

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000265317





TIAN... GIOANNINI... 2005... 0011... 015-94  
BIBLIOTECA EXOAM

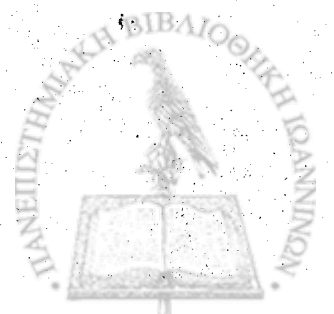
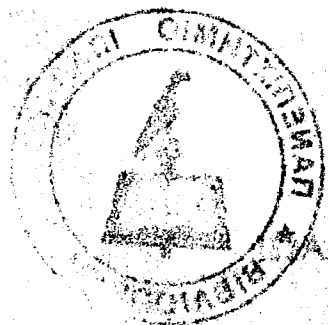
... DI ...  
...  
...  
...  
...  
...  
...

13

...  
...  
...

...  
...

...



Αρ. ατ.:.....1940.....200.8.,,





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΑΓΓΕΛΟΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ  
ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

Ο ρόλος των κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων  
και ουσιών με αντιοξειδωτική ικανότητα στον  
καρκίνο

Ιωάννης Κ. Τολιόπουλος  
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2007





**«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα (Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2)»**



**Ημερομηνία αίτησης του κ. Τολιόπουλου Ιωάννη 4-11-2002**

**Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 489<sup>α</sup>/4-2-2003**

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων

Χαραλαμπίδης Κωνσταντίνος, Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην Κλινική-Λειτουργική Φυσιολογία

Μέλη

Ευαγγέλου Άγγελος, Καθηγητής Φυσιολογίας

Καρκαμπούνας Σπυρίδων, Λέκτορας Φυσιολογίας

**Ημερομηνία ορισμού θέματος: 26-2-2003**

« Ο ρόλος των κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων και των αντιοξειδωτικών στον καρκίνο »

**ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 607<sup>α</sup>/29-5-2007**

1. Ευαγγέλου Άγγελος, Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
2. Μπουραντάς Κων/νος, Καθηγητής Παθολογίας-Αιματολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
3. Τσελέπης Αλέξανδρος, Καθηγητής Βιοχημείας, Χημικού Τμήματος Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. Καλφακάκου Βασιλική, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
5. Καραμούζης Μιχαήλ, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας Ιατρικής Σχολής Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
6. Χαραλαμπίδης Κων/νος, Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
7. Καρκαμπούνας Σπυρίδωνας, Λέκτορας Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων

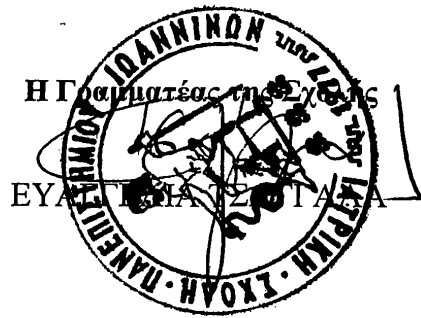
**Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 28-11-2007**



**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ**

**Ιωάννης Γουδέβενος**

**Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας**



ΒΙΒΛΙΟΦΙΛΙΑ

Αφιερωμένο στην οικογένεια μου,

στους φίλους μου,

στους καθηγητές μου σε Ελλάδα και Αμερική

και στους συνεργάτες μου.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ 2

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ 3

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ 4

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ 5

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ 6

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΕΝΤΟ 7

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΤΟ 8

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΒΔΟΜΟ 9

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΟΚΤΩ 10

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΝΝΕΑ 11

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΚΑ 12

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΒΔΟΜΟΝΤΕΝ 13

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΟΓΔΟΝΤΕΝ 14

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 15

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 16

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 17

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 18

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 19

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 20

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 21

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 22

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 23

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 24

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 25

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 26

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 27

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 28

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 29

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 30

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 31

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 32

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 33

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 34

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 35

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 36

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 37

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 38

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 39

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 40

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 41

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 42

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 43

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 44

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 45

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 46

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 47

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 48

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 49

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 50

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 51

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 52

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 53

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 54

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 55

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 56

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 57

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 58

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 59

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 60

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 61

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 62

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 63

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 64

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 65

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 66

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 67

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 68

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 69

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 70

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 71

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 72

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 73

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 74

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 75

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 76

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 77

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 78

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 79

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 80

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 81

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 82

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 83

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 84

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 85

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 86

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 87

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 88

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 89

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 90

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 91

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 92

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 93

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 94

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 95

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 96

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 97

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 98

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 99

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΔΕΚΑΝΤΕΝ 100



## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Πρόλογος	σ. 9
Συντομογραφίες	σ. 13

### ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

#### 1. ΚΥΤΤΑΡΟΚΤΟΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ Ή ΦΥΣΙΚΟΙ ΦΟΝΕΙΣ

1.1. Γενικά για τους φυσικούς φονείς (Natural Killer Cells, NKCs)	σ. 15
1.2. Ιστορική αναδρομή - Γενικά χαρακτηριστικά των NKCs	σ. 16
1.3. Φαινοτυπικά και γονοτυπικά χαρακτηριστικά των NKCs	σ. 19
1.4. Μορφολογία και κυτταροχημεία των NKCs	σ. 28

#### 2. ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ NKCs

2.1. Γενικά η διαδικασία για την ωρίμανση των NKCs	σ. 31
2.2. Η ωρίμανση των NKCs in vitro	σ. 32

#### 3. ΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΩΝ NKCs

3.1. Ειδικοί κατασταλτικοί υποδοχείς MHC τύπου I	σ. 40
3.2. Ειδικοί κατασταλτικοί υποδοχείς χωρίς MHC: Παράδειγμα του 2B4	σ. 48
3.3. Ενεργοποιητικοί υποδοχείς των NKCs	σ. 48

#### 4. ΟΙ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ NKCs

4.1. Μηχανισμοί δράσης των NKCs	σ. 53
4.2. Οι κυτταροκίνες και ιντερφερόνες στην δράση των NKCs	σ. 55
4.3. Η αντικαρκινική δράση των NKCs	σ. 58

#### 5. NKT ΚΥΤΤΑΡΑ (ΦΥΣΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΟΚΤΟΝΑ Τ ΚΥΤΤΑΡΑ)

5.1. Γενικά για τα NKT κύτταρα	σ. 62
5.2. Τα ανθρώπινα NKT κύτταρα	σ. 62



5.3. Η επιλογή του T υποδοχέα	σ. 63
5.4. Ανάπτυξη των NKT και συμβατική ανάπτυξη των T κυττάρων	σ. 66
5.5. Τα NKT κύτταρα και το CD1d	σ. 67
5.6. Αντικαρκινικές αντιδράσεις των NKT κυττάρων	σ. 68
<b>6. Η ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ ΚΑΙ ΤΑ NKS</b>	σ. 70
<b>7. ΤΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΚΑΙ ΤΑ NKS</b>	
7.1. Γενικά για τα αντιοξειδωτικά	σ. 74
7.2. Η δράση των NKS με την επίδραση αντιοξειδωτικών	σ. 78
<b>Σκοπός</b>	σ. 80

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

1. Σχεδιασμός πειραμάτων	σ. 82
2. Μεθοδολογίες των πειραμάτων - Λειτουργικότητα (κυτταροτοξική δράση των NKS)	σ. 85
3. Μεθοδολογία ανοσοφαινότυπου πληθυσμών λεμφοκυττάρων	σ. 93
4. Μεθοδολογία ποσοτικοποίησης των κυττάρων-στόχων	σ. 95
5. Μεθοδολογία καλλιέργειας λειμυοσαρκωμάτων επίμυων Wistar	σ. 96

<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	σ. 97
---------------------	-------

<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	σ. 205
-----------------	--------

<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	σ. 213
---------------------	--------

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	σ. 215
-----------------	--------

<b>SUMMARY</b>	σ. 218
----------------	--------

<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	σ. 224
---------------------	--------

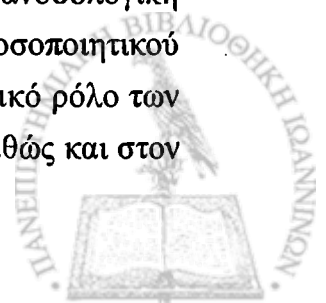


## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η ανακάλυψη των κυτταροκτόνων λεμφοκυττάρων (NK κύτταρα) τα τελευταία τριάντα και πλέον χρόνια αποτελεί μια από τις μεγαλύτερες συνιστώσες τόσο στην ανοσοδιάγνωση όσο και στην ανοσοθεραπεία κακοήθων καρκινικών όγκων. Τα τελευταία χρόνια οι ερευνητές έχουν επικεντρωθεί στον μηχανισμό της λειτουργίας των συγκεκριμένων κυττάρων καθώς και στην ρύθμιση των κατασταλτικών και διεγερτικών υποδοχέων τους. Γενικά, τα NK κύτταρα από την στιγμή της ανακάλυψής τους και μετά την αποκάλυψη του κρισιμότερου φυσιολογικού τους ρόλου έχουν χαρακτηριστεί από τους ερευνητές «θεόσταλτα», ενώ σύμφωνα με το σημερινό επίπεδο γνώσεων θεωρούνται ως ο «εγκέφαλος» του ανοσοποιητικού συστήματος.

Στο πλαίσιο των μελετών για τα NK κύτταρα οι περισσότεροι ερευνητές επικεντρώθηκαν κατά κύριο λόγο στην μελέτη ενεργοποίησης των δράσεων διάφορων κυτταροκινών από αυτά, στους μηχανισμούς της διαφοροποίησης και λειτουργικότητάς τους, καθώς επίσης και στην ανοσοδιέγερση και ανοσοκαταστολή των υποδοχέων τους σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις.

Εδώ και τριάντα χρόνια, το Εργαστήριο της Πειραματικής Φυσιολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων μελετά τον ρόλο των ελευθέρων ριζών καθώς και των αντιοξειδωτικών στην καρκινογένεση, στην ανάπτυξη του καρκίνου από το επίπεδο του αρχικού όγκου μέχρι την τελική νεοπλασματική νόσο, όπως επίσης και στην αντιμετώπιση των κακοηθειών. Επίσης, οι εργασίες εξειδικεύτηκαν στην *in vitro* μελέτη μοντέλων καρκινικών κυττάρων, στην *in vivo* μελέτη της ανάπτυξης όγκων επί πειραματοζώων, καθώς και στην μελέτη των αλληλεπιδράσεων των αιμοπεταλίων και των καρκινικών κυττάρων για την κατανόηση των μηχανισμών της αιματογενούς οδού της μεταστατικής διασποράς. Σε όλα τα ανωτέρω μοντέλα μελετήθηκαν οι εξειδικευμένες δράσεις εξωγενών και ενδογενών αντιοξειδωτικών παραγόντων με εξειδικευμένες ικανότητες εξουδετέρωσης συγκεκριμένων τύπων ελευθέρων ριζών ή δραστικών μορφών οξυγόνου, αλλά και οι συνεργικές δράσεις συνόλων αντιοξειδωτικών ουσιών. Τα τελευταία χρόνια δόθηκε μια μεγάλη έμφαση στην δράση των αντιοξειδωτικών τόσο στην αιμοπεταλιακή συνιστώσα της μετάστασης όσο και στην ανοσολογική συνιστώσα. Ένα τμήμα της μελέτης της συνεισφοράς του ανοσοποιητικού συστήματος στην αναχαίτιση του καρκίνου εστιάστηκε στον αντικαρκινικό ρόλο των NK-λεμφοκυττάρων και των NK-T-κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων, καθώς και στον



διεγερτικό - προστατευτικό ρόλο των αντιοξειδωτικών παραγόντων. Επίσης, βάσει των δεδομένων που ελήφθησαν από τα αντιοξειδωτικά και τα μέταλλα, προέκυψε το αίτημα της σύνθεσης νέων ενώσεων ικανών να συνδυάσουν τις επί μέρους αντικαρκινικές συνεισφορές του μετάλλου με τον οργανικό αντιοξειδωτικό υποκαταστάτη. Επί τη βάση αυτής της προοπτικής οι μελέτες συνεχίστηκαν με απώτερο σκοπό: 1<sup>ον</sup>) Τη σύνθεση και έλεγχο νέων οργανομεταλλικών αντικαρκινικών συμπλόκων και 2<sup>ον</sup>) Την απομόνωση και ταυτοποίηση νέων αντικαρκινικών ουσιών από την γλωρίδα της Ελλάδας.

Παράλληλα χρησιμοποιήθηκε μια νέα προσέγγιση φυσικοχημικού χαρακτήρα για την περαιτέρω ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Η προσέγγιση αυτή συμπεριέλαβε την μελέτη των δράσεων στοχευμένων στατικών ηλεκτρομαγνητικών πεδίων, πολύ χαμηλής έντασης μεν αλλά πολύ συγκεκριμένης δομής ως προς το πληροφοριακό περιεχόμενο της εκτεμπόμενης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας.

Με βάση τις θεμελιώδεις μελέτες για αντικαρκινικές δράσεις φυσικών ουσιών, οι έρευνες συνεχίστηκαν με τον έλεγχο φυσικών απλών ή σύμπλοκων σκευασμάτων με την μεθοδολογία της κυτταροτοξικότητας των NK κυττάρων και την τεχνολογία της κυτταρομετρίας ροής σε *in vitro* πειράματα. Κατόπιν ελέγχθηκαν κατηγορίες καρκινοπαθών που υποβλήθηκαν σε χημειοθεραπείες και διάφορες θεραπευτικές προσεγγίσεις με φυσικές αντιοξειδωτικές ουσίες, ΗΜΓνητικό συντονισμό, μονοκλωνικά αντισώματα και αιματοθεραπεία, και συγκρίθηκαν οι πληθυσμοί των NK κυττάρων καθώς και η λειτουργικότητά τους.

Η παρούσα μελέτη ξεκίνησε το 2003 και ολοκληρώθηκε το 2007 στο Εργαστήριο της Πειραματικής Φυσιολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Μερικά από τα τμήματά της έγιναν στο Ανοσολογικό Εργαστήριο του Π.Γ.Ν. ΑΧΕΠΑ, όπως επίσης και στα Ερευνητικά και Μικροβιοπαθολογικά Διαγνωστικά Εργαστήρια «Ανάλυση».

Καταθέτοντας την μελέτη αυτή, θέλω κατά πρώτον να ευχαριστήσω θερμά τον Αν. Καθηγητή του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Δρ. Κώστα Χαραλαμπίοπουλο, για την ουσιαστική επίβλεψη της διδακτορικής μου διατριβής και τις τις πολύτιμες συμβουλές του και οδηγίες για την ολοκλήρωση της μελέτης.

Επίσης επιθυμώ να εκφράσω τις θερμότερες μου ευχαριστίες προς τον Καθηγητή Φυσιολογίας και Διευθυντή του Εργαστηρίου Πειραματικής Φυσιολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Δρ. Άγγελο Ευαγγέλου, ο οποίος μου έδωσε την δυνατότητα της συνολικής εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής και συγχρόνως το ερέθισμα για γνωστική εμβάθυνση σε εξαιρετικά ενδιαφέρουσες τομές της ιατροβιολογικής έρευνας.





Τους καθηγητές Κων. Χαραλαμπόπουλο και Άγγελο Ευαγγέλου ευχαριστώ επίσης θερμά για την υποστήριξη που μου προσέφεραν με ιδέες, γνώσεις και κριτικές παρατηρήσεις, όπως και για την πολύτιμη καθοδήγηση που μου παρείχαν κατά την διάρκεια όλων των σταδίων της παρούσας μελέτης.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον Δρ. Σπύρο Καρκαμπούνα, Λέκτορα του Εργαστηρίου Φυσιολογίας, για την βοήθεια που μου προσέφερε τόσο στην απόκτηση της απαραίτητης τεχνικής κατάρτισης όσο και στην εκτέλεση πολλών σημαντικών πειραμάτων, καθώς και για την υποστήριξή του σε όλα τα στάδια της εκπόνησης της μελέτης, τόσο σε πρακτικό όσο και σε θεωρητικό επίπεδο. Τον Δρ. Καρκαμπούνα ευχαριστώ επίσης για την πολύτιμη προσφορά ιδεών και συζητήσεων καθ' όλη την διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας διατριβής, τόσο στα Ιωάννινα όσο και στην Θεσσαλονίκη.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον φίλο και συνεργάτη βιοπαθολόγο Δρ. Τηλέμαχο Δασκάλου για την πολύτιμη συμπαράστασή του από την αρχή έως το πέρας της διατριβής, αλλά και για την συνεισφορά του σε αρκετά πειράματα, καθώς και την ενθάρρυνση του για την συμμετοχή μας σε πανελλήνια, πανευρωπαϊκά και παγκόσμια επιστημονικά συνέδρια. Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ για τον συνεργάτη και φίλο βιολόγο Δημήτρη Μπουγιουκλή που συμπαραστάθηκε ηθικά, πνευματικά, αλλά και στο όλο «στήσιμο» των πρωτοκόλλων εργασίας για το καλύτερο και ακριβές αποτέλεσμα της διατριβής. Σημαντική βοήθεια, και τον ευχαριστώ θερμά γι' αυτό, παρείχε και ο βιολόγος Απόστολος Μέτσιος, υποψήφιος διδάκτωρ του Εργαστηρίου Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής Ιωαννίνων για την πετυχημένη καλλιέργεια των λειομυοσαρκωματικών κυττάρων από επίμυες Wistar, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως κύτταρα-στόχοι σε ένα μεγάλο μέρος της διατριβής.

Επίσης, θερμά ευχαριστώ τον συνεργάτη χειρουργό ιατρό Αχιλλέα Πιστοφίδη, Διευθυντή του Κέντρου Βιολογικής Ιατρικής στην Θεσσαλονίκη, για την συμπαράσταση και την υποστήριξή του και για την παραχώρηση αντιοξειδωτικών σκευασμάτων και ενός αριθμού δειγμάτων αίματος από ασθενείς με συμπαγείς κακοήθεις όγκους για την περάτωση ενός μέρους της διατριβής.

Ευχαριστίες οφείλω ακόμη στην ειδικευόμενη ιατρό αιματολόγο Δήμητρα Μίχου, της Αιματολογικής Κλινικής του Αντικαρκινικού Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης «Θεαγένειο», για την προσφορά της στις αιμοληψίες από μια ομάδα καρκινοπαθών καθώς επίσης και στον πλήρη έλεγχο που είχε για το θεραπευτικό σχήμα της συγκεκριμένης ομάδας ασθενών.

Ευχαριστώ την Αναπληρώτρια Διευθύντρια του Μικροβιολογικού Εργαστηρίου του Π.Γ.Ν. ΑΧΕΠΑ, Δρ. Χριστίνα Αγγουριδάκη, για την παραχώρηση του εξοπλισμού του εργαστηρίου, ώστε να εκτελεστεί το πρώτο και αρχικό μέρος των πειραμάτων *in vitro*. Χωρίς την πρωτοβουλία της, η διατριβή αυτή μπορεί να μην είχε ξεκινήσει ακόμη.



Ακόμα ευχαριστώ θερμά και τον ιατρό μικροβιολόγο Σπύρο Γέρου από τα Ερευνητικά και Διαγνωστικά Εργαστήρια «Ανάλυση», που μου παραχώρησε όλο τον εξοπλισμό για την περάτωση αυτής της διατριβής.

Επιπλέον, ευχαριστίες οφείλω στον Κώστα Χαβέλα, ηλεκτρονικό, για την συνεισφορά του με τις συσκευές ΗΜΓνητικού συντονισμού. Ακόμα, ευχαριστώ την αξιότιμη φοιτήτρια του Χημικού Τμήματος Α.Π.Θ. Γαρυφαλλιά Δριμαροπούλου για την πολύτιμη συνεισφορά της στην στατιστική ανάλυση των πειραματικών δεδομένων και τον γιατρό Γεώργιο Γκολομπία για την τυπογραφική επιμέλεια. Επιπλέον, ευχαριστίες οφείλω στον Δρ. Παναγιώτη Βελτίστα, Επίκουρο Καθηγητή Αναλυτικής Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, ο οποίος συνέθεσε όλα τα σύμπλοκα των μετάλλων που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των πειραμάτων. Έχω την αίσθηση ότι ειδικά η σύνθεση του σύμπλοκου με την πουτρεσκίνη αποτέλεσε ένα κατόρθωμα εξ αιτίας της πολύ μεγάλης δυσκολίας της.

Θέλω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον συνεργάτη και φίλο Αντώνη Αυδίκο, μαθηματικό, ο οποίος βοήθησε πολύ στην όλη τεχνική οργάνωση και υποστήριξη των πειραμάτων, καθώς στην επιμέλεια, εκτύπωση και εμφάνιση του όλου τόμου της διατριβής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω το επιστημονικό προσωπικό του Εργαστηρίου της Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την βοήθεια που μου προσέφερε κατά την εκτέλεση πολλών πειραμάτων της παρούσας μελέτης και για την υπομονή και την προθυμία του, ώστε να υπερνικηθεί κάθε δυσκολία κατά την εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής.



## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ADCC = Αντισωμοεξαρτώμενη διά κυττάρων επιτελούμενη κυτταροτοξικότητα  
 AGM = Αορτο-γοναδο-μεσонеφρική περιοχή  
 APCs = Αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα  
 BHT = Βουτυλικό υδροξυτολουένιο  
 BHA = Βουτυλική υδροξυανισόλη  
 CD = Ομάδες διαφοροποίησης αντιγόνων  
 CMPs = Κοινά αρχέγονα μυελικά κύτταρα  
 CLPs = Κοινά αρχέγονα λεμφικά κύτταρα  
 DMBA = 9.10.διμέθυλ-1.2-βενζανθρακένιο  
 DPPD = N-N-διαφαινυλ-P-φαινυλένο-διαμίνη  
 EE= Επιτροπή Ερευνών  
 ΕΕΔ= Εθνική Επιτροπή Δεοντολογίας  
 FeR = Fc υποδοχέας  
 FITC = Φλουορεσκεΐνη  
 GM-CSF = Παράγοντας διεγερτικός αποικιών κοκκιοκυττάρων μακροφάγων  
 HLAs = Σύστημα ιστοσυμβατότητας  
 ΗΜΓΠ=Ηλεκτρομαγνητικά πεδία  
 HSCs = Αιμοποιητικά αρχέγονα κύτταρα  
 Ig = Ανοσοσφαιρίνη  
 IL = Ιντερλευκίνη  
 IFN-γ = Ιντερφερόνη γάμμα  
 ITSMs = Ανοσο-υποδοχείς τυροσίνης βασιζόμενοι σε μοτίβα μετατροπής  
 KIR = Υποδοχείς φυσικών φονέων πανομοιότυποι με ανοσοσφαιρίνη  
 LGLs = Μεγάλα κοκκιάδη λεμφοκύτταρα  
 LAK = Ενεργοποιημένα με λεμφοκίνη κύτταρα-φονείς  
 MHC = Μείζον σύμπλεγμα ανοσοσυμβατότητας  
 MCMV = Μεγαλοκυτταροϊός ποντικού  
 MICA = Μόριο της MHC τάξης I σχετιζόμενο με την πρωτεΐνη A  
 MCA = Methylchoanthrene  
 MPR = Υποδοχέας φωσφατικής 6 μανόσης  
 NK = Φυσικοί φονείς ή κυτταροκτόνα λεμφοκύτταρα  
 NKT = NK T κύτταρα  
 NKPs = Πρόδρομα κύτταρα των NK  
 NDGA = Νορ-διωδρο-γουαιαρετικό οξύ  
 PAH = Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες  
 PC5 = Φυκοερυθρίνη-κυκλίνη 5  
 PBLs = Περιφερικά λεμφοκύτταρα  
 PMNs = Περιφερικά μονοκύτταρα  
 RAG 1,2 = Ανασυνδυασμένο ενεργοποιημένο γονίδιο  
 SDS = Sodium dodecyl sulfate  
 SCF = Παράγοντας των αρχέγονων κυττάρων  
 TCR = Υποδοχέας T κυττάρου  
 TNF = Παράγοντας νέκρωσης όγκων  
 ZAP 70 = Πρωτεΐνη σχετιζόμενη με την ζ αλυσίδα



[The following text is extremely faint and largely illegible due to low contrast and scan quality. It appears to be a multi-paragraph document, possibly a letter or report, with several lines of text per paragraph. The text is oriented vertically on the page.]



## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

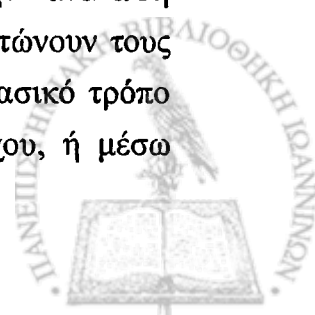
### 1. ΚΥΤΤΑΡΟΚΤΟΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ Ή ΦΥΣΙΚΟΙ ΦΟΝΕΙΣ

#### 1.1. Γενικά για τους φυσικούς φονείς (Natural Killer Cells, NKCs)

Οι φυσικοί φονείς ή κυτταροκτόνα-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα (Natural Killer Cells - NKCs) αποτελούν βασικό υποπληθυσμό των λεμφοκυττάρων και επιπλέον είναι σημαντικός παράγοντας των λευκών αιμοσφαιρίων για το αμυντικό σύστημα του ανθρώπινου οργανισμού. Τα κυτταροκτόνα κύτταρα (NKCs) αναφέρονται και ως φυσικά λεμφοκύτταρα μιας και συνδυάζουν αναγνώριση αντιγόνων με μηχανισμούς των T λεμφοκυττάρων, έκκριση κυτταροκινών και κυτταροτοξική συμπεριφορά. Γενικά τα κύτταρα αυτά θα λέγαμε ότι είναι η ραχοκοκκαλιά του ανθρώπινου ανοσοποιητικού συστήματος (Dokum et al. 2001) Οι φυσικοί φονείς δεν διαθέτουν ανοσολογική μνήμη και είναι ανεξάρτητοι από το υπόλοιπο ανοσολογικό σύστημα. Αποτελούν περίπου το 15% του συνολικού αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων. Η συγκεκριμένη τους δράση είναι η θανάτωση ιών, βακτηριδίων και καρκινικών κυττάρων και γι' αυτό αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας του ανθρώπινου οργανισμού. Η δραστηριότητά τους στο ανοσοποιητικό σύστημα είναι ό,τι η λειτουργικότητα του εγκεφάλου για το ανθρώπινο σώμα (Smyth et al. 2002).

Η φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ των κυτταροκτόνων κυττάρων και των κυττάρων στόχων τους είναι ένα γεγονός - κλειδί για την φυσιολογία των εν λόγω κυττάρων. Ένας λόγος επίσης που ονομάζονται "φυσικοί φονείς" είναι ότι δεν χρειάζονται να αναγνωρίσουν συγκεκριμένο αντιγόνο πριν δραστηριοποιηθούν εναντίων στόχων και δεν απαιτείται η αναγνώριση του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τύπου I (MHC I) (Ljunggren et al. 1990). Όμως, τελευταίες ανακαλύψεις έχουν δείξει ότι ο μοριακός μηχανισμός που ελέγχει την συμπεριφορά των κυτταροκτόνων κυττάρων εναντίων άλλων κυττάρων είναι πολύ πιο πολύπλοκος από ό,τι πιστευόταν στο παρελθόν. Πράγματι, η δραστηριότητα των NK κυττάρων φαίνεται να συντονίζεται από την αντίθετη δραστηριότητα των διεγερτικών και κατασταλτικών υποδοχέων τους. Η πρόσδεση των NKCs σε ποικίλα κύτταρα στόχους συντελεί στην δραστηριοποίηση της λυτικής τους δραστηριότητας μέσω των διεγερτικών υποδοχέων. Η δραστηριοποίηση αυτή μπορεί να ανακληθεί από τους κατασταλτικούς υποδοχείς των NKCs, οι οποίοι μεταφέρουν ένα αρνητικό μήνυμα στους στόχους που προσδένονται τα μόρια του MHC I (Moretta et al. 1996).

Είναι πλέον φανερό ότι η αυτή η πρόσδεση των NKCs είναι σημαντικός και απαραίτητος παράγοντας για την δραστηριοποίησή τους όσον αφορά την θανάτωση των στόχων τους. Τα κυτταροκτόνα κύτταρα (NKCs) μπορούν να θανατώνουν τους στόχους τους με διαφορετικούς μηχανισμούς: i) Κυτταρικά: με τον κλασικό τρόπο της περφορίνης, που καταστρέφει την κυτταρική μεμβράνη του στόχου, ή μέσω



διέγερσης ενζύμων που προκαλούν την ενεργοποίηση κυτταροτοξικών μηχανισμών, ii) Διά μέσου διαλυτών παραγόντων: τα NKCs μπορούν να διεγείρονται και να παράγουν IFN- $\gamma$  (ιντερφερόνη  $\gamma$ ) και TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ), παράγοντες που ασκούν κυτταροστατικές / κυτταροτοξικές δράσεις σε συγκεκριμένους στόχους (Trinchieri et al. 1989). Η ποσοστιαία αναλογία ή ακόμα και το επίπεδο λειτουργικότητας των NKCs βρέθηκε ότι παίζουν σημαντικότερο ρόλο στο αναπαραγωγικό σύστημα και σε μεταμοσχεύσεις, καρκίνο, αυτοάνοσα νοσήματα, φλεγμονές και νευρολογικές διαταραχές (Trinchieri et al. 1989, Albertsson et al. 2003, French et al. 2003, Whiteside et al. 1989).

## 1.2. Ιστορική αναδρομή - Γενικά χαρακτηριστικά των NKCs

Το 1960, ο Govaerts (Govaerts et al. 1960) παρατήρησε ότι λεμφοκύτταρα σκυλιών από τον θωρακικό πόρο τα οποία περιέχονταν σε νεφρικό μόσχευμα ήταν κυτταροτοξικά *in vitro* για τα νεφρικά κύτταρα του δότη. Από τότε η μελέτη των κυτταροτοξικών κυττάρων έχει επεκταθεί σε ποικίλες κυτταρικές αντιδράσεις της φυσικής ανοσίας, οι οποίες κατευθύνθηκαν εναντίων μεταμοσχευτικών αντιγόνων σε αλλογενετικά κύτταρα, ιικά αντιγόνα, αντιγόνα σχετιζόμενα με όγκους, και αυτοαντιγόνα της αυτοάνοσης παθολογίας (Permann et al. 1969, Cerottini et al. 1974). Η συγκεκριμένη κυτταροτοξική συμπεριφορά έναντι μεταμοσχευτικών αντιγόνων επιτυγχάνεται από τα T λεμφοκύτταρα του θύμου αδένου. Τα αντιγόνα τα οποία αναγνωρίζονται από τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (CTLs) έχει αποδειχθεί ότι κωδικοποιούνται από γονίδια του MHC τύπου I (Rosenau et al. 1964), και αργότερα αναγνωρίστηκαν ως προϊόντα των γονιδίων MHC τύπου I και II (Trinchieri et al. 1973, Eijssvoogel et al. 1972, Nabholz et al. 1974).

Πάρα πολλές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ανθρώπους και πειραματόζωα έχουν ερευνήσει την υπόθεση ότι τα CTLs έναντι αντιγόνων εκφράζονται *de novo* σε συγγενικούς όγκους (κύτταρα), τα οποία ήταν υπεύθυνα για την ανοσολογική εποπτεία έναντι νεοπλασματικών κυττάρων (Hellstrom et al. 1968). Στις συγκεκριμένες μελέτες, η κυτταροτοξικότητα των λεμφοκυττάρων σε καρκινοπαθείς είχε επιδειχθεί σε αυτόλογους και αλλογενετικούς τύπους όγκων. Όμως, οι Zinkernagel και Doherty (Zinkernagel et al. 1974) έδειξαν ότι τα CTLs αναγνωρίζουν ιικά αντιγόνα σε στόχους (κύτταρα) μόνο σε συσχέτιση με προϊόντα του συγγενικού MHC. Αυτός ο περιορισμός του MHC των CTLs είχε μελετηθεί και επιδειχθεί για αντιγόνα που είχαν συσχετισθεί με όγκους (Trinchieri et al. 1976). Από την άλλη μεριά, μελέτες βασισμένες στην κυτταροτοξικότητα λεμφοκυττάρων αποκάλυψαν όχι μόνο ότι αλλογενετικοί και συγγενικοί όγκοι είχαν εξαλειφθεί χωρίς την ενεργοποίηση του MHC, αλλά ότι λεμφοκύτταρα από φυσιολογικούς δότες ήταν συχνά κυτταροτοξικά. Λεμφοκύτταρα από υγιείς δότες, τόσο από περιφερικό αίμα



όσο και από λεμφοκύτταρα σπλήνα πειραματόζωων, βρέθηκαν ταυτόχρονα να είναι κυτταροτοξικά *in vitro* για μερικά φυσιολογικά κύτταρα, καλλιεργήσιμες κυτταρικές σειρές, αιμοποιητικά κύτταρα, και κύτταρα όγκων (Jondal et al. 1975, Matthews et al. 1975, Ortaldo et al. 1977, Peter et al, 1975, Takasugi et al. 1973, West et al. 1977). Αυτός ο τύπος κυτταροτοξικότητας όπου δεν είναι απαραίτητη η παρουσία του MHC ορίζεται ως “φυσική κυτταροτοξικότητα” (natural cytotoxicity) και τα κύτταρα τα οποία συμβάλλουν λειτουργικά στην φυσική κυτταροτοξικότητα ονομάζονται φυσικοί φονείς ή κυτταροκτόνα - κυτταροτοξικά κύτταρα (Natural Killer Cells). Η ύπαρξη των NK κυττάρων υποκίνησε την επεξήγηση επιστημονικών μελετών με βάση την συγκεκριμένη κυτταροτοξικότητα έναντι αυθαίρετων ανθρώπινων όγκων (Herberman et al. 1977) και την θεωρία της ανοσολογικής εποπτείας, η οποία βασίζεται στην φυσική ανοσία και στα ειδικά CTLs (Bloom et al. 1982, Patek et al. 1988).

Η ανακάλυψη των NKCs πραγματοποιήθηκε το 1972 από τον Dr. Thornthwaite στο Αντικαρκινικό Ερευνητικό Ινστιτούτο του West Tennessee. Ο συγκεκριμένος ερευνητής είχε μελετήσει κύτταρα ποντικών πάνω σε σπλήνα και αργότερα σε λέμφους, τα οποία κατέστρεφαν ερυθροκύτταρα προβάτων όταν έρχονταν σε επαφή. Τα παράξενα αυτά κύτταρα ήταν άγνωστα τότε, αλλά ο Thornthwaite κατόρθωσε να τα μετρήσει ποσοτικά, να υπολογίσει την πυκνότητά τους και να μελετήσει την μορφολογία τους χρησιμοποιώντας απλό αλλά και ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Εικόνα 1.1) Το όνομα που τους δόθηκε ήταν “complement independent plaque-forming cells” (CIPFC) ή “rough lymphocyte plaque-forming cells”. Αργότερα οι ερευνητές Heberman και Oldham το 1973 τα ονόμασαν όπως αναφέρονται σήμερα, δηλαδή «φυσικούς φονείς» (natural killer cells) Thornthwaite [www.cancerfoundation.com/NK\\_cells.html](http://www.cancerfoundation.com/NK_cells.html)).



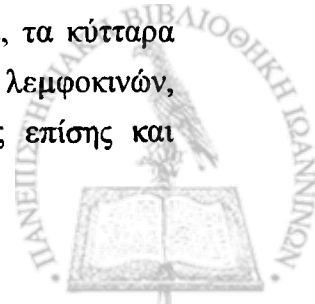
Εικόνα 1.1: Φυσικό κυτταροκτόνο κύτταρο (ηλεκτρονικό μικροσκόπιο).



Για πολλά χρόνια, η κύρια δυσκολία για τη μελέτη των NKCs ήταν ο ορισμός της λειτουργικότητάς τους, εάν δηλαδή τα κύτταρα αυτά μεσολαβούν στην φυσική κυτταροτοξικότητα ή στην κυτταροτοξικότητα η οποία δεν απαιτεί την παρουσία του μείζονος συμπληρώματος της ιστοσυμβατότητας (MHC). Σε αντίθεση με τα T κυτταροτοξικά κύτταρα, τα NKCs δεν έχουν ειδικότητα, περιορισμό σε προϊόντα MHC στην επιφάνεια κυττάρων στόχων και ανοσολογική μνήμη. Μερικοί ερευνητές έχουν προτείνει ότι τα NKCs πρέπει να ορίζονται σε σχέση με την λειτουργικότητά τους (Ritz et al. 1988, Reynolds et al. 1987).

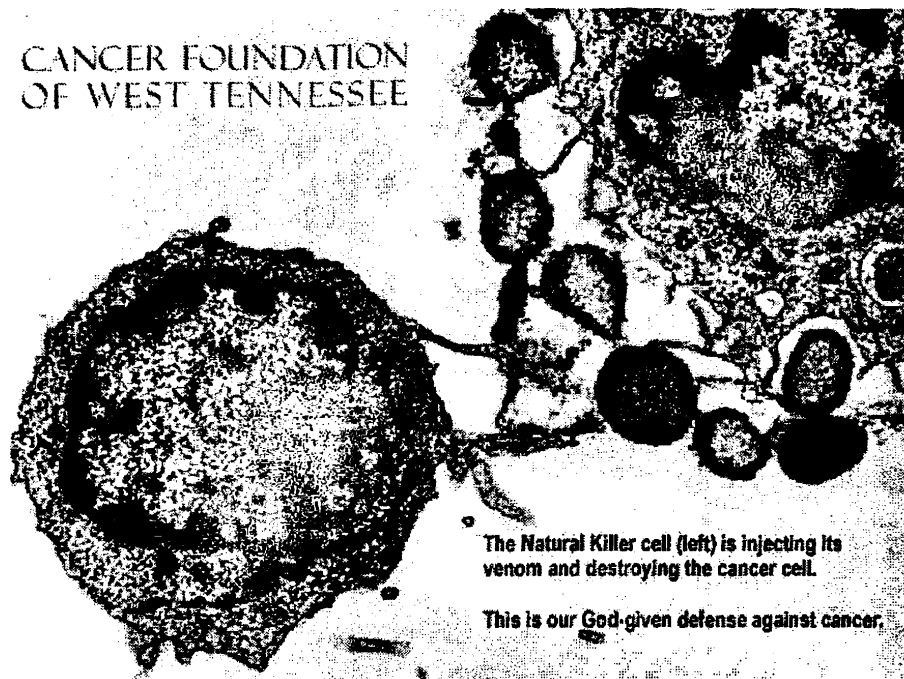
Αναμφισβήτητα, σήμερα είναι δυνατόν να γίνει: α) Διαχωρισμός των ώριμων NKCs από τα T, B και τα μυελικά κύτταρα, β) Διαχωρισμός των προγονικών των NKCs από τα T, B και τα μυελικά κύτταρα και γ) Εξαρτοποίηση των NKCs από τον μυελό των οστών και όχι από τον θύμο αδένα όσον αφορά την διαφοροποίησή τους (Lanier et al. 1986, Trinchieri et al. 1984). Για αυτό το λόγο, τα NKCs αντιπροσωπεύουν έναν ιδιαίτερο υποπληθυσμό λευκών αιμοσφαιρίων, ο οποίος αποτελεί συστατικό της τρίτης κυτταρικής σειράς των λεμφοκυττάρων (Lanier et al. 1986, Trinchieri et al. 1984, Trinchieri et al. 1985, Lanier et al. 1988). Παρά την ακριβή ταυτοποίηση και την πιθανή ετερογένεια των NKCs, παρατηρήθηκε ότι είναι απαραίτητη η περισσότερο λεπτομερής ανάλυση της λειτουργικότητάς τους, όπως συμφωνήθηκε στο 5ο παγκόσμιο συνέδριο για τα NKCs το 1988 (Fitzgerald et al. 1988). Τα NKCs έχουν οριστεί ως μεγάλα κοκκιάδη λεμφοκύτταρα (LGLs) τα οποία δεν εκφράζουν στην επιφάνεια CD3 αντιγόνο ή κάποιες αλυσίδες του γνωστού T υποδοχέα (π.χ. α, β, γ ή δ), αλλά εκφράζουν CD16 και δείκτες ανθρωπίνων κυττάρων επιφανείας NKH-1 (Leu-19) και NK-1.1/NK-2.1 σε ποντίκια, και επιπλέον μεσολαβούν σε κυτταρολυτικές αντιδράσεις έναντι στόχων ακόμα και με την απουσία των MHC I και II (Fitzgerald et al. 1988)).

Κάποια T λεμφοκύτταρα τα οποία είναι  $\alpha\beta^+$  ή  $\gamma\delta^+$  μπορούν να εκφράζουν, ειδικά όταν ενεργοποιούνται, μια κυτταρολυτική δραστηριότητα όμοια με αυτή των NKCs. Τα συγκεκριμένα T κύτταρα ονομάζονται κυτταροκτόνα (NK-like) και έχουν κυτταρολυτική δραστηριότητα χωρίς να είναι απαραίτητη η παρουσία του MHC (Fitzgerald et al. 1988). Τα κύτταρα αυτά έχουν γίνει γνωστά για την θεραπευτική τους δράση όταν είναι ενεργοποιημένα με λεμφοκίνη (lymphokine-activated killer - LAK) (Rosenberg et al. 1985) ή και με ιντερλευκίνη 2, η οποία ενεργοποιείται από τα NKCs. Η σχετική συμπεριφορά των παραπάνω κυτταρικών τύπων με κυτταροτοξικές ιδιότητες εξαρτάται από την προέλευση των λεμφοκυττάρων και από τις κατάλληλες συνθήκες για την ενεργοποίησή τους (Fitzgerald et al. 1988). Παρόλο που τα NKCs πήραν το όνομά τους με βάση την κυτταροτοξική τους δραστηριότητα, τα κύτταρα αυτά έχουν ποικίλες λειτουργίες που συμπεριλαμβάνουν την παραγωγή λεμφοκινών, ρυθμιστικές λειτουργίες στην φυσική ανοσία και αιμοποίηση, όπως επίσης και





δράσεις εναντίον μικροβιακών φλεγμονών και καρκινικών όγκων (Trinchieri et al. 1984) (Εικόνα 1.2).



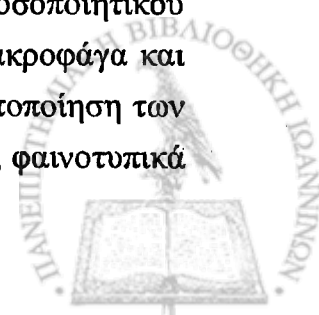
Εικόνα 1.2: Φυσικό κυτταροκτόνο κύτταρο (NKC) ενεργοποιείται εναντίον καρκινικού κυττάρου.

Η κυτταροτοξική ιδιότητα των NKCs πολλές φορές δεν είναι δυνατόν να εφαρμοστεί φυσιολογικά *in vivo*. Τα NKCs μαζί με τα μονοκύτταρα, μακροφάγα, αιμοπετάλια και άλλα, αποτελούν σημαντικό πληθυσμό κυττάρων φυσικής ανοσίας. Η μεσολάβηση των NKCs για τις παραπάνω λειτουργίες ρυθμίζεται από ένα πολύπλοκο δίκτυο κυτταρικών και χυμικών αλληλεπιδράσεων (humoral interactions) με κυτταρικούς τύπους φυσικής και επίκτητης ανοσίας, νευρικού συστήματος κ.ά.

### 1.3. Φαινοτυπικά και γονοτυπικά χαρακτηριστικά των NKCs

#### A. Ταυτοποίηση των κυτταροκτόνων κυττάρων (NKCs)

Η ταυτοποίηση των NKCs βασίζεται αποκλειστικά στην ικανότητά τους να μεσολαβούν στην αντισωμοεξαρτώμενη διά κυττάρων επιτελούμενη κυτταροτοξικότητα (ADCC), η οποία είναι μια λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος που γίνεται και από άλλα κύτταρα, όπως μονοκύτταρα, μακροφάγα και ενεργοποιημένα T κύτταρα. Ένα σημαντικό σημείο σχετικά με την ταυτοποίηση των NKCs ως έναν σχετικά ομογενή κυτταρικό τύπο, βασίζεται στα φυσικά, φαινοτυπικά



χαρακτηριστικά, καθώς και στην κοκκιώδη μορφολογία τους (Saksela et al. 1979). Αρχικά, τα NKCs περιγράφονταν ως μη προσκολλητικά, μη φαγοκυτταρικά, θετικά σε FcγR με μορφολογία λεμφοκυττάρων (Trinchieri et al. 1975). Όμως η χρησιμοποίηση των μονοκλωνικών αντισωμάτων για δείκτες επιφάνειας κυττάρων συνεισέφερε τα μέγιστα στην ταυτοποίηση των NKCs. Πρόσφατες και πιο εξελιγμένες μελέτες χρησιμοποίησαν μοριακούς ανιχνευτές (probes) για την γονιδιακή έκφραση της μεταγραφής και την γενοτυπική οργάνωση των κυτταροκτόνων κυττάρων. Ποικίλες μέθοδοι για την ταυτοποίηση των NKCs αναφέρονται για την φαινοτυπική ανάλυσή τους. Μερικές από αυτές, συνοπτικά, είναι οι εξής:

1. Απομάκρυνση των κυττάρων που φέρουν αντίσωμα με αντίσωμα και συμπλήρωμα ή διαχωρισμός κυττάρων με θετική ή αρνητική επιλογή χρησιμοποιώντας φθορισμό ή μεθόδους με σφαιρίδια, ακολουθούμενη από ανάλυση κυτταροτοξικής δραστηριότητας (Perussia et al. 1983, Zarling et al. 1981, Perussia et al. 1983, Lanier et al. 1983).

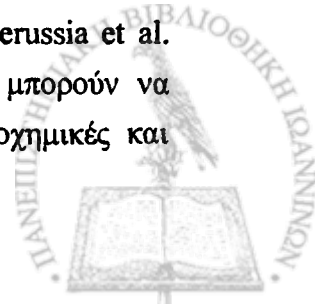
2. Ανάλυση με δείκτες επιφανείας εμπλουτισμένων κυττάρων LGL είχαν προκαλέσει κάποια σύγχυση λόγω παρουσίας επιμολύνσεων, αλλά με την χρησιμοποίηση αρνητικής επιλογής με ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα πραγματοποιήθηκε η ανίχνευση των συγκεκριμένων φορέων μόλυνσης (Ortaldo et al. 1981).

3. Συνδυασμένη χρήση μονοκλωνικού αντισώματος με φθορισμό ή κυτταροτοξικότητα συμπληρώματος είναι μέθοδος για άμεση και ακριβή φαινοτυπική ανάλυση ταυτόχρονα σε κύτταρα στόχους και λυτικά κυτταροκτόνα κύτταρα (Perussia et al. 1983, Varcas-Cortes et al. 1983).

Παρόλη την δυναμική των ανωτέρω μεθόδων, τεχνικά είναι πολύ δύσκολες, χρονοβόρες και κοπιαστικές και για αυτό δεν χρησιμοποιούνται ευρέως.

4. Απομόνωση κλώνων λεμφοκυττάρων με NK κυτταρική δραστηριότητα, ή οποία είναι εξαρτώμενη από την IL-2 (Ritz et al. 1988). Η διαθεσιμότητα των κλώνων των NKCs παρέχει τη δυνατότητα για τη μελέτη της λειτουργίας των κυττάρων αυτών χρησιμοποιώντας ομογενή κυτταρικά διαλύματα. Όμως, εκτός από την ικανότητα των NKCs να ενεργοποιούνται χωρίς την παρουσία του MHC, υπάρχουν και μερικά T κύτταρα, τα οποία ειδικά με την ενεργοποίηση την ιντερλευκίνης 2, δρουν κυτταροτοξικά χωρίς την μεσολάβηση του MHC (Ritz et al. 1988, Brooks 1983, Brooks et al. 1983, Van De Griend et al. 1984). Πράγματι, σε παλιότερες μελέτες είχε περιγραφεί ότι οι περισσότεροι κλώνοι των NK προέρχονταν από T κύτταρα (Ritz et al. 1988).

5. Καλλιέργεια των NK κυττάρων με διαφορετικές μεθόδους (Perussia et al. 1987, Vujanovic et al. 1988). Πολυάριθμα κυτταροκτόνα κύτταρα μπορούν να απομονωθούν με πλήρη καθαρότητα και να χρησιμοποιηθούν σε βιοχημικές και



μοριακές μελέτες, ενώ παλιότερα αυτό δεν ήταν εφικτό λόγω περιορισμένου αριθμού NKCs που λαμβάνονταν σε μικρές ποσότητες.

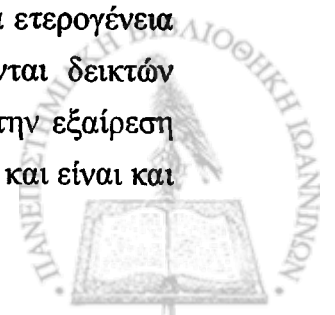
6. Η κυτταρική σειρά ποντικών RNK-16, η οποία έχει αυθόρμητα κυτταροτοξικές ιδιότητες έναντι των YAC-1 κυττάρων και χαρακτηριστικά των NKCs (Ward et al. 1983), χρησιμοποιήθηκε για την βιοχημική και κυτταροτοξική ανάλυση των NKCs και τον κυτταροτοξικό μηχανισμό τους. Σε μερικές μελέτες χρόνιων και οξέων λευχαιμιών, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των NKCs για την διαπίστωση των χαρακτηριστικών τους (Reynolds and Foon 1984).

Εκτός από τις λανθασμένες εκτιμήσεις λόγω της χρήσης επιμολυσμένων ή μη ταυτοποιημένων NKCs, τα αποτελέσματα που καταγράφηκαν χρησιμοποιώντας όλες τις παραπάνω μεθόδους για την ταυτοποίηση των κυτταροκτόνων κυττάρων θεωρούνται λογικά και σταθερά γιατί εξυπηρετούν στην διαφοροποίησή τους από τα T και B κύτταρα.

### B. Φαινότυπος επιφανείας των NKCs

Προηγούμενες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ανθρώπινους πληθυσμούς έδειξαν ότι τα NKCs είναι εκείνα τα κύτταρα που πράγματι εκφράζουν το FcγR, και περίπου 50% από αυτά σχηματίζουν ρόδακες χαμηλής συγγένειας με ερυθροκύτταρα πρόβάτων στους 4°C, ενώ ένα μικρό μόνο ποσοστό από τα T-κύτταρα σχηματίζουν ρόδακες υψηλής συγγένειας στους 29°C (West et al. 1977, Santoli et al. 1978). Η παρουσία των υποδοχέων συμπληρώματος στα NKCs έχει γίνει επίμαχο ζήτημα (Jonald et al. 1975, Nocera et al. 1982, Pross et al. 1977, Vierling et al. 1978). Τα περισσότερα NKCs εκφράζουν τον υποδοχέα για C3bi (CR3 ή CD11b), αλλά όχι για C3b (CR1 ή CD35) ή C3d (CR2 ή CD21) (Ault and Sprinder 1981, Beller et al. 1982, Kay and Horwitz 1980, Perussia et al. 1982). Η χρήση των μονοκλωνικών αντισωμάτων έχει αποκαλύψει ότι τα αντιγόνα επιφανείας δεν είναι μοναδικά για τα NKCs, αλλά ένας συνδυασμός αντιγόνων που απαντάται και σε άλλους κυτταρικούς τύπους, κυρίως T κύτταρα και μονοκύτταρα. Στον πίνακα 1.1 παρουσιάζεται ο αντιγονικός φαινότυπος των NKCs σε σύγκριση με τους άλλους πληθυσμούς λευκοκυττάρων. Στον συγκεκριμένο πίνακα πρέπει να σημειωθεί ότι η θέση των ράβδων σε κάθε κυτταρικό πληθυσμό μπορεί να μην είναι πάντοτε αντιπροσωπευτική ή αποκλειστικά να εκφράζονται αντιγόνα σε συγκεκριμένο κυτταρικό πληθυσμό σε διαφορετικούς υποπληθυσμούς.

Συχνά οι συγκεκριμένοι δείκτες επιφανείας (Πίνακας 1.1) δεν είναι πάντα παρόντες σε όλους τους πληθυσμούς των NKCs, υποδηλώνοντας κάποια ετερογένεια στον πληθυσμό των εν λόγω κυττάρων. Γενικά, τα NKCs στερούνται δεικτών επιφανείας που αναφέρονται ως χαρακτηριστικά των B κυττάρων, με την εξαίρεση ότι περιγράφηκε το αντιγόνο CB02, το οποίο είναι παρόν στα B κύτταρα και είναι και



υποπληθυσμός των NKCs (Funaro et al. 1988). Ο περισσότεροι ερευνητές συμφωνούν ότι τα NKCs όταν είναι σε ηρεμία δεν εκφράζουν σημαντικά το αντιγόνο MHC τύπου II (Perussia et al. 1983, Ng et al. 1980, Perussia and Trinchieri 1984) αλλά οι (Brooks και Moore 1986) έχουν αναφέρει την έκφραση των αντιγόνων HLA-DR, DP και DQ σε έναν υποπληθυσμό των κυτταροκτόνων κυττάρων (NKs).

Cluster	Mol wt (K)	Antigen	B	T cells	MDCK	Macrophage	FcR
MHC I	45,19	Class I MHC					
MHC II	29,32	Class II MHC					
CD1	18	CD1A, Leu-8		(T-lymphocyte)			
CD2	46-80	OKT11, Leu-2b (E-PR)					
CD3	22-28	OKT3, Leu-3					
CD4	55	OKT4, Leu-3					
CD6	67	OK11, Leu-8					
CD8	120	T12					
CD7	60	CD7, Leu-8					
CD8	32,43	OKT8, Leu-2					
CD11a	160,80	LFA-1					
CD11b	170,80	MAC-1 (CR3)					
CD11c	160,80	Leu-M5					
CD11d	88	Mac-1, CR3.1					
CD15	(H-2aglycosyl)	MF-1, CD7.2					
CD18	84,78	CD18, CR3, Leu-11 (FcR)					
CD18	80	(beta chain of CD18)					
CD20	22,27	B1					
CD21	148	TH3-2 (CR2)					
CD24	42	BA1					
CD25	68	TAC (IL-2 R)					
CD26	44	Tr-46, 2.3					
CD28	40	N-3 (F-40)					
CD32	180-250	(CR1)					
CD36	45	OKT10, Leu-17					
CD71	80,70	OKT8, CD8 (Transf. R)					
CD79b	250	NKH-1, Leu-19/NCAM					
CD87	110	Leu-7, HNK-1					

Πίνακας 1.1: Δείκτες επιφανείας ανθρώπινων NKCs σε σύγκριση με τα T, B, μονοκύτταρα και πολυμορφοπύρηννα ουδετερόφιλα κύτταρα. Τα αντιγόνα έχουν επιλεγθεί σύμφωνα με τις ομάδες διαφοροποίησης CD (clusters of differentiation), οι οποίες ορίζονται για διαφοροποιημένα λευκοκύτταρα. Επίσης τα μοριακά βάρη καθώς και τα πρωτότυπα αντισώματα αναφέρονται για την ταυτοποίησή τους. Το μήκος των ράβδων δηλώνει την κατά προσέγγιση αναλογία των κυττάρων που εκφράζουν τα αντιγόνα.

### 1. FcR - CD16 αντιγόνο

Το CD16 FcR αντιγόνο είναι ένας υποδοχέας χαμηλής συγγένειας που προσδέεται στην ανοσοσφαιρίνη IgG σε ανοσολογικά σύμπλοκα με διαλυτά ή μη διαλυτά αντιγόνα, αλλά δεν προσδέεται με την IgG μονομερικά. Αρκετά

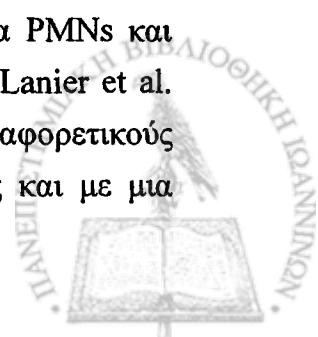


μονοκλωνικά αντισώματα που παράγονται έναντι του CD16 FcR προσδένονται σε λίγους αντιγονικούς καθοριστές στο μόριο CD16 και μπορούν να έχουν διαφορετική κυτταρική ειδικότητα. Κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των πολυμορφοπύρηνων ουδετερόφιλων, το αντιγόνο CD16 εμφανίζεται σε ώριμο στάδιο διαφοροποίησης στον μυελό. Στο περιφερικό αίμα, το CD16 εκφράζεται σε όλα τα ουδετερόφιλα και στα ηωσινόφιλα με πολύ πιο ώριμη μορφολογία. Τα βασεόφιλα δεν εκφράζουν το CD16 FcR. Τα περιφερόμενα μονοκύτταρα εκφράζουν λίγο έως ελάχιστα CD16, αλλά το εκφράζουν ως *in vitro* μονοκύτταρα από καλλιέργεια σε υψηλή πυκνότητα. Επίσης, ακόμα παραμένει άγνωστο εάν ο παραπάνω υποδοχέας πρώτα εκφράζεται στα NKCs, λόγω της περιορισμένης γνώσης που υπάρχει σχετικά με την διαφοροποίηση των συγκεκριμένων κυττάρων (Perussia et al. 1983, Perussia et al. 1984, Fleit et al. 1982, Rumpold et al. 1982, Phillips and Babcock 1983).

Το πρώτο αντι-CD16 αντιγόνο (3G8) αποδείχτηκε ότι αντιδρά με πολυμορφοπύρηννα ουδετερόφιλα και μακροφάγα (Fleit et al. 1982). Ένα άλλο αντι-CD16 μονοκλωνικό αντίσωμα (B73.1) αντιδρά με τον μεγαλύτερο πληθυσμό των NKCs. Τα CD16+ λεμφοκύτταρα πράγματι περιέχουν όλα τα λεμφοκύτταρα τα οποία είναι ικανά να μεσολαβήσουν στην κυτταροτοξικότητα. Παρόλο που το αντιγόνο CD16 δεν είναι αποκλειστικά παρόν στα NKCs, θεωρείται ο καλύτερος δείκτης για την ταυτοποίηση και τον καθαρό διαχωρισμό των NKCs από τα περιφερικά μονόπύρηννα κύτταρα (PMNs). Ενώ το αντίσωμα B73.1 αντιδρά με το 50% των δοτών των PMNs, το 3G8 δεν έχει την συγκεκριμένη ιδιότητα. Πάντως, και τα δυο αντισώματα αντιδρούν με όλους τους δότες από όλα τα NKCs.

Το αντίσωμα AB.28 (Malavasi et al. 1985, Malavasi et al. 1986) περιγράφηκε για πρώτη φορά ως ειδικό του FcγR των NKCs λόγω της ικανότητάς του να μπλοκάρει τη δημιουργία ρόδακα με αντίσωμα επικαλυμμένο από ερυθροκύτταρα. Πάντως, το αντιγόνο που αναγνωρίζεται από το συγκεκριμένο αντίσωμα εμφανίζει διαφορετικά μοριακά χαρακτηριστικά από αυτά του CD16, είναι παρόν στα κύτταρα όταν το CD16 FcR διαμορφώνεται από αντισώματα ή ανοσολογικά σύμπλοκα (Matera et al. 1986) και τάχιστα εξαφανίζεται από τα NKCs σε καλλιέργεια όταν εκφράζεται έντονα το CD16 FcR. Η ακριβής φύση του αντισώματος AB.28 παραμένει ακόμη αντικείμενο για περαιτέρω διερεύνηση.

Τα μόρια CD16 παράγονται ως ίζημα από την μεμβράνη των PMNs ή NKCs και εμφανίζονται ως μια μεγάλη δέσμη σε πηκτή από sodium dodecyl sulfate (SDS) μοριακού βάρους από 50.000 έως 70.000 (Brooks 1983, Fleit et al. 1982). Τα μόρια αυτά είναι γλυκοζυλιωμένα και με την προσθήκη N-γλυκανάσης διακρίνονται καθαρά ως δέσμες κυμαινόμενες σε 23-28 kDa και 32-36 kDa από τα PMNs και NKCs αντίστοιχα (Clarkson and Ory 1988, Simmonw and Seed 1988, Lanier et al. 1988, Ravetch et al. 1989). Συμπερασματικά, το CD16 εκφράζεται σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους σε μόρια με διαφορετικά επίπεδα γλυκοζυλίωσης και με μια



πολυπεπτιδική αλυσίδα διαφόρων διαστάσεων. Η λειτουργική συνάφεια στις δομικές διαφορές του CD16 FcR ανάμεσα στα NKCs και PMNs υποδηλώνεται από το γεγονός ότι τα NKCs μόνο είναι ικανά να λύουν παραγόμενα υβριδικά κύτταρα αντισώματος CD16, επίσης ότι το CD16 λειτουργεί στα NKCs ως δομή μεταγωγής σήματος στην αντισωμοεξαρτώμενη διά κυττάρων εκτελούμενη κυτταροτοξικότητα (ADCC) (Graziano et al. 1989).

Η έκφραση επιφάνειας του CD16 στα ανθρώπινα NKCs είναι ρυθμιζόμενη. Η επώαση των NKCs με αντισώματα CD16 ή ανοσολογικά σύμπλοκα συντελεί στην ταχεία εξαφάνιση των CD16 από την επιφάνεια των κυττάρων (Peroussia et al. 1983). Επίσης, η επεξεργασία των NKCs με rhorbol διεστέρες αυξάνει βαθμιαία την έκφραση του CD16 σε λίγα λεπτά (Trinchieri et al. 1984). Στους περισσότερους υγιείς δωρητές, το αντιγόνο CD16 εκφράζεται σε ασήμαντο πληθυσμό CD3<sup>+</sup> των T κυττάρων. Πάντως, η παρουσία περίπου 5-10% CD3<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup> των T κυττάρων έχει αναφερθεί για δύο από 50 δωρητές που ελέγχθηκαν κατά την διάρκεια μελετών (Lanier et al. 1985). Τα συγκεκριμένα T κύτταρα εκφράζουν το CD16 σε πολύ χαμηλότερο ποσοστό από ό,τι τα NKCs που εκφράζουν CD3<sup>-</sup> και CD 16<sup>+</sup>. Το CD16 FcR είναι ένας υποδοχέας που χρησιμοποιείται από τα NKCs για την αναγνώριση στόχων και σε γενικές γραμμές μόνο οι κλώνοι CD16<sup>+</sup> διαθέτουν αντισωμοεξαρτώμενη διά κυττάρων εκτελούμενη κυτταροτοξικότητα (ADCC). Επίσης προτάθηκε ότι οι υποπληθυσμοί των NKCs όπως FcγR<sup>+</sup> και FcγR<sup>-</sup> μεσολαβούν στην κυτταροτοξικότητα έναντι κυτταρικών σειρών όπως K562, λέμφωμα Burkitt's και Daudi (Masucci et al. 1986). Το CD16 εκφράζεται σε περισσότερο από 50% κύτταρα περιφερικού αίματος με κυτταροτοξική δράση και στις δυο κυτταρικές σειρές (K562, Daudi) ((Peroussia et al. 1983).

## 2. NKH-1/Leu-19 αντιγόνο

Μια σειρά αντισωμάτων τα οποία αντέδρασαν με τα περισσότερα NKCs δημιούργησαν ένα μόριο μοριακού βάρους 200.000-220.000, το οποίο αναφέρεται ως αντιγόνο NKH-1 ή Leu-19. Το πρώτο αντίσωμα που περιγράφηκε ήταν το N901, το οποίο παράχθηκε από ποντίκια που τους χορηγήθηκαν κύτταρα από ασθενή με χρόνια μυελογενή λευχαιμία σε βλαστική κρίση (Griffin et al. 1983). Το N901 αναγνωρίζει ένα αντιγόνο που εκφράζεται σε υψηλή πυκνότητα σε μη ώριμη μυελική κυτταρική σειρά KG1a και στον μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων από ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία (Griffin et al. 1983). Επίσης, το N901 αντιδρά με νευρώνες, κυτταρικές σειρές νευροβλαστώματος και ανθρώπινες σειρές τερατοκαρκινώματος, ειδικά μετά την αυξημένη διαφοροποίηση νευρικών κυττάρων (McGarty et al. 1988). Τα δύο αντισώματα, NKH-1A (Hercend et al. 1985) και Leu-19 (Lanier et al. 1986) αποδείχθηκε ότι αντιδρούν με τα NKCs με την ίδια ειδικότητα. Το αντιγόνο NKH-



1/Leu-19 εκφράζεται σε πολύ χαμηλή πυκνότητα στα NKCs περιφερικού αίματος, αλλά η πυκνότητα αυξάνεται σημαντικά με βάση την αύξηση και την διέγερση των NKCs *in vitro* (Perussia et al. 1987). Τα κύτταρα CD16, NKH-1+ αντιπροσωπεύουν το 2-3% των περιφερικών λεμφοκυττάρων (PBLs) και υποδιαιρούνται σε δύο υποσύνολα βασισμένα στην έκφραση των CD3 αντιγόνων. Τα CD3<sup>+</sup>, NKH-1<sup>+</sup>, CD16<sup>-</sup> αντιπροσωπεύουν έναν μικρό υποπληθυσμό T κυττάρων (Lanier et al. 1986). Το αντιγόνο NKH-1/Leu-19 εκφράζεται σχεδόν σταθερά σε κλώνους χωρίς περιορισμένη ειδικότητα του MHC και στο CD3<sup>-</sup> και στο CD3<sup>+</sup> (Ritz et al. 1988). Πάντως, η παρουσία του αντιγόνου NKH-1/Leu-19 σε μερικούς κλώνους χωρίς κυτταροτοξική δράση αποκλείει τον συσχετισμό ανάμεσα στο αντιγόνο και την κυτταροτοξικότητα (Lanier et al. 1987).

Ένα άλλο μονοκλωνικό αντίσωμα, το NKH-2, επιδεικνύει εκλεκτική αντιδραστικότητα για μεγάλα κοκκιώδη λεμφοκύτταρα (LGLs) (Hercend et al. 1985) και προάγει την παραγωγή ενός μορίου των 50 kDa ξεχωριστό από το NKH-1. Περίπου το 7% των PBLs εκφράζουν αντιγόνα και μερικώς επικαλύπτονται με τα υποσύνολα NKH-1<sup>+</sup>. Τα κύτταρα NKH-1+ και NKH-2- φαίνονται στο περιφερικό αίμα να έχουν υψηλότερη κυτταροτοξική δράση από ό,τι έχουν τα κύτταρα NKH-1-, NKH-2+, παρόλο που ιδιαίτερα κυτταροτοξικοί κλώνοι έχουν μελετηθεί ανεξαιρέτως φαινοτύπου.

### 3. HNK-1/Leu-7 αντιγόνο

Η αντιδραστικότητα του αντισώματος HNK-1 (αντί-Leu-7), που αρχικά περιγραφόταν ως ειδική για τα κυτταροκτόνα κύτταρα (NKCs), είναι πολύπλοκη. Το αντίσωμα IgM παράγει ένα αντιγόνο 110 kDa από τα PBLs και αντιδρά με περίπου 30-70% των NKCs περιφερικού αίματος με μεγάλη ποικιλομορφία ανάμεσα σε δότες (Perussia et al. 1983, Lanier et al. 1983). Για το αντιγόνο HNK-1/Leu-7 δεν υπάρχει συσχετισμός ανάμεσα στην ποσοστιαία αναλογία των θετικών PBLs και στην κυτταροτοξικότητα των NKCs (Perussia et al. 1982). Τα κύτταρα του ομφάλιου λώρου, τα οποία φυσιολογικά εκφράζουν το CD16 και έχουν μειωμένη αλλά σημαντική κυτταροτοξικότητα των NKCs, δεν εκφράζουν το παραπάνω αντίσωμα (Perussia et al. 1983, Abo et al. 1982). Επίσης, το HNK-1 αντιδρά με ένα ποικίλο ποσοστό των CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, μερικές φορές με HLA-DR<sup>+</sup> T κύτταρα (Abo et al. 1982) και με έναν σπάνιο πληθυσμό των CD4<sup>+</sup> T κυττάρων τα οποία αναπτύσσονται σε ποικίλες παθολογικές καταστάσεις (Velardi et al. 1985, Velardi et al. 1985, Velardi et al. 1985). Η παρουσία των κοκκίων φαίνεται να χαρακτηρίζει τα περισσότερα HNK-1/Leu-7 λεμφοκύτταρα με δείκτες και T και NK κυττάρων (Abo et al. 1982). Με βάση την ειδικότητα του αντισώματος HNK-1, τα περισσότερα συμπεράσματα για την βιολογία και την λειτουργία των NKCs βγαίνουν από την χρήση του αντισώματος

σαν τον μόνο ανιχνευτή που πρέπει να απορρίπτεται, και ότι το HNK-1 δεν πρέπει να χρησιμοποιείται ως δείκτης των NKCs.

Με βάση την αντιδραστικότητα των PBLs με τα HNK-1 και CD16, τα PBLs διαφοροποιούνται σε τέσσερα υποσύνολα: α)  $CD3^-$ ,  $CD16^+$ , HNK-1<sup>-</sup> NKCs, με την υψηλότερη κυτταροτοξικότητα, β)  $CD3^-$ ,  $CD16^+$ , HNK-1<sup>+</sup> NKCs, με ενδιάμεση κυτταροτοξική δραστηριότητα, γ)  $CD3^+$ ,  $CD16^-$ , HNK-1<sup>+</sup> NKCs, με χαμηλή κυτταροτοξική δραστηριότητα, και δ)  $CD3^+$ ,  $CD16^-$ , HNK-1<sup>-</sup>, μικρά T κύτταρα, χωρίς κυτταροτοξική δράση. Επίσης, το αντίσωμα HNK-1 αντιδρά με περιφερικά νεύρα, νωτιαίο μυελό, αδenoκαρκίνωμα του πνεύμονα, ενδοκρινή κύτταρα εμβρυικού βρόγχου, μόρια προσκόλλησης νευρικών κυττάρων, άλλα νευροενδοκρινή κύτταρα, και υπερτροφικό και κακόηθες επιθήλιο του προστάτη (Ando and Tamaki 1985, Stoll et al. 1985, Hozumi et al. 1987, Ball et al. 1986, Bunn et al. 1985, Rusthoven et al. 1985, Kruse et al. 1984).

Μονοκλωνικά IgM αντισώματα με την ίδια αντιδραστικότητα όπως το HNK-1 είναι παρόντα σε ορό ασθενών με περιφερική πολυνευροπάθεια, μια χρόνια ασθένεια που προσβάλλει ανθρώπους μεγαλύτερων ηλικιών (Braun et al. 1982, Steck et al. 1983, Leibowitz et al. 1983). Παρόλο που τα μονοκλωνικά IgM από ασθενείς δείχνουν συναγωνισμό για πρόσδεση με HNK-1 υποδεικνύοντας μια ιδανική αντιγονική ειδικότητα, η προσδετική συγγένεια είναι χαμηλή συγκρινόμενη με HNK-1, και αυτή η πρόσδεση αποδεικνύεται στους 4°C και όχι στους 37°C (Miller et al. 1985). Γι' αυτό είναι απίθανη η πρόσδεση των ανθρώπινων μονοκλωνικών αντισωμάτων σε περιφερόμενα κυτταροκτόνα κύτταρα *in vivo*. Συχνά, νευροπαθείς ασθενείς με μονοκλωνική παραπρωτεϊναιμία έχουν φυσιολογικό αριθμό και δράση των κυτταροκτόνων κυττάρων τους (Sriram and Lanier 1986, Dell-Casa-Alberighi et al. 1988), παρόλο που ένας μειωμένος αριθμός των HNK-1<sup>+</sup> κυττάρων αναφέρθηκε σε τρεις ασθενείς (Murray and Steck 1984).

#### 4. CD11/CD18 αντιγόνα και μυελομονοκυτταρικά αντιγόνα

Τα CD11/CD18 είναι μια οικογένεια τριών μορίων που αποτελούνται από μια κοινή β υποομάδα (CD18, 95 kDa) και διαφορετικές α υποομάδες: CD11a ή LFA-T, CD11b ή CR3, και CD11c ή p150 (Springer et al. 1987). Και τα τρία μόρια εκφράζονται στα ανθρώπινα κυτταροτοξικά κύτταρα (Timonen et al. 1988). Το CD11a ή LFA-T εκφράζεται σε όλα τα λεμφοκύτταρα, όπου τα CD11b και CD11c τείνουν να εκφραστούν στα NKCs κύτταρα (Kay and Horwitz 1980, Timonen et al. 1988). Το CD11b εκφράζεται έντονα στα PMNs και στα μονοκύτταρα (Breard et al. 1980). Πάντως, το CD11b είναι παρόν σε χαμηλή ένταση στο μεγαλύτερο ποσοστό των NKCs, εκφράζεται σε μερικά T κύτταρα και τάχιστα εξαφανίζεται από τα NKCs που σταθεροποιούνται σε καλλιέργεια (Perussia et al. 1987).





## 5. Αντιγόνα σχετιζόμενα με T κύτταρα και TCR

Τα ανθρώπινα NKCs δεν εκφράζουν το αντιγόνο CD5 που είναι παρόν σε όλα τα T κύτταρα (Perussia et al. 1983, Perussia et al. 1982, Zarling and Kung 1980), παρόλο που το CD5 αντιδρά με κυτταροπλασματικά αντιγόνα σε επιτρεπόμενα NKCs (Morgan et al. 1987). Το αντιγόνο CD4 δεν εκφράζεται στα NKCs, όπου το 30-50% των συγκεκριμένων κυττάρων εκφράζουν το CD8 σε χαρακτηριστική πυκνότητα (Perussia et al. 1983). Το CD8 που παράγεται από τα αντι-CD8 αντισώματα των NKCs φαίνεται να είναι απολύτως όμοιο με αυτό που παράγεται από τα T κύτταρα (Perussia et al. 1983). Η έκφραση του CD8 διατηρείται σε μαζικές καλλιέργειες των NKCs (Perussia et al. 1987), αλλά οι  $CD3^- CD8^+$  κλώνοι των NK κυττάρων είναι σπάνιοι (Ritz et al. 1987). Τα  $CD8^-$  και  $CD8^+$  των NKCs έχουν παρόμοια κυτταροτοξική δράση, αλλά δεν έχουν ανιχνευτεί άλλες λειτουργικές δυνατότητες στους δύο υποπληθυσμούς (Perussia et al. 1983). Επίσης, τα CD7 και CD44 εκφράζονται στα NKCs (Calvo et al. 1984). Η έκφραση του CD2 είναι περισσότερο ετερογενής στα NKCs από ότι στα T κύτταρα και δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του CD2 και της κυτταροτοξικής δράσης των NKCs.

Ο μεγαλύτερος πλυθυσμός των NKCs εκφράζει σε χαμηλή πυκνότητα το αντίγόνο CD38, ενώ τα T κύτταρα σε ηρεμία είναι αρνητικά για αυτό το αντιγόνο (Ortaldo et al. 1981). Όμως, το αντιγόνο αυτό εκφράζεται και στα ενεργοποιημένα T και στα NK κύτταρα *in vitro* για την διαφοροποίησή τους (Hercend et al. 1981, London et al. 1985). Στην πραγματικότητα, όλη η φυσική κυτταροτοξικότητα είναι αποτέλεσμα μεσολάβησης των  $CD3^-$  λεμφοκυττάρων (Brooks 1983, Rumbold et al. 1982, Perussia et al. 1982, Zarling and Kung 1980).

Ανάλυση των γονιδίων TCR $\beta$  και  $\gamma$  έδειξε ότι δεν υπάρχει απόδειξη για ανασυνδυασμό και των φυσιολογικών αλλά και καλλιιεργειών των NKCs<sup>113,114</sup>, παρόλο που όπως αναμενόταν, ανασυνδυασμός παρατηρήθηκε στα  $CD3^+$  T κύτταρα (Ritz et al. 1985, Leiden et al. 1988). Επίσης, ανασυνδυασμοί δεν αποδείχτηκαν ούτε στην περιοχή TCR $\delta$  των NKCs (Isobe et al. 1989, Biondi et al. 1989).

Τα NKCs δεν διαθέτουν ανιχνεύσιμο υποδοχέα των T κυττάρων (TCR) στην κυτταρική επιφάνεια, όπως ανιχνεύτηκε με αντισώματα στο TCR $\alpha\beta$  ή  $\gamma\delta$ , αλλά ούτε και εκφράζουν TCR μετά από *in vitro* καλλιέργεια (Perussia et al. 1987). Ένα μη λειτουργικό μεταγραφικό τμήμα του γονιδίου TCR $\beta$  που δεν περιέχει την μεταβλητή περιοχή V (variable), είναι ανιχνεύσιμο στα κυτταροκτόνα κύτταρα ή στα  $CD3^-$  NK κύτταρα (Ritz et al. 1985, Lanier et al. 1986). Το γονίδιο TCR $\beta$  στα NKCs είναι πιο μεθυλιωμένο από τα T κύτταρα, αλλά λιγότερο μεθυλιωμένο από τα B κύτταρα και τα μονοκύτταρα, γεγονός που προκαλεί την μερική δραστηριοποίηση του γονιδίου (Sakamoto et al. 1988).

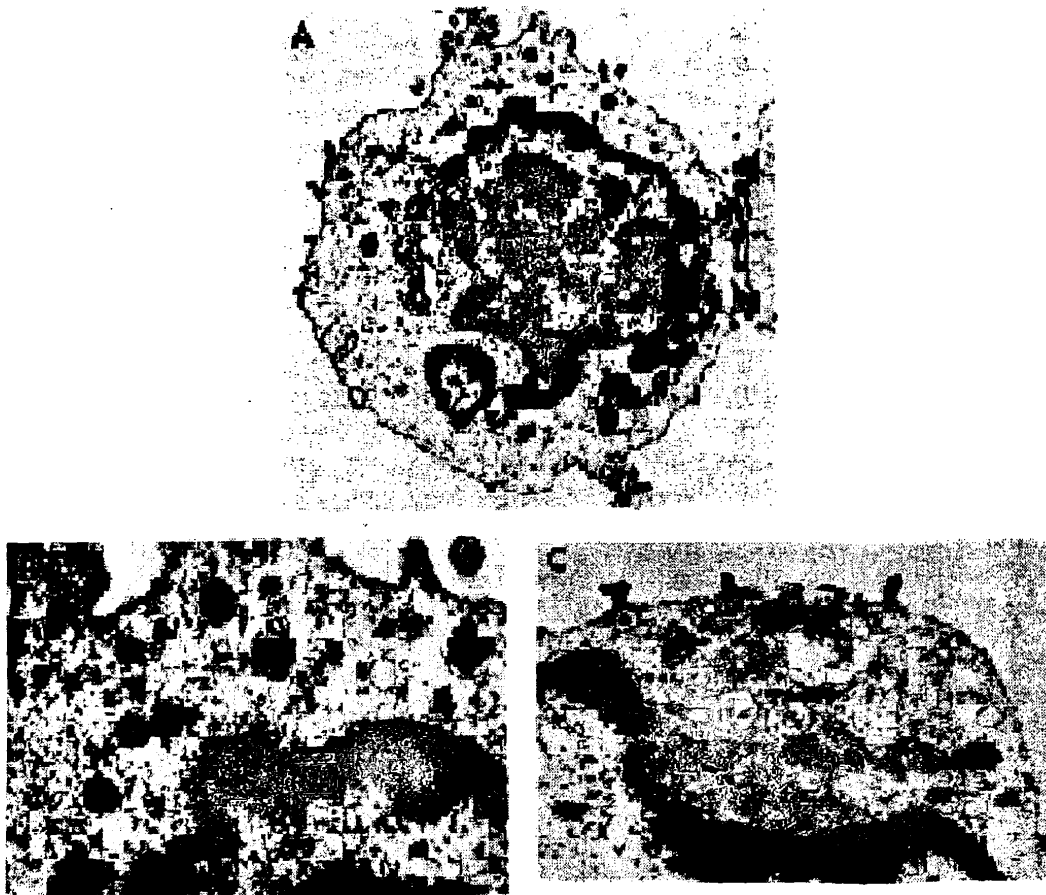


#### 1.4 Μορφολογία και κυτταροχημεία των NKCs

Η μορφολογική ταυτοποίηση των περισσότερων NKCs σαν LGLs είχε μελετηθεί από το παρελθόν με ανάλυση των λεμφοκυττάρων που έχουν την ιδιότητα πρόσδεσης σε ευαίσθητα κύτταρα στόχους (Saksela et al. 1979, Timonen et al. 1979a, Timonen et al. 1979b).. Ο κύριος ρόλος των LGLs ως NKCs που μελετήθηκε ήταν η συσχέτιση ανάμεσα στον αριθμό των LGLs που προσδένονται στην κυτταρική σειρά K562 και στο επίπεδο της κυτταροτοξικής δράσης σε φυσιολογικούς δότες (Timonen et al. 1979a). Σε τουλάχιστον 70% του ανθρώπινου περιφερικού αίματος έχει αποδειχθεί η κυτταρική δράση των NKCs (Timonen et al. 1981). Η μορφολογία των LGLs έχει μελετηθεί στα NKCs σε πειραματόζωα όπως τα ποντίκια, οι επίμυες και τα άλογα (Magnuson et al. 1987).

Κύτταρα ανθρώπινου περιφερικού αίματος με μορφολογία όπως τα LGLs (π.χ. με υψηλή αναλογία κυτταροπλάσματος - πυρήνα, οδοντωτό πυρήνα και αζουροφιλικά κοκκία) είχαν περιγραφεί το 1911 από τους Pappenheim και Ferrata και ονομάστηκαν μονοκυτταροειδή ή λευκοκυτταροειδή λεμφοκύτταρα. Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο τα LGLs φαίνονται ως μεσαίου μεγέθους λεμφοκύτταρα με στρογγυλούς ή οδοντωτούς πυρήνες, συμπυκνωμένη χρωματίνη και συνήθως χαρακτηριστικό πυρινίσκο (Grossi et al. 1982, Babcock and Phillips 1983, Payne and Glasser 1981, Huhn et al. 1982) (Εικόνα 1.3).





Εικόνα 1.3: Χαρακτηριστικά γνωρίσματα των NKCs σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Α) x9.100, Β) Κοκκία x26.000, Γ) Κοκκία στα οποία χορηγήθηκαν αντισώματα αντι-CD16 μαζί με σεφαρόζη x26.000.

Το κυτταρόπλασμα είναι πληθωρικό και περιέχει μεγάλη ποικιλία από οργανίδια. Μια πολύ καλά αναπτυσσόμενη συστοιχία Golgi με αρκετά επικαλυμμένα κυστίδια συχνά βρίσκεται στην εγκοπή του πυρήνα. Επίσης, χαρακτηριστικά κεντριόλια και σχετιζόμενα μικροσφαιρίδια ανιχνεύονται στην περιοχή αυτή. Το κυτταρόπλασμα περιέχει μια πληθώρα από μιτοχόνδρια και έναν αριθμό από λυσοσώματα. Το κοινό μεταξύ τους είναι ότι είναι προσκολλημένα σε μεμβράνη με κοκκία περιέχοντας ένα πυκνό ομογενές στρώμα ηλεκτρονίων. Επιπλέον, άλλα οργανίδια όπως μαλακά κυστίδια, επικαλυμμένα κυστίδια και πολυχυμοτόπια σωματίδια είναι συνήθως παρόντα. Το μέγεθος των κοκκίων των ώριμων NKCs σε ηρεμία φτάνει από 50 έως 800 nm, εμφανίζοντας κυκλική ή επιμήκη κατανομή, και περιλαμβάνουν ένα πυκνό από ηλεκτρόνια εσωτερικό τμήμα (internum), το οποίο περιβάλλεται από μια ζώνη χαμηλότερης θολερότητας (externum). Η διαμόρφωση των κοκκίων έχει αποδοθεί είτε στα στάδια διαφοροποίησής τους είτε σε ενεργοποίηση των NKCs με τη χορήγηση λεμφοκίνης ή σε κυτταροτοξική δράση (Caulfield et al. 1987, Kang et al. 1987, Zarcome et al. 1987).



Τα κοκκία των NKCs βάφονται με γλυκοπρωτεΐνες, οξύ φωσφατάσης, τριμεταφωσφατάση, αρυλσωλφατάση και β-γλυκουρονιδάση, γεγονός που δηλώνει ότι είναι πρωτογενή λυσοσώματα. Η παρουσία της ενδογενούς περοξιδάσης στα LGLs έχει αναφερθεί σε μερικές, αλλά όχι σε πολλές μελέτες (Caulfield et al. 1987, Kang et al. 1987, Zargome et al. 1987). Οι (Babcock και Phillips 1983) ανίχνευσαν την δράση της περοξιδάσης σε μερικά μόνο κυστίδια και πρότειναν ότι μπορούν να αντιπροσωπεύουν ενζυματική δράση φαγοκυτταρωμένου υλικού και όχι ενδογενή περοξιδάση.

Τα NKCs εκφράζουν ποικίλη εστερική δράση, η οποία ανιχνεύτηκε με ιστοχημεία. Η Naphthol AS-D chloroacetate esterase, ένα ένζυμο με ουδετεροφιλικά κοκκιοκύτταρα, εκφράζεται στα περισσότερα κοκκία των NK κυττάρων (Heumann et al. 1983). Μη ειδικές εστεράσες, όπως a-naphthyl acetate (ANAE) και a-naphthyl butyrate (ANBE), είναι ανιχνεύσιμες στα NKCs. Οι ANAE και ANBE είναι παρούσες στα κοκκία των LGLs δίνοντας μια διάσπαρτη χρώση που συχνά παραμελείται από την οπτική μικροσκοπία. Το μοτίβο βαφής των LGLs είναι πολύ διαφορετικό από αυτό που παρατηρείται στα περισσότερα T κύτταρα, στα οποία η δράση της εστεράσης σαν μία κυτταροπλασματική κουκκίδα μη κατασταλόμενη από NaF, ανταποκρίνεται στο σωματίο Gall (σωρός λυσοσωμάτων δίπλα σε μια σταγόνα λιπιδίων) ή σε συσσωρευμένα πυκνά σωματίδια, όπως απεικονίζονται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Monahn et al. 1981, Prasthofer et al. 1988).



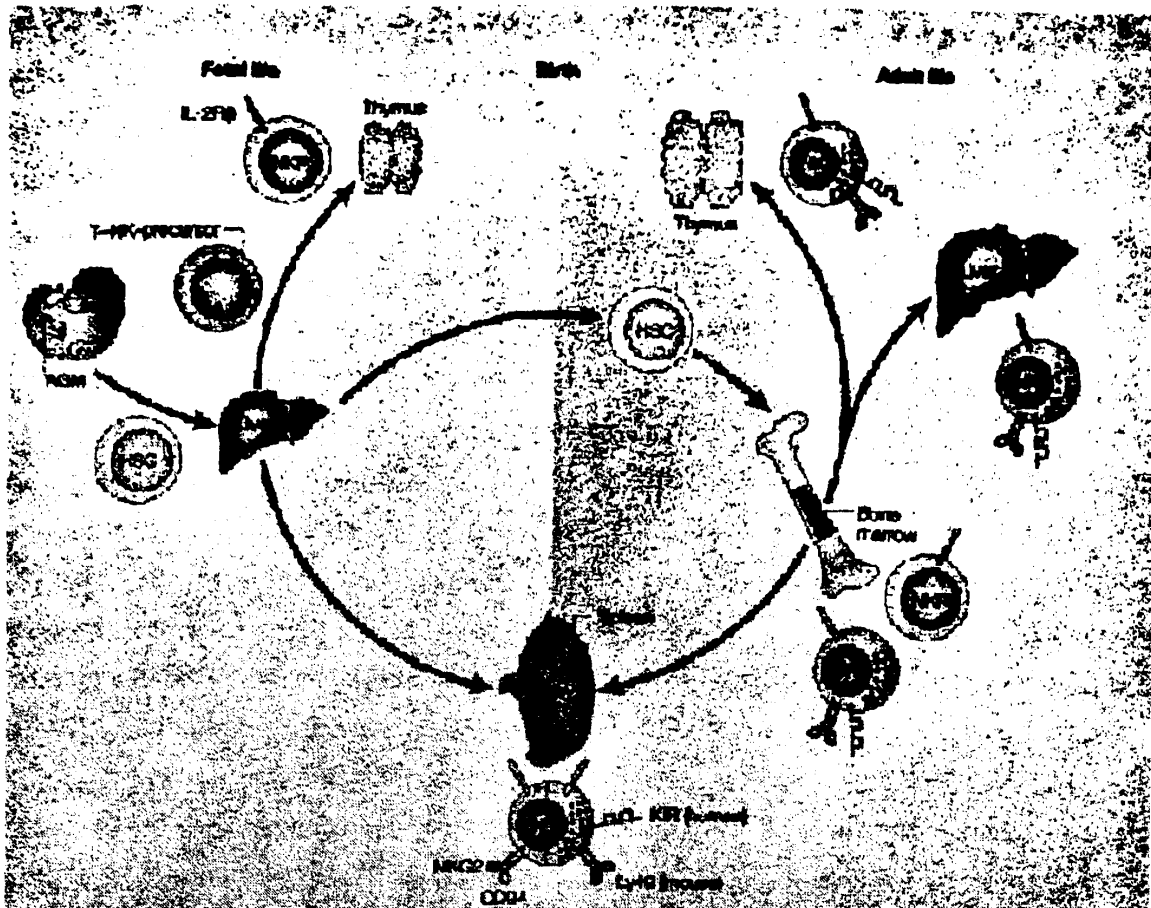
## 2. ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ NKCs

### 2.1. Γενικά η διαδικασία για την ωρίμανση των NKCs

Υπάρχουν πολλά ερωτήματα για την διαδικασία ανάπτυξης και ρύθμισης της λειτουργίας των NK κυττάρων. Παρόλα αυτά, η γνώση για τα μεταγραφικά προγράμματα της ωρίμανσής τους και τον ρόλο τους όσον αφορά τις δραστικές τους ικανότητες έχει βελτιωθεί πολύ τα τελευταία χρόνια.

Τα λεμφοκύτταρα γενικά αναπτύσσονται σε ανατομικά ξεχωριστές περιοχές στο έμβρυο και στον ενήλικα. Όμως, η ακριβής περιοχή για την ανάπτυξη των NK κυττάρων δεν έχει οριστεί με ακρίβεια και δεν είναι εύκολα κατανοητή. Η προέλευσή τους πάντως αναφέρεται στα αιμοποιητικά αρχέγονα κύτταρα (hematopoietic stem cells HSCs), τα οποία λειτουργικά είναι ένας κυτταρικός τύπος που έχει την ιδιότητα να ανανεώνει και να αναπαράγει όλους τους κυτταρικούς τύπους στο αίμα. Τα HSCs έχουν ανιχνευτεί σε πολλές περιοχές κατά τη διάρκεια της εμβρυικής ή εφηβικής ηλικίας, όπως: λεκιθικός σάκκος, αορτο-γοναδο-μεσονεφρική περιοχή (AGM), ήπαρ στο έμβρυο, και μυελός, θύμος αδένας, σπλήνας, επίπλουν και ήπαρ στους ενήλικες (Godin and Curnano 2002) (Εικόνα 2.1). Πολλοί από αυτούς τους ιστούς περιέχουν ώριμα NK κύτταρα. Πάντως, με τη σύμφωνη γνώμη της επιστημονικής κοινότητας, η κυριότερη πηγή παραγωγής των NK κυττάρων είναι ο μυελός των οστών. Το περιβάλλον του μυελού παρέχει μια πλούσια πηγή κυτταροκινών και αυξητικών παράγοντων που μπορούν να υποστηρίξουν την ανάπτυξη των NKCs *in vitro* και περιέχει κύτταρα στρώματος που είναι απαραίτητα για την πλήρη ωρίμανση των κυτταροκτόνων κυττάρων. Πράγματι, σε μελέτες αποδείχτηκε ότι ραδιοϊσοτοπική χορήγηση σε ποντίκια επηρέασε την ανάπτυξη των NKCs πολύ περισσότερο από άλλα αιμοποιητικά όργανα όπως ο σπλήνας. Επίσης, τα πρόδρομα κύτταρα των NKCs (NK-cell precursors NKPs) βρίσκονται στον μυελό των οστών (Kumar et al. 1979). Όργανα όπως ο θύμος αδένας και ο σπλήνας δεν αναφέρονται ως ουσιαστικοί παράγοντες για την ωρίμανση των NKCs. Για παράδειγμα, η σπληνεκτομή σε ανθρώπους και ποντίκια, όπως και η απουσία του θύμου αδένου δεν έδειξαν να επηρεάζουν την ανάπτυξη των NK κυττάρων (Schwarz and Hiserodt 1990, Passlick et al. 1991). Επίσης, NKCs υπάρχουν στο ήπαρ, το οποίο είναι μια ενεργή περιοχή για την παραγωγή των NKPs στην εμβρυική ηλικία (Philips et al. 1992, Jaleco et al. 1997), αλλά παραμένει άγνωστο ακόμα και σήμερα αν η περιοχή αυτή είναι υπεύθυνη για την ανάπτυξη των NK κυττάρων. Παρόλα αυτά, είναι πιθανόν ο θύμος αδένας, το ήπαρ και ο σπλήνας να έχουν κάποιο ρόλο στην διαφοροποίηση των NKCs, που έχει ως αποτέλεσμα την ετερογένεια των εν λόγω κυττάρων. Περαιτέρω φαινοτυπική και λειτουργική ανάλυση των NKCs, τα οποία παράγονται κατά την απουσία του θύμου αδένου ή του σπλήνα, μπορεί να οδηγήσουν σε απαντήσεις για το επίμαχο ζήτημα διαφοροποίησης.



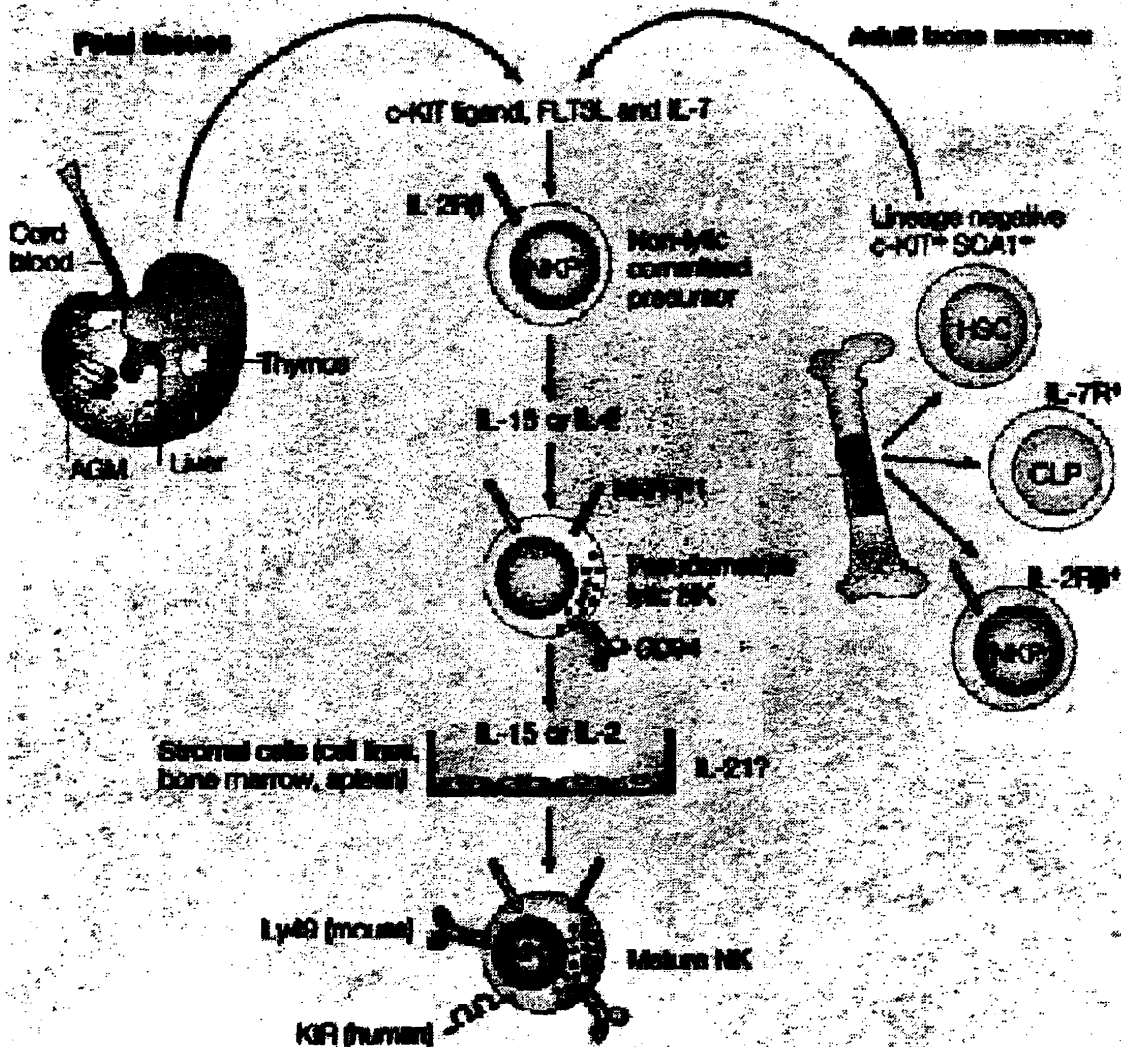


Εικόνα 2.1: Η ανάπτυξη των NK κυττάρων. Στο έμβryo, τα HSCs παράγονται στην περιοχή AGM, από την οποία προέρχονται όλα τα κύτταρα του αίματος. Πρόδρομα κύτταρα (T-NK precursors) για την παραγωγή των NKCs έχουν ανιχνευτεί στον εμβρυικό θύμο αδένα, αίμα, σπλήνα και ήπαρ. Από την γέννηση μέχρι την ενηλικίωση τα NKCs φαίνεται να παράγονται από τον μυελό με τη μορφή των NKPs. Επίσης τα NKCs δεν εκφράζουν τους κατασταλτικούς υποδοχείς KIR σε ανθρώπους και Ly49 σε ποντίκια, αλλά εκφράζουν υποδοχείς όπως CD94-NKG2. Η IL-2Rβ αλυσίδα είναι ο απαραίτητος λειτουργικός υποδοχέας για την ωρίμανση των NK κυττάρων.

## 2.2. Η ωρίμανση των NK κυττάρων in vitro

Η γνώση για τα ενδιάμεσα στάδια της ανάπτυξης των NKCs παραμένει σε εμβρυϊκό επίπεδο. Παρόλα αυτά, σημαντική πρόοδος παρατηρήθηκε στην ταυτοποίηση των πρόδρομων των αιμοποιητικών κυττάρων και στον κατάλληλο ορισμό των συνθηκών καλλιέργειας NK κυττάρων ανθρώπου και ποντικού, τα οποία μπορούν να παράγονται από τον εμβρυϊκό θύμο αδένα, εμβρυϊκό ήπαρ, αίμα ομφάλιου λώρου και HSCs του μυελού των οστών (Mingeri et al. 1991, Ikawa et al. 1990, Shlbuye et al. 1995, Williams et al. 1997) (Εικόνα 2.2). Σε παλαιότερες μελέτες, η ανάπτυξη των NK κυττάρων από απομονωμένα HSCs είχε αποδειχτεί ως

εξαρτώμενη από κύτταρα στρώματος, αλλά μετέπειτα μελέτες έδειξαν ότι οι κυτταροκίνες μπορούν να επιτρέψουν την παραγωγή των NK κυττάρων από HSCs ανεξάρτητα από τα κύτταρα στρώματος (Miller et al. 1994).



Εικόνα 2.2: Ανάπτυξη των NKCs in vitro. Περιγραφή καλλιέργειας σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο, πρόωρες ενεργοποιημένες κυτταροκίνες αυξάνουν τον αριθμό των πρόδρομων αιμοποιητικών κυττάρων και επιτρέπουν την εμφάνιση των NKPs που εκφράζουν την β αλυσίδα του υποδοχέα την ιντερλευκίνης 2 (IL-2Rβ). Στο δεύτερο στάδιο, η ιντερλευκίνη 15 εκφράζεται με αποτέλεσμα την διαφοροποίηση NKP πληθυσμών και την απόκτηση της λυτικής τους δυναμικής. Η τελική ωρίμανση των NK κυττάρων επιδεικνύεται από την έκφραση των υποδοχέων KIR στους ανθρώπους και των υποδοχέων Ly49 σε ποντίκια και απαιτεί επαφή με τα κύτταρα του στρώματος. (CLP: common lymphoid progenitor, FLT3L: FMS-like tyrosine kinase ligand, NKR-P1: NK cell receptor protein 1).

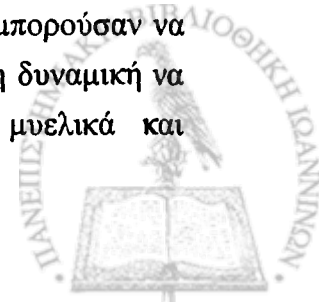


Το αρχικό μοντέλο των δύο σταδίων για την ανάπτυξη των NK κυττάρων παρήγαγε ένα χρήσιμο σημείο αναφοράς για την κατανόηση της διαδικασίας παραγωγής τους. Σήμερα, ισχύει ένα μοντέλο ανάπτυξης των NK κυττάρων το οποίο περιλαμβάνει τρία στάδια: 1) Δέσμευση των HSCs στη λεμφοειδική σειρά και μετά στην NK σειρά, 2) Ωρίμανση των NKPs προς κύτταρα με φαινοτυπικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των περιφερικών NK κυττάρων και 3) Έξοδος των NK κυττάρων στα περιφερικά όργανα.

### Στάδιο 1: Δέσμευση για την δημιουργία δραστικών κυττάρων

Η μεταβολή των HSCs σε NKPs πραγματοποιείται σε διαφορετικές αιμοποιητικές σειρές που μπορεί να προέρχονται από διάφορα όργανα. Το πρώτο βήμα της δέσμευσης των HSCs παρέχει κοινά πρόδρομα μυελοειδή κύτταρα (CMPs) και κοινά πρόδρομα λεμφοειδή κύτταρα (CLPs). Τα CLPs και τα ενδιάμεσα πρόδρομα κύτταρα, όπως οι πρώιμοι λεμφοειδείς πρόγονοι (ELPs), διαφοροποιούνται στα υπό περιορισμό πρόδρομα κύτταρα των B και T κυττάρων. Παλαιότερες μελέτες έδειξαν ότι η παραγωγή των NK κυττάρων από  $CD34^+$  HSCs απαιτούσε επαφή με κύτταρα στρώματος, όπου περισσότερο διαφοροποιημένα  $CD7^+CD34^+$  κύτταρα μπορούν να παράγουν NKCs όταν καλλιεργούνται μόνο με ιντερλευκίνη-2 (IL-2) (Miller et al. 1994). Κατά παρόμοιο τρόπο,  $CD34^+CD38^+$  κύτταρα εμβρυϊκού ήπατος (και όχι τα περισσότερο πρωτόγονα  $CD34^+CD38^-$  HSCs) μπορούν να παράγουν NK κύτταρα *in vitro* χρησιμοποιώντας ιντερλευκίνη 15 (IL-15) (Jaleco et al. 1997). Αυτές οι μελέτες υποδεικνύουν ότι όταν παραχθούν τα NKPs, μπορούν να οδηγηθούν κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να δημιουργηθούν τα NK κύτταρα μόνο υπό την επιρροή της IL-2 ή IL-15. Αργότερα αποδείχθηκε ότι τα απαραίτητα κύτταρα στρώματος μπορούν να αντικατασταθούν από πρώιμα ενεργοποιημένες κυτταροκίνες, όπως ο παράγοντας των αρχέγονων κυττάρων (SCF), γνωστός ως c-kit ligand, το υπόστρωμα ήπατος εμβρυϊκής κινάσης 2 (FLK2), γνωστή ως FMS-like tyrosine kinase 3 ligand (FLT3L), και η ιντερλευκίνη 7 (IL-7). Με την καλλιέργεια των HSCs με τις παραπάνω κυτταροκίνες, δύο ερευνητικές ομάδες ανακάλυψαν έναν υποπληθυσμό έκφρασης της β αλυσίδας του υποδοχέα της ιντερλευκίνης 2 (IL-2Rβ) που ήταν πιθανώς τα NKPs (Mrozek et al. 1996).

Στην συνέχεια, τα NKPs ταυτοποιήθηκαν σε εμβρυϊκό θύμο αδένα ποντικού και σε μυελό ενήλικα ανθρώπου. Τα κύτταρα αυτά ήταν αρνητικά σε CD3, CD19, εξέφραζαν την IL-2Rβ και είχαν έλλειψη έκφρασης δεικτών επιφάνειας των ώριμων NKCs (όπως οι υποδοχείς NK1.1, DX5 Ly49). Επίσης, τα NKPs θα μπορούσαν να διαφοροποιηθούν σε NKCs με υψηλή συχνότητα, αλλά τους έλλειπε η δυναμική να γίνουν άλλοι αιμοποιητικοί πληθυσμοί περιλαμβάνοντας B, T, μυελικά και





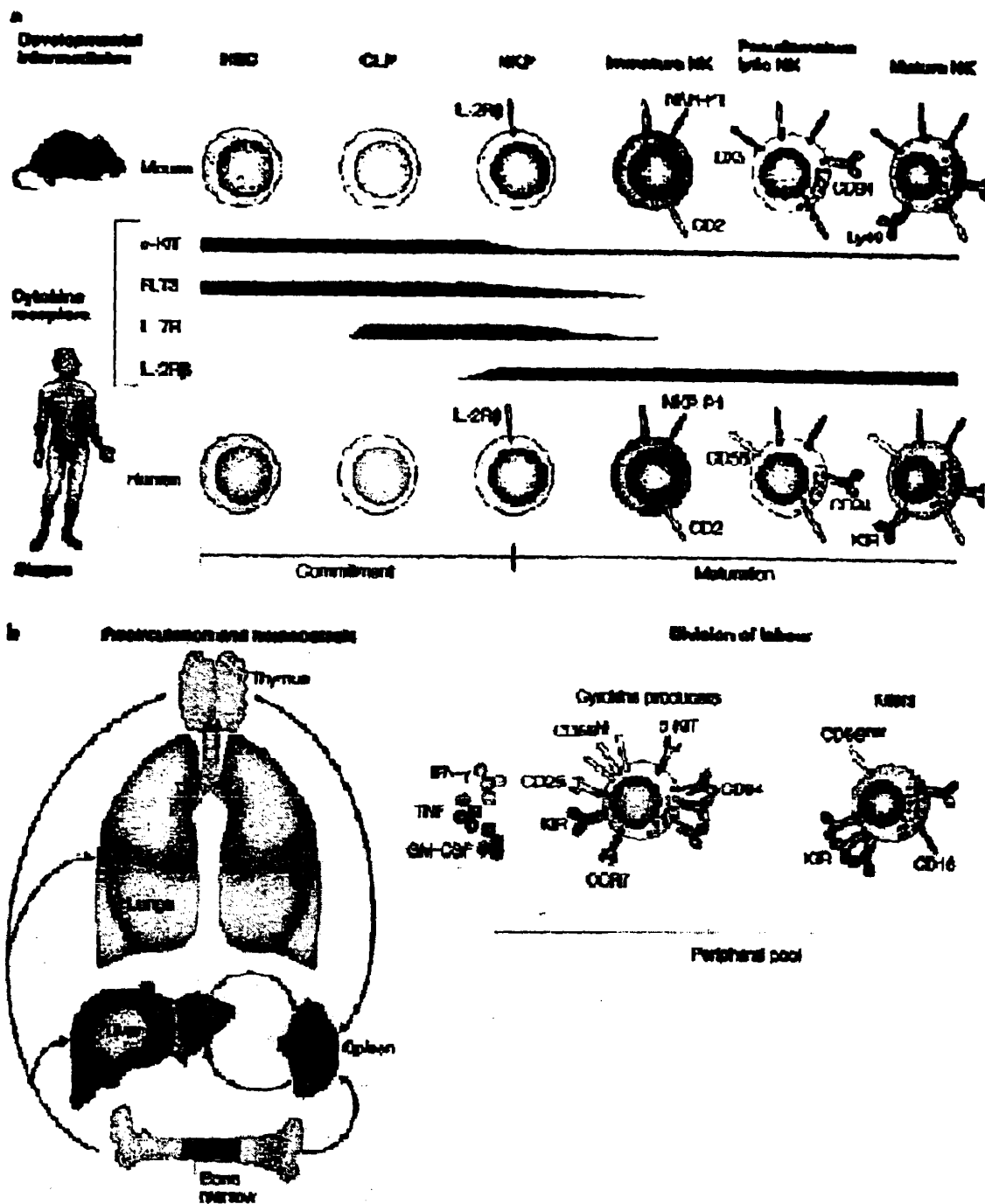
ουσιαστικά δέσμευση για NK κύτταρα (Ikawa et al. 1990). Λόγω του ότι τα HSCs, ELPs, CLPs και NKPs εκφράζουν τους υποδοχείς εξαρτημένων κυτταροκινών της κοινής  $\gamma$  αλυσίδας, οι ιντερλευκίνες 2, 4, 7, 9, 15 ή 21 μπορούν να συμπεριληφθούν στην παραγωγή των NKPs. Έτσι, η δέσμευση για την παραγωγή των NK κυττάρων μπορεί να οδηγηθεί και από άλλους παράγοντες εκτός από πρώιμες ενεργοποιημένες κυτταροκίνες, παρόλο που αυτοί οι διαλυτοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την επόμενη NK γενεά.

Επιπλέον, θα πρέπει να σημειωθεί ότι μεταγραφικοί παράγοντες ρυθμίζουν πολλές αναπτυξιακές διαδικασίες και είναι καθοριστικοί ρυθμιστές στην διαφοροποίηση στο αιμοποιητικό σύστημα (Warren et al. 2003). Ένα υποσύνολο μεταγραφικών παραγόντων έχει ανιχνευτεί, το οποίο επηρεάζει είτε την ανάπτυξη όλων των λεμφοκυττάρων ή επιλεκτικά εμποδίζει την ανάπτυξη μεμονωμένων κυτταρικών σειρών. Μια μετάλλαξη στο γονίδιο *Ikaros* εμποδίζει την ανάπτυξη των B, NK, δενδριτικών και εμβρυικών T κυττάρων, επιτρέποντας μόνο ένα περιορισμένο κύμα T κυτταρικής ανάπτυξης (Wang et al. 1998.). Αυτό το γονίδιο εναλλακτικά μπορεί να συνδεθεί (spliced) ώστε να παράγει πολλαπλούς ισότυπους, οι οποίοι μπορούν να έχουν μοναδικούς ρόλους στην αιμοποίηση. Υπερέκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου σε  $CD34^+$  HSCs μπορεί να επηρεάσει την διαδικασία της αιμοποίησης, πιθανώς δρώντας ως κυρίαρχος ρυθμιστής (Tucker et al. 2002). Το γονίδιο *Ikaros* θα μπορούσε να ελέγξει την ομοιότητα των ELP/CLP και επομένως όλες τις λεμφικές κυτταρικές σειρές μέσω της συντήρησης των υποδοχέων των κυτταροκινών και του αυξητικού παράγοντα. Συμπερασματικά, θα λέγαμε ότι η ταυτοποίηση των NKPs παρείχε ένα σημαντικό κομμάτι στον γρίφο της ανάπτυξης των NK κυττάρων. Περαιτέρω έρευνα των NKPs αναμφισβήτητα θα συνεισέφερε στην κατανόηση των μηχανισμών που ελέγχουν την γένεση και την συντήρησή τους.

#### Στάδιο 2: Φτιάχνοντας ένα ώριμο NK κύτταρο

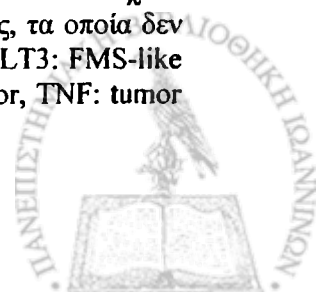
Ο μοριακός και κυτταρικός χάρτης για την ωρίμανση των NKPs σε NKCs είναι αρκετά ελλιπής. Όσον αφορά τη διαδικασία της ωρίμανσης, είναι γνωστό ότι τα NKCs σχηματίζουν έναν χαρακτηριστικό φαινότυπο κυτταρικής επιφάνειας και τη δυναμική να αφυπνίσουν δραστικές λειτουργίες. Οι περισσότερες προσπάθειες για να χαρακτηριστούν τα ενδιάμεσα στάδια της κυτταρικής ανάπτυξης των NKCs σχετίζονται με δείκτες των ώριμων NK κυττάρων, περιλαμβάνοντας NK 1.1, DX5 και Ly49 σε ποντίκια και CD161, CD56, CD16 και υποδοχείς δραστικών κυττάρων πανομοιότυπους με ανοσοσφαιρίνη (KIR) σε ανθρώπους. Προσεκτικές φαινοτυπικές και λειτουργικές αναλύσεις σπάνιων άωρων NK κυττάρων ή απομονωμένων από εμβρυικό ήπαρ, μυελό και ομφάλιο λώρο ή από αυτά που αναπτύσσονται από τα HSCs in vitro (Sivori et al. 2002, Zamal et al. 1998), υποστηρίζουν ένα γραμμικό μοντέλο ωρίμανσης των NK κυττάρων (Εικόνα 2.3).





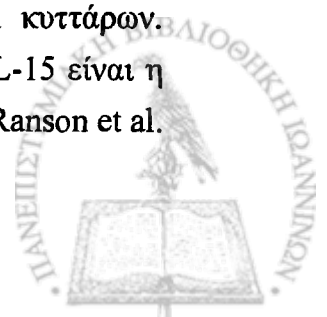
Εικόνα 2.3: Λειτουργικό μοντέλο ανάπτυξης των NK κυττάρων.

α) Στάδιο 1 (Δέσμευση): Έκφραση του υποδοχέα IL-2R $\beta$ , Στάδιο 2 (Ωρίμανση): Έκφραση του NKR-P1 (NK1.1 σε ποντίκια και CD161 σε ανθρώπους), CD2 ανιχνεύουν άωρα NK κύτταρα που δεν είναι κυτταρολυτικά, DX5 σε ποντίκια και CD56 σε ανθρώπους κατέχονται μαζί με την κυτταρολυτική τους δυναμική. Άλλοι δείκτες όπως CD38, CD7, 2B4 δεν απεικονίζονται. Το σχεδιάγραμμα των κυτταροκινών ρυθμίζεται αναπτυξιακά στους ανθρώπους, αλλά είναι ελλιπές για τα ποντίκια. β) Ωριμα NK κύτταρα εξάγονται στην περιφέρεια, τα οποία μπορούν να επανακυκλοφορούν στα διάφορα όργανα και ιστούς, αλλά οι μηχανισμοί δεν είναι ακόμα γνωστοί. Στους ανθρώπους δύο υποσύνολα των NKCs έχουν περιγραφεί και είναι εξειδικευμένα για παραγωγή κυτταροκινών ή θανάτωσης, τα οποία δεν έχουν ξεκάθαρα αποδειχθεί σε ποντίκια. (CCR7: CC-chemokine receptor 7, FLT3: FMS-like tyrosine kinase 3, GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, TNF: tumor necrosis factor).



Οι δείκτες που εκφράζονται πρώτα από άωρα NK κύτταρα ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεϊνών των υποδοχέων των NKCs λεκτίνης τύπου C (NKR-P1), η οποία ανιχνεύεται σαν NK1.1 στα ποντίκια και CD161 στους ανθρώπους (Zamal et al. 1998). Τα άωρα NKCs των ποντικών είναι αρνητικά στο DX5 και τα ομόλογά τους των ανθρώπων είναι αρνητικά στο CD56. Επιπλέον, άωρα NK κύτταρα και από τα δύο είδη αποτυγχάνουν να εκφράσουν τους Ly49 υποδοχείς ειδικούς για MHC και την οικογένεια KIR σε ανθρώπους και ποντίκια αντίστοιχα. Αυτά τα άωρα NK κύτταρα αποτυγχάνουν να θανατώσουν στόχους ευαίσθητους σε περφορίνη και δεν παράγουν IFN- $\gamma$ . Τα ανθρώπινα ή τα NK κύτταρα ποντικών τα οποία παράγονται *in vitro* από κύτταρα στρώματος και IL-15 είναι κυτταρολυτικά και μπορούν να παράγουν κυτταροκίνες (Miller et al. 2001). Αντίθετα, παρατεταμένη καλλιέργεια ανθρώπινων CD34+ HSCs ή NKPs ποντικών με IL-15 κατά την απουσία κυττάρων στρώματος δημιουργεί «ψευδώς ώριμα» λυτικά NK κύτταρα. Αυτά εκφράζουν διάφορους δείκτες ώριμων NK κυττάρων (NK1.1 και DX5 στα ποντίκια, CD56 σε ανθρώπους και το σύμπλεγμα CD94-NKG2 και στα δύο είδη), αλλά όχι στους υποδοχείς Ly49 ή KIR. Ο λόγος της ύπαρξης των «ψευδώς ώριμων» NKCs *in vivo* παραμένει άγνωστος. Οι παρατηρήσεις αυτές δηλώνουν ότι οι μηχανισμοί που συμμετέχουν στην επιλογή των υποδοχέων Ly49 και KIR δεν είναι απαραίτητο να παράγουν λειτουργικά NK κύτταρα. Έτσι, και στα ποντίκια και στους ανθρώπους, η ταυτοποίηση των άωρων NK κυττάρων προσφέρει ένα ουσιώδες σημείο εκκίνησης για διάφορες εξαιρετικές διευκρινήσεις που αφορούν ενδιάμεσα στάδια διαφοροποίησης, συμπεριλαμβάνοντας την φύση των σημάτων που προάγουν και ρυθμίζουν την ανάπτυξη των λειτουργικών των υποδοχέων Ly49/KIR και δραστικών NK κυττάρων (Williams et al. 1997, Miller et al. 1994, Mrozek et al. 1996, Sivori et al. 2002).

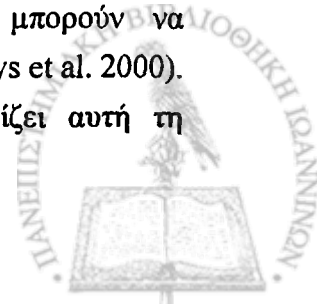
Σημαντικός παράγοντας για την κατάλληλη ωρίμανση των NK κυττάρων είναι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αναπτυσσόμενων NK κυττάρων και γειτονικών κυττάρων στρώματος. Ένα μοντέλο σημειώνει ότι μια μορφή λεμφοτοξίνης, LT $\alpha_1\beta_2$ , προσκολλημένη σε μεμβράνη, η οποία πιθανώς εκφράζεται από NKPs, δίνει σήμα στον υποδοχέα LT $\beta$ R, ο οποίος εκφράζεται από κύτταρα στρώματος για να ενισχύουν την παραγωγή της IL-15 (Raulet et al. 2001). Πάντως, διάφορες παρατηρήσεις υποδηλώνουν ότι η IL-15 (και όχι η IL-2) είναι κρίσιμη για την παραγωγή των NK κυττάρων κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Καταρχάς, η IL-2 είναι προϊόν των T κυττάρων και ακόμα και ανεπαρκή T κύτταρα σε ανθρώπους και ποντίκια μπορούν να έχουν φυσιολογική διαφοροποίηση των NKCs. Έπειτα, η ανεπάρκεια της IL-2 σε ποντίκια και ανθρώπους δεν σχετίζεται με την ανεπάρκεια των NK κυττάρων. Συμπερασματικά, αυτές οι παρατηρήσεις υποστηρίζουν την ιδέα ότι η IL-15 είναι η βασική κυτταροκίνη για την ανάπτυξη των NKCs (Lauwerys et al. 2000, Ranson et al. 2002).



Τα αναπτυσσόμενα NK κύτταρα αποκτούν ένα σύμπλεγμα ενεργοποιημένων και κατασταλτικών υποδοχέων. Οι υποδοχείς NKG2D εκφράζονται πρώιμα στην εμβρυική ζωή πριν ακόμα παραχθούν τα NK κύτταρα. Πάντως, όταν οι υποδοχείς NKG2D που εκφράζουν τα NKCs παράγονται πρώιμα στη ζωή, τα υποστρώματά τους δεν εκφράζονται πλέον, εκτός εάν εμφανιστεί κάποια παθολογική κατάσταση. Μερικά μέλη υποδοχέων όπως η οικογένεια των CD94-NKG2 μπορούν να μεσολαβούν σε καταστολή μετά από επαφή με μόρια MHC τύπου I, όπως HLA-E στους ανθρώπους και Oa1<sup>b</sup> στα ποντίκια. Όπως οι υποδοχείς CD94-NKG2 εκφράζονται πριν από τους Ly49 στην ανάπτυξη των NKCs, μπορούν να προμηθεύουν έναν μηχανισμό για πρώιμη αυτοαντοχή στην οντογένεια (Braud et al. 1998, Vance et al. 1998, Cooper et al. 2001). Έτσι, η συχνότητα της έκφρασης του υποδοχέα φαίνεται να ρυθμίζεται κατά κάποιο τρόπο με πετυχημένη έκφραση του υποδοχέα και στους ανθρώπους και στα ποντίκια (Miller and McCullar 2001). Αλλά οι ερωτήσεις που γεννιούνται είναι πότε τα αναπτυσσόμενα NKCs γίνονται ανταγωνίσιμα για να παράγουν κυτταροκίνες; Στα ανθρώπινα NK κύτταρα, όπως φαίνεται από την εικόνα 2.3, υπάρχει μια «κατανομή εργασίας». Υποσύνολα των NK κυττάρων με σχετικά πολύ φτωχή φυσική κυτταρολυτική δυναμική (CD16<sup>+</sup>CD56<sup>hi</sup> και CD16<sup>+</sup>CD56<sup>lo</sup>), είναι δυναμικοί παραγωγοί κυτταροκινών όπως IFN- $\gamma$ , TNF, LT $\beta$ , GM-CSF, IL-10, IL-13, ακολουθώντας διέγερση μονοκινών (Cooper et al. 2001). Δεν υπάρχει καθαρή εξήγηση για τη διαφοροποίηση λειτουργιών ανάμεσα σε παραγωγή κυτταροκινών και υποσύνολα των κυτταρολυτικών NK κυττάρων στα ποντίκια. Ακόμη, εάν ειδικά υποσύνολα των NKCs συμμετέχουν στην παραγωγή κυτταροκινών παραμένει άγνωστο (Peritt et al. 1998, Hoshino et al. 1999).

### Στάδιο 3: Αποστολή των NKCs στην πρώτη γραμμή

Ο μέσος όρος ζωής των ώριμων NK κυττάρων είναι άγνωστος. Όταν ώριμα σπληνικά NK κύτταρα επισυνάπτονται με φθορίζουσες χρωστικές ουσίες που μεταφέρονται σε φυσιολογικά ενήλικα ποντίκια, μπορούν να ανιχνευτούν στην κυκλοφορία για τουλάχιστον πέντε εβδομάδες (Lawerys et al. 2000)<sup>1</sup>. Επιπλέον, όταν αυτά τα NK κύτταρα μεταφέρονται σε ποντίκια τα οποία γενετικά δεν διαθέτουν IL-15, επισυναπτόμενα NK κύτταρα δεν είναι ανιχνεύσιμα στο αίμα, μυελό, σπλάι ή σπλήνα μέσα σε 5 ημέρες, υποδηλώνοντας ότι η IL-15 δεν είναι απαραίτητη μόνο για την ανάπτυξη των NKCs, αλλά και για την ομοίωση των εν λόγω κυττάρων *in vivo* (Lauwerys et al. 2000, Ranson et al. 2002). Επίσης, τα NK κύτταρα φαίνεται να ανταγωνίζονται για περιφερικές πηγές IL-15. Η μεταφορά των NKCs σε δότες όπου τα EK κύτταρα είναι ελλιπή, δείχνει ότι τα ώριμα NKCs μπορούν να διαφοροποιηθούν κρατώντας την ομοίωση στον οργανισμό (Lauwerys et al. 2000). Σε αντίθεση, η μεταφορά των επιπλέον NKCs ποντικών εμποδίζει αυτή τη



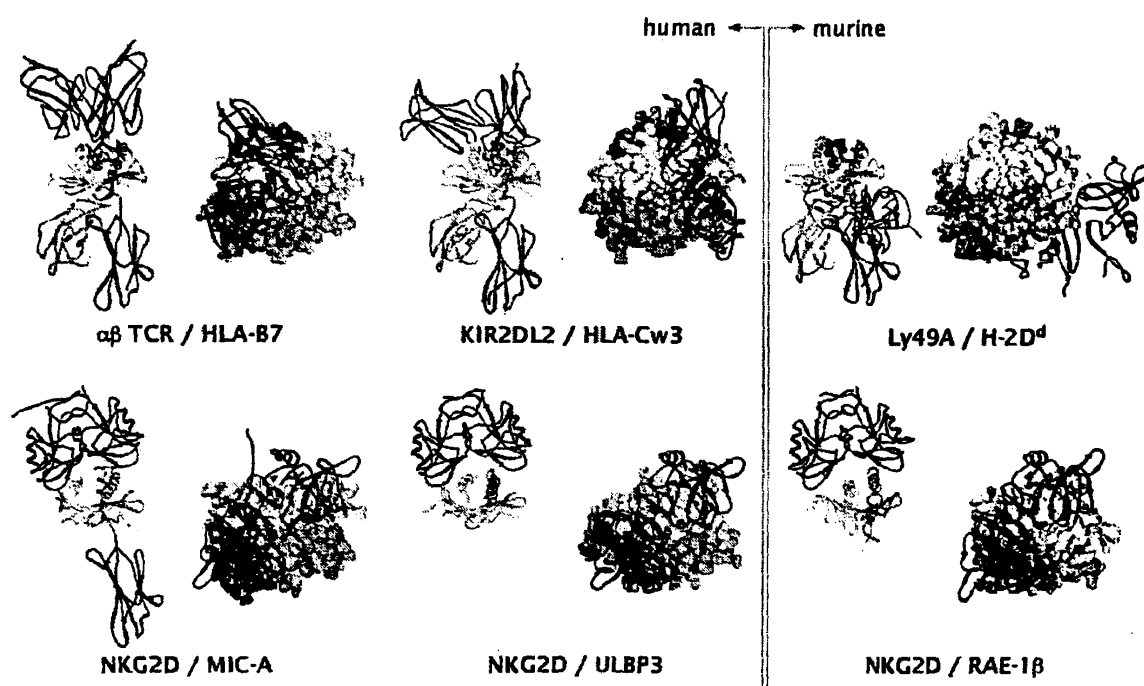
διαφοροποίηση, η οποία προκύπτει λόγω του ανταγωνισμού με την IL-15. Έτσι, η διαθεσιμότητα της IL-15 θα μπορούσε αυστηρά ελεγχόμενη να ρυθμίσει την έκφραση του IL-15Ra. Αυτό είναι επίσης συνεπές με το γεγονός ότι είναι δύσκολο να ανιχνευτεί διαλυτή IL-15 σε υπερκείμενες καλλιέργειες *in vivo* (Cerwenka and Lanier 2001).

Όσον αφορά την κυκλοφορία, ώριμα NK κύτταρα μπορούν να βρεθούν σε διαφορετικούς ιστούς όπως ο σπλήνας, το ήπαρ, οι πνεύμονες, το έντερο και ο πλακούντας (Εικόνα 2.3b). Η γνώση μέχρι σήμερα είναι ελάχιστη για τους μηχανισμούς οι οποίοι κατευθύνουν τα NK κύτταρα στους παραπάνω ιστούς κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, παρόλο που διαφορετικοί υποδοχείς χυμοκινών και μορίων προσκόλλησης των NKCs δηλώνουν έναν πιθανό μηχανισμό. Στους ανθρώπους, ο υποπληθυσμός των NKCs CD56<sup>low</sup> δηλώνει χημειοταξία με ανταπόκριση στην χυμοκίνη CXCL8 (γνωστή ως IL-8) και διαλυτά fractalkine, παρόμοια με τα ουδετερόφιλα, όπου ο υποπληθυσμός των NKCs CD56<sup>hi</sup> εμφανίζει υψηλή έκφραση του υποδοχέα 7 της χυμοκίνης CC (CCR7) και L-σελεκτίνης, οι οποίες συνδέονται με την κατεύθυνση των λεμφοκυττάρων (Frey et al. 1998). Κατ' αναλογία με τα παραπάνω, οι Fehrig et al έδειξαν ότι τα CD56<sup>hi</sup> NK κύτταρα βρίσκονται κατά δέκα φορές περισσότερο στις παραλεμφοξιδιακές περιοχές των T κυττάρων των φυσιολογικών λεμφοκυττάρων από ό,τι στο αίμα. Παρομοίως, ο υποπληθυσμός CD56<sup>hi</sup> των NK κυττάρων είναι ο κύριος υποπληθυσμός παρών στον πλακούντα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Παρόλη την σύγχρονη επιστημονική γνώση, αποδείξεις δεν υπάρχουν για ευδιάκριτους υποπληθυσμούς των NKCs στα ποντίκια, αν και φαίνεται εύλογο ότι υπάρχουν τέτοιες εξειδικευμένες λειτουργίες. Λιγοστή είναι επίσης η γνώση για τους μηχανισμούς που κατευθύνουν τα NK κύτταρα στα ποντίκια και παρατηρήσεις για ευδιάκριτους υποδοχείς χυμοκινών σε ανθρώπινους υποπληθυσμούς δίνουν ένα ενδιαφέρον δυνητικό μοντέλο, το οποίο θα μπορούσε περαιτέρω να αναλυθεί και στα ποντίκια.



### 3. ΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΩΝ ΝΚ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

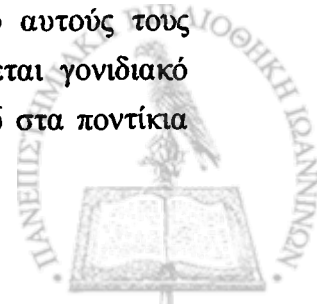
Η δράση των ΝΚ κυττάρων ελέγχεται με ένα ποικίλο σύνολο υποδοχέων κυττάρων επιφανείας. Η λειτουργία των υποδοχέων αυτών είναι εξαρτημένη από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η φύση των κυττάρων-στόχων και των κυτταροκινών. Κάθε κύτταρο μπορεί να εκφράσει πολλαπλούς ενεργοποιητικούς και κατασταλτικούς υποδοχείς και η κυτταροτοξικότητα εξαρτάται από την ισορροπία που προξενούν τα σήματα των εν λόγω υποδοχέων. Στις περισσότερες περιπτώσεις, νόμιζαν ότι το κατασταλτικό σήμα υπερέχει στο να αποφεύγονται αυτοάνοσα αποτελέσματα (Long 1999, Yokoyama 1998, Yokoyama 2003). Μερικοί από τους υποδοχείς που θα συζητηθούν σε αυτό το κεφάλαιο είναι ο Ly49 στα ποντίκια και ο KIRs στον άνθρωπο, καθώς και οι οικογένειες CD94, NKG2, 2B4 και στους δύο.



Εικόνα 3.1: Οι υποδοχείς των ΝΚ κυττάρων στον άνθρωπο (human) και στα ποντίκια (murine).

#### 3.1. Ειδικοί κατασταλτικοί υποδοχείς ΜHC τύπου I

Η ανακάλυψη των ειδικών κατασταλτικών υποδοχέων ΜHC τύπου I έδωσε περαιτέρω γνώση στην επιστημονική υπόθεση σχετικά με τον μηχανισμό κατά τον οποίο τα ΝΚ κύτταρα αναγνωρίζουν τον στόχο τους. Πολλοί από αυτούς τους υποδοχείς κωδικοποιούνται από έναν αριθμό γονιδίων που ονομάζεται γονιδιακό σύμπλεγμα των ΝΚ κυττάρων, το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6 στα ποντίκια



και στο χρωμόσωμα 12 στους ανθρώπους. Αυτά τα γονίδια κατά προτίμηση εκφράζονται στα NK κύτταρα (Lanier 1997, Vales-Gomez et al. 2000).

*α) Κατασταλτικοί υποδοχείς Ly49 και KIRs*

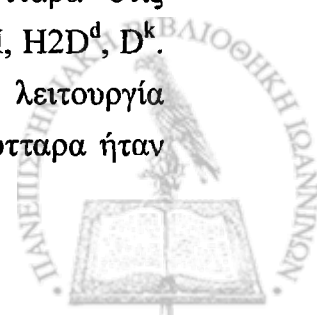
Με την τεχνική της γονιδιακής αλληλουχίας στην σειρά Β6 των ποντικών, η οικογένεια Ly49 ήταν μια από τις πρώτες ταυτοποιήσεις και βρέθηκε να περιέχει τουλάχιστον 16 γονίδια και ψευδογονίδια (Ly49a έως Ly49q) (Yokoyama and Plougastel 2003). Η οικογένεια των υποδοχέων Ly49 είναι υψηλά σχετιζόμενη με περισσότερο από 80% της πανομοιότητας των αμινοξέων.

Αυτοί οι υποδοχείς είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες λεκτίνης τύπου C (Εικόνα 3.2), που βρίσκονται συνδεδεμένοι ως διμερείς δισουλφιδικοί δεσμοί. Η ποικιλομορφία ανάμεσα στην γονιδιακή οικογένεια δημιουργείται με εναλλακτικό κόψιμο - ράψιμο (splicing) και αλληλικό πολυμορφισμό (Lanier 1998). Επίσης, ανάλυση και άλλων κυτταρικών σειρών από ποντίκια έχει αποκαλύψει παραλλαγές στην συγκεκριμένη οικογένεια των υποδοχέων (Markigiannis et al. 2001a, Markigiannis et al. 2001b).



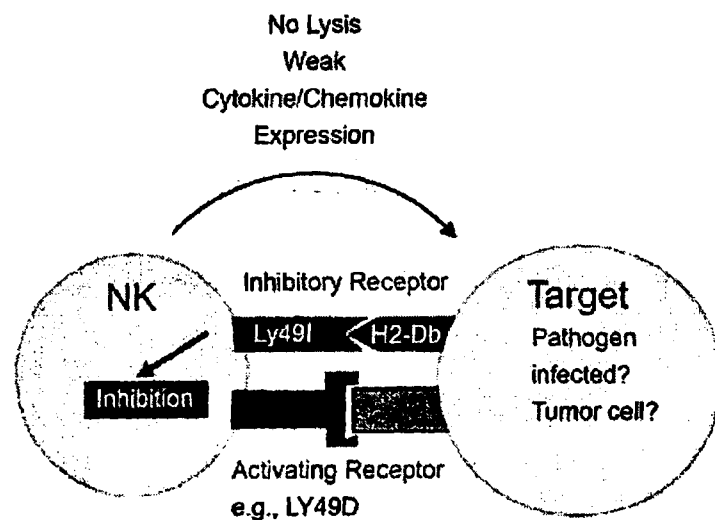
Εικόνα 3.2: Αλληλεπιδράσεις μεταξύ υποδοχέων λεκτίνης τύπου C και μορίων πανομοιότυπων με MHC τύπου I.

Οι υποδοχείς Ly49 εκφράζονται αυθαίρετα (Raulet et al. 1997). Επιπλέον, τα NK κύτταρα μπορούν να εκφράζουν πολλαπλούς κατασταλτικούς υποδοχείς, αλλά τουλάχιστον ένας είναι παρών για κάθε αλλήλιο MHC τύπου I. Οι υποδοχείς Ly49 εκφράζονται σε μερικά επικαλυμμένους υποπληθυσμούς των NKCs, κατά τους οποίους περισσότερο από ένας υποδοχέας βλέπει το ίδιο υπόστρωμα MHC. Ο Ly49A ήταν από τους πρώτους κατασταλτικούς υποδοχείς που περιγράφηκε για τα NK κύτταρα. Ο υποδοχέας αυτός εκφράζεται σε 10-20% στα NK κύτταρα στις περισσότερες κυτταρικές σειρές και προσδένεται στα μόρια MHC τύπου I, H2D<sup>d</sup>, D<sup>k</sup>. Η ειδικότητα του υποστρώματος του Ly49 και η κατασταλτική λειτουργία αποδείχθηκε σε λειτουργικά πρωτόκολλα και έδειξε ότι Ly49A+ NK κύτταρα ήταν



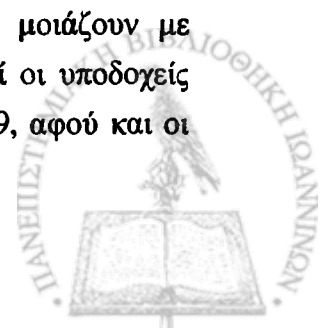
αδύνατο να λύσουν τους κυτταρικούς στόχους H2D<sup>d</sup> ή D<sup>k+v</sup> (Sentman et al. 1991). Ένας άλλος κατασταλτικός Ly49 υποδοχέας, ο Ly49G2, βρέθηκε σε 50% από τα NK κύτταρα και προσδένεται στα H2D<sup>d</sup>, H2L<sup>d</sup>. Σε άλλες μελέτες, η καταστολή της λύσης των H2-D<sup>d+</sup> στόχων εμποδίζεται με τη χρήση μονοκλωνικού αντισώματος ειδικού για το Ly49G2, το οποίο ονομάζεται 4D11 (Mason et al. 1995).

Το μονοκλωνικό 5E6 χρωματίζει ένα υποσύνολο των NK κυττάρων, που αργότερα αποδείχτηκε ότι είναι τα κύτταρα Ly49C<sup>+</sup> και Ly49I<sup>+</sup>. Αρχικές μελέτες περιέγραψαν την λειτουργία και την ειδικότητα του υποπληθυσμού 5E6<sup>+</sup> στην απόρριψη μεταμόσχευσης μυελού. Το μονοκλωνικό 5E6 αναπτύχθηκε εμβολιάζοντας 129/J ποντίκια (H2<sup>b</sup>) με ενδοσπληνικές εγχύσεις καθαρών B6 NK κυττάρων, για την ταυτοποίηση καινούργιων υποδοχέων των NKCs στην B6 κυτταρική σειρά ποντικών. Η τεχνολογία της κυτταρομετρίας ροής έδειξε ότι το μονοκλωνικό 5E6 έβαψε περίπου το 40-50% των B6 NK κυττάρων. Λειτουργικά πρωτόκολλα έδειξαν ότι ο υποπληθυσμός 5E6<sup>+</sup> των NKCs καταστάληκε από το H2<sup>b</sup> και αυτός ο υποπληθυσμός συμμετείχε στην απόρριψη του H2<sup>d</sup> μυελού *in vivo* (Sentman et al. 1989, Sentman et al. 1991). Μετέπειτα μελέτες έδειξαν ότι το μονοκλωνικό αντέδρασε σε διασταύρωση με δύο υποδοχείς Ly49, τον Ly49C και Ly49I (Brennan et al. 1996). Ο υποδοχέας Ly49C αποδείχθηκε ότι προσδένεται στα H2<sup>d</sup>, H2<sup>k</sup>, H2<sup>b</sup>, H2<sup>s</sup> (Yu et al. 1996). Επίσης, *in vitro* μελέτες έδειξαν ότι ο υποδοχέας Ly49I αντιδρά με τους υποπληθυσμούς H2<sup>d</sup>, H2<sup>k</sup>, H2<sup>a</sup>, H2<sup>f</sup> και H2<sup>v</sup> (Hanke et al. 1999).



Σχήμα 3.1: Διασύνδεση των ενεργητικών και κατασταλτικών υποδοχέων οδηγεί σε καταστολή της δράσης των NK κυττάρων.

Στους ανθρώπους, οι υποδοχείς των κυττάρων φονέων που μοιάζουν με ανοσοσφαιρίνες (KIRs) κωδικοποιούνται από τα NK κύτταρα. Αυτοί οι υποδοχείς μπορεί να θεωρούνται λειτουργικά παρόμοιοι με τους υποδοχείς Ly49, αφού και οι





δύο οικογένειες κατέχουν ενεργοποιητικούς και κατασταλτικούς υποδοχείς και αλληλεπιδρούν με τα μόρια του MHC τύπου I. Όμως, λειτουργικά τα Ly49 είναι διαφορετικά από την οικογένεια των KIRs που θεωρούνται μέρος της οικογένειας των ανοσοσφαιρινών και βρίσκονται σαν μονομερή. Ατομικοί υποδοχείς KIR ονομάζονται σύμφωνα με τον αριθμό των επιπλέον κυτταρικών πεδίων που περιέχουν. Για παράδειγμα, ο υποδοχέας KIR3D έχει τρία πεδία ανοσοσφαιρινών στην επιπλέον κυτταρική περιοχή και προσδέεται με τα HLA-A και HLA-B. Ο υποδοχέας KIR2D έχει δύο πεδία ανοσοσφαιρινών στην επιπλέον κυτταρική περιοχή και βλέπει το HLA-C. Όπως στους υποδοχείς Ly49, υπάρχει μεγάλη ποικιλομορφία και στην έκφραση του υποδοχέα KIR λόγω του εναλλακτικού κοψίματος - ραψίματος (splicing) και του αλληλικού πολυμορφισμού (Lanier 1998).

### *β) Κατασταλτικοί υποδοχείς στα T κύτταρα*

Τα τελευταία χρόνια, διάφορα διαγενετικά ποντίκια αναπτύχθηκαν που εκφράζουν κατασταλτικούς Ly49 σε όλα τα NK και T κύτταρα. Στην φύση, οι κατασταλτικοί υποδοχείς των NK κυττάρων έχουν βρεθεί να εκφράζονται σε έναν μικρό υποπληθυσμό T κυττάρων, περιλαμβάνοντας τα NKT κύτταρα, CD8<sup>+</sup> αβT κύτταρα, CD4<sup>+</sup> αβT κύτταρα και γδT κύτταρα (Vivier et al. 2004). Η έκφραση του υποδοχέα Ly49 στα T κύτταρα μπορεί να αυξάνεται μετά από ιική μόλυνση (Peacock et al. 2002). Γενικά, η λειτουργία των υποδοχέων Ly49 στα T κύτταρα δεν είναι καλά κατανοητή. Για αυτό το λόγο, ο ρόλος του συγκεκριμένου υποδοχέα στα διαγενετικά ποντίκια θα πρέπει να μελετηθεί περαιτέρω.

Σε μια σειρά μελετών από την επιστημονική ομάδα του W. Held, το Ly49A transgene ρυθμίστηκε από τον προαγωγέα (promoter) του MHC τύπου I, και σε αυτά τα ποντίκια παρατηρήθηκε ειδική καταστολή του MHC τύπου I των NKCs, προλαμβάνοντας απόρριψη των H2<sup>d</sup> μοσχευμάτων μυελού και μειώνοντας την διαφοροποίηση των T κυττάρων (Held et al. 1996). Για τις ανταποκρίσεις των Ly49A<sup>+</sup> των T κυττάρων αναπτύχθηκε ένα Ly49A από διαγενετικά ποντίκια εκφράζοντας τον υποδοχέα transgene χρησιμοποιώντας τον προαγωγέα CD2, ο οποίος ήταν εγγενής στον υποδοχέα αβ TCR των ποντικών (Fahlen et al. 1997, Oberg et al. 2000). Τα Ly49A<sup>+</sup> T κύτταρα έδειξαν μειωμένη ανταπόκριση εκφράζοντας H2Dd, εκτός εάν το Ly49A εμποδίζεται από μονοκλωνικό αντίσωμα ή παράγεται περίσσια αντιγονικού πεπτιδίου. Αυτό δηλώνει ότι η κατασταλτική λειτουργία του υποδοχέα Ly49 στα T κύτταρα είναι παρόμοια με αυτή των NKCs, αλλά το κατασταλτικό σήμα μπορεί να εξουδετερωθεί από ένα δυνατό ενεργοποιημένο σήμα διαμέσου του υποδοχέα TCR (Oberg et al. 2000). Αυτά τα αποτελέσματα φαίνονται και σε μία διαφορετική μελέτη από τον P. Duplay, η οποία υπολογίζει σε ποιους παράγοντες αποδίδεται η ενεργοποίηση των T κυττάρων κατά την παρουσία των κατασταλτικών Ly49 χρησιμοποιώντας Ly49A και Ly49C

επιμολυσμένα transfected κύτταρα. Με βάση τα *in vitro* πρωτόκολλα, η δύναμη της καταστολής από NK κατασταλτικούς υποδοχείς συσχετίζεται με την πυκνότητα επιφανείας του υποδοχέα και με συγγένεια με το εμπλεκόμενο υπόστρωμα (Chalifour et al. 2003). Αυτή η αξίωση υποστηρίχθηκε με plasmon resonance analysis, η οποία έδειξε ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ H2D<sup>d</sup> και Ly49A είναι ισχυρότερες από τους συνδυασμούς των κατασταλτικών υποδοχέων Ly49-υποστρωμάτων (Hanke and Raulet 2001), με τιμές K<sub>D</sub> παρόμοιες με τις αλληλεπιδράσεις του TCR-MHC (Natarajan et al. 2002).

Παράλληλα με το σύστημα των ποντικών, οι κατασταλτικοί KIRs μπορεί να είναι αρνητικοί ρυθμιστές συγκεκριμένων T κυττάρων, μιας και η παρουσία τους έχει φανεί πως μετριάζει την ενεργοποίηση των T κυττάρων, επηρεάζοντας την επαναδιοργάνωση του κυτταρικού σκελετού (Cambiaggi et al. 1997). Για την μελέτη της ενεργοποίησης των ανθρώπινων λεμφοκυττάρων *in vivo*, δημιουργήθηκαν επιγενετικά ποντίκια τα οποία υπερέκφρασαν τον υποδοχέα KIR, KIR2DL3 ή CD158b, ο οποίος αναγνωρίζει το HLA-Cw3. Η έκφραση του CD158b ήταν λειτουργική στα NKCs στα συγκεκριμένα ποντίκια από τότε που τα επιγενετικά ποντίκια δεν μπορούσαν να απορρίψουν μοσχεύματα μυελού εκφράζοντας το HLA-Cw3. Όσον αφορά την δράση των T κυττάρων, αυτά τα ευρήματα αντικατοπτρίζουν αποτελέσματα του Ly49A των επιγενετικών ποντικών (Oberg et al. 2000), όπου η έκφραση του κατασταλτικού υποδοχέα θα μπορούσε να τροποποιήσει αλλά όχι να προλάβει την ενεργοποίηση των T κυττάρων (Cambiaggi et al. 1997).

Στα ποντίκια και στους ανθρώπους, αυτοί οι κατασταλτικοί υποδοχείς π βρίσκονται κυρίως στα CD8<sup>+</sup> T κύτταρα και σπάνια βρίσκονται στα Cd4<sup>+</sup> T κύτταρα. Οι κατασταλτικοί υποδοχείς που εκφράζουν τα T κύτταρα συσσωρεύονται ανάλογα με την ηλικία και την φλεγμονή. Αρχικά, πιστευόταν ότι αυτά τα κύτταρα είχαν έναν φαινότυπο μνήμης διότι τα Ly49<sup>+</sup> T κύτταρα εξέφραζαν μερικούς δείκτες οι οποίοι σχετίζονται με κύτταρα μνήμης (Cambiaggi et al. 1997). Πρόσφατες μελέτες αποδεικνύουν ότι τα εν λόγω κύτταρα δεν λειτουργούν σαν κύτταρα μνήμης στην ανταπόκριση της φλεγμονής (Peacock et al. 2002). Παλιότερα οι επιστήμονες νόμιζαν ότι οι κατασταλτικοί υποδοχείς μπορούν να λειτουργούν στα T κύτταρα μνήμης για να βοηθήσουν στη συντήρηση κάποιας κατάστασης μέχρι να παραχθεί ένα σημαντικό ενεργοποιητικό σήμα. Σήμερα, τα αποτελέσματα μελετών μετατοπίζονται στην ιδέα ότι αυτά τα κύτταρα είναι παρόντα σε δυναμική μέχρι την ανάπτυξη των κυττάρων μνήμης.

#### γ) Επίδραση των υποδοχέων Ly49 στην ανοχή

Η ανοσολογική ανοχή είναι ζωτική στο να προλαμβάνει την αυτοαντίδραση. Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην ανάπτυξη και συντήρηση στην ανοχή των NK κυττάρων δεν έχουν ξεκαθαριστεί απολύτως. Όμως, πιστεύεται ότι οι κατασταλτικοί



υποδοχείς των NKCs παίζουν πρωταρχικό ρόλο στην ανοχή των κυττάρων αυτών. Παρόλο που οι υποδοχείς των NK είναι κωδικοποιημένοι στη μικροβιακή χλωρίδα, η έκφραση των Ly49 και KIR ποικίλει ανάμεσα σε διαφορετικές παραγόμενες σειρές και σε άτομα. Επίσης, μελέτες έδειξαν ότι η έκφραση του υποδοχέα των NKCs προσαρμόζεται στο περιβάλλον σύμφωνα με την έκφραση του MHC τύπου I (Dorfman and Roulet 1996, Held et al. 1996, Karlhofer et al. 2001). Η τροποποίηση του υποδοχέα Ly49 μπορεί να είναι μια διαδικασία απαραίτητη για τη διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ ενεργοποιημένων και κατασταλακτικών σημάτων. Το MHC τύπου I μπορεί να βοηθήσει τα NK κύτταρα να βαθμονομήσουν την έκφραση του υποδοχέα ως έναν τρόπο για να οριοθετήσει την παραγωγή των λιγότερο ενεργών NKCs με πλεόνασμα από κατασταλακτικούς υποδοχείς (Roulet et al. 2001).

Επιπλέον, οι υποδοχείς των NK κυττάρων επηρεάζουν τους μηχανισμούς ανοχής των T κυττάρων. Τα Ly49A επιγενετικά ποντίκια εμφανίζουν σοβαρότατη φλεγμονή κατά την οποία πεθαίνουν σε διάστημα μόλις μερικών εβδομάδων. Με την αποτίμηση των ειδικοτήτων του TCR, υπολογίστηκε ότι συγκεκριμένοι Vβ κλώνοι των T κυττάρων, οι οποίοι φυσιολογικά διαγράφονται σε υγιή ποντίκια, ήταν παρόντες στα Ly49 επιγενετικά ποντίκια. Η κατάλληλη ανάπτυξη των T κυττάρων βασίζεται στη σηματοδότηση ανάμεσα τα μόρια TCR και MHC. Αυτό υπέδειξε ότι οι υποδοχείς Ly49 μπορούν να συμμετέχουν στην ανάπτυξη των T κυττάρων, πιθανώς με τη μείωση του σήματος του TCR. Για αυτό, η τροποποίηση στην έκφραση του Ly49 των T κυττάρων μπορεί να επηρεάσει τους μηχανισμούς ανοχής των συγκεκριμένων κυττάρων (Fahlen et al. 1997).

#### δ) Οικογένεια κατασταλακτικών υποδοχέων NKG2 και CD94

Όπως οι υποδοχείς Ly49, έτσι και η οικογένεια των υποδοχέων NKG2 είναι πρωτεΐνες C τύπου, λεκτίνες (Εικόνα 3.2). Απαιτούν διμερισμό (dimerization) με το CD94 για την έκφραση στην κυτταρική επιφάνεια (Yokoyama and Plougastel 2003, Roulet et al. 2001). Το CD94 είναι ένα κοινό σταθερό υποσύνολο που έχει οριακό αλληλικό πολυμορφισμό. Οι υποδοχείς NKG2/CD94 αρχικά ταυτοποιήθηκαν στους ανθρώπους, αλλά διατηρούνται έντονα και στο σύστημα των ποντικών. Αυτά τα ετεροδιμερή προσδένονται στα μόρια MHC τύπου I, HLA-E, Qa-1 στα ποντίκια. Τα συγκεκριμένα μόρια δεν είναι πολυμορφικά και εμφανίζουν πεπτίδια από το MHC τύπου I ή από τα HLAs (Yokoyama and Plougastel 2003, Roulet et al. 2001). Γι' αυτό, οι υποδοχείς NKG2/CD94 επιτρέπουν τα NKCs έμμεσα να εξετάσουν την κατάσταση της έκφρασης του MHC τύπου I στα κύτταρα στόχους.

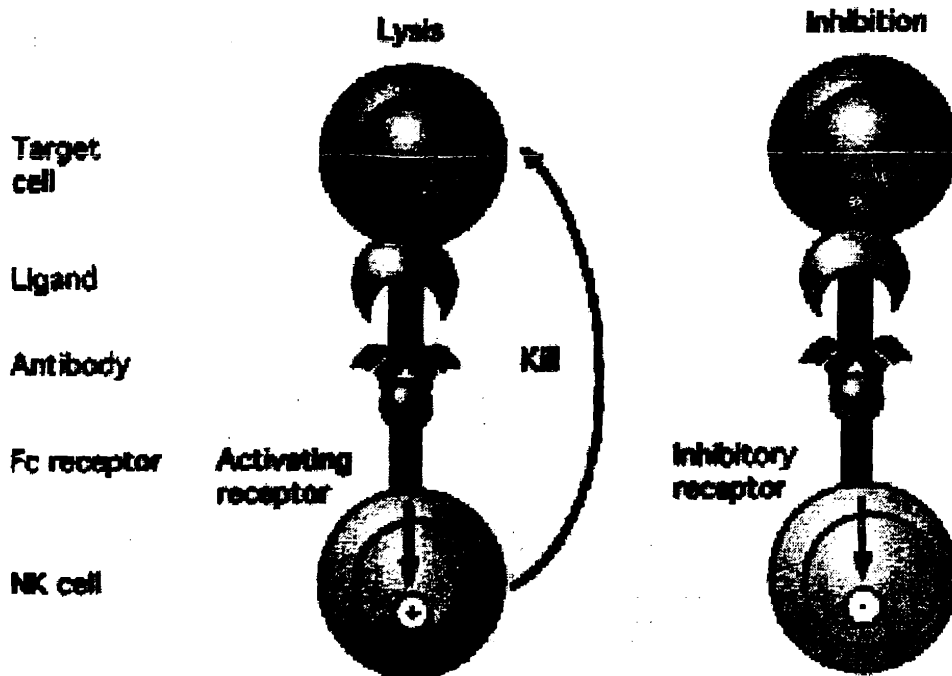
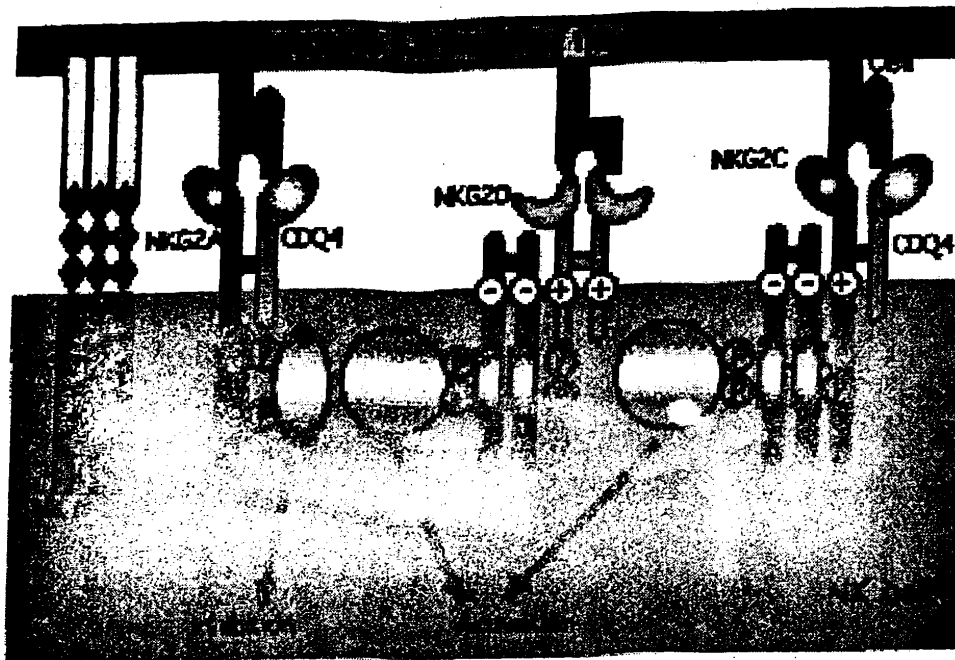
#### ε) Σηματοδότηση του κατασταλακτικού υποδοχέα

Η σηματοδότηση του κατασταλακτικού υποδοχέα έχει μελετηθεί εκτενέστερα με αναφορά στην οικογένεια των KIRs. Από τότε που ανακαλύφθηκε ότι οι



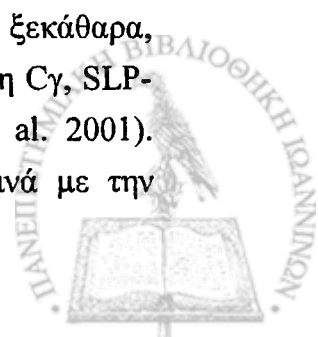
κατασταλτικοί υποδοχείς ανθρώπων και ποντικών κατέχουν ανοσοϋποδοχείς τυροσίνης βασισμένους σε κατασταλτικά μοτίβα (ITIMs: immuno-receptor tyrosine based inhibitory motifs), θεωρήθηκε ότι οι μηχανισμοί σηματοδότησής τους ήταν παρόμοιοι (Yokoyama 1998). Αυτά τα ITIMs φωσφορυλιώνονται όταν ο υποδοχέας δεσμεύεται από το υπόστρωμά του. Τότε τα φωσφορυλιωμένα ITIMs συγκεντρώνουν φωσφατάσες τυροσίνης (tyrosine phosphatase, SHP-1 και SHP-2). Οι φωσφατάσες θεωρούνται ότι αποφωσφορυλιώνουν υποστρώματα τα οποία είναι απαραίτητα για την ενεργοποίηση των NK κυττάρων.





Εικόνα 3.3: Κατασταλτικοί και διεγερτικοί υποδοχείς των NK κυττάρων. Μηχανισμοί καταστολής και ενεργοποίησης των NKCs.

Τα υποστρώματα για τα SHP-1 και SHP-2 δεν έχουν περιγραφεί ξεκάθαρα, όμως μπορούν να περιλαμβάνουν μόρια όπως Syk, ZAP 70, φωσφολιπάση Cγ, SLP-76, ναν και Rac (Long 1999, Lanier 1997, Lanier 1998, McVicar et al. 2001). Θεωρείται ότι το εμπόδιο για την ενεργοποίηση των NKCs που ξεκινά με την



δέσμευση του κατασταλτικού υποδοχέα εμφανίζεται νωρίς στην αλληπάλληλη σηματοδότηση, μια και δεν ανιχνεύεται παραγωγή inositol-1,4,5- triphosphate και ροή ασβεστίου (Long 1999).

### 3.2. Ειδικό κατασταλτικό υποδοχείς χωρίς MHC: Παράδειγμα του 2B4

Παλαιότερα, υπήρχε μεγάλη αντιπαράθεση όσον αφορά τον υποδοχέα 2B4 (CD244). Αυτός ο υποδοχέας διαφέρει από τους άλλους κατασταλτικούς υποδοχείς των NKCs διότι η σηματοδότησή του δεν γίνεται από τη μεσολάβηση του MHC τύπου I και δεν περιέχει ενδοκυτταρικά ITIM μοτίβα. Αντιθέτως, το 2B4 αλληλεπιδρά με το υπόστρωμα CD48 (Brown et al. 1998) και κατέχει ανοσοϋποδοχείς τυροσίνης βασιζόμενους με μοτίβα μετατροπής (ITSMs: immunoreceptor tyrosine-based switch motifs), ενδοκυτταρικές περιοχές φωσφορυλιωμένης τυροσίνης. Υπάρχουν δύο εναλλακτικοί ισότυποι του 2B4 των ποντικών. Κάθε μορφή transfected στην NK κυτταρική σειρά αρουραίου RNK-16 και μια σειρά από λειτουργικά κυτταρολυτικά πρωτόκολλα αποκάλυψαν ότι οι μορφές 2B4L και 2B4S είχαν αντίθετες λειτουργίες. Από την μια μεριά πίστευαν ότι η μορφή 2B4S είναι ενεργοποιητική και κατέχει ένα ITSM, και από την άλλη ότι η μορφή 2B4L είναι κατασταλτική κατέχοντας 4 ITSMs (παρόμοια με την ανθρώπινη μορφή του 2B4) (Schatzle et al. 1999). Η μορφή 2B4L εκφράζεται στα B6 NK κύτταρα (Mooney et al. 2004). Αρχικά, λειτουργικές μελέτες που χρησιμοποίησαν το μονοκλωνικό αντίσωμα anti-2B4 έδειξαν την έξαρση της λυτικής δραστηριότητας και της παραγωγής IFN $\gamma$ . Αυτά τα αποτελέσματα επεξηγήθηκαν με την ταυτοποίηση του 2B4 ως ενεργοποιημένου υποδοχέα (Trinchieri 1989, Mason et al. 1998). Οι παραπάνω μελέτες έδειξαν ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των 2B4 και CD48 κατέστειλαν την λύση και την παραγωγή IFN $\gamma$  από τα NK κύτταρα. Αυτό επιβεβαιώθηκε από in vitro μελέτες, ελέγχοντας την λυτική δράση του B6 ή 2B4 $^{-/-}$  των NK κυττάρων στα CD48(+/-) της κυτταρικής καρκινικής σειράς P815 (Mooney et al. 2004).

### 3.3. Ενεργοποιητικοί υποδοχείς των NK κυττάρων

Η ενεργοποίηση των NKCs επιτρέπει στην απελευθέρωση των κυτταροκινών να τροποποιεί ανοσολογικές απαντήσεις, όπως επίσης και την έναρξη των κυτταροτοξικών μηχανισμών (Trinchieri 1989). Επίσης, θεωρείται ότι η λύση των στόχων που προκαλείται από τα NK κύτταρα αποφασίζεται από την σύνδεση υποστρώματος και ενεργοποιητικών υποδοχέων και από την έλλειψη (ή μείωση) της συμμετοχής των κατασταλτικών υποδοχέων. Οι περισσότερες πληροφορίες όσον αφορά τους υποδοχείς των NKCs σχετίζονται άμεσα με υποδοχείς και υποστρώματα. Πρόσφατα σημειώθηκε αρκετή πρόοδος στο να αποσαφηνιστεί ο ρόλος των



ενεργοποιητικών υποδοχέων των NKCs και των υποστρωμάτων τους στην απόρριψη του μυελού, στην εκκαθάριση μεταμορφωμένων κυττάρων και μολυσμένων κυττάρων από ιούς.

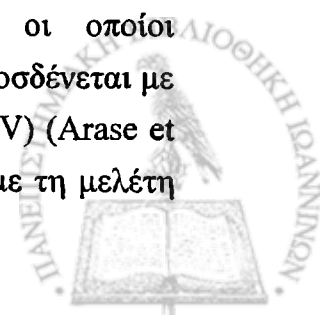
Ενεργοποιητικοί υποδοχείς όπως οι Ly49D και Ly49H είναι παρόμοιοι με τους κατασταλτικούς υποδοχείς, εκτός από το ότι έχουν έλλειψη από ITMs για την κυτταροπλασματική σηματοδότηση. Αντιθέτως, αυτοί οι υποδοχείς κατέχουν ένα θετικά φορτισμένο υπόλειμμα αμινοξέος στην διαμεμβρανική περιοχή επιτρέποντας την συσχέτιση με την ενεργοποιημένη πρωτεΐνη DNAX (DAP: ένα μόριο των 12 kDa). Το DAP12 είναι ένα μόριο προσαρμογέας, το οποίο προκαλεί μεταγωγή στα ενεργοποιημένα σήματα διαμέσου των κυτταροπλασματικών μοτίβων ITAMs (Mason et al. 1998). Ο υποδοχέας NKG2D συσχετίζεται με το μόριο DAP10, το οποίο εκπέμπει ένα ενεργοποιητικό σήμα διαμέσου ενός κυτταροπλασματικού μοτίβου ονόματι YxxM (Difenchbach and Raulet 2002). Αυτό διαφέρει από τα μέλη της άλλης οικογένειας των NKG2 διότι δεν απαιτείται το CD94 για έκφραση, αλλά πραγματικά εκφράζεται σαν ομοδιμερές (Difenchbach et al. 2000).

#### *α) Ειδικοί ενεργοποιητικοί υποδοχείς του MHC τύπου I*

Σε αρκετές μελέτες έχει αναφερθεί ότι τα Ly49D+ κύτταρα είναι τα δραστικά για την απόρριψη των D<sup>d</sup>+ κυττάρων των επιγενετικών ποντικών. Για την κατάλληλη δοκίμασία της λυτικής ιδιότητας των κυττάρων Ly49D+ επιλέχθηκαν τα B6 NK κύτταρα, τα οποία δεν εκφράζουν κατασταλτικούς υποδοχείς όπως Ly49A, C, G2 και I. Ένα μικρό υποσύνολο των NKCs, τα Ly49D+ και Ly49A/C/G2/I-, απομονώθηκαν με την τεχνική του διαχωρισμού κυττάρων με κυτταρομετρία ροής (sorting). Αυτά τα Ly49D+ κύτταρα δεν επηρεάστηκαν από την σηματοδότηση του κατασταλτικού υποδοχέα Ly49 και ήταν εφικτή η λύση των στόχων D8. Γι' αυτό, το συμπέρασμα ήταν ότι το μικρό αυτό υποσύνολο των NK κυττάρων ήταν υπεύθυνο για την απόρριψη του B6 ξενιστή του μυελού D8 (George et al. 1999). Επίσης, έχει βρεθεί ότι το Ly49D αναγνωρίζει ένα μόριο ονόματι Hm1-C4 στα κύτταρα ωαρίων κινέζικων ποντικών. Πράγματι, η λύση αυτή θα μπορούσε να κατασταλεί εμποδίζοντας την λειτουργία των Ly49D στα B6 NK κύτταρα με το μονοκλωνικό αντίσωμα 4E4. Επίσης, η δομή του Hm1-C4 μοιάζει με την δομή των μορίων του MHC τύπου I (Furukawa et al. 2002). Το Hm1-C4 είναι ένα παράδειγμα για το πώς ενεργοποιητικοί NK υποδοχείς ανιχνεύουν μόρια που μοιάζουν με MHC τύπου I.

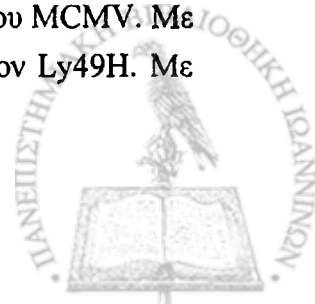
#### *β) Ενεργοποιητικοί υποδοχείς που αναγνωρίζουν μόρια παρόμοια με MHC*

Και άλλοι ενεργοποιητικοί υποδοχείς έχουν ανακαλυφθεί οι οποίοι αναγνωρίζουν μόρια παρόμοια με αυτά του MHC τύπου I. Το Ly49H προσδέεται με την m157, μια ιική γλυκοπρωτεΐνη κυτταρομεγαλοϊού ποντικών (MCMV) (Arase et al. 2002). Αυτό το εύρημα ακολούθησε μια άλλη σοβαρή ανακάλυψη με τη μελέτη



της γενετικής αντίστασης του MCMV. Τα ποντίκια B6 είναι ευαίσθητα στον MCMV (Cmnl<sup>l</sup>), αλλά άλλες εγγενείς κυτταρικές σειρές, όπως BALP/c και DBA/2, είναι ευαίσθητες στην επιμόλυνση από MCMV (Cmnl<sup>l</sup>). Η ευαισθησία του MCMV ήταν γενετικά ταξινομημένη στην γεωμετρική περιοχή cmln του χρωμοσώματος 6 στα NK κύτταρα (Scalzo et al. 1992, Xu et al. 1992). Η σχέση, όσον αφορά την αντίσταση μεταξύ των NKCs και MCMV, αποκαλύφθηκε σε μελέτες από τον S. Vidal χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμένη εγγενή σειρά BXD-8. Η σειρά αυτή είναι πολύ ευαίσθητη στην επιμόλυνση από τον MCMV, αλλά κατέχει ένα απλότυπο B6 στο Cmnl. Η έκφραση στα μοντέλα έκφρασης των NKCs σημείωσε διαγραφή του Ly49H στην σειρά BXD-8 των ποντικίων. Ενώ αυτή φαινόταν να είναι η μόνη αλλαγή στις δυο σειρές, συνυπολογίστηκε στην αντίσταση στον MCMV. Αυτό το συμπέρασμα υποστηρίχθηκε με επιπρόσθετες μελέτες, που έδειξαν ότι εμποδίζοντας τα Ly49H κύτταρα ή μειώνοντας τα Ly49H+ κύτταρα στην σειρά B6 των ποντικίων, αυξήθηκε η ευαισθησία από την επιμόλυνση από τον MCMV. Επιπλέον, ευαίσθητες σειρές Ly49H- μπορούσαν να είναι ανθεκτικές με επιγενετική έκφραση του Ly49H (Daniels et al. 2001, Lee et al. 2003).

Ο Lanier ήταν από τους πρώτους που ξεκίνησε πειράματα σχετικά με την ταυτοποίηση του υποστρώματος για τον υποδοχέα Ly49H. Από τότε που αποδείχτηκε ότι ο Ly49H παρέχει αντίσταση στον MCMV και ότι άλλοι υποδοχείς Ly49H είναι προσδεμένοι στα μόρια MHC τύπου I, θεωρήθηκε ότι ο Ly49H πιθανώς αναγνώρισε ένα μόνο μόριο MHC τύπου I το οποίο άλλαξε από ιική φλεγμονή. Για την δοκιμασία της παραπάνω υπόθεσης εφαρμόστηκε ένας καινοτομικός πειραματικός σχεδιασμός. Απαραίτητα για την ενεργοποίηση σήματος ήταν T κύτταρα υβριδωμάτων, τα οποία συνδέθηκαν με Ly49H και DAP12. Η NFAT πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς για ενεργοποίηση των κυττάρων, και γι' αυτό τον λόγο η διασύνδεση του Ly49H με το μονοκλωνικό αντίσωμα επέτρεψε τα κύτταρα να φθορίζουν. Για τον υπολογισμό της αλληλεπίδρασης μεταξύ Ly49H και MHC χρησιμοποιήθηκαν ινοβλάστες β2M<sup>-/-</sup> μολυσμένοι και μη μολυσμένοι από CMV για τον έλεγχο του Ly49H ως σημείο αναφοράς. Οι περισσότεροι υποδοχείς Ly49H προσδέονται εξ ολοκλήρου με συγκεκριμένα μόρια MHC τύπου I, αλλά τα Ly49H δεν χρειάζονται την έκφραση του MHC για το διαχωρισμό μολυσμένων και μη μολυσμένων κυττάρων. Αυτό υποστηρίχθηκε από προηγούμενες μελέτες που έδειξαν ότι ασχέτως με την έκφραση του MHC, τα NK κύτταρα θα μπορούσαν να ανταποκριθούν στα μολυσμένα κύτταρα από τον MCMV. Γι' αυτό, η άμεση αλληλεπίδραση του Ly49H με MHC δεν μεσολάβησε στον θάνατο των μολυσμένων κυττάρων. Ερευνητές θεώρησαν ότι ο Ly49H αντιδρούσε με ικές κωδικοποιημένες πρωτεΐνες και παρουσιάστηκε σε μια ομάδα διαγραφής μεταλλάξεων του MCMV. Με αυτήν την προσέγγιση, το m157 ανακαλύφθηκε ως υπόστρωμα για τον Ly49H. Με





δομική ανάλυση, το m157 αποδείχτηκε να είναι μια πρωτεΐνη παρόμοια με το MHC (Arase et al. 2002).

Ένας άλλος ενεργοποιητικός υποδοχέας που έχει ανακαλυφθεί είναι ο NKG2D. Το μόριο MICA (συσχετιζόμενη Α πρωτεΐνη με την αλυσίδα του MHC τύπου I), ήταν γνωστό ότι ήταν ένα αντιγόνο για τα γδ Τ ανθρώπινα κύτταρα και συνήθως βρισκόταν σε επιθηλιακά κύτταρα όγκων. Τα Τ κύτταρα κλώνοι μπορούσαν να θανατώσουν ανοσοποιημένα MICA κύτταρα, εκτός εάν μια διαλυτή μορφή της πρωτεΐνης MICA χρησιμοποιούνταν έτσι ώστε να εμποδίσει την πρόσδεση του Τ κυττάρου στη συνδεμένη πάνω στο κύτταρο MICA. Οι παρατηρήσεις αυτές υποδηλώνουν ότι η πρωτεΐνη MICA συμμετέχει στην ενεργοποίηση των Τ κυττάρων. Οι ερευνητές ενδιαφέρονταν να υπολογίσουν εάν η MICA αλληλεπιδρούσε με τον υποδοχέα TCR ή άλλους υποδοχείς επιφανείας στα δραστικά κύτταρα. Αρκετοί πρωτογενείς κυτταρικοί τύποι και κυτταρικές σειρές αξιολογήθηκαν για την προσδετική τους ικανότητα με την MICA. Επίσης, θεωρήθηκε ότι όλοι οι κυτταρικοί τύποι που προσδέονται σε διαλυτή MICA εκφράζουν έναν ειδικό υποδοχέα MICA. Σε προσπάθειες που καταβλήθηκαν για την ταυτοποίηση του ειδικού υποδοχέα MICA, μοντέλα έκφρασης συγκρίνονταν ανάμεσα σε κυτταρικές σειρές που αντιδρούσαν θετικά σε χρώση με διαλυτή πρωτεΐνη MICA και κύτταρα τα οποία δεν προσδέονταν στην MICA. Η υβριδοποίηση - αφαίρεση του DNA χρησιμοποιήθηκε για την παραπάνω ανάλυση και αποκάλυψε τον NKG2D ως υποψήφιο υποδοχέα. Το ανοσολογικό ίζημα των ανοσοποιημένων transfected MICA κυττάρων με NKG2D mAb επιβεβαίωσε τον συσχετισμό μεταξύ MICA και NKG2D. Λειτουργικά, η δέσμευση του NKG2D με τον υποδοχέα MICA θα μπορούσε να αυξήσει επανακατευθυνόμενα την λύση του συμπλέγματος υποδοχέα FcR με P815 κύτταρα. Η περίληψη αυτών των αποτελεσμάτων δηλώνει ότι η ενεργοποιητική λειτουργία του NKG2D είναι εξαρτώμενη από την MICA (Bauer et al. 1999).

Τα ομόλογα MICA δεν έχουν ανιχνευτεί καθόλου στο σύστημα των ποντικών. Όμως για την ταυτοποίηση των υποστρωμάτων των ποντικών για το NKG2D χρησιμοποιήθηκαν φθορίζουσες ουσίες σε τετραμερή μορφή στην εξωκυτταρική περιοχή του NKG2D σε μια ομάδα πρωτογενών κυττάρων και ογκολογικών κυτταρικών σειρών. Διάφορες κυτταρικές σειρές δέχτηκαν χρώση για την πρόσδεση με το NKG2D, περιλαμβάνοντας την J774 κυτταρική σειρά των μακροφάγων. Μια έκφραση του cDNA της σειράς J774 χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση δυνητικών NKG2D υποστρωμάτων. Θετικοί κλώνοι ήταν δυνατόν να ωθήσουν στην κυτταροτοξικότητα των NK κυττάρων και στην απελευθέρωση της IFN $\gamma$ . Με βάση την περαιτέρω ανάλυση δυο μόρια ταυτοποιήθηκαν, τα οποία είναι το H60 και το ρετινοϊκό οξύ. Αυτά τα μόρια είναι μακρινοί συγγενείς του MHC τύπου I (Diefenbach et al. 2000). Όταν το H60 εκφραζόταν στα ανθεκτικά από όγκους NK



κύτταρα με ανοσοποίηση (transfection), αυτά τα κύτταρα γίνονται ευαίσθητα στη θανάτωση των NKCs σε εξάρτηση από τον NKG2D.

Η φυσιολογική ή μη έκφραση του MHC τύπου I δρα ως δείκτης για την υγεία των κυττάρων που αποτρέπει την δραστηριοποίηση των NK κυττάρων με την δέσμευση των κατασταλτικών υποδοχέων των NKCs. Επιπλέον, μόρια παρόμοια με το MHC, όπως MICA, H60 και m157, φαίνεται να εκφράζονται μόνο όταν το κύτταρο έχει αλλάξει ή έχει υποστεί πίεση (Bauer et al. 1999). Η κυτταρική πίεση μπορεί να αυξηθεί με ογκολογικές διαδικασίες ή με ιική μόλυνση. Για την μελέτη της ενεργοποίησης του συστήματος NK-υποστρώματος, θετικοί μηχανισμοί για την σηματοδότηση στο εσωτερικό του οργανισμού χρησιμοποιήθηκαν από τα NK κύτταρα για την ταυτοποίηση βλαβερών κυτταρικών τύπων. Αυτά τα τελευταία ευρήματα εμπλέκουν περισσότερο τον ρόλο των NK κυττάρων στην επιτήρηση των όγκων. Επιπλέον, ενεργοποιητικοί υποδοχείς έχουν ανακαλυφθεί που παίζουν ρόλο εναντίον όγκων, αλλά η ταυτοποίηση των υποστρωμάτων τους είναι ακόμα σε ερευνητικό επίπεδο. Επίσης, οι υποδοχείς φυσικής κυτταροτοξικότητας, όπως NKp46, NKp44 και NKp30, ανακαλύφθηκαν στα NK κύτταρα και ανταποκρίνονται σε μη ειδικά μόρια του MHC (Moretta et al. 2000). Καινούργιες μελέτες σε αυτούς τους υποδοχείς θα ήταν σημαντικές στην κατανόηση άλλων ενεργοποιητικών μηχανισμών των NK κυττάρων.



## 4. ΟΙ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ NK ΚΥΤΤΑΡΩΝ

### 4.1. Μηχανισμοί δράσης των NK κυττάρων

Η κυτταρολυτική δράση μέσω κοκκίων είναι αναμφισβήτητα η πιο σημαντική λειτουργία των δραστικών κυττάρων όπως τα NK και τα CD8+ T κύτταρα. Όταν το κύτταρο φονέας αναγνωρίζει τον στόχο του, τα κυτταροτοξικά κοκκία μετακινούνται στην ανοσολογική σύναψη όπου οι μεμβράνες τους συγχωνεύονται με την πλασματική μεμβράνη του δραστικού κυττάρου και αδειάζουν τα συστατικά τους έτσι ώστε να αυξήσουν την απόπτωση των στόχων τους. Τα πρωταρχικά θανάσιμα συστατικά είναι οι προτεάσες σπρίνης (ονόματι granzymes, για τα ένζυμα των κοκκίων), και οι ισχυρές πρωτεΐνες της μεμβράνης περφορίνη και γρανουλυσίνη. Αυτές είναι προσκολλημένες σε ένα στρώμα πρωτεογλυκάνης. Οι βασικοί μηχανισμοί χρησιμοποιούνται από όλα τα κύτταρα φονείς, είτε είναι CD4+ ή CD8+ T κύτταρα ή NK κύτταρα, παρόλο που τα granzymes που περιέχουν μπορούν να ποικίλουν στα κύτταρα φονείς. Παρά το γεγονός ότι τα περισσότερα κυτταροτοξικά μόρια ανακαλύφθηκαν στα μέσα της δεκαετίας του 1980 ως μοριακά εργαλεία, η μοριακή κατανόηση των μηχανισμών δράσης τους παραμένει θολή. Το granzyme B, το οποίο ενεργοποιεί την αποπτωτική οδό της κασπάσης, ήταν το πρώτο κυτταρολυτικό μόριο που μελετήθηκε σε ευρύ φάσμα. Επίσης, καινούργιοι μηχανισμοί που ανακαλύφθηκαν, επιδεικνύουν πως τα κύτταρα φονείς μπορούν να προστατευθούν από τα δικά τους όπλα μαζικής καταστροφής (Lieberman 2003).

Οι Clark και Griffiths περιγράφουν ότι πίσω από την δημιουργία και απελευθέρωση των κυτταροτοξικών κοκκίων βρίσκονται εξειδικευμένα εκκριτικά λυσοσώματα. Τα κυτταρολυτικά μόρια, περιλαμβάνοντας granzymes, περφορίνη, γρανουλυσίνη και υπόστρωμα fas, είναι απαραίτητο να ταξινομούνται και να αποθηκεύονται σε αυτά τα όξινα κοκκία με τρόπο ώστε να προστατεύονται τα κύτταρα φονείς από αυτοκαταστροφή. Μετά την αναγνώριση του κατάλληλου στόχου από τα κύτταρα φονείς, τα κυτταροτοξικά κοκκία προσκολλώνται και μετακινούνται με μικροσφαιρίδια στην ανοσολογική σύναψη. Στην εκκριτική περιοχή της σύναψης, ξεχωριστά από την περιοχή σηματοδότησης που περιέχει τον TCR ή τον υποδοχέα του NK κυττάρου και βοηθητικά μόρια, η κυτταροτοξική μεμβράνη του κοκκίου προσδέεται στην μεμβράνη του κυττάρου φονέα και απελευθερώνει τα συστατικά του (Clark and Griffiths 2003).



Το επόμενο βήμα σε αυτή την διαδικασία αναφέρεται από τους Catafano και Henkart και είναι η μεταβίβαση των κυτταροτοξικών δραστικών μορίων στους στόχους μέσω περφορίνης. Το αρχικό μοντέλο της δράσης της περφορίνης ήταν ότι αυτή πολυμερίζεται στην μεμβράνη του κυττάρου - στόχου και δημιουργεί ανοίγματα για την ταχύτερη είσοδο των granzymes και την επίσπευση θανάσιμου χτυπήματος. Αυτό το μοντέλο διορθώθηκε όταν αποδείχτηκε ότι τα granzymes ενδοκυτταρώνονται σε κύτταρα τα οποία είναι ανεξάρτητα από το μηχανισμό της περφορίνης. Μια οδός για ενδοκυττάρωση είναι ο υποδοχέας της mannose-6-phosphate (MPR) ανεξαρτήτου κατιόντος, αλλά πρέπει να σημειωθεί ότι υπάρχουν και άλλες οδοί για ενδοκυττάρωση. Παρόλα αυτά, η περφορίνη είναι απαραίτητη για την απελευθέρωση των granzymes από το endosome. Δεν υπάρχει μέχρι σήμερα ξεκάθαρη εξήγηση για το πώς αυτό συμβαίνει (Catafano and Hankart 2003). Αλλά δημιουργείται και το ερώτημα, πώς ο φυσικός φονέας προστατεύεται από την απελευθέρωση της περφορίνης; Μια μελέτη έδειξε ότι η κατεψίνη B στην κυτταροτοξική μεμβράνη των κοκκίων μετατοπίζεται στην μεμβράνη κυττάρου φονέα μετά την συγχώνευση των μεμβρανών των κοκκίων, και διασπά και αδρανοποιεί όση περφορίνη κατευθύνεται προς τον φυσικό φονέα. Επίσης, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι οι φυσικοί φονείς προστατεύονται από τα συστατικά τους με την έκφραση καταστολέων, που ονομάζονται σερπίνες (Balaji et al. 2002).

Το καλύτερο μόριο που μελετήθηκε και συνεισφέρει στους θανάσιμους μηχανισμούς ενεργοποίησης των κοκκιοκυττάρων είναι το granzyme B. Παρόλο που παλαιότερα θεωρούσαν ότι το granzyme B άμεσα και ολοκληρωτικά ενεργοποιούσε την κασπάση και κασπάση 3, τώρα φαίνεται από τις μελέτες των Bleackley και Trapani ότι το granzyme B μερικώς ενεργοποιεί την κασπάση 3 και απαραίτητη είναι και η συμμετοχή των μιτοχονδρίων για την πληρότητα της ενεργοποίησης (Goring et al. 2003, Sutton et al. 2003). Αυτό εξηγεί γιατί η υπερέκφραση του bcl-2, μια στρατηγική του όγκου για την διαφυγή κασπάσης, καταστέλλει σημαντικά την απόπτωση που γίνεται με τη μεσολάβηση του granzyme B. Η επιστημονική ομάδα του Froelich αναφέρει ότι το granzyme B (μαζί και τα granzymes A και C) αυξάνουν τον κυτταρικό θάνατο και την μιτοχονδριακή απώλεια της δυναμικής της μεμβράνης (Metkar et al. 2003). Όμως, τίποτα δεν είναι γνωστό για αυτή την εναλλακτική οδό του μιτοχονδριακού κυτταρικού θανάτου.

Ένα άλλο σημαντικό granzyme είναι το granzyme A. Οι Lieberman και Fan περιγράφουν μια πρωτότυπη οδό για κυτταρικό θάνατο που προκύπτει από αύξηση του granzyme A. Παρόλο που τα στοχευμένα κύτταρα έχουν όλα τα μορφολογικά γνωρίσματα της απόπτωσης, η συγκεκριμένη οδός για τις κασπάσες έχει τη μορφή του DNA που μετατρέπεται σε μονή έλικα. Από ό,τι έχει ανακαλυφτεί μέχρι τώρα, το granzyme A φαίνεται να επικεντρώνεται στον αποσυντονισμό του πυρήνα, ειδικά των



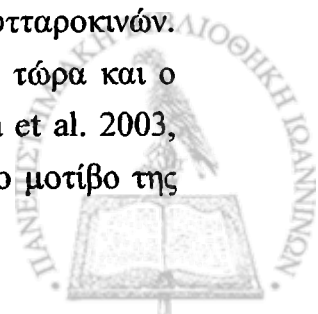
πρωτεϊνών της χρωματίνης, ή στην τροποποίηση της χρωματίνης (Lieberman and Fan 2003).

Επιπλέον, τα granzymes A και B εκφράζονται και σε άλλα πειραματόζωα, αλλά η λειτουργικότητά τους δεν είναι ακόμα κατανοητή. Πρόσφατες μελέτες πρότειναν την ύπαρξη υποπληθυσμών των κυττάρων φονέων που εκφράζουν διαφορετικούς τύπους granzymes, και μπορεί να έχουν ξεχωριστούς ρόλους στην ανοσολογική προστασία. Επίσης, ξεχωριστή ενεργοποίηση μπορεί να δημιουργήσει διάφορα σχήματα της έκφρασης των granzymes, αλλά για αυτό θα πρέπει να πραγματοποιηθούν αρκετές μελέτες. Πρόσφατα το εργαστήριο Lev άνοιξε την πόρτα στην κατανόηση του ρόλου των orphan granzymes, δείχνοντας ότι το granzyme C ενεργοποιεί μια πρωτότυπη θανατική κυτταρική οδό με μορφολογικά γνωρίσματα απόπτωσης. Το granzyme C προκαλεί σημαντικά την άμεση μιτοχονδριακή βλάβη με δραματικό μιτοχονδριακό εξόγκωμα. Η σκιαγράφηση γενικά των οδών του κυτταρικού θανάτου ανεξάρτητα από την κασπάση είναι δυνατόν σήμερα να είναι μια καρποφόρα ερευνητική περιοχή για τα επόμενα χρόνια, επεκτείνοντας την κατανόηση μηχανισμών για την ανοσολογική προστασία από ιούς και όγκους που ξεγλιστρούν από την ενεργοποίηση της κασπάσης (Johnson et al).

Ένα ακόμα συστατικό που μελετήθηκε από τους Clayberger και Krensky είναι η γρανουλυσίνη (granulysin), η οποία μπορεί να θανατώσει βακτήρια τόσο καλά όσο και όγκους. Η γρανουλυσίνη, η οποία εκφράζεται στους ανθρώπους και όχι στα ποντίκια, ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών που παρεμβάλλουν και διαταράσσουν μεμβράνες και αυτός είναι ο πρωτοταγής μηχανισμός της δράσης της. Η πρόσφατη λύση της κρυσταλλικής δομής της γρανουλυσίνης προβάλλει ένα καθαρό μοντέλο για την δράση της. Ένα μικρό πεπτίδιο γρανουλυσίνης μιμείται την μεμβρανολυτική δράση ολόκληρου του μορίου, και είναι δυνατόν να αναπτυχθούν μικρά σταθεροποιημένα μόρια για θεραπευτική χρήση. Επίσης, η γρανουλυσίνη μπορεί να είναι σημαντική και στην άμυνα έναντι μυκήτων και βακτηριδίων (Clayberger et al. 2003).

#### 4.2. Οι κυτταροκίνες και ιντερφερόνες στην δράση των NKCs

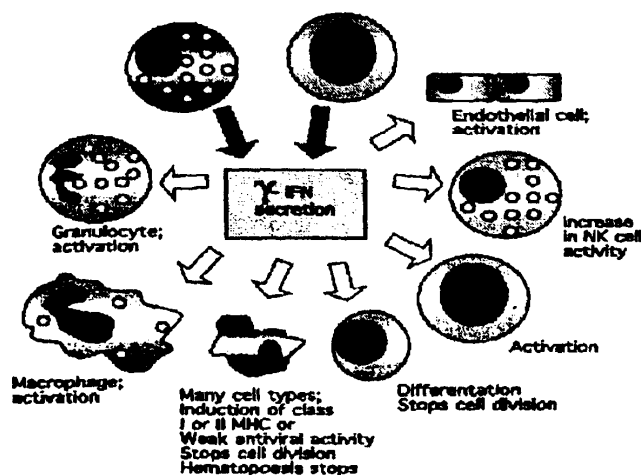
Οι κυτταροκίνες είναι τμήμα των διαλυτών μεσολαβητών στην ρύθμιση της ανοσολογικής άμυνας. Οι κυτταροκίνες ρυθμίζουν την διαφοροποίηση και επίσης την παραγωγή κυτταροκινών από ποικίλους κυτταρικούς τύπους. Πρόκειται για μικρές, μη δομικές, ενδοκυτταρικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες. Οι ιντερλευκίνες και ιντερφερόνες είναι τα κύρια συστατικά του συστήματος των κυτταροκινών. Τουλάχιστον 29 ιντερλευκίνες και 4 ιντερφερόνες είναι γνωστές μέχρι τώρα και ο αριθμός των ιντερλευκινών αυξάνει συνεχώς (Curfs et al. 1997, Gadina et al. 2003, Gracie et al. 2003, Parrish-Novak et al. 2000, Sheppard et al. 2003). Το μοτίβο της



παραγωγής των ιντερφερονών και ιντερλευκινών από τα NK κύτταρα επιταχύνει την αντίδραση του Th1 (CD4+ T βοηθητικό κύτταρο), που σημαίνει ότι τα NK κύτταρα παράγουν κυτταροκίνες τύπου Th1, όπως IFN- $\gamma$  μετά από διέγερση με IL-12 και IL-15. Την ίδια ώρα δεν παράγουν Th2 (T βοηθητικό κύτταρο τύπου 2) πρωτεΐνες, όπως IL-4. Για την αντίδραση του Th2, τα NK κύτταρα χρειάζονται μια πρωτοταγή διέγερση με IL-4. Η αντίδραση του Th2 είναι γνωστό ότι συνδέεται με την αλλεργία. Η πρωταρχική αντίδραση του Th1 ξεκινά με φωσφορυλίωση ενός signal transducer και με έναν ενεργοποιητή της μεταγραφής 4 (Stat 4), ενώ η αντίδραση του Th2 ξεκινά με φωσφορυλίωση Stat 6 (Romagnani 1997, Gor et al. 2003).

#### 4.2.1. IFNs και GM-CSF στα NK κύτταρα

Η IFN- $\gamma$  διεγείρει τα ανοσολογικά κύτταρα για την μεσολάβηση της άμυνας, ειδικά την αντίδραση του Th1 έναντι ενδοκυτταρικών φλεγμονών όπως αυτών με ιούς. Γι' αυτό, η διαταραχή της παραγωγής της IFN- $\gamma$  συχνά οδηγεί σε μειωμένη αντοχή σε ιική μόλυνση (Seaman 2000). Μετά την μόλυνση ανθρώπινων κυττάρων από ιούς παράγονται ιντερφερόνες τύπου I (IFN- $\alpha/\beta$ ), οι οποίες εντείνουν την λυτική ικανότητα των NKCs (Biron and Brossay 2001). Ακόμη, Η IFN- $\alpha$  ενεργοποιεί ανοσολογικές αντιδράσεις τύπου Th1 μέσω του Stat 4, που οδηγεί στην έκφραση του γονιδίου IFN- $\gamma$  στα T κύτταρα (Rogge et al. 1998). Μια άλλη κυτταροκίνη που παράγεται από τα NK κύτταρα μετά από διέγερση είναι ο διεγερτικός παράγοντας αποικιών κοκκιοκυττάρων - μακροφάγων (GM-CSF) (Ushio et al. 1996). Η GM-CSF οδηγεί αποικίες κοκκιοκυττάρων και μακροφάγων προς ωρίμανση. Επίσης, τα μονοκύτταρα και οι ινοβλάστες παράγουν GM-CSF (Hamilton 2002).



Σχήμα 4.1: Παραγωγή IFN- $\gamma$  από NK και T κύτταρα. Η IFN- $\gamma$  είναι ρυθμιστής πολλών κυτταρικών τύπων, περιλαμβάνοντας τα T και NKCs.



#### 4.2.2. IL-12

Η IL-12 είναι μέρος μιας μικρής ετεροδιμερικής οικογένειας κυτταροκινών μαζί με δύο άλλες ιντερλευκίνες που ανακαλύφθηκαν πρόσφατα, τις IL-23 και IL-27. Η IL-12 παράγεται από φαγοκυτταρικά και δενδριτικά κύτταρα μετά από μικροβιακή φλεγμονή. Πολλοί κυτταρικοί τύποι εκφράζουν υποδοχείς IL-12, αλλά οι υποδοχείς είναι πιο άφθονοι στα NK και στα ενεργοποιημένα T κύτταρα. Η IL-12 εντείνει την διαφοροποίηση, κυτταροτοξικότητα και παραγωγή της IFN- $\gamma$  (Trinchieri 2003, Karp and Willis-Karp 2001). Επίσης δρα σε συνεργασία με την IL-18 στην αύξηση της διαφοροποίησης των NK και T κυττάρων (Fehniger et al. 1999, Lauwerys et al. 1999).

#### 4.2.3. IL-15 και IL-2

Η σημαντικότερη λειτουργία της IL-15 είναι ότι ξεκινάει τη διαφοροποίηση των NK και T κυττάρων από τα αρχέγονα κύτταρα στον μυελό των οστών (Fehniger and Caligiuri 2001). Η IL-15 μπορεί να είναι κρίσιμη ιντερλευκίνη για την *in vivo* επιβίωση των NK κυττάρων (Copper et al. 2002, Prlic et al. 2003). Μοιράζεται ένα μέρος του ετεροτριμερικού της υποδοχέα με την IL-2, που είναι ομόλογη με την IL-15, με την οποία μοιράζεται πολλές λειτουργίες. Η διαφορά είναι ότι η IL-15 συμμετέχει περισσότερο στις NK λειτουργίες από ό,τι η IL-2 και έχει μια ευρύτερη λειτουργία όσον αφορά την κατανομή ιστού (Fehniger and Caligiuri 2001). Η IL-15 παράγεται από πολλούς ιστούς και κύτταρα, όπως μονοκύτταρα, μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα και κύτταρα στρώματος μυελού.

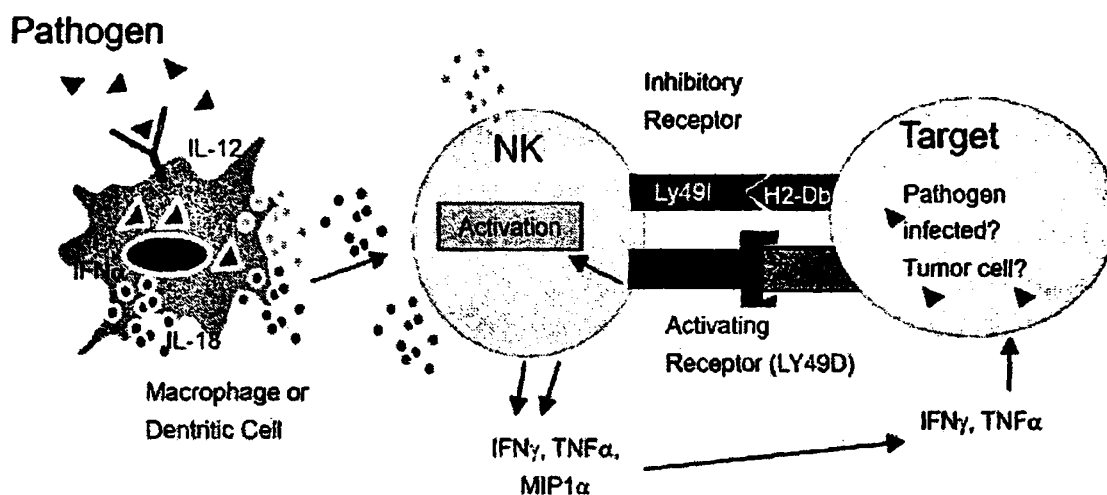
#### 4.2.4. IL-18

Η IL-18 είναι άλλη μια ιντερλευκίνη που παίζει ρόλο στην ρύθμιση των NK κυττάρων. Παράγεται από μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα και κερατινοκύτταρα. Μαζί με τα NK κύτταρα, πολλά άλλα κύτταρα επίσης εκφράζουν υποδοχείς IL-18. Η βασική λειτουργία της IL-18 είναι να διεγείρει απόκριση έναντι μικροβιακής φλεγμονής, ενώ επιπλέον ενεργοποιεί και επιταχύνει πολλές λειτουργίες των NKCs, όπως ωρίμανση, κυτταροτοξικότητα και παραγωγή κυτταροκινών, ειδικότερα της IFN- $\gamma$ . Η IL-18 είναι συχνά μια συνδιεγερτική ιντερλευκίνη μαζί με τις IL-15 ή IL-12. Η συνέργεια αυτών των κυτταροκινών αυξάνει τον ρυθμό παραγωγής και διαφοροποίησης των NK κυττάρων (Fehniger et al. 1999, Lauwerys et al. 1999).



#### 4.2.5. IL-21

Η IL-21 ανακαλύφθηκε πρόσφατα και ενεργοποιείται από τα CD4+ T κύτταρα<sup>271</sup>. Τα T, B και NK κύτταρα εκφράζουν υποδοχείς IL-21. Αυτή η ιντερλευκίνη μπορεί να προκαλεί κατασταλτικά ή διεγερτικά ερεθίσματα στα NK κύτταρα. Μπορεί να διεγείρει κυτταρολυτική δράση, μόνη της ή σε συνεργασία με την IL-15, και να αυξάνει τον πληθυσμό των NKCs στον μυελό ή στο περιφερικό αίμα. Υψηλές δόσεις IL-21 καταστέλλουν την διαφοροποίηση των NKCs και χαμηλές δόσεις μπορούν να τη διεγείρουν (Parish-Novak et al. 2002). Σύμφωνα με τους Strengell et al, η IL-21 δρα σε συνεργασία με τις IL-15 και IL-18 διεγείροντας την παραγωγή της IFN- $\gamma$  (Strengell et al. 2003).



Σχήμα 4.2: Απελευθέρωση διαλυτών μεσολαβητών (π.χ. IL-12, IL-18, IFN- $\gamma$ ) από παθογόνα κύτταρα μπορούν να ενεργοποιούν τα NKCs.

#### 4.3. Η αντικαρκινική δράση των NK κυττάρων

Απαραίτητη προϋπόθεση για να παίξουν τα NK κύτταρα έναν ρόλο στον έλεγχο της αύξησης των όγκων είναι η ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν και να καταστρέφουν συγγενικά κακοήθη κύτταρα ή να ενεργοποιούν έμμεσα επίκτητους ή μη επίκτητους μηχανισμούς αντιογκολογικής αντοχής. Η ικανότητα των NK κυττάρων να θανατώνουν συγγενικά κύτταρα αποδείχθηκε χρησιμοποιώντας μεταμορφωμένες κυτταρικές σειρές σαν στόχους (Santoli et al. 1976), αλλά νέα κύτταρα όγκοι είναι σχεδόν ανεπηρέαστα στην θανάτωση από τα NK κύτταρα. Μελέτες στις οποίες τα NKCs εμπλουτίστηκαν ή ενεργοποιήθηκαν με IFN ή IL-2 έδειξαν ότι αλλογενετικά και αυτόλογα κακοήθη νέα κύτταρα είναι ευαίσθητα στην μεσολαβούμενη κυτταροτοξικότητα από τα NK κύτταρα (Huberman et al. 1979,





Santoli et al. 1978, Crimm et al. 1982). Η *in vivo* ύπαρξη των NK κυτταροτοξικών κυττάρων με πιθανή λειτουργία στην εποπτεία έναντι όγκων σηματοδοτεί την σπουδαιότητα των *in vivo* ρυθμιστικών μηχανισμών για την οργάνωση και την ενεργοποίηση των NK κυττάρων τοπικά σε αναλογία με άλλους μη επίκτητους μηχανισμούς της άμυνας του οργανισμού (Trinchieri and Santolini 1978).

Στα πειραματόζωα, η *in vivo* επιρροή των NK κυττάρων έναντι όγκων ερευνήθηκε αξιολογώντας την μακράς διάρκειας αύξηση των όγκων (Kiessling et al. 1976), την δημιουργία μεταστάσεων (Hanna et al. 1981) και την εξόντωση ραδιοσημασμένων όγκων από το ζώο ή από συγκεκριμένα όργανά του (π.χ. πνεύμονες) (Gorelik et al. 1979, Riccardi et al. 1980). Τα πειραματικά μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν περιλάμβαναν ανάλυση της συσχέτισης της δράσης των NKCs και αντοχής στους όγκους και πειραματικές διαδικασίες ικανές να ενεργοποιήσουν ή να καταστείλουν την δράση των NKCs (Haller et al. 1977). Αυτό πραγματοποιήθηκε με την χρήση του  $^{89}\text{Sr}$  (Haller and Wigzell 1977), με μονοκλωνικά αντισώματα anti-NK-1.1 (Seman et al. 1987) και anti-IFN (Reid et al. 1981). Όλα τα πειράματα δείχνουν ότι τα NK κύτταρα είναι αποτελεσματικά *in vivo* και ότι μπορούν να καταστρέφουν όγκους. Ο άμεσος ρόλος τους στην αποτροπή της δημιουργίας μετάστασης επιβεβαιώθηκε με πειράματα, στα οποία η δημιουργία μετάστασης αποτράπηκε σε πειραματόζωα με πολύ χαμηλό αριθμό NKCs με την μεταμόσχευση νέων NKCs (Hanna and Burton 1981, Barlozzari et al. 1985) ή κλωνοποιημένων κυτταρικών σειρών με NK δράση (Strong et al. 1981).

Η μετάσταση συχνά προελαύνει με αιματογενή διασπορά. Η παρουσία στο αίμα των κυτταροτοξικών NK κυττάρων μπορεί να ρυθμίζεται έτσι ώστε να θανατώνουν κύτταρα-όγκους που είναι παρόντα στην κυκλοφορία πριν αυτά τα κύτταρα συσσωρευτούν και δημιουργήσουν μετάσταση. Η απόδειξη ότι τα NK κύτταρα εξολοθρεύουν κύτταρα-όγκους στην κυκλοφορία δεν αποκλείει την πιθανότητα ότι η πρόληψη για την μετάσταση μπορεί να λαμβάνει χώρο και σε επίπεδο ιστού (Wiltrout et al. 1985). Η ενεργοποιημένη IL-2 καταστέλλει τη δημιουργία μεταστάσεων. Η εμπλουτισμένη προετοιμασία των NKCs σε συνδυασμό με την IL-2 επέδειξε ένα εντυπωσιακό αντιμεταστατικό αποτέλεσμα σε επίπεδο πνευμόνων και ήπατος και παρέτεινε σημαντικά την προσδόκιμο επιβίωση μετά από θεραπεία (Schwarz et al. 1989).

Ο ρόλος των NK κυττάρων στην άμυνα έναντι όγκων στους ανθρώπους έχει γίνει θέμα σε εκατοντάδες μελέτες, αλλά η σχέση ανάμεσα στην δράση των NKCs και στην πρόοδο του όγκου παραμένει δύσκολη προσέγγιση (Pross and Baines 1986). Το βασικό εμπόδιο αυτών των μελετών είναι η υψηλή ποικιλία στον αριθμό των NK κυττάρων και στη δραστηριότητα ανάμεσα σε υγιείς εθελοντές και η δυσκολία για την προσεκτική ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων. Τα αποτελέσματα τα οποία παρουσιάζονται είναι συνήθως πειραμάτων που έχουν εκτελεστεί σε συγκεκριμένο

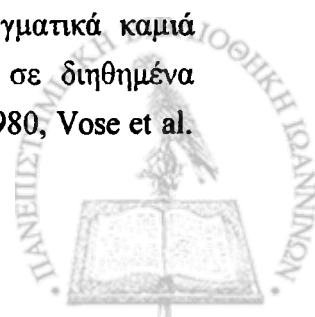


αριθμό ασθενών, και δεν είναι εφαρμόσιμα με αποδεκτά κριτήρια ποσοτικοποίησης και στανταρίσματος. Σε μελέτες κατά τις οποίες ο φαινότυπος των NKCs έχει αναλυθεί, συχνά δεν γινόταν χρήση των κατάλληλων αντιδραστηρίων και στις περισσότερες περιπτώσεις ο αριθμός των NKCs εκφραζόταν σαν ένα τμήμα του ολικού αριθμού των λεμφοκυττάρων και όχι σαν μια απόλυτη συγκέντρωση κυττάρων. Γι' αυτό, πολλές μελέτες θα μπορούσαν να θεωρηθούν ανακριβείς και δεν προσθέτουν νέα γνώση για την λειτουργία των NKCs *in vivo*.

Συχνά, σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο η κυτταροτοξική δράση των NK κυττάρων είναι μειωμένη (Cunningham-Rundles et al. 1981, Kadish et al. 1981, Pandolfi et al. 1982, Pross and Baines 1976, Takasugi et al. 1977). Αυτή η μείωση φαίνεται να είναι δευτερεύουσα στην εισβολή του όγκου εξαιτίας είτε της αλληλεπίδρασης των NK κυττάρων με κύτταρα-όγκους ή της παρουσίας κατασταλτικών κυττάρων (Allavena et al. 1981, Eremin et al. 1981, Herberman et al. 1979, Uchida and Micksche 1981). Οι Pross και Baines ανέφεραν την ανάλυση δεδομένων 307 ασθενών σε μια μελέτη συνόλου 1600 αυθαίρετα επιλεγμένων καρκινοπαθών. Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν NK κύτταρα ως δραστικά κύτταρα και η σειρά K562 ως κύτταρα-στόχοι, εφαρμόζοντας ένα προσεκτικά ποσοτικοποιημένο πρωτόκολλο. Κάθε εθελοντής εξετάστηκε σε διαφορετικά πειράματα. Αυθαίρετα επιλέχθηκαν εθελοντές υγείς ως κοντρόλς, ασθενείς χωρίς απόδειξη ασθένειας και ασθενείς με τοπική ασθένεια που είχαν συγκρίσιμη κυτταροτοξική δράση. Οι ασθενείς με μεταστατική ασθένεια και περισσότεροι ασθενείς με προχωρημένες μεταστάσεις έδειξαν σημαντικά ελαττωμένη κυτταροτοξική δράση των NK κυττάρων (Pross and Baines 1986).

Η μείωση της δράσης των NK κυττάρων στους καρκινοπαθείς οφείλεται πιθανόν σε ποικίλους διαφορετικούς μηχανισμούς, αντανακλώντας την ρύθμιση της συνθετικότητας των NK κυττάρων *in vivo*. Ο ανταγωνισμός ή η απενεργοποίηση από τα κύτταρα των όγκων μείωσε την αντίδραση στην IFN ή IL-2, την δυνατότητα παραγωγής IFN ή IL-2, την παρουσία κατασταλτικών κυττάρων (περιλαμβάνοντας μονοκύτταρα / μακροφάγα που δρουν για την απελευθέρωση των προσταγλανδινών) και την παρουσία κατασταλτικών ουσιών όπως οι γλυκοπρωτεΐνες και τα γλυκολιπίδια. Οι παραπάνω μαζί με άλλους μηχανισμούς έχουν περιγραφεί ως υπεύθυνοι για την μείωση των NKCs στους καρκινοπαθείς (Pross and Baines 1986).

Οι περισσότερες μελέτες της κυτταροτοξικής δράσης των NK κυττάρων σε καρκινοπαθείς πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας κύτταρα από περιφερικό αίμα. Επομένως είναι δυνατόν η μείωση στη λειτουργία ή στον αριθμό των NKCs να οφείλεται στην μεταβολή της κυκλοφορίας των κυττάρων ή στην κατάσχεσή τους στις περιοχές όγκων ή στην αφαιμάξη της λέμφου. Πάντως, πραγματικά καμιά κυτταρική δράση των NK δεν βρέθηκε σε κακοήγη έξαρση ή σε διηθημένα λεμφοκύτταρα μέσα σε όγκους (Golub et al. 1982, Mantovani et al. 1980, Vose et al.



1977). Επίσης, η έλλειψη της δράσης των NK κυττάρων στις περιοχές των όγκων θα μπορούσε να οφείλεται στην *in situ* καταστολή της δράσης των NKCs, διότι σε μερικές μελέτες λειτουργικά κυτταροτοξικά NKCs έχουν εμπλουτιστεί από ασκитικό υγρό και διηθημένα λεμφοκύτταρα σε όγκους (Introna et al. 1983, Uchida and Micksche 1981, Moy et al. 1985, Uchida and Micksche 1983).

Εάν τα NKCs παίζουν κάποιο ρόλο στην εποπτεία έναντι καρκινωμάτων, η λιγοστή δράση τους θα έχει προγνωστική αξία στον υπολογισμό του κινδύνου στην ανάπτυξη όγκων. Ασθενείς με γενετικές ασθένειες, όπως CHS ή X-LPD με πρωτοταγή και δευτεροταγή μείωση της δράσης των NKCs αντίστοιχα, έχουν υψηλή προδιάθεση να αναπτύξουν LPD. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η αιτιολογία της ασθένειας είναι μάλλον ιική και ο ρόλος των NKCs αντικατοπτρίζει την ιική παρά την αντικαρκινική τους δράση (Pross and Herberman 1989). Σε οικογενές μελάνωμα, συγγενείς των ασθενών, οι οποίοι είχαν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης όγκων, έδειξαν μειωμένη δράση των NKCs, προτείνοντας έναν πιθανό ρόλο της αντίστασης των κυττάρων αυτών στην αύξηση των όγκων (Hershey et al. 1979). Εκτός από τους ασθενείς με συμπαγείς όγκους, αυτοί με πρωτοταγή μη διεισδυτικό μελάνωμα έχουν χαμηλή δράση των NK κυττάρων. Επειδή η δράση των NKCs σε υγιείς εθελοντές μπορεί να ποικίλει και η ασθένεια από μόνη της να επηρεάζει την δράση των κυττάρων αυτών, παραμένει ακόμα άγνωστο αν πράγματι έχουν κάποιον ρόλο στην εποπτεία των όγκων, παρά το γεγονός ότι για πολλά χρόνια πραγματοποιήθηκε έρευνα για πιθανή σχέση ανάμεσα στην χαμηλή και υψηλή δράση των NKCs και στην πιθανότητα ανάπτυξης πρωτοταγών όγκων (Pross 1986).



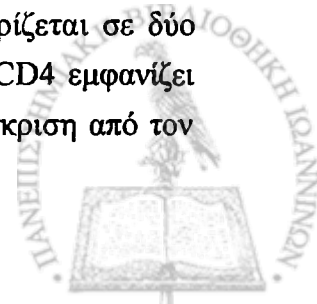
## 5. NKT ΚΥΤΤΑΡΑ (ΦΥΣΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΟΚΤΟΝΑ Τ ΚΥΤΤΑΡΑ)

### 5.1. Γενικά για τα NKT κύτταρα

Τα NKT κύτταρα είναι ένας υποπληθυσμός των λεμφοκυττάρων που βρίσκονται στα ποντίκια και στους ανθρώπους (Kronenberg and Garin 2002) και έχουν χαρακτηριστικά φυσικής αλλά και επίκτητης ανοσίας. Τα κύτταρα αυτά εμπλέκονται στις ανοσολογικές απαντήσεις σε διάφορα παθογόνα. Τα NKT κύτταρα εκφράζουν και υποδοχείς των T κυττάρων και υποδοχείς των NK κυττάρων. Υπάρχουν 4 ομάδες των κυττάρων αυτών, οι οποίες διαφέρουν στον υπό περιορισμό TCR, στην έκφραση του δείκτη των NK και στην έκφραση του δείκτη επιφανείας. Τα NKT κύτταρα κατέχουν έναν φαινότυπο ενεργοποιημένων T κυττάρων (π.χ. CD69<sup>+</sup>, CD44<sup>high</sup>, CD62L, CD5<sup>high</sup>, CD45RB<sup>high</sup> και IL-2R), που είναι ενδεικτικός για κάθε κυτταρικό τύπο και μπορεί ταχύτατα να ανταποκρίνεται σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα (Bendelac et al. 1997, Hammond et al. 1999). Αυτά τα κύτταρα εκφράζουν τους υποδοχείς των NK και τους επικρατέστερους δείκτες, όπως NK1.1, CD122 και Ly49 μόρια μεμβρανών. Επίσης, τα NKT κύτταρα χαρακτηρίζονται από την ταχύτατη έκκριση σε υψηλά επίπεδα ιντερλευκίνης 4. Τα κύτταρα αυτά διανέμονται σε όλο τον οργανισμό, αλλά η αντιστοιχία τους με τα T κύτταρα ποικίλει ανάλογα με τον ιστό. Στα ποντίκια, τα NKT είναι επικρατέστερα στον θύμο αδένα (~15%) και στον μυελό των οστών (~25%), ενώ είναι λιγότερα στον σπλήνα (3%), στους λεμφαδένες (0,3%), στο αίμα (4%) και στους πνεύμονες (7%). Όπως συμβαίνει στα T κύτταρα, έτσι και στα NKT κύτταρα η συντήρησή τους γίνεται ανεξάρτητα από τον θύμο αδένα. Επιπλέον, ο μυελός των οστών παίζει σημαντικό ρόλο στην ανανέωση των NKT κυττάρων μετά την ενεργοποίησή τους και την τελική δράση τους έναντι όγκων (Godfrey et al. 2000).

### 5.2. Τα ανθρώπινα NKT κύτταρα

Οι άνθρωποι υποπληθυσμοί των NKT κυττάρων ύστερα από αρκετές μελέτες φαίνεται να έχουν τα ίδια χαρακτηριστικά με τα NKT των ποντικιών. Η πρώτη ομάδα τους κατέχει ένα iTCR περιλαμβάνοντας τις αλυσίδες Va24JaQ και Vβ11. Επίσης, τα NKT κύτταρα κατέχουν ένα μη μεταβλητό TCR, περιλαμβάνοντας την α αλυσίδα Va24JaQ και την β αλυσίδα Vβ11. Η διασπορά των NKT στους ανθρώπους δεν είναι και τόσο ξεκάθαρη, αλλά αναφέρεται σε μερικές μελέτες ότι βρίσκονται στο ήπαρ (Godfrey et al. 2000). Μια βασική διαφορά ανάμεσα στα ανθρώπινα NKT και αυτά των ποντικιών είναι ότι η πρώτη ομάδα των NKT κυττάρων διαχωρίζεται σε δύο ξεχωριστούς λειτουργικούς υποπληθυσμούς: τον CD4<sup>+</sup> και DN. Το CD4<sup>+</sup> εμφανίζει πολικότητα με περισσότερη έκκριση IL-4 από τον Th2 και μερική έκκριση από τον



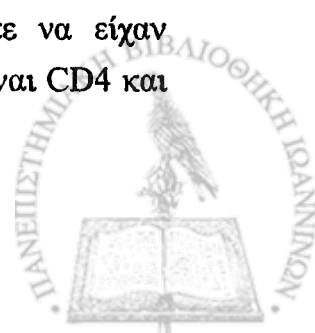
Th1. Αυτά τα κύτταρα παίζουν ρυθμιστικό ρόλο στην ανοσολογική ανοχή (Lee et al. 2002, Kim et al. 2002). Το DN εκκρίνει IFN- $\gamma$  από τον Th1 και λειτουργεί σε απάντηση στην μόλυνση και φλεγμονή. Επιπρόσθετα, αυτοί οι υποπληθυσμοί διαφέρουν σε χυμοκίνες και στην έκφραση των δεικτών των NK κυττάρων. Κάθε υποπληθυσμός κατέχει ξεχωριστούς υποδοχείς χυμοκινών και κυτταροκινών των T κυττάρων (Jayawardena-Wolf et al. 2001).

Τα NKT των ανθρώπων και των πειραματοζώων παίζουν παρόμοιους ρόλους σε σχετιζόμενες αυτοάνοσες παθήσεις. Μοντέλα των NKT κυττάρων στα ποντίκια υπάρχουν στον διαβήτη τύπου I, στον συστηματικό ερυθματώδη λύκο και στην συστηματική σκλήρυνση. Συνεπώς, οι ανταποκρίσεις των NKT κυττάρων στα μοντέλα των πειραματοζώων είναι σημαντικές για την κατανόηση των ρόλων των συγκεκριμένων κυττάρων στην ανοσολογική ρύθμιση. Οι υποδοχείς iTCR και CD1d των ανθρώπινων NKT κυττάρων και εκείνων των πειραματοζώων είναι τόσο υψηλά διατηρήσιμοι ανάμεσα στα δυο αυτά είδη, ώστε το CD1d των πειραματοζώων είναι ικανό να ενεργοποιήσει ανθρώπινα NKT κύτταρα και το ανθρώπινο CD1d είναι ικανό να ενεργοποιήσει τα NKT κύτταρα των πειραματοζώων (Kronenberg et al. 1999). Αυτό δηλώνει ότι τα CD1d και iTCR είναι μερικώς μοιρασμένα ανάμεσα στους ανθρώπους και στα πειραματόζωα.

### 5.3. Η επιλογή του T υποδοχέα

Ο μηχανισμός της επιλογής του υποδοχέα από τα DN (double negative) θυμοκύτταρα είναι ελάχιστα κατανοητός. Η θεωρία αναφέρει ότι τα DP (double positive) θυμοκύτταρα λαμβάνουν ένα ξεχωριστό σήμα από επιθηλιακά κύτταρα του φλοιού για να διαφοροποιηθούν σε CD4 ή CD8 κύτταρα. Η επιλογή της καταγωγής των κυττάρων είναι αυθαίρετη γενετική επιλογή, ανεξάρτητη από εξωτερικά σήματα. Λόγω αυτής της γενετικής επιλογής, ο υποδοχέας δεν εκφράζεται περαιτέρω. Με αυτό το σύστημα, κάποια DP θυμοκύτταρα θα επιλέξουν ασυμβίβαστα λάθος υποδοχέα και γι' αυτό αποβάλλονται με απόπτωση. Διάφορες μελέτες χρησιμοποιήθηκαν για να ερευνηθούν και τις δύο θεωρίες<sup>223</sup>.

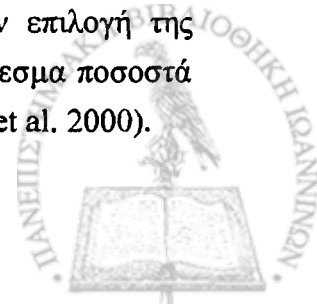
Η θεωρία υποστηρίχτηκε με πειράματα στα οποία τα θυμοκύτταρα επέλεξαν τους λάθος υποδοχείς που δεν είχαν απελευθερωθεί από την επιγενετική έκφραση του κατάλληλου μορίου του MHC. Σε αυτά τα πειράματα, η έκφραση ενός τύπου του TCR (CD4 ή CD8) ισχυροποιείται κατά την ανάπτυξη του T κυττάρου και με την προσθήκη του υποδοχέα που επιλέγεται αυθαίρετα. Εάν αυτή η θεωρία ήταν σωστή, τότε τα T κύτταρα που επιλέγουν έναν λάθος υποδοχέα θα έπρεπε να είχαν απελευθερωθεί με ενδυναμωμένη έκφραση. Το τελικό αποτέλεσμα θα είναι CD4 και CD8 (DP) ώριμα κύτταρα (Germain 2002).

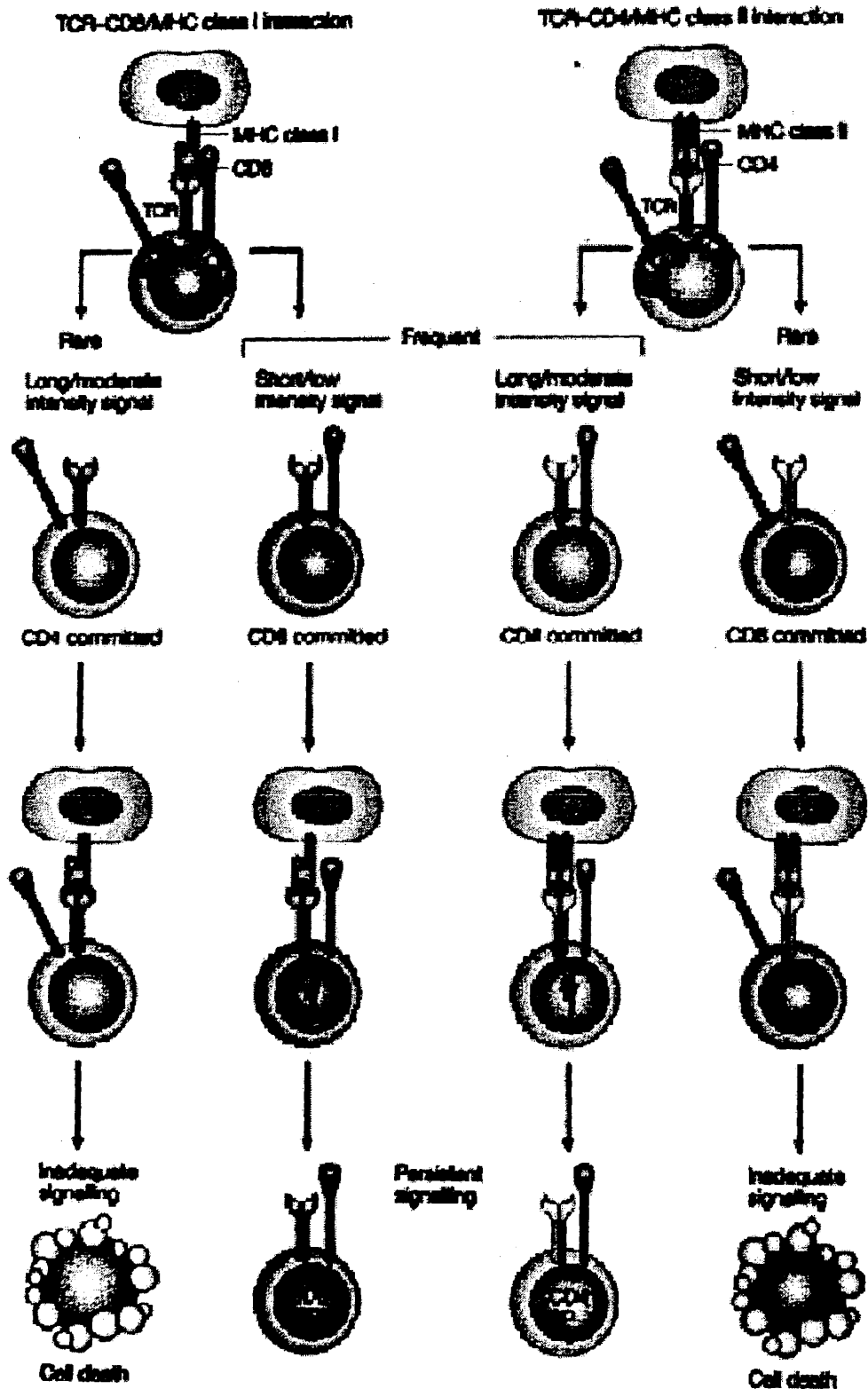


Μελέτες που υποστηρίζουν ανάπτυξη αυτού του τύπου αποδόθηκαν στην φαινοτυπική ανάλυση του μορίου MHC σε ποντίκια. Σε δύο διαφορετικά ποντίκια αναπτύχθηκαν δύο ξεχωριστοί φαινότυποι DP θυμοκυττάρων: CD4<sup>med</sup>, CD8<sup>high</sup> (MHC II -/-) και CD4<sup>high</sup>, CD8<sup>med</sup> (MHC -/-). Αυτά τα μεταβατικά στάδια δεν αναμένονταν, μιας και το ανεπαρκές μόριο MHC δεν ήταν παρόν για να ξεκινήσει η ανάπτυξη των T κυττάρων. Η έκφραση του αντίθετου υποδοχέα στα ποντίκια (CD4 στο MHC I ή CD8 στο MHC II) εξαλείφθηκε πραγματικά (Germain 2002).

Οι Germain et al ανακάλυψαν ότι και τα CD4 και CD8 SP (single positive) θυμοκύτταρα προέρχονται από τα CD4<sup>high</sup>, CD8<sup>med</sup> DP θυμοκύτταρα και ότι η απάλειψη του υποδοχέα δεν είναι γραμμική (Lucas and Germain 1996). Αυτά τα δεδομένα επιδεικνύουν ότι και οι δύο υποδοχείς χάνονται στην σηματοδότηση του TCR και η περαιτέρω απώλεια υπολογίζεται από την ισχύ του σήματος. Τότε και οι δυο υποδοχείς επανεκφράζονται με έναν ασυμμετρικό τρόπο, κατά τον οποίο πρώτο το CD4 και μετά το CD8 διαφοροποιούνται στα παρατηρήσιμα CD4<sup>high</sup> και CD8<sup>med</sup> DP θυμοκύτταρα. Μετά από αυτή την επανέκφραση, ο μη κατάλληλος υποδοχέας εξαλείφεται. Οι Germain et al πρότειναν ένα τροποποιημένο μοντέλο ανάπτυξης και το απέδωσαν ως ισχύ του μοντέλου σηματοδότησης (Germain 2002) (εικόνα 5.1).

Σύμφωνα με την θεωρία της ισχύος της σηματοδότησης, η δέσμευση των CD4 και CD8 θυμοκυττάρων εξαρτάται από την διάρκεια και την ένταση του σήματος από τον TCR. Η μικρή διάρκεια του σήματος οδηγεί στην δέσμευση του CD8 και η μακρά διάρκεια στην δέσμευση του CD4. Η επιλογή της έκφρασης του CD4 είναι βασισμένη στην σύνδεση της κινάσης της τυροσίνης Lck και του συγκεκριμένου υποδοχέα (Germain 2002). Σε αυτό το μοντέλο μερικά DP θυμοκύτταρα θα έχουν TCR που προσδέεται χαλαρά στο μόριο MHC τύπου II, με αποτέλεσμα την λανθασμένη επιλογή του CD8, ενώ άλλα DP θυμοκύτταρα που θα έχουν TCR με ισχυρή πρόσδεση με τα μόρια MHC τύπου II, θα οδηγούνται στην λανθασμένη επιλογή του CD4. Και οι δυο αυτές περιπτώσεις θα μπορούσαν να είναι σπάνιες και τα κύτταρα που επιδεικνύουν αυτές τις επιλογές οδηγούνται σε απόπτωση. Σε μελέτες με ανασυνδυασμένο υποδοχέα, στις οποίες τα ενδοκυτταρικά πεδία των CD4 και CD8 ανταλλάσσονται, η δρομολόγηση της καταγωγής τους ελέγχεται από την απόληξη του ενδοκυτταρικού σήματος του υποδοχέα. Θυμοκύτταρα που είναι ειδικά στο MHC τύπου II, κατά την απουσία κυττάρων που εκφράζουν CD4 αναπτύσσονται σε CD8 θυμοκύτταρα. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις εστέρα φορμόλης ή ιονομυκίνης παράγονταν τα CD8 T κύτταρα, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις αυτών των φαρμάκων παράγονταν τα CD4 T κύτταρα. Σε άλλα πειράματα ο TCR των DP θυμοκυττάρων διασυνδεόταν με CD4 ή CD8 ή TCR και παράγονταν SD θυμοκύτταρα μέχρι ένα ποσοστό μετάβασης περίπου 90%. Μελέτες περί κινητικής για την επιλογή της αποτελεσματικότητας των CD4 και CD8 T κυττάρων είχαν ως αποτέλεσμα ποσοστά επιλογής μέχρι 40% για τα CD8 T κύτταρα και 90% για τα CD4 (Itano et al. 2000).





Σχήμα 5.1: Η ισχύς του μοντέλου σηματοδότησης στην ανάπτυξη των CD4 και CD8 T κυττάρων.



#### 5.4. Ανάπτυξη των NKT κυττάρων και συμβατική ανάπτυξη των T κυττάρων

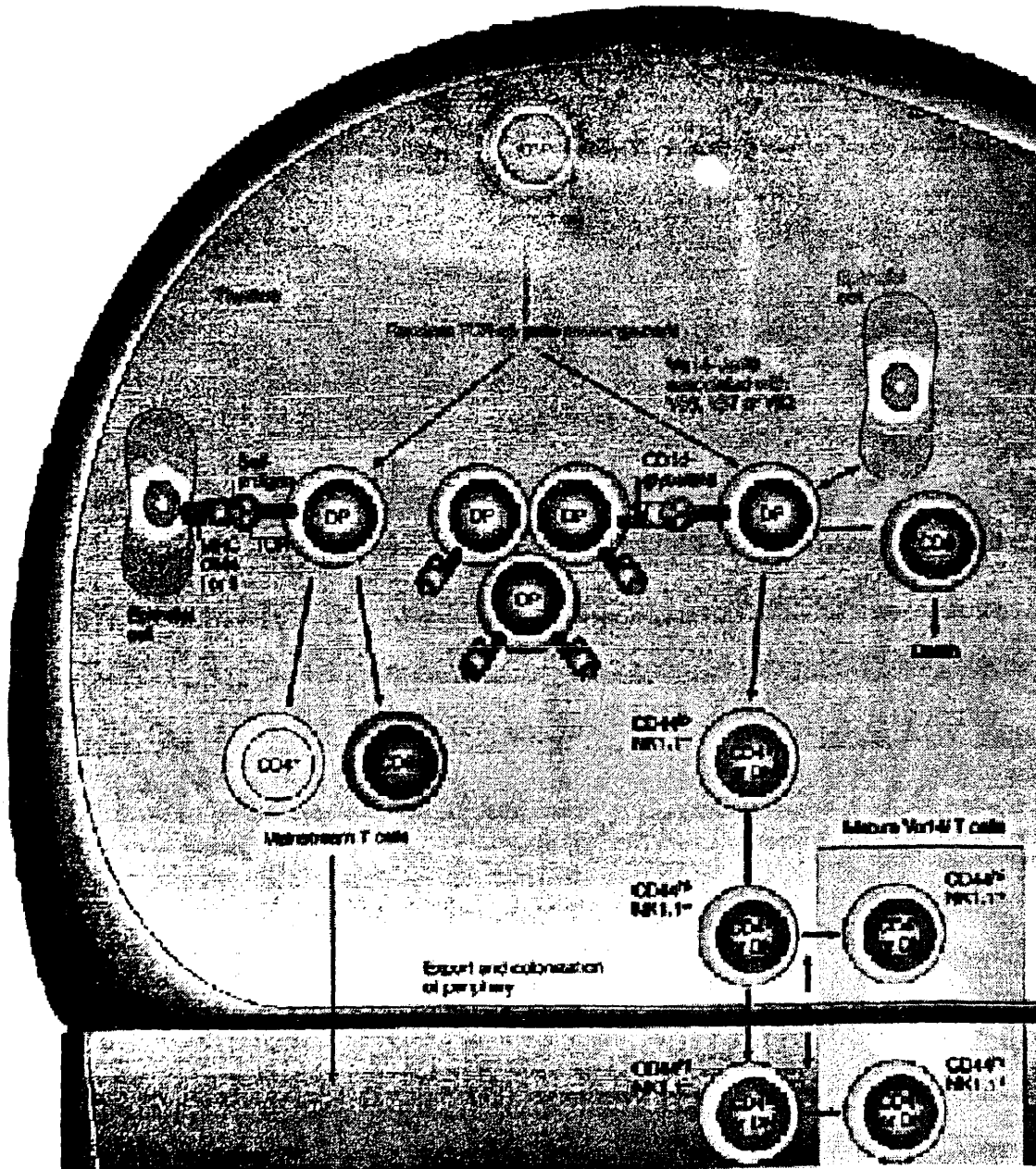
Τα NKT κύτταρα ακολουθούν μια παρόμοια αναπτυξιακή οδό όπως τα T κύτταρα, αλλά με πολλές διαφορές (εικόνα 5.2). Νεογνά ποντίκια στα οποία έχει αφαιρεθεί ο θύμος αδένας δείχνουν μείωση των NKT κυττάρων (Hammond et al. 1998). Εξάλλου, μια άθικτη δομή θύμου αδένου είναι απαραίτητη (Nakagawa et al. 1997). Στα ποντίκια με ελαττωματική δομή του θύμου αδένου (π.χ. ποντίκια *aly/aly*), τα NKT κύτταρα μειώνονται ενώ τα συμβατικά T κύτταρα παραμένουν σταθερά. Τα ποντίκια *aly/aly* έχουν ελάχιστα κατανοητή φλοιομυελική σύνδεση και μη ξεκάθαρα οριοθετημένη περιοχή. Η μυελική περιοχή είναι εξαιρετικά μικρή και τα μυελικά επιθηλιακά κύτταρα είναι αραιά, καθώς στον φλοιό υπάρχουν πυκνότεροι δικτυωτοί ινοβλάστες από ό,τι στα ποντίκια *aly/+*. Τα αντίγραφα Va14-Ja281 βρίσκονταν μόνο στον θύμο αδένου των ποντικίων και όχι στον μυελό των οστών (μια προτεινόμενη εναλλακτική περιοχή ανάπτυξης) (Tilloy et al. 1999). Στον θύμο αδένου έχουν ανιχνευτεί τα πρόδρομα NKT κύτταρα (NK1.1-CD4+) χρησιμοποιώντας τετραμερή CD1d- $\alpha$ -GalCer (Pellicci et al. 2002). Σε αντίθεση με τα συμβατικά T κύτταρα, τα NKT κύτταρα επιλέγονται από τα CD1d DP θυμοκύτταρα (Garin et al. 2001, Coles and Raulet 2000). Η έκφραση του CD8 έχει ως αποτέλεσμα την απόπτωση. Ακολουθώντας την ισχύ του μοντέλου σηματοδότησης, τα NKT κύτταρα που λαμβάνουν ένα συχνό και μεγάλης έως μέτριας έντασης σήμα πιθανώς αναπτύσσονται σε CD4 NKT κύτταρα, ενώ αυτά που λαμβάνουν ένα μικρό χαμηλής έντασης σήμα γίνονται DN NKT κύτταρα. Πάντως, τέτοια γεγονότα δεν έχουν παρατηρηθεί και είναι μόνο επιστημονική θεωρία. Επίσης, μια ποικιλία από μεταλλάξεις μπορούν να επηρεάσουν την ανάπτυξη των NKT κυττάρων. Εξάλειψη του CD1d έχει ως αποτέλεσμα την μείωσή τους (Hong et al. 1999, Elewaut and Kronenberg 2000, Chiu et al. 2002), και όπως τα συμβατικά T κύτταρα, έτσι και τα NKT κύτταρα απαιτούν πετυχημένη έκφραση και της  $\alpha$ -αλυσίδας και του iTCR (Eberl et al. 1999, Taniguchi et al. 1996). Σε αντίθεση με τα συμβατικά T κύτταρα, τα NKT κύτταρα δεν φαίνεται να προβαίνουν σε αρνητική επιλογή, και ενδεχομένως κρατιούνται υπό έλεγχο από τους KIR υποδοχείς τους (Kronenberg and Garin 2002, Godfrey et al. 2000).

Οι κυτταροκίνες που είναι κρίσιμες για την ανάπτυξη των NKT κυττάρων είναι η IL-7, η IL-15 (Kronenberg and Garin 2002, Godfrey et al. 2000), η λεμφοτοξίνη μεμβράνης (Lta/ $\beta$ ) (Elewaut et al. 2000, Lizuka et al. 1999) και ο διεγερτικός παράγοντας αποικιών κοκκιοκυττάρων μακροφάγων (GM-CSF) (Sato et al. 1999). Σε ποντίκια, η διάσπαση της έκφρασης του γονιδίου της καθεσίνης S έχει ως αποτέλεσμα την εξασθενημένη επιλογή και λειτουργία των NKT κυττάρων (Riese et al. 2001). Επίσης, η έκφραση της κοινής  $\gamma$ -αλυσίδας είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη των NKT κυττάρων. Όπως τα συμβατικά T κύτταρα, τα NKT κύτταρα





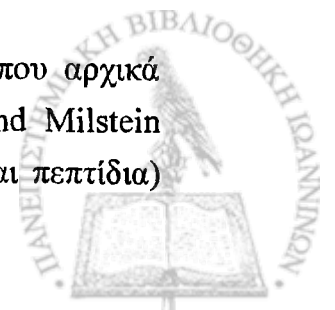
απαιτούν και τον RAG 1 και 2 για την πετυχημένη έκφραση του υποδοχέα TCR (Godfrey et al. 2000). Τα NKT κύτταρα, σε αντίθεση με τα συμβατικά T κύτταρα, είναι εξαρτώμενα από τη σηματοδότηση του παράγοντα Fyn (Tomura et al. 1998, Eberl et al. 1998). Επίσης, η απαλοιφή της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Ets-1 έχει ως αποτέλεσμα την μείωσή τους (Walunas et al. 2000).



Σχήμα 5.2: Η αναπτυξιακή οδός των NKT κυττάρων.

### 5.5. Τα NKT κύτταρα και το CD1d

Η οικογένεια CD1 είναι μια ομάδα μη κλασικών μορίων MHC που αρχικά ανακαλύφθηκαν με την χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων (Calabi and Milstein 2000). Η οικογένεια αυτή παρουσιάζει υδροφοβικά αντιγόνα (λιπίδια και πεπτιδια)



(Gumperz and Brenner 2001) στα ανοσολογικά συστήματα και έχει αναφερθεί ως η τρίτη αντιγονοπαρουσιαστική οδός. Η ανακάλυψη αυτού του συστήματος απέδωσε καινούργιους ρόλους στα T κύτταρα όσον αφορά την επίκτητη κυτταρική ανοσία: την αναγνώριση των αντιγόνων γλυκολιπιδίων και την αποβολή συσχετιζόμενων παθογόνων. Αυτή η διαδικασία της αντιγονοπαρουσίασης λιπιδίων παραλληλίζεται με παραδοσιακά αντιγονο-παρουσιαστικά πεπτίδια και χρησιμοποιεί παρόμοιες ενδοκυτταρικές περιοχές (Matsuda and Kronenberg 2001, Moody and Porcelli 2001). Τα CD1 γονίδια επιδεικνύουν μια έλλειψη πολυμορφισμού (Porcelli and Modlin 1999). Αυτή η έλλειψη της ποικιλομορφίας προτείνει ότι υπάρχουν ξεχωριστές εξελιγμένες πιέσεις στο να διατηρούν αυτές τις γενετικές αλληλουχίες. Επίσης, τα μόρια CD1 έχουν ρόλο στην παρουσίαση των αυτοαντιγόνων στο ανοσολογικό σύστημα, υποδεικνύοντας ότι παίζουν έναν ρόλο στην ρύθμιση της ανοσίας και στην επιτήρηση των όγκων (Matsuda and Kronenberg 2001).

### 5.6. Αντικαρκινικές αντιδράσεις των NKT κυττάρων

Τα NKT κύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στην καταστροφή όγκων σε τρία καρκινικά μοντέλα ποντικών. Τα τρία αυτά μοντέλα είναι το μοντέλο μεσολάβησης απόρριψης με IL-12, το α-GalCer μοντέλο απόρριψης και το φυσικό μοντέλο απόρριψης (Smyth et al. 2002).

Στο πρώτο μοντέλο, τα NKT είναι ενεργοποιημένα και αντιμεταστατικά σε χαμηλές δόσεις ιντερλευκίνης 12 (Smyth et al. 2002, Takeda et al. 2000, cui et al. 1997). Τα NKT κύτταρα ενεργοποιούν NK κύτταρα για να θανατώσουν καρκινικά κύτταρα, αλλά οι ρόλοι των μακροφάγων και CD8+ κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων παραμένουν άγνωστοι σε αυτή τη διαδικασία. Η λύση των όγκων απαιτεί IL-12, περφορίνη και IFN- $\gamma$ . Σε υψηλές δόσεις IL-12, και τα NKT και τα NK κύτταρα ενεργοποιούνται για να παράγουν IFN- $\gamma$  (Smyth et al. 2002). Όλες οι παρατηρήσεις δίνουν έμφαση στον ρόλο των NKT κυττάρων έναντι όγκων με τη χρήση της IL-12.

Στο δεύτερο μοντέλο, το α-GalCer παρουσιάζεται από τα αντιγονο-παρουσιαστικά κύτταρα (APCs) στα NKT κύτταρα με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των τελευταίων. Αυτή η ενεργοποίηση ενισχύεται με την έκκριση της IL-12 από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Επιπλέον, τα NKT κύτταρα εκκρίνουν IFN- $\gamma$ , το οποίο ενεργοποιεί τα NK κύτταρα και διεγείρει περαιτέρω την δράση του APC. Ο ρόλος των μακροφάγων και των CD8+ λεμφοκυττάρων και σε αυτό το μοντέλο δεν είναι ξεκάθαρος. Η λύση των όγκων είναι εξαρτώμενη από την IL-12 και το IFN- $\gamma$ , αλλά ανεξάρτητη από περφορίνη (Kawano et al. 1998, Kawano et al. 1997, Smyth et al. 2000). Τα NKT κύτταρα μπορούν να θανατώνουν απευθείας όγκους σε ποντικά *in vitro* (Kawano et al. 1998).



Το τρίτο μοντέλο ανακαλύφθηκε με την χρήση μεθυλγολανθρίνης (MCA) που προκάλεσε αύξηση των όγκων. Σε αυτό το μοντέλο, ενδογενές αντιγόνο γλυκολιπιδίου (πιθανώς προερχόμενο από όγκο) παρουσιάζεται στα NKT κύτταρα από τα APCs. Αυτό το μοντέλο είναι παρόμοιο με το δεύτερο, με την διαφορά ότι δεν είναι απαραίτητη η περφορίνη για τη θανάτωση των όγκων. Επίσης, τα NK κύτταρα και τα CD8+ κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα ενεργοποιούνται από IFN- $\gamma$  για την θανάτωση όγκων. Σε αυτό το μοντέλο, τα NKT κύτταρα είναι ουσιαστικά για προστασία, σε σχέση με άλλα μοντέλα όπου τα NKT κύτταρα είναι προστατευτικά μόνο όταν χορηγείται ενδογενής IL-12 ή  $\alpha$ -GalCer (Smyth et al. 2000).



## 6. Η ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ ΚΑΙ ΤΑ ΝΚ ΚΥΤΤΑΡΑ

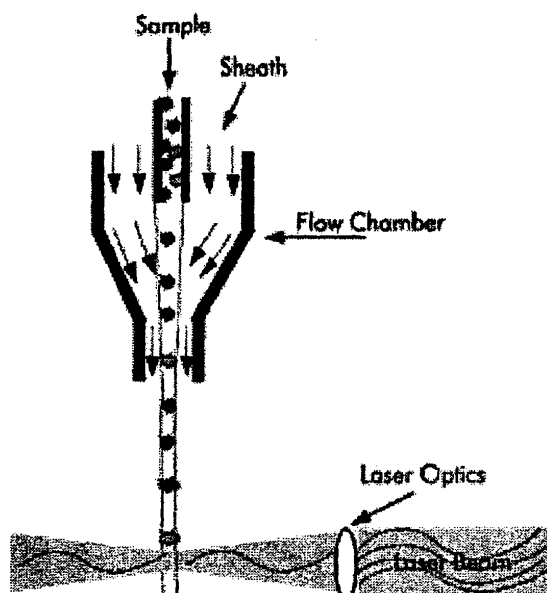
Αν και οι ρίζες της κυτταρομετρίας ροής εντοπίζονται στις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα, η εκτενής χρήση της ξεκινάει γύρω στο 1970 με τις πρώτες πολυμήχανες εμπορικές επινοήσεις. Στο κλινικό εργαστήριο όμως εφαρμόστηκε στα μέσα της δεκαετίας του 1980 λόγω της εξάπλωσης του AIDS και φυσικά και της αύξησης εφαρμογής της παρασκευής και σήμανσης των μονοκλωνικών αντισωμάτων. Το αποτέλεσμα είναι ότι μέχρι και σήμερα πάνω από 30.000 κυτταρομετρητές ροής και κυτταροδιαχωριστές ροής υπάρχουν διεθνώς σε εργαστήρια. Τα μηχανήματα αυτά είναι υψηλού κοστολογίου αλλά προσφέρουν λεπτομερειακές επιστημονικές πληροφορίες και εφαρμόζονται από ιδιαίτερα εξειδικευμένο προσωπικό.

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μια γρήγορη τεχνική, ποσοτική, δυναμική και πολυπαραμετρική, και βασίζεται στην ανάλυση του κάθε κυττάρου ξεχωριστά. Η σχεδιάσή της έγινε με τέτοιο τρόπο, ώστε να ενισχύσει τη μικροσκοπική ανάλυση των κυττάρων με χρήση φθορίζοντων ιχνηθετών και υποστρωμάτων. Στην αρχή δημιουργήθηκε μόνο για κυτταροδιαχωρισμό, αλλά σήμερα αποτελεί σημαντικό εργαλείο στα κλινικά και ερευνητικά εργαστήρια.

Βασική προϋπόθεση για την διαδικασία επεξεργασίας δειγμάτων είναι ότι το δείγμα πρέπει να βρίσκεται σε μορφή εναιωρήματος και συνήθως είναι ολικό αίμα. Στην συνέχεια γίνεται προσθήκη ενός ή περισσότερων μονοκλωνικών αντισωμάτων που έχουν σημαθεί με τις κατάλληλες φθορίζουσες χρωστικές και το δείγμα υφίσταται επεξεργασία ανάλογα με τον προσδιορισμό, 15 έως 45 λεπτά συνήθως. Πρωταρχικός στόχος είναι τα αντισώματα να συνδεθούν στην επιφάνεια ή στο εσωτερικό των κυττάρων με τα αντίστοιχα αντιγόνα (Herzenberg and De Rosa 2000).

Οι παράμετροι που αξιολογούνται κατά την ανάλυση των δειγμάτων είναι η σκέδαση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας στα κύτταρα καθώς και η παραγόμενη φθορίζουσα ακτινοβολία. Προϋπόθεση είναι τα κύτταρα να διέρχονται ένα-ένα μέσα από την κυψελίδα ροής και κατά συνέπεια και από το σημείο που συναντώνται με την προσπίπτουσα ακτινοβολία, γεγονός που επιτυγχάνεται μέσω της υδροδυναμικής εστίασης (Σχήμα 6.1).



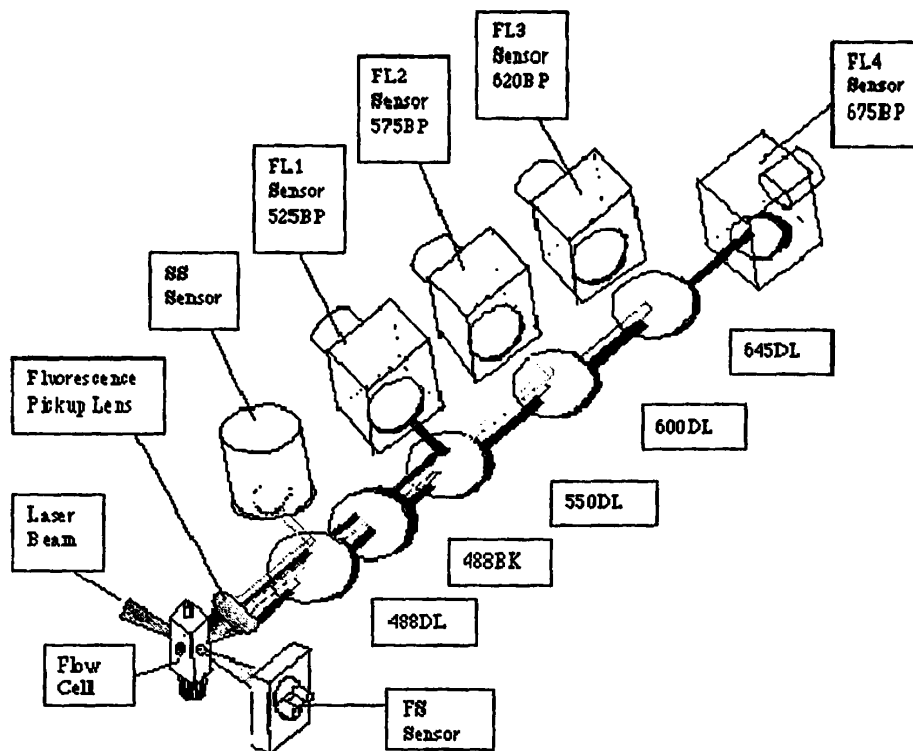


Σχήμα 6.1: Διάταξη κυψελίδας ροής σε κυτταρομετρητή ροής. Διακρίνεται η κεντρική ροή του δείγματος, η περιβάλλουσα ροή (sheath), η προερχόμενη από laser φωτεινή δέσμη ακτινοβολίας και η σκέδαση της ακτινοβολίας μετά από πρόσπτωση σε ένα κύτταρο.

Στην κυψελίδα ροής υπάρχουν δύο ρεύματα: η κεντρική ροή του δείγματος, που ρυθμίζεται έτσι ώστε να είναι στρωτή και νηματική, και η περιβάλλουσα ροή (sheath flow) που δεν αναμιγνύεται με το δείγμα. Η ακτινοβολία, που συνήθως προέρχεται από ένα laser (συνήθως ιόντων αργού 488nm), ως πηγή ενέργειας είναι απαραίτητη για την διέγερση των φθορίζουσών χρωστικών. Ταυτόχρονα όμως καθώς προσπίπτει πάνω στα κύτταρα σκεδάζεται στον χώρο. Το σκεδαζόμενο φως μετρείται από τον κυτταρομετρητή ροής σε μικρή γωνία ( $1-19^\circ$ ), πρόσθια σκέδαση (FS, Forward Scatter), αλλά και σε  $90^\circ$ , πλάγια σκέδαση (Side Scatter). Η σκέδαση εξαρτάται από τα φυσικά χαρακτηριστικά των κυττάρων (Σχήμα 6.2). Το αποτέλεσμα είναι να διαχωρίζεται ο κυτταρικός πληθυσμός ανάλογα με το μέγεθος (FS) και την κοκκίωση (SS). Κατ' αυτόν τον τρόπο, είναι εφικτό να απομονωθεί ηλεκτρονικά ο πληθυσμός που θα υποστεί επεξεργασία, με τον σχηματισμό γύρω από αυτόν μιας περιφράξης (gate) (Marti et al. 2001). Το επόμενο βήμα στην ανάλυση είναι ο προσδιορισμός των αντιγόνων των κυττάρων μέσω των παραγόμενων σημάτων φθορισμού από τα σημασμένα μονοκλωνικά αντισώματα. Για να παρατηρηθεί το φαινόμενο του φθορισμού οι φθορίζουσες ουσίες απαιτούν μια πηγή ενέργειας συγκεκριμένου μήκους κύματος, δηλαδή ακτινοβολία η οποία προέρχεται από laser, με πλεονέκτημα την παραγωγή μονοχρωματικής και σταθερής ακτινοβολίας. Οι φθορίζουσες



χρωστικές αφού διεγερθούν εκπέμπουν σε διάφορα μήκη κύματος μεγαλύτερης διέγερσης.



Σχήμα 6.2: Σχηματική απεικόνιση της οπτικής διάταξης του κυτταρομετρητή ροής. Διαθέτει μια φωτεινή πηγή laser και 4 φωτοπολλαπλασιαστές για την ταυτόχρονη ανίχνευση 4 φθοριοχρωμάτων (FITC, PE, ECD/PI και PC5/PerC/PC5.5). Οι περιοχές FL1 έως FL4 απεικονίζουν ξεχωριστά τους πληθυσμούς που επισημαίνονται με φθοριοχρώματα.

Η εκπομπή αποτελεί ένα φάσμα ακτινοβολίας, για τον λόγο αυτόν είναι πιθανό να υπάρχει και επικάλυψη φθοριοχρωμάτων, η οποία μπορεί να διορθωθεί μέσω του λογισμικού (compensation) (Herzenberg and De Rosa 2000). Το πλεονέκτημα στους κυτταρομετρητές ροής είναι ότι από μια πηγή ενέργειας (ένα laser) μπορεί να υπάρχει ταυτόχρονη εκπομπή και προσδιορισμός 3-5 φθοριοχρωμάτων, ανάλογα με το μηχάνημα που είναι διαθέσιμο. Αυτό μεταφράζεται, στο ότι με την τεχνική αυτή μπορούν να προσδιοριστούν σε ένα σωληνάριο δείγματος 3-5 αντιγόνα ταυτόχρονα στην κυτταρική μεμβράνη ενός κυττάρου, καθώς και η συνέκφρασή τους. Η ταχύτητα ανάλυσης φτάνει έως και 3500 κύτταρα/sec (Ibrahim and Van denEngh 2003). Οι κορυφές που χρησιμοποιούνται και διεγείρονται από laser 488nm είναι συνήθως η φλουορεσκεΐνη (FITC), η φυκοερυθρίνη-κυκλίνη 5 (PC5), η Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP) και η PE, με κορυφές στο φάσμα εκπομπής στα 525nm (πράσινο), 575 nm (κίτρινο), 620 nm (πορτοκαλί) και 675 nm (κόκκινο) αντίστοιχα (Σχήμα 6.2) (Marti et al. 2001). Τα σήματα τα οποία μπορούν να συνυπάρξουν σε ένα ιστόγραμμα δεν είναι αποκλειστικά φθορισμοί ή σκέδαση. Ιδιαίτερα χρήσιμες πληροφορίες

προκύπτουν από το συνδυασμό των σημάτων SS και κάποιου φθορισμού (FL1-5), ανάλογα με τι φθοριόχρωμα έχει σημανθεί ο υπό μελέτη πληθυσμός. Πολλές φορές για να εξαχθεί ένα αποτέλεσμα είναι απαραίτητη η χρήση περισσότερων της μιας περιφράξης.

Η ανάλυση των δειγμάτων με κυτταρομετρία ροής δεν γίνεται όπως σε ένα κλειστό σύστημα αναλυτή, όπως π.χ. στους βιοχημικούς ή ακόμα και στους αιματολογικούς αναλυτές. Ανάλογα με το σύστημα που διαθέτουν οι χρήστες, την εμπειρία τους και τη διαθεσιμότητα των μονοκλωνικών αντισωμάτων, μπορεί ο τρόπος ανάλυσης του ίδιου δείγματος να διαφοροποιείται από εργαστήριο σε εργαστήριο. Επίσης, το γεγονός ότι ο χρήστης μέσω του λογισμικού έχει τη δυνατότητα να επεμβαίνει στην ανάλυση, συνεπάγεται και υποκειμενικότητα σε κάποιον βαθμό (Marti et al. 2001).

Η κυτταρομετρία ροής είναι από τις πιο ακριβείς τεχνολογίες όσον αφορά τον προσδιορισμό των NK και NKT κυττάρων. Αυτό πραγματοποιείται είτε με τον προσδιορισμό των συγκεκριμένων κυττάρων που προέρχονται από τον μυελό σε περιφερικό αίμα (ανοσοφαινότυπος), είτε με τον έλεγχο της κυτταροτοξικής δράσης των εν λόγω κυττάρων. Η λεπτομερής αναφορά των τεχνικών αυτών αναλύεται στο ειδικό μέρος «Υλικά και Μέθοδοι». Και οι δύο αυτοί δείκτες είναι πολύ σημαντικοί και είναι τελείως διαφορετικοί. Ο απόλυτος αριθμός των δραστικών αυτών κυττάρων είναι ένας δείκτης που υποδηλώνει την αύξηση ή μείωσή τους ανάλογα με τις παθολογικές καταστάσεις που αντιμετωπίζει το ανοσοποιητικό σύστημα, και από την άλλη μεριά εξέχουσα σημασία έχει και η κυτταροτοξική δράση, το πόσο δηλαδή λειτουργικά είναι τα NK και NKT κύτταρα για τον έλεγχο της ανοσοθεραπείας από εκφυλιστικές παθήσεις, στην αναπαραγωγική ιατρική και σε άλλες ειδικότητες.

Επίσης, η κυτταρομετρία ροής αποτελεί ένα χρήσιμο βοήθημα στην κυτταρολογία αλλά και στην μελέτη των συμπαγών όγκων. Άλλα βιολογικά υγρά, όπως βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα, ENY, υαλοειδές και υδατοειδές υγρό ή ούρα, μπορούν επίσης να αναλυθούν με κυτταρομετρία ροής (Marti et al. 2001). Πλεονέκτημα αποτελεί το γεγονός ότι τα αποτελέσματα αποθηκεύονται και μπορούν να ανακληθούν ανά πάσα στιγμή για περαιτέρω μελέτη. Παράλληλα, πρέπει να τονιστεί ότι επειδή η κυτταρομετρία ροής στερείται της δυνατότητας μορφολογικής ανάλυσης, μπορεί συχνά να είναι απαραίτητη η συνεισφορά του μικροσκοπίου καθώς και μοριακών τεχνικών.



## 7. ΤΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΚΑΙ ΤΑ ΝΚ ΚΥΤΤΑΡΑ

### 7.1. Γενικά για τα αντιοξειδωτικά

Τα αντιοξειδωτικά λειτουργούν σαν δεύτερη γραμμή άμυνας, μειώνοντας την βλάβη που προκαλείται από υδροξυλικές και άλλες ρίζες ενδογενούς και εξωγενούς προέλευσης. Αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες και σχηματίζουν προϊόντα που διακόπτουν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις. Από την άλλη μεριά, η υπεροξειοδισμουτάση, η καταλάση και οι υπεροξειδάσες διατηρούν χαμηλά την συγκέντρωση της ρίζας υπεροξειδίου και του οξυγονούχου ύδατος. Για τον λόγο αυτό, τα εν λόγω ένζυμα αποτελούν την πρώτη γραμμή της άμυνας του οργανισμού. Τα αντιοξειδωτικά μπορεί να είναι φυσικές ουσίες μεμονωμένες, εκχυλίσματα φυτών, ένζυμα, μέταλλα, ιχνοστοιχεία ή συνθετικές ουσίες, ακόμα και σύμπλοκα. Οι τοκοφερόλες – με πιο διαδεδομένη την α-τοκοφερόλη – βρίσκονται κυρίως στις κυτταρικές μεμβράνες και αποτελούν τα κύρια φυσικά αντιοξειδωτικά (Makoto and Mino 1989, Desai 1989). Τα συνθετικά αντιοξειδωτικά είναι συνθετικές ουσίες με αντιοξειδωτική δράση. Χρησιμοποιούνται συνήθως ως συντηρητικά για διατήρηση λιπών, ελαίων, κονσερβών, φαρμάκων, προστασία βιταμίνης C, E και άλλων ουσιών που οξειδώνονται εύκολα. Μερικές από τις συνήθειες αντιοξειδωτικές ουσίες είναι: βουτυλικό υδροξυτολουένιο (BHT), βουτυλική υδροξυανισόλη (BHA), νορ-διυδρογουαιαρετικό οξύ (NDGA), γαλλικό προπύλιο, N-N-διαφαινυλ-P-φαινυλένο-διαμίνη (DPPD), 6-διυδροξυ-1.4-διμεθυλκαρβαζόλη.

*Μέταλλα:* Πολλά βιολογικά δραστικά μέταλλα είναι αναστολείς της καρκινογένεσης. Τα μέταλλα κοβάλτιο, ψευδάργυρος, σελήνιο και βανάδιο είναι ισχυροί αναστολείς των πολυκυκλικών αρωματικών καρκινογόνων υδρογονανθράκων (PAH). Το κοβάλτιο στη μορφή νιτρικό νάτριο-κοβάλτιο, όταν χορηγηθεί σε πειραματόζωα μειώνει σημαντικά την επίπτωση του καρκίνου του δέρματος που προκαλείται από την τοπική εφαρμογή του μεθυλχολανθρενίου (Orzechowski et al. 1965). Η χορήγηση ψευδαργύρου ως συμπληρωματικού της διαίτας εκφράζει ανασταλτική δράση στον σχηματισμό όγκου από διμεθυλβενζανθρακένιο (Poswillo 1971). Η αύξηση του όγκου που επάγεται από εμφύτευση DMBA στους υπογνάθιους αδένες των ποντικών albino καθυστερεί με την παρουσία ψευδαργύρου στο πόσιμο νερό τους (Ciapparell et al 1972). Στην ομάδα των ποντικών που έπινε απιονισμένο νερό, καλώς διαφοροποιημένα επιδερμοειδή καρκινώματα αναπτύχθηκαν στους υπογνάθιους αδένες. Αυξάνοντας





την συγκέντρωση του ψευδαργύρου στο πόσιμο νερό, το νεοπλασματικό επιθήλιο αρχίζει να μειώνεται και η φλεγμονώδης απάντηση γίνεται περισσότερο εμφανής.

Το σελήνιο στην μορφή του νατριούχου σεληνίου μειώνει τον αριθμό των όγκων σε ποντίκια και τον ολικό αριθμό όγκων που δημιουργούνται από τοπική εφαρμογή κροτωνελαίου σε πειραματόζωα (Shamberger 1970). Το σελήνιο ανήκει στην ομάδα των αντιοξειδωτικών τα οποία είναι ισχυροί αναστολείς της χημικής καρκινογένεσης από καρκινογόνα PA (Shapiro 1972).

Το βανάδιο είναι επίσης ένας ισχυρός αναστολέας της χημικής καρκινογένεσης. Οι καρκινογόνες ιδιότητες πολλών PAH εξαφανίζονται παρουσία οξειδίου του βαναδίου. Το οξείδιο του βαναδίου επιδρά στην καταλυτική οξείδωση των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων προς μη καρκινογόνα προϊόντα (Bear et al. 1975).

*Βιταμίνες:* Μερικές βιταμίνες αποτελούν σημαντικούς πιθανούς αναστολείς της καρκινογένεσης. Εκτός του ότι αποτελούν απαραίτητα συστατικά για τις φυσιολογικές λειτουργίες των ζωικών οργανισμών, έχουν πολύ χαμηλή τοξικότητα, μπορούν επίσης να αποτελέσουν παράγοντες που θα χρησιμοποιηθούν για την πρόληψη και ίσως μερικές φορές και για την θεραπεία των κακοήθων νόσων.

**Βιταμίνη Α:** Η βιταμίνη Α είναι ένας αναστολέας της καρκινογένεσης (Shamberger 1971). Η επαγωγή των όγκων του στομάχου και του τραχήλου που προκαλείται από PAH σε ποντίκια, αναστέλλεται με την βιταμίνη Α. Οι (Saffiotti et al. 1967) έδειξαν ότι η βιταμίνη Α αναστέλλει την χημική επαγωγή της τραχειοβρογχικής επιθηλιακής μεταπλασίας και τους επιθηλιακούς όγκους. Τα άλφα και βήτα-ρετινοϊκά οξέα αναστρέφουν τη μεταπλασία που οφείλεται σε έλλειψη της βιταμίνης Α σε τραχείες hamster, καθώς και σε καλλιέργειες οργάνων. Το ρετινοϊκό οξύ επίσης αναστέλλει τους όγκους του μαστού που προκαλούνται από τη χορήγηση διμεθυλβενζανθρακένιου.

Υψηλές τοξικές δόσεις βιταμίνης Α μπορεί να εκφράζουν επαγωγική δράση για τον όγκο. Η κατάσταση με την βιταμίνη Α είναι όμοια με αυτήν που παρατηρήθηκε με πολλές αμίνες, που ανάλογα με τις συνθήκες μπορεί να δρουν είτε ως αναστολείς είτε ως επαγωγείς της χημικής καρκινογένεσης και της αύξησης του όγκου. Τα μειονεκτήματα που παρατηρήθηκαν στη βιταμίνη Α ξεπεράστηκαν μέχρι ενός σημείου από την χρήση συνθετικών αναλόγων, που είναι λιγότερα τοξικά και περισσότερο δραστικά στην πρόληψη της καρκινογένεσης (Saffiotti et al. 1967).

**Βιταμίνη Β<sub>1</sub> (θειαμίνη):** Πειραματικές έρευνες έδειξαν ότι νεαρά καρκινικά κύτταρα μεταξύ καλλιιεργειών των ιστών επαναδιαφοροποιούνται σε φυσιολογικά κύτταρα παρουσία της βιταμίνης Β<sub>1</sub>. Η Βιταμίνη Β<sub>1</sub> είναι ένας πιθανός αναστολέας της καρκινογένεσης προστατεύοντας τα κύτταρα του εμβρύου όρνιθας από κακοήθη



διαφοροποίηση και μεταστρέφοντας τις παθολογικές κυτταρικές μεταβολές σε φυσιολογικούς μηχανισμούς (Warburg et al. 1970).

Βιταμίνη B<sub>2</sub> (Ριβοφλαβίνη): Πολλές μελέτες (Shamberger 1971) έδειξαν ότι η ριβοφλαβίνη μερικώς προστατεύει τα πειραματόζωα από την επαγωγή των όγκων από καρκινογόνα. Συνθετικά παρασκευασμένη ριβοφλαβίνη και ανάλογά της μπορούν να αναστείλουν την καρκινογένεση. Άλλες μελέτες έδειξαν ότι η ανεπάρκεια της βιταμίνης B<sub>2</sub> αναστέλλει την ανάπτυξη των όγκων σε πειραματόζωα και πιθανόν και στον άνθρωπο. Μέρος των αντιφατικών αποτελεσμάτων ερμηνεύεται από τις διαφορετικές συνθήκες σε κάθε έρευνα.

Η ανεπάρκεια της βιταμίνης B<sub>2</sub> προκαλεί στον άνθρωπο και στα πειραματόζωα μια σειρά από επιθηλιακές αλλαγές, όπως είναι ατροφία του επιθηλίου του οισοφάγου και του στομάχου, επιθηλιακή υπερπλασία και υπερκεράτωση, αλωπεκία, έλκη και δερματίτιδες. Παρατηρήσεις έδειξαν ότι η ανεπάρκεια της βιταμίνης σε νεαρά ποντίκια αυξάνει τον λόγο της χημικής καρκινογένεσης που προκαλείται από τοπική εφαρμογή DMBA και κροτωνελαίου, όπου αναπτύσσεται καρκίνος ταχύτερα και σε μεγαλύτερους αριθμούς στην ομάδα με ανεπάρκεια ριβοφλαβίνης παρά στην ομάδα ελέγχου. Η επαγωγή των όγκων είναι αυξημένη και ο συνολικός αριθμός των όγκων ανά πειραματόζωο που αναπτύσσει καρκίνο είναι αυξημένος επίσης. Το φαινόμενο της αναστολής / επαγωγής μπορεί να ερμηνευτεί με το δεδομένο ότι κάτω από αυτές τις πειραματικές συνθήκες (σε πειραματόζωα με τοπική εφαρμογή καρκινογόνου και χορήγηση δίαιτας με φυσιολογικές ποσότητες ριβοφλαβίνης), μπορεί να παρατηρηθεί μια σημαντική αύξηση της δραστηριότητας της αρυλ-υδροξυλάσης, με αποτέλεσμα την αύξηση του σχηματισμού ενδιάμεσων μεταβολιτών του DMBA που αυξάνουν την σύνδεση του καρκινογόνου με το DNA.

Βιταμίνη C: Η βιταμίνη C είναι στενά συνδεδεμένη με την νόσο σκορβούτο και με τον καρκίνο. Καθαρό L-ασκορβικό οξύ παρασκευάστηκε για πρώτη φορά το 1928 από τον Albert Szent-Gyorgyi, αλλά μόλις το 1932 διαπιστώθηκε ότι η ουσία αυτή είναι η βιταμίνη C. Ο Greer χορηγώντας δόσεις από 24-42 γραμμάρια ασκορβικού οξέος σε περιπτώσεις μυελογενούς λευχαιμίας πέτυχε πλήρη ύφεση (Greer 1954). Οι αντικαρκινικές ιδιότητες του ασκορβικού και των οξειδωτικών του προϊόντων ανασκοπήθηκαν από τους Namamura και Yamafuji το 1968.

Από τα πειραματικά δεδομένα γίνεται αντιληπτός ο μηχανισμός της δράσης του ασκορβικού οξέος. Μερικά από αυτά είναι ιδιαίτερου ενδιαφέροντος όπως: αυξημένη λεμφοκυτταρική βλαστογένεση με την από του στόματος χορήγηση ασκορβικού, *in vitro* αδρανοποίηση ιών με ασκορβικό οξύ και χρήση του στη πρόληψη και την θεραπεία νεοπλασματικών νόσων προερχομένων από ιούς. Η χορήγηση βιταμίνης C υποτίθεται ότι αυξάνει την φυσική αντίσταση του οργανισμού και τον βοηθά να αντιμετωπίζει καλύτερα τις παθολογικές καταστάσεις. Μία νέα άποψη σχετικά με την διαφοροποίηση των κυττάρων εισήχθη από τους Cameron και Pauling (Cameron and



Pauling 1973, Cameron and Pauling 1974). Αυτοί υπέθεσαν ότι η ανάπτυξη των κυττάρων ρυθμίζεται από το περιβάλλον τους με τις διακυτταρικές γλυκοζαμινογλυκάνες. Τα κύτταρα ελευθερώνουν το ένζυμο υαλουρονιδάση που προάγει την διαίρεσή τους, την δυσπλασία και την μετανάστευση. Η δυσπλασία συνεχίζεται επί μακρόν, όσο η υαλουρονιδάση ελευθερώνεται, και σταματά με τους φυσιολογικούς αναστολείς της υαλουρονιδάσης. Φυσιολογικός αναστολέας της υαλουρονιδάσης είναι μία ολιγογλυκοζαμινογλυκάνη που απαιτεί ασκορβικό οξύ για την σύνθεσή της. Αυτή η υπόθεση ερμηνεύει τις μεγάλες ποσότητες ασκορβικού οξέος που απαιτούνται σε πολλές καταστάσεις με κυτταρικές δυσπλασίες, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου.

Μια κλινική μελέτη με υψηλές δόσεις ασκορβικού οξέος σε προχωρημένο καρκίνο του ανθρώπου ανακοινώθηκε από τους παραπάνω συγγραφείς. Επρόκειτο για πενήντα ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο που έλαβαν 10 gr ασκορβικό οξύ την ημέρα ενδοφλεβίως ή από του στόματος. Η τελικά χορηγηθείσα συνολική δόση ασκορβικού οξέος ήταν πάνω από 9 κιλά σε δύο περιπτώσεις. Μερικές ευεργετικές απαντήσεις (υφέσεις) παρατηρήθηκαν και ένας αριθμός καρκινοπαθών πέτυχε ικανοποιητικό επίπεδο δραστηριότητας και ζωής. Οι παραπάνω συγγραφείς συμπέραναν ότι «τα κλινικά δεδομένα επιβεβαιώνουν ότι υψηλές δόσεις ασκορβικού οξέος αυξάνουν την φυσική αντίσταση στον καρκίνο».

Βιταμίνη E: Η βιταμίνη E είναι ένα λιποδιαλυτό αντιοξειδωτικό. Τα παράγωγα της βιταμίνης E και άλλα φυσικά ή συνθετικά μη τοξικά αντιοξειδωτικά, τα οποία αναστέλλουν την καρκινογένεση την προκαλούμενη από χημικά καρκινογόνα σε διάφορους ιστούς, μπορούν να θεωρηθούν επιτυχώς αναστολείς της περιβαλλοντικής καρκινογένεσης.

Οι υπόλοιπες ουσίες όπως ρεσβερατρόλη, θυμόλη, απιγενίνη, γενιστεΐνη καρβακρόλη που δοκιμάστηκαν στην παρούσα μελέτη εμφανίζουν *in vitro* μέτρια έως ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα (Δασκάλου 2004, Karkabounas et al. 2006)

#### **Η αντιοξειδωτική δράση των Ηλεκτρομαγνητικών πεδίων(ΗΜΓΠ)**

Η έκθεση σε ΗΜΓνητικά πεδία ραδιοφωνικών συχνοτήτων αυξάνει την αντιοξειδωτική ικανότητα των λεμφοκυττάρων ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα (Islamov et al. 2002). Επίσης *in vitro* μελέτες δείχνουν ότι τα ΗΜΓνητικά πεδία μπορεί να «εκκαθαρίσουν» ελεύθερες ρίζες επιδρώντας στο σπιν των ασύζευκτων ηλεκτρονίων και να προκαλούν ανασυνδιασμό ζευγών ελευθέρων ριζών καθώς και να επιταχύνουν της αντιδράσεις εξουδετέρωσης τους (Grissom 1995). Συμπερασματικά φαινεται από τα δεδομένα της έρευνας ότι μία από τις επιδράσεις των ΗΜΓνητικών πεδίων είναι και η αντιοξειδωτική.



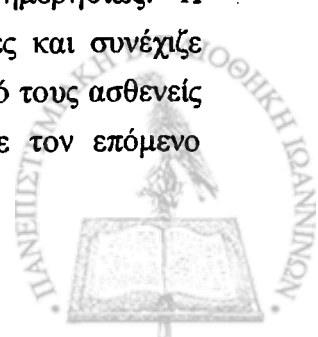
## 7.2. Η δράση των NK κυττάρων με την επίδραση αντιοξειδωτικών

Αρκετές μελέτες πραγματοποιήθηκαν από επιστήμονες τα τελευταία χρόνια σχετικά με την διέγερση των αντιοξειδωτικών ουσιών ή σύμπλοκων φυσικών ουσιών που έχουν ανοσοδιεγερτικές ιδιότητες στα NK κύτταρα. Οι ουσίες αυτές παρατηρήθηκε ότι ενεργοποιούν την λειτουργική διαδικασία των NKCs, χωρίς να αλλάζουν το ποσοστό τους στο περιφερικό αίμα και χωρίς να δημιουργούν παρενέργειες στο ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου. Αυτό είναι μια σημαντική παρατήρηση που μπορεί να προάγει την ανοσοθεραπεία, ιδιαίτερα σε ανθρώπους προσβεβλημένους με συμπαγείς κακοήθεις όγκους που η αντιμετώπισή τους με κλασικές χημειοθεραπευτικές μεθόδους προκάλεσε σοβαρές παρενέργειες.

Σε μία από τις μελέτες, που πραγματοποιήθηκε το 2001 στην Ιατρική Σχολή Αθηνών, χρησιμοποιήθηκε σελήνιο και αφλατοξίνη B1 σε συγκεντρώσεις μικρότερες από  $5 \times 10^{-11} \text{M}$  ή 0.05 ppb και  $10^{-5} \text{M}$ . Οι συγκεκριμένες ουσίες εφαρμόστηκαν σε NK κύτταρα υγιών εθελοντών και η αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε με τη μεθοδολογία του  $^{51}\text{Cr}$ . Οι δύο παραπάνω ουσίες όταν χρησιμοποιήθηκαν ξεχωριστά έδειξαν ανοσοκατασταλτική δράση στην λειτουργία των NK κυττάρων. Από την άλλη μεριά όμως, όταν χρησιμοποιήθηκαν σε συνδυασμό, προκάλεσαν στατιστικά μια σημαντική αύξηση στην κυτταροτοξική δράση των NKCs στην χαμηλότερη συγκέντρωση της αφλατοξίνης B1 (0.005ppb) και σεληνίου ( $10^{-8} \text{M}$ ) (Methenitou et al. 2001).

Επίσης, μελέτη σχετικά με τη δράση των NK κυττάρων και τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες της βιταμίνης C (δόσεις από 500 έως 5000 mg) πραγματοποιήθηκε στην Καλιφόρνια των Η.Π.Α. Σε 25 υγιείς εθελοντές παρατήρησαν τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των NK κυττάρων αλλά δεν παρατήρησαν σημαντικές διαφορές στην αύξηση της λειτουργικότητάς τους σε σχέση με τις διαφορετικές δόσεις που χορηγήθηκε η βιταμίνη C (Vojdani et al. 2001).

Μία από τις σημαντικότερες μελέτες στην οποία παρατηρήθηκε αύξηση του αριθμού των NK κυττάρων μετά από χορήγηση φυσικών ουσιών είναι αυτή του Dr. Ghoneum, όπου χρησιμοποιήθηκε ένα σκεύασμα ονόματι MGN3 (εκχύλισμα αραμπινοξυλάνης από πίτουρο ρυζιού που ενζυματικά αναμείχθηκε με εκχύλισμα μανιταριού *Hypomyces mycelia*). Το σκεύασμα που δημιούργησε ο παραπάνω ερευνητής προκαλεί από τη μια αύξηση στην αποτελεσματικότητα των NK κυττάρων και από την άλλη αυξάνει και τα επίπεδα των ιντερφερονών. Τα ευρήματα του Dr. Ghoneum αφορούσαν 72 ασθενείς. Τη μελέτη την παρουσίασε στην Αμερικανική Ομοσπονδία Έρευνας του καρκίνου και αφορούσε πέντε ασθενείς με καρκίνο μαστού. Σε κάθε ασθενή χορηγούνταν 3 γραμμάρια MGN3 ημερησίως. Η κυτταροτοξική δράση των NKCs αυξήθηκε μέσα σε δυο εβδομάδες και συνέχισε ανοδικά όσο προχωρούσε η μελέτη. Σε διάρκεια 6 έως 8 μηνών, 2 από τους ασθενείς αποκαταστάθηκαν πλήρως. Επίσης, σε μελέτη που συμπληρώθηκε τον επόμενο



χρόνο, σε 27 ασθενείς με διάφορους τύπους καρκίνου όπως μαστού, προστάτη, λευχαιμία και πολλαπλούν μυέλωμα, υπολογίστηκε η λειτουργικότητα των NKCs πριν και μετά την χορήγηση του MGN3 σε χρόνο δυο εβδομάδων. Η δράση των NK κυττάρων αυξήθηκε κατά 154-332% στον καρκίνο μαστού, 174-385% στον καρκίνο προστάτη, 100-240% στην λευχαιμία και 100-537% στο πολλαπλούν μυέλωμα (Ghoneum et al. 1996, Ghoneum 1995, Ghoneum 1998).

Επιπλέον, ένα βαθυπράσινο σκεύασμα που ονομάζεται σπιρουλίνα (μια μορφή από κυανοφύκη) παρατηρήθηκε ότι έχει σημαντικές ιδιότητες. Το 2002 σε μια ιαπωνική μελέτη, σε 12 άνδρες χορηγήθηκε από το στόμα εκχύλισμα σπιρουλίνας σε ζεστό νερό και υπολογίστηκε ο αριθμός και η δράση των NK κυττάρων πριν και μετά την θεραπεία. Στο τέλος της μελέτης σημειώθηκε σημαντική αύξηση του αριθμού αλλά και της κυτταροτοξικής δράσης των NKCs. Οι ερευνητές συμπέραναν ότι η σπιρουλίνα δρα άμεσα και έμμεσα στα NK κύτταρα (Hirahashi et al. 2002). Επίσης, στην Κίνα ερευνητές απέδειξαν την δυναμική δράση της σπιρουλίνας στην μείωση των παρενεργειών τόσο της χημειοθεραπείας όσο και της ακτινοθεραπείας, επιδεικνύοντας την αύξηση των λευκών αιμοσφαιρίων στο περιφερικό αίμα και των εμπύρινων κυττάρων και DNA στον μυελό των οστών (Dasgupta et al. 2001, Zhang et al. 2001).



## ΣΚΟΠΟΣ

Δεδομένου ότι πολλές μελέτες διενεργούνται σχετικά με την διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος για την αντιμετώπιση κακοήθων όγκων, πολλοί ερευνητές – την τελευταία δεκαετία τουλάχιστον – έχουν στρέψει το ενδιαφέρον τους στην δράση και την λειτουργικότητα γενικά των NK κυττάρων.

Στο πλαίσιο της φυσικής ανοσίας έγινε γνωστό ότι τα κυτταροκτόνα λεμφοκύτταρα NK παίζουν σημαντικότατο ρόλο στην εξολόθρευση καρκινικών όγκων, ιών και βακτηριδίων. Ο ρόλος των NK κυττάρων θεωρείται σημαντικότατος στην ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος του ανθρώπου.

Με την πάροδο του χρόνου επιβεβαιώθηκε ότι είναι απαραίτητη όχι μόνο η παρουσία των συγκεκριμένων κυττάρων, αλλά και η λειτουργικότητά τους σαν προγνωστικός και σαν θεραπευτικός παράγοντας. Δηλαδή, η ρύθμιση των NK κυττάρων στην ανοσοδιέγερση κατά του καρκίνου αποτελεί την κατακλείδα στην ομαλή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος ακόμα και για προληπτικούς σκοπούς. Η αποτυχία της ρύθμισης αυτών των κυττάρων μπορεί να επιταχύνει την ανάπτυξη των όγκων, με οδυνηρές συνέπειες για ζωτικούς ιστούς και όργανα αλλά και για όλο τον ανθρώπινο οργανισμό.

Το Εργαστήριο της Φυσιολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων ασχολείται εδώ και τριάντα και πλέον χρόνια με την έρευνα του καρκίνου, και ειδικότερα με την μελέτη φυσικών ουσιών ή αντιοξειδωτικών που έχουν αντικαρκινικές ιδιότητες και συμβάλλουν σημαντικά στην πρόληψη από την επάρατη νόσο.

Δεδομένων λοιπόν των αντικαρκινικών ιδιοτήτων ουσιών που βρίσκονται συνήθως στη φύση ή στον ανθρώπινο οργανισμό, σχεδιάστηκε μια πρωτοποριακή μεθοδολογία με βάση την τεχνολογία της κυτταρομετρίας ροής, η οποία παρουσιάζει ορισμένες ενδείξεις για την επίδραση των συγκεκριμένων σκευασμάτων στα NK κύτταρα, αλλά ακόμα και για την άμεση επίδρασή τους έναντι καρκινικών κυττάρων. Η μεθοδολογία αυτή αφορά την κυτταροτοξική δράση των NK κυττάρων και αποδεικνύει την λειτουργικότητα των συγκεκριμένων κυττάρων έναντι καρκινικών σειρών, όπως της K562 και λειομυοσαρκωμάτων από ποντίκια Wistar. Επίσης, η μεθοδολογία του πλήρους ανοσοφαινότυπου προσέφερε στην πληροφορία που αφορά τον απόλυτο αριθμό των πληθυσμών των λεμφοκυττάρων και ιδιαίτερα των NK και NK T κυττάρων, που είναι απαραίτητοι διαγνωστικοί και προγνωστικοί δείκτες και καθοριστικοί παράγοντες για την άμυνα του ανθρώπινου οργανισμού.

Βασικός σκοπός της μελέτης αυτής ήταν να ανιχνευτούν ουσίες οι οποίες έχουν την δυνατότητα να προκαλούν σημαντική ανοσοδιέγερση των NK κυττάρων έναντι



καρκινικών σειρών ή ακόμα και να θανατώνουν άμεσα και επιλεκτικά τα καρκινικά κύτταρα χωρίς να προσβάλουν τα υγιή ανθρώπινα κύτταρα. Παράλληλα, σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να συγκριθούν με τις δύο παραπάνω μεθοδολογίες, αποτελέσματα θεραπειών στις οποίες υποβλήθηκαν διάφοροι καρκινοπαθείς με συμπαγείς όγκους. Τέτοιες θεραπείες ήταν η χορήγηση βιολογικών σκευασμάτων, η επίδραση μαγνητικών πεδίων και η χορήγηση χημειοθεραπευτικών παραγόντων.



## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

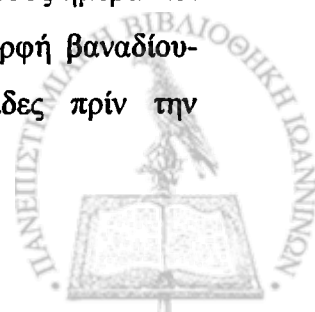
### ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 1. Σχεδιασμός πειραμάτων

Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν χωρίστηκαν στα *in vitro* και *in vivo*. Τα *in vitro* πειράματα περιλάμβαναν ομάδες 12 υγιών εθελοντών (άνδρες και γυναίκες) από τους οποίους έγιναν αιμοληψίες από την μεσοβασιλική φλέβα και απομονώθηκαν τα NK κύτταρα, των οποίων η λειτουργικότητα αξιολογήθηκε με την πρόσθεση αντιοξειδωτικών ουσιών ή σύμπλοκων σκευασμάτων με αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Η συμμετοχή των εθελοντών σε όλη την μελέτη υπήρξε αυθόρμητη και όχι αμειβόμενη, σύμφωνα με τις διατάξεις της συνδιάσκεψης του Ελσίνκι περί ανθρωπίνων δικαιωμάτων (1979). Οι εθελοντές ήταν μη καπνιστές, ελεύθεροι από ιστορικό βαρείας νόσου και δεν έκαναν χρήση φαρμακευτικών ουσιών για το διάστημα των πειραμάτων. Τα *in vivo* πειράματα πραγματοποιήθηκαν με την μεθοδολογία της κυτταροτοξικότητας των NKCs με την χρήση της τεχνολογίας της κυτταρομετρίας ροής.

Τα *in vivo* πειράματα περιλάμβαναν μια ομάδα ελέγχου 10 ατόμων (ανδρών και γυναικών από 34 έως 70 ετών), στους οποίους χορηγήθηκαν ημερησίως 35 ml χυμός *Aloe vera* και ένα γραμμάριο καθαρής κρυσταλλική βιταμίνη C για 45 ημέρες. Στην ομάδα ελέγχου μετρήθηκε ο αριθμός των NKCs και NKT κυττάρων και η λειτουργικότητα των συγκεκριμένων κυττάρων πριν και μετά την χορήγηση των παραπάνω ουσιών. Επίσης, 8 καρκινοπαθείς (2 άνδρες και 6 γυναίκες) από 28 έως 79 ετών) συμμετείχαν εθελοντικά στην μελέτη. Όλοι οι ασθενείς ήταν πλήρως ενημερωμένοι για το ερευνητικό πρωτόκολλο και υπέγραψαν τη συμφωνία για την μελέτη. Το πρωτόκολλο της μελέτης είχε την έγκριση της Επιτροπής ερευνών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (ΕΕ Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, 2004) και από της Εθνική Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας (ΕΕΔ 2006). Οι διαδικασίες που ακολούθησαν ήταν σύμφωνα με τις ηθικές αξίες για πειράματα σε ανθρώπους σύμφωνα με τις διατάξεις της συνδιάσκεψης του Ελσίνκι το 1975, όπως διαμορφώθηκε το 1983.

Οι ασθενείς είχαν λάβει χημειοθεραπεία, ακτινοβολία και/ή αντιοξειδωτική αγωγή (Ασκορβικό οξύ 200 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα, β-καροτένιο 1,5 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα, α-τοκοφερόλη 1,5 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα και βανάδιο σαν σκεύασμα 0,1mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα στη μορφή βαναδίου-κυστεΐνης και/ή βαναδίου-πουτρεσκίνης) τουλάχιστον 4 εβδομάδες πριν την





συμμετοχή τους στην μελέτη και επίσης δεν λάμβαναν καμία άλλη ουσία κατά την διάρκεια της μελέτης. Το είδος της νεοπλασίας και το στάδιο είχαν επιβεβαιωθεί με αξονική ή μαγνητική τομογραφία, ιστολογικά, βιοχημικά, αιματολογικά, και με καρκινικούς δείκτες. Οι ασθενείς ήταν απαραίτητο να έχουν σε επάρκεια λειτουργικό μυελό των οστών, καθώς και επαρκή νεφρική και ηπατική λειτουργία. Επίσης γενική αίματος καθώς και βιοχημικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν μια μέρα πριν και μια μέρα μετά την μελέτη. Τα βασικά χαρακτηριστικά και το ιστορικό της θεραπείας των ασθενών που συμμετείχαν στην μελέτη απεικονίζονται στον πίνακα I.

**Πίνακα I:** Τύπος καρκίνου, μεταστάσεις και θεραπεία που υποβάλλονταν οι οκτώ ασθενείς που συμμετείχαν στην μελέτη.

ΑΑ - Φ- Η	Τύπος καρκίνου	Μεταστάσεις	Θεραπεία	Χημειοθεραπεία
1. ♀ 38	Πορογενής Ca μαστού	ήπαρ, πνεύμονες, λεμφαδένες, εγκέφαλος	αντιοξειωτικά, V-cys, V-putr,	paclitaxol
2. ♀ 52	Πορογενής Ca μαστού	ήπαρ, πνεύμονες, λεμφαδένες, εγκέφαλος	αντιοξειωτικά, V-cys, V-putr,	paclitaxol
3. ♀ 66	Πορογενής Ca μαστού	ήπαρ, πνεύμονες	αντιοξειωτικά	όχι
4. ♀ 75	Αδενοκαρκίνωμα στο κόλον	ήπαρ	αντιοξειωτικά	5-Fluoro-uracil
5. ♀ 79	Non Hodgkin's λέμφωμα	πολλά όργανα	αντιοξειωτικά, V-cys, V-putr,	όχι
6. ♀ 28	Ινωσάρκωμα	πνεύμονες >18	V-cys, V-putr.	όχι
7. ♂ 36	Μελάνωμα αμφιβληστοειδή	πολλαπλές στον εγκέφαλο	αντιοξειωτικά, V-cys, V-putr,	όχι
8. ♂ 52	Αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα	πνεύμονες >20	αντιοξειωτικά, V-cys, V-putr,	Cis-platinum, taxol

### *Συσκευή και σχέδιο της έκθεσης σε ΗΜΓΠ*

Οι μετρήσεις των ραδιοσυχνοτήτων και η έκθεση των ασθενών σε ηλεκτρομαγνητικά πεδία πραγματοποιήθηκε με συσκευή που ονομάζεται MULTI



CHANNEL DYNAMIC EXITER 100 V1 (MCDE), η οποία κατασκευάστηκε από τον Κώστα Χαβέλα και τους συνεργάτες του. Η συσκευή MCDE έχει πιστοποιηθεί από την Διεθνή Επιτροπή Ατομικής Ενέργειας (E.K.E.F.E DEMOKRITOS, Athens Greece) για την ασφαλή χρήση σε ανθρώπους και πειραματόζωα (Karabetsos 2000). Η συσκευή αποτελείται από τα βασικά μέρη: α) ένα διαγνωστικό τμήμα με φωτομετρικά χαρακτηριστικά EPR και β) μια γεννήτρια ΗΜΓ νητικών πεδίων σε διάφορες εντάσεις (από 1,1 έως 1,11 +/-0.01 V/m για το ηλεκτρικό πεδίο και 0.0027 to 0.0029 +/-0.00005 A/m για το μαγνητικό πεδίο) και ραδιοσυχνότητες (από 1kHz έως 1MHz) που καθοδηγείται από ειδικό λογισμικό. Για τη χρήση του συγκεκριμένου λογισμικού, απαραίτητη προϋπόθεση είναι η καταγραφή συχνοτήτων συντονισμού βιολογικών στόχων και μετά με τη χρήση ειδικού αλγόριθμου υπολογίζονται οι ηλεκτρομαγνητικές συχνότητες που απαιτούνται για να συντονίσουν διάφορα όργανα, ιστούς και κύτταρα του οργανισμού στις φυσιολογικές τους συχνότητες. Το σύστημα βασίζεται σε λεπτομερή βάση δεδομένων που περιλαμβάνει τις φυσιολογικές συχνότητες συντονισμού οργάνων και ιστών ενός υγιή οργανισμού.

Η συσκευή παρέχει μια ομοιόμορφη έκθεση του οργανισμού σε ΗΜΓΠ. Οι ασθενείς κατά την διάρκεια της αγωγής καθόνταν αναπαυτικά σε δωμάτιο με σταθερή θερμοκρασία (20-21°C) και υγρασία σε απόσταση 250 με 300 εκατοστά από την διπολική κεραία της συσκευής έτσι ώστε οι ραδιοσυχνότητες (RFs) που εκπέμπονταν να απορροφούνται εξ ίσου το ίδιο από κάθε ασθενή ( Allen et al. 2003).

Όλοι οι ασθενείς είχαν εκτεθεί σε RFs για 8 ώρες ημερησίως, 6 ημέρες την εβδομάδα για 4 εβδομάδες. Οι αιμοληψίες λαμβάνονταν σε σωληνάρια λιθίου μια ημέρα πριν την έκθεση στο τέλος του πειράματος και έπρεπε να χρησιμοποιηθεί μέσα σε 24 ώρες για να διατηρηθεί η ζωτικότητα των NK κυττάρων. Οι ασθενείς υποβάλλονταν και σε προσωπική συνέντευξη να διαπιστωθεί ότι δεν ήταν έγκυες λόγω της μείωσης του αριθμού των NK κυττάρων, και ότι δεν λάμβαναν φαρμακευτική αγωγή που θα προκαλούσε προβλήματα στην επεξήγηση των αποτελεσμάτων. Επιπλέον, υπολογίστηκαν ο αριθμός των NK, NKT λεμφοκυττάρων καθώς και η λειτουργικότητα των συγκεκριμένων κυττάρων.

Για λόγους σύγκρισης με άλλες θεραπευτικές μεθόδους, τα in vivo πειράματα συνεχίστηκαν με καρκινοπαθείς που υποβάλλονταν σε διαφορετική θεραπευτική προσέγγιση, όπως Mabthera. Η διαδικασία περιλάμβανε καρκινοπαθείς με πολλαπλούν μυέλωμα και λέμφωμα Hodgkin's που υποβάλλονταν σε χημιοθεραπεία



και σε θεραπεία με μονοκλωνικά αντισώματα και υπολογίστηκαν ο αριθμός των NK, NKT λεμφοκυττάρων καθώς και η λειτουργικότητα των συγκεκριμένων κυττάρων πριν και μετά από τρίμηνη θεραπεία.

## 2. Μεθοδολογίες των πειραμάτων - Λειτουργικότητα (κυτταροτοξική δράση των NK κυττάρων)

Η μεθοδολογία των πειραμάτων όσον αφορά τον ρόλο των φυσικών φονέων (NK cells) στον καρκίνο περιλαμβάνει: Α) την απομόνωσή τους, Β) την καλλιέργειά τους και Γ) την λειτουργικότητά τους.

Α) Η απομόνωση των φυσικών φονέων από ανθρώπινο ολικό αίμα βασίζεται στη μεθοδολογία του ρόδακος (rosettesep). Γενικά η μεθοδολογία αυτή περιλαμβάνει μια σύντομη επώαση του δείγματος, το οποίο είναι επισκιασμένο με μονοκλωνικά αντισώματα, και μια φυγοκέντρηση για τον διαχωρισμό των κυττάρων που επιλέξαμε να απομονώσουμε. Συγκεκριμένα, τα μονοκλωνικά αντισώματα προσκολλώνται πάνω στα μη απαιτούμενα κύτταρα του ολικού αίματος σχηματίζοντας ανοσολογικούς ρόδακες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της πυκνότητας των μη απαιτούμενων κυττάρων, έτσι ώστε με τη φυγοκέντρηση να κατακάθονται στον πυθμένα μετά την τοποθέτηση φικόλης. Τα κύτταρα της αρεσκείας μας (φυσικοί φονείς οι οποίοι δεν επισκιάζονται ποτέ από τα μονοκλωνικά αντισώματα) βρίσκονται σε ζώνη ανάμεσα από το πλάσμα και τη φικόλη και συλλέγονται εύκολα με πιπέτα.

Απαραίτητα υλικά και αντιδραστήρια για την απομόνωση των φυσικών φονέων είναι τα παρακάτω:

Φιαλίδια με EDTA για αιμοληψία και συλλογή, tac κοκτέιλ (περιλαμβάνει μονοκλωνικά αντισώματα για τα ακόλουθα αντιγόνα επιφανείας: CD3, CD4, CD19, CD36, CD66b), εμβρυικός βόειος ορός, phosphate buffered saline χωρίς Ca ή Mg, φικόλη, πιπέτες, φυγόκεντρος.

Η διαδικασία έχει ως εξής:

- 1) Τοποθέτηση 50 ml tac κοκτέιλ ανά ml ολικού αίματος και αμέσως καλή ανάδευση.
- 2) Επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- 3) Αραιώση του δείγματος με ίσο όγκο PBS +2% FBS και αμέσως ανάδευση.
- 4) Τοποθέτηση φικόλης κάτω από την ζώνη του αραιωμένου διαλύματος με προσοχή χωρίς να αναμιχθεί με το δείγμα.
- 5) Φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στις 1200 στροφές σε θερμοκρασία δωματίου.



6) Απομόνωση των φυσικών φονέων από την ζώνη της φικόλης και του πλάσματος.

7) Πλύσιμο των κυττάρων μας με PBS +2%FBS.

B) Η καλλιέργεια των φυσικών φονέων γίνεται σε methycellulose media. Η χρησιμοποίηση αυτού του μέσου μεγιστοποιεί την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των κυττάρων της αρεσκείας μας και με την χρησιμοποίηση ενός παράγοντα δίνεται η δυνατότητα αύξησης του ιξώδους του μέσου, έτσι ώστε οι αποικίες των κυττάρων να είναι ευδιάκριτες και εύκολα μετρήσιμες. Η αξιόπιστη καλλιέργεια των φυσικών φονέων και η συντήρηση των κυτταρικών τους σειρών απαιτούν τον ακόλουθο εξοπλισμό: θάλαμο βιολογικής ασφάλειας, CO<sub>2</sub> κλίβανο, ανάστροφο μικροσκόπιο, πιπέτες, αυτόματο μετρητή κυττάρων. Απαραίτητα υλικά και αντιδραστήρια είναι: τρυβλία petri, χρώση tryptan blue, 3% acetic acid με μπλε μεθυλίνη, methylcellulose σε Iscove's MDM.

Η διαδικασία καλλιέργειας των φυσικών φονέων είναι η ακόλουθη:

1) Αποστειρωμένα δοχεία petri των 35 mm προσημειώνονται για διπλά δείγματα.

2) Σωληνάκια methylcellulose βγαίνουν από την κατάψυξη και έρχονται σε θερμοκρασία δωματίου κατά την διάρκεια της νύχτας. Αν είναι απαραίτητο, αναδεύονται για να αναμιχθούν όλα τα συστατικά. Ο ολικός όγκος πρέπει να είναι 3 ml, αλλιώς προστίθενται άλλοι παράγοντες.

3) Προετοιμασία 10x κυττάρων σε Iscove's MDM με 2% FBS.

4) Ακριβής μεταφορά 0.3 ml κυττάρων σε 3 ml methylcellulose medium.

5) Ανάδευση των σωληναρίων.

6) Δύο με τρία λεπτά παραμονή σε ηρεμία για να διαλυθούν οι φυσαλίδες που πιθανόν να εμφανιστούν στην επιφάνεια.

7) Μεταφορά 1,1 ml methylcellulose σε κάθε τρυβλίο petri με 3 cc σύριγγα χωρίς τη βελόνα.

8) Διανομή με απαλές κινήσεις του υλικού σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου petri.

9) Τοποθέτηση των 2 τρυβλίων petri σε ένα των 100 mm. Ταυτόχρονα προστίθεται ένα άλλο 35 mm δοχείο petri με αποσταγμένο νερό και γίνεται αλλαγή του καπακιού του 100 mm δοχείου petri. Η χρησιμοποίηση του petri των 100 mm γίνεται για συντήρηση υγρασίας και ελαχιστοποίηση επιμολύνσεων κατά τη διάρκεια χειρισμού των αποικιών.

10) Τελικό στάδιο είναι η τοποθέτηση των αποικιών σε CO<sub>2</sub> κλίβανο με συνθήκες 5% CO<sub>2</sub> και >95% υγρασία. Οι κατάλληλες συνθήκες είναι βασικότατος παράγοντας για την διασφάλιση καλλιέργειας κυττάρων με υψηλές προδιαγραφές.



Γ) Η λειτουργικότητα των φυσικών φονέων εξετάζεται με κυτταρομετρία ροής. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό της κυτταροτοξικής δραστηριότητας των φυσικών φονέων. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι η ικανότητα να διαφοροποιηθούν τα δραστικά κύτταρα (effectors) από τους στόχους (targets) που είναι κυτταρικοί πληθυσμοί. Αυτό γίνεται με την χρησιμοποίηση της κυτταρικής σειράς K562 και κυττάρων λειομυοσαρκωμάτων επίμυων Wistar, που παίζουν τον ρόλο κυττάρων-στόχων, τα οποία βάφονται με πράσινο φθοριόχρωμα. Αυτή η χρώση παραμένει στην μεμβράνη των κυττάρων-στόχων, έτσι ώστε να επιτρέπει ένα καθαρό διαχωρισμό ανάμεσα στα δραστικά κύτταρα και τα κύτταρα-στόχους. Μετά την επώαση των δραστικών κυττάρων (φυσικοί φονείς και ΝΚΤ κύτταρα) με τα κύτταρα-στόχους, ένα κόκκινο φθοριόχρωμα DNA προστίθεται για να σημάνει τα κύτταρα-στόχους που επηρεάστηκαν από την δραστηριότητα των φυσικών φονέων. Αυτή η χρώση επισυνάπτεται μόνο σε κύτταρα με συμβιβαστικές πλασματικές μεμβράνες. Με αυτό τον τρόπο, ένας καθαρός διαχωρισμός μπορεί να παρατηρηθεί μεταξύ τεσσάρων κυτταρικών «τύπων»: ζωντανά κύτταρα-στόχοι, νεκρά κύτταρα-στόχοι, ζωντανά δραστικά κύτταρα και νεκρά δραστικά κύτταρα. Έτσι μπορεί να εξακριβωθεί η ακριβής αντιστοιχία ανάμεσα στα δραστικά και στα κύτταρα-στόχους.

Απαραίτητος εξοπλισμός είναι: πιπέτες, υδατόλουτρο, CO<sub>2</sub> κλίβανος, ψηφιακό θερμομέτρο, αναδευτήρας vortex, φυγόκεντρος, αιματοκυτταρόμετρο, κυτταρομετρητής ροής με μήκος κύματος 488 nm. Το κιτ που χρησιμοποιήθηκε είναι της εταιρείας Orpegen, Germany.

Απαραίτητα υλικά και αντιδραστήρια είναι τα ακόλουθα: δοκιμαστικοί σωλήνες των 15, 50 ml και 12x75 mm, αποστειρωμένες πιπέτες των 1, 5, 10 ml, σωληνάρια συλλογής αίματος με EDTA, φικόλη, PBS, φιαλίδια με κύτταρα σειράς K562, κύτταρα από λειομυοσαρκώματα επίμυων Wistar (κύτταρα-στόχοι), φιαλίδια που περιέχουν ιντερλευκίνη-2, μπουκάλια με complete medium, μπουκάλι με διάλυμα χρώσης DNA.

Η διαδικασία μέτρησης της κυτταροτοξικότητας των φυσικών φονέων είναι η ακόλουθη:

1) Προετοιμασίες.

1.1) Ετοιμασία υδατόλουτρου στους 37° C.

1.2) Τοποθέτηση complete medium στο υδατόλουτρο.

1.3) Προετοιμασία πάγου για τοποθέτηση δειγμάτων μέχρι τις μετρήσεις.

1.4) Άνοιγμα και καλιμπράρισμα του κυτταρομετρητή ροής.

2) Απομόνωση των δραστικών κυττάρων (effector cells).

Συλλογή 5 ml αίματος από υγιή άτομα που θα ελεγχθούν για λειτουργικότητα των φυσικών φονέων.



2.1) Τοποθέτηση 5 ml φικόλης σε δοκιμαστικό σωλήνα των 15 ml. Αραίωση δείγματος αίματος σε αντιστοιχία 1:2 με PBS. Προσεκτική τοποθέτηση αραιωμένου αίματος στην ζώνη της φικόλης.

2.2) Φυγογέντρωση για 20 λεπτά σε 700 x g σε θερμοκρασία δωματίου.

2.3) Απομόνωση της άνω ζώνης και συλλογή της ζώνης που περιέχει τα μονοπύρηνια κύτταρα. Μεταφορά των παραπάνω κυττάρων σε δοκιμαστικό σωλήνα, πρόσθεση 12 ml PBS, ανάδευση.

2.4) Φυγοκέντρωση για 10 λεπτά σε 250 x g . Άδειασμα του υπερκείμενου χωρίς να πειραχθεί ο κυτταρικός σβώλος.

2.5) Τοποθέτηση στον κυτταρικό σβώλο 1 ml complete medium, προσδιορισμός κυττάρων με αιματοκυταρόμετρο και ρύθμιση της κυτταρικής συγκέντρωσης σε  $5 \times 10^6$  κύτταρα ανά ml σε complete medium.

3.1) Τοποθέτηση των K562 κυττάρων-στόχων σε υδατόλουτρο στους 37° C.

3.2) Τοποθέτηση 50 ml complete medium σε δοκιμαστικό σωλήνα των 50 ml.

3.3) Μεταφορά των κυττάρων-στόχων στον δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει τα 50 ml complete medium και ανάδευση.

3.4) Φυγοκέντρωση σε 120 x g για 5 λεπτά και απομάκρυνση του υπερκείμενου.

3.5) Τοποθέτηση 1 ml complete medium στον κυτταρικό σβώλο. Προσδιορισμός κυττάρων και ρύθμιση της κυτταρικής συγκέντρωσης σε  $1 \times 10^5$ /ml σε complete medium.

4) Τεστ κυτταροτοξικότητας με κυτταρομετρητή ροής.

Τα δραστικά κύτταρα (E) αναμιγνύονται με τα K562 κύτταρα-στόχους (T) σε αναλογίες 50:1, 25:1, 12,5:1 (Πίνακας 1). Τα δραστικά κύτταρα επωάζονται σε τελικό όγκο 200  $\mu$ l.

Πίνακας 1.1: Αναλογίες όγκων για έλεγχο (control) και δείγματα.

E:T	E κύτταρα ( $\mu$ l)	T κύτταρα-στόχοι ( $\mu$ l)	complete medium ( $\mu$ l)
50:1	100	100	0
25:1	50	100	50
12,5:1	25	100	75
Έλεγχος	0	100	100

4.1) Ανάδευση όλων των σωληναρίων και φυγοκέντρωση σε 120 x g για 2-3 λεπτά.

4.2) Επώαση των σωληναρίων για 120 λεπτά σε CO<sub>2</sub> κλίβανο σε 37°C.



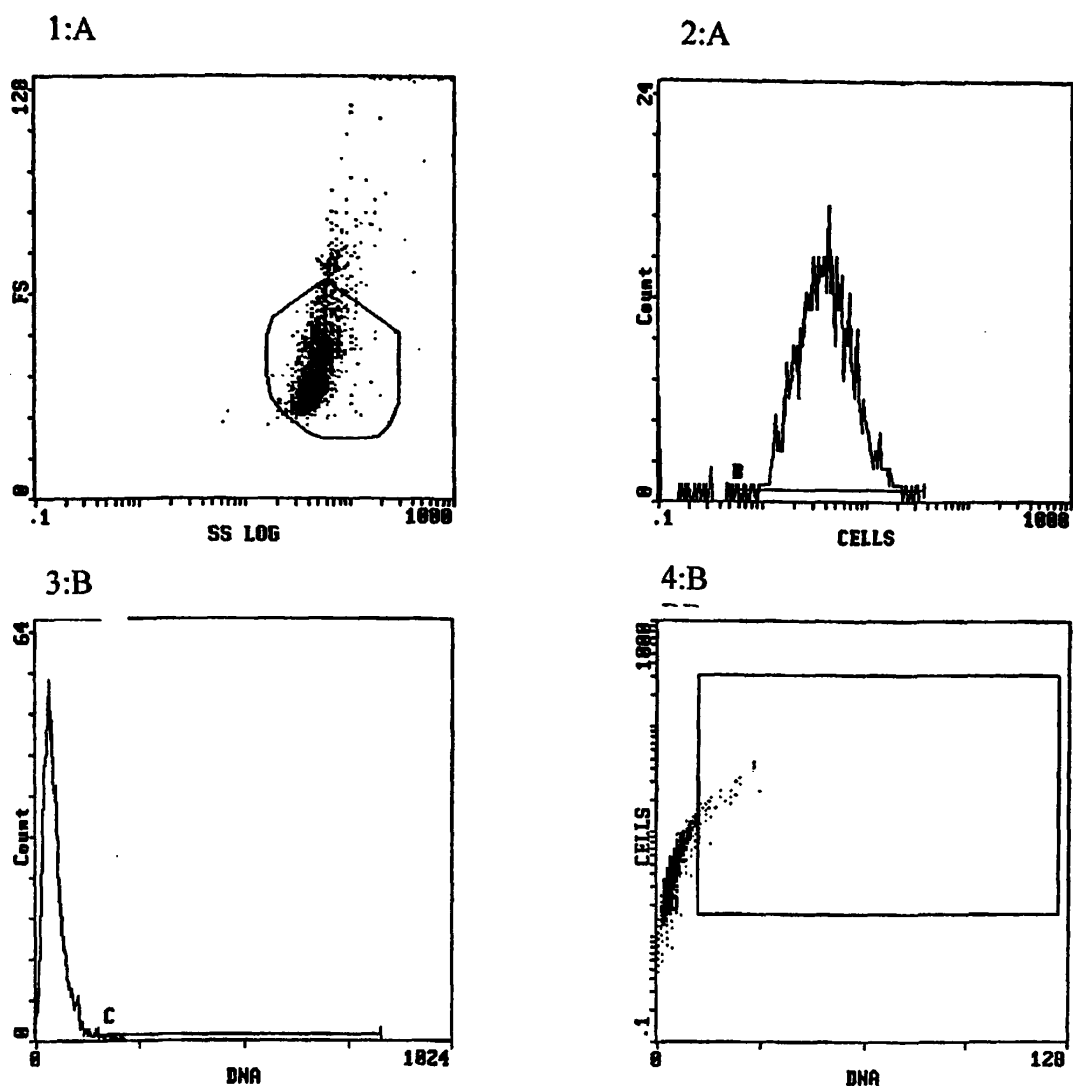
4.3) Πρόσθεση 50  $\mu$ l DNA χρώσης ανά σωληνάριο, ανάδευση και επώαση 5 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου. Μέτρηση σε διάστημα 30 λεπτών μετά από την πρόσθεση της χρώσης DNA.

5) Ανάλυση αποτελεσμάτων από κυτταρομετρητή ροής.

Χρησιμοποίηση του κοντρόλ δείγματος και σε κάθε δείγμα γίνεται αξιολόγηση της αναλογίας E:T επί τοις εκατό (%). Δύο κυτταρομετρητές ροής χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των δειγμάτων: ο FACScan και ο Epics XL-MCL της εταιρείας Becton Dickinson.

Τα ιστογράμματα που χρησιμοποιήθηκαν με τους δύο κυτταρομετρητές ροής για την ανάλυση της λειτουργικότητας των NK κυττάρων είναι τα ακόλουθα:

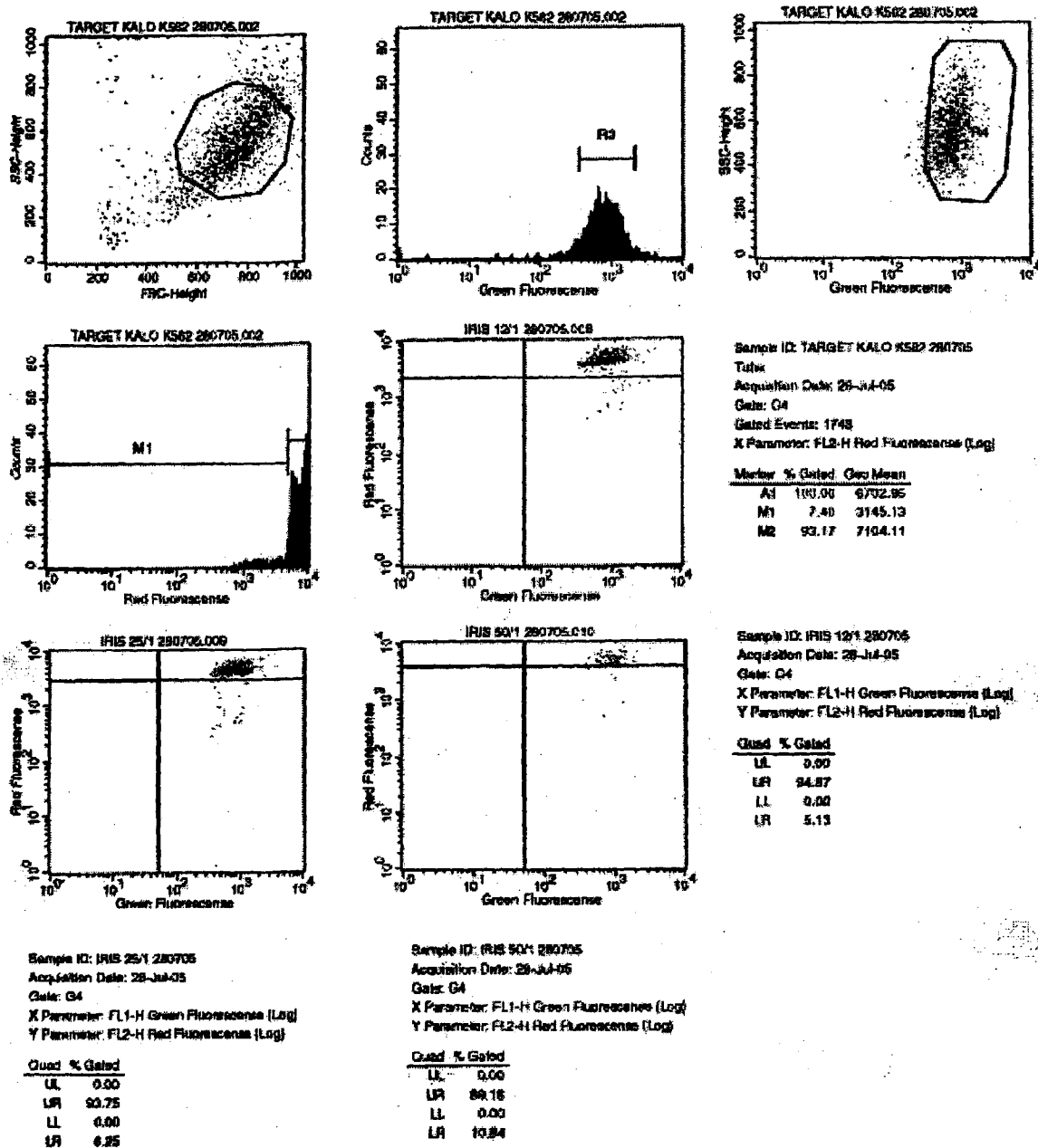




**Σχήμα 1.1:** Ιστογράμματα από τον κυτταρομετρητή Erics XL-MCL.

1:A. Ολόκληρος ο πληθυσμός της σειράς K562. 2:A. Ζωτικότητα της καρκινικής σειράς με την ένταση του πράσινου φθορισμού. 3:B. Απόπτωση της K562 από το σημείο C και μετά. 4:B. Ορατή η έναρξη της απόπτωσης των κυττάρων που εισβάλλουν στο παραλληλόγραμμο.

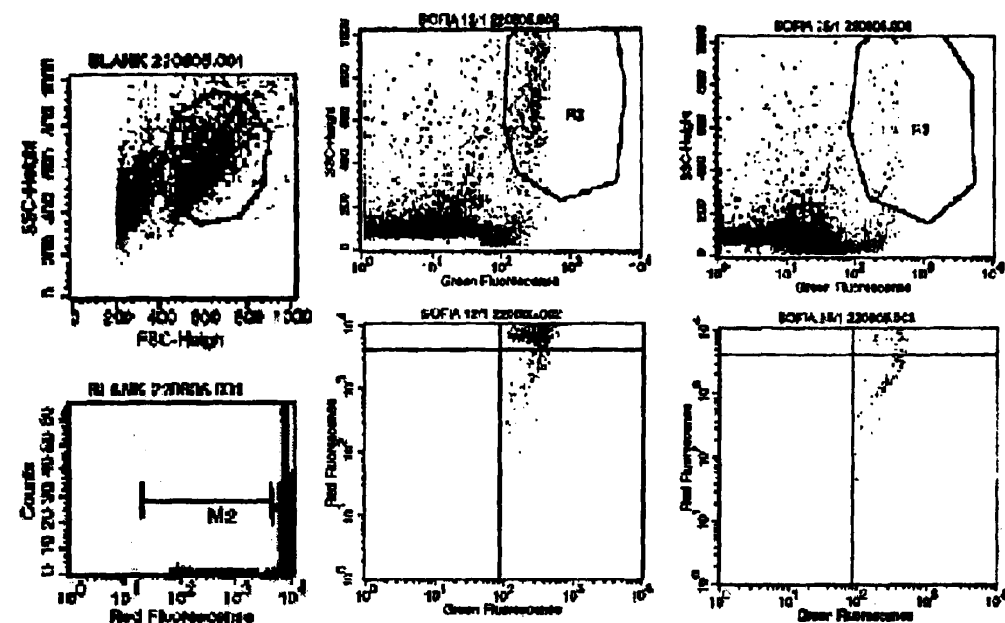




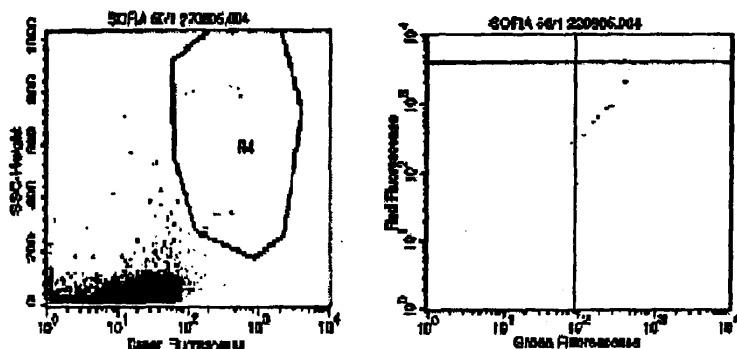
Σχήμα 1.2: Ιστογράμματα από τον κυτταρομετρητή FACSscan για τον έλεγχο της κυτταροτοξικότητας των NKCs και στις 3 αναλογίες 12,5:1, 25:1, 50:1. Τα τρία επάνω σχήματα δηλώνουν, από αριστερά προς δεξιά, τον πληθυσμό των δραστικών και κυττάρων-στόχων, την ζωτικότητα της σειράς K562 με την ένταση του πράσινου φθορισμού και την περιοχή που είναι μόνο ο αριθμός των κυττάρων-στόχων. Στην μεσαία σειρά, αριστερά η μεγάλη κορυφή (περιοχή M2) είναι ο αριθμός των ζωντανών καρκινικών κυττάρων, ενώ στην M2 περιοχή υπάγεται ο αριθμός των νεκρών καρκινικών κυττάρων. Δεξιά στο δεξιό μεγάλο τεταρτημόριο απεικονίζεται ο πληθυσμός των αποπτωτικών καρκινικών κυττάρων στην αναλογία 12,5:1. Τέλος, στην τρίτη σειρά από αριστερά προς δεξιά απεικονίζεται η απόπτωση των καρκινικών κυττάρων στις αναλογίες 25:1 και 50:1 αντίστοιχα.



Τέλος, με τον τελευταίο κυτταρομετρική ροής δημιουργήθηκε και μια διαφορετική ανάλυση, με ιστογράμματα που μπορούν να ελέγχουν την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων με παρόμοιες παραμέτρους.



Marker	% Gated	Geo Mean	Gated % Gated		Gated % Gated	
			LR	UR	LL	LR
M1	100.00	6162.00	UR	68.57	LR	0.00
M2	97.19	6700.00	LL	9.00	LR	0.00
M3	7.00	720.00	LR	14.60	LR	00.00



Gated % Gated	
LR	5.00
UR	13.00
LL	1.67
LR	00.00

Σχήμα 1.3: Ιστογράμματα επίδειξης κυτταροτοξικότητας των NK κυτάρων στις αναλογίες δραστικών κυττάρων-στόχων 12,5:1, 25:1 και 50:1 αντίστοιχα. Στα τρία μεγαλύτερα ιστογράμματα χωρίς τεταρτημόρια σημειώνονται τα καρκινικά κύτταρα που έχουν σημειωθεί με πράσινο φθορισμό. Στα άλλα τρία φαίνεται ο πληθυσμός των ζωντανών καρκινικών κυττάρων στο τρίτο τεταρτημόριο (πάνω δεξιά UR) και ο πληθυσμός των αποπτωτικών στο τέταρτο τεταρτημόριο (κάτω δεξιά LR) και στις τρεις αναλογίες. Επίσης, στο δεύτερο από αριστερά ιστογράμματα φαίνεται στην περιοχή M2 ο ζωντανός πληθυσμός των κυττάρων-στόχων.

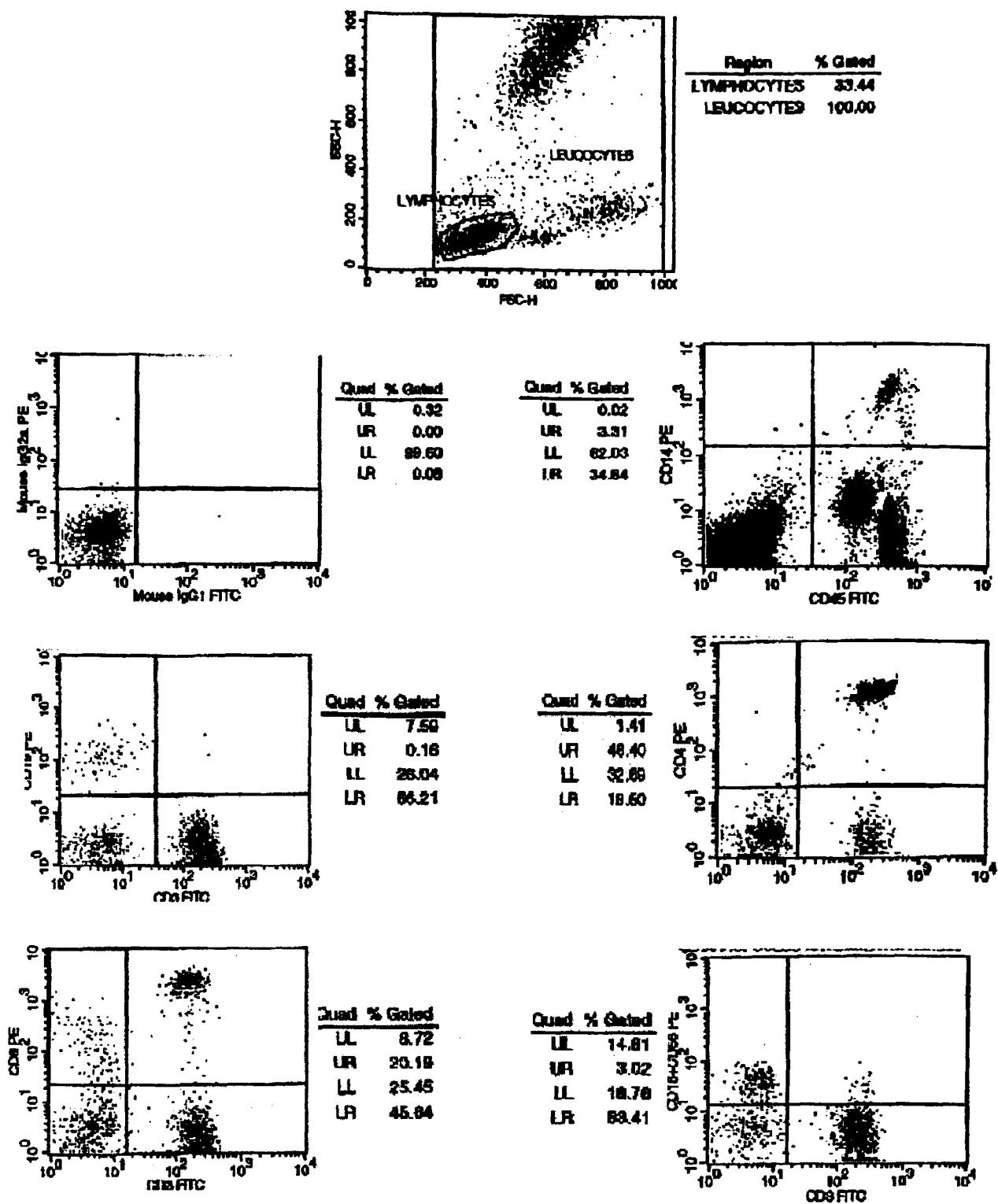


### 3. Μεθοδολογία ανοσοφαινότυπου πληθυσμών λεμφοκυττάρων

Απαραίτητη προϋπόθεση για τον υπολογισμό των πληθυσμών των λεμφοκυττάρων με ακρίβεια είναι ένας κυτταρομετρητής ροής και το Simultest IMK-lymphocyte kit που αποτελείται από LeucoGATE (CD45/CD14), Control ( $\gamma 1/\gamma 2\alpha$ ), CD3/CD19, CD3/CD4, CD3/CD8, CD3/CD16+CD56, και FACS Lysing solution. Το kit είναι της εταιρείας Becton Dickinson. Συνοπτικά, το παραπάνω kit αποτελείται από 6 φιαλίδια αντιδραστηρίων και από λυτικό αντιδραστήριο.

Το πρωτόκολλο εργασίας έχει ως εξής: Σε έξι σωληνάρια 12x75mm (Falcon) τοποθετείται αντιδραστήριο 20  $\mu$ l από το κάθε φιαλίδιο του kit, αντίστοιχα. Έπειτα τοποθετούνται 100  $\mu$ l ολικού αίματος (αιμοληψία σε σωληνάριο γενικής αίματος με EDTA/K3 και ρυθμισμένο με πληθυσμό λευκών από 4.000 κύτταρα/ $\mu$ l έως 10.000 κύτταρα) σε κάθε σωληνάριο. Κατόπιν, γίνεται ανάδευση και επώαση σε σκοτεινό χώρο για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά προστίθενται σε κάθε σωληνάριο 2ml διάλυμα εργασίας λυτικού αντιδραστηρίου (αραίωση του αντιδραστηρίου με απεσταγμένο νερό σε αναλογία 1:10), και γίνεται ανάδευση και επώαση σε σκοτεινό χώρο και κανονικές συνθήκες. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των σωληνάρων για 5 λεπτά στις 1800 στροφές το λεπτό. Αμέσως μετά, χύνεται προσεκτικά το υπερκείμενο υγρό και προστίθενται 500  $\mu$ l PBS, γίνεται ανάδευση και η μέτρηση στον κυτταρομετρητή ροής. Αν υπάρχει η επιθυμία η μέτρηση να γίνει μετά από 24 ώρες, τότε πρέπει να προστεθεί 100  $\mu$ l παραφολμαδεΰδη. Τα ιστογράμματα ενός πλήρους ανοσοφαινότυπου φαίνονται στο σχήμα 1.4.



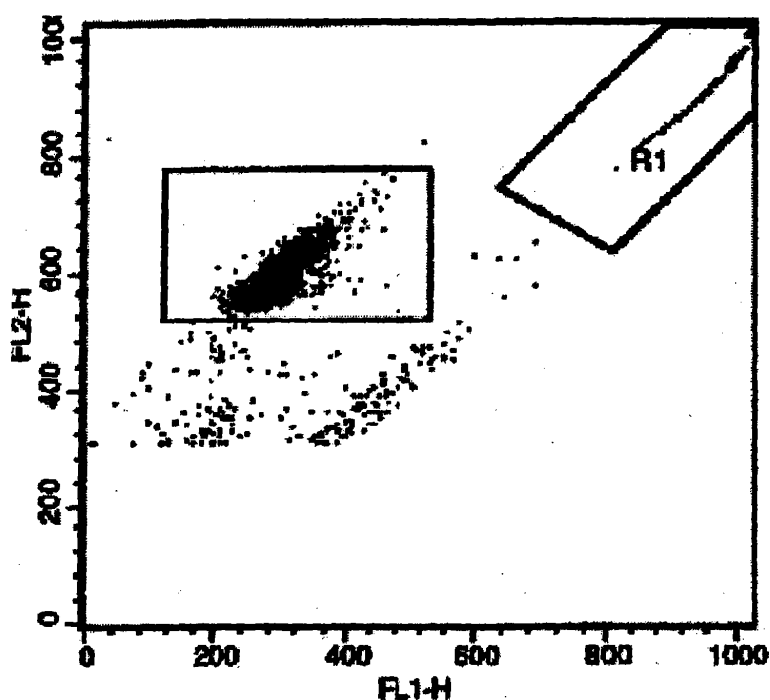


Σχήμα 1.4: Πλήρης ανοσοφαινότυπος πληθυσμών λεμφοκυττάρων. Στην κορυφή με κόκκινο απεικονίζεται ο πληθυσμός των λεμφοκυττάρων. IgG1 mouse είναι το ισотυπικό κοντρόλ. Με το CD14/CD45 γίνεται ο διαχωρισμός των μονοκυττάρων από τα λεμφοκύτταρα. Τα υπόλοιπα δείχνουν τον διαχωρισμό στον πληθυσμό των λεμφοκυττάρων (CD19 για τα B, CD3/CD4 για τα βοηθητικά T, CD3/CD8 για τα κατασταλτικά T, και CD16+56 για τα NK). UL: πάνω αριστερά, UR: πάνω δεξιά, LL: κάτω αριστερά, LR: κάτω δεξιά.



#### 4. Μεθοδολογία ποσοτικοποίησης των κυττάρων-στόχων

Η μεθοδολογία αυτή γίνεται με κυτταρομετρία ροής για περισσότερη ακρίβεια στον υπολογισμό των κυττάρων-στόχων. Η διαδικασία περιλαμβάνει την τοποθέτηση σε φιαλίδιο Falcon 12x75 mm 100 μl εναιωρήματος καρκινικών κυττάρων, 100 μl σφαιριδίων γνωστής συγκέντρωσης και 100 μl PI (Ιωδιούχο Προπίδιο). Το διάλυμα υφίσταται επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και αμέσως μετά γίνεται η μέτρηση στον κυτταρομετρητή ροής. Η ανάλυση και ο υπολογισμός επιδεικνύονται στο σχήμα 1.5.



Region	Events
R1	10000
R2	3858

**Σχήμα 1.5:** Ποσοτικοποίηση των καρκινικών κυττάρων. R1 ο πληθυσμός των σφαιριδίων και R2 ο πληθυσμός των ζωντανών καρκινικών κυττάρων. Η συγκέντρωση των καρκινικών κυττάρων είναι  $3858/10000 \times 95400/100\mu\text{l} = 368$  κύτταρα ανά μl ή 368000 ανά ml. 95400 είναι ο αριθμός των σφαιριδίων που έχει μετρηθεί από την εταιρεία Becton Dickinson.



## 5. Μεθοδολογία καλλιέργειας λειομυοσαρκωμάτων επίμυων Wistar

Τα κύτταρα λειομυοσαρκώματος είναι νεοπλασματική σειρά που απομονώθηκε από επίμυες Wistar και καλλιεργήθηκε. Απαραίτητος εξοπλισμός για την μεθοδολογία αυτή είναι ο θάλαμος βιολογικής ασφάλειας για αποφυγή επιμολύνσεων και ο κλίβανος διοξειδίου του άνθρακα για επώαση. Η διαδικασία έχει ως εξής:

A) Τοποθέτηση 450 ml DMEM (πλούσιο σε γλυκόζη με στρεπτομυκίνη και πενικιλίνη) και 50 ml BSA, στη συνέχεια ανάδευση.

B) Επαναφορά των τρυβλίων Petri από τον κλίβανο όπου φυλάσσονται στους 37° C.

Γ) Μετά από 8 με 10 ώρες γίνεται εξέταση στο μικροσκόπιο της κατάστασης των κυττάρων. Αυτά που είναι προσκολλημένα στον πυθμένα είναι τα ζωντανά. Με πιπέτα των 10 ml αναρρόφηση όλου του υγρού που υπάρχει στο τρυβλίο.

Δ) Προστίθενται 10 ml νέου υγρού και μέσα στο 24ωρο επαναλαμβάνεται η διαδικασία του Γ σταδίου.

Ε) Μετά την επανάληψη της διαδικασίας, όταν πρόκειται να γίνει η πρόσθεση του νέου καλλιεργητικού υγρού προστίθεται 1 ml τρυψίνη/EDTA και αυτό παραμένει για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για να ξεκολλήσουν τα κύτταρα.

Ζ) Πρόσθεση 10 ml DMEM ώστε να σταματήσει η δράση της τρυψίνης, και στη συνέχεια γίνεται επώαση στον κλίβανο διοξειδίου του άνθρακα στους 37° C μέχρι να επαναληφθεί η διαδικασία.



## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η λειτουργικότητα των NK λεμφοκυττάρων στα *in vitro* πειράματα, που υπολογίστηκε μετά από χορήγηση αντοξειδωτικών και σύμπλοκων ουσιών, καταγράφηκε σε 24 πίνακες και 61 διαγράμματα μετά από ανάλυση κυτταρομετρίας ροής στις τρεις διαφορετικές αναλογίες των δραστικών κυττάρων NKCs (effectors) με τα καρκινικά κύτταρα-στόχους (target cells).

Συγκεκριμένα, η αύξηση της λειτουργικότητας των NK κυττάρων μετά από χορήγηση ασκορβικού οξέος στην συγκέντρωση  $3 \times 10^{-3}$  M που παρατηρήθηκε κατά μέσο όρο είναι  $105 \pm 8,47$ ,  $61 \pm 2,72$  και  $285 \pm 17,66\%$  στις αναλογίες 12,5:1, 25:1 και 50:1 αντίστοιχα  $p < 0,05$  (Πίνακας 1, διαγράμματα 1-3). Το ασκορβικό οξύ από μόνο του χωρίς την παρουσία των NK κυττάρων προκάλεσε κυτταροτοξική δράση κατά μέσο όρο 7,5 %.

Η αύξηση της λειτουργικότητας των NK κυττάρων μετά από χορήγηση απιγενίνης στην συγκέντρωση  $3 \times 10^{-3}$  M που παρατηρήθηκε κατά μέσο όρο είναι  $329 \pm 121,7$  ( $p < 0,2$ ) και  $465,5 \pm 45,56$  ( $p < 0,05$ )% στις αναλογίες 25:1 και 50:1, ενώ δεν σημειώθηκε αύξηση στην αναλογία 12,5:1 (Πίνακας 2, διαγράμματα 4-6). Η απιγενίνη από μόνη της χωρίς την παρουσία των NK κυττάρων προκάλεσε κυτταροτοξική δράση κατά μέσο όρο 1,9 %.

Η αύξηση της λειτουργικότητας των NK κυττάρων μετά από χορήγηση καρβακρόλης στην συγκέντρωση  $3 \times 10^{-3}$  M που παρατηρήθηκε κατά μέσο όρο είναι  $105,9 \pm 7\%$  ( $p < 0,05$ ) στην αναλογία 25:1, ενώ στις άλλες δύο αναλογίες δεν υπήρξε αύξηση (Πίνακας 3, διαγράμματα 7-9). Η καρβακρόλη από μόνη της χωρίς την παρουσία των NK κυττάρων προκάλεσε κυτταροτοξική δράση κατά μέσο όρο 4,7 %.

Η αύξηση της λειτουργικότητας των NK κυττάρων μετά από χορήγηση ρεσβερατρόλης στην συγκέντρωση  $3 \times 10^{-3}$  M που παρατηρήθηκε κατά μέσο όρο είναι  $319 \pm 34$ ,  $450 \pm 34$  και  $62 \pm 2,4\%$  ( $p < 0,05$ ) στις αναλογίες  $\varsigma$  12,5:1, 25:1 και 50:1 αντίστοιχα (Πίνακας 4, διαγράμματα 9-12). Η ρεσβερατρόλη από μόνη της χωρίς την παρουσία των NK κυττάρων προκάλεσε κυτταροτοξική δράση κατά μέσο όρο 5,5%.

Η αύξηση της λειτουργικότητας των NK κυττάρων μετά από χορήγηση καθαρού εκχυλίσματος κυπαρισσόμελου που παρατηρήθηκε κατά μέσο όρο είναι  $292 \pm 17$ ,  $275 \pm 15$  και  $150 \pm 10$  ( $p < 0,05$ ) στις αναλογίες 12,5:1, 25:1 και 50:1 αντίστοιχα (Πίνακας 5, διαγράμματα 13-15). Το αλκοολικό εκχύλισμα του κυπαρισσόμελου από μόνο του χωρίς την παρουσία των NK κυττάρων προκάλεσε κυτταροτοξική δράση κατά μέσο όρο 26,5%.

Η αύξηση της λειτουργικότητας των NK κυττάρων μετά από χορήγηση καθαρού εκχυλίσματος του φυτού *viscum album* που παρατηρήθηκε κατά μέσο όρο



είναι  $340 \pm 12$ ,  $165 \pm 14$  και  $73,5 \pm 9\%$  ( $p < 0.05$ ) στις αναλογίες 12,5:1, 25:1 και 50:1 αντίστοιχα (Πίνακας 6, διαγράμματα 16-18). Το *viscum album* από μόνο του χωρίς την παρουσία των NK κυττάρων προκάλεσε κυτταροτοξική δράση κατά μέσο όρο 8,8%.

Η αύξηση της λειτουργικότητας των NK κυττάρων μετά από χορήγηση βαναδοκυστεΐνης στην συγκέντρωση  $3 \times 10^{-3}$  M που παρατηρήθηκε κατά μέσο όρο είναι  $277 \pm 12$ ,  $358 \pm 12$  και  $74 \pm 6\%$  ( $p < 0.05$ ) στις αναλογίες 12,5:1, 25:1 και 50:1 αντίστοιχα (Πίνακας 7, διαγράμματα 19-21). Η βαναδοκυστεΐνη από μόνη της χωρίς την παρουσία των NK κυττάρων προκάλεσε κυτταροτοξική δράση κατά μέσο όρο 7,6%.

Η αύξηση της λειτουργικότητας των NK κυττάρων μετά από χορήγηση βαναδοπουτρεσκίνης στην συγκέντρωση  $3 \times 10^{-3}$  M που παρατηρήθηκε κατά μέσο όρο είναι  $590 \pm 12$ ,  $490 \pm 12$  και 0% ( $p < 0.05$ ) στις αναλογίες 12,5:1, 25:1 και 50:1 αντίστοιχα (Πίνακας 8, διαγράμματα 22-24). Η βαναδοπουτρεσκίνη από μόνη της χωρίς την παρουσία των NK κυττάρων προκάλεσε κυτταροτοξική δράση κατά μέσο όρο 17,4%.

Η αύξηση της λειτουργικότητας των NK κυττάρων μετά από χορήγηση θυμόλης στην συγκέντρωση  $3 \times 10^{-3}$  M που παρατηρήθηκε κατά μέσο όρο είναι 0,  $148 \pm 10$  και  $286 \pm 12\%$  ( $p < 0.05$ ) στις αναλογίες 12,5:1, 25:1 και 50:1 αντίστοιχα (Πίνακας 9, διαγράμματα 25-27). Η θυμόλη από μόνη της χωρίς την παρουσία των NK κυττάρων προκάλεσε κυτταροτοξική δράση κατά μέσο όρο 1,7%.

Η αύξηση της λειτουργικότητας των NK κυττάρων μετά από χορήγηση ροζμαρινικού οξέος στην συγκέντρωση  $3 \times 10^{-3}$  M που παρατηρήθηκε κατά μέσο όρο είναι  $61 \pm 7$ ,  $17 \pm 5$  και  $131 \pm 10\%$  ( $p < 0.05$ ) στις αναλογίες 12,5:1, 25:1 και 50:1 αντίστοιχα (Πίνακας 10, διαγράμματα 28-30). Το ροζμαρινικό οξύ από μόνο του χωρίς την παρουσία των NK κυττάρων προκάλεσε κυτταροτοξική δράση κατά μέσο όρο 1,2%.

Η αύξηση της λειτουργικότητας των NK κυττάρων μετά από χορήγηση μεθυλικού νιτρικού προπανίου στην συγκέντρωση  $3 \times 10^{-3}$  M που παρατηρήθηκε κατά μέσο όρο είναι  $61 \pm 10$ ,  $359 \pm 10$  και  $480 \pm 22\%$  ( $p < 0.05$ ) στις αναλογίες 12,5:1, 25:1 και 50:1 αντίστοιχα (Πίνακας 11, διαγράμματα 31-33). Το μεθυλικό νιτρικό προπάνιο από μόνο του χωρίς την παρουσία των NK κυττάρων προκάλεσε κυτταροτοξική δράση κατά μέσο όρο 2,6%.

Η αύξηση της λειτουργικότητας των NK κυττάρων μετά από χορήγηση PBN στην συγκέντρωση  $3 \times 10^{-3}$  M που παρατηρήθηκε κατά μέσο όρο είναι 0,  $309 \pm 12$  και  $631 \pm 16\%$  ( $p < 0.05$ ) στις αναλογίες 12,5:1, 25:1 και 50:1 αντίστοιχα (Πίνακας 12, διαγράμματα 34-36). Το PBN από μόνο του χωρίς την παρουσία των NK κυττάρων προκάλεσε κυτταροτοξική δράση κατά μέσο όρο 1,9%.





Η αύξηση της λειτουργικότητας των NK κυττάρων μετά από χορήγηση ασπιρινικού χαλκού στην συγκέντρωση  $3 \times 10^{-3}$  M που παρατηρήθηκε κατά μέσο όρο είναι  $287 \pm 13$ ,  $69 \pm 9$  και  $38 \pm 6\%$  ( $p < 0.05$ ) στις αναλογίες 12,5:1, 25:1 και 50:1 αντίστοιχα (Πίνακας 13, διαγράμματα 37-39). Ο ασπιρινικός χαλκός από μόνος του χωρίς την παρουσία των NK κυττάρων προκάλεσε κυτταροτοξική δράση κατά μέσο όρο 6,5%.

Η αύξηση της λειτουργικότητας των NK κυττάρων μετά από χορήγηση διβούτυλο-δισασκορβικού κασιτέρου στην συγκέντρωση  $3 \times 10^{-3}$  M που παρατηρήθηκε κατά μέσο όρο είναι  $309 \pm 12$ ,  $18 \pm 6$  και  $55 \pm 9\%$  ( $p < 0.05$ ) στις αναλογίες 12,5:1, 25:1 και 50:1 αντίστοιχα (Πίνακας 14, διαγράμματα 40-42). Ο διβούτυλο-δισασκορβικός κασίτερος από μόνος του χωρίς την παρουσία των NK κυττάρων προκάλεσε κυτταροτοξική δράση κατά μέσο όρο 5,8%.

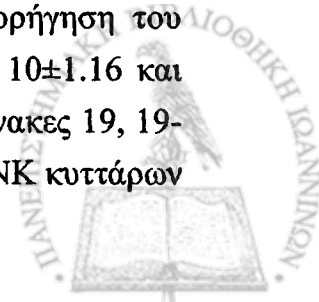
Η αύξηση της λειτουργικότητας των NK κυττάρων μετά από χορήγηση θειογλυκολικού μολυβδαινίου στην συγκέντρωση  $3 \times 10^{-3}$  M που παρατηρήθηκε κατά μέσο όρο είναι  $288 \pm 19$ ,  $70 \pm 10$  και  $7 \pm 6\%$  ( $p < 0.001$ ) στις αναλογίες 12,5:1, 25:1 και 50:1 αντίστοιχα (Πίνακας 15, διαγράμματα 43-45). Το θειογλυκολικό μολυβδαίνιο από μόνο του χωρίς την παρουσία των NK κυττάρων προκάλεσε κυτταροτοξική δράση κατά μέσο όρο 4,9%.

Η χορήγηση της πλατίνης με πουτρεσκίνη δεν προκάλεσε ανοσοδιέγερση των NK κυττάρων στην συγκέντρωση  $3 \times 10^{-3}$  M, αλλά αντίθετα δεν παρατηρήθηκαν ούτε καν πυρήνες καρκινικών ή δραστικών κυττάρων και γι' αυτό σημειώθηκε η κυτταροτοξικότητα των NK κυττάρων με παύλα (-) (Πίνακας 16, διαγράμματα 46-48).

Η αύξηση της λειτουργικότητας των NK κυττάρων μετά από χορήγηση γενιστεΐνης στην συγκέντρωση  $3 \times 10^{-3}$  M που παρατηρήθηκε κατά μέσο όρο είναι  $291 \pm 11$ ,  $100 \pm 9,5$  και  $0\%$  ( $p < 0.05$ ) στις αναλογίες 12,5:1, 25:1 και 50:1 αντίστοιχα (Πίνακας 17, διαγράμματα 49-51). Η γενιστεΐνη από μόνη της χωρίς την παρουσία των NK κυττάρων προκάλεσε κυτταροτοξική δράση κατά μέσον όρο 3,8%.

Η αύξηση της λειτουργικότητας των NK κυττάρων έναντι της σειράς K562 και λειομυοσαρκωμάτων επίμυων Wistar μετά από χορήγηση καθαρού εκχυλίσματος του φυτού *Morinda citrifolia* (Noni) που παρατηρήθηκε κατά μέσο όρο είναι  $291 \pm 12$ ,  $329 \pm 14$  και  $396 \pm 23\%$  ( $p < 0.05$ ) στις αναλογίες 12,5:1, 25:1 και 50:1 αντίστοιχα (Πίνακες 18, 18-1, διάγραμμα 52). Το εκχύλισμα από μόνο του χωρίς την παρουσία των NK κυττάρων προκάλεσε κυτταροτοξική δράση κατά μέσο όρο 5,8%.

Η αύξηση της λειτουργικότητας των NK κυττάρων έναντι της σειράς K562 και λειομυοσαρκωμάτων επίμυων Wistar που παρατηρήθηκε μετά από χορήγηση του σύμπλοκου σκευάσματος Noni premium κατά μέσο όρο είναι  $10 \pm 0.9$ ,  $10 \pm 1.16$  και  $10 \pm 0.94\%$  ( $p < 0.05$ ) στις αναλογίες 12,5:1, 25:1 και 50:1 αντίστοιχα (Πίνακες 19, 19-1, διάγραμμα 53). Το εκχύλισμα από μόνο του χωρίς την παρουσία των NK κυττάρων



προκάλεσε κυτταροτοξική δράση κατά μέσο όρο 85%. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η κυτταροτοξική δράση του σκευάσματος έναντι των NK κυττάρων, χωρίς την παρουσία νεοπλασματικών κυττάρων (κύτταρα-στόχους), ήταν μόνο από 1-4% στις συγκεντρώσεις 12,5:1, 25:1 και 50:1 αντίστοιχα (Διάγραμμα 54).

Η αύξηση της λειτουργικότητας των NK κυττάρων έναντι της σειράς K562 μετά από χορήγηση του σύμπλοκου σκευάσματος Ubichinon compositum που παρατηρήθηκε κατά μέσο όρο είναι  $308 \pm 12$ ,  $31 \pm 6$  και 0% ( $p < 0.05$ ) στις αναλογίες 12,5:1, 25:1 και 50:1 αντίστοιχα (Πίνακας 20, διάγραμμα 55).

Η αύξηση της λειτουργικότητας των NK κυττάρων έναντι της σειράς K562 μετά από χορήγηση του σύμπλοκου σκευάσματος Glyoxal compositum που παρατηρήθηκε κατά μέσο όρο είναι  $202 \pm 8$ , 0 και 0% ( $p < 0.05$ ) στις αναλογίες 12,5:1, 25:1 και 50:1 αντίστοιχα (Πίνακας 21, διαγράμματα 56-58).

Η αύξηση της λειτουργικότητας των NK κυττάρων έναντι της σειράς K562 μετά από χορήγηση του σκευάσματος Katalyzsatoren που παρατηρήθηκε κατά μέσο όρο είναι  $86 \pm 7$ , 0 και 0% στις αναλογίες 12,5:1, 25:1 και 50:1 αντίστοιχα (Πίνακας 22, διάγραμμα 59).

Η αύξηση της λειτουργικότητας των NK κυττάρων έναντι της σειράς K562 μετά από χορήγηση του σύμπλοκου σκευάσματος Coenzyme compositum που παρατηρήθηκε κατά μέσο όρο είναι  $71 \pm 5$ ,  $91 \pm 9$  και  $81 \pm 9\%$  ( $p < 0,05$ ) στις αναλογίες 12,5:1, 25:1 και 50:1 αντίστοιχα (Πίνακας 23, διάγραμμα 60).

Η αύξηση της λειτουργικότητας των NK κυττάρων έναντι της σειράς K562 μετά από χορήγηση του εκχυλίσματος του φυτού Aloe vera που παρατηρήθηκε κατά μέσο όρο είναι  $56 \pm 8$ ,  $189 \pm 12$  και  $46 \pm 6\%$  ( $p < 0.05$ ) στις αναλογίες 12,5:1, 25:1 και 50:1 αντίστοιχα (Πίνακας 24, διάγραμμα 61). Το εκχύλισμα από μόνο του χωρίς την παρουσία των NK κυττάρων προκάλεσε κυτταροτοξική δράση κατά μέσο όρο 19,5%.

Επίσης, θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι απλές αντιοξειδωτικές ουσίες όταν χρησιμοποιήθηκαν έναντι καρκινικών κυττάρων στην συγκέντρωση  $3 \times 10^{-6}$  M δεν παρατηρήθηκε να προκαλούν αύξηση της λειτουργικότητας των NK λεμφοκυττάρων.



**Πίνακας 1:** Ποσοστά αύξησης λειτουργικότητας των NK κυττάρων έναντι λειομυοσαρκωμάτων Wistar με χορήγηση ασκορβικού οξέος στην συγκέντρωση  $3 \times 10^{-3}$  M.

	Αναλογίες δραστικών κυττάρων-στόχων σε 12 υγιείς εθελοντές		
	12.5:1	25:1	50:1
Ποσοστό %	107	64	267
κυτταροτοξικότητας	112	59	312
των NK κυττάρων	101	58	278
με χορήγηση	99	59	321
ασκορβικού οξέος	97	62	345
	115	67	268
	102	53	272
	125	64	255
p<0,05	87	68	296
	83	55	311
	96	58	266
	135	66	238

**Πίνακας 2:** Ποσοστά αύξησης λειτουργικότητας των NK κυττάρων έναντι λειομυοσαρκωμάτων Wistar με χορήγηση απιγενίνης στην συγκέντρωση  $3 \times 10^{-3}$  M.

	Αναλογίες δραστικών κυττάρων-στόχων σε 12 υγιείς εθελοντές		
	12.5:1	25:1	50:1
Ποσοστό %	0	330	490
κυτταροτοξικότητας	2	290	312
των NK κυττάρων	5	350	510
με χορήγηση	0	278	468
απιγενίνης	0	337	379
	1	305	397
	0	367	432
	0	320	412
p<0,05	0	342	580
	0	357	520
	3	376	524
	0	297	563



**Πίνακας 3:** Ποσοστά αύξησης λειτουργικότητας των NK κυττάρων έναντι λειομυοσαρκωμάτων Wistar με χορήγηση καρβακρόλης στην συγκέντρωση  $3 \times 10^{-3}$  M.

	Αναλογίες δραστικών κυττάρων-στόχων σε 12 υγιείς εθελοντές		
	12.5:1	25:1	50:1
Ποσοστό % κυτταροτοξικότητας των NK κυττάρων με χορήγηση καρβακρόλης	0	97	0
	2	102	0
	0	104	1
	6	99	0
	0	97	0
	1	135	3
	0	102	0
	8	125	0
p<0,05	0	97	9
	0	102	0
	10	105	7
	2	112	2

**Πίνακας 4:** Ποσοστά αύξησης λειτουργικότητας των NK κυττάρων έναντι λειομυοσαρκωμάτων Wistar με χορήγηση ρεσβερατρόλης στην συγκέντρωση  $3 \times 10^{-3}$  M.

	Αναλογίες δραστικών κυττάρων-στόχων σε 12 υγιείς εθελοντές		
	12.5:1	25:1	50:1
Ποσοστό % κυτταροτοξικότητας των NK κυττάρων με χορήγηση ρεσβερατρόλης	324	475	59
	290	323	67
	324	476	58
	265	430	59
	319	399	62
	302	402	69
	345	420	63
	319	435	57
p<0,05	333	540	58
	347	505	65
	364	514	58
	299	483	69



**Πίνακας 5:** Ποσοστά αύξησης λειτουργικότητας των NK κυττάρων έναντι λειομυοσαρκωμάτων Wistar με χορήγηση του εκχυλίσματος του φυτού *Cypressus sempervirens*.

	Αναλογίες δραστικών κυττάρων-στόχων σε 12 υγιείς εθελοντές		
	12.5:1	25:1	50:1
Ποσοστό % κυτταροτοξικότητας των NK κυττάρων με χορήγηση <i>Cypressus</i> <i>sempervirens</i>	287	267	147
	272	312	122
	298	245	158
	251	302	121
	325	301	175
	238	234	148
	342	262	152
	305	265	165
	276	296	146
$p < 0,05$	301	301	151
	285	275	176
	328	239	138

**Πίνακας 6:** Ποσοστά αύξησης λειτουργικότητας των NK κυττάρων έναντι λειομυοσαρκωμάτων Wistar με χορήγηση του εκχυλίσματος του φυτού *Viscum album*.

	Αναλογίες δραστικών κυττάρων-στόχων σε 12 υγιείς εθελοντές		
	12.5:1	25:1	50:1
Ποσοστό % κυτταροτοξικότητας των NK κυττάρων με χορήγηση <i>Viscum album</i>	356	175	47
	380	155	72
	329	145	88
	316	202	81
	325	167	75
	357	134	48
	342	162	95
	305	165	65
$p < 0,05$	354	196	86
	334	201	91
	355	135	76
	328	139	58



**Πίνακας 7:** Ποσοστά αύξησης λειτουργικότητας των NK κυττάρων έναντι λειομυοσαρκωμάτων Wistar με χορήγηση της βαναδοκουστεΐνης στην συγκέντρωση  $3 \times 10^{-3}$  M.

	Αναλογίες δραστικών κυττάρων-στόχων σε 12 υγιείς εθελοντές		
	12.5:1	25:1	50:1
Ποσοστό %	267	344	57
κυτταροτοξικότητας	282	375	82
των NK κυττάρων	278	329	74
με χορήγηση	301	386	84
βαναδοκουστεΐνης	245	365	79
	268	345	58
	262	342	85
	275	395	65
p<0,05	283	382	76
	311	334	91
	304	355	66
	248	338	68

**Πίνακας 8:** Ποσοστά αύξησης λειτουργικότητας των NK κυττάρων έναντι λειομυοσαρκωμάτων Wistar με χορήγηση της βανοδο-πουτρεσκίνης (van putr) στην συγκέντρωση  $3 \times 10^{-3}$  M.

	Αναλογίες δραστικών κυττάρων-στόχων σε 12 υγιείς εθελοντές		
	12.5:1	25:1	50:1
Ποσοστό %	575	475	0
κυτταροτοξικότητας	546	483	0
των NK κυττάρων	613	506	1
με χορήγηση van	588	530	0
putr	599	499	0
	612	467	3
	568	458	0
	589	485	0
p<0,05	623	522	9
	593	505	0
	594	478	7
	583	483	2



**Πίνακας 9:** Ποσοστά αύξησης λειτουργικότητας των NK κυττάρων έναντι λειομυοσαρκωμάτων Wistar με χορήγηση της θυμόλης στην συγκέντρωση  $3 \times 10^{-3}$  M.

	Αναλογίες δραστικών κυττάρων-στόχων σε 12 υγιείς εθελοντές		
	12.5:1	25:1	50:1
Ποσοστό % κυτταροτοξικότητας των NK κυττάρων με χορήγηση θυμόλης	0	136	296
	2	167	301
	0	147	275
	6	122	262
	0	158	275
	0	121	283
	9	146	311
	0	151	267
p<0,05	0	176	312
	3	138	245
	0	167	302
	0	148	312

**Πίνακας 10:** Ποσοστά αύξησης λειτουργικότητας των NK κυττάρων έναντι λειομυοσαρκωμάτων Wistar με χορήγηση ροζμαρινικού οξέος στην συγκέντρωση  $3 \times 10^{-3}$  M.

	Αναλογίες δραστικών κυττάρων-στόχων σε 12 υγιείς εθελοντές		
	12.5:1	25:1	50:1
Ποσοστό % κυτταροτοξικότητας των NK κυττάρων με χορήγηση ροζμαρινικού οξέος	47	13	147
	36	16	122
	52	04	136
	66	12	122
	68	15	158
	81	12	121
	57	14	118
	72	28	106
p<0,05	57	17	122
	58	38	158
	65	16	121
	72	14	146



**Πίνακας 11:** Ποσοστά αύξησης λειτουργικότητας των NK κυττάρων έναντι λειομυοσαρκωμάτων Wistar με χορήγηση μεθυλικο-νιτροζο-προπάνιου στην συγκέντρωση  $3 \times 10^{-3}$  M.

	Αναλογίες δραστικών κυττάρων-στόχων σε 12 υγιείς εθελοντές		
	12.5:1	25:1	50:1
Ποσοστό %	81	329	478
κυτταροτοξικότητας	57	386	483
των NK κυττάρων	72	365	420
με χορήγηση	68	345	435
μεθυλικο-νιτροζο-	35	364	379
προπάνιου	45	367	397
	67	356	465
	57	380	445
p<0,05	77	354	475
	56	334	483
	35	355	490
	87	380	497

**Πίνακας 12:** Ποσοστά αύξησης λειτουργικότητας των NK κυττάρων έναντι λειομυοσαρκωμάτων Wistar με χορήγηση PBN στην συγκέντρωση  $3 \times 10^{-3}$  M.

	Αναλογίες δραστικών κυττάρων-στόχων σε 12 υγιείς εθελοντές		
	12.5:1	25:1	50:1
Ποσοστό %	0	315	625
κυτταροτοξικότητας	0	276	589
των NK κυττάρων	3	298	620
με χορήγηση PBN	9	336	645
	0	334	678
	7	303	637
	2	277	589
p<0,05	1	287	598
	0	325	654
	8	325	658
	0	311	635
	2	321	644





**Πίνακας 13:** Ποσοστά αύξησης λειτουργικότητας των NK κυττάρων έναντι λειομυοσάρκωμάτων Wistar με χορήγηση ασπιρινικού χαλκού στην συγκέντρωση  $3 \times 10^{-3}$  M.

	Αναλογίες δραστικών κυττάρων-στόχων σε 12 υγιείς εθελοντές		
	12.5:1	25:1	50:1
Ποσοστό %	297	89	46
κυτταροτοξικότητας	268	92	38
των NK κυττάρων	267	71	47
με χορήγηση	297	58	25
ασπιρινικού χαλκού	280	65	26
	302	72	33
	257	68	52
	282	35	23
p<0,05	325	45	39
	279	67	31
	258	82	43
	327	78	51

**Πίνακας 14:** Ποσοστά αύξησης λειτουργικότητας των NK κυττάρων έναντι λειομυοσάρκωμάτων Wistar με χορήγηση διβούτυλο-δισασκορβικού κασσιτέρου στην συγκέντρωση  $3 \times 10^{-3}$  M.

	Αναλογίες δραστικών κυττάρων-στόχων σε 12 υγιείς εθελοντές		
	12.5:1	25:1	50:1
Ποσοστό %	315	15	62
κυτταροτοξικότητας	276	27	79
των NK κυττάρων	298	29	62
με χορήγηση	336	36	45
διβούτυλο-	334	14	78
δισασκορβικού	303	03	37
κασσιτέρου	277	21	58
	282	12	68
	325	15	54
p<0,05	325	07	38
	311	11	35
	321	04	44



**Πίνακας 15:** Ποσοστά αύξησης λειτουργικότητας των NK κυττάρων έναντι λειομυοσαρκωμάτων Wistar με χορήγηση θειογλυκολικού μολυβδαινίου στην συγκέντρωση  $3 \times 10^{-3}$  M.

	Αναλογίες δραστικών κυττάρων-στόχων σε 12 υγιείς εθελοντές		
	12.5:1	25:1	50:1
Ποσοστό %	276	75	05
κυτταροτοξικότητας	276	77	19
των NK κυττάρων	262	58	02
με χορήγηση	276	53	15
θειογλυκολικού	302	61	08
μολυβδαινίου	303	73	02
	259	77	01
	272	72	11
P<0,001	314	85	14
	305	51	02
	301	71	05
	312	81	04

**Πίνακας 16:** Ποσοστά αύξησης λειτουργικότητας των NK κυττάρων έναντι λειομυοσαρκωμάτων Wistar με χορήγηση πλατίνας με πούτρεσκίνη στην συγκέντρωση  $3 \times 10^{-3}$  M.

	Αναλογίες δραστικών κυττάρων-στόχων σε 12 υγιείς εθελοντές		
	12.5:1	25:1	50:1
Ποσοστό %	--	--	--
κυτταροτοξικότητας	--	--	--
των NK κυττάρων	--	--	--
με χορήγηση	--	--	--
πλατίνας	--	--	--
	--	--	--
	--	--	--
	--	--	--
	--	--	--
	--	--	--



**Πίνακας 17:** Ποσοστά αύξησης λειτουργικότητας των NK κυττάρων έναντι λειομυοσαρκωμάτων Wistar με χορήγηση γενιστεΐνης στην συγκέντρωση  $3 \times 10^{-3}$  M.

	Αναλογίες δραστικών κυττάρων-στόχων σε 12 υγιείς εθελοντές		
	12.5:1	25:1	50:1
Ποσοστό % κυτταροτοξικότητας των NK κυττάρων με χορήγηση γενιστεΐνης	268	135	06
	297	122	12
	287	109	02
	278	92	15
	329	81	18
	312	84	03
	287	107	01
	282	101	04
p<0,05	268	108	06
	275	95	15
	304	82	13
	302	89	02

**Πίνακας 18:** Ποσοστά αύξησης λειτουργικότητας των NK κυττάρων έναντι της σειράς K562 με χορήγηση του καθαρού εκχυλίσματος του φυτού *Morinda citrifolia* (noni).

	Αναλογίες δραστικών κυττάρων-στόχων σε 12 υγιείς εθελοντές		
	12.5:1	25:1	50:1
Ποσοστό % κυτταροτοξικότητας των NK κυττάρων με χορήγηση <i>Morinda citrifolia</i>	312	326	385
	276	286	419
	268	298	420
	286	343	367
	274	353	378
	303	303	437
	277	356	389
	268	359	398
p<0,05	319	331	394
	328	312	438
	276	337	435
	301	343	294



**Πίνακας 18-1:** Ποσοστά αύξησης λειτουργικότητας των NK κυττάρων έναντι λειομυοσαρκωμάτων Wistar με χορήγηση καθαρού εκχυλίσματος του φυτού *Morinda citrifolia* (noni).

	Αναλογίες δραστικών κυττάρων-στόχων σε 12 υγιείς εθελοντές		
	12.5:1	25:1	50:1
Ποσοστό %	215	279	321
κυτταροτοξικότητας	276	257	389
των NK κυττάρων	248	298	260
με χορήγηση του	236	312	245
<i>Morinda citrifolia</i>	241	302	378
	258	265	337
	223	277	349
	243	282	348
$p < 0,05$	256	284	354
	217	257	298
	287	304	295
	241	314	294

**Πίνακας 19:** Ποσοστά αύξησης λειτουργικότητας των NK κυττάρων έναντι λειομυοσαρκωμάτων Wistar με χορήγηση του σύμπλοκου σκευάσματος Noni premium.

	Αναλογίες δραστικών κυττάρων-στόχων σε 12 υγιείς εθελοντές		
	12.5:1	25:1	50:1
Ποσοστό %	10	10	11
κυτταροτοξικότητας	10	07	10
των NK κυττάρων	13	08	08
με χορήγηση Noni	12	10	10
premium	10	12	10
	07	10	10
	12	07	13
	11	13	10
$p < 0,05$	10	12	07
	08	10	10
	10	07	07
	12	10	10



**Πίνακας 19-1:** Ποσοστά αύξησης λειτουργικότητας των NK κυττάρων έναντι της σειράς K562 με χορήγηση του σύμπλοκου σκευάσματος Noni premium.

	Αναλογίες δραστικών κυττάρων-στόχων σε 12 υγιείς εθελοντές		
	12.5:1	25:1	50:1
Ποσοστό %	12	10	13
κυτταροτοξικότητας	10	13	12
των NK κυττάρων	07	12	10
με χορήγηση Noni	13	10	07
premium	12	07	10
	07	12	07
	08	11	13
	10	13	12
p<0,05	12	12	10
	08	10	10
	10	10	07
	11	07	10

**Πίνακας 20:** Ποσοστά αύξησης λειτουργικότητας των NK κυττάρων έναντι της σειράς K562 με χορήγηση του σύμπλοκου σκευάσματος Ubichinon compositum.

	Αναλογίες δραστικών κυττάρων-στόχων σε 12 υγιείς εθελοντές		
	12.5:1	25:1	50:1
Ποσοστό %	315	31	0
κυτταροτοξικότητας	276	27	0
των NK κυττάρων	298	29	3
με χορήγηση	336	33	9
Ubichinon	334	42	0
compositum	303	38	7
	277	29	2
	282	22	1
p<0,05	325	37	0
	325	22	8
	311	32	0
	321	25	2



**Πίνακας 21:** Ποσοστά αύξησης λειτουργικότητας των NK κυττάρων έναντι της σειράς K562 με χορήγηση του σύμπλοκου σκευάσματος Glyoxal compositum.

	Αναλογίες δραστικών κυττάρων-στόχων σε 12 υγιείς εθελοντές		
	12.5:1	25:1	50:1
Ποσοστό %	202	0	2
κυτταροτοξικότητας	178	1	0
των NK κυττάρων	204	3	4
με χορήγηση	219	2	0
Glyoxal compositum	200	0	0
	197	0	1
	182	2	0
	201	1	0
p<0,05	220	2	5
	219	3	7
	187	0	0
	211	0	2

**Πίνακας 22:** Ποσοστά αύξησης λειτουργικότητας των NK κυττάρων έναντι της σειράς K562 με χορήγηση του σύμπλοκου σκευάσματος Katalysatoren.

	Αναλογίες δραστικών κυττάρων-στόχων σε 12 υγιείς εθελοντές		
	12.5:1	25:1	50:1
Ποσοστό %	86	0	0
κυτταροτοξικότητας	89	0	4
των NK κυττάρων	68	1	3
με χορήγηση	95	3	0
Katalysatoren	78	2	0
	63	0	9
	89	0	12
	98	1	1
p<0,05	78	3	0
	102	0	3
	92	6	1
	88	10	0



**Πίνακας 23:** Ποσοστά αύξησης λειτουργικότητας των NK κυττάρων έναντι της σειράς K562 με χορήγηση του σύμπλοκου σκευάσματος Coenzyme compositum.

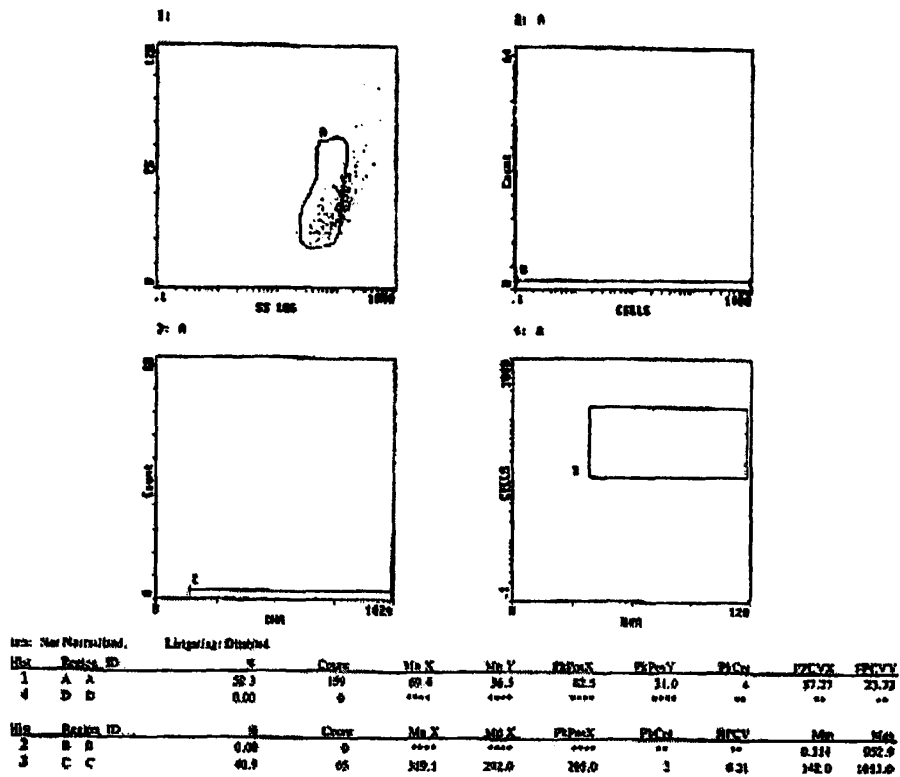
	Αναλογίες δραστικών κυττάρων-στόχων σε 12 υγιείς εθελοντές		
	12.5:1	25:1	50:1
Ποσοστό % κυτταροτοξικότητας των NK κυττάρων με χορήγηση Coenzyme compositum	70	85	80
	80	76	89
	83	98	62
	69	65	102
	56	94	105
	57	103	63
	82	107	89
	71	82	98
	70	75	67
p<0,05	78	95	68
	61	91	63
	72	121	88

**Πίνακας 24:** Ποσοστά αύξησης λειτουργικότητας των NK κυττάρων έναντι της σειράς K562 με χορήγηση του εκχυλίσματος του φυτού Aloe vera.

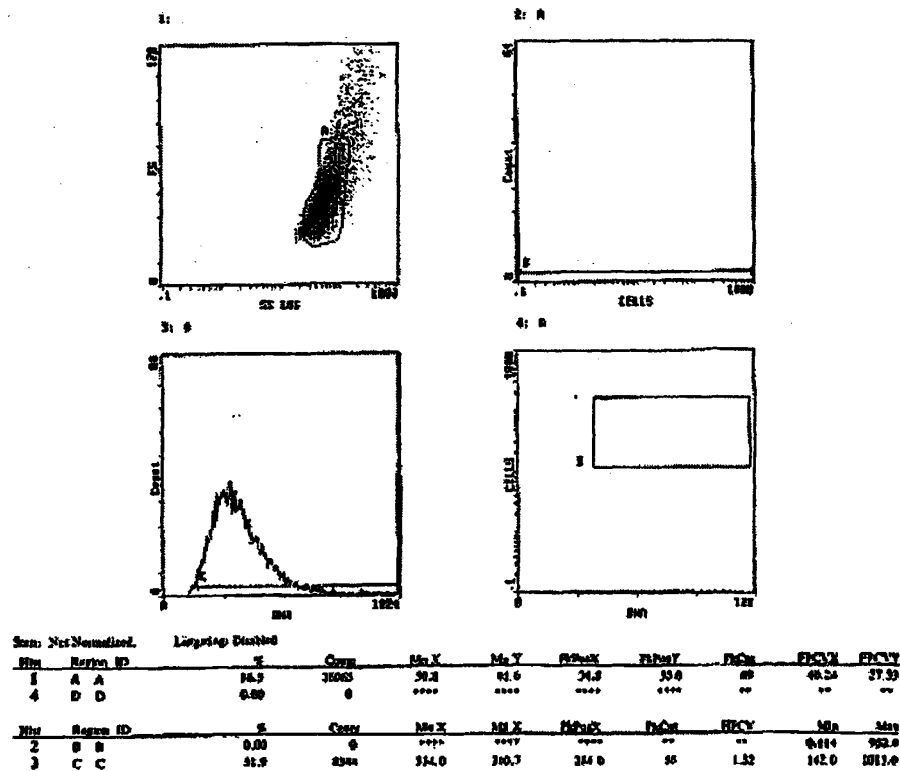
	Αναλογίες δραστικών κυττάρων-στόχων σε 12 υγιείς εθελοντές		
	12.5:1	25:1	50:1
Ποσοστό % κυτταροτοξικότητας των NK κυττάρων με χορήγηση Aloe vera	58	183	44
	76	176	58
	39	198	62
	36	206	45
	54	204	38
	73	173	37
	77	167	58
	42	178	49
p<0,05	55	225	34
	57	165	28
	61	181	48
	42	221	54

**Διάγραμμα 1:** Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση ασκορβικού οξέος στην συγκέντρωση δραστικών κυττάρων-στόχων 12,5:1.





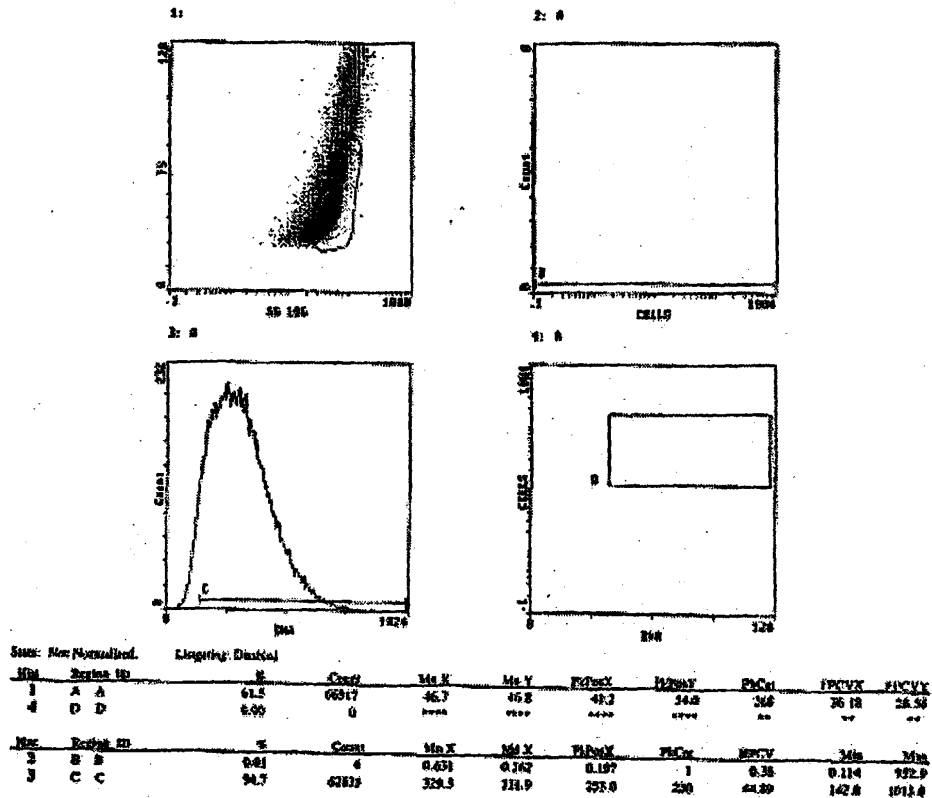
Διάγραμμα 2: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση ασκορβικού οξέος στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 25:1.



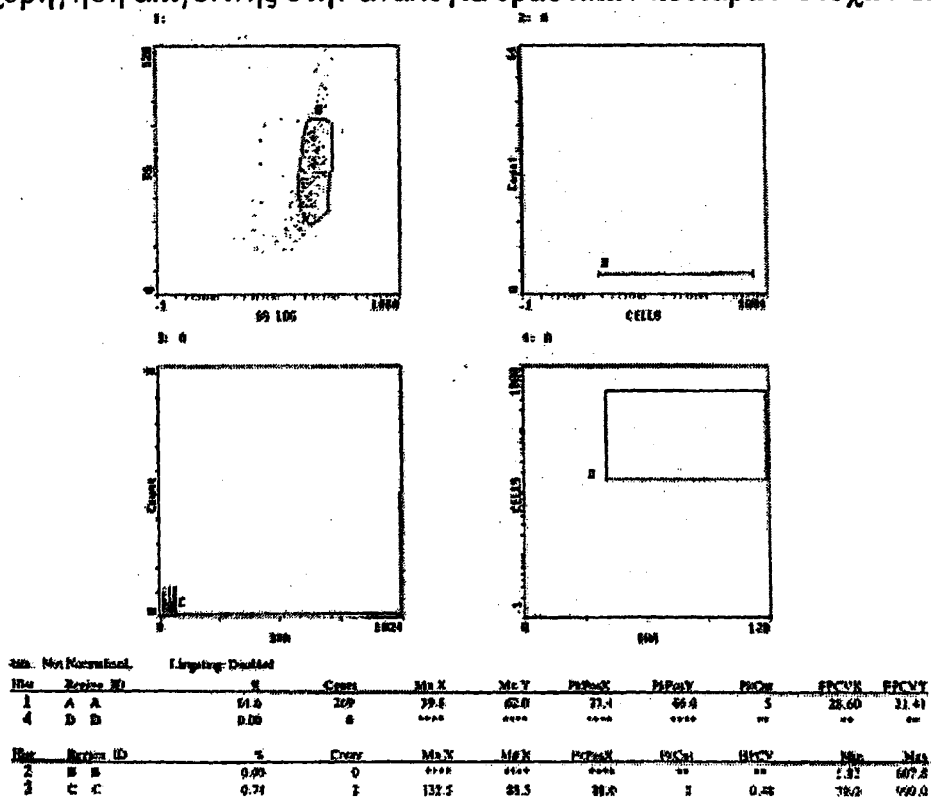
Διάγραμμα 3: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση ασκορβικού οξέος στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 50:1.



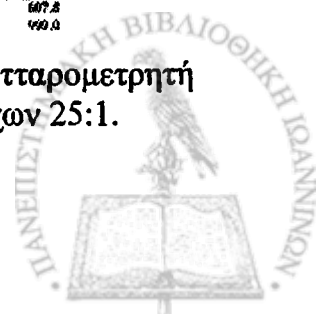


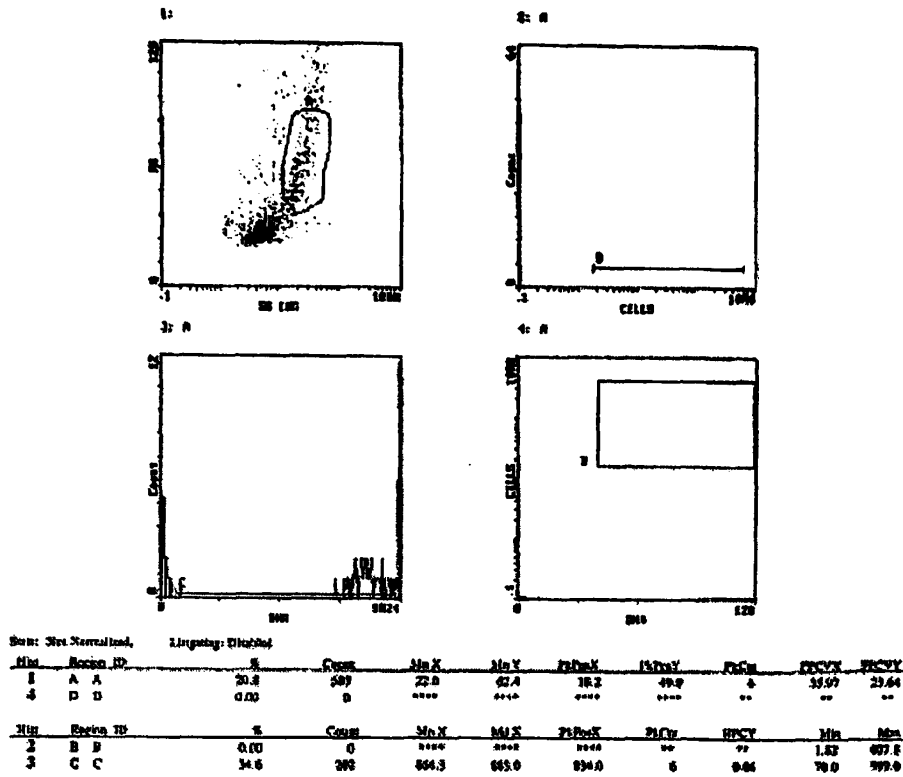


Διάγραμμα 4: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση απιγενίνης στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 12,5:1.

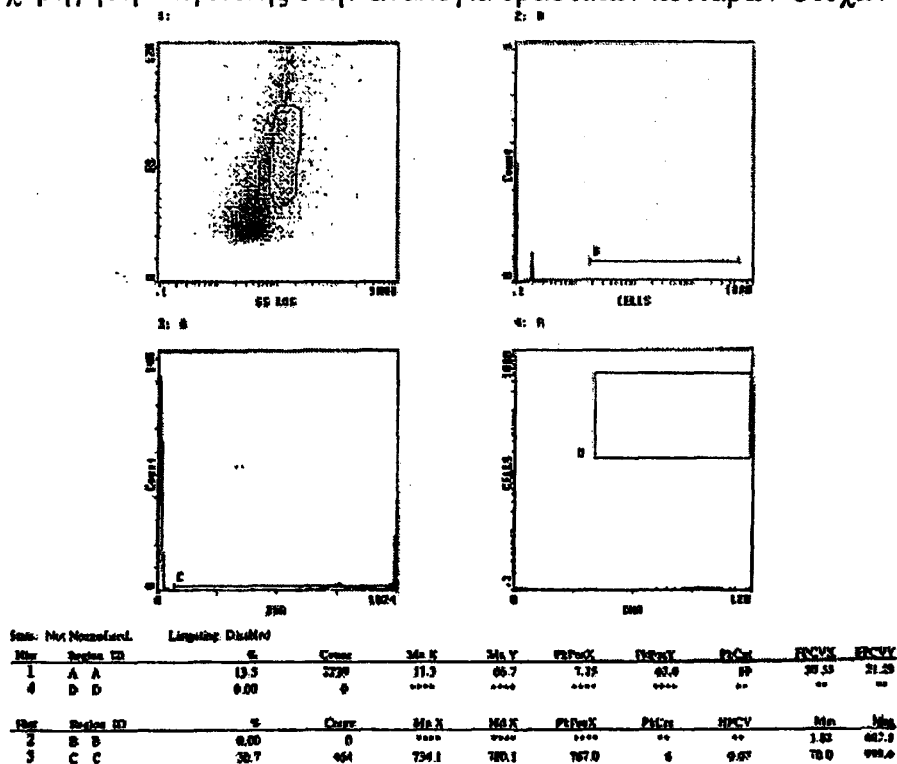


Διάγραμμα 5: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση απιγενίνης στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 25:1.



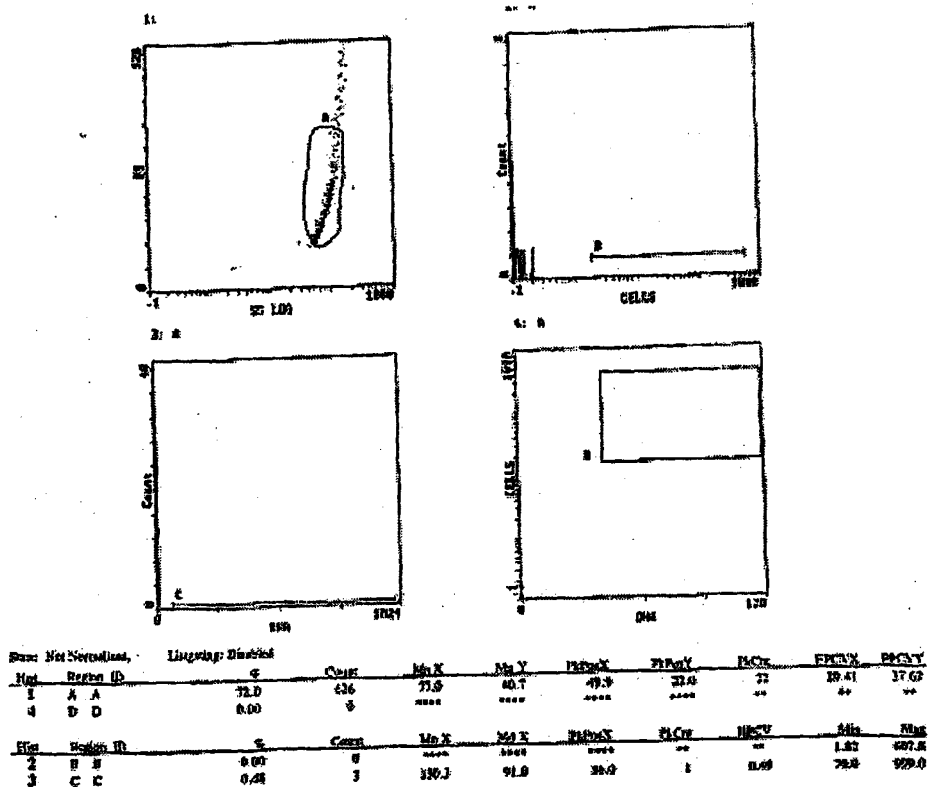


Διάγραμμα 6: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση απιγενίνης στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 50:1.

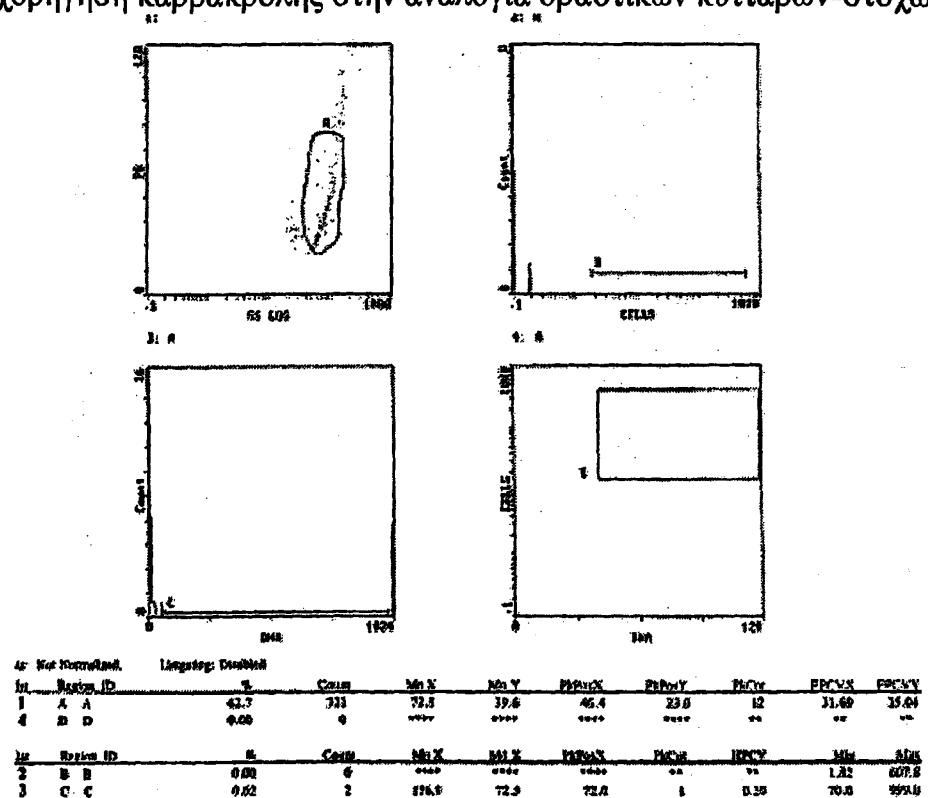


Διάγραμμα 7: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση καρβακρόλης στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 12,5:1.



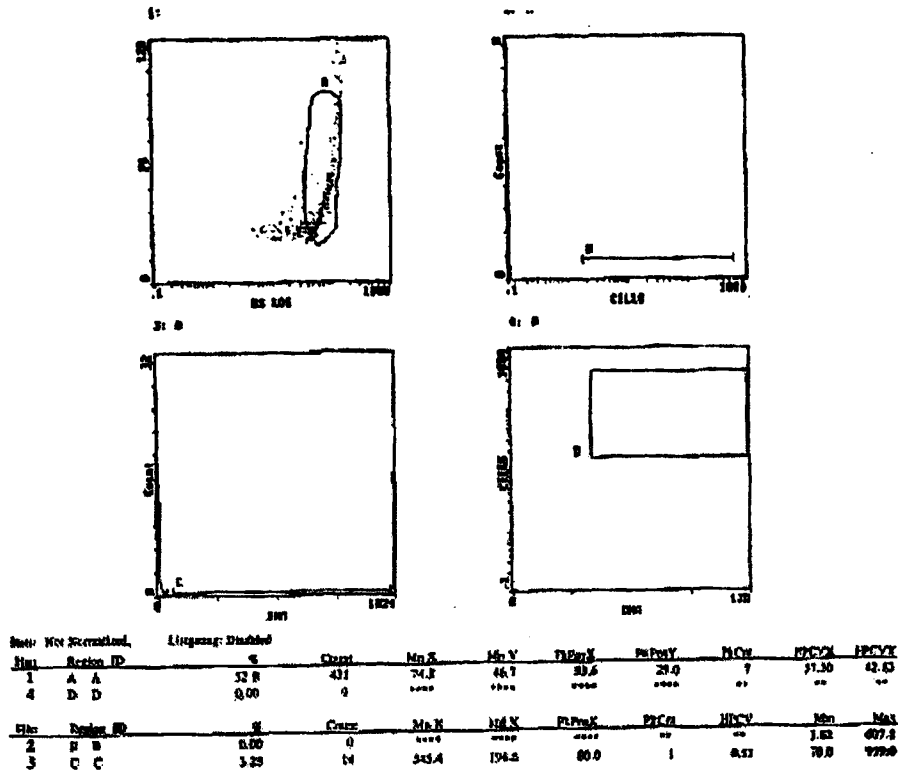


Διάγραμμα 8: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση καρβακρόλης στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 25:1.

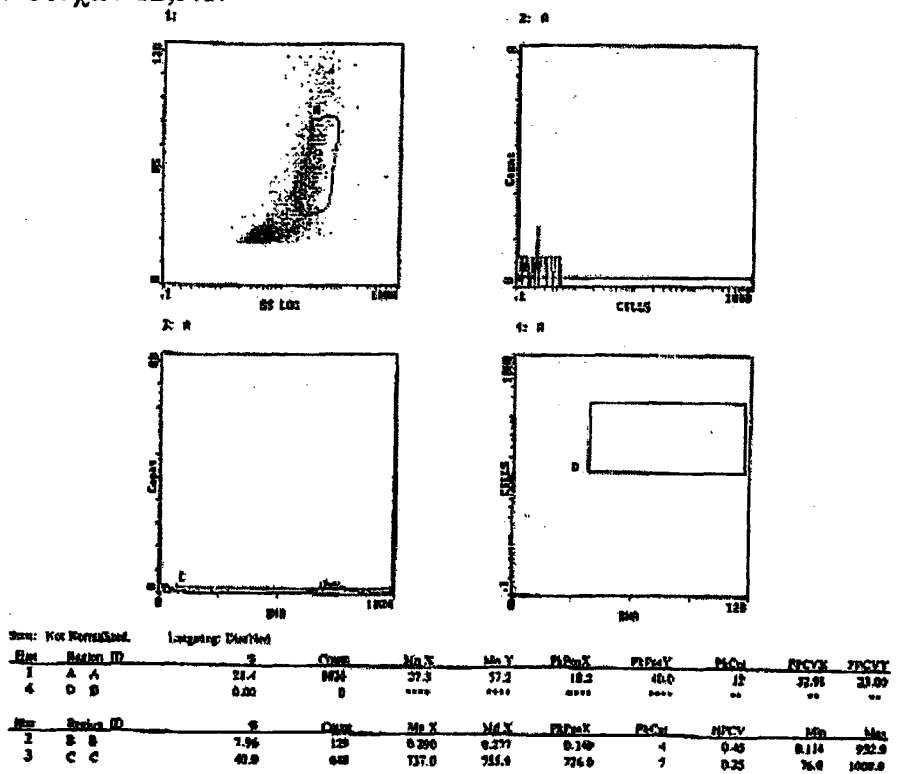


Διάγραμμα 9: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση καρβακρόλης στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 50:1.



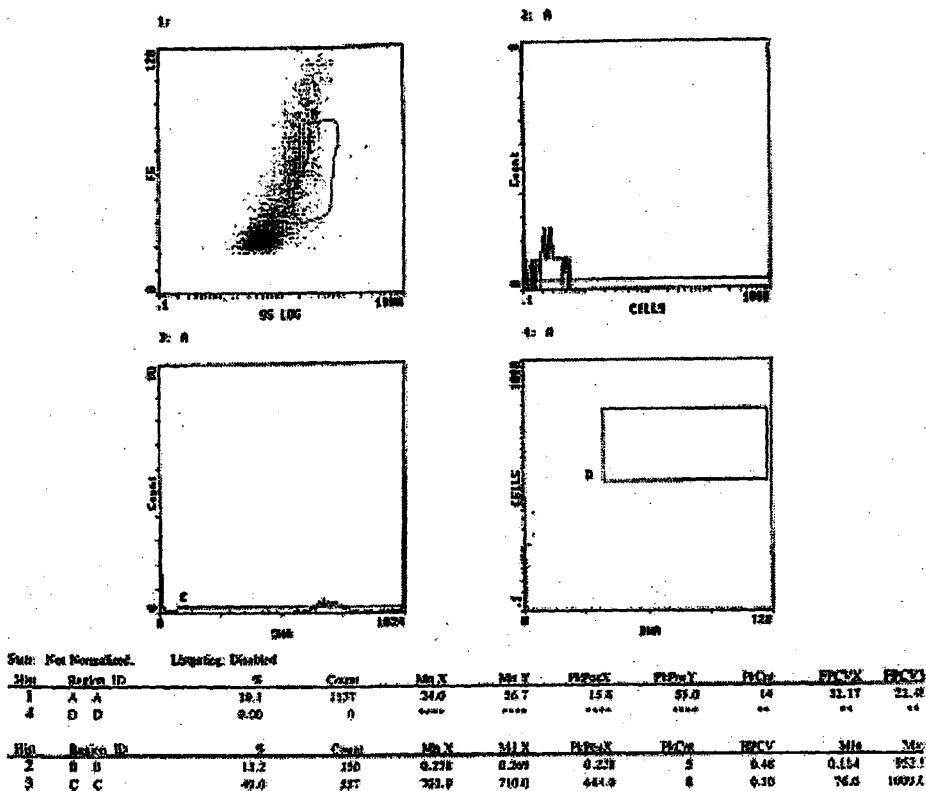


Διάγραμμα 10: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση ρεσβερατρόλης στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 12,5:1.

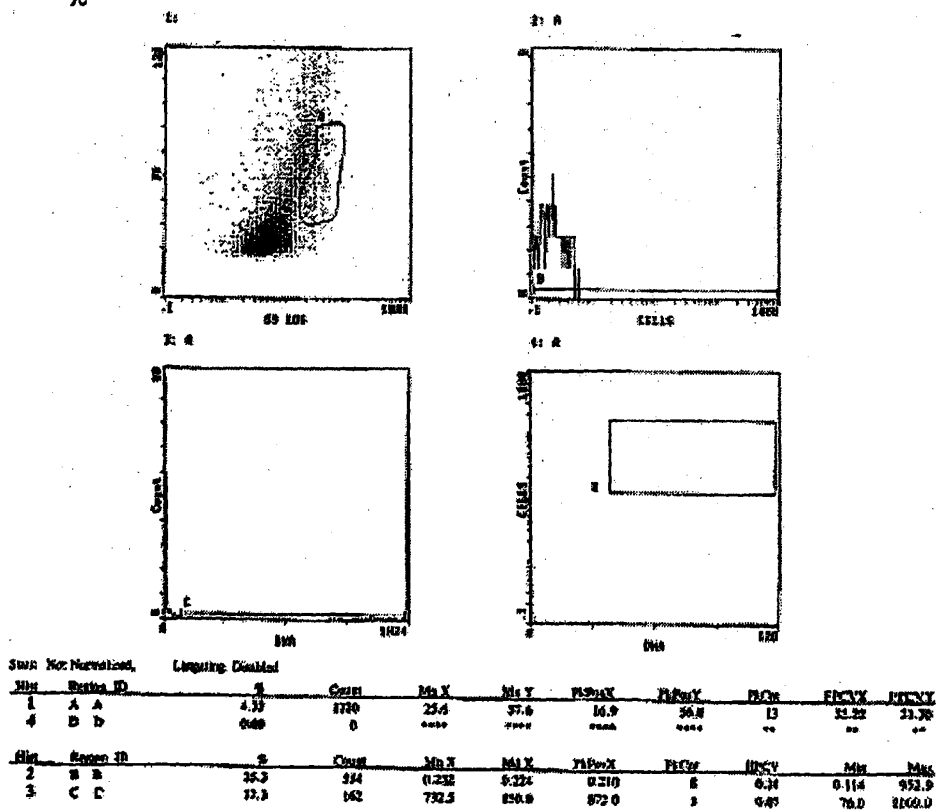


Διάγραμμα 11: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση ρεσβερατρόλης στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 25:1.



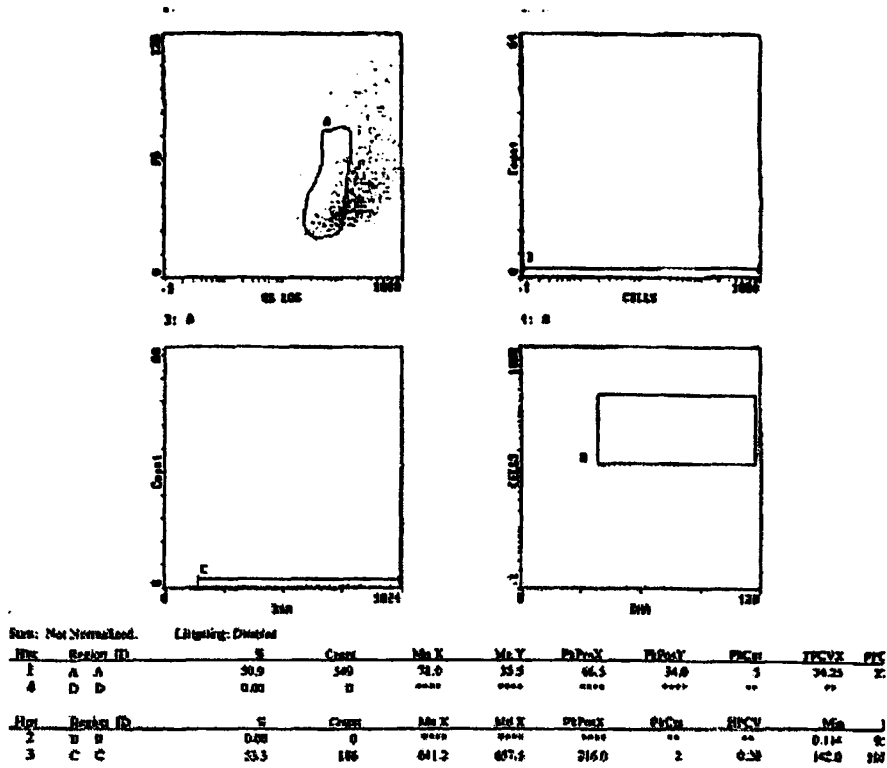


Διάγραμμα 12: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση ρεσβερατρόλης στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 50:1.

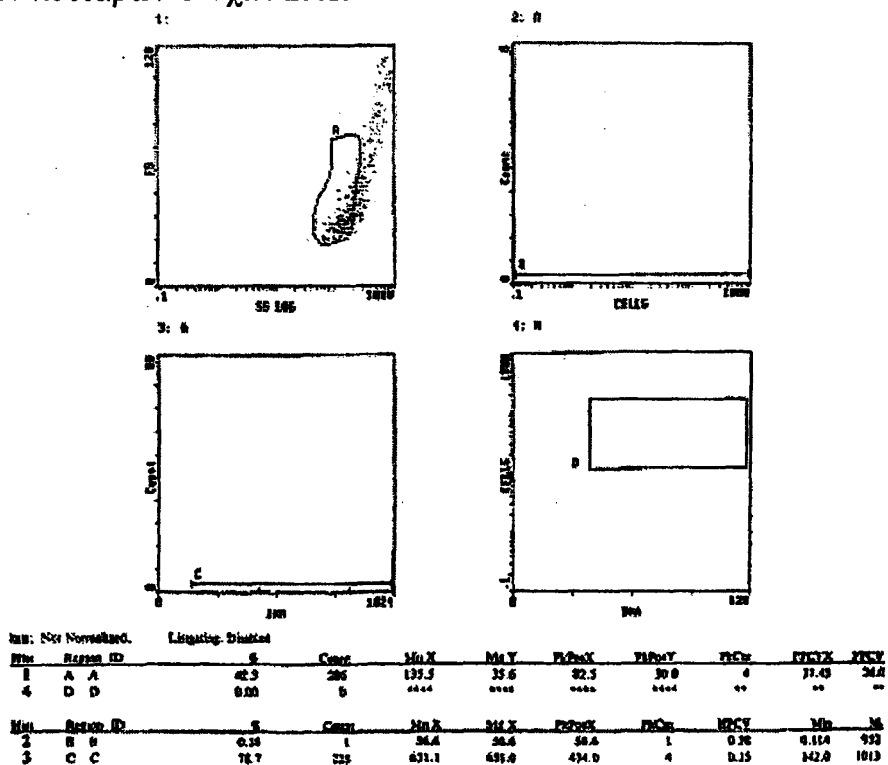


Διάγραμμα 13: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση Cypressus sempervirens στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 12,5:1



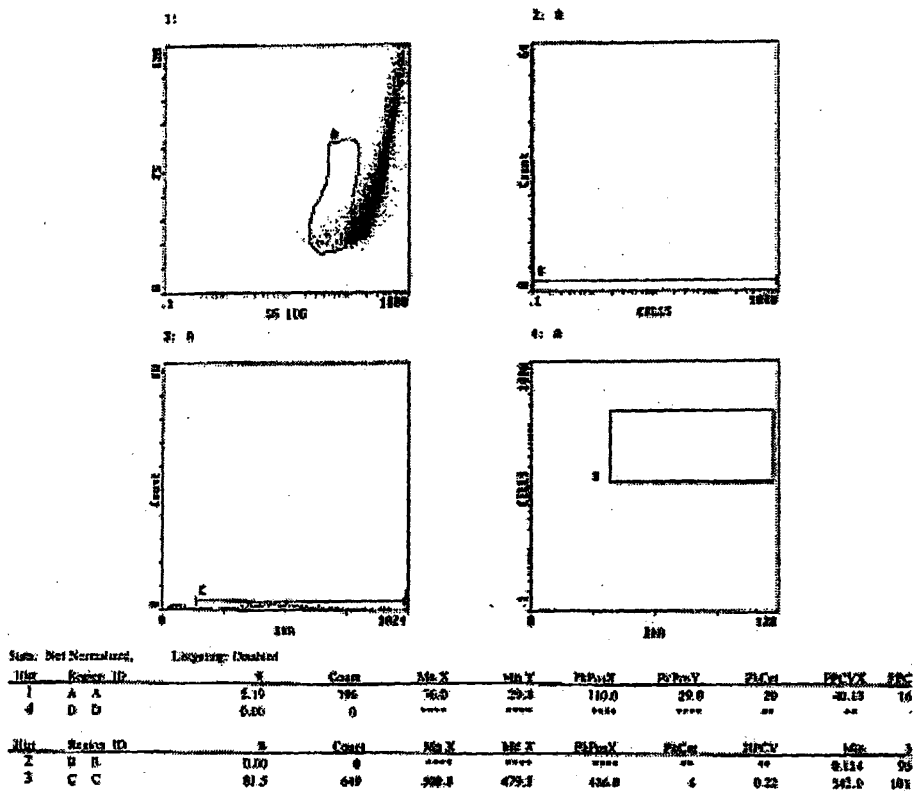


Διάγραμμα 14: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση *Cyperus sempervirens* στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 25:1.

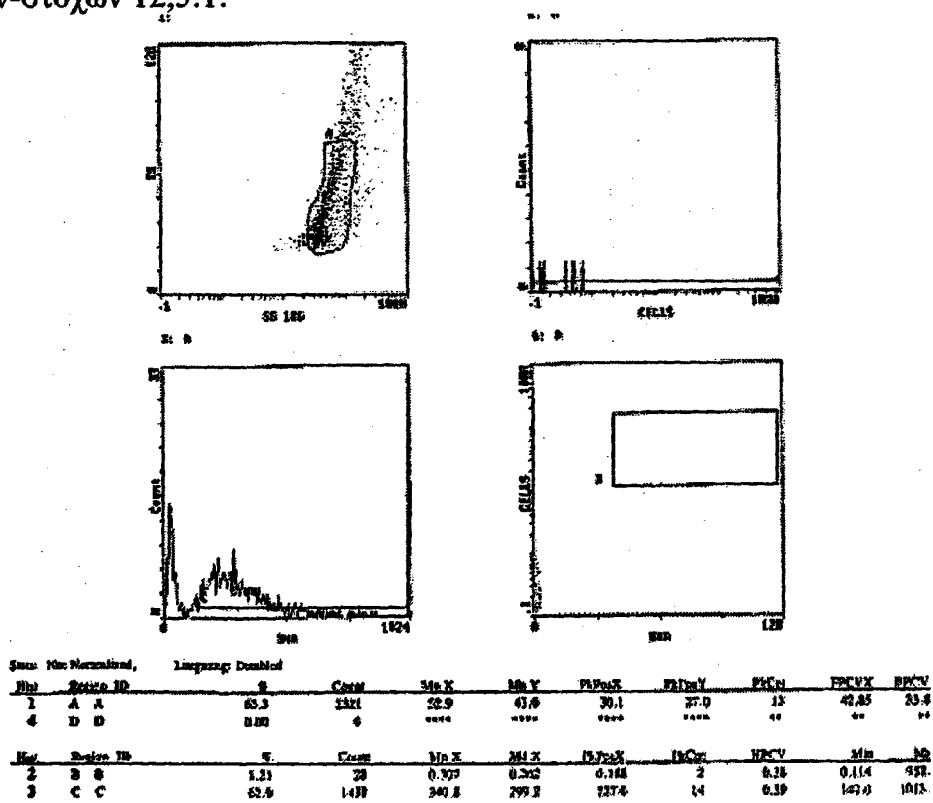


Διάγραμμα 15: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση *Cyperus sempervirens* στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 50:1.



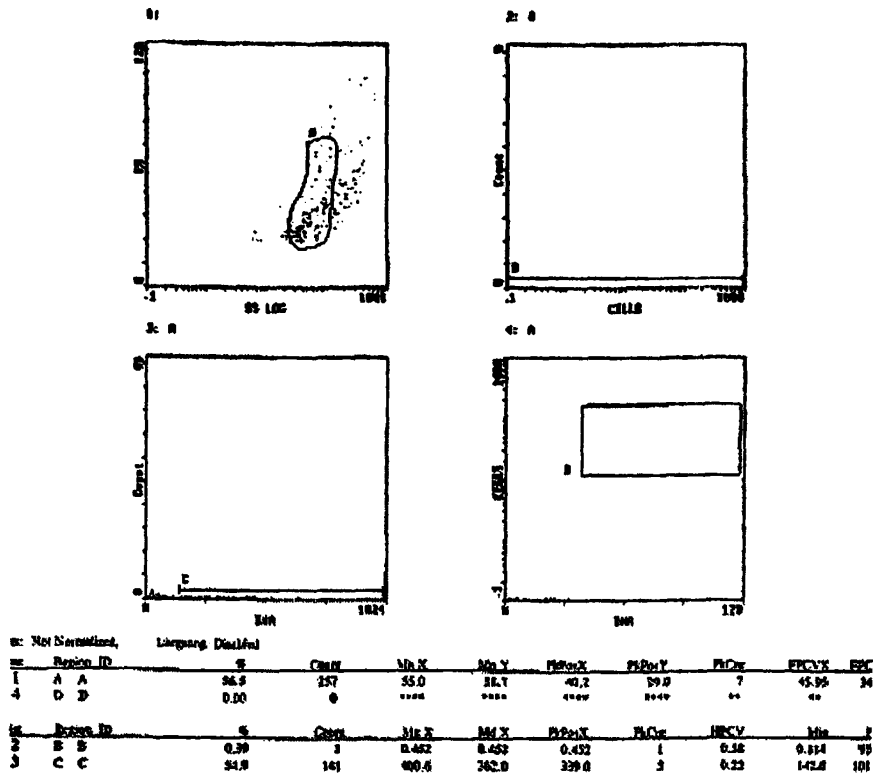


Διάγραμμα 16: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση Viscum album στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 12,5:1.

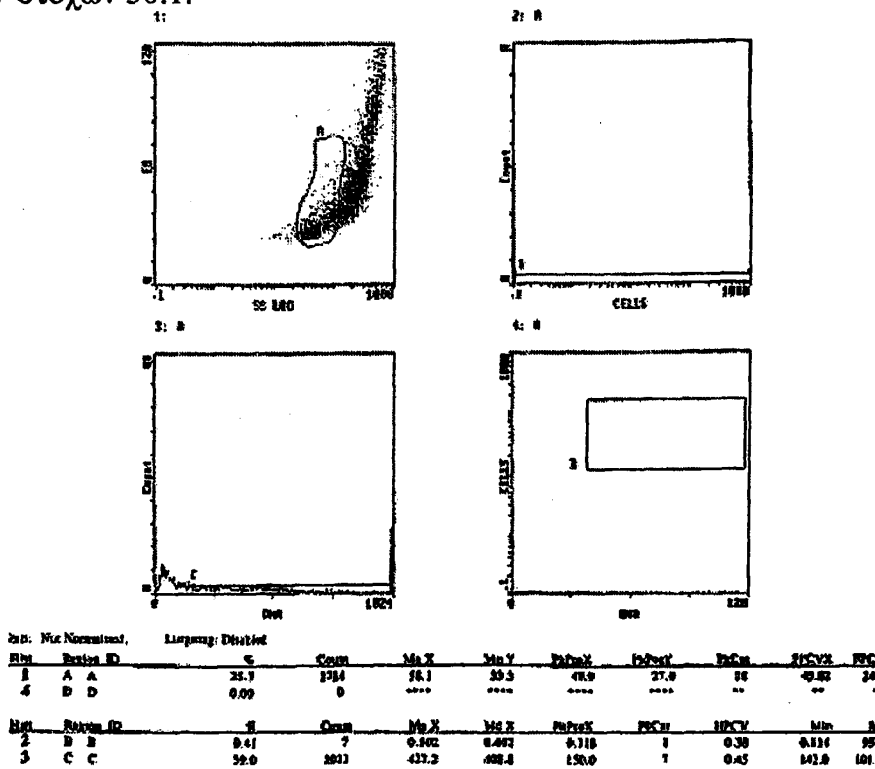


Διάγραμμα 17: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση Viscum album στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 25:1.





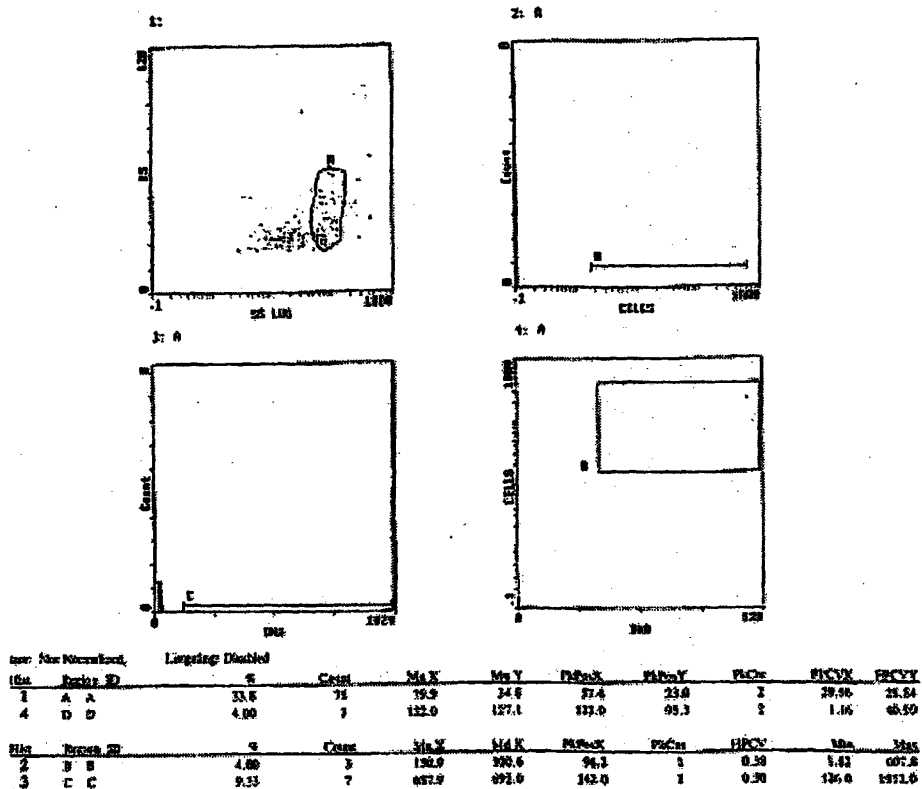
Διάγραμμα 18: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση *Viscum album* στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 50:1.



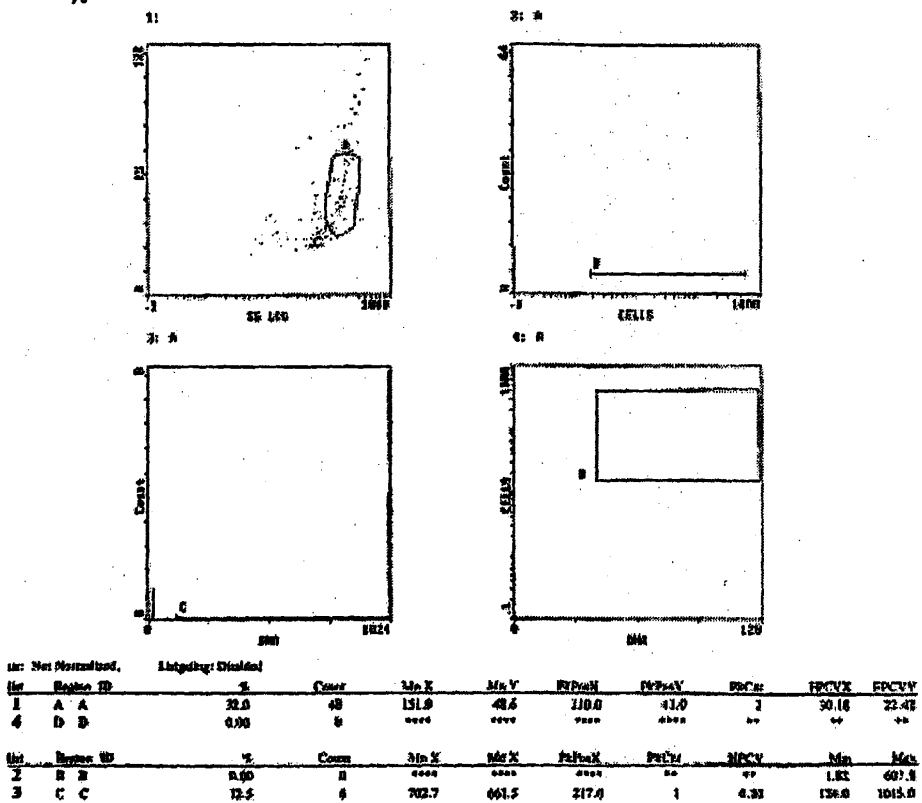
Διάγραμμα 19: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση βαναδίου-κυστεΐνης στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 12,5:1.





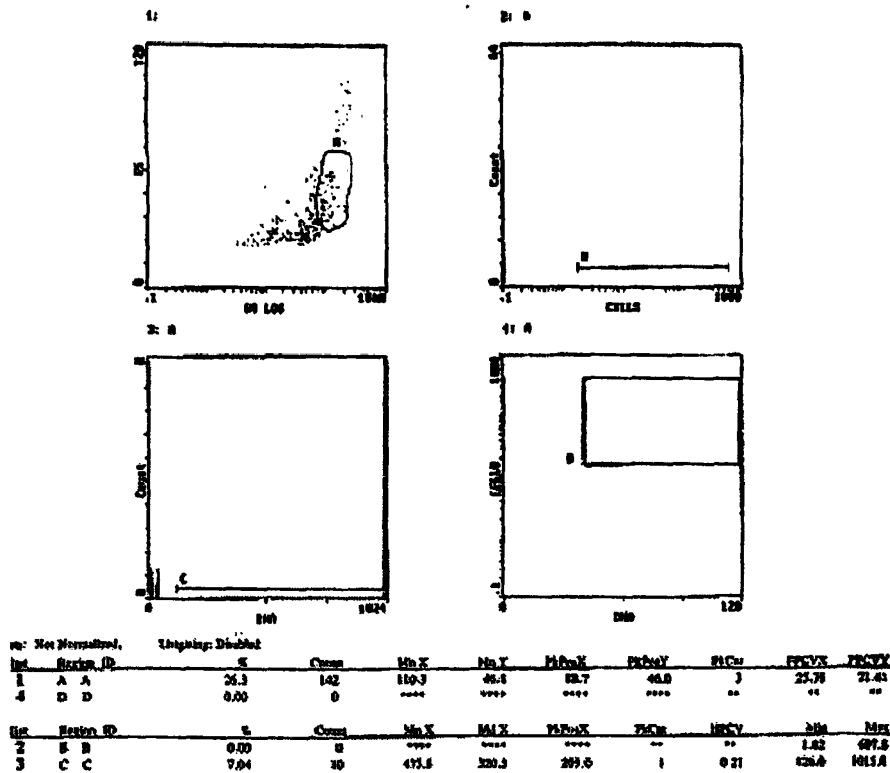


Διάγραμμα 20: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση βαναδίου-κυστεΐνης στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 25:1.

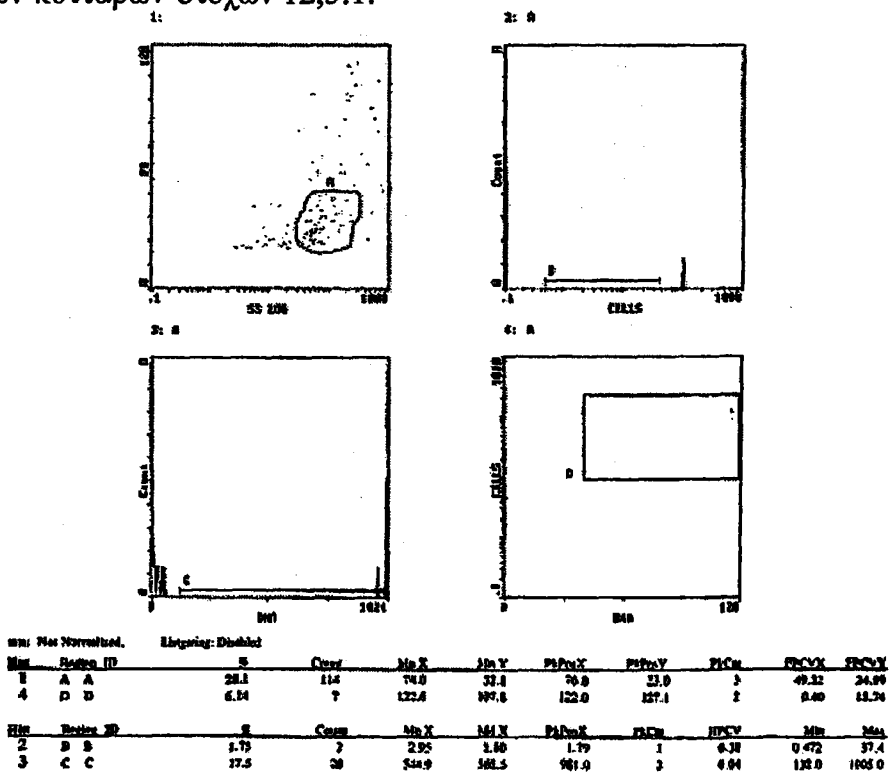


Διάγραμμα 21: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση βαναδίου-κυστεΐνης στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 50:1.



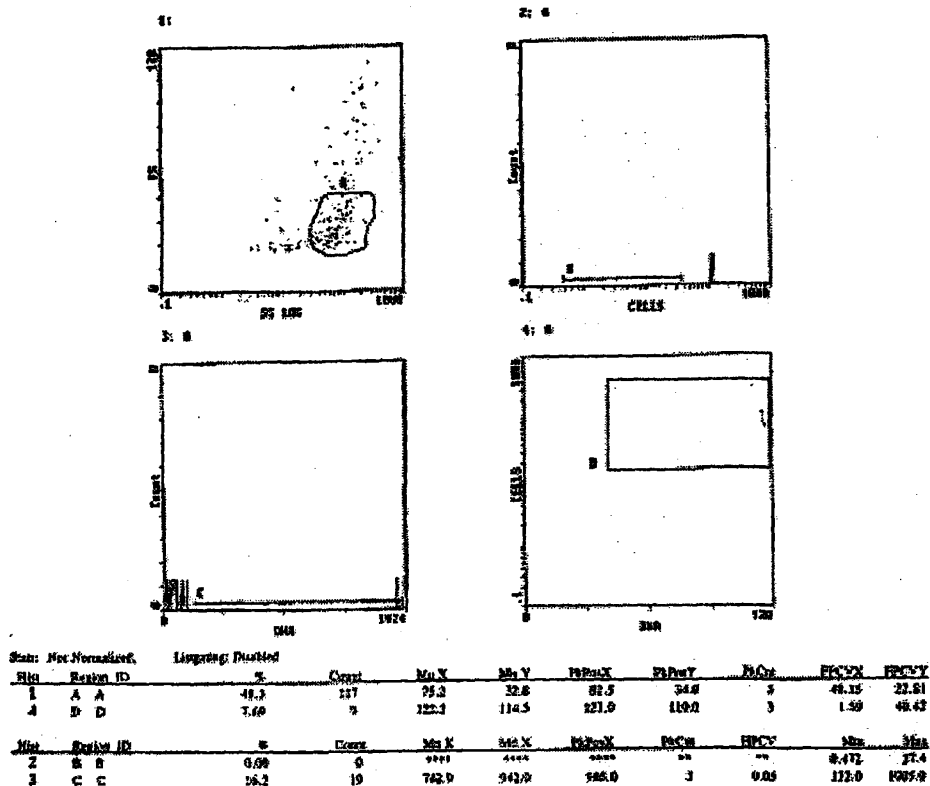


Διάγραμμα 22: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση βαναδίου-πυρρεσκίνης στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 12,5:1.

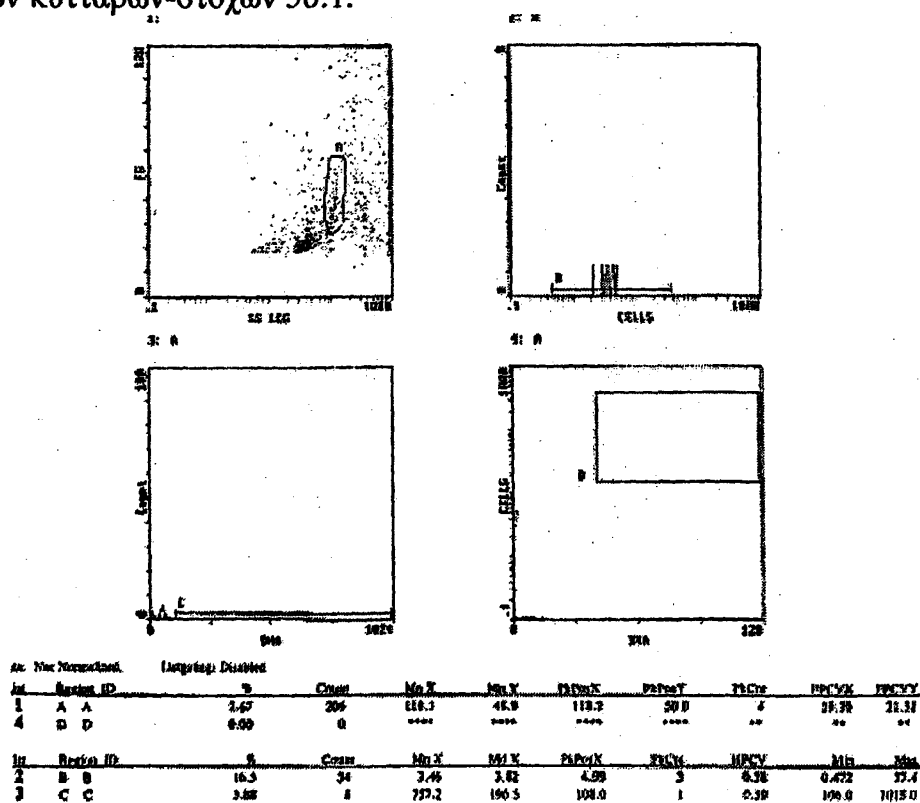


Διάγραμμα 23: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση βαναδίου-πυρρεσκίνης στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 25:1.



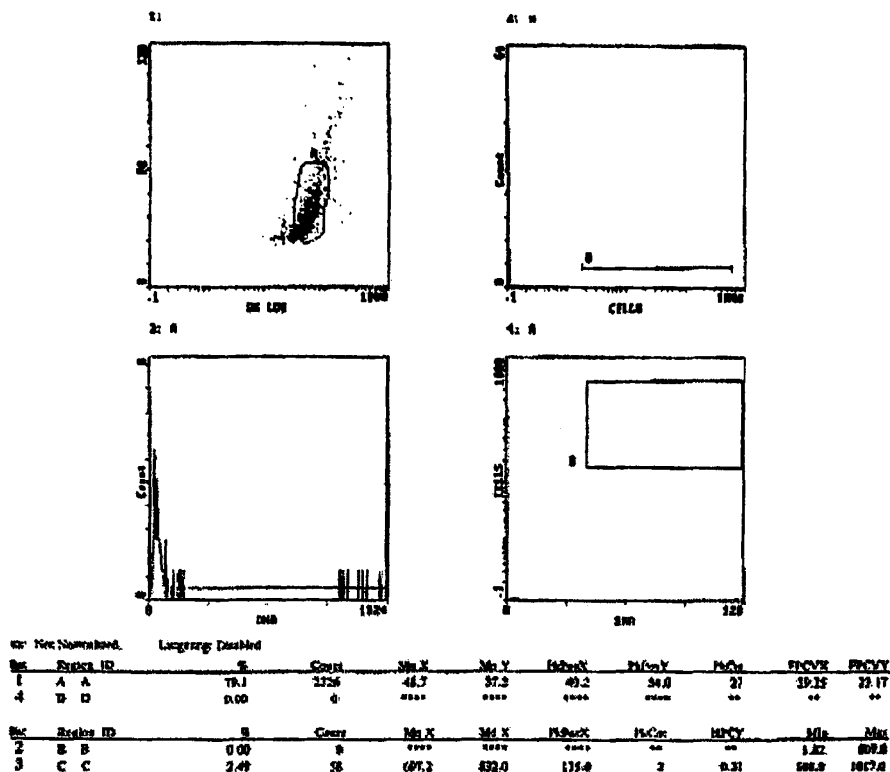


**Διάγραμμα 24:** Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση βαναδίου-πυρρεσκίνης στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 50:1.

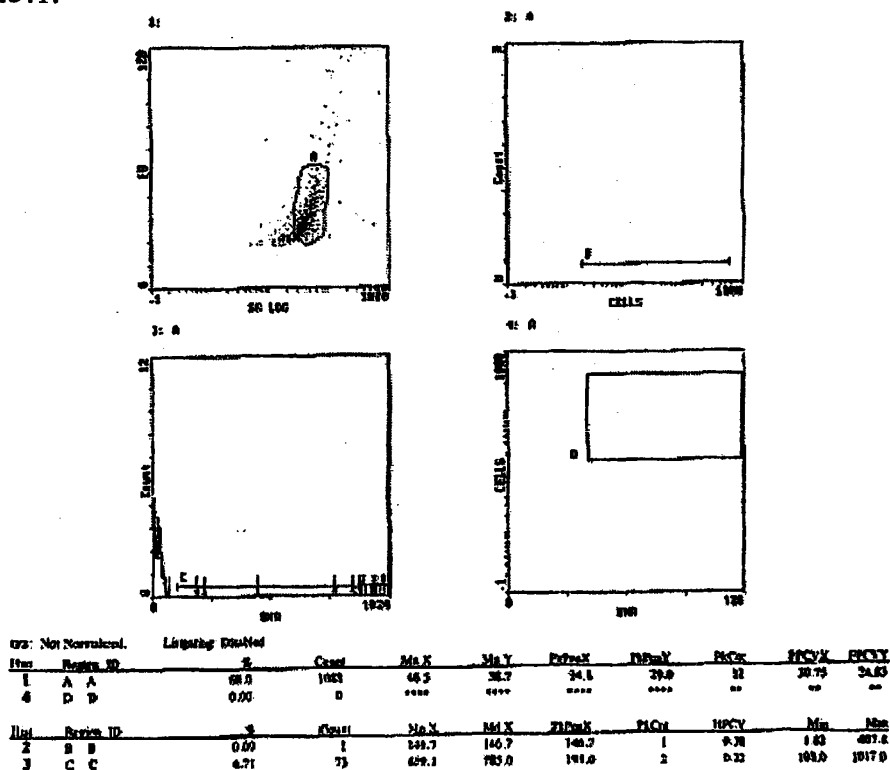


**Διάγραμμα 25:** Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση θυμόλης στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 12,5:1.



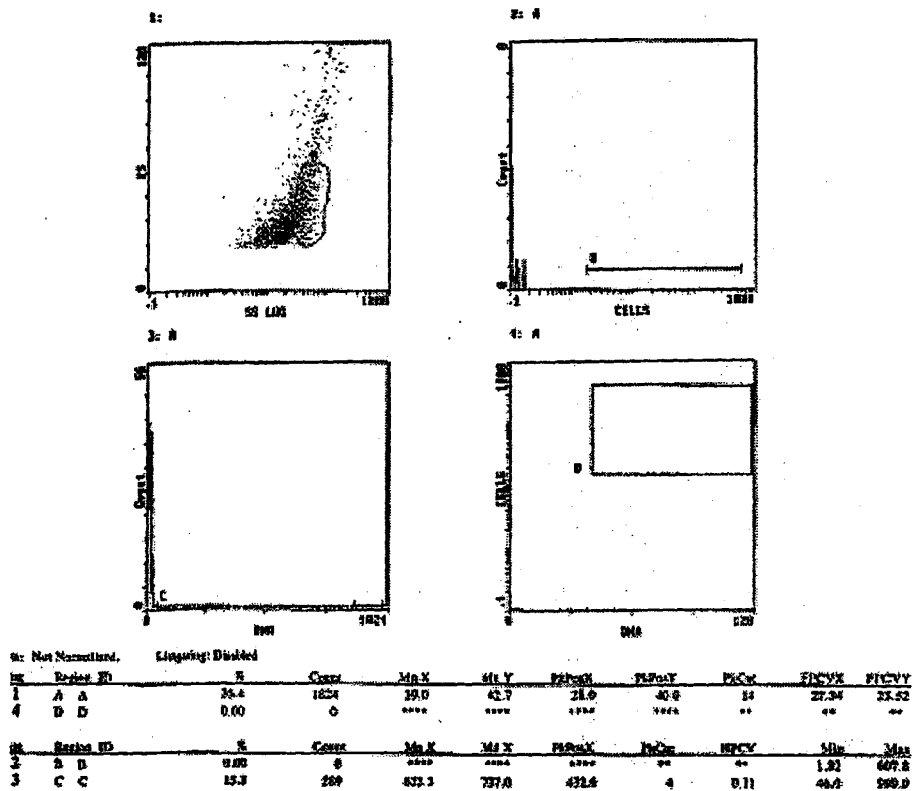


Διάγραμμα 26: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση θυμόλης στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 25:1.

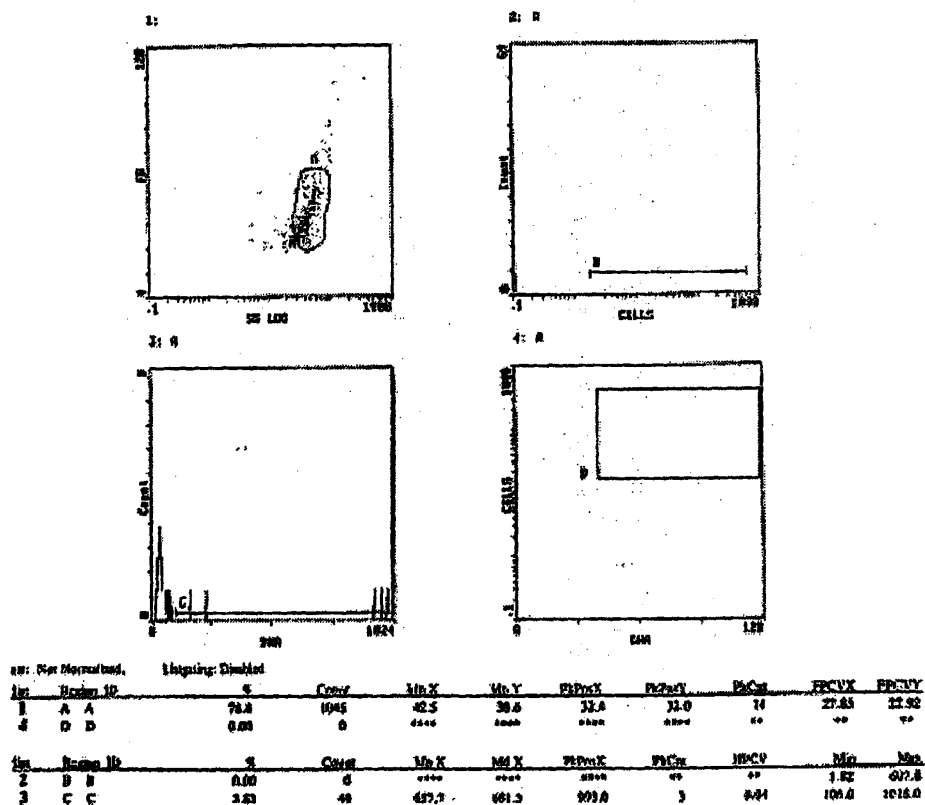


Διάγραμμα 27: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση θυμόλης στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 50:1.



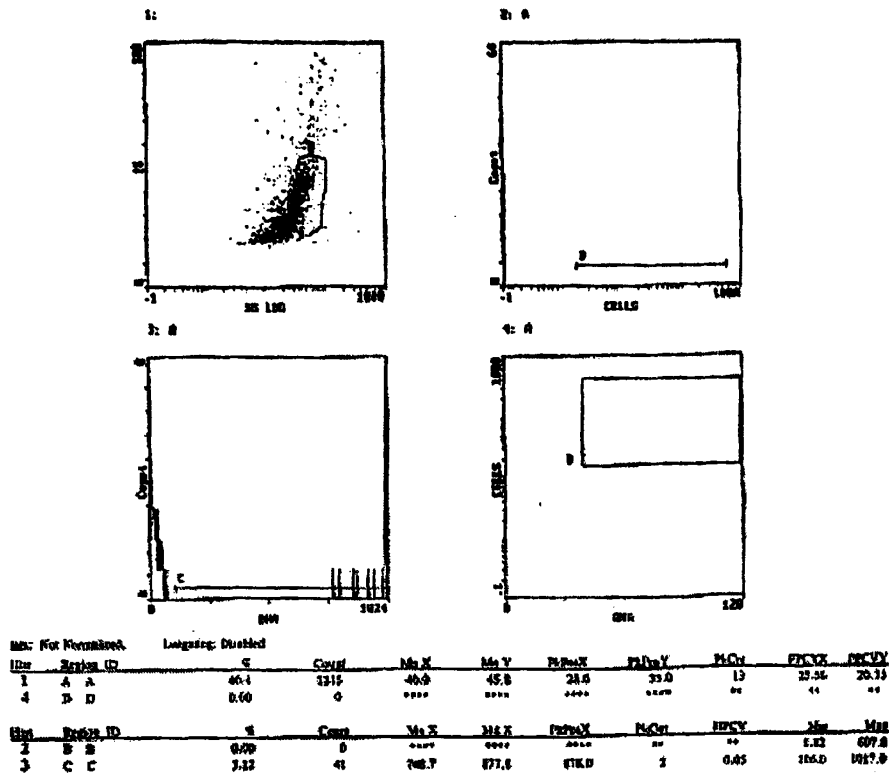


**Διάγραμμα 28:** Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση ροζμαρινικού οξέος στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 12,5:1.

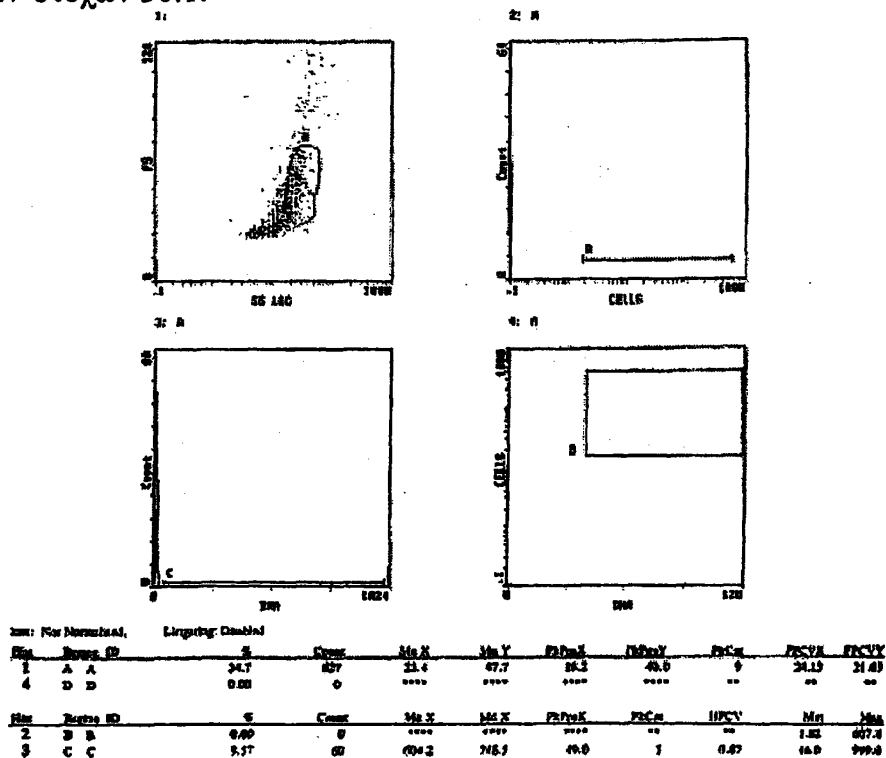


**Διάγραμμα 29:** Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση ροζμαρινικού οξέος στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 25:1.



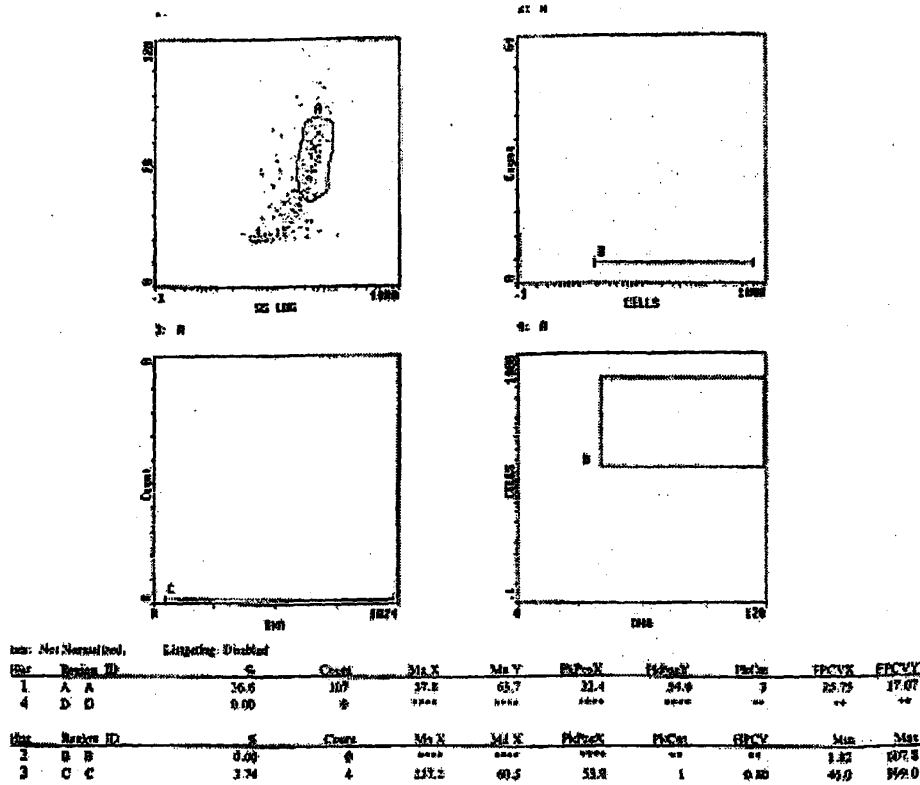


Διάγραμμα 30: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση ροζμαρινικού οξέος στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 50:1.

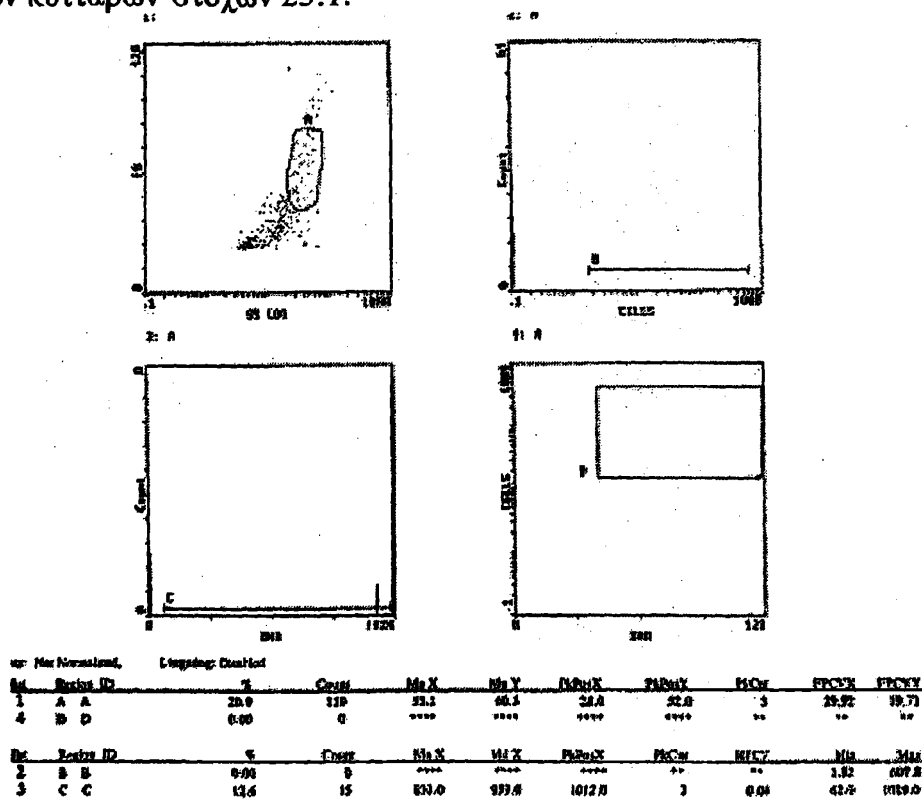


Διάγραμμα 31: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση μεθυλ-νιτροζο-προπανίου στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 12,5:1.



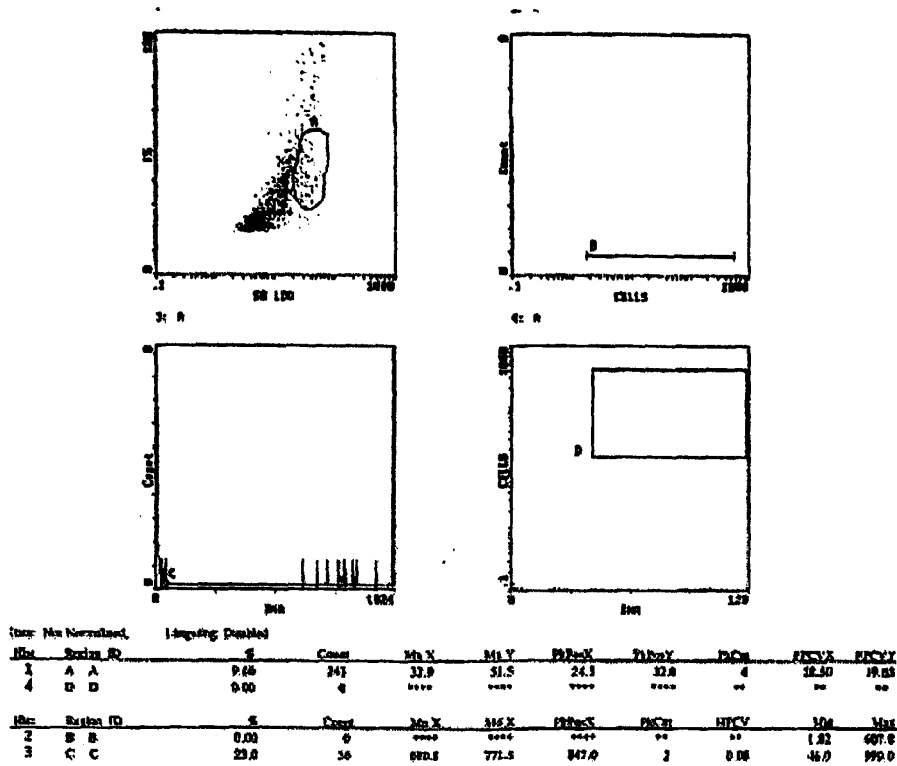


Διάγραμμα 32: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση μεθυλ-νιτροζο-προπανίου στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 25:1.

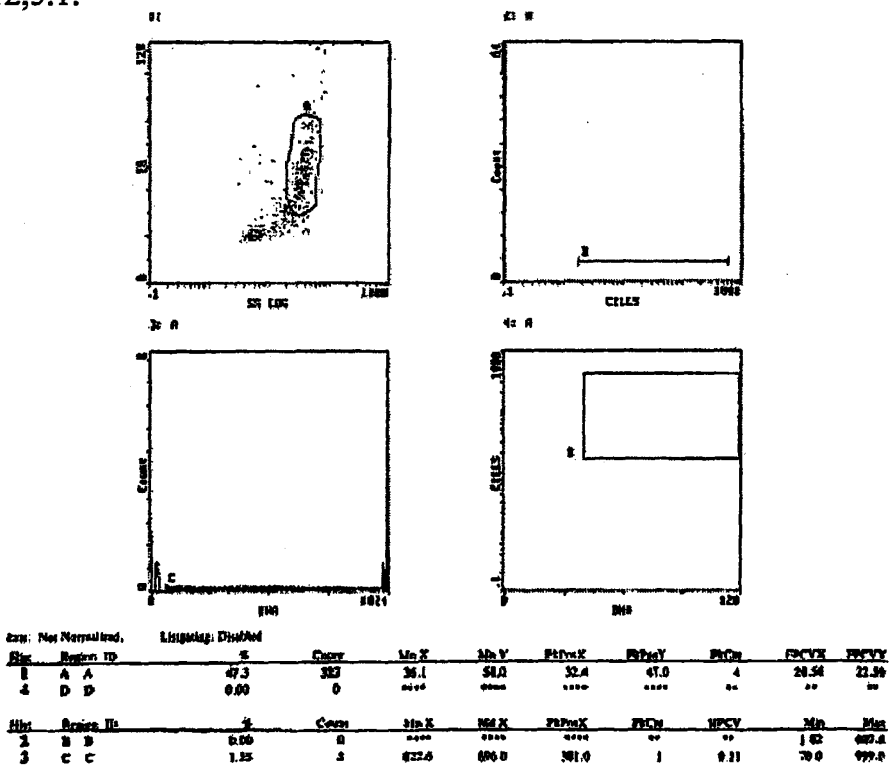


Διάγραμμα 33: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση μεθυλ-νιτροζο-προπανίου στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 50:1.





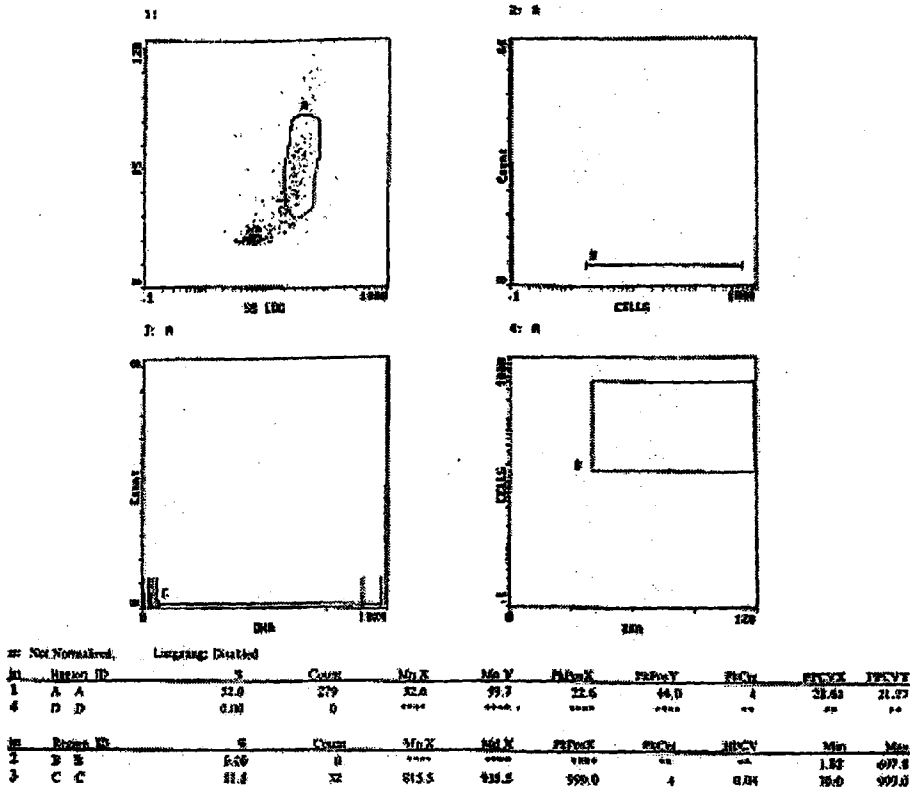
Διάγραμμα 34: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση PBN στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 12,5:1.



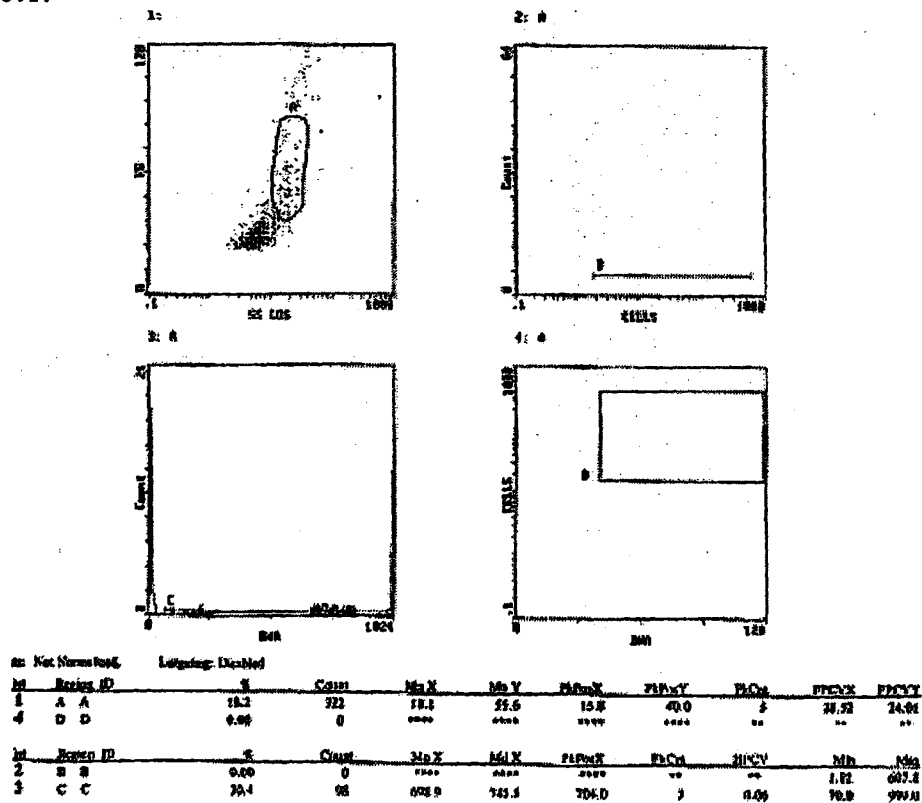
Διάγραμμα 35: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση PBN στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 25:1.





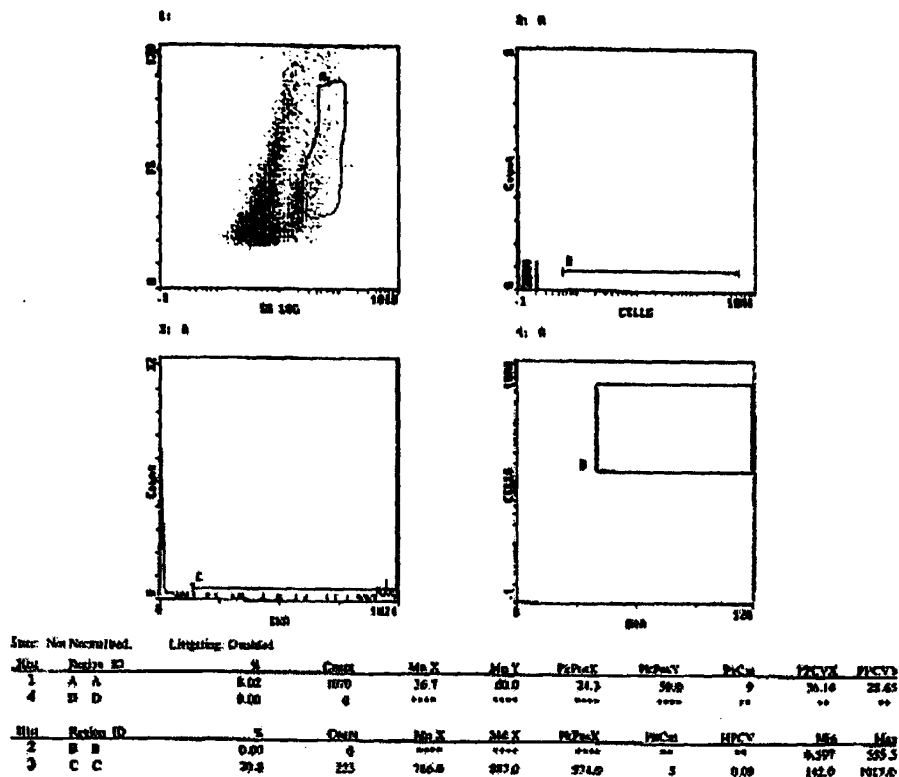


**Διάγραμμα 36:** Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση PBN στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 50:1.

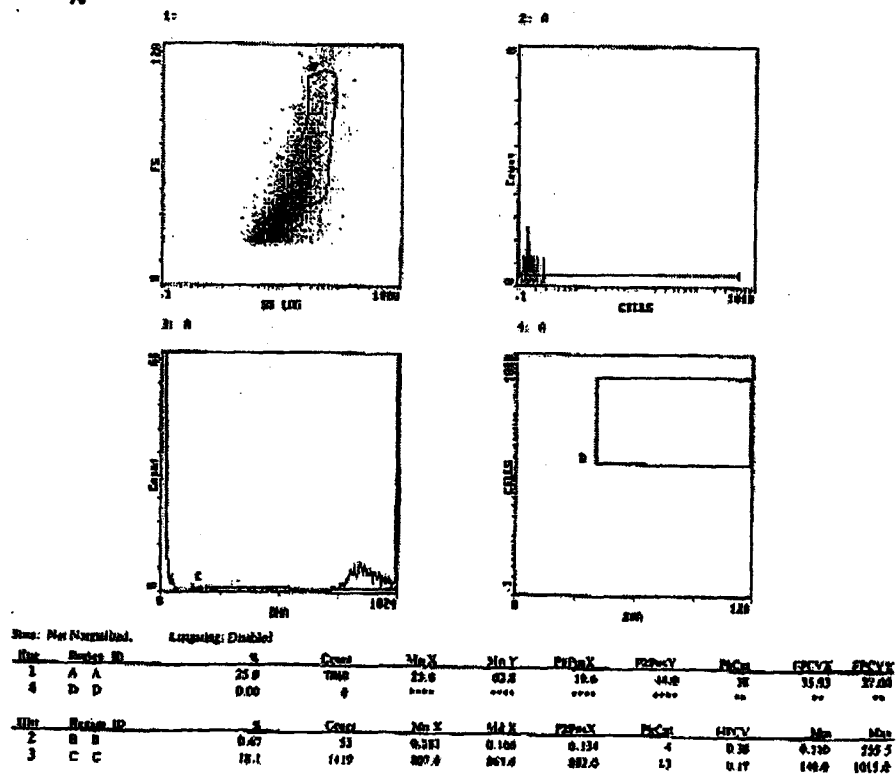


**Διάγραμμα 37:** Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση ασπιρινικού χαλκού στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 12,5:1.



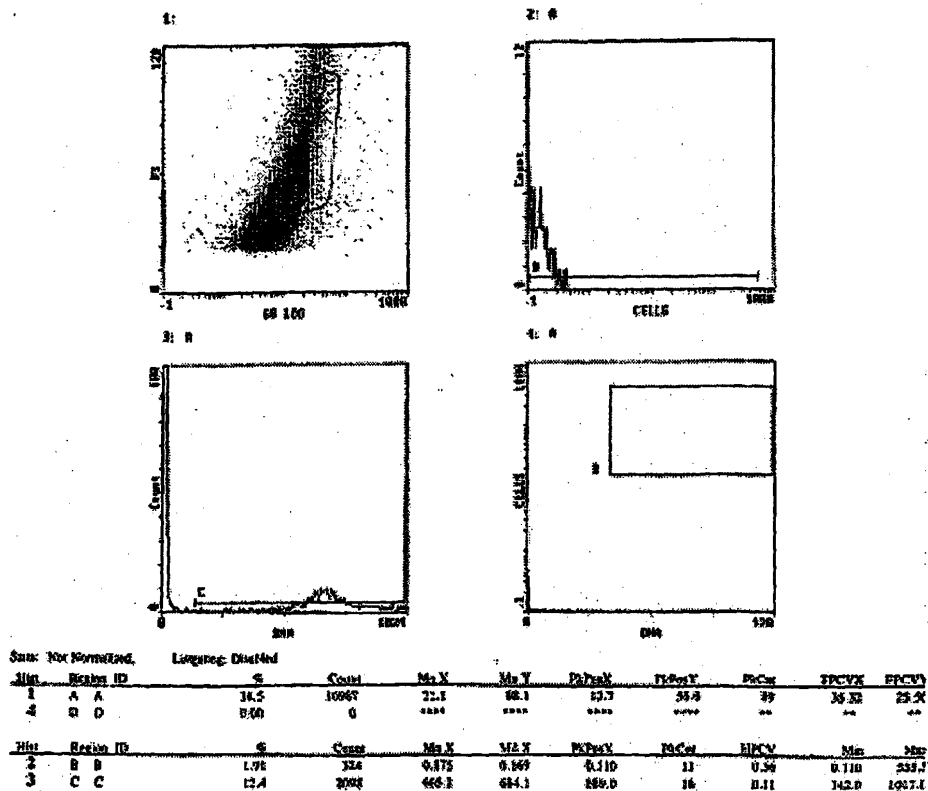


**Διάγραμμα 38:** Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση ασπιρικού χαλκού στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 25:1.

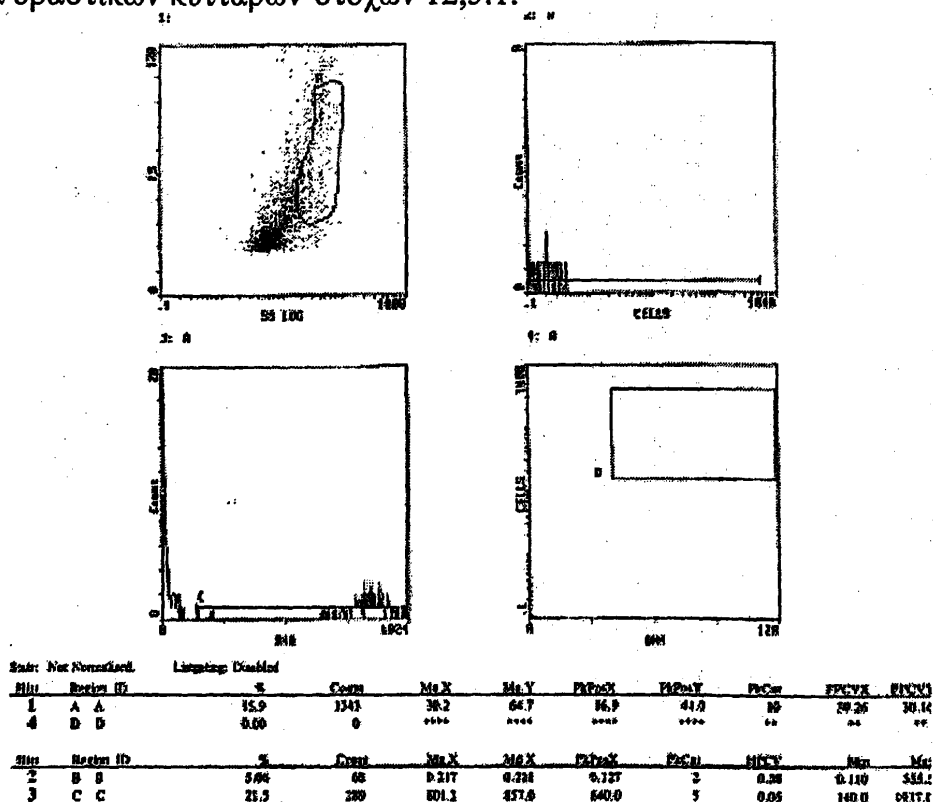


**Διάγραμμα 39:** Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση ασπιρικού χαλκού στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 50:1.



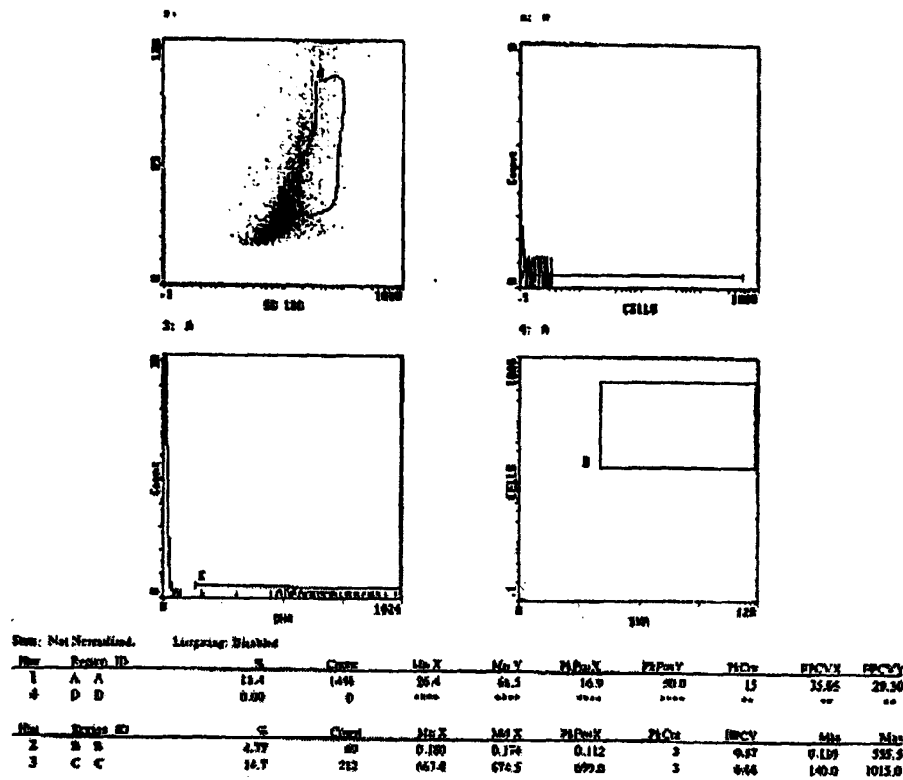


**Διάγραμμα 40:** Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση διβούτυλο-δισασκορβικού κασιτιέρου στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 12,5:1.

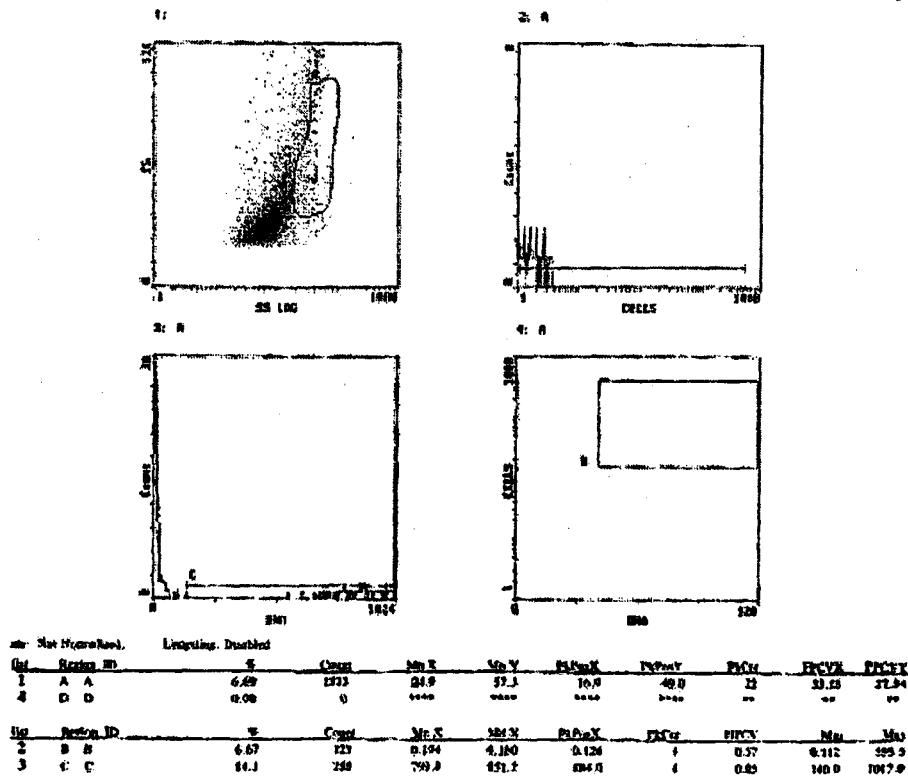


**Διάγραμμα 41:** Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση διβούτυλο-δισασκορβικού κασιτιέρου στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 25:1



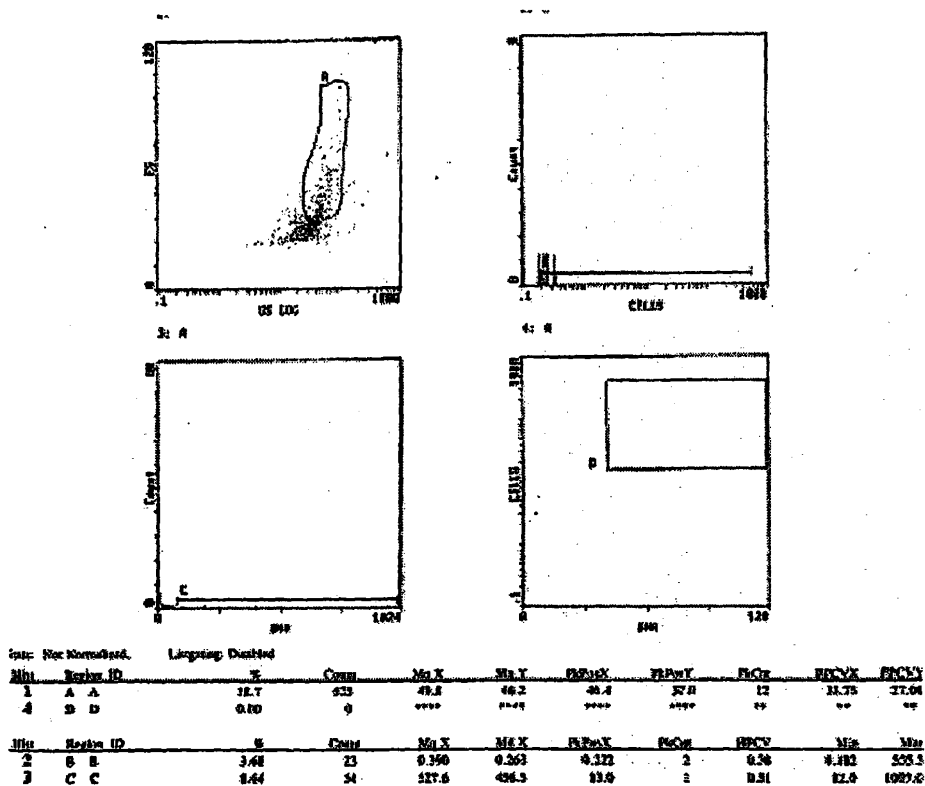


Διάγραμμα 42: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρική ροής με χορήγηση διβούτυλο-δισασκορβικού κασιτέρου στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 50:1.

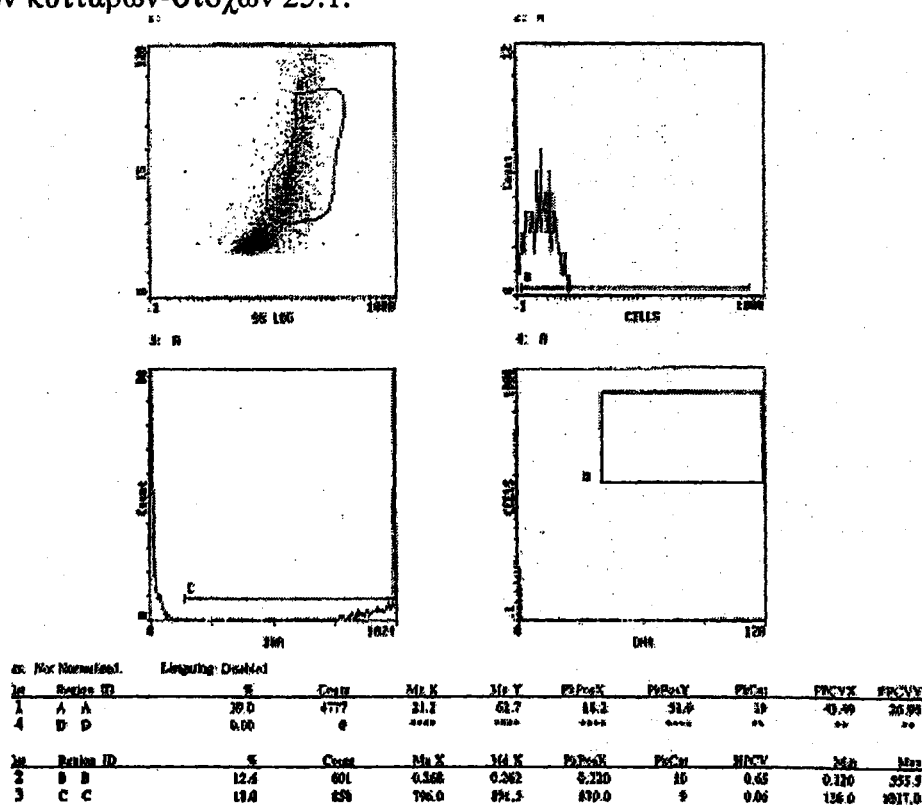


Διάγραμμα 43: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρική ροής με χορήγηση θειογλυκολυκού μολυβδαινίου στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 12,5:1.



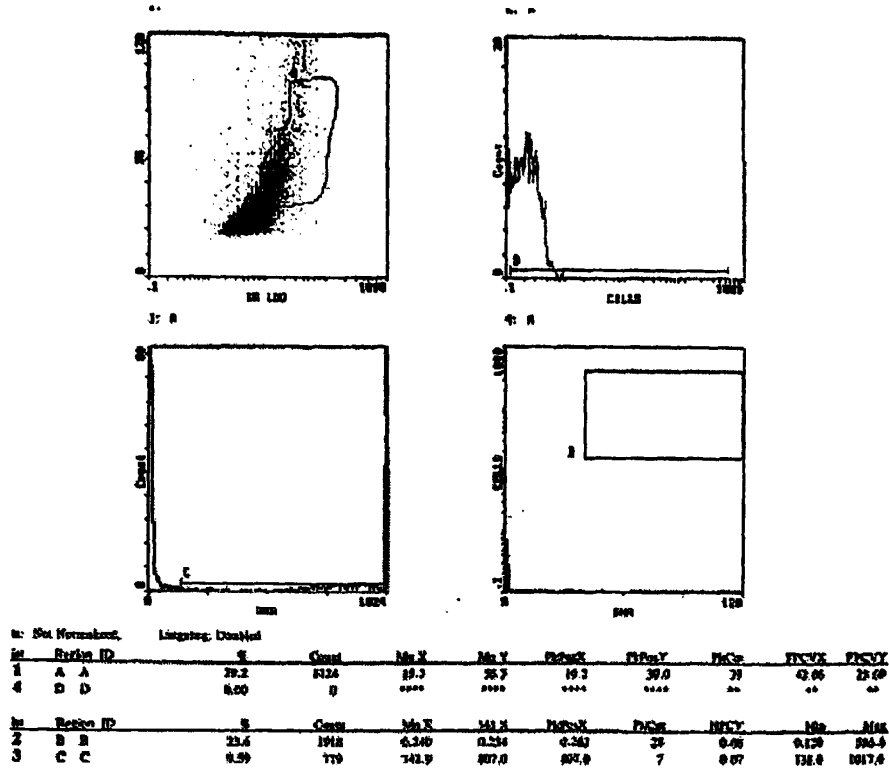


Διάγραμμα 44: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση θειογλυκολικού μολυβδαινίου στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 25:1.

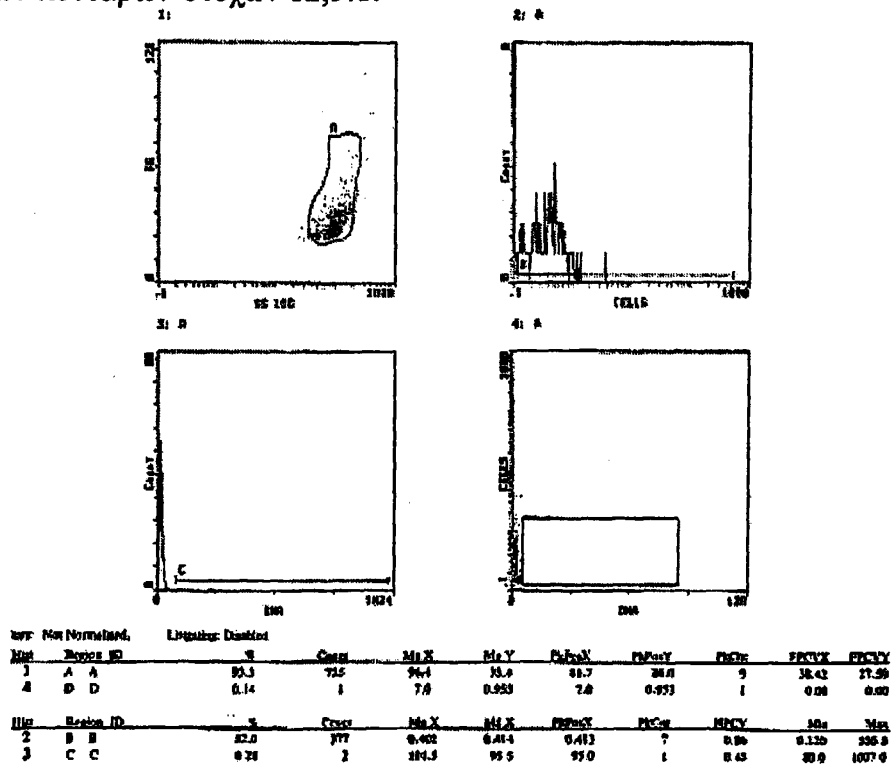


Διάγραμμα 45: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση θειογλυκολικού μολυβδαινίου στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 50:1.



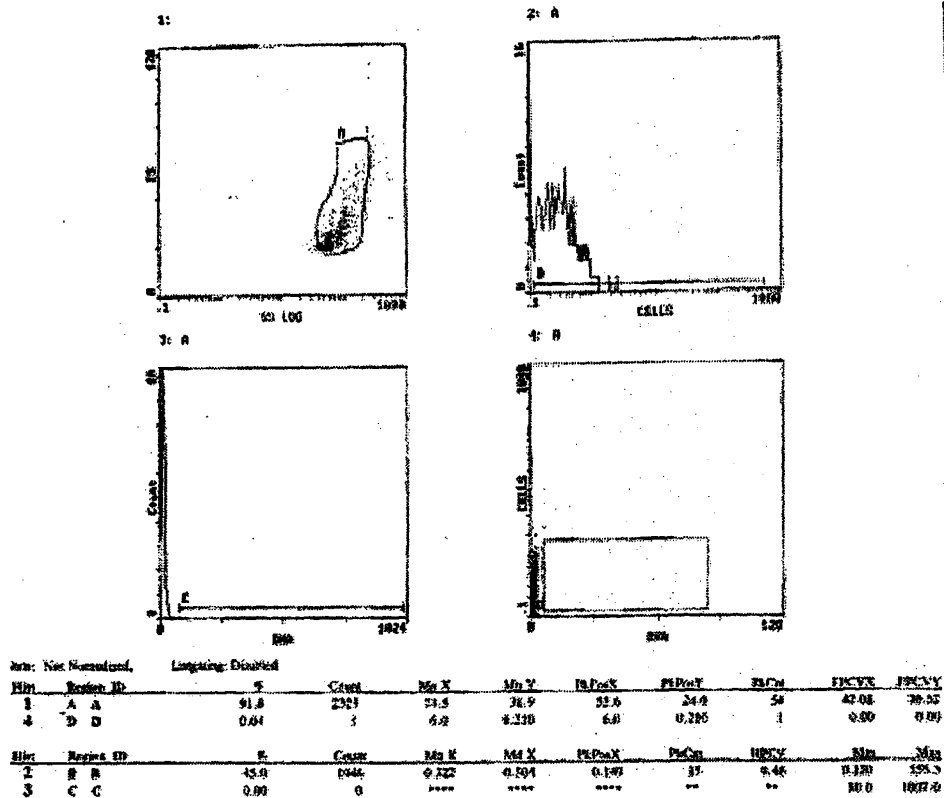


Διάγραμμα 46: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση πλατίνας με πουτρεσκίνη στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 12,5:1.

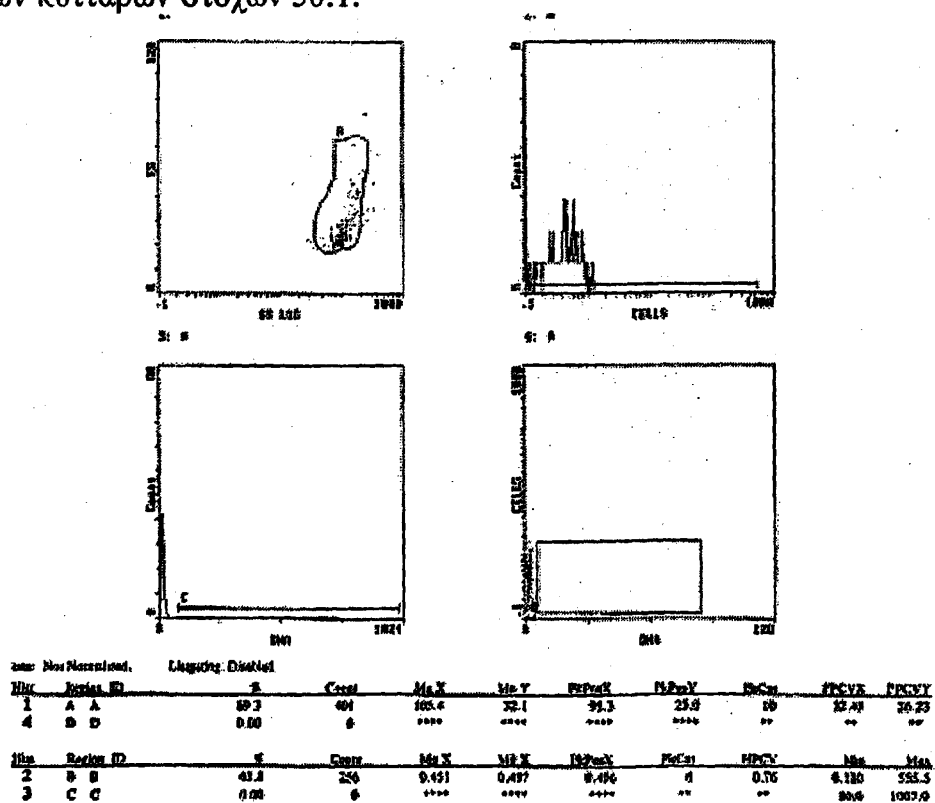


Διάγραμμα 47: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση πλατίνας με πουτρεσκίνη στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 25:1.



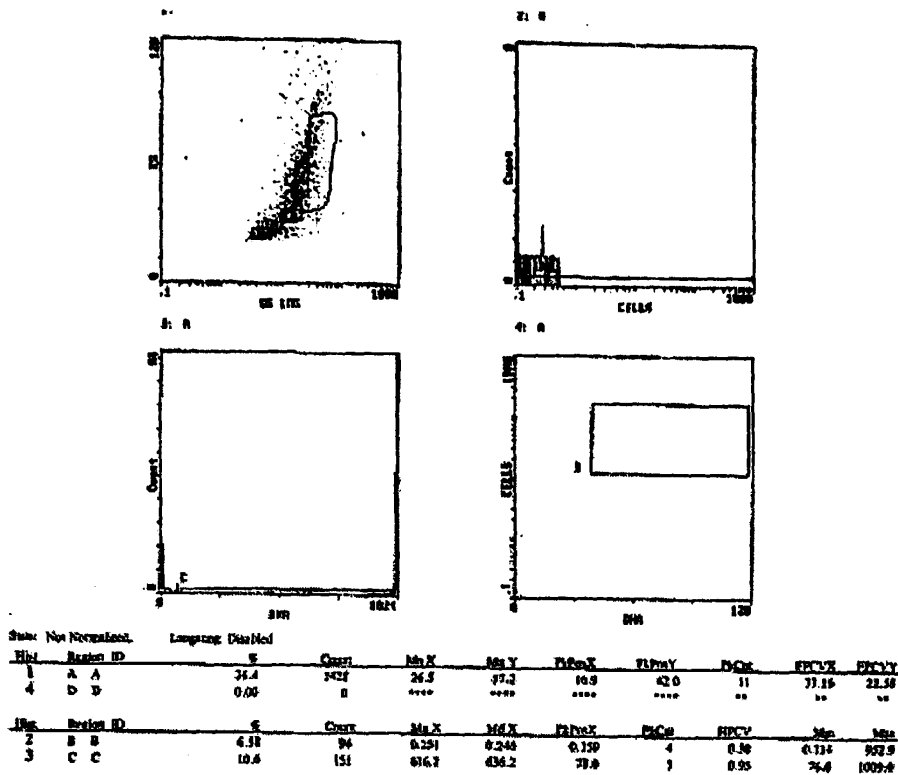


Διάγραμμα 48: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση πλατίνας με πουτρεσκίνη στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 50:1.

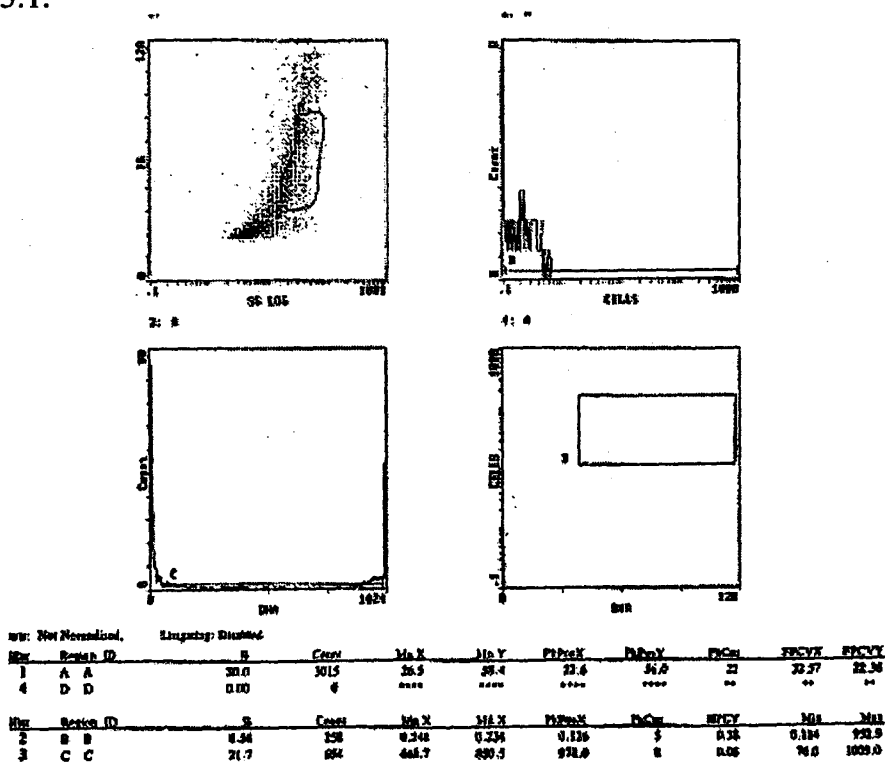


Διάγραμμα 49: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση γενιστεΐνης στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 12,5:1.



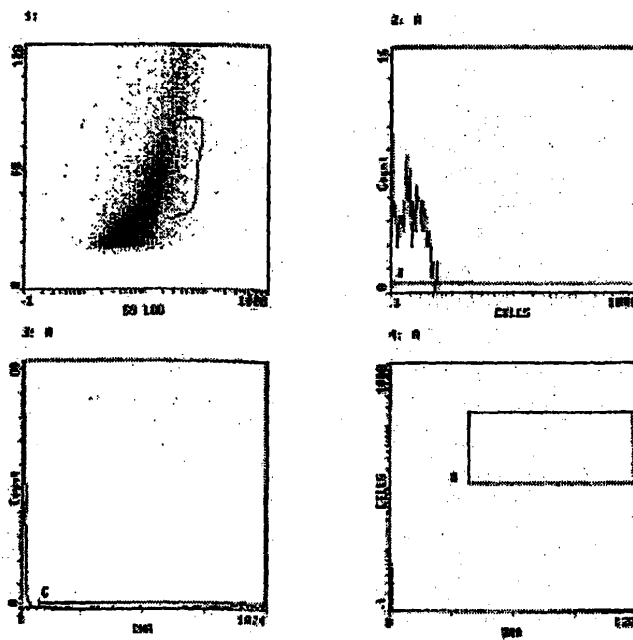


Διάγραμμα 50: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση γενιστεΐνης στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 25:1.





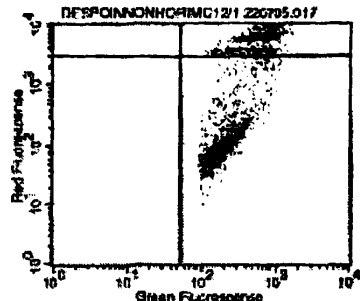
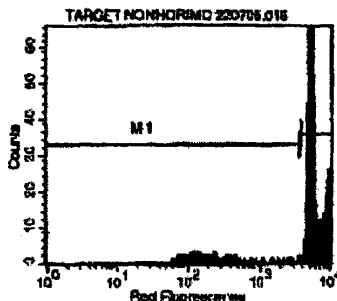
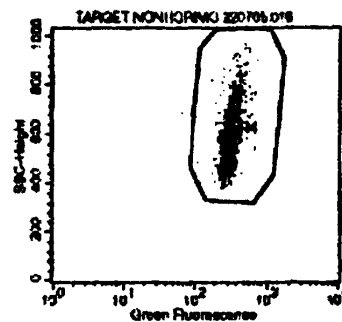
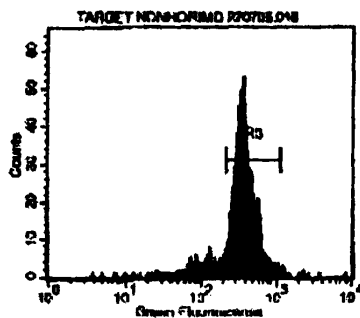
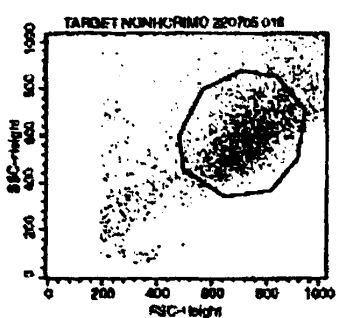
**Διάγραμμα 51:** Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση γενιστεΐνης στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 50:1.



Gate: Not Normalized		Statistics: Discrete									
Gate	Region ID	%	Count	Min X	Min Y	PSA-M	PSA-Y	PSA-Z	PSA-W	PSA-H	PSA-V
1	A A	9.30	3090	22.8	35.5	19.0	53.0	37	32.36	20.82	
4	D D	0.00	0								
Gate	Region ID	%	Count	Min X	Min Y	PSA-M	PSA-Y	PSA-Z	PSA-W	PSA-V	
2	B B	23.4	818	0.226	0.226	0.187	15	0.01	0.174	0.520	
3	C C	9.26	308	263.0	325.2	619.0	4	0.00	76.0	1089.0	

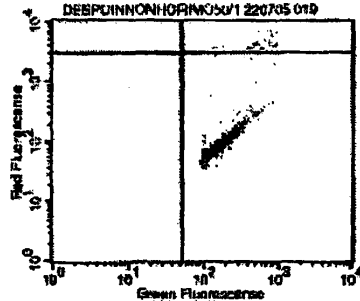
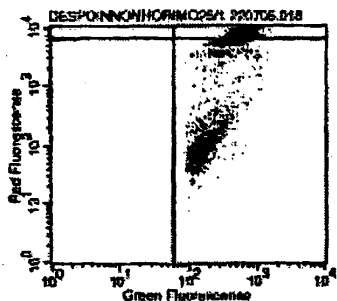


**Διάγραμμα 52:** Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση εκχυλίσματος Noni στις αναλογίες δραστικών κυττάρων-στόχων 12,5:1, 25:1, 50:1.



Sample ID: TARGET NON-HORMO 220705  
 Tube:  
 Acquisition Date: 22-Jul-05  
 Gate: G4  
 Gated Pvalue: 2817  
 X Parameter: FL2-H Red Fluorescence (Log)

Marker	% Gated	Geo Mean
All	100.00	4508.77
M1	5.82	245.85
M2	94.11	8398.58



Sample ID: DESPOINNONHORMO12/1 220705  
 Acquisition Date: 22-Jul-05  
 Gate: G4  
 X Parameter: FL1-H Green Fluorescence (Log)  
 Y Parameter: FL2-H Red Fluorescence (Log)

Quad	% Gated
UL	0.00
UR	47.68
LL	0.00
LR	52.41

Sample ID: DESPOINNONHORMO25/1 220705  
 Acquisition Date: 22-Jul-05  
 Gate: G4  
 X Parameter: FL1-H Green Fluorescence (Log)  
 Y Parameter: FL2-H Red Fluorescence (Log)

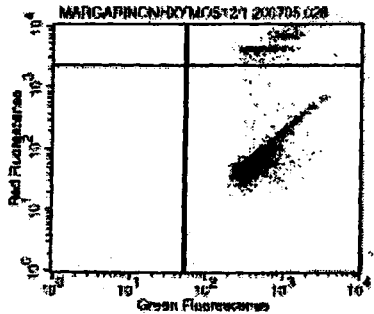
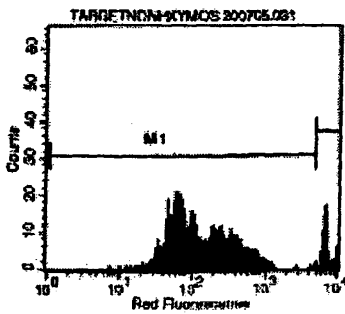
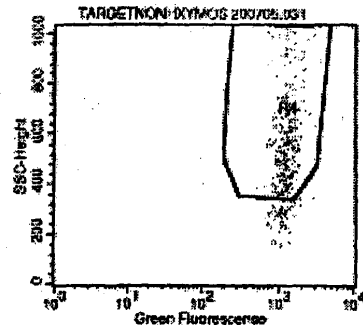
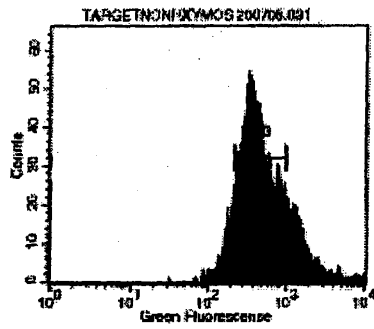
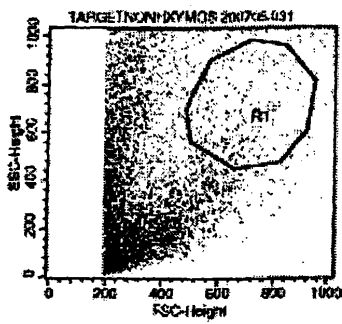
Quad	% Gated
UL	0.00
UR	24.65
LL	0.00
LR	75.35

Sample ID: DESPOINNONHORMO50/1 220705  
 Acquisition Date: 22-Jul-05  
 Gate: G4  
 X Parameter: FL1-H Green Fluorescence (Log)  
 Y Parameter: FL2-H Red Fluorescence (Log)

Quad	% Gated
UL	0.00
UR	4.98
LL	0.00
LR	95.04

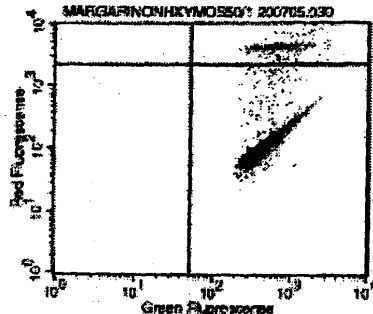
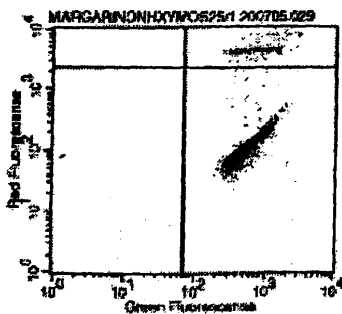


**Διάγραμμα 53:** Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση του σύμπλοκου Noni premium στις αναλογίες δραστικών κυττάρων-στόχων 12,5:1, 25:1, 50:1.



Sample ID: TARGETNONI-DYMMOS 200705  
 Tube:  
 Acquisition Date: 23-Jul-05  
 Gate: G4  
 Gated Events: 2928  
 X Parameter: FL2-H Red Fluorescence (Log)

Marker	% Gated	Geo.Mean
AF	105.00	105.15
M1	85.67	115.94
M2	7.33	6729.74



Sample ID: MARGARINONI-DYMMOS121 200705  
 Acquisition Date: 23-Jul-05  
 Gate: G4  
 X Parameter: FL1-H Green Fluorescence (Log)  
 Y Parameter: FL2-H Red Fluorescence (Log)

Quad	% Gated
UL	0.00
UR	12.53
LL	0.00
LR	87.47

Sample ID: MARGARINONI-DYMMOS251 200705  
 Acquisition Date: 20-Jul-05  
 Gate: G4  
 X Parameter: FL1-H Green Fluorescence (Log)  
 Y Parameter: FL2-H Red Fluorescence (Log)

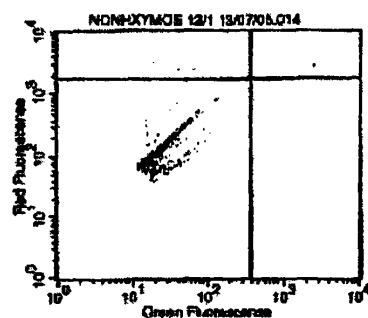
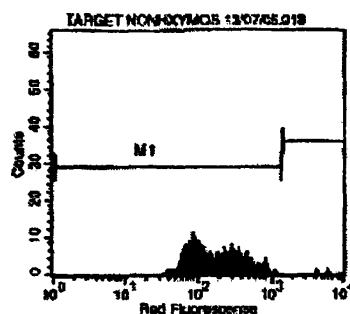
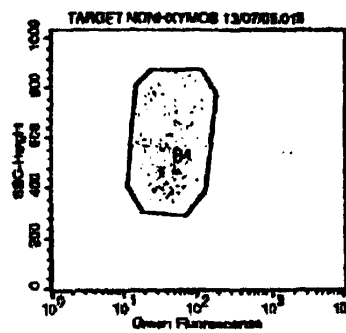
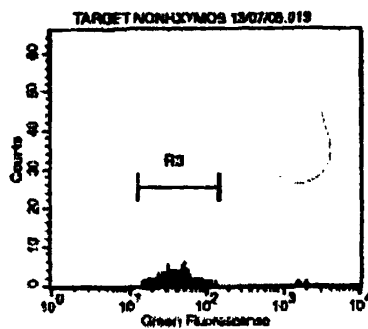
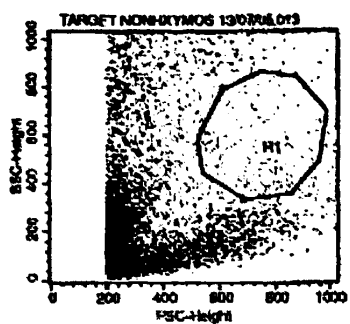
Quad	% Gated
UL	0.00
UR	0.88
LL	0.00
LR	99.12

Sample ID: MARGARINONI-DYMMOS501 200705  
 Acquisition Date: 20-Jul-05  
 Gate: G4  
 X Parameter: FL1-H Green Fluorescence (Log)  
 Y Parameter: FL2-H Red Fluorescence (Log)

Quad	% Gated
UL	0.00
UR	0.00
LL	0.00
LR	91.92

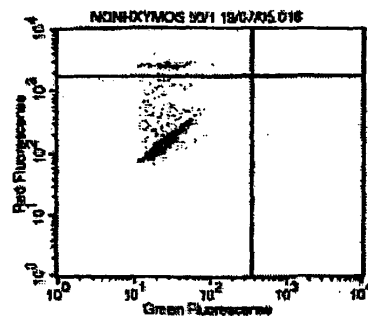
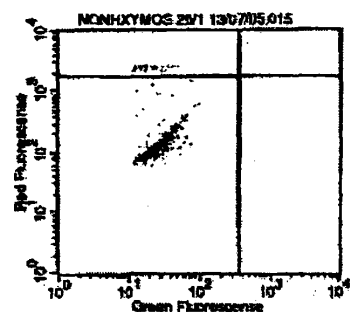


Διάγραμμα 54: Απεικονίσεις απόπτωσης των δραστικών κυττάρων με χορήγηση του *Morinda citrifolia* στις αναλογίες δραστικών κυττάρων-στόχων 12,5:1, 25:1, 50:1.



Sample ID: TARGET NON-KYMOS 13/07/05  
 Tube:  
 Acquisition Date: 13-Jul-05  
 Gate: G4  
 Gated Events: 636  
 X Parameter: FL2-H Red Fluorescence (Log)

Marker	% Gated	Geo Mean
A1	100.00	145.80
M1	99.76	144.61
M2	0.24	4531.58



Sample ID: NON-KYMOS 12/1 13/07/05  
 Acquisition Date: 13-Jul-05  
 Gate: G4  
 X Parameter: FL1-H Green Fluorescence (Log)  
 Y Parameter: FL2-H Red Fluorescence (Log)

Quadrant	% Gated
UL	0.26
UR	0.00
LL	99.05
LR	0.00

Sample ID: NON-KYMOS 25/1 13/07/05  
 Acquisition Date: 13-Jul-05  
 Gate: G4  
 X Parameter: FL1-H Green Fluorescence (Log)  
 Y Parameter: FL2-H Red Fluorescence (Log)

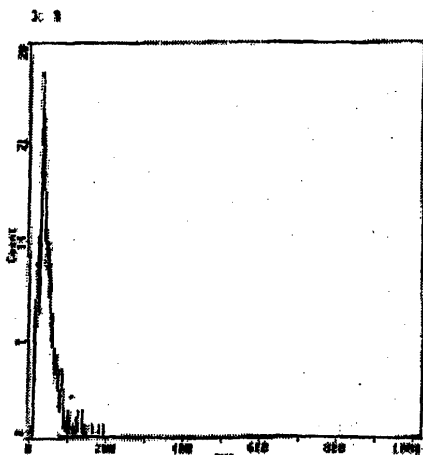
Quadrant	% Gated
UL	4.23
UR	0.00
LL	95.77
LR	0.00

Sample ID: NON-KYMOS 50/1 13/07/05  
 Acquisition Date: 13-Jul-05  
 Gate: G4  
 X Parameter: FL1-H Green Fluorescence (Log)  
 Y Parameter: FL2-H Red Fluorescence (Log)

Quadrant	% Gated
UL	4.12
UR	0.00
LL	95.88
LR	0.00

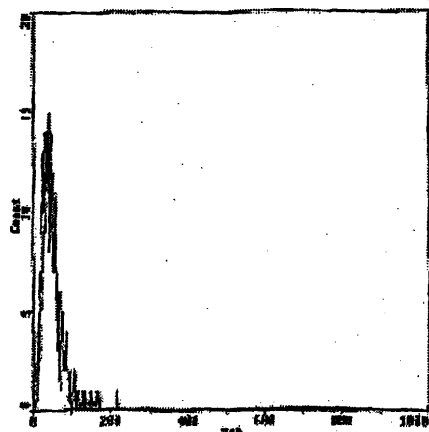


**Διάγραμμα 55:** Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση Ubichinon compositum στις αναλογίες δραστικών κυττάρων-στόχων 12,5:1, 25:1, 50:1.



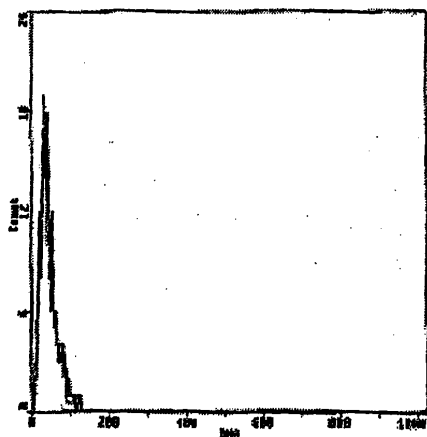
Stat: Not Normalized. Display: Disabled

Stat	Region ID	Count	Min X	Max X	FLPoW	FLCo	FLCV	Min	Max
3	C C	112	125.0	160.5	82.0	5	0.14	50.0	1021.0



Stat: Not Normalized. Display: Disabled

Stat	Region ID	Count	Min X	Max X	FLPoW	FLCo	FLCV	Min	Max
3	C C	91	127.5	164.0	81.0	5	0.14	50.0	1021.0

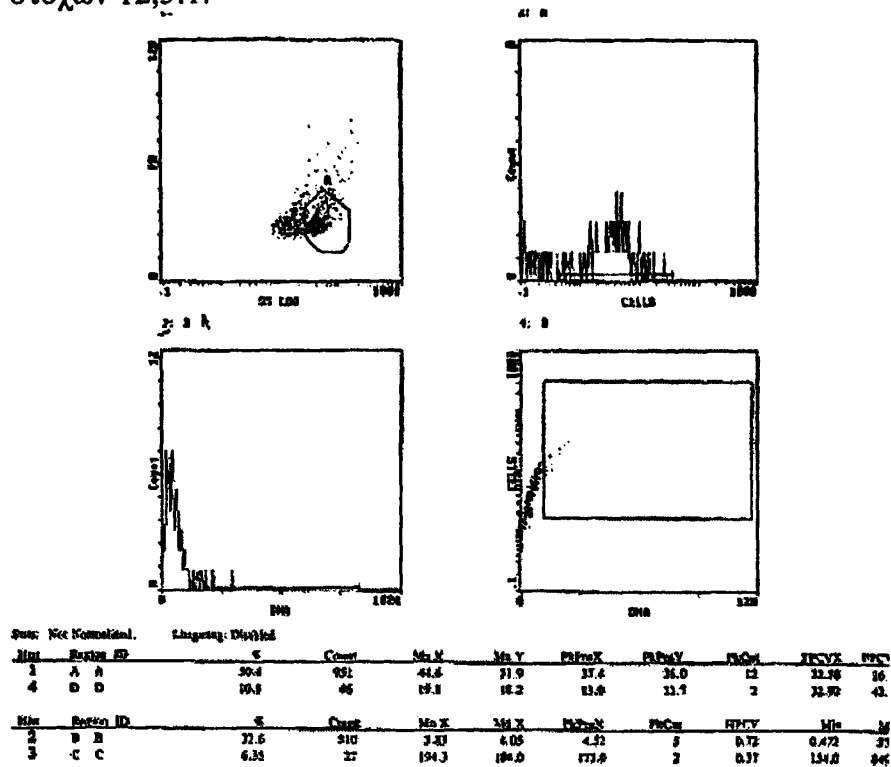


Stat: Not Normalized. Display: Disabled

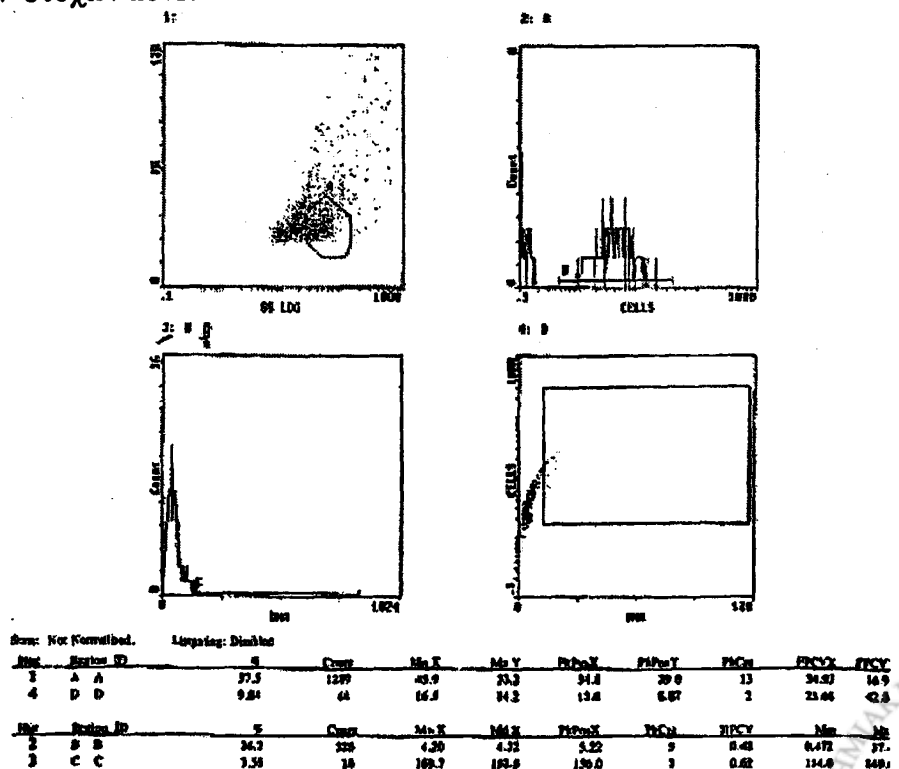
Stat	Region ID	Count	Min X	Max X	FLPoW	FLCo	FLCV	Min	Max
3	C C	125	127.1	161.3	81.0	6	1.00	50.0	1021.0



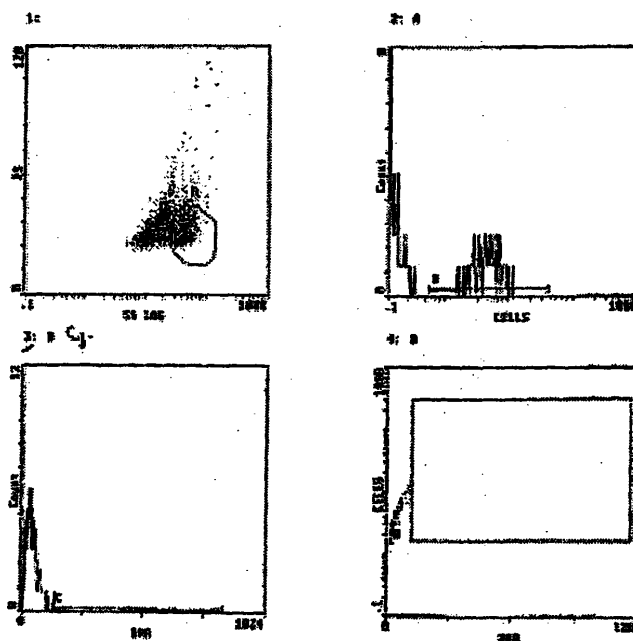
**Διάγραμμα 56:** Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση Glyoxal compositum στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 12,5:1.



**Διάγραμμα 57:** Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση Glyoxal compositum στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 25:1.

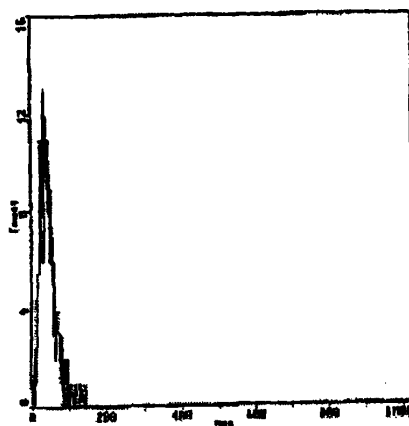


**Διάγραμμα 58:** Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση Glyoxal compositum στην αναλογία δραστικών κυττάρων-στόχων 50:1.



Plot	Gate	Area	Count	Min X	Max X	Min Y	Max Y	FL1-H	FL2-H	FL3-H
1	A A	27.5	3716	48.1	32.7	57.4	28.0	33	28.05	16.
4	D D	6.34	17	20.9	19.8	15.0	10.2	1	20.64	37.
2	B B	9.67	195	4.00	4.25	3.27	4	0.38	0.478	5.
3	C C	4.70	11	203.7	191.0	170.0	1	0.62	134.0	84.

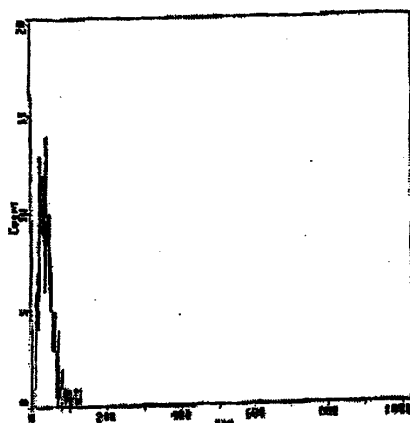
Διάγραμμα 59: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση Katalysatoren στις αναλογίες δραστικών κυττάρων-στόχων 12,5:1, 25:1, 50:1.



Size: Not Normalized. Ligand: Diablot

Min	Ratio ID	Count	Min X	Max X	FL1-X	FL1-C	FL1-V	Min	Max	
3	C C	12.3	66	126.7	104.6	20.8	3	0.71	81.0	1021.0

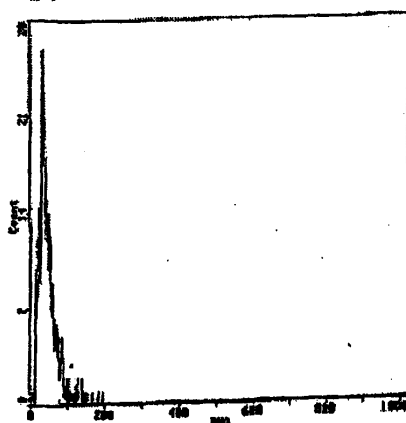
3: 8



Size: Not Normalized. Ligand: Diablot

Min	Ratio ID	Count	Min X	Max X	FL1-X	FL1-C	FL1-V	Min	Max	
3	C C	7.48	43	120.1	99.0	22.0	3	1.94	80.0	1021.0

3: 8



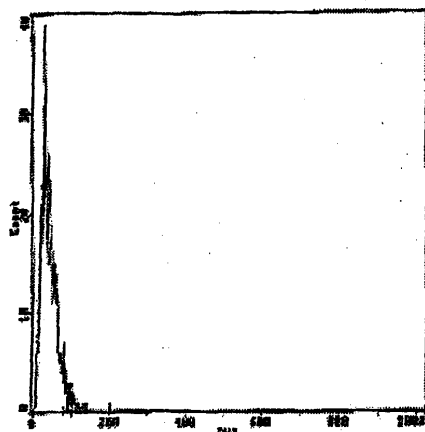
Size: Not Normalized. Ligand: Diablot

Min	Ratio ID	Count	Min X	Max X	FL1-X	FL1-C	FL1-V	Min	Max	
3	C C	11.9	102	124.4	100.3	22.0	6	0.96	80.0	1021.0





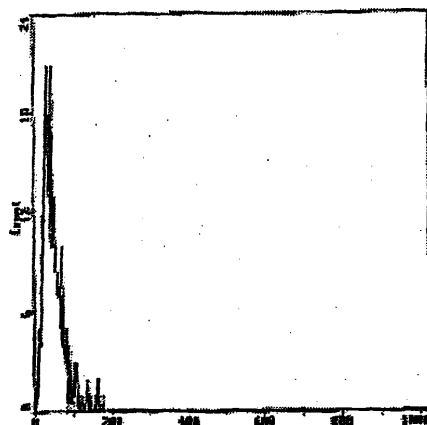
**Διάγραμμα 60:** Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση Coenzyme compositum στις αναλογίες δραστικών κυττάρων-στόχων 12,5:1, 25:1, 50:1.



Stat: Not Normalized, Language: Default

Min	Max	ID	Count	Min X	Max X	FWHM X	FWHM	Area	Min	Max	
3	C	C	100	112	179.5	95.9	32.9	9	1.39	80.0	1001.0

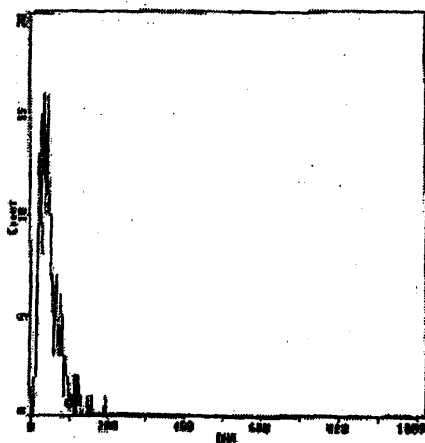
3: 1



Stat: Not Normalized, Language: Default

Min	Max	ID	Count	Min X	Max X	FWHM X	FWHM	Area	Min	Max	
3	C	C	13.3	116	123.5	102.7	80.0	8	1.27	80.0	1001.0

3: 2

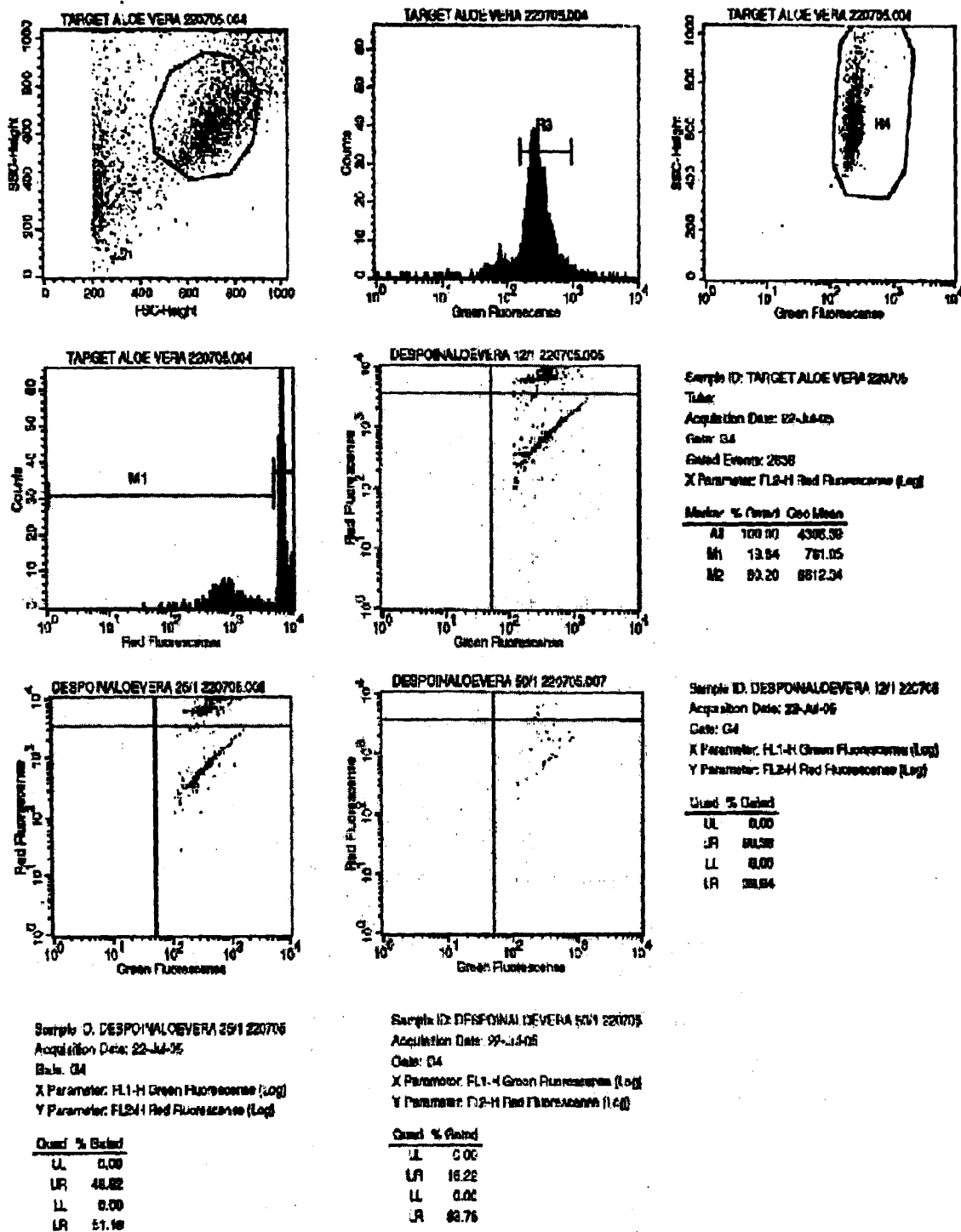


Stat: Not Normalized, Language: Default

Min	Max	ID	Count	Min X	Max X	FWHM X	FWHM	Area	Min	Max	
3	C	C	15.6	112	128.6	103.9	83.9	6	1.33	80.0	1001.0



**Διάγραμμα 61:** Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής με χορήγηση Aloe vera στις αναλογίες δραστικών κυττάρων-στόχων 12,5:1, 25:1, 50:1.



Όσον αφορά στα αποτελέσματα in vivo, η ομάδα ελέγχου που τους χορηγήθηκε για 45 ημέρες 50ml Aloe vera και ένα γραμμάριο κρυσταλλικής σκόνης ασκορβικού οξέος αποτελούνταν από 7 άνδρες και 3 γυναίκες ηλικίας 34-70 ετών. Η μεταβολή της κυτταροτοξικής δράσης των NK κυττάρων καταγράφεται στον Πίνακα 25.

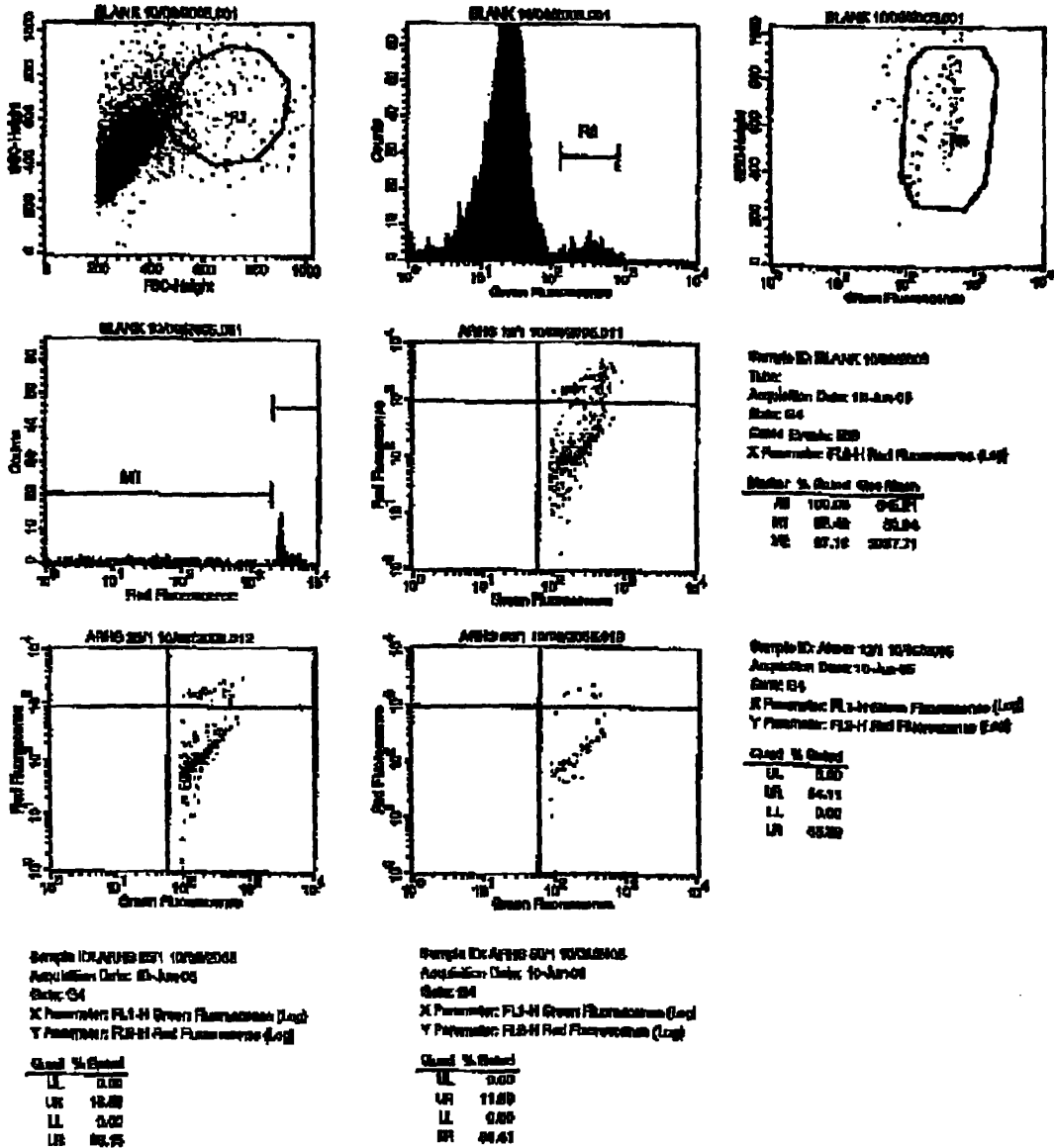
**Πίνακας 25:** Μεταβολή λειτουργικότητας των NK κυττάρων στην ομάδα ελέγχου μετά από χορήγηση βιταμίνης C και Aloe vera.

Εθελοντές Φύλο-Ηλικία	12:1	25:1	50:1
A1 A57	↓ 620%	↓ 277%	↓ 32,33%
A2 Θ48	↓ 69,8	↓ 162%	↑ 15%
A3 Θ36	0	↑ 49%	↑ 24,7%
A4 A38	↑ 505%	↑ 272%	↑ 125%
A5 A58	0	↑ 119%	↑ 107%
A6 Θ59	↑ 431%	↑ 75%	↑ 161%
A7 A70	↑ 87%	↑ 154%	↑ 196%
A8 A55	0	↓ 19%	0
A9 A34	↓ 439%	↓ 100%	↓ 32%
A10 A42	↑ 5%	↑ 86%	↑ 56%

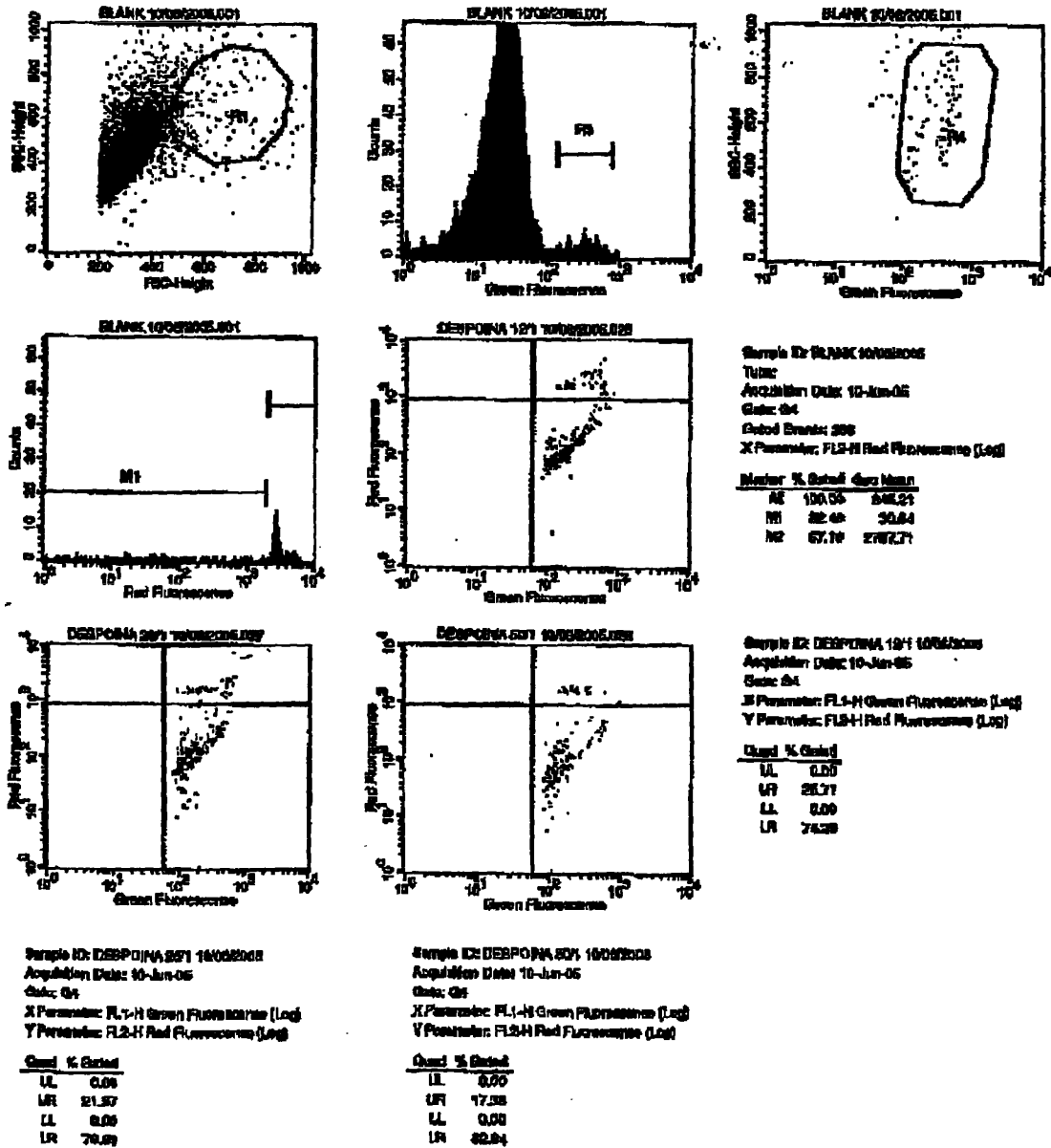
Η λειτουργικότητα των NK κυττάρων στην ομάδα ελέγχου πριν και μετά από την χορήγηση των αναφερθέντων ουσιών απεικονίζεται στα παρακάτω διαγράμματα μετά από ανάλυση από τον κυτταρομετρητή ροής.



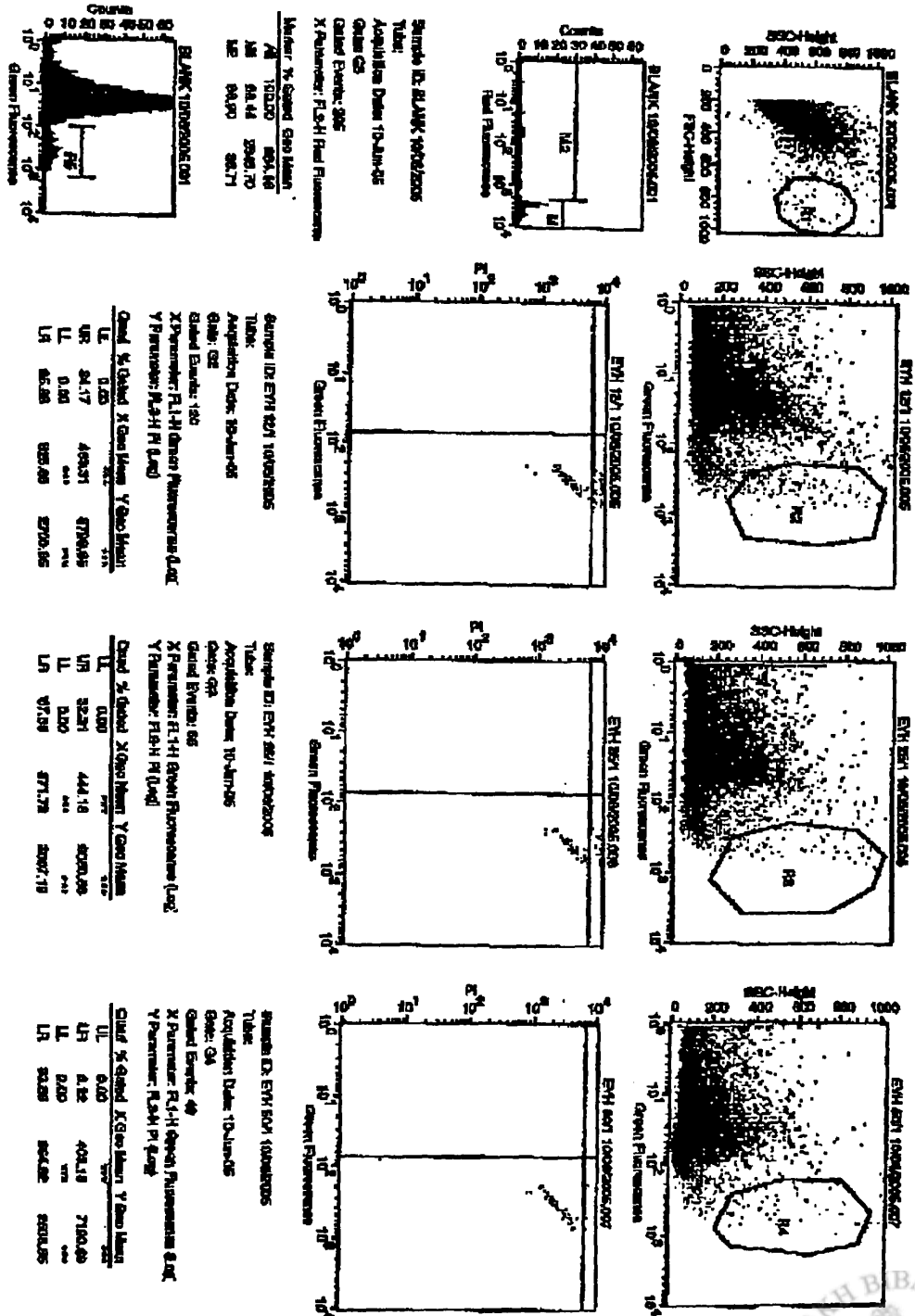
Διάγραμμα 62: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρική ροής του εθελοντή με κωδικό Α1 πριν την χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών.



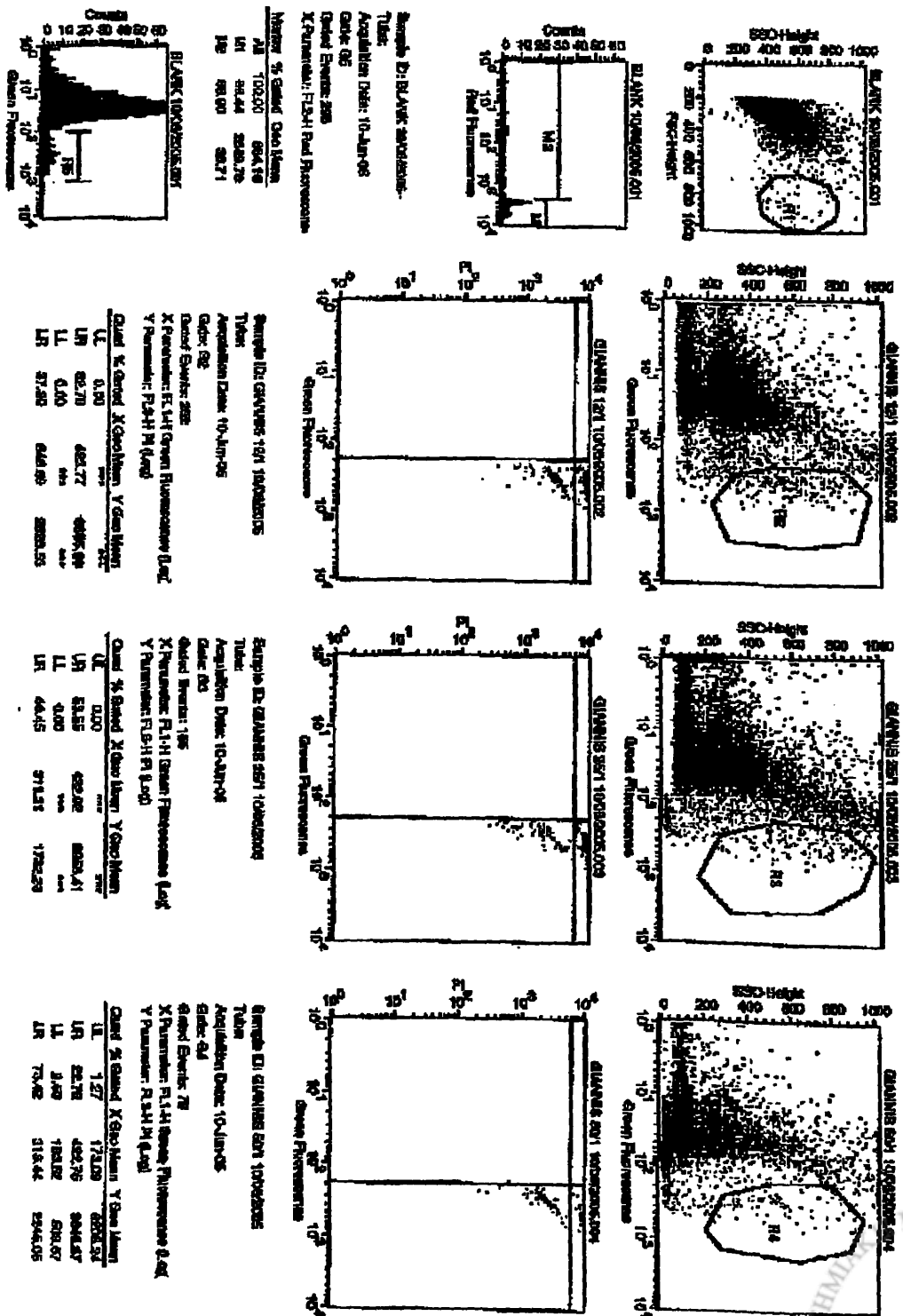
**Διάγραμμα 63:** Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής του εθελοντή με κωδικό A2 πριν την χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών.



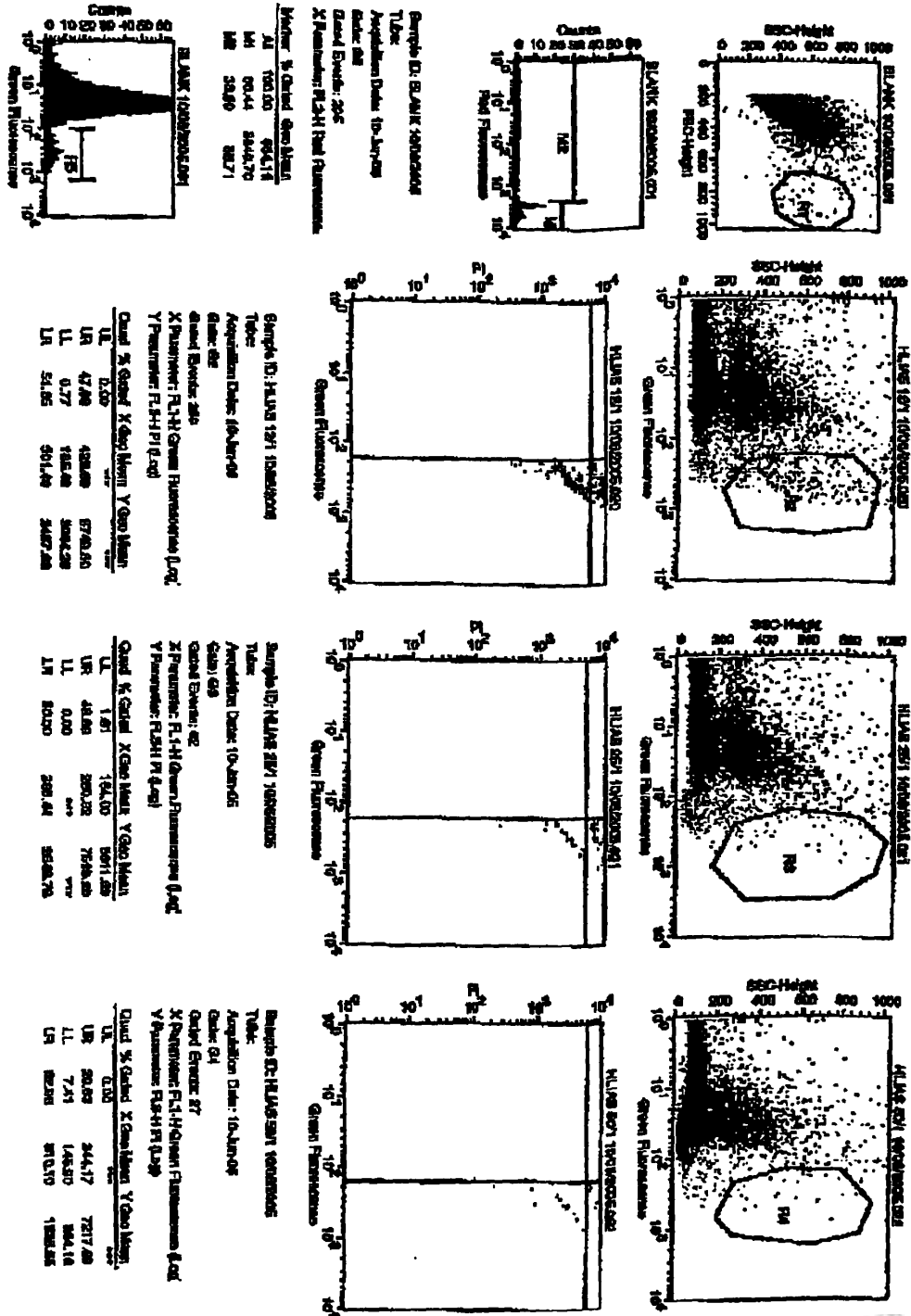
Διάγραμμα 64: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρική ροής του εθελοντή με κωδικό Α3 πριν την χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών.



Διάγραμμα 65: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής του εθελοντή με κωδικό A4 πριν την χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών.

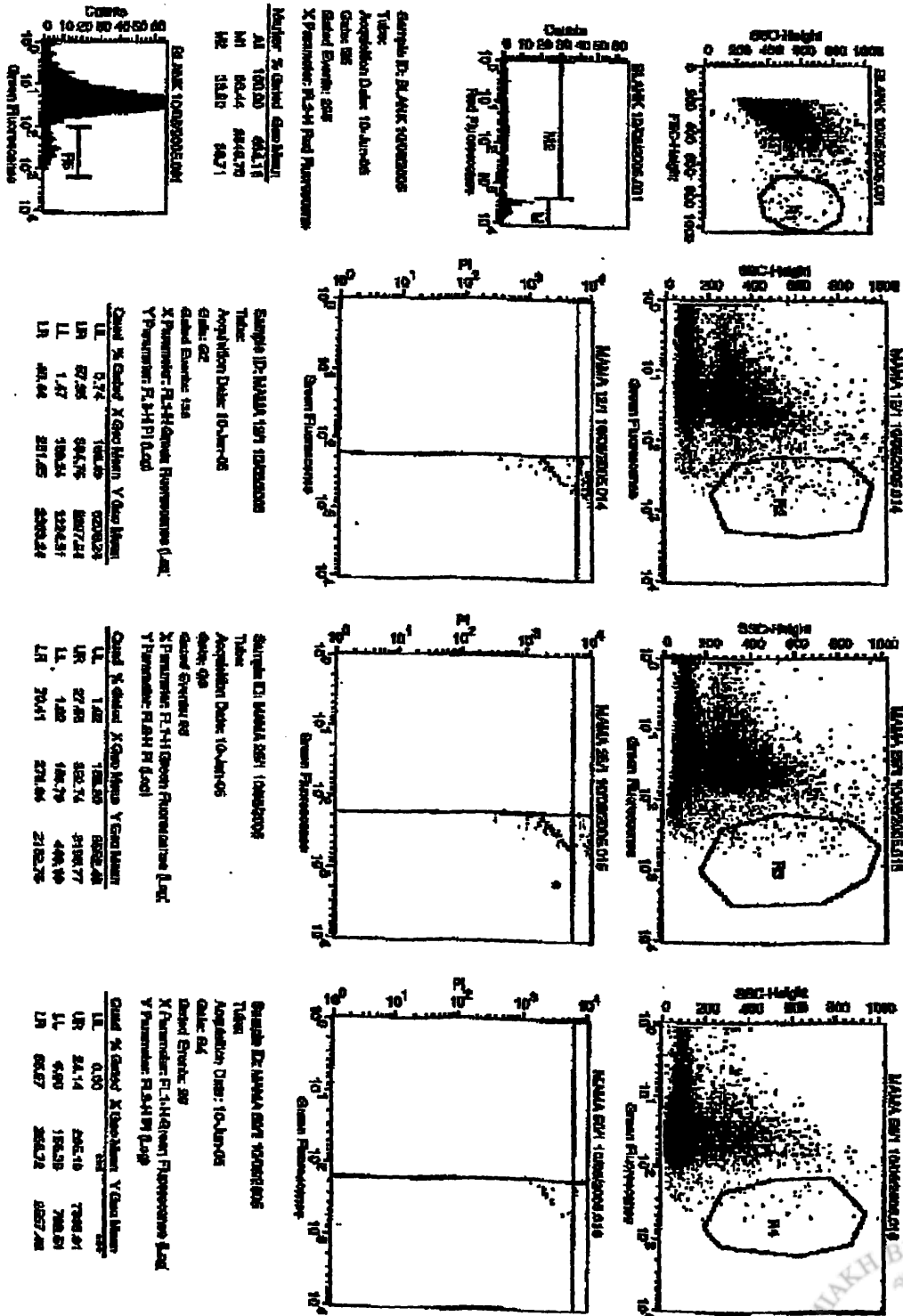


Διάγραμμα 66: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής του εθελοντή με κωδικό A5 πριν την χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών.

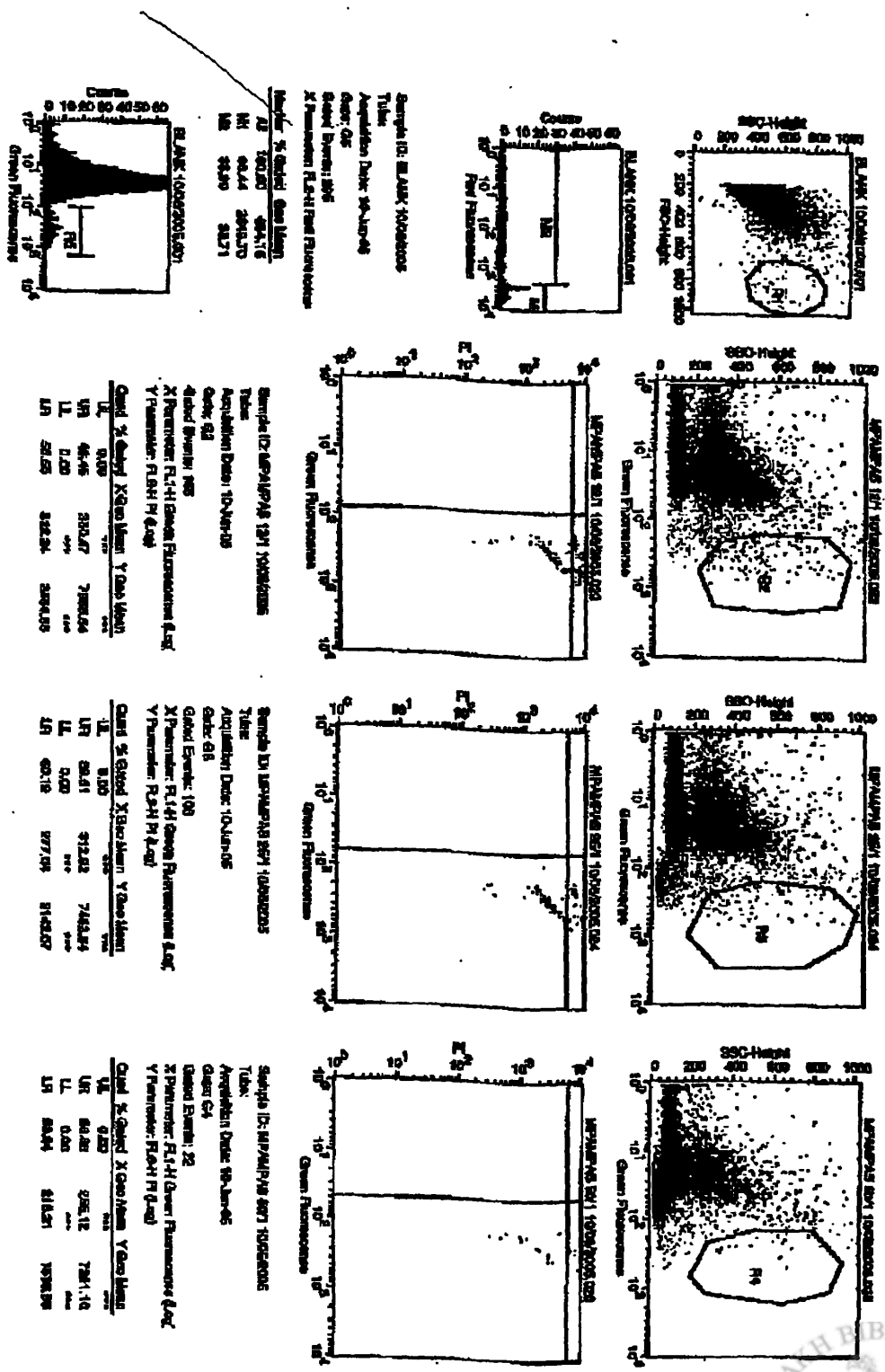




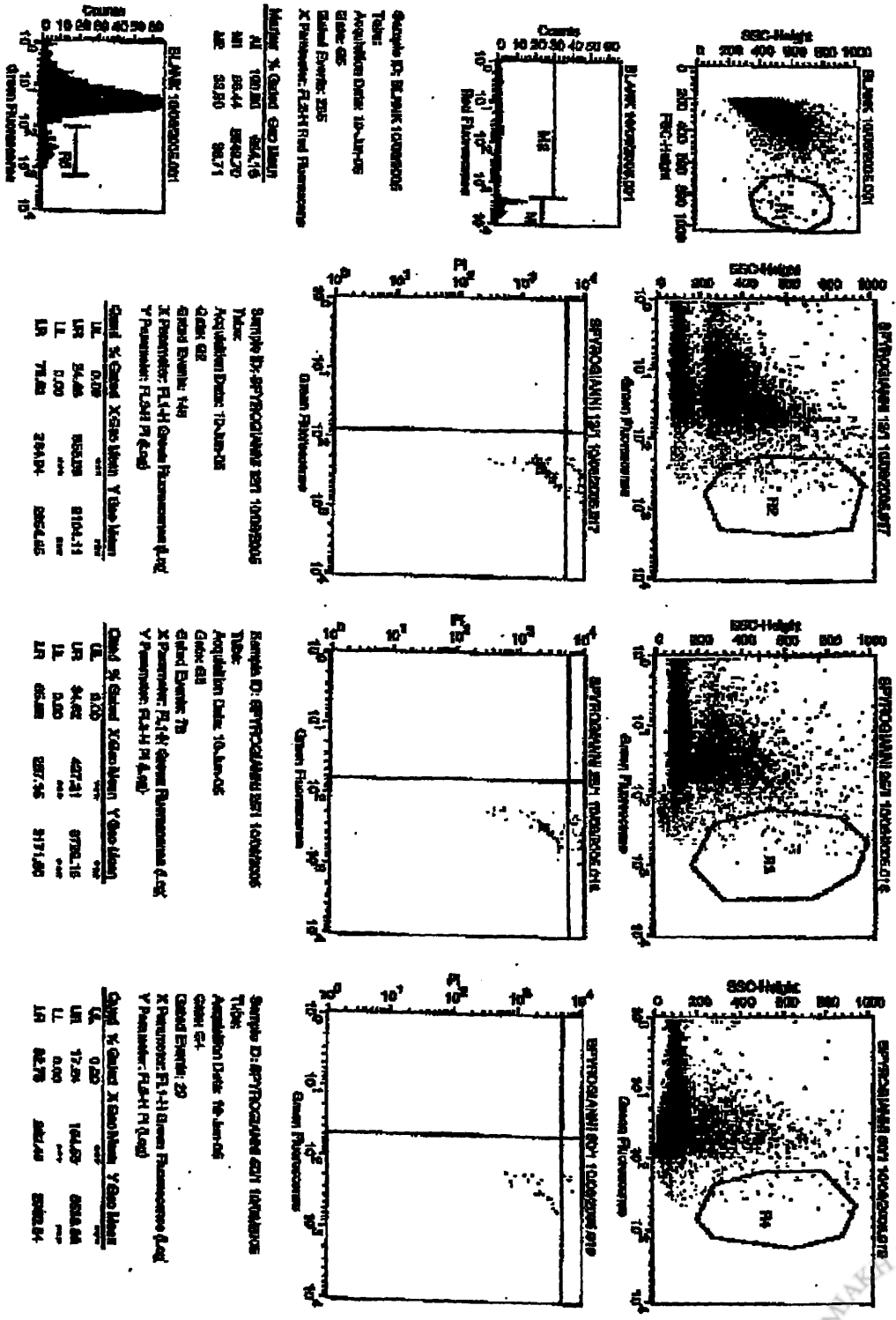
**Διάγραμμα 67:** Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής του εθελοντή με κωδικό Α6 πριν την χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών.



Διάγραμμα 68: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρική ροής του εθελοντή με κωδικό A7 πριν την χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών.



**Διάγραμμα 69:** Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής του εθελοντή με κωδικό Α8 πριν την χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών.



Διάγραμμα 70: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής του εθελοντή με κωδικό A9 πριν την χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών.

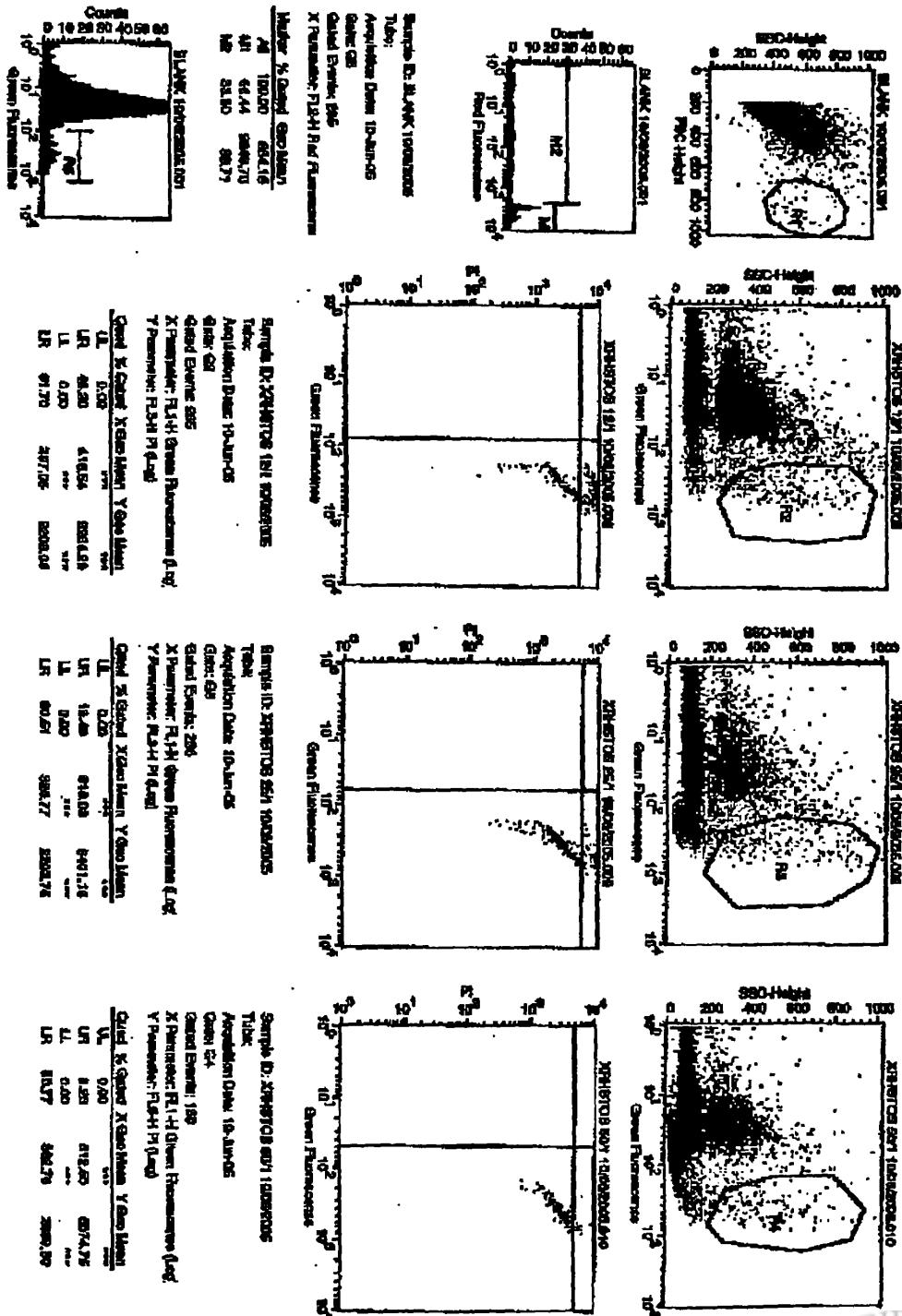
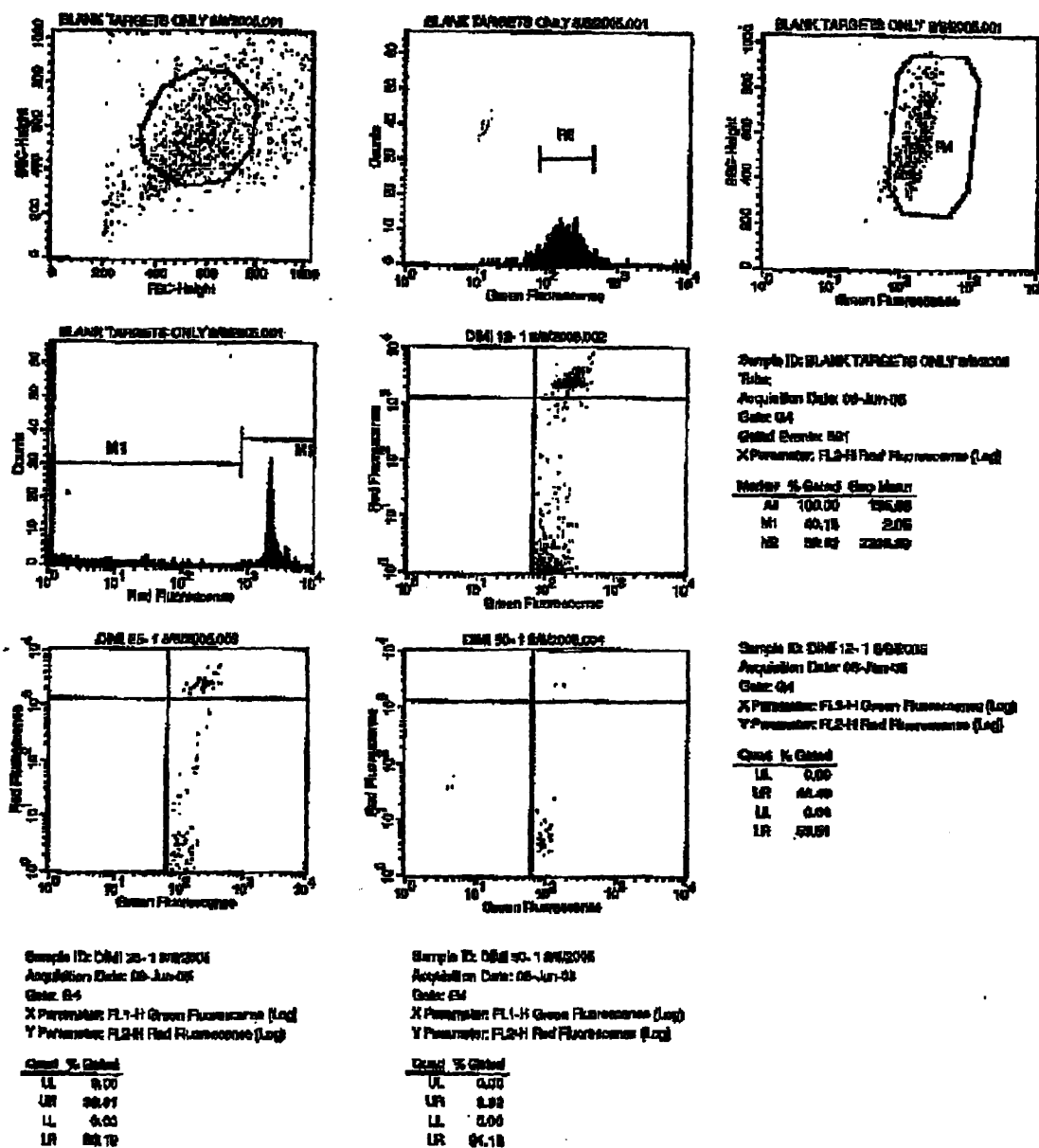


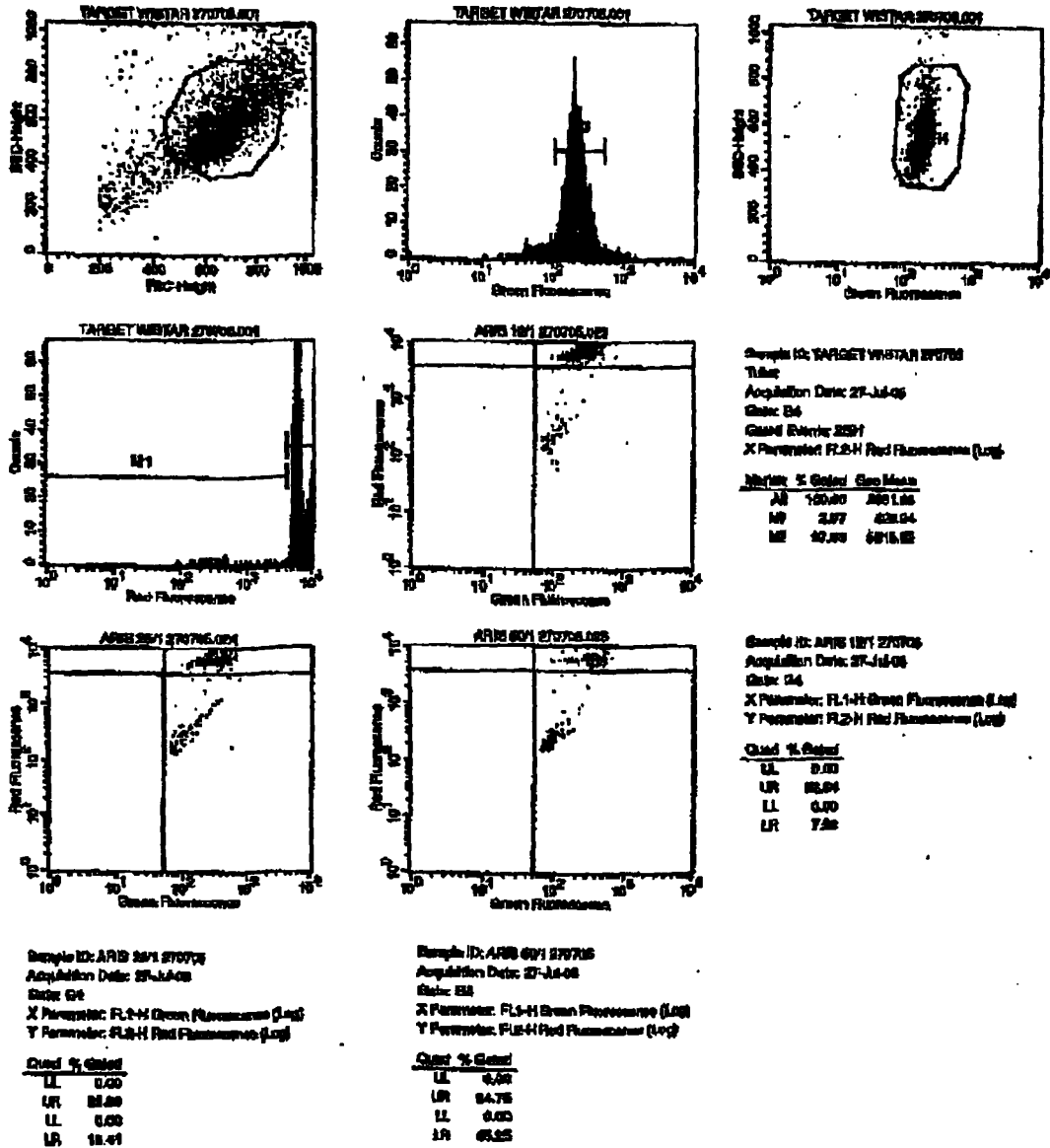
Figure 1



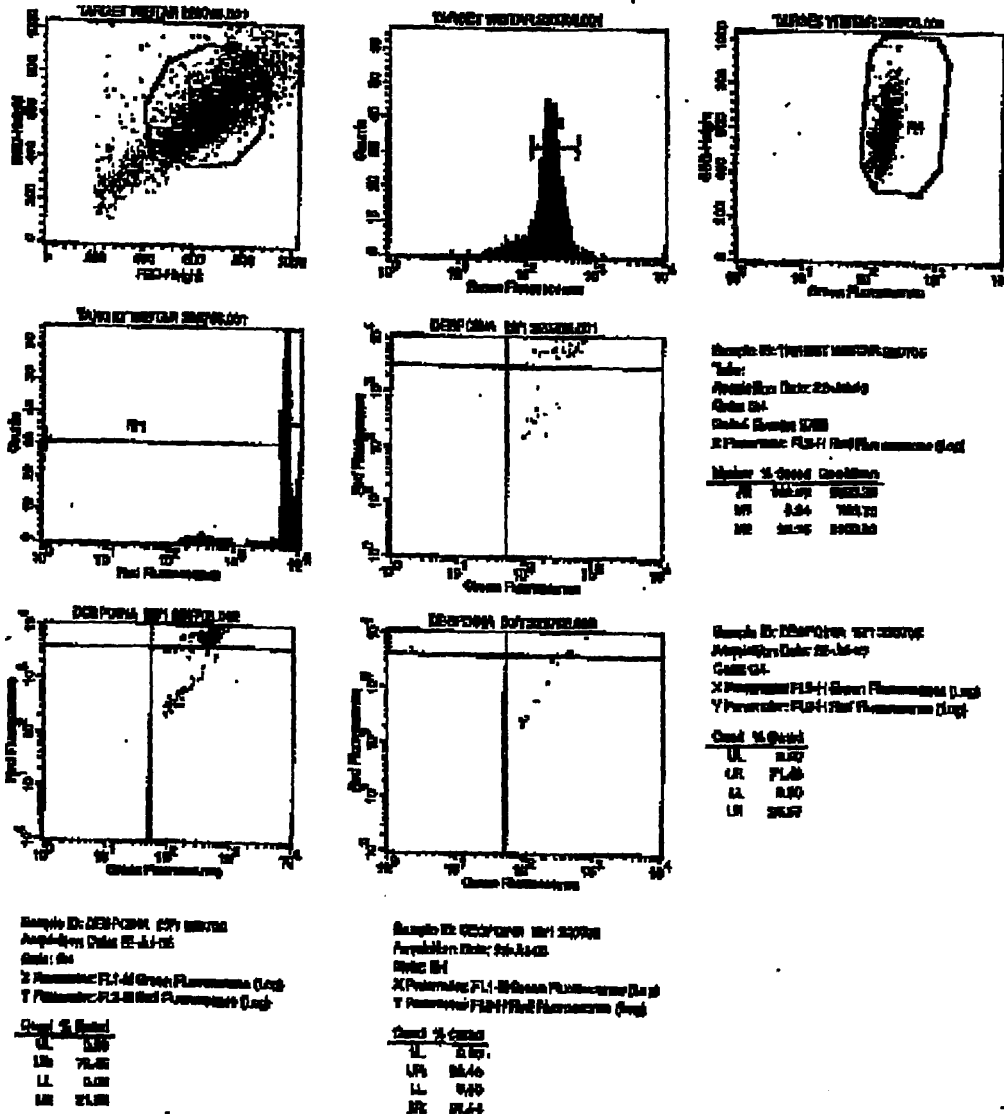
Διάγραμμα 71: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής του εθελοντή με κωδικό A10 πριν την χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών.



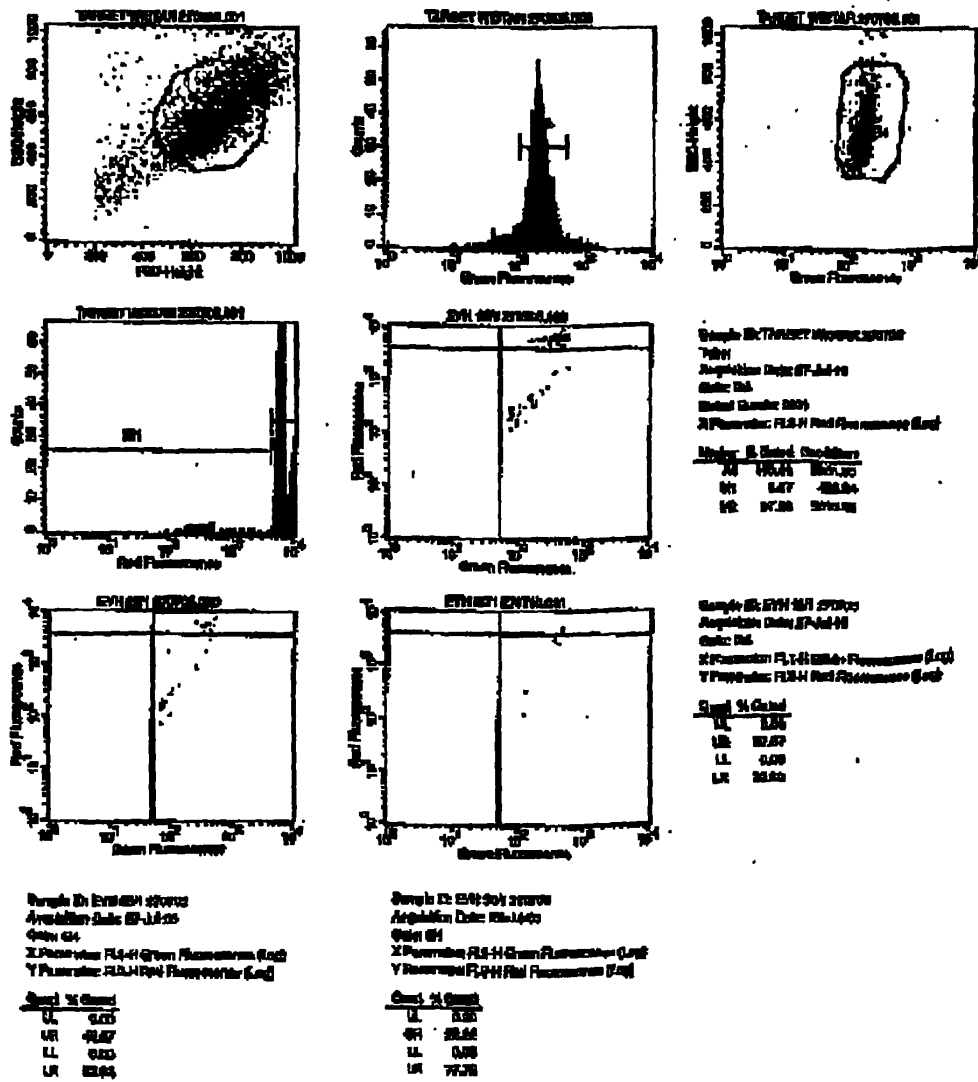
Διάγραμμα 72: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής του εθελοντή με κωδικό A1 μετά την χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών.



**Διάγραμμα 73:** Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής του εθελοντή με κωδικό A2 μετά την χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών.

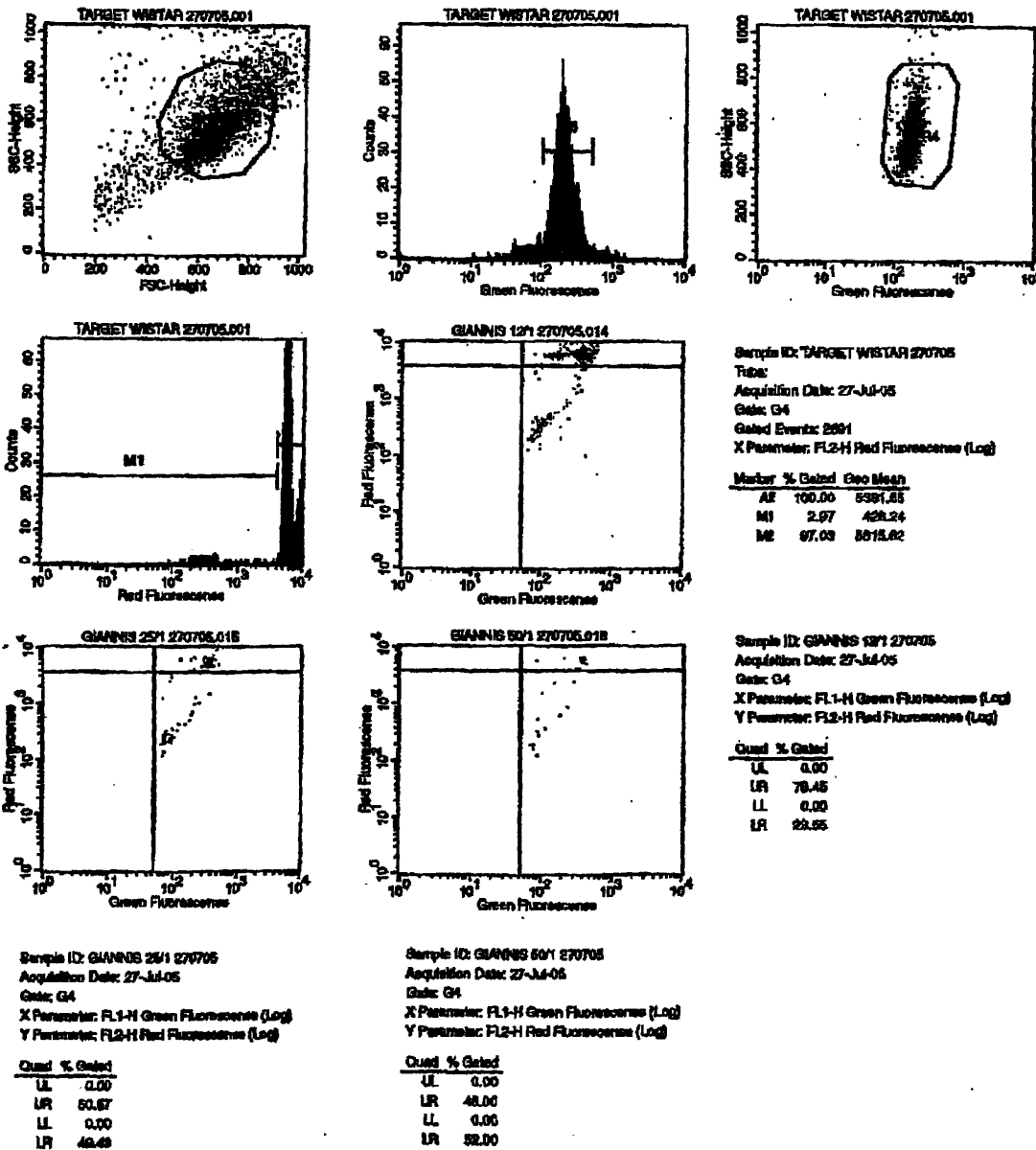


**Διάγραμμα 74:** Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής του εθελοντή με κωδικό A3 μετά την χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών.

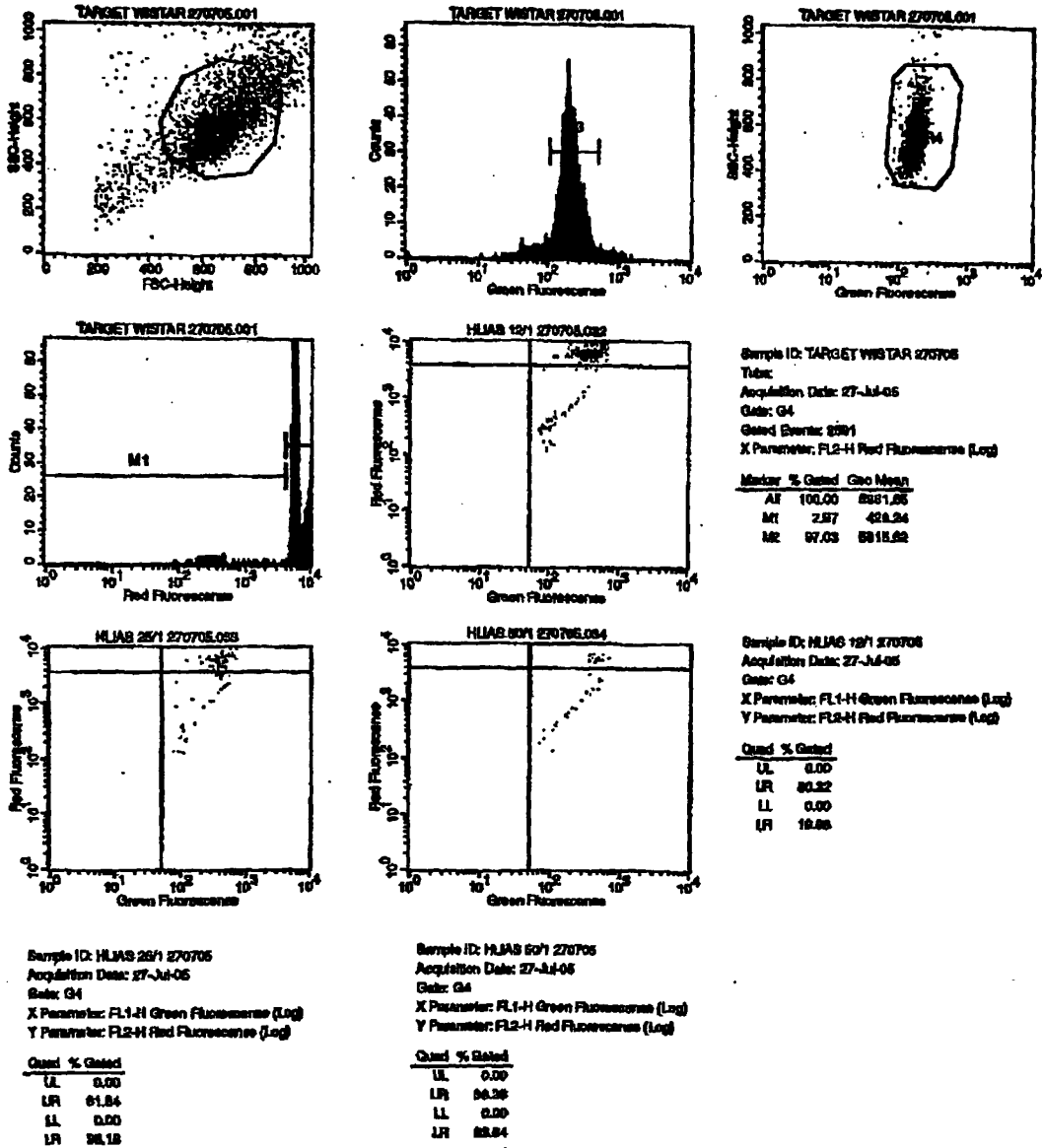




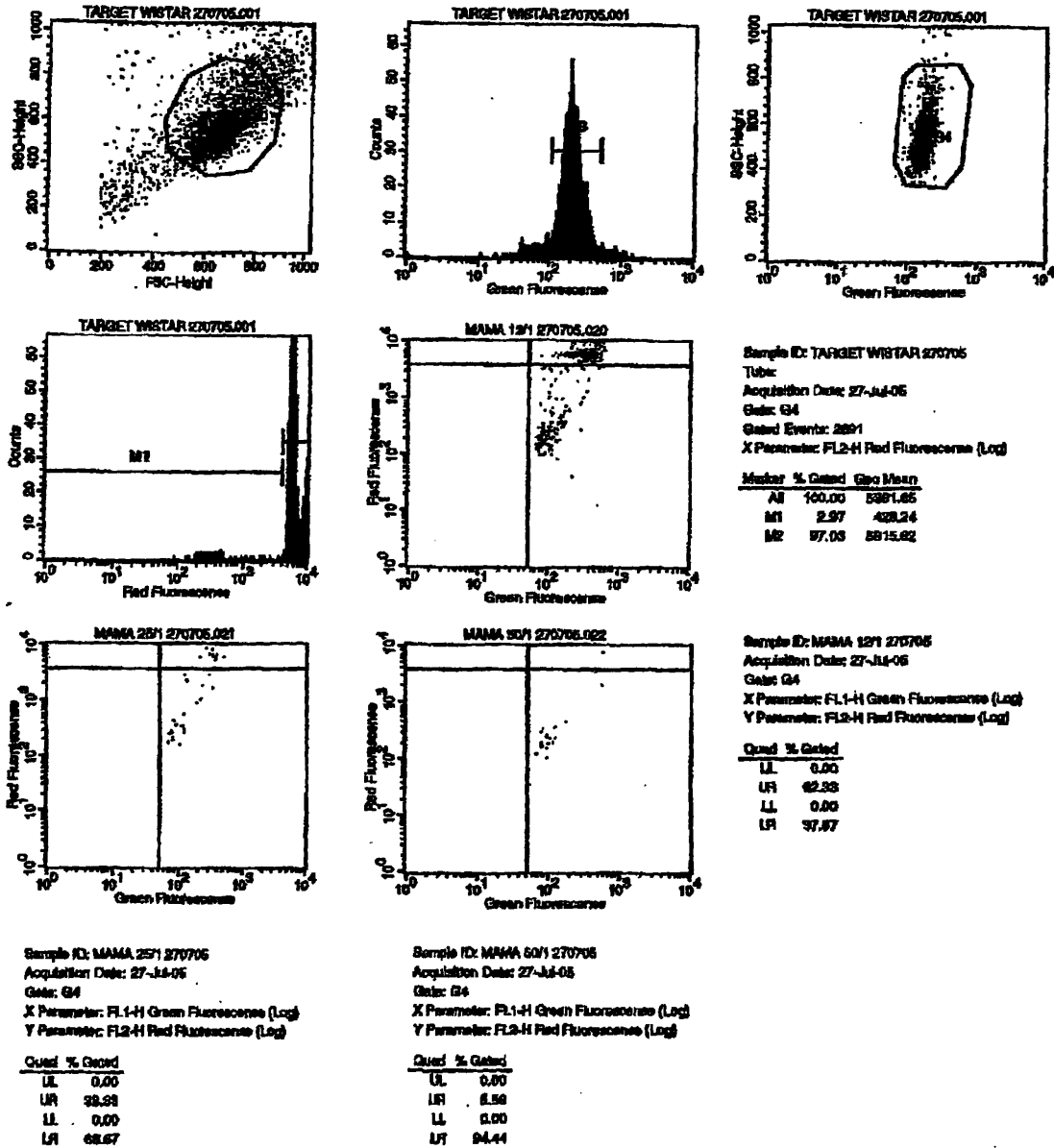
**Διάγραμμα 75:** Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής του εθελοντή με κωδικό A4 μετά την χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών.



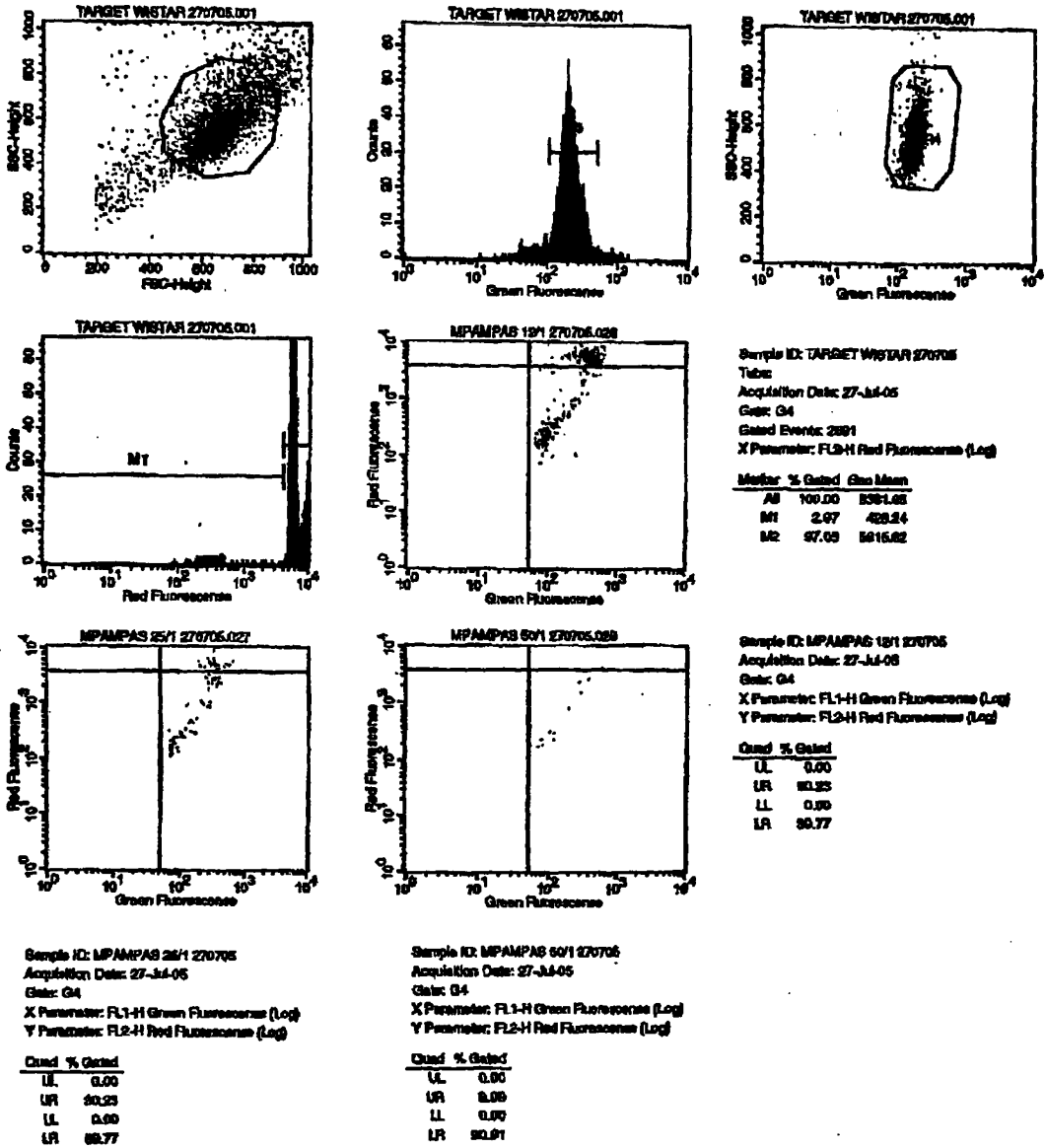
Διάγραμμα 76: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής του εθελοντή με κωδικό A5 μετά την χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών.



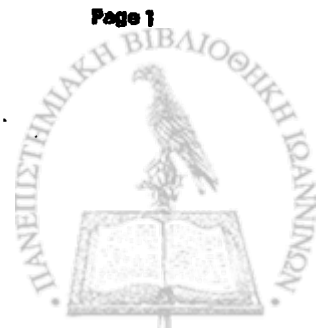
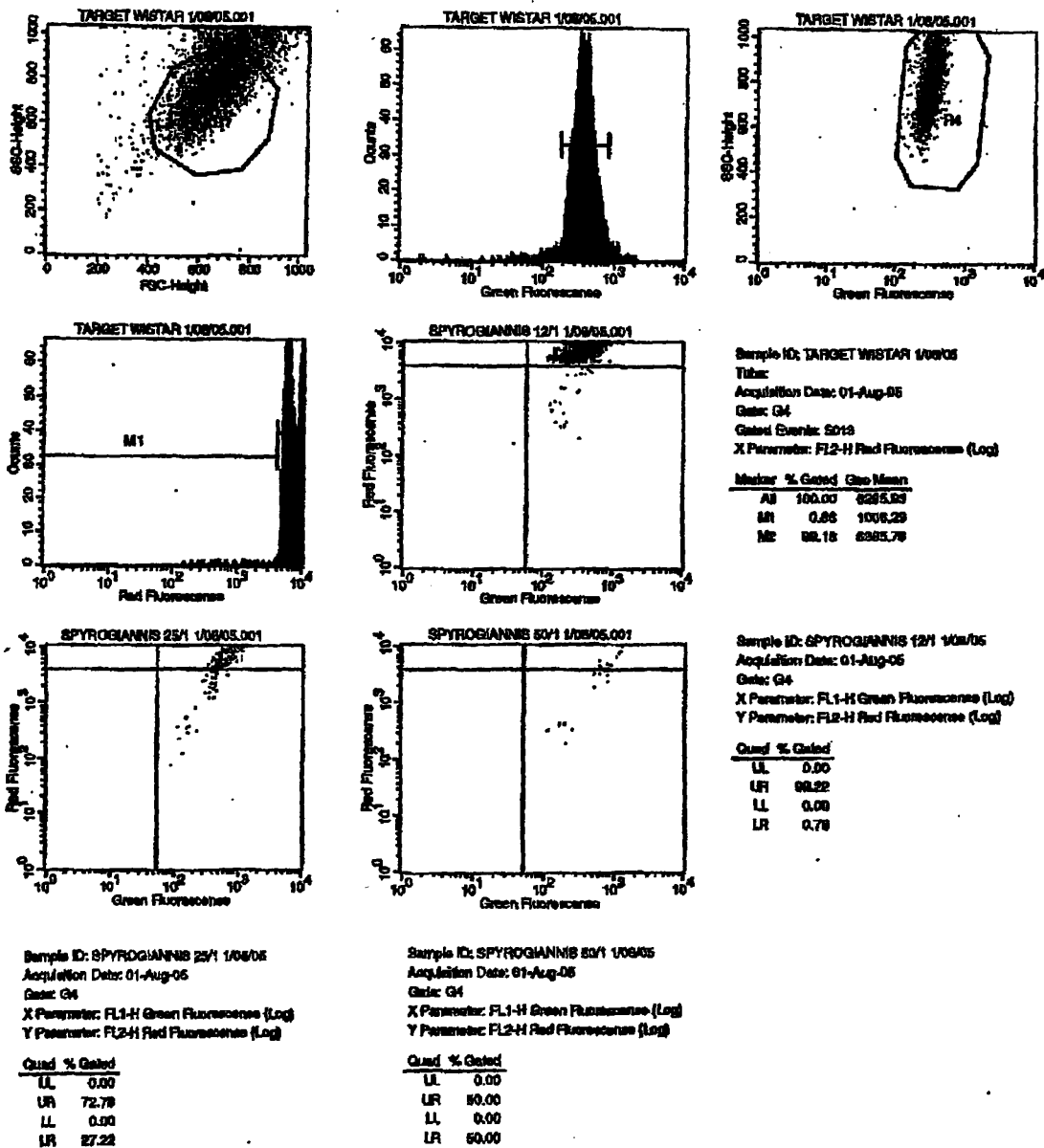
Διάγραμμα 77: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής του εθελοντή με κωδικό Α6 μετά την χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών.



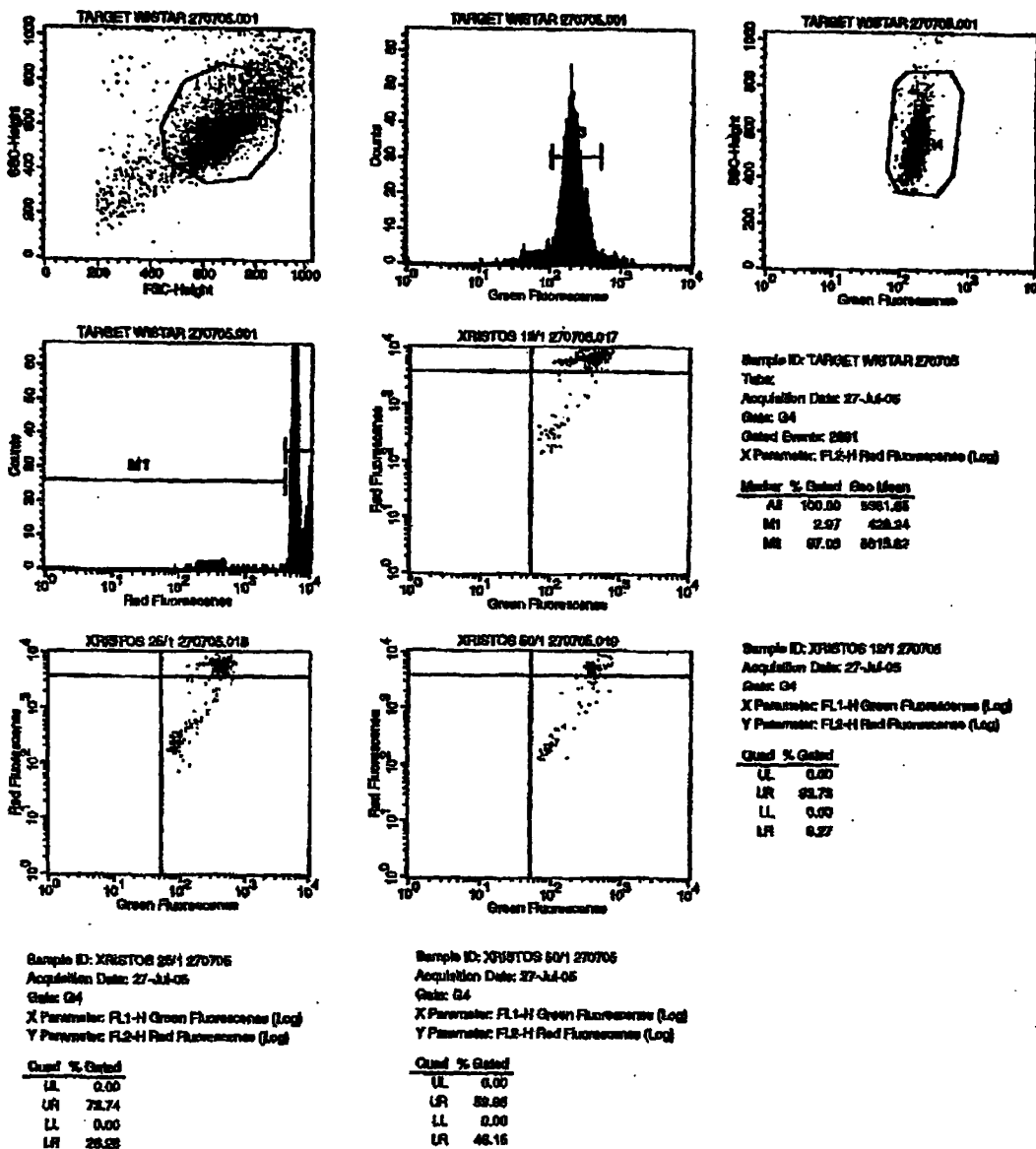
**Διάγραμμα 78:** Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρική ροής του εθελοντή με κωδικό A7 μετά την χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών.



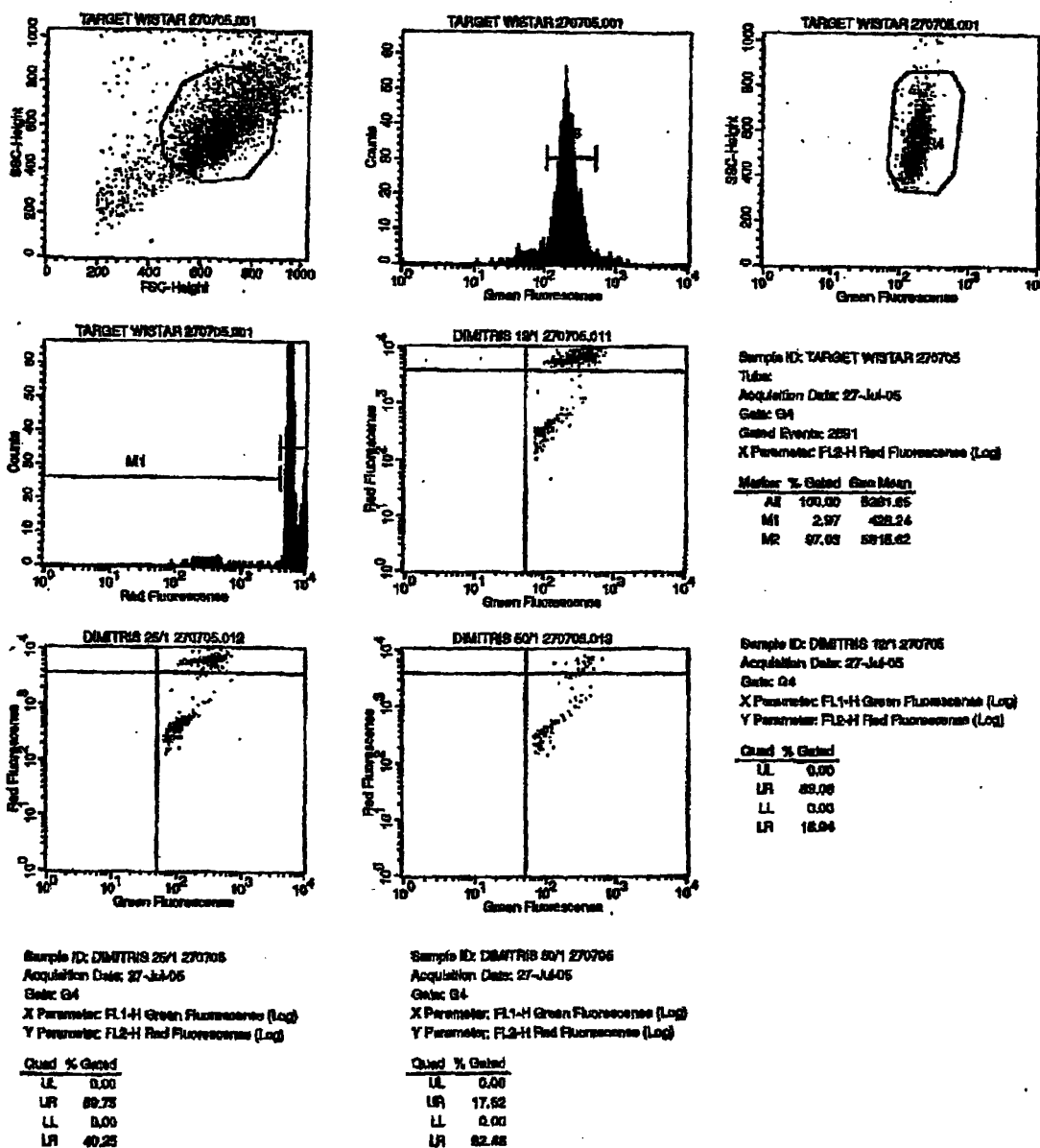
Διάγραμμα 79: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής του εθελοντή με κωδικό A8 μετά την χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών.



Διάγραμμα 80: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής του εθελοντή με κωδικό A9 μετά την χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών.

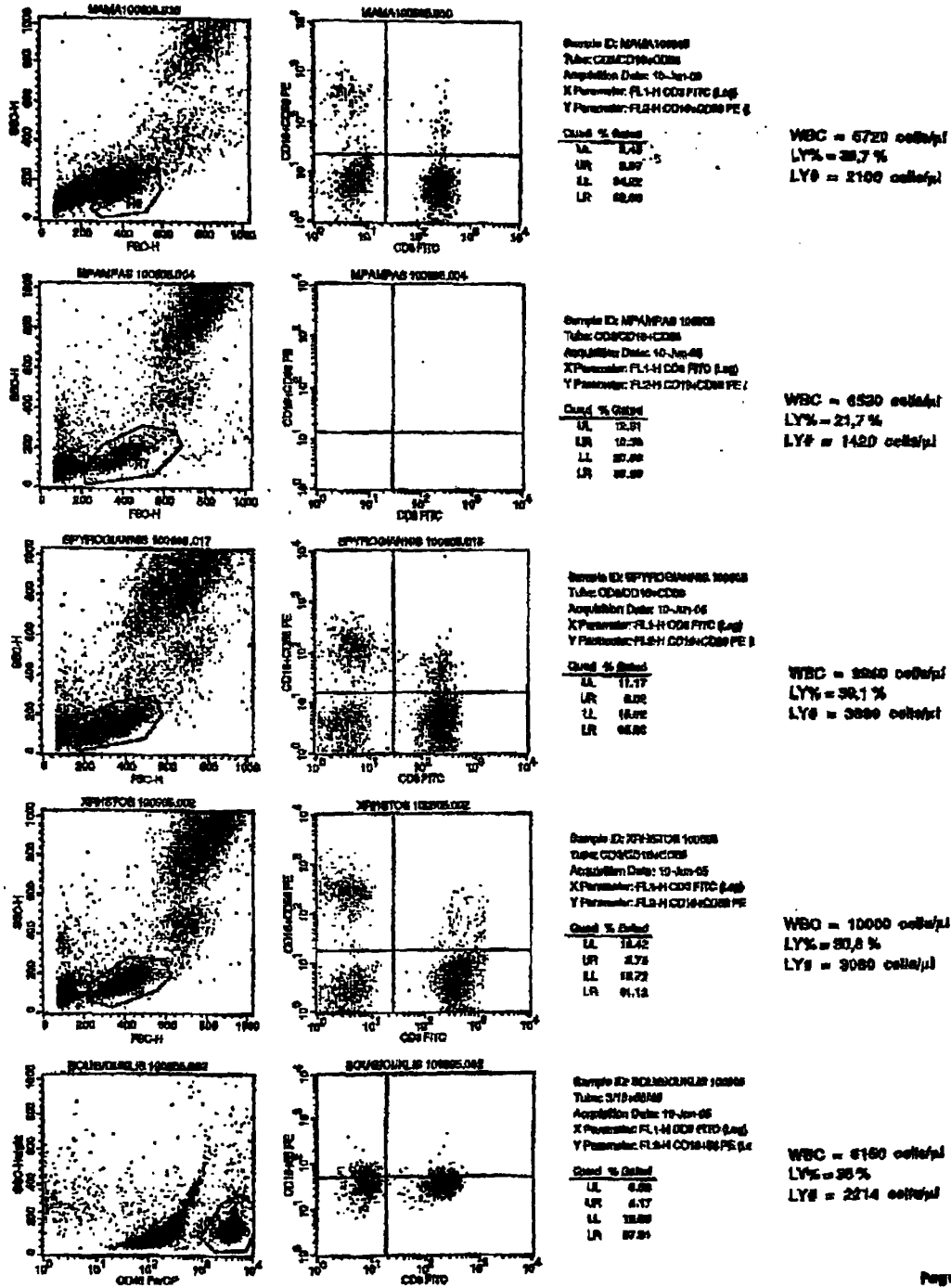


Διάγραμμα 81: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής του εθελοντή με κωδικό A10 μετά την χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών.



Επιπλέον, στην ίδια ομάδα ελέγχου μετρήθηκε και ο απόλυτος αριθμός των NK και NKT λεμφοκυττάρων πριν και μετά την χορήγηση των αντιοξειδωτικών ουσιών και δεν διαπιστώθηκε κάποια σημαντική μεταβολή στον απόλυτο αριθμό τους. Οι εν λόγω μετρήσεις καταγράφονται στα παρακάτω διαγράμματα (82-85).

**Διάγραμμα 82:** Οι πληθυσμοί των NK και NKT λεμφοκυττάρων στην ομάδα ελέγχου πριν την χορήγηση των αντιοξειδωτικών σκευασμάτων.

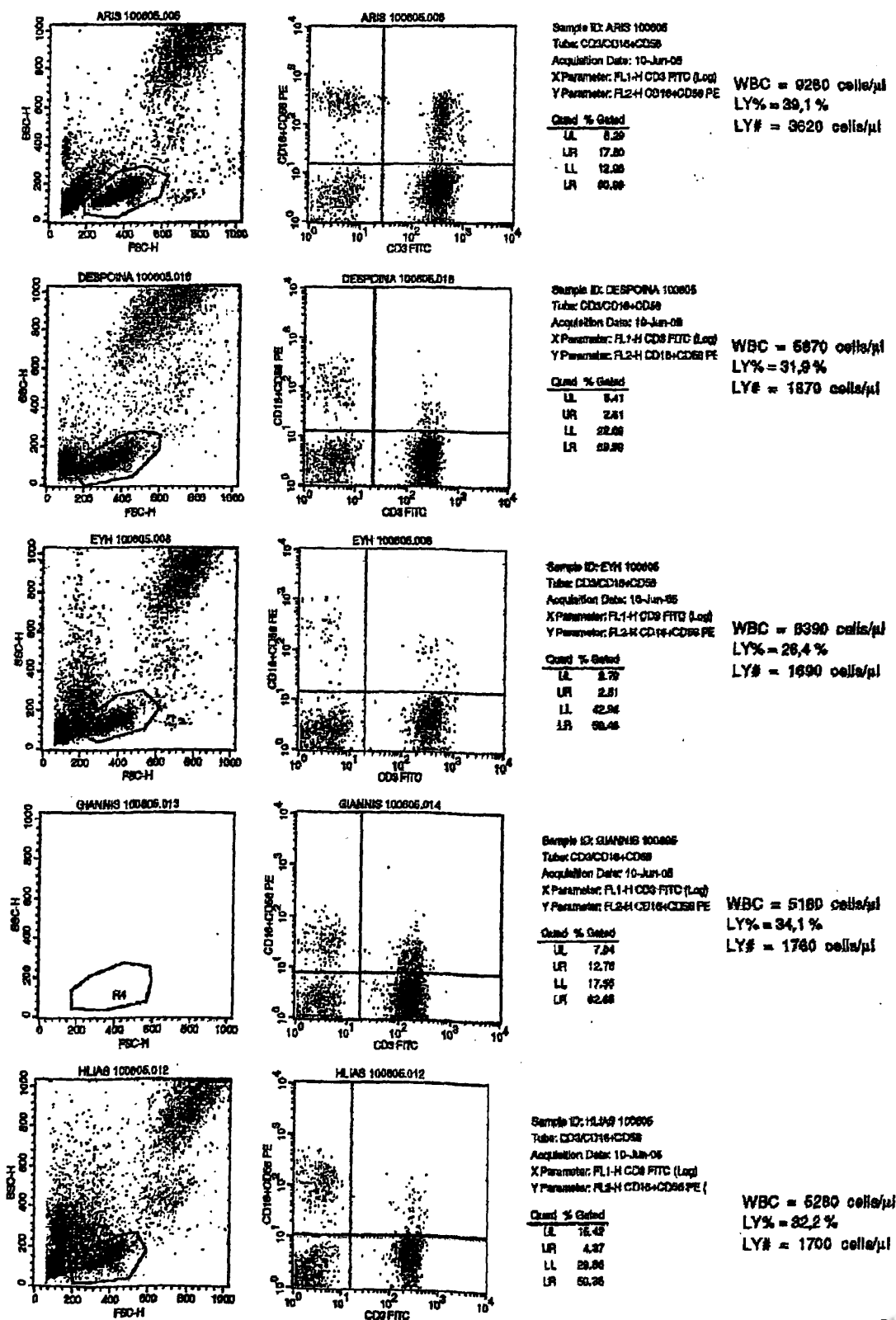


Page 2

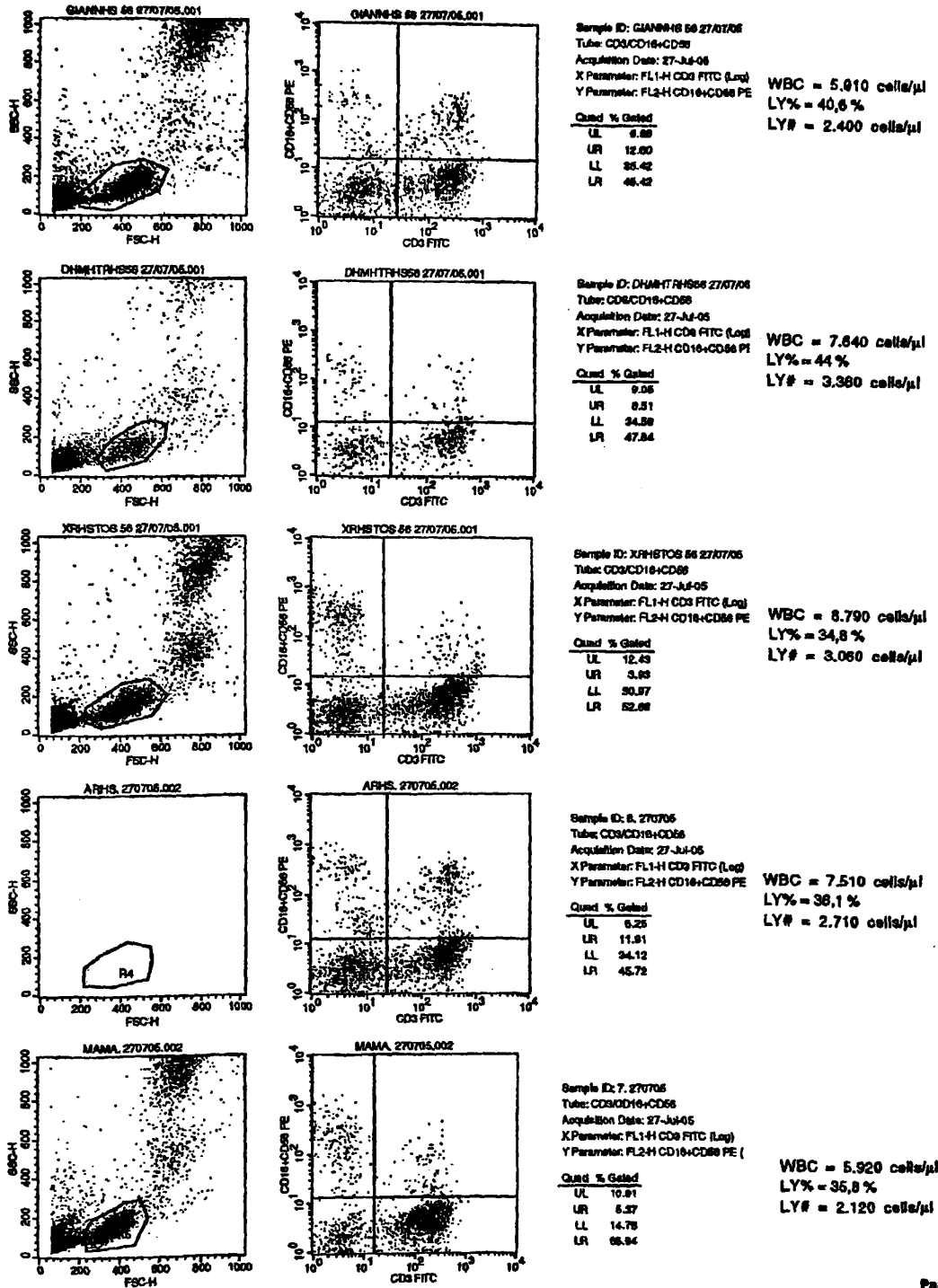




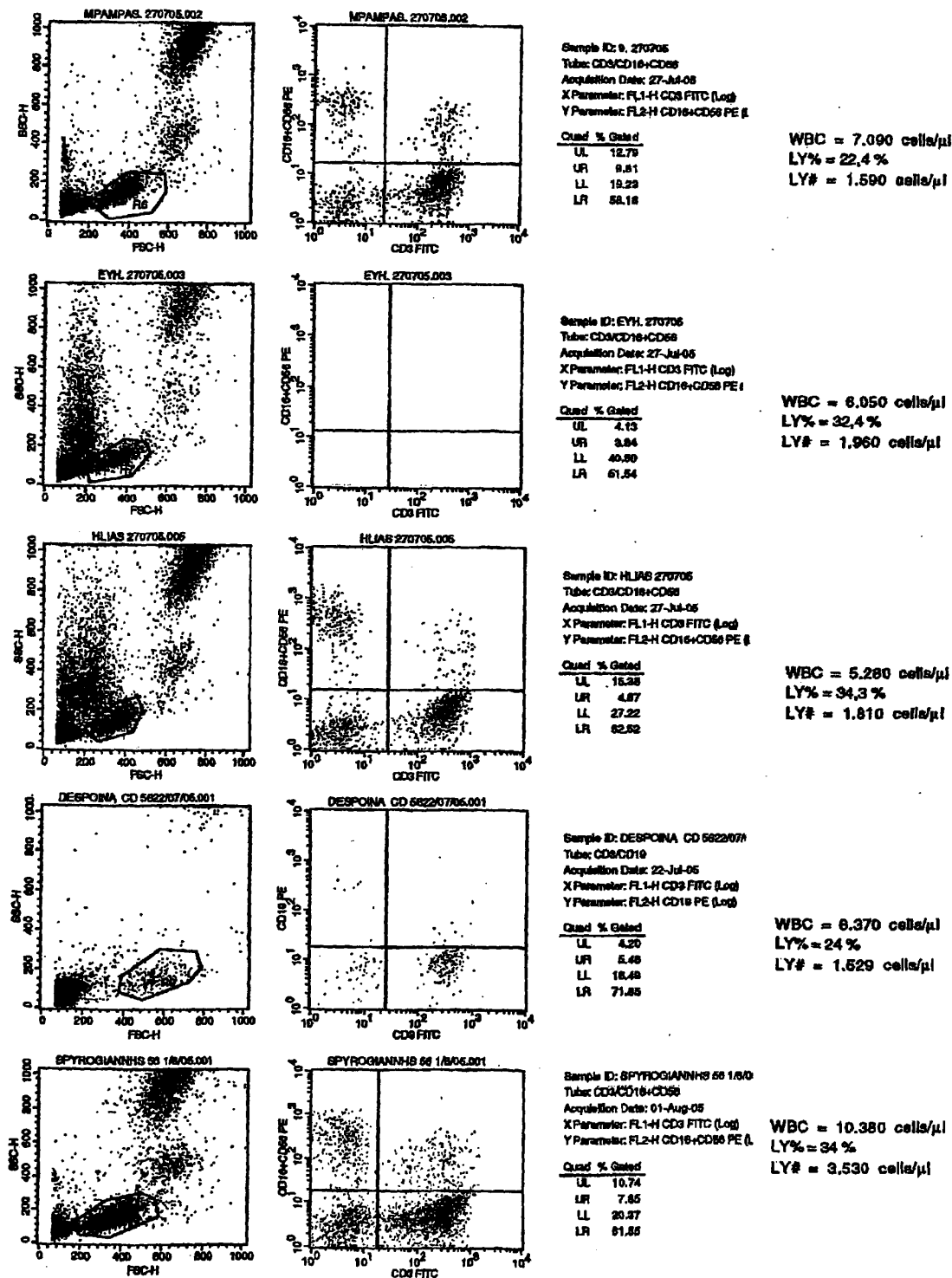
**Διάγραμμα 83:** Οι πληθυσμοί των NK και NKT λεμφοκυττάρων στην υπόλοιπη ομάδα ελέγχου πριν την χορήγηση των αντιοξειδωτικών σκευασμάτων.



**Διάγραμμα 84:** Οι πληθυσμοί των NK και NKT λεμφοκυττάρων στην ομάδα ελέγχου μετά την χορήγηση των αντιοξειδωτικών σκευασμάτων.



**Διάγραμμα 85:** Οι πληθυσμοί των NK και NKT λεμφοκυττάρων στην υπόλοιπη ομάδα ελέγχου μετά την χορήγηση των αντιοξειδωτικών σκευασμάτων.



Η επόμενη ομάδα της οποίας αξιολογήθηκε το ανοσοποιητικό σύστημα με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής, είναι 6 καρκινοπαθείς οι οποίοι έπασχαν από τις ακόλουθες νόσους και υποβλήθηκαν στις ακόλουθες θεραπευτικές αγωγές: K1. Άνδρας 70 ετών με πολλαπλούν μυέλωμα που υποβλήθηκε σε αγωγή με μελφαλίνη και πρεδνιζολόνη. K2. Άνδρας 73 ετών με λέμφωμα στομάχου (Non-Hodgins), με αγωγή Mabthera Chor (Rituximab με πρεδνιζολόνη, κυκλοφωσφαμίδη, βινκριστίνη). K3. Γυναίκα 73 ετών με πολλαπλούν μυέλωμα, με αγωγή Velcade (Bortexamib). K4. Άνδρας 60 ετών με MALT λέμφωμα στομάχου σε θεραπεία με Mabthera Chor. K5. Γυναίκα 42 ετών με λέμφωμα εντέρου (Non-Hodgins) υψηλού βαθμού κακοήθειας, με αγωγή Mabthera Chor. K6. Άνδρας 58 ετών με λέμφωμα μεσοθωρακίου (Non-Hodgins) υψηλού βαθμού κακοήθειας με αγωγή Mabthera Chor. Οι ασθενείς αυτοί ελέγχθηκαν όσον αφορά τη λειτουργικότητα των NKCs καθώς και τον απόλυτο αριθμό των NK και NKT λεμφοκυττάρων πριν και μετά τη θεραπευτική αγωγή. Ο επανέλεγχος έγινε τρεις μήνες μετά τη θεραπεία.

Ο άνδρας με κωδικό K1 πριν τη θεραπεία εμφάνισε στον ορό του απόλυτο αριθμό των NK 8,48%, και NKT 5,36%. Επίσης, η λειτουργικότητα των NK κυττάρων ήταν 42, 50 και 82% στις αναλογίες 12,5:1, 25:1 και 50:1 αντίστοιχα (Διαγράμματα 86, 94). Μετά την θεραπεία ο αριθμός των NK ήταν 1,60% και των NKT 2,08% και η λειτουργικότητα των NK 43, 50 και 82% στις τρεις αναλογίες αντίστοιχα (Διαγράμματα 87, 96).

Ο άνδρας με κωδικό K2 πριν τη θεραπεία εμφάνισε στον ορό του απόλυτο αριθμό των NK 9,13% και NKT 16,09%. Επίσης, η λειτουργικότητα των NK κυττάρων ήταν 51,83 και 95% στις αναλογίες 12,5:1, 25:1, και 50:1 αντίστοιχα (Διαγράμματα 88, 95). Μετά την θεραπεία ο αριθμός των NK ήταν 8,09% και των NKT 3,58% και η λειτουργικότητα των NK 72, 61 και 91% στις τρεις αναλογίες αντίστοιχα (Διαγράμματα 89, 96).

Η γυναίκα με κωδικό K3, πριν τη θεραπεία εμφάνισε στον ορό της απόλυτο αριθμό των NK 20,30% και NKT 1,74%. Επίσης, η λειτουργικότητα των NK κυττάρων ήταν 19, 63 και 68% στις αναλογίες 12,5:1, 25:1, και 50:1 αντίστοιχα (Διαγράμματα 90, 95). Μετά την θεραπεία ο αριθμός των NK ήταν 20,29% και των NKT 3,20% και η λειτουργικότητα των NK 15, 22 και 43% στις τρεις αναλογίες αντίστοιχα (Διαγράμματα 91, 96).

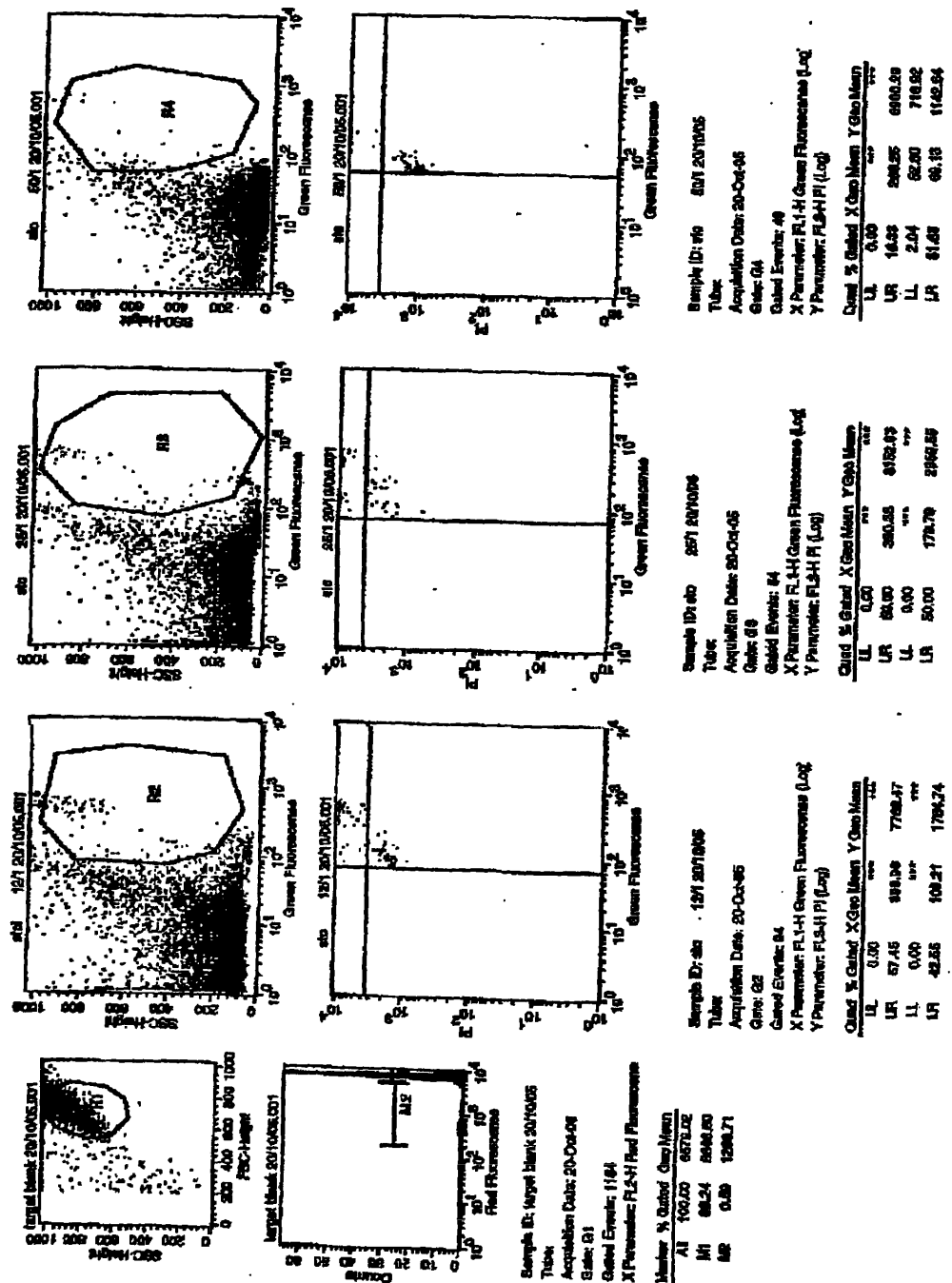
Ο άνδρας με κωδικό K4, πριν τη θεραπεία εμφάνισε στον ορό του απόλυτο αριθμό των NK 2,88% και NKT 16,79%. Επίσης, η λειτουργικότητα των NK κυττάρων ήταν 5, 15 και 9% στις αναλογίες 12,5:1, 25:1, και 50:1 αντίστοιχα (Διαγράμματα 92,95). Μετά την θεραπεία ο αριθμός των NK ήταν 4,82% και των NKT 1,46% και η λειτουργικότητα των NK 45, 64 και 68% στις τρεις αναλογίες αντίστοιχα (Διαγράμματα 93, 96).



Η γυναίκα με κωδικό K5, πριν τη θεραπεία εμφάνισε στον ορό της απόλυτο αριθμό των NK 7,38% και NKT 8,77% (Διάγραμμα 94). Μετά την θεραπεία ο αριθμός των NK ήταν 33,47 % και των NKT 7,83% (Διάγραμμα 97).

Ο άνδρας με κωδικό K6 πριν τη θεραπεία εμφάνισε στον ορό του απόλυτο αριθμό των NK 5,34% και NKT 5,34% (Διάγραμμα 94). Μετά την θεραπεία ο αριθμός των NK ήταν 1,28% και των NKT 6,69% (Διάγραμμα 97).

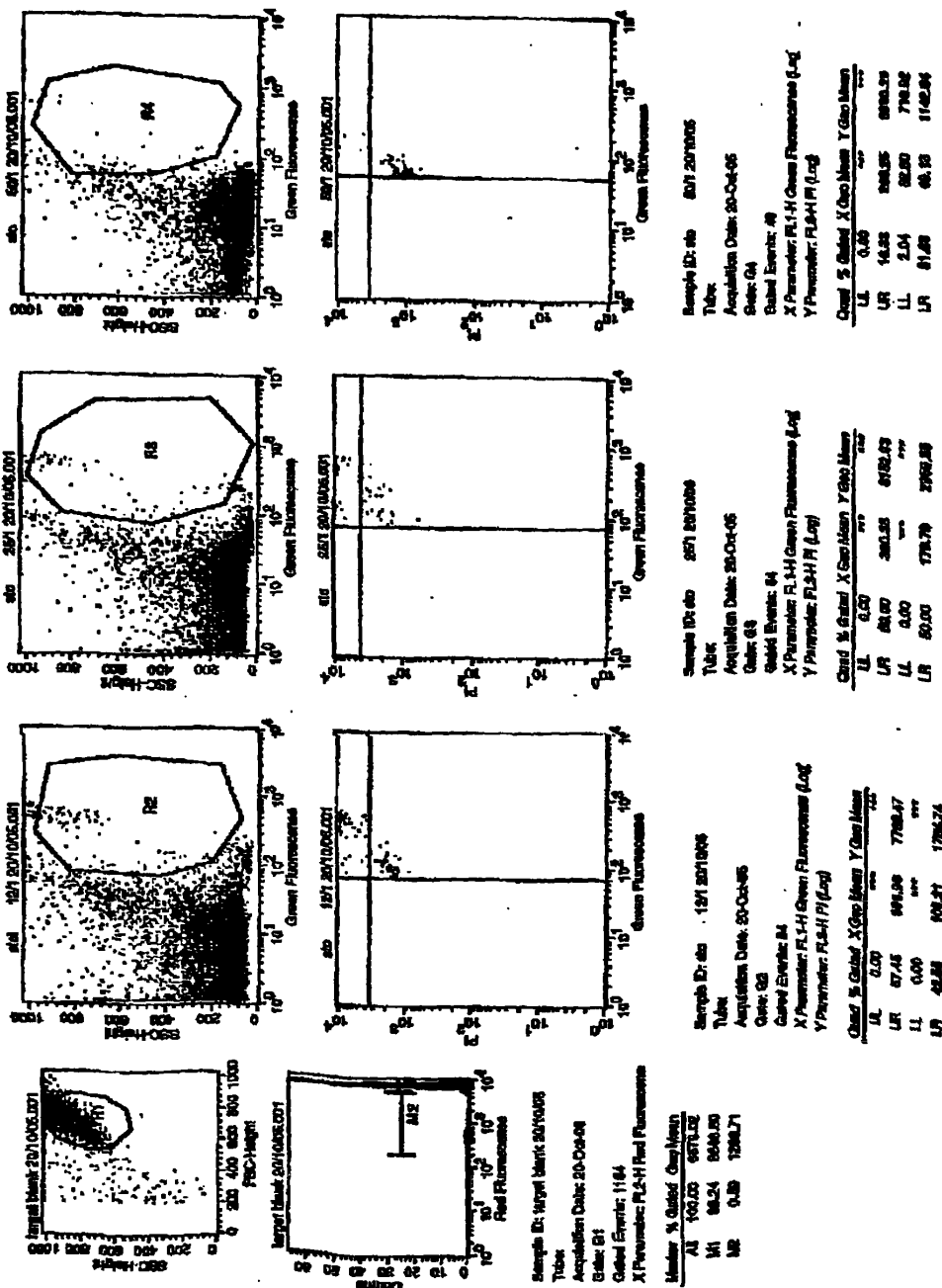
**Διάγραμμα 86:** Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής του καρκινοπαθούς άνδρα 70 με κωδικό K1 χωρίς θεραπεία.



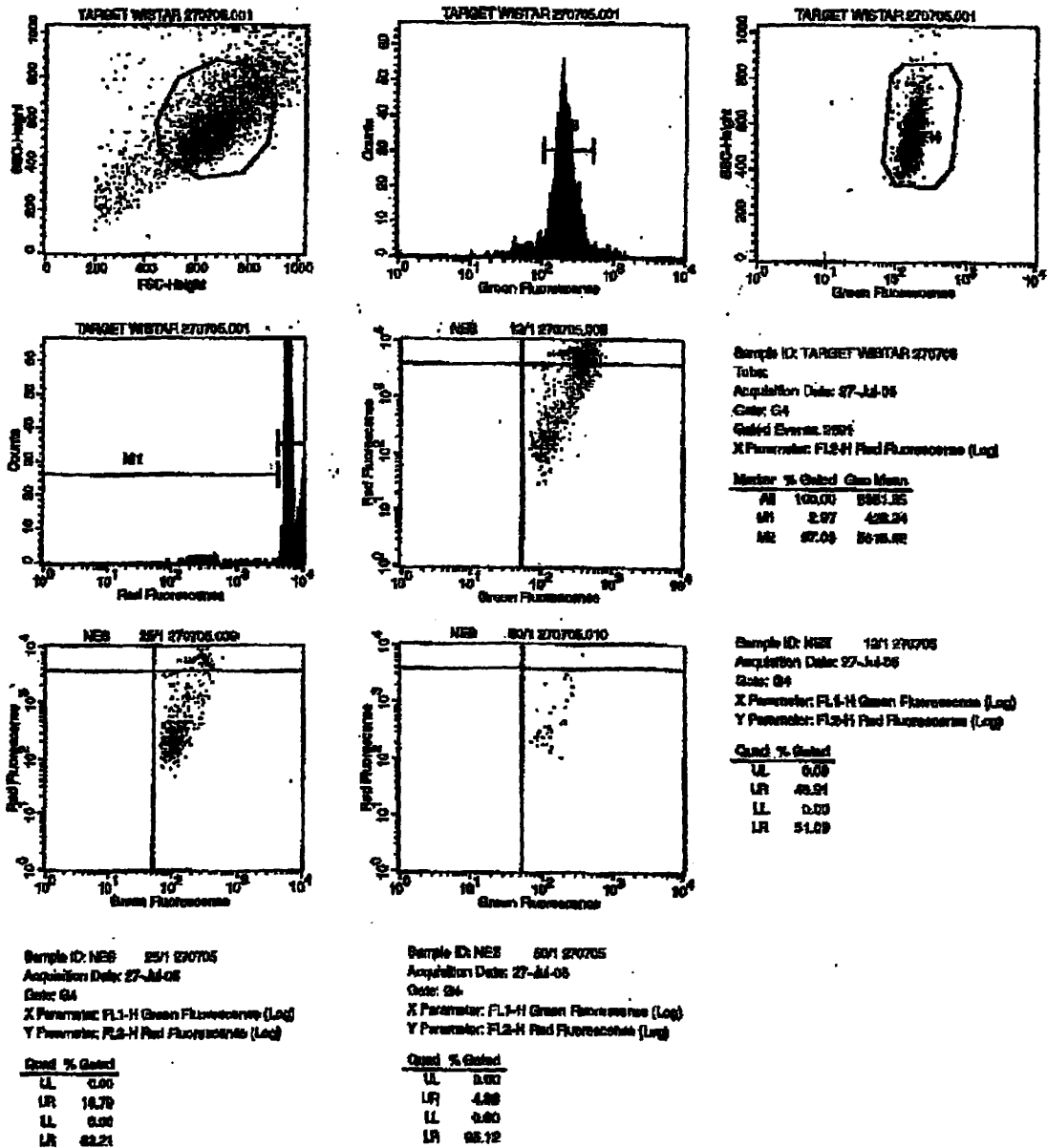
Page 1



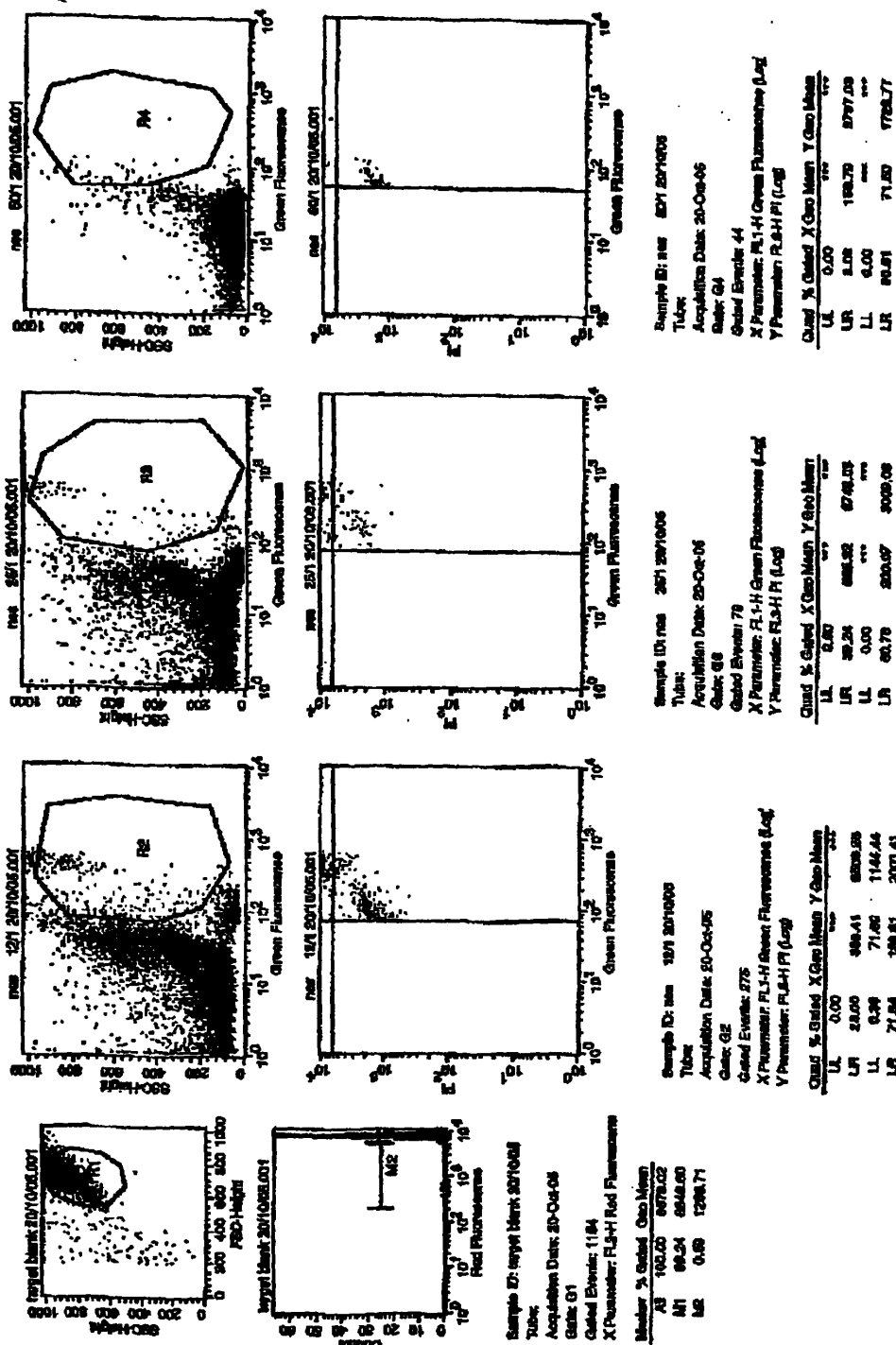
Διάγραμμα 87: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής του καρκινοπαθούς άνδρα 70 με κωδικό K1 μετά τη θεραπεία.



Διάγραμμα 88: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής του καρκινοπαθούς άνδρα 73 με κωδικό K2 πριν τη θεραπεία.



Διάγραμμα 89: Αλεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής του καρκινοπαθούς άνδρα 73 με κωδικό K2 μετά τη θεραπεία.

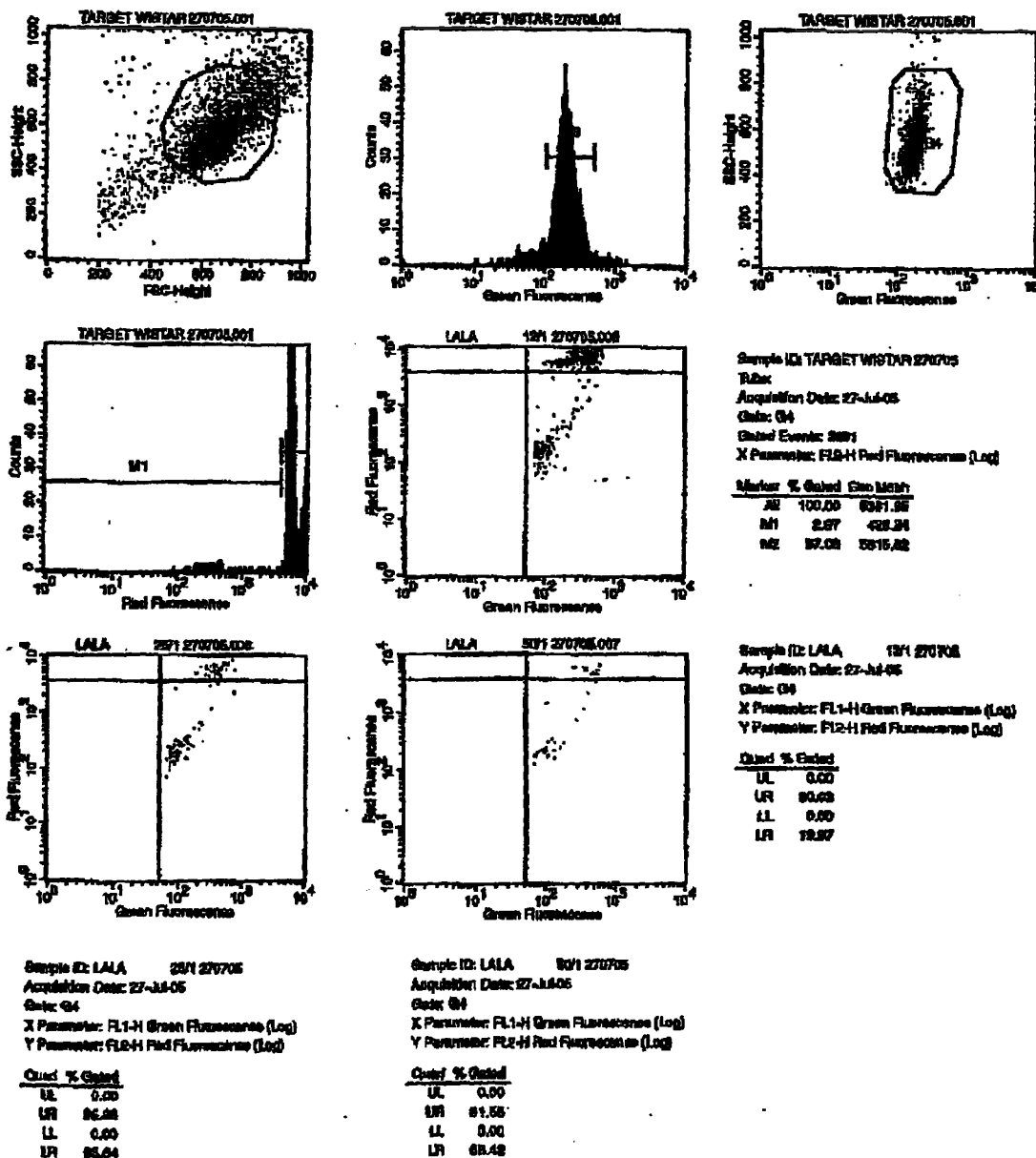


Page 1

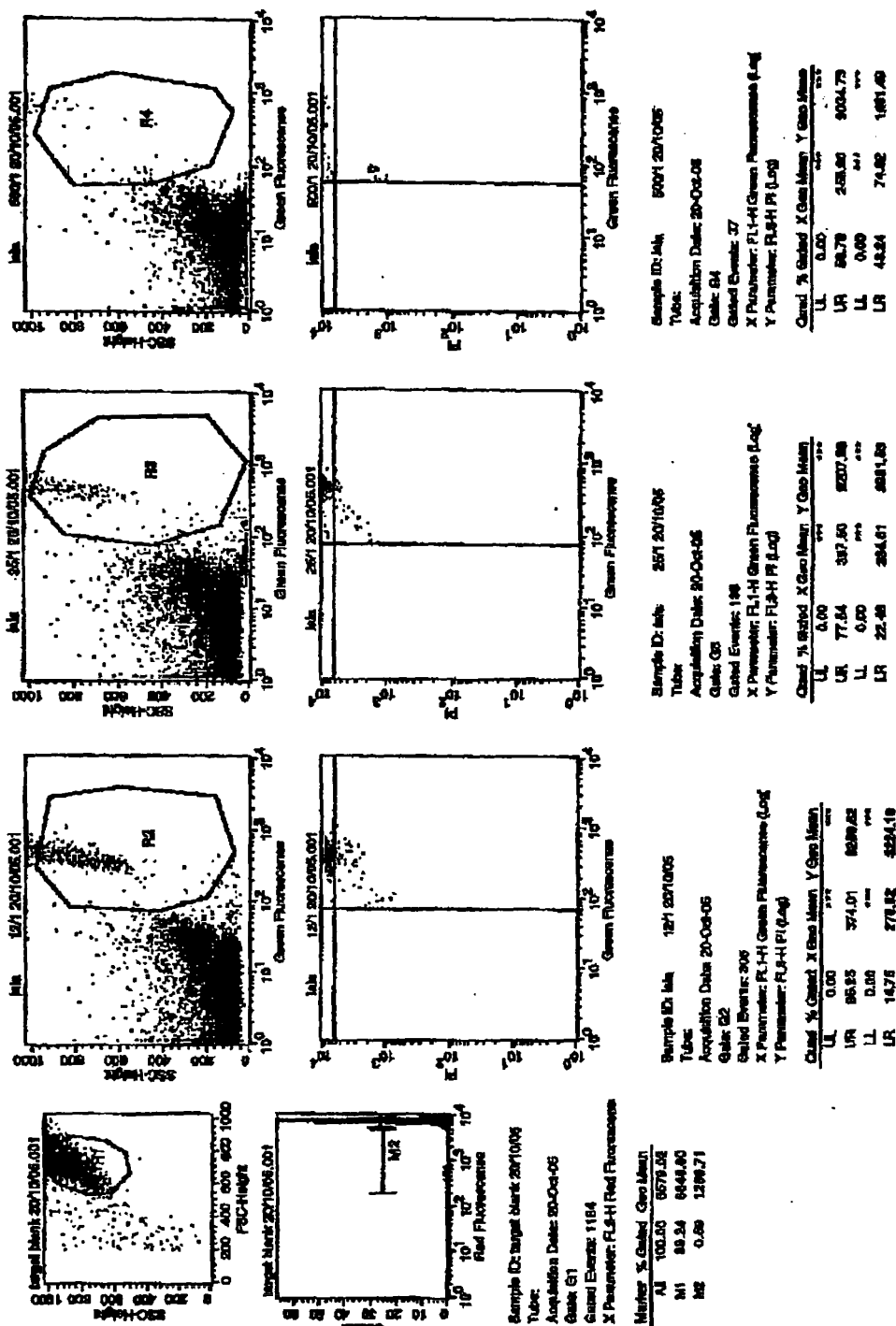




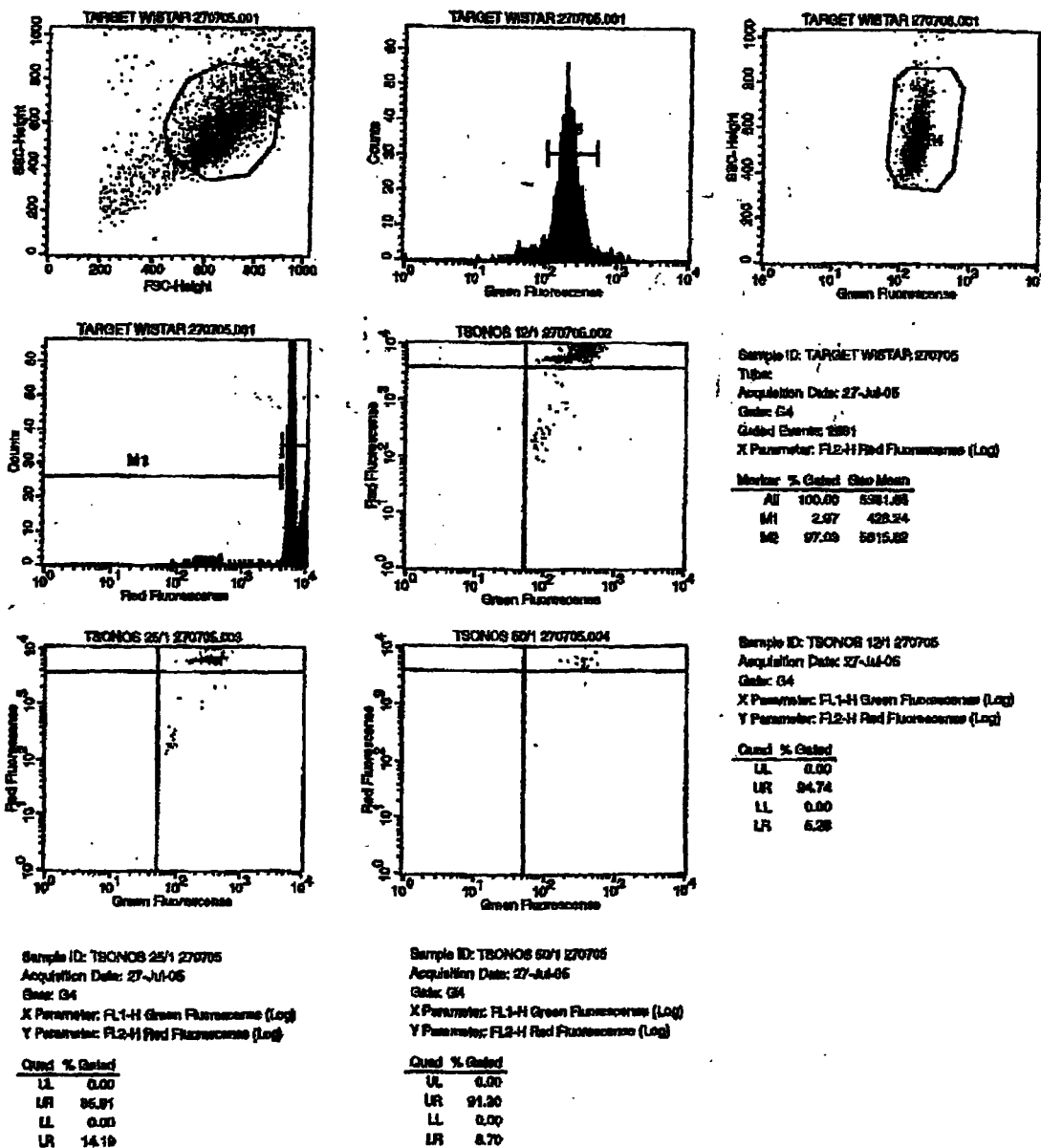
**Διάγραμμα 90:** Αλεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής της καρκινοπαθούς γυναίκας 73 με κωδικό K3 πριν τη θεραπεία.



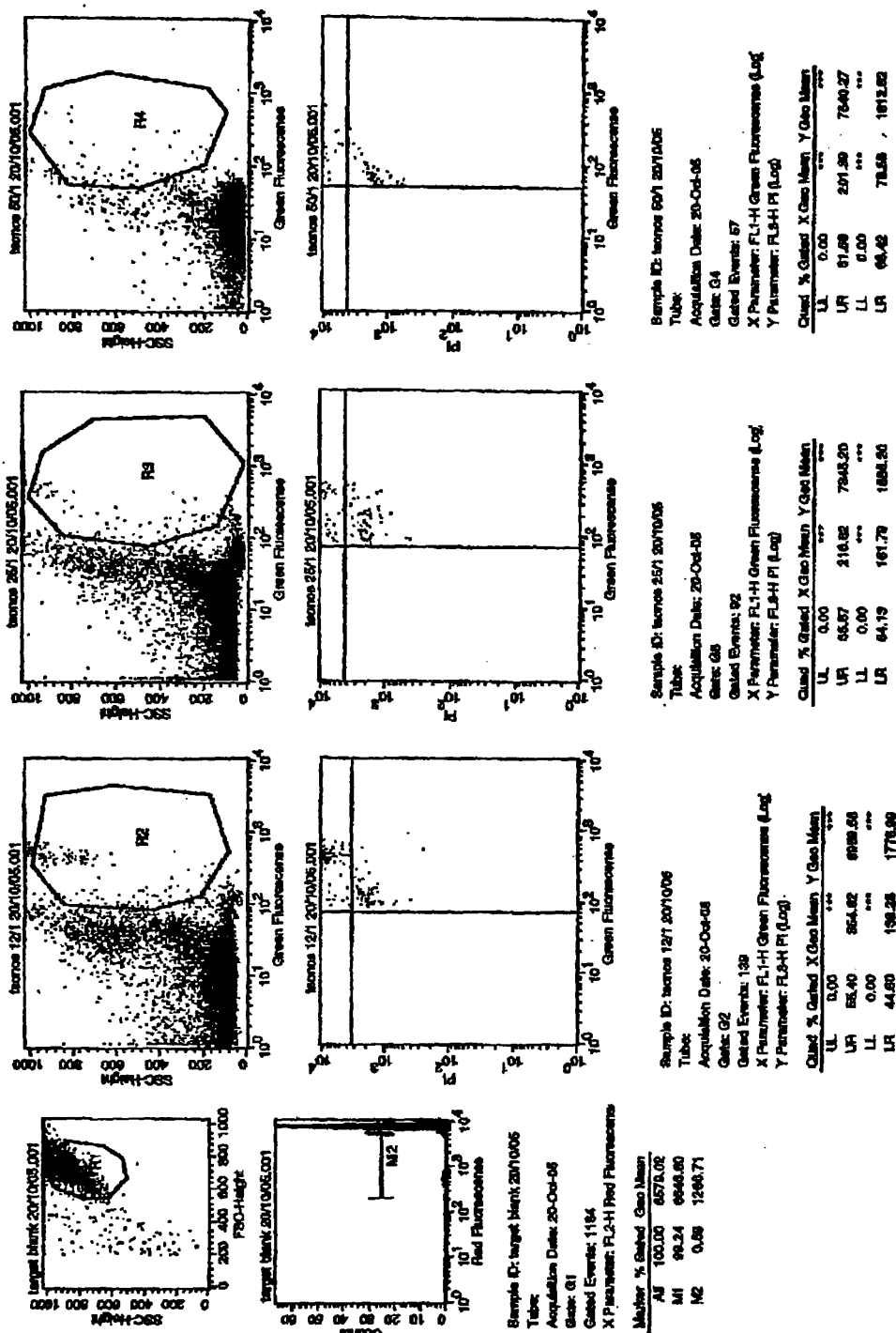
Διάγραμμα 91: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής της καρκινοπαθούς γυναίκας 73 με κωδικό K3 μετά τη θεραπεία.



**Διάγραμμα 92:** Αλεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής του καρκινοπαθούς άνδρα 60 με κωδικό Κ4 πριν τη θεραπεία.

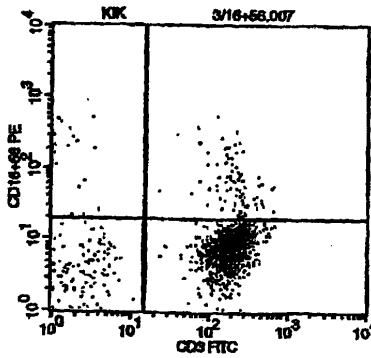
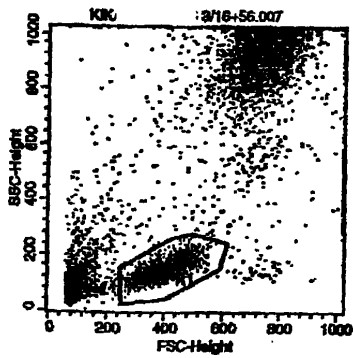


**Διάγραμμα 93:** Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής του καρκινοπαθούς άνδρα 60 με κωδικό K4 μετά τη θεραπεία.



**Διάγραμμα 94:** Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των πλυθυσμών των NK και NKΤ κυττάρων σε 3 καρκινοπαθείς με κωδικούς Κ6 (άνδρας ετών 58), Κ5 (γυναίκα ετών 42) και Κ1 (άνδρας ετών 70) πριν τη θεραπεία.

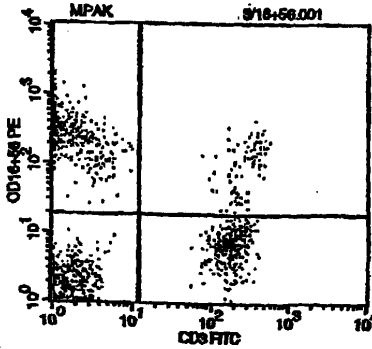
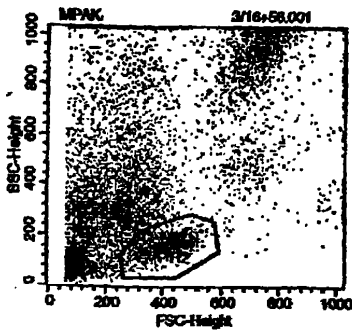
ΕΑ



Acquisition Date: 10-Feb-06  
X Parameter: FL1-H CD3 FITC (Log)  
Y Parameter: FL2-H CD16+88 PE (Log)

Quad	% Gated
UL	1.28
UR	8.89
LL	7.40
LR	84.89

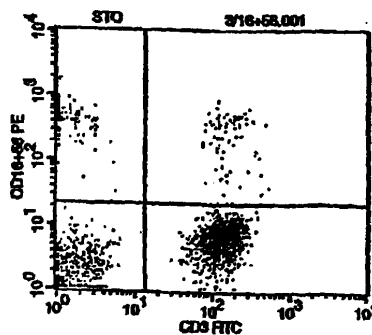
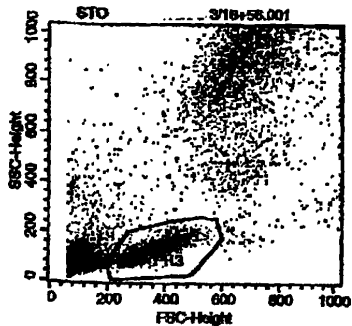
**KIK**  
**WBC: 3.590 cells/μl**  
**LY%: 17,8%**  
**LY#: 640 cells/μl**



Acquisition Date: 10-Feb-06  
X Parameter: FL1-H CD3 FITC (Log)  
Y Parameter: FL2-H CD16+88 PE (Log)

Quad	% Gated
UL	33.47
UR	7.82
LL	30.28
LR	28.49

**MPAK**  
**WBC: 2.370 cells/μl**  
**LY%: 21,9%**  
**LY#: 520 cells/μl**



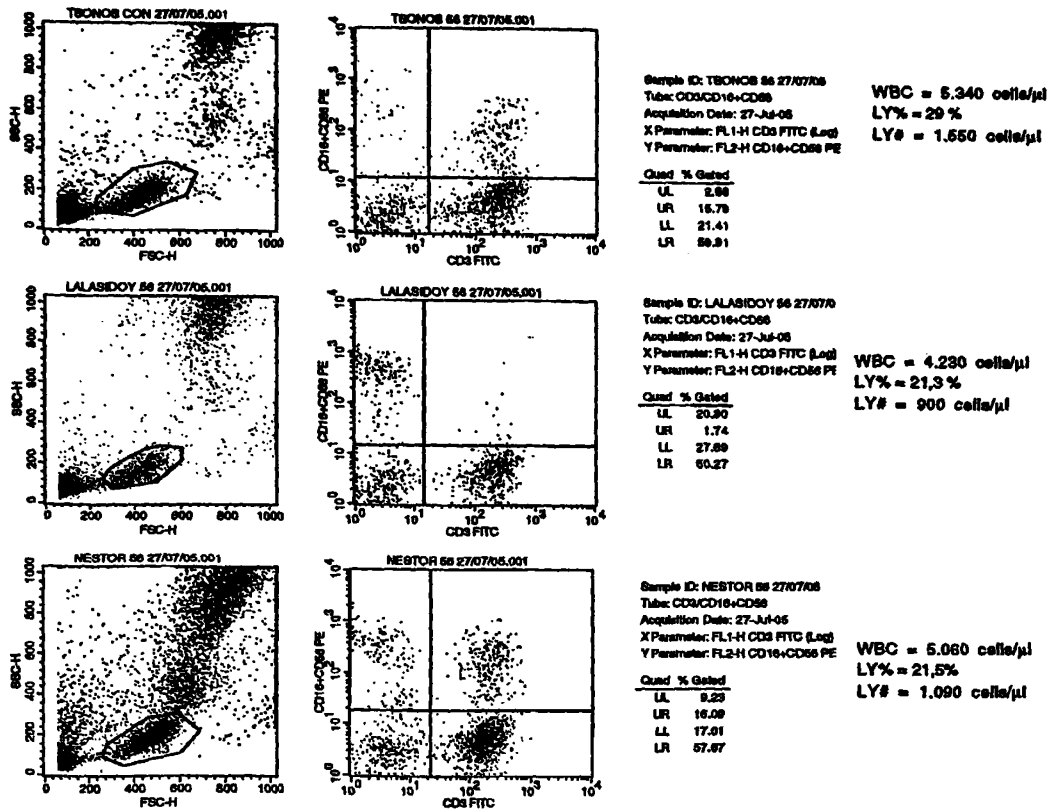
Acquisition Date: 10-Feb-06  
X Parameter: FL1-H CD3 FITC (Log)  
Y Parameter: FL2-H CD16+88 PE (Log)

Quad	% Gated
UL	6.48
UR	5.36
LL	22.46
LR	63.70

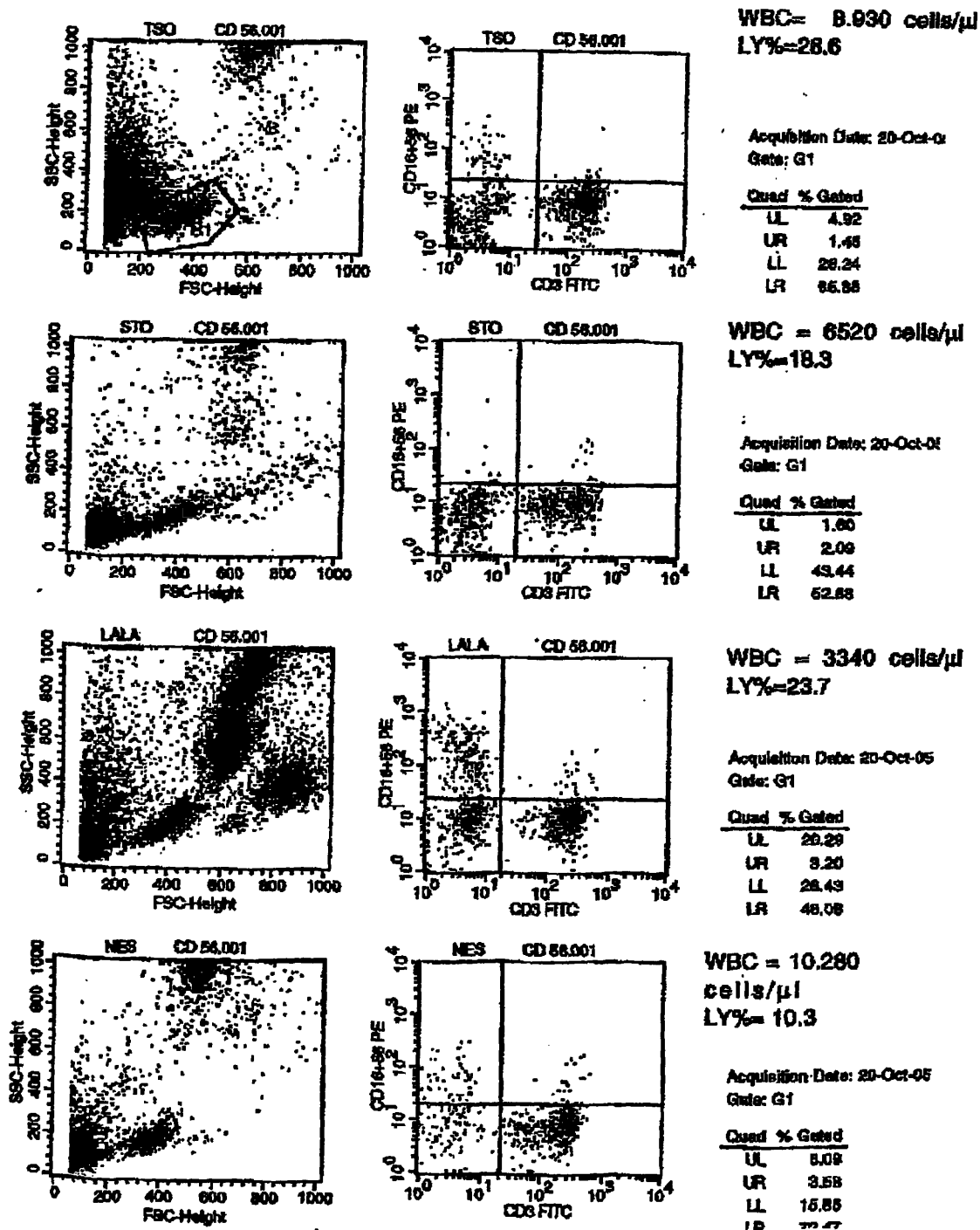
**STO**  
**WBC: 7.190 cells/μl**  
**LY%: 26,4%**  
**LY#: 1.900 cells/μl**



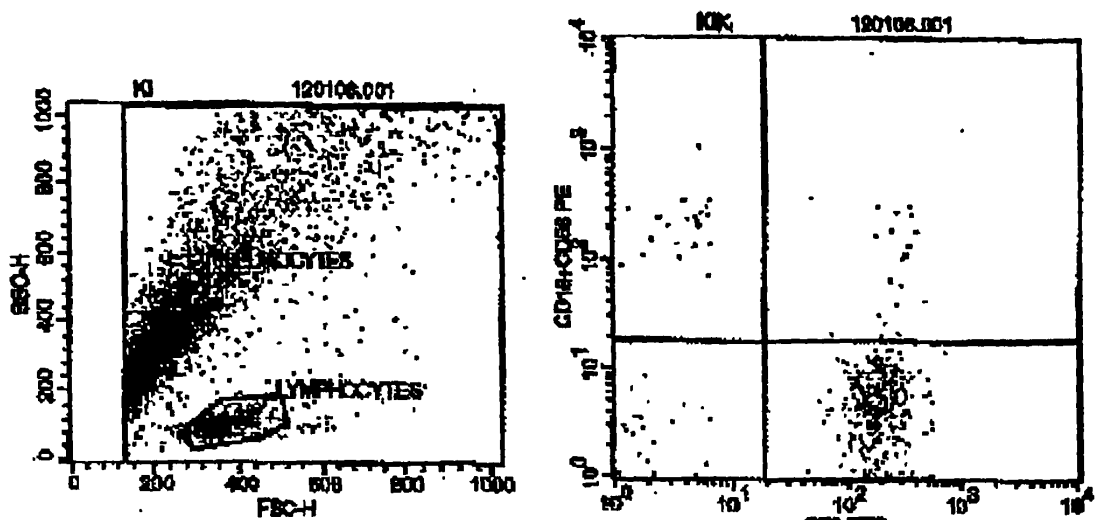
**Διάγραμμα 95:** Αλεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των πλυθυσμών των NK και NKT κυττάρων σε 3 καρκινοπαθείς με κωδικούς K4 (άνδρας ετών 60), K3 (γυναίκα ετών 73) και K2 (άνδρας ετών 73) πριν τη θεραπεία.



**Διάγραμμα 96:** Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των πλυθυσμών των NK και NKT κυττάρων σε 4 καρκινοπαθείς με κωδικούς K4 (άνδρας ετών 60), K1 (άνδρας ετών 70), K3 (γυναίκα ετών 73) και K2 (άνδρας ετών 73) μετά τη θεραπεία.

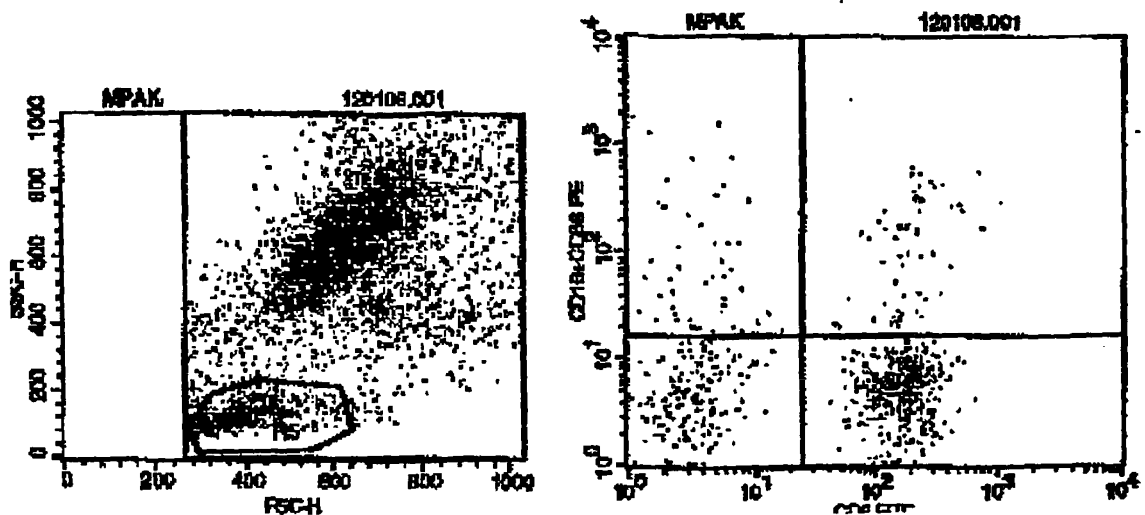


**Διάγραμμα 97:** Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των πληθυσμών των NK και NKT κυττάρων στους υπόλοιπους 2 καρκινοπαθείς (γυναίκα με κωδικό K5 και άνδρας με κωδικό K6) μετά τη θεραπεία.



**WBC: 5.850 cells/ $\mu$ l**  
**LYMPHS%: 46,1%**  
**LYMPHS#: 2.700 cells/ $\mu$ l**

Quad	% Gated	X Geo Mean	Y Geo Mean
UL	5.84	3.89	197.18
UR	5.94	254.48	78.05
LL	4.83	2.01	2.89
LR	84.48	189.85	4.52



**WBC: 1.500 cells/ $\mu$ l**  
**LYMPHS%: 13,8%**  
**LYMPHS#: 200 cells/ $\mu$ l**

Quad	% Gated	X Geo Mean	Y Geo Mean
UL	7.38	3.80	77.99
UR	8.77	190.27	108.85
LL	25.25	3.85	4.22
LR	88.62	180.79	4.78



Τέλος, η κλινική μελέτη πλαισιώνεται με τον πληθυσμό των καρκινοπαθών του Εργαστηρίου της Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής Ιωαννίνων, οι οποίοι εκτέθηκαν σε Ηλεκτρομαγνητικά πεδία ραδιοφωνικών συχνοτήτων συντονισμού επί 8 ώρες ημερησίως για 4 εβδομάδες με συσκευή που ελέγχθηκε από το ΕΚΕΦΕ «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ». Συνοπτικά τα αποτελέσματα της έκθεσης των ασθενών αυτών στα ΗΜΓΠ, όσον αφορά στον αριθμό των NK και NK T κυττάρων και την κυτταροτοξική τους δράση φαίνονται στον Πίνακα 26.

ΑΑ-Φ- Η	%NK, NKT πριν την αγωγή	%NK, NKT cells μετά την αγωγή	μεταβολή % των ολικών NKCs μετά την αγωγή	%κυτταροτοξι κότητα των NKCs 12:1,25:1,50:1 πριν την αγωγή	%κυτταροτοξι κότητα των NKCs 12:1,25:1,50:1 μετά την αγωγή	%μεταβολή σε κυτταροτοξικό τητα των NK 12:1,25:1,50:1 μετά την αγωγή
1. ♀ 38	10.57, 1.17	21.41, 6.12	+134	26, 48, 89	32, 28, 72	↑, ↓, ↓
2. ♀ 52	6.16, 5.54	10.16, 20.43	+161	3, 89, 84	43, 59, 72	↑, ↓, ↓
3. ♀ 66	20.14, 3.14	19.25, 4.15	+1.1	5, 15, 27	25, 38, 46	↑, ↑, ↑
4. ♀ 75	2.48, 3.45	5.45, 6.78	+97	15, 35, 45	18, 42, 48	↑, ↑, ↑
5. ♀ 79	3.55, 1.50	8.60, 3.50	+100	2, 15, 28	5, 25, 32	↑, ↑, ↑
6. ♀ 28	5.89, 1.70	17.69, 16.55	+351	16, 43, 38	32, 39, 79	↑, ↓, ↑
7. ♂ 36	6.27, 3.23	10.62, 15.46	+174.5	24, 49, 90	32, 39, 79	↑, ↓, ↓
8. ♂ 52	6.80, 5.40	10.20, 6.35	+36	25, 46, 68	35, 52, 72	↑, ↑, ↑

Πίνακας 26: Οι απόλυτοι αριθμοί των ασθενών των NK και NK T κυττάρων καθώς και η κυτταροτοξική τους δράση πριν και μετά την έκθεσή τους σε ΗΜΓΠ.

Όλοι οι ασθενείς παρουσίασαν άυξηση στον συνολικό αριθμό των NK κυττάρων κυμαίνοντας από 1,1 % έως 354% με κατά μέσο όρο άυξηση 131%. (Πίνακας 26). Επίσης η κυτταροτοξική δράση αυξήθηκε σημαντικά στην αναλογία 12:1 σε όλους τους ασθενείς, και 4 στου 8 ασθενείς (50%) στις αναλογίες 25:1 και 50:1(Πίνακας 26).

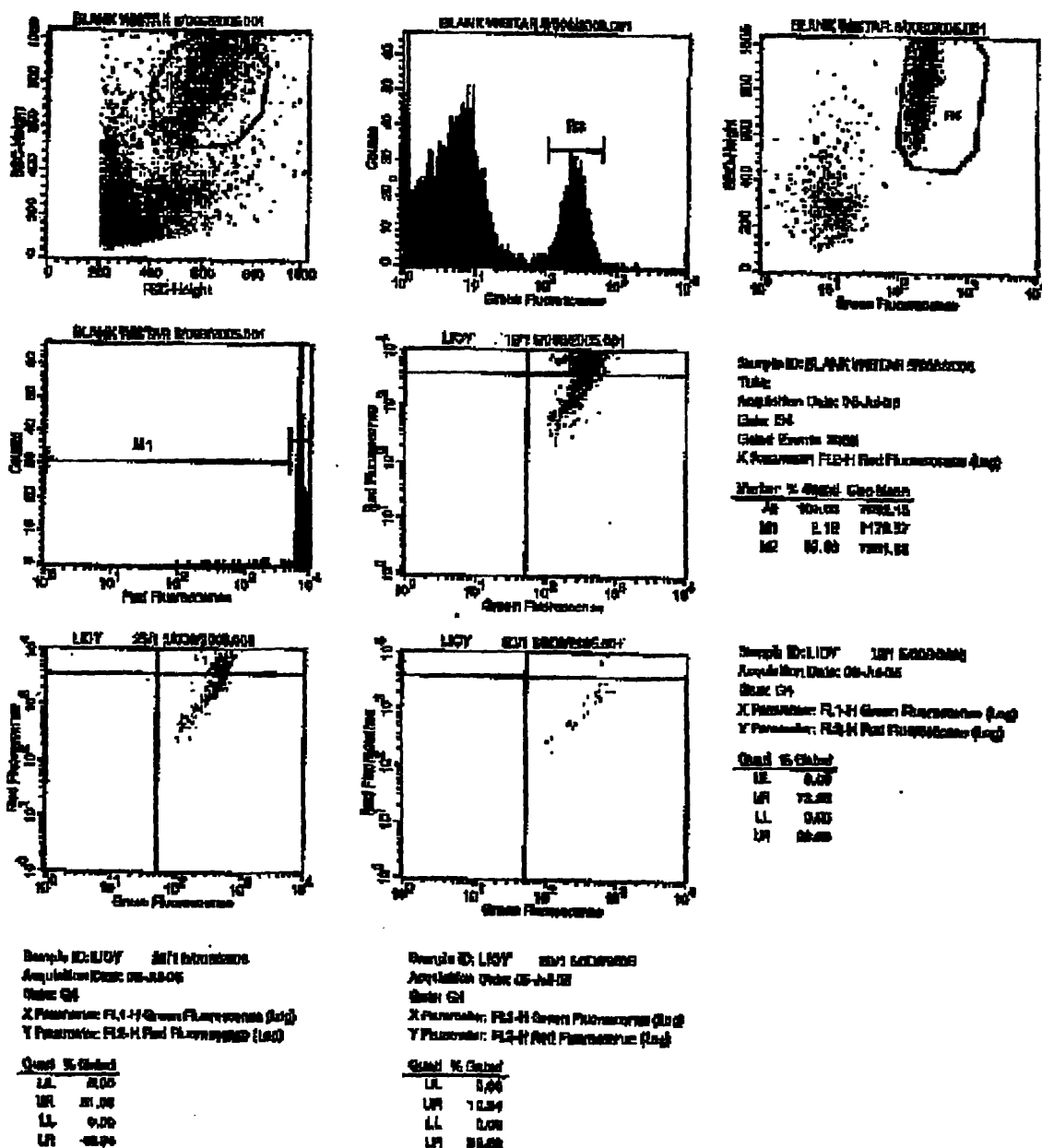
Ενδεικτικά σε γυναίκα 38 ετών ( AA1, Πίνακας I), η κυτταροτοξικότητα των NK κυττάρων ελέγχθηκε πριν, κατά και μετά την έκθεση σε ΗΜΓΠ, καθώς και ο απόλυτος αριθμός των NK και NKT κυττάρων. Η εν λόγω ασθενής πριν την έκθεση σε ΗΜΓΠ εμφάνισε στον ορό απόλυτο αριθμό των NK κυττάρων 14,57% και των NKT 1,18%. Επίσης, η λειτουργικότητα των NK κυττάρων ήταν 26, 48 και 89% στις αναλογίες 12,5:1, 25:1 και 50:1 αντίστοιχα (Διαγράμματα 98, 101). Κατά την διάρκεια της έκθεσης σε ΗΜΓΠ, ο αριθμός των NK κυττάρων μετρήθηκε σε 12% και

των ΝΚΤ 4,93% και η λειτουργικότητα των ΝΚ ήταν 17, 43 και 49% στις τρεις αναλογίες αντίστοιχα (Διαγράμματα 99, 111). Μετά την έκθεση σε ΗΜΓΠ, ο αριθμός των ΝΚ κυττάρων ήταν 21,41% και των ΝΚΤ 6,12% και η λειτουργικότητα των ΝΚ ήταν 32, 28 και 72% στις τρεις αναλογίες αντίστοιχα (Διαγράμματα 100, 112).

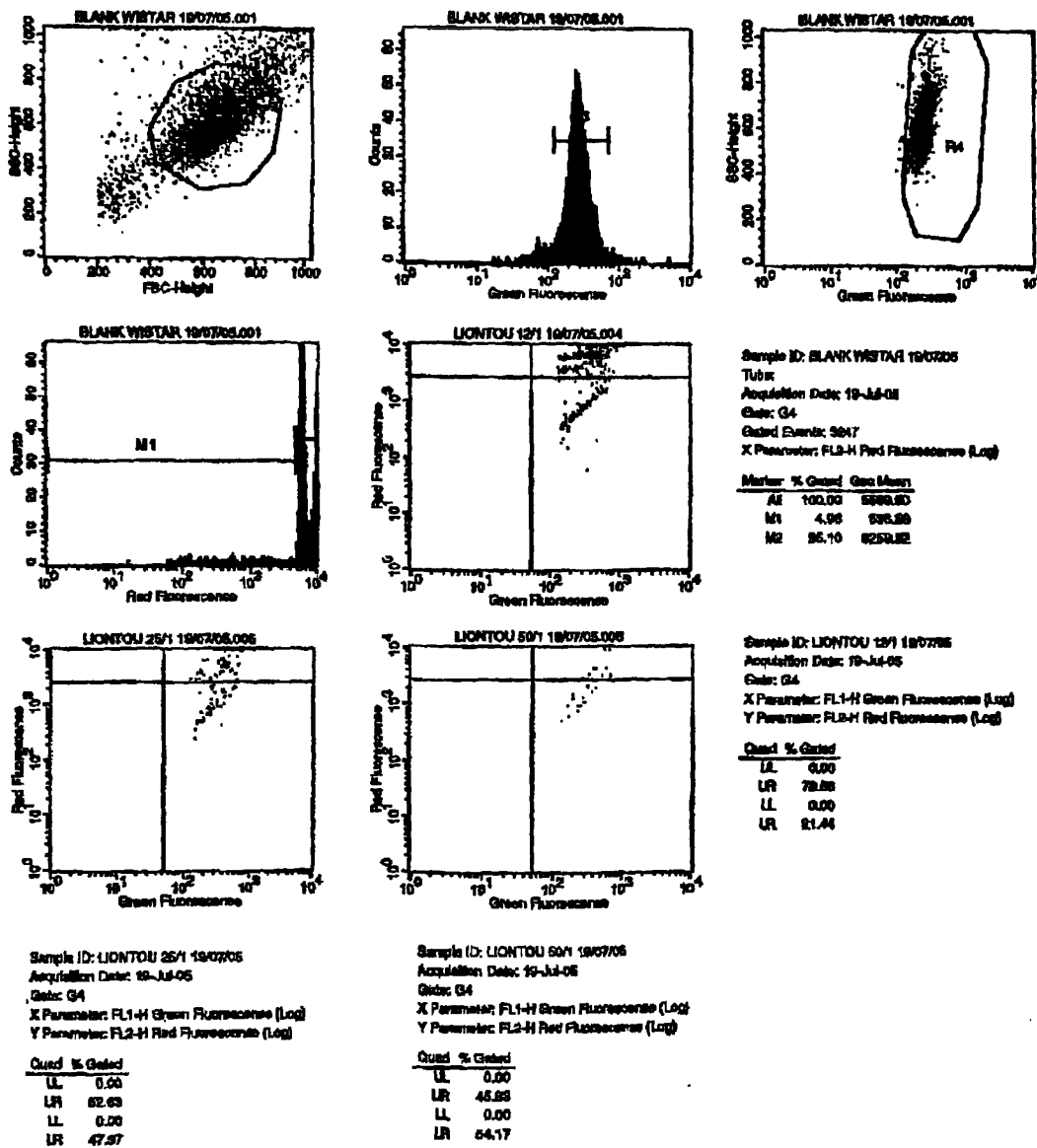
Στην γυναίκα 52 ετών (ΑΑ2, Πίνακας Ι), η κυτταροτοξικότητα των ΝΚ κυττάρων ελέγχθηκε πριν, κατά και μετά την έκθεση σε ΗΜΓΠ, καθώς και ο απόλυτος αριθμός των ΝΚ και ΝΚΤ κυττάρων. Η ασθενής πριν την έκθεση σε ΗΜΓΠ εμφάνισε στον ορό απόλυτο αριθμό των ΝΚ κυττάρων 6,16% και των ΝΚΤ 5,54%. Επίσης, η λειτουργικότητα των ΝΚ κυττάρων ήταν 3, 89 και 84% στις αναλογίες 12,5:1, 25:1 και 50:1 αντίστοιχα (Διαγράμματα 101, 102). Κατά την διάρκεια της έκθεσης σε ΗΜΓΠ ο αριθμός των ΝΚ κυττάρων ήταν 10,16% και των ΝΚΤ 20,43% και η λειτουργικότητα των ΝΚ 38, 55 και 72% στις τρεις αναλογίες αντίστοιχα (Διαγράμματα 103, 111). Μετά την έκθεση σε ΗΜΓΠ ο αριθμός των ΝΚ κυττάρων ήταν 7,77% και των ΝΚΤ 19,35% και η λειτουργικότητα των ΝΚ ήταν 43, 59 και 72% στις τρεις αναλογίες αντίστοιχα (Διαγράμματα 104, 112).



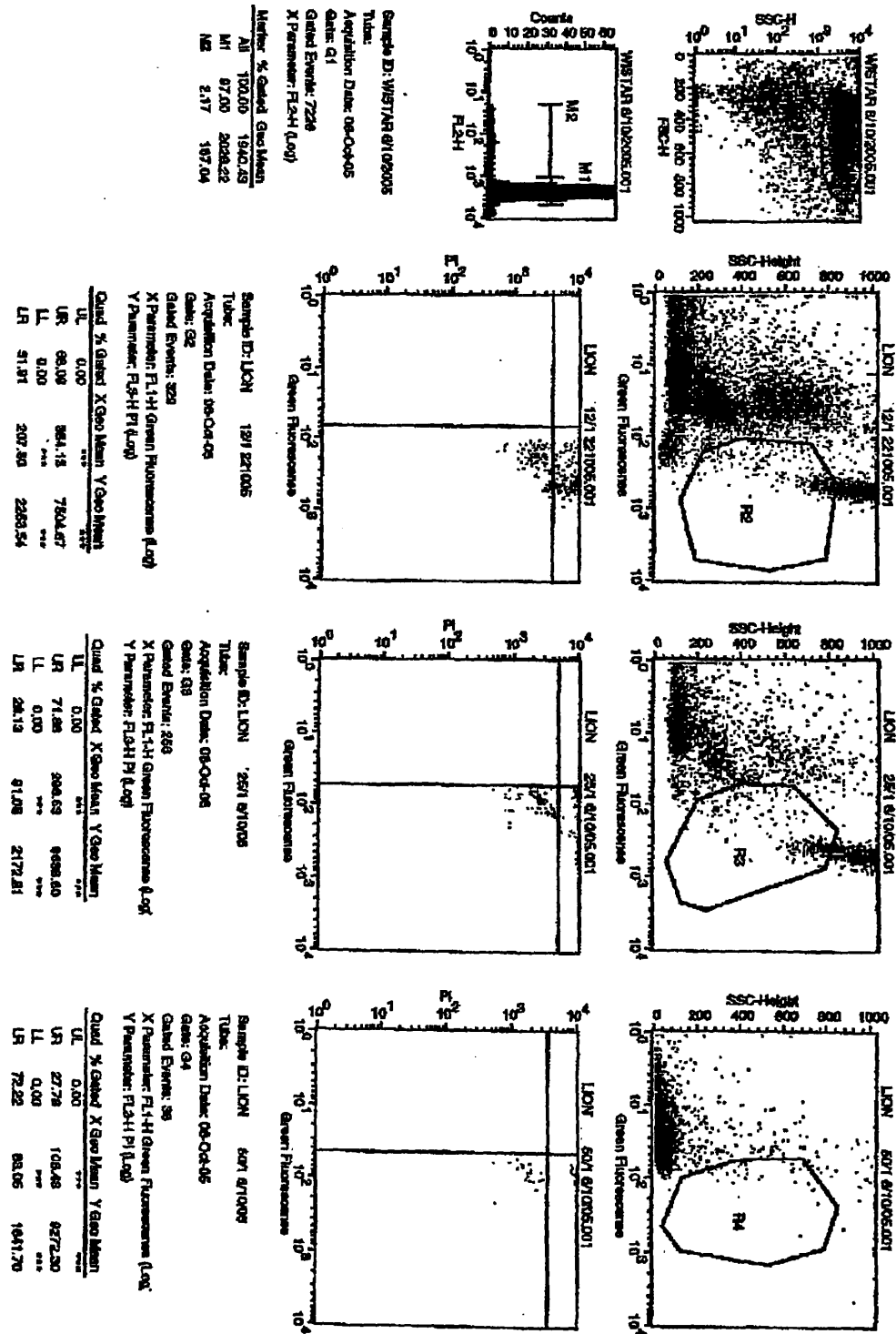
**Διάγραμμα 98:** Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρικό ροή της καρκινοπαθούς γυναίκας AA1 38 με πριν την έκθεση σε ΗΜΓΠ.



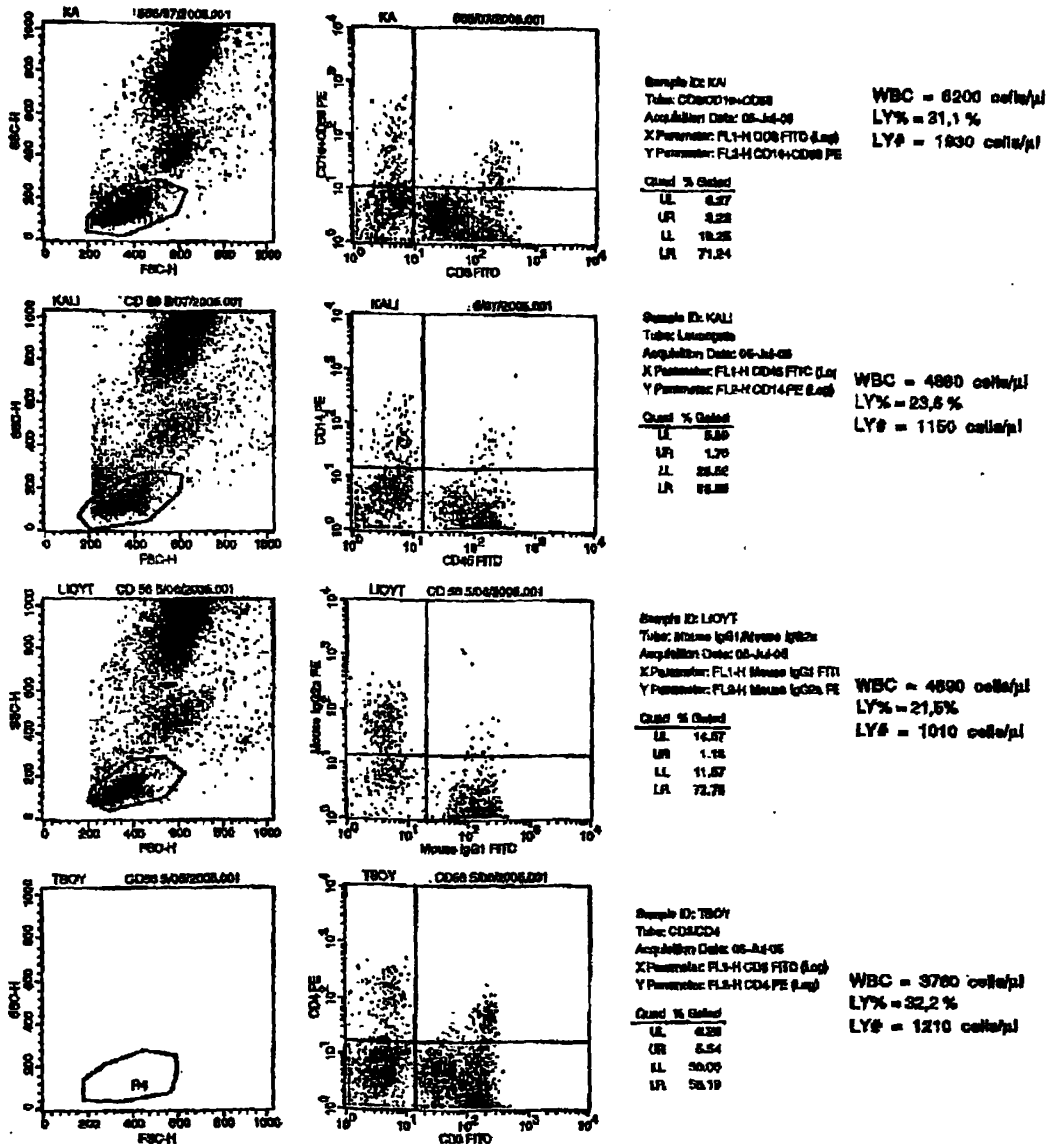
Διάγραμμα 99: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής της καρκινοπαθούς γυναίκας ΑΑ1 38 κατά τη διάρκεια της έκθεσης σε ΗΜΓΠ.



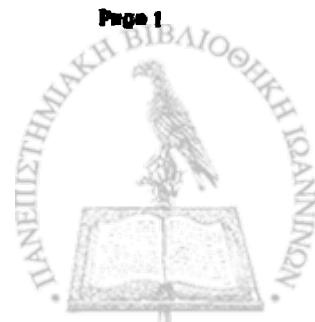
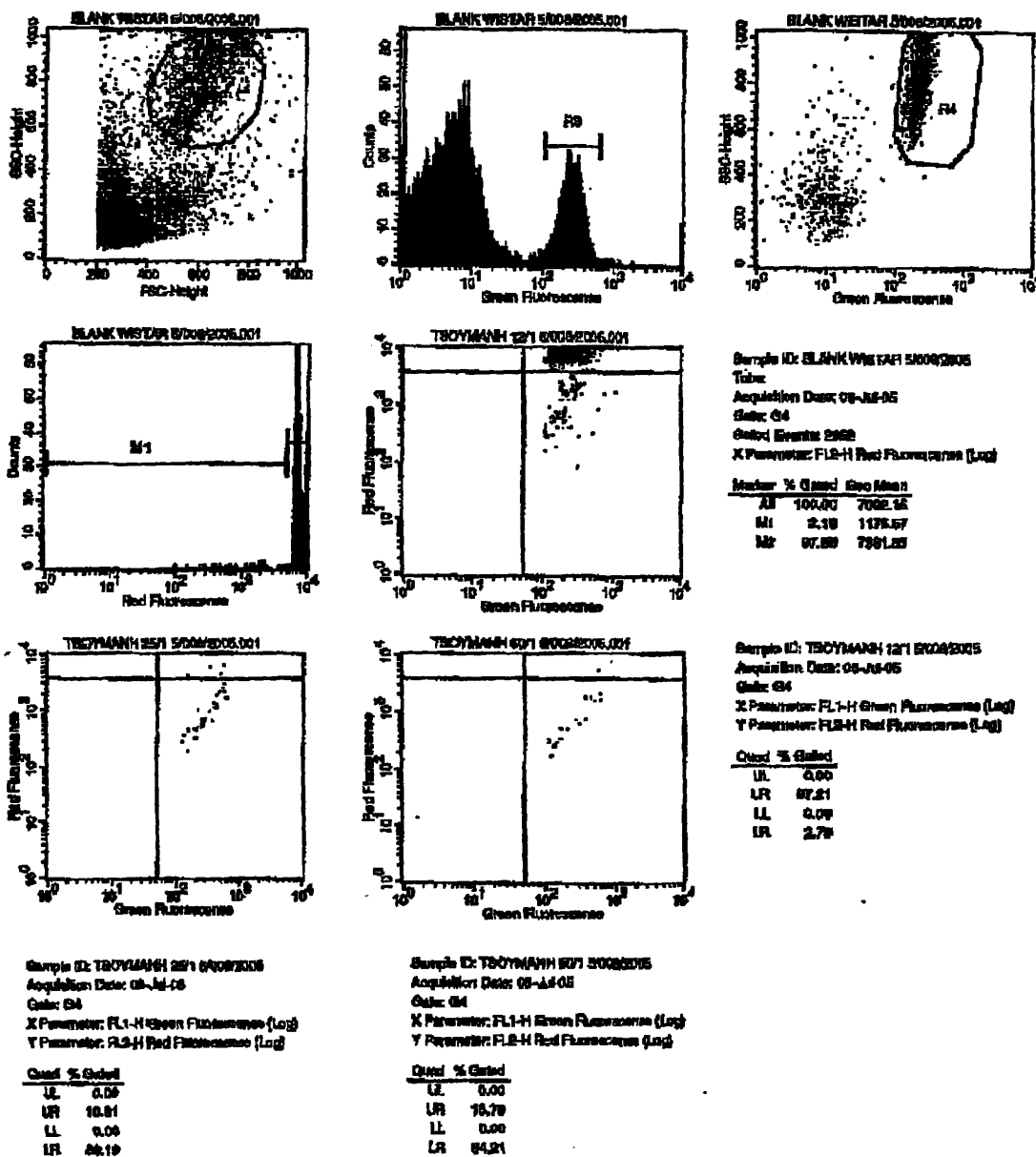
**Διάγραμμα 100:** Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρική ροής της καρκινοπαθούς γυναίκας AA1 38 με κωδικό K7 μετά τη έκθεση σε ΗΜΓΠ.



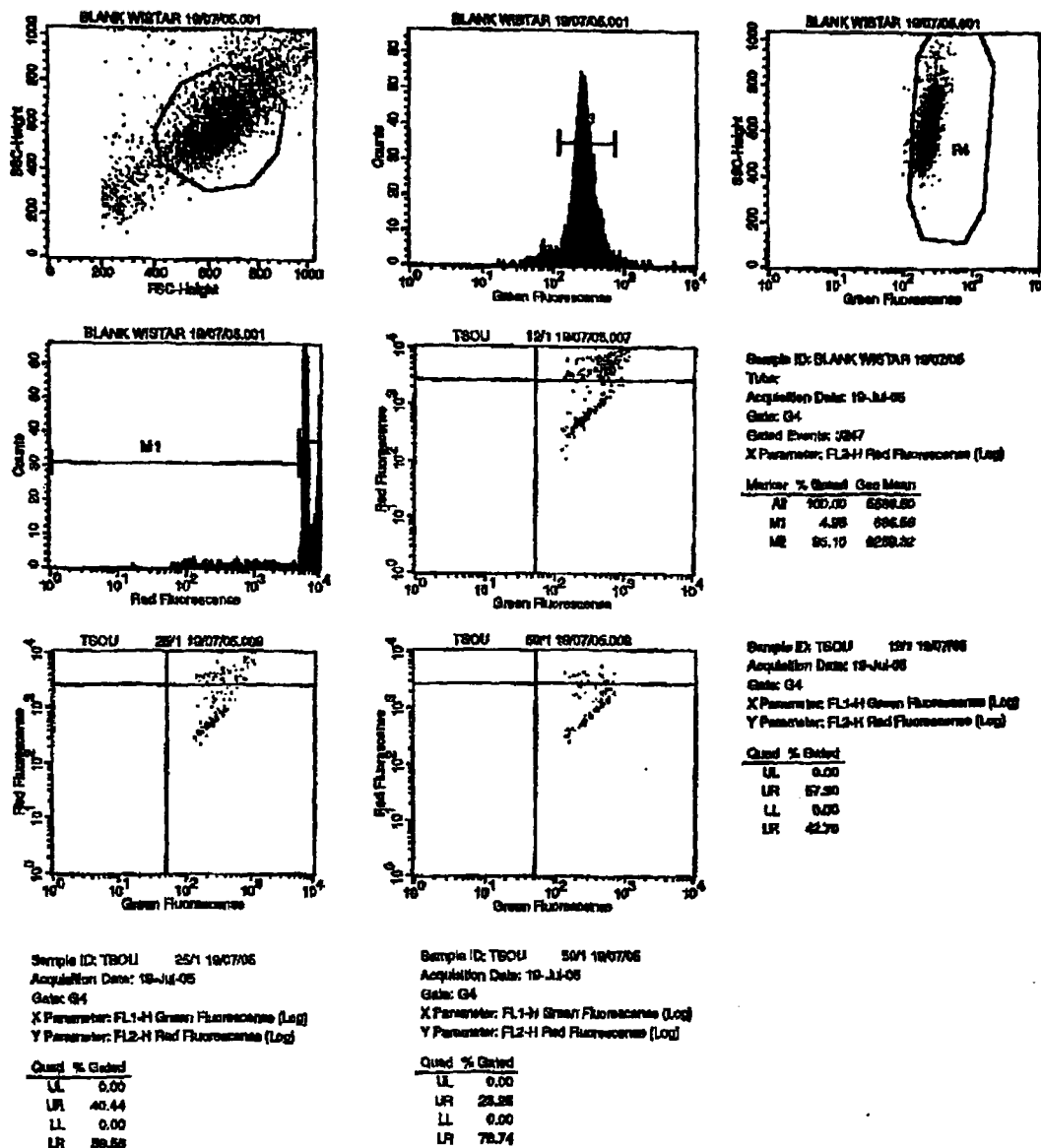
**Διάγραμμα 101:** Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των πληθυσμών των NK και NKT κυττάρων των καρκινοπαθών του τμήματος της Φυσιολογίας (άνδρας AA7 36 ετών, γυναίκα AA6 28 ετών, γυναίκα AA1 38 ετών και γυναίκα AA2 52 ετών) πριν τη έκθεση σε ΗΜΓΠ.



Διάγραμμα 102: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής της καρκινοπαθούς γυναίκας ΑΑ2 52 πριν την έκθεση σε ΗΜΠΠ..

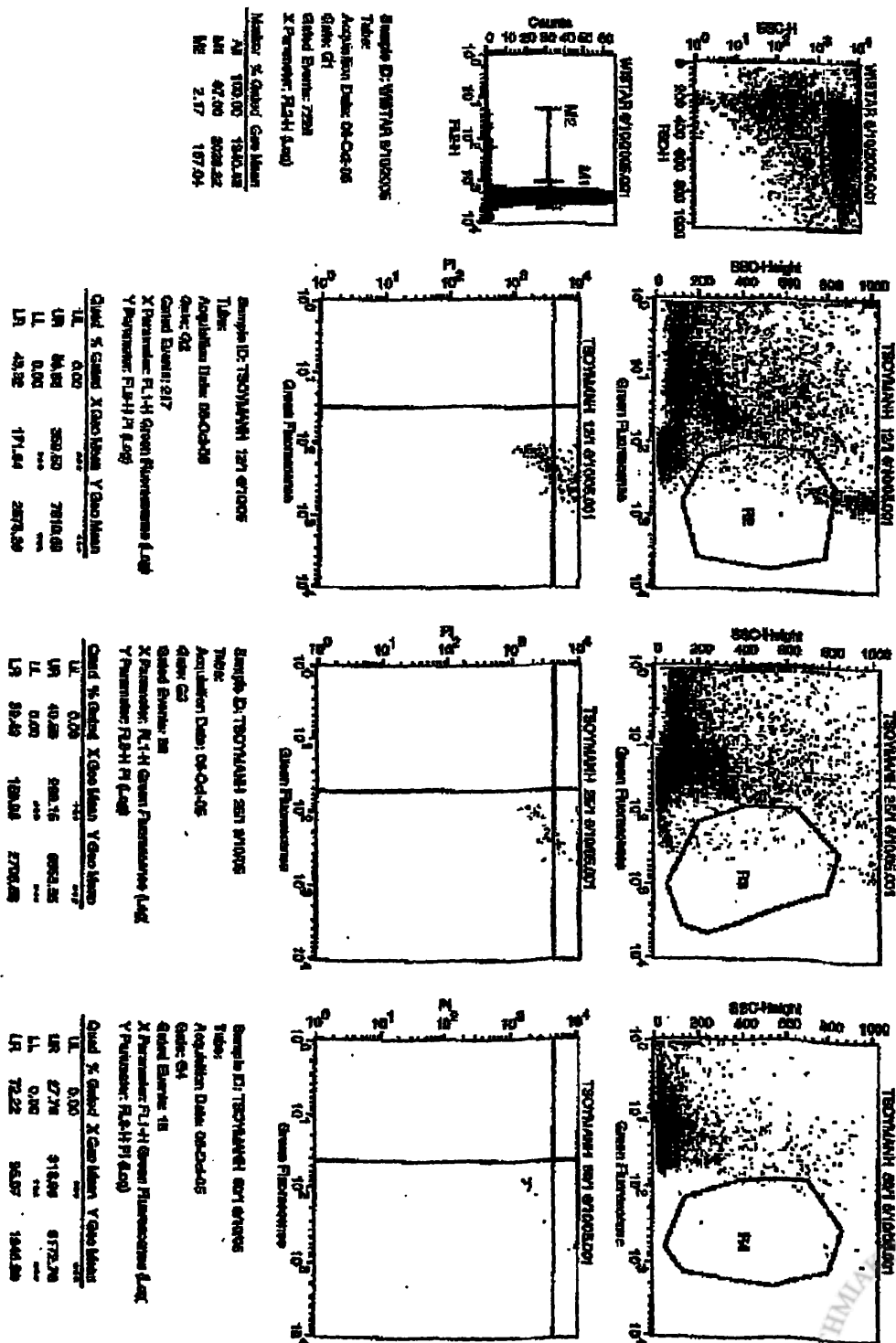


Διάγραμμα 103: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρική ροή της καρκινοπαθούς γυναίκας ΑΑ2 52 κατά τη έκθεση σε ΗΜΓΠ.





Διάγραμμα 104: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής της καρκινοπαθούς γυναίκας ΑΑ2 52 μετά την έκθεση σε ΗΜΓΠ.

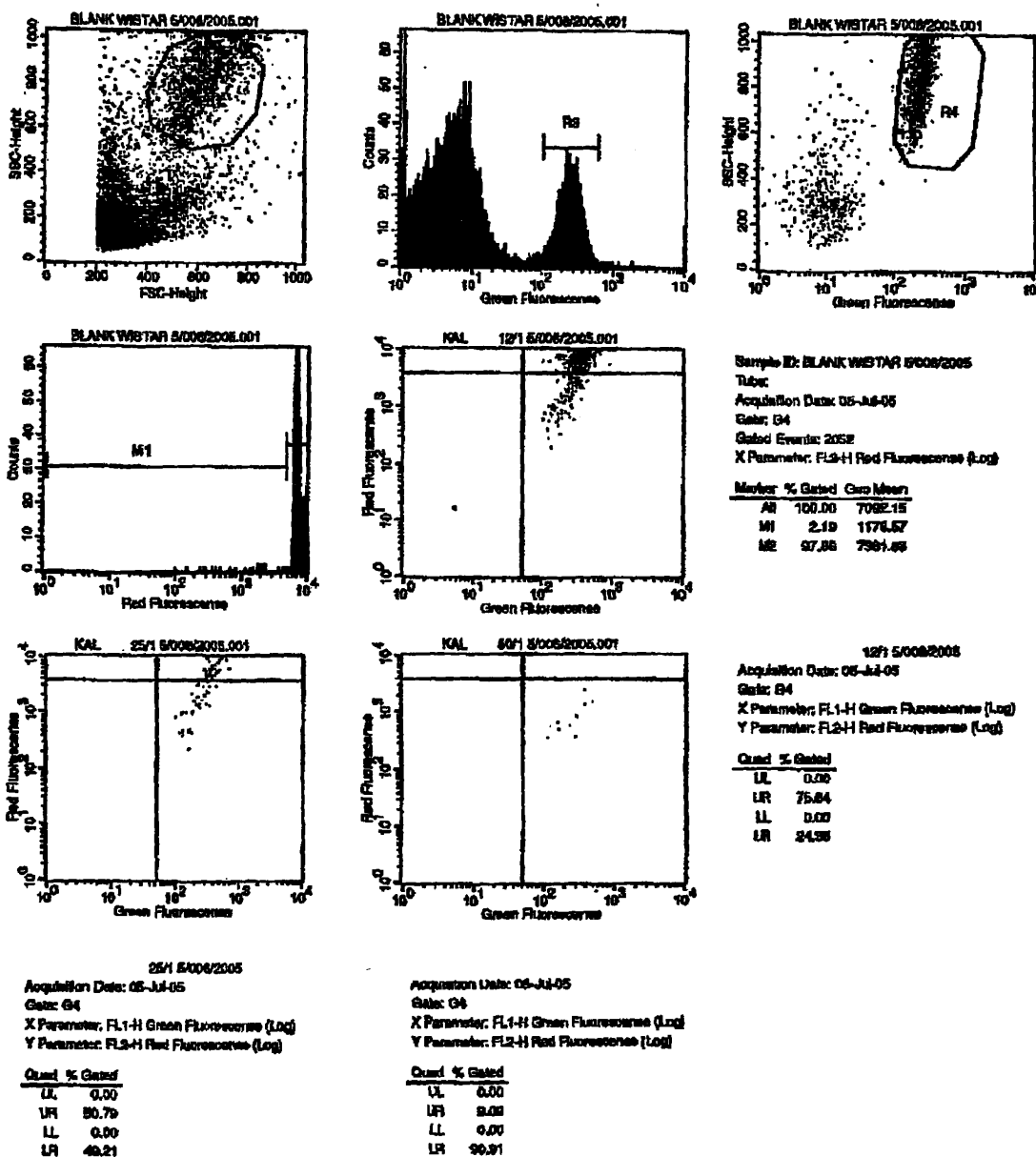


Σε άνδρα 36 ετών (ΑΑ7, Πίνακας Ι) ελέγχθηκε η κυτταροτοξικότητα των ΝΚ κυττάρων πριν, κατά και μετά την εκθεση σε ΗΜΓΠ, καθώς και ο απόλυτος αριθμός των ΝΚ και ΝΚΤ κυττάρων. Ο ασθενής πριν την εκθεση σε ΗΜΓΠ εμφάνισε απόλυτο αριθμό των ΝΚ κυττάρων 6,27% και των ΝΚΤ 3,23%. Επίσης, η λειτουργικότητα των ΝΚ κυττάρων ήταν 24, 49 και 90% στις αναλογίες 12,5:1, 25:1, και 50:1 αντίστοιχα (Διαγράμματα 101, 105). Κατά την διάρκεια της εκθεσης σε ΗΜΓΠ, ο αριθμός των ΝΚ κυττάρων ήταν 10,62% και των ΝΚΤ 15,46% και η λειτουργικότητα των ΝΚ ήταν 22, 41 και 81% στις τρεις αναλογίες αντίστοιχα (Διαγράμματα 106, 111). Μετά την εκθεση σε ΗΜΓΠ, ο αριθμός των ΝΚ κυττάρων ήταν 7,21% και των ΝΚΤ 14,42% και η λειτουργικότητα των ΝΚ 32, 39 και 79% στις τρεις αναλογίες αντίστοιχα (Διαγράμματα 107, 112).

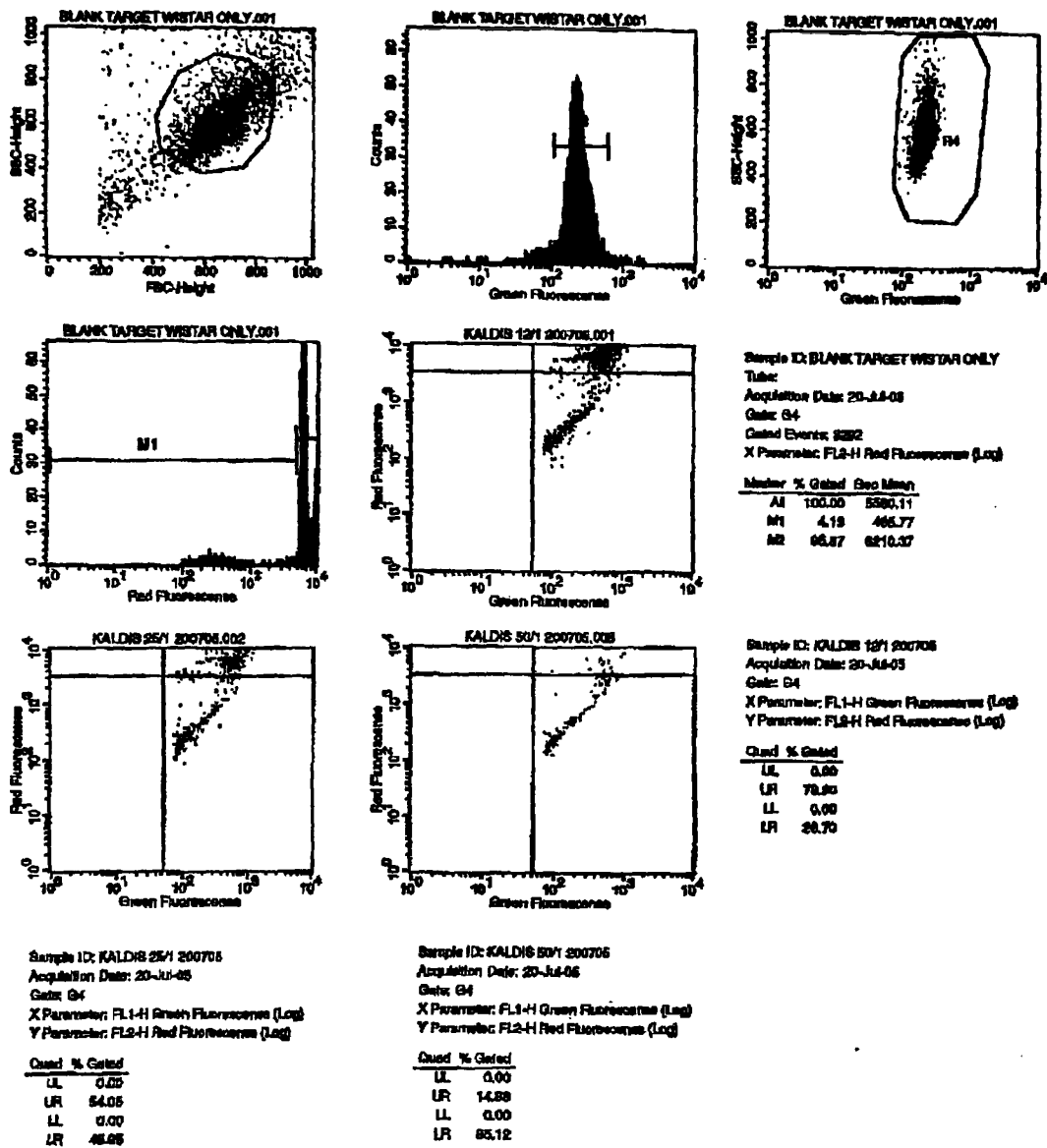
Σε γυναίκα 28 ετών (ΑΑ6, Πίνακας Ι), η κυτταροτοξικότητα των ΝΚ κυττάρων ελέγχθηκε πριν, κατά και μετά εκθεση σε ΗΜΓΠ, καθώς και ο απόλυτος αριθμός των ΝΚ και ΝΚΤ κυττάρων. Η ασθενής πριν τη εκθεση σε ΗΜΓΠ εμφάνισε στον ορό απόλυτο αριθμό των ΝΚ κυττάρων 5,89% και των ΝΚΤ 1,70%. Επίσης, η λειτουργικότητα των ΝΚ κυττάρων ήταν 16, 43 και 38% στις αναλογίες 12,5:1, 25:1, και 50:1 αντίστοιχα (Διαγράμματα 101, 108). Κατά την διάρκεια της εκθεσης σε ΗΜΓΠ, ο αριθμός των ΝΚ κυττάρων ήταν 9,23% και των ΝΚΤ 6,38% και η λειτουργικότητα των ΝΚ κυττάρων ήταν 32, 38 και 52% στις τρεις αναλογίες αντίστοιχα (Διαγράμματα 109, 111). Μετά την εκθεση σε ΗΜΓΠ, ο αριθμός των ΝΚ κυττάρων ήταν 17,68% και των ΝΚΤ 16% και η λειτουργικότητα των ΝΚ κυττάρων ήταν 41, 46 και 71% στις τρεις αναλογίες αντίστοιχα (Διαγράμματα 110, 112).



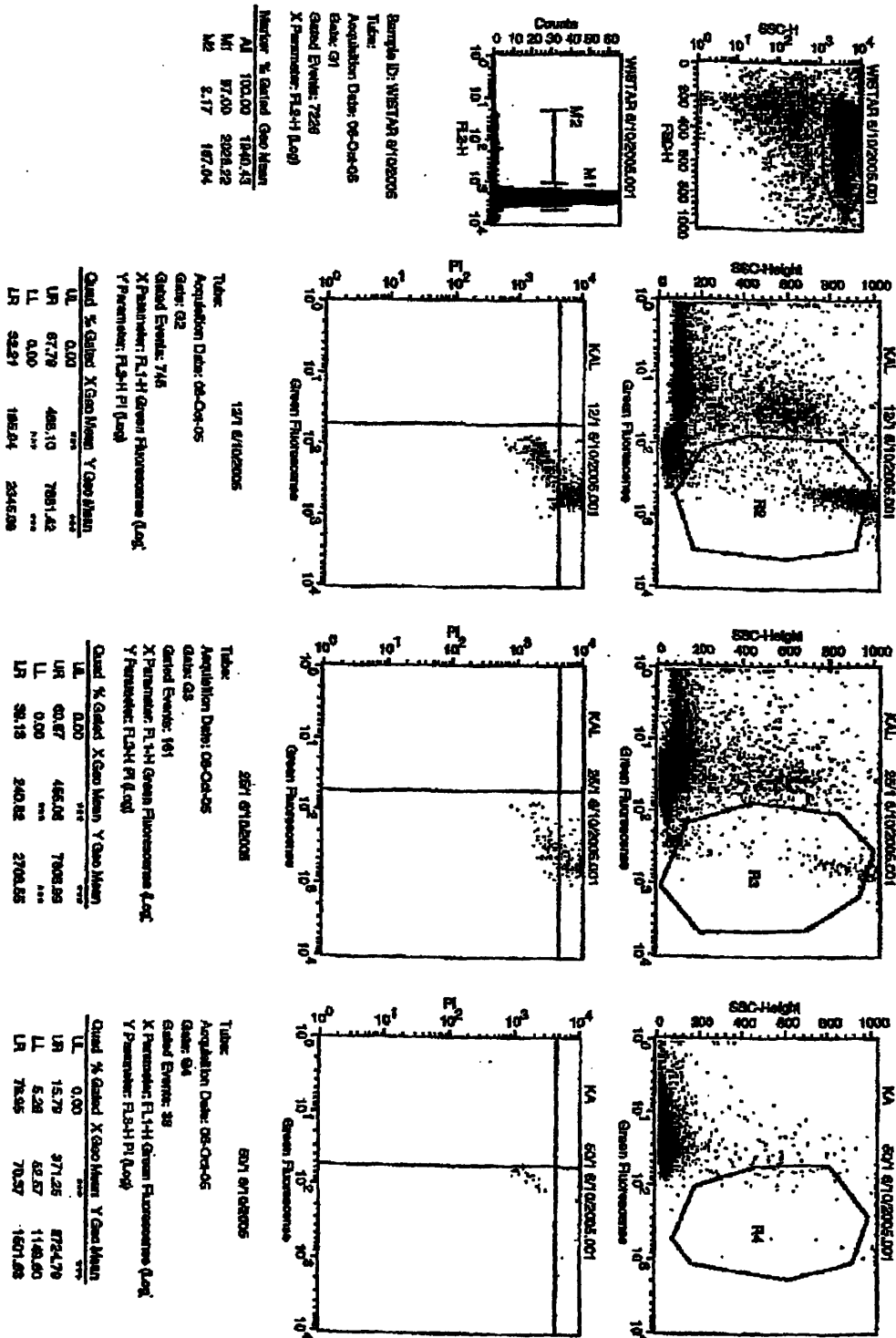
Διάγραμμα 105: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής του καρκινοπαθούς άνδρα AA7 36 πριν την έκθεση της ΗΜΓΠ.



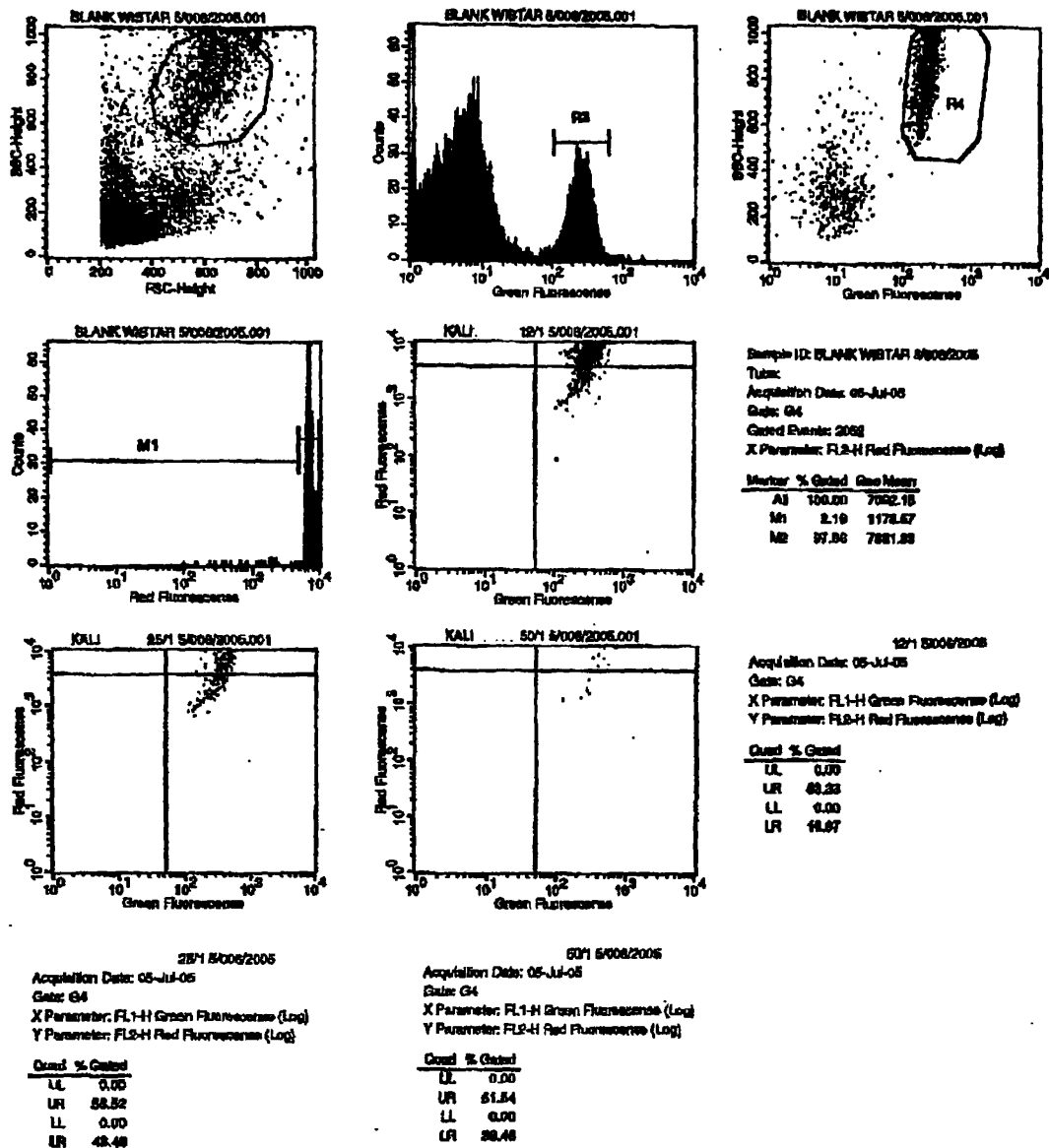
**Διάγραμμα 106:** Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής του καρκινοπαθούς άνδρα AA7 36 κατά την διάρκεια της έκθεσης σε ΗΜΠΠ



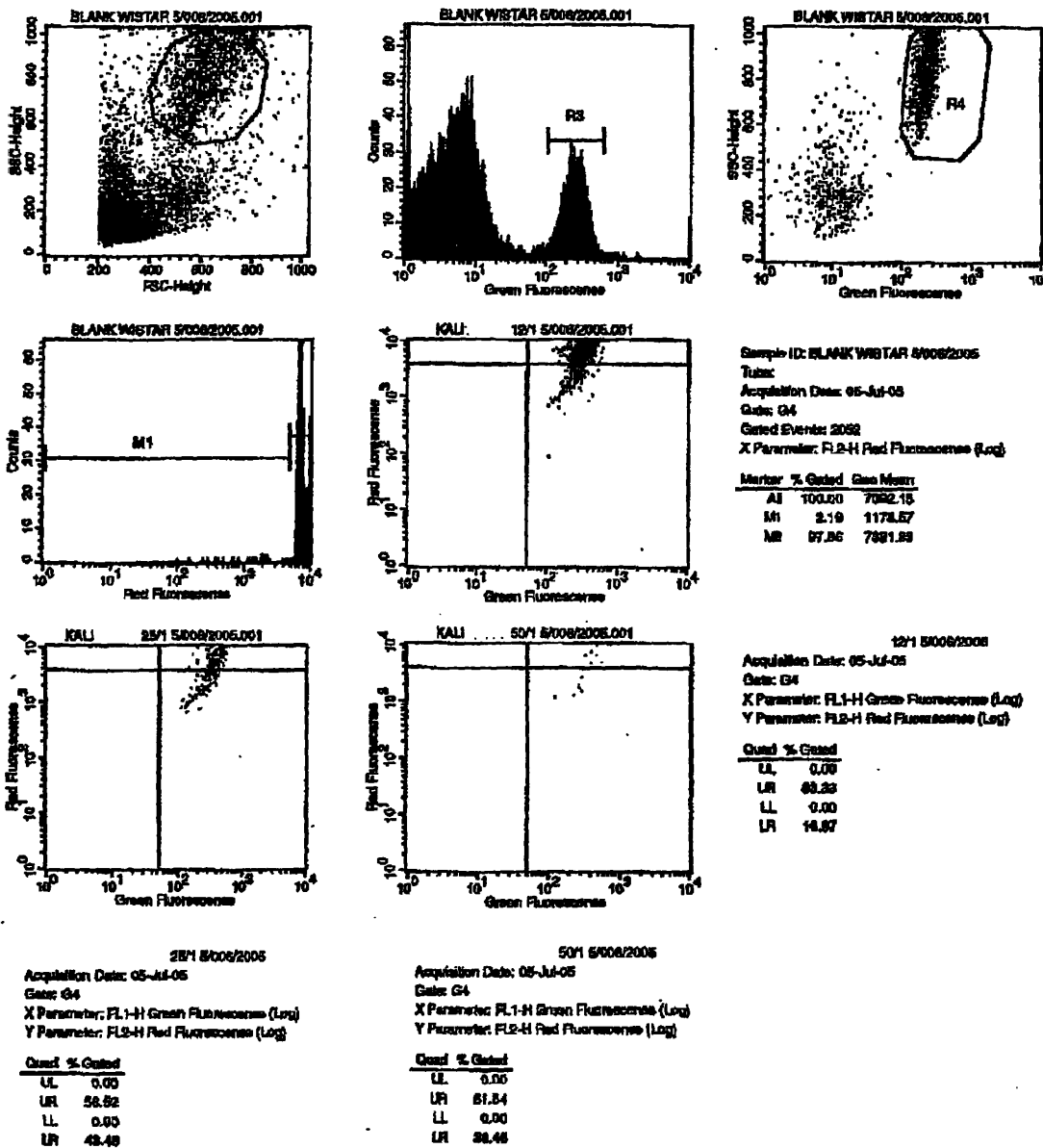
Διάγραμμα 107: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρικό ροή του καρκινοπαθούς άνδρα ΑΑ7 36 μετά την έκθεση σε ΗΜΠΠ.



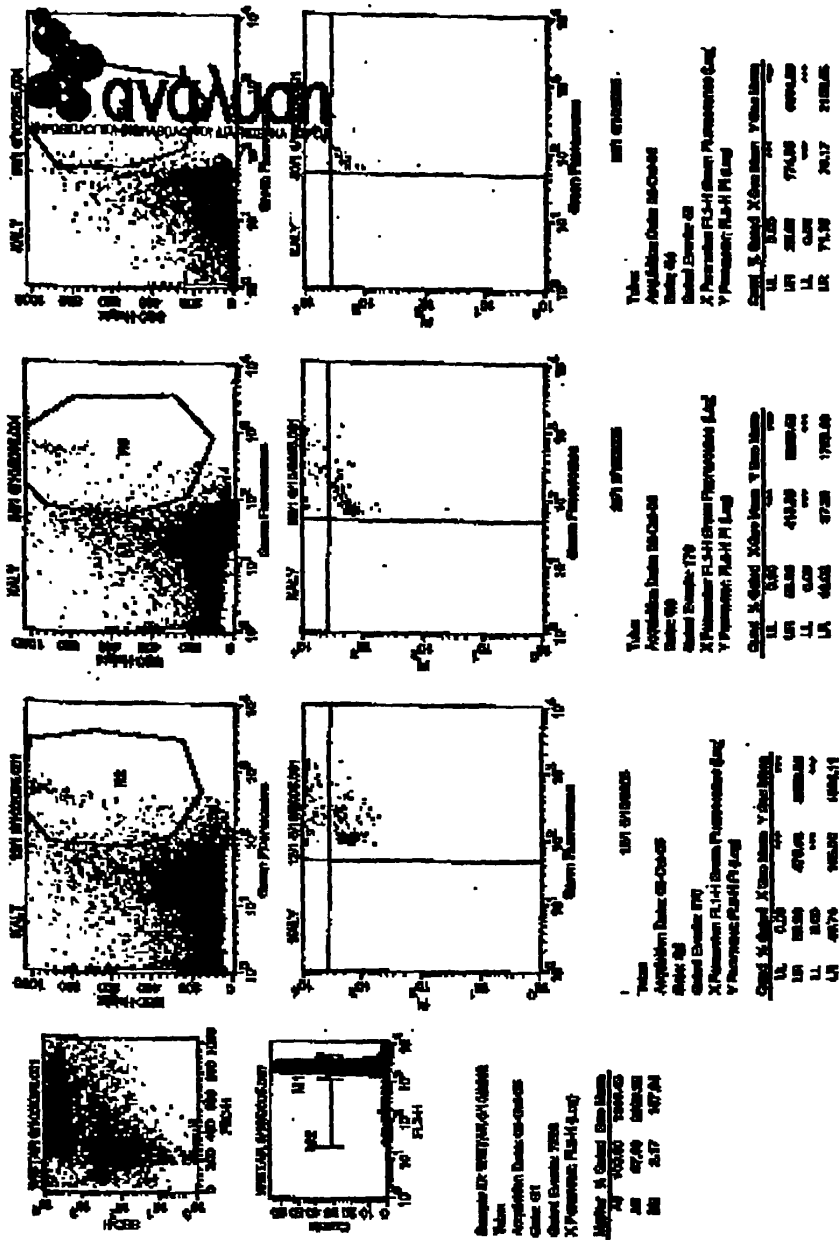
**Διάγραμμα 108:** Αλεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής της καρκινοπαθούς γυναίκας 28 ετών ΑΑ6 πριν την έκθεση σε ΗΜΓΠ.



**Διάγραμμα 109:** Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής της καρκινοπαθούς γυναίκας 28 ετών ΛΑ6 πριν την έκθεση σε ΗΜΓΠ.

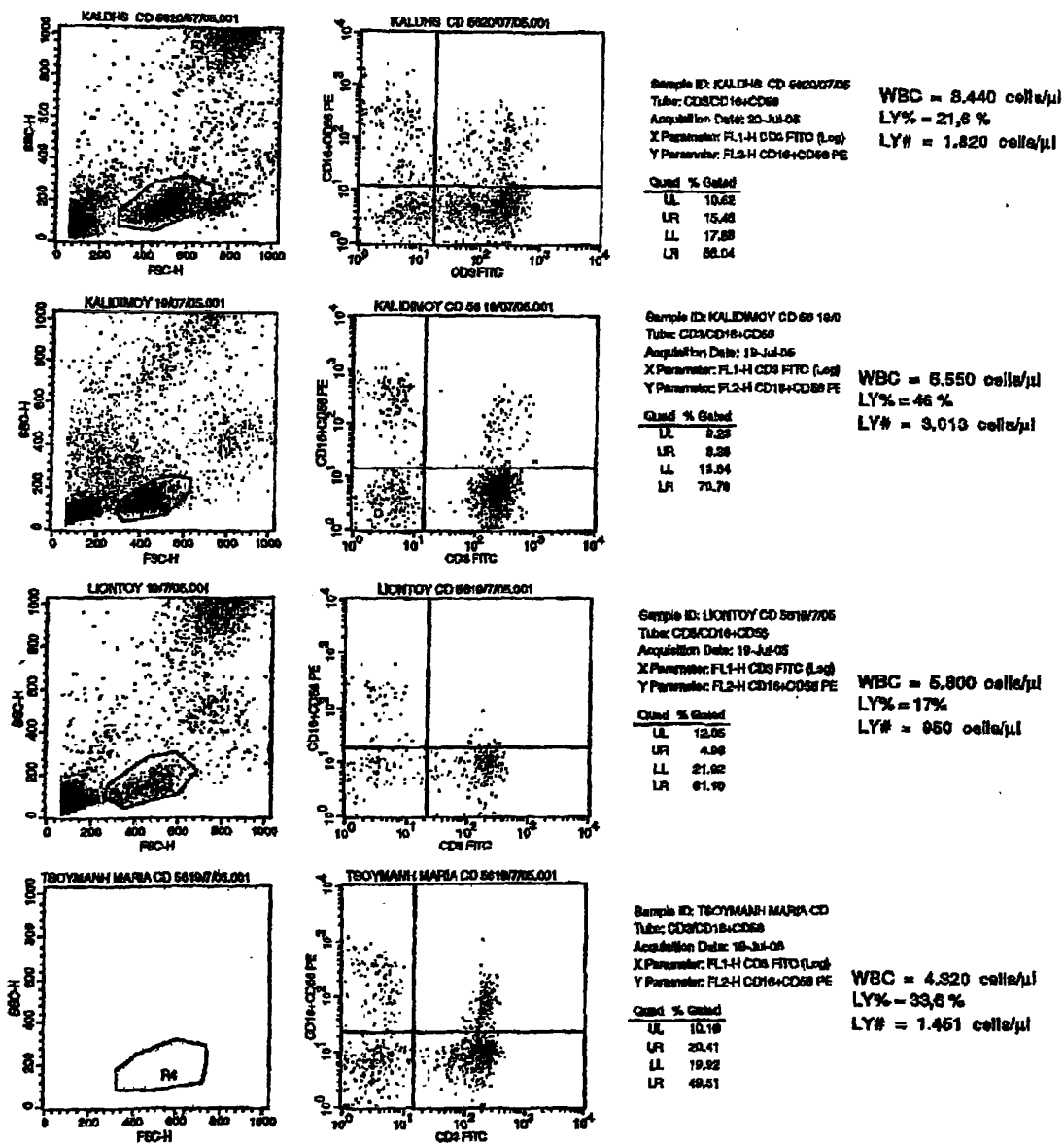


Διάγραμμα 110: Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των NKCs από τον κυτταρομετρητή ροής της καρκινοπαθούς γυναίκας 28 ετών ΑΑ6 μετά την έκθεση σε ΗΜΓΠ.

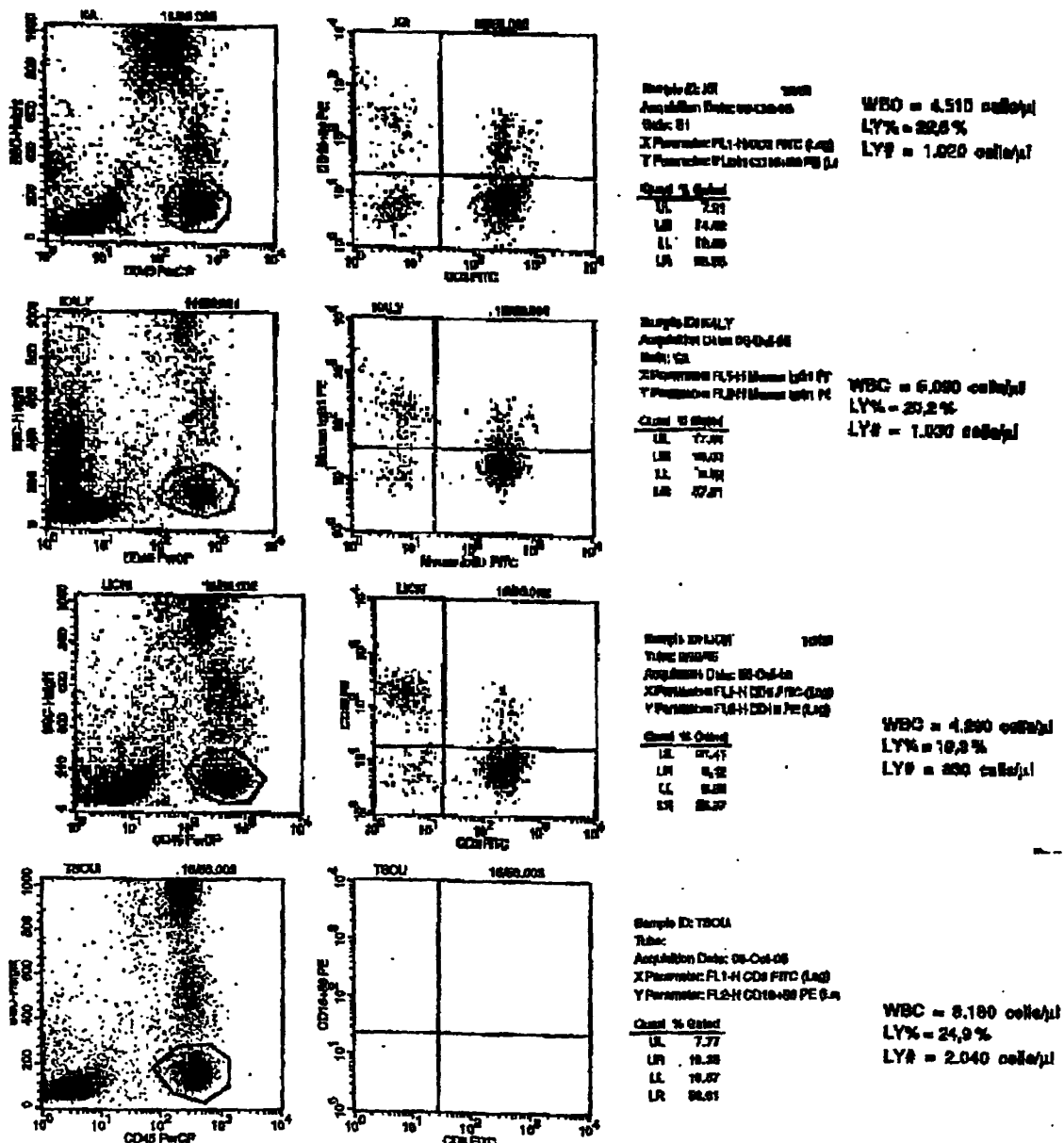




**Διάγραμμα 111:** Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των πληθυσμών των NK και NKT κυττάρων των καρκινοπαθών (άνδρας AA7 36 ετών, γυναίκα AA6 28 ετών, γυναίκα AA1 38 ετών και γυναίκα AA2 52 ετών) κατά τη διάρκεια της έκθεσης σε ΗΜΓΠ.



**Διάγραμμα 112:** Απεικονίσεις κυτταροτοξικότητας των πληθυσμών των NK και NKT κυττάρων των καρκινοπαθών του τμήματος της Φυσιολογίας (καρκινοπαθών (άνδρας AA7 36 ετών , γυναίκα AA6 28 ετών, γυναίκα AA1 38 ετών και γυναίκα AA2 52 ετών) μετά την έκθεση σε ΗΜΓΠ..

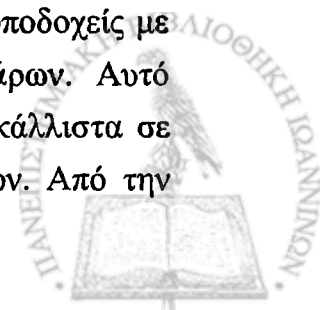


## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από τα πειραματικά δεδομένα στις *in vitro* δοκιμασίες βρέθηκαν χρήσιμα αποτελέσματα, τα οποία θα μπορούσαν να αξιολογηθούν ανάλογα για μελλοντικές θεραπευτικές προσεγγίσεις όσον αφορά στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος με τη διέγερση των NK λεμφοκυττάρων. Όπως φαίνεται από τα δεδομένα, το ασκορβικό οξύ είναι από τα ισχυρότερα αντιοξειδωτικά με δράση στα NKCs, διότι ενισχύει τη λειτουργικότητα των εν λόγω κυττάρων και στις τρεις συγκεντρώσεις, γεγονός που σημαίνει ότι δεν ενεργοποιεί καθόλου τους κατασταλτικούς υποδοχείς τους κατά τη διάρκεια της δράσης του. Επιπλέον θα πρέπει να σημειωθεί ότι το ασκορβικό οξύ δεν φαίνεται ιδιαίτερα τοξικό έναντι των καρκινικών κυττάρων, οπότε δεν προκαλεί πρόβλημα στη δομή και λειτουργία των φυσιολογικών κυττάρων. Η δράση μιας ουσίας ως προς την ανοσοενίσχυση φαίνεται έντονα στις αναλογίες 12,5:1 και 25:1, όπου λιγιστός αριθμός NK κυττάρων εμπλέκεται έναντι κυττάρων-στόχων, και με αυτό τον τρόπο τα κυτταροκτόνα κύτταρα γίνονται πιο κινητικά και πιο λειτουργικά έτσι ώστε να φτάσουν στο στόχο τους. Η αναλογία 50:1 δείχνει ότι ένας μεγάλος αριθμός NK κυττάρων είναι ικανός να θανατώσει σταθερό πληθυσμό καρκινικών κυττάρων, οπότε και να μην υπάρχει ανοσοενίσχυση στην περίπτωση αυτή δεν υφίσταται κάποιο σοβαρό πρόβλημα για το ανοσοποιητικό σύστημα. Από την άλλη μεριά όμως, εάν η λειτουργικότητα των NKCs στη συγκεκριμένη αναλογία είναι χαμηλή, τότε υφίσταται πρόβλημα στην κινητικότητα και στον μηχανισμό θανάτωσης.

Όσον αφορά άλλες ουσίες, όπως η ρεσβερατρόλη, βαναδοκουστεΐνη, μεθυλικό-νιτροζο-προπάνιο, καθώς και τα εκχυλίσματα των φυτών *Morinda citrifolia*, *Cypressus semprenivrens* και *Viscum album*, μπορούν να θεωρηθούν ως ισχυρά αντιοξειδωτικά εφόσον προκάλεσαν σημαντική διέγερση των NK κυττάρων και στις τρεις αναλογίες. Το ενθαρρυντικό σημείο εδώ είναι ότι οι παραπάνω ουσίες δεν είναι κυτταροτοξικές από μόνες τους, εκτός από το εκχύλισμα του φυτού *Cypressus semprenivrens*, το οποίο εμφάνισε μια κυτταροτοξικότητα της τάξης 26,5% και του οποίου η δράση θα μπορούσε να μελετηθεί εκτενέστερα και με άλλες ποικίλες μελέτες.

Επιπλέον, υψηλή ανοσοενίσχυση παρέχουν η βαναδοπουτρεσκίνη, το θειογλυκολικό μολυβδαίνιο και η γενιστεΐνη στις χαμηλές αναλογίες 12,5:1 και 25:1, ενώ στην 50:1 δεν υπήρξε αύξηση κυτταροτοξικότητας. Αυτό πιθανόν δηλώνει ότι τα NKCs μπορούν σε συγκεκριμένο χρόνο να θανατώσουν σταθερό αριθμό καρκινικών κυττάρων που τα περιβάλλει, οπότε ενεργοποιούνται οι κατασταλτικοί υποδοχείς με αποτέλεσμα τη μείωση της κυτταροτοξικής δράσης των NK κυττάρων. Αυτό σημαίνει ότι οι παραπάνω ουσίες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν κάλλιστα σε ασθενείς που έχουν πολύ χαμηλό αριθμό NK και NKT λεμφοκυττάρων. Από την



άλλη μεριά, ουσίες όπως η απιγενίνη, η θυμόλη και το PBN εμφάνισαν μεγάλη αύξηση κυτταροτοξικότητας των NKCs στις αναλογίες 25:1 και 50:1, αλλά η κυτταροτοξική δράση ήταν σταθερή στην αναλογία 12,5:1. Αυτό πιθανώς σημαίνει ότι ο αριθμός NKCs πρέπει να είναι αρκετά υψηλός για να ενεργοποιήσουν τους υποδοχείς δράσης, ειδάλως η ύπαρξη των παραπάνω ουσιών δεν τα επηρεάζει στην περαιτέρω λειτουργικότητά τους.

Ήπια αντιοξειδωτικά όσον αφορά την δράση τους στα NKCs μπορούν να χαρακτηριστούν από τα πειραματικά δεδομένα το ροζμαρινικό οξύ, ο ασπιρινικός χαλκός, ο διβουτιλο-δισασκορβικός κασσίτερος και το εκχύλισμα του φυτού *Aloe vera*, τα οποία εμφανίζουν αυξημένη κυτταροτοξική δράση στα NKCs, αλλά όχι τόσο έντονη όσο οι ουσίες που αναφέρθηκαν παραπάνω. Βέβαια αυτό δεν αποκλείει και το ενδεχόμενο να μπορούν να δρουν και συνεργικά με τις παραπάνω ουσίες. Όμως, το σκεύασμα που εμφανίζει τελείως διαφορετικές ιδιότητες από όλα όσα αναφέρθηκαν μέχρι τώρα είναι το σύμπλοκο σκεύασμα *Noni premium*. Ο σημαντικότερος λόγος που αναφέρεται το συγκεκριμένο σκεύασμα είναι ότι ενώ θα αναμενόταν να προκαλεί ανοσοενίσχυση από μόνο του, προκαλεί την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων των σειρών K562 και λειομυοσαρκωμάτων επίμυων Wistar και μάλιστα σε υψηλό ποσοστό, περίπου 85%. Το δε ελπιδοφόρο μήνυμα είναι ότι δεν είναι καθόλου κυτταροτοξικό και επικίνδυνο για τη θανάτωση των φυσιολογικών κυτταροκτόνων λεμφοκυττάρων. Επιπλέον, είναι πιθανόν τέτοια σκευάσματα που θανατώνουν άμεσα τα καρκινικά κύτταρα, σε συνεργεία με ανοσοδιεγερτικά σκευάσματα, να έχουν την δυνατότητα να δρουν σε έναν συμπαγή καρκινικό όγκο πολύ πιο στοχευμένα και αποτελεσματικά από ό,τι οποιοσδήποτε άλλος συνδυασμός.

Επίσης, τα ενέσιμα σύμπλοκα σκευάσματα *Glyoxal compositum*, *Ubichinon compositum*, *Katalysatoren* και *Coenxyme compositum*, από τα πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι προκαλούν ανοσοδιέγερση των NK κυττάρων αλλά πολύ πιο ήπια σε σύγκριση με άλλες ουσίες που αναφέρονται παραπάνω, γεγονός που πιθανόν να οφείλεται στις διαδοχικές αραιώσεις που υπέστησαν μέχρι την τελική παρασκευή τους. Αυτό βέβαια έχει και ένα θετικό αποτέλεσμα, όσον αφορά την ανάγκη να ενισχυθεί το ανοσοποιητικό σύστημα του ασθενούς μακροπρόθεσμα. Τέλος, η χορήγηση της πλατίνης, η οποία χρησιμοποιείται ως χημειοθεραπευτικός παράγοντας, έδειξε από τα πειραματικά δεδομένα ότι καταστρέφει και τα καρκινικά κύτταρα και τα φυσιολογικά κυτταροκτόνα κύτταρα, και μάλιστα με τέτοιο τρόπο, ώστε ήταν αδύνατο να εντοπιστούν τα νεκρά κύτταρα στην οθόνη του κυτταρομετρητή ροής. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την πιθανή μείωση του βαθμού ωρίμανσης των NK κυττάρων στο περιφερικό αίμα (μείωση του απόλυτου αριθμού των NKCs) και παράλληλα την προσβολή άλλων οργάνων του ανθρώπινου οργανισμού με αποτέλεσμα να διαταράσσεται η ομοιόστασή του. Συνεπώς, μπορεί μεν απώτερος



σκοπός να είναι θανάτωση καρκινικών όγκων, αλλά από την άλλη προκαλούνται περαιτέρω προβλήματα στον ασθενή.

Τα *in vitro* πειραματικά δεδομένα αποτελούν βάση για την αξιολόγηση ουσιών που τείνουν να τροποποιήσουν και να ενισχύσουν την λειτουργικότητα των NK λεμφοκυττάρων. Από τα δεδομένα των ασθενών που υποβλήθηκαν σε κάποια θεραπευτική αγωγή είναι δυνατόν να αξιολογηθεί κατάλληλα η ποιότητα της θεραπείας σε κάθε ανοσοποιητικό σύστημα ξεχωριστά. Με άλλα λόγια, να ελέγχεται η στοχευμένη θεραπευτική προσέγγιση σε κάθε ασθενή ξεχωριστά. Γι' αυτό τον λόγο ελέγχθηκαν 10 φυσιολογικοί εθελοντές ως ομάδα ελέγχου, στους οποίους χορηγούνταν καθημερινά κρυσταλλική καθαρή βιταμίνη C και το εκχύλισμα του *Aloe vera*. Τα πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι 6 στους 10 φυσιολογικούς ανθρώπους εμφάνισαν σημαντική αύξηση κυτταροτοξικότητας των NK λεμφοκυττάρων. Οι 4 στους 6 σημείωσαν αύξηση κυτταροτοξικής δράσης των κυττάρων φονέων και στις τρεις αναλογίες, ενώ οι άλλοι 2 εμφάνισαν δράση στις αναλογίες 25:1 και 50:1 αντίστοιχα. Τα άτομα που παρουσίασαν αύξηση της δράσης των NKCs δεν εμφάνισαν αύξηση του απόλυτου αριθμού των εν λόγω κυττάρων, εκτός από ένα άτομο, και αυτό σημαίνει ότι η βιταμίνη C και το εκχύλισμα του φυτού *Aloe vera* από την μια μεριά είναι ανοσοδιεγερτικά για τον ανθρώπινο οργανισμό, από την άλλη όμως δεν προκαλούν διέγερση του μυελού για την παραγωγή κυτταροκτόνων κυττάρων. Όσον αφορά τα άτομα που δεν παρουσίασαν αύξηση της κυτταροτοξικότητας, είναι πιθανόν να μην λάμβαναν συστηματικά τα παραπάνω σκευάσματα, οπότε δεν μπορούν να βγουν εκ του ασφαλούς συμπεράσματα για τους 4 αυτούς εθελοντές. Όμως πρέπει να σημειωθεί ότι οι 4 στους 6 εθελοντές μπορούσαν να παρακολουθηθούν και να ελεγχθούν και είναι σίγουρο ότι έπαιρναν τα σκευάσματα συστηματικά, και αυτό είναι πολύ σημαντικό για την εξαγωγή αξιόπιστων συμπερασμάτων. Επίσης, το βέβαιο είναι ότι η χορήγηση της βιταμίνης C και του εκχυλίσματος *Aloe vera* προκαλεί ανοσοενίσχυση ανεξαρτήτως ορίου ηλικίας, αφού υπήρξε αύξηση της κυτταροτοξικής δράσης των NKCs ατόμων με εύρος ηλικιών από 34 έως 70 ετών.

Όσον αφορά την θεραπευτική προσέγγιση των καρκινοπαθών με χημειοθεραπευτική αγωγή και μονοκλωνικά αντισώματα, παρατηρήθηκαν ενδιαφέρουσες επιστημονικές ενδείξεις ως προς την ενίσχυση ή την καταστολή των NK λεμφοκυττάρων. Ο άνδρας ασθενής 73 ετών με λέμφωμα στομάχου σημείωσε αύξηση του απόλυτου αριθμού των NK και NKT κυττάρων κατά 127% και αύξηση της λειτουργικότητας των κυττάρων αυτών κατά 39% στην αναλογία 12,5:1 και μείωση της λειτουργικότητας κατά 38% στην αναλογία 25:1 (σταθερή στην 50:1), γεγονός που σημαίνει ότι η παρουσία των μονοκλωνικών αντισωμάτων προκαλεί κατά κάποιο τρόπο διέγερση του μυελού παρόλη την χημειοθεραπευτική αγωγή και την ηλικία του παραπάνω ασθενούς, αλλά δεν προκύπτουν από τον συγκεκριμένο

ασθενή βάσιμα συμπεράσματα όσον αφορά τη σταθερή ανοσοδιέγερση των NK κυττάρων. Στην 73χρονη ασθενή με πολλαπλούν μυέλωμα που υποβλήθηκε σε αγωγή με Velcade (Bortezomib), έναν αναστολέα πρωτεοσώματος, παρατηρήθηκε από την μία μείωση της λειτουργικότητας των NKCs κατά 33, 186 και 58% στις τρεις αναλογίες αντίστοιχα, και από την άλλη ο αριθμός των NK και NKT λεμφοκυττάρων παρέμεινε σταθερός και μάλιστα σε υψηλό επίπεδο, γύρω στο 21%, που σημαίνει ότι η κύρια άμυνα του οργανισμού παρέμεινε μετά τη θεραπεία σε πολύ καλό επίπεδο. Ο 70χρονος ασθενής με πολλαπλούν μυέλωμα που υποβλήθηκε σε θεραπεία με μελφαλάνη και πρεδνιζολόνη μόνο, σημείωσε σημαντικότερη πτώση του αριθμού των NK και NKT κυττάρων κατά 300%, με αποτέλεσμα ο αριθμός των κυτταροτοξικών κυττάρων να είναι στο χαμηλότερο επίπεδο που μπορεί να υφίσταται (περίπου 3%) και βέβαια να απειλείται η κατάσταση του συγκεκριμένου ασθενούς όλο και περισσότερο. Στον άνδρα 60 ετών με λέμφωμα στομάχου που υποβλήθηκε σε θεραπεία Chor Mabthera (περισσότερο χημειοθεραπευτική αγωγή), παρατηρήθηκε από τη μια σημαντική μείωση των NK και NKT κυττάρων κατά 177%, με αποτέλεσμα ο αριθμός των κυττάρων αυτών να είναι στο 5,5%, και από την άλλη μεριά αύξηση της λειτουργικότητας των NKCs κατά 780, 339 και 689% στις τρεις αναλογίες αντίστοιχα. Αυτό πιθανόν να συμβαίνει διότι οι υποδοχείς των σημαντικά μειωμένων αριθμητικά NKCs ενεργοποιούνται στο έπακρο και αυξάνεται έτσι η κυτταροτοξική τους δράση, για να εξασφαλισθεί η όσο το δυνατόν πιο αποτελεσματική λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Τέλος, στην γυναίκα 42 ετών με λέμφωμα εντέρου υψηλού βαθμού κακοήθειας που υποβλήθηκε σε θεραπεία με μονοκλωνικά αντισώματα και χημειοθεραπεία, παρατηρήθηκε υψηλή αύξηση του αριθμού των NK και NKT κυττάρων κατά 166%, καθώς επίσης και του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων κατά 58%. Στην συγκεκριμένη ασθενή φαίνεται ότι η μικρή σχετικά ηλικία συνεισφέρει σημαντικά στο να μη μειώνεται ο αριθμός των NKCs κατά τη διάρκεια της χημειοθεραπείας.

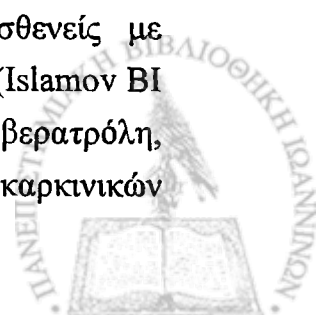
Τα τελευταία και τα πιο ενδιαφέροντα πειραματικά δεδομένα καρκινοπαθών με συμπαγείς όγκους από το Εργαστήριο της Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων είναι αυτά που σχετίζονται με μια διαφορετική προσέγγιση και μια καινοτομία όσον αφορά την τεχνολογία και την τεχνογνωσία, που είναι πρωτότυπη για τα ελληνικά δεδομένα. Όλοι οι ασθενείς παρουσίασαν αύξηση στον συνολικό αριθμό των NK κυττάρων κυμαίνοντας από 1,1 % έως 354% με κατά μέσο όρο αύξηση 131%. (Πίνακας 26). Επίσης η κυτταροτοξική δράση αυξήθηκε σημαντικά στην αναλογία 12:1 σε όλους τους ασθενείς, και 4 στους 8 ασθενείς (50%) στις αναλογίες 25:1 και 50:1(Πίνακας 26).

Πιο συγκεκριμένα, σε γυναίκα καρκινοπαθή 38 ετών με Ca μαστού και μεταστάσεις στο ήπαρ, παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση του αριθμού των NK και NKT λεμφοκυττάρων, η οποία έφτασε μετά το πέρας της έκθεσης σε ΗΜΓΠ σε



ποσοστό 147%, ενώ παράλληλα η κυτταροτοξική δράση των NK κυττάρων παρουσίασε σταθερότητα σε φυσιολογικό λειτουργικό επίπεδο, γεγονός που οφείλεται πιθανώς στον υψηλό αριθμό των NK κυττάρων τα οποία κυκλοφορούσαν στο περιφερικό αίμα της ασθενούς. Ο υψηλός αριθμός των NKCs μπορεί να οφείλεται στην διέγερση του μυελού, μιας και τα αντιοξειδωτικά βιταμίνη C και E που χορηγήθηκαν αποδείχτηκε ότι προκαλούν μόνο ενίσχυση της κυτταροτοξικής δράσης των παραπάνω κυττάρων. Επιπλέον, σε γυναίκα καρκινοπαθή 52 ετών με Ca μαστού και μεταστάσεις στο ήπαρ και πνεύμονα, μετά από έκθεση σε ΗΜΓΠ, παρατηρήθηκε αύξηση του αριθμού των NK και NKT κυττάρων κατά τη διάρκεια της θεραπείας κατά 146% και πολύ σημαντική αύξηση στην αναλογία 12,5:1, γεγονός που σημαίνει ότι παρόλο τον υψηλό αριθμό των NKCs η λειτουργικότητά τους ήταν μηδαμινή και βέβαια είναι ουσιαστικό ότι στην αύξηση της δράσης τους συνετέλεσαν οι χορηγούμενες αντιοξειδωτικές ουσίες. Σε άλλη μια δύσκολη περίπτωση, σε άνδρα καρκινοπαθή ετών 36 με μελάνωμα και μεταστάσεις σε πνεύμονα, εγκέφαλο και περιτόναιο, παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση του αριθμού των NK και NKT κυττάρων κατά 133% σε όλα τα στάδια της έκθεσης σε ΗΜΓΠ, ενώ σταθεροποιήθηκε η λειτουργική δράση των NKCs σε ικανοποιητικά επίπεδα. Τέλος, σε γυναίκα ασθενή 28 ετών με νινοςάρκωμα και ποικίλες μεταστάσεις, παρατηρήθηκε σημαντικότερη αύξηση των NK και NKT κυττάρων κατά 340% μέχρι το πέρας της έκθεσης σε ΗΜΓΠ, και αύξηση της κυτταροτοξικότητας κατά 156% στην αναλογία 12,5:1. Είναι βέβαια αξιοσημείωτο ότι όλοι οι παραπάνω ασθενείς σημείωσαν αύξηση και του αριθμού των NKCs, αλλά και της κυτταροτοξικής τους δράσης ανάλογα με την περίπτωση. Μάλιστα, το πλέον ελπιδοφόρο γεγονός είναι ότι ενώ ο μέσος όρος του προσδόκιμου επιβίωσης των παραπάνω τεσσάρων ασθενών, που σύμφωνα με τη γνώμη κλινικών ογκολόγων, ήταν περίπου τρεις μήνες, παρατάθηκε σημαντικά και μερικοί από αυτούς βρίσκονται ακόμη εν ζωή. Επομένως, μια θεραπευτική στοχευμένη αγωγή σαν την τελευταία θα μπορούσε να συνεισφέρει σημαντικά στην παράταση ζωής στην αντιμετώπιση της επάρατης νόσου, και μάλιστα αν χρησιμοποιηθεί και σε πρώιμα στάδια της νόσου.

Οι Kirston et al έχουν αποδώσει τις ευεργετικές δράσεις των RFs σε καρκινοπαθείς με γλιοβλαστώματα του εγκεφάλου στην παρακώλυση του σχηματισμού της μιτοτικής ατράκτου οφειλόμενης στην επίδραση των ηλεκτρικών πεδίων στα μεγάλα δίπολα των διμερών της τουμπουλίνης της ατράκτου. Εντούτοις, η έκθεση σε οργανωμένα ΗΜΓΠ συντονισμού (βιοσυντονιστική αγωγή) έχει δείξει ότι αυξάνει το αντιοξειδωτικό σύστημα στα λεμφοκύτταρα σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα που ασκεί μη ειδική προστασία στα NK κύτταρα ((Islamion BI et al 2002). Επίσης, έχουμε δείξει ότι φυτικά αντιοξειδωτικά όπως η ρεσβερατρόλη, αυξάνουν σημαντικά την κυτταροτοξικότητα των NK κυττάρων εναντίον καρκινικών κυττάρων (Toliopoulos et al 2005)



Ακόμα, οι Pessina και Aldinucci διαπίστωσαν ότι τα ΗΜΓΠ μπορεί να αυξήσουν σημαντικά την παραγωγή IL-1, IL-2 και του TNFα από τα μονοκύτταρα του αίματος (Pessina and Aldinucci 1998). Είναι γνωστό ότι η IL-2 αυξάνει την κυτταροτοξική δράση των NK λεμφοκυττάρων. (Lauweyys 159). Είναι επομένως πιθανόν η αύξηση της κυτταροτοξικότητας των NK κυττάρων που διαπιστώθηκε στους ασθενείς με καρκίνο τελικού σταδίου να οφείλεται στην αύξηση της έκκρισης της IL-2 από τα μονοκύτταρα τους κατά την έκθεση τους στα συντονισμένα ΗΜΓΠ.

Η θεραπευτική αγωγή με το φαινόμενο του βιοσυντονισμού μπορεί να συμβάλει αφ' ενός σε προληπτικό και αφ' ετέρου σε θεραπευτικό επίπεδο. Η μελέτη της επίδρασης ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων στα έμβια όντα ξεκίνησε στη Ρωσία στα τέλη του 18ου αιώνα, όπου υπήρχαν δημοσιεύσεις με δεδομένα για την δράση μαγνητικών πεδίων σε ζωντανούς οργανισμούς. Από τις έρευνες αυτές προέκυψε ότι τα έμβια όντα είναι προσαρμοσμένα όχι μόνο στο γεωμαγνητικό πεδίο του πλανήτη μας, αλλά και ότι η αποστέρησή του μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές λειτουργικές διαταραχές σε μικρό χρονικό διάστημα, δηλαδή ότι το γεωμαγνητικό πεδίο με τα φυσικά χαρακτηριστικά του είναι απαραίτητο για την φυσιολογική λειτουργία των έμβιων όντων. Παράλληλα, οι διαταραχές που καταγράφηκαν στις ανθρώπινες λειτουργίες κατά τις μεταβολές του γεωμαγνητικού πεδίου της γης, που οφείλονται σε ηλιακές ηλεκτρομαγνητικές θύελλες, καθώς και τα προβλήματα των αστροναυτών μετά την έκθεση στην κοσμική ακτινοβολία, οδήγησαν την επιστημονική κοινότητα σε εκτεταμένες πειραματικές μελέτες της επίδρασης ηλεκτρομαγνητικών πεδίων διαφόρων συχνοτήτων και εντάσεων στα έμβια. Έτσι ανακαλύφθηκαν οι βλαπτικές επιδράσεις των ιονίζουσών ακτινοβολιών (ακτίνες X, γάμα, υπεριάδης ακτινοβολία ή ηλεκτρομαγνητικό φάσμα). Από τις έρευνες αυτές και την επέκτασή τους σε ηλεκτρομαγνητικά κύματα του σύγχρονου πολιτισμού (μικροκύματα, ραδιοφωνικά κύματα, VHF) προέκυψε ότι μερικοί τύποι ηλεκτρομαγνητικών πεδίων όχι μόνο δεν είναι βλαπτικοί για τον οργανισμό ανθρώπων και ζώων, αλλά μπορεί να έχουν ωφέλιμες επιδράσεις στην επιτάχυνση της θεραπείας διαφόρων παθολογικών καταστάσεων, όπως ταχεία επούλωση καταγμάτων, καταστολή επιληπτικών εστιών, βελτίωση ασθενών με σκλήρυνση κατά πλάκας, αναλγησία και πολλές άλλες. Με βάση τα χαρακτηριστικά των εν λόγω πεδίων (συχνότητα, ένταση, παλμικότητα-στατικότητα πεδίου), οι συσκευές που κατασκευάστηκαν δεν παράγουν ιονίζουσα ακτινοβολία και τα εκπεμπόμενα ηλεκτρομαγνητικά πεδία έχουν συχνότητα 100 φορές και ένταση 1600 φορές μικρότερη των επιτρεπομένων ορίων έκθεσης των έμβιων όντων. Παρόλα αυτά, η πλήρης επιστημονική ερμηνεία των επιδράσεων αυτών υστερεί σήμερα και περαιτέρω διερεύνηση είναι απαραίτητη, αλλά πολλές φορές το θετικό αποτέλεσμα για την κατάσταση του ασθενούς είναι αυτό που μετράει και είναι και η πεμπουσία στην ρεαλιστική επιστημονική κοινότητα (Schoni et al. 1997, Sudd et al. 1997, Maiko et al. 2000, Islamov et al. 2002)





Στην παρούσα μελέτη σημαντική είναι η συνεισφορά της κυτταρομετρίας ροής στην μεθοδολογία της εκτίμησης της κυτταροτοξικής δράσης των NK λεμφοκυττάρων. Η μεθοδολογία αυτή είχε ως σκοπό να ανιχνεύσει τυχόν μεταβολές της λειτουργικότητας των NKCs σε διάφορους τύπους καρκινοπαθών, αλλά και να αξιολογήσει τις δράσεις ποικίλων τύπων αντιοξειδωτικών ουσιών όσον αφορά τη δράση των εν λόγω κυττάρων. Ο σκοπός πρέπει να σημειωθεί ότι επετεύχθη, και μάλιστα με πολύ καλύτερα δεδομένα από τα αναμενόμενα. Δεδομένου πλέον ότι η καταστολή της κυτταροτοξικότητας των NKCs είναι γεγονός σε ασθενείς σε προχωρημένο στάδιο και με μεταστάσεις αλλά και σε ασθενείς με οξεία και χρόνια μυελογενή λευχαιμία, είναι πολύ σημαντικό ότι η παραπάνω μεθοδολογία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστική για την πιθανότητα ανάπτυξης μεταστάσεων σε ασθενείς με πρωτογενείς όγκους (Kadish et al. 1991, Srskaar et al. 1986, Hersey et al. 1986). Η παραπάνω μεθοδολογία ανακοινώθηκε πρωταρχικά το έτος 2004 στο 6<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ανοσολογίας και έκτοτε παρουσιάζεται σε πανευρωπαϊκά και παγκόσμια συνέδρια, τυγχάνει δε της απόλυτης αποδοχής της παγκόσμιας επιστημονικής κοινότητας (Toliopoulos et al. 2005a, Toliopoulos et al. 2005b, Toliopoulos et al. 2006).

Από την άλλη μεριά, και η παρουσία των NKCs είναι καταλυτική στη ζωτική λειτουργία του ανοσολογικού συστήματος. Ο βαθμός της λειτουργικότητάς τους θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως παράγοντας κινδύνου για κακοήθεις όγκους. Από τη βιβλιογραφία έχει συχνά αναφερθεί ότι η μειωμένη δράση των NKCs μπορεί να είναι σημαντικός παράγοντας για την ανάπτυξη όγκων σε άνδρες. Ασθενείς με φυσικές ή επίκτητες ανοσοανεπάρκειες, των οποίων η δράση των NKCs είναι κατασταλμένη ή απύσχα, τυγχάνει να έχουν υψηλό δείκτη κακοήθειας (Purtilo et al. 1981, Saemundsen et al. 1981). Επιπλέον σε αυτές τις παρατηρήσεις η χαμηλή δράση των NK κυττάρων σε φυσιολογικά άτομα βρέθηκε να είναι στενά συνδεδεμένη γενικά με καρκίνο, γεγονός που διαπιστώθηκε σε μελάνωμα και καρκίνο του μαστού (Strayer et al. 1984, Strayer et al. 1986, Hersey et al. 1979). Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι και γενετικές ανωμαλίες που οφείλονται στην δράση των NKCs μπορούν να συνεισφέρουν στο έναυσμα των καρκινικών όγκων. Με βάση τα ανωτέρω, η δραστηριότητα των NK κυττάρων θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για την ανίχνευση ατόμων με υψηλό ρίσκο ανάπτυξης καρκίνου, ειδικά αυτών που είναι συγγενείς καρκινοπαθών.

Σε άλλες μελέτες παρατηρήθηκε ότι η δράση των NKCs είναι σημαντικός προγνωστικός παράγοντας των κακοήθων ασθενειών. Σε ασθενείς με λευχαιμίες, μια ξαφνική και σημαντική μείωση των NKCs παρατηρήθηκε σχεδόν πάντα σε υποτροπή της ασθένειας. Αυτό παρατηρήθηκε σε ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε χημειοθεραπεία και σε ασθενείς με οξεία λευχαιμία που υποβλήθηκαν σε μεταμόσχευση μυελού. Η πιθανή προγνωστική χρησιμότητα της μέτρησης της

δράσης των NKCs και η λειτουργία τους στο αίμα των ασθενών με λεμφώματα έχει επισημανθεί και από πρόσφατες μελέτες (Lutzova et al. 1987, Baumann et al. 1986). Επίσης, υπάρχει απόδειξη ότι σε χειρουργημένους ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου η αφαίρεση των πρωτογενών όγκων ακολουθήθηκε από την επιστροφή της δράσης των NK κυττάρων σε φυσιολογικά επίπεδα. Παρόμοιες προτάσεις, ότι η δράση των NKCs θεωρείται θεραπευτικός οδηγός σε αποτελέσματα πετυχημένων χειρουργικών επεμβάσεων, ανέφεραν οι Lin et al σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα (Lin et al. 1987, Tarter et al. 1986, Whiteside and Herberman 1994).



**Εικόνα 1:** Καρκινικό κύτταρο περιβάλλεται από πολλά NK κύτταρα -εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο(Whiteside and Herberman 1994 ).

Συνοψίζοντας, θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο ρόλος των NK λεμφοκυττάρων είναι σημαντικός αλλά και πολυπρόσωπος. Παρόλο που ο μηχανισμός της δράσης των κυττάρων αυτών παραμένει άγνωστος μέχρι σήμερα, το γεγονός και μόνο ότι ένα NK κύτταρο από μόνο του μπορεί να καταστρέψει 27 καρκινικά κύτταρα πριν πεθάνει, και μπορεί να προσδεθεί ταυτόχρονα σε δύο ή περισσότερα κύτταρα (Whiteside and Herberman 1994), τεκμηριώνει τον χαρακτηρισμό ότι τα NKCs είναι για το ανοσοποιητικό σύστημα ό,τι ο εγκέφαλος για τον ανθρώπινο οργανισμό (Εικόνα 1). Λόγω του ότι τα NK κύτταρα φαίνεται να συμμετέχουν σε πολλές δράσεις, όπως ρυθμιστικές και αναπτυξιακές στο ανοσοποιητικό σύστημα, η σπουδαιότητά τους δεν υπάρχει λόγος πολλές φορές να υπερεκτιμάται ή να προκαλείται έμφαση σε υπερθετικό βαθμό. Συγκεκριμένα, για να ορίσει κανείς περαιτέρω το ρόλο των NK λεμφοκυττάρων στην πρόγνωση, διάγνωση και παθογένεση σε ανθρώπινες ασθένειες, θα πρέπει να ασχοληθεί και με περαιτέρω δείκτες και να οδηγήσει την επιστημονική κοινότητα σε συγκεκριμένες και στοχευμένες θεραπευτικές προσεγγίσεις, με στόχο πάνω από όλα την βελτίωση της ανθρώπινης υγείας.



## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την παρούσα εργασία προέκυψαν τα εξής συμπεράσματα:

- 1) Οι αντιοξειδωτικές ουσίες αποτελούν σημαντικούς ανοσοδιεγερτικούς παράγοντες όσον αφορά την δράση των NK λεμφοκυττάρων, αλλά παίζουν λιγότερο έως ελάχιστο ρόλο στην διέγερση του μυελού για την μεταβολή του απόλυτου αριθμού τους.
- 2) Οι ουσίες ρεσβερατρόλη, βαναδοκουστεΐνη και μεθυλικό-νιτροζο-προπάνιο, καθώς και τα εκχυλίσματα των φυτών *Morinda citrifolia*, *Cypressus semprevirens* και *Viscum album* θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως ισχυρές αντιοξειδωτικές ουσίες, εφόσον προκάλεσαν σημαντική διέγερση των NK κυττάρων *in vitro* και στις τρεις συγκεντρώσεις 12,5:1, 25:1 και 50:1.
- 3) Οι ουσίες απιγενίνη, θυμόλη και PBN εμφάνισαν μεγάλη αύξηση κυτταροτοξικότητας στα NKCs *in vitro* στις συγκεντρώσεις 25:1 και 50:1, αλλά η κυτταροτοξική δράση ήταν σταθερή στην συγκέντρωση 12,5:1, γεγονός που σημαίνει ότι για την δράση των συγκεκριμένων αντιοξειδωτικών απαραίτητη προϋπόθεση είναι η ύπαρξη σημαντικού αριθμού των NK λεμφοκυττάρων.
- 4) Ήπια αντιοξειδωτικά μπορούν να χαρακτηριστούν το ροζμαρινικό οξύ, ο ασπιρινικός χαλκός, ο διβούτιλο-δισασκορβικός κασσίτερος και το εκχύλισμα του φυτού *Aloe vera*, τα οποία εμφανίζουν αυξημένη κυτταροτοξική δράση στα NKCs *in vitro* και στις τρεις συγκεντρώσεις, αλλά όχι τόσο έντονη όσο οι ουσίες που αναφέρθηκαν παραπάνω.
- 5) Πρέπει να τονιστεί ιδιαίτερα ότι ο αριθμός των NK κυττάρων CD16,56 και η κυτταροτοξική δράση των κυττάρων αυτών είναι δυο τελείως διαφορετικοί διαγνωστικοί δείκτες.
- 6) Η πλατίνα διαλύει και τα καρκινικά κύτταρα και τα φυσιολογικά κυτταροκτόνα κύτταρα *in vitro*, και μάλιστα με τέτοιο τρόπο, ώστε ήταν αδύνατο να εντοπιστούν τα νεκρά κύτταρα στην οθόνη του κυτταρομετρητή ροής.
- 7) Υπάρχουν και αντιοξειδωτικά σκευάσματα που δεν προκαλούν ανοσοδιέγερση, αλλά δρουν στοχευμένα σε καρκινικά κύτταρα *in vitro*, όπως το *Noni premium*.
- 8) Υψηλή ανοσοενίσχυση παρέχουν η βαναδοπουτρεσκίνη, το θειογλυκολικό μολυβδαίνιο και η γενιστεΐνη στις χαμηλές συγκεντρώσεις 12,5:1 και 25:1 *in vitro*, ενώ στην 50:1 δεν υπήρξε αύξηση κυτταροτοξικότητας, γεγονός που σημαίνει ότι από τις συγκεκριμένες ουσίες ωφελούνται άτομα με χαμηλό αριθμό των NKCs.
- 9) Η χορήγηση της βιταμίνης C και του εκχυλίσματος του *Aloe vera* προκαλεί ανοσοενίσχυση ανεξαρτήτως ορίου ηλικίας, χωρίς να προκαλεί σημαντική αύξηση του αριθμού των NK κυττάρων *in vivo*.



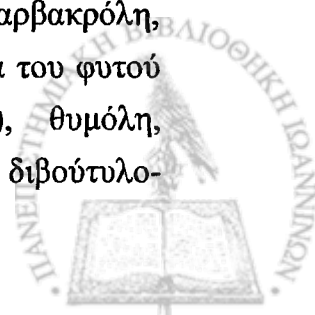
- 10) Το Velcade (Bortezomib), ένας αναστολέας πρωτεοσώματος, παρατηρήθηκε ότι αφ' ενός μειώνει την λειτουργικότητα των NKCs και στις τρεις συγκεντρώσεις και αφ' ετέρου ότι δεν μεταβάλλει τον αριθμό των NK και NKT λεμφοκυττάρων, ο οποίος παρέμεινε σταθερός και μάλιστα σε υψηλό επίπεδο (περίπου 21%), γεγονός που σημαίνει ότι η κύρια άμυνα του οργανισμού παρέμεινε μετά τη θεραπεία σε πολύ καλό επίπεδο *in vivo*.
- 11) Η θεραπεία με μελφαλάνη και πρεδνιζολόνη προκάλεσε σημαντικότερη πτώση του αριθμού των NK και NKT κυττάρων, με αποτέλεσμα ο αριθμός των κυτταροτοξικών κυττάρων να είναι στο χαμηλότερο επίπεδο που μπορεί να υφίσταται *in vivo* (περίπου 3%).
- 12) Η παρουσία των μονοκλωνικών αντισωμάτων είναι καταλυτική σε συνέργεια με τη χημειοθεραπευτική αγωγή, διότι διατήρησε στις περισσότερες περιπτώσεις τον αριθμό των NK ή τον αύξησε, και όταν μειωνόταν ο αριθμός των NKCs αυξάνονταν η λειτουργικότητά τους.
- 13) Οι χορήγηση βιταμινών C, B, E, καροτενίου, βαναδίου και σεληνίου, καθώς και η αγωγή με το φαινόμενο του βιοσυντονισμού, αυξάνουν σημαντικά τον αριθμό των NK κυττάρων στο περιφερικό αίμα και διατηρούν ή αυξάνουν την κυτταροτοξική δράση *in vivo* σε καρκινοπαθείς με συμπαγείς όγκους.
- 14) Ο ρόλος των NK λεμφοκυττάρων είναι καθοριστικός τόσο στην διάγνωση όσο και στην πρόγνωση σοβαρών παθήσεων όπως ο καρκίνος.
- 15) Είναι προφανές ότι τα ευρήματα της παρούσας μελέτης δεν αποτελούν οδηγό για καθιέρωση της αγωγής με αντιοξειδωτικά ή ΗΜΓΠ για ασθενείς με κακοήθεις νόσους, παρέχουν όμως σοβαρές ενδείξεις για την ερμηνεία της ευεργερτικής δράσης ανάλογων αγωγών που βρίσκονται σε πειραματικό στάδιο και αναμένεται να συμβάλουν στην καθιέρωσή τους ως ιατρικές μεθόδους..



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ο ρόλος των NK λεμφοκυττάρων έναντι των καρκινικών σειρών K562 και κυττάρων λειομυοσαρκωμάτων επίμυων Wistar in vitro και in vivo. Στα in vitro πειράματα χρησιμοποιήθηκαν διάφορες αντιοξειδωτικές ουσίες ή σύμπλοκα αυτών και παρατηρήθηκε η μεταβολή της δράσης των NK λεμφοκυττάρων με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. Τα in vivo πειράματα περιλάμβαναν μια ομάδα ελέγχου δέκα ατόμων (ανδρών και γυναικών από 34 έως 70 ετών), στους οποίους χορηγήθηκαν ημερησίως 35ml χυμός Aloe vera και ένα γραμμάριο καθαρή κρυσταλλική βιταμίνη C για 45 ημέρες. Στην ομάδα ελέγχου μετρήθηκε ο αριθμός των NKCs και NKT κυττάρων και η λειτουργικότητα των συγκεκριμένων κυττάρων πριν και μετά από την χορήγηση των παραπάνω ουσιών. Επίσης, σε καρκινοπαθείς και των δύο φύλων με συμπαγείς μεταστατικούς όγκους χορηγήθηκαν αντιοξειδωτικές ουσίες, ενώ ταυτόχρονα υποβάλλονταν σε θεραπεία επί οκτώ ώρες ημερησίως με τη μέθοδο του ηλεκρομαγνητικού βιοσυντονισμού για τέσσερις εβδομάδες. Μερικοί από αυτούς υποβάλλονταν και σε χημειοθεραπευτική αγωγή. Στο περιφερικό αίμα των ασθενών αυτών μετρήθηκε ο αριθμός των NKCs και NKT κυττάρων, καθώς και η λειτουργικότητά τους πριν, κατά την διάρκεια και μετά την θεραπευτική αγωγή. Για λόγους σύγκρισης με άλλες θεραπευτικές μεθόδους, τα in vivo πειράματα συνεχίστηκαν με καρκινοπαθείς που υποβάλλονταν με διαφορετική θεραπευτική προσέγγιση, όπως Mabthera. Η διαδικασία περιλάμβανε καρκινοπαθείς με πολλαπλούν μυέλωμα και λέμφωμα Hodgkin's που υποβάλλονταν σε χημειοθεραπεία και σε θεραπεία με μονοκλωνικά αντισώματα και υπολογίστηκαν ο αριθμός των NK και NKT λεμφοκυττάρων καθώς και η λειτουργικότητα των συγκεκριμένων κυττάρων πριν και μετά από τρίμηνη θεραπεία.

Η μεθοδολογία που κυρίως χρησιμοποιήθηκε είχε ως σκοπό τον έλεγχο της κυτταροτοξικής δράσης των NK κυττάρων και του ανοσοφαινότυπου των υποπληθυσμών των λεμφοκυττάρων. Η πρώτη μεθοδολογία περιλαμβάνει τέσσερα βασικά στάδια: α) την απομόνωση των NK λεμφοκυττάρων από περιφερικό αίμα εθελοντών αιμοδοτών και την ποσοτικοποίησή τους, β) την ποσοτικοποίηση των καρκινικών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν ως κύτταρα στόχοι (target cells), γ) την επώαση των NK με τα καρκινικά κύτταρα στις συγκεντρώσεις 12,5:1, 25:1, και 50:1, και δ) την ανάλυση των δεδομένων με τους κυτταρομετρητές ροής των εταιρειών Coulter και Becton Dickinson. Πρέπει να σημειωθεί ότι κατά την διάρκεια του τρίτου σταδίου προστέθηκαν ουσίες όπως: ασκορβικό οξύ, απιγενίνη, καρβακρόλη, ρεσβερατρόλη, εκχύλισμα του φυτού *Cypressus sempervirens*, εκχύλισμα του φυτού *Viscum album*, βαναδοκυστεΐνη, βανοδο-πουντρεσκίνη (van putr), θυμόλη, ροζμαρινικό οξύ, μεθυλικό-νιτροζο-προπάνιο, PBN, ασπιρινικός χαλκός, διβούτυλο-



δισασκορβικός κασσίτερος, θειογλυκολικό μολυβδαίνιο, πλατίνα με πουτρεσκίνη, γενιστεΐνη, καθαρό εκχύλισμα του φυτού *Morinda citrifolia* (noni), το σύμπλοκο σκεύασμα Noni premium, τα σύμπλοκα σκευάσματα Ubichinon compositum, Glyoxal compositum, Katalysatoren και Coenzyme compositum, καθώς και το εκχύλισμα του φυτού *Aloe vera*. Η δεύτερη μεθοδολογία περιλάμβανε την σήμανση των NK και NKT κυττάρων με μονοκλωνικά αντισώματα όπως CD3, CD16, CD56, και καταγραφή με τον κυτταρομετρητή ροής του απόλυτου αριθμού των συγκεκριμένων κυττάρων.

Τα *in vitro* αποτελέσματα ήταν ενδιαφέροντα διότι βρέθηκαν σημαντικές ουσίες που προκαλούν ανοσοδιέγερση έναντι καρκινικών σειρών, άλλες μεγαλύτερου και άλλες μικρότερου μεγέθους. Το ασκορβικό οξύ είναι από τα ισχυρότερα αντιοξειδωτικά διότι ενισχύει τη λειτουργικότητα των NKCs και στις τρεις συγκεντρώσεις και μάλιστα σε υψηλά ποσοστά. Η ρεσβερατρόλη, βαναδοκουστεΐνη, μεθυλικό-νιτρόζο-προπάνιο, καθώς και τα εκχυλίσματα των φυτών *Morinda citrifolia*, *Cypressus sempervirens* και *Viscum album* θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως ισχυρές αντιοξειδωτικές ουσίες. Υψηλή ανοσοενίσχυση παρέχουν η βαναδοπουτρεσκίνη, το θειογλυκολικό μολυβδαίνιο και η γενιστεΐνη στις χαμηλές συγκεντρώσεις 12,5:1 και 25:1, ενώ στην 50:1 δεν υπήρξε αύξηση κυτταροτοξικότητας. Από την άλλη μεριά, ουσίες όπως απιγενίνη, θυμόλη και PBN εμφάνισαν μεγάλη αύξηση κυτταροτοξικότητας στα NKCs στις συγκεντρώσεις 25:1 και 50:1, αλλά η κυτταροτοξική δράση ήταν σταθερή στην συγκέντρωση 12,5:1. Ήπια αντιοξειδωτικά μπορούν να χαρακτηριστούν από τα πειραματικά δεδομένα το ροζμαρινικό οξύ, ο ασπιρινικός χαλκός, ο διβούτιλο-δισασκορβικός κασσίτερος και το εκχύλισμα του φυτού *Aloe vera*, τα οποία εμφανίζουν αυξημένη κυτταροτοξική δράση στα NKCs αλλά όχι τόσο έντονη όσο οι ουσίες που αναφέρθηκαν παραπάνω. Τα ενέσιμα σύμπλοκα σκευάσματα Glyoxal compositum, Ubichinon compositum, Katalysatoren και Coenzyme compositum από τα πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι προκαλούν ανοσοδιέγερση των NK κυττάρων, αλλά πολύ πιο ήπια σε σύγκριση με άλλες ουσίες που αναφέρονται παραπάνω, γεγονός που πιθανόν να οφείλεται στις διαδοχικές αραιώσεις που υπέστησαν μέχρι την τελική παρασκευή τους. Επίσης, ενδιαφέρον παρουσίασε και ένα σύμπλοκο σκεύασμα, το Noni premium, το οποίο παρατηρήθηκε ότι δεν προκαλεί ανοσοδιέγερση όπως τα υπόλοιπα, αλλά προκαλεί άμεσα την θανάτωση των καρκινικών στόχων σε μεγάλο ποσοστό και μάλιστα χωρίς να δημιουργεί προβλήματα στα NK λεμφοκύτταρα. Επιπλέον, σημαντική παρατήρηση πρέπει να θεωρηθεί και το ότι η χορήγηση της πλατίνας κατέστρεψε και τα καρκινικά κύτταρα και τα φυσιολογικά.

Τα *in vivo* πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι έξι στους δέκα φυσιολογικούς ανθρώπους εμφάνισαν σημαντική αύξηση κυτταροτοξικότητας των NK λεμφοκυττάρων μετά τη χορήγηση του χυμού *Aloe vera* και της κρυσταλλικής



μορφής της καθαρής βιταμίνης C. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με το ότι δεν παρουσιάστηκε αύξηση του αριθμού των NK και NKT λεμφοκυττάρων, σημαίνει ότι οι εν λόγω ουσίες προκαλούν σημαντική ανοσοδιέγερση, χωρίς να διεγείρουν τον μυελό για την παραγωγή νέων λεμφοκυττάρων.

Όσον αφορά τη θεραπευτική προσέγγιση των καρκινοπαθών με χημειοθεραπευτική αγωγή και μονοκλωνικά αντισώματα, παρατηρήθηκε ότι η παρουσία των μονοκλωνικών αντισωμάτων προκαλεί κατά κάποιο τρόπο διέγερση του μυελού παρά την χημειοθεραπευτική αγωγή και την ηλικία του ασθενούς, αλλά δεν προκύπτουν από έναν συγκεκριμένο ασθενή βάσιμα συμπεράσματα ως προς τη σταθερή ανοσοδιέγερση των NK κυττάρων. Επίσης, το Velcade (Bortezomib), ένας αναστολέας πρωτεοσώματος, παρατηρήθηκε ότι όταν χορηγήθηκε, από την μια σημειώθηκε μείωση της λειτουργικότητας των NKCs και στις τρεις συγκεντρώσεις, και από την άλλη ο αριθμός των NK και NKT λεμφοκυττάρων παρέμεινε σταθερός και μάλιστα σε υψηλό επίπεδο, γύρω στο 21%, που σημαίνει ότι το η κύρια άμυνα του οργανισμού παρέμεινε μετά τη θεραπεία σε πολύ καλό επίπεδο *in vivo*. Επιπλέον, η θεραπεία με μελφαλάνη και πρεδνιζολόνη επέφερε σημαντικότερη πτώση του αριθμού των NK και NKT κυττάρων, με αποτέλεσμα ο αριθμός των κυτταροτοξικών κυττάρων να είναι στο χαμηλότερο επίπεδο που μπορεί να υφίσταται, περίπου 3%. Ακόμα, η παρουσία των μονοκλωνικών αντισωμάτων είναι καταλυτική σε συνέργεια με τη χημειοθεραπευτική αγωγή, διότι διατήρησε στις περισσότερες περιπτώσεις τον αριθμό των NK ή τον αύξησε, και όταν μειωνόταν ο αριθμός των NKCs αυξανόταν η λειτουργικότητα των NKCs.

Τα τελευταία και τα πιο ενδιαφέροντα πειραματικά δεδομένα καρκινοπαθών με συμπαγείς όγκους από το εργαστήριο της Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων είναι αυτά που οδηγούν σε μια διαφορετική προσέγγιση και σε μια καινοτομία όσον αφορά την υψηλή τεχνολογία και τεχνογνωσία, που είναι πρωτότυπη για τα Ελληνικά δεδομένα. Πιο συγκεκριμένα, και οι 8 ασθενείς καρκινοπαθείς τελικού σταδίου, με την έκθεση στα ΗΜΓΠ ραδιοφωνικών συχνοτήτων παρουσίασαν σημαντικότερη αύξηση του απόλυτου αριθμού και των NK καθώς και NKT κυττάρων και η λειτουργική τους δράση παρέμεινε σταθερή σε φυσιολογικά επίπεδα ή είχε ανοδική πορεία.

Το τελικό συμπέρασμα από την συγκεκριμένη εργασία είναι ότι ο έλεγχος της κυτταροτοξικής δράσης των NK λεμφοκυττάρων είναι σημαντικός δείκτης όσον αφορά τη διάγνωση και την πρόγνωση των καρκινοπαθών με πρωτοπαθείς όγκους, καθώς και για τον έλεγχο του θεραπευτικού σχήματος ουσιών ή φαρμάκων που χορηγούνται σε ασθενείς όταν υποβάλλονται σε θεραπευτικά πρωτόκολλα.



## SUMMARY

### **The role of NK cytotoxic cells and the antioxidants in cancer**

Ioannis John Toliopoulos

Laboratory of Experimental Physiology, Faculty of Medicine, University of Ioannina,  
45110 IOA, Greece

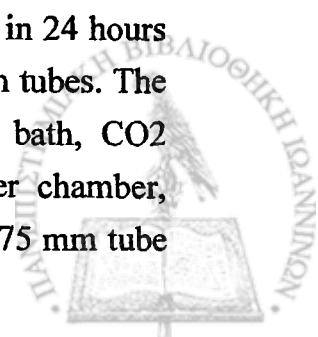
#### **Introduction**

A subpopulation of lymphocytes called Natural Killer cells, which have tremendous lethal capacity. Also, the cytotoxic T cells have the same ability and they are important leucocytes for the immune system. Natural Killer (NK) cells form the first line of defense against pathogens or host cells. These cells contain granules, like the cytotoxic T cells, and they are filled with potent specific antigen before their action. The NK cells, unlike cytotoxic T cells, do not recognize a specific antigen before their action. Both cytotoxic T cells and natural killer cells kill on contact. The killer binds to its target, aims its weapons, and then delivers a lethal burst of chemicals that produces holes in the target cell's membrane. Fluids seep in and leak out, and the cell bursts. The NK cells have evolved a mechanism (not clear at present) for mediating host defense against infection with viruses by having the ability to distinguish infected from uninfected cells. However, one possible mechanism may be that NK cells selectively kill target cells bearing low levels of MHC class I molecules on their surface. NK cells kill target cells by releasing a) perforin, b) granzymes, and c) by direct apoptosis. The study of the function of the NK cytotoxicity is very important and demonstrated in this thesis by in vitro and in vivo experiments.

#### **Material and Methods**

##### *Equipment and Reagents*

Twelve healthy volunteers donated blood, which had to be handled in 24 hours for preserving the vitality of the NK cells. Blood was collected in Lithium tubes. The necessary apparatus included the following: Pipettes with tips, water bath, CO<sub>2</sub> incubator at 37°C, digital thermometer, vortex mixer, hematocytometer chamber, coverslip or electronic counter, centrifuge with swinging buckets and 12x75 mm tube





carriers, flow cytometer with 488 nm excitation wavelength (argon – ion laser) from Becham Coulter and BD Corps., ice bath with cover, and disposable tubes of 15 and 50ml.

The reagents included prestained K562 target cells stored at  $-70^{\circ}\text{C}$ , complete medium, DNA staining solution, Isopaque-Ficoll solution, and sterile PBS. The supplements that was used for the in vitro experiments were the following: ascorbic acid, apigenin, carvacrol, resveratrol, vanadium cysteine, vanadium putrescine, thymole, rosmarinic acid, methyl-nitro-propane, PBN, aspirinic acid, genistein, platinum with poutrescine, di-boutyl-diascorbic tin, sulfurogluconic lead (in a concentration  $10^{-3}$  M), extracts of the plants Cupressus Sempervirens, viscum album, Morinda Citrifolia (noni), aloe vera, and the complex supplements of Ubichinon compositum, Glyoxal compositum, Katalysatoren, Coenzyme compositum.

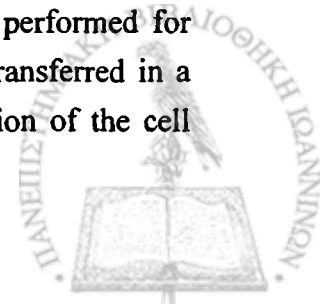
The in vivo experiments included one control group of 10 healthy individuals aged from 30 to 70, and after administration of one gram of vitamin C and the juice of aloe vera, the number of NK and NK T cells was determined as well as the cytotoxic activity of NK cells. On the other hand, a group of cancer patients were submitted others to mabthera therapy, one to velcade, a suppressor of proteosomes, and one to melfalane and prednizoolne. Their NK and NK T cells was determined and the cytotoxic activity of the NKCs before and after the therapy. Finally, eight end-stage cancer patients with solid tumors from the Laboratory of Physiology, Medical Faculty of Ioannina were exposed to resonant radiofrequency EMFs emitted by radiofrequency generator named MULTI CHANNEL DYNAMIC EXITER 100 V1 (MCDE) invented by K. Havelas and collaborators, which has been certified by the International Committee of Atomic Energy (E.K.E.F.E DEMOKRITOS, Athens Greece) for its safe use in humans and animals, and were detected for the number of NK, NK T cells and the cytotoxicity of the NKCs before, during, and after the exposure.

#### *Methodology of the NK Cytotoxicity Assay*

This method included four steps: a) isolation of effector cells (include PBMCs containing the NK cells), b) thawing of K562 target cells, c) flow cytometric cytotoxicity assay, and d) flow cytometric analysis.

In the first step, 5ml of collected heparinized blood was placed carefully in a 15ml test tube, which was filled with 5ml of Ficoll solution. Centrifugation for 20 min at  $700 \times g$  at room temperature followed, and then collection of the mononuclear cell layer from the interface using a clean serological pipette. Final task was to determine the cell concentration and adjust it at  $5 \times 10^6$  cells per ml in complete medium.

In the second step, a rapid thawing of K562 target cells was performed for optimal recovery of viable cells. Then rapidly the target cells were transferred in a 50ml tube containing 50ml of complete medium. After a centrifugation of the cell



suspension at 120 x g for 5 min, the supernatant was discarded and finally the target cells were counted and adjusted in a concentration of  $1 \times 10^5$  cells per ml in complement medium.

In the third step, effector cells were mixed with K562 target cells in the desired E:T ratios ranging from 50:1 to 12.5:1. Effector cells and target cells were incubated in a final volume of 200 $\mu$ l. One sample was used as control because only target cells were placed in one sample. One sample was used as blank because there was no supplement, and 50 $\mu$ l the above antioxidants and extracts of plants were put in the tubes. Finally, the tubes were incubated in a CO<sub>2</sub> chamber for four hours.

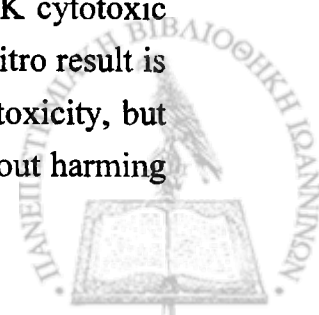
In the final step, 50 $\mu$ l of DNA staining solution was added after incubation, and then the samples were analyzed in the flow cytometer.

#### *Determination of NK and NK T cell population*

In six falcon tubes, 20  $\mu$ l of reagent was put of each monoclonal antibody. Then 100  $\mu$ l of total blood was put to each tube. Then, incubation followed in dark place for 15min in room temperature. In each tube, 2ml of lytic reagent was added, and again tubes remained in dark place for 10 minutes. After 5 min of centrifugation, the supernatant was decanted, 500 $\mu$ l of PBS was added and immediately followed the analysis of flow cytometry.

## Results

The in vitro results were very interesting because there were investigated supplements that increased the NK cytotoxicity significantly. There were substances that increased the NK function in all three concentrations such as ascorbic acid, resveratrol, vanadium-cysteine, methyl-nitroso-prapane, and the extracts of the plants *Morinda Citrifolia*, *Cupressus Semprevirens*, and *Viscum Album* could be characterized as strong antioxidants. Supplements such as genistein, vanadium-poutrescine, sulfuglucolic lead contribute to high immunomodulation in the ratios 12.5:1 and 25:1, and no significant change in the 50:1 ratio. On the other hand, substances like apigenin, thymole, and PBN indicated high increase of NK cytotoxicity in concentrations 25:1, and 50:1, but the cytotoxic activity in the 50:1 ratio was stable. Weaker antioxidants can be characterized substances such as rosmarinic acid, aspirinic copper, diboutyl-disascorbic tin, and the extract of the plant aloe vera. The complex supplements such as Glyoxal Compositum, Ubichinon Compositum, Katalysatoren και Coenzyme Compositum caused lower NK cytotoxic activity compared to the other supplements. Moreover, the interesting in vitro result is the supplement of Noni premium, which does not cause increase in cytotoxicity, but rather kills directly the cancer cell lines in an average of 85 percent, without harming the effector cells.



The in vivo data showed that six of 10 healthy volunteers indicated serious increase of cytotoxicity of the NK cells after the administration of aloe vera and vitamin C, but no increase was noted in the number of the NK and NKT cells. On the other side, the therapeutic approach with chemotherapy and monoclonal antibodies indicated that the presence of antibodies causes in a way the stimulation of the bone marrow besides the age of the patient, but no standard conclusions can be drawn about the NK cytotoxic activity. Furthermore, Velcade that was administered in a patient, on the one hand, it caused the decrease of the NK cytotoxicity, but on the other hand, the number of NK and NKT remained stable and high up to 21 percent. Also, the therapy with melfalane and prednisolone caused the lowering of the number of NK and NKT cells as low as three percent. However, the most important and encouraging results are the one with solid tumors. Specifically, the 8 end-stage cancer patients showed high increase in numbers of the NK and NKT cells and the cytotoxicity of the NK cells increased or remained stable.

### **Discussion**

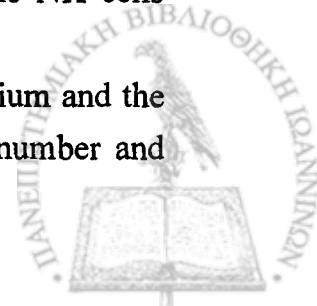
The most important parameter about the godgiven NK cells is that they have the capability to activate and suppress when is necessary their receptors in order to keep in balance the immune system. The major issue to be visualized in this report is that the number of the NK and NKT cells is a complete different marker from the cytotoxicity of the NK cells. This difference had been demonstrated with different kinds of individuals in vivo and the conclusion that was drawn is that there may be circumstances that the number of NK and NKT was high but the NK cytotoxic activity was low and vice versa. Another encouraging note in this study is the methodology of quantification of NK cytotoxicity assay. This technique can be used to investigate modified NK function found in various disorders and to evaluate the effects of drugs on NK activity. Moreover, the NK cell cytotoxicity can be used as a prognostic value for the probability of developing metastasis in patients with primary tumors. Therefore, stability of the immune system will be remained and attacks will be prevented of foreign invaders. Also, it is important to be mentioned that this technique has been demonstrated with success since 2004 in various scientific conferences in Hellenic and international conferences with oral and poster presentations respectively.

### **Conclusions**

Our investigation indicates that:



- 1) The antioxidant substances are important immunomodulator factors in the action of the NKCs, but they play less or none in the alteration of their absolute number by the stimulation of bone marrow.
- 2) Resveratrol, vanadium-cystein, methyl-nitrozo-propane, and the extracts of the plants *Morinda Citrifolia*, *Cupressus Semprevirens*, and *Viscum Album* could be considered strong antioxidants since they caused important stimulation in the NKCs in the 12.5:1, 25:1 and 50:1 ratios, respectively.
- 3) Apipenin, thymole, and PBN indicated high increase in cytotoxicity of NKCs in vitro in 25:1, 50:1 ratios, but the cytotoxic action was stable in the 12.5:1 ratio, which means that for more action the existance of higher number of NKCs is necessary.
- 4) Moderate antioxidants can be characterized rosmarinic acid, aspirinic copper, diboutyl-disascorbic tin, and the extract of *Aloe Vera*, which show increased cyttotoxic action of the NKCs not as high as the substances mentioned above.
- 5) Platinum demolishes literary both cancer and effector cells in vitro in way that it was even impossible for the nuclei to be collected and visualized by the flow cytometer.
- 6) There are complex supplements that don't cause immunomodulation, but kill directly cancer cells in vitro such as *Noni premium*.
- 7) Vanadium-poytrescine, sulfurglyconic lead, and genistein indicated increase in the ratios 12.5:1 and 25:1, while no increase noted in the 50:1 ratio in vitro, which means that from these supplements could benefit patients with low number of NKCs.
- 8) The administration of vitamin C and the extract of *Aloe Vera* causes immunomodulation independently of the patient's age without any increase in number of NK and NKT cells.
- 9) *Velcade (Bortezomib)*, as observed caused the decrease in NK function in the three ratios, and on the other hand the number of NK and NKT cells remained stable and in high levels around 21 percent in vivo.
- 10) Thy therapy with *melfalane* and *prednizolone* caused serious decrease of the number of NK and NKT cells and the result was the very low level of those cells which was around 3 percent in vivo.
- 11) The presence of monoclonal antibodies was catalytic in combination with chemotherapy because in most cases the number of NK cells was increased and when this number was decreased, the cytotoxic action of the NK cells increased gradually.
- 12) The administration of vitamins C, B, E, catotene, vanadium, selenium and the phenomenon of bioresonance caused significant increase in the number and



the cytotoxicity of the NK cells in patients with compact tumors and metastases.

13) The role of NK cells is important in diagnosis as well as in the prognostic of serious conditions as cancer.

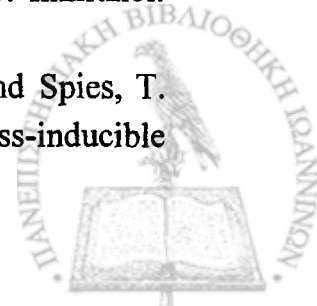
14) It is obvious that the findings of the present study do not indicate use of antioxidants or electromagnetic treatment in patients with malignant diseases, however they provide substantial indications interpreting the beneficial effects of these methods on cancer patients and are expected to potentially contribute to the application of these experimentally investigated methods in contemporary medicine.

**Key words:** NK cells, target cells, antioxidants, bioresonance, flow cytometry, Mabthera, chemotherapy



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

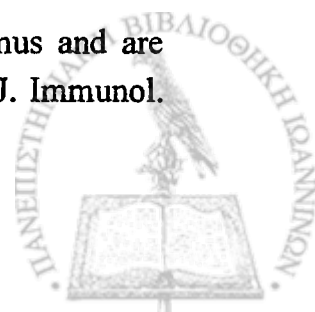
- Abo, T., Cooper M. D. and Balch, C. M. Characterization of HNK-1(+) (Leu-7) human lymphocytes. I. Two distinct phenotypes of human NK cells with different cytotoxic capability. *J. Immunol.* 1982; 129:1752.
- Abo, T., Cooper M. D. and Balch, C. M. Postnatal expansion of the natural killer and killer cell population in humans identified by the monoclonal HNK-1 antibody. *J. Exp. Med.* 1982; 155:321.
- Albertsson, A. Basse A, Hokland, M et al. NK cells and the tumour microenvironment: implications for NK-cell function and anti-tumor activity. *Trends in Immunology* 2003, 24: 603-609.
- Allavena, P., Introna, M., Mangioni, C., and Mantovani, A. Inhibition of natural killer activity by tumor-associated lymphoid cells from ascites ovarian carcinoma. *JNCI, J. Natl. Cancer Inst.* 1981; 67:319.
- Allen SJ, Adair ER, Mylacraine K et al: Empirical and Theoretical Dosimetry in Support of Whole body resonant RF exposure in Human Volunteers. *Bioelectromagnetics* 2003; 24:502-509.
- Ando, I., and Tamaki, K. HNK-1 antibody reacts with peripheral nerves and sweat glands in the skin. *Br. J. Dermatol.* 1985; 113:75.
- Arase, H., Mocarski, E. S., Campbell, A. E., Hill, A. B., and Lanier, L. L. Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science* 2002; 296:1323-1326.
- Ault, K. A., and Springer, T. A. Cross-reaction of a rat-anti-mouse phagocyte-specific monoclonal antibody (anti-MAC-1) with human monocytes and natural killer cells. *J. Immunol.* 1981; 126:359.
- Babcock, G. F., and Phillips, J. H. Human NK cells: Light and electron microscopic characteristics. *Surv. Immunol. Res.* 1983; 2:88.
- Balaji, KN., Schaschke, N., Machleidt, W., Catalfamo, M., Henkart, PA. Surface acthepsin B protects cytotoxic lymphocytes from self-destruction after degranulation. *J. Exp. Med.* 2002; 196:493-503.
- Ball, E. D., Sorenson, G. D., and Pettengill, O. S. Expression of myeloid and major histocompatibility antigens on small cell carcinoma of the lung cell lines analysed by cytofluography: Modulation by gamma-interferon. *Cancer Res.* 1986; 46:2335.
- Barlozzari, T., Leohardt, J., Wiltout, R. H., and Herberman, R. B. Direct evidence for the role of LGL in the inhibition of experimental tumor metastases. *J. Immunol.* 1985; 134:2783.
- Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J. H., Lanier, L. L. and Spies, T. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 1999; 285:727-729.



- Baumann, M. A., Milson, T. J., Patrick et al. Correlation of circulating natural killer cell count with prognosis in large cell lymphoma. 1986; 57:2309-2312.
- Bear, JL, Gray, HB., Rainen, L., Chang, I., Howard, R., Serio, G., Kimbal, A. Interaction of Rhodium (II) carboxylates with molecules of biologic importance. *Cancer Chemother. Rep.* 1975; 59:611.
- Beller, D. L., Springer, T. A., and Schreiber, R. D. Anti-Mac-1 selectively inhibits the mouse and human type three complement receptor. *J. Exp. Med.* 1982; 156:1000.
- Bendelac, A., Rivera, MN., Park, SH., Roark, JH. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu. Rev. Immunol.* 1997; 15:535-62.
- Biondi, A., Allavena, P., Rossi, V., Rambaldi, A., and Mantovani, A. Expression of the T cell receptor delta gene in natural killer cells. *J. Immunol. Res.* 1989; 1:7.
- Biron, CA., Brossay, L. NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections. *Curr. Opin. Immunol.* 2001; 13:458-464.
- Bloom, B. R. Natural killers to rescue immune surveillance? *Nature (London)* 1982; 300: 214.
- Braud, V. M. et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B, and C. *Nature* 1998; 391:795-799.
- Braun, P. E., Frail, D. E., and Latov, N. Myelin-associated glycoprotein is the antigen for a monoclonal IgM in polyneuropathy. *J. Neurochem* 1982; 39:1261.
- Breard, J. E., Reinherz, L., Kung, P. C., Goldstein, G., and Schlossman, S. F. A monoclonal antibody reactive with peripheral blood monocytes. *J. Immunol.* 1980; 124:1943.
- Brennan, J., Lemieux, S., Freeman, J. D., Mager, D. L., and Takei, F. Heterogeneity among Ly-49C natural killer (NK) cells: characterization of highly related receptors with differing functions and expression patterns. *J. Exp. Med.* 1996; 184:2085-2090.
- Brooks, C. F., and Moore, M. Presentation of a soluble bacterial antigen and cell-surface alloantigens by large granular lymphocytes (LGL) in comparison with monocytes. *Immunology* 1986; 58:343.
- Brooks, C. G. reversible induction of natural killer cell activity in cloned murine cytotoxic T lymphocytes. *Nature (London)* 1983; 305:155.
- Brooks, C. G., Urdal, D. L., and Henney, C. S. Lymphokine-driven 'differentiation' of cytotoxic T-cell clones into cells with NK-like specificity: Correlations with display of membrane macromolecules. *Immunol. Rev.* 1983; 72:43.
- Brown, M. H., Boles, K., van der Merwe, P. A., Kumar, V., Mathew, P. A., and Barclay, A. N. 2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48. *J. Exp. Med.* 1998; 188:2083-2090.
- Bunn, P. A., Jr., Linnoila, I., Minna, J. D., Carney, D., and Gazdar, A. F. Small cell lung cancer, endocrine cells of the fetal bronchus, and other neuroendocrine cells express the Leu-7 antigenic determinant present on natural killer cells. *Blood* 1985; 65:764.
- Calabi, F., Milstein, C. The molecular biology of CD1. *Semin. Immunol.* 2000; 12:503-9.



- Calvo, C. F., Boumsell, L., Kolb, J. P., Laffy, B., Bernard, A., and Senik, A. Preferential elimination of NK and CTL functions by anti-D44 monoclonal antibody. *J. Immunol.* 1984; 132:2345.
- Cambiaggi, A., Verthuy, C., Naquet, P., Romagne, F., Ferrier, P., Biassoni, R., Moretta, A., Moretta, L., and Vivier, E. Natural killer cell acceptance of H-2 mismatch bone marrow grafts in transgenic mice expressing HLA-Cw3 specific killer cell inhibitory receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997; 94:8088-8092.
- Cameron, E., Pauling, L. Ascorbic acid and the glycosaminoglycans. An orthomolecular approach to cancer and other diseases. *Oncology* 1973; 27:181.
- Cameron, E., Pauling, L. The orthomolecular treatment of cancer. The role of ascorbic acid in host resistance. II. Clinical trial of high dose ascorbic acid supplements in advanced human cancer. *Chem. Biol. Interact.* 1974; 9:285.
- Catalfano, M., Henkart, PA. Perforin and the granule exocytosis cytotoxicity pathway. *Curr. Opin. Immunol.* 2003; 15:522-527.
- Caulfield, J. P., Hein, A., Schmidt, R. E., and Ritz, J. Ultrastructural evidence that the granules of human natural killer cells clones store membrane in a nonbilayer phase. *Am. J. Pathol.* 1987; 127:305.
- Cerottini, J. C., and Brunner, K. T. Cell mediated cytotoxicity, allograft rejection and tumor immunity. *Adv. Immunol.* 1974; 18:67.
- Cerwenka, A & Lanier, L. L. Ligands for natural killer cell receptors: redundancy or specificity. *Immunol. Rev.* 2001; 181:158-169.
- Chalifour, A., Roger, J., Lemieux, S., and Duplay, P. Receptor/ligand avidity determines the capacity of Ly49 inhibitory receptors to interfere with T-cell receptor-mediated activation. *Immunology* 2003; 109:58-67.
- Chiu, YH., Rark, SH., Benlagha, K., Forestier, C., Jayawardena-Wolf, J., Savage, PB., Teyton, L., Bendelac, A. Multiple defects in antigen presentation and T cell development by mice expressing cytoplasmic tail-truncated CD1d. *Nat. Immunol.* 2002; 3:55-60.
- Ciapparell, J., Retief, D., Fatti, L. The effect of zinc on DMBA induced salivary gland tumors in the albino rat. *S. Afr. J. Med. Sci.* 1972; 37:85.
- Clark, R., Griffiths, GM. Lytic granules, secretory lysosomes and disease. *Curr. Opin. Immunol.* 2003; 15:522-527.
- Clarkson, S. B., and Ory, P. A. CD16. Developmentally regulated IgG Fc receptors on cultured human monocytes. *J. Exp. Med.* 1988; 167:408.
- Clayberger, C., Krensky, AM. Granulysin. *Curr. Opin. Immunol.* 2003; 15:560-565.
- Coles, M. C., McMahan, C. W., Takizawa, H., and Raulet, D. H. Memory CD8 T lymphocytes express inhibitory MHC-specific Ly49 receptors. *Eur. J. Immunol.* 2000; 30:236-244.
- Coles, MC., Raulet, DH. NK1.1+ T cells in the liver arise in the thymus and are selected by interactions with class I molecules on CD4+ CD8+ cells. *J. Immunol.* 2000; 164:2412-8.





- Cooper, M. A. Et al. Human natural killer cells : a unique innate immunoregulatory role for the CD56<sup>bright</sup> subset. *Blood* 2001; 97:3146-3151.
- Copper, MA., Bush, JE., Fehniger, TA., VanDeusen, JB., Waite, RE., Liu, Y., Caligiuri, MA. In vivo evidence for a dependence on interleukin 15 for survival of natural killer cells. *Blood* 2002; 100:3633-3638.
- Crimm, E. A., Mazumder, A., Zhang, H. Z., and rosenberg, S. A. Lymphokine-activated killer cells phenomenon. Lysis of natural killer resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1982; 155:1823.
- Cui, J., Shin, T., Kawano, T., Sato, H., Kondo, E., Toura, I., Kaneko, Y., Koseki, H., Kanno, M., Taniguchi, M. Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science* 1997; 278:1623-6.
- Cunningham-Rundles, S., Filippa, D. A., Braun, D. W., Antonelli, P., and Ashikari, H. Natural cytotoxicity of peripheral blood lymphocytes and regional lymph node cells in breast cancer in women. *JNCI, J. Natl. Cancer. Inst.* 1981; 67:585.
- Curfs, JH., Meis, JF., Hoogkamp-Korstanje, JA. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clin. Microbiol. Rev.* 1997; 10:742-780.
- Δασκάλου ΤΑ. Μελέτη των επιδράσεων μεταβολικών προϊόντων των κατεχολαμινών στην ενεργοποίηση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Διδακτορική διατριβή. Εργαστήριο Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, 2004
- Daniels, K. A., Devora, G., Lai, W. C., O'Donnell, C. L. Bennet, M., and Welsh, R. M. Murine cytomegalovirus is regulated by a discrete subset of natural killer cells reactive with monoclonal antibody to Ly49H. *J. Exp. Med.* 2001; 194:29-44.
- Dasgupta T et al. Chemomodulation of carcinogen metabolizing enzymes, antioxidant profiles and skin and forestomach papillomagenesis by *Spirulina platensis*. *Mol Cell Biochem* 2001; 226:27-38.
- dell-Casa-Alberighi, O., Nobile-Orazio, E., Bonara, P., Hu, C., Spagnol, G., Radelli, L., and Scorza-Smeraldi, R. NK cells in patients with peripheral neuropathy and IgM monoclonal protein reacting with the myelin-associated glycoprotein (MAG). *J. Neuroimmunol.* 1988; 18:207.
- Desai, ID. Methods of analysis of Vitamin E in animals tissues, in: *Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine, Vol III.* Miquel J, Quintanilha AI, Weber H (eds) 1989. CRC Press, Florida pp. 247-252.
- Diefenbach, A., Jamieson, A. M., Liu, S. D., Shastri, N., and Roulet, D. H. Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nat. Immunol.* 2000; 1:119-126.
- Difenbach, A. and Raulet, D. H. The innate immune response to tumors and its role in the induction of T-cell immunity. *Immunol. Rev.* 2002; 188:9-21.
- Dokum, A. O. et al. Specific and nonspecific NK cell activation during infection. *Natural Immunol* 2001, 2: 951-956.
- Dorfman, J. R. and Raulet, D. H. Major histocompatibility complex genes determine natural killer cell tolerance. *Eur. J. Immunol.* 1996; 26:151-155.



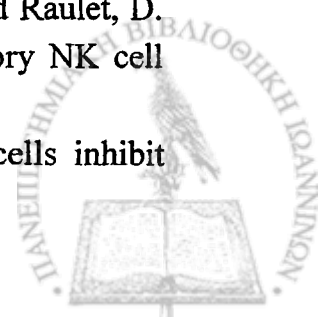
- Dorfman, J. R. and Roulet, D. H. Major histocompatibility complex genes determine natural killer cell tolerance. *Eur. J. Immunol.* 1996; 26:151-155.
- Eberl, G., Fehling, HJ., von Boehmer, H., MacDonald, HR., Absolute requirement for the pre-T cell receptor alpha chain during NK1.1+ TCRalphabeta cell development. *Eur. J. Immunol.* 1999; 29:1966-71.
- Eberl, G., Lowin-Kropf, B., MacDonald, HR. Cutting edge:NKT cell development is selectively impaired in Fyn-deficient mice. *J. Immunol.* 1999; 163:4091-4.
- Επιτροπή Ερευνών (ΕΕ) Παν/μίου Ιωαννίνων. Αρ. έγκρισης προγράμματος 62/573, 2004.
- Εθνική Επιτροπή Δεοντολογίας (ΕΕΔ). Αρ. Πρωτ. 15217 /3-3-2006.
- Eijssvoogel, V. P., Koring, L., De Groot-Koo, Y. L., Van Rood, J. J., Van Leenmen, A., and Dutoit, E. D. Mixed lymphocyte culture and HLA. *Transplant. Proc.* 1972; 4: 199.
- Elewaut, D., Brossay, L., Santee, SM., Naidenko, OV., Burdin, N., De Winter, H., Matsuda, J., Ware, CF., Cheroutre, H., Kronenberg, M. Membrane lymphotoxin is required for the development of different subpopulations of NKT cells. *J. Immunol.* 2000; 165:671-9.
- Elewaut, D., Kronenberg, M. Molecular biology of NKT cell specificity and development. *Semin. Immunol.* 2000; 12:561-8.
- Eremin, O., Coombs, R. R., and Ashby, J. Lymphocytes infiltrating human breast cancers lack NK cells activity and show low levels of NK cell activity. *Br. J. Cancer* 1981; 44:166.
- Fahlen, L., Khoo, N. K., Daws, M. R., and Sentman, C. L. Location-specific regulation of transgenic Ly49A receptors by major histocompatibility complex class I molecules. *Eur. J. Immunol.* 1997; 27:2057-2065.
- Fehniger, TA., Caligiuri, MA. Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood* 2001; 97:14-32.
- Fehniger, TA., Shah, MH., Turner, MJ., VanDeusen, JB., Whitman, SP., Cooper, MA., Suzuki, K., Wechser, M., Goodsaid, F., Caliguri, MA. Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12 for the innate immune response. *J. Immunol.* 1999; 162:4511-4520.
- Fitzgerald-Bocarsly, P., Herberman, R., Hercend, T., Hiserodi, J., Kumar, V., Lanier, L., Ortaldo, J., Pross, H., Reynolds, C., Welsh, R., and Wigzell, H. A definition of natural killer cells. *Immunol Today* 1988; 9:292.
- Fleit, H. G., Wright, S. D., and Unkeles, J. C. Human neutrophil Fc receptor distribution and structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1982; 79:3275.
- French R. Yokoyana W. Natural Killer cells and viral infections. *Current Opinion in Imuunology* 2003, 15: 45-51.
- Frey, M. et al. Differential expression and function of L-selectin on CDbright and CD56dim natural killer cells subsets. *J. Immunol.* 1998; 161:400-408.



- Funaro, A., Bellone, G., Alessio, M., De Monte, L., Palestro, G., Matera, L., Caligaris-Cappio, F., and Malavasi, F. Recognition by monoclonal antibody CB02 of a surface molecule shared by B lymphocytes and a discrete large granular lymphocyte subset with cytotoxic activity. *Nat. Immun. Cell Growth Regul.* 1988; 7:106.
- Furukawa, H., Iizuka, K., Proussine-Laurent, J., Shastri, N., and Yokoyama, W. M. 2002. A ligand for the murine NK activation receptor Ly-49D: activation of tolerized NK cells from beta 2-microglobulin-deficient mice. *J. Immunol.* 2002; 169:126-136.
- Gadina, M., Ferguson, PR., Johnston, JA. New interleukins: are there any more? *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2003; 16:211-217.
- Gapin, L., Matsuda, JL., Surh, CD., Kronenberg, M. NKT cells derive from double-positive thymocytes that are positively selected by CD1d. *Nat. Immunol.* 2001; 2:971-8.
- George, T. C., Mason, L. H., Ortaldo, J. R., Kumar, V., and Bennet, M. Positive recognition of MHC class I molecules by the Ly49D receptor of murine NK cells. *J. Immunol.* 1999; 162:2035-2043.
- Germain, RN. T- cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nature Rev. Immunol.* 2002; 2:309-22.
- Ghoneum, M. Enhancement of Human Natural Killer Cell Activity by modified Arabinoxylane from rice bran. *Int. J. Immunotherapy* 1998; 14 (2):89-99.
- Ghoneum, M. Immunomodulatory and Anticancer properties of MGN-3, a modified xylose from rice bran, in 5 patients with breast cancer. Abstract, American Association for Cancer Research Special Conference: The Interface between basic and applied research. November, 1995, Baltimore, MD.
- Ghoneum, M., Manatalla, G. NK immunomodulatory function in 27 patients by MGN-3, a modified arabinoxylane from rice bran. Abstract, 87<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, April, 1996, Washington, DC.
- Godfrey, DI, Hammond, KJ, Poulton, LD, Smyth, MJ, Baxter, AG. NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol. Today* 2000; 21:573-83.
- Godin, I, & Curnano, A. The hare and the tortoise: an embryonic haematopoietic race. *Nature Rev. Immunol.* 2002; 2:593-604.
- Golub, S. H., Niitsuma, M., Kawate, N., Cochran, A., J., and Holmes, E. C. NK activity of tumor infiltrating and lymph node lymphocytes in human pulmonary tumors. In 'NK Cells and Other Natural Effector Cells' 1982; (R. B. Herberman, ed.), p. 1113. Academic Press, New York.
- Goping, IS., Barry, M., Liston, P., Sawchuk, T., Constantinescu, G., Michalak, KM., Shostak, I., Roberts, DL., Hunter, AM., Korneluk, R. et al. Granzyme B-induced apoptosis require both direct caspase activation and relief of caspase inhibition. *Immunity* 2003; 18:355-365.
- Gor, DO., Rose, NR., Greenspan, NS. Th1-Th2: a procrustean paradigm. *Nat. Immunol.* 2003; 4:503-505.



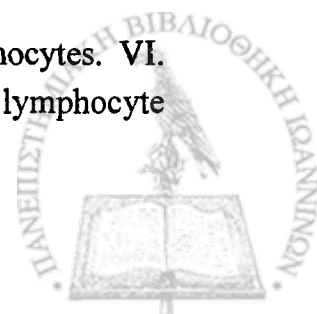
- Gorelik, E., Fogel, M., Feldman, M., and Segal, S. Differences in resistance of metastatic tumor cells and cells from local tumor growth to cytotoxicity of natural killer cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 1979; 63:1397.
- Govaerts H. Cellular antibodies in kidney transplantation. *J. immunol* 1960;85: 516.
- Gracie, JA., Robertson, SE., McInnes, IB., Interleukin-18. *J. Leukoc. Biol.* 2003 ; 73 :213-224.
- Graziano, R. E., Looney, r. S., Shen, L., and Fanger, M. W. FcγR-mediated killing by eosinophils. *J. Immunol.* 1989; 142:230.
- Greer, E. Alcoholic cirrhosis: complicated by polycythaemia vera and then myelogenous leukemia and tolerance of large doses of vitamin C. *Med Times* 1954; 82:765.
- Griffin, J. D., Hercend, T., Beveridge, R., and Schlossman, S. F. Characterization of an antigen expressed on human natural killer cells. *J. Immunol.* 1983; 130:247.
- Grisomm, CB. Magnetic Field Effects in Biology: A Survey of Possible Mechanisms with Emphasis on Radical-Pair Recombination. *Chem Rev* 1995; 95:3-24.
- Grossi, C. E., Cadoni, A., Zicca, A., Leprini, A., and Ferrarini, M. Large granular lymphocytes in human peripheral blood: Ultrastructural and cytochemical characterization of the granules. *Blood* 1982; 59:277.
- Gumperz, JE., Brenner, MB. CD1-specific T cells in microbial immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 2001; 13:19-25.
- Haller, O., Hansson, M., Kiessling, B., and Wigzell, H. Role of non-conventional natural killer cells in resistance against syngeneic tumor cells in vivo. *Nature (London)* 1977; 270:609.
- Haller, Q., and Wigzell, H. Suppression of natural killer cell activity with radioactive strontium: Effector cells are marrow dependent. *J. Immunol.* 1977; 118:1503.
- Hamilton, JA. GM-CSF in inflammation and autoimmunity. *Trends Immunol.* 2002; 23:403-408.
- Hammond, K., Cain, W. van, D., I., Godfrey, D. Three day neonatal thymectomy selectively depletes NK1.1+ T cells. *Int. Immunol.* 1998; 10:1491-9.
- Hammond, KJ, Pelikan, SB. Crowe NY, Randle-Barrett, E., Nakayama, T., Taniguchi, M., Smyth, MJ, van Driel, IR, Scollay, R., Baxter AG., Godfrey, DI. NKT cells are phenotypically and functionally diverse. *Eur. J. Immunol.* 1999; 29:3768-81.
- Hanke, T. and Raulet, D. H. Cumulative inhibition of NK cells and T cells resulting from engagement of multiple inhibitory Ly49 receptors. *J. Immunol.* 2001; 166:3002-3007.
- Hanke, T., Takizawa, H., McMahon, C. W., Busch, D. H., Pamer, E. G., Miller, J. D., Altman, J. D., Liu, Y., Cado, D., Lemonnier, F. A., Bjorkman, P. J., and Raulet, D. H. Direct assessment of MHC class I binding by seven Ly49 inhibitory NK cell receptors. *Immunity.* 1999; 11:67-77.
- Hanna, N., and Burton, R. C. Definitive evidence that natural killer cells inhibit experimental tumor metastasis in vivo. *J. Immunol.* 1981; 127:1754.



- Held, W., Cado, D., and Raulet, D. H. Transgenic expression of the Ly49A natural killer cell receptor confers class I major histocompatibility complex (MHC)-specific inhibition and prevents bone marrow allograft rejection. *J. Exp. Med.* 1996; 184:2037-2041.
- Held, W., Dorfman, J. R., Wu, M. F., and Roulet, D. H. Major histocompatibility complex class I-dependent skewing of the natural killer cell Ly49 receptor repertoire. *Eur. J. Immunol.* 1996; 26:2286-2292.
- Hellstrom, I., Hellstrom, K. E., Pierce, G. E., and Yang, J. P. S. Cellular and humoral immunity to different types of human neoplasms. *Nature (London)* 1968; 220: 1352.
- Herberman, R. b., Holden, H., T., Djeu, J. Y., Jerrells, T. R., Varesio, L., Tagliabue, A., White, S. L., Oehler, J. R., and Dean, J. H. Macrophages as regulators of immune responses against tumors. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1979; 121B:361.
- Herberman, R. B., Nunn, M. E., Holden, H. T., Staal, S., and Djeu, J. Y. Augmentation of natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic target cells. *Int. J. Cancer* 1977; 19: 555.
- Hercend, T., Griffin, J. D., Bensussan, A., Schmidt, R. E. Edson, M. A., Brennan, A., Murray, C., Daley, J. F., Schlossman, S.F., and Ritz, J. Generation of monoclonal antibodies to a human natural killer clone. Characterization of two natural killer-associated antigens, NKH1A and NKH2, expressed on a subset of large granular lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 1985; 75:932.
- Hercend, T., Ritz, S., Schlossman, S. F., and Reinherz, E. L. Comparative expression of T9, T10 and Ia antigens on activated human T cell subsets. *Hum. Immunol.* 1981; 3:247.
- Hersey, P., Edwards, A., Honeyman, M., and McCarthy, W., H. Low natural killer activity in familiar melanoma patients and their relatives. *Brit. J. Cancer* 1979; 40:113-122.
- Hersey, P., Edwards, A., McCarthy, W. & Milton, G. Tumor related changes and prognostic significance of natural killer cell activity in melanoma patients In. "NK cells and other Natural effector cells" (R. B. Herberman, ed./p. 1167, Academic Press, New York.
- Hersey, P., Honeyman, E. M., and McCarthy, W. H. Low natural-killer-cell activity in familiar melanoma patients and their relatives. *Br. J. Cancer* 1979; 40:113.
- Herzenberg, LA., De Rosa, SC. Monoclonal antibodies and the FACS: complementary tools for immunobiology and medicine. *Immunology Today* 2000; 21 (8):383-390.
- Heumann, D., Colombatti, M., and Mach, J. P. Human large granular lymphocytes contain an esterase activity usually considered as specific for the myeloid series. *Eur. J. Immunol.* 1983; 13:254.
- Hirahashi T et al. Activation of the human innate immune system by Spirulina: augmentation of interferon production and NK cytotoxicity by oral administration of hot water extract of *Spirulina platensis*. *Int Immunopharmacol* 2002; 2:423-34.



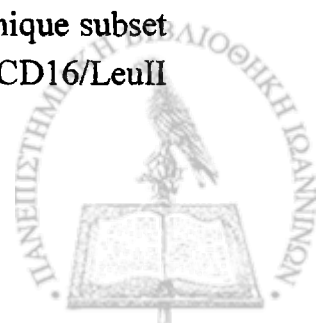
- Hong, S., Schrer, DC., Singh, N., Mendirata, SK., Serizawa, I., Koezuka, Y., Van Kaer, L. Lipid antigen presentation in the immune system: lessons learned from CD1d knockout mice. *Immunol. Rev.* 1999; 169:31-44.
- Hoshino, T., willtrout, R. H. & Young, H. A. IL-18 is a potent coinducer of IL-13 in NK and T cells: a new potential role for IL-18 in modulating the immune response. *J. Immunol.* 1999; 162:5070-5077.
- Hozumi, I., Sato, S., Tunoda, H., Inuzuka, T., Tanaka, M., Nishizawa, M., Baba, H., and Miyatake, T. Shared carbohydrate antigenic determinant between the myelin-associated glycoprotein (MAG) and lung cancers. An immunohistochemical study by an anti-MAG IgM monoclonal antibody. *J. Neuroimmunol.* 1987; 15:147.
- Huberman, E., and Callahan, M. E. Induction of terminal differentiation in human promyelocytic leukaemia cells by tumor promoting agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1979; 76:1293.
- Huhn, D., Huber C., and Gastl, G. Large granular lymphocytes: Morphological studies. *Eur. J. Immunol.* 1982; 12:985.
- Ibrahim, SF, van den Engh, G. High-speed cell sorting: fundamentals and recent advances. *Current Opinion in Biotechnology* 2003; 14:5-12.
- Ikawa, T., Kawamoto, H., Rujimoto, S. & Kalsura, Y. Commitment of common T/natural killer progenitors to unipotent T and NK progenitors in the murine fetal thymus revealed by a single progenitors in the murine fetal thymus revealed by a single progenitor assay. *J. Exp. Med.* 1990; 190:1617-1626.
- Introna, M., Allavena, P., Biondi, A., Colombo, N., Villa, A., and Mantovani, A. Defective natural killer activity within human ovarian tumors: Low numbers of morphologically defined effectors present in situ. *J. Natl. Cancer Inst.* 1983; 70:21.
- Islamov BI, Balabanova RM et al. Effect of bioresonance therapy on antioxidant system in lymphocytes in patients with rheumatoid arthritis. *Bull Exp Biol Med* 2002; 134 (3): 248-250.
- Isobe, M., Russo, G., Cuturi, M. C., et al. Human natural killer cells transcribe unrearranged T cell receptor  $\delta$  gene: Analysis and cloning of the transcripts. 1989;
- Itano, A., Robey, E., Highly efficient selection of CD4 and CD8 lineage thymocytes supports an instructive model of lineage commitment. *Immunity* 2000; 12:383-9.
- Jaleco, A. C. et al. Fetal liver contains committed NK progenitors, but is not a site for the development of CD34- cells into T cells. *J. Immunol.* 1997; 159:694-702.
- Jayawardena-Wolf, J., Benlagha, K., Chiu, YH, Mehr, R., Bendelac, A., CD 1d endosomal trafficking is independently regulated by an intrinsic CD1d-encoded tyrosine motif and by the invariant chain. *Immunity* 2001; 5:461-77.
- Johnson, H., Scorrano, L., Korsmeyer, SJ., Ley, TJ. Cell death induced by granzyme C. *Blood* 2003; 101:3093-3101.
- Jondal, M., and Pross, H. Surface markers on human B and T lymphocytes. VI. Cytotoxicity against cell lines as a functional marker for lymphocyte subpopulations. *Int. J. Cancer* 1975; 15: 596.



- Kadish, A. S. Doyle, A. T. Steinhauer, E. H., and Ghossein, N. A. Natural cytotoxicity and interferon production in human cancer: Deficient natural killer activity and normal interferon production in patients with advanced disease. *J. Immunol.* 1981; 127:1817.
- Kadish, AS, Doyle, A. T., Steinhauer, E.H. & Ghosslin, N.A. Natural cytotoxicity and interferon production in human cancer: Deficient natural killer activity and normal interferon production in patients with advanced disease. *J. Immunol* 1991; 127:1817.
- Kang, Y. H. Carl, M., Grimley, P. M., Serrate, S., and Yaffe, L. Immunoultrastructural studies of human NK cells. I. Ultracytochemistry and comparison with T cell subsets. *Anat. Rec.* 1987; 217:274.
- Kang, Y. H., Carl, M., Watson, L. P., and Yaffe, L. Immunoelectron microscopic identification of human NK cells by FITC-conjugated anti-Leu IIa and biotinylated anti-Leu-7 antibodies. *J. Immunol. Methods* 1985; 84:177.
- Karabetsos E. Measurements' report of electromagnetic radiation levels emitted from the device Multi Channel Dynamic Exciter 100 v. 1 Report of EEAE: MIA EEP 2, 15-11-2000, Karabetsos E, ed, Bulletin no 2, National Center of Physics Research "Dimokritos" publ, Athens, Greece, 2000.
- Karkabounas S., Kostoula OK, daskalou T. Anticarcinogenic and antiplatelet effects of carvacrol. *Exp Oncol* 2006; 28 (2):121-5.
- Karlhofer, F. M., Huziker, R., Reichlin, A., Margulies, D. H., and Yokoyama, W. M. Host MHC class I molecules in vivo expression of a NK cell receptor. *J. Immunol.* 1994; 153:2407-2416.
- Karp, CL., Willis-Karp, M. Complement and IL-12 yin and yang. *Microbes Infect.* 2001; 3:109-119.
- Kawano, T., Cui, J., Koezuka, Y., Tura, I., Kaneko, Y., Motoki, K., Ueno, H., Nakagawa, R., Sato, H., Kondo, E., Koseki, H., Taniguchi, M. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of Valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 1997; 278:1626-9.
- Kawano, T., Cui, J., Koezuka, Y., Tura, I., Kaneko, Y., Sato, H., Kondo, E., Harada, M., Koseki, H., Nakayama, T., Tanaka, Y., Taniguchi, M. Natural killer-like non-specific tumor cell lysis mediated by specific ligand-activated Valpha14 NKT cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998; 95:5690-3.
- Kay, H. D., and Horwitz, D. A. Evidence by reactivity with hybridoma antibodies for a probable myeloid origin of peripheral blood cells active in natural cytotoxicity and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J. Clin. Invest.* 1980; 66:847.
- Kiessling, R., Petransyi, G., Klein, G., and Wigzell, H. Non-T-cell resistance against a mouse Maloney sarcoma. *Int. J. Cancer.* 1976; 17:275.



- Kim CH, Johnston, B. Butcher, EC. Trafficking machinery of NKT cells: shared and differential chemokine receptor expression among V alpha 24 (+) V beta 11 (+) NKT cell subset with distinct cytokine-producing capacity. *Blood* 2002; 100:11-6.
- Kim, S. et al. In vivo developmental stages in murine natural killer cell maturation. *Nature Immunol.* 2002; 3:523-528.
- Kirson ED, Dbaly V, Tovarys F et al: Alternating electric fields arrest cell proliferation in animal tumor models and human brain tumors. *PNAS* 104(24):10152-10157,2007
- Kirson ED, Gurvich Z , Schneiderman R et al: Disruption of Cancer Cell Replication by Alternating Electric Fields .*Cancer Res* 64:3268-3295,2004.
- Kronenberg, M., Brossay, L., Kurepa, Z., Forman, J., Conserved lipid and peptide presentation functions of nonclassical class I molecules. *Immunol. Today* 1999; 20:515-21.
- Kronenberg, M., Gapin, L. The Unconventional Lifestyle of NKT cells. *Nature Rev. Immunol.* 2002; 2:557-68.
- Kruse, J., Mailhammer, R., Wernecke, H., Faissner, A., Sommer, I., Goridis, C., and Schacher, M. Neural cell adhesion molecules and myelin-associated glycoprotein share a common carbohydrate moiety recognized by monoclonal antibodies L2 and HNK-1. *Nature (London)* 1984; 311:153.
- Kumar, V., Ben-Ezra, J., Bennett, M. & Scennenfeld, G. Natural killer cells in mice treated with strontimu: normal target-binding cell numbers but inability to kill even after interferon administration. *J. Immunol.* 1979; 123:1832-1838.
- Lanier, L. L. Le, A. M., Civin, C. I., Loken, M. R., and Phillips, J. H. 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.* 1986; 136:4480.
- Lanier, L. L. Le. A. M., Dining, A., Evans, E. L., Krensky, A. M., Clayberger, C., and Philips, J. H. Expression of Leu-19 (NKH-1) antigen on IL-2 dependent cytotoxic and non-cytotoxic T cell lines. *J. Immunol.* 1987; 138:2019.
- Lanier, L. L. Natural killer cells: from no receptors to too many. *Immunity* 1997; 6:371-378.
- Lanier, L. L. NK receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 1998; 16:359-393.
- Lanier, L. L., and Phillips, J. H. What are natural killer cells? *ISI Atlas of Sci.: Immunol.* 1988. p. 15.
- Lanier, L. L., Cwirla, S., Federspiel, N., and Phillips, J. H. Human natural killer cells isolated from peripheral blood do not rearrange T cell antigen receptor chain genes. *J. Exp. Med.* 1986; 163:209.
- Lanier, L. L., Kipps, T. J., and Phillips, J. H. Functional properties of a unique subset of cytotoxic CD3+ T lymphocytes that express Fc receptors for IgG (CD16/LeuII antigen). *J. Exp. Med.* 1985; 162:2089.

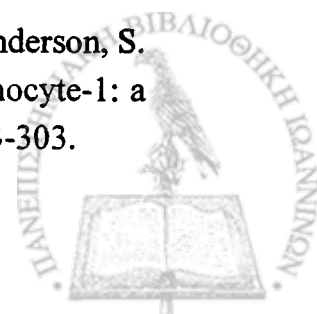




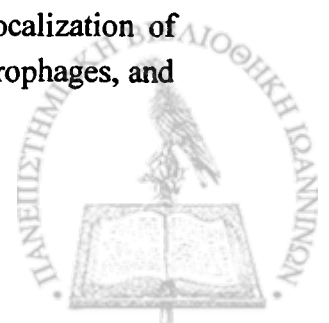
- Lanier, L. L., Le, A. M., Phillips, J. H. Warner, N. L., and Babcock, G. F. Subpopulations of human natural killer cells defined by expression of the Leu7 (HNK-1) and Leu11 (NK-15) antigens. *J. Immunol.* 1983; 131:1789.
- Lanier, L. L., Phillips, J., Hackett, J., Tutt, M., and Kumar, V. Natural killer cells: Definition of a cell type rather than a function. *J. Immunol.* 1986; 137: 2735.
- Lanier, L. L., Ruitenberg, J. J., and Phillips, J. H. Functional and biochemical analysis of CD16 antigen on natural killer cells and granulocytes. *J. Immunol.* 1988; 141:3478.
- Lauwerys, B. R., Garol, N., Renauld, J. C. & Houssiau, F. A. Cytokine production and killer activity of NK/T-NK cells derived with IL-2, IL-15, or the combination of IL-12 and IL-18. *J. Immunol.* 2000; 165:1847-1853.
- Lauwerys, BR., Renauld, JC., Houssiau, FA. Synergistic proliferation and activation of natural killer cells by interleukin 12 and interleukin 18. *Cytokine* 1999; 11:822-830.
- Lee, PT, Benlagha, K., Teyton, L., Bendelac, A. Distinct Functional Lineages of Human V (alpha) 24 Natural Killer Cells. *J. Exp. Med.* 2002; 195:625-36.
- Lee, S. H. Zafer, A., de Repentigny, Y., Kothary, R., Tremblay, M. L. Gros, P., Duplay, P., Webb, J. R. and Vidal, S. M. Transgenic expression of the activating natural killer receptor Ly49H confers resistance to cytomegalovirus in genetically susceptible mice. *J. Exp. Med.* 2003; 197:515-526.
- Leibowitz, S., Gregson, N. A., Kennedy, M., and Kahn, S. N. IgM paraproteins with immunological specificity of a schwann cell component and peripheral nerve myelin in patients with polyneuropathy. *J. Neurol. Sci.* 1983; 59:153.
- Leiden, J. M., Gottesdiener, K., et al. T-cell receptor gene rearrangement and expression in human natural killer cells: Natural killer activity is not dependent on the arrangement and expression of T-cell receptor alpha, beta, or gamma genes. *Immunogenetics* 1988; 27:231.
- Lieberman, J. Mechanisms of granule-mediated cytotoxicity. *Curr. Opin. Immunol.* 2003; 15:513-515.
- Lieberman, J., Fan, Z. Nuclear war: the granzyme A-bomb. *Curr. Opin. Immunol.* 2003; 15:553-559.
- Lin, C. C. Kuo, Y. C., Huang, W. C., and Lin C. Y. Natural killer activity in lung cancer patients. *Chest* 1987; 92: 1022-1024.
- Lizuka, K., Chaplin, DD., Wang, Y., Wu, Q., Pegg, LE., Yokoyama, WM, Fu., YX. Requirement for membrane lymphotoxin in natural killer cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999; 96:6336-40.
- Ljunggren HG, Karre K. In search of the "missing-self": MHC molecules and N K cell recognition. *Immunology Today* 1990, 11:237-244.
- London, L., Perussia, B., and Trinchieri, G. Induction of proliferation in vitro of resting human natural cells: Expression of surface activation antigens. *J. Immunol.* 1985; 134:718.



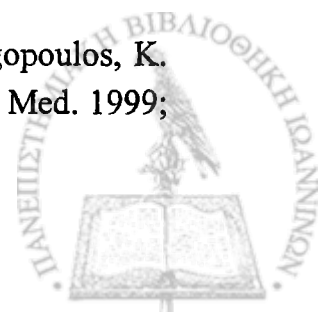
- Long, E.O. Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 1999; 17:875-904.
- Lucas, B., Germain, RN. Unexpectedly complex regulation of CD4/CD8 coreceptor expression supports a revised model for CD4+ CD8+ thymocyte differentiation. *Immunity* 1996; 5:461-77.
- Lutzova, E., Savary, C. A., and Herberman, R. B., Impaired NK cell profile in leukemia patients. In "Immunology of Natural Killer Cells" (E. Lotzova and R. Herberman, Eds), 1987, Vol. 2, pp.29-53, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Magnuson, N. S., Perryman, L. E., Wyatt, C. R., Mason, P. H., and Talmadge, J. E. Large granular lymphocyte from SCID horses develop potent cytotoxic activity after treatment with human recombinant interleukin 2. *J. Immunol.* 1987; 139: 61.
- Maiko, Olu, Gogoleva EF. Outpatient bioresonance treatment of gonathrosis. *Tek Arkh* 2000; 72 (12):50-53.
- Makoto, Mino. Analysis fo Tocopherol in Blood and Liver, In: *Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine, Vol III.* Miquel J, Quintanilha Al, Weber H (eds) 1989. CRC Press, Florida pp. 239-245.
- Makrigrannis, A. P., and Anderson, S. K. The murine Ly49 family: form and function. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warz.)* 2001; 49:47-50.
- Makrigrannis, A. P., Pau, A. T., Saleh, A., Winkler-Pickett, R., Ortaldo, J. R., and Anderson, S. K. Class I MHC-binding characteristics of the 129/J Ly49 repertoire. *J. Immunol.* 2001; 166:5034-5043.
- Malavasi, F., Bellone, G., Matera, L., Milanese, C., Ferreto, E., Funaro, A., Demaria, S., Caligaris-Cappio, F., Camussi, G., and Dellabona, P. Murine monoclonal antibodies as probes for the phenotypical, functional and molecular analysis of a discrete peripheral blood lymphocyte population exerting natural killer activity in vitro. *Hum. Immunol.* 1985; 14:87.
- Malavasi, F., Tetta, C., Funaro, A., Bellone, G., Ferrero, E., Collifranzone, A., Dellabona, P., Rusci, R., Matera, L., Camussi, G., and Caligaris-Cappio, F. Fc receptor triggering induces expression of surface-activation antigens and release of platelet-activating factor in large granular lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986; 83:2443.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sessa, C., Bollis, G., and Mangioni, C. Natural killer activity of lymphoid cells isolated from human ascitic ovarian tumors. *Int. J. Cancer* 1980; 25:573.
- Mark J. Smyth, Yoshihiro Hayakawa, Kazuyoshi Takeda, and Hideo Yagila. *Nature Reviews Cancer* 2002, 2: 850-861.
- Marti, GE., Stetler-Stevenson, M., Blessing, JJH., Fleisher, TA. Introduction to Flow Cytometry. *Seminars in Hematology* 2001; 38 (2) April.
- Mason, L. H. Orlando, J. R., Young, H. A., Kumar, V., Bennett, M., and Anderson, S. K. Cloning and functional characteristics of murine large granular lymphocyte-1: a member of the Ly-49 gene family (Ly-49G2). *J. Exp. Med.* 1995; 182:293-303.



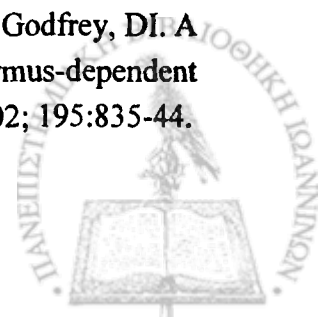
- Mason, L. H. Willette-Brown, J., Anderson, S. K., Gosselin, P., Shores, E. W., Love, P. E., Ortaldo, J. R., and McVicar, D. W. Characterization of an associated 16-kDa tyrosine phosphoprotein required for Ly-49D signal transduction. *J. Immunol.* 1998; 160:4148-4152.
- Masucci, M. G., Msucci, G., Klein, E., and Berthold, W. Target selectivity of interferon-induced human killer lymphocytes related to their Fc receptor expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986; 77:3620.
- Matera, L., santoli, D., Garbarino, G., Pegoraro, L., Bellone, G., and Pagliardi, G. Modulation of in vitro myelopoiesis by LGL: Different effects on early and late progenitor cells. *J. Immunol.* 1986; 136:1260.
- Mathew B et al. Evaluation of chemoprevention of oral cancer with *Spirulina fusiformis*. *Nutr Cancer* 1995; 24:197-202.
- Matsuda, JL., Kronenberg, M. Presentation of self and microbial lipids by CD1 molecules. *Curr. Opin. Immunol.* 2001; 13:19-25.
- Matthews, N., MacLaurin, B. P., and Clarke, G. N. Characterization of the normal lymphocyte population cytolytic to Burkitt's lymphoma cells of the EB2 cell line. *J. Exp. Biol. Med. Sci.* 1975; 53: 389.
- McGarry, r. C., Pinto, A., Hammersley-Straw, D. R., and Trevenen, C. L. Expression of markers shared between human natural killer cells and neuroblastoma lines. *Cancer Immunol. Immunother.* 1988; 27, 47.
- McVicar, D. W. and Burshtyn, D. N. Intracellular signalling by the killer immunoglobulin-like receptors and Ly49. *Sci. STKE.* 2001:RE1.
- Methenitou, G., Maravelias, C., Athansiadis, S., Dona, A. Koutselinis, A., Immunomodulative effects of aflavins and selenium on human NK cells. *Vet. Hum. Toxicol.* 2001; 43 (4): 232-4.
- Metkar, SS., Wang B., Ebbs, ML., Kim, JH., Lee, YJ., Raja, SM., Froelich, CJ. Granzyme B activates procaspase-3 which signals a mitochondrial amplification loop for maximal apoptosis. *J. Cell Biol.* 2003; 160:875-885.
- Miller, J. S. & McCullar, V. Human natural killer cells with polyclonal letin and immunoglobulin-like receptors develop from single hematopoietic stem cells with preferential expression of NKG2A and KIR2DL2/L3/S2. *Blood* 2001; 98:705-713.
- Miller, J. S. Alley, K. A. & McGlave, P. Differentiation of NK cells from human primitive marrow progenitors in a stroma-based long-term culture system: identification of a CD34-7- NK progenitors. *Blood* 1994; 83:2594-2601.
- Miller, S., Trinchieri, G., Perussia, B., and Kalhn, S. Murine and human monoclonal IgM antibodies with specificity for myelin-associated glycoprotein: Comparative binding to myelin and to lymphocytes. *J. Neuroimmunol.* 1985; 15:229.
- Mingeri, M. C. et al. In vitro proliferation and cloning of CD3 CD16- cells from human thymus precursors. *J. Exp. Med.* 1991; 174:21-30.
- Monahn, R. A., Dvorak, H. F., and Dvorak, A. M. Ultrastructural localization of nonspecific esterase activity in quinea pig and human monocytes, macrophages, and lymphocytes. *Blood* 1981; 58:1089.



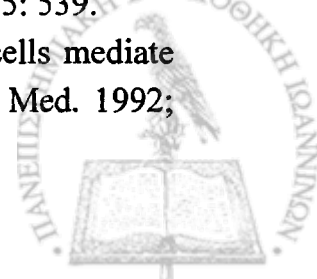
- Moody, DB., Porcelli, SA. CD1 trafficking: invariant chain gives a new twist to the tale. *Immunity* 2001; 15:861-5.
- Mooney, J. M., Klem, J., Wulfing, C., Mijares, L. A., Schwartzberg, P. L., Bennett, M., and Schatzle, J. D. The Murine NK Receptor 2B4 (CD244) Exhibits Inhibitory Function Independent of Signaling Lymphocytic Activation Molecule-Associated Protein Expression. *J. Immunol.* 2004; 173:2953-3961.
- Moretta A. Bottino C. et al. Receptors for HLA class I molecule in human natural killer cells. *Ann Rev Immunol* 1996, 14: 619-648.
- Moretta, A., Biassoni, R., Bottino, C., Mingari, M. C., and Moretta, L. Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity. *Immunol. Today* 2000; 21:228-234.
- Morgan, A. C., Jr., Schroff, R. W., Klein, R. A., McIntyre, R. F., Mason, A., Herberman, R. B., and Ortaldo, J. Occult (non-surface expression) of T, B, and monocyte markers in human large granular lymphocytes. *Mol. Immunol.* 1987; 24:117.
- Moy, P., Holmes, E., and Golub, S. Depression of natural killer cytotoxic activity in lymphocytes infiltrating human pulmonary tumors. *Cancer Res.* 1985; 45:57.
- Mrozek, E. Anderson, P. & Caligiuri, M. A. Role of interleukin-15 in the development of human CD56- natural killer cells from CD34- hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1996; 87:2632-2640.
- Murray, N., and Steck, A. J. Indication of a possible role in a demyelinating neuropathy for an antigen shared between myelin and NK cells. *Lancet* 1984; 1:711.
- Nabholz, M., Vives, J., Young, H. Meo, T., Miggiano, V., Rijnbeek, A., and Schreffler, D. C. Cell mediated cell lysis in vitro: Genetic control of killer cell production and target specificities in the mouse. *Eur. J. Immunol.* 1974; 4: 378.
- Nakagawa, K., Iwabuchi, K., Ogasawara, K., Ato, M., Kajiwara, M., Nishihori, H., Iwabuchi, C., Ishikura, H., Good, RA., Onoe, K. Generation of NK1.1+ T cell antigen receptor alpha/beta+ thymocytes associated with intact thymic structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1997; 94:2472-7.
- Nakamura, Y., Yamaruji, K. Antitumor activities of oxidized product of ascorbic acid. *Scientific bulletin of the faculty of Agriculture. Kyushu University* 1968; 23:119.
- Natarajan, K. Dimasi, N., Wang, J., Margulies, D. H., and Mariuzza, R. A. MHC class I recognized by Ly49 natural killer cell receptors. *Mol. Immunol.* 2002; 38:1023-1027.
- Ng, A. K., Indiveri, F., Pellegrino, M. A., Molinaro, G. A., Quaranta, V., and Ferrone, S. Natural cytotoxicity and antibody-dependent cellular cytotoxicity of human lymphocytes depleted of HLA-DR bearing cells with monoclonal HLA-DR antibodies. *J. Immunol.* 1980; 124:2336.
- Nichogiannopoulou, A., Trevisan, M., Naben, S., Friedrich, C. & Georgopoulos, K. Defects in hemopoietic stem cell activity in Ikaros mutant mice. *J. Exp. Med.* 1999; 190:1201-1214.



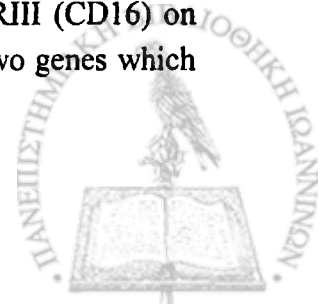
- Nocera, A., Caldoni, A., Zicca, A., Diprimio, R., Leprini, A., and Ferrarini, M. Receptors for the third complement component on a proportion of large granular lymphocytes from human peripheral blood. *Scand. J. Immunol.* 1982; 15:573.
- Oberg, L., Eriksson, M., and Sentman, C. L. Expression of Ly49A on T cells alters the threshold for T cell responses. *Eur. J. Immunol.* 2000; 30:2849-2856.
- Oberg, L., Eriksson, M., and Sentman, C. L. Expression of Ly49A on T cells alters the threshold for T cell responses. *Eur. J. Immunol.* 2000; 30:2849-2856.
- Ortaldo, J. R., Oldham, R. K., Cannon, G. C., and Herberman, R. B. Specificity of natural cytotoxic reactivity of normal human lymphocytes against a myeloid leukaemia cell line. *J. Natl. Cancer Inst. (U.S.)* 1977; 59: 77.
- Ortaldo, J. R., Sharrow, S. O., Timonen, T., and Herberman, R. B. Determination of surface antigens on highly purified human NK cells by flow cytometry with monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 1981; 127:2401.
- Orzechowski, RF., Gauteri, RF., Mann, DE. Effect of sodium cobaltnitrite and p-aminopropriophenone on the minimal carcinogenic dose 50 of methylcholanthrene on mouse epidermis. *J. Pharm. Sci.* 1965; 54:64.
- Pandolfi, F., Semenzato, G., De Rossi, G., Strong, D. M., Quinti, I., Pezzuto, A., Mandelli, F., and Aiuti, F. Heterogeneity of t-CLL defined by monoclonal antibodies in nine patients. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1982; 24:330.
- Pappenheim, A., and Ferrata, A. Uber die verschiedenen lymphoiden Zellformen des normalen und pathologischen Blutes. *Folia Haemat.* 1911; 10:78.
- Parish-Novak, J. et al. IL-21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature* 2000; 408:57-63.
- Parish-Novak, J., Foster, DC., Holly, RD., Clegg, CH. Interleukin-21 and the IL-21 receptor: novel effectors of NK and T cell responses. *J. Leukoc. Biol.* 2002; 72:856-863.
- Parrish-Novak, J., Dillon, SR., Nelson, A. et al. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature* 2000; 408:57-63.
- Passlick, B. et al. Posttraumatic splenectomy does not influence peripheral blood mononuclear cell subsets. *J. Clin. Lab. Immunol.* 1991; 34:157-161.
- Patek, P. O., and Collins, J. L. Tumor surveillance revisited: Natural cytotoxic (NC) activity deters tumorigenesis. *Cell Immunol.* 1988; 116: 240.
- Payne, C. M., and Glasser, L. Evaluation of surface markers on normal human lymphocytes containing parallel tubular arrays: A quantitative ultrastructural study. *Blood* 1981; 57:567.
- Peacock, C. D., Xu, W., Stepp, S. E., and Welsh, R. M. Dynamics of Ly49 expressing cytotoxic lymphocyte subsets in response to virus infection. *Microbes. Infect.* 2002; 4:1481-1490.
- Pellicci, DG., Hammond, KJ., Uldrich, AP., Baxter, AG., Smyth, MJ., Godfrey, DI. A natural killer T (NKT) cell developmental pathway involving a thymus-dependent NK1.1(-) CD4(+) CD1d-dependent precursor stage. *J. Exp. Med.* 2002; 195:835-44.



- Peritt, D. et al. Differentiation of human NK cells into NK1 and NK2 subsets. *J. Immunol* 1998; 161:5821-5824.
- Perlmann, P., and Holm, G. cytotoxic effect of lymphoid cells in vitro. *Immunol.* 1969;11:117.
- Peroussia, B., Acuto, O., Terhorst, C., Faust, J., Lazarus, R., Fanning, V., and Trinchieri, G. Human natural killer cells analysed by B73.1, a monoclonal antibody blocking FcR functions. II. Studies of B73.1 antibody-antigen interaction on the lymphocyte membrane. *J. Immunol.* 1983; 130:2142.
- Perussia, B. Ramoni, C., Anegon, I., Cuturi, M. C., Faust, J., and Trinchieri, G. Preferential proliferation of natural killer cells among peripheral blood mononuclear cells cocultured with B lymphoblastoid cells lines. *Nat. Immun. Cell Growth Regul.* 1987; 6:181.
- Perussia, B., and Trinchieri, G. Antibody 3G8, specific for the human neutrophil Fc receptor, reacts with natural killer cells. *J. Immunol.* 1984; 132:1410.
- Perussia, B., Fanning, V., and Trinchieri, G. A human NK and K cell subset shares with cytotoxic T cell expression of the antigen recognized by antibody OKT8. *J. Immunol.* 1983; 131:223.
- Perussia, B., Fanning, V., and Trinchieri, G. Phenotypic characterization of human natural killer and antibody-dependent killer cells as an homogeneous and discrete cell subset. In "NK Cells and Other Natural Effector Cells" (R. B. Herberman, ed), 1982; p. 39. Academic Press, New York.
- Perussia, B., Starr, S., Abraham, S., Fanning, V., and Trinchieri, G. Human natural cells analyzed by B73.1, a monoclonal antibody blocking Fc receptor functions. I. Characterization of the lymphocyte subset reactive with B73.1. *J. Immunol.* 1983; 130:2133.
- Perussia, B., Trinchieri, G., Jackson, A., Warner, N. L., Faust, J., Rumpoid, H., Kraft, D., and Lanier, L. L. the Fc receptor for IgG on human natural killer cells: Phenotypic, functional and comparative studies using monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 1984; 133:180.
- Perussia, B., Trinchieri, G., Lebman, D., Jankiewicz, J., Lnage, B., and Rovera, G. Monoclonal antibodies that detect differentiation surface antigens on human myelomonocytic cells. *Blood* 1982; 59:382.
- Pessina GP and Aldinucci. Pulsed Electromagnetic Fields Enhance the Induction of Cytokines by Peripheral Blood Mononuclear Cells Challenged with Phytohemagglutin. *Bioelectromagnetics* 1998; 19:445-451.
- Peter, H. H., Pavie-Fisher, J., Fridman, W. H., Aubert, G., Cesarini, J. P., Roubin, R., and Kourilsky, F. M. Cell mediated cytotoxicity in vitro of human lymphocytes against a tissue culture melanoma cell line (IGR3) *J. Immunol.* 1975; 115: 539.
- Phillips, J. H. et al. Ontogeny of human natural killer cells: fetal NK cells mediate cytolytic functions and express cytoplasmic CD3 $\epsilon$ ,  $\delta$ proteins. *J. Exp. Med.* 1992; 175:1055-1063.



- Phillips, J. H., and Babcock, G. f. NKP-15: A monoclonal antibody reactive against purified human natural killer cells and granulocytes. *Immunol. Lett.* 1983; 6:143.
- Porcelli, SA., Modlin, RL. The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annu. Rev. Immunol.* 1999; 17:297-329.
- Poswillo, DE., Cihen, B. Inhibition of carcinogenesis by dietary zinc. *Nature* 1971; 231:447.
- Prasthofer, F., Zarcone, D., and Grossi, C. E. Distinctive morphological features of human peripheral blood lymphocytes. *EOS-J. Immunol. Immuno-pharmacol.* 1988; 8:84.
- Prlic, M., Blazar, BR., Farrar, MA., Jameson, SC. In vivo survival and homeostatic proliferation of natural killer cells. *J. Exp. Med.* 2003; 197:967-976.
- Pross, H. E., and Herberman, R. B. Clinical application of natural killer cells. In 'Proceedings of the Fifth NK Workshop' 1989; (E. W. Ades and C. Lopez, eds). Karger, Basel.
- Pross, H. E., Baines, M. G., and Jondal, M. Spontaneous human lymphocyte-mediated cytotoxicity against tumor target cells. II. Is the complement receptor necessarily present on the killer cells? *Int. J. Cancer.* 1977; 20:353.
- Pross, H. F. The involvement of natural killer cells in human malignant disease. In "Immunobiology of Natural Killer Cells" 1986; (E. Lotzova and R.B. Herberman, eds.), Vol. 2. p.11. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Pross, H. F., and Baines, M. G. Alterations in natural killer cell activity in tumor-bearing hosts. In 'Immunobiology of Natural Killer Cells' (E. Lotzova and R. B. Herberman, eds), 1986; Vol. 1, p.57. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Pross, H. F., and Baines, M. G. Spontaneous human lymphocyte-mediated cytotoxicity against tumor target cells. I. The effect of malignant disease. *Int. J. Cancer* 1976; 18:593.
- Purtilo, D., Sakamoto, K., Saemundsen, A., et al., Documentation of Epstein-Barr virus infection in immunodeficient patients with life-threatening lymphoproliferative diseases by clinical, virological and immunopathological studies. *Cancer Res.* 1981; 41:4226-4235.
- Ranson, T. et al. IL-15 is an essential component for survival of NK cells. *Blood* 2002; 100:2633-2638.
- Raulet, D. H., Vance, R. E., and McMahon, C. W. Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. *Annu. Rev. Immunol.* 2001; 19:291-330.
- Raulet, D. H., Held, W., Correa, I., Dorfman, J. R., Wu, M. F., and Corral, L. Specificity, tolerance and developmental regulation of natural killer cells defined by expression of class I-specific Ly49 receptors. *Immunol. Rev.* 1997; 155:41-52.
- Raulet, D. H., Vance, R. E. & McMahon, C. W. Regulation of the natural killer cell repertoire. *Annu. Rev. Immunol.* 2001; 19:291-330.
- Ravetch, J. V., and Perussia, B. Alternative membrane form of Fc $\gamma$ RIII (CD16) on human NK cells and neutrophils: Cell-type specific expression of two genes which differ in single nucleotide substitutions. *J. Exp. Med.* 1989; 170:481.



- Reid, L., M., Minato, N., Gresser, I., Holland, J., Kadish, A., and Bloom, B. R. Influence of anti-mouse interferon serum on the growth and metastasis of tumor cells persistently infected with virus and of human prostatic tumors in athymic nude mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1981; 78:1171.
- Reynolds, C. W., and Foon, K. A. T $\gamma$ -lymphoproliferative disease and related disorders in humans and experimental animals: A review of the clinical, cellular, and functional characteristics. *Blood* 1984; 64:1146.
- Reynolds, C. W., and Ortaldo, J. R. Natural killer activity: The definition of a function rather than a cell type. *Immunol. Today* 1987; 8:172.
- Riccardi, C., Santoni, A., Barlozzari, T., Puccetti, P., and Herberman, R. B. In vivo natural reactivity of mice against tumor cells. *Int. J. Cancer* 1980; 25:475.
- Riese, R.J., Shi, G.P., Villadangos, J., Stetson, D., Driessen, C., Lennon-Dumenil, A.M., Chu, C.L., Naumov, Y., Behar, S.M., Ploegh, H., Locksley, R., Chapman, H.A. Regulation of CD1 function and NK1.1(+) T cell selection and maturation by cathepsin S. *Immunity*. 2001; 15:909-19.
- Ritz, J., Campen, T. J., Schmidt, R. E., Royer, H. D., Hercend, T., Hussey, R. E., and Reinherz, E. L. Analysis of T-cell receptor gene rearrangement and expression in human natural killer cells clones. *Science* 1985; 228:1540.
- Ritz, J., Schmidt, R. E., Michon, J., Hercend, T., and Schlossman, S. F. Characterization of functional surface structures on human natural killer cells. *Adv. Immunol.* 1988; 42: 181.
- Rogge, L., Ambrosio, D D., Biffi, M., Penna, G., Minetti, L.J., Presky, D.H., Adorini, L., Sinigaglia, F. The role of Stat4 in species-specific regulation of Th cell development by type I IFNs. *J. Immunol.* 1998; 161:6567-6574.
- Romagnani, S. The Th1/Th2 paradigm. *Immunol. Today* 1997; 18:263-266.
- Rosenau, W., and Moon, H. D. The specificity of the cytolytic effect of sensitized lymphoid cells in vitro. *J. Immunol* 1964; 93: 910.
- Rosenberg, S. Lymphokine activated killer cells: A new approach to immunotherapy of cancer. *JNCI, J. Natl. Cancer Inst.* 1985; 75:595.
- Rumpold, H., Kraft, D., Obexer, G., Bock, G., and Gebhart, W. A monoclonal antibody against a surface antigen shared by human large granular lymphocytes and granulocytes. *J. Immunol.* 1982; 129:1458.
- Rusthoven, J. J., Robinson, J. B., Kolin, A., and Pinkerton, P. H. The natural-killer-cell-associated HNK-1 (Leu-7) antibody reacts with hypertrophic and malignant prostatic epithelium. *Cancer (Philadelphia)* 1985; 56:289.
- Saemundsen, A. K., Berkel, A. I., Henle, W., et al., Epstein-Barr virus carrying lymphoma in a patient with ataxia telangiectasia. *Britt. Med. J.* 1981; 282:425-427.
- Saffiotti, U., Montesano, R., SellaKumar, A.R., Borg, S.A. Experimental cancer of the lung inhibition by vitamin A of the induction of tracheobronchial squamous cell tumors. *Cancer* 1967; 20:857.

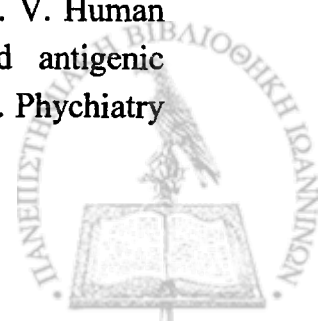




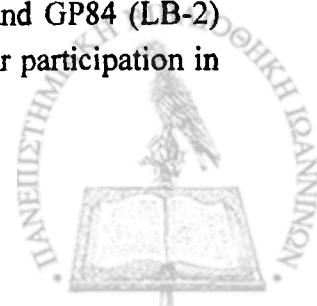
- Sakamoto, S., Ortaldo, J. R., and Young, H. A. Methylation patterns of the T cell receptor beta-chain gene in T cells, large granular lymphocytes, B cells, and monocytes. *J. Immunol.* 1988; 140:654.
- Saksela, E., Timonen, T., Ranki, A., and Hayry, P. Morphological and functional characterization of isolated effector cells responsible for human natural killer activity to fetal fibroblasts and to cultured cell line targets. *Immunol. Rev.* 1979; 44:71.
- Santoli, D., Trinchieri, G., and Koprowski, H. Cell-mediated cytotoxicity in humans against virus-infected target cells. II. Interferon induction and activation of natural killer cells. *J. Immunol.* 1978; 121:532.
- Santoli, D., Trinchieri, G., Moretta, L., Zmijewski, C. M., and Koprowski, H. Spontaneous cell-mediated cytotoxicity in humans. Distribution and characterization of the effector cells. *Clin. Exp. Immunol.* 1978; 33:309.
- Santoli, D., Trinchieri, G., Zmijewski, C., and Koprowski, H. HLA-related control of spontaneous and antibody-dependent cell-mediated cytotoxic activity in humans. *J. Immunol.* 1976; 117:765.
- Sato, H., Nakayama, T., Tanaka, Y., Yamashita, M., Shibata, Y., Kondo, E., Saito, Y., Taniguchi, M. Induction of differentiation of pre-NKT cells to mature Valpha14 NKT cells by granulocytes/macrophage colony-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999; 96:7439-44.
- Scalzo, A. A., Fitzgerald, N. A., Wallace, C. R., Gibbons, A. E., Smart, Y. C., Burton, R. C., and Shellam, G. R. The effect of the *Cmv-1* resistance gene, which is linked to the natural killer cell gene complex, is mediated by natural killer cells. *J. Immunol.* 1992; 149:581-589.
- Schatzle, J. D., Sheu, S., Stepp, S. E., Mathew, P. A., Bennett, M., and Kumar, V. Characterization of inhibitory and stimulatory forms of the murine natural killer cell receptor 2B4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999; 96:3870-3875.
- Schoni MH, Nikolaizik WH et al: Efficacy trial of bioresonance in children with atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; 112 (3):238-246.
- Schwarz, R. E. & Hiserodt, J. C. Effects of splenectomy on the development of tumor-specific immunity. *J. Surg. Res.* 1990; 48:448-453.
- Schwarz, R. E., Vujanovic, N. L., and Hiserodt, J. C. Lymphokine-activated killer cells in rats: Enhanced anti-metastatic activity of LAK cells purified and expanded by their adherence to plastic. *Cancer Res.* 1989; 49:1441.
- Seaman, W. E. Natural killer cells and natural killer T cells. *Arthritis Rheum.* 2000; 43:1204-1217.
- Seman, W. E., Sleisenger, M., Eriksson, E., and Koo, G. C. Depletion of natural killer cells in mice by monoclonal antibody to NK-1.1. Reduction in host defense against malignancy without loss of cellular or humoral immunity. *J. Immunol.* 1987; 138:4539.



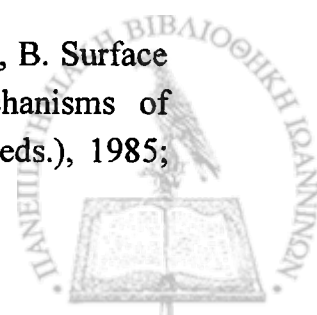
- Sentman, C. L., Hackett, J., Jr., Kumar, V., and Bennett, M. Identification of a subset of murine natural killer cells that mediates rejection of Hh-1d but not Hh-1b bone marrow grafts. *J. Exp. Med.* 1989; 170:191-202.
- Sentman, C. L., Kumar, V., and Bennet, M. Rejection of bone marrow cell allografts by natural killer cell subsets: 5E6+ cell specificity for Hh-1 determinant 2 shared by H-2d and H-2f. *Eur. J. Immunol.* 1991; 21:2821-2828.
- Shamberger, R.J. Inhibitory effect of vitamin A on carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* 1971; 47:667.
- Shamberger, R.J. Relationship of Selenium to cancer inhibitory effect of selenium on carcinogenesis. *J. Natl. Cacer. Inst.* 1970; 44:931.
- Shapiro, JR. Selenium and carcinogenesis. *Ann. NY. Acad. Sci.* 1972; 192:215.
- Sheppard, P., Kindsvogel, W., Xu, W., Henderson, K., Schlutsmeyer, S. et al. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat. Immunol.* 2003; 4:63-68.
- Shlbuye, A, Nagayoshi, K., Nakamura, K. & Nakauchi, H. Lymphokine requirement for the generation of natural killer cells from CD34- hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1995; 85:3538-3546.
- Simmons, D., and Seed, B. The Fc receptor of the natural killer cells is a phospholipids-linked membrane protein. *Nature (London).* 1988; 333:568.
- Sivori, S. et al. Early expression of triggering receptors and regulatory role of 2B4 in human natural killer cell precursors undergoing in vitro differentiation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2002; 99:4526-4531.
- Smyth, MJ., Crowe, NY., Hayakawa, Y., Takeda, K., Yagita, H., Godfrey, DI. NKT cells-conductors of tumor immunity? *Curr. Opin. Immunol.* 2002; 14:165-71.
- Smyth, MJ., Thia, KY., Street, SE., Cretney E., Trapani, JA., Taniguchi, M., Kawano, T., Pelikan, SB., Crowe, NY., Godfrey, DI. Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J. Exp. Med.* 2000; 191:661-8.
- Springer, T. A., Dustin, M. L., Kishimoto, T. K., and Marlin, S. D. The lymphocyte function-associated LFA-1, CD2, and LFA-3 molecules: Cell adhesion receptors of the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 1987; 5:223.
- Srirarm, S., and Lanier, L. NK cell function in a patient with IgM monoclonal antibody against myelin-associated glycoprotein. *Neurology* 1986; 36:566.
- Srskaar, D., Frre, O., Albrechtsen, D. & Stavem, P. Decreased natural killer cell activity versus normal natural killer cell markers in mononuclear cells from patients with smouldering leukemia. *Scand. J. Haematol.* 1986; 37:154.
- Steck, A. J., Murray, N., Meier, C., Page, N., and Perruisseau, G. Demyelinating neuropathy and monoclonal IgM antibody to myelin-associated glycoprotein. *Neurology* 1983; 33:19.
- Stoll, G., Schwendemann, G., Heininger, K., Steck, A. J., and Toyka, K. V. Human monoclonal anti-MAG antibody and anti-Leu 7 recognize shared antigenic determinants in peripheral nerve and spinal cord. *J. Neurol., Neurosurg. Phychiatry* 1985; 48:635.



- Strayer, D. R., Carter, W. A., and Brodsky, I., Familiar occurrence of breast cancer is associated with reduced natural killer cytotoxicity. *Breast Cancer Res. Treat.* 1986; 7:187-192.
- Strayer, D. R., Carter, W. A., Mayberry, S. D et al. Low natural cytotoxicity of peripheral blood mononuclear cells in individuals with high familial incidences of cancer. 1984; *Cancer Res* 44:370-374.
- Strengell, M., Matikainen, S., Siren, J., Lehtonen, A., Foster, D., Julkunen, I., Sareneva, T. IL-21 in Synergy with IL-15 or IL-18 Enhances IFN-gamma Production in Human NK and T Cells. *J. Immunol.* 2003; 170:5464-5469.
- Strong, D. M., Pandolfi, F., Sleese, R. B., Budd, J. E., and Woody, J. N. Antigenic characterization of a T-CLL with heteroantisera and monoclonal antibodies: Evidence for the T cell lineage of an Ia-positive, Fc-IgG positive, suppressor-cell subpopulation. *J. Immunol.* 1981; 126:2205.
- Sudd S: Bioresonance therapy in treatment of allergies. Every person has its own vibration pattern. *Fortschr Med* 1997; 115 (11):16-18.
- Sutton, VR., Wowk, ME., Cancilla, M., Trapani, JA. Caspase activation by granzyme B is indirect, and caspase autoprocessing requires the release of proapoptotic mitochondrial factors. *Immunity* 2003; 18:319-329.
- Takasugi, M., Mickey, M. R., and Terasaki, P. I. Reactivity of lymphocytes from normal personal on cultured tumor cells. *Cancer Res.* 1973; 33: 2898.
- Takasugi, M., Ramseyer, A., and Takasugi, J. Decline of natural nonselective cell-mediated cytotoxicity in patients with tumor progression. *Cancer Res.* 1977; 37:413.
- Takeda, K. Hayakawa, Y. Atsuta, M., Hong, S., Van Kaer, L., Kobayashi, K, Ito, M., Yagita, H., Okumura, K. Relative contribution of NK and NKT cells to the anti-metastatic activities of IL-12. *Int. Immunol.* 2000; 12:909-14.
- Taniguchi, M., Koseki, H., Tokuhisa, T., Masuda, K., Sato, H., Kondo, E., Kawano, T., Cui, J., Koyasu, S., Makino, Y. Essential requirement of an invariant V alpha 14 T cell antigen receptor expression in the development of natural killer T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996; 93:11025-8.
- Tarter, P. I., Martinell, G., Steinberg, B., and Barron, D. Changes in peripheral T cell subsets and natural killer cytotoxicity in relation to colon rectal cancer surgery. *Cancer Detect. Prev.* 1986; 9:359-364.
- Thornthwaite, T. Jerry. My discovery of the NK cell. <http://www.cancerfoundation.com/Nkcells.html>
- Tilloy, F., Di Santo, JP, Bendelac, A., Lantz, O. Thymic dependence of invariant V alpha 14+ natural killer-T cell development. *Eur. J. Immunol.* 1999; 29:3313-8.
- Timonen, T., Ortaldo, J. R., and Herberman, R. B. Characteristics of human large granular lymphocytes and relationship to natural killer and K cells. *J. Exp. Med.* 1981; 153:569.
- Timonen, T., Patarroyo, M., and Gahmberg, C. G. CDIIa-c/CD18 and GP84 (LB-2) adhesion molecules on human large granular lymphocytes and their participation in natural killing. *J. Immunol.* 1988; 141:1041.



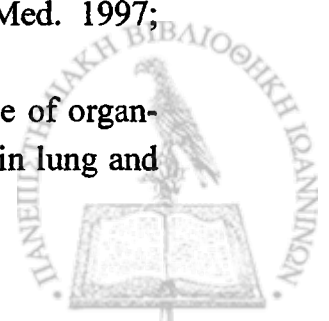
- Timonen, T., Ranki, A., Saksela, E., and Hayry, P. Human natural cell-mediated cytotoxicity against fetal fibroblasts. III. Morphological and functional characterization of the effector cells. *Cell. Immunol.* 1979; 48:121.
- Timonen, T., Saksela, E., Ranki, A., and Hayry, P. Fractionation, morphological and functional characterization of effector cells responsible for human natural killer activity against cell line targets. *Cell. Immunol.* 1979; 48:133.
- Toliopoulos, Bougiouklis, Daskalou et al. Induction of NK lymphocytes against cancer cell lines by administration of *Morinda Citrifolia*. *FEBS Journal* 2006; 273:66.
- Toliopoulos, Daskalou, Pistofidis et al. Resveratrol, an ingredient of many plants that increases NK lymphocytes' cytotoxicity against cancer cells. *Turkish Journal of Haematology.* 2005a; 22:319-20.
- Toliopoulos, Karkabounas Daskalou et al. Induction of NK lymphocytes against leiomyosarcoma Wistar rat cell lines by administration of the extract of *Cupressus Semprevirens*. *Tissue Antigens* 2005b; 565-66.
- Tomura, M., Zhou, XY., Maruo, S., Ahn, HJ., Hamaoka, T., Okamura, H., Nakanishi, K., Tanimoto, T., Kurimoto, M., Fujiwara, H. A critical role for IL-18 in proliferation and activation of NK1.1+ CD3- cells. *J. Immunol.* 1998; 160:4738-46.
- Trinchieri, G. *Biology of Natural Killer Cells. Advances in Immunology* 1989, 47:187-376.
- Trinchieri, G. *Biology of the Natural Killer Cells. Adv. Immunol.* 1989; 47:187-386.
- Trinchieri, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2003; 3:133-146.
- Trinchieri, G., Aden, D., and Knowles, B. B. Cell-mediated cytotoxicity to SV40-specific tumor-associated antigens. *Nature (London)* 1976; 261: 312.
- Trinchieri, G., and Perussia, B. Human natural killer cells: Biologic and pathologic aspects. *Lab. Invest.* 1984;50: 489.
- Trinchieri, G., and Santolini, D. Antiviral activity induced by culturing lymphocytes with tumor-derived or virus-transformed cells. Enhancement of human natural cell activity by interferon and antagonistic inhibition of susceptibility of target cells to lysis. *J. Exp. Med.* 1978; 147:1314.
- Trinchieri, G., bauman, P., De Marchi, M., and Tokes, Z. Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity in humans. I. Characterization of the effector cell. *J. Immunol.* 1975; 115:249.
- Trinchieri, G., bernoco, D., Curtoni., S. E., Miggiano, V. C., and Ceppellini, R. Cell-mediated lympholysis in man: Relevance of HLA antigens and antibodies. In "Histocompatibility Testing-192" 7 (J. Dausset, ed.), 1973. p.509. Munksgaard, Copenhagen.
- Trinchieri, G., Degliantoni, G., Kobayashi, M., London, L., and Perussia, B. Surface phenotype and functions of human natural killer cells. In "Mechanisms of Cytotoxicity by NK Cells" (R. B. Herberman and D.M. Callewaert, eds.), 1985; p.29. Academic Press, Orlando, Florida.



- Trinchieri, G., O'Brien, T., Shade, M., and Perussia, B. Phorbol esters enhance spontaneous cytotoxicity of human lymphocytes, abrogate Fc receptor expression and inhibit antibody-dependent lymphocyte-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* 1984; 133:1869.
- Tucker, S. N., Jessup, H. K., Fujii, H. & Wilson, C. B. Enforced expression of the Ikaros isoform IK5 decreases the numbers of extrathymic intraepithelial lymphocytes and natural killer 1.1-T cells. *Blood* 2002; 99:513-519.
- Uchida, A., and Micksche, M. Lysis of fresh human tumor cells by autologous large granular lymphocytes from peripheral blood and pleural effusions. *Intl. J. Cancer* 1983; 32: 37.
- Uchida, A., and Micksche, M. Natural killer cells in carcinomatous pleural effusions. *Cancer Immunol. Immunother.* 1981; 11:131.
- Uchida, A., and Micksche, M. Suppressor cells for natural killer activity in carcinoma pleural effusions of cancer patients. *Cancer Immunol Immunother.* 1981; 11:255.
- Ushio, S., Namba, M., Okura, T., Hattori, K. et al. Cloning of the cDNA for human IFN-gamma-inducing factor, expression in *Escherichia coli*, and studies on the biologic activities of the protein. *J. Immunol.* 1996; 156:4274-4279.
- Vales-Gomez, M., Reyburn, H., and Strominger, J. Molecular analyses of the interactions between human NK receptors and their HLA ligands. *Hum. Immunol.* 2000; 61:28-38.
- van De Griend, R. J., Krimpen, B. A., Ranfeltap, C. P. M., and Bolhuis, R. H. Rapidly expanded activated human killer clones have strong antitumor cells activity and have the surface phenotype of either T, non-T, or null cells. *J. Immunol.* 1984: 132:3185.
- Vance, R. E., Kraft, J. R., Altman, J. D., Janeen, P. E. & Raulet, D. H. Mouse CD94/NKG2A is a natural killer cell receptor for the nonclassical major histocompatibility complex (MHC) class I molecule Qa-1(b). *J. Exp. Med.* 1998; 188:1841-1848.
- Varcas-Cortes, V., Hellstrom, U., and Perlmann, P. Surface markers of human natural killer cells as analysed in a modified single cells cytotoxicity assay on poly-L-lysine coated over slip. *J. Immunol.* 1983; 62:β7.
- Velardi, A., Clement, L. T., and Grossi, C. E. Quantitative and functional analysis of a human lymphocyte subset with the T-helper (Leu3/T4+) phenotype and natural killer (NK)-cell characteristics in patients with malignancy. *J. Clin. Immunol.* 1985; 5:329.
- Velardi, A., Grossi, C. E. and Cooper, M. D. A large subpopulation of lymphocytes with T helper phenotype (Leu-3/T4+) exhibits the property of binding to NK cell targets and granular morphology. *J. Immunol.* 1985; 134:58.
- Velardi, A., Prchal, J. T., Prasthofer, E. F., and Grossi, C. E. Expression of NK-lineage markers on peripheral blood lymphocytes with T-helper (Leu 3<sup>+</sup>/T4<sup>+</sup>) Phenotype in B cell chronic lymphocytic leukaemia. *Blood* 1985; 65:149.



- Vierling, J. M., Steer, C. J., Bundy, B. M., Strober, W., Jones, E. A., Hague, N. E., and Nelson, D. L. Studies of complement receptor on cytotoxic effector cells in human peripheral blood. *Cell. Immunol.* 1978; 35:403.
- Vivier, E. and Anfossi, N. Inhibitory NK-cell receptors on T cells: witness of the past, actors of the future. *Nat. Rev. Immunol.* 2004; 4:190-198.
- Vojdani, A., Bazargan, M., Vojdani, E., Wright, J. New evidence for antioxidant properties of Vitamin C. *Cancer Detct. Prev.* 2001; 25 (2):222.
- Vose, B. M., Vanky, F., Argov, S., and Klein, E. Natural cytotoxicity in man: Activity of lymph node and tumor-infiltrating lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 1977; 7:753.
- Vujanovic, N. L., Herberman, R. B., Maghazachi, A. A., and Hiserodt, J. C. Lymphokine activated killer cells in rats. III. A simple method for the purification of large granular lymphocytes and their rapid expansion and conversion into lymphokine-activated killer cells. *J. Exp. Med.* 1988; 167: 15.
- Walunas, TL., Wang, B., Wang, CR., Leiden, JM. Cutting edge: the Ets1 transcription factor is required for the development of NKT cells in mice. *J. Immunol.* 2000; 164:2857-60.
- Wang, J. H. et al. Selective defects in the development of the fetal and adult lymphoid system in mice with an Ikaros null mutation. *Immunity* 1998; 5:537-549.
- Warburg, O., Geissler, A., Lorenz, A. Uber die Erzeugung von normalen Stoffwechsel aus Korbstoffwechsel durch Zusatz von Vitamin B1. *Z. Naturforsch. B.* 1970; 25:559.
- Ward, J. M., and Reynolds, C. W. Large granular leukaemia in F344 rats. *Am. J. Pathol.* 1983; 111:1.
- Warren, L. A. & Rothenberg, E. V. Regulatory coding of lymphoid lineage choice by hematopoietic transcription factors. *Curr. Opin. Immunol.* 2003; 15:166-175.
- Wattenberg, LW. Inhibition of carcinogenic and toxic effects of polycyclic hydrocarbons by phenolic antioxidants and ethoxyquin. *J. Natl. Cancer Inst.* 1972; 48:1425.
- West, W. H., Cannon, G. B., Kay, H. D., Bonnard, G. D., and Herberman, R. B. Natural cytotoxic reactivity of human lymphocytes against a myeloid cell line: Characterization of the effector cells. *J. Immunol* 1977; 118: 355.
- Whiteside T., Herberman R. The role of Natural Killer Cells in human disease. *Clinical Immunology* 1989, 53: 1-23.
- Whiteside, T., Herberman, R. B. The role of Human Natural killer cells in Health and Disease. *Clinical Diagn. Lab. Immunol* 1994; 1(2):125-33.
- Williams, N. S. et al. Generation of lytic natural killer 1.1-Ly-49 cells from multipotential murine bone marrow progenitors in a stroma-free culture: definition of cytokine requirements and developmental intermediates. *J. Exp. Med.* 1997; 186:1609-1614.
- Wiltrout, R. H., Herberman, R. B., Zhang, S. R. and Chirigos, M. A. Role of organ-associated NK cells in decreased formation of experimental metastases in lung and liver. *J. Immunol.* 1985; 134:4267.



- Xu, J., Dallas, P. B. Lyons, P. A. Shellam, G. R., and Scalzo, A. A. Identification of the glycoprotein H gene of murine cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* 1992; 73 (Pt 7):1849-1854.
- Yokoyama, W. M. and Plougastel, B. F. Immune functions encoded by the natural killer gene complex. *Nat. Rev. Immunol.* 2003; 3:304-316.
- Yokoyama, W. M. Natural Killer cell receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 1998; 10:298-305.
- Yu, Y. Y., George, T., Dorfman, J. R., Roland, J., Kumar, V., and Bennet, M. The role of Ly49A and 5E6(Ly49C) molecules in hybrid resistance mediated by murine by natural killer cells against normal T cells blasts. *Immunity.* 1996; 4:67-76.
- Zamal, L. et al. Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity differential use of TRAIL and Ras ligand by immature and mature primary human NK cells. *J. Exp. Med.* 1998; 188:2375-2380.
- Zarcone, D., Prasthofer, E. F., Malavasi, F., Pistoia, V., Lobuglio, A. F., and Grossi, C. Ultrastructural analysis of human natural killer activation. *Blood* 1987; 69:1725.
- Zarling, J. M., and Kung, P. C. Monoclonal antibodies which distinguish between human NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *Nature (London)* 1980; 288:394.
- Zarling, J. M., Clouse, K. A., Biddison, W. E., and Kung, P. C. Phenotypes of human natural killer cell populations detected with monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 1981; 127:2575.
- Zhang HQ et al. Chemo-and radio-protective effects of polysaccharide of *Spirulina platensis* on hemopoietic system of mice and dogs. *Acta Pharmacol Sin* 2001; 22:1121-4.
- Zinkernagel, R. M., and Doherty, P. Immunological surveillance against altered self components by sensitized T lymphocytes in lymphochoriomeningitis. *Nature (London)* 1974; 251: 547.
- Zucker-Franklin, D., Grusky, G., and Yang, J. S. Arylsulfatase in natural killer cells: Its possible role in cytotoxicity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1983; 80:6977.

