Platsoukas, 1991). Σε περιπτώσεις μελανώματος (Itoh et al., 1988) και καρκίνου μαστού (Baxevanis et al., 1994b) έχει προταθεί ότι η αυτόλογη κυτταροτοξική δράση πραγματοποιείται μέσω της αναγνώρισης στα καρκινικά κύτταρα των τάξης I μορίων από το σύμπλοκο CD3+TCR α/β των T κυτταροτοξικών κυττάρων.

Εκτός από τις περιπτώσεις των CTL TIL που αναφέρθηκαν με αυτόλογη κυτταροτοξικότητα, T κυτταρικές σειρές και κλώνοι με μη ειδική κυτταροτοξική δράση έχουν περιγραφεί και από άλλα είδη νεοπλασιών όπως καρκίνο νεφρού (Nishimura et al., 1991), καρκίνο γαστρεντερικού (Nishimura et al., 1986), καρκίνο πνεύμονα (Anderson et al., 1987), σαρκώματα (Topalian, 1987),



καρκίνο εντέρου (Yoo et al., 1990), αδενοκαρκίνωμα ορθού (Nishimura et al., 1991) και τέλος καρκίνοι οισοφάγου και εγκεφάλου (Miesher et al., 1987).

Τα τελευταία χρόνια υπάρχουν ενδείξεις που αναφέρονται στην ύπαρξη κυτταροτοξικών TIL  $\gamma/\delta+$ . Παρατηρήθηκε ότι T  $\gamma/\delta+$  κυτταρικοί κλώνοι εκδήλωναν πολύ συχνά μη ειδική κυτταροτοξικότητα, κάτι που ενέχει τα κύτταρα αυτά στην ανοσοεπίβλεψη ενάντια στον καρκίνο (Borst et al., 1987, Moigneou et al., 1987). Σε συνάρτηση με τα προηγούμενα ευρήματα, είναι και οι αναφορές σε T  $\gamma/\delta+$  κυτταρικούς κλώνους με αυτόλογη κυτταροτοξικότητα σε in-vitro καλλιέργειες (Wright et al., 1989). Η πρώτη αναφορά για εύρεση T  $\gamma/\delta+$  κυτταρικών κλώνων προερχόμενες από TIL καλλιέργειες και που παρουσίαζαν αυτόλογη κυτταροτοξικότητα συνδεδεμένη με τάξης I μόρια του ΜΣΙ, έγινε από την ομάδα του Zocchi (Zocchi et al., 1990) σε νεοπλασίες πνεύμονα. TCR  $\gamma/\delta+$  TIL απομονώθηκαν επίσης από πρωτογενές δερματικό μελάνωμα (Bachelez et al., 1992). Τα κύτταρα αυτά καλλιεργήθηκαν in-vitro για πολλές εβδομάδες με IL-2 και αυτόλογα καρκινικά κύτταρα. Λειτουργικές μελέτες αποκάλυψαν ότι  $\gamma/\delta+$  κλώνοι ή κυτταρικές σειρές που αναπτύχθηκαν από λεμφοκύτταρα που διηθούσαν πρωτογενές μελάνωμα μπορούσαν να λύουν αυτόλογα καρκινικά κύτταρα και με τρόπο που να μην ενέχονται τα μόρια του τάξης I ΜΣΙ. Παρόμοια αποτελέσματα περιγράφηκαν από την ομάδα του Nanno (Nanno et al., 1992) που έδειξαν τον in-vitro πολλαπλασιασμό T κυτταρικών σειρών ή κλώνων που εκφράζουν τον TCR  $\gamma/\delta+$  σε ασθενείς με συμπαγείς όγκους όπως, νεόπλασμα του Wilm, σάρκωμα ή μεταστατικό μελάνωμα.

Το γεγονός ότι τα TIL εμπεριέχουν υποπληθυσμούς T λεμφοκυττάρων με ικανότητα να αναγνωρίζουν και να λύουν τα αυτόλογα καρκινικά κύτταρα σε αντιγονικούς όγκους, τα καθιστά σημαντική πηγή κυτταρική ανοσίας στην καταπολέμηση της νεοπλασίας. Επιπλέον τέτοιοι ΚΤΛ κλώνοι έχουν χρησιμοποιηθεί σε μελέτες ανοσοεπιλογής για την ανίχνευση ΚΚΑ σε κλώνους αυτόλογων καρκινικών κυττάρων (Boon, 1992). Μελέτες στην αναδιάταξη των



TCR γονιδίων σε T κυτταρικούς κλώνους ή σειρές με αυτόλογη κυτταροτοξική δράση προτείνουν πιθανή συσχέτιση μεταξύ της εμφάνισης και εξάπλωσης της νεοπλασίας και της έκφρασης των γονιδίων αυτών. Σε αυτή τη βάση ο Belldegrun και οι συνεργάτες του (*Belldegrun et al., 1989*) έδειξαν ένα ολιγοκλωνικό χαρακτήρα των TIL κυτταρικών σειρών σε ανθρώπινο μελάνωμα με μια κατά προτίμηση έκφραση των γονιδίων V- $\gamma$ 5 και V- $\gamma$ 10 του TCR υποδοχέα. Σε μία άλλη μελέτη TIL με ειδικότητα για τον αυτόλογο όγκο σε ασκίτικα υγρά καρκίνου ωοθήκης φαίνεται να εκφράζουν τα V-B8.1+ και V- $\beta$ 6.7+ γονίδια (*Ioannides et al., 1991*). Παρ' όλα αυτά χρειάζεται περαιτέρω επιβεβαίωση των πρηγούμενων αποτελεσμάτων για την ορθότητα της συσχέτισης της επιλεκτικής γονιδιακής έκφρασης των TCR στα TIL ασθενών με καρκίνο διότι υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα στην πρόσφατη βιβλιογραφία (*Albertini et al., 1991, Ferradini et al., 1992*).

Όπως προαναφέρθηκε, η αυτόλογη κυτταροτοξική δράση σε TIL ενεργοποιημένα με IL-2 διαφορετικών τύπων νεοπλασίας, αμφισβητείται από αρκετά εργαστήρια.

#### **1.14 Προθυμοσίνη α (*Prothymosin a, ProTa*).**

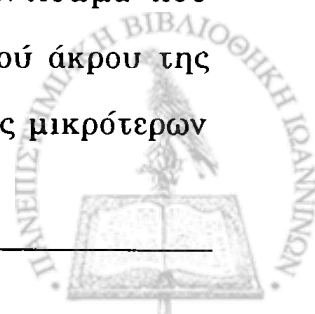
Το όνομα "θυμοσίνη" χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά για να προσδιορίσει έναν παράγοντα από εκχύλισμα θύμου μόσχου που προκαλούσε λεμφοκυτταροποίηση σε ποντίκια από τα οποία είχε αφαιρεθεί ο θύμος. Κλασματοποίηση της θυμοσίνης απέδωσε ένα βιολογικά ενεργό παρασκεύασμα που ονομάστηκε "κλάσμα 5 τής θυμοσίνης" (thymosin fraction 5, TF5) (*Hooper et al., 1975*), που στη συνέχεια δείχτηκε να αποτελείται από ένα μίγμα πεπτιδίων με μοριακά βάρη κυμαινόμενα από 1000 έως 14000 daltons και ισοηλεκτρικά σημεία από 4 έως 8 (*Low & Goldstein, 1979*). Το TF5 αναφέρθηκε ότι αυξάνει τις ανοσολογικές λειτουργίες σε αρκετές *in vitro* αλλά και *in vivo* δοκιμασίες με πειραματόζωα, καθώς και σε ασθενείς με πρωτογενείς ανοσο-



ανεπάρκειες (Low & Goldstein, 1984). Το πρώτο πεπτίδιο που απομονώθηκε από το TF5 ήταν η θυμοσίνη α1 (thymosin α1, Τα1), ένα όξινο πεπτίδιο με pH=4.2, που περιέχει 28 αμινοξέα και ένα ακετυλιωμένο αμινοτελικό άκρο. Η Τα1 έδειξε αρκετές αλλά όχι όλες τις βιολογικές δραστηριότητες του TF5 οδηγώντας στο συμπέρασμα πως υπάρχουν και άλλα ενεργά πεπτίδια σ' αυτό (Low & Goldstein, 1979). Άλλα πεπτίδια με γνωστή δομή που απομονώθηκαν από το TF5 μόσχου περιλαμβάνουν τις θυμοσίνες β1 και β4 (Schulof & Goldstein, 1981). Η θυμοσίνη β4 (thymosin β4, Τβ4) περιέχει 43 αμινοξέα και είναι επίσης ακετυλιωμένη στο αμινοτελικό της άκρο. Η θυμοσίνη β4 αναφέρθηκε πως αυξάνει τη δραστηριότητα της τρανσφεράσης του τελικού δεοξυνουκλεοτιδίου, ενός δείκτη Τ κυτταρικής διαφοροποίησης (Schulof & Goldstein, 1981) και ότι διεγείρει την απελευθέρωση ενός ορμονοδιεγερτικού παράγοντα στον υποθάλαμο (Redar et al., 1981).

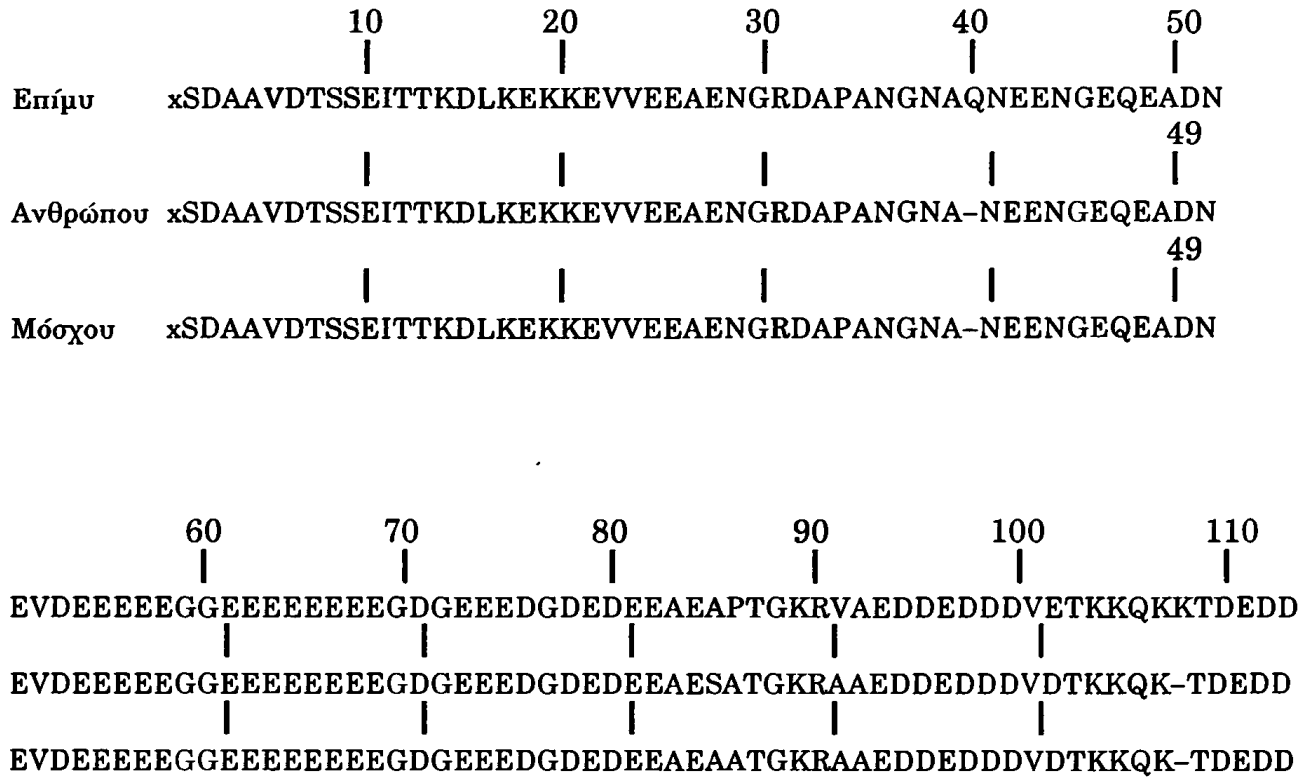
### 1.15 Προθυμοσίνη α και θυμοσίνη α1.

Από μια σειρά ερευνητικών αποτελεσμάτων αποδείχτηκε πως η Τα1 ήταν ένα πρωτεολυτικό παράγωγο ενός μεγαλύτερου πολυπεπτιδίου. Η μετάφραση του mRNA από θύμο μόσχου in vitro απέδωσε ένα παράγωγο με μοριακό βάρος 16KDa με αλληλουχίες αμινοξέων που υπήρχαν και στην Τα1 (Freire et al., 1981). Επιπλέον τουλάχιστον άλλα δύο σχετιζόμενα πεπτίδια απομονώθηκαν από το TF5 (Caldarella et al., 1983) ένα περιέχον τα πρώτα 24 αμινοξέα της Τα1 και ένα μεγαλύτερο της Τα1 που ονομάστηκε θυμοσίνη α11 (thymosin α11, Τα11) και περιέχει 7 επιπλέον αμινοξέα στο καρβοξυτελικό άκρο. Κανένα από αυτά τα πεπτίδια δεν μπορούσε να απομονωθεί από νωπό θύμο με μεθόδους που απέκλειαν πρωτεολυτικές τροποποιήσεις. Για την απομόνωση του φυσικού προδρόμου αυτών των πεπτιδίων αναπτύχθηκε μια ραδιοανοσολογική μέθοδος (Radioimmunoassay, RIA) που χρησιμοποιούσε ένα αντίσωμα που αναγνώριζε ένα τμήμα περιέχον τα 10 αμινοξέα του αμινοτελικού άκρου της Τα1 (Haritos & Horecker 1985). Για να αποφευχθεί ο σχηματισμός μικρότερων



ανοσοαντιδρώντων τμημάτων, ήταν αναγκαίος ο βρασμός του κατεψυγμένου ιστού πριν από την εκχύλιση για την αδρανοποίηση των εδνογενών πρωτεασών (Haritos et al., 1984). Η μέθοδος που τελευταία χρησιμοποιείται για την απομόνωση των πεπτιδίων από κατεψυγμένο θύμο επίμυ (Komiyama et al., 1986), περιλαμβάνει τη δι οξέος κατακρήμνισή των εκχυλισμάτων που παράγονται από βρασμένους ιστούς, ακολούθως δε διαχωρισμό με βάση το μέγεθος σε Sephacryl S-200. Αυτή η τεχνική απέδωσε τρεις κορυφές πεπτιδίων η μια από τις οποίες, η ενδιάμεση κορυφή α, περιείχε όλη την ανοσοενεργή δράση. Το ανοσολογικά ενεργό πεπτίδιο που απομονώθηκε με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσεως (high pressure liquid chromatography, HPLC) από την κορυφή α ονομάστηκε προθυμοσίνη α (Prothymosin α, ProTa). Η προθυμοσίνη α από άνθρωπο ή μόσχο περιέχει 109 αμινοξέα, με την αλληλουχία της Ta1 (28 αμινοξέα) στο αμινοτελικό της άκρο (σχήμα 2) (Haritos et al., 1985 a, Goodall et al., 1986, Eschenfeldt & Berger 1986, Paneerselvam et al., 1988). Είναι ένα εξαιρετικά όξινο πεπτίδιο (pI=3.55) πλούσιο σε γλουταμικό και ασπαρτικό οξύ (60% των αμινοξέων). Δεν περιέχει καθόλου αρωματικά αμινοξέα ούτε κυστεΐνη ή μεθειονίνη. Η αλληλουχία των αμινοξέων της ProTa βρέθηκε με τη χρήση συμβατικών μεθόδων με εξαίρεση το τμήμα από τη θέση 64 έως την 76 που ήταν πλούσιο σε γλουταμικό οξύ. Η αλληλουχία του τμήματος αυτού επιτεύχθηκε με ανάλυση ενός cDNA κλώνου από ανθρώπινο σπλήνα (Goodall et al., 1986, Eschenfeldt & Berger 1986). Η ProTa έχει επίσης απομονωθεί από θύμο ανθρώπου και η πρωτοταγής δομή της έχει καθοριστεί (Pan et al., 1986). Το ανθρώπινο πολυπεπτίδιο περιέχει τέσσερεις υποκαταστάσεις αμινοξέων και δύο διαγραφές σε σχέση με την ProTa του επίμυ. Οι διαγραφές αφορούν την Glu<sup>39</sup> και την Lys<sup>107</sup> της αλληλουχίας της ProTa του επίμυ (σχήμα 2). Αν και τόσο η ανθρώπινη όσο και η ProTa του επίμυ περιέχουν την αλληλουχία της Ta1, δείχνουν σημαντικές διαφορές όσον αφορά τη δραστηριότητα τους σε μια δοκιμασία προστασίας μυών όπως θα δούμε.





Θύμος επίμυ: 111 αμινοξέα  
 Θύμος ανθρώπου: 109 αμινοξέα  
 Μόσχου: 109 αμινοξέα

**ΣΧΗΜΑ 2.** Αλληλουχία αμινοξέων Προθυμοσίνης α απομονωθείσα από τρία διαφορετικά είδη (*Paneerselvam et al., 1988*).



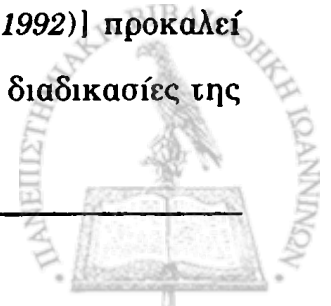


### **1.16 Κατανομή στους ιστούς και βιολογικές ιδιότητες.**

Η ProTa βρέθηκε σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στο θύμο και ακολούθως στο σπλήνα, τους πνεύμονες, τους νεφρούς, το ήπαρ και τον εγκέφαλο (*Haritos et al., 1984a, Haritos and Horecker, 1985*). Με τη χρήση της μεθόδου RIA πιστοποιήθηκε η ύπαρξη της ProTa στο περιφερικό αίμα και εντοπίστηκε στα λευκοκύτταρα (*Paneerselvam et al., 1988*).

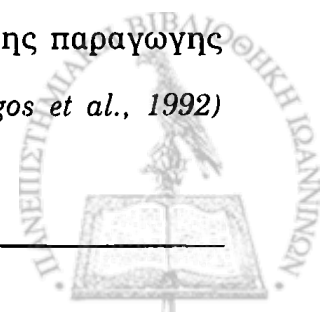
Προκαταρκτικές παρατηρήσεις οδηγούν στην υπόθεση ότι η ProTa εξωκυττάρια πιθανόν να διεγείρει την κυτταρική ανοσία. Έτσι, η ProTa προστατεύει ευαισθητοποιημένες σειρές μυών έναντι μόλυνσης με *Candida albicans* και είναι πολύ πιο αποτελεσματική από την Ta1 ή την Ta11 σε αυτή τη δοκιμασία. Η Παραθυμοσίνη από την άλλη, ένα συγγενές πεπτίδιο, αναστέλλει την αποτελεσματικότητα της ProTa σε αυτή τη δοκιμασία (*Caldarella et al., 1983, Haritos et al., 1985b*). Αρκετό ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η Παραθυμοσίνη χορηγούμενη σε ανθεκτικές σειρές μυών τις κάνει ευαίσθητες σε τυχαία μόλυνση. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η ανθρώπινη ProTa είναι λιγότερο αποτελεσματική από την ProTa του επίμου στην συγκεκριμένη δοκιμασία (*Pan et al., 1986*). Η ProTa έχει τελευταία απομονωθεί από άλλα είδη και συγκεκριμένα τόσο από θύμο αδένα χοίρου (*Economou et al., 1988*) όσο και από σπλήνα αιγός (*Frillingos et al., 1991*).

Οι μελέτες σχετικά με τον κυτταρικό εντοπισμό της ProTa δείχνουν ότι πρόκειται για πυρηνική πρωτεΐνη (*Manrow et al., 1991*) η οποία εμπλέκεται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Μάλιστα όταν *anti sense* (αντινοητικά) ολιγοδεοξυνοκλεοτιδία ProTa προστίθονται στην καλλιέργεια διαιρούμενων κυττάρων μυελώματος αναστέλεται ο πολλαπλασιασμός τους (*Sburlati et al., 1991*). Το τελευταίο γεγονός ενισχύεται από τα δεδομένα που δείχνουν ότι η ενεργοποίηση του πρωτο-ογκογονιδίου *c-myc* [του οποίου η έκφραση αυξάνεται κατά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (*Marcu et al., 1992*)] προκαλεί μεταγραφή του γονιδίου της ProTa (*Eilers et al., 1991*). Κατά τις διαδικασίες της



οντογένεσης, διαφοροποίησης ή θερμικού σοκ η έκφραση του γονιδίου της ProTa αυξάνεται με ταυτόχρονη αύξηση της μεταγραφής του c-myc και μάλιστα είναι πολύ πιθανό η έκφραση του τελευταίου να ρυθμίζει την μεταγραφή του πρώτου. Εντούτοις και όταν το c-myc σταματάει να εκφράζεται το γονίδιο της ProTa εξακολουθεί να μεταγράφεται (*Vareli et al., 1995*). Υπάρχουν και διαφορετικές εκτιμήσεις που αναφέρουν ότι η c-myc πρωτεΐνη συνδέεται στον προαγωγέα του γονιδίου της ProTa (E box) ο οποίος όμως δεν επηρεάζει την μεταγραφή του (*Mol et al., 1995*). Η εμπλοκή του μορίου στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό υποστηρίζεται από δεδομένα που δείχνουν ότι η ProTa συνδέεται με την ιστόνη H1. Αναλυτικότερα η αλληλεπίδραση της τελευταίας με trans acting factors έχει σαν αποτέλεσμα την χαλάρωση των δεσμών μεταξύ της H1 και του νουκλεοσώματος με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η μεταγραφή (*Kas et al., 1993*). Η ProTa συνδέεται με την H1 και η αλληλεπίδραση αυτή πραγματοποιείται με την συμμετοχή του όξινου τμήματος του μορίου (κατάλοιπα 52-82). Έχοντας υπόψη το ρόλο της ProTa στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μπορούμε να υποθέσουμε ότι ανήκει στην κατηγορία των πρωτεϊνών που τροποποιούν την δομή του χρωμοσώματος οδηγώντας στην χαλάρωση των δεσμών μεταξύ χρωματίνης και νουκλεοσωμάτων ώστε να είναι δυνατή η μεταγραφή ή ο πολλαπλασιασμός (*Paramarkaki and Tsolas, 1994*).

Το εργαστήριο μας ήταν το πρώτο που ασχολήθηκε με την in vitro εξωκυττάρια δράση της ProTa. Κατά την διάρκεια των τελευταίων 10 ετών σε μια σειρά δημοσιεύσεων η ProTa έδειξε ανοσοενισχυτική δράση σε μια ποικιλία ανοσολογικών δοκιμασιών όπως: αύξηση της αυτόλογης ΜΛΑ και της ετερόλογης ΜΛΑ (*Baxevanis et al., 1988*) αύξηση της έκφρασης μορίων ιστοσυμβατότητας σε μονοκύτταρα αύξηση της παραγωγής IL-2 και της έκφρασης των υποδοχέων της (*Baxevanis et al., 1990*) επαγωγή της παραγωγής της ανοσοενισχυτικής θυμοσίνης α1 από μονοκύτταρα (*Frillingos et al., 1992*)



ελάττωση της παραγωγής της ανοσοκατασταλτικής προσταγλανδίνης E2 αύξηση της κυτταροτοξικότητας των T λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος (Baxevanis et al., 1993) καθώς και παραγωγή ανιόντος του σουπεροξειδίου (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) από μονοκύτταρα περιφερικού αίματος (Aliverti et al., 1995). Επίσης η ProTa έδειξε να αποκαθιστά ανεπαρκείς ανοσολειτουργίες σε ασθενείς με αυτοανοσία όπως σκλήρυνση κατά πλάκας (Reclos et al., 1987) και ερυθρηματώδη λύκο (Baxevanis et al., 1987a). Σε πρόσφατα in vivo πειράματα η ProTa έδειξε αντικαρκινική δράση αφού επιμύκηνε την βιοσιμότητα μυών στους οποίους έγινε έγχυση με αυτόλογα λευχαιμικά κύτταρα (Papanastasiou et al., 1992). Η καλλιέργεια μονοκυττάρων περιφερικού αίματος υγείων δοτών παρουσία IFN $\gamma$  και ProTa είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής TNF $\alpha$  με ταυτόχρονη αύξηση της κυτταροτοξικής τους δράσης εναντίον κυττάρων μελανώματος. Η αύξηση της κυτταροτοξικότητας εναντίον κυττάρων μελανώματος παρατηρήθηκε και στην περίπτωση που τα μονοκύτταρα προέρχονταν από ασθενείς με μελάνωμα χωρίς όμως την ταυτόχρονη αύξηση στην συγκέντρωση του TNF $\alpha$  παρουσία είτε IFN $\gamma$  ή ProTa ή συνδυασμό αυτών (Garbin et al., 1994).

Τέλος αξίζει να αναφερθεί μια μελέτη όπου έδειξε την ύπαρξη ειδικών υποδοχέων για ProTa σε μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος (Cordero et al., 1994). Επίσης πρόσφατα βρέθηκε ότι οι δύο υποδοχείς (υψηλής και χαμηλής συγγένειας) αυξάνονται μετά από διέγερση των λεμφοκυττάρων με PHA και η σύνδεση με το μόριο της ProTa έχει σαν αποτέλεσμα την εσωτερικοποίηση του τελευταίου (Cordero et al., 1995).

### **1.17 Σκοπός της διατριβής.**

Όπως προαναφέρθηκε στην προηγούμενη παράγραφο η ProTa παρουσιάζει μία in vitro ανοσοενισχυτική δράση κυρίως σε λειτουργίες T λεμφοκυττάρων και μονοκυττάρων. Επίσης το ίδιο μόριο δείχνει in vivo αντικαρκινική δράση.



Γνωρίζοντας ότι νεοπλασίες στον άνθρωπο συνοδεύονται ή προκαλούν ανοσοανεπάρκειες που εκδηλώνονται κυρίως στην Τ εξαρτώμενη ανοσία, ήταν αρκετά σημαντικό να μελετηθεί η δράση της ProTa in vitro σε υπολειπόμενα ανοσοκυτταρικά συστήματα σε καρκινοπαθείς. Γνωρίζοντας επίσης ότι πρόσφατες μέθοδοι ανοσοθεραπείας του καρκίνου αναφέρονται στην in vitro ενεργοποίηση ανοσοκατεσταλμένων λεμφοκυττάρων του ίδιου του ασθενή, με IL-2 ήταν αρκετά ενδιαφέρον να μελετηθεί η τυχόν συνεργιστική δράση της ProTa σε τέτοιου είδους συστήματα. Ένα άλλο σημαντικό πεδίο έρευνας για την βιολογική δράση της ProTa αναφέρεται στη ρύθμιση του ανοσολογικού συστήματος. Ήταν λοιπόν αρκετά χρήσιμο να διαπιστωθεί εάν και με ποιους μηχανισμούς η ProTa τροποποιεί την λειτουργικότητα ρυθμιστικών Τ λεμφοκυττάρων τα οποία συμβάλλουν άμεσα στην επαγωγή των εκτελεστικών λειτουργιών του ΑΣ.

Τέλος αρκετά ενδιαφέρον ήταν να μελετηθούν οι in vivo κυτταρικοί μηχανισμοί που επάγονται από την ProTa μια που τελικά οδηγούν στην καταστροφή αυτόλογων καρκινικών κυττάρων. Η μελέτη περί της in vivo και in vitro αντικαρκινικής δράσης της ProTa σε πειραματόζωα τοποθετεί τις βάσεις για την μελλοντική χρησιμοποίησή της σε κλινικές δοκιμές για την ανοσοθεραπεία του καρκίνου.



## ΥΛΙΚΑ και ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Υλικά.

Το καλλιεργητικό υλικό RPMI 1640, τον εμβρυϊκό ορό μύσχου το διττανθρακικό νάτριο, την L-γλουταμίνη και το εξισορροπημένο αλατούχο διάλυμα του Hank's προμηθευτήκαμε από την GIBCO (Girard Island, New York, NY, ΗΠΑ). Το διάλυμα Ficoll-Hyraque από την Pharmacia Fine Chemicals (Uppsalla, Sweden), την PGE<sub>2</sub>, την ινδομεθακίνη και το N-2-υδροξυαιθυλπιπεράζινο -N-2-αιθανοσουλφονικό οξύ (HEPES) από τη Sigma Chemical Co (St.Louis.MO), το Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub> και την <sup>3</sup>H-θυμιδίνη (47 μCi/mmol) από την Amersham (The Radiochemical Centre, Amersham U.K.). Η ανθρώπινη ανασυνδυσασμένη IL-2 ήταν μία γενναιόδωρη προσφορά της Cetus Corporation (Emeryville CA, USA) (1 Cetus Unit (U)=6IU). Η PGE<sub>2</sub> και η ινδομεθακίνη διαλύθηκαν σε απόλυτη αλκοόλη ώστε να παρασκευαστεί διάλυμα συγκέντρωσης 10<sup>-2</sup>M και έπειτα με διάλυση σε πλήρες θρεπτικό υλικό φερόταν στην προς χρήση τελική συγκέντρωση. Η τελική συγκέντρωση της αιθανόλης στα δείγματα ήταν μικρότερη ή ίση με 0.01% και όπως έχει ήδη αναφερθεί (?) δεν επηρέασε ούτε τη βιωσιμότητα ούτε τη δραστικότητα των NK και LAK κυττάρων. Το πλήρες θρεπτικό υλικό αποτελούνταν από RPMI 1640 10% FCS, 10 mM HEPES, 2mM L-γλουταμίνη και 100 μg/ml γενταμυκίνη.

Από τη Merck (Germany) προμηθευτήκαμε τα εξής: χλωριούχο νάτριο, μονόξινο και δισόξινο φωσφορικό νάτριο και υγρό σπινθηρισμού. Από τη Sigma (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) πήραμε φυτοαιμοσυγκολλητίνη (PHA), διμεθυσουλφοξειδίο (DMSO), αλβουμίνη από ορό βοός (BSA), κυανούν του τρυπανίου (trypan blue), 2-Μερκαπτοαιθανόλη και Triton-X.

Από την Leo Pharmaceutical (Denmark), προμηθευτήκαμε ηπαρίνη και από τη Flow (Flow Laboratories, England) γενταμυκίνη.



Τα πλαστικά που χρησιμοποιήθηκαν, όπως πλάκες καλλιέργειας των 24 φρεατίων, τρυβλία Petri, πλαστικά σωληνάρια αποστειρωμένα ή μη, διαφόρων χωρητικοτήτων, οι φιάλες των κυτταροκαλλιεργειών, οι πλάκες μικροκαλλιεργειών των 96 φρεατίων με επίπεδη ή κοίλη βάση, τα σωληνάρια σπινθηρισμού και τα σωληνάρια καταψύξεων κυττάρων πήραμε είτε από την Costar (Costar, Cambridge, Mass USA) είτε από την Greiner (Greiner, Kirchheim, Stuttgart, Germany).

Το Nylon wool που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση καθαρών T λεμφοκυττάρων ήταν από την Fenwall Laboratories (ΗΠΑ) και τα φίλτρα στείρωσεως των 0.22 και 0.45  $\mu\text{m}$ , προμηθευτήκαμε από την Millipore.

Τα μονοκλωνικά αντισώματα anti-H2K<sup>d</sup>, anti H2D<sup>d</sup> anti IA<sup>d</sup> anti IE<sup>d</sup>, anti CD4 (ο κλώνος RM4-5 ο οποίος αναστέλει τη σύνδεση του μονοκλωνικού αντισώματος GK1.5), anti NK 1.1 (κλώνος 3A4), anti CD8b [ειδικό για την  $\beta$  αλυσίδα του CD8 (Ly3)] συνδεδεμένο με φθορισεΐνη, anti CD4 (κλώνος RM4-4 ο οποίος αναστέλει τη σύνδεση του μονοκλωνικού αντισώματος 2B6) συνδεδεμένο με φυκοερυθρίνη, anti-NK ειδικό (ειδικός κλώνος 5E6 που δεν αντιδρά με το NK 1.1 αντιγόνο) συνδεδεμένο με φθορισεΐνη, mouse anti rat IgG2a, anti CD25 συνδεδεμένο με φυκοερυθρίνη, anti I A<sup>d</sup> συνδεδεμένο με φυκοερυθρίνη, anti CD3e (ειδικό για T κύτταρα) συνδεδεμένο με φθορισεΐνη, καθώς και το πολυκλωνικό rat mouse IgM, πήραμε από την Farmingen (San Diego, Calif).

Τα αντισώματα εναντίον των ανθρώπινων αντιγόνων CD3, CD14, CD19 ήταν από την Becton Dickinson. Τα Dynabeads επικαλυμένα με πολυκλωνικό αντίσωμα εναντίον της IgG του μύος ή με μονοκλωνικό αντίσωμα εναντίον των ανθρώπινων: CD3, CD4, CD8, CD19 καθώς και το διάλυμα DETACHa bead προμηθευτήκαμε από την Dynal (Oslo, Norway).

Το τοξοειδές του τετάνου (tetanus toxoid) ήταν μία ευγενής προσφορά από το Dr.G.C. Tsokos. Η προθυμοσίνη α από θύμο επίμυ ήταν δώρο του Dr



B.L. Hovecker (Cornell University, Medical College, New York, N.Y., ΗΠΑ). Η προθυμοσύνη α από θύμο χοίρου και βοός απομονώθηκαν σύμφωνα με τη μεθοδολογία των Χαρίτου και Hovecker (*Haritos et al., 1984, Komiyama et al., 1986, Economidou et al., 1988, Frillingos et al., 1986*) ήταν μία ευγενική προσφορά του καθηγητή Ορ. Τσόλα (Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων) και του Αναπληρωτή Καθηγητή της Ζωολογίας του πανεπιστημίου Αθηνών Α. Χαρίτου.

## 2.2 Διαλύματα

Φυσιολογικός ορός ρυθμισμένος με διάλυμα φωσφορικών (Phosphate buffered Saline, PBS).

**Διάλυμα Α:** Παρασκευάζεται 5M διάλυμα δισόξινου φωσφορικού νατρίου ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )

**Διάλυμα Β:** Παρασκευάζεται 5M διάλυμα μονόξινου φωσφορικού νατρίου ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ). Ποσότητες από τα διαλύματα Α και Β αναμιγνύονται στο πεχάμετρο μέχρις ότου  $\text{pH}=7.4$  (διάλυμα Γ).

Είκοσι ml από το διάλυμα Γ φέρονται στο 1 λίτρο με προσθήκη φυσιολογικού ορού ( $\text{NaCl } 0.9\%$ ). Το έτοιμο πλέον PBS αποστειρώνεται σε υγρό κλίβανο.

**Χρήση:** Αντί καλλιεργητικού υλικού ή φυσιολογικού ορού για πλυσίματα κυττάρων, στον ανοσοφθορισμό των ELISA. Επίσης χορηγείται σε μύς (μάρτυρες).



### **2.3 Κατάψυξη και απόψυξη κυττάρων.**

Τα αποθέματα των κυττάρων διατηρούνται κατεψυγμένα σε υγρό άζωτο (-196°C). Η διαδικασία κατάψυξης είναι η εξής: Το εναιώρημα των κυττάρων φυγοκεντρείται στις 1000 rpm επί 5 λεπτά και το κυτταρικό ίζημα επανειωρείται σε κρύο καλλιεργητικό υλικό RPMI 1640 με 40-60% εμβρυϊκό ορό μωσαρίου, 2mM L γλουταμίνη, 50 μg/ml γενταμυκίνη και 10% διμεθυλσουλφοξειδίου (DMSO) ή γλυκερίνη. Η κυτταρική πυκνότητα ρυθμίζεται στις  $5 \cdot 10^6$  κύτταρα/ml. Στη συνέχεια 1 ml από αυτό το εναιώρημα μεταφέρεται σε ειδικά σωληνάρια κατάψυξης. Τα σωληνάρια τοποθετούνται σε απλό καταψύκτη όπου ψύχονται σταδιακά. Τέλος μεταφέρονται σε αποθηκευτική φιάλη με υγρό άζωτο, όπου διατηρούνται για 6-12 μήνες. Η απόψυξη των κυττάρων γίνεται με γρήγορη μεταφορά στους 37°C. Το εναιώρημα, 1 ml, φυγοκεντρείται σε 50 ml RPMI 1640 για 5 λεπτά στις 1000 rpm. Το ίζημα της φυγοκέντρωσης επαναδιαλυτοποιείται σε 5-6 ml προθερμασμένου (37°C) πλήρους καλλιεργητικού υλικού και τοποθετείται σε πλαστικές πλάκες 24 οπών.

### **2.4 Μέτρηση βιωσιμότητας.**

Η μέτρηση της βιωσιμότητας γίνεται με τη μέθοδο του αποκλεισμού της χρωστικής κυανού του τροπανίου (trypan blue dye exclusion) από τα ζωντανά κύτταρα. Χρησιμοποιείται 2% διάλυμα χρωστικής σε φυσιολογικό ορό (0.9% NaCl). Σε 9 μέρες δείγματος κυτταρικού εναιωρήματος προστίθεται 1 μέρος διαλύματος χρωστικής (τελική συγκέντρωση 0.2%). Το δείγμα επωάζεται επί 5 λεπτά στους 36.5-37°C και στη συνέχεια, μετρείται ο αριθμός των βαμμένων (νεκρών) κυττάρων σε σύνολο 500 κυττάρων. Η βιωσιμότητα είναι το ποσοστό των ζωντανών (άβαφων) κυττάρων στο σύνολο των κυττάρων που μετρήθηκαν.



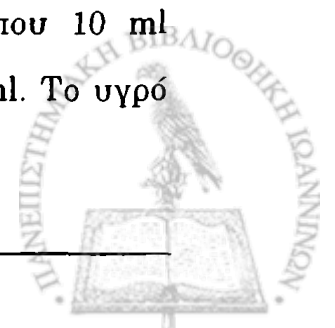


## **2.5 Ανοσοφθορισμός.**

Σαν φαινότυπο ορίζουμε την ποιοτική και ποσοτική κατανομή ενός μεγάλου εύρους αντιγόνων επιφανείας που χαρακτηρίζουν έναν κυτταρικό πληθυσμό. Ο προσδιορισμός των αντιγόνων επιφανείας έγινε με άμεσο και έμμεσο ανοσοφθορισμό με χρήση κυτταρομετρητή ροής. Στον άμεσο ανοσοφθορισμό μονοκλωνικά αντισώματα συνδεδεμένα με φθοριοχρωστική (φλουρεσκίνη -FITC ή φυκοερυθρίνη-PE) σε συγκέντρωση 1  $\mu\text{g/ml}$  επωάζονται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C, μαζί με  $10^6$  κύτταρα σε συνολικό όγκο 100  $\mu\text{l}$ . Στη συνέχεια το παρασκεύασμα πλένεται τρεις φορές σε διάλυμα PBS/BSA 0.1% για να απομακρυνθεί η περίσσεια αντισώματος και μονιμοποιείται με PBS/φορμαλδεύδη 1%. Στον έμμεσο ανοσοφθορισμό, τα μονοκλωνικά αντισώματα που χρησιμοποιούνται δεν είναι σημασμένα με φθοριοχρωστική. Στην περίπτωση αυτή μετά από την πρώτη επώαση στις παραπάνω συνθήκες και το πλύσιμο την πρώτη επώαση στις παραπάνω συνθήκες και το πλύσιμο των κυττάρων, ακολουθεί δεύτερη επώαση του παρασκευάσματος με σημασμένο αντίσωμα εναντίον του Fc τμήματος της πρώτης ανοσοσφαιρίνης. Επαναλαμβάνεται η σειρά των πλυσιμάτων και η μονιμοποίηση. Τα δείγματα μετρώνται εντός διημέρου με το κυτταρόμετρο ροής (FACS can, Becton Dickinson).

## **2.6 Απομόνωση μονοπυρήνων λεμφοκυττάρων από περιφερικό αίμα ανθρώπου.**

Τα ανθρώπινα μονοπύρηννα λεμφοκύτταρα απομονώθηκαν με τη μέθοδο του Boyum (Boyum, 1968). Είκοσι ml περιφερικού αίματος συλλέγονται σε αποστειρωμένα φιαλίδια που περιέχουν 250-500 IU ηπαρίνης. Το κάθε φιαλίδιο με ηπαρινισμένο αίμα μοιράζεται σε δύο φιαλίδια (ανά 10 ml περίπου), αραιώνεται με HBSS (περίπου 15 ml) και τοποθετείται με προσοχή σαν στοιβάδα στην επιφάνεια του υγρού διαχωρισμού (περίπου 10 ml Lymphoprep ανά φιαλίδιο) σε σωλήνες φυγοκέντρησης των 50 ml. Το υγρό



διαχωρισμού έχει πυκνότητα 1.077 g/ml. Ακολουθεί φυγοκέντρηση επί 30 λεπτά σε 1750 rpm (900xg) δε θερμοκρασία δωματίου. Η στοιβάδα ακριβώς πάνω στην επιφάνεια του υγρού διαχωρισμού αποτελείται από τα μονοπύρρηνα λεμφοκύτταρα του αίματος. Το υπερκείμενο απομακρύνεται όσο το δυνατόν πληρέστερα (μέχρι περίπου τη στοιβάδα). Η στοιβάδα αυτή συλλέγεται με προσεκτική κυκλική κίνηση της βελόνας της σύριγγας πάνω στη στοιβάδα έως ότου οπτικά δεν παρατηρούνται άλλα κύτταρα (η ενδιάμεση επιφάνεια μεταξύ του ορού και του Lymphoprep να είναι διαυγής). Τα κύτταρα πλένονται με κρύο PRMI 1640 με φυγοκέντρηση μία φορά στις 1300 rpm (400xg) επί 10 λεπτά και η έκπλυση επαναλαμβάνεται ακόμη δύο φορές με φυγοκέντρηση στις 1300 rpm επί 5 λεπτά. Τέλος τα κύτταρα επαναιωρούνται στην κατάλληλη κυτταρική πυκνότητα σε πλήρες καλλιεργητικό υλικό. Με αυτή τη μέθοδο 20 ml αίματος υγιούς δότη αποδίδουν με φρέσκο Lymphoprep περίπου 30-60 εκατομμύρια μονοπύρρηνα λευκοκύτταρα.

### 2.7 Απομόνωση μονοκυττάρων.

Ο διαχωρισμός των μονοκυττάρων γίνεται βάσει της ιδιότητάς τους να προσκολλώνται σε πλαστικές επιφάνειες προεπωασμένες με εμβρυϊκό ορό μύσχου (*Kumagai et al., 1978*). Ο διαχωρισμός αυτός επιτελείται ως εξής: πλαστικά τρυβλία Petri επωάζονται ολονυκτίως με εμβρυϊκό ορό μύσχου (FCS) στους 4°C. Πριν τοποθετηθούν τα απομονωθέντα μονοπύρρηνα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος τα τρυβλία πλένονται, τουλάχιστον τρεις φορές με φυσιολογικό ορό ρυθμισμένο με διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffer Saline, PBS). Τα λεμφοκύτταρα φέρονται σε πυκνότητα  $1 \times 10^7$  κύτταρα/ml σε πλήρες καλλιεργητικό υλικό και τοποθετούνται στα τρυβλία έτσι ώστε η στάθμη του υγρού να μην υπερβαίνει τα 3 χιλιοστόμετρα. Τα τρυβλία επωάζονται για τρεις ώρες στους 36.5-37°C σε επωαστικό κλίβανο παρουσία 5% CO<sub>2</sub> και 95% υγρασίας. Μετά το πέρας της

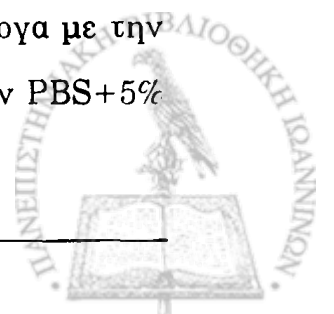


επώασης, τα τρυβλία αναταράσσονται δυνατά προς εναιώρηση των μη προσκολληθέντων κυττάρων (T και B λεμφοκύτταρα). Το εναιώρημα αποχύνεται ή φυλάσσεται για να περαστεί μετά από στήλη nylon wool για τον περαιτέρω διαχωρισμό των T λεμφοκυττάρων. Προστίθεται γρήγορα πλήρες καλλιεργητικό υλικό στα τρυβλία που αφήνονται στον πάγο για 10 περίπου λεπτά ώστε να επιτευχθεί η αποκόλληση των μονοκυττάρων. Με την άκρη του εμβόλου μιας σύριγγας του 1 ml επιτελείται μηχανικά η αποκόλληση των υπολοίπων μονοκυττάρων. Η αποκόλληση μπορεί να γίνει και με την επανειλημμένη υποπίεση έκλουση μέσω μίας βελόνας 21 G. Το εναιώρημα φυλάσσεται και αφού προστεθεί σε αυτό και το καλλιεργητικό υγρό από το πλύσιμο του τρυβλίου γίνεται έλεγχος του συλλεχθέντος πληθυσμού. Ο πληθυσμός των μονοκυττάρων ελέγχεται με το μονοκλωνικό αντίσωμα anti CD14 που αναγνωρίζει μονοκύτταρα καθώς επίσης και με άλλα αντισώματα που αναγνωρίζουν T ή B λεμφοκύτταρα για να διαπιστωθεί η καθαρότητα του πληθυσμού καθώς και με χρώση με τροποποιημένη Giemsa και με ειδική χρώση εστεράσης. Ικανοποιητική θεωρείται καθαρότητα του μονοκυτταρικού πληθυσμού με ποσοστό μεγαλύτερο από 95% άλλως η διαδικασία επαναλαμβάνεται.

## **2.8 Απομόνωση T-λεμφοκυττάρων.**

Η απομόνωση των T λεμφοκυττάρων με nylon wool (*Julius et al., 1973*) μπορεί να γίνει είτε απευθείας μετά το διαχωρισμό των μονοπύρηνων λευκοκυττάρων από το περιφερικό αίμα είτε από το υπερκείμενο που προκύπτει από το διαχωρισμό των μονοκυττάρων (μετά την ισχυρή ανατάραξη -βλ. παραπάνω). Η διαδικασία απομόνωσης είναι η εξής:

Ποσότητα nylon wool εκπλύεται με HCl 0.1N. Ακολουθούν διαδοχικές εκπλύσεις με δις απεσταγμένο νερό έως ότου το pH φθάσει το 7. Η ποσότητα αυτή τοποθετείται σε κυλίνδρους συρίγγων των 5 ή 10 ml (ανάλογα με την ποσότητα των κυττάρων προς διαχωρισμό). Οι σύριγγες περιέχουν PBS+5%



FCS μέχρι την ένδειξη 4 (προκειμένου για σύριγγα των 5 ml). Το nylon wool τοποθετείται στείρα και πιέζεται προσεκτικά ώστε να απελευθερωθεί ο τυχόν εγκλωβισμένος αέρας, μέχρι την ένδειξη 3 της σύριγγας των 5 ml. (Σε περίπτωση που χρησιμοποιηθεί σύριγγα των 10 ml, οι αντίστοιχες ενδείξεις είναι 8 και 6). Ελευθερώνουμε την οπή της βελόνας ώστε να περάσει το υγρό έκλουσης (PBS+5% FCS) και περνάμε μέσα από την κολώνα άλλα 10-15 ml υγρό στάγδην για εξισορρόπησή της. Κλείνουμε την οπή της βελόνας, προσθέτουμε 1 ml υγρό έκπλυσης και επωάζουμε την στήλη για 1 ώρα στους 37°C σε επωαστικό κλίβανο. Μετά το πέρας της επώασης αφήνουμε το υγρό έκπλυσης να φύγει και τα κύτταρα που τα έχουμε φέρι σε όγκο 0.5-1 ml τοποθετούνται στάγδην επί της στήλης. Προστίθεται 1 ml υγρό έκπλυσης ώστε τα κύτταρα να προωθηθούν στο σώμα του nylon wool, το άκρο της βελόνας επανασφραγίζεται και η στήλη επωάζεται για 1 ακόμη ώρα σε επωαστικό κλίβανο. Μετά το τέλος της επώασης, το άκρο της βελόνας ελευθερώνεται και προστίθεται στάγδην 10-15 ml υγρό έκπλυσης προς παραλαβή των κυττάρων. Ο παραλαμβανόμενος πληθυσμός των T λεμφοκυττάρων ελέγχεται ως προς την καθαρότητα του με το μονοκλωνικό αντίσωμα anti CD3 που αναγνωρίζει T λεμφοκύτταρα και άλλα αντισώματα (όπως anti CD14 που αναγνωρίζει μονοκύτταρα ή SIg για τα B λεμφοκύτταρα). Ικανοποιητική θεωρείται καθαρότητα μεγαλύτερη από 95% άλλως η διαδικασία επαναλαμβάνεται.

## **2.9 Απομόνωση CD4+ και CD8+ λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών.**

Η απομόνωση των CD4+ και CD8+ υποπληθυσμών από καθαρό T λεμφοκυτταρικό πληθυσμό (βλ. παραπάνω) γίνεται με την χρήση μαγνητικών σφαιριδίων DYNAL τα οποία στην επιφάνειά τους φέρουν μονοκλωνικό αντίσωμα που συνδέεται είτε με CD4 αντιγόνο είτε με το CD8+. Αναλυτικότερα:



- ▶ Μετρούνται τα T λεμφοκύτταρα με τη μέθοδο που περιγράφηκε παραπάνω.
- ▶ Υπολογίζεται θεωρητικά ο αριθμός των CD4+ ή CD8+ κυττάρων που αντιστοιχεί στον παραπάνω αριθμό T λεμφοκυττάρων.

Τα T λεμφοκύτταρα επώαστηκαν στους 4°C με ανοσομαγνητικά σφαιρίδια επικαλυμμένα με το επιθυμητό αντίσωμα σε μία αναλογία περίπου  $4 \cdot 10^6$  σφαιρίδια/ $10^6$  κύτταρα στόχους κάτω από περιοδική ανάδευση.

- ▶ Τα CD4+ ή CD8+ λεμφοκύτταρα που προσδέθηκαν στα μαγνητικά σφαιρίδια συλλέχθηκαν με την βοήθεια ενός μαγνήτη (MPC-6, DYNAL).
- ▶ Το εναιώρημα σφαιριδίων κυττάρων ξεπλύθηκε τρεις φορές ώστε να απομακρυνθούν τα μη δεσμευμένα κύτταρα.
- ▶ Καταμέτρηση των απομονωμένων κυττάρων.
- ▶ Για την αποκόλληση των σφαιριδίων από τα κύτταρα χρησιμοποιείται ειδικό πολυκλωνικό αντίσωμα (DETACH A BEAD, DYNAL), το οποίο συνδέεται με τα Fab τμήματα του μονοκλωνικού αντισώματος. Η αλληλεπίδραση αυτή παρεμποδίζει τη σύνδεση του Fab τμήματος του συνδεδεμένου στα σφαιρίδια μονοκλωνικού αντισώματος, με τον επίτοπο του μορίου που αυτό αναγνωρίζει στα απομονωμένα κύτταρα. Η αλληλεπίδραση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα το σύμπλεγμα των ανοσομαγνητικών σφαιριδίων με το μονοκλωνικό αντίσωμα στην επιφάνειά τους και το πολυκλωνικό αντίσωμα συνδεδεμένο πάνω στα Fab τμήματα του τελευταίου να αποδεσμεύεται από τα κύτταρα. Η χρήση μαγνήτη (MPC-6, DYNAL) έχει σαν αποτέλεσμα τη συλλογή των σφαιριδίων οπότε τα κύτταρα είναι πλέον απομονωμένα και κατάλληλα για λειτουργικά πειράματα.



## 2.10 Κυτταρικές σειρές.

Οι παρακάτω κυτταρικές σειρές χρησιμοποιήθηκαν σαν κύτταρα στόχοι στα πειράματα προσδιορισμού της δραστικότητας των NK και LAK κυττάρων. Η K562 προέρχεται από ένα ασθενή με χρόνια μυελογενή λευχαιμία. Οι κυτταρικές σειρές DAUDI και RAJI είναι ανθρώπινες κυτταρικές σειρές που προέρχονται από λέμφωμα Burkitt. Η L1210 και η YAC προέρχονται από λέμφωμα μυός. Η P815 προέρχεται από μαστοκύττωμα μυός.

## 2.11 Ετερόλογη μικτή λεμφοκυτταρική αντίδραση.

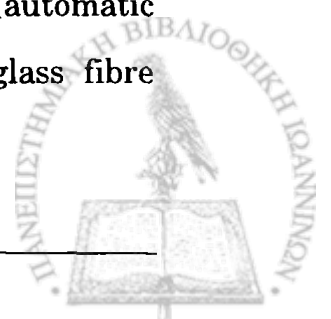
Η θεωρητική βάση της λεμφοκυτταρικής αντίδρασης αναφέρθηκε στην εισαγωγή, όπου αναπτύχθηκαν τα στάδια των κυτταρικών διεγέρσεων και ενεργοποιήθηκαν τα στάδια των κυτταρικών διεγέρσεων και ενεργοποιήσεων που τελικά οδηγούν στον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων (κυρίως του CD4+ υποπληθυσμού). Στην πράξη ξεχωρίζουμε δύο πληθυσμούς στη μικτή λεμφοκυτταρική αντίδραση: τον πληθυσμό των αντιδρώντων (responder) κυττάρων και τον πληθυσμό που προκαλεί αυτή τη διέγερση (stimulators) όντας ο ίδιος απενεργοποιημένος (συνήθως με γ ακτινοβολία). Η απενεργοποίηση γίνεται ώστε ο μόνος πληθυσμός που θα έχει τη δυνατότητα πολλαπλασιασμού να είναι ο αντιδρών. Η ετερόλογη μικτή λεμφοκυτταρική αντίδραση είναι ένα κυτταρικό σύστημα που επιτρέπει μία *in vitro* αξιολόγηση του ανοσολογικού συστήματος εναντίον ξένων αντιγόνων.

Αναλυτικά η τεχνική έχει ως εξής: από το περιφερικό αίμα δότη που προορίζεται να δώσει τα αντιδρώντα κύτταρα, απομονώνονται τα μονοπύρρηνα λευκοκύτταρα μετά από φυγοκέντρηση πάνω σε Lymphoprep. Επακολουθεί προσκόλληση σε τρυβλία petri και απομόνωση των μονοκυττάρων. Το υπερκείμενο περνιέται από στήλη nylon wool και απομονώνεται ο T πληθυσμός. Η κυτταρική πυκνότητα ρυθμίζεται και για



τους δύο πληθυσμούς στα  $2 \times 10^6$  κύτταρα/ml ή σε  $1 \times 10^6$  κύτταρα/ml σε πλήρες καλλιεργητικό υλικό RPMI 1640 που δυνατόν να περιέχει αντί για 10% FCS, 10% ορό AB από μη ηπαρινισμένα αίματα. Ο πληθυσμός των μονοκυττάρων απενεργοποιείται κατόπιν ακτινοβολίας από πηγή κοβαλτίου (3000-3300 rads). Από το περιφερικό αίμα του δότη του οποίου τα κύτταρα θα αποτελέσουν το διεγείροντα πληθυσμό, απομονώνονται με διαδικασία παρόμοια με αυτή που προαναφέρθηκε, τα μονοκύτταρα τα οποία απενεργοποιούνται επίσης κατόπιν ακτινοβολίας από πηγή κοβαλτίου (3000-3300 rads).

Για τον αντιδρώντα πληθυσμό είναι απαραίτητη η παρουσία αυτολόγων μονοκυττάρων (Baxevanis et al., 1986). Συνεπώς στην ετερόλογη ΜΛΑ ο αντιδρών πληθυσμός μπορεί να είναι και μονοπύρηννα απευθείας μετά την απομόνωσή τους από το περιφερικό αίμα. Η αναλογία με την οποία αναμιγνύονται οι πληθυσμοί είναι T λεμφοκύτταρα:αυτόλογα μονοκύτταρα:ετερόλογα μονοκύτταρα=1:0.1:1 (πίνακας 5). Όταν χρησιμοποιούνται  $2 \times 10^5$  αντιδρώντα λεμφοκύτταρα με  $2 \times 10^5$  ετερόλογα μονοκύτταρα χρησιμοποιούμε πλάκες με επίπεδο πυθμένα στα φρεάτια ενώ όταν χρησιμοποιούνται μικρότεροι αριθμοί κυττάρων (π.χ.  $1 \times 10^5$  αντιδρώντα κύτταρα εναντίον  $1 \times 10^5$  διεγερδόντων μονοκυττάρων) χρησιμοποιούνται πλάκες με φρεάτια κοίλου πυθμένα. Σε πλάκες μικροκαλλιέργειας των 96 φρεατίων βάζουμε 100 μl από καθέναν από τους δύο πληθυσμούς (=  $2 \times 10^5$  κύτταρα ανά φρεάτιο από κάθε πληθυσμό). Τα δείγματα μπαίνουν πάντα εις τριπλούν (3 ίδια φρεάτια ανά δείγμα) εκτός αν αναφέρεται αλλιώς. Η πλάκα παραμένει στον επωαστικό κλίβανο επί 6 ημέρες (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% υγρασία). Δεκαέξι ή δεκαοκτώ ώρες πρίν από το τέλος της καλλιέργειας, προστίθεται 1 μCi τριτωμένης (<sup>3</sup>H) θυμιδίνης. Μετά το πέρας των 6 ημερών τα κύτταρα συλλέγονται από έναν αυτόματο κυτταροσυλλέκτη (automatic cell harvester, DYNATECH) πάνω σε χαρτί με ίνες γυαλιού (glass fibre



paper). Τα χαρτιά αυτά αντιστοιχούν ανά ένα σε κάθε φρεάτιο της αρχικής πλάκας, ξεραίνονται και τοποθετούνται σε σωληνάρια σπινθηρισμού. Στα σωληνάρια αυτά τοποθετούνται 6 ml υγρού σπινθηρισμού και η ενσωματωθείσα ραδιενέργεια μετριέται σε έναν μετρητή β ακτινοβολίας (BECKMAN).

Με δεδομένο ότι μόνο τα πολλαπλασιαζόμενα δηλ. τα ενεργοποιημένα κύτταρα συνθέτουν DNA και συνεπώς ενσωματώνουν την ραδιενεργό θυμιδίνη μπορούμε να θεωρήσουμε τα ποσά της ραδιενέργειας των δειγμάτων σαν ένδειξεις ενεργοποίησης του αντιδρώντος πληθυσμού.



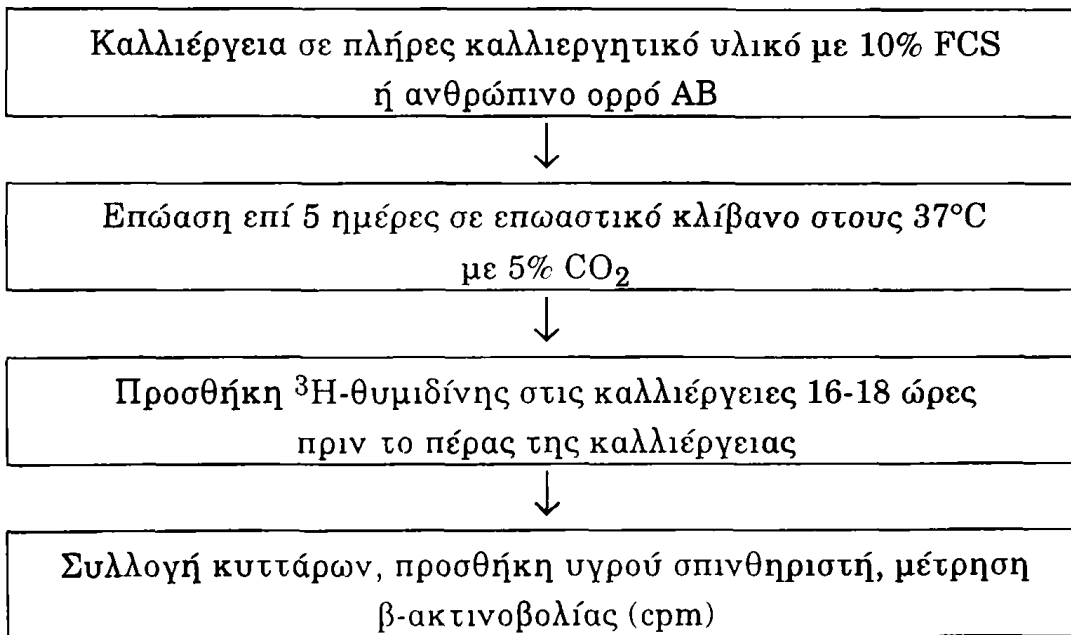


**ΕΤΕΡΟΛΟΓΟΣ ΜΙΚΤΗ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ (ΕΜΛΑ)**

ΔΟΤΗΣ Α		ΔΟΤΗΣ Β
Περιφερικό αίμα		Περιφερικό αίμα
Απομόνωση	Μονοπυρήνων	Απομόνωση Μονοπυρήνων
Απομόνωση Λεμφοκυττάρων	Απομόνωση Μονοκυττάρων	Απομόνωση Μονοκυττάρων
(responder cells)	(accessory cells)	(stimulatory cells)
	Απενεργοποίηση γ-ακτινοβολία	Απενεργοποίηση γ-ακτινοβολία

**ΣΤΑΔΙΟ ΕΠΩΑΣΗΣ**  
**ΔΥΝΑΤΟΙ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΙ**

T+Mo	_____	Mo
PBMC	_____	Mo
CD4+ +Mo	_____	Mo
CD8+ +Mo	_____	Mo
$\frac{2 \times 10^5 : 2 \times 10^4}{\text{φρεάτιο}}$	_____	$\frac{2 \times 10^5}{\text{φρεάτιο}}$

**ΣΧΗΜΑ 3.****Σχηματική παράσταση ΕΜΛΑ**

## 2.12 CML δοκιμασία.

Για την πραγματοποίηση αυτής της δοκιμασίας βασιστήκαμε στο πρωτόκολλο που περιγράφεται από τον (Balch et al., 1983). Με την διαδικασία που αναφέρθηκε στην προηγούμενη παράγραφο απομονώνονται τα μονοπύρηννα λεμφοκύτταρα από περιφερικό αίμα. Τα κύτταρα τα οποία θέλουμε να ελέγξουμε για CML κυτταροτοξικότητα αποτελούν τον πλυσθισμό των κυττάρων εκτελεστών ενώ τα κύτταρα εναντίον των οποίων θα εκδηλωθεί η κυτταροτοξικότητα αποτελούν τα κύτταρα στόχους. Μετά την απομόνωση των μονοπυρήνων λεμφοκυττάρων ένα μέρος των κυττάρων στόχων ακτινοβολείται σε πηγή κοβαλτίου (3000-3300 rads) ενώ το υπόλοιπο μέρος των κυττάρων στόχων καλλιεργείται παρουσία φυτοαιμοσυγκολλητίνης (PHA) συγκέντρωσης  $1\mu\text{g/ml}$  σε πλάκες καλλιέργειας 24 φρεατίων. Τα ακτινοβολημένα κύτταρα μετρούνται και φέρονται σε πυκνότητα  $1 \times 10^6$  κύτταρα/ml.

Τα κύτταρα εκτελεστές μετρούνται επίσης και φέρονται σε πυκνότητα  $2 \times 10^6$  κύτταρα/ml. Σε πλάκες καλλιέργειας 24 φρεατίων βάζουμε  $1\text{ml}$  ( $= 2 \times 10^6$  κύτταρα) από τον πληθυσμό των κυττάρων εκτελεστών και  $1\text{ml}$  ( $= 1 \times 10^6$  κύτταρα) από τον πληθυσμό των κυττάρων στόχων. Μετά το πέρας των 6 ημερών τα κύτταρα στόχοι είναι νεκρά και συνεπώς στην καλλιέργεια υπάρχουν μόνο τα κύτταρα εκτελεστές τα οποία μετρούνται και φέρονται σε πυκνότητα  $1 \times 10^6$  κύτταρα/ml.

Ένα τμήμα των κυττάρων στόχων, που αναπτύσσεται παρουσία φυτοαιμοσυγκολλητίνης για 6 ημέρες, επωάζονται για 1 ώρα με  $200 \mu\text{Ci Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  στους  $37^\circ\text{C}$ . Κατόπιν της διαδικασίας αυτής τα κύτταρα πλένονται 3 φορές με HBSS στις 1500 rpm για 5 λεπτά. Μετά το πέρας των πλυσιμάτων τα κύτταρα επώαστηκαν για 5 λεπτά στους  $37^\circ\text{C}$  για να γίνει η αυτόματη απελευθέρωση  $^{51}\text{Cr}$ .



Σε πλάκες μικροκαλλιέργειας 96 φρεατίων βάζουμε 100  $\mu\text{l}$  ( $=1 \times 10^5$  κύτταρα/ml) από τον πληθυσμό των κυττάρων εκτελεστών και 100  $\mu\text{l}$  ( $=1 \times 10^4$  κύτταρα/ml) από τον πληθυσμό των κυττάρων στόχων. Επίσης 100  $\mu\text{l}$  ( $=1 \times 10^4$  κύτταρα/ml) από τα κύτταρα στόχους τοποθετούνται με 100  $\mu\text{l}$  πλήρες καλλιεργητικό υλικό με σκοπό τον μετέπειτα προσδιορισμό της αυθόρμητης απελευθέρωσης  $^{51}\text{Cr}$  από τα κύτταρα στόχους. Για τον προσδιορισμό της ολικής ποσότητας δεσμευμένου  $^{51}\text{Cr}$  από τα κύτταρα στόχους, 100  $\mu\text{l}$  ( $=1 \times 10^4$  κύτταρα/ml) από αυτά επωάστηκαν με 100  $\mu\text{l}$  διαλύματος Triton (το οποίο λύει τα κύτταρα). Όλα τα δείγματα τοποθετούνται εις τριπλούν. Οι πλάκες μικροκαλλιέργειας επωάζονται σε κλίβανο  $37^\circ\text{C}$  για 4 ώρες αφού φυγοκεντρηθούν για 5 min σε 500rpm (50xg). Μετά το πέρας των 4 ωρών συλλέγεται 100  $\mu\text{l}$  από κάθε φρεάτιο και η απελευθερωθείσα ραδιενέργεια μετριέται σε μετρητή γ-ακτινοβολίας (PACKARD, Downers Groves, IL). Το ποσοστό της % απελευθερωθείσας ραδιενέργειας υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\% \text{ ειδική απελευθέρωση } ^{51}\text{Cr} = \frac{\text{cpm δείγματος} - \text{cpm αυθόρμητης έκλυσης}}{\text{cpm ολικής ποσότητας} - \text{cpm αυθόρμητης έκλυσης}}$$

### 2.13 NK δοκιμασία.

Για τη μέτρηση της NK κυτταροτοξικότητας απομονώνουμε τα μονοπύρηννα λευκοκύτταρα από το περιφερικό αίμα όπως αναφέρεται σε προηγούμενη παράγραφο. Στη συνέχεια τα μονοπύρηννα λευκοκύτταρα τοποθετούνται σε πλήρη καλλιεργητικό υλικό μετρούνται και φέρονται σε πυκνότητα  $2 \times 10^6$  κύτταρα/ml, και αποτελούν τα κύτταρα εκτελεστές.

Τα κύτταρα της λευχαιμικής σειράς K562 επωάζονται με  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  για 1 ώρα στους  $37^\circ\text{C}$ . Στη συνέχεια πλένονται 3 φορές με HBSS, επαναδιαλύονται σε πλήρες καλλιεργητικό υλικό, μετρούνται και φέρονται σε πυκνότητα  $1 \times 10^5$  κύτταρα/ml. Σε πλάκες μικροκαλλιέργειας 96 φρεατίων βάζουμε 100  $\mu\text{l}$ , ( $=2 \times 10^5$  κύτταρα) από τα κύτταρα εκτελεστές και 100  $\mu\text{l}$



( $=1 \times 10^4$  κύτταρα) από τα κύτταρα. Στη συνέχεια η διαδικασία είναι παρόμοια με αυτή που ακολουθείται στην παραπάνω με τον τελικό προσδιορισμό της NK κυτταροτοξικότητας.

#### **2.14 Συλλογή υπερκείμενων από In vitro καλλιέργειες ΕΜΛΑ και ΝΚ.**

Με την πάροδο 6 ημερών συλλέχθηκαν 150 ml υπερκείμενο από καλλιέργειες ΕΜΛΑ οι οποίες αναπτύχθηκαν όπως αναφέρεται στην αντίστοιχη παράγραφο παρουσία ή απουσία ProTa χωρίς την πρόσθεση ραδιενεργού θυμιδίνης. Επίσης παράλληλα με τις ΝΚ καλλιέργειες για τον προσδιορισμό της ΝΚ κυτταροτοξικότητας δημιουργούνται καλλιέργειες των οποίων τα κύτταρα στόχοι δεν έχουν επωαστεί με  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ . Μετά την πάροδο 4 και 18 ωρών συλλέγεται 150 ml υπερκείμενο. Τα συλλεχθέντα χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό IL-2, PGE-2 όπως θα αναλυθεί παρακάτω.

#### **2.15 In vitro ανοσολογική απάντηση παρουσία Τοξοειδούς του Τετάνου.**

Για τον προσδιορισμό της in vitro ανοσολογικής απάντησης παρουσία τοξοειδούς του τετάνου (T.T.) απομονώθηκαν μονοπύρνα λεμφοκύτταρα (PBMC) με τη διαδικασία που περιγράφεται αναλυτικά σε προηγούμενη παράγραφο (2.6). Στη συνέχεια τοποθετούνται σε πλήρες καλλιεργητικό υλικό μετρούνται και φέρονται στην πυκνότητα των  $3 \times 10^6$  κύτταρα/ml.

Σε πλάκες μικροκαλλιέργειας 96 φρεατίων τοποθετούνται 100 μl ( $=3 \times 10^5$  κύτταρα) από τα PBMC και στη συνέχεια προστίθεται το αντιγόνο TT έτσι ώστε έχει την επιθυμητή τελική συγκέντρωση. Στη συνέχεια οι πλάκες τοποθετούνται σε επωαστικό κλίβανο ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , 95% υγρασία για 7 ημέρες, 18 ώρες πριν τη συμπλήρωση των 7 ημερών προστίθεται 1 μCi θυμιδίνης σε κάθε φρεάτιο. Στο τέλος της καλλιέργειας τα κύτταρα



συλλέγονται από ένα αυτόματο κυτταροσυλλέκτη (DYNATECH) και ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 2.10.

Τα CD4+, CD8+ λεμφοκύτταρα και τα μονοκύτταρα απομονώνονται όπως περιγράφονται αλλού (παράγραφοι 2.9 και 2.7 αντίστοιχα). Οι πληθυσμοί των CD4+ και CD8+ κυττάρων μετρούνται και φέρονται σε πυκνότητα  $1 \times 10^6$  κύτταρα/ml. Ο πληθυσμός των μονοκυττάρων μετρείται και φέρεται σε πυκνότητα  $1 \times 10^6$  κύτταρα/ml. Σε πλάκες 96 φρεατίων τοποθετούνται 100  $\mu$ l ( $10^5$  κύτταρα) από τον πληθυσμό των CD4+ ή των CD8+ και 50  $\mu$ l ( $=0.5 \cdot 10^5$  κύτταρα) από τον πληθυσμό των μονοκυττάρων. Στη συνέχεια προστίθεται το αντιγόνο ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή τελική συγκέντρωση. Οι πλάκες στη συνέχεια τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο επί 7 ημέρες (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% υγρασία) 18 ώρες πριν τη συμπλήρωση των 7 ημερών προστίθεται 1  $\mu$ Ci θυμιδίνης/ φρεάτιο και στη συνέχεια ακολουθείται η παραπάνω εκτεθείσα διαδικασία.

Παράλληλα με την παραπάνω διαδικασία δημιουργούνται και πλάκες μικροκαλλιιεργειών οι οποίες περιέχουν τους συνδυασμούς κυττάρων και αντιγόνου που αναφέρονται παραπάνω. Η διαφορά είναι ότι ο κάθε συνδυασμός επαναλαμβάνεται 7 φορές. Έτσι είναι δυνατόν ανά μία ημέρα να λαμβάνεται υπερκείμενο το οποίο χρησιμοποιείται για τους προσδιορισμούς κυτταροκινών που θα αναφερθούν παρακάτω.

### **2.16 Καλλιέργειες LAK κυττάρων.**

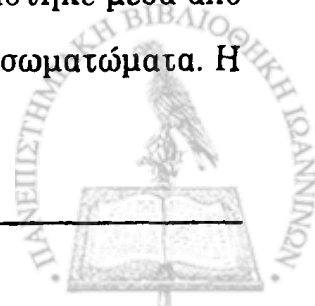
Από περιφερικό αίμα απομονώθηκαν PBMC όπως περιγράφεται παραπάνω μετρήθηκαν και φέρονται σε συγκέντρωση  $2.5-5.0 \times 10^5$  κύτταρα/ml. Προστίθεται ανασυνδυασμένη IL-2 σε τελική συγκέντρωση 1000 U/ml. Η καλλιέργεια των LAK κυττάρων μοιράζεται σε 8 φρεάτια σε πλάκες καλλιέργειας 24 οπών. Στη συνέχεια στο κάθε φρεάτιο προστίθενται ProTa ώστε η συγκέντρωσή της να ανέλθει στους αριθμούς που παρουσιάζονται στα αντίστοιχα πειράματα. Στη συνέχεια οι πλάκες



τοποθετούνται σε επωαστικό κλίβανο (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% υγρασία). Μετά το πέρας των 7 ημερών τα κύτταρα χρησιμοποιούνται για κυτταροτοξικές διαδικασίες όπως αναφέρεται στις αντίστοιχες παραγράφους.

### **2.17 Απομόνωση και καλλιέργεια των TIL.**

Τμήματα συμπαγών όγκων απομόνώνονται κατά τη διάρκεια χειρουργικών επεμβάσεων με άσηπτο τρόπο και τοποθετούνται σε πλαστικό μπουκαλάκι που περιείχε πλήρες καλλιεργητικό υλικό. Στη συνέχεια και μέσα σε χρονικό διάστημα που δεν ξεπερνούσε την 1 ώρα μεταφέρονταν το υλικό από το χειρουργείο στο εργαστήριο όπου και τοποθετείτο σε πλαστικό τρυβλίο Petri όπου και θα ακολουθούσε το πρώτο στάδιο διαχωρισμού των κυτταρικών πληθυσμών. Με τη χρήση στείρων νυστεριών απομακρύνθηκε ο νεκρωτικός και ο λιπώδης ιστός από το τεμάχιο του όγκου. Στη συνέχεια με μηχανικό τρόπο και με τη χρήση λαβίδας και νυστεριού ο όγκος τεμαχίστηκε σε τμήματα πολύ μικρού μεγέθους της τάξης του 1-3 mm<sup>3</sup>. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας απελευθερώθηκαν κύτταρα και συσσωματώματα κυττάρων στο υδατινό εναιώρημα. Τα ινώδη τμήματα που δεν έσπασαν κατά τη διάρκεια της μηχανικής διαδικασίας και που εμπεριείχαν μεγάλο αριθμό κυττάρων υποβλήθηκαν σε ενζυματική επεξεργασία με την προσθήκη 1-2 mgr/ml κολλαγενάσης και 0.2 mgr/ml δεσοξυριβονουκλεάσης. Η επώαση διήρκεσε από 2 ώρες το ελάχιστο μέχρι 16 ώρες το μέγιστο στους 37°C μέχρι την πλήρη διάσπαση των τεμαχιδίων του όγκου και τη μετατροπή τους σε εναιώρημα κυττάρων. Στη συνέχεια το εναιώρημα κυττάρων πλήθηκε σε RPMI 1640 κατόπιν φυγοκέντρησης στις 1500 rpm για 5 λεπτά. Αυτό έγινε για να απομακρυνθούν τα λιπώδη και τα άλλα στοιχεία της ενζυματικής διάσπασης που καθίστανται τοξικά για την κυτταρική καλλιέργεια. Το ίζημα της φυγοκέντρησης επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 1640 rpm και το εναιώρημα κυττάρων φιλτραρίστηκε μέσα από nylon wool για να απομακρυνθούν τα μεγάλα κυτταρικά συσσωματώματα. Η



βιωσιμότητα των κυττάρων ελέγχθηκε και ξεπερνούσε σε κάθε περίπτωση το 80%. Η ταυτοποίηση των μονοπυρήνων από τα καρκινικά κύτταρα έγινε κατά πρώτο λόγο με βάση το μέγεθος και τη μορφολογία τους κατόπιν μικροσκοπικής παρατήρησης. Τα κύτταρα μετρήθηκαν και αραιώθηκαν σε πυκνότητα  $0.25 \times 10^6$  κύτταρα/ml. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε 1 ml/φρεάτιο σε πλάκα 24 οπών. Στα φρεάτια προστέθηκαν 1000 U/ml IL-2 καθώς και ProTa ώστε η συγκέντρωσή της να είναι αυτή που αναφέρεται στα σχετικά σχήματα. Οι πλάκες τοποθετούνται σε επωαστικό κλίβανο ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , 95% υγρασία) για 7 ημέρες. Μετά το πέρας του παραπάνω χρονικού διαστήματος τα κύτταρα χρησιμοποιούνται σε κυτταροτοξική δοκιμασία.

### **2.18 Απομόνωση και καλλιέργεια EAMNC.**

Μετά την αφαίρεση του ασκίτικου ή πλευριτικού υγρού, προστίθεται σε αυτό μικρή ποσότητα ηπαρίνης (10 U/ml) για να εμποδίσει τους μηχανισμούς πήξης να δράσουν. Στη συνέχεια το υγρό φιλτράρεται μέσα από αποστειρωμένη σύριγγα των 50 ml με βαμβάκι για να κατακρατηθούν τα τεμάχια των ιστών και τα μεγάλα συσσωματώματα. Το διηθημένο με αυτό το τρόπο υγρό συλλέγεται σε σωληνάρια των 50 ml όπου και φυγοκεντρείται για 50 λεπτά στις 1500 rpm. Το ίζημα των κυττάρων που προκύπτει μετά το τέλος της φυγοκέντρησης επαναδιαλυτοποιείται σε 10 ml διαλύματος Lymphoprep για το διαχωρισμό των μονοπυρήνων κυττάρων από τα ερυθροκύτταρα. Στη συνέχεια τα μονοπύρηνα κύτταρα που μαζί με τα καρκινικά κύτταρα μένουν στην πάνω στοιβάδα του Lymphoprep μετρούνται και φέρονται στην επιθυμητή συγκέντρωση των  $0.5 \times 10^6$  μονοπυρήνων κυττάρων/ml. Στη συνέχεια η καλλιέργεια των EAMNC γίνεται ακολουθώντας το ίδιο πρωτόκολλο με αυτό των TIL.



### **2.19 Έλεγχος της κυτταροτοξικής δράσης.**

Ο προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης των TIL, EAMNC, LAK κυττάρων έγινε χρησιμοποιώντας, όπως και στην περίπτωση της CML και NK δοκιμασίας, την τεχνική της ειδικής απελευθέρωσης ραδιενεργού χρωμίου ( $^{51}\text{Cr}$ ). Ο έλεγχος αυτός έγινε εναντίον των κυττάρων των καρκινικών σειρών K562, DAUDI, RAJI (κύτταρα στόχοι).

Τα κύτταρα προς έλεγχο της κυτταροτοξικής τους δράσης (κύτταρα εκτελεστές) πλήθυσαν σε πλήρες καλλιεργητικό υλικό, επαναιωρήθηκαν στη συγκέντρωση του  $1 \times 10^6$  κύτταρα/ml και τοποθετήθηκαν ανά 100  $\mu\text{l}$ /φρεάτιο σε πλάκες μικροκαλλιεργειών των 96 οπών με κοίλο πυθμένα.  $10^7$  κύτταρα στόχοι επώαστηκαν σε πλήρες καλλιεργητικό υλικό που περιέχει 100  $\mu\text{Ci}$   $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  για 60 λεπτά στους  $37^\circ\text{C}$ . Μετά το πέρας της επώασης τα κύτταρα στόχοι πλήθυσαν τρεις φορές επαναιωρήθηκαν και επώαστηκαν επί 30 επιπλέον λεπτά ώστε να γίνει η αυτόματη απελευθέρωση  $^{51}\text{Cr}$ . Στη συνέχεια μετρούνται και φέρονται σε πυκνότητα  $1 \times 10^5$  κύτταρα/ml. Η συνέχεια της διαδικασίας είναι όμοια με αυτή που περιγράφηκε στην παράγραφο 2.12 με σκοπό τον υπολογισμό της ειδικής απελευθέρωσης  $^{51}\text{Cr}$ .

### **2.20 Απομόνωση μονοπυρήνων λεμφοκυττάρων από σπλήνα μύος.**

Οι μύς θυσιάζονται και κατόπιν αφαιρούνται οι σπλήνες τους κάτω από άσηπτες συνθήκες. Στη συνέχεια με μηχανική κατεργασία, χρησιμοποιώντας αποστειρωμένους ομογενοποιητές δημιουργούμε ένα εναιώρημα κυττάρων. Ακολούθως φιλτράρουμε το διάλυμα μέσα από σύριγγα η οποία έχει αποστειρωθεί με βαμβάκι με σκοπό να κατακρατηθούν τα ινώδη στοιχεία. Επιστοιβάζουμε το διήθημα πάνω από Lymphoprep και φυγοκεντρούμε στις 1750 rpm για 30 λεπτά. Στη συνέχεια όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.8 συλλέγουμε τον πληθυσμό των μονοπυρήνων λευκοκυττάρων.





**2.21 Συλλογή υπερκείμενων από In vitro καλλιέργειες****σπληνοκυττάρων μυός.**

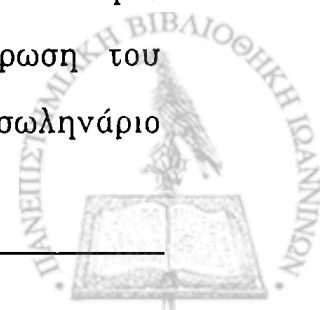
Μετά την απομόνωση των μονοπύρηνων λεμφοκυττάρων από σπλήνα μυός τα κύτταρα μετρούνται και φέρονται σε πυκνότητα  $4 \times 10^6$  κύτταρα/ml. Βάζουμε 5 ml από τα κύτταρα ( $= 2 \times 10^6$  κύτταρα) σε φρεάτια από φιάλες καλλιέργειας των 25 cm<sup>2</sup>. Επίσης προσθέτουμε ProTa ώστε η συγκέντρωση της να είναι 250 ng/ml. Οι φιάλες τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% υγρασία). Μετά το πέρας 3 ημερών συλλέγονται τα υπερκείμενα τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για τη μέτρηση των κυτταροκινών IL-2 και TNFα.

**2.22 Μέτρηση του ποσοστού των σπληνοκυττάρων με ανοσοφθορισμό.**

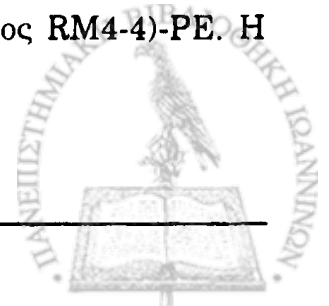
Η μέτρηση του ποσοστού των υποπληθυσμών CD8+, NK+, CD3+ Tac+, CD3+ IA+, γίνεται με ανοσοφθορισμό όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.8. Τα αντισώματα που χρησιμοποιούνται εδώ είναι τα anti, -CD4FITC, -CD8-FITC, -NK-PE, -CD3-FITC, -CD25-PE, -IA<sup>d</sup>-PE (Pharmingen, California).

**2.23 Απομόνωση υποπληθυσμών CD4+ και CD8+ λεμφοκυττάρων από σπληνοκύτταρα μυός.**

Αρχικά πραγματοποιείται η απομόνωση των μονοπυρήνων λεμφοκυττάρων από σπληνοκύτταρα όπως αυτή παρουσιάζεται στην παράγραφο 2.19. Μετά τη διαδικασία αυτή απομονώνονται τα T λεμφοκύτταρα περνώντας τα μονοπύρηννα μέσα από στήλες nylon wool όπως περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 2.11. Στη συνέχεια τα κύτταρα μετρούνται και φέρονται σε πυκνότητα  $15 \times 10^6$  κύτταρα/ml. 70 μl ( $= 1 \times 10^6$  κύτταρα χρησιμοποιούνται για ανοσοφθορισμό με anti CD3FITC όπως περιγράφεται στην παράγραφο). Η ανάλυση έδειξε 96% CD3+. 2 ml από το διάλυμα ( $30 \times 10^6$  κύτταρα) επωάζονται με anti CD4 (κλώνος RM4-5) ώστε η συγκέντρωση του αντισώματος να είναι 10 μg/ml. Η επώαση λαμβάνει χώρα σε σωληνάριο



στους 0°C και διαρκεί 1 ώρα. Με το πέρας της επώασης προσθέτουμε PBS στο σωληνάριο και το φυγόκεντρούμε. Επαναδιαλύουμε το ίζημα με PBS και επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία 2 φορές. Τελικά επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 2 ml PBS/2% FCS. Ταυτόχρονα επικαλύπτουμε τρυβλία Petri με mouse-anti rat IgG 2a. Η τελευταία επώαση λαμβάνει χώρα στους 4°C για 1 ώρα. Μετά το τέλος της μίας ώρας ξεπλένουμε το τρυβλίο Petri με PBS. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 3 φορές. Ακολούθως βάζουμε το διάλυμα των κυττάρων στο τρυβλίο και το επωάζουμε στους 4°C για 1 ώρα. Μετά την πάροδο μίας ώρας συλλέχθηκαν όλα τα μη προσκολλημένα κύτταρα ανακινώντας το τρυβλίο και αναρροφώντας τα προσεκτικά με πιπέτα. Στη συνέχεια προσθέτουμε 2 ml PBS/2% FCS, ανακινούμε προσεκτικά το τρυβλίο και αναρροφούμε το υπερκείμενο, επαναλαμβάνουμε μία φορά ακόμη. Φυγόκεντρούμε τα κύτταρα και τα επαναδιαλύουμε σε πλήρες θρεπτικό υλικό. Στη συνέχεια τα κύτταρα μετρούνται και φέρονται σε πυκνότητα  $2 \times 10^6$  κύτταρα/ml. Σε δύο δείγματα του 1 ml από τα κύτταρα ( $1 \times 10^6$  κύτταρα) γίνεται ανοσοφθορισμός όπως έχει ήδη περιγραφεί σε προηγούμενη παράγραφο (2,22) με anti CD8<sub>b</sub>-FITC και anti CD4 (κλώνος RM4-4)-PE. Η ανάλυση έδειξε ότι τα μη προσκολλημένα κύτταρα είναι σε ποσοστό 96% CD8+ ενώ μόνο 3% είναι CD4+. Τα προσκολλημένα κύτταρα αποκολλώνται από τον πυθμένα του τρυβλίου Petri με μηχανική διεργασία όπως αυτή περιγράφεται στην παράγραφο που αναφέρεται στην απομόνωση μονοκυττάρων (παράγραφος 2.7). Στη συνέχεια το εναιώρημα φυγόκεντρείται στις 1500 rpm για 5 λεπτά. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε PBS/2% FCS και η διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλες 2 φορές. Τελικά τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε πλήρες καλλιεργητικό υλικό, μετρούνται και φέρονται σε πυκνότητα  $2 \times 10^6$  κύτταρα/ml. Σε δύο δείγματα του 1 ml ( $= 1 \times 10^6$  κύτταρα) γίνεται ανοσοφθορισμός όπως έχει ήδη περιγραφεί (παράγραφος 2.5) με anti CD8<sub>b</sub>-FITC και anti CD4 (κλώνος RM4-4)-PE. Η



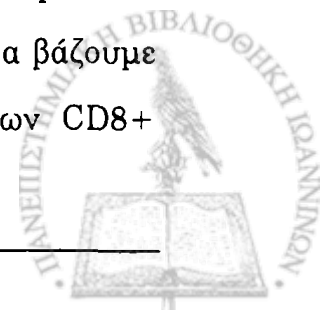
ανάλυση έδειξε ότι τα προσκολλημένα κύτταρα είναι σε ποσοστό 95% CD4+ και περίπου 3% CD8+.

#### **2.24 Απομόνωση NK+ κυττάρων από σπληνοκύτταρα μυός.**

Αρχικά πραγματοποιείται η απομόνωση των μονοπυρήνων λεμφοκυττάρων από σπληνοκύτταρα όπως αυτή παρουσιάζεται στην παράγραφο 2.19. Τα σπληνοκύτταρα μετρούνται και αραιώνονται σε συγκέντρωση  $15 \times 10^6$  κύτταρα/ml. 2 ml από τα κύτταρα ( $=30 \times 10^6$  κύτταρα) επωάζονται με anti-NK 1.1 (κλώνος 3A4) ώστε η τελική συγκέντρωση του μονοκλωνικού αντισώματος να είναι 10  $\mu\text{g/ml}$ , με διαδικασία όμοια αυτής που χρησιμοποιήθηκε για τα CD4+ κύτταρα. Ταυτόχρονα επικαλύπτουμε τρυβλίο Petri με rat-anti mouse IgM όπως αναφέρεται στην προηγούμενη παράγραφο. Ακολουθώντας όμοια διαδικασία με αυτή που ακολουθείται για την απομόνωση των CD4+ κυττάρων απομονώνουμε τα NK κύτταρα σε πλήρες θρεπτικό υλικό. Στη συνέχεια τα κύτταρα μετρούνται και φέρονται σε πυκνότητα  $2 \times 10^6$  κύτταρα/ml. Σε δείγμα του 1ml ( $=1 \times 10^6$  κύτταρα) πραγματοποιείται ανοσοφθορισμός όπως έχει περιγραφεί (παράγραφος 2.22) με NK ειδικό (κλώνος 5E6) αντίσωμα. Η μετέπειτα ανάλυση έδειξε ότι ο πληθυσμός αποτελείται από 92% NK κύτταρα.

#### **2.25 Πολλαπλασιασμός CD4+ ή CD8+ εναντίον καρκινικών σειρών.**

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω η κυτταρική πυκνότητα των υποπληθυσμών των CD4+ και CD8+ λεμφοκυττάρων ρυθμίστηκε στην  $2 \times 10^6$  κύτταρα/ml. Από τις καλλιέργειες των κυτταρικών σειρών λαμβάνουμε  $10 \times 10^6$  κύτταρα από κάθε σειρά. Τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται σε πλαστικά σωληνάρια και στη συνέχεια απενεργοποιούνται κατόπιν ακτινοβολίας σε πηγή κοβαλτίου ( $\gamma$ -ακτινοβολία-7000 rads). Στη συνέχεια τα κύτταρα μετρούνται και αραιώνονται στη συγκέντρωση των  $0.5 \times 10^6$  κυττάρων/ml. Σε πλάκες μικροκαλλιέργειας των 96 φρεατίων με επίπεδο πυθμένα βάζουμε 100  $\mu\text{l}$  είτε από τον πληθυσμό των CD4+ ή τον πληθυσμό των CD8+



κυττάρων και προσθέτουμε 100 μl (=5x10<sup>4</sup> κύτταρα) από τα κύτταρα της αντίστοιχης καρκινικής σειράς. Στη συνέχεια βάζουμε την πλάκα σε επωαστικό κλίβανο (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% υγρασία) για 5 ημέρες, 18 ώρες πριν τη λήψη της καλλιέργειας προσθέτουμε 1 μCi ραδιοσημασμένης θυμιδίνης/φρεάτιο. Μετά το πέρας των 5 ημερών τα κύτταρα συλλέγονται από αυτόματο κυτταροσυλλέκτη (automatic cell harvester, DYNATECH) πάνω σε χαρτί με ίνες γυαλιού (glass fibre paper). Στη συνέχεια ακολουθείται η ίδια διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 2.10 για τη μέτρηση της ενσωματωθείσης ραδιενέργειας.

## **2.26 Ποσοτικός προσδιορισμός της παραγωγής IL-2, IL-4, IL-6, TNFα, IFNγ PGE-2**

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των παραπάνω ουσιών έγινε με την ανοσοενζυματική τεχνική της έμμεσης ELISA-100 μl από κάθε υπερκείμενο καλλιεργείων προς έλεγχο τοποθετήθηκαν σε πλάκες ELISA με 96 φρεάτια στις οποίες είχε προσκολληθεί πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της προς αναζήτησης ουσίας. Τα υπερκείμενα επωάζονται μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και μετά το πέρας της επώασης αδειάζουμε την πλάκα αναποδογυρίζοντάς την και στη συνέχεια ακολουθούν τρία πλυσίματα με PBS - Tween 0.1% για την απομάκρυνση κάθε μη συνδεδεμένου μορίου. Προσθέτουμε 100 μl από το δεύτερο αντίσωμα που έχει βέβαια ειδικότητα για την συγκεκριμένη ουσία. Το αντίσωμα αυτό είναι προσυνδεδεμένο με βιοτίνη και επωάζεται στην πλάκα για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.

Στο τέλος της επώασης ξεπλένουμε τρεις φορές με PBS - Tween 0.1%. Σε κάθε περίπτωση ο χρόνος που μεσολαβεί μεταξύ διαδοχικών πλυσιμάτων δεν πρέπει να υπολείπεται τριών λεπτών. Στη συνέχεια προσθέτουμε 100 μl από το σύμπλοκο στερεπταβιδίνης-υπεροξειδάσης (είναι γνωστή η πολύ μεγάλη συγγένεια της στερεπταβιδίνης με τη βιοτίνη). Επωάζουμε για μισή ώρα σε



θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας της επώασης ακολουθούν πέντε πλυσίματα με PBS - Tween 0.1%.

Επόμενο στάδιο είναι η προσθήκη του χρωμογόνου υποστρώματος της ανοσοαντίδρασης. Σαν χρωμογόνο χρησιμοποιήσαμε το OPD το οποίο το διαλύουμε σε διάλυμα κιτρικών. Μετά τη διάλυση του OPD προσθέτουμε και υπεροξειδίο του υδρογόνου σε τελική συγκέντρωση 0.015%. Επωάζουμε για 10-20 λεπτά, ανάλογα με το πόσο ισχυρό είναι το σήμα που παίρνουμε και τέλος σταματάμε την αντίδραση με την προσθήκη 50  $\mu$ l  $H_2O_42N$ . Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας γίνεται σε ένα ELISA reader στα 420nm. Ολα τα υπερκείμενα μετρήθηκαν εις διπλούν.

### 2.27 Ασθενείς.

Το χρονικό διάστημα Νοεμβρίου 1991 μέχρι και Δεκεμβρίου 1992 σε συνολικό αριθμό 113 ασθενών, εκ των οποίων 50 ήταν άρρενες και 63 με θήλειες με μέσο ηλικίας 56 έτη (από 32 εως 82 ετών) απομονώθηκαν περιφερειακά μονοπύρηννα λεμφοκύτταρα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της EMΛΑ, της NK και της CML κυτταροτοξικότητας. Οι ασθενείς είχαν αναπτύξει ποικίλους τύπους καρκίνου και ανήκαν σε διαφορετικά στάδια όπως αναφέρεται στη σχετική παράγραφο (αποτελέσματα, πίνακες). Ταυτόχρονα μονοπύρηννα απομονώθηκαν και από φυσιολογικούς δότες τα οποία χρησιμοποιήθηκαν σε ανάλογες μελέτες. Τη χρονική περίοδο από Ιανουάριο 1993 εως Ιανουάριο 1994, απομονώθηκαν μονοπύρηννα λεμφοκύτταρα από 12 φυσιολογικούς δότες τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της LAK κυτταροτοξικότητας. Το ίδιο χρονικό διάστημα απομονώθηκαν μονοπύρηννα λεμφοκύτταρα από 21 συμπαγείς όγκους προερχόμενα από αντίστοιχο αριθμό με καρκίνο πνεύμονα (n=3), καρκίνο ωοθήκης (n=1), καρκίνο νεφρού (n=1), μελάνωμα (n=3), καρκίνο μαστού (n=13) και 7 πλευριτικά υγρά προερχόμενα από καρκίνο πνεύμονα. Η ηλικία των ασθενών κυμαινόταν από 27 εως 63 έτη (μέσος όρος



53.7 χρόνια). Κανείς από τους ασθενείς δεν είχε λάβει προεγχειρητικά αντινεοπλασματική θεραπεία. Η μέση διάμετρος των συμπαγών όγκων ήταν  $3.3 \pm 1.97$  cm ενώ ο μέσος όγκος των πλευριτικών υγρών ήταν  $670 \pm 235$  ml. Τα κλινικά στάδια των συμμετεχόντων ασθενών αναφέρονται στις σχετικές παραγράφους.

Για τη σταδιοποίηση χρησιμοποιήθηκε η διεθνής ονοματολογία της Διεθνούς Ένωσης Κατά του Καρκίνου (International Union Against Cancer (UIAC)).

### **2.28 Πειραματόζωα.**

Τους μύς που χρησιμοποιήσαμε, προμηθευτήκαμε από την αποικία πειραματοζώων του Ελληνικού Αντικαρκινικού Ινστιτούτου.

Χρησιμοποιήθηκαν μύς που ανήκαν στο θηλυκό γένος και η ηλικία τους ήταν μεταξύ της 4<sup>ης</sup> και 6<sup>ης</sup> εβδομάδας.

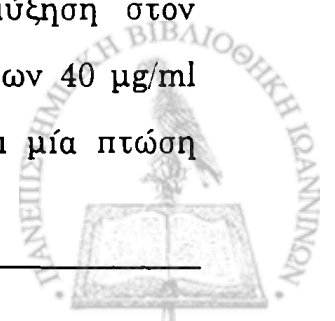


## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### In vitro σύστημα ενεργοποίησης του ανοσολογικού συστήματος παρουσία τοξοειδούς του τετάνου.

Κατά καιρούς έχουν δημοσιευθεί εργασίες όπου δείχνεται ότι τόσο τα CD4+ όσο και τα CD8+ λαμβάνουν ενεργό ρόλο στην επαγωγή και εξέλιξη της ανοσολογικής απάντησης πράγοντας IL-2 (*Singer et al., 1987*). Εν τούτοις όταν σε in vitro δοκιμασίες χρησιμοποιούνται κλασσικά αντιγόνα όπως το τοξοειδές του τετάνου (tetanus toxoid, TT) μόνο ο υποπληθυσμός των CD4+ κυττάρων είναι ικανός να διεγερθεί και να παράγει IL-2 (*Via et al., 1990*). Η απάντηση στο αντιγόνο αυτό περιορίζεται από τα MHC τάξης II μόρια όπου τα CD4+ κύτταρα πρέπει να αναγνωρίσουν το αντιγόνο σε συνδυασμό με "ίδιο" MHC μόριο (MHC self restriction) που παρουσιάζεται από κύτταρα παρουσιαστές του αντιγόνου όπως π.χ. από μονοκύτταρα (*Schmitt et al., 1984*).

Σε μια προσπάθεια να αναλύσουμε τη βιολογική δράση της ProTa σε in vitro συστήματα ενεργοποίησης του ανοσολογικού συστήματος παρουσία διαλυτών πρωτεϊνών που αφορούν κυρίως στο ρυθμιστικό τμήμα της κυτταρικής ανοσίας χρησιμοποιήσαμε το αντιγόνο TT σε καλλιέργειες μονοκυττάρων που προέρχονταν από υγιείς δότες. Το αντιγόνο προστέθηκε στις καλλιέργειες σ' ένα εύρος συγκεντρώσεων με σκοπό να προσδιοριστούν η ιδανική συγκέντρωση του αντιγόνου που θα εξήρθε τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων, καθώς και η συγκέντρωση εκείνη (μη ιδανική) που θα είχε σαν αποτέλεσμα τον ελάχιστο πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων (πίνακας 4). Οι ίδιες συγκεντρώσεις αντιγόνου χρησιμοποιήθηκαν και σε απομονωμένους πληθυσμούς CD4+ και CD8+ κυττάρων σε συνδυασμό με αυτόλογα μονοκύτταρα. Όπως φαίνεται στον πίνακα 4, σταδιακά ανερχόμενες δόσεις TT (5-40 µg/ml) επάγουν μια συνεχή αύξηση στον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων. Κατά την ιδανική δόση των 40 µg/ml παρατηρείται ο μέγιστος πολλαπλασιασμός. Ακολούθως υπάρχει μία πτώση



στον παρατηρούμενη διέγερση όταν αυξάνεται η συγκέντρωση του TT(60-80  $\mu\text{g/ml}$  αντιγόνου). Η ιδανική δόση TT διεγείρει δεκαπλάσιο πολλαπλασιασμό των αμιγών μονοκυττάρων περιφερικού αίματος ενώ η ελάχιστη αύξηση στον πολλαπλασιασμό παρατηρείται στη μη ιδανική συγκέντρωση των 5  $\mu\text{g/ml}$  (η συγκέντρωση των 2  $\mu\text{g/ml}$  δεν είχε κανένα αποτέλεσμα στον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων). Στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκαν καθαρά CD4+ λεμφοκύτταρα σημειώθηκαν ανάλογες παρατηρήσεις με μόνη διαφορά ότι ο πολλαπλασιασμός των CD4+ λεμφοκυττάρων σε σχέση με τις καλλιέργειες που σχηματίστηκαν απουσία TT, παρουσία της ιδανικής συγκέντρωσης TT ήταν πολύ μεγαλύτερος (περίπου 15 φορές σε σύγκριση με την διέγερση απουσία TT ενώ η αντίστοιχη αύξηση που παρατηρήθηκε σε ολικά PBMC ήταν περίπου 10 φορές). Τα CD8+ κύτταρα δεν έδειξαν κανένα πολλαπλασιασμό παρουσία οποιασδήποτε συγκέντρωσης αντιγόνου γεγονός που συμφωνεί με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Via et al., 1990).

Συνεπώς μετά τα όσα εκτέθηκαν παραπάνω γίνεται φανερό ότι στο συγκεκριμένο in vitro σύστημα μελέτης ο πληθυσμός που διεγείρεται και πολλαπλασιάζεται είναι ο υποπληθυσμός των CD4+ κυττάρων ο οποίος παρουσιάζει τη μεγαλύτερη διέγερση στην ιδανική συγκέντρωση των 40  $\mu\text{g/ml}$  και την ελάχιστη διέγερση στη μη ιδανική συγκέντρωση των 5  $\mu\text{g/ml}$ .





**ΠΙΝΑΚΑΣ 4** Πολλαπλασιασμός των κυττάρων απαντητών (cpm) παρουσία ή απουσία ΤΤ.

		ΤΤ $\mu\text{g/ml}$ (τελική συγκέντρωση)						
		0	5	10	20	40	60	80
1.	965	1847	3415	8083	<b>10231</b>	9040	7116	
2.	1123	2054	4834	11897	<b>13371</b>	11125	8563	
3.	965	1712	4520	10721	<b>12435</b>	10158	8153	
4.	884	1612	3145	10594	<b>11582</b>	9168	7241	
5.	1137	2512	7242	11291	<b>12386</b>	9811	7434	
		<b>CD4+</b>						
1.	825	2135	4951	13572	<b>15063</b>	14774	11392	
2.	1047	2448	5263	14803	<b>18362</b>	16836	12185	
3.	1124	2246	5156	14174	<b>17261</b>	15856	11141	
4.	886	1857	4164	13842	<b>15748</b>	14247	12968	
5.	1078	2349	4531	12730	<b>16953</b>	15349	10171	
		<b>CD8+</b>						
1.	929	1193	874	1427	<b>1535</b>	1150	1146	
2.	1048	1495	998	1163	<b>1128</b>	1257	1277	
3.	886	1646	1041	1478	<b>1206</b>	1376	1150	
4.	749	1708	1342	1782	<b>1441</b>	1903	1829	
5.	891	1545	1371	1239	<b>1701</b>	1392	1412	

Σχηματίσθηκαν καλλιέργειες που αποτελούνται από τα προς πολλαπλασιασμό κύτταρα (PBMC ή CD4+ ή CD8+) και από αυτόλογα κύτταρα παρουσιαστές αντιγόνου (§2.15). Απουσία αντιγόνου παρατηρείται μια ελάχιστη διέγερση. Αυξανόμενη συγκέντρωση αντιγόνου προκαλεί μια αύξηση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των PBMC η οποία οφείλεται στον πολλαπλασιασμό των CD4+ κυττάρων ενώ τα CD8+ δεν πολλαπλασιάζονται.



Προηγούμενα πειράματα που έγιναν στο εργαστήριό μας απέδειξαν ότι η ProTa ενισχύει σημαντικά τις λειτουργίες των T κυττάρων *in vitro* επιδρώντας μέσω των μονοκυττάρων (Baxevanis *et al.*, 1987a, Baxevanis *et al.*, 1987b, Baxevanis *et al.*, 1987c, Reclos *et al.*, 1987, Baxevanis *et al.*, 1988, Baxevanis *et al.*, 1989).

Χρησιμοποιώντας το παραπάνω *in vitro* σύστημα διέγερσης των CD4+ με τα μονοκύτταρα παρουσία TT στάθηκε δυνατό να μελετηθεί αναλυτικά η δράση της ProTa σε T λεμφοκυτταρικά συστήματα. Χρησιμοποιήθηκαν CD4+ κύτταρα τα οποία διεγέρθηκαν παρουσία αντιγόνου συγκέντρωσης 40  $\mu\text{g/ml}$  (ιδανική δόση) όπως και παρουσία αντιγόνου συγκέντρωσης 5  $\mu\text{g/ml}$  (μη ιδανική δόση). Σε παράλληλα πειράματα χρησιμοποιήθηκε μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων ProTa. Έτσι μας δόθηκε η δυνατότητα να εξετάσουμε την επίδραση της ProTa τόσο στην περίπτωση της μεγαλύτερης διέγερσης (40  $\mu\text{g/ml}$  TT) όσο και στην περίπτωση της ελάχιστης δυνατής διέγερσης (5  $\mu\text{g/ml}$  TT). Επειδή η μέγιστη βιολογική δράση της ProTa εμφανίζεται σε διαφορετικές δόσεις όταν αυτή εξετάζεται σε διαφορετικούς δότες (Baxevanis *et al.*, 1987b) η ProTa μελετήθηκε σε ένα εύρος σταδιακά αυξανόμενων συγκεντρώσεων (από 15,625 έως 250  $\text{ng/ml}$ ) για κάθε εξεταζόμενο δότη και τα αποτελέσματα ομαδοποιήθηκαν ανάλογα με τη δόση εκείνη της ProTa κατά την οποία επιτεύχθηκε η εκάστοτε μεγαλύτερη βιολογική δράση (ενίσχυση του TT-επαγόμενου πολλαπλασιασμού).

Στον πίνακα 5 παρουσιάζονται τα ομαδοποιημένα αποτελέσματα των πειραμάτων όπου η μεγαλύτερη βιολογική δράση της ProTa παρουσιάστηκε στη δόση των 31.25  $\text{ng/ml}$ . Παρατηρούμε ότι στη συγκεκριμένη συγκέντρωση η αύξηση του πολλαπλασιασμού των CD4+ κυττάρων είναι μέγιστη τόσο όταν η συγκέντρωση του αντιγόνου είναι 40  $\mu\text{g/ml}$  (ιδανική δόση TT: σύστημα I) όσο και όταν είναι 5  $\mu\text{g/ml}$  (μη ιδανική δόση TT: σύστημα II).



Για να εκτιμηθεί το αυξητικό αποτέλεσμα της δράσης της ProTa μελετήθηκε ο λόγος  $\frac{C_{pm} \text{ παρουσία ιδανικής δόσης Προ-α}}{C_{pm} \text{ απουσία Προ-α}}$ , ο οποίος παρουσιάζεται σε παρένθεση στον πίνακα 5.

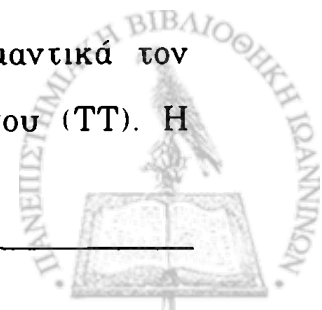
Μια γενική εκτίμηση για την επίδραση της ProTa στα συστήματα I και II μας δείχνει ότι η ProTa παρουσιάζει μεγαλύτερη αυξητική δράση στο σύστημα II. Αναλυτικότερα παρατηρούμε ότι για το σύστημα II ο δείκτης αύξησης λαμβάνει τιμές από 6.1 έως 11.5 ενώ οι τιμές την αύξησης για το σύστημα I είναι 1.6 έως 1.79. Αυτό συμβαδίζει με προηγούμενες μελέτες όπου η ProTa δείχθηκε να έχει εμφανέστερα ενισχυτικά αποτελέσματα σε υπολειπόμενα ανοσολογικά συστήματα ασθενών με ανοσοανεπάρκειες (*Baxevanis et al., 1987b*).

Στατιστικά σημαντικές αυξήσεις στον πολλαπλασιασμό των CD4+ λεμφοκυττάρων εμφανίστηκαν στις συγκεντρώσεις ProTa 62,5 ng/ml ( $p < 0.05$ ), 31,25 ng/ml ( $p < 0.01$ ) και στη συγκέντρωση των 15,625 ng/ml ( $p < 0.01$ ).

Ο πίνακας 6 παρουσιάζει τα αποτελέσματα που εξάγονται στις περιπτώσεις εκείνες που η μέγιστη δράση της ProTa εμφανίστηκε στη δόση των 62.5 ng/ml και αποτελούν σχεδόν το 44% των επιτυχόντων πειραμάτων (7 πειράματα σε σύνολο 16). Η χρησιμοποίηση αυτής της συγκέντρωσης ProTa έχει σαν αποτέλεσμα την ενίσχυση του πολλαπλασιασμού των CD4+ κυττάρων, όπως αυτή καθορίζεται από το δείκτη αύξησης που ορίστηκε παραπάνω, από 1.65 έως 1.82 στην περίπτωση του συστήματος I. Αντίθετα, όπως και στον πίνακα 5 η αύξηση για το σύστημα II κυμάνθηκε από 5 έως 10.2.

Στον πίνακα 7 δείχνονται τα πειράματα όπου η μέγιστη δράση της ProTa παρουσιάστηκε στη δόση των 125 ng/ml (6 πειράματα σε σύνολο 16). Οι παρατηρήσεις είναι ανάλογες με αυτές των προηγούμενων περιπτώσεων όπου στο σύστημα I ο δείκτης αύξησης κυμαίνεται από 1.57 έως 1.72 ενώ στο σύστημα II από 5.23 έως 11.37.

Από τα παραπάνω συνεπάγεται ότι η ProTa αυξάνει σημαντικά τον πολλαπλασιασμό των CD4+ λεμφοκυττάρων παρουσία αντιγόνου (TT). Η



δράση της ProTa αν και φαίνεται σε ιδανικά συστήματα ενεργοποίησης των CD4+ λεμφοκυττάρων (40  $\mu\text{g/ml}$  TT), εν τούτοις είναι πλέον εμφανέστερη σε μη ιδανικά συστήματα (5  $\mu\text{g/ml}$  TT) και ενθαρρύνει σημαντικά την περαιτέρω χρησιμοποίησή της σε ανοσοανεπάρκειες εκδηλούμενες μέσω των CD4+ λεμφοκυττάρων.



**ΠΙΝΑΚΑΣ 5.** Ομαδοποιημένα αποτελέσματα της δράσης της ProTa όπου η μέγιστη αύξηση (cpm) παρατηρήθηκε στη δόση των 31,25 ng/ml.

**CD4+ APC+ TT (40 µg/ml)  
ProTa (ng/ml)**

	CD4+	0 <sup>β</sup>	250	125	62.5	31.25	15.625
Σύστημα I 1.	1241 <sup>α</sup>	19437	22623	25305	32812	34844 (1.79)	33125
2.	861	15745	17368	22337	24753	26351 (1.6)	25496
3.	1164	14324	16341	19459	20165	29921	21178

**CD4+ APC+ TT (5 µg/ml)  
ProTa (ng/ml)**

	CD4+	0 <sup>β</sup>	250	125	62.5	31.25	15.625
Σύστημα II 1.	1241 <sup>α</sup>	2371	3043	4254	9431	14484 (6.1)	10469
2.	861	1513	1976	2864	7129	17493 (11.5)	13852
3.	1164	2214	3716	4013	7804	17873 (8)	10476

α: Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν απουσία TT και ProTa (CD4+ κύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία μόνο αυτολόγων APC)

β: Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν όπως στο α παρουσία TT (40 µg/ml και 30 µg/ml) και διαφορετικών συγκεντρώσεων ProTa.



**ΠΙΝΑΚΑΣ 6.** Ομαδοποιημένα αποτελέσματα δράσης της ProTa όπου η μέγιστη αύξηση (cpm) παρατηρήθηκε στα 62.5 ng/ml.

		<b>CD4+ APC+ TT (40 µg/ml) ProTa (ng/ml)</b>						
		<b>CD4+</b>	<b>0<sup>β</sup></b>	<b>250</b>	<b>125</b>	<b>62.5</b>	<b>31.25</b>	<b>15.625</b>
Σύστημα I	1.	1387 <sup>α</sup>	17168	20349	26178	30389 (1.77)	28712	27104
	2.	879	13472	17457	20265	22348 (1.65)	20162	19158
	3.	1024	12147	14631	17191	21271 (1.75)	20460	19529
	4.	986	14165	15852	19863	22481 (1.58)	21327	20831
	5.	1173	16311	19167	26741	27385 (1.67)	26614	25645
	6.	1518	18721	21284	28157	32181 (1.71)	31192	30861
	7.	1632	19102	23240	30138	34813 (1.82)	33792	31418

		<b>CD4+ APC+ TT (5 µg/ml) ProTa (ng/ml)</b>						
		<b>CD4+</b>	<b>0<sup>β</sup></b>	<b>250</b>	<b>125</b>	<b>62.5</b>	<b>31.25</b>	<b>15.625</b>
Σύστημα II	1.	1387 <sup>α</sup>	2537	14601	18247	21468 (8.5)	17475	16878
	2.	879	1688	12847	14514	17890 (10.5)	16848	13359
	3.	1024	1873	6237	8489	11976 (6.39)	8021	7231
	4.	986	1824	13926	16086	18645 (10.2)	17976	14148
	5.	1173	2326	14224	17516	20374 (8.75)	19485	16743
	6.	1518	2746	5610	8113	15840 (5.76)	11071	9306
	7.	1632	2916	6571	9583	14763 (5)	10954	9812

α: Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν απουσία TT και ProTa (CD4+ κύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία μόνο αυτολόγων APC)

β: Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν όπως στο α παρουσία TT (40 µg/ml και 30 µg/ml) και διαφορετικών συγκεντρώσεων ProTa.



**ΠΙΝΑΚΑΣ 7.** Ομαδοποιημένα αποτελέσματα δράσης της ProTa όπου η μέγιστη αύξηση (cpm) παρατηρήθηκε στα 125 ng/ml.

**CD4+ APC+ TT (40 µg/ml)  
ProTa (ng/ml)**

	CD4+	0 <sup>β</sup>	250	125	62.5	31.25	15.625	
	1.	819 <sup>α</sup>	15297	24345	<b>26320 (1.72)</b>	22743	19360	17018
	2.	735	14496	19876	<b>22748 (1.56)</b>	18161	17147	16252
Σύστημα I	3.	943	12383	18397	<b>19495 (1.57)</b>	17289	16438	14815
	4.	1268	15687	23418	<b>26163 (1.67)</b>	21837	20459	18172
	5.	1472	16345	22151	<b>24675 (1.5)</b>	21546	18577	17269
	6.	1582	19752	30172	<b>33207 (1.68)</b>	28272	26384	22346

**CD4+ APC+ TT (5 µg/ml)  
ProTa (ng/ml)**

	CD4+	0 <sup>β</sup>	250	125	62.5	31.25	15.625	
	1.	819 <sup>α</sup>	1535	10934	<b>16218 (10.5)</b>	14685	9814	6141
	2.	735	1362	14751	<b>15498 (11.37)</b>	13626	10619	1906
Σύστημα II	3.	943	1794	12597	<b>17365 (9.67)</b>	14728	3493	2836
	4.	1268	2408	15233	<b>19276 (8)</b>	16284	13965	8427
	5.	1472	2753	14278	<b>20824 (7.56)</b>	16539	10250	9584
	6.	1582	2947	9073	<b>15435 (5.23)</b>	6169	5892	4365

α: Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν απουσία TT και ProTa (CD4+ κύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία μόνο αυτολόγων APC)

β: Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν όπως στο α παρουσία TT (40 µg/ml και 30 µg/ml) και διαφορετικών συγκεντρώσεων ProTa.

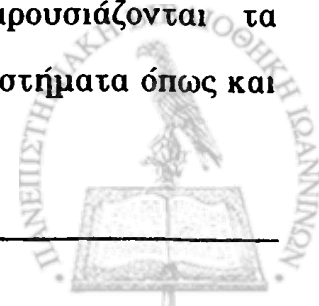


## **Η ProTa εκδηλώνει τη δράση της μέσω της αύξησης των κυτταροκινών IL-2, TNF $\alpha$ και IL-1 $\beta$ .**

Επιδιώκοντας να εμβαθύνουμε στην ανάλυση του τρόπου δράσης της ProTa ερευνήσαμε τους πιθανούς παράγοντες μέσω των οποίων εκδηλώνεται ο πολλαπλασιασμός των CD4+ λεμφοκυττάρων στο συγκεκριμένο *in vitro* σύστημα. Έχοντας υπόψη τη σημασία των κυτταροκινών IL-2, IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  σε παρόμοια *in vitro* συστήματα (Rich E.A. *et al.*, 1993, Marshall J.D. *et al.*, 1993) εξετάσαμε τα επίπεδα αυτών των κυτταροκινών στις *in vitro* καλλιέργειες με TT καθώς και τις μεταβολές της συγκέντρωσής τους παρουσία ProTa.

Στον πίνακα 8 παρουσιάζεται η κινητική μελέτη της παραγωγής IL2. Παρατηρούμε ελάχιστη παραγωγή IL-2 κατά τη συνολική περίοδο των 7 ημερών απουσία αντιγόνου ανεξάρτητα από την παρουσία ή όχι ProTa. Αντίθετα η προσθήκη αντιγόνου έχει σαν αποτέλεσμα την σημαντική αύξηση των επιπέδων IL-2 (ημέρες 3-5) που παρουσία ProTa αυξάνονται ακόμη περισσότερο (135,7 $\pm$ 31,4 pg/ml με 75,3 $\pm$ 13,8 pg/ml παρουσία ή απουσία ProTa αντίστοιχα κατά την τρίτη ημέρα,  $p < 0.01$ ). Γενικά η αύξηση των επιπέδων IL-2 παρουσία ProTa ήταν σημαντική σε όλη τη διάρκεια των καλλιεργειών (σύγκρινε τρίτη και τέταρτη στήλη από αριστερά) με  $p < 0.01$  σε όλες τις περιπτώσεις. Όπως και στα προηγούμενα πειράματα όπου αναλύθηκε η δράση της ProTa στον πολλαπλασιασμό των CD4+ λεμφοκυττάρων, έτσι και εδώ σε καλλιέργειες που σχηματίστηκαν με μη ιδανικές δόσεις η ενισχυτική δράση της ProTa στην παραγωγή IL-2 ήταν ακόμη πιο εμφανής. Έτσι λοιπόν η αύξηση των συγκεντρώσεων της IL-2 στα υπερκείμενα των καλλιεργειών ήταν διπλάσια έως τετραπλάσια εκτός της πρώτης ημέρας ( $p < 0.001$ ).

Παρόμοια μελέτη πραγματοποιήθηκε για την IL-1 $\beta$  που ως γνωστόν παράγεται από τα μονοκύτταρα. Στον πίνακα 9 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της κινητικής μελέτης στα ίδια κυτταρικά συστήματα όπως και





στον πίνακα 8. Τα μέγιστα επίπεδα IL-1β παρουσιάζονται κατά την ημέρα 2 ανεξάρτητα της συγκέντρωσης TT (σύγκρινε τρίτη και πέμπτη στήλη από αριστερά αντίστοιχα). Η προσθήκη ProTa σε αυτές τις καλλιέργειες έχει σαν αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση των επιπέδων IL-1β σε όλες τις ημέρες της καλλιέργειας με την μέγιστη τιμή την ημέρα 2. Έτσι λοιπόν παρουσία της ιδανικής δόσης TT των 40 μg/ml παρατηρήθηκε μία αύξηση των επιπέδων της IL-1β της τάξης του 68.3% έως 95% ( $p < 0.01$ ), ενώ η αύξηση αυτή ήταν πολύ μεγαλύτερη σε καλλιέργειες που σχηματίστηκαν με 5 μg/ml TT (από 260% έως 309%  $p < 0.001$ ).

Ο πίνακας 10 παρουσιάζει την κινητική μελέτη που αφορά το TNFα. Η μέγιστη παραγωγή της κυτταροκίνης σημειώνεται επίσης την ημέρα 2 ανεξάρτητα της συγκέντρωσης του TT (σύγκρινε τρίτη και πέμπτη στήλη από αριστερά). Η προσθήκη ProTa σε αυτές τις καλλιέργειες έχει σαν αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση των επιπέδων του TNFα σε όλες τις ημέρες καλλιέργειας, χωρίς να επηρεαστεί η ημέρα της μέγιστης παραγωγής. Παρουσία της ιδανικής δόσης TT των 40 μg/ml παρατηρήθηκε μία αύξηση των επιπέδων της TNFα που την ημέρα 2 φτάνει το 114% ( $p < 0.05$ ), ενώ η αύξηση αυτή ήταν πολύ μεγαλύτερη σε καλλιέργειες που σχηματίστηκαν με 5 μg/ml TT (από 260% έως 341%  $p < 0.001$ ).

Στους πίνακες 11 και 12 φαίνεται η κινητική που ακολουθούν οι κυτταροκίνες IFNγ (που παράγεται από τα T λεμφοκύτταρα) και IL-6 (που παράγεται από τα μονοκύτταρα). Η μέγιστη συγκέντρωση για την IFNγ παρουσιάζεται την ημέρα 3 ενώ για την IL-6 την ημέρα 2. Η παρουσία της ProTa δεν είχε κανένα αποτέλεσμα στη συγκέντρωση των δύο κυτταροκινών.

Η δράση της ProTa στην παραγωγή των ίδιων κυτταροκινών εξετάστηκε σε ευρύτερο αριθμό ατόμων (πίνακας 13) ούτως ώστε να έχουμε ένα στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα. Χρησιμοποιώντας τα ίδια συστήματα καλλιέργειών αναλύθηκαν τα επίπεδα των IL-2, IL-1β, IFNγ, TNFα, IL-6 κατά την ημέρα



πλέον της μέγιστης παραγωγής τους (βλ. προηγούμενες παραγράφους). Έτσι λοιπόν όπως φαίνεται στον πίνακα 13 η ProTa αυξάνει την παραγωγή της IL-2 (τρίτη ημέρα). Αναλυτικότερα έχουμε  $143.7 \pm 13.7$  με  $85.1 \pm 14.5$  pg/ml IL-2 σε ιδανικές δόσεις TT σε 14 δότες όπου πρέπει να σημειωθεί ότι σημαντική αύξηση σημειώθηκε σε όλους του εξετασθέντες (αύξηση 168%) ενώ όταν η δόση TT ήταν μη ιδανική η αύξηση ήταν 273% (σύγκρινε  $101.3 \pm 23.2$  με  $27.1 \pm 4.8$ ). Η αύξηση για την IL1 $\beta$  ήταν 70% (σύγκρινε  $104.6 \pm 25.2$  με  $61.4 \pm 11.1$ ) σε ιδανική δόση TT, ενώ ήταν 237% (σύγκρινε  $54.1 \pm 10.4$  με  $16.5 \pm 2.1$ ) όταν χρησιμοποιείται μη ιδανική δόση TT. Όσον αφορά την TNF $\alpha$  η αύξησή της ανήλθε σε 65% (σύγκρινε  $108 \pm 25.8$  με  $65.4 \pm 12.5$ ) παρουσία ιδανικής δόσης TT ενώ ήταν 255% (σύγκρινε  $62.9 \pm 15.3$  με  $17.7 \pm 2.9$ ). Τέλος στην περίπτωση της IFN $\gamma$ , IL6 δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή.

Τα μέχρι στιγμής αποτελέσματα δείχνουν ότι η ProTa επάγει την αύξηση της παραγωγής τριών σημαντικών κυτταροκινών που ως γνωστόν έχουν ένα πολυσύνθετο βιολογικό πεδίο δράσης σε ανοσολογικά και μη συστήματα (Baxeuanis and Paramichail, 1994) μεταξύ των οποίων φυσικά είναι και η ενεργοποίηση T λεμφοκυττάρων. Επιπλέον λοιπόν η δια της ProTa επαγόμενη αύξηση της παραγωγής των IL-2, IL-1 $\beta$  και TNF $\alpha$ , σημειώθηκε με την ταυτόχρονη αύξηση του πολλαπλασιασμού των CD4+ λεμφοκυττάρων στα ίδια κυτταρικά συστήματα. Διαπιστώνεται ότι η ProTa δρα στην αύξηση του πολλαπλασιασμού των CD4+ λεμφοκυττάρων έμμεσα διά της αυξημένης παραγωγής των ανωτέρω κυτταροκινών.



**ΠΙΝΑΚΑΣ 8.** Επίπεδα IL-2 (pg/ml) σε κυτταροκαλλιέργειες παρουσία ή απουσία ProTa.

<u>Ημέρες καλλιέργειας</u>	<u>CD4+ APC</u>	<u>CD4+ APC +ProTa</u>	<u>CD4+ APC +TT (40)</u>	<u>CD4+ APC +TT (40) +ProTa</u>	<u>CD4+ APC +TT (5)</u>	<u>CD4+ APC +TT (5) +ProTa</u>
1.	9.7±2.1	11.0±1.1	15.1±2.6	19.2±3.6	13.6±2.2	15.3±2.1
2.	14.1±2.9	18.2±3.7	25.3±5.2	45.1±8.7	17.2±3.1	30.1±5.2
3.	19.3±4.2	2.7±4.8	75.3±13.8	135.7±31.4	22.3±4.2	80.4±183
4.	17.9±3.8	24.3±5.2	70.8±15.2	123.6±26	19.5±3.8	77.2±15.6
5.	15.1±2.8	20.3±4.1	55.7±10.3	101.2±21.3	16.5±2.9	63.8±14.1
6.	10.3±2.0	16.5±3.2	45.2±7.2	75.3±14.8	13.5±2.7	52.4±12
7.	7.5±1.4	12.8±2.5	30.2±5.9	70.6±15.2	11.4±1.7	40.2±8.1

**ΠΙΝΑΚΑΣ 9.** Επίπεδα IL-1β (pg/ml) σε κυτταροκαλλιέργειες παρουσία ή απουσία ProTa.

<u>Ημέρες καλλιέργειας</u>	<u>CD4+ APC</u>	<u>CD4+ APC +ProTa</u>	<u>CD4+ APC +TT (40)</u>	<u>CD4+ APC +TT (40) +ProTa</u>	<u>CD4+ APC +TT (5)</u>	<u>CD4+ APC +TT (5) +ProTa</u>
1.	8.3±1.4	9.6±1.7	40.7±7.7	68.5±18.3	11.3±1.6	42.6±9.6
2.	11.2±1.7	13.1±2.4	56.2±11.8	99.8±27.8	15.1±2.5	61.8±14.6
3.	7.2±1.4	8.9±1.4	32.9±7.6	61.1±15.2	12.4±2.1	44.7±8.8
4.	4.6±0.7	5.1±0.97	24.2±6	47.4±10	8.8±1.4	36.2±7.6
5.	2.2±0.4	3.5±0.6	13.8±3.1	28.1±5.9	5.2±10.8	22.1±3.5
6.			9.6±1.7	17.2±3.1		12.4±1.7
7.				10.5±1.5		6.7±10.8



**ΠΙΝΑΚΑΣ 10.** Επίπεδα TNF $\alpha$  (pg/ml) σε κυτταροκαλλιέργειες απουσία ή παρουσία ProTa.

<u>Ημέρες</u> <u>καλλιέργειας</u>	<u>CD4+</u> <u>APC</u>	<u>CD4+ APC</u> <u>+ProTa</u>	<u>CD4+ APC</u> <u>+TT (40)</u>	<u>CD4+ APC</u> <u>+TT (40)</u> <u>+ProTa</u>	<u>CD4+ APC</u> <u>+TT (5)</u>	<u>CD4+ APC</u> <u>+TT (5)</u> <u>+ProTa</u>
1.	7.1 $\pm$ 1	10.8 $\pm$ 1.9	47.2 $\pm$ 10.3	<b>92.7<math>\pm</math>19.5</b>	12.8 $\pm$ 2.1	<b>53.1<math>\pm</math>9.5</b>
2.	9.7 $\pm$ 1.5	14.5 $\pm$ 2.4	68.7 $\pm$ 14.4	<b>147.6<math>\pm</math>38.4</b>	18.2 $\pm$ 2.9	<b>74.2<math>\pm</math>17.1</b>
3.	5.1 $\pm$ 0.9	9.3 $\pm$ 1.6	51.8 $\pm$ 12.3	<b>112.1<math>\pm</math>30.2</b>	13.9 $\pm$ 1.6	<b>57.3<math>\pm</math>12.6</b>
4.	3.5 $\pm$ 0.5	6.9 $\pm$ 1.2	38.2 $\pm$ 8.7	<b>73.1<math>\pm</math>17.5</b>	10.5 $\pm$ 1.1	<b>46.8<math>\pm</math>9.1</b>
5.		2.4 $\pm$ 0.3	24.5 $\pm$ 5.6	<b>57.3<math>\pm</math>10.8</b>	8.4 $\pm$ 1.2	<b>30.4<math>\pm</math>6.9</b>
6.			12.4 $\pm$ 1.9	<b>31.7<math>\pm</math>6.6</b>	4.1 $\pm$ 0.5	<b>15.2<math>\pm</math>2.4</b>
7.			6.7 $\pm$ 0.7	<b>19.2<math>\pm</math>3.4</b>	2.7 $\pm$ 0.3	<b>8.1<math>\pm</math>0.9</b>
8.			2.1 $\pm$ 0.4	<b>11.9<math>\pm</math>2.2</b>		<b>7.6<math>\pm</math>0.9</b>

**ΠΙΝΑΚΑΣ 11.** Επίπεδα IFN $\gamma$  (pg/ml) σε κυτταροκαλλιέργειες απουσία ή παρουσία ProTa.

<u>Ημέρες</u> <u>καλλιέργειας</u>	<u>CD4+</u> <u>APC</u>	<u>CD4+ APC</u> <u>+ProTa</u>	<u>CD4+ APC</u> <u>+TT (40)</u>	<u>CD4+ APC</u> <u>+TT (40)</u> <u>+ProTa</u>	<u>CD4+ APC</u> <u>+TT (5)</u>	<u>CD4+ APC</u> <u>+TT (5)</u> <u>+ProTa</u>
1.	6.7 $\pm$ 1.1	9.1 $\pm$ 1.3	23.4 $\pm$ 3.7	<b>25.6<math>\pm</math>5.3</b>	9.8 $\pm$ 1.4	<b>11.9<math>\pm</math>1.5</b>
2.	8.7 $\pm$ 1.2	10.4 $\pm$ 1.8	34.1 $\pm$ 6.6	<b>32.7<math>\pm</math>6.8</b>	11.5 $\pm$ 1.8	<b>12.4<math>\pm</math>1.6</b>
3.	12.3 $\pm$ 1.7	13.5 $\pm$ 2.4	42.0 $\pm$ 8.8	<b>45.1<math>\pm</math>9.5</b>	15.2 $\pm$ 1.6	<b>16.4<math>\pm</math>2.1</b>
4.	10.3 $\pm$ 1.6	10.2 $\pm$ 1.5	32.1 $\pm$ 7.3	<b>37.4<math>\pm</math>8.6</b>	10.8 $\pm$ 1.1	<b>13.4<math>\pm</math>2.1</b>
5.	6.4 $\pm$ 1.2	7.1 $\pm$ 1.1	20.5 $\pm$ 3.7	<b>18.6<math>\pm</math>3.1</b>	8.5 $\pm$ 1.5	<b>9.2<math>\pm</math>1.3</b>
6.	3.2 $\pm$ 0.4	3.7 $\pm$ 0.7	13.1 $\pm$ 3.1	<b>13.7<math>\pm</math>2.3</b>	5.7 $\pm$ 0.9	<b>7.2<math>\pm</math>1.1</b>
7.			6.1 $\pm$ 1.2	<b>8.2<math>\pm</math>1.4</b>	3.8 $\pm$ 0.5	<b>5.6<math>\pm</math>0.8</b>



**ΠΙΝΑΚΑΣ 12.** Επίπεδα IL-6 (pg/ml) σε κυτταροκαλλιέργειες απουσία ή παρουσία ProTa.

<u>Ημέρες καλλιέργειας</u>	<u>CD4+ APC</u>	<u>CD4+ APC +ProTa</u>	<u>CD4+ APC +TT (40)</u>	<u>CD4+ APC +TT (40) +ProTa</u>	<u>CD4+ APC +TT (5)</u>	<u>CD4+ APC +TT (5) +ProTa</u>
1.	8.6±1.2	11.4±2.1	48.4±10.1	51.5±10.9	12.7±2.3	11.2±2.1
2.	14.3±1.8	16.1±2.7	72.9±16.7	68.1±14.1	15.2±2.5	17.4±2.7
3.	11.9±1.7	12.4±2.1	41.6±7.8	40.7±7.8	14.3±1.7	16.8±3.1
4.	9.2±1.4	9.2±1.7	31.4±5.6	34.5±6.2	11.9±2.1	10.7±1.6
5.	7.5±0.9	8.1±1.4	29.1±6.1	28.4±5.4	10.8±1.9	8.1±0.9
6.	5.2±0.9	6.8±1.1	21.7±4.1	22.3±4.1	4.5±0.7	6.6±0.7
7.			14.3±2.5	16.2±2.7		

**ΠΙΝΑΚΑΣ 13.** Συνολικά αποτελέσματα από τη δράση της ProTa στα επίπεδα παραγωγής κυτταροκινών (pg/ml) κατά την ημέρα της μέγιστης παραγωγής τους.

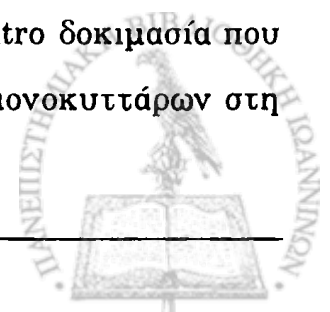
	<u>CD4+ APC +TT (40)</u>	<u>CD4+ APC +TT (40) +ProTa</u>	<u>CD4+ APC +TT (5)</u>	<u>CD4+ APC +TT (5) +ProTa</u>
<b>IL-2</b>	85.1±14.5	143.7±13.7	27.1±4.8	101.3±23.2
<b>IL-1β</b>	61.4±11.1	104.6±25.2	14.5±2.1	54.1±10.4
<b>TNFα</b>	65.4±12.5	108±25.8	17.7±2.9	72.9±15.3
<b>IFNγ</b>	45.9±9.6	48.6±9.8	16.8±3.1	17.9±3.4
<b>IL-6</b>	68.7±14.7	73.7±15.4	16.2±2.4	15.9±2.6



**Ο ασθενείς με καρκίνο παρουσιάζουν ελαττωμένη ΜΛΑ και χαμηλή κυτταροτοξική ικανότητα. Συσχέτιση με τα επίπεδα IL-2 και PGE-2 και δράση της ProTa**

Οι ασθενείς με καρκίνο παρουσιάζουν μία πληθώρα διαταραχών στις λειτουργίες του ανοσοολογικού συστήματος (Α.Σ.) οι οποίες κυρίως αφορούν δυσλειτουργίες των μονοπυρήνων κυττάρων σε συστήματα διέγερσης με ετερόλογα λεμφοκύτταρα καθώς επίσης και μειωμένη κυτταροτοξικότητα των ίδιων κυττάρων εναντίον καρκινικών κυττάρων ή καρκινικών κυτταρικών σειρών. (Anastasopoulos et al., 1992, Monson et al., 1987, Balch et al., 1990, Figarella et al., 1984). Έχει μάλιστα πρόσφατα δειχθεί ότι οι δυσλειτουργίες που παρουσιάζονται στο επίπεδο των κυτταροτοξικών κυττάρων οφείλονται σε μία αυξημένη παραγωγή προσταγλανδίνης E2 (PGE2) από μονοπύρηνα περιφερικού αίματος που οδηγεί στη μειωμένη έκκριση ιντερλευκίνης-2 (IL-2) από πρόδρομα κυτταροτοξικά T κύτταρα και ελαττωμένης έκφρασης των υποδοχέων της IL-2 στα ίδια κύτταρα (Baxevanis et al., 1993b). Σαν αποτέλεσμα αυτού του γεγονότος εμφανίζεται μία ελαττωμένη ικανότητα των NK και LAK κυττάρων να καταστρέφουν καρκινικές κυτταρικές σειρές ή καρκινικά κύτταρα απομονωμένα από όγκους.

Η δημιουργία ώριμων κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων (CTL) απο πρόδρομα τοιάυτα (pCTL) προϋποθέτει την ενεργοποίηση των τελευταίων κατόπιν αναγνώρισης του συγκεκριμένου αντιγόνου (π.χ. ενός καρκινικού αντιγόνου) στην επιφάνεια κυττάρων παρουσιαστών του αντιγόνου (APC) (Melief, 1992). Τα pCTL που αναγνωρίζουν το αντιγόνο σε συνδυασμό με τα μόρια τάξης I του ΜΣΙ ενεργοποιούνται, πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται σε ώριμα CTL που πλέον είναι σε θέση να καταστρέφουν κύτταρα στόχους (π.χ. καρκινικά κύτταρα) που φέρουν στην επιφάνειά τους τον ίδιο συνδυασμό αντιγόνου και μορίου ΜΣΙ (Melief, 1992). Η in vitro δοκιμασία που εξετάζει την κυτταρική συνεργασία μεταξύ των pCTL και μονοκυττάρων στη



δημιουργία των ώριμων CTL εκφράζεται μέσω της ετερόλογης μικτής λεμφοκυτταρικής αντίδρασης (ΕΜΛΑ) όπου τα ώριμα CTL αναγνωρίζουν και καταστρέφουν μονοπύρηνια κύτταρα που εκφράζουν ετερόλογα μόρια τάξης I του ΜΣΙ. Επίσης κατά την ΕΜΛΑ παράγονται ποικίλες ουσίες που τροποποιούν την κυτταροτοξικότητα μεταξύ των οποίων είναι οι IL-2 και η PGE2. Έτσι λοιπόν εξετάσαμε το ρόλο των επιπέδων της PGE2 και IL-2 κατά την ΜΛΑ σαν ανοσοτροποποιητές της. Ένας άλλος διαλυτός παράγοντας που τροποποιεί την ανοσολογική αντίδραση είναι η ProTa. Ειδικότερα σε in vitro μελέτες η ProTa ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων τόσο στην αυτόλογη όσο και στην ετερόλογη ΜΛΑ (Baxevanis et al., 1987, 1988). Επίσης η ανοσοενισχυτική της δράση είναι περισσότερο έντονη σε κυτταρικά συστήματα όπου υπάρχει μια ελαττωμένη ανοσολογική απάντηση όπως στην περίπτωση των αυτοάνοσων νοσημάτων (Baxevanis et al., 1987b, Reclos et al., 1987). Δεδομένης της ανεπάρκειας της συνεργασίας των μονοπύρηνων κυττάρων του Α.Σ. στους ασθενείς με καρκίνο μελετήσαμε την in vitro δράση της ProTa στα παραπάνω υπολειπόμενα κυτταρικά συστήματα και τον τρόπο που επηρεάζει άλλους διαλυτούς παράγοντες όπως την IL-2 και PGE-2.

### Κατάταξη των ασθενών με βάση τον τύπο και το στάδιο της νόσου.

Στον πίνακα 14 παρουσιάζεται ο αριθμός των ασθενών που εξετάστηκαν ανάλογα με τον τύπο του καρκίνου και το στάδιο της νόσου, το οποίο καθορίστηκε με βάση τα κριτήρια της Διεθνούς Ενώσεως Εναντίον του Καρκίνου (International Union Against Cancer (Hossfeld et al., 1990) . Οι καρκινοπαθείς (50 άνδρες και 63 γυναίκες, κατά μέσο όρο ηλικίας 56 ετών) παρουσίαζαν συμπαγείς όγκους και δεν είχαν δεχθεί κάποια αντικαρκινική θεραπεία προηγουμένως. Οι υγιείς δότες που εξετάστηκαν σαν μάρτυρες ήταν 95.



**ΠΙΝΑΚΑΣ 14.** Καρκινοπαθείς που εξετάσθηκαν στην ετερόλογη T-επαγόμενη κυτταροτοξικότητα (CML).

Τύποι καρκίνου	αριθμός ασθενών	Στάδιο			
		I	II	III	IV
Μελάνωμα	18	0	1	8	9
Καρκίνος πνεύμονα	11	0	0	6	5
Καρκίνος παχέος εντέρου	11	0	1	3	7
Καρκίνος μαστού	30	1	2	15	12
Καρκίνος νεφρού	15	0	0	9	6
Καρκίνος ωοθηκών	15	0	1	7	7
Καρκίνος ενδομητρίου	13	0	1	5	7





Επειδή όπως αναφέρθηκε η ΕΜΛΑ αποτελεί μία *in vitro* δοκιμασία που αναπαριστά πιστότερα την *in vivo* κατάσταση του ΑΣ τουλάχιστον όσον αφορά την ικανότητα δημιουργίας CTL εξετάστηκαν στη σειρά αυτών των πειραμάτων αρχικά οι τιμές της ΕΜΛΑ σε καρκινοπαθείς και συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες σε υγιείς δότες. Όπως φαίνεται στον πίνακα 15 οι τιμές της ήταν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερες από αυτές των υγιών δοτών (σύγκρινε  $9215 \pm 2962$  με  $39718 \pm 12215$  αντίστοιχα  $p < 0.01$ ).

Η δράση της ProTa ελέγχθηκε σε ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων ώστε να βρεθεί η ιδανική δόση κατά την οποία παρατηρείται η μεγαλύτερη αύξηση τιμών της ΕΜΛΑ. Όπως παρουσιάζεται στον πίνακα 15 η ProTa ενίσχυσε σημαντικά τις τιμές της ΕΜΛΑ σε καρκινοπαθείς (σύγκρινε  $9215 \pm 2962$  με  $28628 \pm 9019$   $p < 0.01$ ) που ανήλθαν περίπου στο επίπεδο των μαρτύρων (σύγκρινε  $39718 \pm 122125$  με  $28628 \pm 9019$ ,  $p$  μη σημαντικό).

Επίσης μια μικρή αλλά στατιστικά σημαντική αύξηση παρουσιάστηκε και στους υγιείς δότες (σύγκρινε  $54414 \pm 14223$  με  $39718 \pm 12215$   $p < 0.01$ ) που συμβαδίζει με προηγούμενες μελέτες (*Baxevanis et al., 1988*).

Όπως και σε προηγούμενες μελέτες οι ιδανικές δόσεις της ProTa ήταν διαφορετικές μεταξύ των ατόμων που εξετάστηκαν. Έτσι λοιπόν στον πίνακα 16 παρουσιάζεται μία ομαδοποίηση των εξετασθέντων (υγιείς και καρκινοπαθείς) ανάλογα με την ιδανική δόση της ProTa η οποία επέφερε τη μεγαλύτερη αύξηση των τιμών στην ΕΜΛΑ τους. Επειδή ο αριθμός των εξετασθέντων ήταν μεγάλος ( $n=108$  ασθενείς και  $n=95$  υγιείς δότες) και ως εκ τούτου παρουσιάστηκαν πολλές διαφορετικές ιδανικές δόσεις ProTa η ομαδοποίηση έγινε με ενός αυθαιρέτου εύρους ιδανικών δόσεων ProTa (125-500, 550-750, βλ. πίνακα 16).

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν αφ' ενός μία ελαττωμένη λειτουργία του ΑΣ των καρκινοπαθών στη δημιουργία ΚΤΛ που ασφαλώς προδικάζει



υπολειπόμενη κυτταροτοξικότητα και αφ' ετέρου μία ενισχυτική δράση της ProTa στην επαγωγή ισχυρής ΕΜΛΑ και κατά συνέπεια δημιουργίας CTL που ασφαλώς δημιουργεί τις βάσεις για μία δράση αυτού του μορίου στην κυτταροτοξικότητα μονοπυρήνων κυττάρων από καρκινοπαθείς.



**ΠΙΝΑΚΑΣ 15.** Ετερόλογη ΜΛΑ (ΕΜΛΑ) σε υγιείς δότες & καρκινοπαθείς.  
Δράση της ProTa.

<b>Ε.Μ.Λ.Α.</b>				
	cpm - ProTa	cpm + ProTa	Δείκτης αύξησης	Ιδανικό εύρος δόσεων% των ατόμων που απάντησαν στο αντίστοιχο εύρος δόσεων ProTa (ng/ml)
Υγιείς δότες	39718	54414		125-1125 (71%)
n=95	±	±	1.37	1250-2000 (29%)
	12215	14223		
Καρκινοπαθείς	9215	28628		125-1125 (70%)
n=108	±	±	3.10	1250-2000 (30%)
	2962	9019		

Ετερόλογη Μ.Λ.Α. υγιών δοτών και καρκινοπαθών παρουσία ή απουσία ProTa. Σε κάθε πείραμα  $10^5$  T λεμφοκύτταρα απαντητές καλλιεργήθηκαν με  $10^5$  απενεργοποιημένα (3000 rads) μονοκύτταρα (διεγέρτες) από υγιείς δότες. Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα δίνονται σαν μέσος όρος  $\pm$  τυπική απόκλιση. Οι τιμές των κυττάρων απαντητών, καλλιεργημένων χωρίς την παρουσία κυττάρων διεγερτών δεν ξεπέρασαν τα 2500 c.p.m. Ομοίως οι τιμές των κυττάρων διεγερτών καλλιεργημένων χωρίς την παρουσία των αντιδρώντων κυττάρων δεν ξεπέρασαν τα 650 cpm.



**ΠΙΝΑΚΑΣ 16.** Ομαδοποίηση κατανομής ιδανικών δόσεων ανάμεσα στους καρκινοπαθείς και στους υγιείς δότες.

	<b>Ιδανική δόση ProTa</b>	<b>Αριθμός ατόμων</b>	<b>Ποσοστό ατόμων που ανταποκρίθηκαν στο συγκεκριμένο εύρος συγκεντρώσεων ProTa</b>
n = 95	125-500	24	25.2%
	500-750	17	17.8%
	750-1000	12	12.6%
	1000-1250	15	15.7%
	1250-1500	11	11.5%
	1500-1750	10	9.5%
	1750-2000	6	6.3%
n = 108	125-500	28	25.9%
	500-750	19	17.5%
	750-1000	13	12%
	1000-1250	16	14.8%
	1250-1500	18	16.6%
	1500-1750	8	7.4%
	1750-2000	5	4.6%

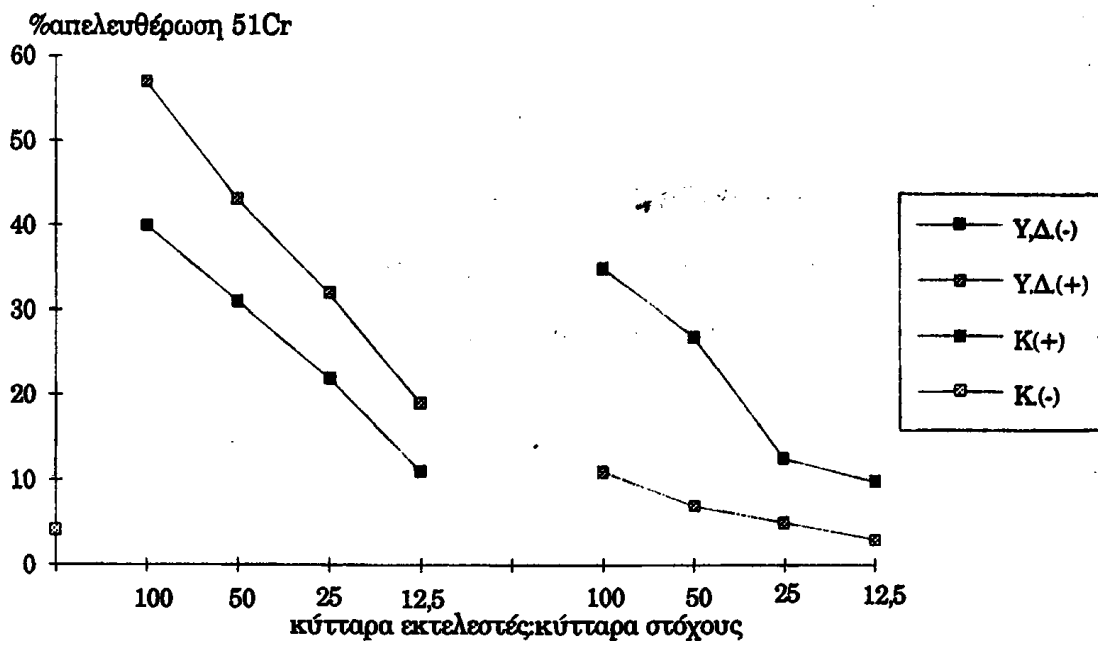


### Ανάλυση της ετερόλογης T εκδηλούμενης κυτταροτοξικότητας (CML) σε υγιείς δότες και καρκινοπαθείς.

Μετά την παραπάνω διαπίστωση σχετικά με την ελαττωμένη ΕΜΛΑ εξετάσθηκε κατά πόσο ή σε ποιό βαθμό επηρεάζεται από τη νόσο η κυτταροτοξικότητα που εκδηλώνεται από τα T κύτταρα (CML). Οι πειραματικές διαδικασίες έδειξαν ότι η CML ήταν μειωμένη στους καρκινοπαθείς όταν αυτοί συγκρίθηκαν με υγιείς δότες.

Έτσι λοιπόν όπως παρατηρείται στο σχήμα 4 η CML σε καρκινοπαθείς ανήλθε μόλις σε  $12 \pm 3.1\%$  (μέσος όρος  $\pm$  τυπική απόκλιση από 6 δότες) ενώ σε 6 υγιείς μάρτυρες αυτή ανήλθε σε  $39.7 \pm 6.8\%$  ( $p < 0.01$ ). Η σχέση αυτή παρατηρήθηκε σε πειράματα όπου η σχέση κυττάρων εκτελεστών:κύτταρα στόχους ήταν 100:1 και διατηρήθηκε και σε μικρότερες αναλογίες (50:1, 25:1, 12.5:1) αποδεικνύοντας ότι η ελαττωμένη CML σε καρκινοπαθείς δεν είναι ένα αποτέλεσμα που επηρεάζεται από τις *in vitro* πειραματικές διαδικασίες αλλά αναπαριστά τη δυσλειτουργία του ΑΣ καρκινοπαθών στο να αναπτύσσει ικανή κυτταροτοξική δράση. Όπως και στην ΕΜΛΑ, η παρουσία ιδανικών δόσεων ProTa (που ελήφθησαν από τα αποτελέσματα του πίνακα 15) ενίσχυσε σημαντικά την CML σε καρκινοπαθείς. Όπως δείχνεται λοιπόν στο σχήμα 4 παρουσία ProTa η CML σε καρκινοπαθείς ανήλθε σε  $36.5 \pm 5.7\%$  (στην αναλογία 100:1 μεταξύ κυττάρων εκτελεστών και κυττάρων στόχων) που είναι παρόμοια αυτής των υγιών δοτών ( $39.7 \pm 6.8$ ). Η δράση της ProTa φάνηκε σε όλες τις υπόλοιπες αναλογίες δηλ. 50:1, 25:1 και 12.5:1 όπου τα επίπεδα της CML σε καρκινοπαθείς ήσαν περίπου ίδια με αυτά των υγιών δοτών.



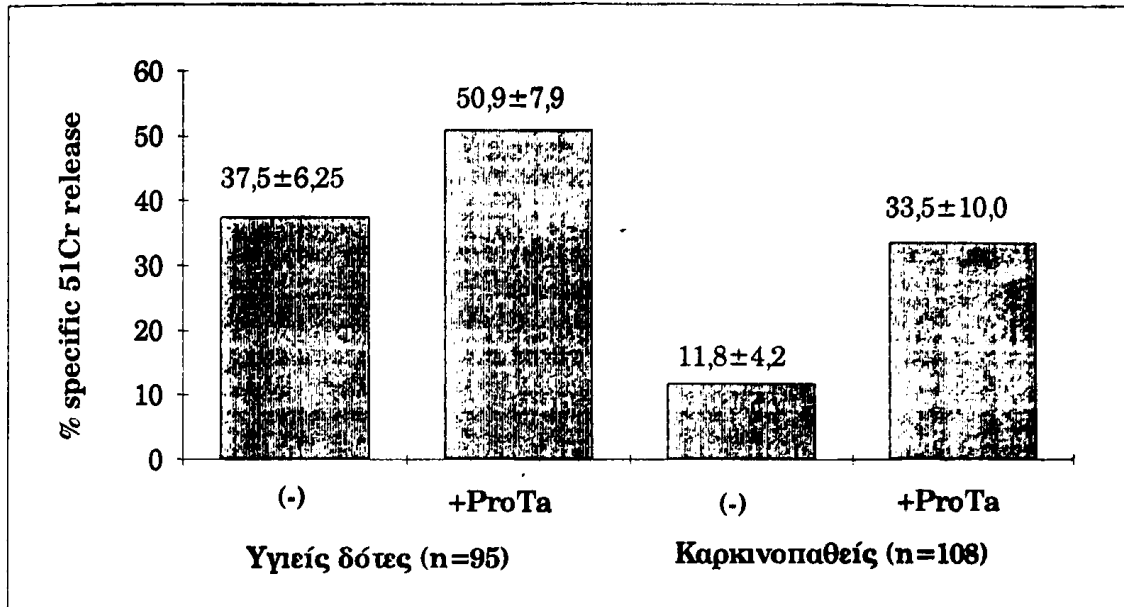


**ΣΧΗΜΑ 4.** Σύγκριση ετερόλογης κυτταροτοξικότητας εναντίον μονοπύρηνων κυττάρων μεταξύ υγιών δοτών και καρκινοπαθών.

Επίσης όπως και στην ΕΜΛΑ, η ProTa ενίσχυσε ακόμη και την CML σε υγιείς δότες όπου όμως η αύξηση ήταν μικρότερη αυτής των καρκινοπαθών (σύγκρινε 56.37±9.8 παρουσία ProTa με 39.7±6.8, δείκτης αύξησης 1.42 με 36.5±5.7% παρουσία ProTa με 12.6±3.6% δείκτης αύξησης 3.04 p<0.01 σε αναλογία 100:1). Τα αποτελέσματα αυτά πιστοποιούν τη σχέση ΕΜΛΑ με την CML όπου φαίνεται ότι και τα δύο συστήματα υπολειτουργούν σε καρκινοπαθείς ενώ αποκαθιστώντας τις τιμές της ΕΜΛΑ με την ProTa αποκαθίστανται και οι τιμές της CML.

Τόσο η ελαττωματική CML σε καρκινοπαθείς όσο και η ενισχυτική δράση της ProTa στις τιμές της CML δείχθηκε σε μία εκτενέστερη μελέτη όπου εξετάστηκαν συνολικά 108 ασθενείς και 95 υγιείς μάρτυρες. Τα αποτελέσματα που δείχνονται στο σχήμα 5 επιβεβαιώνουν αυτά των προηγούμενων (σχήμα 4): η CML στους ασθενείς ήταν σημαντικά ελαττωμένη σε σύγκριση με υγιείς δότες (11.8±4.2%, 37.5±6.25% αντίστοιχα, p<0.01). Παρουσία ProTa αυτή ανήλθε σε 33.5±10.0 που ήταν περίπου στα ίδια επίπεδα των υγιών δοτών ενώ και στους υγιείς δότες επήλθε μία αύξηση παρουσία ProTa (50.9±7.9%, 37.5±6.25% p<0.1). Για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η αναλογία 100:1 μεταξύ κυττάρων εκτελεστών και κυττάρων στόχων και δείχνονται στην ιδανική συγκέντρωση της ProTa για κάθε δότη (βλ.πίνακα 15).





**ΣΧΗΜΑ 5** Ετερόλογη C.M.L. ενεργότητα των μονοπύρηνων κυττάρων από υγιείς δότες και από καρκινοπαθείς παρουσία ή απουσία ProTa.

Η ProTa προστίθεται στην αρχή της καλλιέργειας στην ιδανική συγκέντρωση κάθε φορά όπως αυτή καθορίζεται από τις καλλιέργειες της E.M.L.A. Τα μονοπύρηννα κύτταρα από τους υγιείς δότες και από τους καρκινοπαθείς διεγέρθηκαν κατά τη διάρκεια 6 ημερών καλλιέργεια με ακτινοβολημένα κύτταρα από 2 υγιείς δότες για να αποφευχθεί μια πιθανή ομοιότητα των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας. Κάθε σημείο αναπαριστά την κυτταροτοξικότητα των μονοπύρηνων κυττάρων κάθε ατόμου εναντίον των ακτινοβολημένων κυττάρων στόχων.

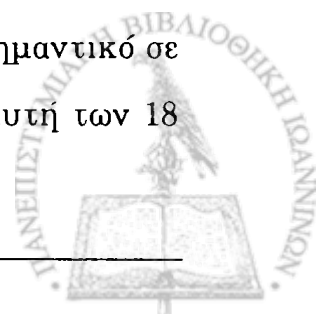
Για την εξαγωγή των παραπάνω αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η αναλογία μονοπύρηννα κύτταρα:κύτταρα στόχους 100:1.



### Σύγκριση της NK ενεργότητας που εκδηλώνεται από καρκινοπαθείς και υγιείς. Δράση της ProTa.

Σε αντίθεση με την CML όπου τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν το αντιγόνο μαζί με τα μόρια της τάξης I του ΜΣΙ στην επιφάνεια των κυττάρων στόχων (O Bourke et al., 1990) τα NK κύτταρα καταστρέφουν τα κύτταρα στόχους μη ειδικά δηλ. χωρίς να αναγνωρίζουν τα μόρια του ΜΣΙ (Trincheri, 1989). Για το λόγο αυτό η άμυνα που εκδηλώνεται από τα NK κύτταρα θεωρείται σαν "πρώτη γραμμή άμυνας" αφού τα NK κύτταρα για να καταστρέψουν κύτταρα-στόχους δεν χρειάζεται να έχουν προηγουμένως ενεργοποιηθεί ή προκύψει από τη διαφοροποίηση πρόδρομων κυττάρων [όπως π.χ. τα CTL που προκύπτουν από τα pCTL (βλ. ανωτέρω) (Melief, 1992)] . Γνωρίζοντας λοιπόν ότι η CML είναι ελαττωμένη σε καρκινοπαθείς ήταν λογικό να ελεγχθεί η κυτταροτοξικότητα που εκδηλώνεται από NK κύτταρα (NK κυτταροτοξικότητα [σχήμα 6]). Για τον καθορισμό της NK κυτταροτοξικότητας χρησιμοποιήθηκε η καρκινική σειρά K562. Ο ιδανικός καθορισμός της αναλογίας κύτταρα εκτελεστές:κύτταρα στόχοι έγινε σε προκαταρκτικά πειράματα όπου βρέθηκε ότι η ζητούμενη αναλογία ήταν 20:1.

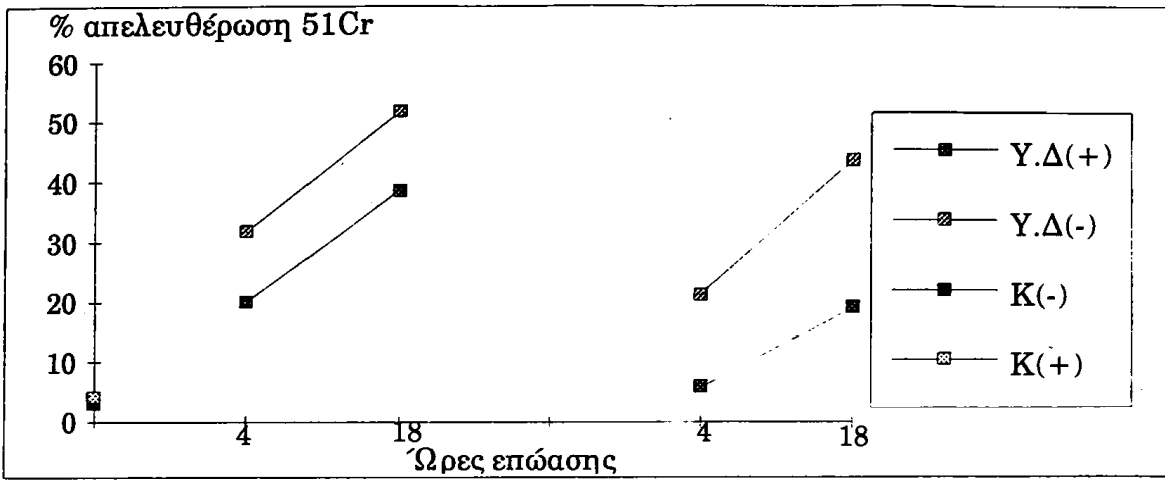
Όπως δείχνεται στο σχήμα 6 η NK κυτταροτοξικότητα σε καρκινοπαθείς (n=108) ήταν σημαντικά χαμηλότερη αυτής των υγιών δοτών (n=95) ανεξάρτητα με τον χρόνο επώασης που χρησιμοποιήθηκε κατά την διάρκεια των πειραμάτων. Έτσι λοιπόν όταν τα κύτταρα εκτελεστές επώασθηκαν με τα κύτταρα στόχους για 4 ώρες η NK κυτταροτοξικότητα σε ασθενείς ήταν  $5.2 \pm 2.5\%$  ενώ στους υγιείς ήταν  $20.1 \pm 3.3\%$  ( $p < 0.01$ ). Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα που εξήχθησαν και στις 18 ώρες επώασης:  $18.9 \pm 3.8\%$  σε ασθενείς και  $38.7 \pm 5.6\%$  σε υγιείς ( $p < 0.05$ ). Παρουσία ProTa η NK κυτταροτοξικότητα των 4 ωρών σε ασθενείς ανήλθε στα επίπεδα του  $21.3 \pm 2.5\%$  (p μη σημαντικό σε σύγκριση με το  $20.1 \pm 3.3\%$  της κυτταροτοξικότητας σε υγιείς και αυτή των 18



ωρών ανήλθε σε  $43.5 \pm 6.9\%$  υψηλότερο του  $38.7 \pm 5.6\%$  των υγιών δοτών αλλά στατιστικά μη σημαντικό). Όλα τα αποτελέσματα του σχήματος 6 δείχνονται με τις εκάστοτε ιδανικές δόσεις της ProTa όπως προέκυψε από προηγούμενα πειράματα, με τους ίδιους ασθενείς, που δείχνονται στον πίνακα 15.

Παρατηρούμε λοιπόν ότι και στην NK κυτταροτοξικότητα η ProTa δρά βιολογικά αυξάνοντας τις χαμηλές τιμές των καρκινοπαθών στα επίπεδα των υγιών δοτών. Πρέπει να σημειωθεί επίσης ότι όπως και στην EMΛΑ και CML (βλ. ανωτέρω), έτσι και στην NK κυτταροτοξικότητα η ProTa έδειξε βιολογική δράση και στους υγιείς δότες όπου τα επίπεδα κυτταροτοξικότητας των 4 ωρών ανήλθαν  $31.8 \pm 5.8\%$  ( $p < 0.2$  σε σύγκριση με  $20.1 \pm 3.3\%$  χωρίς ProTa) ενώ αυτά των 18 ωρών ανήλθαν σε  $51.6 \pm 6.3\%$  ( $p < 0.2$  σε σύγκριση με  $38.7 \pm 5.6\%$  χωρίς ProTa).





**ΣΧΗΜΑ 6** Σύγκριση NK κυτταροτοξικότητας μεταξύ υγιών δοτών και καρκινοπαθών.

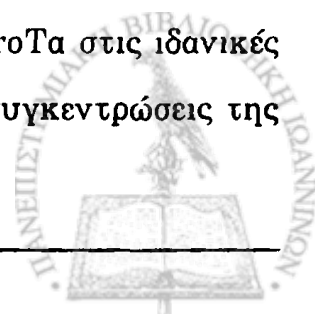
Δράση της ProTa.



**Εμμεσος μηχανισμός δράσης της ProTa.**

Μετά την διαπίστωση ότι η ProTa δρά ενισχυτικά τόσο στην CML όσο και στην NK ενεργότητα προσπαθήσαμε να εμβαθύνουμε στο μηχανισμό δράσης της. Τα βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με τις πειραματικές δοκιμασίες που ακολουθήθηκαν έδειχναν ότι PGE<sub>2</sub> που παράγεται από τα μονοκύτταρα κύτταρα (MNC) αναστέλλει την παραγωγή IL-2 (*Rappaport and Dodge, 1982*) και αυτό έχει αρνητικό αποτέλεσμα στην ΜΛΑ (*Chouaib et al., 1985*). Επιπλέον η PGE<sub>2</sub> έχει δειχθεί να επιδρά αρνητικά στην NK κυτταροτοξικότητα (*Rappaport and Dodge, 1982*) αντίθετα με την IL-2 που ρυθμίζει θετικά τις κυτταροτοξικές διαδικασίες (*Wagner et al., 1986*). Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω καθώς και ότι τα CTL προκύπτουν από την ΕΜΛΑ (άρα οι κυτταρονίνες όπως IL-2 και PGE<sub>2</sub> που επηρεάζουν τη ΜΛΑ και κατά συνέπεια επηρεάζουν και τη δημιουργία των CTL), μετρήσαμε τα ποσά της IL-2 και PGE<sub>2</sub> σε υπερκείμενα τόσο NK καλλιέργειών όσο και ΕΜΛΑ παρουσία ή απουσία ProTa και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 17.

Για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν επτά καρκινοπαθείς και επτά υγιείς δότες και η προσθήκη της ProTa έγινε στις ιδανικές συγκεντρώσεις όπως αυτές καθορίστηκαν προγενέστερα (πίνακας 15). Οι τιμές της συγκέντρωσης της PGE<sub>2</sub> σε καρκινοπαθείς τόσο για την ΕΜΛΑ όσο και για τις NK καλλιέργειες (4 και 18 ωρών) ήταν αυξημένες (298, 43, 176 Pg/ml αντίστοιχα) σε σχέση με αυτές των υγιών δοτών (63, 7, 26 Pg/ml). Αντιθέτως τα επίπεδα της IL-2 ήταν ελαττωμένα στις καλλιέργειες των MNC από καρκινοπαθείς (4.3, 0.3, 1.5 U/ml για ΕΜΛΑ και NK 4 και 18 ωρών αντίστοιχα) σε σχέση με αυτά σε υγιείς δότες (15.6, 1.2, 5.2 U/ml αντίστοιχα). Τα παραπάνω αποτελέσματα δικαιολογούν τόσο τις χαμηλές τιμές της ΕΜΛΑ (που έχει σαν συνέπεια ελαττωμένη CML ενεργότητα) όσο και τις χαμηλές τιμές της NK ενεργότητας. Όταν σε ανάλογες καλλιέργειες προστέθηκε ProTa στις ιδανικές δόσεις (πίνακας 2), υπήρξε μιά σημαντική ελάττωση στις συγκεντρώσεις της



$\text{PGE}_2$  στις καλλιέργειες των MNC από καρκινοπαθείς: από 298  $\text{pg/ml}$  σε 76  $\text{pg/ml}$  στην ΕΜΛΑ ( $p < 0.01$ ) από 43  $\text{pg/ml}$  σε 15  $\text{pg/ml}$  σε NK καλλιέργειες 4 ωρών ( $p < 0.001$ ) και από 176  $\text{pg/ml}$  σε 39  $\text{pg/ml}$  σε NK καλλιέργειες 18 ωρών ( $p < 0.01$ ). Η ελάττωση αυτή της  $\text{PGE}_2$  συνοδεύτηκε από αύξηση των αντίστοιχων συγκεντρώσεων της IL-2: από 43 U/ml σε 10.8 U/ml στην ΕΜΛΑ ( $p < 0.01$ ) από 0.3 U/ml σε 1.1 U/ml σε NK καλλιέργειες των 4 ωρών και από 1.5 U/ml σε 3.9 U/ml ( $p < 0.005$ ) σε NK καλλιέργειες 18 ωρών. Σε όλες τις περιπτώσεις τα επίπεδα των IL-2 και  $\text{PGE}_2$  σε καλλιέργειες καρκινοπαθών παρουσία ProTa δεν διέφεραν στατιστικά με αυτά των υγιών δοτών. Επίσης, αξίζει να αναφερθεί ότι και εδώ η ProTa αύξησε τα επίπεδα της IL-2 και μείωσε αντίστοιχα της  $\text{PGE}_2$  στους υγιείς δότες, πράγμα που εξηγεί την ενισχυτική της δράση στην ΕΜΛΑ, CML και NK κυτταροτοξικότητα σε καλλιέργειες MNC από τους ίδιους δότες. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η ελαττωμένη κυτταροτοξικότητα σε καρκινοπαθείς, οφείλεται στην αυξημένη παραγωγή  $\text{PGE}_2$  στις *in vitro* καλλιέργειες, η οποία επιφέρει μια ταυτόχρονη πτώση των επιπέδων της IL-2 ελαττώνοντας τις κυτταροτοξικές λειτουργίες των MNC (δηλ. CML και NK κυτταροτοξικότητα).



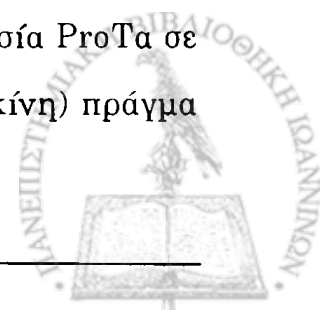
**ΠΙΝΑΚΑΣ 17.** Μέτρηση της IL-2 και της PGE-2 σε καλλιέργειες των ΕΜΛΑ και κατά τη διάρκεια της ΝΚ κυτταροτοξικότητας.

	Απουσία ProTa						Παρουσία ProTa					
	PGE-2 (pg/ml)			IL-2 (U/ml)			PGE-2 (pg/ml)			IL-2 (U/ml)		
	ΕΜΛΑ	NK	NK	ΕΜΛΑ	NK	NK	ΕΜΛΑ	NK	NK	ΕΜΛΑ	NK	NK
		4	18		4	18		4	18		4	18
	298	43	176	4.3	0.3	1.5	76	15	39	10.8	1.1	3.9
<u>Καρκινοπαθείς</u>	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
n = 7	76	15	67	1.9	0.1	0.6	23	6	16	3.7	0.3	1.6
	63	7	26	15.6	1.2	5.2	41	4	9	22	1.9	7.5
<u>Υγιείς δότες</u>	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
n = 7	17	2	5	3.9	0.3	2.0	8	2	3	7.3	0,7	2.9



### Σύγκριση μεταξύ της δράσης της ProTa, IL-2, ινδομεθακίνης στην NK κυτταροτοξικότητα και στη CML.

Τα παραπάνω δεδομένα μας οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η αυξημένη παραγωγή της PGE-2 και η ελαττωμένη παραγωγή της IL-2 είναι υπεύθυνος για την ελαττωμένη NK και CML ενεργότητα που εκδηλώνουν τα μονοπύρρηνα και ότι η ProTa επαναφέρει τις παραπάνω συγκεντρώσεις στα φυσιολογικά επίπεδα. Χρησιμοποιήσαμε ινδομεθακίνη, η οποία καταστέλλει τη σύνθεση της PGE<sub>2</sub> (Rappaport and Dodge, 1982) και συγκρίναμε το αποτέλεσμα της δράσης της, με αυτή της ProTa και της IL-2 οι οποίες ως γνωστόν αυξάνουν την κυτταροτοξική ικανότητα των MNC. Τα αποτελέσματα της σύγκρισης αυτής απεικονίζονται στον πίνακα 18. Επιπλέον μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις της PGE<sub>2</sub> και της IL-2 στα υπερκείμενα των καλλιέργειών. Ταυτόχρονα ελαττώθηκε, ως ήταν αναμενόμενο, η παραγωγή της PGE<sub>2</sub> σε NK καλλιέργειες 4 ωρών (52 pg/ml παρουσία ProTa και 13 pg/ml παρουσία ινδομεθακίνης από 139 pg/ml σε καλλιέργειες απουσία των δύο αυτών παραγόντων) και στις CML καλλιέργειες (από 205 pg/ml σε 89 pg/ml και 27 pg/ml παρουσία ProTa ή ινδομεθακίνης αντίστοιχα). Ταυτόχρονα με την ελάττωση της PGE<sub>2</sub> παρουσία ProTa ή ινδομεθακίνης αυξήθηκαν τα επίπεδα της NK (46.9% και 40.3% παρουσία ProTa και ινδομεθακίνης αντίστοιχα από 17.3% απουσία αυτών  $p < 0.01$ ) και CML κυτταροτοξικότητας (29.7% και 24.7% παρουσία ProTa και ινδομεθακίνης αντίστοιχα από 13.5% απουσία αυτών  $p < 0.01$ ). Παρατηρείται ότι αν και η ινδομεθακίνη ελαττώνει δραστικότερα τα επίπεδα της PGE<sub>2</sub> σε σύγκριση με την ProTa (σύγκρινε 13 pg/ml και 27 pg/ml σε NK κυτταροτοξικότητα και CML αντίστοιχα παρουσία ινδομεθακίνης με 52 pg/ml και 89 pg/ml αντίστοιχα παρουσία ProTa,  $p < 0.05$ ) εν τούτοις η αύξηση της κυτταροτοξικότητας παρουσία ProTa είναι μεγαλύτερη σε σύγκριση με αυτήν παρουσία ινδομεθακίνης (46.9% και 29.7% σε NK και CML παρουσία ProTa σε σύγκριση με 40.3% και 24.7% στις ίδιες καλλιέργειες με ινδομεθακίνη) πράγμα



που υποδηλώνει ότι η αυξημένη παραγωγή PGE<sub>2</sub> στις καλλιέργειες των MNC από καρκινοπαθείς δεν είναι ο μοναδικός παράγοντας για την ελαττωμένη κυτταροτοξικότητα. Το χαμηλό ποσοστό επαναφοράς της κυτταροτοξικότητας παρουσία IL-2 ίσως να σχετίζεται με αδυναμία των κυττάρων των καρκινοπαθών να δεσμεύσουν την IL-2 (πιθανόν να εκφράζουν χαμηλά επίπεδα υποδοχέων για την IL-2).





**ΠΙΝΑΚΑΣ 18.** Η ProTa βελτιώνει την NK και την ετερόλογη T-επαγόμενη κυτταροτοξικότητα (CML) σε καρκινοπαθείς μέσω της αύξησης των επιπέδων της IL-2 και ταυτόχρονα την ελάττωση των αντιστοιχών της PGE-2.

<u>NK κυτταροτοξικότητα</u> (n=5)	Απελευθέρωση <sup>51</sup> Cr(%)	PGE <sub>2</sub> (pg/ml)	IL-2 (U/ml)
-	17.3±6.7	139±56	1.9±0.7
ProTa	46.9±10.3	52±15	3.9±1.0
IL-2	24.6±7.2	119±27	-
Ινδομεθακίνη	40.3±9.7	13±6	4.2±0.9
<u>CML</u> (n=5)			
-	13.5±3.6	205±39	6.0±1.7
ProTa	29.7±6.9	89±30	13.6±3.7
IL-2	17.9±5.6	182±42	-
Ινδομεθακίνη	24.7±6.7	27±7	13.9±2.5

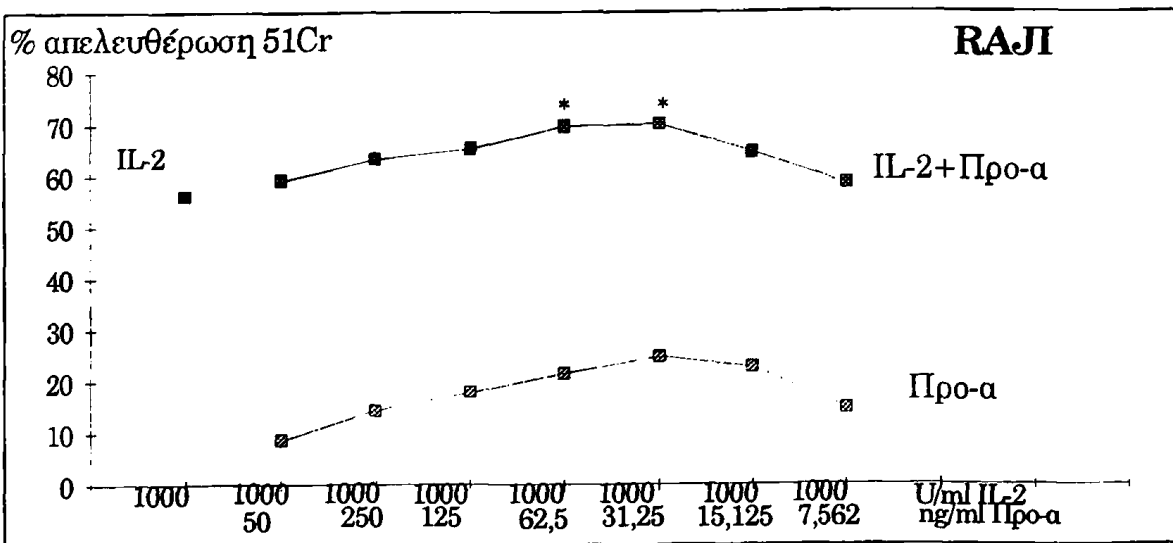
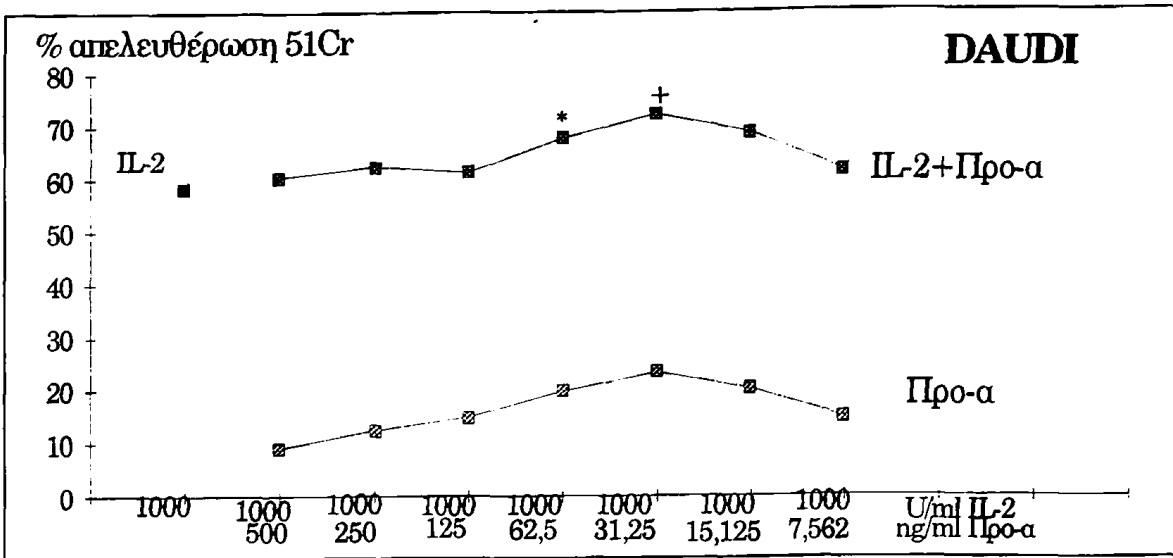
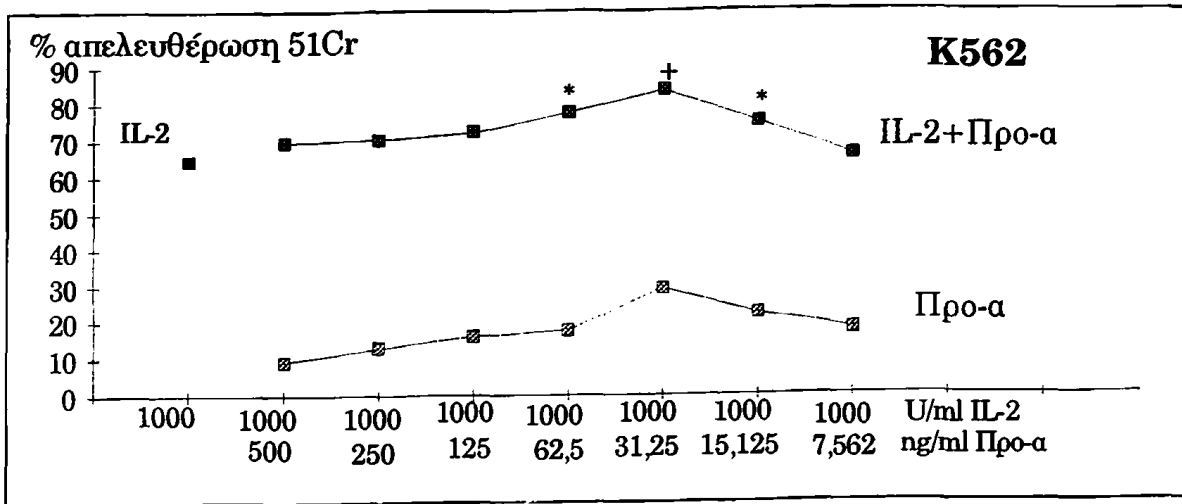


**Συnergιστική δράση της ProTa και IL-2 στην ενίσχυση της κυτταροτοξικότητας των TIL και EAMNC.**

Στις προηγούμενες παραγράφους δείχθηκε η ενισχυτική δράση της ProTa στην κυτταροτοξικότητα λεμφοκυττάρων (T και NK) περιφερικού αίματος σε υγιείς και καρκινοπαθείς. Ήταν λοιπόν εύλογο να ερευνηθεί κατά πόσο η ProTa θα ασκούσε παρόμοια βιολογική δράση σε T λεμφοκύτταρα που διηθούν όγκους (TIL) ή κακοήθεις συλλογές (EAMNC) αφού όπως αναφέρθηκε ήδη στην εισαγωγή (§1.13) αυτά τα T λεμφοκύτταρα δείχνουν ειδικότητα για αυτόλογα καρκινικά κύτταρα και θεωρούνται σαν τα πλέον κατάλληλα για ανοσοθεραπευτικά πρωτόκολλα σε κλινικές δοκιμασίες.

Τα αποτελέσματα από συνολικά 21 εξετασθείσες περιπτώσεις TIL δείχνονται αναλυτικά στα σχήματα 7 έως 27. Επιμέρους εξετάστηκε η κυτταροτοξική δράση των TIL από καρκίνο πνεύμονα (n=3), καρκίνο νεφρού (n=1), καρκίνο ωοθήκης (n=1) μελάνωμα (n=3), καρκίνο μαστού (n=13). Τα στάδια των διαφόρων καρκίνων ήταν: στάδιο II (n=3), στάδιο III (n=7), στάδιο IV (n=11). Η ProTa αύξησε σε στατιστικά σημαντικά επίπεδα τη δια της IL-2 επαγόμενη κυτταροτοξικότητα σε TIL. Η δράση της ProTa παρατηρήθηκε σε όλες τις εξετασθείσες περιπτώσεις (n=21), όπου όπως και σε ανωτέρω περιγραφόμενα πειράματα η ιδανική ενισχυτική δράση της ProTa επιτεύχθηκε σ' ένα εύρος συγκεντρώσεων που ήταν: 31.25 ng/ml (n=4), 62.5 ng/ml (n=11), 125 ng/ml (n=6). Τα ποσοστά αύξησης κυμάνθηκαν από 13% (σε μια περίπτωση ήταν 9%) έως 69.5% και δεν συσχετίστηκαν με τον τύπο καρκίνου ή το στάδιο της νόσου.

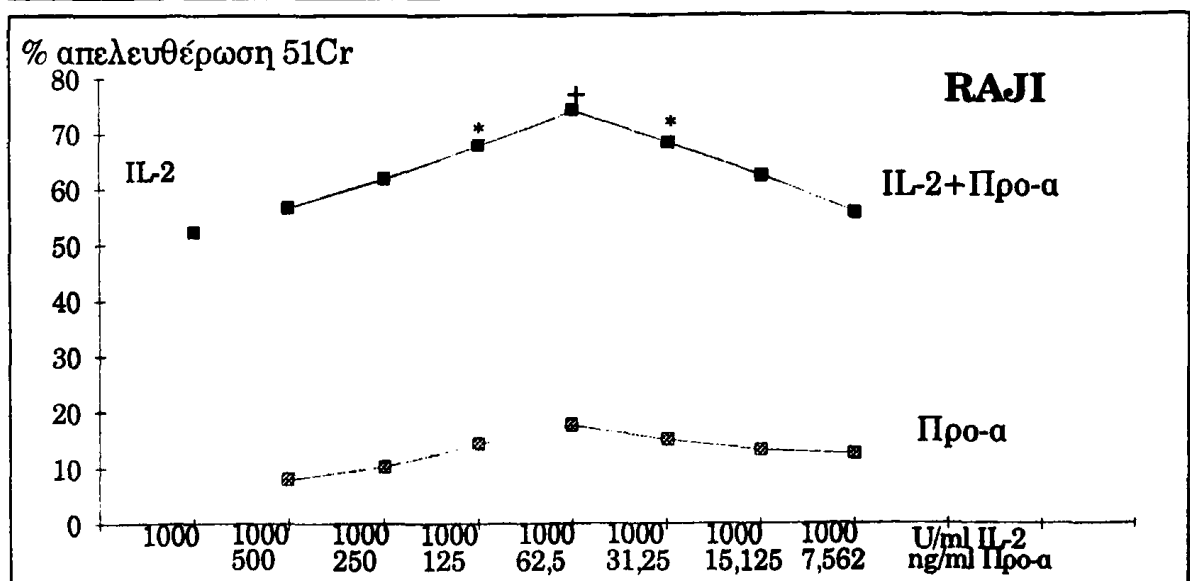
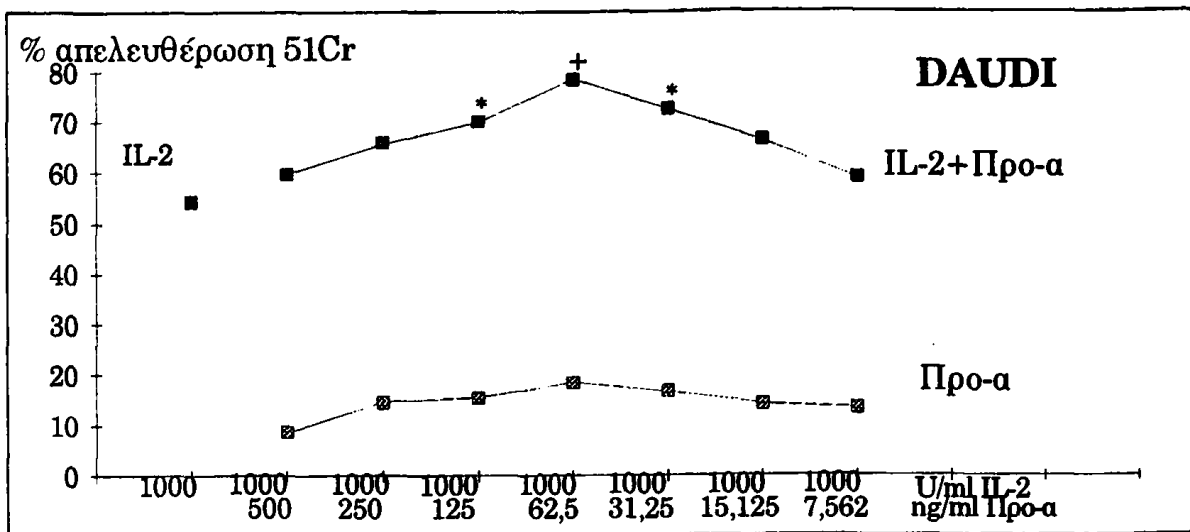
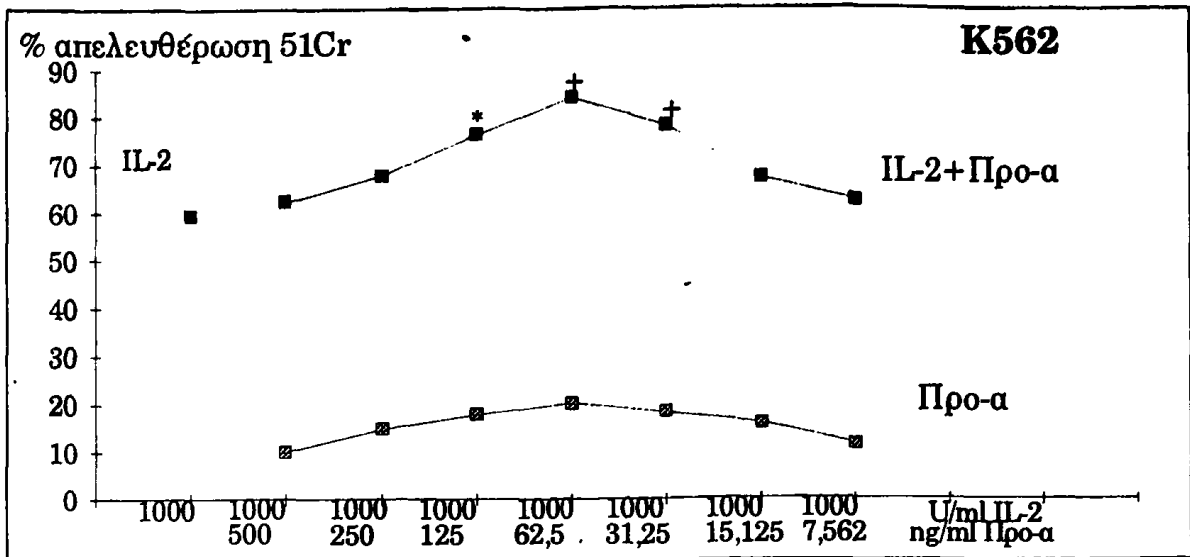




+: P<0.01  
 \*: P<0.05

**ΣΧΗΜΑ 7.** Κυτταροτοξική δράση των TIL έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών. Δράση της Προ-α. Περίπτωση #(No) 1: Ca πνεύμονα. Στάδιο IV.



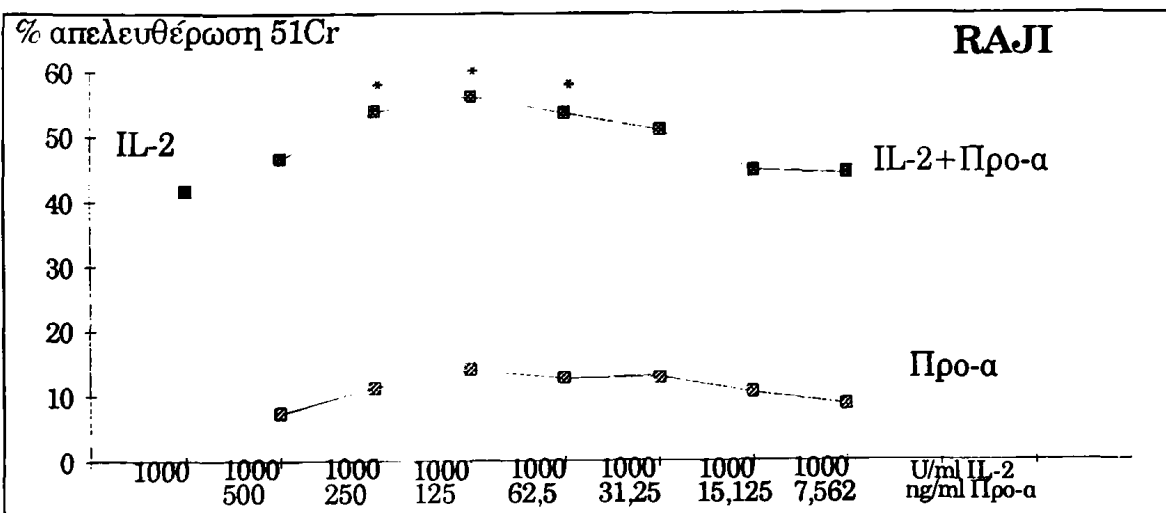
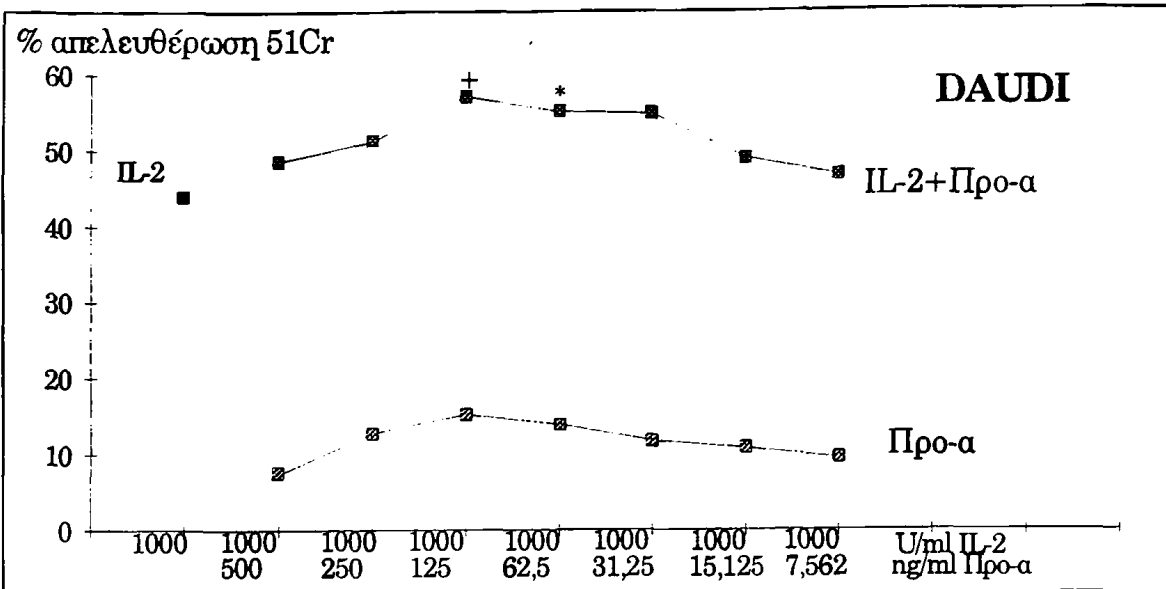
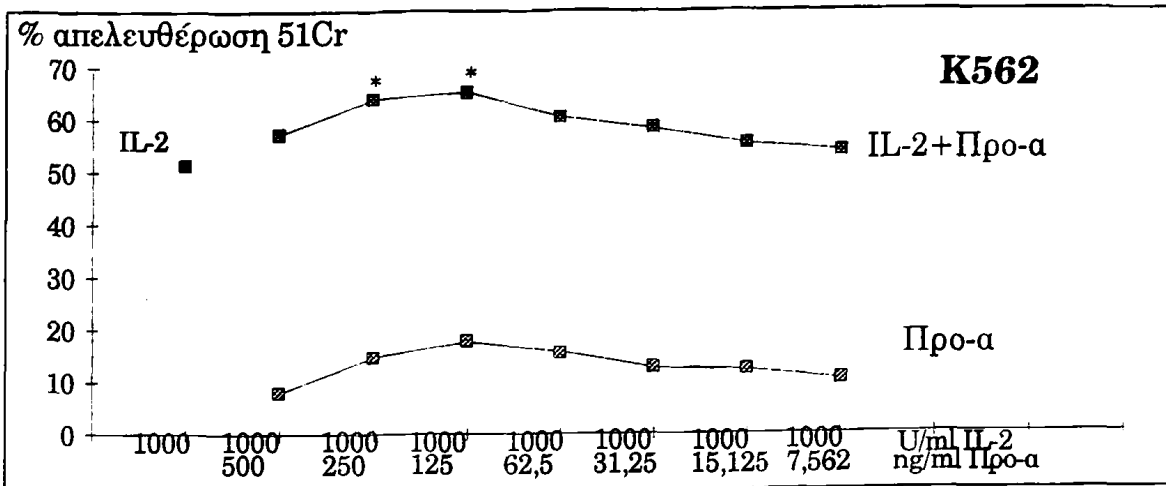


+ :  $P < 0.01$

\* :  $P < 0.05$

**ΣΧΗΜΑ 8.** Κυτταροτοξική δράση των TIL έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών. Δράση της Προ-α. Περίπτωση # (No) 2: Ca πνεύμονα. Στάδιο III.

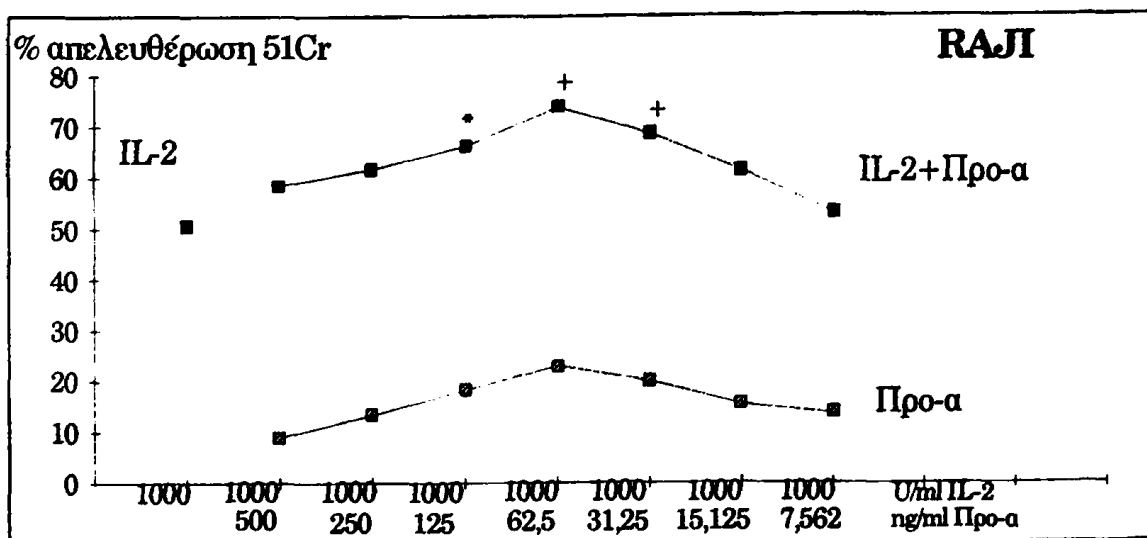
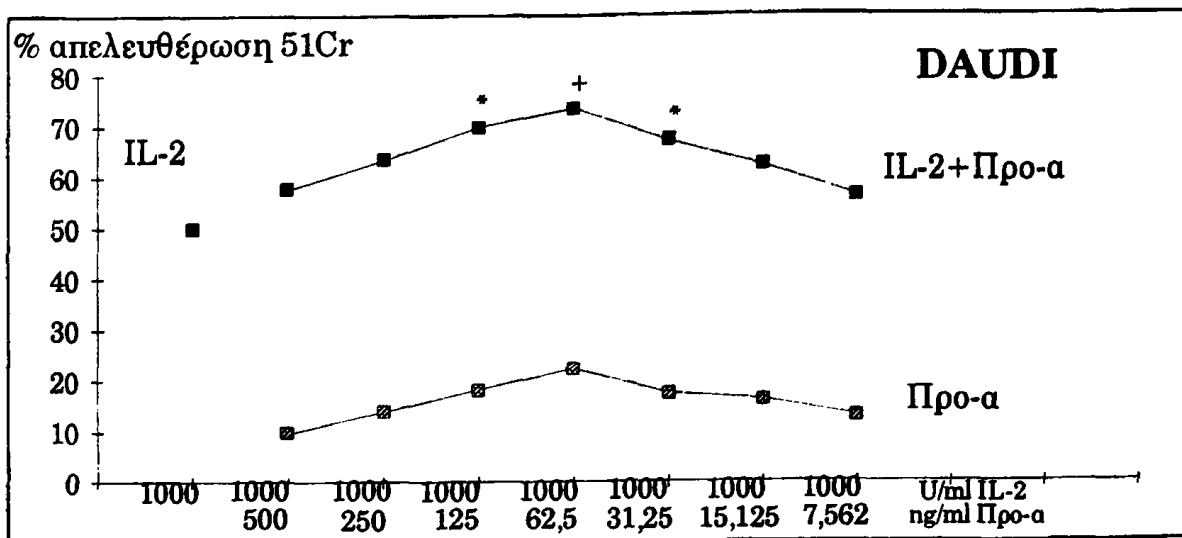
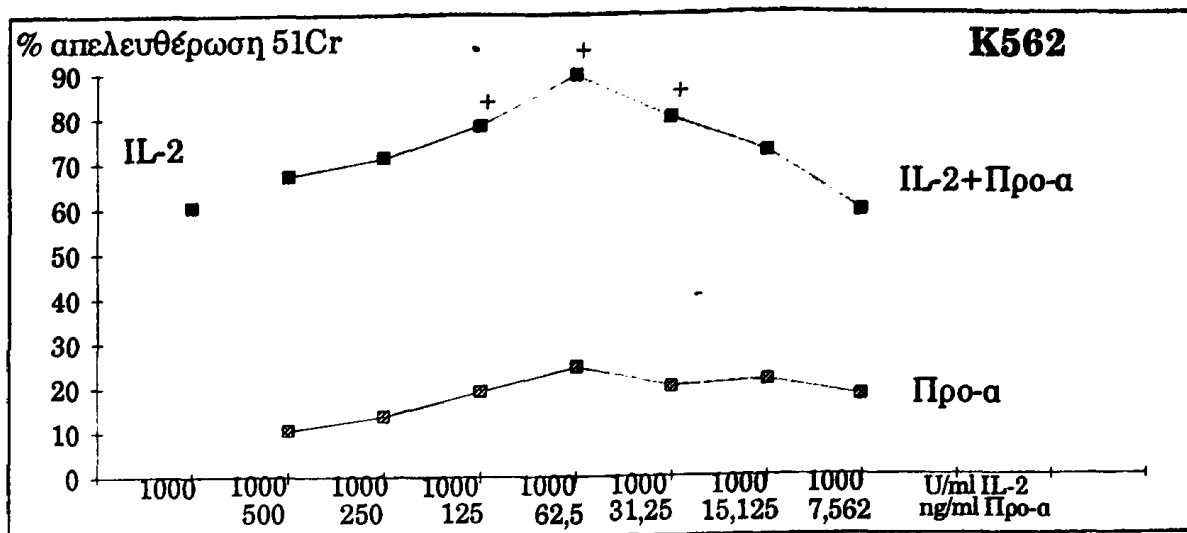




+:  $P < 0.01$   
 \*:  $P < 0.05$

**ΣΧΗΜΑ 9.** Κυτταροτοξική δράση των TIL έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών. Δράση της Προ-α. Περίπτωση # (No) 3: Ca πνεύμονα. Στάδιο III.

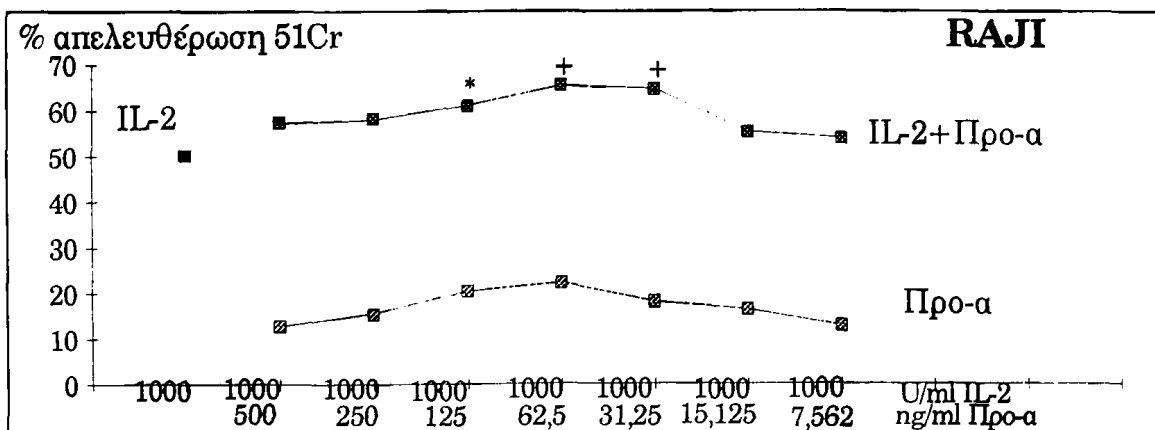
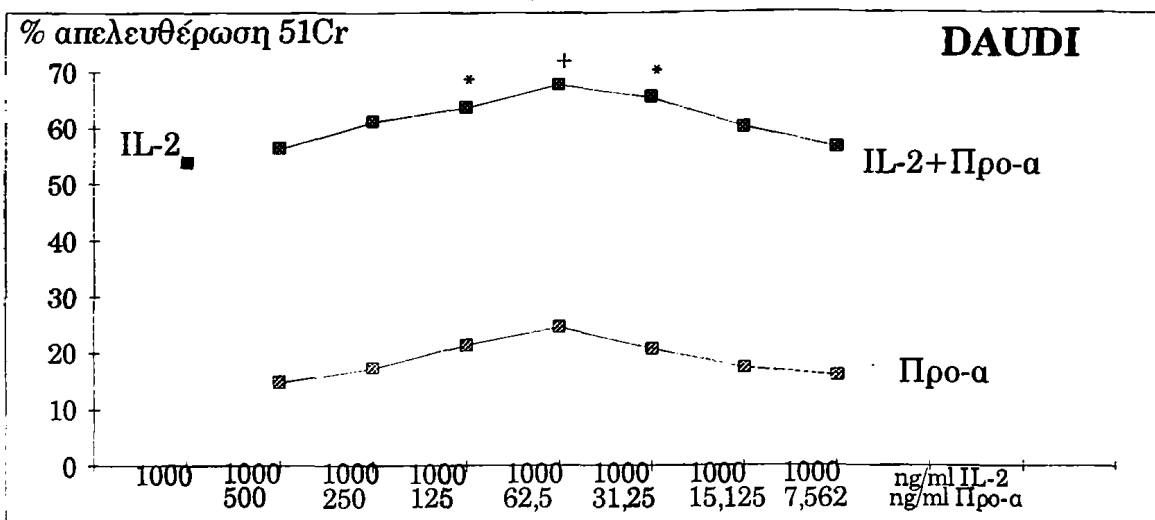
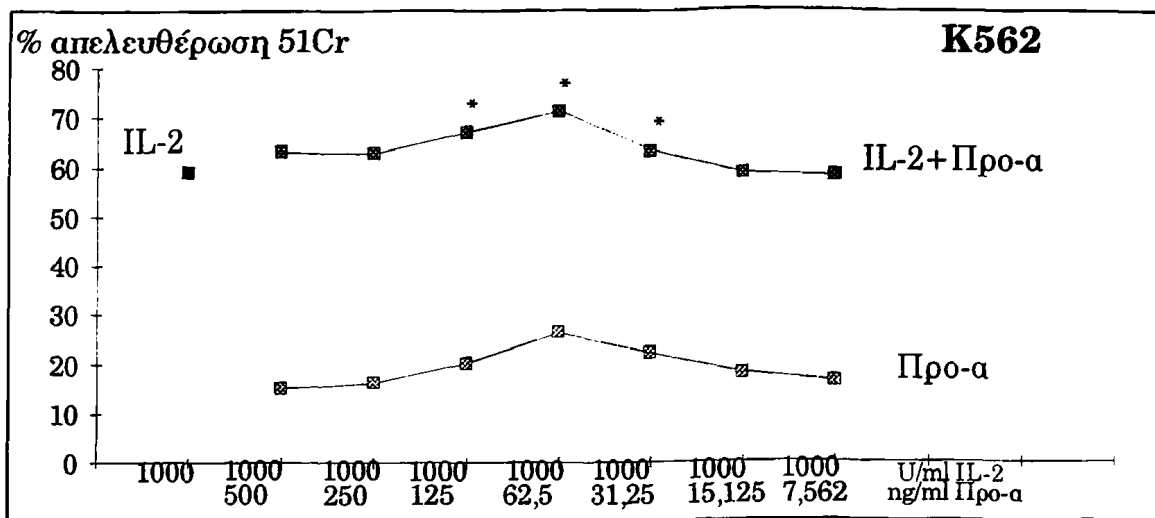




+ :  $P < 0.01$   
 \* :  $P < 0.05$

**ΣΧΗΜΑ 10.** Κυτταροτοξική δράση των TIL έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών. Δράση της Προ-α. Περίπτωση #(No) 4: Ca ωοθήκης. Στάδιο II.



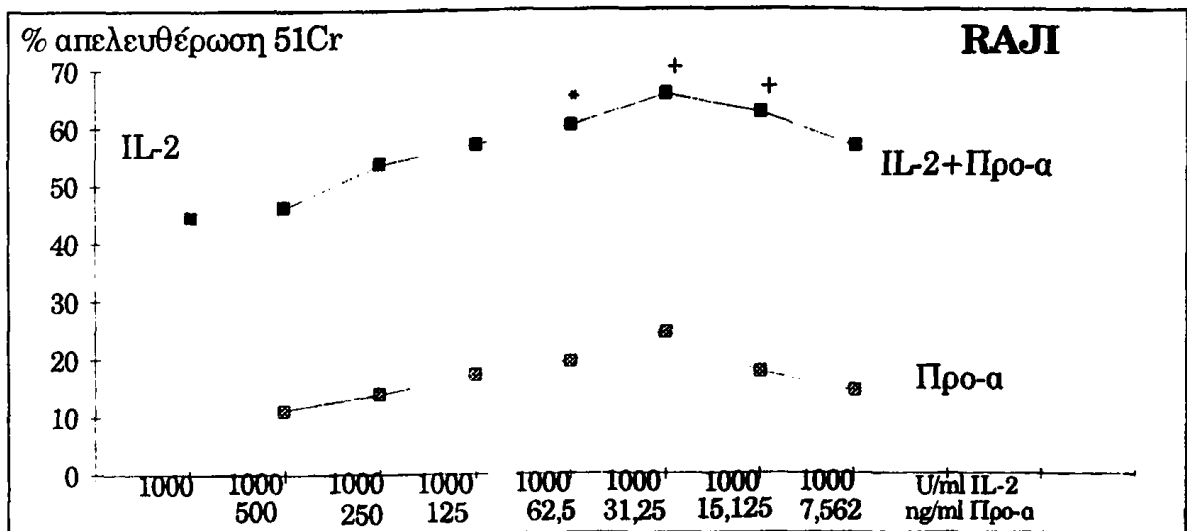
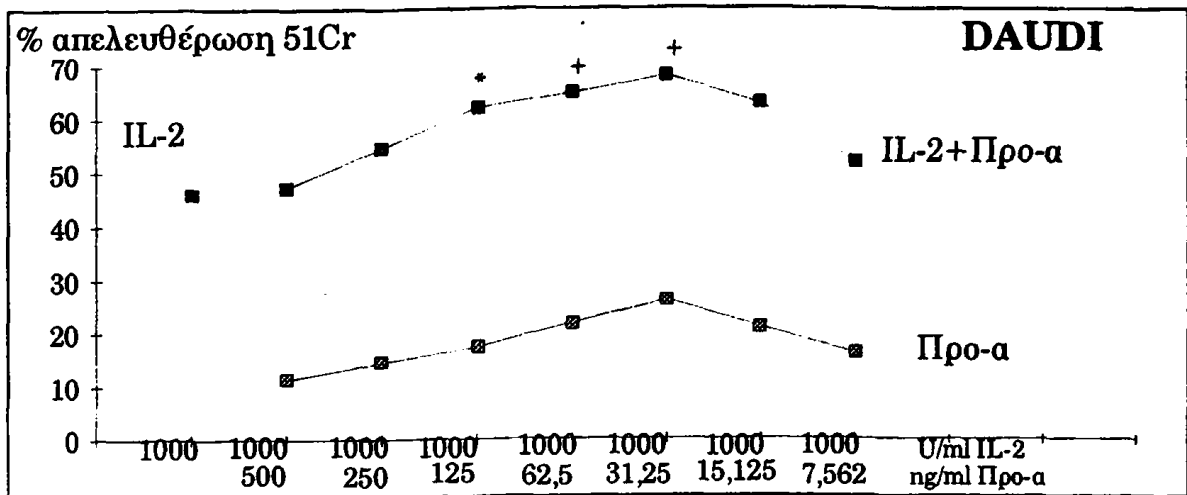
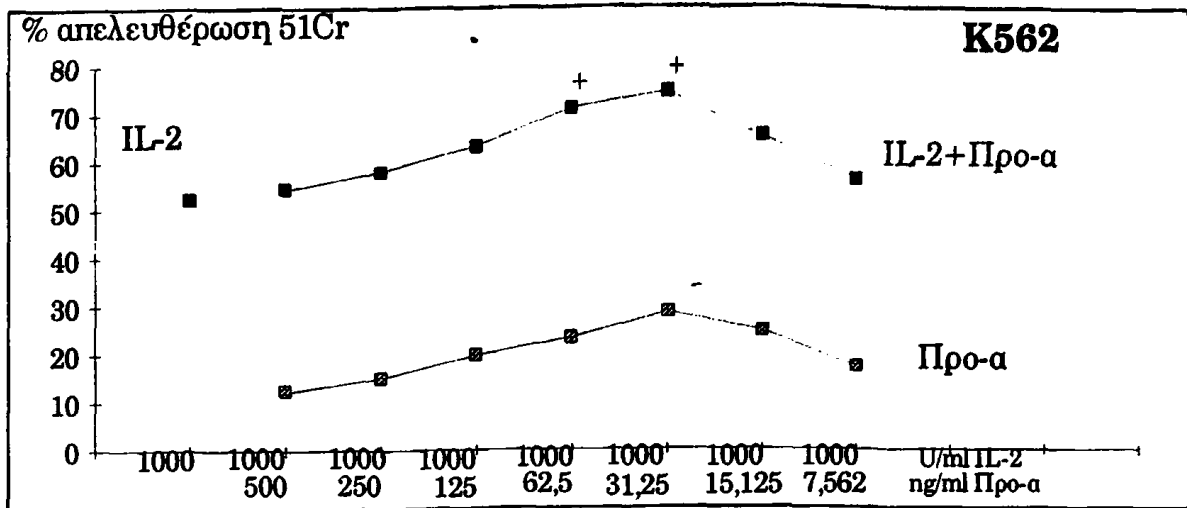


+:  $P < 0.01$

\*:  $P < 0.05$

**ΣΧΗΜΑ 11.** Κυτταροτοξική δράση των TIL έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών. Δράση της Προ-α. Περίπτωση #(No) 5: Ca νεφρού. Στάδιο IV.





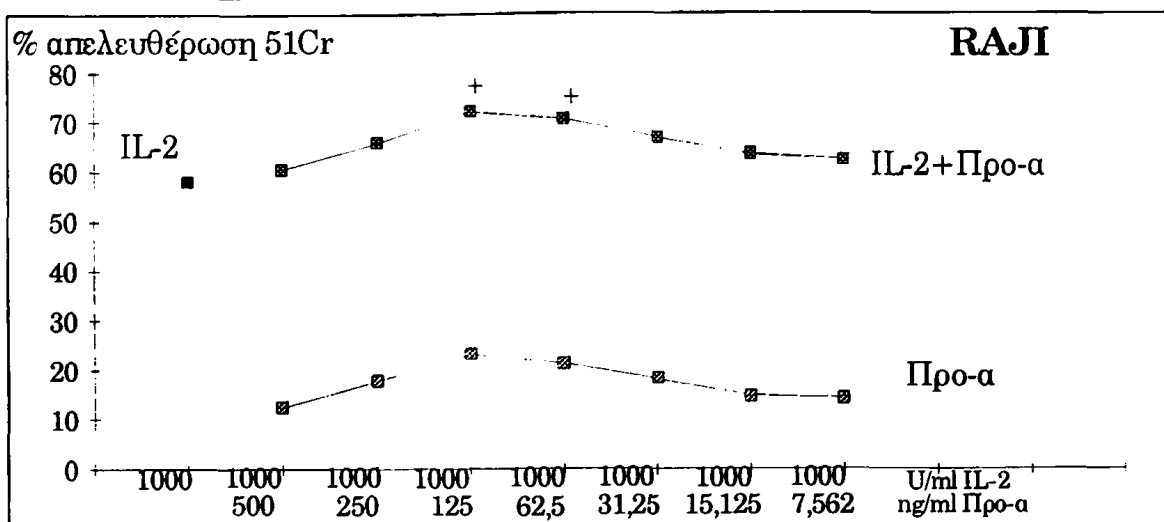
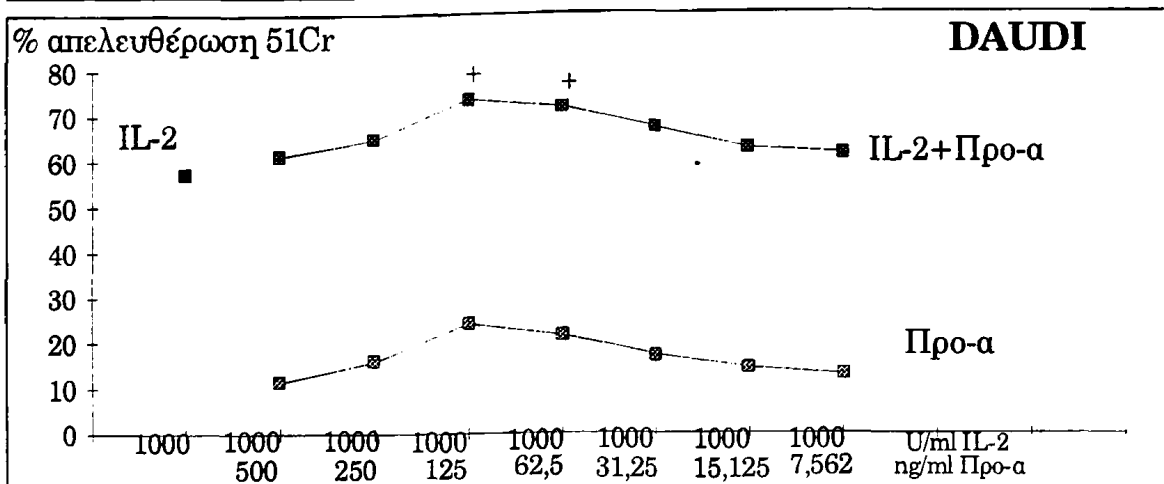
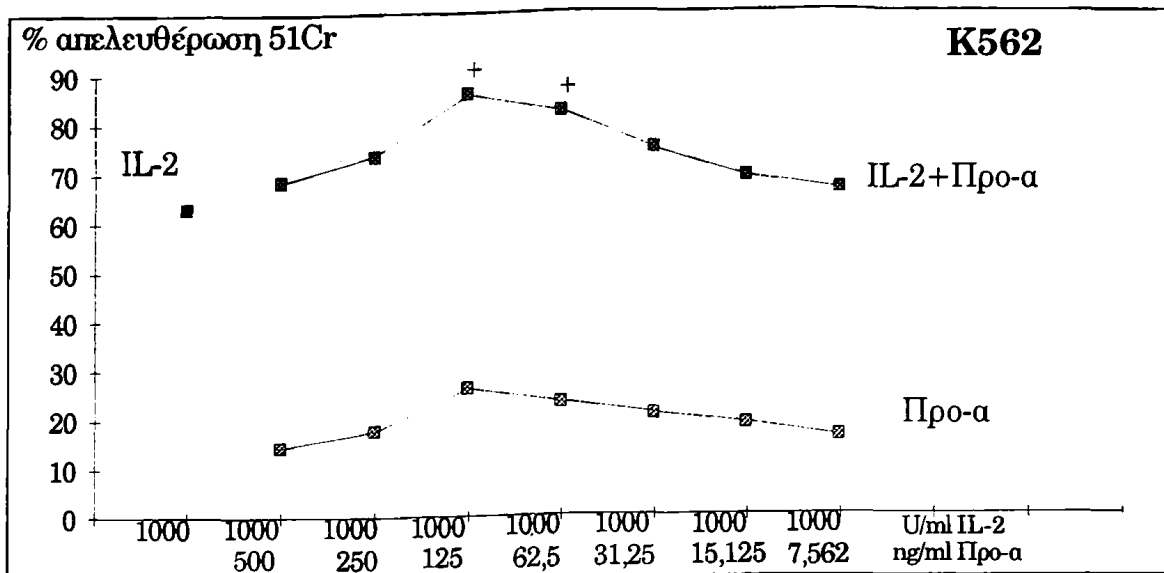
+:  $P < 0.01$

\*:  $P < 0.05$

**ΣΧΗΜΑ 12.** Κυτταροτοξική δράση των TIL έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών. Δράση της Προ-α. Περίπτωση #(No) 6: Μελάνωμα. Στάδιο IV.



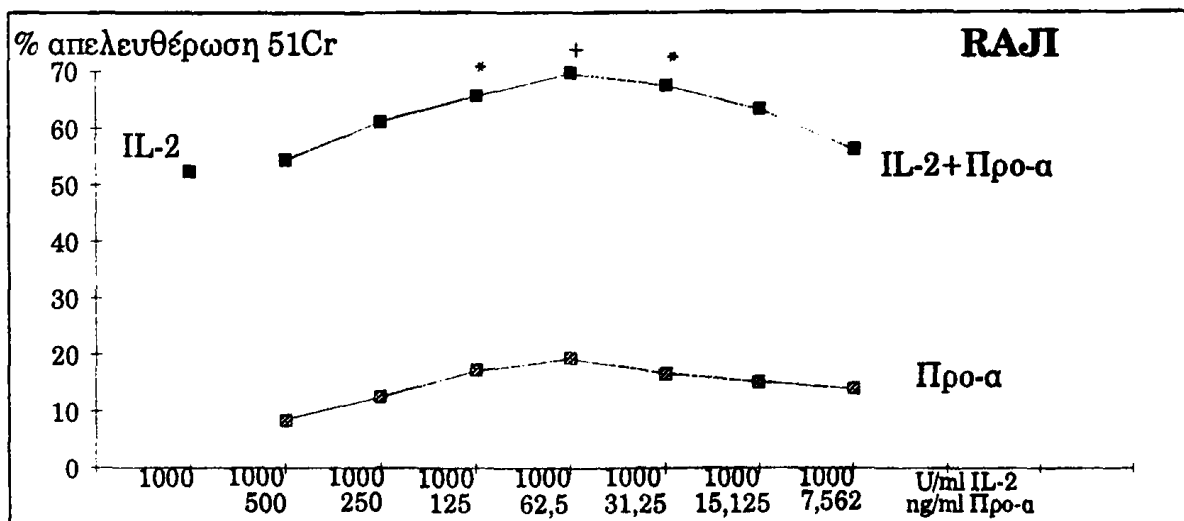
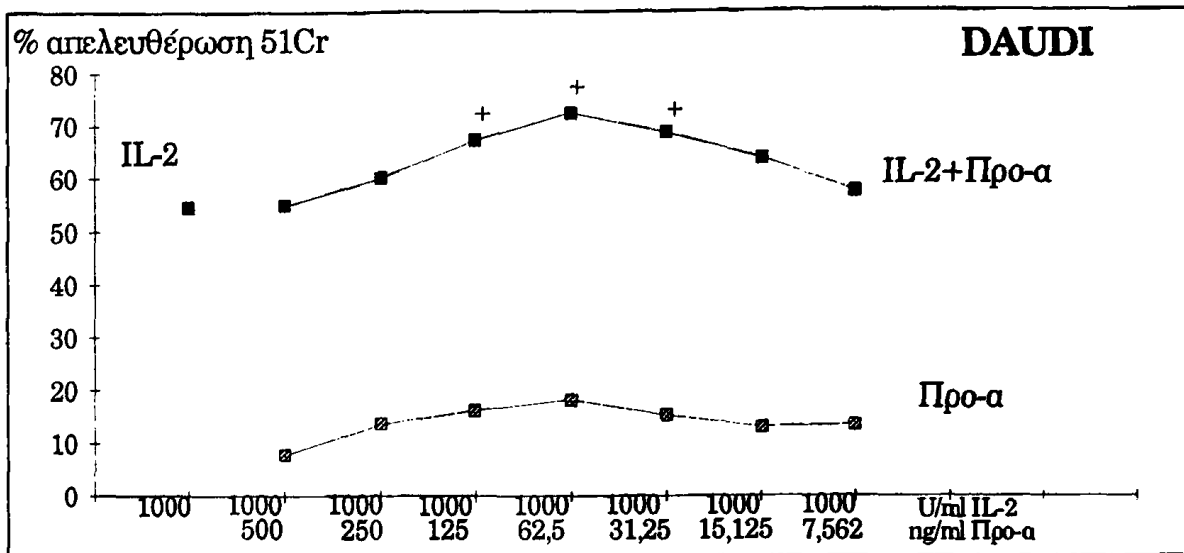
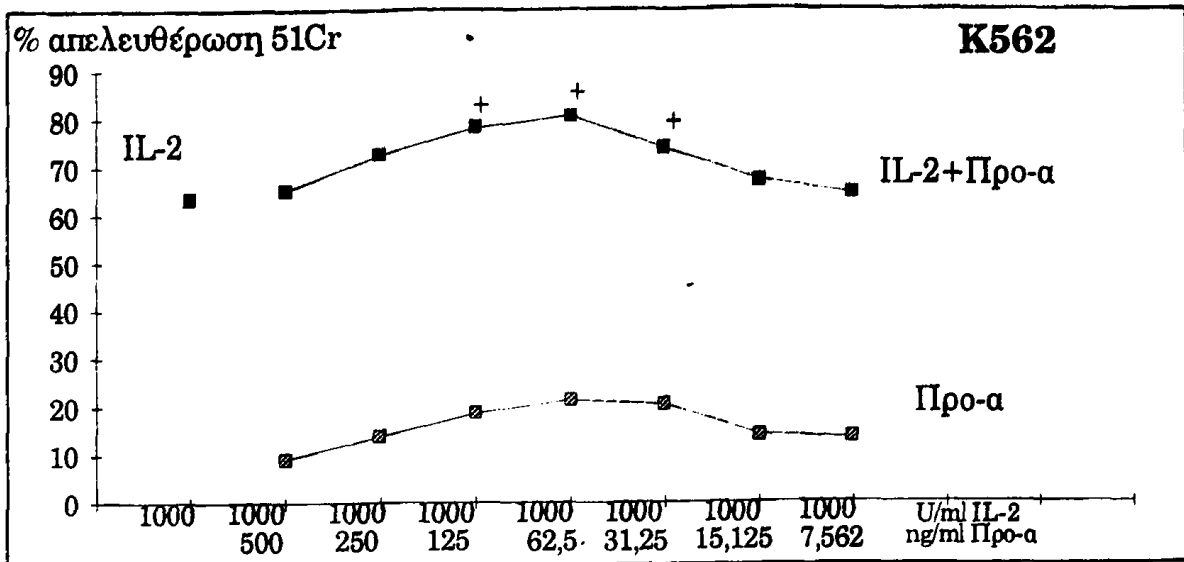




+ :  $P < 0.01$

**ΣΧΗΜΑ 13.** Κυτταροτοξική δράση των TIL έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών. Δράση της Προ-α. Περίπτωση #(No) 7: Μελάνωμα. Στάδιο III.



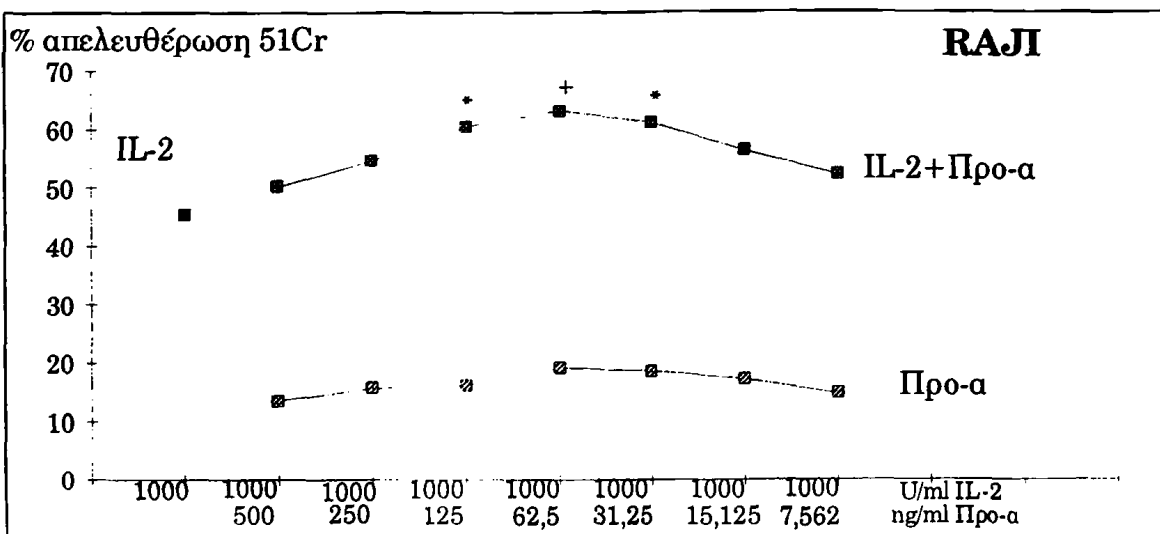
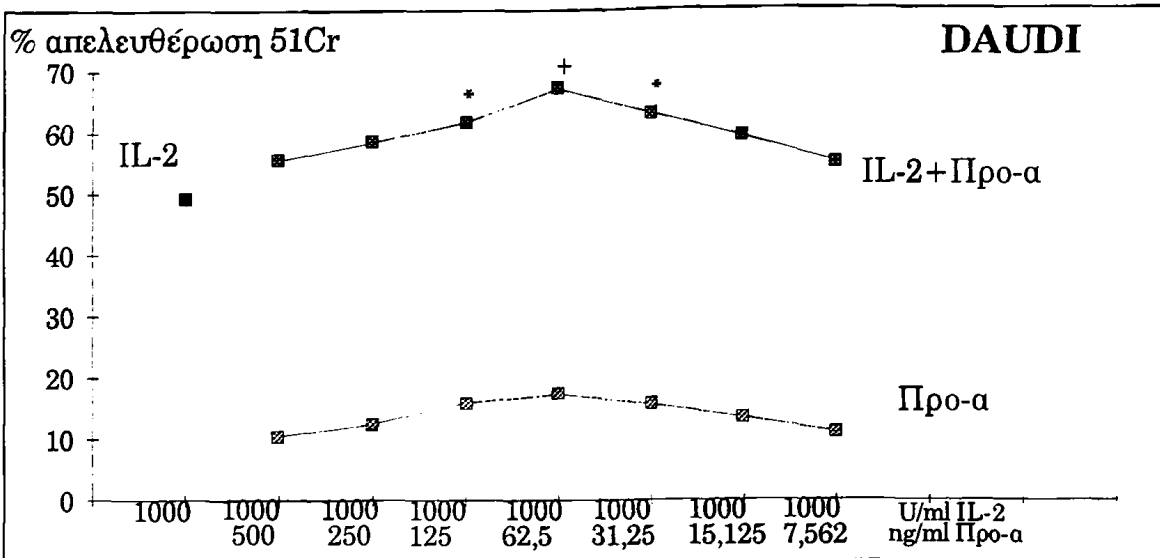
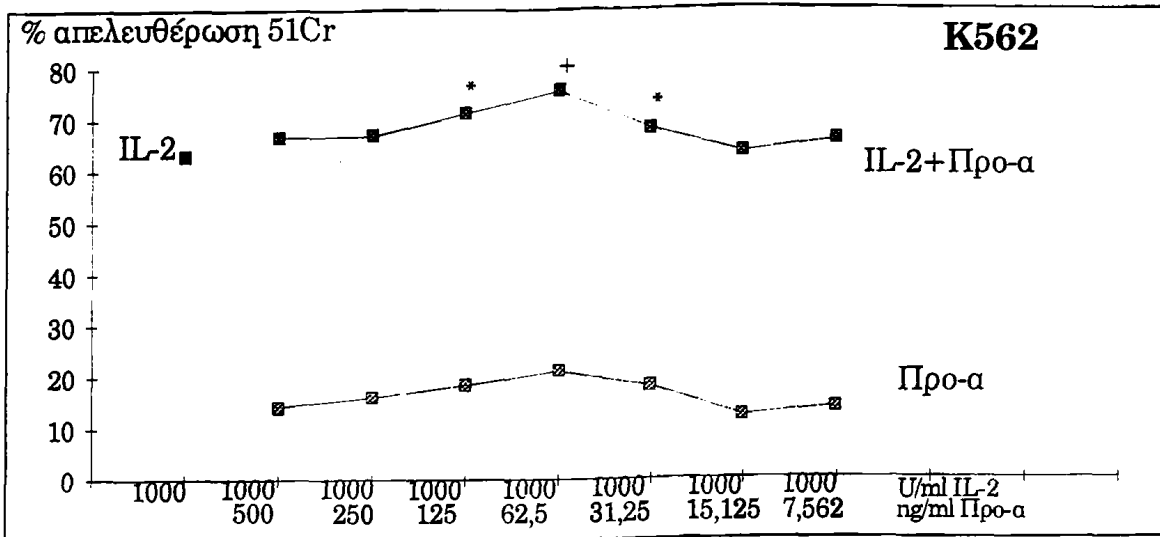


+: P<0.01

\*: P<0.05

**ΣΧΗΜΑ 14.** Κυτταροτοξική δράση των TIL έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών. Δράση της Προ-α. Περίπτωση # (No) 8: Μελάνωμα. Στάδιο IV.

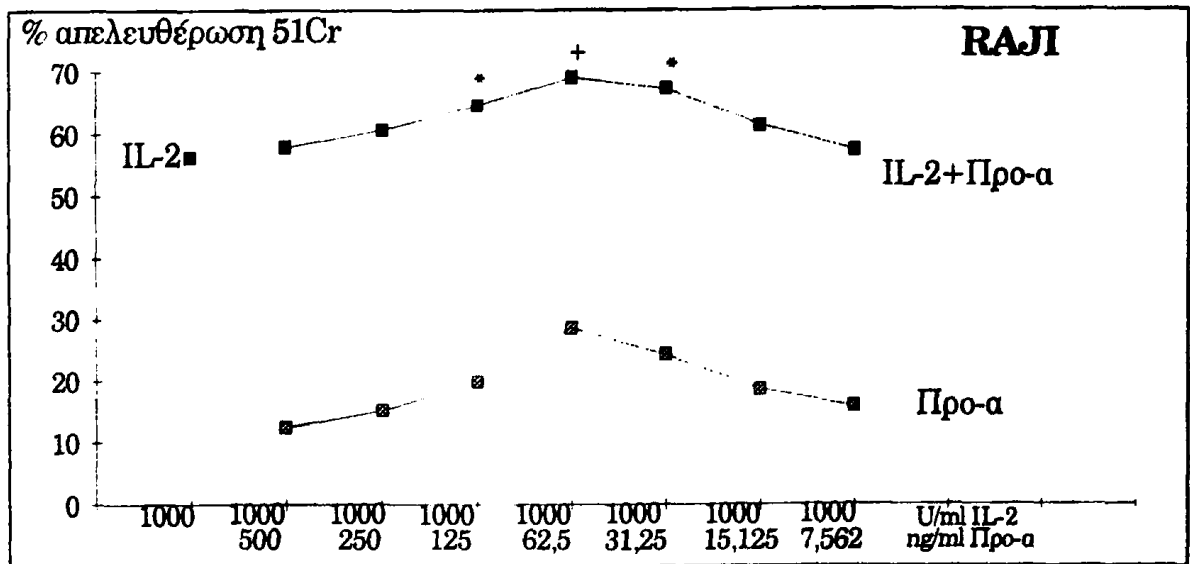
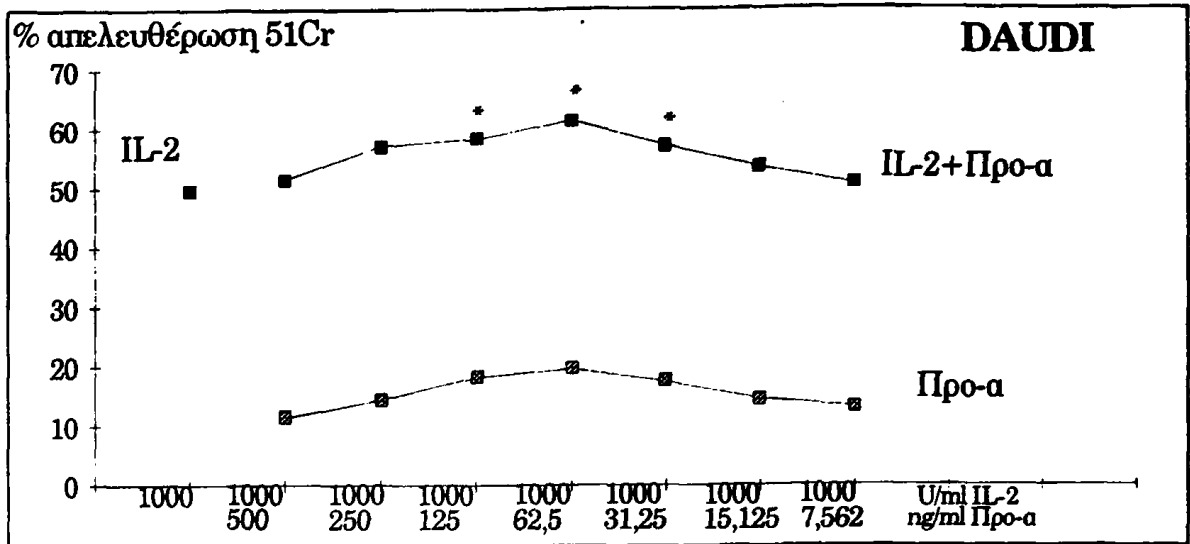
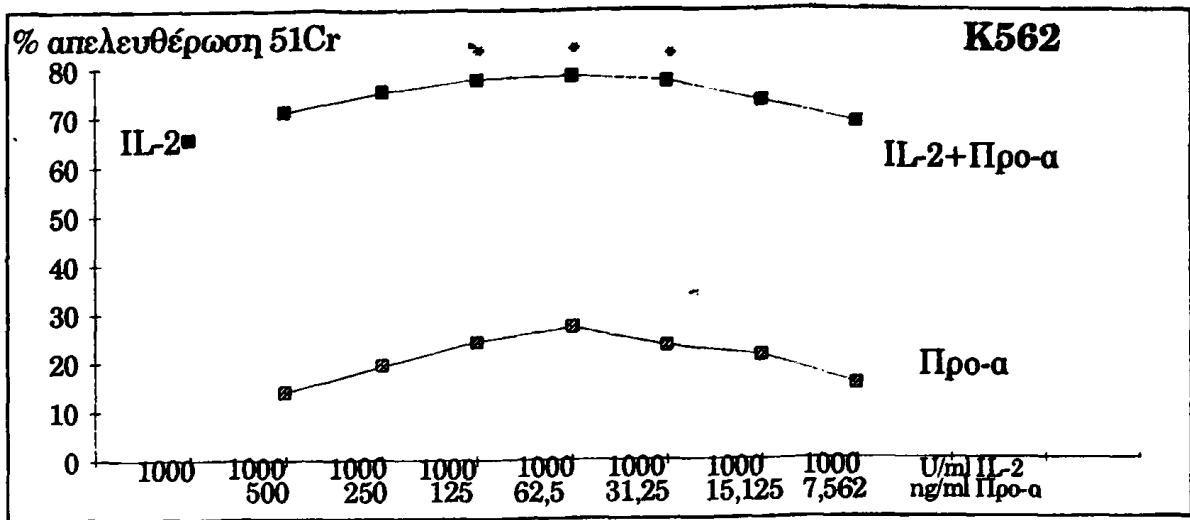




+:  $P < 0.01$   
 \*:  $P < 0.05$

**ΣΧΗΜΑ 15.** Κυτταροτοξική δράση των TIL έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών. Δράση της Προ-α. Περίπτωση # (No) 9: Ca μαστού. Στάδιο III.

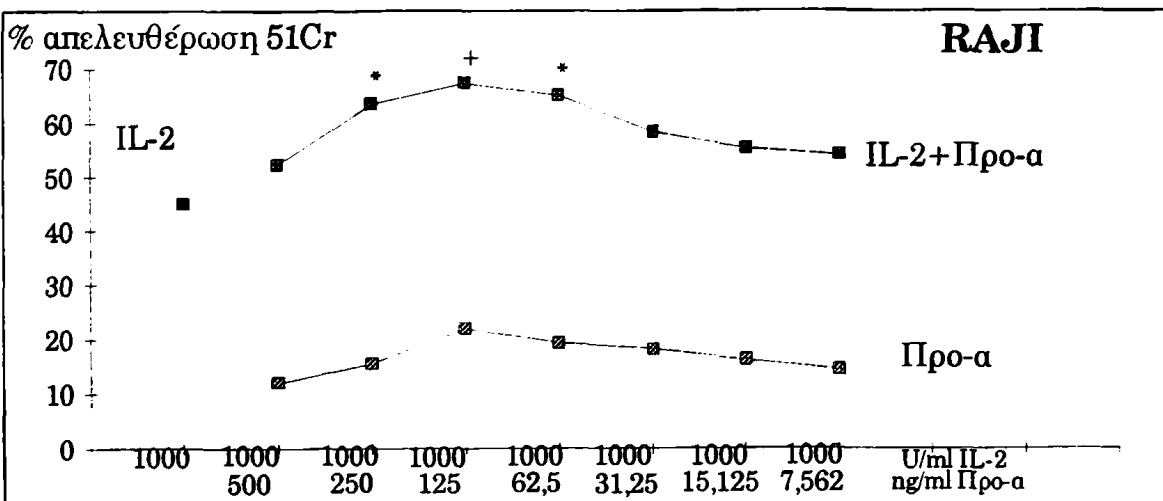
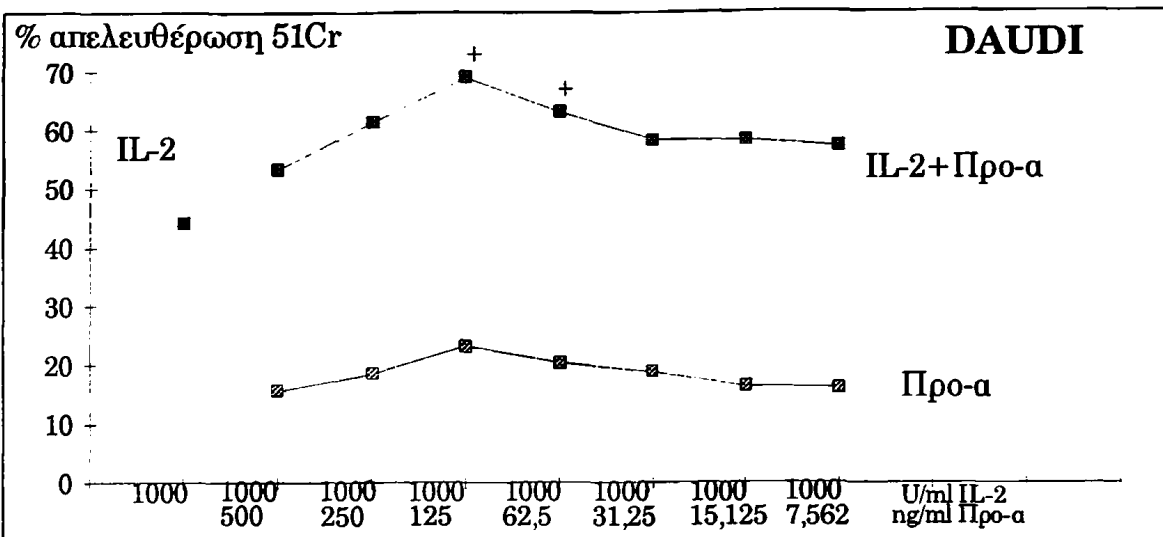
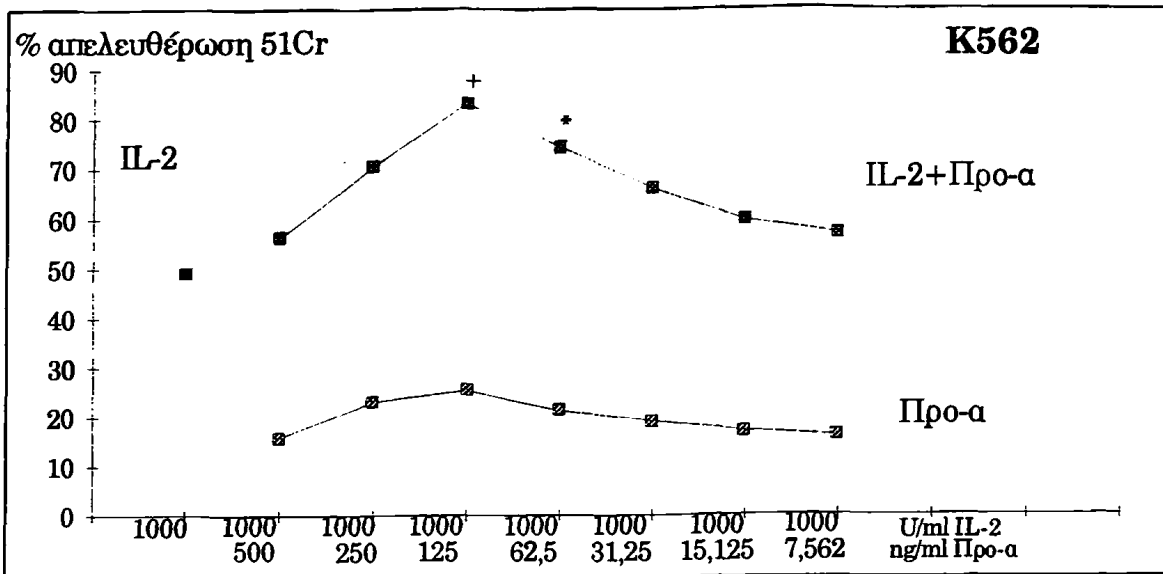




+: P<0.01  
 \*: P<0.05

**ΣΧΗΜΑ 16.** Κυτταροτοξική δράση των TIL έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών. Δράση της Προ-α. Περίπτωση # (No) 10: Ca μαστού. Στάδιο IV.

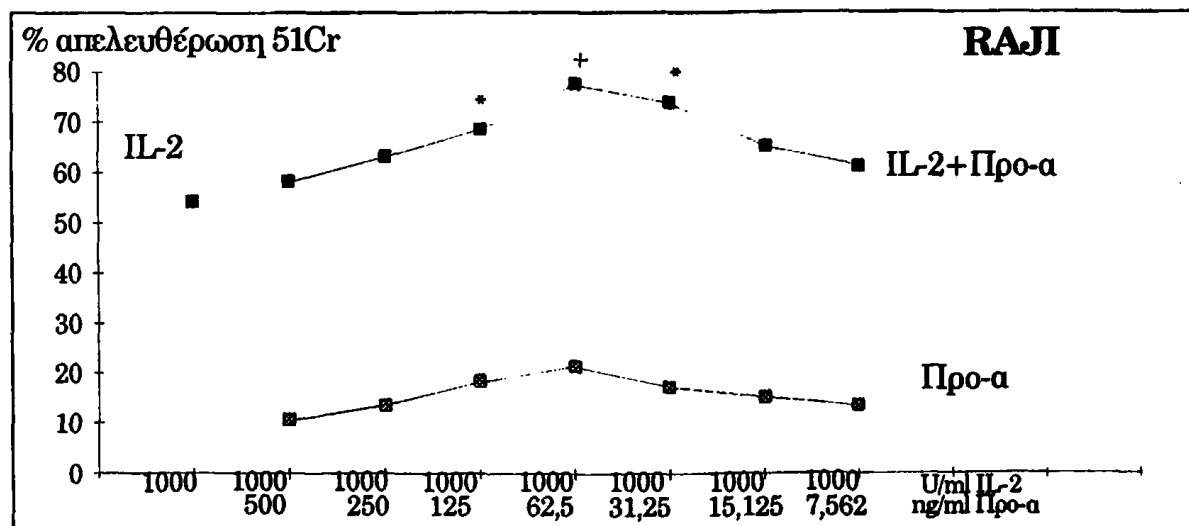
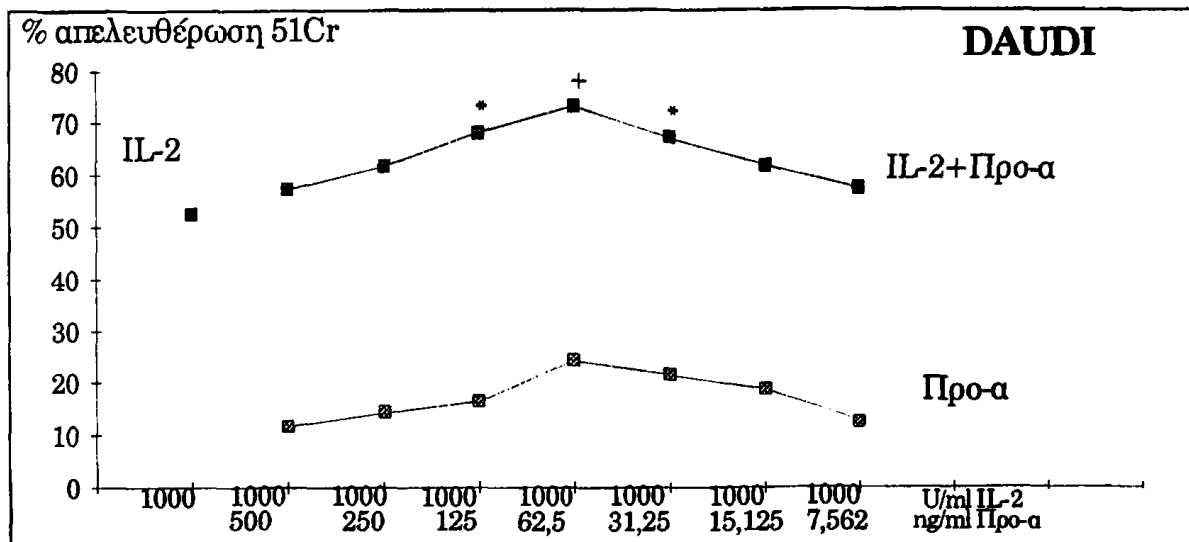
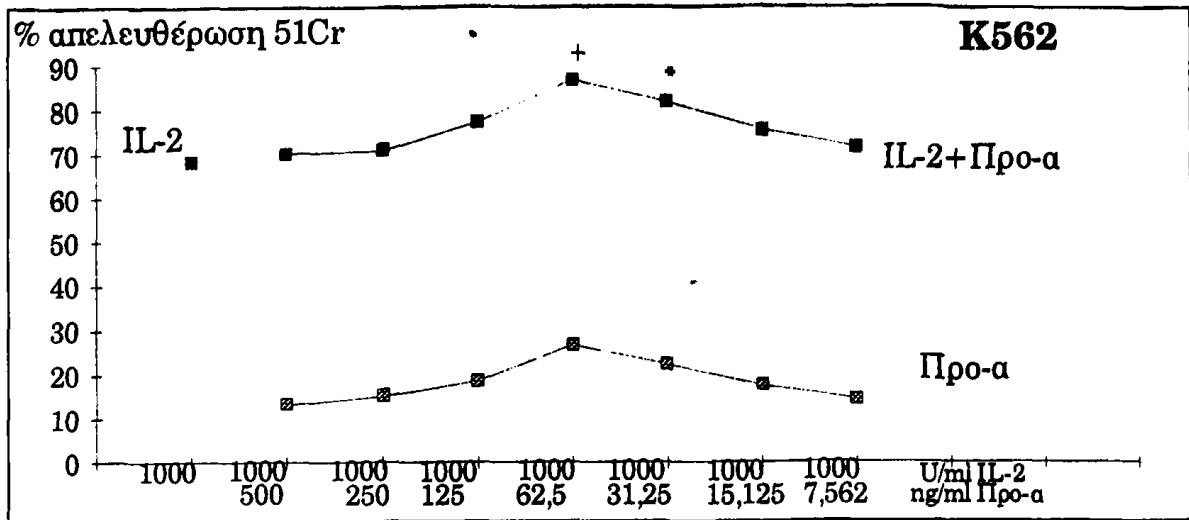




+: P<0.01  
\*: P<0.05

**ΣΧΗΜΑ 17.** Κυτταροτοξική δράση των TIL έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών. Δράση της Προ-α. Περίπτωση # (No) 11: Ca μαστού. Στάδιο IV.



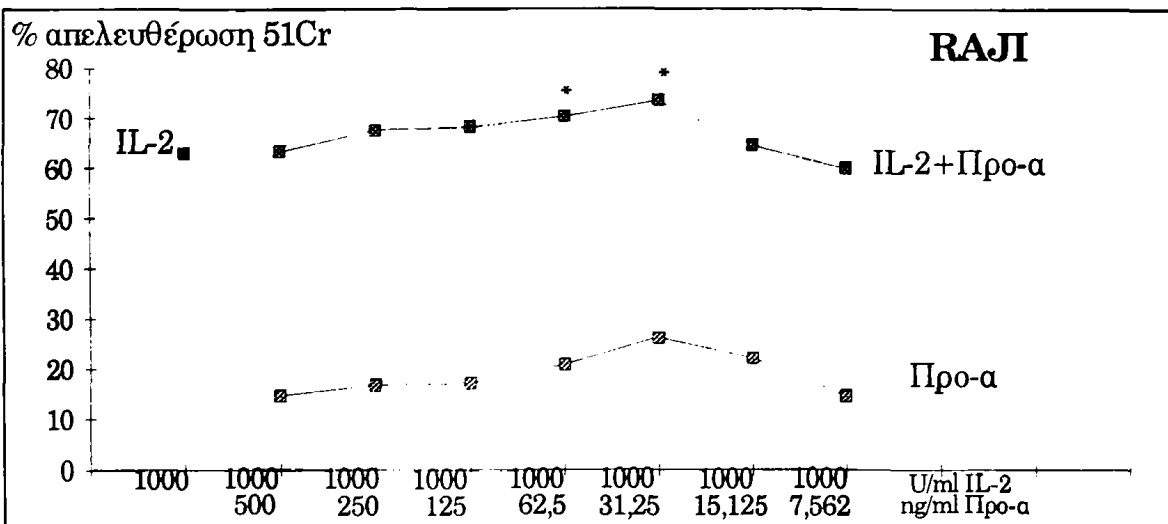
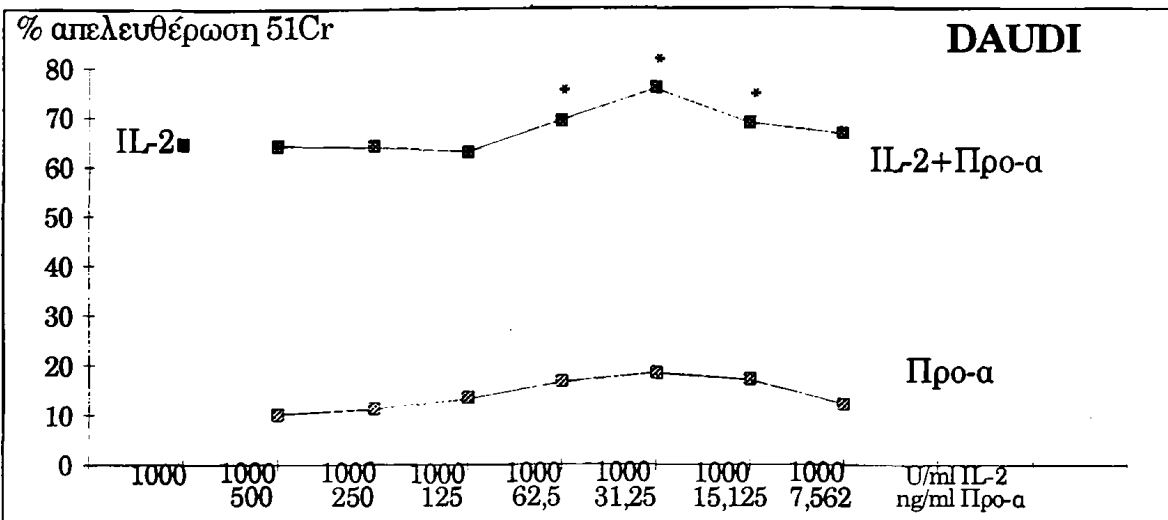
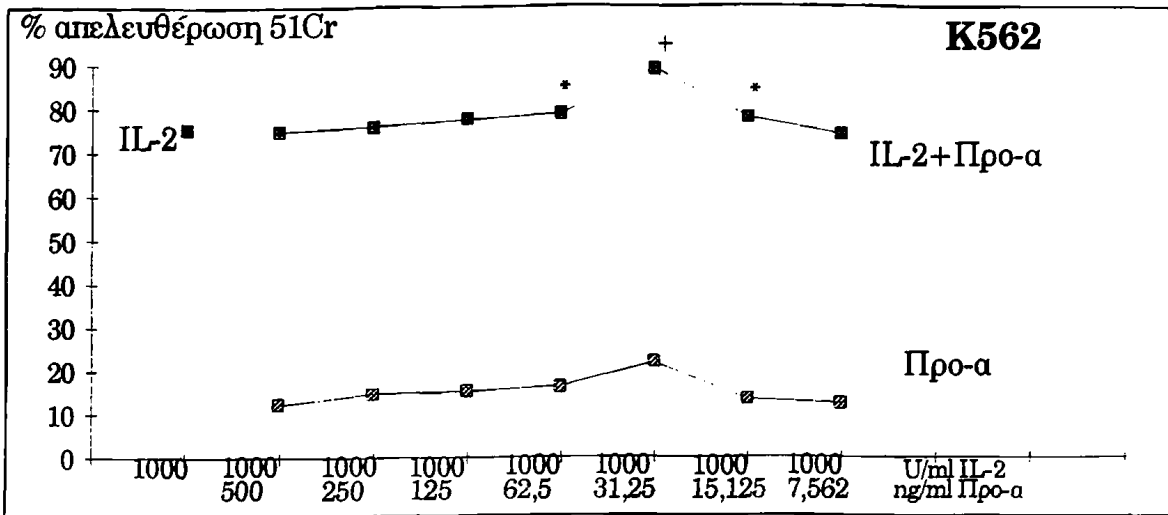


+: P<0.01

\*: P<0.05

**ΣΧΗΜΑ 18.** Κυτταροτοξική δράση των TIL έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών. Δράση της Προ-α. Περίπτωση #(No) 12: Ca μαστού. Στάδιο III.

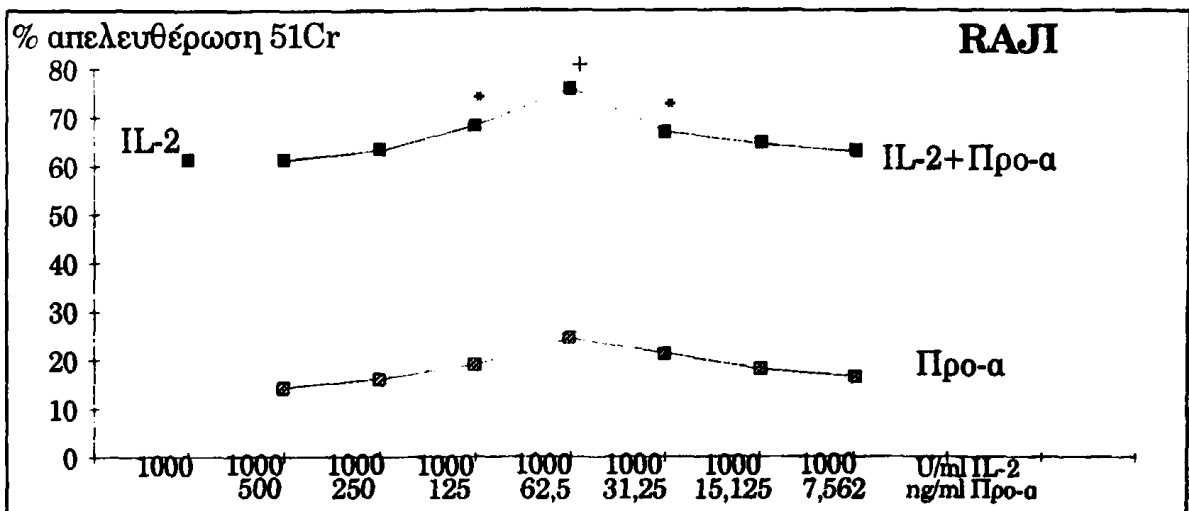
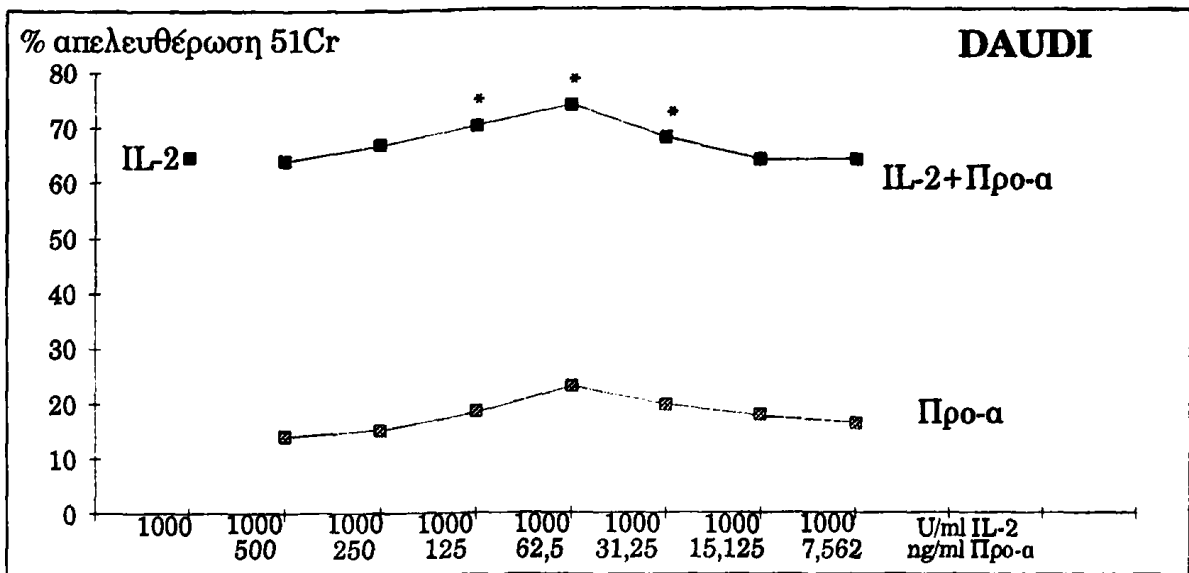
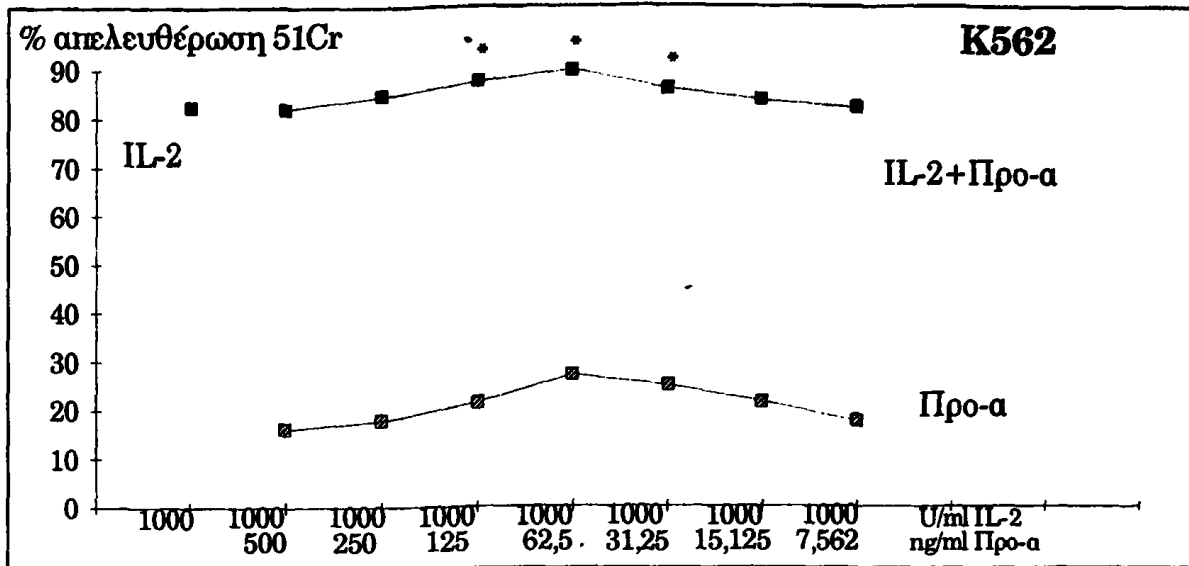




+ :  $P < 0.01$   
 \* :  $P < 0.05$

**ΣΧΗΜΑ 19.** Κυτταροτοξική δράση των TIL έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών. Δράση της Προ-α. Περίπτωση # (No) 13: Ca μαστού. Στάδιο II.





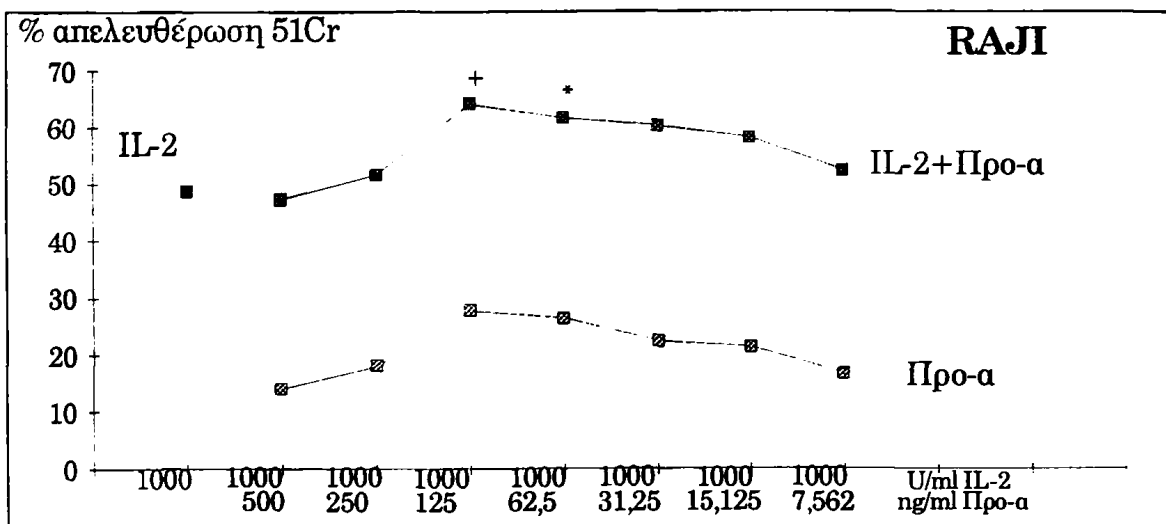
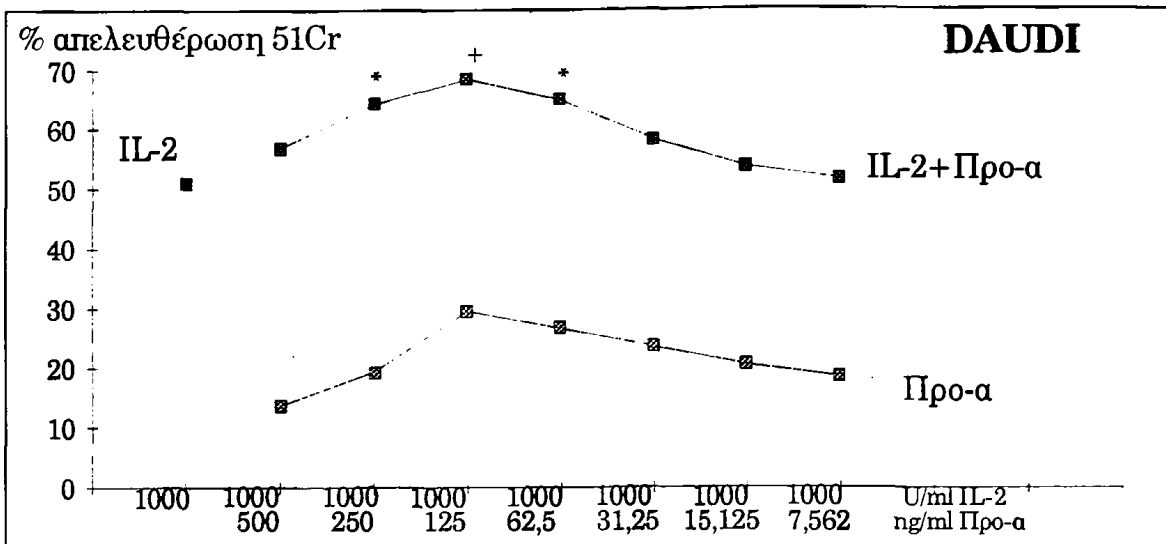
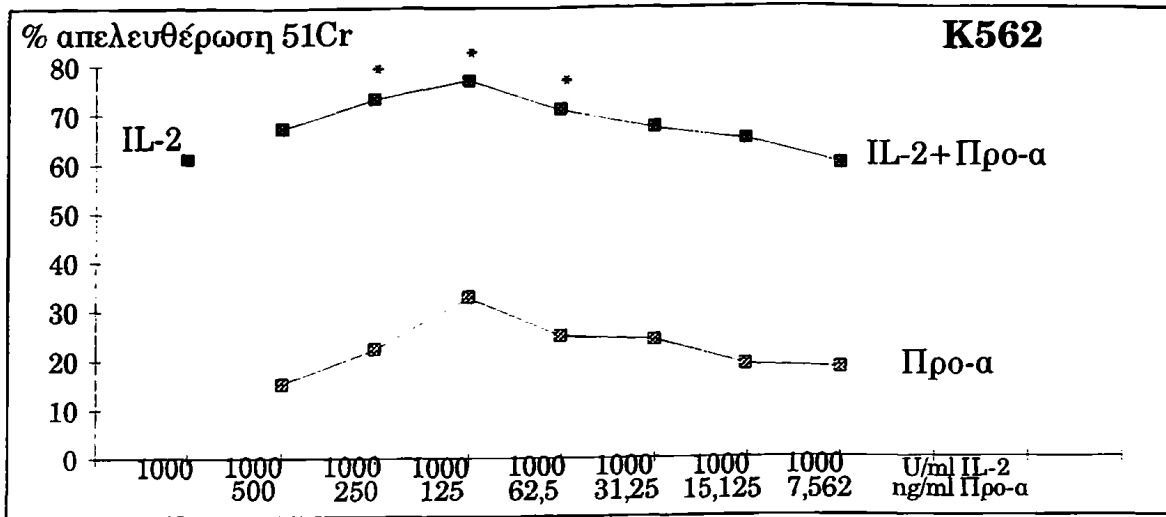
+: P<0.01

\*: P<0.05

**ΣΧΗΜΑ 20.** Κυτταροτοξική δράση των TIL έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών. Δράση της Προ-α. Περίπτωση #(No) 14: Ca μαστού. Στάδιο IV.



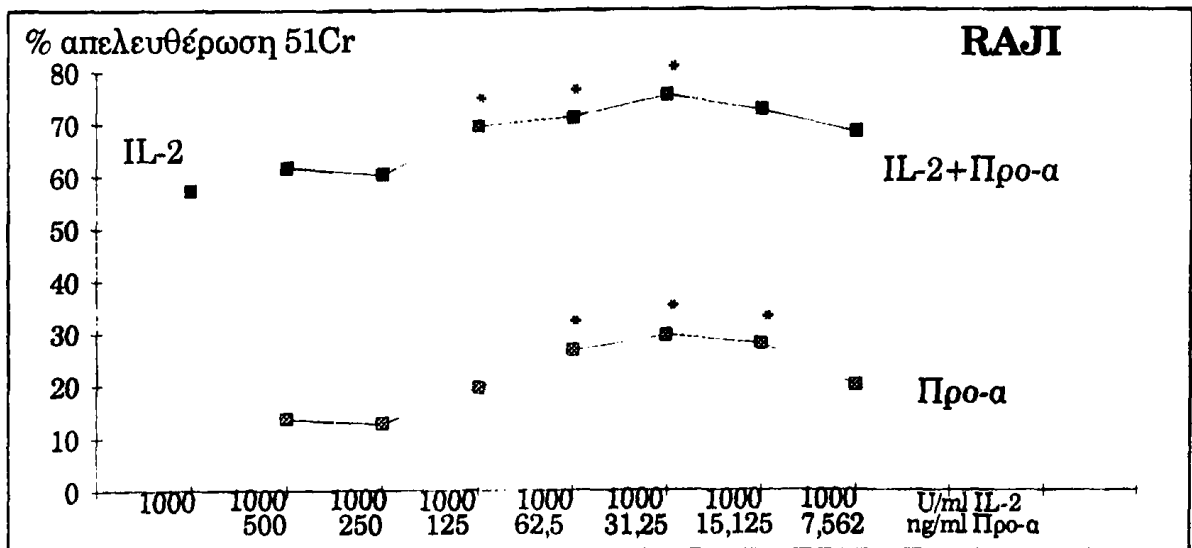
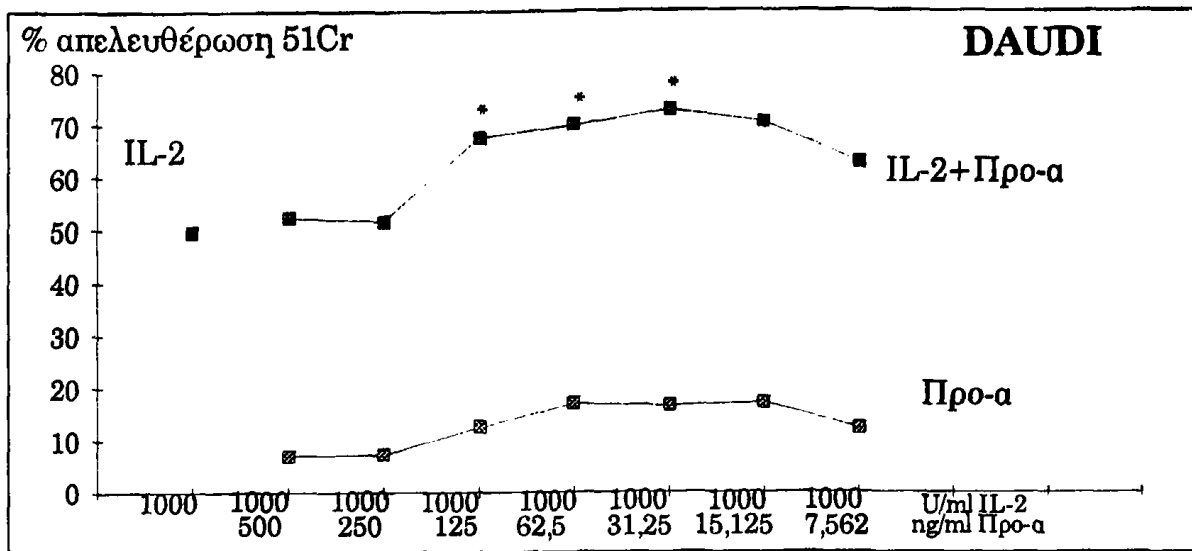
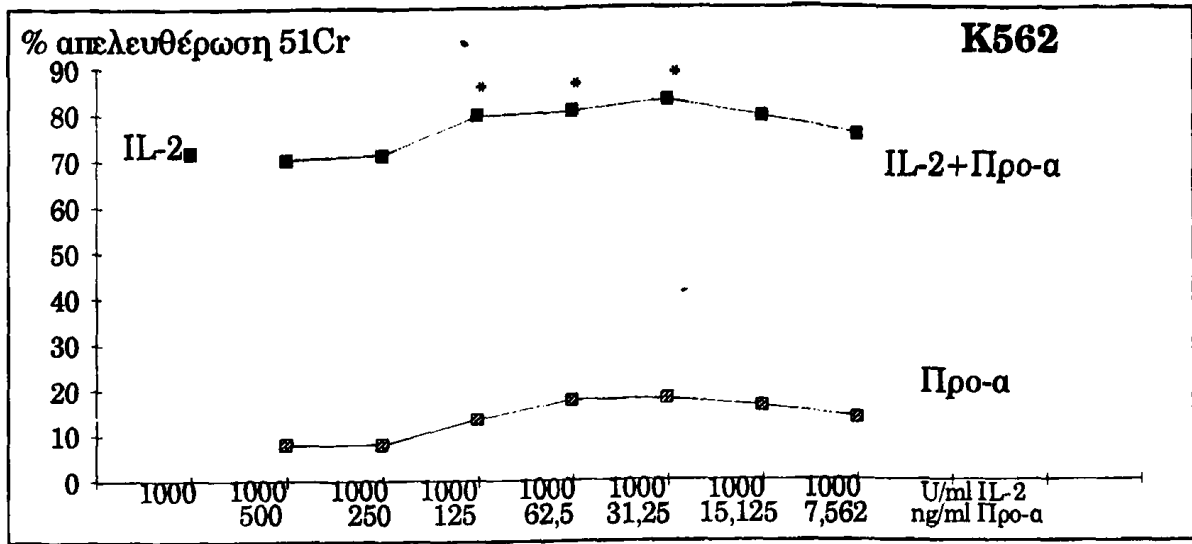




+:  $P < 0.01$   
 \*:  $P < 0.05$

**ΣΧΗΜΑ 21.** Κυτταροτοξική δράση των TIL έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών. Δράση της Προ-α. Περίπτωση # (No) 15: Ca μαστού. Στάδιο IV.

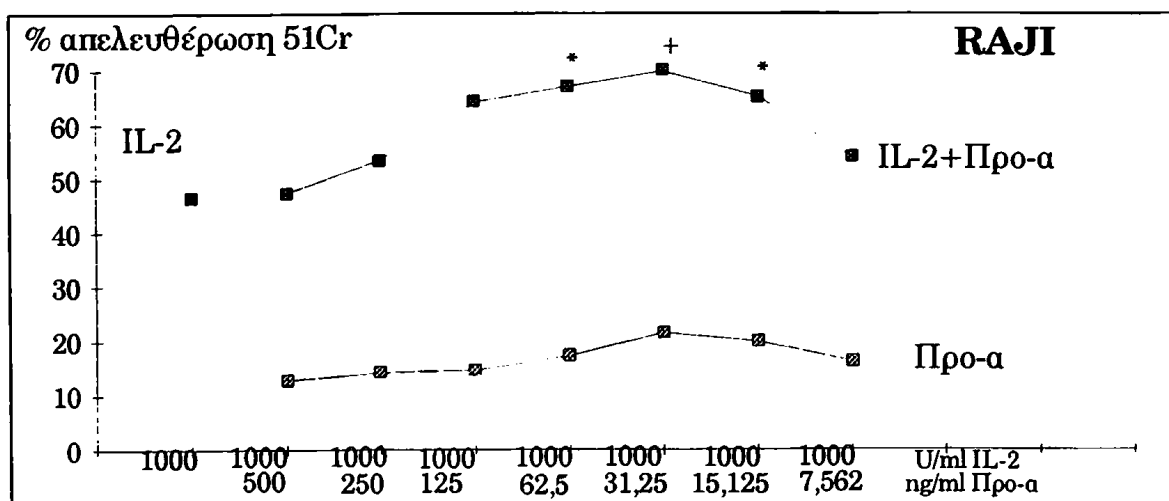
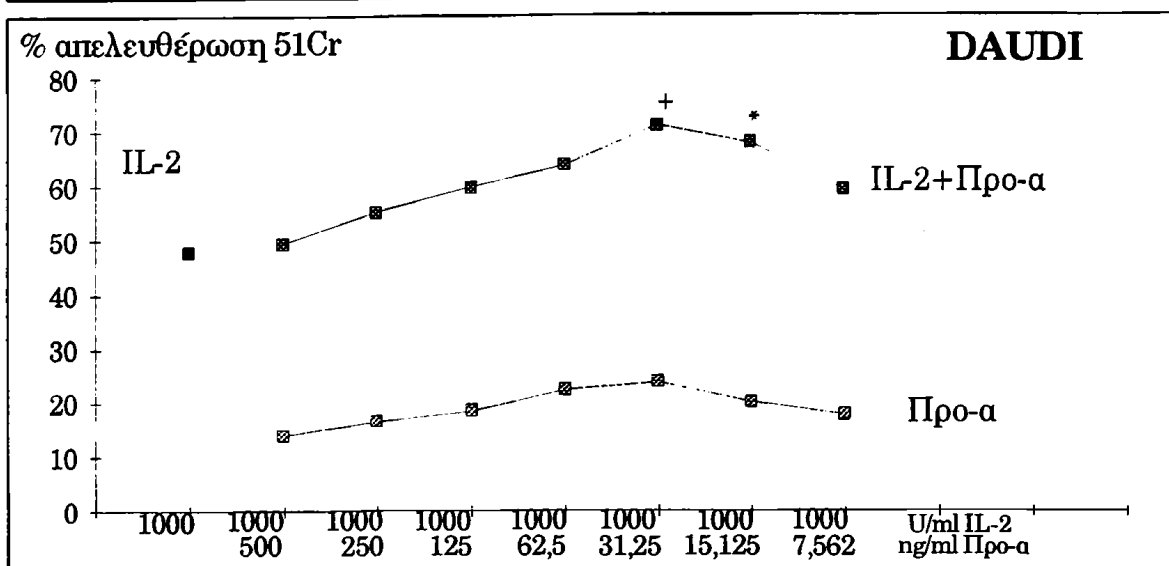
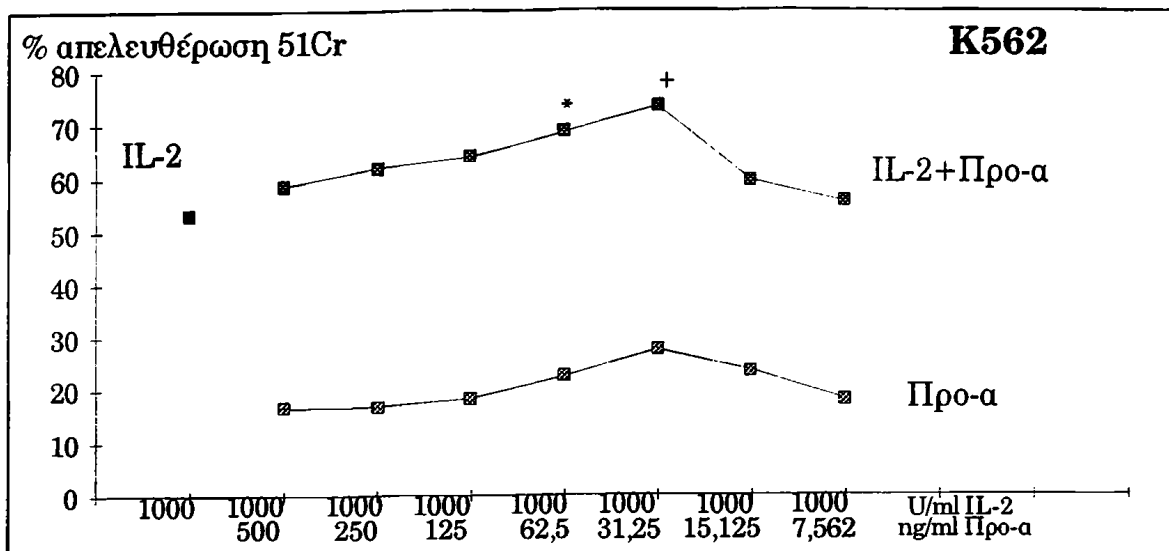




\*:  $P < 0.05$

**ΣΧΗΜΑ 22.** Κυτταροτοξική δράση των TIL έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών. Δράση της Προ-α. Περίπτωση #(No) 16: Ca μαστού. Στάδιο IV.



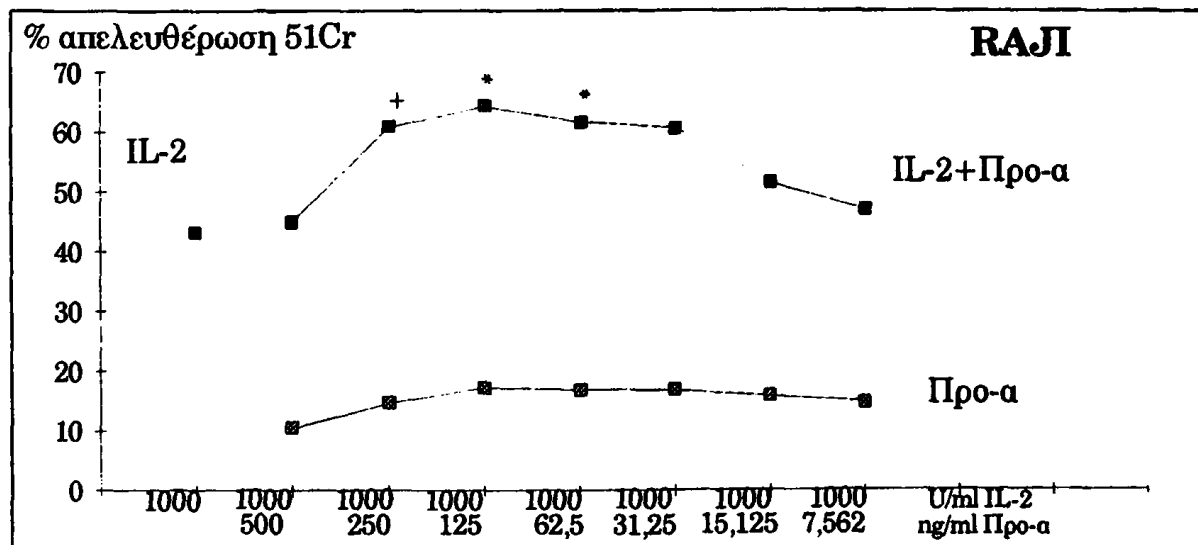
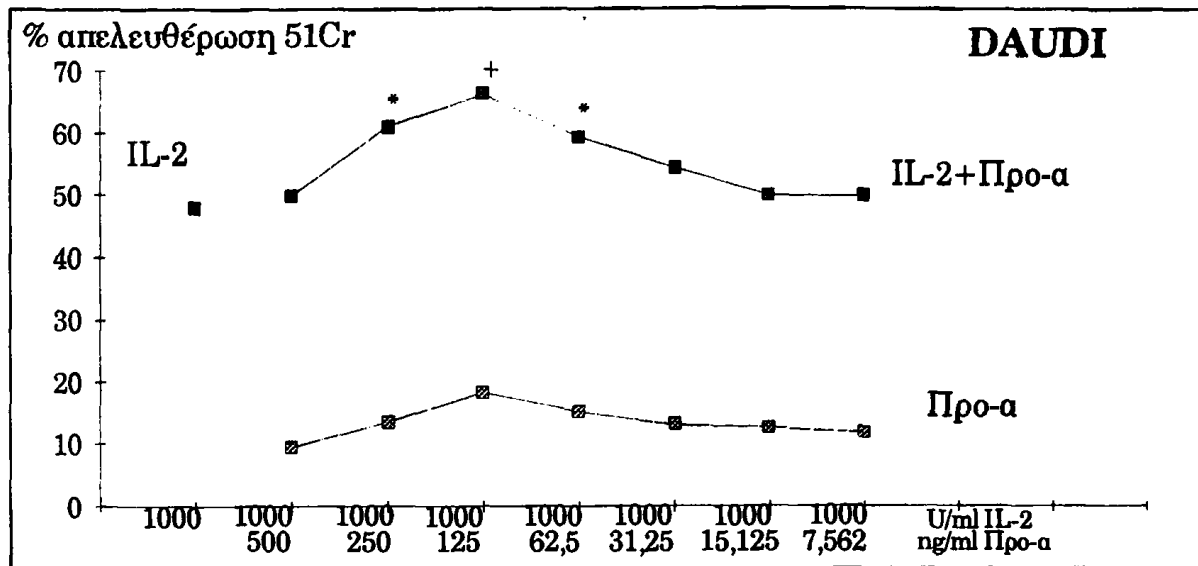
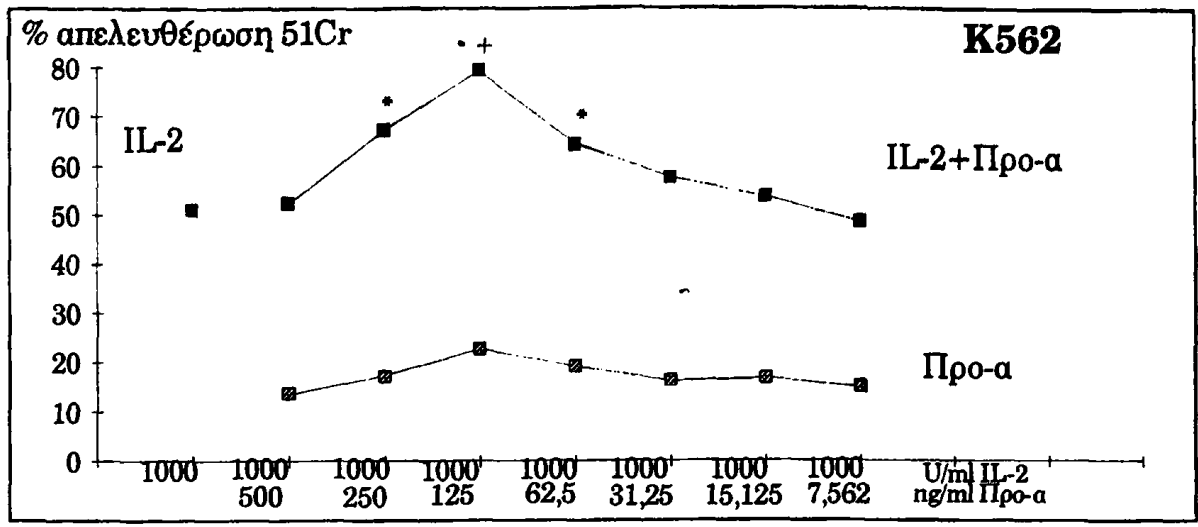


+:  $P < 0.01$

\*:  $P < 0.05$

**ΣΧΗΜΑ 23.** Κυτταροτοξική δράση των TIL έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών. Δράση της Προ-α. Περίπτωση # (No) 17: Ca μαστού. Στάδιο IV.

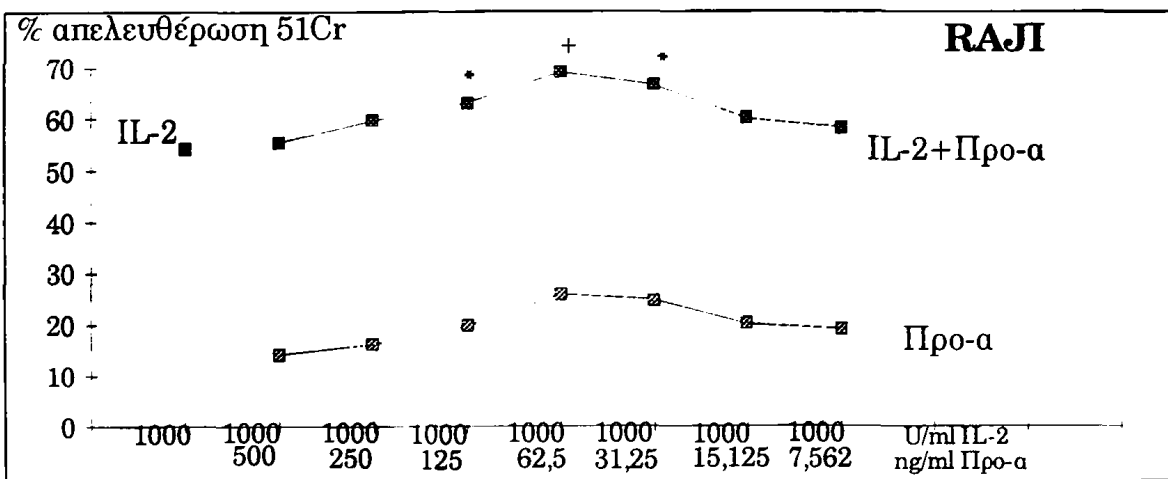
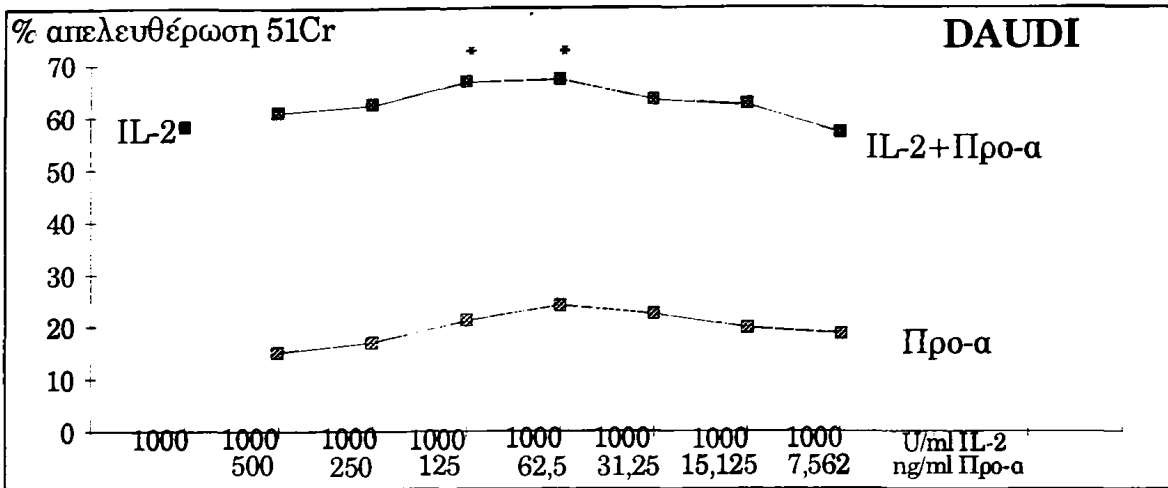
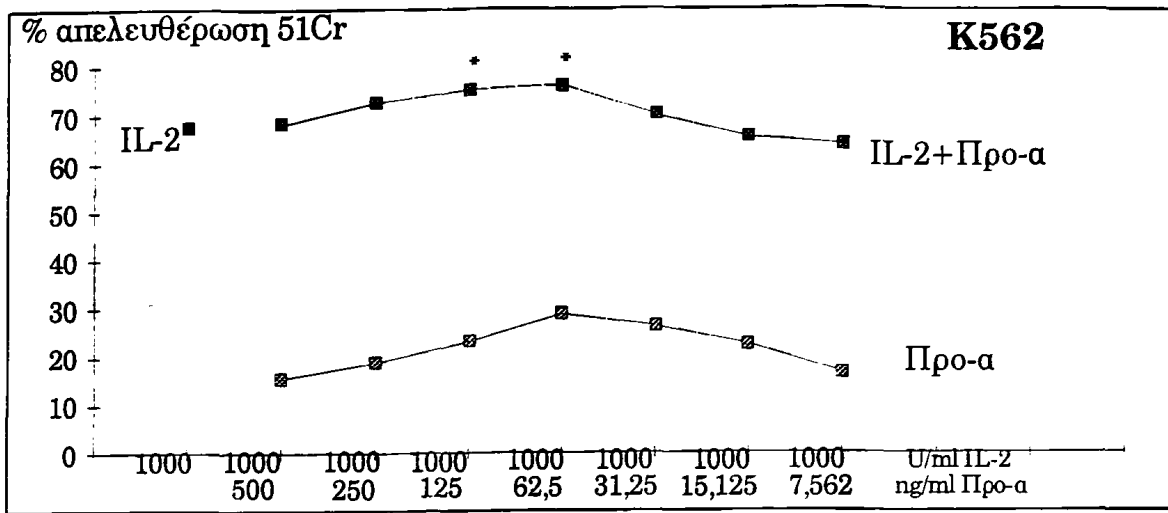




+: P<0.01  
 \*: P<0.05

**ΣΧΗΜΑ 24.** Κυτταροτοξική δράση των TIL έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών. Δράση της Προ-α. Περίπτωση #(No) 18: Ca μαστού. Στάδιο III.

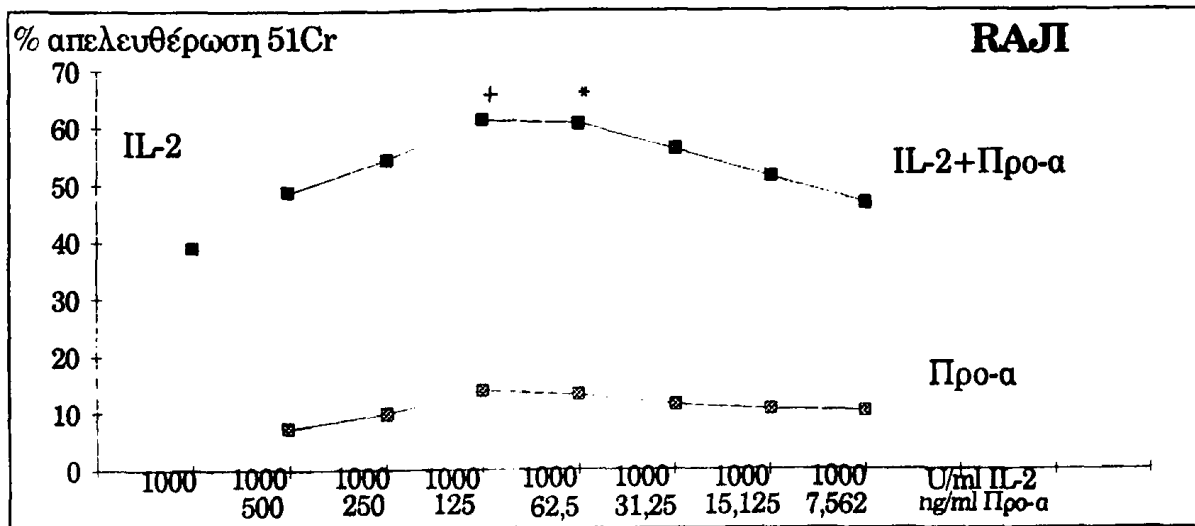
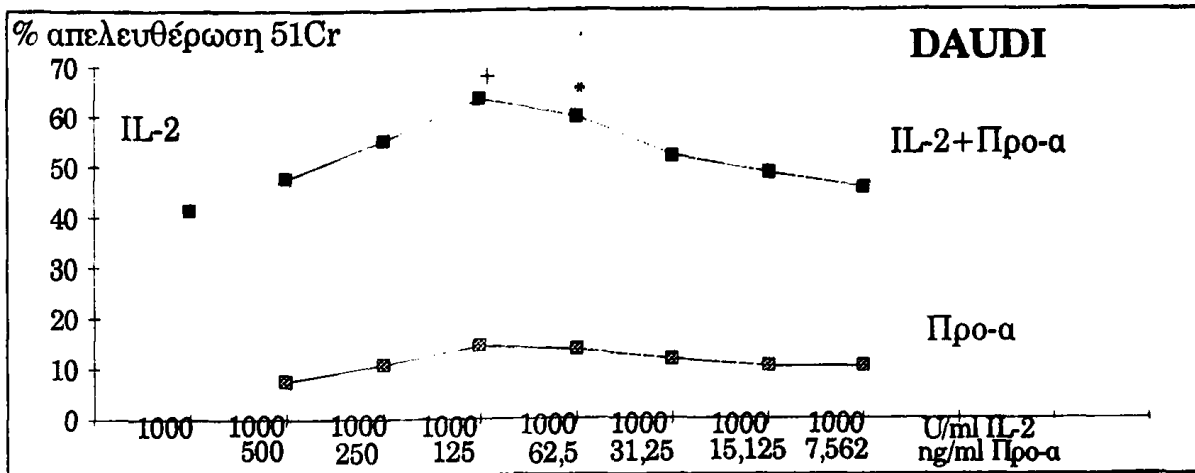
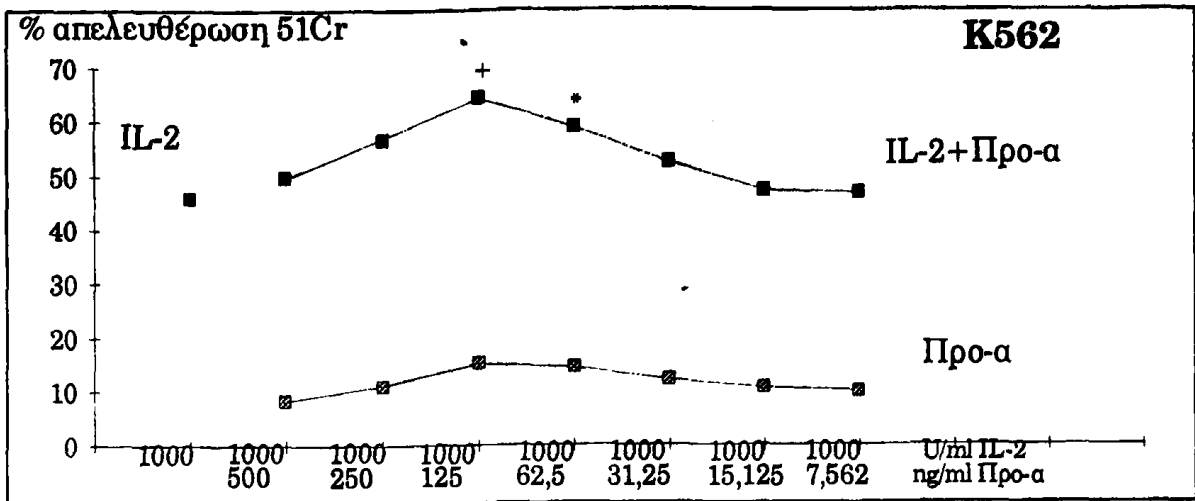




+: P<0.01  
 \*: P<0.05

**ΣΧΗΜΑ 25.** Κυτταροτοξική δράση των TIL έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών. Δράση της Προ-α. Περίπτωση #(No) 19: Ca μαστού. Στάδιο II.



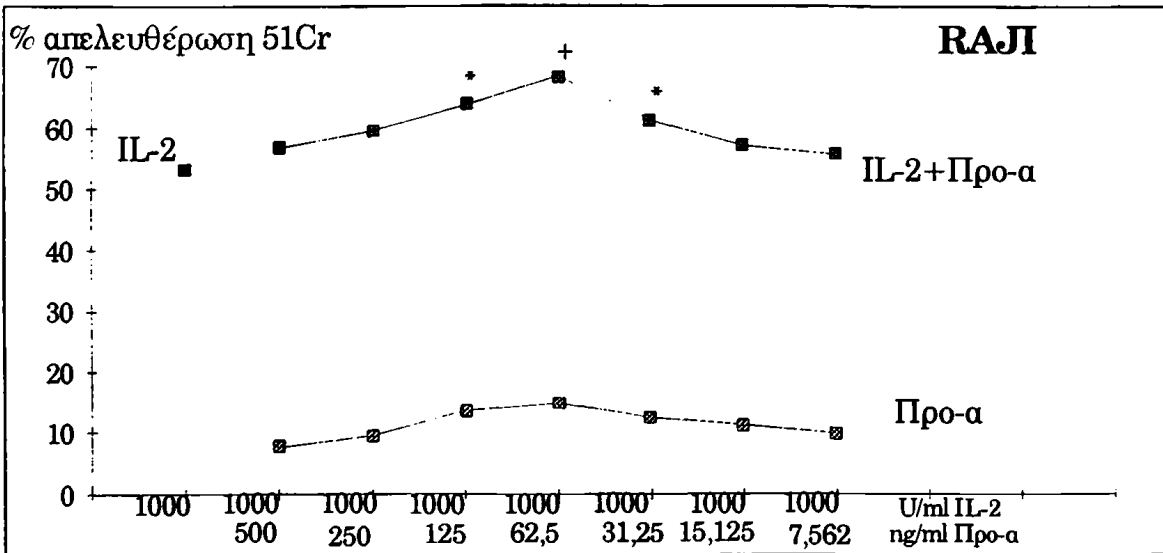
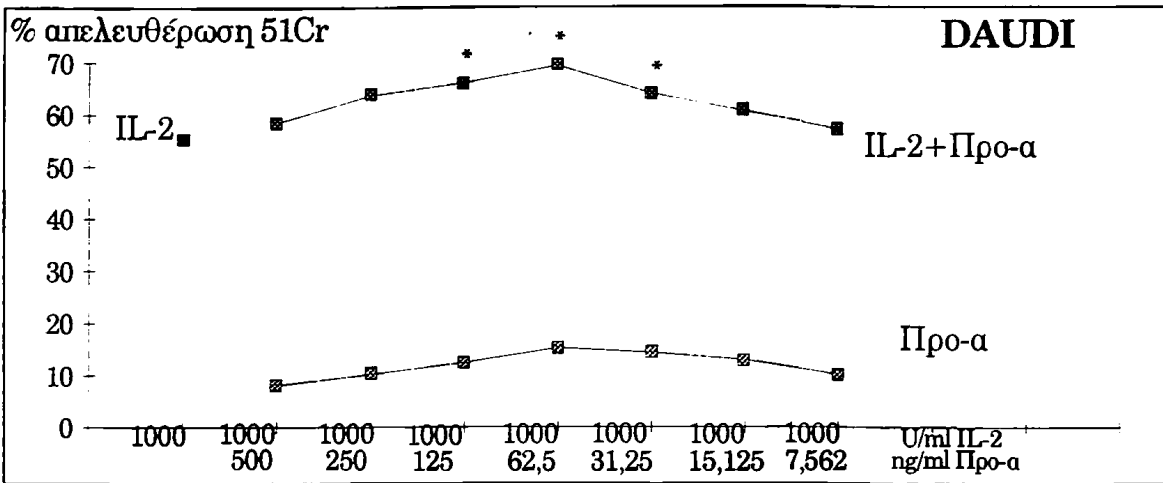
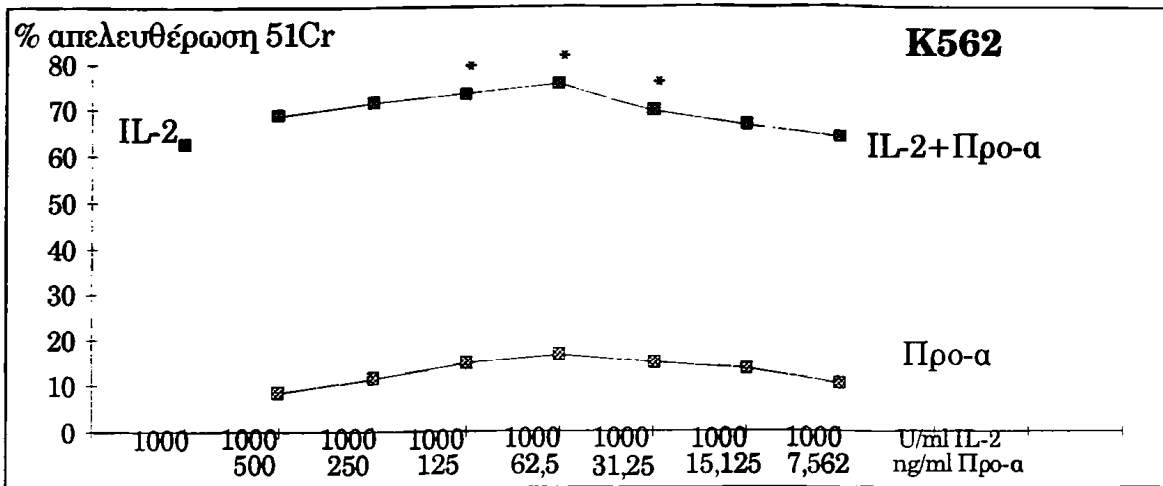


+ :  $P < 0.01$

\* :  $P < 0.05$

**ΣΧΗΜΑ 26.** Κυτταροτοξική δράση των TIL έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών. Δράση της Προ-α. Περίπτωση # (No) 20: Ca μαστού. Στάδιο IV.





+:  $P < 0.01$

\*:  $P < 0.05$

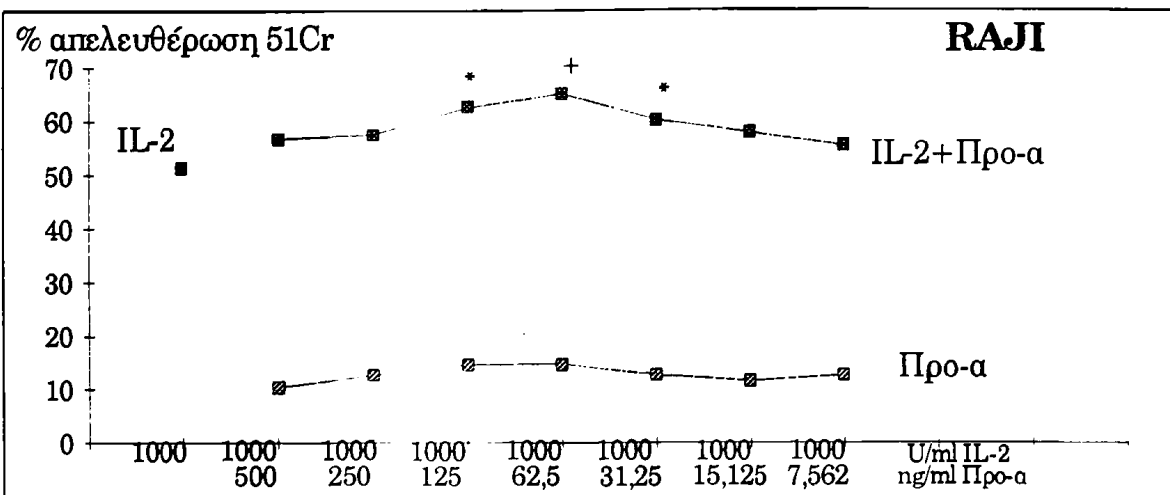
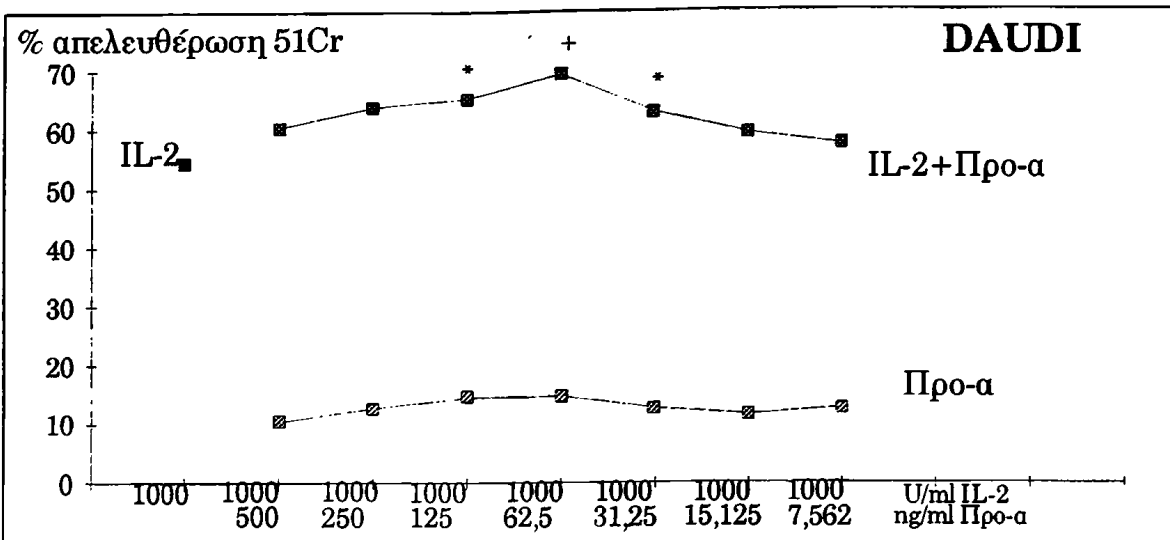
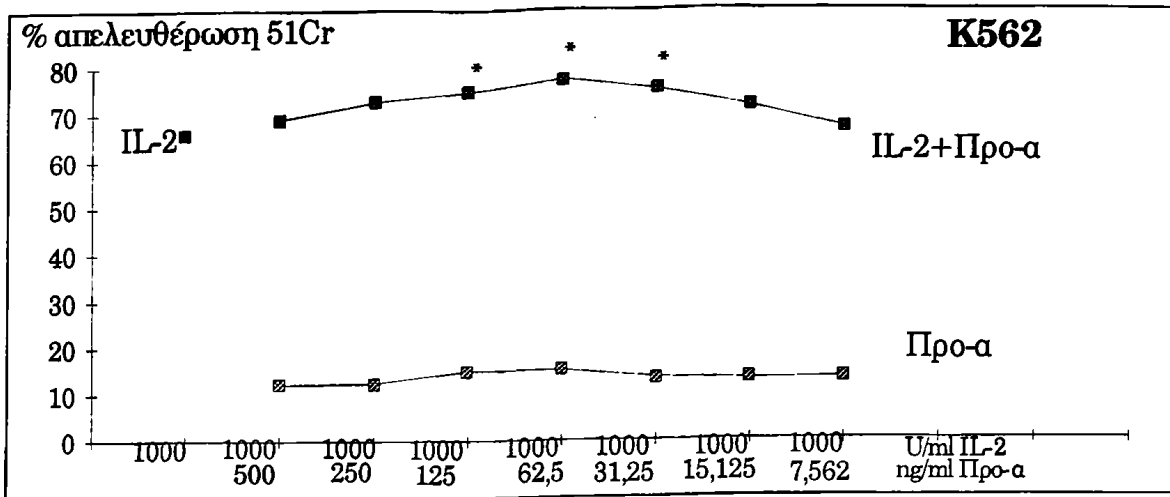
**ΣΧΗΜΑ 27.** Κυτταροτοξική δράση των TIL έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών. Δράση της Προ-α. Περίπτωση # (No) 21: Ca μαστού. Στάδιο IV.



Παρόμοια αποτελέσματα πάρθηκαν και με τη χρησιμοποίηση ΕΑΜΜC από πλευριτικά και ασκитικά υγρά. Εξετάσθηκαν συνολικά επτά υγρά (3 ασκητικά και 4 πλευριτικά). Από 4 περιπτώσεις καρκίνου πνεύμονα και 3 περιπτώσεις καρκίνου ωοθήκης τα στάδια ήταν II (n=1), III (n=2), IV (n=4). Η ProTa αύξησε την κυτταροτοξικότητα των ΕΑΜΜC σε όλες τις περιπτώσεις όπως δείχνεται στα σχήματα 28 έως 34, με ιδανικές δόσεις 250 ng/ml (n=1), 125 ng/ml (n=2), 62.5 ng/ml (n=3), 31.25 ng/ml (n=1) και εύρος ποσοστιαίας αύξησης από 17.5% έως 69% (σε μια περίπτωση ήταν και 80%).







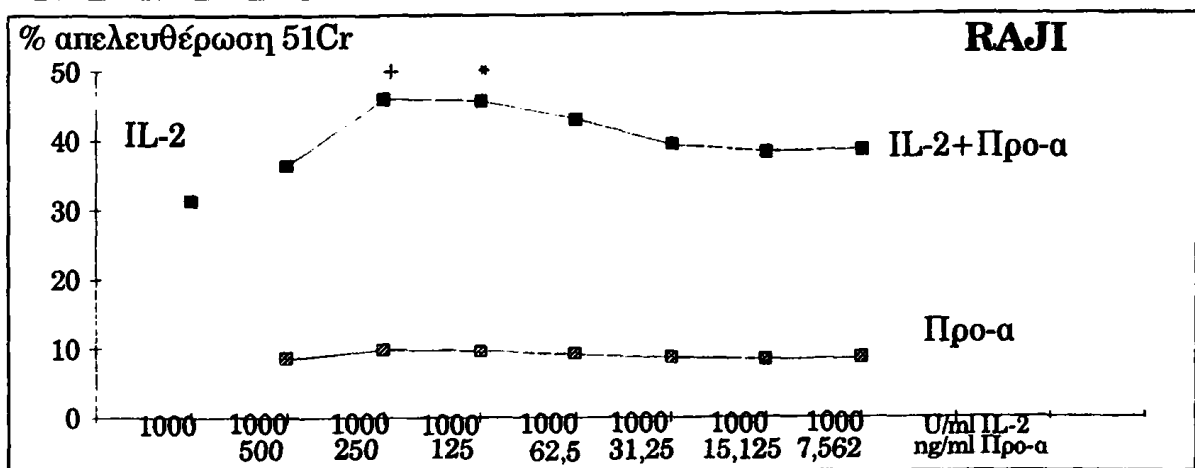
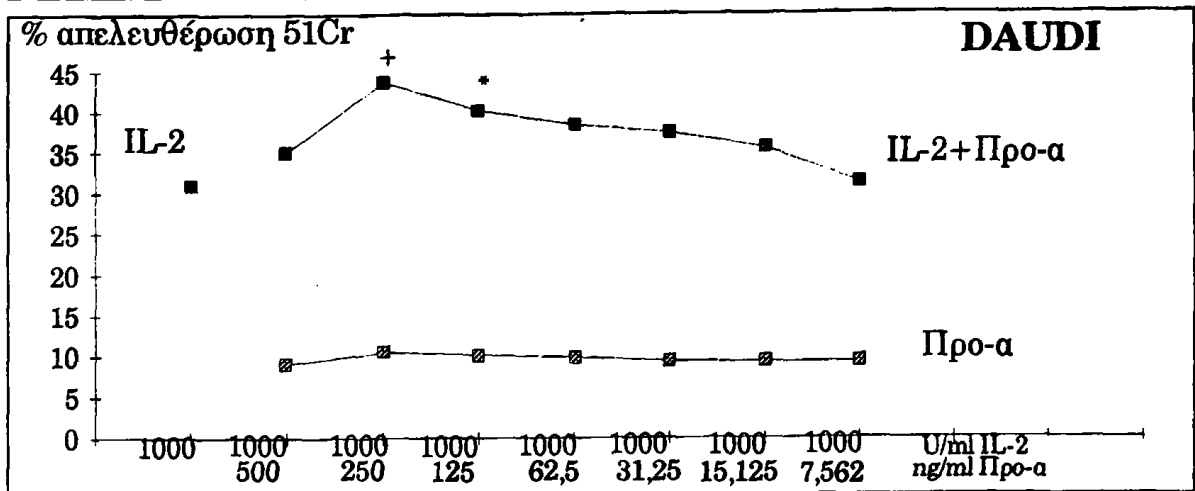
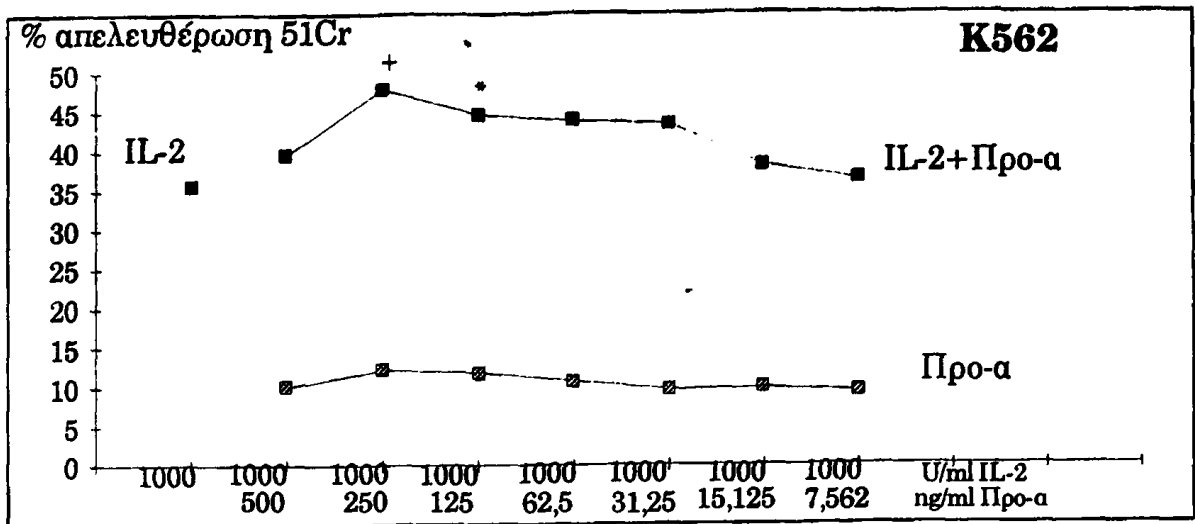
+:  $P < 0.01$

\*:  $P < 0.05$

**ΣΧΗΜΑ 28.** Κυτταροτοξική δράση των EAMNC έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών.

Δράση της Pro-a. Περίπτωση #(No) 22: Ca πνεύμονα. Στάδιο IV.



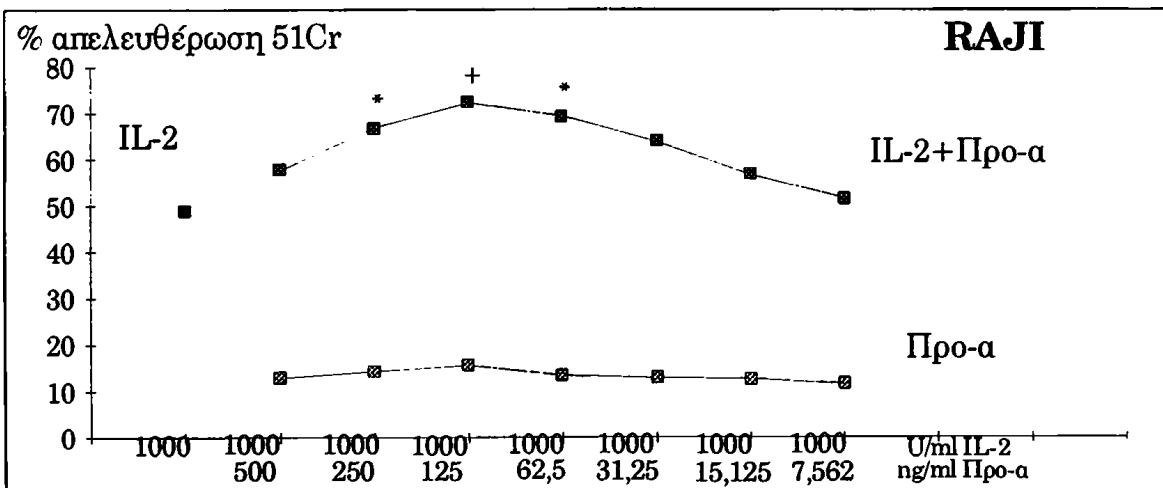
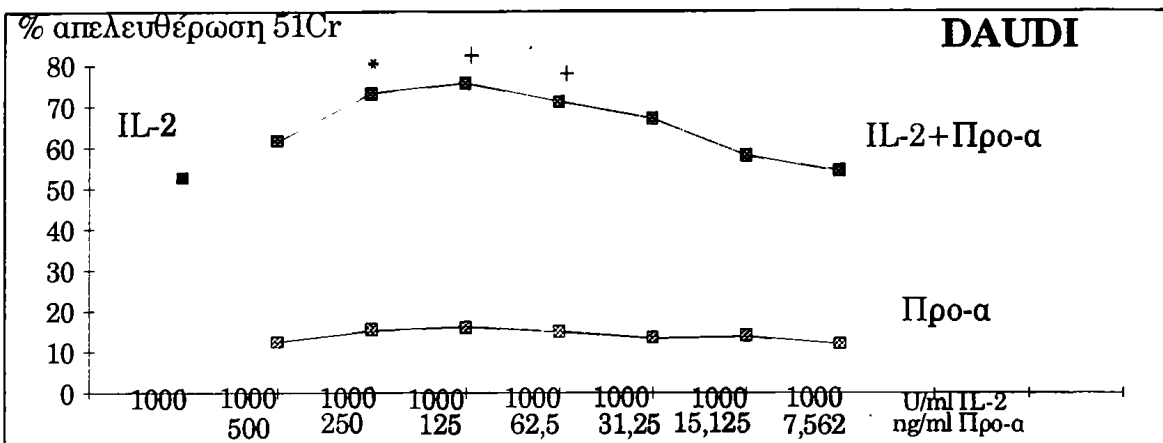
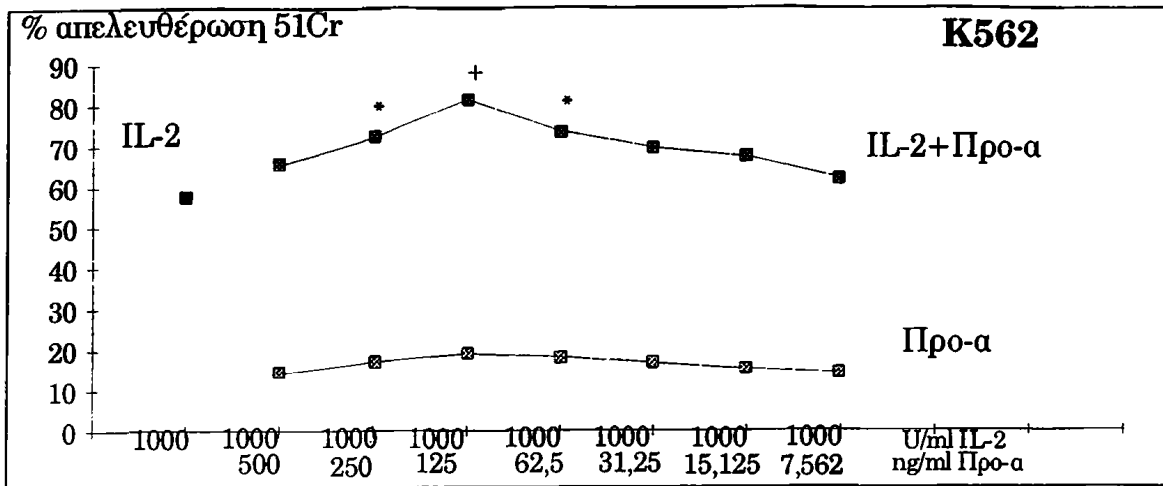


+ :  $P < 0.01$

\* :  $P < 0.05$

**ΣΧΗΜΑ 29.** Κυτταροτοξική δράση των ΕΑΜΝC έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών. Δράση της Προ-α. Περίπτωση # (No) 23: Ca πνεύμονα. Στάδιο IV.





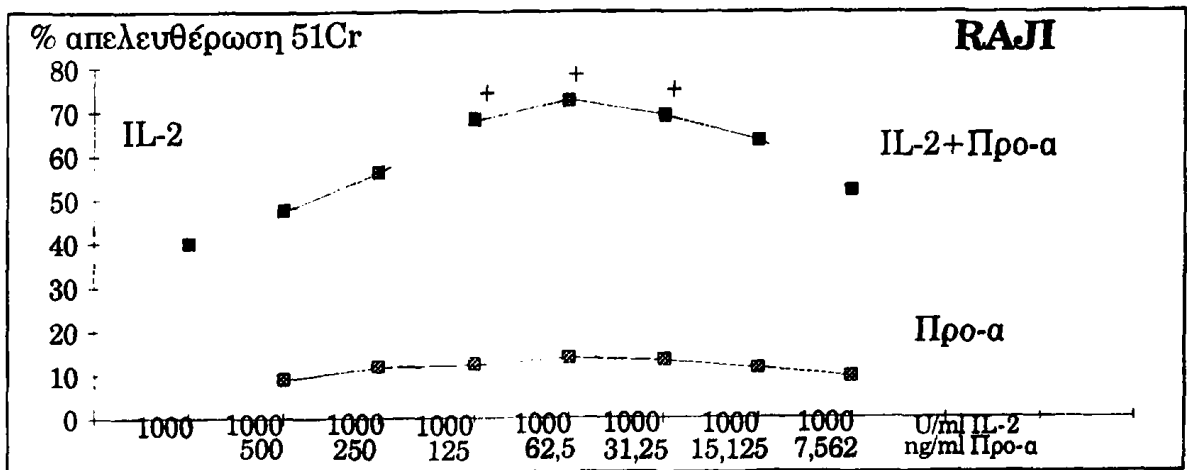
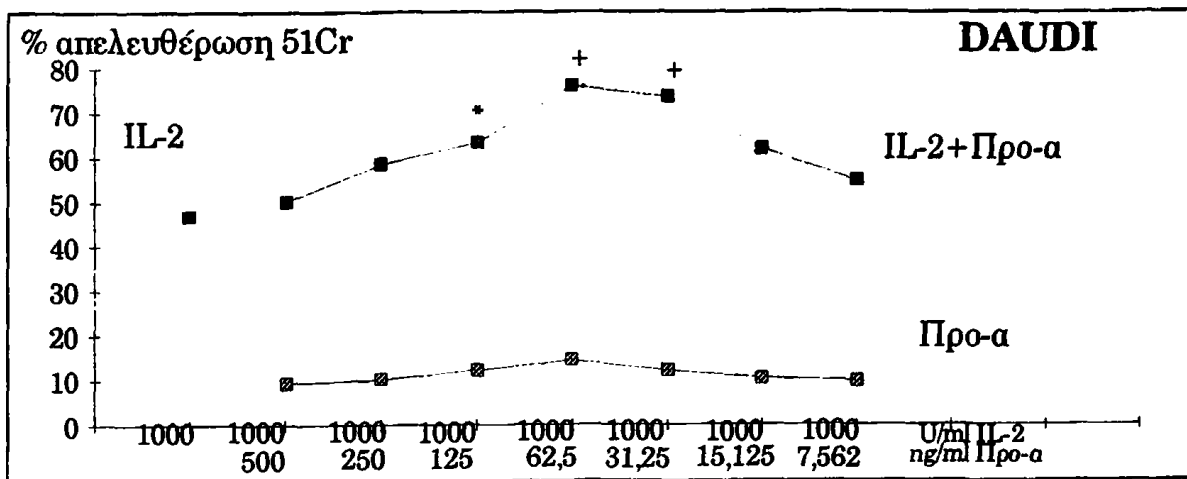
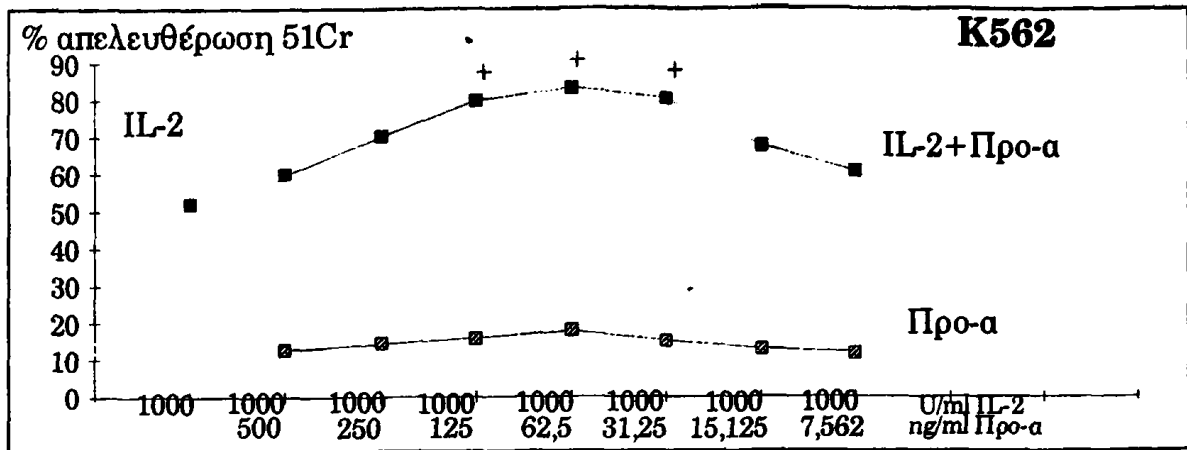
+:  $P < 0.01$

\*:  $P < 0.05$

**ΣΧΗΜΑ 30.** Κυτταροτοξική δράση των ΕΑΜΝC έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών.

Δράση της Προ-α. Περίπτωση # (No) 24: Ca πνεύμονα. Στάδιο II.



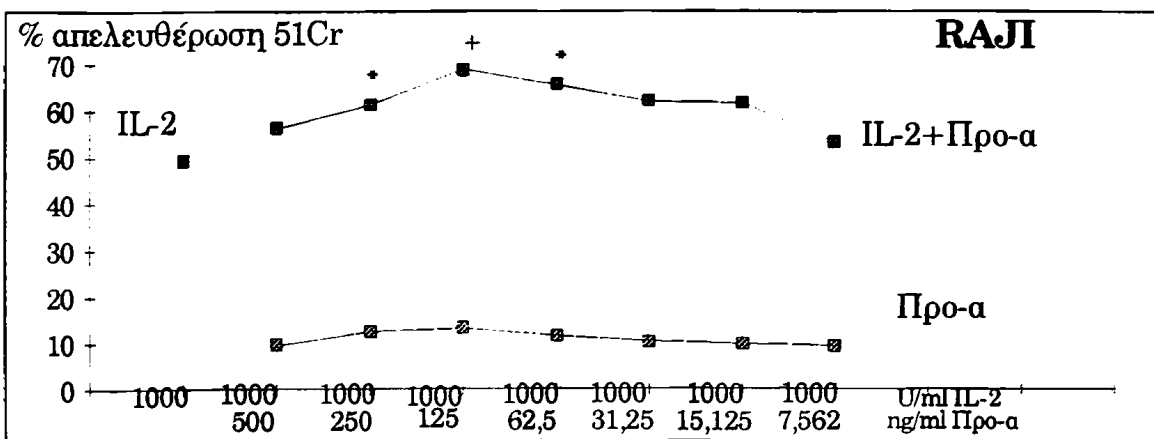
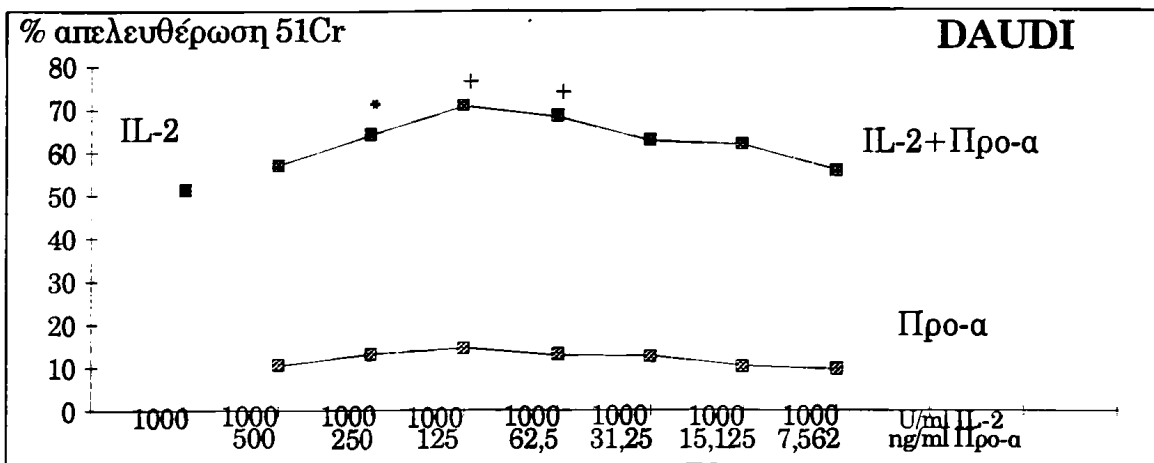
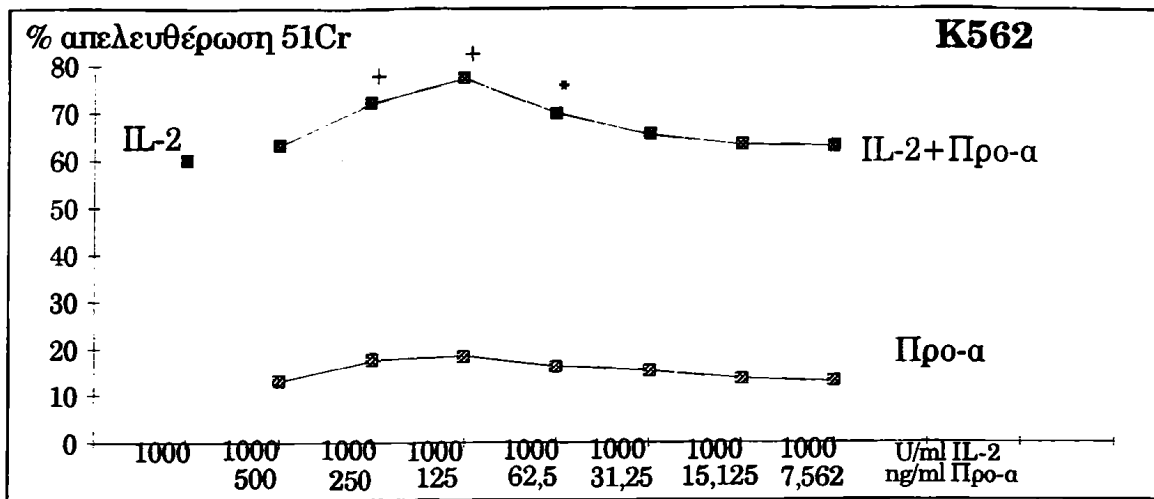


+:  $P < 0.01$

\*:  $P < 0.05$

**ΣΧΗΜΑ 31.** Κυτταροτοξική δράση των ΕΑΜΝC έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών. Δράση της Προ-α. Περίπτωση #(No) 25: Ca πνεύμονα. Στάδιο ΙΙΙ.





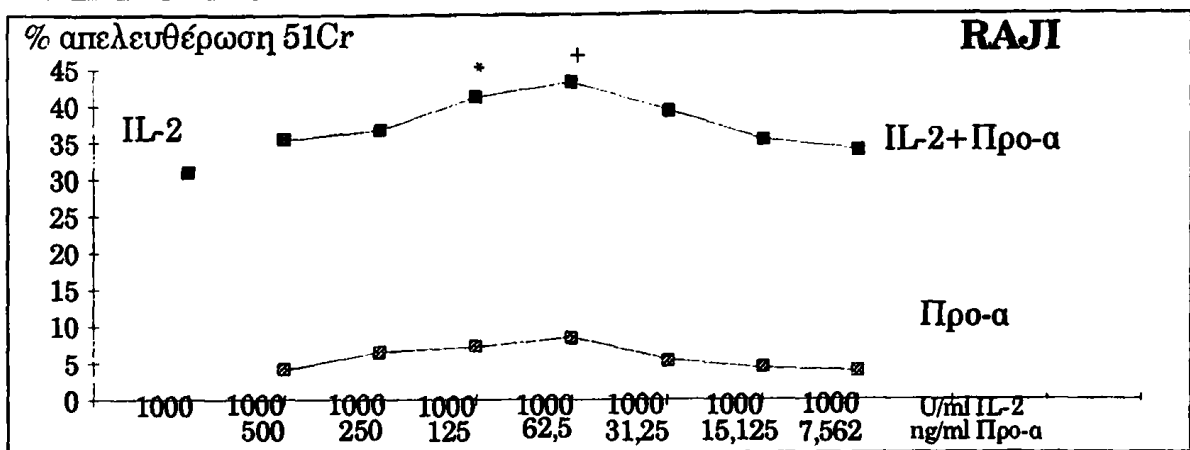
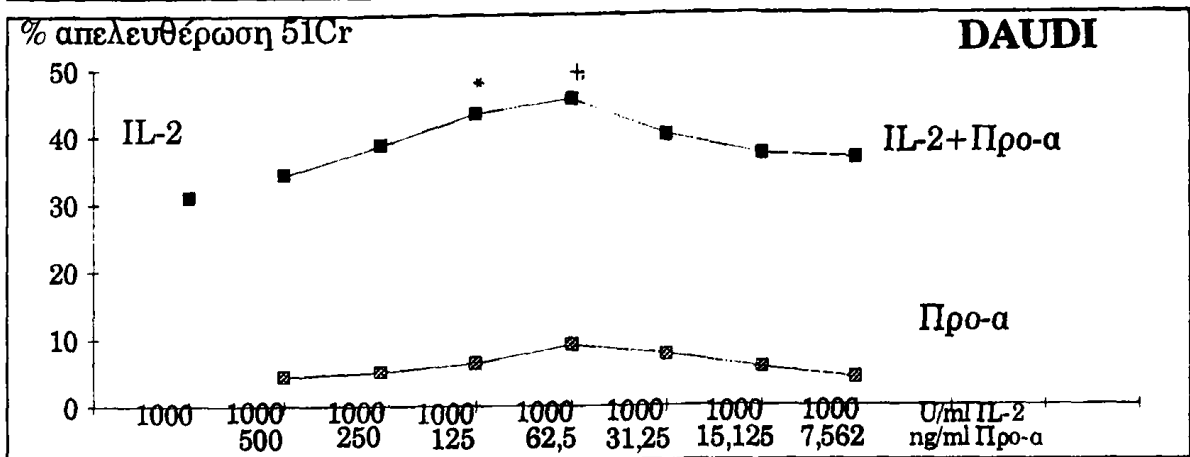
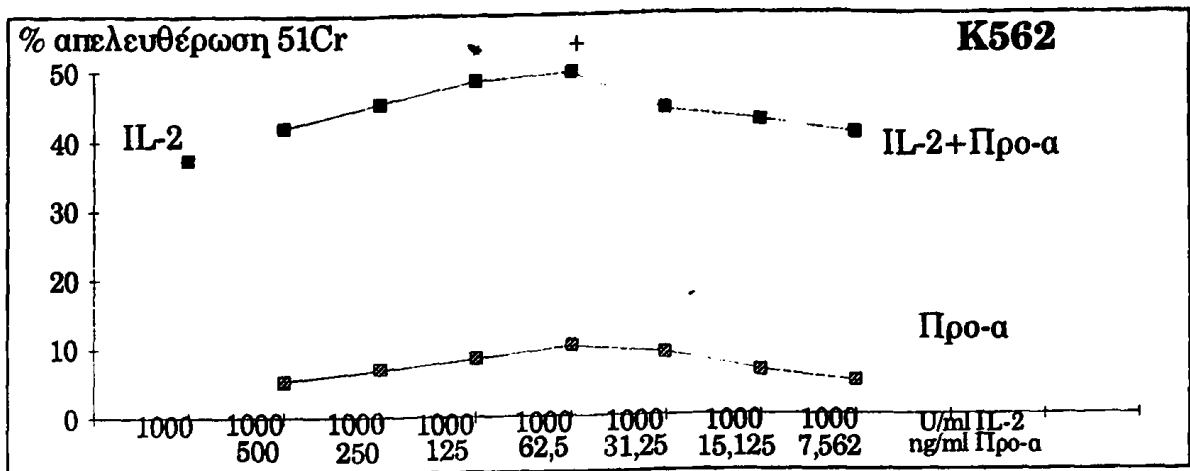
+:  $P < 0.01$

\*:  $P < 0.05$

**ΣΧΗΜΑ 32.** Κυτταροτοξική δράση των EAMNC έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών.

Δράση της Προ-α. Περίπτωση # (No) 26: Ca ωοθήκης. Στάδιο IV.





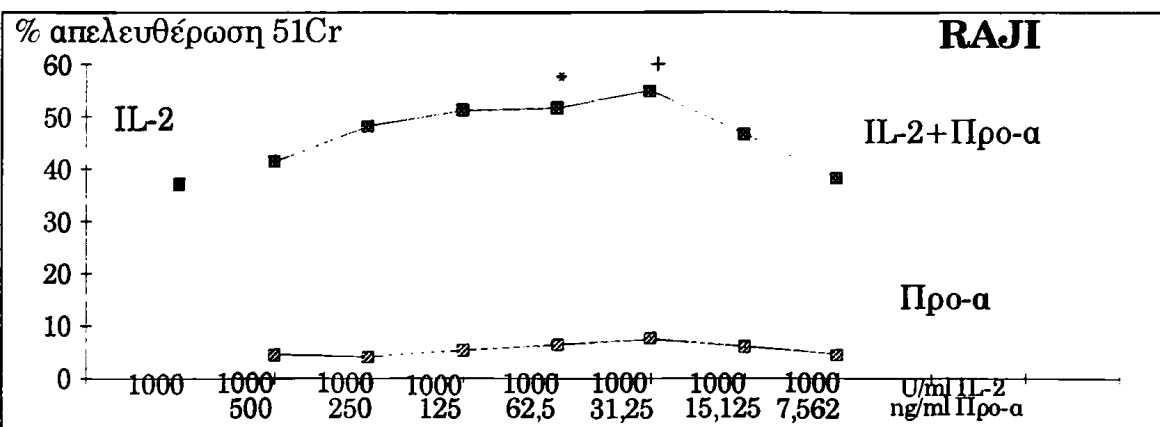
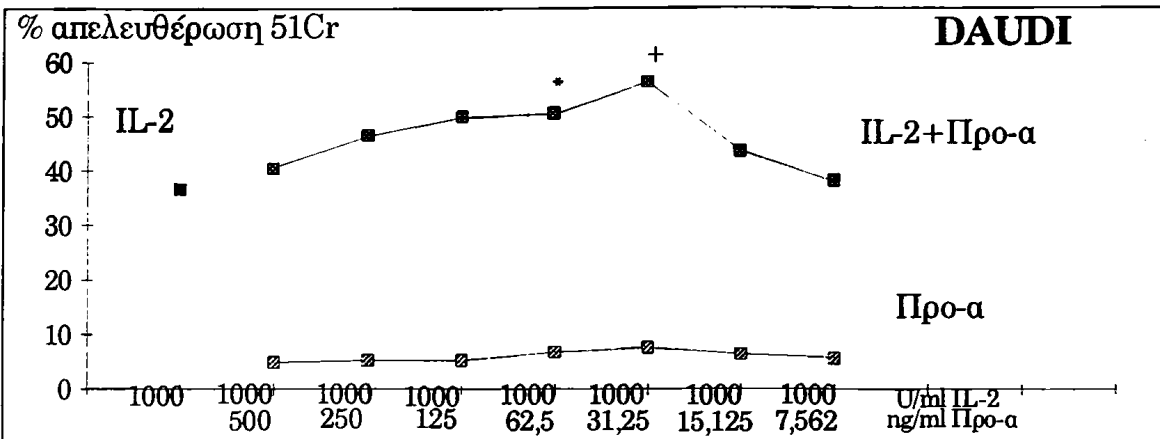
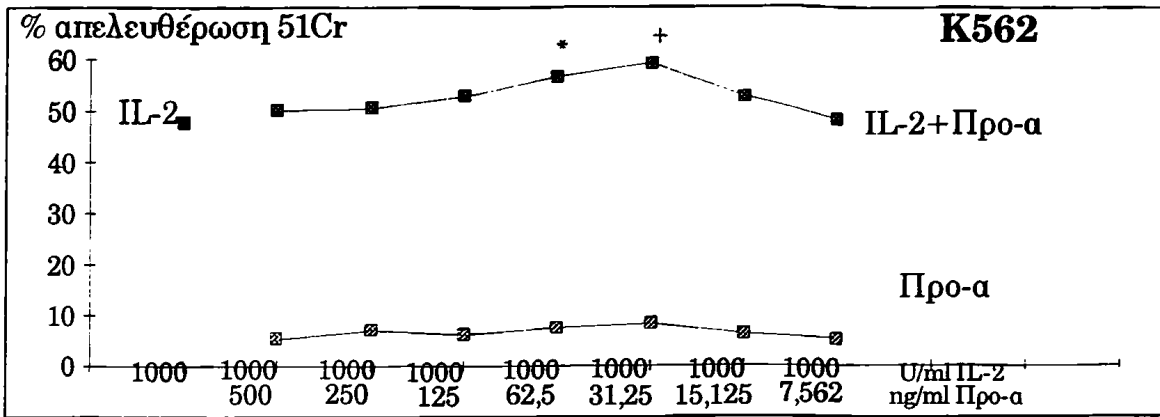
+:  $P < 0.01$

\*:  $P < 0.05$

**ΣΧΗΜΑ 33.** Κυτταροτοξική δράση των ΕΑΜΝC έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών.

Δράση της Προ-α. Περίπτωση # (No) 27: Ca ωοθήκης. Στάδιο III.





+: P<0.01

\*: P<0.05

**ΣΧΗΜΑ 34.** Κυτταροτοξική δράση των ΕΑΜΝC έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών. Δράση της Προ-α. Περίπτωση #(No) 28: Ca ωοθήκης. Στάδιο IV.



**Συnergιστική δράση ProTa στα LAK κύτταρα.**

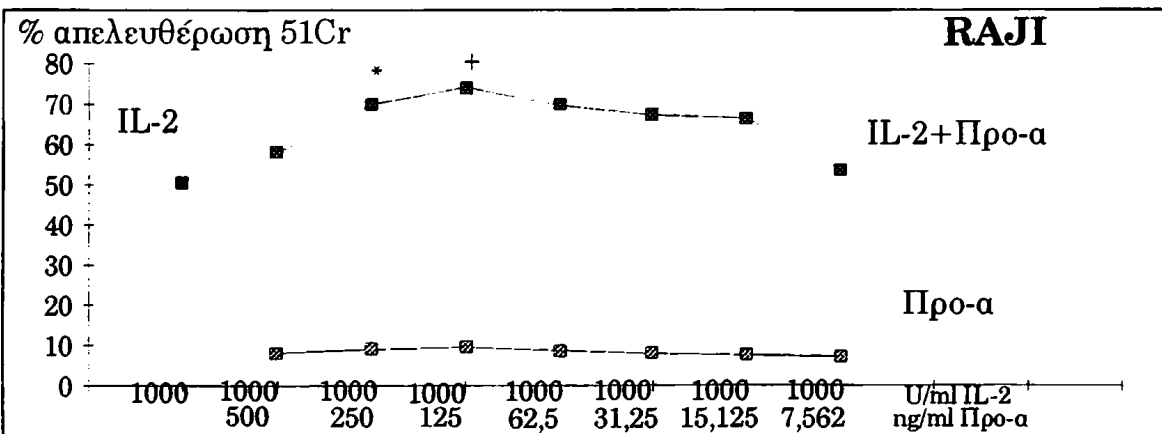
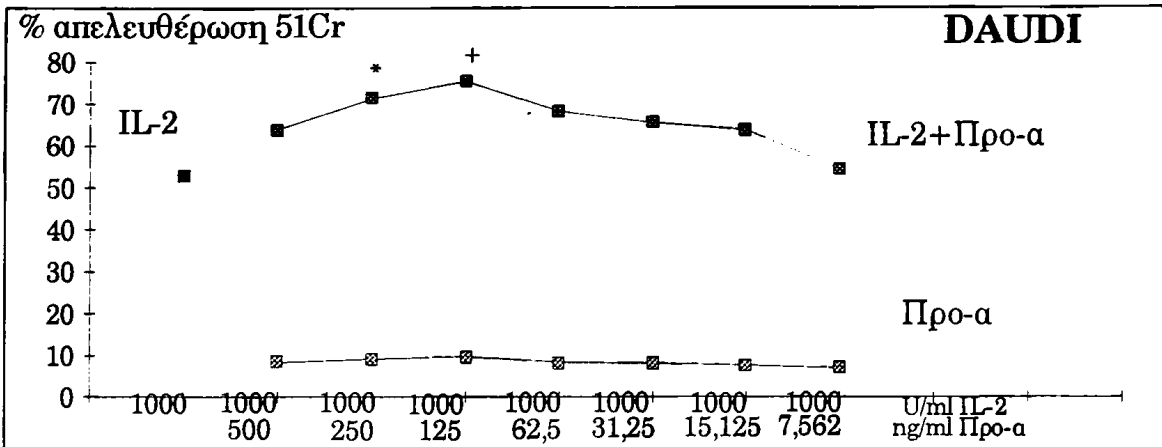
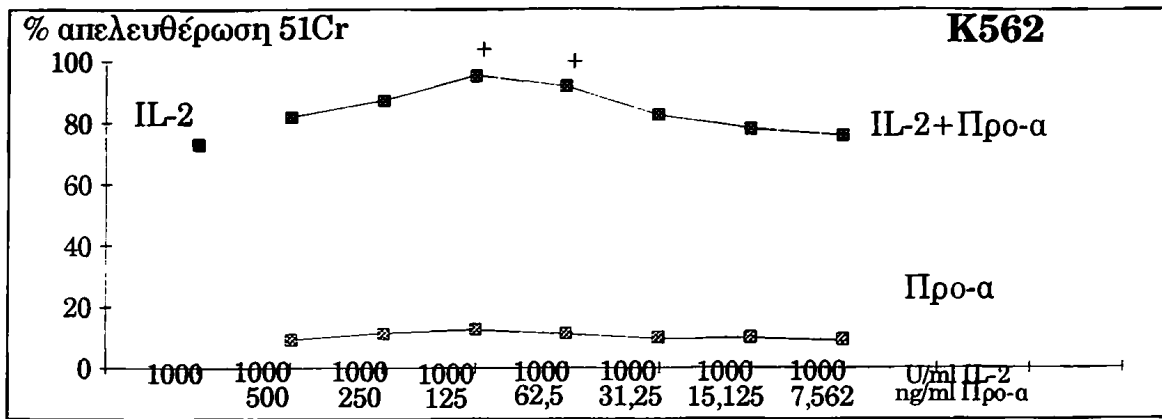
Τα μονοπύρηννα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος μετά από καλλιέργεια 5 ημερών με IL-2 ενεργοποιούνται (LAK κύτταρα) και είναι ικανά να καταστρέφουν μια πληθώρα καρκινικών σειρών μεταξύ των οποίων και τη K562, DAUDI και RAJI. Εξετάσθηκαν συνολικά λεμφοκύτταρα από 7 περιπτώσεις καρκίνου του μαστού (4 περιπτώσεις σταδίου IV και 3 περιπτώσεις σταδίου III), 3 από καρκίνο πνεύμονα (2 περιπτώσεις σταδίου IV και 1 περίπτωση σταδίου III) και 3 περιπτώσεις καρκίνου ωοθήκης (2 περιπτώσεις σταδίου III και 1 σταδίου II).

Όπως και στα προηγούμενα πειράματα η ProTa αύξησε σε στατιστικά σημαντικά επίπεδα τη δια της IL-2 επαγόμενη κυτταροτοξικότητα των LAK κυττάρων. Η δράση της παρατηρήθηκε σε όλες τις εξετασθείσες περιπτώσεις (σχήματα 35 έως 47) και η ενισχυτική δράση της επιτεύχθηκε σε ένα εύρος συγκεντρώσεων που ήταν: 250 ng/ml (n=2), 125 ng/ml (n=5), 62,5 ng/ml (n=6) και τα ποσοστά αύξησης ήταν από 17% (σε μια περίπτωση ήταν 11.8%) έως 58% (σε δύο περιπτώσεις έφθασε το 80%).

Αξίζει να σημειωθεί ότι σε όλες τις περιπτώσεις των TIL, EAMNC και LAK η ιδανική δόση της ProTa για την αύξηση της κυτταροτοξικότητας ήταν η ίδια και για τις τρεις καρκινικές σειρές στον ίδιο ασθενή.





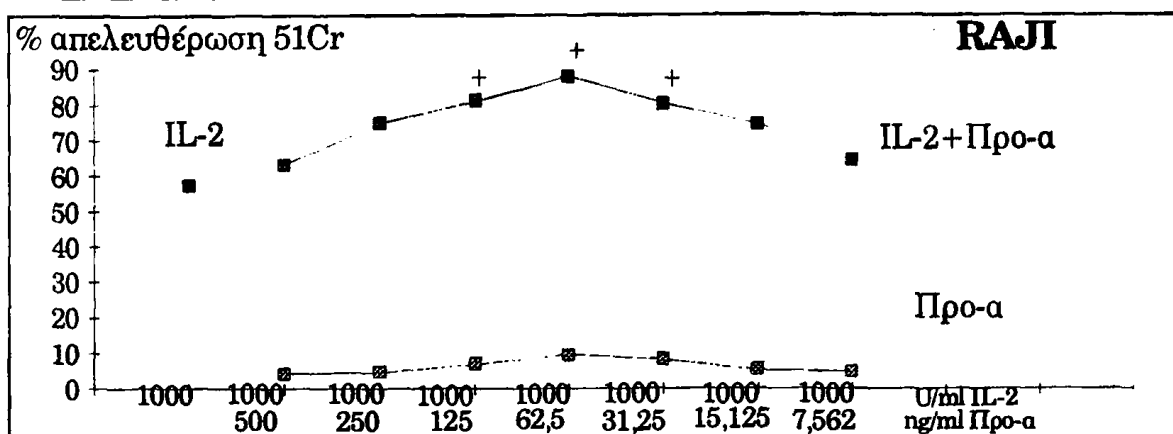
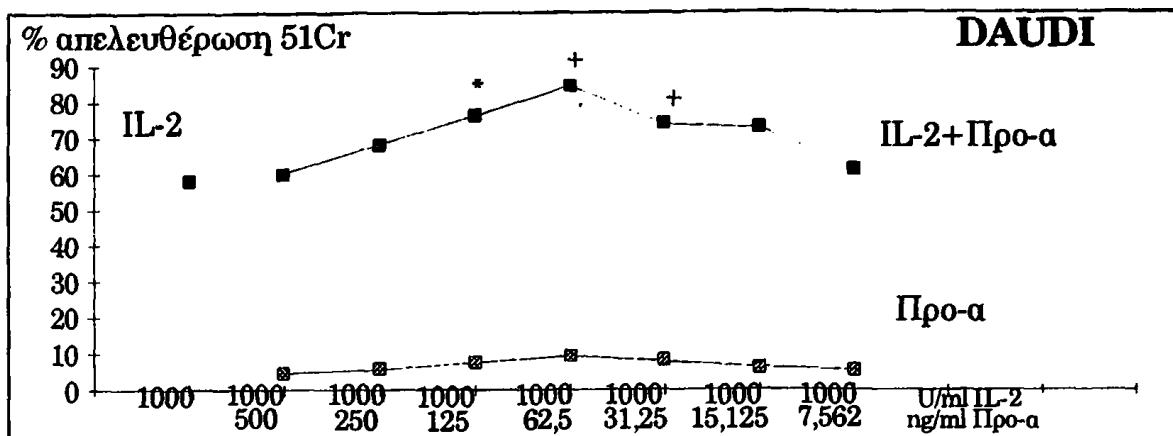
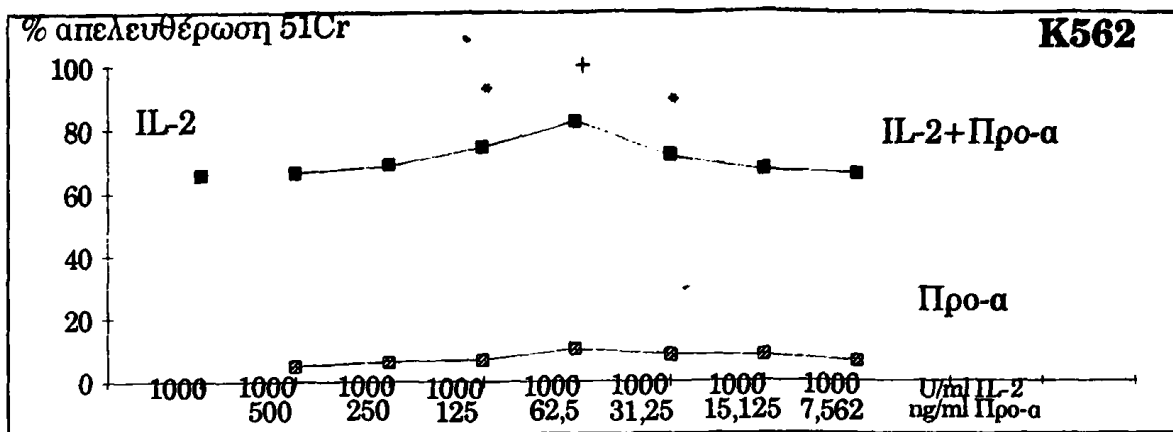


+: P<0.01

\*: P<0.05

**ΣΧΗΜΑ 35.** Κυτταροτοξική δράση των LAK κυττάρων έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών. Δράση της Προ-α. Περίπτωση # (No) 29. Ca μαστού. Στάδιο IV.



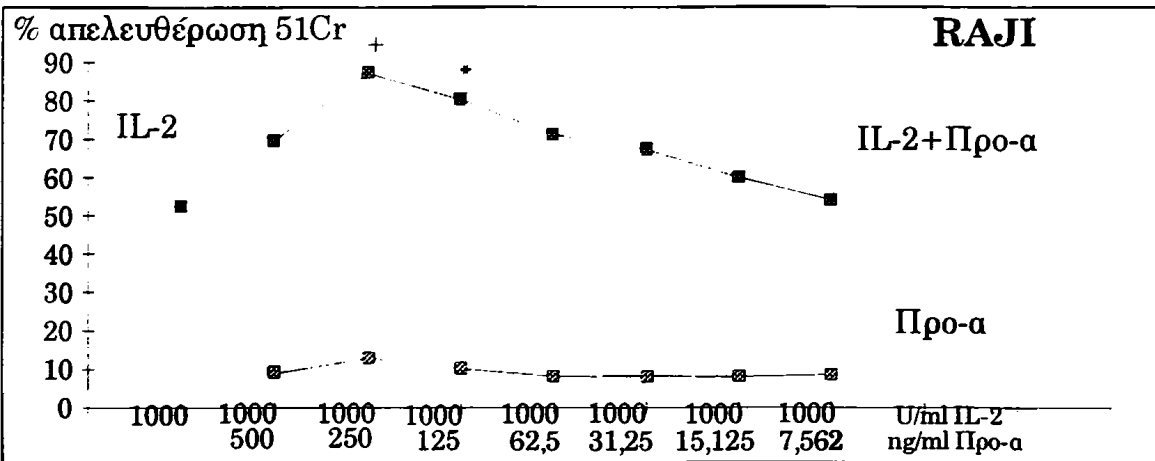
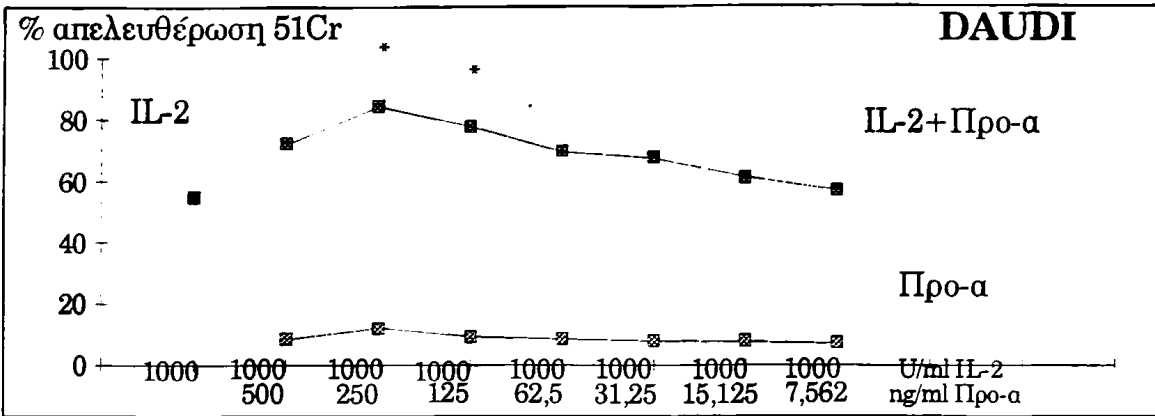
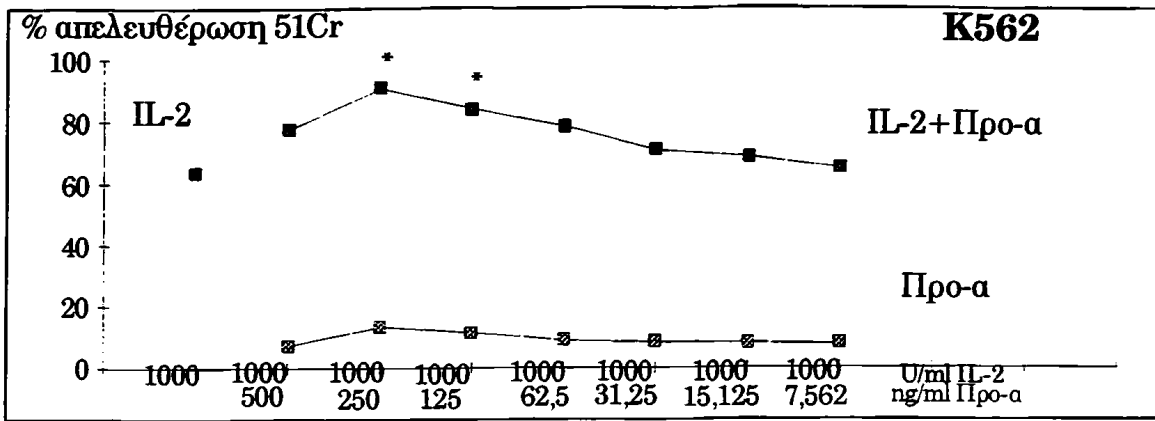


+: P<0.01

\*: P<0.05

**ΣΧΗΜΑ 36.** Κυτταροτοξική δράση των LAK κυττάρων έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών. Δράση της Προ-α. Περίπτωση # (No) 30. Ca μαστού. Στάδιο III.



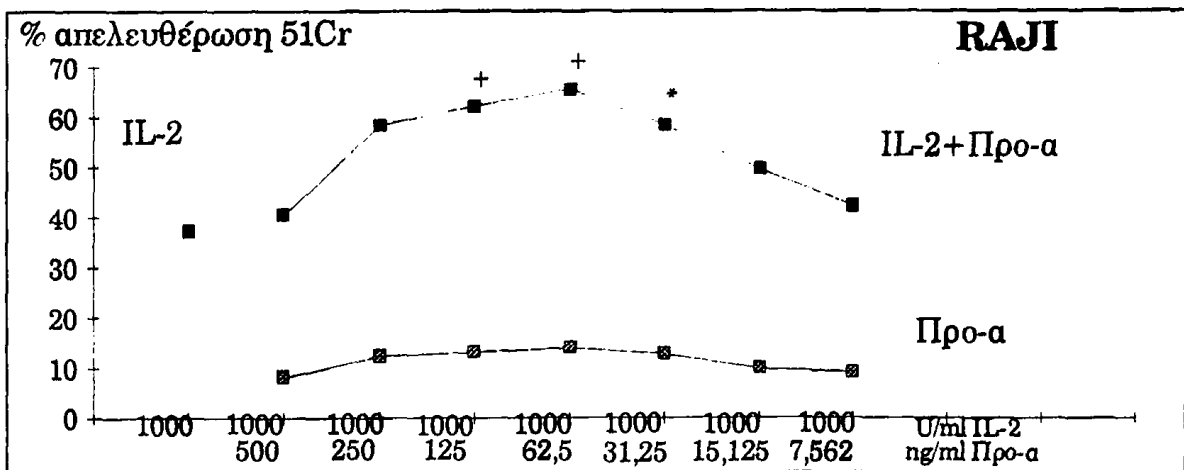
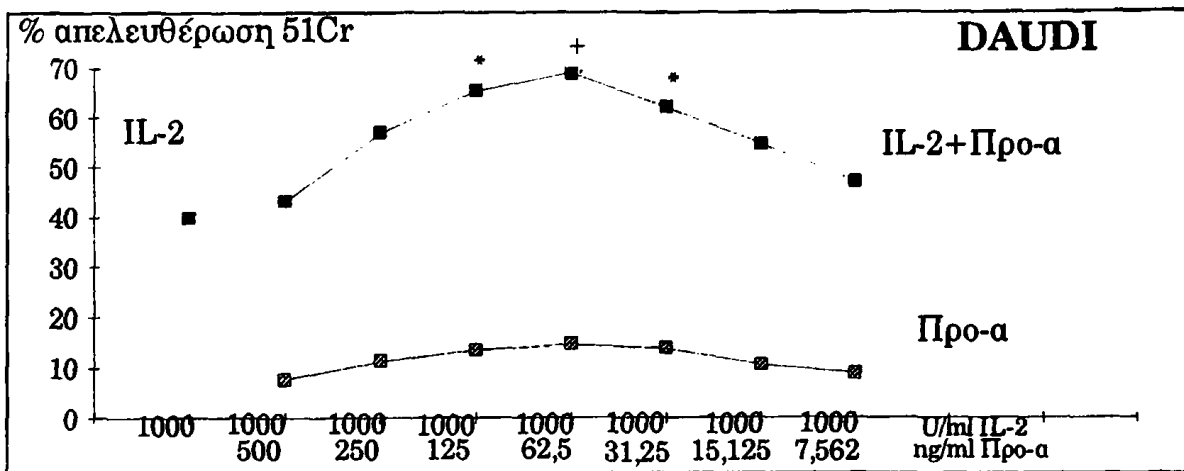
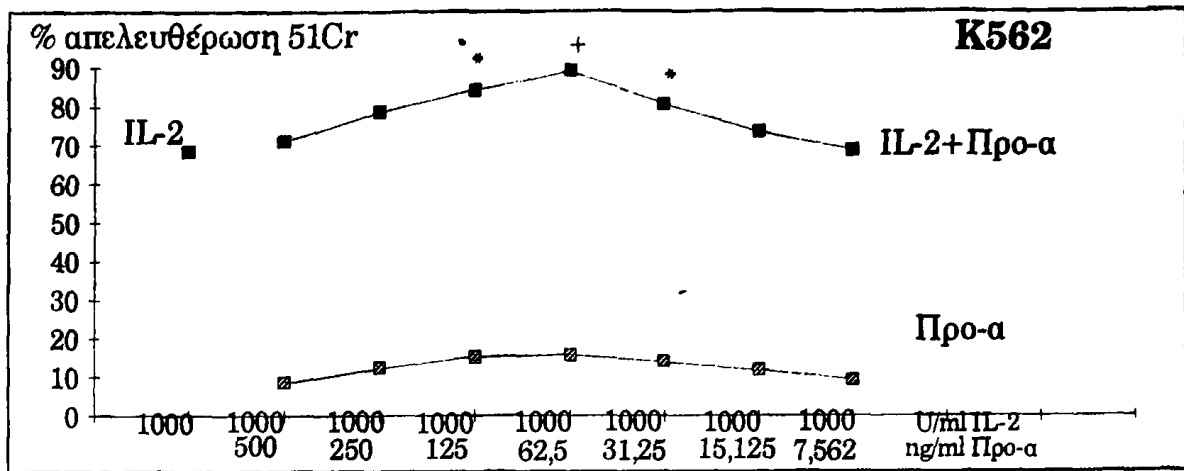


+: P<0.01

\*: P<0.05

**ΣΧΗΜΑ 37.** Κυτταροτοξική δράση των LAK κυττάρων έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών. Δράση της Προ-α. Περίπτωση # (No) 31. Ca μαστού. Στάδιο IV.



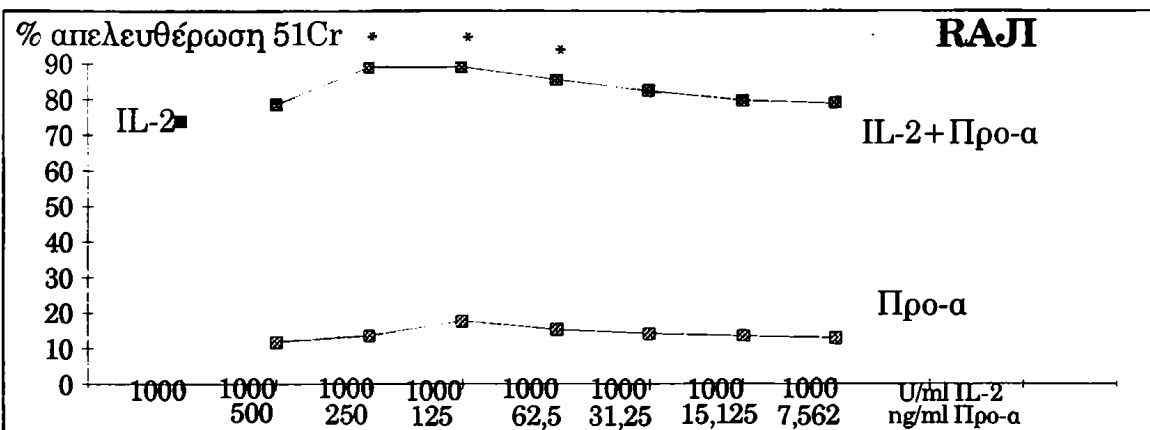
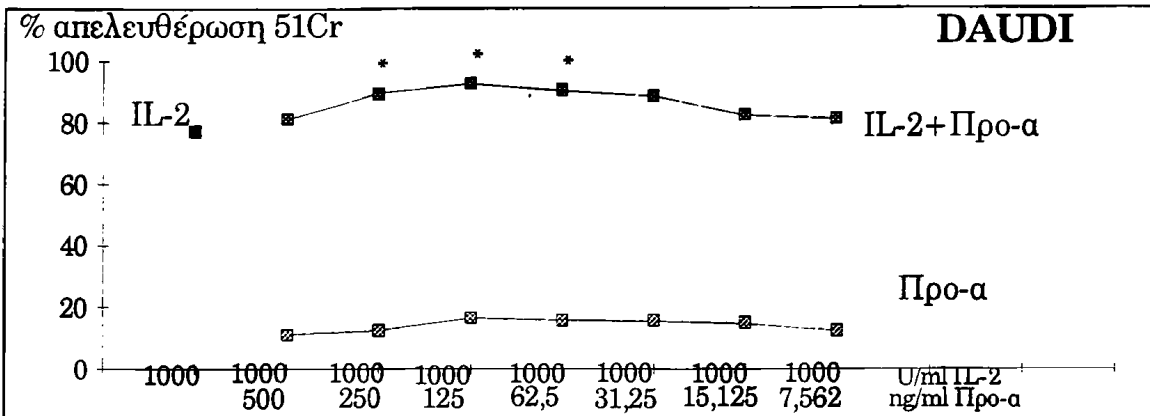
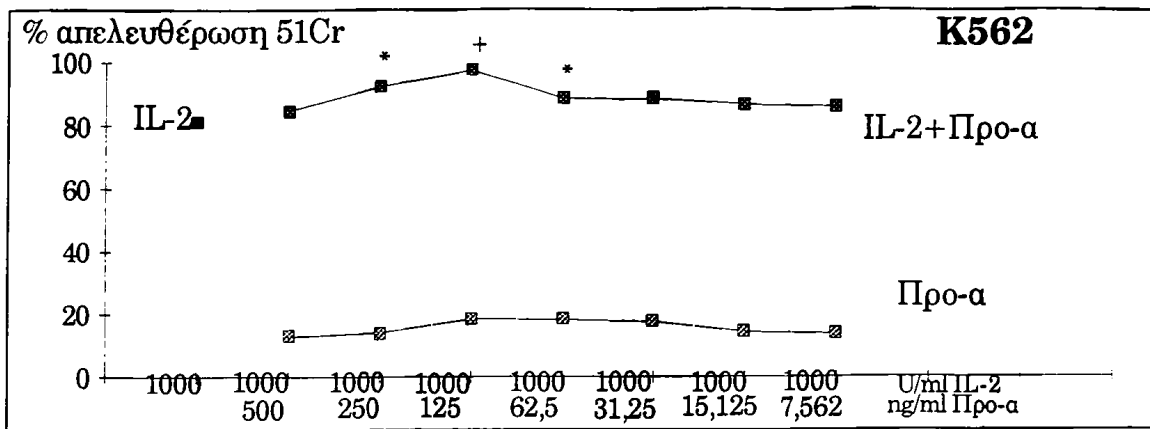


+:  $P < 0.01$

\*:  $P < 0.05$

**ΣΧΗΜΑ 38.** Κυτταροτοξική δράση των LAK κυττάρων έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών. Δράση της Προ-α. Περίπτωση # (No) 32. Ca μαστού. Στάδιο III.



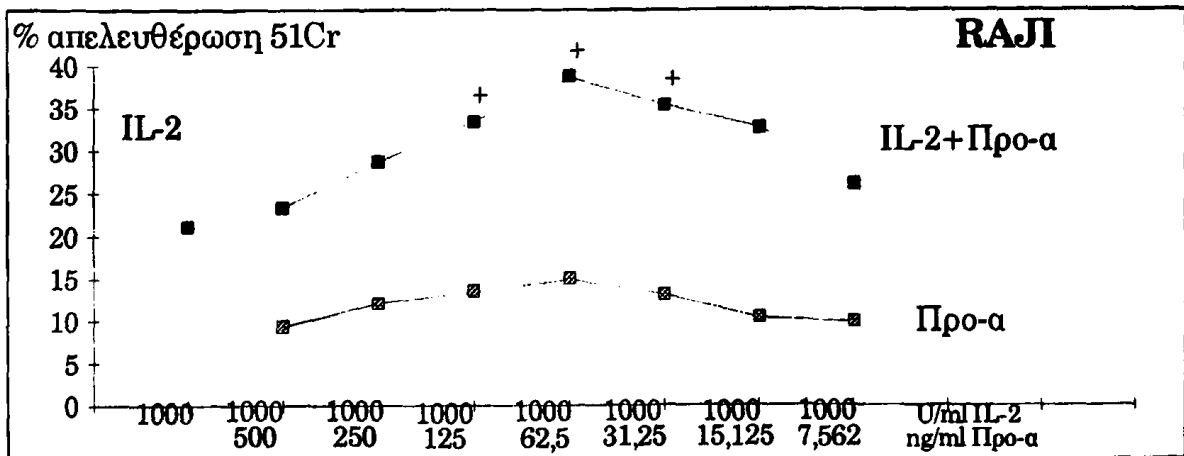
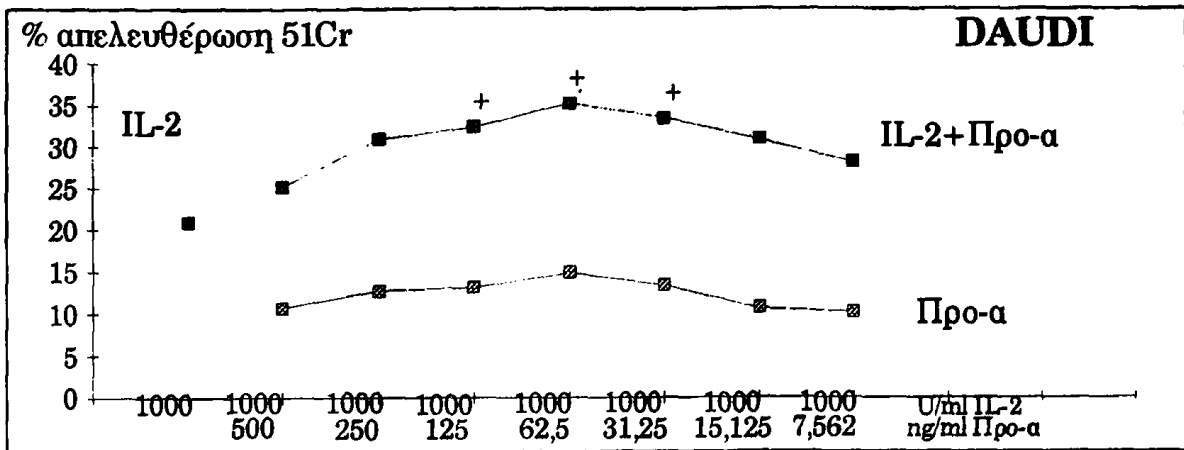
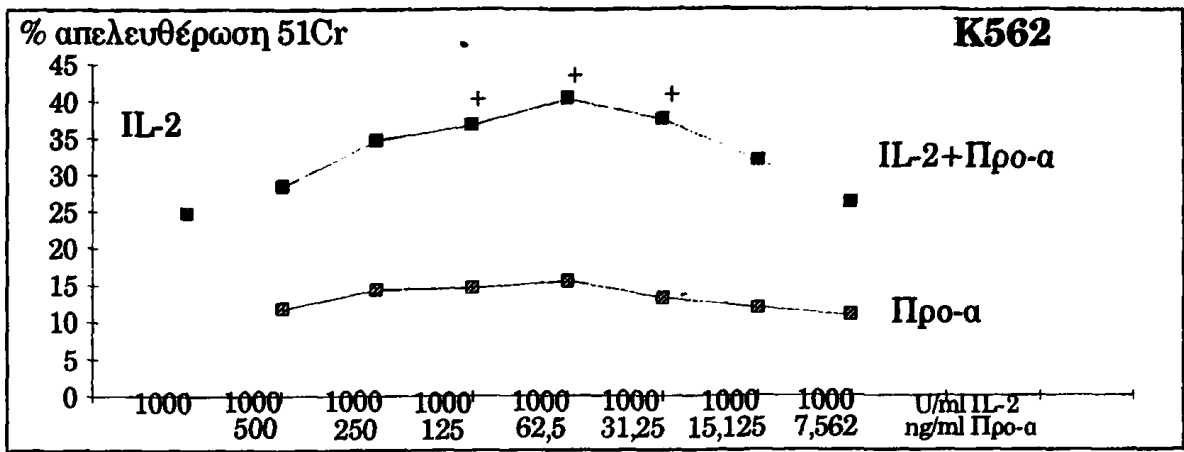


+: P<0.01

\*: P<0.05

**ΣΧΗΜΑ 39.** Κυτταροτοξική δράση των LAK κυττάρων έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών. Δράση της Προ-α. Περίπτωση #(No) 33.Ca μαστού. Στάδιο IV.

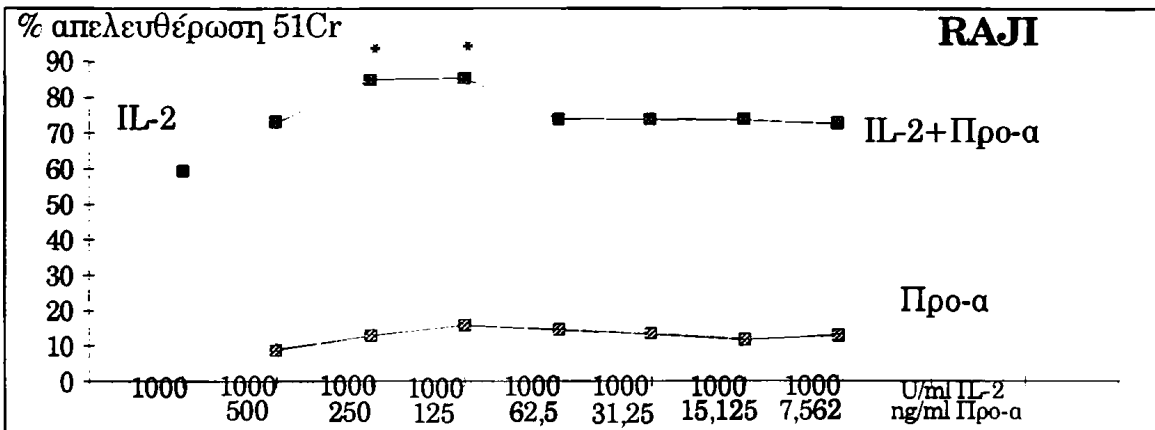
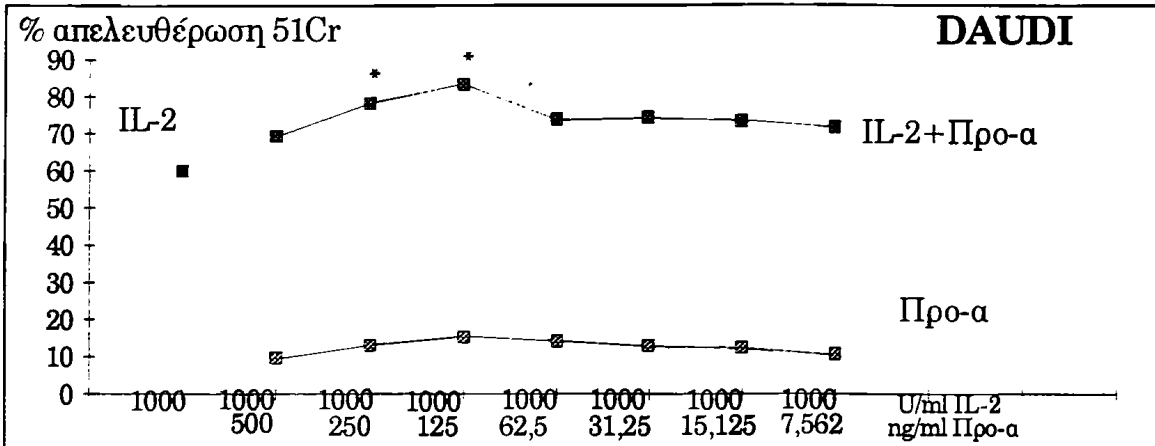
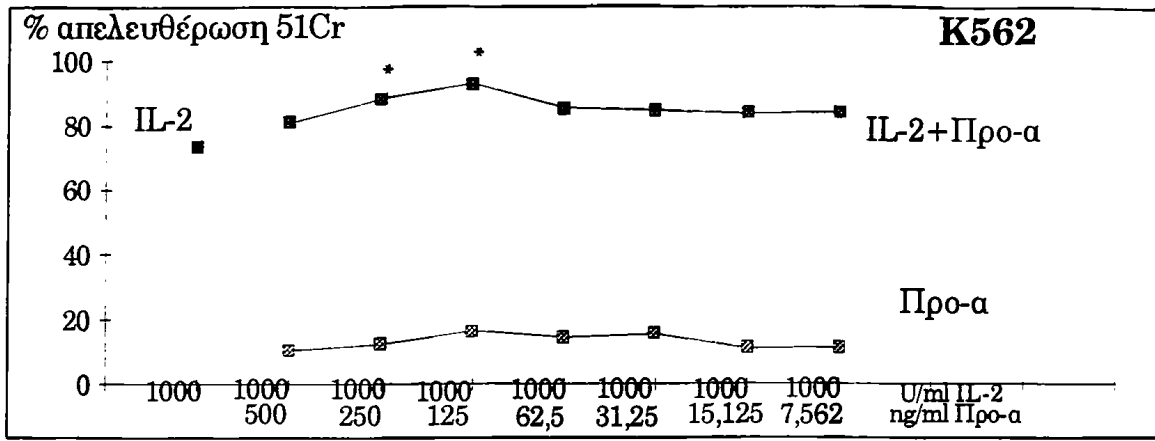




+:  $P < 0.01$

**ΣΧΗΜΑ 40.** Κυτταροτοξική δράση των LAK κυττάρων έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών. Δράση της Προ-α. Περίπτωση # (No) 34. Ca μαστού. Στάδιο III.

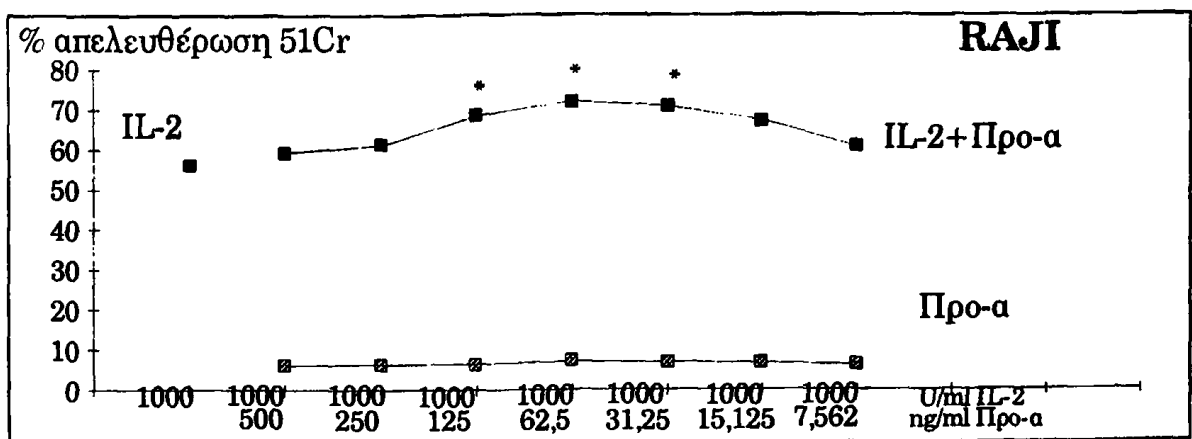
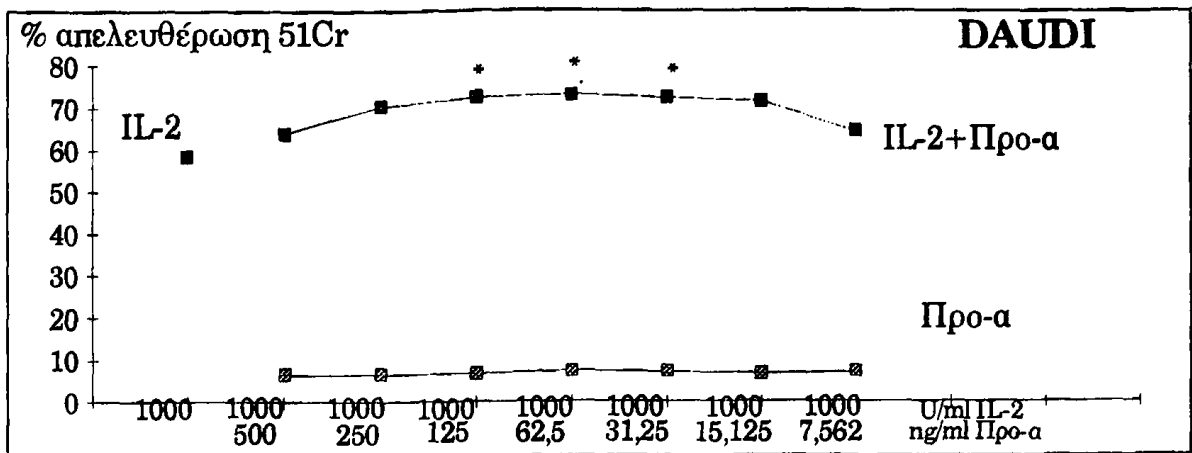
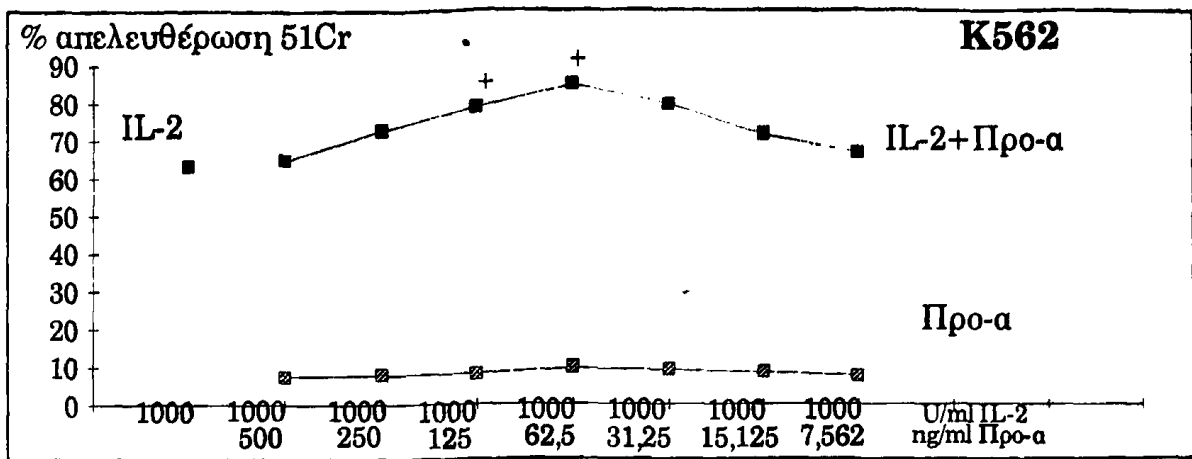




\*: P < 0.05

**ΣΧΗΜΑ 41.** Κυτταροτοξική δράση των LAK κυττάρων έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών. Δράση της Προ-α. Περίπτωση # (No) 35. Ca μαστού. Στάδιο IV.



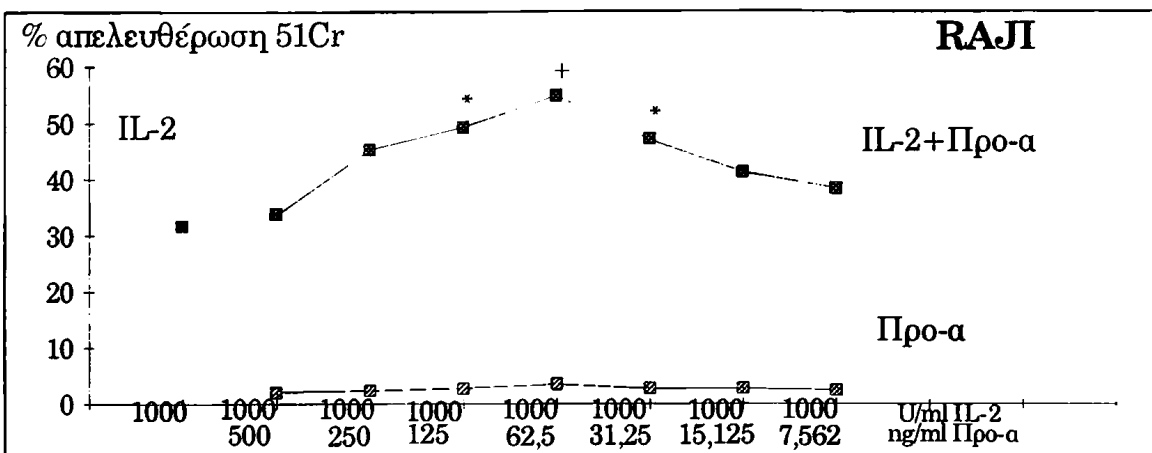
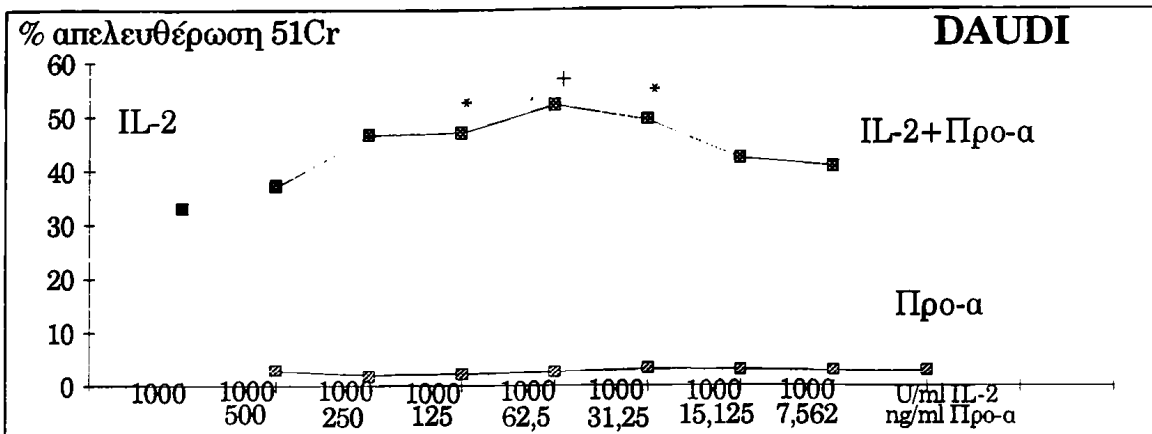
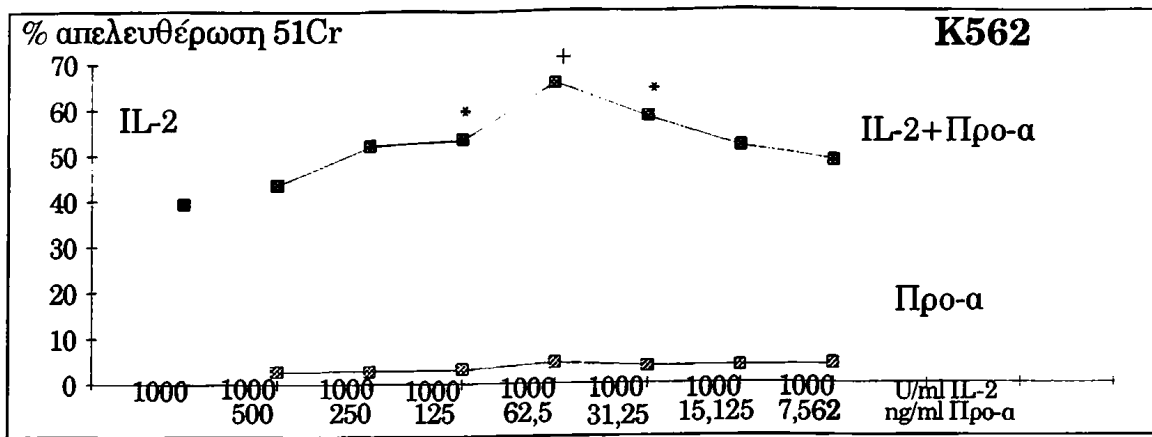


+: . P<0.01  
 \*: P<0.05

**ΣΧΗΜΑ 42.** Κυτταροτοξική δράση των LAK κυττάρων έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών. Δράση της Προ-α. Περίπτωση # (No) 36.Ca πνεύμονα. Στάδιο IV.



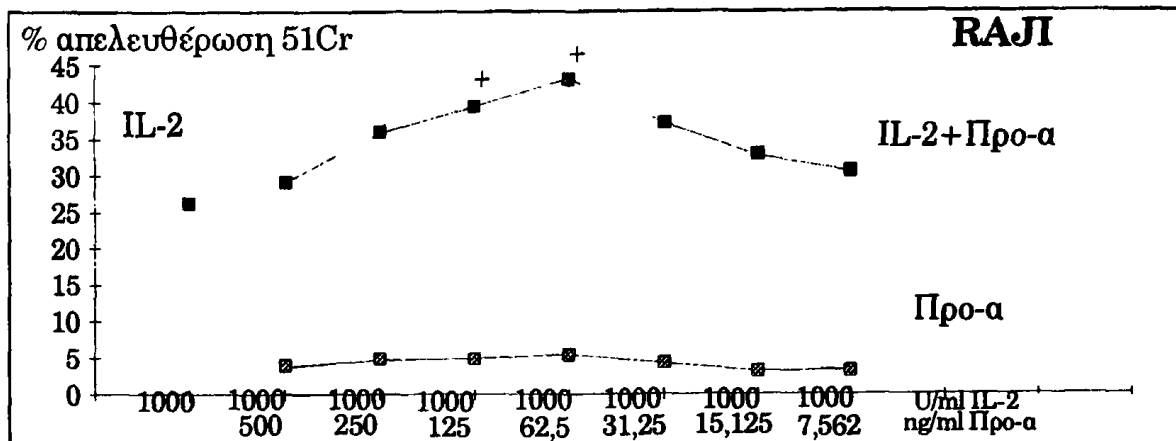
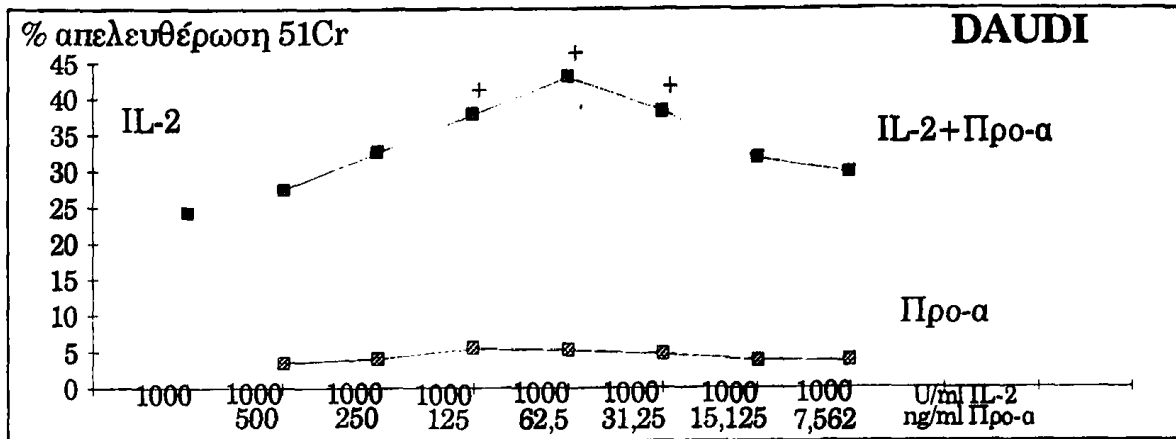
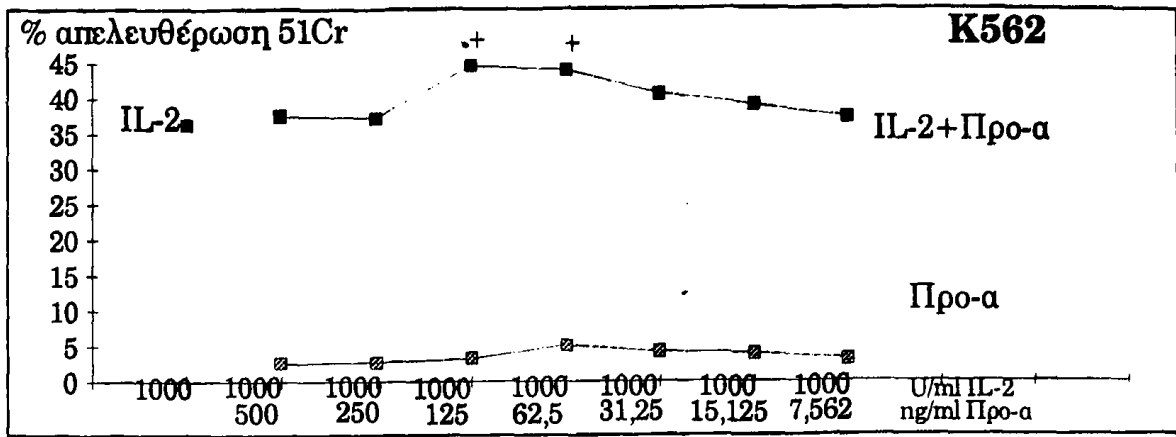




+: P<0.01  
\*: P<0.05

**ΣΧΗΜΑ 43.** Κυτταροτοξική δράση των LAK κυττάρων έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών. Δράση της Προ-α. Περίπτωση #(No) 37.Ca πνεύμονα. Στάδιο IV.

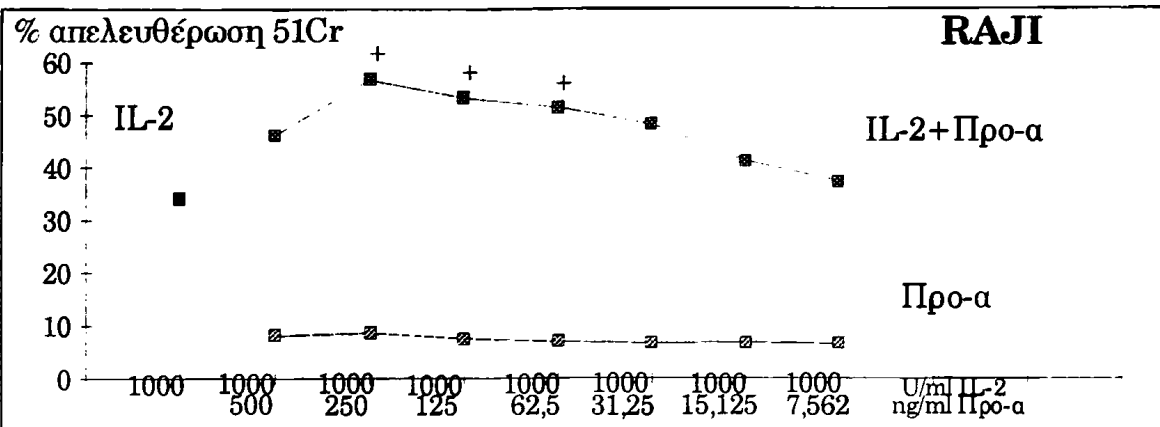
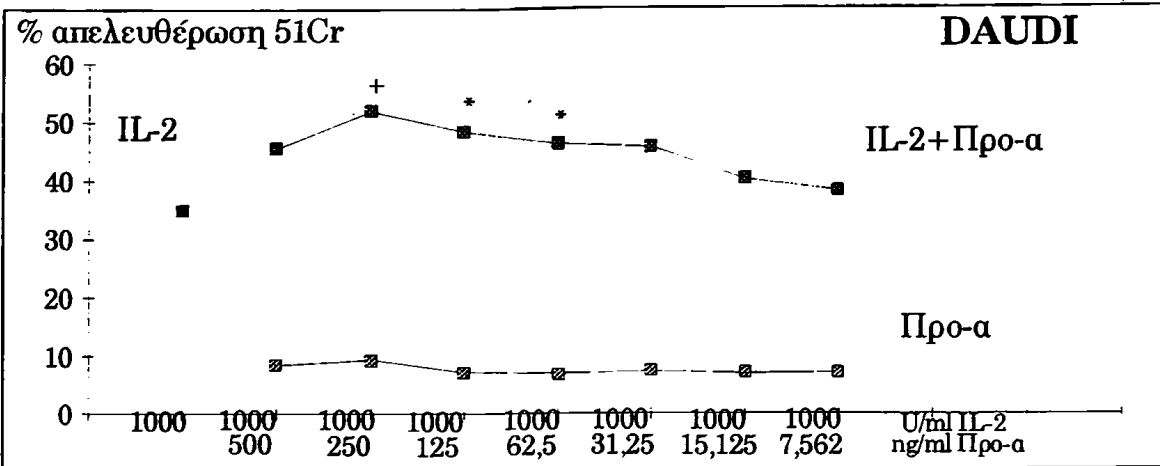
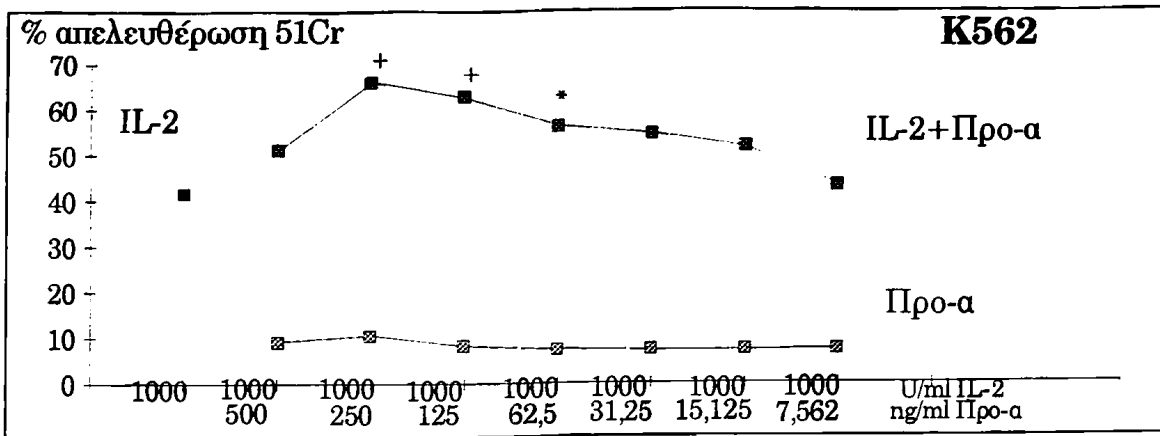




+ : P < 0.01

**ΣΧΗΜΑ 44.** Κυτταροτοξική δράση των LAK κυττάρων έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών. Δράση της Προ-α. Περίπτωση # (No) 38. Ca πνεύμονα. Στάδιο III.



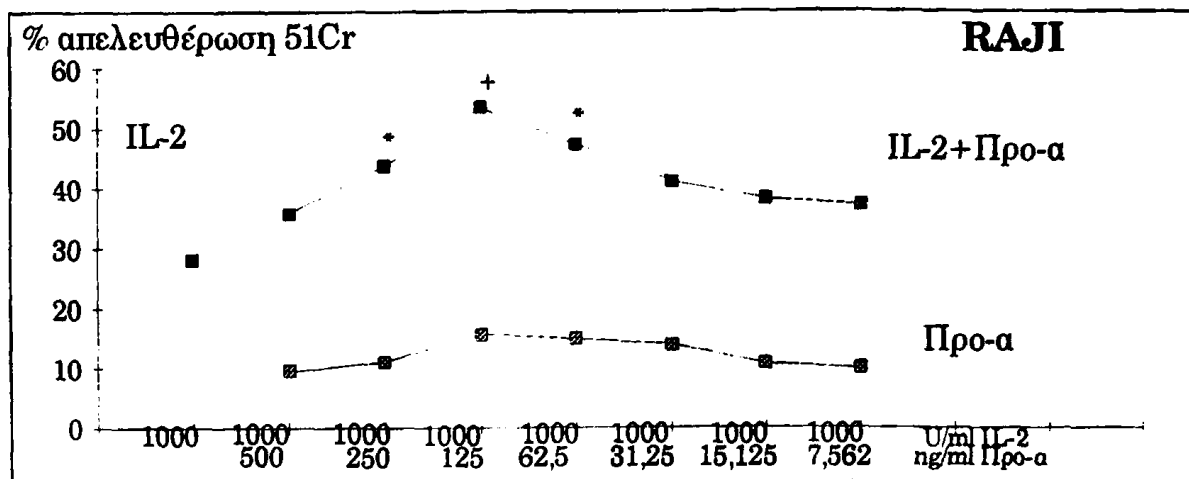
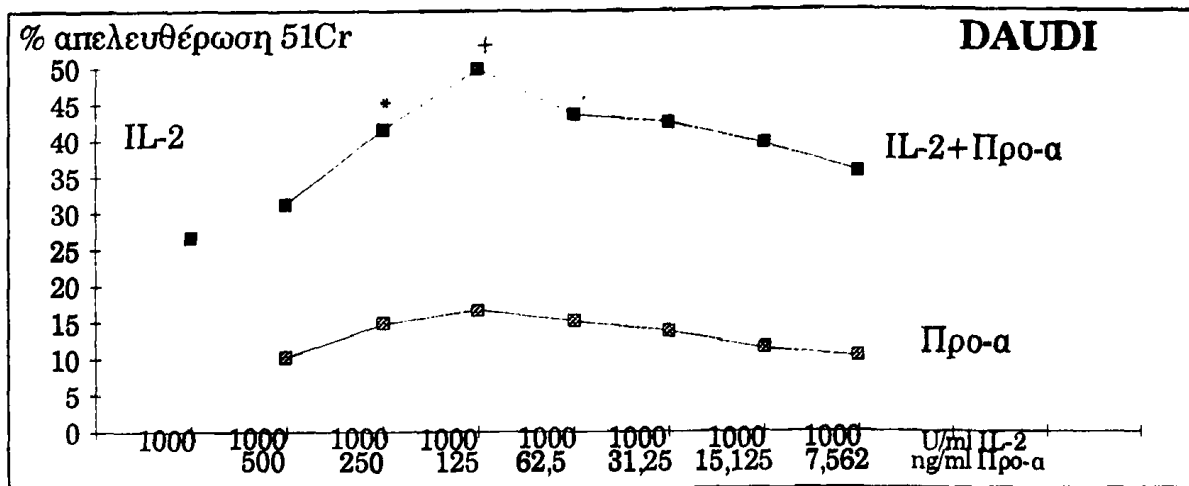
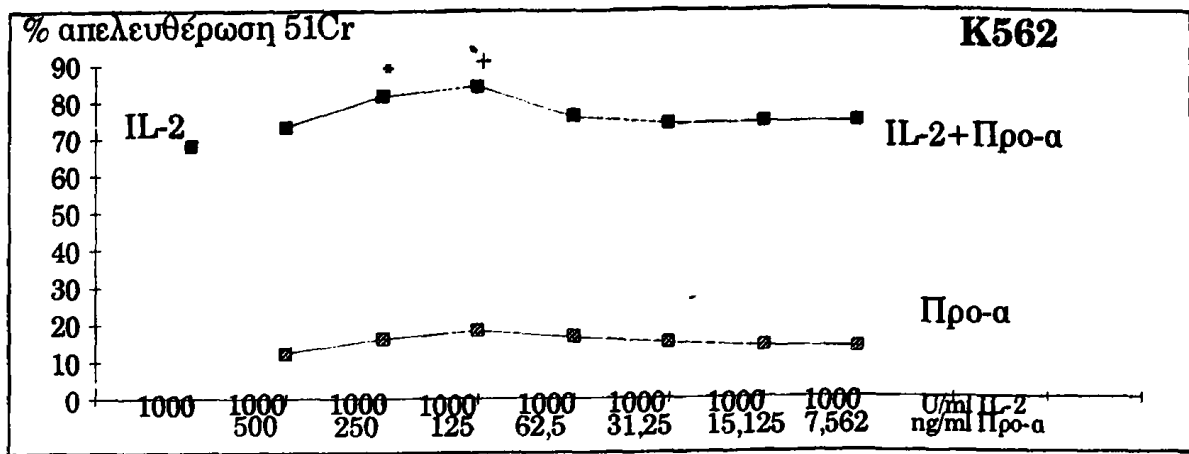


+: P < 0.01

\*: P < 0.05

**ΣΧΗΜΑ 45.** Κυτταροτοξική δράση των LAK κυττάρων έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών. Δράση της Προ-α. Περίπτωση #(No) 39.Ca ωθήκης. Στάδιο III.

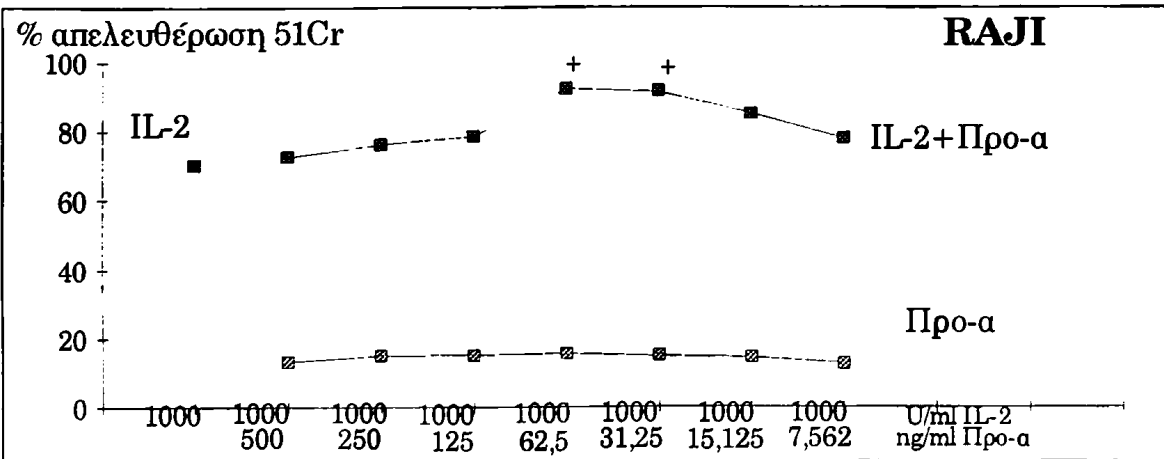
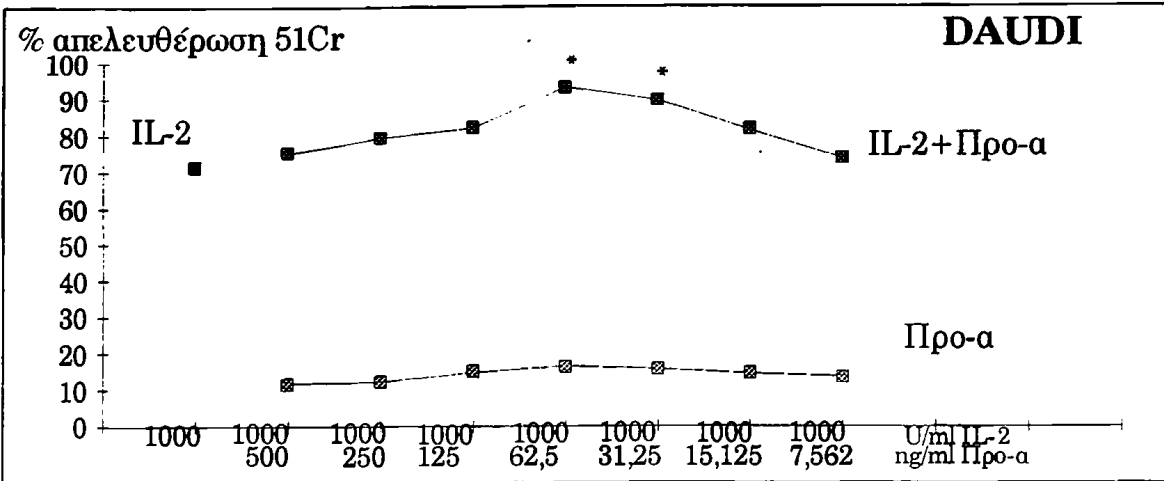
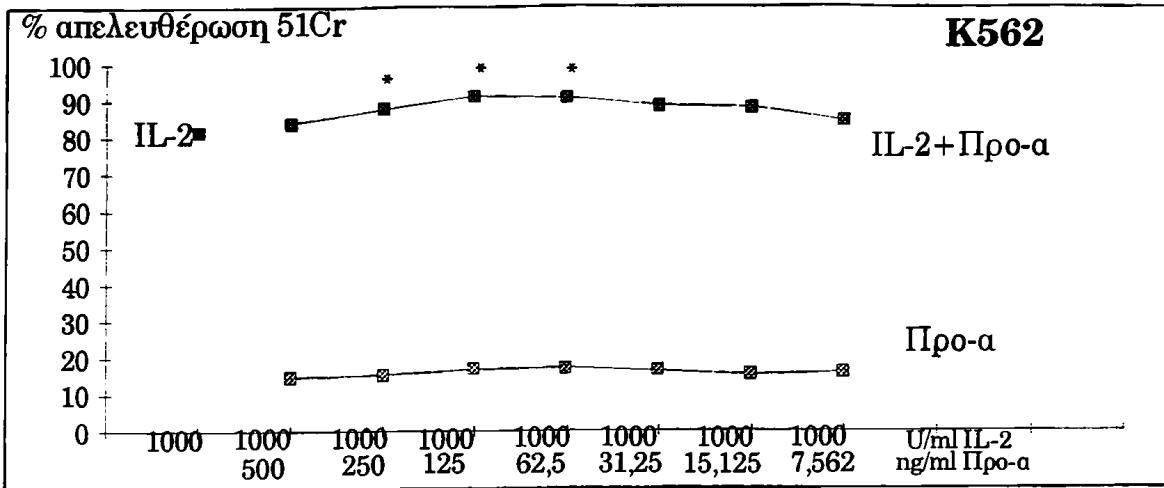




+:  $P < 0.01$   
 \*:  $P < 0.05$

**ΣΧΗΜΑ 46.** Κυτταροτοξική δράση των LAK κυττάρων έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών. Δράση της Προ-α. Περίπτωση # (No) 40. Ca ωθηκής. Στάδιο III.





+: P<0.01  
 \*: P<0.05

**ΣΧΗΜΑ 47.** Κυτταροτοξική δράση των LAK κυττάρων έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών. Δράση της Προ-α. Περίπτωση #(No) 41. Ca ωοθήκης. Στάδιο II.



**Κυτταροτοξικότητα εναντίον καρκινικών κυττάρων και δράση της ProTa.**

Η κυτταροτοξική δράση εναντίον των καρκινικών κυττάρων μπορεί να εκδηλωθεί με δύο τρόπους: με τη συμμετοχή Τ κυττάρων (ΚΤΛ) τα οποία καταστρέφουν τα καρκινικά κύτταρα μέσω της αναγνώρισης καρκινικών αντιγόνων (αυτό το είδος της κυτταροτοξικότητας περιορίζεται από το ΜHC) και από τα ΝΚ κύτταρα τα οποία καταστρέφουν τα καρκινικά κύτταρα (ΝΚ κυτταροτοξικότητα) χωρίς να απαιτείται αναγνώριση των ΜHC μορίων (ΜHC μη περιορισμένη κυτταροτοξικότητα) (Baxeuanis and Paramichail,1994). Τα ΝΚ κύτταρα υπό την επίδραση επαρκών δόσεων IL-2 είναι δυνατόν να ενεργοποιηθούν και να εκδηλώσουν κυτταροτοξικότητα εναντίον ανθεκτικών στην ΝΚ κυτταροτοξικότητα καρκινικών κυττάρων (LAK κυτταροτοξικότητα) σε σχέση με τα μη ενεργοποιημένα (Naume et al., 1992). Η LAK κυτταροτοξικότητα μπορεί επίσης να επιτευχθεί με τη συνεργασία κυτταροκινών και IL-2. Έτσι λοιπόν διάφορες κυτταροκίνες όπως TNF $\alpha$  IFN $\alpha$ ,- $\gamma$  IL-6,IL-7 κ.α. έχουν δειχθεί να συνεργούν με χαμηλές δόσεις IL-2 στην δημιουργία LAK κυτταροτοξικότητας (Baxeuanis and Paramichail,1994).

Η χορήγηση της ProTa σε DBA/2 μυσ πριν από τη χορήγηση των L1210 συγγενικών λευχαιμικών κυττάρων έχει σαν αποτέλεσμα την αναχαίτηση της αύξησης των λευχαιμικών κυττάρων (Papanastasiou et al., 1992). Η παραπάνω αντικαρκινική δράση της ProTa όπου καταλήγει στην επιβίωση των DBA/2 μυών εκδηλώνεται μέσω της ενεργοποίησης των ενδοπεριτοναϊκών μακροφάγων και της παραγωγής TNF- $\alpha$  που ως γνωστό καταστρέφουν καρκινικά κύτταρα (Decker et al., 1987). Με δεδομένη την in vivo δράση της ProTa σε DBA/2 μυσ εξετάσθηκαν οι ανοσολογικές μεταβολές που προκαλούνται στα σπληνοκύτταρα, μετά από την in vivo χορήγησή της. Επίσης εξετάσθηκαν οι μεταβολές που προκαλούνται, όσον αφορά στην κυτταροτοξικότητα, σε in vitro καλλιέργειες σπληνοκυττάρων στις οποίες

προστίθεται εξωγενώς ProTa. Τα πειράματα αυτά θα προσέδιδαν μια πληρέστερη εικόνα όσον αφορά στο μηχανισμό δράσης της ProTa in vivo.

### **Πρωτόκολλο χορήγησης ProTa σε DBA/2 μυσ.**

Το πρωτόκολλο χορήγησης ProTa σε DBA/2 μυσ φαίνεται στον πίνακα 19. Η χορήγηση της ProTa γινόταν κάθε δύο ημέρες για τρεις εβδομάδες. Η ιδανική δόση χορήγησης ProTa ήταν 300 ng/μυ διαλυμένης σε 0.5 ml PBS, όπως είχε καθοριστεί από προγενέστερα πειράματα (*Papanastasiou et al., 1992*). Η πρώτη θυσία των μυών πραγματοποιήθηκε δέκα ημέρες μετά το πέρας των τριών εβδομάδων χορήγησης με σκοπό να μεγιστοποιηθεί η δράση της ProTa (*Papanastasiou et al., 1992*). Οι επόμενες θυσίες έγιναν στους αναγραφόμενους στα σχήματα χρόνους.

### **Η επίδραση της ProTa σε DBA/2 μυσ αυξάνει την NK και LAK κυτταροτοξικότητα.**

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της ProTa στα σπληνοκύτταρα, υπολογίστηκε η κυτταροτοξικότητα που εκδηλώνεται εναντίον καρκινικών σειρών. Από τις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν άλλες ήταν ευαίσθητες σε NK κυτταροτοξικότητα (π.χ. YAC) και άλλες ήταν ανθεκτικές σε NK κυτταροτοξικότητα (π.χ. P815). Με τον τρόπο αυτό μελετήθηκε τόσο η δια της ProTa επαγόμενη μεταβολή της NK κυτταροτοξικότητας όσο και η δημιουργία LAK κυτταροτοξικότητας. Όπως φαίνεται στο σχήμα 48, τα σπληνοκύτταρα των μυών στους οποίους είχε χορηγηθεί ProTa παρουσιάζουν σημαντικά αυξημένη κυτταροτοξική δράση συγκρινόμενα με τα σπληνοκύτταρα των μαρτύρων.



**ΠΙΝΑΚΑΣ 19. Πρωτόκολλο χορήγησης ProTa σε DBA/2 μυς.**

	<u>1<sup>η</sup> εβδομάδα</u>	<u>2<sup>η</sup> εβδομάδα</u>	<u>3<sup>η</sup> εβδομάδα</u>	<u>4<sup>η</sup> εβδομάδα</u>
<b>Ημέρες</b>	1, 3, 5	1, 3, 5	1, 3, 5	-





Η αύξηση αυτή της NK κυτταροτοξικότητας που άρχισε να εμφανίζεται κατά την δέκατη ημέρα ( $53.4 \pm 1.8\%$  συγκρινόμενη με το  $36 \pm 1.6\%$  των μαρτύρων) μετά το τέλος της χορήγησης της ProTa παρέμεινε στα αυξημένα αυτά επίπεδα ( $54.1 \pm 2.3\%$  και  $51.4 \pm 2.6\%$  κατά την ημέρα 20 και 30 ενώ των μαρτύρων ήταν  $37.1 \pm 1.8\%$  και  $34.6 \pm 1.9\%$  αντίστοιχα  $p < 0.01$ ) συνολικά 30 ημέρες, διάστημα ικανό για να καταστραφεί ένας τυχόν αναπτυσσόμενος όγκος αφού κατά την ίδια χρονική περίοδο ProTa συνέβαλε στη δημιουργία και LAK κυτταροτοξικότητας στα σπληνοκύτταρα. Έτσι όπως δείχνεται στο σχήμα 4 (κάτω πλευρά) σπληνοκύτταρα από DBA/2 μυσ στους οποίους χορηγήθηκε η ProTa κατέστρεψαν NK-ανθεκτικούς καρκινικούς κλώνους (P815 και L1210) σε σημαντικά ποσοστά κατά τη χρονική περίοδο από 10<sup>ης</sup> έως 30<sup>ης</sup> ημέρας μετά τη χορήγηση της ProTa. Τα ποσοστά αύξησης σε σύγκριση με τους μάρτυρες κυμάνθηκαν από 170 έως 233 %.

Συνεπώς η χορήγηση της ProTa στους μυσ έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση τόσο της NK όσο και της LAK κυτταροτοξικότητας των σπληνοκυττάρων με τη μέγιστη αύξηση να παρουσιάζεται την ημέρα 20 και την εξαφάνιση της *in vivo* δράσης της την ημέρα 50

#### Επίδραση της ProTa στο φαινότυπο των σπληνοκυττάρων.

Οι παρατηρούμενες μεταβολές της NK και LAK κυτταροτοξικότητας, σχετίστηκαν με τη μεταβολή του φαινότυπου των σπληνοκυττάρων, καθώς και με την μεταβολή του ποσοστού των διαφόρων υποπληθυσμών τους. Έτσι η αύξηση της NK και LAK κυτταροτοξικότητας συμβάδισε με ανάλογη αύξηση του ποσοστού των NK κυττάρων.

Αναλυτικότερα (σχήμα 49) οι μυσ, στους οποίους χορηγήθηκε ProTa, εμφάνισαν μεγαλύτερα ποσοστά NK κυττάρων σε σχέση με του μάρτυρες κατά την χρονική περίοδο μεταξύ 10<sup>ης</sup> και 30<sup>ης</sup> ημέρας μετά της χορήγησης



της ProTa με τη μέγιστη διαφορά να παρατηρείται την 20η ημέρα (166 %  $p < 0.005$ ). Δηλαδή η κινητική μελέτη της αύξησης της NK και LAK κυτταροτοξικότητας σχετίσθηκε με αυτή της αύξησης των NK κυττάρων σε σπληνοκύτταρα.

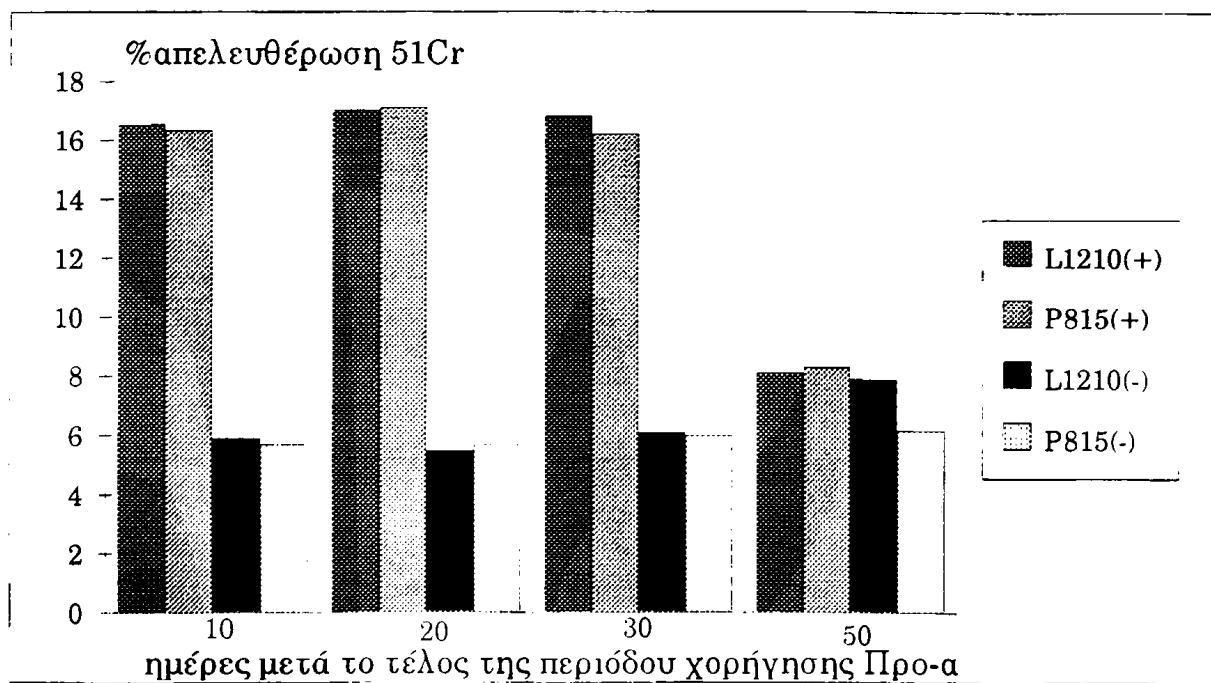
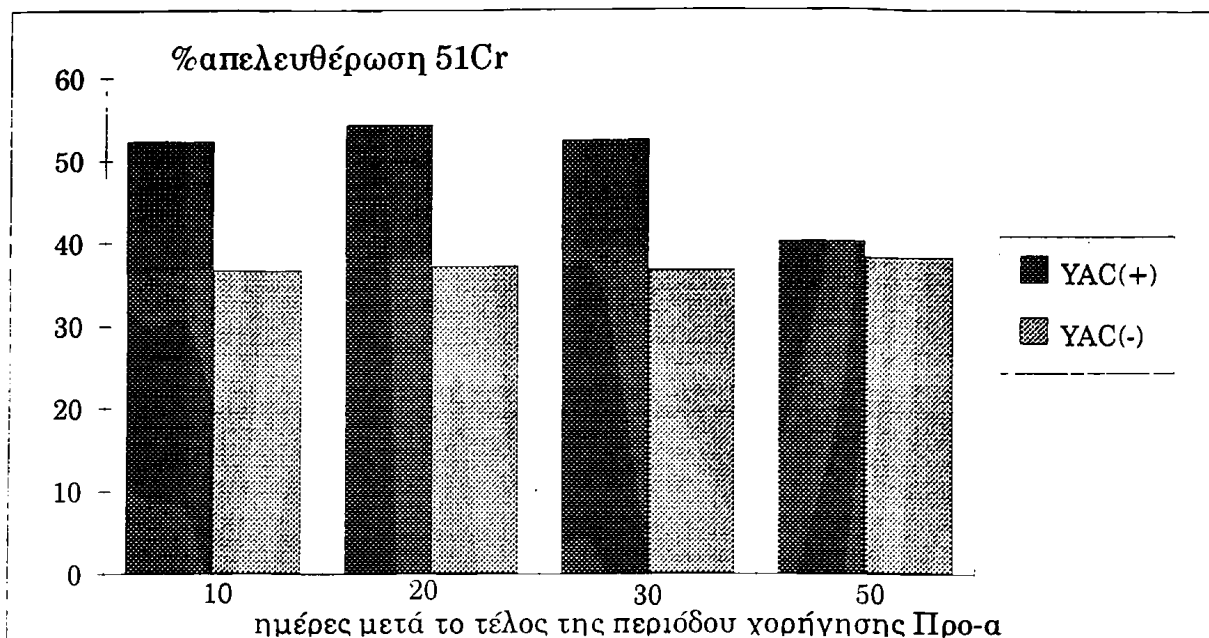
Ταυτόχρονα με τα παραπάνω μελετήθηκαν και οι μεταβολές των ποσοστών των υπόλοιπων υποπληθυσμών. Όπως επίσης δείχνεται στο σχήμα 49 υπήρξε αύξηση στα ποσοστά των CD3+ ενεργοποιημένων κυττάρων και του CD8+ υποπληθυσμού. Η αύξηση αυτή των CD8+ ακολουθεί κινητική παρόμοια με αυτή των NK κυττάρων ( $p < 0.05$ ). Δηλαδή παρουσιάζει ένα μέγιστο σημείο την ημέρα είκοσι (92%  $p < 0.005$ ) και στη συνέχεια μειώνεται σταδιακά μέχρι το επίπεδο του αντίστοιχου ποσοστού των μαρτύρων την ημέρα πενήντα. Όσον αφορά στα CD4+ κύτταρα αυτά δεν απεικονίζονται στο σχήμα εξαιτίας του ότι δεν βρέθηκε διαφορά στα αντίστοιχα ποσοστά. Η αύξηση αυτή του ποσοστού των ενεργοποιημένων CD3+ T λεμφοκυττάρων παρατηρήθηκε με την ανάλυση έκφρασης 2 μορίων του υποδοχέα της IL-2 (Tac) και του μορίου HLA IA. Και τα δύο αυτά μόρια εμφανίζονται σε ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα.

Η ταυτόχρονη αύξηση των ενεργοποιημένων T λεμφοκυττάρων καθώς και των CD8+ κυττάρων μεταξύ σπληνοκυττάρων σε DBA/2 μυσ κατόπιν χορήγησης ProTa οδήγησαν σε μια μελλοντική μελέτη της T κυτταροτοξικότητας, ενώ η παρατηρούμενη αύξηση της NK κυτταροτοξικότητας και η επαγωγή της LAK ενεργότητας δικαιολογείται από την αντίστοιχη αύξηση του ποσοστού των NK κυττάρων.

### **In Vitro επίδραση της ProTa σε σπληνοκύτταρα DBA/2 μυών.**

Μετά τα παραπάνω συμπεράσματα σχετικά με την in vivo δράση της ProTa το ερώτημα που προέκυψε ήταν κατά πόσο η in vivo δράση της ProTa εναρμονίζεται με την in vitro επίδρασή της στα σπληνοκύτταρα.



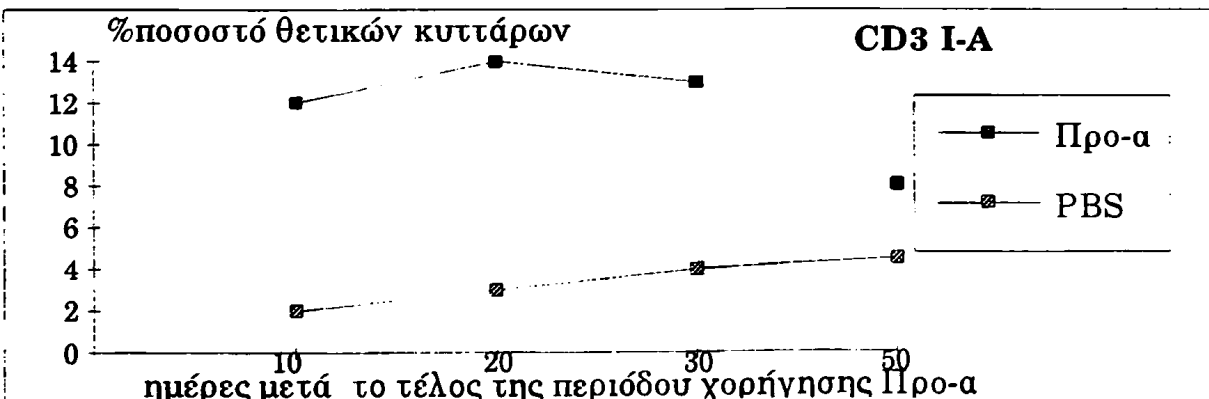
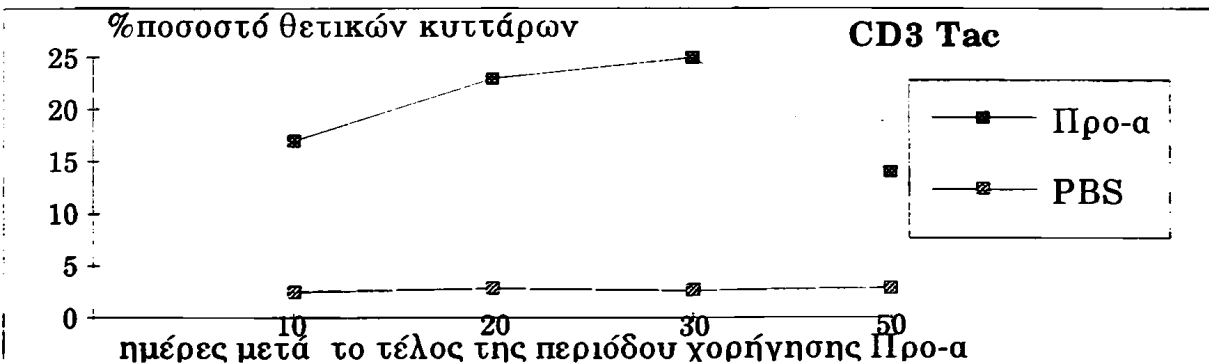
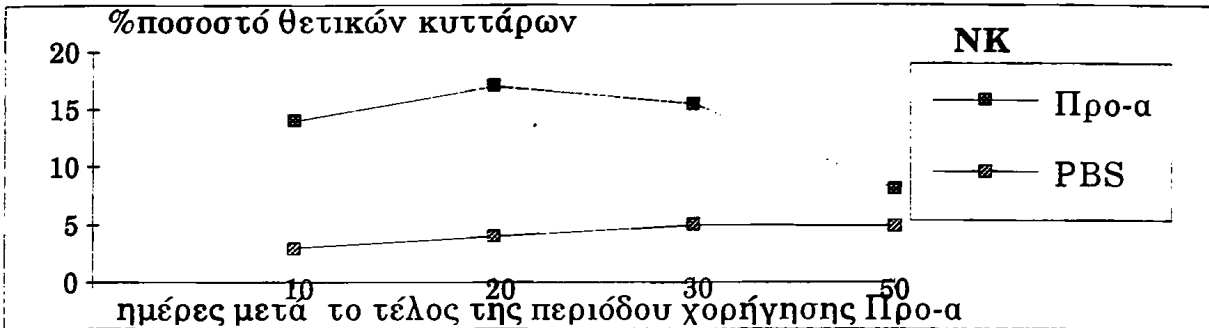
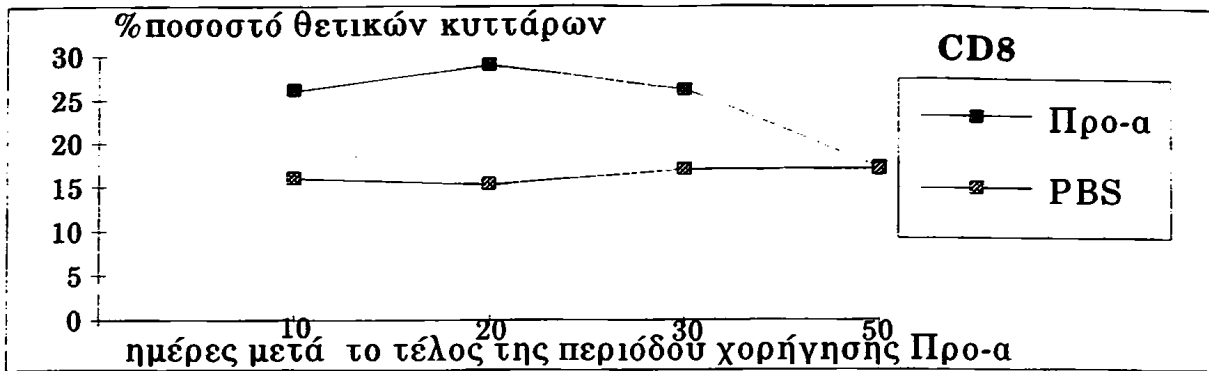


**ΣΧΗΜΑ 48.** NK κυτταροτοξικότητα και LAK κυτταροτοξικότητα σε DBA/2 μυσ. In vivo δράση της ΠροΤα.

Γνωρίζοντας ότι η IL-2 επιδρά και στην ενεργοποίηση των NK κυττάρων και στην διαφοροποίησή τους σε LAK κύτταρα (*Grimm E.A. et al., 1982*) συγκρίναμε την δράση της με την αντίστοιχη της IL-2 στην *in vivo* επαγωγή NK και LAK κυτταροτοξικότητας. Τα συμπεράσματα από τη μελέτη αυτή παρουσιάζονται στο σχήμα 50. Οι κυτταρικές γραμμές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι ίδιες με αυτές των *in vivo* μελετών δηλ. YAC, L1210, P815. Η μελέτη της κινητικής δράσης της IL-2 δείχνει, όπως αναμενόταν, μια αύξηση της NK και LAK κυτταροτοξικότητας μέχρι τη συγκέντρωση των 1000 U/ml όπου παρουσιάζεται το μέγιστο της δράσης της. Η δράση της ProTa ακολουθεί μια δική της κινητική με το μέγιστο της δράσης της να σημειώνεται στην συγκέντρωση των 250 ng/ml. Όσον αφορά στη μελέτη της NK δράσης παρατηρούμε ότι τα σπληνοκύτταρα στην ανωτέρω συγκέντρωση της ProTa λύουν τα YAC κύτταρα σε ποσοστό  $53\pm 12\%$ , ενώ τα ίδια NK ευαίσθητα κύτταρα λύνονται με την ιδανική συγκέντρωση της IL-2 σε ποσοστό  $65\pm 13.9\%$ . Παρατηρούμε λοιπόν ότι υπάρχει μια σημαντική ομοιότητα στη δράση των δύο ουσιών όσον αφορά την αύξηση της NK κυτταροτοξικότητας. Η μελέτη της λύσης των κυτταρικών σειρών L1210 και P815 μας δείχνουν τα ποσοστά της LAK επαγόμενης κυτταροτοξικότητας. Η δράση της IL-2 στα σπληνοκύτταρα επάγει λύση των κυττάρων στόχων κατά  $29\pm 7\%$  και  $28\pm 4.7\%$  αντίστοιχα, στην ιδανική δόση των 1000 U/ml ενώ η ProTa λύει και τις δύο κυτταρικές γραμμές σε ένα ποσοστό 22% στην δόση των 250 ng/ml (p μη σημαντικό).

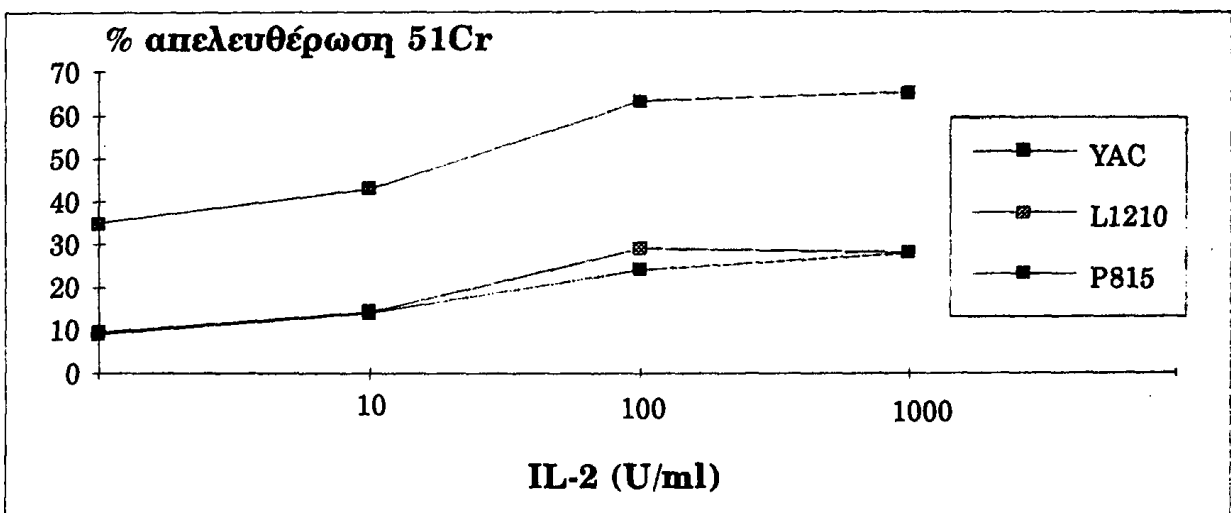
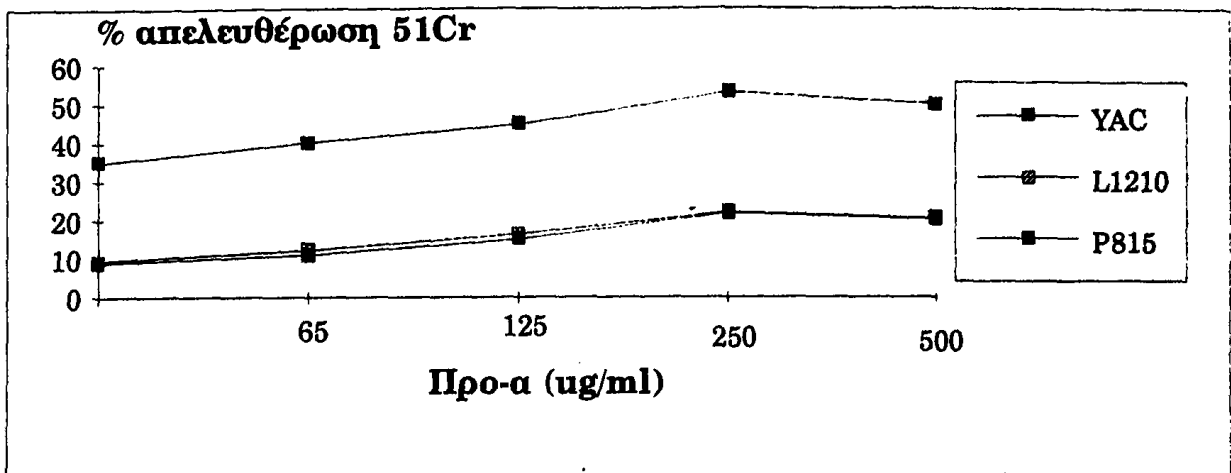
Συνεπώς η αντικαρκινική *in vivo* δράση της ProTa έγκειται στην επαγωγή της LAK και την αύξηση της NK κυτταροτοξικότητας *in vivo*. Αυτή δυνατόν να είναι της ίδιας έντασης με την δια της IL-2 επαγόμενης, αφού τα *in vitro* πειράματα έδειξαν περίπου ίση ικανότητα επαγωγής NK και LAK κυτταροτοξικότητας από την ProTa και την IL-2.





**ΣΧΗΜΑ 49.** Φαινοτυπικές αλλαγές σε σπληνοκύτταρα DBA/2 μυσών κατόπιν χορήγησης ProTa.



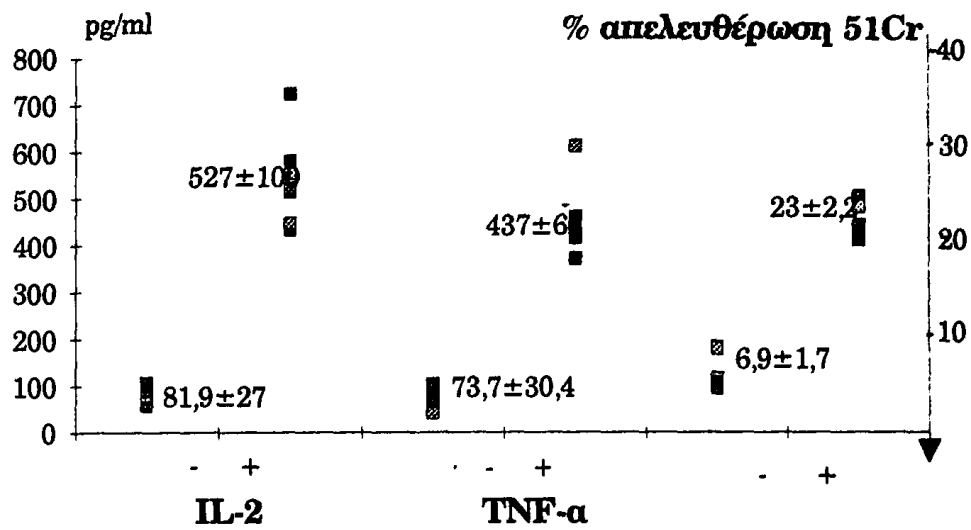


**ΣΧΗΜΑ 50.** Σύγκριση της *in vitro* δράσης των ΠροΤα και IL-2 στην NK και LAK κυτταροτοξικότητα σε σπληνοκύτταρα DBA/2 μωών.

**Έμμεση in vitro δράση της ProTa σε σπληνοκύτταρα DBA/2 μυσών.**

Το επόμενο ερώτημα αφορούσε στο μηχανισμό με τον οποίο πραγματοποιούνται τα παραπάνω. Μία άμεση δράση του μορίου πάνω στα NK κύτταρα ή μια έμμεση δράση μέσω της παραγωγής κάποιων κυτταροκινών. Ορμώνενοι από παλιότερα πειράματα (*Papanastasiou et al., 1992*), όπου η ProTa δείχθηκε να αυξάνει την in vivo παραγωγή TNFα αλλά και την in vitro παραγωγή IL-2 (*Baxevanis et al., 1994*) ελέγχθηκε η δεύτερη υπόθεση. Έτσι μετρήθηκε η συγκέντρωση της IL-2 και του TNFα σε σπληνοκύτταρα μυσών που καλλιεργήθηκαν in vitro με ProTa και σπληνοκύτταρα μαρτύρων (απουσία ProTa). Ταυτόχρονα μετρήθηκε η LAK κυτταροτοξικότητα στα ίδια σπληνοκύτταρα εναντίον της καρκινικής σειράς L1210. Τα αποτελέσματα των μετρήσεως απεικονίζονται στο σχήμα 51. Η έκθεση των σπληνοκυττάρων στην ProTa στη συγκέντρωση των 250 ng/ml (όπως δείχνεται στο σχήμα 6 αποτελεί την ιδανική δόση) έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής IL-2 περίπου κατά έξι φορές ( $p < 0.001$ ). Η αυξημένη παραγωγή IL-2 εναρμονίζεται με αύξηση της συγκέντρωσης του TNFα. Συγκεκριμένα η παραγωγή TNFα σε καλλιέργειες υπό την επίδραση της ProTa αυξήθηκε σε σχέση με τους μάρτυρες περίπου πέντε φορές ( $p < 0.01$ ). Η αύξηση αυτή των κυτταροκινών συμβάδιζε με την αύξηση της εκδηλούμενης LAK κυτταροτοξικότητας (σε  $23\% \pm 2.2\%$  από  $6.9 \pm 1.7\%$  ( $p < 0.01$ )). Συνεπώς η IL-2 και η TNFα που παράγεται εξαιτίας της παρουσίας της ProTa στις κελλιέργειες έχουν σαν αποτέλεσμα την παρατηρούμενη επαγωγή της LAK κυτταροτοξικότητας. Επομένως συμπεραίνουμε ότι η ProTa δεν δρα άμεσα στα NK κύτταρα αλλά έμμεσα μέσω της παραγωγής κυτταροκινών που ενεργοποιεί αυτά.





**ΣΧΗΜΑ 51.** Σύγκριση παραγωγής IL-2 και TNF-α καθώς επίσης και LAK κυτταροτοξικότητας σε καλλιέργειες σπληνοκυττάρων από DBA/2 μυς παρουσία ή απουσία ProTa.



**Πρωτόκολλο ταυτόχρονης χορήγησης ProTa και L1210 κυττάρων με σκοπό την ανίχνευση CTL κυτταροτοξικότητας.**

Όπως δείχθηκε παραπάνω η χορήγηση ProTa σε μυσ είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση της NK κυτταροτοξικότητας τη δημιουργία LAK κυτταροτοξικότητας καθώς και μία αύξηση των ενεργοποιημένων CD3+ κυττάρων (σχήμα 49). Η παρατηρούμενη αυτή αύξηση των T λεμφοκυττάρων μας ώθησε να ερευνήσουμε το κατά πόσο η ProTa συνέβαλε στην επαγωγή T κυτταροτοξικότητας που να εκδηλώνεται απο τα ενεργοποιημένα CD3+ T λεμφοκύτταρα εναντίον των συγγενικών χορηγούμενων L1210 καρκινικών κυττάρων. Για το σκοπό αυτό χορηγήθηκε ProTa ταυτοχρόνως με L1210 συγγενικά λευχαιμικά κύτταρα σε DBA/2 μυσ και ελέγχθηκε η NK, η LAK και η T εκδηλούμενη κυτταροτοξικότητα. Το πρωτόκολλο χορήγησης απεικονίζεται στον πίνακα 20 και αναλυτικότερα περιλαμβάνει τις εξής ομάδες: οι μυσ της ομάδας 1 οι οποίοι δέχθηκαν τη χορήγηση μίγματος ProTa και L1210 κυττάρων σε τρεις κύκλους εμβολιασμού (ProTax3, L1210x3) οι οποίοι χρονικά απείχαν πέντε ημέρες. Η ομάδα 2 αποτελούνταν από μυσ οι οποίοι δέχθηκαν ένα κύκλο εμβολιασμού με ProTa και δύο κύκλους εμβολιασμού με μίγμα ProTa και L1210 (ProTax3, L1210x2) Στους μυσ της ομάδας 3 ακολουθήθηκε ο παραπάνω ρυθμός χορήγησης με τη διαφορά ότι στους δύο πρώτους κύκλους χορηγήθηκε μόνο ProTa και στον κύκλο τρία μίγμα ProTa και L1210(ProTax3,L1210x1). Η ομάδα 4 δέχθηκε κατά τη διάρκεια την παραπάνω κύκλων μόνο ProTa(ProTax3), η ομάδα 5 μόνο τη χορήγηση L1210 (L1210x3) και η ομάδα 6 δέχθηκε μόνο PBS (PBSx3, μάρτυρες). Η ProTa χορηγήθηκε ταυτόχρονα με τα L1210 καρκινικά κύτταρα ώστε να δοθεί η δυνατότητα ενεργοποίησης των T λεμφοκυττάρων από τα πιθανά καρκινικά αντιγόνα που εκφράζονται στην επιφάνεια των L1210 κυττάρων ταυτόχρονα με την ενισχυτική δράση της ProTa πάνω σε αυτά (τουλάχιστον ποσοτικά όπως δείχθηκε ανωτέρω).



**ΠΙΝΑΚΑΣ 20.** Ομάδες DBA/2 μυών σύμφωνα με το πρωτόκολλο χορήγησης ProTa και L1210 κυττάρων.

Ομάδα <sup>1</sup>	1ος κύκλος	2ος κύκλος	3ος κύκλος
1	ProTa <sup>2</sup> +L1210 -5 ημέρες <sup>3</sup>	- ProTa +L1210 - 5 ημέρες <sup>3</sup>	-ProTa +L1210
2	ProTa +PBS <sup>4</sup> -5 ημέρες	- ProTa +L1210 - 5 ημέρες	-ProTa +L1210
3	ProTa +PBS -5 ημέρες	- ProTa +PBS -5 ημέρες	-ProTa +L1210
4	ProTa +PBS -5 ημέρες	- ProTa +PBS -5 ημέρες	-ProTa +PBS
5 <sup>5</sup>	PBS +L1210 -5 ημέρες	- PBS +L1210 -5 ημέρες	-PBS +L1210
6	PBS -5 ημέρες	- PBS -5 ημέρες	-PBS

- 1: Οι ομάδες #1, #2, #3 αποτελούνται από 30 μύς. Οι ομάδες #4 και #6 αποτελούνται από 15 μύς και η ομάδα #5 από 35 μύς.
- 2: 300 ng ProTa/μυ χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά σε 0.5 ml Φ.Ο. που περιείχε επίσης  $2 \cdot 10^5$  λευχαιμικά L1210 κύτταρα.
- 3: Ο δεύτερος και ο τρίτος κύκλος εμβολιασμού έγινε την 5<sup>η</sup> και τη 10<sup>η</sup> ημέρα μετά τον πρώτο κύκλο χορήγησης. Οι μύς θυσιάστηκαν 3 ημέρες (1<sup>η</sup> θυσία) 12 ημέρες (2<sup>η</sup> θυσία) και 22 ημέρες (3<sup>η</sup> θυσία) μετά το τέλος του τρίτου κύκλου του εμβολιασμού.
- 4: Χορηγήθηκε 0.5 ml Φ.Ο. ενδοπεριτοναϊκά.
- 5: Στα πειράματα που ακολούθησαν χρησιμοποιήθηκαν μόνο μύς που δεν ανέπτυξαν ασκίτη.



**Μελέτη της εμφάνισης ασκίτη στις διάφορες ομάδες μυών.**

Οι θυσίες των μυών πραγματοποιήθηκαν τις ημέρες που αναφέρονται στον πίνακα 21. Ως πρώτη ημέρα λαμβάνεται αυτή της πρώτης χορήγησης L1210 και ProTa(1ος κύκλος εμβολιασμού). Ο χρόνος των τριών θυσιών επιλέχθηκε έτσι ώστε να μας διαφωτίσει σχετικά με το χρόνο δράσης της ProTa αφού κάθε ομάδα είχε στη διάθεσή της διαφορετικό χρόνο ανάπτυξης κυτταροτοξικότητας. Έτσι λοιπόν η πρώτη θυσία πραγματοποιήθηκε την ημέρα 13, δηλαδή τρεις ημέρες μετά το πέρας του πρωτοκόλλου χορήγησης. (3ος κύκλος εμβολιασμού). Οι επόμενες πραγματοποιήθηκαν την ημέρα 22 και 32 προσφέροντας έτσι μια καλή κινητική μελέτη των παραμέτρων που εξετάστηκαν.

Το σημαντικότερο στοιχείο του πίνακα 21 αφορά στην προστατευτική δράση της ProTa αφού σημειώνεται ο χρόνος εμφάνισης ασκίτη και στα πειραματόζωα που δέχθηκαν τη χορήγηση ProTa. Επιβεβαιώνεται η προστατευτική δράση της ProTa, όπως έχει ήδη δημοσιευτεί (*Papanastasiou et al., 1992*). Αντίθετα 59 από τους 70 μυς στους οποίους είχε χορηγηθεί μόνο L1210, ανέπτυξαν ασκίτη την 13 ημέρα, ενώ 3 μόνο από το σύνολο των 120 μυών των ομάδων #1 και #2 (που χορηγήθηκε ProTa ταυτόχρονα με L1210) εμφάνισαν ασκίτη στο ίδιο διάστημα.



**ΠΙΝΑΚΑΣ 21.** Εμφάνιση του ασκίτη στις διάφορες ομάδες των μυών.

Ομάδα	1η θυσία (ημέρα 13)	2η θυσία (ημέρα 22)	3η θυσία (ημέρα 32)
1	2 <sup>1</sup> /5 <sup>2</sup> /23 <sup>3</sup> (1 <sup>1</sup> /5 <sup>2</sup> /24 <sup>3</sup> ) <sup>7</sup>	5/5/13 (3/5/16)	5/5/3 <sup>4</sup> (6/5/5 <sup>8</sup> )
2	0/5/25 (0/5/25)	6/5/14 (5/5/15)	6/5/3 <sup>5</sup> (5/5/5 <sup>9</sup> )
3	0/5/25 (0/5/25)	2/5/18 (1/5/19)	7/5/6 <sup>6</sup> (7/5/7 <sup>10</sup> )
4	0/5/10 (0/5/10)	0/5/5 (0/5/5)	0/5/0 (0/5/0)
5	29/5/1 (30/5/0)	1/0/0 -	- -
6	0/5/10 (0/5/10)	0/5/5 (0/5/5)	0/5/0 (0/5/0)

- 1: Αριθμός των μυών που ανέπτυξαν ασκίτη.
- 2: Αριθμός των μυών που θυσιάστηκαν.
- 3: Αριθμός των μυών που απέμειναν μετά την αντίστοιχη θυσία.
- 4: Εμφάνιση ασκίτη στις 52±3 ημέρες.
- 5: Εμφάνιση ασκίτη στις 53±7 ημέρες.
- 6: Εμφάνιση ασκίτη στις 49±3 ημέρες.
- 7: Δεύτερο πρωτόκολλο εμβολιασμού. Βλέπε πίνακα 25.
- 8: Εμφάνιση ασκίτη στις 56±7 ημέρες.
- 9: Εμφάνιση ασκίτη στις 60±10 ημέρες.
- 10: Εμφάνιση ασκίτη στις 59±6 ημέρες.



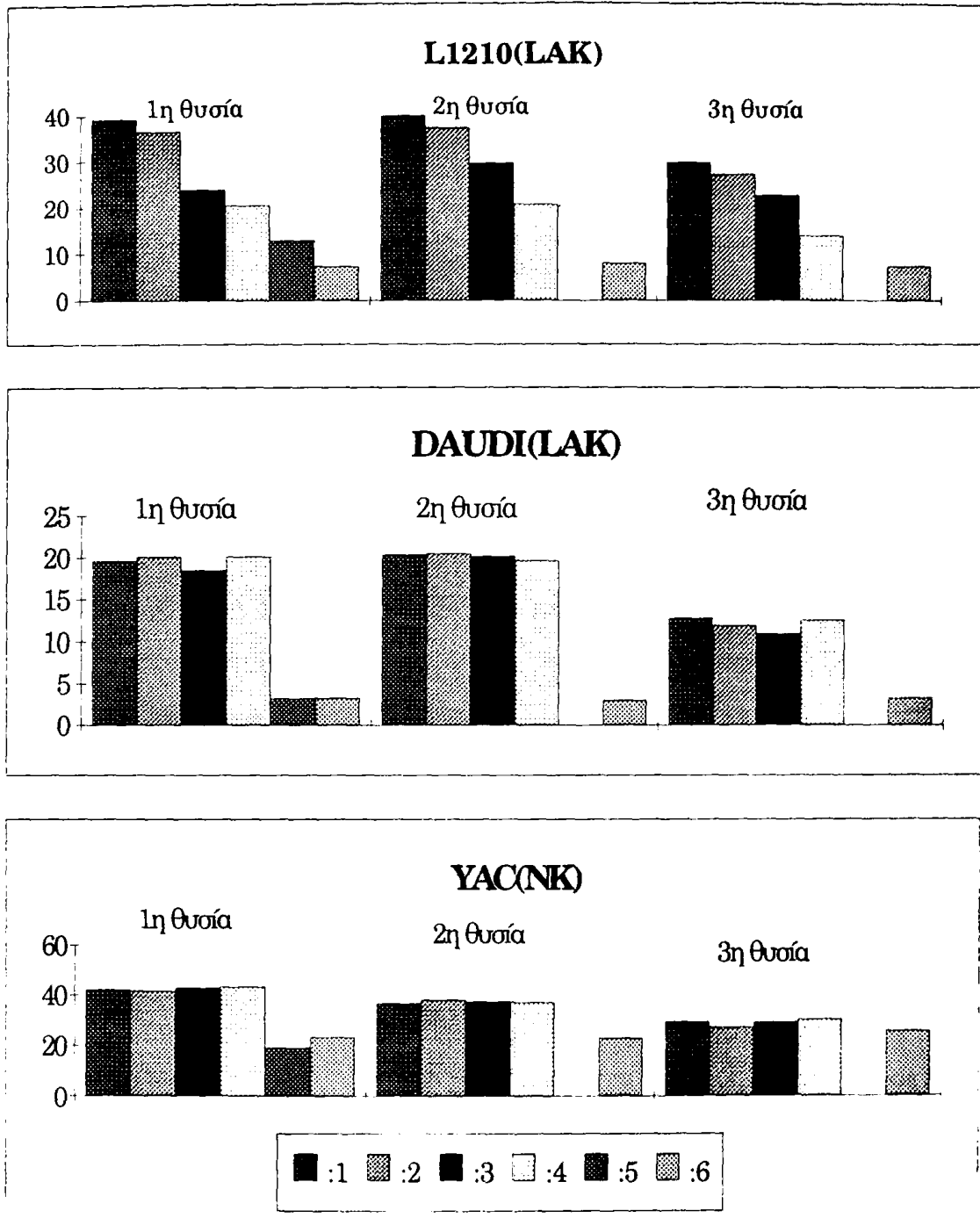
**Κυτταροτοξικότητα που εκδηλώνεται από τα σπληνοκύτταρα.**

Για να μελετηθεί με μεγαλύτερη ακρίβεια η δια της ProTax επαγόμενη κυτταροτοξικότητα απομονώθηκαν οι υποπληθυσμοί των σπληνοκυττάρων που είναι υπεύθυνοι για το κάθε είδος αυτής δηλ. NK κύτταρα για NK και LAK κυτταροτοξικότητα και T λεμφοκύτταρα για την CML κυτταροτοξικότητα.

Αρχικά εξετάστηκε ολόκληρος ο πληθυσμός των σπληνοκυττάρων και τα αποτελέσματα από τις τρεις θυσίες εκθέτονται στο σχήμα 52. Ο διαχωρισμός της NK κυτταροτοξικότητας από την LAK επιτεύχθηκε όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, με τη χρησιμοποίηση κυτταρικών γραμμών όπως η YAC που είναι ευαίσθητη σε NK κυτταροτοξικότητα και η L1210, DAUDI που χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό της LAK κυτταροτοξικότητας γιατί είναι NK ανθεκτικές σειρές. Η χρησιμοποίηση της L1210 κυτταρικής γραμμής είναι σημαντική για την ανίχνευση της CML εξαιτίας του ότι τα χορηγηθέντα κύτταρα ήταν L1210 και κατά συνέπεια δημιουργήθηκαν ιδανικές συνθήκες για την in vivo ενεργοποίηση των T κυττάρων μνήμης. Κατά την πρώτη θυσία τόσο η ομάδα #1 (ProTax3 L1210x3) όσο και η #2 (ProTax2 L1210x3) κατάστρεψαν τα L1210 κύτταρα στόχους (LAK κυτταροτοξικότητα) σε περίπου ίσα επίπεδα ( $39.3 \pm 3.2\%$ ,  $36.6 \pm 2.9\%$  αντίστοιχα). Τα ποσοστά κυτταροτοξικότητας στις δύο αυτές ομάδες είναι δυνατόν να οφείλονται στην δράση των T λεμφοκυττάρων (CML) και NK κυττάρων (NK και LAK κυτταροτοξικότητα).

Η ομάδα #3 (ProTax1, L1210x3) εμφανίζει ένα ποσοστό κυτταροτοξικότητας αρκετά χαμηλότερο ( $23.9 \pm 1.7\%$ ) αφού σε αυτή την περίπτωση CML είναι αδύνατον να εμφανιστεί καθότι τα L1210 χορηγήθηκαν μόνο κατά τον τρίτο κύκλο και έτσι η χρονική περίοδος έως την πρώτη θυσία (3 ημέρες) δεν ήταν αρκετή για την εκδήλωση CML, για την in vivo δημιουργία της



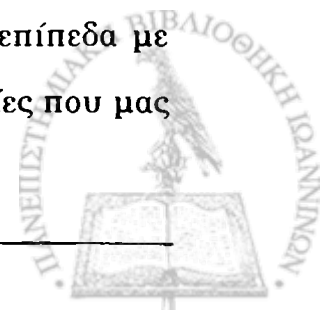


**ΣΧΗΜΑ 52.** Σύγκριση NK και LAK κυτταροτοξικότητας από σπληνοκύτταρα μεταξύ των διαφορετικών ομάδων DBA/2 μυών.



οποίας απαιτούνται περισσότερες των 5 ημερών (Herberman et al., 1977), ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά των ομάδων #4 (ProTax3), #5 (L1212x3), #6 (PBSx3) ήταν  $20.5 \pm 3.2\%$ ,  $12.9 \pm 1.5\%$ , και  $7.3 \pm 1.1\%$ . Η κυτταροτοξικότητα της ομάδας #4 ήταν αναμενόμενη με βάση προηγούμενα πειράματα αφού η χορήγηση ProTa σε μυς επάγει NK και LAK κυτταροτοξικότητα και όχι CML (Baxevanis et al., 1994) ενώ οι ομάδες-μάρτυρες δείχνουν κάποια μικρή κυτταροτοξικότητα ανάλογη με τις χορηγήσεις που δέχθηκαν (τα ποσοστά της ομάδας #6 είναι δυνατόν να θεωρηθούν σαν ποσοστά βάσης ενώ εκείνα της ομάδας #5 εκδηλώνονται προφανώς δια της CML αφού στην συγκεκριμένη ομάδα χορηγήθηκαν μόνο L1210 που δυνατόν να ενεργοποιούν ειδικά κυτταροτοξικά T κύτταρα (ΚΤΛ). Οι μυς της ομάδας #5 (L1210x3) δεν χρησιμοποιήθηκαν στις επόμενες θυσίες εξαιτίας του ότι ανέπτυξαν ασκίτη. Κατά τη δεύτερη θυσία παρατηρούμε ότι η κυτταροτοξικότητα που εκδηλώνει η ομάδα #3 ( $31.6 \pm 1.7\%$ ) είναι στα ίδια επίπεδα με την αντίστοιχη των ομάδων #1 και #2 ( $39.7 \pm 5.7\%$ ,  $37.2 \pm 3.3\%$ ).

Οι παρατηρούμενες διαφορές μεταξύ πρώτης και δεύτερης θυσίας για την ομάδα #3 δικαιολογούνται από το γεγονός του ότι (όπως ήδη προαναφέρθηκε) οι μυς της συγκεκριμένης ομάδας δέχθηκαν L1210 μόνο τρεις ημέρες πριν την πρώτη θυσία και ως εκ τούτου δεν υπήρχε αρκετός χρόνος για να αναπτύξουν μια δεύτερη γραμμή άμυνας (π.χ. T εκδηλούμενη κυτταροτοξικότητα) απέναντι στα χορηγηθέντα L1210 κύτταρα. Συνεπώς περιορίζονται στην LAK κυτταροτοξικότητα (όπως αναμενόταν από πειράματα που έχουν εκτεθεί στις παραπάνω σελίδες) και λύουν τα L1210 σε παρόμοιο ποσοστό με τους αντίστοιχους μυς της ομάδας #4 (ProTax3). Αντίθετα στην δεύτερη θυσία ο χρόνος είναι αρκετός (12 ημέρες) για την επαγωγή και T κυτταροτοξικότητας (όπως αποδεικνύεται παρακάτω) και τα σπληνοκύτταρα της ομάδας #3 καταστρέφουν τα L1210 σε ίσα επίπεδα με τα αντίστοιχα των ομάδων #1 και #2. Αναλύοντας τις πληροφορίες που μας



δίνονται από τη χρησιμοποίηση της κυτταρικής γραμμής DAUDI (ευαίσθητη σε LAK κυτταροτοξικότητα) καταλήγουμε στην επιβεβαίωση των παραπάνω αποτελεσμάτων. Πράγματι τόσο κατά την πρώτη θυσία όσο και κατά τη δεύτερη οι τέσσερις πρώτες ομάδες λύνουν τα κύτταρα στόχους στο ίδιο περίπου ποσοστό επιβεβαιώνοντας το γεγονός ότι η ProTa επάγει μια μη ειδική (LAK) κυτταροτοξικότητα η οποία είναι ανεξάρτητη από τα χορηγηθέντα (L1210) κύτταρα. Η λύση της κυτταρικής γραμμής YAC μας δείχνει ότι υπάρχει μια αυξημένη NK ενεργότητα, αφού οι τέσσερις πρώτες ομάδες καταστρέφουν σε σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό τα συγκεκριμένα κύτταρα στόχους από ότι οι ομάδες μάρτυρες και στις δύο θυσίες. Η εξίσωση της κυτταροτοξικότητας που δείχνει η ομάδα #4 με αυτές των ομάδων #1, #2, #3, που έχουν δειχθεί τη χορήγηση L1210 κυττάρων μας δείχνει ότι η αυξημένη NK ενεργότητα οφείλεται αποκλειστικά στην ProTa.

Ανακεφαλαιώνοντας τα συμπεράσματα που προκύπτουν από το σχήμα 52, μπορούμε να διαπιστώσουμε ότι οι ομάδες που δέχθηκαν ProTa και L1210 κύτταρα αναπτύσσουν ειδική (CML εναντίον των L1210 κυττάρων) και μη ειδική (NK και LAK) κυτταροτοξικότητα (ομάδες #1 και #2 κατά την 1η και 2η θυσία και ομάδα #3 κατά την 2η θυσία). Η ομάδα #4 που δέχθηκε μόνο ProTa αναπτύσσει μόνο NK και LAK κυτταροτοξικότητα ενώ η ομάδα #5 που δάχθηκε μόνο L1210 ανέπτυξε μόνο CML.

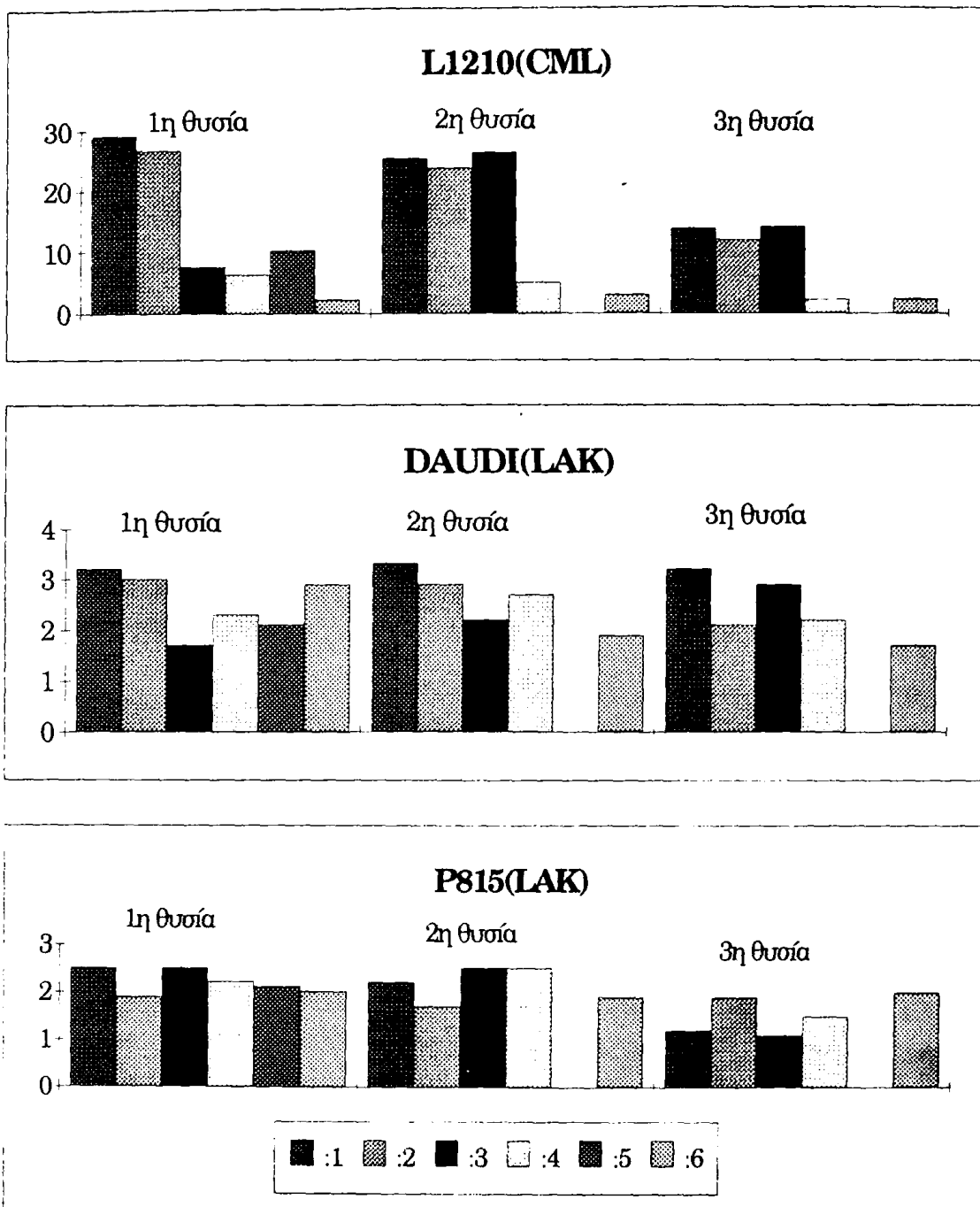




**T κυτταροτοξικότητα (CML).**

Τα ανωτέρω συμπεράσματα πιστοποιήθηκαν με την απομόνωση του T πλυσμού που μας έδωσε τη δυνατότητα μελέτης της ειδικής κυτταροτοξικότητας (σχήμα 53), που προκαλείται από T κύτταρα (ΚΤΛ). Σαν κύτταρα στόχοι χρησιμοποιήθηκαν τα χορηγηθέντα L1210 κύτταρα (όπου αποτελούν και το προς αναγνώριση αντιγόνο) και σαν μάρτυρες τα DAUDI για τυχόν ανεύρεση LAK κυτταροτοξικότητας καθώς και τα P815 που έχουν την ίδια προέλευση (είναι δηλαδή συγγενικά), (βλ. Υλικά και Μέθοδοι §) με τα L1210 αλλά διαφέρουν αντιγονικά. Κατά την πρώτη θυσία των μυών παρατηρούμε ότι οι ομάδες #1 και #2, λύνουν τα L1210 στο ίδιο περίπου ποσοστό ( $29.2 \pm 3.2\%$  και  $26.7 \pm 1.3\%$  αντίστοιχα) ενώ η ομάδα #3 δείχνει μια μειωμένη λύση ( $7.6 \pm 1.9$ ). Η αύξηση του τελευταίου ποσοστού στη δεύτερη θυσία εναρμονίζεται με τα προηγούμενα. Δηλαδή οι τρεις ημέρες που μεσολαβούν από τη χορήγηση της ProTa έως την πρώτη θυσία δεν επιτρέπουν την ανάπτυξη της T κυτταροτοξικότητας στην ομάδα #3. Αντίθετα μετά το πέρας 12 ημερών από τη χορήγηση της (2η θυσία) οι μυς της ανωτέρω ομάδας αναπτύσσουν σημαντική T κυτταροτοξικότητα παρόμοια με αυτή των ομάδων #1 και #2 ( $26.2 \pm 1.9$ ,  $25.2 \pm 3.3$ ,  $23.7 \pm 2.6$  αντίστοιχα). Η σταθερή μικρή κυτταροτοξικότητα που παρατηρείται από την ομάδα #4 κατά τις δύο θυσίες ( $6.3 \pm 1.6\%$ ,  $5.0 \pm 2.3\%$ ) μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η ProTa δεν είναι ικανή να επάγει T κυτταροτοξικότητα χωρίς την ταυτόχρονη χορήγηση L1210 κυττάρων. Η μικρή κυτταροτοξικότητα που αναπτύσσεται από την ομάδα #5 (9.8%) δείχνει ότι τα L1210 μπορούν να επάγουν μια T κυτταροτοξικότητα ενώ η χορήγηση της ProTa ταυτοχρόνως (ομάδες #1 και #2) οδηγεί στην ενίσχυση του φαινομένου.





**ΣΧΗΜΑ 53.** Κυτταροτοξική ενεργότητα απο Τ λεμφοκύτταρα.

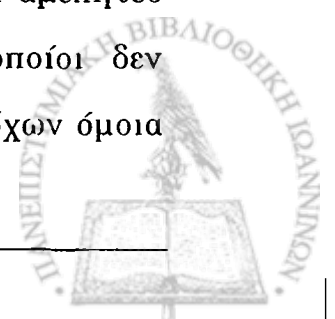


Η τρίτη θυσία επιβεβαιώνει ότι η *in vivo* επίδραση της ProTa μειώνεται αλλά οι διαφορές ανάμεσα στην κυτταροτοξικότητα των διαφόρων ομάδων είναι ακόμη διακριτές (οι τιμές από τις ομάδες #1, #2, #3 είναι σημαντικά μεγαλύτερες από την τιμή της ομάδας #6). Αντιθέτως όταν σαν κύτταρα στόχοι χρησιμοποιούνται κύτταρα DAUDI δεν παρατηρείται σημαντική κυτταροτοξικότητα (μικρότερη του 3%) σε καμιά από τις παραπάνω ομάδες. Αυτό ήταν αναμενόμενο δεδομένου ότι η ενεργοποίηση των CTL κατά τη διάρκεια της *in vivo* επώασης είχε σαν στόχους L1210 κύτταρα. Συνεπώς τα CTL δεν αναγνωρίζουν τα κύτταρα DAUDI. Η επανάληψη του φαινομένου στην περίπτωση της χρησιμοποίησης P815 σαν κύτταρα-στόχους, ενισχύει ακόμη περισσότερο το συμπέρασμα ότι τα CTL αναγνωρίζουν καρκινικά αντιγόνα στα L1210 κύτταρα αλλά όχι στα συγγενικά P815 κύτταρα.

Συνεπώς τα αποτελέσματα του σχήματος 53 δείχνουν ότι η ProTa μπορεί να επάγει T κυτταροτοξικότητα εναντίον L1210 μόνο όταν χορηγείται ταυτόχρονα με τα κύτταρα αυτά και ότι τα αντιγόνα που αναγνωρίζονται από τα CTL δεν υπάρχουν στην συγγενική λευχαιμική σειρά P815.

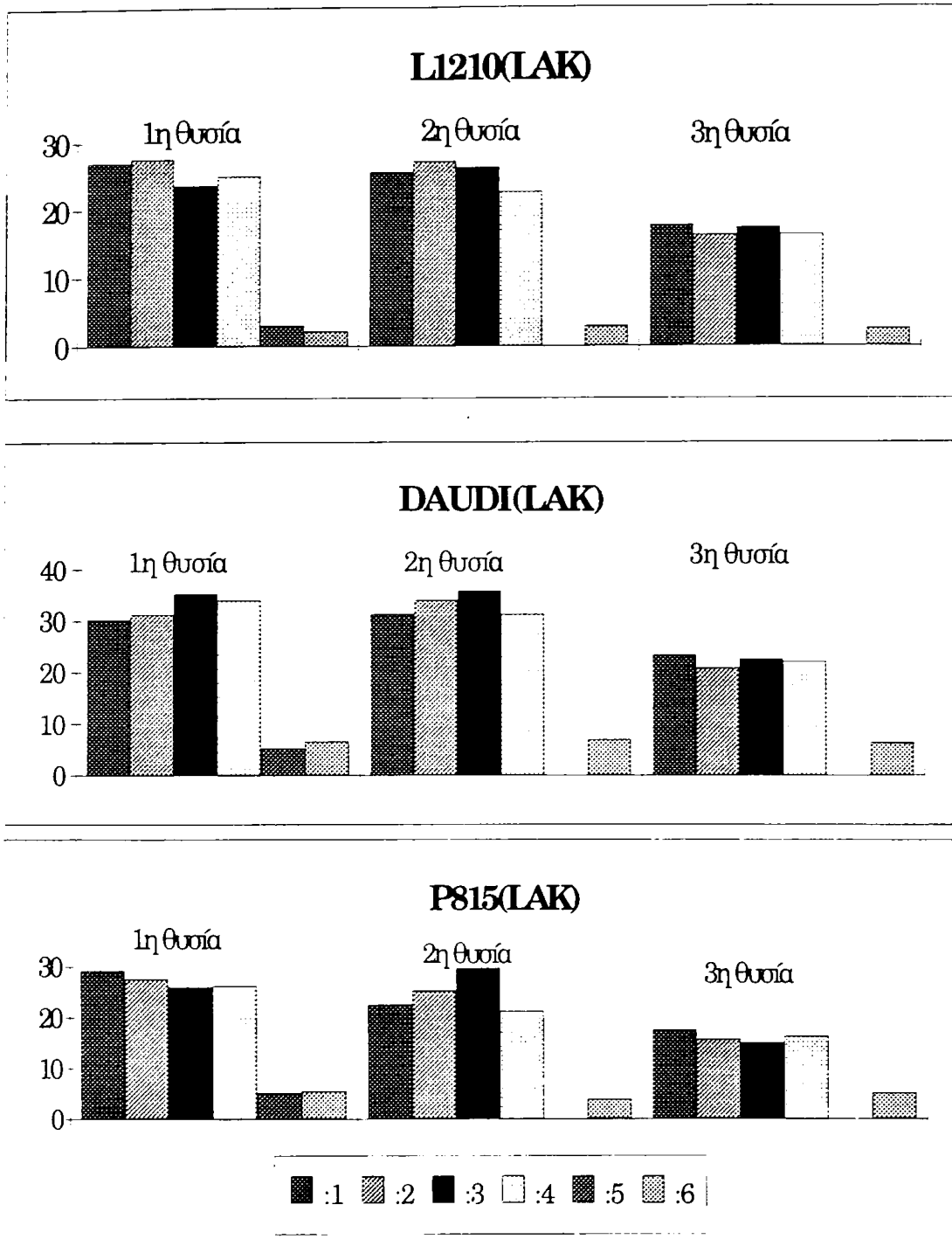
### Κυτταροτοξικότητα από NK κύτταρα.

Τα NK κύτταρα που απομονώνονται από το σύνολο των σπληνοκυττάρων δοκιμάζονται εναντίον L1210, DAUDI και P815 κυττάρων στόχων. Δεδομένου ότι οι συγκεκριμένες κυτταρικές γραμμές είναι ευαίσθητες σε LAK κυτταροτοξικότητα μελετάται άμεσα η επίδραση της ProTa σε NK κύτταρα. Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στο σχήμα 54, κατά την πρώτη θυσία και οι τρεις κυτταρικές γραμμές, λύνονται κατά παρόμοιο ποσοστό (περίπου 30%) και από τις τέσσερις πρώτες ομάδες. Αντίθετα οι ομάδες που αποτελούν τους μάρτυρες (#5 και #6) δείχνουν ένα αμελητέο ποσοστό κυτταροτοξικότητας. Οι μύς της ομάδας #4, οι οποίοι δεν δέχθηκαν τη χορήγηση L1210 κυττάρων, λύνουν τα κύτταρα στόχων όμοια



με τις ομάδες #1, #2 και #3. Δηλαδή η επαγωγή της LAK κυτταροτοξικότητας απαιτεί μόνο τη χορήγηση της ProTa ανεξάρτητα από τη χορήγηση κυττάρων. Κατά τη δεύτερη θυσία επαναλαμβάνεται το παραπάνω φαινόμενο με την κυτταροτοξικότητα από τέσσερις πρώτες ομάδες να είναι σημαντικά μεγαλύτερη από αυτή της ομάδας #6. Όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις η δράση της ProTa εξασθενεί κατά την τρίτη θυσία αλλά επιβεβαιώνεται η δράση της ProTa όπως προκύπτει από το σχήμα 54. Από τα παραπάνω, προκύπτει το συμπέρασμα ότι η ProTa είναι ικανή να διαφοροποιήσει τα NK κύτταρα ώστε να αποκτήσουν LAK ενεργότητα ανεξάρτητα από την παρουσία κυττάρων.





**ΣΧΗΜΑ 54.** Κυτταροτοξική ενεργότητα NK 1.1+ απομονωμένων από σπληνοκύτταρα.



**Περιορισμός της T ενεργότητας από τάξης I μόρια του ΜΣΙ.**

Μετά την ανίχνευση της επαγωγής CTL από την ταυτόχρονη παρουσία ProTa και L1210 κυττάρων το ερώτημα που προέκυψε ήταν μέσω ποιού μορίου επιτελούνταν η καταστροφή των κυττάρων στόχων. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν μονοκλωνικά αντισώματα, εναντίον τόσο των τάξης I όσο και των τάξης II μορίων του Μ.Σ.Ι. του μυ, που προσδέθηκαν στην επιφάνεια των L1210 κυττάρων και παρατηρήθηκε η επίδρασή τους στην κυτταροτοξικότητα. Τα αποτελέσματα της παραπάνω διαδικασίας απεικονίζονται στον πίνακα 22. Οπως παρατηρούμε η σύνδεση του  $\alpha\text{-H2K}^d$  πάνω στα L1210 έχει σαν επακόλουθο την αναστολή της T κυτταροτοξικότητας. Δηλαδή η σύνδεση του αντισώματος πάνω στο αντίστοιχο μόριο έχει σαν αποτέλεσμα την αδυναμία σύνδεσης των CTL πάνω στα καρκινικά κύτταρα στόχους(L1210).

Ειδικότερα παρατηρούμε ότι κατά την πρώτη θυσία η ομάδα #3 δείχνει μια μικρή κυτταροτοξικότητα εναντίον των L1210 κυττάρων η οποία αναστέλλεται από τη χρησιμοποίηση του παραπάνω αντισώματος. Η διαπίστωση αυτή επιβεβαιώνει τις προηγούμενες υποθέσεις για τον χρόνο δράσης της ProTa, που εκτέθηκαν παραπάνω, αφού δείχνεται η ειδικότητα αυτής της αντίδρασης (τα ποσοστά της CML είναι περίπου ίδια και στις τρεις ομάδες). Ομοια ποσοστά αναστολής της κυτταροτοξικότητας που παρατηρείται στην ομάδα #5, συμφωνεί με την υπόθεση που παρουσιάστηκε παραπάνω σχετικά με την ιδιότητα των L1210 να επάγουν κυτταροτοξικότητα από CTL. Αντίθετα με τις υπόλοιπες ομάδες η μικρή κυτταροτοξικότητα της ομάδας #4 δεν αναστέλλεται από τη χρησιμοποίηση του αντισώματος.



**ΠΙΝΑΚΑΣ 22.** Η επαγόμενη από την ProTa T ενεργότητα in vivo εναντίον των L1210 κυττάρων περιορίζεται από το τάξης I Μ.Σ.Ι.

Ομάδα	1η θυσία				2η θυσία			
	-	H-2k <sup>d</sup>	aH2D <sup>d</sup>	aI-A <sup>d</sup>	-	aH-2k <sup>d</sup>	aH2D <sup>d</sup>	aI-A <sup>d</sup>
1	29.2	<b>3.1</b>	24.1	22.7	20.6	<b>2.5</b>	19.3	17.9
2	27.6	<b>2.0</b>	22.6	23.5	23.2	<b>2.6</b>	20.5	20.2
3	7.9	<b>1.5</b>	7.6	9.6	22.1	<b>1.7</b>	23.2	19.7
4	7.6	7.3	7.2	7.9	7.5	7.3	6.5	7.2
5	9.1	<b>1.3</b>	9.2	9.0	-	-	-	-
6	5.6	5.3	5.0	5.1	5.2	5.0	3.9	5.1



Η παρατήρηση αυτή εμπλέκει την πιθανή ύπαρξη T κυττάρων που εκδηλώνουν κυτταροτοξικότητα που δεν περιορίζεται από το Μ.Σ.Ι. (Ioannides and Whiteside, 1993). Η χρησιμοποίηση αντισωμάτων για άλλα μόρια του Μ.Σ.Ι. (εναντίον του τάξης I μορίου H2D<sup>d</sup> και εναντίον του τάξης II μορίου I-A<sup>d</sup>) δεν επέφερε καμιά μεταβολή στην T κυτταροτοξικότητα. Η επανάληψη του πειράματος κατά την δεύτερη θυσία επιβεβαίωσε τα παραπάνω αποτελέσματα. Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί με το γενικότερο μοντέλο των CTL που εκδηλώνεται μέσω των προϊόντων της τάξης I του Μ.Σ.Ι.

Συνεπώς το συμπέρασμα που απορρέει από τα παραπάνω είναι ότι η ProTa επάγει μια T κυτταροτοξικότητα η οποία περιορίζεται από το τάξης I H2K<sup>d</sup> μόριο επιφανείας και όχι από το H2D<sup>d</sup> ή το IA<sup>d</sup>.

#### Συμμετοχή των CD4+ κυττάρων στην ρύθμιση της κυτταροτοξικότητας.

Όπως δείχθηκε παραπάνω η ProTa επάγει μια CML η οποία εκδηλώνεται εναντίον αντιγόνων που υπάρχουν στα L1210 κύτταρα και περιορίζεται από το H-2K<sup>d</sup> μόριο επιφανείας. Ποιά ήταν όμως η συμμετοχή των δύο βασικών υποπληθυσμών των T κυττάρων CD4+, CD8+ στην παραπάνω διαδικασία; Έχοντας υπόψη το ρόλο των CD4+ στην αναγνώριση συγκεκριμένων καρκινικών αντιγόνων (Melief, 1992) ελέγχθηκε η παρουσία τέτοιων κυττάρων και ο πιθανός ρόλος τους. Έτσι μελετήθηκε ο *in vitro* πολλαπλασιασμός (σαν αποτέλεσμα ενεργοποίησης) των CD4+ κυττάρων των διαφόρων ομάδων υπό την παρουσία L1210 κυττάρων (τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί για την *in vivo* διέγερση των μυών), καθώς και η ειδικότητα αυτής της ενεργοποίησης χρησιμοποιώντας άλλες κυτταρικές σειρές. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρουσιάζονται στον πίνακα 23. Κατά την πρώτη θυσία τα CD4+ κύτταρα των ομάδων #1 και #2 πολλαπλασιάζονται περίπου στον ίδιο βαθμό που είναι σημαντικά μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο των ομάδων #5 και #6. Η διέγερση των



CD4+ κυττάρων της ομάδας #3 ήταν πολύ μικρή κατά την πρώτη θυσία αλλά εφάμιλλη των αντίστοιχων των ομάδων #1 και #2 κατά τη δεύτερη θυσία. Αυτό σημαίνει ότι η διέγερση των CD4+ κυττάρων προς πολλαπλασιασμό, υπό την παρουσία των χορηγηθέντων L1210 κυττάρων, είναι ανάλογη της κυτταροτοξικότητας (CML) που εκδηλώνουν τα T κύτταρα (CTL) των αντίστοιχων ομάδων. Το εύλογο ερώτημα που προέκυψε ήταν αν μόρια του ΜΣΙ όπως και στην CML αναλαμβάνουν σημαντικό ρόλο παρουσίαση των καρκινικών αντιγόνων των L1210 κυττάρων σε CD4+ κύτταρα.



**ΠΙΝΑΚΑΣ 23.** Πολλαπλασιασμός CD4+ T κυττάρων κατόπιν *in vivo* και *in vitro* διέγερσης με L1210 συγγενικά καρκινικά κύτταρα. Γενετικός περιορισμός μέσω των I-A τάξεως II μορίων του MHC.

Ομάδα	1η θυσία(L1210) <sup>1</sup>				2η θυσία(L1210) <sup>1</sup>			2η θυσία	
	-	aI-A <sup>d</sup>	aH-2K <sup>d</sup>	-	aI-A <sup>d</sup>	aH-2K <sup>d</sup>	P815 <sup>1</sup>	Daudi <sup>1</sup>	YAC <sup>1</sup>
1	25.6	2.5 <sup>2</sup>	25.9	22.7	3.5	22.0	1.1	0.9	0.7
2	23.7	1.7	26.2	23.1	2.9	22.5	0.7	0.6	0.9
3	3.6	1.0	3.5	20.7	2.5	17.6	1.2	1.0	1.2
4	1.5	1.6	1.9	1.7	1.7	1.3	1.5	1.2	1.3
5	7.6	1.2	7.1	-	-	-	-	-	-
6	1.6	1.7	1.7	1.5	1.6	1.6	1.7	1.5	1.6

1: Τα κύτταρα ( $5 \cdot 10^4$  κύτταρα/φρεάτιο) που χρησιμοποιήθηκαν ακτινοβολήθηκαν (7000 rad). Ως εκ τούτου οι τιμές του τυφλού ήταν μικρότερες από 160 cpm σε όλες τις περιπτώσεις.



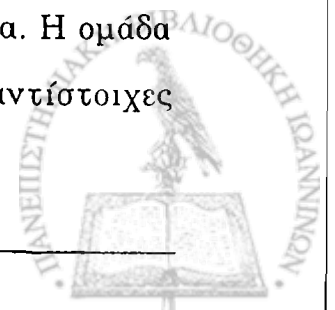
Χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά αντισώματα που αναγνωρίζουν τάξης I και τάξης II μόρια του Μ.Σ.Ι. στην επιφάνεια των L1210 κυττάρων βρέθηκε ότι τα υπεύθυνα μόρια στην περίπτωση αυτή ήταν τάξης II του ΜΣΙ και συγκεκριμένα το ΙΑ<sup>d</sup>. Η αναστολή παρατηρήθηκε ακόμη και στις ομάδες #3 και #5 που τα παρατηρούμενα μεγέθη ήταν χαμηλά.

Η δεύτερη θυσία επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα της πρώτης. Επιπλέον η χρησιμοποίηση διαφορετικών κυτταρικών σειρών κατά την *in vitro* διέγερση (P815, DAUDI, YAC) τονίζει την εξειδίκευση των CD4+ κυττάρων αφού αδυνατούν να πολλαπλασιαστούν *in vitro* παρουσία άλλων κυττάρων εκτός των L1210. Όταν τα CD8+ κύτταρα από τις διάφορες ομάδες καλλιεργήθηκαν με L1210, P815, DAUDI, YAC κύτταρα δεν έδειξαν καμιά πολλαπλασιαστική ικανότητα και ως εκ τούτου δεν παρουσιάζονται στον πίνακα 23.

Αρα ο πολλαπλασιασμός των CD4+ κυττάρων ακολουθεί το ίδιο πρότυπο με την κυτταροτοξικότητα των T κυττάρων, είναι ειδικός για τα χορηγηθέντα L1210 κύτταρα και πραγματοποιείται μέσω της τάξης II μορίων του Μ.Σ.Ι. ΙΑ<sup>d</sup>.

### Τα ΚΤΛ κύτταρα είναι CD8+.

Μετά τη διαπίστωση του ειδικού ΜΣΙ εξαρτώμενου πολλαπλασιασμού των CD4+ παρουσία L1210 κυττάρων, προσπαθήσαμε να ελέγξουμε την ειδικότητα των CD8+CTL. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στον πίνακα 24. Όπως παρατηρούμε υπάρχει μια αναλογία μεταξύ των αποτελεσμάτων αυτών και των αντίστοιχων του σχήματος 53. Για τις δύο πρώτες ομάδες η κυτταροτοξικότητα και στις δύο θυσίες ήταν σχεδόν ίδια, ενώ η τρίτη ομάδα αρχικά επέδειξε μια μικρή κυτταροτοξικότητα (3.2%) η οποία πλησίασε τα επίπεδα των δύο πρώτων (26.7%) στην δεύτερη θυσία. Η ομάδα #4 καταστρέφει τα L1210 κύτταρα στο ίδιο ποσοστό με τις αντίστοιχες



ομάδες των μαρτύρων. Τέλος η παρατηρούμενη κυτταροτοξικότητα ήταν ειδική για τα L1210 κύτταρα αφού όταν τα κύτταρα στόχοι ήταν P815 ή DAUDI η κυτταροτοξικότητα ήταν πολύ χαμηλή σε όλες τις περιπτώσεις. Τα CD4+ κύτταρα δοκιμάστηκαν σε ανάλογα πειράματα κυτταροτοξικότητας όπου διαπιστώθηκε ότι δεν υπήρχε κυτταροτοξικότητα ανεξάρτητα από το είδος των κυττάρων στόχων.

Από τον πίνακα 24 προκύπτει ότι η κυτταροτοξικότητα των κυττάρων διαφόρων ομάδων οφείλονται αποκλειστικά στα CD8+ κύτταρα και ότι η αντίδραση αυτή είναι αυστηρά εξειδικευμένη για τα χορηγηθέντα L1210 κύτταρα.

(A)  
(B)  
(C)  
(D)



**ΠΙΝΑΚΑΣ 24.** Η κυτταροτοξικότητα των CD8+ λεμφοκυττάρων *in vitro* είναι ειδική για τα *in vivo* χορηγηθέντα συγγενικά L1210 καρκινικά κύτταρα.

**Κύτταρα στόχοι**

<i>Ομάδα</i>	<i>L1210</i>	<i>P815</i>	<i>Daudi</i>
1	26.5 <sup>1</sup> /27.6 <sup>2</sup>	2.3/3.1	1.9/3.2
2	23.9/25.1	1.9/2.7	2.7/3.6
3	3.2/26.7	1.9/2.6	1.5/1.3
4	3.5/3.2	2.3/2.9	3.6/2.3
5	2.2/-	2.5/-	1.9/-
6	3.5/5.1	2.3/3.1	2.7/3.3

1, 2: %Αελευθέρωση <sup>51</sup>Cr από την 1<sup>η</sup> και 2<sup>η</sup> θυσία αντίστοιχα.

Μεγαρούλη, 1989



### Συνεργασία των CD4+ και CD8+ κυττάρων για την εκδήλωση κυτταροτοξικότητας.

Στις προηγούμενες δύο παραγράφους δείχθηκε η ικανότητα των CD4+ κυττάρων να αναγνωρίζουν L1210 κύτταρα και να διεγείρονται προς πολλαπλασιασμό καθώς και η κυτταροτοξική ικανότητα των CD8+ κυττάρων απέναντι στα ίδια κύτταρα. Το εύλογο ερώτημα που προέκυψε ήταν κατά πόσο τα L1210-ειδικά CD4+ κύτταρα ρυθμίζουν την κυτταροτοξική λειτουργία των CD8+ -L1210 ειδικών κυττάρων. Ειδικότερα, χρησιμοποιήθηκαν CD8+ κύτταρα από την ομάδα #5 (που είχε δεχθεί μόνο τη χορήγηση L1210 κυττάρων-επομένως εκεί υπήρχαν CD8+ CTL με ειδικότητα για τα L1210 κύτταρα τα οποία όμως έδειχναν χαμηλά ποσοστά κυτταροτοξικότητας λόγω της ελλειπούς ενεργοποίησης των αυτολόγων CD4+ κυττάρων προφανώς επειδή σε αυτούς τους μυς δεν χορηγήθηκε ProTa) τα οποία αναμίχθηκαν με CD4+ κύτταρα που προέρχονταν από τις υπόλοιπες ομάδες. Με τον τρόπο αυτό εξετάσθηκε η ικανότητα των CD4+ να ρυθμίζουν τη δράση των CD8+. Η κυτταροτοξικότητα των CD8+ κυττάρων της ομάδας #5, χωρίς την παρουσία CD4+, δείχνεται στον πίνακα 24 (2.2%). Στον πίνακα 25 απεικονίζεται η τροποποίηση αυτής της κυτταροτοξικότητας εξαιτίας της προσθήκης των CD4+ κυττάρων και για τις δύο θυσίες. Η παρουσία των CD4+ κυττάρων από την ίδια ομάδα έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της κυτταροτοξικότητας σε χαμηλά ποσοστά κατά την πρώτη θυσία σε  $7.9 \pm 0.6\%$ . Όταν τα προστιθέμενα CD4+ κύτταρα προέρχονταν από τις ομάδες #1 και #2 υπήρξε μια σημαντική αύξηση της κυτταροτοξικότητας η οποία ήταν παρόμοια και για τις δύο θυσίες (σύγκρινε  $22.5 \pm 1.9$ ,  $25.2 \pm 1.1$  με  $19.3 \pm 0.7$ ,  $20.9 \pm 1.3$  αντίστοιχα)(πίνακας 11). Αντιθέτως η προσθήκη των CD4+ της ομάδας #3 έχει σαν συνέπεια αύξηση της κυτταροτοξικότητας μόνο όταν αυτά προέρχονταν από μυς της δεύτερης θυσίας γεγονός που εναρμονίζεται

με τα όσα εκτέθηκαν στις παραπάνω σελίδες. Τα CD4+ κύτταρα της ομάδας #4 δεν βοηθούσαν τα εν λόγω CD8+ ώστε αυτά να καταστρέψουν τα L1210 σε ποσοτά μεγαλύτερα από τα αντίστοιχα των μαρτύρων. Ο μηχανισμός που επιτελείται η κυτταροτοξικότητα εμπλέκει τα κλάσης I αντιγόνα του Μ.Σ.Ι. (H-2K<sup>d</sup>) αφού η σύνδεση των αντίστοιχων αντισωμάτων στα L1210 κύτταρα έχει σαν συνέπεια την αναστολή της δράσης των CD8+, σε όλες τις περιπτώσεις. Επίσης δεν παρατηρήθηκε καμιά δράση των CD8+ όταν τα κύτταρα στόχοι αποτελούνταν από P815, DAUDI. Έτσι αποδεικνύεται η εξειδίκευση από τις παραπάνω επιδράσεις. Αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι η ειδική κυτταροτοξικότητα που εκδηλώνεται από τα CD8+ κύτταρα ρυθμίζεται από τα CD4+ που έχουν δεχθεί τη χορήγηση ProTa και L1210. Επίσης όταν τα CD4+ δέχονται μόνο την επίδραση της ProTa χωρίς την παρουσία των L1210 κυττάρων (ομάδα #4) αδυνατούν να διεγείρουν CD8+ κύτταρα προς κυτταροτοξικότητα (Baxevanis et al., 1993). Επιπρόσθετα τα CD4+ που έχουν δεχθεί την επίδραση L1210 κυττάρων δεν είναι ικανά να προκαλέσουν την καταστροφή των L1210. Δηλαδή η συνεργιστική δράση της ProTa και των L1210 διεγείρουν τα CD4+ που με τη σειρά τους ρυθμίζουν την κυτταροτοξικότητα των CD8+ εναντίον των L1210 κυττάρων.

Μετα



**ΠΙΝΑΚΑΣ 25.** Ρύθμιση της CD8+ κυτταροτοξικότητας εναντίον των L1210 κυττάρων από συγγενικά ρυθμιστικά CD4+ κύτταρα.

*Προέλευση Κυτταροτοξική ενεργότητα των CD8+ κυττάρων των CD4+ από μυσ της ομάδας #5 (1η θυσία) αναμεμιγμένων κυττάρων με CD4+ κύτταρα*

		<i>L1210</i>	<i>L1210+antiH-2K<sup>d</sup></i>	<i>P815</i>	<i>Daudi</i>
Ομάδα	1	22.5±1.9	2.9±0.6	2.5±0.3	1.7±0.3
	2	25.2±1.1	2.2±0.7	3.5±0.7	2.3±0.5
	3	9.6±2.3	2.2±0.1	1.6±0.2	3.1±0.3
1η θυσία <sup>1</sup>	4	7.7±2.6	2.5±0.2	2.5±0.3	1.9±0.6
	5	7.9±0.6	1.1±0.3	1.9±0.2	2.2±0.2
	6	7.6±0.7	1.3±0.5	2.3±0.1	2.5±1.0
	1	19.3±0.7	1.9±0.3	1.9±0.3	2.7±0.3
2η θυσία <sup>2</sup>	2	20.9±1.3	2.2±0.5	0.7±0.2	2.2±0.2
	3	22.5±2.3	2.3±1.0	2.3±1.2	2.5±0.2
	4	7.6±1.6	2.2±0.3	1.3±0.1	1.9±0.9
	6	7.2±0.6	1.5±0.3	0.9±0.2	1.7±0.6

- Κατά την 1η θυσία CD4+ κύτταρα από τις ομάδες που δεικνύονται αναμίχθησαν με CD8+ κύτταρα της ομάδας #5.
- Οι ομάδες που χρησιμοποιήθηκαν για τη 2η θυσία σχηματίσθηκαν 9 μέρες πριν από αυτές που χρησιμοποιήθηκαν για την πρώτη θυσία έτσι ώστε και οι δύο θυσίες να συμπέσουν. Με αυτό τον τρόπο κατορθώθηκε να εξετασθεί η ρυθμιστική δράση CD4+ κυττάρων πάνω στην CD8+ κυτταροτοξικότητα και από τις δύο θυσίες ταυτόχρονα.

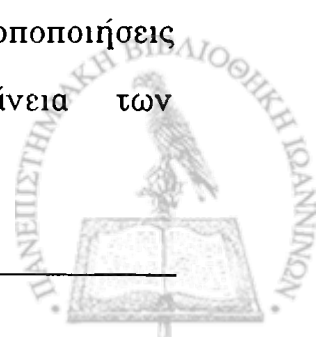




## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στα πλαίσια της παρούσης διατριβής έγινε μια όσο το δυνατόν λεπτομερής ανάλυση του μηχανισμού δράσης της ProTa σε ρυθμιστικές και εκτελεστικές λειτουργίες του ΑΣ. Οι ρυθμιστικές λειτουργίες του ΑΣ, εξετάστηκαν σε *in vitro* μοντέλα όπου αναλύθηκε η βιολογική δράση της ProTa στα κατ'εξοχήν υπεύθυνα κύτταρα του ΑΣ για την ανοσορύθμιση δηλ. τα CD4+ κύτταρα. Σε αυτού του είδους τα πειράματα έπρεπε η *in vitro* ενεργοποίηση των CD4+ κυττάρων να αντανakλά όσο το δυνατόν πιστότερα αυτήν που πραγματοποιείται *in vivo* έτσι ώστε να μας παρέχεται η πεποίθηση ότι η παρατηρούμενη δράση της ProTa *in vitro* δυνατόν να ισχύει και σε ανοσορυθμιστικές λειτουργίες *in vivo*. Γι αυτό λοιπόν το λόγο σαν αντιγόνο επιλέχθηκε το τοξοειδές του τετάνου (tetanus toxoid, TT) το οποίο χρησιμοποιείται για εμβολιασμό στον άνθρωπο και επάγει την δημιουργία κυττάρων μνήμης ειδικών για TT (Via et al., 1990). Έτσι λοιπόν στον ανθρώπινο οργανισμό υπάρχουν ήδη TT ειδικά ρυθμιστικά CD4+ κύτταρα τα οποία ενεργοποιούνται σε υψηλά ποσοστά *in vitro* παρουσία TT γεγονός που προσδίδει την δυνατότητα εκτενούς μελέτης της δράσης της ProTa σε ανοσοκυτταρικά CD4+ -επαγόμενα λειτουργικά συστήματα.

Η δράση της ProTa σε εκτελεστικές λειτουργίες του ΑΣ μελετήθηκε σε *in vitro* και *in vivo* πειραματικά μοντέλα. Οι *in vivo* πειραματικές διαδικασίες συμπεριέλαβαν την ενίσχυση της άμυνας του οργανισμού εναντίον αυτόλογων καρκινικών κυττάρων (ΑΛΚ). Σε αυτά τα πλαίσια η ProTa χορηγήθηκε είτε πριν την έγχυση των ΑΛΚ έτσι ώστε να εξετασθεί ο ρόλος της σαν προστατευτικό αντιδραστήριο, ή ταυτόχρονα με την έγχυση των ΑΛΚ για να αναλυθεί ο ρόλος της σαν θεραπευτικό μέσο. Η γενικότερη δράση της ProTa *in vivo* ελέγχθηκε με τέσσερις τρόπους: πρώτον αναλύθηκαν τροποποιήσεις σχετικές με την έκφραση γλυκοπρωτεϊνών στην επιφάνεια των



λεμφοκυττάρων σε λεμφοειδή όργανα όπως ο σπλήνας. Είναι γνωστό ότι η κυτταρική συνεργασία και επαγωγή ανοσολογικών μηχανισμών επιτελείται μέσω της αναγνώρισης και σύνδεσης μορίων επιφανείας μεταξύ των κυττάρων που έρχονται σε επαφή και επομένως η τροποποίηση της έκφρασης αυτών των μορίων οδηγεί σε τροποποιήσεις ανοσολεειτουργιών. Δεύτερον, εξετάσθηκε η παραγωγή ποικίλων κυτταροκινών που παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανοσορύθμιση και τις κυτταροτοξικές λειτουργίες του ΑΣ. Με αυτόν τον τρόπο μελετήθηκε κατά πόσο η δράση της ProTa in vivo θα μπορούσε να είναι έμμεση δηλ. οι ProTa επαγόμενες ανοσοτροποποιήσεις να επιτυγχάνονται διά της ProTa αύξησης των επιπέδων των κυτταροκινών. Τρίτον, εξετάσθηκε κατά πόσο η ProTa τροποποιεί την κυτταροτοξική λειτουργία όλων των κυρίων τύπων κυτταροτοξικών κυττάρων δηλ. των T λεμφοκυττάρων, των NK κυττάρων και των LAK κυττάρων. Με αυτό τον τρόπο θα είχαμε μια άμεση απόδειξη για τον τρόπο που εκδηλώνει η ProTa την αντικαρκινική της δράση in vivo αφού και οι τρεις προαναφερθέντες τύποι κυτταροτοξικών κυττάρων εκδηλώνουν ογκολυτική λειτουργικότητα. Τέταρτον, έγινε σαφής προσδιορισμός του χρονικού διαστήματος που μεσολάβησε για την ανάπτυξη του όγκου σαν ασκητικό υγρό στην περιτοναϊκή κοιλότητα μεταξύ οργανισμών που δέχθηκαν ProTa και μαρτύρων. Επίσης στις ίδιες ομάδες έγινε σύγκριση του χρονικού μήκους επιβίωσης. Αυτό το τελευταίο είναι καθοριστικό για τη δράση της ProTa in vivo και βέβαια συνδέεται άμεσα με τα προηγούμενα τρία που μας παρέχουν πληροφόρηση για τους μηχανισμούς μέσω των οποίων εκδηλώνεται η αντικαρκινική δράση της ProTa in vivo. Σε αυτό το σημείο πρέπει να αναφερθεί ότι η in vivo δράση της ProTa, εκτός των εκτελεστικών λειτουργιών του ΑΣ μελετήθηκε και σε ρυθμιστικές λειτουργίες αφού εξετάσθηκε και ο ρόλος των CD4+ κυττάρων των οργανισμών που δέχθηκαν ProTa στο να συνεργάζονται με τα CD8+ κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα για την εκδήλωση κυτταροτοξικότητας. Είναι ήδη γνωστό ότι

επαγωγή κυτταροτοξικών T κλώνων (CTL) ειδικών για ένα συγκεκριμένο αντιγόνο απαιτεί την προενεργοποίηση ρυθμιστικών CD4+ κυττάρων που αναγνωρίζουν το ίδιο αντιγόνο ταυτόχρονα με τα μόρια τάξης II του MHC (*Melief,1992*). Τα ενεργοποιημένα CD4+ κύτταρα παράγουν κυτταροκίνες (κυρίως IL2, IL12) και υποβοηθούν στην ενεργοποίηση και διαφοροποίηση προδρόμων CTL. Τα τελευταία έχουν ήδη μερικώς διαφοροποιηθεί, κατόπιν αναγνώρισης του αντιγόνου με τα μόρια τάξης I του MHC, σε κυτταροτοξικά CTL που καταστρέφουν κύτταρα στόχους τα οποία φέρουν στην επιφάνειά τους το συγκεκριμένο αντιγόνο (*Melief,1992*). Έτσι λοιπόν το σύστημα της επαγόμενης κυτταροτοξικότητας μέσω των CTL μας παρέχει τη δυνατότητα εξέτασης της ρυθμιστικής λειτουργίας των CD4+ κυττάρων και κατ' επέκταση την ανάλυση της βιολογικής *in vivo* δράσης της ProTa στα ίδια κύτταρα.

Στο τρίτο τμήμα της παρούσης διατριβής μελετήθηκε η δράση της ProTa σε μοντέλα κυτταροτοξικότητας με ανθρώπινα λεμφοκύτταρα που εκδηλώνουν σχετική δραστηριότητα εναντίον καρκινικών κυττάρων και τα οποία κατά την τελευταία δεκαετία έχουν χρησιμοποιηθεί σε κλινικές δοκιμές για την ανοσοθεραπεία του καρκίνου. Αυτά συμπεριέλαβαν τα κύτταρα α) που διηθούν συμπαγείς όγκους (TIL), β) που ευρίσκονται σε κακοήθειες συλλογές υγρών (EAMNC), γ) που είναι στο περιφερικό αίμα και ενεργοποιούνται σε καλλιέργειες με IL2 (LAK), δ) NK και ε) CTL. Με αυτό τον τρόπο εξετάστηκε η δράση της ProTa σε όλους τους τύπους λεμφοκυττάρων στον άνθρωπο που εκδηλώνουν αντικαρκινική κυτταροτοξική δράση και που όπως προαναφέρθηκε έχουν χρησιμοποιηθεί σε ανοσοθεραπευτικά πρωτόκολλα για τον καρκίνο (*Rosenberg et al.,1986, Foa et al.,1992*). Το υλικό συλλέχθηκε από μια πληθώρα τύπων καρκίνου σε διαφορετικά στάδια έτσι ώστε να εξακριβωθεί το κατά πόσο επιλεκτικά δρα η ProTa σε αυτά τα συστήματα. Η πληροφόρηση από αυτού του είδους τα πειράματα παρέχει την θεμελιώδη βάση για μελλοντική



χρησιμοποίηση της ProTa σε συνδυασμό με άλλες κυτταροκίνες σε κλινικές δοκιμές ανοσοθεραπείας του καρκίνου.

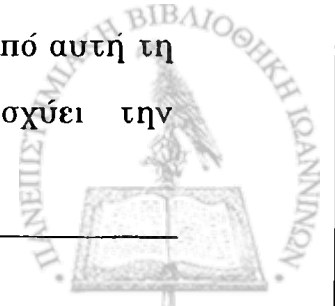
Η ProTa σε όλες τις προαναφερθείσες πειραματικές διαδικασίες έδειξε ανοσοενισχυτική δράση η οποία τουλάχιστον στο ανθρώπινο σύστημα επιτεύχθηκε σε συγκεντρώσεις που διέφεραν μεταξύ των ατόμων που εξετάστηκαν. Τόσο η ανοσοενισχυτική δράση της ProTa όσο και το εύρος των ιδανικών δόσεων μεταξύ των δοτών συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες όπου η δράση της ProTa εξετάστηκε σε συστήματα ενεργοποίησης T λεμφοκυττάρων στη μικτή λεμφοκυτταρική αντίδραση τόσο σε υγιείς δότες όσο και σε ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας (*Reclos et al., 1987*) και ερυθρηματώδη λύκο (*Baxevanis et al., 1987a*).

Η ProTa αύξησε σε στατιστικά σημαντικά επίπεδα την ενεργοποίηση των CD4+ κυττάρων σε καλλιέργειες με TT. Μάλιστα η αύξηση της ενεργοποίησης αυτής συνοδεύθηκε με αυξημένα επίπεδα των κυτταροκινών IL2, TNF και IL1. Επειδή ακριβώς τα CD4+ κύτταρα αποτελούν τον κατ' εξοχήν ρυθμιστικό υποπληθυσμό των T κυττάρων, η ανοσοενισχυτική in vitro δράση της ProTa σε αυτά υποδηλώνει μια παρόμοια δράση in vivo. Η ανοσοεπιτήρηση που επιτελούν τα CD4+ κύτταρα in vivo αποσκοπεί κυρίως στην παρεμπόδιση εκδήλωσης αυτοαντίδρασης από T κυτταροτοξικούς ή B κλώνους που θα είχε σαν αποτέλεσμα την καταστροφή ιστών και την εκδήλωση αυτοανοσίας (*McFarlin and McFarland, 1982*). Πράγματι σε πολλά αυτοάνοσα νοσήματα όπως ρευματοειδής αρθρίτιδα, ερυθρηματώδης λύκος, σκλήρυνση κατά πλάκας, έχει δειχθεί μια δυσλειτουργία στον ανοσορυθμιστικό CD4+ υποπληθυσμό (*Bach et al., 1980, Morimoto et al., 1980*). Επομένως, βάσει των αποτελεσμάτων της διατριβής, η ProTa θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί in vivo για την ενίσχυση ελαττωματικών λειτουργιών των CD4+ κυττάρων σε πειραματικά μοντέλα αυτοανοσίας όπως π.χ. πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα η οποία σε επίμυς προκαλεί συμπτώματα παρόμοια της σκλήρυνσης κατά πλάκας. Το

γεγονός ότι η δράση της ProTa σε CD4+ κύτταρα δείχθηκε σε σύστημα ενεργοποίησης με TT δεν εμποδίζει την κατάληξη στο συμπέρασμα ότι αυτή δρα γενικώς σε CD4+ κλώνους αφού α) τα ποσοστά των TT ειδικών κλώνων στον άνθρωπο είναι υψηλά λόγω των προηγούμενων ανοσοποιήσεων με TT και β) είναι γνωστό ότι CD4+ κλώνοι με ειδικότητα για ένα τυχόν αντιγόνο X, συμβάλλουν στην ανοσορύθμιση αναγνωρίζοντας αντιγονικούς επιτόπους στα κύτταρα των οποίων την λειτουργικότητα ελέγχουν (αυτοαντίδραση). Ο μηχανισμός με τον οποίον η ProTa ενισχύει την ενεργοποίηση και πολλαπλασιασμό των CD4+ κυττάρων προφανώς εγκείται στην αύξηση των επιπέδων των TNFα, IL1β και IL2 στις καλλιέργειες. Είναι ήδη γνωστό από τη διεθνή βιβλιογραφία ότι σε συστήματα παρουσίασης αντιγόνου τα κύτταρα παρουσιαστές του (π.χ. μονοκύτταρα), εκκρίνουν TNFα και IL1β που καταναλώνονται από τα T λεμφοκύτταρα (μέσω ειδικών υποδοχέων) και επάγουν τη σύνθεση και έκκριση της IL2 η οποία με τη σειρά της καταναλώνεται από τα ίδια τα T λεμφοκύτταρα (που εν τω μεταξύ έχουν εκφράσει τον IL2 ειδικό υποδοχέα). Τα αποτελέσματα της διαδοχικής επίδρασης των TNFα, IL1β και IL2 στα T λεμφοκύτταρα (που έχουν αναγνωρίσει το αντιγόνο σε συνδυασμό με τα μόρια τάξης II του MHC) έχει σαν αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό τους (Rosenberg et al., 1987).

Πράγματι έχει δειχθεί ελλειπής πολλαπλασιασμός των T λεμφοκυττάρων με χαμηλά επίπεδα των ανωτέρω κυτταροκινών (Cameron et al., 1988). Επομένως βάσει των προαναφερθέντων η δια της ProTa επαγόμενη αύξηση των επιπέδων των IL1β, TNFα και IL2, συντελεί στην ενίσχυση της ενεργοποίησης και πολλαπλασιασμού των CD4+ κυττάρων.

Τα in vivo πειράματα για την απόδοση αντικαρκινικής δράσης στην ProTa έδειξαν τον ανοσοενισχυτικό τους ρόλο στην λειτουργικότητα των CD8+ κυτταροτοξικών κυττάρων (CTL). Ένα ακόμη σημαντικό εύρημα από αυτή τη σειρά των πειραμάτων είναι ότι η ProTa επιλεκτικά ενισχύει την



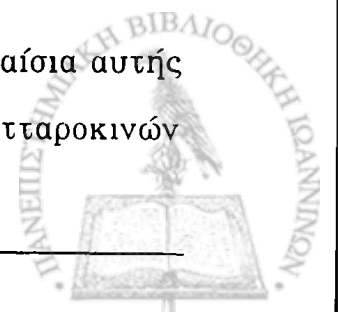
ενεργοποίηση T λεμφοκυττάρων που αναγνωρίζουν καρκινικά αντιγόνα στα λευχαιμικά L1210 κύτταρα είτε αυτά είναι CD4+ ρυθμιστικά ή CD8+ κυτταροτοξικά κύτταρα. Έτσι λοιπόν πέραν από το γεγονός ότι η ProTa ενισχύει την κυτταροτοξικότητα σε λεμφοκυτταρικούς υποπληθυσμούς που το εν γένει λειτουργικό τους πρόγραμμα είναι μη ειδικό δηλ. λύουν κύτταρα στόχους (π.χ. καρκινικά κύτταρα) χωρίς να είναι αναγκαίο να αναγνωρίζουν καρκινικά αντιγόνα σε συνδυασμό με μόρια του MHC (όπως είναι τα NK και LAK κύτταρα) επιπλέον η ProTa ενισχύει την κυτταροτοξικότητα και σε κύτταρα με ειδικό λειτουργικό πρόγραμμα όπως είναι τα CTL που λύουν αυτόλογα καρκινικά κύτταρα κατόπιν αναγνώρισης των καρκινικών αντιγόνων μαζί με τα τάξης I μόρια και του MHC (*Melief,1992*). Το τελευταίο δείχθηκε με τον πλέον πειστικό τρόπο αφού μονοκλωνικά αντισώματα εναντίον αυτών των μορίων του MHC αναχαίτησαν την ενισχυμένη κυτταροτοξικότητα των CTL εναντίον των συγγενικών λευχαιμικών L1210 κυττάρων. Παρ' όλα αυτά αρκετά σημαντικό είναι και το εύρημα ότι η ProTa ενισχύει την NK και LAK επαγόμενη κυτταροτοξικότητα. Οι συγκεκριμένοι υποπληθυσμοί [η πλειονότητα των LAK κυττάρων προέρχεται από τα δια της IL2 ενεργοποιημένα NK κύτταρα (*Roit,1991*)] αποτελούν την "πρώτη γραμμή" άμυνας του οργανισμού εναντίον ενός αναπτυσσόμενου όγκου ακριβώς διότι δρουν μη ειδικά, δηλ. δεν χρειάζεται προενεργοποίησή τους με τα καρκινικά αντιγόνα σε συνδυασμό με τα μόρια του MHC (*Trincheri,1989*).

Σύγχρονοι μέθοδοι ανοσοθεραπείας του καρκίνου συμπεριλαμβάνουν πρωτόκολλα που συνίστανται στην έγχυση στον ασθενή αυτολόγων λεμφοκυττάρων ενεργοποιημένων in vitro με IL2 και υψηλών δόσεων IL2 (*Rosenberg,1992*). Τα προς έγχυση κύτταρα είναι LAK (*Rosenberg,1987*) ή TIL (*Topalian et al.,1989*) και πρόσφατα EAMNC (*Baxeuanis et al.,1994a*). Αν και αρχικά επεκράτησε η άποψη ότι τα TIL είναι εμπλουτισμένα με T λεμφοκύτταρα με ειδικότητα για αυτόλογα καρκινικά αντιγόνα και έτσι

παρουσία IL2 το ποσοστό αυτών των ήδη ενεργοποιημένων T λεμφοκυττάρων (αφού απομονώνονται μέσα από τον όγκο) θα αυξάνονταν σημαντικά με συνέπεια την αποτελεσματικότερη καταστροφή των αυτόλογων καρκινικών κυττάρων *in vivo*, εν τούτοις τα κλινικά ευρήματα με LAK ή TIL ήσαν παρόμοια (Rosenberg,1992). Από την άλλη πλευρά η έγχυση υψηλών δόσεων IL2 έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία τοξικών παρενεργειών στους ασθενείς και έτσι τερματίζεται πρόωρα η θεραπευτική αγωγή (Rosenberg,1992).

Με βάση τις δύο προαναφερθείσες παρατηρήσεις πολλά ερευνητικά εργαστήρια μελέτησαν το ενδεχόμενο χρησιμοποίησης συνδυασμού χαμηλών δόσεων IL2 με άλλη ή άλλες κυτταροκίνες που θα επέφεραν εξίσου υψηλή *in vitro* ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων (δηλ. τόση όση θα επιτυγχνόταν με υψηλές δόσεις IL2) με προφανώς βελτιωμένα κλινικά αποτελέσματα και αποφυγή των τοξικών παρενεργειών. Έτσι λοιπόν κατά καιρούς έχουν δημοσιευθεί αποτελέσματα που δείχνουν τη συνεργιστική δράση διαφόρων κυτταροκινών όπως TNF, IL1, IFN κ.α., με την IL2 στην *in vitro* ενεργοποίηση των LAK ή TIL (Matosian Rogers et al.,1989, Cameron et al., 1988, Crump et al., 1989). Επίσης υπάρχουν δημοσιεύσεις σχετικές με την έγχυση ενεργοποιημένων LAK ή TIL με τους ανωτέρω συνδυασμούς των κυτταροκινών σε ασθενείς (Rosenberg et al.,1987, Lee et al., 1989). Στα πλαίσια αυτής της διατριβής δείχθηκε για πρώτη φορά ότι η ProTa δείχνει συνεργιστική δράση με την IL2 στην ενεργοποίηση TIL, LAK καθώς και EAMNC. Αυτή η συνεργιστική δράση επιτεύχθηκε σε μια πληθώρα τύπων καρκίνου διαφορετικών σταδίων. Το εύρημα αυτό είναι σημαντικό διότι καθιστά την ProTa σαν ένα επιπλέον υποψήφιο για μελλοντική *in vivo* χρησιμοποίηση με την IL2 σε ανοσοθεραπευτικά σχήματα ανεξάρτητα με τον τύπο ή το στάδιο του καρκίνου.

Στα *in vitro* αλλά και στα *in vivo* πειράματα που έγιναν στα πλαίσια αυτής της διατριβής η ProTa δείχθηκε να αυξάνει τα επίπεδα των κυτταροκινών



όπως TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  και IL2. Όπως προαναφέρθηκε αυτές οι κυτταροκίνες συντελούν στην ενεργοποίηση των CD4+ κυττάρων. Ομως υπάρχει αρκετή βιβλιογραφία που αποδεικνύει ότι οι ίδιες παίζουν σημαντικό ρόλο και στην ενεργοποίηση των κυτταροτοξικών κυττάρων (Baxevanis et al., 1993). Επομένως θα μπορούσαμε να δεχθούμε σαν ένα γενικό μηχανισμό για την ανοσοενισχυτική δράση της ProTa σε CD4+ κύτταρα και κυτταροτοξικά (CD8+, NK, LAK, TIL, EAMNC) κύτταρα την αύξηση στις καλλιέργειες (in vivo) των επιπέδων των προαναφερθέντων κυτταροκινών χωρίς βέβαια να αποκλείουμε την πιθανότητα και επιπροσθέτων μηχανισμών, όπως π.χ. αύξηση επιπέδων άλλων κυτταροκινών (π.χ. IL12) αύξηση μορίων σύνδεσης (π.χ. ICAM1, LFA1) κ.α.

Η επιμύκηση της βιωσιμότητας (ή και της θεραπείας που παρατηρήθηκε σε ένα αρκετά σημαντικό ποσοστό) των DBA/2 μυών που δέχθηκαν αυτόλογα καρκινικά L1210 κύτταρα δια της έγχυσης ProTa στα προαναφερθέντα πρωτόκολλα, αποδείχθηκε να επιτυγχάνεται μέσω της: α) της ειδικής ενεργοποίησης των CD4+ ρυθμιστικών κυττάρων σε συνδυασμό με την ειδική (CD8+, CTL) και μη ειδική (NK, LAK) ενεργοποίηση κυτταροτοξικών κυττάρων β) με την αύξηση μορίων επιφανείας στα αντίστοιχα κύτταρα και γ) με την αύξηση των επιπέδων κυτταροκινών. Αυτά τα αποτελέσματα σε συνδυασμό με την ενεργότητα της ProTa να αυξάνει την δια των TIL-, LAK- και EAMNC- επαγόμενη κυτταροτοξικότητα εναντίον αυτόλογων καρκινικών κυττάρων με την ταυτόχρονη παρουσία IL2 τοποθετούν τις θεμελιώδεις βάσεις για μελλοντική χρησιμοποίηση του πολυπεπτιδίου αυτού σε πρωτόκολλα ανοσοθεραπείας του καρκίνου.





## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στα πλαίσια της παρούσης διατριβής εξετάσθηκε ο ρόλος της προθυμοσίνης α (ProTa) σε υπολειπόμενα συστήματα κυτταροτοξικότητας σε ασθενείς με καρκίνο. Επίσης αναλύθηκε ο μηχανισμός δράσης της ProTa σε T λεμφοκύτταρα που ρυθμίζουν την κυτταροτοξικότητα σε *in vitro* και *in vivo* μοντέλα όπου στα τελευταία δείχτηκε η αντικαρκινική της δράση. Στα συστήματα κυτταροτοξικότητας η ProTa έδειξε μια συνεργιστική δράση με την ιντερλευκίνη-2 (IL-2) και επέφερε μια στατιστικά σημαντική αύξηση της λύσης καρκινικών κυτταρικών σειρών. Αυτή η ενισχυτική δράση της ProTa δείχθηκε σε τρεις διαφορετικούς τύπους κυτταροτοξικών κυττάρων δηλ. των TIL (tumor infiltrating lymphocytes) που απομονώθηκαν από χειρουργημένα τεμάχια συμπαγών όγκων, LAK (lymphokine activated killers) που απομονώθηκαν από περιφερικό αίμα και των EAMNC (effusion associated mononuclear cells) που απομονώθηκαν από πλευριτικά και ασκίτικα υγρά. Το ανωτέρω υλικό (κύτταρα) συλλέχθηκε από μια πληθώρα ασθενών και από διαφορετικούς τύπους καρκίνων διαφορετικών σταδίων.

Σε όλες τις περιπτώσεις η ProTa έδειξε ενισχυτική δράση που κυμάνθηκε από 13% έως 69.5% .

Εξετάσθηκαν διάφορες δόσεις ProTa και η μέγιστη δράση της παρατηρήθηκε σχεδόν πάντα σε μία ή δύο συγκεντρώσεις που διέφεραν από άτομο σε άτομο. Οι ιδανικές δόσεις ProTa κυμάνθηκαν από 31,25 ng/ml έως 250 ng/ml. Επίσης εκτός της συνεργιστικής δράσης της στην αύξηση της IL-2 επαγόμενης κυτταροτοξικότητας, η ProTa συνέτεινε στην αύξηση της δια των κυττάρων φυσικών φονέων (Natural Killer Cells, NK) αυτόματης λύσης καρκινικών κυττάρων, όπως επίσης και σε αυτήν που επάγεται σε μεικτές καλλιέργειες λεμφοκυττάρων που συντελείται από κυτταροτοξικά (CD8+) T λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος (cytotoxic T lymphocytes, CTL). Η ProTa επίσης δείχθηκε



να ενισχύει την ενεργοποίησή και τον πολλαπλασιασμό των ρυθμιστικών CD4+ λεμφοκυττάρων σε *in vitro* πειραματικά μοντέλα παρουσία του τοξοειδούς του τετάνου (tetanus toxoid, TT). Ο μηχανισμός δράσης της ProTa σε αυτά τα συστήματα δείχθηκε να λειτουργεί μέσω της αύξησης της παραγωγής κυτταροκινών (IL-2, IL-1β, TNFα). Τέλος η ενισχυτική δράση της ProTa στην κυτταροτοξικότητα δείχθηκε και σε *in vivo* πειραματικά μοντέλα όπου η ProTa ενίσχυσε την δια των CD8+ λεμφοκυττάρων εκδηλούμενη κυτταροτοξικότητα εναντίον αυτολόγων καρκινικών κυττάρων αυξάνοντας έτσι την επιβίωση των πειραματοζώων .

Η *in vitro* ενισχυτική δράση της ProTa σε συστήματα κυτταροτοξικότητας έναντι καρκινικών κυττάρων σε συνδυασμό με την *in vivo* αντικαρκινική της δράση, καθιστά το πολυπεπτίδιο αυτό υποψήφιο για κλινικές δοκιμές στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου.



## SUMMARY

In the framework of this thesis we have investigated the role of prothymosin  $\alpha$  (ProT $\alpha$ ) in the modulation of regulatory and cytotoxic lymphocyte activities in *in vitro* and *in vivo* models. The models assessing regulatory T lymphocyte activities were i) CD4 cell mediated proliferation to tetanus toxoid (TT) (*in vitro* model) and ii) CD4 cell mediated responses to L1210 leukemic cells including proliferation and induction of L1210 cytotoxic activity (*in vivo* model). The effect of ProT $\alpha$  on cytotoxic responses was analysed utilising as effector cells lymphocytes from cancer patients which were isolated from surgically excised solid tumors (tumor infiltrating lymphocytes, TIL), from malignant pleural or peritoneal effusions (Effusion Associated Mononuclear Cells, EAMNC), or from peripheral blood (lymphokine activated killers, LAK).

In addition, ProT $\alpha$  was tested for each effect on the natural killer (NK) cell mediated cytotoxicity and on cell mediated lympholysis (CML) which represents the capacity of T lymphocytes to lyse major histocompatibility complex (MHC)-restricted tumor targets on secondary cultures. Finally ProT $\alpha$  was tested for *in vivo* anticancer activity in animals which were injected with syngeneic leukemic cells.

ProT $\alpha$  was found to potentiate the activation and proliferation of CD4<sup>+</sup> cells to TT by inducing increased levels of IL-1 and IL-2 as well as TNF $\alpha$  in cultures. More importantly, ProT $\alpha$  was demonstrated to exert an overall enhancing effect on cytotoxic responses by inducing higher levels of IL-2 and decreasing the levels of prostaglandin E<sub>2</sub> in cultures. Moreover ProT $\alpha$  has shown a synergistic effect with IL-2 in inducing cytotoxic activity in TIL, EAMNC and LAK. Finally ProT $\alpha$  exhibited anticancer capacity *in vivo* by prolonging the survival of experimental animals against the growth of syngeneic tumor cells.



In conclusion, the data in the present thesis strongly emphasize the role of ProTa as an agent with tumoricidal activity and puts forward its use in clinical trials for cancer immunotherapy.

IN  
B



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. AKBAR A.N., SALMON M., JANOSSY G. (1991).  
The synergy between naive and memory T cells during activation.  
***Immunol Today 12:184-188.***
2. ALBERTINI M.R., NICKLAS J.A., CHASTENAY B.F., HUNTER T.C., ALBERTINI R.J.,  
CLARK S.S. HANK J.A., SONDEL P.M. (1991).  
Analysis of T cell receptor  $\Delta$  and a genes from peripheral blood, regional  
lymphnode and tumor-infiltrating lymphocyte clones from melanoma patients.  
***Cancer Immunol.Immunother. 32: 325-330.***
3. ALIVERTI A., GALARIS D., TSOLAS O. (1995).  
Superoxide anion generation by human peripheral blood mononuclear cells in  
response to prothymosin  $\alpha$ .  
***Arch.Biochem.Biophys. 321,1: 108-114.***
4. ALLAVENA P., PRESTI L.O., DI BELLO M., LUCCHINI V., LISSONI A., ZANETTA G.,  
MANGIONI C., MANTOVANI A.(1988).  
Proliferative response of lymphocytes from cancer patients to autologous tumor  
cells.  
***Cancer.Immunol.Immunother. 27: 69-76.***
5. ANASTASOPOULOS E., RECLOS G.J., BAXEVANIS C.N., GRITZAPIS A.D.,  
PANAGIOTOPOULOS N., FOTIOU S., MISSITZIS I., KARYDAS I.  
PAPAMICHAIL M. (1992).  
Monocyte disorders associated with T cell defects in cancer patients with solid  
tumors.  
***Anticancer Res. 12: 489-497.***
6. ANDERSON T.M., IBAYASHI Y., HOLMES E.C., GOLUB S.H. (1987).  
Modification of natural killer activity of lymphocytes infiltrating human lung  
cancers.  
***Cancer Immunol.Immunother. 25: 65-72.***
7. ANICHINI A. (1989).  
Immune response to specific human tumors.  
***Curr.Opin.Immunol. 1:917-921.***



8. AZUMA M., CAYABYAB M., BUCK D., PHILLIPS J.H., LANIER L.L. (1992).  
CD28 interaction with B7 co-stimulates primary allogeneic proliferative responses and cytotoxicity mediated by small resting T lymphocytes.  
***J.Exp.Med.* 175: 353-360.**
9. BACH M.A., PHAN DINH-TOY F., TOURNIER E., CHATNOUD BACH J.F. (1980).  
Deficit of suppressor T cells in active multiple sclerosis  
***Lancet* 2, 1221-1224.**
10. BACHELEZ H., FLAGEUL B., DEPOS L., BOUMSELL L., BENSUSSAN A. (1992).  
TCR gamma delta bearing T lymphocytes infiltrating human primary cutaneous melanomas.  
***J.Invest.Dermatol.* 98: 369-375.**
11. BALCH C.M., RILEY L.B., BAE Y-J, SALMERON M.A., PLATSUKAS C.D.,  
VON ESCHENBACH A.C., ITOH K.(1990).  
Patterns of human tumor infiltrating lymphocytes in 120 human cancers.  
***Arch.Surg.* 126: 200-205.**
12. BALCH C.M., TILDEN A.B., DOUGHERTY P.A., CLOUD G., ABU T. (1983).  
Depressed levels of granular lymphocytes with natural killer (NK) cell function in 247 cancer patients.  
***Ann.Surg.* 198:192-199.**
13. BARND D.L., LAN M.S., METZGAR R.S.X., FINN O.J. (1989).  
Specific major histocompatibility complex-unrestricted recognition of tumor-associated mucins by human cytotoxic T cells.  
***Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 86: 7159-7163.**
14. BAUME DM, ROBERTSON MJ, LEVINE H, MANLEY TJ, SHOW PW, RITZ J. (1992).  
Differential responses to interleukin-2 dHfine functionally distict subjects of human natural killer cells.  
***Eur.J.Immunol.* 22:1-6.**
15. BAXEVANIS C.N., IOANNIDES C.-G., PAPAMICHAIL M. (1986).  
The role of self Ia molecules in the murine MLR  
***Eur.J.Immunol.* 16:361-365.**
16. BAXEVANIS C.N., PEREZ S., KOKKINOPOULOS D., PAPAMICHAIL M. (1987).  
The biological effect of three thymosin fraction 5 polypeptides in the murine mixed lymphocyte reaction  
***Immunology* 54:723-730.**



17. BAXEVANIS C.N., RECLOS G.J., PAPAMICHAIL M., TSOKOS G.C. (1987a).  
Prothymosin  $\alpha$  restores the depressed autologous and allogeneic mixed lymphocyte reaction in patients with systemic lupus erythematosis.  
***Immunopharmacol.Immunotoxicol. 9:429-438.***
18. BAXEVANIS C.N., RECLOS G.J., PEREZ S., KOKKINOPOULOS D., PAPAMICHAIL M. (1987b).  
Immunoregulatory effects of fraction 5 thymus peptides.I. Tymosin  $\alpha$ 1 enhances while thymosin  $\beta$ 4 suppresses the human autologous and allogeneic mixed lymphocyte reaction.  
***Immunopharmacol. 13:133-141.***
19. BAXEVANIS C.N., RECLOS G.J., SFAGOS C., DOUFEXIS E., PAPAGEORGIU C., PAPAMICHAIL M. (1987c).  
Multiple sclerosis:Monocyte stimulatory defect in mixed lymphocyte reaction associated with clinical disease activity.  
***Clin.Exp.Immunol. 67: 362-371.***
20. BAXEVANIS C.N., RECLOS G.J.,PANEERSELVAM M., PAPAMICHAIL M. (1988).  
Enhancement of human T lymphocyte functions by prothymosin  $\alpha$ :I. augmentation of mixed lymphocyte culture reactions and soluble protein induced proliferative responses. in patients with systemic lupus erythematosis.  
***Immunopharmacology 15:73-84.***
21. BAXEVANIS C.N., RECLOS G.J., ECONOMOU M., ARSENIS P., KATSIYIANNIS A., SEFERIADES K., PAPADOPOULOS G., TSOLAS O., PAPAMICHAIL M.(1989).  
Mechanism of action of prothymosin  $\alpha$  in the human autologous mixed lymphocyte response.  
***Immunopharmacol.Immunotoxicol 10:443-461.***
22. BAXEVANIS C.N., THANOS D., RECLOS G.J., ANASTASOPOULOS E., TSOKOS G.C., PAPAMATHEAKIS J., PAPAMICHAIL M. (1990).  
Production of lymphokine mRNA by CD45R+ and CD45R- helper T cells from human peripheral blood and human CD4+ T cell clones  
***J.Immunol. 148:1979-1984.***
23. BAXEVANIS C.N, RECLOS G.J., GRITZAPIS A.D., DEDOUSIS G.V.Z., PAPAMICHAIL M. (1993).  
Elevated PGE2 production by monocytes is responsible for the depressed levels of natural killer (LAK) cell function in patients with breast cancer.  
***Cancer 72: 491-501.***



24. BAXEVANIS C.N., RECLOS G.J., GRITZAPIS A.D., DEDOUSIS G.V.Z., ARSENIS P., KATSIYIANNIS A., MITSIS P.G., TSAVARIS N., PAPAMICHAIL M. (1993a).  
Comparison of immune parameters in patients with one or two primary malignant neoplasms.  
***Nat.Immun. 12: 41-49.***
25. BAXEVANIS C.N., RECLOS G.J., PAPAMICHAIL M. (1993b).  
Prothymosin  $\alpha$  restores the depressed allogeneic cell-mediated lympholysis and natural-killer- cell activity in patients with cancer.  
***Int.J.Cancer 53: 264-268.***
26. BAXEVANIS C.N., GRITZAPIS A.D., DEDOUSIS G.V.Z., PAPADOPOULOS N.P., TSOLAS O., PAPAMICHAIL M. (1994).  
Induction of lymphokine activated killer activity in mice by Prothymosin  $\alpha$ .  
***Cancer Immunol.Immunother. 38: 281-286.***
27. BAXEVANIS C.N., RECLOS G.J., DEDOUSIS G.V.Z., GRITZAPIS A.D., MANIAS A., STATHOPOULOS G, PAPAMICHAIL M. (1994a).  
Lymphocytes infiltrating ascitic fluid and pleural effusions of advanced cancer patients : Synergy between IL-2 and IL-1 $\Delta$  in the selective increase of CD8+ effectors and autologous tumor-specific cytotoxicity.  
***Bri.J.Cancer 70:625-630.***
28. BAXEVANIS C.N., RECLOS G.J., GRITZAPIS A.D., DEDOUSIS G.V.Z., MISSITZIS I., PAPAMICHAIL M. (1994b).  
Autologous tumor-specific T lymphocytes in breast cancer. Infiltration of interleukin-2-inducible cytotoxic T lymphocytes in primary tumors and pleural malignant effusions.  
***Cancer 74:1275-1282.***
29. BAXEVANIS C.N., PAPAMICHAIL. (1994).  
Characterization of the antitumor immune response in human cancers and strategies for immunotherapy.  
***Clin.Rev.Oncol.Hematol. 16:157-179.***
30. BECKER J.C., SCHWINN A., DUMMER R., BURG G., BROCKER E.-B. (1993).  
Tumor-infiltrating lymphocytes in primary melanoma : functional consequences of differential IL-2 receptor expression.  
***Clin.Exp.Immunol. 91: 121-125.***





31. BELL E.B., SPARSHOTT S.M. (1990).  
Interconversion of CD45R subsets of CD4 T cells in vivo.  
***Nature* 348:163-165.**
32. BELLDEGRUN A., KASID A., UPPERKAMP M., TOPALIAN S.L., ROSENBERG S.A. (1989).  
Human tumor infiltrating lymphocytes. Analysis of lymphokine mRNA expression and relevance to cancer immunotherapy.  
***J.Immunol.* 142: 4520-4526.**
33. BERKE G. (1991).  
T-cell-mediated cytotoxicity.  
***Curr.Opin.Immunol.* 3: 320-325.**
34. BEVERLY P. (1991).  
Immunological memory in T cells.  
***Curr.Opin.Immunol.* 3:355-360.**
35. BIEVER B.E., BURAKOFF S.J. (1991).  
T cell receptors : adhesion and signalling.  
***Adv.Cancer Res.* 56:49-75.**
36. BOON T. (1992).  
Toward a genetic analysis of tumor rejection antigens.  
***Adv.Cancer Res.* 58: 177-211.**
37. BOON T. (1993).  
Teaching the immune system to fight cancer.  
***Sci.Ame* 266 (3): 32-39.**
38. BORST J., VAN DE GRIEND R.J., VAN OOSTREEN J.W., ANG S.L., MELIEF J.C., SESDMAN J.G., BOLHUIS R.L.H. (1987).  
A T cell receptor  $\alpha$ /CD3 complex found on cloned functional lymphocytes.  
***Nature* 325: 683-685.**
39. BOYUM A. (1968).  
Separation of leukocytes from blood and bone marrow.  
***Scand.J.Clin.Lab.Invest.* 21:77-89.**
40. BROWNING M.J., BODMER W.F. (1992).  
MHC antigens and cancer implications for T-cell surveillance.  
***Curr.Opin.Immunol.* 4:613-618.**



41. CALDARELLA J., GOODAL G.J., FELIX A.M., HEIMER E.P., SALVIN S.B., AND HORECKER B.L. (1983).  
Thymosin  $\alpha_{11}$ , peptide related to thymosin  $\alpha_1$  isolated from calf thymosin fraction 5.  
***Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80: 7424-7427.***
42. CALIGIURI M.A., ZMUIDZINAS A., MANLEY R.J., LEVINE H., SMITH K.A., RITZ J. (1990).  
Functional sequences of interleukin-2 receptor expression in resting human lymphocytes : Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors.  
***J.Exp.Med. 171: 1509-1519.***
43. CAMERON R.B., MC INTOSH J.K., ROSENBERG S.A. (1988)  
Synergistic antitumor effects of combination immunotherapy with recombinant interleukin-2 and a recombinant hybrid alpha-interferon on the treatment of established murine hepatic metastases.  
***Cancer Res. 48: 5810-5817.***
44. CARLOW D.A., ELLIOTT B.E., BARRON A., MAXWELL L., MAC NAUGHTON S, PROSS H. (1991).  
Capacity of CD8+ T cells to reject immunogenic variants of a spontaneous murine carcinoma: lack of non-specific (NK1.1+) effector mechanisms.  
***Scan.J.Immunol. 33: 683-690.***
45. CHAKRABORTY N.G., SPORN J.R., PASQUALE D.R., ERGIN M.T., MUKHERJI B. (1991).  
Suppression of lymphokine-activated killer cell generation by tumor-infiltrating lymphocytes.  
***Clin.Immunol.Immunopathol. 59:407-416.***
46. CHAKRABORTY N.G., TWARDZIK D.R., SIVANANDHAM M., ERGIN M.T., HELLSTROM K.E., MUKHERJI B. (1990).  
Autologous melanoma-induced activation of regulatory T cells that suppress cytotoxic response.  
***J.Immunol. 145:2359-2364.***
47. CHAN A.C., IRVING B.A., WEISS A. (1992).  
New insights into T-cell antigen receptor structure and signal transduction.  
***Curr.Opin.Immunol. 4: 246-251.***



48. CHEN W., PEACE D.J., ROVIRA D.K., YOU S-G., CHEEVER M.A. (1992).  
T-cell immunity to the joining region of P210 BCR-ABL protein.  
***Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89: 1468-1472.***
49. CHERWINSKI H.M., SCHUMACHER J.H., BROWN K.D., MOSMANN T.R. (1987).  
Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine  
synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization,  
functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies.  
***J.Exp.Med. 166: 1229-1244.***
50. CHIEN Y-H., GASCOIGNE M. R. J., KARALER J., LEE N.E., DAVIS M.M. (1984).  
Somatic recombination in a murine T cell receptor gene.  
***Nature 309: 322-326.***
51. CHOUAIB S., BERTOGLIO G., BLAY J-Y., MARCHIOL-FOURNIGAULT C.,  
FRADELI-ZI D. (1988).  
Generation of lymphokine-activated killer cells : Synergy between tumor necrosis  
factor and interleukin 2.  
***Proc.Natl.Acad.Sci. USA 85:6875-6879.***
52. CHOUAIB S., WELTE K., MERTELSMANN R. DUPONT B. (1985).  
Prostaglandin E2 acts at two distinct pathways of T lymphocyte activation:  
inhibition of interleukin-2 production and down regulation of transferrin  
receptor.  
***J.Immunol 135: 1172-1177.***
53. CLAYTON L.K., LERNER A., DIENER A.C., HUSSEY R.E., KOYASU S.,  
REINHERZ EL. (1992).  
T-cell-receptor isoforms.  
***Int.J.Cancer suppl. 7:1-5.***
54. CORDERO J.O., SARANDESES C., NOGUEIRA M. (1994).  
Prothymosin α receptors on peripheral blood mononuclear cells.  
***FEBS Let. 341: 23-27.***
55. CORDERO J.O., SARANDESES C., NOGUEIRA M. (1995).  
Prothymosin α receptors on lymphocytes.  
***J.Interferon Cytokine Res. 15,8: 731-737.***



56. COZZOLINO F., TORCIA M., CAROSSINO A.M., GIORGANI R., SELLI C., TALINI G., REALI E., NOVELLI A., PISTOLA V., FERNARINI M. (1987).  
Characterization of cells from invaded lymphnodes in patients with solid tumors.  
Lymphokine requirement for tumor-specific lymphoproliferative response.  
**J.Exp.Med. 166: 303-318.**
57. CRUMP W.L., OWEN-SCHAUB L.B, GRIMM E.A. (1989).  
Synergy of human recombinant interleukin 1 with interleukin 2 in the generation  
of lymphokine-activated killer cells.  
**Cancer Res. 49:149-155.**
58. CUNNINGHAM B.A., HEMPERLY J.J., MURRAY B.A., PREDIGER E.A.,  
BRACHENBURY R., EDELMAN G.M. (1987).  
Neural cell adhesion molecule : structure, immunoglobulin-like domains, cell  
surface modulation, and alternative RNA splicing.  
**Science 236: 799-802.**
59. DANG N.H., TORIMOTO Y., SCHLOSSMAN S.F., MORIMOTO C. (1990).  
Human CD4 helper T cell activation :Functional involvement of two distinct  
collagen receptors, IF7 and VLA integrin family.  
**J.Exp.Med. 172: 649-652.**
60. DAVIDSON H.W., REID P.A., LANZAVECCHIA A., WATTS C. (1991).  
Processed Antigen Binds to Newly Synthesized MHC class II Molecules in Antigen  
Specific B Lymphocytes.  
**Cell 67: 105-116.**
61. DECKER T., LOOHNMANN-MATTHES M.-L., GIFFORD G.E. (1987).  
Cell associated tumor necrosis factor (TNF) as a killing mechanism of activated  
cytotoxic macrophages.  
**J.Immunol. 138:957-962.**
62. DERYNCK R., GOEDEL D.V., ULLRICH A., GUTTERMAN J.V., WILLIAMS R.D.,  
BRINGMAN T.S., BERGER W.H. (1987).  
Synthesis of messenger RNAs for transforming growth factors  $\alpha$  and  $\Delta$  and the  
epidermal growth factor receptor by human tumors.  
**Cancer Res. 47: 707-712.**
63. DUSTIN M.L., SPRINGER T.A. (1989).  
T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1.  
**Nature 351: 619-624.**



64. EBERT E.C., ROBERTS A.I., O'CONNELL S.M., ROBERTSON F.M., NAGASE H. (1987).  
Characterization of an immunosuppressive factor derived from colon cancer cells.  
***J.Immunol.* 138: 2161-2168.**
65. ECONOMOU M., SEFERIADES K., FRANGOU-LAZARIDES M., HORECKER B.L., TSOLAS O. (1988)  
Isolation and partial characterization of prothymosin  $\alpha$  from porcine tissues.  
***FEBS Let.* 233: 342-346.**
66. EDELMAN G.M. (1988).  
Morphoregulatory molecules.  
***Biochemistry* 27:3533-3539.**
67. EILERS M., SCHIRM S., BISHOP J.M. (1991).  
The myc protein activates transcription of the  $\alpha$  Prothymosin gene.  
***EMBO J.* 10: 133-141.**
68. ESCHENFELDT W.H. BERGER S.L. (1986).  
The human prothymosin  $\alpha$  gene is polymorphic and induced upon growth stimulation: Evidence using a control cDNA.  
***Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 83: 9403-9407.**
69. FALK K., ROTZSCHKE O., STEVANOVIC S., JUNG G., RAMMENSEE H-G. (1991).  
Allele specific Motifs Revealed by sequencing of Self peptides Eluted from MHC molecules.  
***Nature* 351: 290-296.**
70. FERRADINI L., ROMAN-ROMAN S., AZOCAR J., AVRIL M-F., VIEL S., TRIEBEL F., HERCEND T. (1992).  
Analysis of T-cell receptor  $\alpha/\beta$  variability in lymphocytes infiltrating a melanoma metastasis.  
***Cancer Res.* 52: 4649-4654.**
71. FIGARELLA E.F., MORILLO F., BLANCA I. BLANCO N.E. (1984).  
Failure of cell mediated effector mechanisms in lung cancer.  
***J.Nat.Cancer Inst.* 73: 1-6.**
72. FILLIPINI A., TAFFS R.E., AGUI T., SITKOVSKY M.V. (1990).  
Ecto-ATPase activity in cytolytic T-lymphocytes.  
***J.Biol.Chem.* 265: 334-340.**



73. FISCH P., MALKOVSKY M., BRAAKMAN E., STURM E., BOLHUIS R.L.H., PRIEVE A., SOSMAN J.A., LAM V.A., SONDEL P.M. (1990).  
 $\gamma/\delta$  T cell-clones and natural killer cell clones mediate distinct patterns of non-major histocompatibility complex restricted cytotoxicity.  
*J.Exp.Med.* 171: 1567-1577.
74. FISCH P., OETTEL K., FUDIM N., SURFUS J.É., MALKOVSKY M., SONDEL P.M. (1992).  
MHC-unrestricted cytotoxic and proliferative responses of two distinct human  $\alpha/\beta$  T cell subsets to Daudi cells.  
*J.Immunol.* 148: 2315-2323.
75. FOA R., GUARINI A., GOUSBACHER B. (1992).  
IL2 treatment for cancer from biology to gene therapy.  
*Br.J.Cancer* 66: 992-998.
76. FOSSATI G., ANICHINI A., SQUARCINA P., MAZZOCCHI A., PARMIANI G. (1988).  
Proliferative and/or cytotoxic activity of lymphocyte clones to autologous human melanoma.  
*Int.J.Cancer* 42: 239-245.
77. FREIRE M., HANNAPPEL E., REY M., FREIRE J.M., KIDO H. AND HORECKER B.L. (1981).  
Purification of thymus mRNA coding for a 16.000 daltons polypeptide containing the thymosin  $\alpha_1$  sequence.  
*Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 78: 192-195.
78. FRILLINGOS S., FRANGOU-LAZARIDIS M., SEFERIADIS K., HULMES J.D., PAN V-C.E., TSOLAS O. (1986).  
Isolation and partial sequence of goat spleen prothymosin  $\alpha$ .  
*Mol. and Cellul. Biochemistry* 108: 85-94.
79. FRILLINGOS S., SEFERIADES K., PAPANASTASIOU M., BAXEVANIS C.N., FRANGOU LAZARIDES M., ECONOMOU M., PAPAMICHAIL M., TSOLAS O. (1992).  
Appearance of thymosin  $\alpha_1$  in supernatants of monocytes incubated with prothymosin  $\alpha$ .  
*Arch. of Biochem. and Biophysics* 296 1:256-263.
80. FUJIWARA T., GRIMM E.A. (1992).  
Regulation of lymphokine-activated killer cell induction by human recombinant IL-1 receptor antagonist.  
*J.Immunol.* 148: 2941-2946.



81. GALLAGHER G., STIMSON W.H., FINDLAY J., AL-AZZAWI F. (1990).  
Interleukin-6 enhances the induction of human lymphokine-activated killer cells.  
***Cancer Immunol.Immunother.* 31: 49-52.**
82. GARBIN F., ECKERT K., BUTNER P., GARBE C., MAURER R. (1994).  
Prothymosin  $\alpha$  augments deficient antitumor activity of monocytes from melanoma patients in vitro.  
***Anticancer Res.* 14: 2405-2412.**
83. GOODALL G.J., G.J., DOMINGUEZ F. AND HORECKER B.L. (1986).  
Molecular cloning of DNA for human prothymosin  $\alpha$ .  
***Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 83: 8926-8928.**
84. GRIMM E.A.,AMITABHA A, ZHANG H.Z., ROSENBERG S.. (1982).  
Lymphokine-activated killer cell phenomenon.Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin2-activated autologous Human Peripheral Blood Lymphocytes  
***J.Exp.Med.* 155: 1823-1841.**
85. GUILLON P.J., RAMSDEN C.W., SOMERS S.S., SEDMAN P.C. (1989).  
Suppression of the generation of lymphokine-activated killer (LAK) cells by serum-free supernatants of in vitro maintained tumor cell lines.  
***Br.J.Cancer* 59: 515-521.**
86. GUPTA S. (1987).  
Autologous mixed-lymphocyte reaction in man.XVII. In vitro effect of ion-channel blocking agents on the autologous mixed-lymphocyte response.  
***Cell.Immunol.* 104: 290-295.**
87. HARITOS A.A., GODALL G.J., HORECKER B.L. (1984).  
Prothymosin  $\alpha$ : isolation and properties of the major immunoreactive form of thymosin  $\alpha_1$  in rat thymus.  
***Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 81: 1008-1011.**
88. HARITOS A.A., TSOLAS O., HORECKER B.L. (1984a).  
Distribution of prothymosin  $\alpha$  in rat tissues.  
***Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 81: 1391-1393.**
89. HARITOS A.A. HORECKER B.L. (1985).  
A radioimmunoassay for thymosin  $\alpha_1$  that detects the native polypeptide, prothymosin  $\alpha$ .  
***J.Immunol.Meth.,* 81: 199-205.**



90. HARITOS A.A., BLACHER R., STEIN S., CALDARELLA J., HORECKER B.L. (1985a).  
Primary structure of rat thymus prothymosin  $\alpha$ .  
***Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 82: 343-346.***
91. HARITOS A.A., SALVIN S.B., BLACHER R., STEIN S., HORECKER B.L. (1985b).  
Prothymosin  $\alpha$ : A peptide from rat tissues with structural homology to  
prothymosin  $\alpha$ .  
***Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 82: 1050-1053.***
92. HAYDAY A.C., SAITO H., GRILLRES S.D., KRAUZ D.M., TANIGAWA G., EISEN H.,  
TONEGAWA S. (1985).  
Structure organization and somatic rearrangement of cell T cell gamma genes.  
***Cell 40: 259-69.***
93. HEMPERLY J.J., DE GUGLIELMO J.K., REID R.A. (1990).  
Characterization of cDNA clones defining variant forms of human neural cell  
adhesion molecule N-CAM.  
***J.Mol.Neurosci. 2: 71-76.***
94. HERBERMAN R.B., NUNN M.E., HOLDEN H.T., STAAL S., DJEU J.Y. (1977).  
Augmentation of natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against  
syngeneic and allogeneic target cells.  
***Int. J. Cancer 19: 555-564.***
95. HERSEY P., BINDON C., CZERNIECKI M., SPURLING A., WASS J.,  
MCCARTHY W.H. (1983).  
Inhibition of interleukin-2 production by factors released from tumor cells.  
***J.Immunol. 131: 2837-2842.***
96. HERSH E.M., SCUDERI P., GRIMES W.J., CHONG A., BRAILEY J.L.,  
GSHWIND C.R., SALMON S.E. (1989).  
Cytostatic and cytotoxic activity of lymphokine-activated killer cell phenomenon  
***Cancer Immunol.Immunother. 30: 65-70.***
97. HOOPER J.A., MCDANIEL M.C., THURMAN G.B., COHEN G.H., SHULOF R.S.  
GOLDSTEIN A.L. (1975).  
Purification and properties of bovine thymosin.  
***Ann.N.Y.Acad.Sci. 249: 125-144.***
98. HOSSFELD D.K., SHERMAN C.D., LOVE R.R. BOSCH F.X. (1990).  
Manual of clinical oncology  
***Springer New York p.77.***

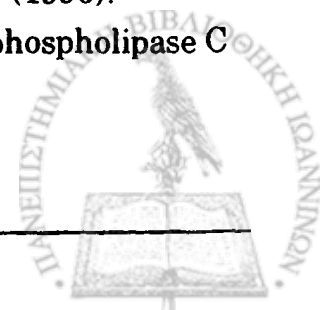




99. HUDZIAK R.M., LEWIS G.D., SHALABY M.R., EESSALU T.E., AGGARWAL B.B., ULLRICH A. (1988).  
Shepard HM. Amplified expression of the HER 2/erbB2 oncogene induces resistance to tumor necrosis factor in NIH-3T3 cells.  
***Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85: 5102-5106.***
100. INABA K., STEINMAN R.M. (1984).  
Resting and sensitized T Lymphocytes Exhibit Distinct Stimulatory (Antigen Presenting Cell). Requirements for Growth and Lymphokine Release.  
***J.Exp.Med. 160: 1717-1735.***
101. INOCUCHI S., IMBODEN J.B. (1990).  
Antigen receptor-mediated regulation of sustained polyphosphoinositide turnover in a human T cell line.  
***J.Biol Chem. 265: 5983-5989.***
102. IOANNIDES C.G., FREEDMAN R.S., IOANNIDES M.G., FISK B, O'BRIAN CA. (1992).  
CTL clones isolated from ovarian tumor infiltrating lymphocytes can recognize peptides with sequences corresponding to the HER2/neu gene product (Meeting abstract).  
***FASEB J.6,4:A 1404.***
103. IOANNIDES C.G., FREEDMAN R.S., PLATSOUKAS C.D., RASHED S., KIM YP. (1991)  
Cytotoxic T cell clones isolated from ovarian tumor-infiltrating lymphocytes recognize multiple antigenic epitopes on autologous tumor cells.  
***J.Immunol. 146 :1700-1707.***
104. IOANNIDES C.G., PLATSOUKAS C.D., RASHED S., WHARTON J.T., CREIGHTON L.E., FREEDMAN R.S. (1991).  
Tumor cytotoxicity by lymphocytes infiltrating ovarian malignant ascites.  
***Cancer Res. 51: 4257-4265.***
105. IOANNIDES C.G., WHITESIDE T.L.(1993)  
T cell recognition of human tumors.Implications for molecular immunotherapy of cancer.  
***Clin.Immunol.Immunopathol. 66: 91-106.***
106. ITOH K., PLATSOUKAS C.D., BALCH C.M. (1988).  
Autologous tumor-specific cytotoxic T lymphocytes in the infiltrate of human metastatic melanomas.  
***J.Exp.Med 168: 1419-1441.***



107. JACKSON A.M., HAWKYARD S.J., PRESCOTT S., RITCHIE A.W., JAMES K., CHISHOLM G.D. (1992).  
An investigation of factors influencing the in vitro induction of LAK activity against a variety of human bladder cancer cell lines.  
***J.Urol. 147: 207-211.***
108. JANEWAY C.A. JR. (1989).  
The role of CD4 in T-cell activation : accessory molecule or co-receptor?  
***Immunol.Today 10:234-238.***
109. JANEWAY C.A.JR, GOLSTEIN P. (1991).  
Lymphocyte activation and effector functions.  
***Curr.Opin.Immunol. 4: 241-245.***
110. JEROME K.R., BARND D.L., BENDT K.M., BOYER C.M., TAYLOR-PAPADIMITRIOU J., MCKENZIE I.F.C., BAST R.C. JR, FINN O.J. (1991).  
Cytotoxic T lymphocytes derived from patients with breast adenocarcinoma recognize an epitope present on the protein core of a mucin molecule preferentially expressed by malignant cells.  
***Cancer Res. 51: 2908-2916.***
111. JONES P.A., DE CLARK Y.A. (1980).  
Destruction of extracellular matrices containing phycoproteins elastin and collagen by metastatic human tumor cells.  
***Cancer Res. 40: 3222-3227.***
112. JONG R., BROUWER M., MIEDEMA F., VAN LIER R.A.W. (1991).  
Human CD8+ T lymphocytes can be divided into CD45RA+ and CD45RO+ cells with different requirements for activation and differentiation.  
***J Immunol 146: 2088-2094.***
113. JULIUS M.H., SIMPSON E., AND HERZENBERG L.A. (1973).  
A rapid method for the isolation of functional thymus derived murine lymphocytes.  
***Eur.J.Immunol. 3: 645-651.***
114. JUNE C.H. (1991).  
Signal transduction in T cells.  
***Curr.Opin.Immunol. 3: 287-293.***
115. JUNE C.H., FLETCHER M.C., LEDBETTER J.A., SAMELSON L.E. (1990).  
Increases in tyrosine phosphorylation are detectable before phospholipase C



activation after T cell receptor stimulation.

***J.Immunol.* 144: 1591-1599.**

116. JUNE C.H., LEDBETTER J.A., LINSLEY P.A., THOMPSON C.B. (1990).  
Role of the CD28 receptor in T-cell activation.  
***Immunol.Today* 11:211-216.**
117. JUNG S., SCHLUESENER H.J. (1991).  
Human T lymphocytes recognize a peptide of single point-mutated, oncogenic ras proteins.  
***J.Exp.Med.* 173:273-276.**
118. KABELITZ D., BENDER A., SCHONDELMAIR S., SHOEL B., KAUFMAN S.H.E. (1990).  
A large fractions of human peripheral blood gamma/delta+ T cells is activated by mycobacterium tuberculosis but not by its 65 KD heat shock protein.  
***J.Exp.Med.* 171:667-679.**
119. KARRE K., LJUNGGREN H.G., PIONTEK G., KIESSLING R. (1986).  
Selective rejection of H-2 deficient lymphoma variants suggests alternative immune defense strategy.  
***Nature* 319: 675-678.**
120. KAS E., POLTJAK L., ADACHI Y., LAEMLI. (1993).  
A model for chromatin opening: stimulation of topoisomerases II and restriction enzyme cleavage of chromatin by dictamycin.  
***EMBO J* 12: 115-126.**
121. KAUFMANN Y., DAVIDSOHN J., LEVANON M., ICEKSON I., REVEL M., RAMOT B. (1991).  
Lymphokine-activated killer (LAK) cells :Interferon- $\alpha$  synergizes with interleukin-2 to induce LAK cytotoxicity in homogenous leukemic preparations.  
***Clin.Immunol.Immunopathol.* 58: 278-288.**
122. KAWAKAMI K., YAMAMOTO Y., KAKIMOTO K., ONONE K. (1989).  
Requirement for delivery of signals by physical interaction and soluble factors from accessory cells in the induction of receptor-mediated T-cell proliferation.  
***J.Immunol.* 142: 1818-1825.**
123. KAWASAKI A., SHINKAI Y., YAGITA H., OKUMURA K. (1992).  
Expression of perforin murine natural killer cells and cytotoxic T lymphocytes in vivo.  
***Eur.J.Immunol.* 22:1215-1219.**



124. KENNEDY I.C.S., ORTALDO J.R, O'SHEA J.J. (1991).  
 Shared structural and functional motifs for signal transduction in T lymphocytes and natural killer cells. In :Lotzova E, Herberman R, eds. NK cell mediated cytotoxicity:Receptors,signalling and mechanisms.  
**CRC Press Boca Ratton FL: 45-52.**
125. KLEIN J. (1979).  
 The Major Histocompatibility Complex of the mouse.  
**Science 203: 516-521.**
126. KLEIN-STRUCKMEIER A., KNUVER-HOPF J., MOHR H. (1991),  
 Modulation of natural and interleukin-2-induced tumor-cytolytic activities by the members of a protein family related to beta-thromboglobulin.  
**Cancer Immunol.Immunother.34: 175-180.**
127. KNUTH A., WOLFEL T., KLEHMANN E., BOON T.,  
 MEYER ZUM BUSCHENFELDE K-H. (1989).  
 Cytolytic T cell clones against an autologous human melanoma : specificity study and definition of three antigens by immunoselection.  
**Proc.Natl.Acad.Sci USA 86: 2804-2808.**
128. KOMIYAMA T., PAN L.X., HARITOS A.A., WIDEMAN J.W., PAN Y-C.E., CHANG M.,  
 ROGERS I., HORECKER B.L. (1986).  
 The primary structure of rat prothymosin.  
**Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 83: 1242-1245.**
129. KONIG F., MALOY W.L., COLIGAN J.E. (1990).  
 The implications of subunit interactions for the structure of the T cell receptor-CD3 complex.  
**Eur.J.Immunol. 20: 299-305.**
130. KONING F. (1990).  
 Lymphocyte antigen receptors : a common design?  
**Immunol Today 12:100-110.**
131. KORETZKY G.A., PICUS J., THOMAS M.L., WEISS A. (1990).  
 Tyrosine phosphatase CD45 is essential for coupling T-cell antigen receptor to the phosphatidyl inositol pathway.  
**Nature 346: 66-68.**



132. KOS J.F., MULLBACHER A. (1993).  
IL-2-independent activity of IL-7 in the generation of secondary antigen-specific cytotoxic T cell responses in vitro.  
***J.Immunol.* 150:387-393.**
133. KOSMIDIS P.A., BAXEVANIS C.N., TSAVARIS N., ANASTASOPOULOS E., PAPANASTASIOU M, BACOIYIANNIS C., MYLONAKIS C., KARVOUNIS N., BALATOUKAS D., KARABELOS A. AND PAPAMICHAIL M. (1992).  
The prognostic significance of immune changes in patients with renal cancer treated with interferon A2b.  
***J.Clin.Oncol.* 10: 1153-1159.**
134. KOULOVA L., CLARK E.A., SHU G., DUPORT B. (1991).  
The CD28 ligand B7/BB1 provides costimulatory signal for alloactivation of CD4+ T cells.  
***J.Exp.Med.* 173: 759-762.**
135. KOVACSOVICS-BANKOWSKI M., ROCK K.L. (1994).  
Presentation of exogenous antigens by macrophages: analysis of major histocompatibility complex class I and II presentation and regulation by cytokines.  
***Eur.J.Immunol.*, 24: 2421-2428.**
136. KUHLMAN P., MOY V.T., LOLLO B.A., BRIAN A.A. (1991).  
The accessory function of murine ICAM-1 in T lymphocyte activation.  
***J.Immunol.* 146: 1773-1782.**
137. KUMAGAI K., ITOH K., HINUMA S., TADA M. (1978).  
Pretreatment of plastic petri dishes with fetal calf serum. A simple method for macrophage isolation.  
***J.Immunol.Meth.* 29, 17-25.**
138. LACHMANN P.J., PETERS D.K. (1981).  
Clinical aspects of immunology.  
***4th Edn.Blackwell Scientific publications Oxford p.3.***
139. LAMB C.A., CRESSWELL P. (1992).  
Assembly and Transport Properties of Invariant Chain Trimers and HLA-DR invariant chain Complexes.  
***J.Immunol.* 148: 3478-3482.**



140. LANIER L.L., CHANG C., AZUMA M., RUITENBERG J.J., HEMPERLY J.J., PHILLIPS J.H. (1991).  
Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD56).  
*J.Immunol.* 146: 4421-4426.
141. LANIER L.L., LE A.M., CIVIN C.I., LOKEN M.R., PHILLIPS J.H. (1986).  
The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes.  
*J.Immunol.* 136: 4480-4485.
142. LEBOW L.T., JEWETT A., BONAVIDA B. (1993).  
Killer cell recruitment and renewal capacity of purified cytolytic and noncytolytic human peripheral blood natural killer cell subsets.  
*J.Immunol.* 150: 320-329.
143. LEDBETTER J.A., SCHIEVEN G.L., UCKUN F.M., IMBODEN J.B. (1991).  
CD45 cross-linking regulates phospholipase of specific substrates in CD3/Ti-stimulated T-cells.  
*J.Immunol.* 146: 1577-1583.
144. LEE K.H., TALPAZ M., ROTHBERG J.M. ET.AL. (1989).  
Concomitant administration of recombinant human interleukin-2 and recombinant interferon  $\alpha$ 2A in cancer patients.  
*J.Clin.Oncol.* 7: 1726-1732.
145. LETOURNEUR O., KENNEDY I.C.S., BRINI A.T., ORTALDO J.R., O'SHEA J.J., KINET J-P. (1991).  
Characterization of the family of dimers associated with Fc receptors. (FcHRI and Fc $\alpha$ RIII).  
*J.Immunol.* 147: 2652-2657.
146. LICHTENSTEIN A., BERERSON J., GEHA J.F., WALDBURGER K., MARTINEZ-MAZA O., BEREK J.S. (1990).  
Resistance of human ovarian cancer cells to tumor necrosis factor and lymphokine-activated killer cells : correlation with expression of HER2/neu oncogenes.  
*Cancer Res.* 50: 7364-7370.
147. LINSLEY P.S., CLARK E.A., LEDBETTER J.A. (1990).  
T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1.  
*Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 87: 5031-5035.



148. LIU C.-C., DETMERS P.A., JIANG S., YOUNG J.P.-E. (1989)  
Identification and characterization of a membrane-bound cytotoxin of murine cytolytic lymphocytes that is related to tumor necrosis factor/cachectin. *Proc. Natl.Acad.Sci.USA* 86: 3286-3290.
149. LIU Y, LINSLEY P.S. (1992).  
Costimulation of T-cell growth.  
*Curr.Opin.Immunol.* 4:265-270.
150. LOW T.L.K. GOLDSTEIN A.L. (1979).  
The chemistry and biology of thymosins II. Amino acid sequence analysis of thymosin  $\alpha_1$  and polypeptide  $\beta_1$ .  
*J.Biol.Chem.* 254 987-995.
151. LOW T.L.K. GOLDSTEIN A.L. (1984).  
Thymosins, isolation, structural studies and biological activities. In Goldstein A.L. (ed.):  
"Thymic Hormones and Lymphokines", *Plenum Press, New York, p.1.*
152. LUGER T.A., KRUTMANN J., KIRNBAUER R., URBANSKI A., SCHMARZ T., KLAPPACHER G., KOCK A., MICKSCHE M., MAKEJCZYK J., SCHAMER E., MAY L.T., SEH-GAL P.B. (1989)  
IFN- $\gamma$ /IL-6 augments the activity of human natural killer cells.  
*J.Immunol.* 143: 1206-1211.
153. MACKAY C.R. (1991).  
T-cell memory : the connection between function, phenotype and migration pathways.  
*Immunol.Today* 12:189-192.
154. MAENGAA A., JAASKELACHEN J., CARPEN O., PATARROYO M., TIMONEN T. (1993)  
Expression of integrins and other adhesion molecules on NK cells; impact of IL-2 on short and long-term cultures.  
*Int.J.Cancer* 53: 850-855.
155. MALEFYT R.W., VERMA S., BEJARANO M.-T., RANES-GOLDBERG M., HILLM., SPITS H. (1993).  
CD2/LFA-3 or LFA-1/ICAM-1 but not CD28/B7 interactions can augment cytotoxicity by virus-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes.  
*Eur.J.Immunol.* 23: 418-424.



156. MANROW R.E., SBURLATI A.R.; HANOVER J.A., BERGER S.L. (1991).  
Nuclear targeting of Prothymosin  $\alpha$ .  
***J.Biol.Chem* 266: 3916-3924.**
157. MARCU K.B., BOSSONE S. A., PATEL J.A. (1992).  
The myc function and regulation.  
***Annu.Rev.Biochem.* 61: 809-860.**
158. MARSHALL J.D., WEN Y., ABRAMS J.S., UMETSU D.T. (1993).  
On the relative roles of interleukin-2 and interleukin-10 in the generation of lymphokine-activated killer cell activity.  
***Cell.Immunol.* 146: 391-405.**
159. MATOSSIAN-ROGERS A., BROWNE C., TURKISH M., O'BYRNE P., FESTENSTEIN H. (1989).  
Tumour necrosis factor-alpha enhances the cytolytic and cytostatic capacity of interleukin-2 activated killer cells.  
***Br.J.Cancer* 59: 573-577.**
160. MCFARLIN, MCFARLAND (1982).  
Multiple sclerosis  
***N.Engl.J.Med.* 4:1183-1188.**
161. MCLAUGHLIN-TAYLOR E., WOODWARD J.G., MCMILLAN M., FRELINGER J.A. (1984).  
Distinct epitopes are recognised by cytolytic T lymphocyte clones on the same class I molecule: direct demonstration using DNA-transfected targets and long-term cytolytic T cell clones.  
***Eur.J.Immunol.* 14: 969-975.**
162. MELIEF C.J.M. (1992).  
Tumor eradication by adoptive transfer of cytotoxic T lymphocytes.  
***Adv.Cancer Res.* 58:143-175.**
163. MELLOR A. (1986).  
The class I MHC gene familie in mice.  
***Immunol.Today* 7: 19-26.**
164. MENTZER S.E., REMOLD-O'DONNELL E., GRIMMS M., BIERER B., ROSEN F., BURAKOFF S.J. (1987).  
Sialophorin, a surface sialoglycoprotein defective in the Wiskott-Aldrich syndrome, is involved in human T-lymphocyte proliferation.  
***J.Exp.Med.* 161:641-653.**





165. MESCHER M.F. (1992).  
Surface contact requirements for activation of cytotoxic T lymphocytes.  
***J.Immunol.* 149: 2402-2405.**
166. MEUER S.C., SCHLOSSMAN S.F., REINHERZ E.L. (1982).  
Clonal analysis of human cytotoxic T lymphocytes : T4+ and T8+ effector T cells recognize products of different major histocompatibility complex regions.  
***Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 79:4395-4400.**
167. MIESCHER S., WHITESIDE T.L., CARREL S., VON FLIEDNER V. (1986).  
Functional properties of tumor-infiltrating and blood lymphocytes in patients with solid tumors.  
***J.Immunol.* 136: 1899-1907.**
168. MIESCHER S., WHITESIDE T.L., MORETTA L., VON FLIEDNER V. (1987).  
Clonal and frequency analyses of tumor infiltrating lymphocytes from human solid tumors.  
***J.Immunol.* 138: 4004-4009.**
169. MITCHEL M.S. (1991).  
Attempts to optimize active specific immunotherapy for melanomas.  
***Int.Rev.Immunol.* 7:331-349.**
170. MOINGEON P., CHANG H., WALLNER B.P., STEBBINS C., FREY A.Z., REINHERZ EL. (1989).  
CD2-mediated adhesion facilitates T lymphocyte recognition function.  
***Nature* 339: 312-314.**
171. MOINGEON P., JITSUKAWA S., FAURE F., TROALEN F., TRIBEL F., GRAZIANI M., FORESTIER F., BELLET D., BOLUM C., HERCEND T. (1987).  
A a-chain complex forms a functional receptor on cloned human lymphocytes with natural killer-like activity.  
***Nature* 325: 723-725.**
172. MOL C.P., WANG R.H., BATEY W.D., LEE A.L., DANG V.C., BERGER L.S. (1995).  
Do products of the myc proto-oncogene play a role in transcriptional regulation of the Prothymosin  $\alpha$  gene?  
***Mol.and Cell.Biol.* 15,12: 6999-7009.**
173. MONACO J.J., CHO S., ATTAYA M. (1990).  
Transport Protein Genes in the murine MHC: Possible implication for antigen processing.  
***Science* 250: 1723-1726.**



174. MONSON J.R.T., RAMSDEN C.W., GILES G.R., BRENNAN T.G. GUILLON P.J. (1987).  
Lymphokine Activated Killer (LAK) cells in patients with gastrointestinal cancer.  
***Gut* 28: 1420-1425.**
175. MORETTA A., TAMBUSI G., BOTTINO C., TRIPODI G., MERLI A., CICCONE E.,  
PANTALEO G., MORETTA L. (1990).  
A novel surface antigen expressed by a subset of human CD3- CD16+ natural  
killer cells.  
***J.Exp.Med.* 171: 695-714.**
176. MORIMOTO C., REINHERTZ E.L., SCHLOSSMAN S.F., SCHUR P.H.,  
STEINBERG A.D. (1980).  
Alterations in immunoregulatory T cells subsets in active systemic lupus  
erythematosus.  
***J.Clin.Invest.* 65 1171-1175.**
177. MOURAD W., GEHA R.S., CHATILA T. (1990).  
Engagement of major histocompatibility complex class II molecules induces  
sustained, lymphocyte function-associated molecule 1-dependent cell adhesion.  
***J.Exp.Med.* 172:1513-1516.**
178. MUKASA A., MIRAMINE C., HOJOK. (1994).  
Generation and characterization of a continuous line of CD8+ suppressively  
regulatory T lymphocytes which down regulates experimental autoimmune  
orchitis (EAO) in mice.  
***Clin.Exp.Immunol.* 96:138-145.**
179. MUKHERJI B., CHAKRABORTY N.G., SIVANANDHAM M. (1990).  
T-cell clones that react against autologous human tumors.  
***Immunol.Rev.* 116: 33-62.**
180. MULE J.J., CUSTER M.C., TRAVIS W.D., ROSENBERG S.A. (1992).  
Cellular mechanisms of the antitumor activity of recombinant IL-6 in mice.  
***J.Immunol.* 148: 2622-2629.**
181. MUSTELIN T., COGGESHALL K.M., ISAKOV N., ALTMAN A. (1990).  
T cell antigen receptor-mediated activation of phospholipase C requires tyrosine  
phosphorylation.  
***Science* 247: 1584-1587.**



182. NAGLER A., LANIER L.L, PHILLIPS J.H. (1990).  
Constitutive expression of high affinity interleukin-2 receptors on human CD16-natural killer cells in vivo.  
***J.Exp.Med.* 171: 1527-1537.**
183. NANNO M., HIDETOSHI S., MATHIOUDAKIS G., SUZUKI R., ITOH K., IOANNIDES C.G., SUZUKI S., CHEN P.F., PLATSUKASC.D. (1992).  
 $\gamma/\delta$  T cell antigen receptors expressed on tumor-infiltrating lymphocytes from patients with solid tumors.  
***Eur.J.Immunol.* 22: 679-687.**
184. NAUME B., ESPEVIK T. (1991).  
Effects of IL-7 and IL-2 on highly enriched CD56+ natural killer cells.  
***J.Immunol.* 147: 2208-2214.**
185. NAUME B., GATELY M., ESPEVIK T. (1992).  
A comparative study of IL-12, IL-2 and IL-7 induced effects on immunomagnetically purified CD56+ NK cells.  
***J.Immunol.* 148: 2429-2436.**
186. NEEFJES J., MOMBURG (1993).  
Cell biology of antigen presentation.  
***Cur.Opin.Immunol.* 5: 27-34.**
187. NEEFJES J.J., PLOEGH H.L. (1988).  
Allele and Locus Specific Differences in the Association of MHC class I H Chain with  $\beta_2$  microglobulin and Cell surface expression. Different Effects of Inhibition of Glycosylation on Class I Subunit Association.  
***Eur.J.Immunol* 18: 801-810.**
188. NEEFJES J.J., PLOEGH H.L. (1992).  
Inhibition of Endosomal Proteolytic Activity by Leupeptin Blocks Surface Expression of MHC Class II Molecules and their Conversion to SDS resistant  $\alpha\beta$  heterodimers in Endosomes.  
***EMBO J.* 11: 411-416.**
189. NEEFJES J.J., SMITT L., GEHRMANN M., PLOEGH H.L. (1992).  
The fate of the three subunits of Major Histocompatibility Complex class I Molecules.  
***Eur.J.Immunol.* 2: 1609-1614.**



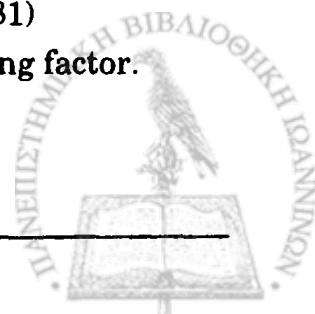
190. NISHIMURA T., TERASHIMA Y., HATTORI T., SATOH M., KONDO Y., KIMURA G., YOSHIDA K., AKIMOTO M. (1991).  
Recombinant interleukin-2-expanded tumor infiltrating lymphocytes from human renal cell cancer do not exhibit autologous tumor cell-specific cytotoxicity.  
*Urol.Int. 47 Suppl. 1: 83-85.*
191. NISHIMURA T., YAGI H., UCHIYAMA Y., HASHIMOTO Y. (1986).  
Generation of lymphokine activated killer (LAK) cells from tumor infiltrating lymphocytes.  
*Cell.Immunol. 100: 149-160.*
192. NOJIMA Y., HUMPHRIES M.J., MOULD A.P., KOMORIYA A., YAMADA K.M., SCHLOSSMAN S.F., MORIMOTO C. (1990).  
VLA-4 mediates CD3-dependent CD4+ T cell activation via the CS1 alternatively spliced domain of fibronectin.  
*J.Exp.Med. 172: 1185-1192.*
193. NOMURA N., UNO E., TAMATANI T., MIYASAKA M., SUZUKI K., SUZUKI A., KIKU-CHI K., VEDE T. (1992).  
Functional analysis of mononuclear cells infiltrating into tumors.  
*Int.Immunol. 4: 407-415.*
194. NOURI A.M., DOS SANTOS A.V., CROSBY D., OLIVER R.T. (1991).  
Correlation between class I antigen expression and the ability to generate tumor infiltrating lymphocytes from bladder tumor biopsies.  
*Br.J.Cancer. 64: 996-1000.*
195. NUMATA A., MINAGAWA T., ASANO M., NAKANE A., KATOH H., TANABE T. (1991).  
Functional evaluation of tumor-infiltrating mononuclear cells.  
*Cancer 68: 1937-1943.*
196. O'ROURKE A.M., MESCHER M.F. (1992).  
Cytotoxic T lymphocyte activation involves a cascade of signaling and adhesion events.  
*Nature 358: 253-255.*
197. O'ROURKE A.M., ROGERS J., MESCHER M.F. (1990).  
Activated CD8+ binding to class I protein mediated by the T cell receptor results in signalling.  
*Nature 346:187-189.*



198. O'SHEA J.J., MC VICAR D.W., KUHNS D.B., ORTALDO J.R. (1992).  
A role for protein tyrosine kinase activity in natural cytotoxicity as well as antibody-dependent cellular cytotoxicity.  
***J.Immunol.* 148:2497-2502.**
199. O'SHEA J.J., WEISSMAN A.M., KENNEDY I., ORTALDO J.R. (1991).  
Engagement of the NK cell IgG Fc receptor results in tyrosine phosphorylation of the z chain.  
***Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88: 350-355.**
200. ORLOF D.G., RA C.S., FRANK S.J., KLAUSNER R.D., KINET J.P. (1990).  
Family of disulphide-linked dimers containing the zeta and eta chains of the T-cell receptor and the gamma chain of Fc receptors.  
***Nature* 347: 189-191.**
201. ORTALDO J.R., MASON A., OVERTON R. (1986).  
Lymphokine-activated killer cells: analysis of progenitors and effectors.  
***J.Exp.Med.* 164:1193-1203.**
202. ORTIZ-NAVARRETE V., HAMMERLING G.J. (1991).  
Surface Appearance and instability of Empty H-2 class I Molecules under Physiological Conditions.  
***Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88: 3594-3597.**
203. PAN L.X., HARITOS A.A., WIDEMAN J., KOMIYAMA T., CHANG M., STEIN S., SALVIN S.B. HORECKER B.L. (1986).  
Human prothymosin  $\alpha$ : Amino acid sequence and immunologic properties.  
***Arch.Biochem.Biophys.* 250: 197.**
204. PANEERSELVAM C., WELLNER D. HORECKER B.L. (1988).  
The amino acid sequence of bovine thymus prothymosin  $\alpha$ .  
***Arch.Biochem.Biophys.* 265: 454.**
205. PAPAMARKAKI T., TSOLAS O. (1994).  
Prothymosin  $\alpha$  binds to histone H1 in vitro.  
***FEBS Let.* 20: 2685-2689.**
206. PAPAMICHAIL M., BANEVANIS C. N. (1992).  
Gamma-interferon enhances the cytotoxic activity of interleukin-2-induced peripheral blood lymphocyte (LAK) cells, tumor infiltrating lymphocytes (TIL), and effusion associated lymphocytes.  
***J.Chemother.* 4: 387-393.**



207. PAPANASTASIOU M., BAXEVANIS C.N., PAPAMICHAIL M. (1992).  
Promotion of murine antitumor activity by prothymosin a treatment I. Induction of tumoricidal peritoneal cells producing high levels of tumor necrosis factor a.  
***Cancer Immunol.Immunother.* 35: 145-150.**
208. PARKINSON D.R. (1990).  
Interleukin-2 :Further progress through greater understanding.  
***J.Natl.Cancer Inst* 82: 1374-1377.**
209. PEACE D.J., CHEN W., NELSON H., CHEEVER M.A. (1991).  
T cell recognition of transforming proteins encoded by mutated ras proto-oncogenes.  
***J.Immunol.* 146: 2059-2065.**
210. PETERS P.J., NEEFJES J.J., OORCHOT V., PLOEGH H.L., GEUZE H.J. (1991).  
Segregation of MHC Class II Molecules from MHC class I Molecules in the Golgi Complex for Transport to Lysosomal Compartments.  
***Nature* 349: 669-676.**
211. PICKER L.J.(1992).  
Mechanisms of lymphocyte homing.  
***Curr.Opin.Immunol.* 4: 277-286.**
212. PLOEGH H.L., CANNON L.E., STROMINGER J.L. (1979).  
Cell free translation of the mRNAs for the heavy and light chains of HLA-A and HLA-B antigens.  
***Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 76: 2273-2277.**
213. PROCOPIO A.D., PAOLINI G.R., VECCHIO I., FRATI L., SANTONI A. (1991).  
GTP-binding proteins transduce signals generated via human Fcα receptor III A (CD16).  
***J.Immunol.* 146: 3550-3555.**
214. RAPPAPORT R.S. DODGE G.R. (1982).  
Prostaglandin E<sub>2</sub> inhibits the production of human interleukin-2  
***J.Exp.Med.* 155: 943-955.**
215. RAVETCH J.V., KINET J.-P. (1991).  
Fc receptors.  
***Annu.Rev.Immunol.*9: 457-492.**
216. REBAR R.W., MIYAKE A., LOW T.L.K. AND GOLDSTEIN A.L. (1981)  
Thymosin stimulates secretion of leutenizing hormone-releasing factor.  
***Science* 214: 669671.**



217. RECLOS G.J., BAXEVANIS C.N., SFAGOS C., PAPAGEORGIOU C., TSOKOS G.C., PAPAMICHAIL M. (1987).  
Multiple sclerosis: II. Effects of prothymosin  $\alpha$  on autologous and allogeneic MLR in patients with multiple sclerosis.  
***Clin. Exp. Immunol.* 70:336-345.**
218. REITER Z., REITER Y., FISHELSON Z., KESSLER A., LOYTER A., NUSSBAUM O., RUBINSTEIN M. (1991).  
Resistance to NK cell-mediated cytotoxicity does not correlate with class I MHC antigen levels.  
***Immunobiology* 183: 23-29.**
219. RENZO L.D., YEFENOL E., KLEIN E. (1991).  
The function of human NK cells is enhanced by  $\beta$ -glucan, a ligand of CR3 (CD11b/CD18).  
***Eur. J. Immunol.* 21: 1755-1758.**
220. RICH E.A., MINCEK M.A., ARMITAGE K.B., DUFFY E.G., OWEN D.C., FAYEN J.D., HOM D.L., ELLNER J.J. (1993).  
Accessory function and properties of monocytes from healthy elderly humans for T lymphocyte responses to mitogen and antigen.  
***Gerontology* 39,2: 93-108.**
221. ROCHE P.A., CRESSWELL P. (1990).  
Invariant Chain Association with HLA-DR Molecules Inhibits Immunogenic Peptide Binding.  
***Nature* 345: 615-618.**
222. ROCHE P.A., MARKS M.S., CRESSWELL P. (1991).  
Formation of a Nine subunit Complex by HLA Class II Glycoproteins and the Invariant Chain.  
***Nature* 354: 392-394.**
223. ROITT I. (1991).  
The acquired immune response II-Production of effectors. In: Roitt I, ed. Essential Immunology.  
**Blackwell Scientific Publications, Oxford, GB, 129-151.**
224. ROITT I., BROSTOFF J., MALE D. (1990).  
Cell mediated immune responses.  
***Second edition. Immunology. Gower Medical publishing London 9.8-9.13.***

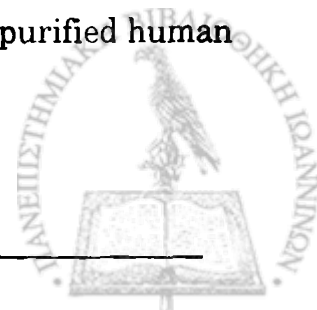


225. RONCAROLO M.-G., BIGLER M., HAANEN J.B.A., YSSEL H., BACCHETTA R., DE VRIES J.E., SPITS H. (1991).  
Natural killer cell clones can efficiently process and present protein antigens.  
*J.Immunol.* 147: 781-787.
226. ROSENBERG S.A., LOTZE M.T., MUUL L.M., LEITMAN S., CHANG A.E.,  
ETTINGHAUSER S.E., MATORY Y.L., SKIBBER J.M., SHILONI E., VETTO J.T.,  
SEIPP C.F.A., SIMPSON C., REICHERT C.M. (1985).  
Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated  
killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer.  
*N.Engl.J.Med.* 313: 1485-1492.
227. ROSENBERG S.A, SPIESS E.P., LAFRENIERE R.A. (1986).  
New approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor infiltrating  
lymphocytes.  
*Science* 233: 1318-1321.
228. ROSENBERG S.A. (1992).  
The immunotherapy and gene therapy of cancer.  
*J.Clin.Oncol.* 10: 180-199.
229. ROSENBERG S.A., LOTZE M.T., MUUL L.M., CHANG A.E., AVIS F.P.,  
LEITMAN S., LINEHAN W.M., ROBERTSON C.N., LEE R.E., RUBIN J.T.,  
SEIPP C.A., SIMPSON C.G, WHITE D.E. (1987).  
A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using  
lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2  
alone.  
*N.Engl.J.Med.* 316: 889-897.
230. RUDD C.E. (1990).  
CD4, CD8 and TCR-CD3 complex : a novel class of protein tyrosine kinase  
receptor.  
*Immunol.Today* 11:400-406.
231. RUDD C.E., ANDERSON P, MORIMOTO C., STREULI M., SCHLOSSMAN S.F. (1989).  
Molecular interactions, T-cell subsets and a role of the CD4/CD8 p56 lck complex  
in human T-cell activation.  
*Immunol.Rev.* 111:225-266.
232. SALMON M., KITAS G.D., BACON P.A. (1989).  
Production of lymphokine mRNA by CD45R+ and CD45R- helper T cells from





- human peripheral blood and human CD4+ T cell clones  
***J.Immunol.* 143:907-912.**
233. SANDERS M.E., MAKGOBA M.W., SHAW S. (1988.)  
Human naive and memory T cells.  
***Immunol. Today* 9:195-199.**
234. SBURLATI A.R., MANROW R.E., BERGER S.L. (1991).  
Prothymosin  $\alpha$  antisense oligomers inhibit myeloma cell division.  
***Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 88: 253-257.**
235. SCHMITT C., M. COGNE., M. AGRAPART., J.J. BALLET. (1984).  
Major histocompatibility complex restriction of tetanus toxoid-specific human T lymphocyte clones.  
***Eur.J.Immunol.* 14: 1131-1135.**
236. SCHULOF R.S. GOLDSTEIN A.L. (1981)  
Thymosins and other thymic hormones. In: *The Lymphokines, Biochemistry and Biological Activity*. Hadden J.W., and Stewart W.E. II (eds).  
***Humana Press, Clifton, New Jersey: p.397.***
237. SHAW S., SHIMIZU Y. (1988).  
Two molecular pathways of human T cell adhesion.  
***Curr.Opin.Immunol.* 1:92-97.**
238. SHIMIZU Y., VAN SEVENTER G.A., HORGAN K.J., SHAW S. (1990).  
Regulated expression and function of three VLA (beta-1) integrin receptors on T cells.  
***Nature* 345: 250-253.**
239. SIEGEL J.P., SHARON M., SMITH P.L., LEONARD W.J. (1987).  
The IL-2 receptor beta chain : role in mediating signals for LAK, NK, and proliferative activities.  
***Science* 238: 75-77.**
240. SINGER A., T.I.MUNITZ., H.GOLDING., A.S.ROSENBERG., T. MIZUOCHI. (1987).  
Recognition requirement for the activation, differentiation and function of T helper cells specific for class II MHC alloantigens..  
***Immunol.Review* 98: 143-170.**
241. SMYTH M.J., ORTALDO J.R. (1991).  
Comparison of the effect of IL-2 and IL-6 on the lytic activity of purified human peripheral blood large granular lymphocytes.  
***J.Immunol.* 146: 1380-1384.**



242. SONE S., UTSUGI T., NII A., OGURA T. (1988).  
Differential effects of recombinant interferons  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  on induction of human lymphokine (IL-2)-activated killer activity.  
*J.Natl.Cancer Inst.* 80: 425-431.
243. SPAGNOLI G.C., JURETIC A., SCHULZ-THATER E., DELLABONA P., FILGUEIRA L., HORIG H., ZUBER M., GAROTTA G., HEBERER M. (1993).  
On the relative roles of interleukin-2 and interleukin-10 in the generation of lymphokine-activated killer cell activity.  
*Cell.Immunol.* 146: 391-405.
244. SPIES T., GERUNDOLO V., COLONNA M., CRESSWELL P., TOWNSEND A., DEMARS R. (1992).  
Presentation of viral antigen by MHC class I Molecules is dependent on a putative peptide transporter Heterodimer.  
*Nature* 335: 644-646.
245. SPRINGER T.A. (1990).  
Adhesion receptors of the immune system.  
*Nature* 346: 425-434.
246. SQUIER M.K.T., COHEN J.J. (1994).  
Cell mediated cytotoxic mechanisms.  
*Curr.Opin.Immunol.* 1:92-97.



247. STAHL A., HEISKALA M., MUSTELIN T., ANDERSON L.C. (1992).  
Activation of natural killer cells via the Fc $\alpha$ RIII (CD16) requires initial tyrosine phosphorylation.  
***Eur.J.Immunol.* 22:611-614.**
248. STERN L.J., WILLEY D.C. (1992).  
The human class II MHC Protein HLA DR1. Assembles as Empty  $\alpha\beta$  Heterodimers in the Absence of antigenic peptide  
***Cell* 68: 465-477.**
249. STRASSMAN G., BACH F.H. (1984).  
OKT4+ cytotoxic T cells can lyse targets via class I molecules and can be blocked by monoclonal antibody against T4 molecules.  
***J.Immunol.* 133:1705-1709.**
250. STURM E., BRAAKMAN E., FISCH P., VREUGENHIL R.J., SONDEL P., BOLHUIS R.L. (1990).  
Human Va9-VE2 O cell receptor- $\alpha$ E lymphocytes show specificity to Burkitt's lymphoma cells.  
***J.Immunol.* 145: 3202-3208.**
251. TACHINABA I., WATANABE M., TANIO Y., HAYASHI S., HOSOE S., SAITO S., MATSUMASHI M., OSAKI T., SHIGEDO Y., MASUNO T., KAWASE I. (1992).  
Generation of a small cell lung cancer variant resistant to lymphokine-activated killer (LAK) cells : association with resistance to a LAK cell-derived cytostatic factor.  
***Cancer Res.* 52: 3310-3316.**
252. TADA T., OHZEKI S., UTSUMI K., TAKIOCHI H., MURAMATSU M., LI X., SHIMIZU J., FUJIWARA H., HAMAOKA T. (1991).  
Transforming growth factor - $\beta$ - induced inhibition of T cell function.  
***J.Immunol.* 146: 1077-1082.**
253. TAKAI Y., WONG G.G., CLARK S.C., BURKOFF S.J., HERRMAN S.H. (1988).  
B-cell stimulatory factor-2 is involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes.  
***J.Immunol.* 140: 508-513.**
254. TAKEUCHI., RUDD C.E., SCHLOSSMAN S.F., MORIMOTO C. (1987).  
Induction of suppression following autologous mixed lymphocyte reaction: role of a novel 2H4 antigen.  
***Eur.J.Immunol.* 17: 97-102.**



255. TAN P.H.S., SANTOS E.B., ROSSBACH H.-C., SANDMAIER B.M. (1993).  
Enhancement of natural killer activity by an antibody to CD44.  
***J.Immunol.* 150 :812-820.**
256. THOMAS M.L., LEFRANCOIS L. (1988).  
Differential expression of the leucocyte- common antigen family.  
***Immunol.Today* 9:320-326.**
257. TING AT., EINSPAHR K.J., ABRAHAM R.T., LEIBSON R.J. (1991).  
Fcγ receptor signal transduction in natural killer cells.  
***J.Immunol.* 147: 3122-3127.**
258. TOPALIAN S.L., ROSENBERG S.A. (1990).  
Tumor infiltrating lymphocytes (TIL) : evidence for specific immune reactions  
against growing cancers in mouse and man. In :  
***De Vita V, Hellman S, Rosenberg SA, eds. Important advances in  
oncology. JB Lippincott Co Philadelphia 19-41.***
259. TOPALIAN S.L., SOLOMON D., ROSENBERG S.A. (1989).  
Tumor-specific cytolysis by lymphocytes infiltrating human melanomas.  
***J.Immunol.* 142: 3714-3725.**
260. TOPALIAN SL, KASID A, ROSENBERG S.A.(1990)  
Immunoselection of a human melanoma resistant to specific lysis by autologous  
tumor-infiltrating lymphocytes.  
***J.Immunol.* 144: 4487-4495.**
261. TORR-AMIONE G., BEAUCHAP R.D., KOEPEN H., PARK B.H., SCHREIBER H.,  
MOSES H.L., ROWLEY D.A. (1990).  
A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth  
factor type Δ1 cDNA escapes immunosurveillance.  
***Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 87: 1486-1490.**
262. TOWNSEND A., ELLIOTT T., CERNUDOLO V., FOSTER L., BARBER B., TSE A. (1990).  
Assembly of MHC class I molecules Analyzed in Vitro.  
***Cell* 62: 285-295.**
263. TRINCHIERI G. (1989).  
Biology of natural killer cells.  
***Adv.Immunol.* 47:187-210.**
264. TRINCHIERI G., PERUSSIA B. (1984)+  
Human natural killer cells: biologic and pathologic aspects.  
***Lab.Invest.* 50: 489-494.**



265. TSCHOPP J., NABHOLZ M. (1990).  
Perforin-mediated target cell lysis by cytolytic T lymphocytes.  
***Annu.Rev.Immunol. 8: 279-302.***
266. TURKA LA, KANNER SB, SHIEVEN GL, THOMPSON CB, LEDBETTER JA.(1992)  
CD45 modulates T cell receptor/CD3-induced activation of human thymocytes via  
regulation of tyrosine phosphorylation.  
***Eur.J.Immunol. 22: 551-557.***
267. UNANUE E.R., ALLEN P.M. (1987).  
The basis for the immunoregulatory Role of Macrophages and Other Accessory  
Cells.  
***Science 236: 551-557.***
268. VAN DEN EYNDE B., HAINANT P., HERIN M., KNUTH A., LEMOINE C.,  
WEYNANTS P., VAN DE BRUGGEN P., FAUCHET R., BOON T. (1989).  
Presence on a human melanoma of multiple antigens recognized by autologous  
CTL.  
***Int.J.Cancer 44: 634-640.***
269. VAN DER BRUGGEN P., TRAVERSARI C., CHOME P., LURQUIN C., DE PLAEN E.,  
VAN DEN EYNDE B., KNUTH A., BOON T. (1991).  
A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human  
melanoma.  
***Science 254: 1643-1647.***
270. VAN DER BRUGGEN P., VAN DEN EYNDE B. (1992).  
Molecular definition of tumor antigens recognized by T lymphocytes.  
***Curr.Opin.Immunol. 4: 608-612.***
271. VAN SEVENTER G.A., SHIMIZU Y., SHAW S. (1991).  
Roles of multiple accessory molecules in T-cell activation.  
***Curr.Opin.Immunol 3:294-303.***
272. VANKY F., STUBER G., WILLEMS J. (1988).  
Importance of MHC antigen expression on solid tumors in the in vitro interaction  
with autologous blood lymphocytes.  
***Cancer Immunol.Immunother. 27: 213-222.***
273. VARELI K., FRANGOU-LAZARIDIS M., TSOLAS O. (1995).  
Prothymosin  $\alpha$  mRNA levels vary with c myc expression during tissue  
proliferation, viral infection and heat shock.  
***FEBS Let. 371: 337-340.***



274. VERSTEEG R. (1992).  
NK cells and T cells: mirror images?.  
***Immunol. Today* 12:244-247.**
275. VIA C.S., TSOKOS G.C., STOCKS N.I., CLEVICI M. SHEARER G.M. (1990).  
Demonstration of three Pathways of T Helper Cell Activation.  
***J.Immunol.* 144: 2524-2528.**
276. WANG P., VANKY F., KLEIN E. (1992).  
MHC-class-I-restricted auto-tumor-specific CD4+ CD8- T-cell clones established  
from autologous mixed lymphocyte-tumor-cell culture (MLTC).  
***Int J Cancer* 51:962-967.**
277. WHITESIDE T.L., HERBERMAN R.B. (1990).  
The biology of human natural killer cells.  
***Ann. Ist. Super. Sanita.* 26 (3-4): 335-348.**
278. WHITESIDE T.L., MIESCHER S., HURLIMANN J., MORETTA L., FLIEDNER V. (1986).  
Clonal analysis and in situ characterisation of lymphocytes infiltrating human  
breast carcinomas.  
***Cancer Immunol.Immunother.* 23: 170-177.**
279. WRIGHT A., HARDT C., HEEG K., PFIZENMAIER K., SOLBACH W., BARTLETT R.,  
STOCKINGER H., ROELLINGHOTT M. (1980).  
T-T cell interactions during cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses: T cell derived  
helper factor (interleukin-2) as a probe to analyze CTL responsiveness and thymic  
maturation of CTL progenitors.  
***Immunol.Review* 51: 215-255.**
280. WRIGHT A., LEE J.E., LINK M.P., SMITH S.D., CAROL W., LEVY R.,  
CLAYBERGER C., KRENSKY A.M. (1989).  
Cytotoxic T lymphocytes specific for self tumor immunoglobulin express T cell  
receptor  $\delta$  chain  
***J.Exp.Med.* 169:1557-1564.**
281. YAMADA A., NIKAIDO T., NOJIMA Y., SCHLOSSMAN S.F., MORIMOTO C. (1991).  
Activation of human CD4 T lymphocytes. Interaction of fibronectin with VLA-5  
receptor on CD4 cells induces the AP-1 transcription factor.  
***J.Immunol.* 146: 53-56.**



282. YAMASHITA N., CLEMENT L.T. (1989).  
Phenotypic characterization of the post-thymic differentiation of human  
alloantigen-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes.  
***J Immunol.* 143:1518-1523.**
283. YOO Y.-K., HEO D.S., HATA K., VAN THIEL D.H., WHITESIDE T.L. (1990).  
Tumor-infiltrating lymphocytes from human colon carcinomas.  
***Gastroenterology* 98: 259-268.**
284. YOSHINO I., TOKUJIRO Y., MITSUHIRO M., ISHIDA T., SUGIMACHI K.,  
KIMURA G., NOMOTO K. (1992).  
Tumor-reactive T-cells accumulate in lung cancer tissues but fail to respond due  
to tumor cell-derived factor.  
***Cancer Res.* 52: 775-781.**
285. ZOCCHI M.R., FERRARINI M., RUGARLI C. (1990).  
- Selective lysis of the autologous tumor by ETCS1+ a/E+ tumor-infiltrating  
lymphocytes from human lung carcinomas.  
***Eur.J.Immunol.* 20: 2685-2689.87.**

