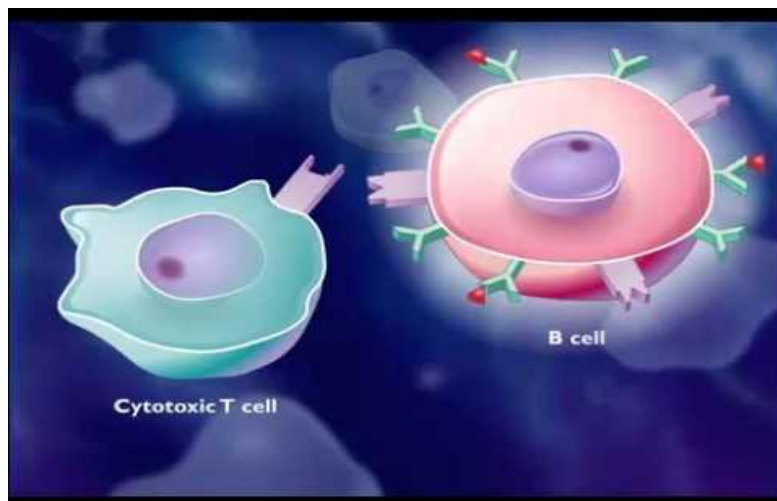




# ΣΧΟΛΗ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ

## ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

### ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΕΙΔΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑ



ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑΣ  
ΣΤΡΟΓΓΥΛΟΥ ΑΝΔΡΙΑΝΝΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ  
ΣΚΕΠΑΣΤΙΑΝΟΣ ΠΕΤΡΟΣ

## Περιεχόμενα

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	5
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
ABSTRACT.....	8
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ.....	10
ΑΝΟΣΙΑ.....	10
1.1 Ορισμός.....	10
1.2 Διάκριση της ανοσίας.....	10
1.3 Φάσεις της ανοσολογικής αντίδρασης.....	14
1.4 Χαρακτηριστικά της ειδικής ανοσίας.....	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΗ.....	16
ΕΙΔΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑ.....	16
2.1 Τ κύτταρα: Η προκαλούμενη από κύτταρα ανοσολογική απόκριση.....	16
2.1.1 Ο θύμος αδένας.....	20
2.2 Κύτταρα και πρωτεΐνες εναντίων μικροβίων.....	21
2.3 Βιολογία των Τ λεμφοκυττάρων.....	23
2.3.1 Σύνθεση του δικτύου των Τ – κυττάρων.....	25
2.3.2 Μηχανισμοί ενεργοποίησης Τ λεμφοκυττάρων, παρουσία αντιγόνου.....	28
2.3.3. Δραστηριοποίηση των μοριακών μηχανισμών των λεμφοκυττάρων.....	30
2.4 Ανοχή.....	33
2.5 Η κυτταρική ανοσία στα όργανα του σώματος.....	35
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ.....	36
ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑ.....	36
3.1 Δοκιμασίες κυτταρικής ανοσίας για την ανοσοθεραπεία των καρκινικών κυττάρων.....	37
3.2 In Vivo Δοκιμασίες αντιγόνου-ειδικής ανοσίας DTH.3.....	39
3.3 In Vitro δοκιμασίες ενός Ανοσολογικής Απάντησης.....	39
3.4 In Vitro Φαινοτυπικά μέτρα ανοσοαποκρίσεων αντιγόνου-ειδικών κυτταρικών.....	40
3.5 Τετραμερές Πεπτίδιο ΜHC.....	41
3.6 TCR.....	42
3.7 Ειδικές ανοσοαποκρίσεις.....	43
3.8 Ανίχνευση των ενδοκυτταρικών κυτοκινών από ELISA και ELISPOT...44	
3.9 Μέτρηση των επιπέδων των κυτοκινών mRNA με πραγματικού χρόνου ποσοτική RT-PCR.....	46
3.10 Δοκιμασία DNA –ATP.....	47
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	52
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	53
ΛΙΣΤΑ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	62

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

Ag = αντιγόνο

MHC = μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας

TCR (T cell receptor) = T κυτταρικός υποδοχέας

CD8 + T = κυτταροτοξικά T κύτταρα

CD4 + T = βοηθητικά T κύτταρα

Treg = .κύτταρα ρυθμιστικών T

IL-10 και TGP-β = ανοσοκατασταλτικές κυτοκίνες

EKA = ενεργοποίηση κυτταρικού θανάτου

CTL = κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα

CD62L = L-σελεκτίνη

CCR7 = CC υποδοχέας χημειοκινών 7

SMAC = υπερμοριακή ενεργοποίηση

APC = Ag-presenting cells

PBMCs = μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Πρώτα απ' όλα, θέλω να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της πτυχιακής εργασίας μου , κ. Σκεπαστιανό Πέτρο για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια της δουλειάς μου.

Επίσης, είμαι ευγνώμων στους υπόλοιπους καθηγητές του τμήματος, οι οποίοι με βοήθησαν κατά τη διάρκεια όλων αυτών των χρόνων να περατώσω τις σπουδές μου με επιτυχία.

Οφείλω ευχαριστίες στη γραμματεία του τμήματος που στάθηκε πρόθυμη να βοηθήσει και να επιλύσει τυχόν απορίες ανά πάσα ώρα και στιγμή.

Ευχαριστώ τους φίλους μου για την υποστήριξή τους και για την κατανόησή τους, ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια των τελευταίων μηνών της προσπάθειάς μου.

Πάνω απ' όλα, είμαι ευγνώμων στους γονείς μου, Στέλιο και Μάρθα Στρογγυλού και στα αδέρφια μου Ραφαήλ και Γεωργία καθώς και για την ολόψυχη αγάπη και υποστήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια.

Αφιερώνω αυτή την εργασία στην αγαπημένη οικογένεια μου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι να γίνει γνωστός ο μηχανισμός της κυτταρικής ανοσίας στον ανθρώπινο οργανισμό.

Η μέθοδος της έρευνας που ακολουθήθηκε είναι η βιβλιογραφική ανασκόπηση σύμφωνα με το θέμα, μέσα από επιστημονικά άρθρα και βιβλία της ελληνικής και ξένης αρθρογραφίας και βιβλιογραφίας.

Ειδικότερα, στο πρώτο μέρος γίνεται μια ανάλυση του όρου «ανοσία», η διάκρισή της, οι φάσεις που διέπουν της ανοσολογικής αντίδρασης και τα χαρακτηριστικά της ειδικής ανοσίας. Στο δεύτερο κεφάλαιο εξετάζεται η φύση της ειδικής κυτταρικής ανοσίας και γίνεται γνωστός ο ρόλος και η βιολογία των Τ λεμφοκυττάρων, τα οποία συμμετέχουν σε αυτήν με διάφορους τρόπους. Στο τρίτο μέρος εξετάζονται οι εργαστηριακές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στην εργαστηριακή διερεύνηση της κυτταρικής ανοσίας.

Τα συμπεράσματα της εργασίας είναι ότι η κυτταρική ανοσία είναι πολύ σημαντική στον ανθρώπινο οργανισμό, μέσα από την προστασία που του παρέχει, καθώς τον προφυλάσσει από την εισβολή ιών, από λοιμώξεις και φλεγμονές. Οι δοκιμασίες (test) που γίνονται για τον λόγο αυτό είναι πολύ σημαντικές και οδηγούν τον ιατρικό κόσμο στη γνώση και καλύτερη θεραπεία του ασθενούς.

Οι πιο σημαντικές δοκιμασίες που χρησιμοποιούνται σήμερα και αναλύονται λεπτομερώς στην παρούσα πτυχιακή εργασία είναι η ELISPOT, η κυτταρομετρία ροής και η πιο σύγχρονη δοκιμασία DNA-ATP

## **ABSTRACT**

The main purpose of this dissertation is to analyze the mechanism of cellular immunity.

The research method followed is the literature review according to the theme, through scientific articles and books of Greek and foreign editorial.

Specifically, the first part is an analysis of the term "immunity", the distinction, the phases regulating the immune response and the characteristics of specific immunity. The second chapter examines the nature of the specific cellular immunity and becomes known the role and the biology of T lymphocytes, which are involved in this in various ways. The third part deals laboratory methods used in laboratory investigation of cellular immunity.

The working conclusions is that cellular immunity is very important in the human body, through the protection granted, and prevents the invasion of viruses, infections and inflammations. The experiments that take place for these reasons are very important and provide further medical knowledge and better treatment of the patient.

The most important tests used today and are detailed in this thesis is the ELISPOT, flow cytometry and the most modern DNA-ATP test

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η πτυχιακή εργασία με θέμα την ειδική κυτταρική ανοσία επιλέχθηκε προκειμένου να γίνει γνωστός ο τρόπος που αντιδρά ο οργανισμός, χωρίς την παρουσία ξένων ουσιών (φάρμακα) εναντίων ιών, λοιμώξεων και φλεγμονών, που στέκονται τροχοπέδη στην υγιή λειτουργία του.

Στο πρώτο κεφάλαιο παρουσιάζεται η έννοια της ανοσίας και αναλύονται τα είδη της.

Στο δεύτερο και τρίτο και ειδικότερο κεφάλαιο αναλύεται λεπτομερειακώς η έννοια της κυτταρικής ανοσίας και ο τρόπος που γίνεται στον ανθρώπινο οργανισμό, όπως επίσης και οι δοκιμασίες που πραγματοποιούνται στα ιατρικά εργαστήρια προκειμένου να ανιχνευθεί ο ρόλος της κυτταρικής ανοσίας.

Ακολουθούν τα συμπεράσματα και η βιβλιογραφία που χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να πιστοποιηθούν με επιστημονική βάση τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν για την ολοκλήρωση της παρούσας πτυχιακής εργασίας.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

## ΑΝΟΣΙΑ

### 1.1 Ορισμός

*Ανοσία* ονομάζεται το σύνολο των μηχανισμών που διαθέτει ο οργανισμός για να αμύνεται σε βλαπτικούς παράγοντες που μπορούν να τον κάνουν να νοσήσει. Ο όρος «ανοσία» δηλώνει ακριβώς την απουσία νόσου (α στερητικό+ νόσος). Ο όρος επικράτησε μετά την παρατήρηση ότι τα άτομα που παθαίνουν ορισμένα λοιμώδη νοσήματα δεν αρρωσταίνουν ξανά από τα ίδια νοσήματα, έστω κι αν έρθουν σε επαφή με τον μικροοργανισμό, που τα προκάλεσε, για δεύτερη φορά. Επίσης, είναι γνωστό ότι ο εμβολιασμός για κάποια λοιμώδη ασθένεια, βοηθά στην ανοσία από την ασθένεια αυτή. Το σύνολο των μηχανισμών τους οποίους επιστρατεύει ο οργανισμός προκειμένου να αμυνθεί εναντίων ενός δυνητικά βλαπτικού παράγοντα στον οποίο εκτίθεται λέγεται *ανοσολογική αντίδραση* ή *ανοσολογική απάντηση* (Καρακάση-Γαρδούνη και συν, 2003).

### 1.2 Διάκριση της ανοσίας

Ανάλογα με το είδος της ανοσολογικής αντίδρασης διακρίνουμε την ανοσία σε *μη ειδική* (ή *εγγενή*) και σε *ειδική*:

Η *εγγενής* ή *μη ειδική ανοσία* περιλαμβάνει τους τρόπους προστασίας του οργανισμού από τους βλαπτικούς παράγοντες που δεν απαιτούν αναγνώριση του αιτίου και ειδική αντίδραση προς το βλαπτικό αίτιο. Για παράδειγμα, αν κάποιοι μικροοργανισμοί από τον ατμοσφαιρικό αέρα εισπνευσθούν από τη μύτη παγιδεύονται από τη βλέννα και εμποδίζεται η είσοδός τους στους πνεύμονες, ενώ αν καταφέρουν να φτάσουν στους πνεύμονες τότε φαγοκυτταρώνονται από τα κυψελιδικά μακροφάγα. Στην περίπτωση αυτή ο οργανισμός αμύνεται με *γενικούς μηχανισμούς άμυνας*, χωρίς να χρειάζεται να γίνει “αναγνώριση του εισβολέα”.

Η *ειδική ανοσία* αναπτύσσεται ως αποτέλεσμα της έκθεσης του οργανισμού σε συγκεκριμένους παράγοντες που είναι σε θέση λόγω της χημικής τους δομής να

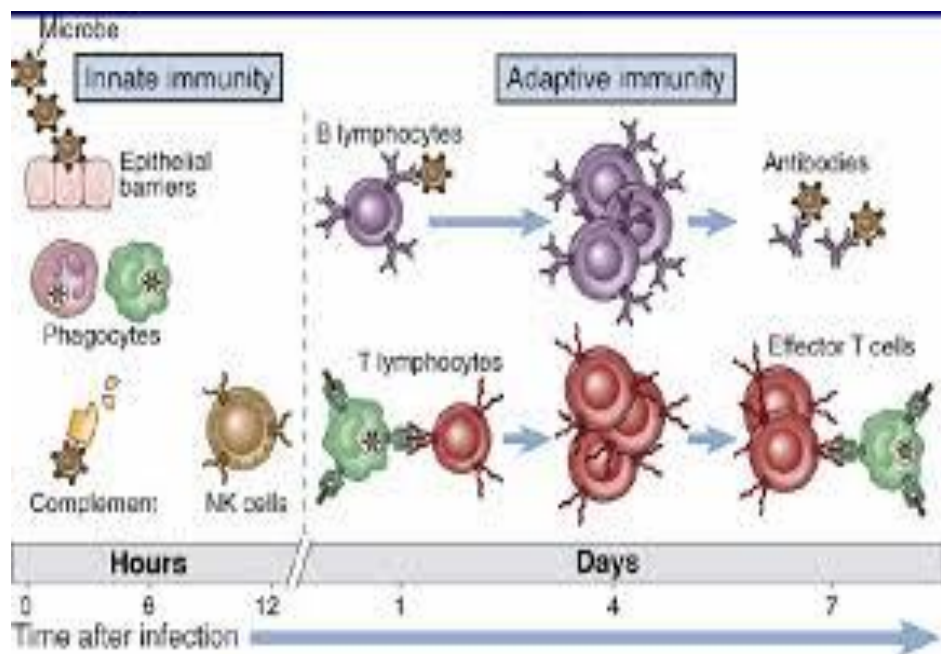


προκαλέσουν ειδική αντίδραση από το ανοσολογικό σύστημα, δηλαδή μπορούν να δράσουν ως *ανοσογόνα*. Τέτοιοι παράγοντες είναι οι μικροοργανισμοί, διάφορες πρωτεΐνες ή άλλες μεγαλομοριακές ουσίες και τα εμβόλια.

Η *ειδική ανοσία* εκδηλώνει την δραστηριότητά της με δύο διαφορετικούς βασικούς τρόπους ή μηχανισμούς, οι οποίοι όμως σχετίζονται μεταξύ τους και εξαρτώνται ο ένας από τον άλλο. Και οι δύο μηχανισμοί συνεργάζονται αρμονικά για να εξουδετερώσουν τους βλαπτικούς παράγοντες που εισβάλλουν στον οργανισμό και είναι οι εξής:

**Χυμική ανοσία:** τα προϊόντα της ανοσολογικής αντίδρασης κυκλοφορούν στο αίμα και στο εξωκυττάριο υγρό. Στην περίπτωση αυτή η ανοσολογική αντίδραση επιτελείται με τα παραγόμενα αντισώματα και τα υπεύθυνα γι αυτήν κύτταρα είναι τα λεγόμενα Β-λεμφοκύτταρα.

**Κυτταρική ανοσία:** τα προϊόντα της ανοσολογικής αντίδρασης είναι κύτταρα και συγκεκριμένα ευαισθητοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα.



Εικόνα 1: Διάκριση ανοσίας. Πηγή: [docplayer.gr](http://docplayer.gr)

Τα **T-λεμφοκύτταρα** διαφοροποιούνται και ωριμάζουν στο θύμο αδένα και είναι απαραίτητα για την ολοκλήρωση της ανοσοβιολογικής απόκρισης. Διακρίνονται σε:

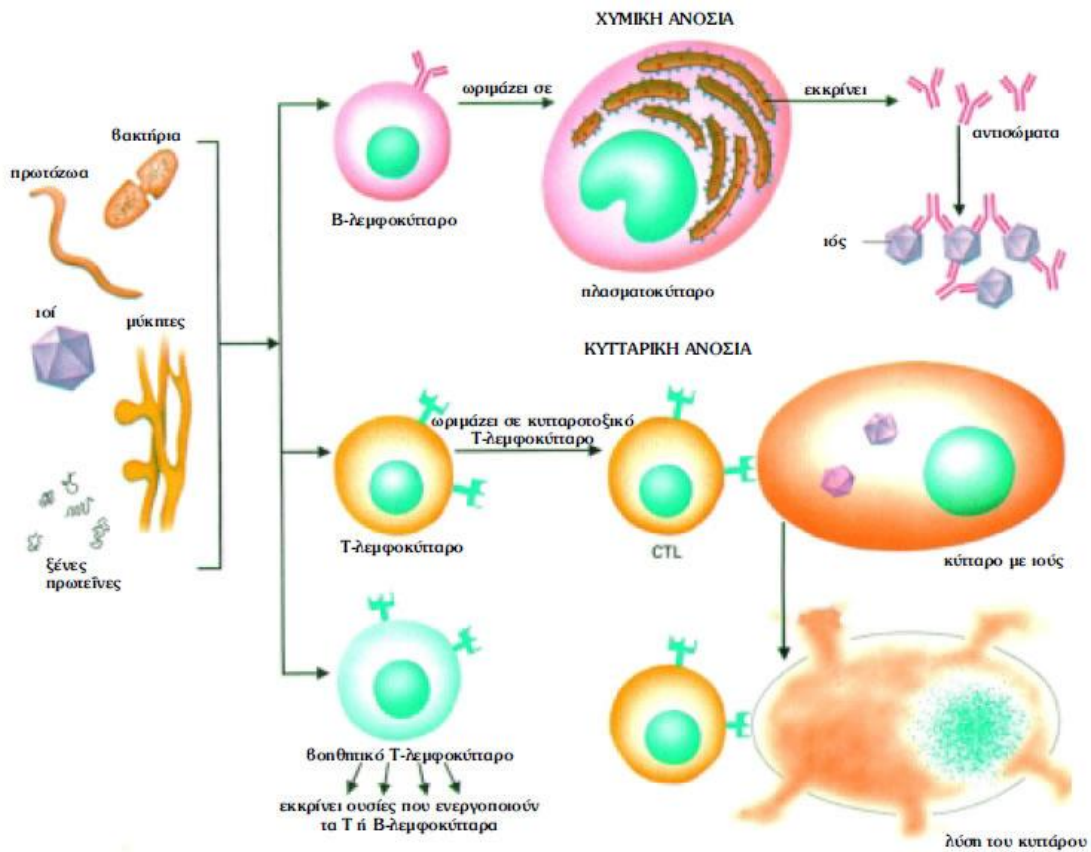
- **Βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα**, τα οποία ενεργοποιούνται από το εκτεθειμένο στην επιφάνεια των μακροφάγων τμήμα του αντιγόνου και στη συνέχεια ενεργοποιούν τα B-λεμφοκύτταρα ή άλλα είδη T-λεμφοκυττάρων μέσω ουσιών που εκκρίνουν.
- **Κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα**, τα οποία ενεργοποιούνται από τα βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα και καταστρέφουν καρκινικά κύτταρα ή κύτταρα που έχουν προσβληθεί από ιό.
- **T-λεμφοκύτταρα μνήμης**, τα οποία παράγονται μετά την έκθεση του οργανισμού σε ένα αντιγόνο και έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούνται αμέσως μετά από επόμενη έκθεση του οργανισμού σ' αυτό.
- **Κατασταλτικά T-λεμφοκύτταρα**, τα οποία σταματούν την ανοσοβιολογική απόκριση μετά την επιτυχή αντιμετώπιση του αντιγόνου (Αδαμαντιάδου και συν, 2013).

Ορισμένα T λεμφοκύτταρα ενεργοποιούν τα φαγοκύτταρα, ώστε να καταστρέψουν τους μικροοργανισμούς που εγκλωβίζονται σε φαγοκυτταρικά κυστίδια. Ένας άλλος πληθυσμός των κυττάρων αυτών είναι υπεύθυνος για τη φόνευση κάθε τύπου κυττάρων του ξενιστή, που φιλοξενούν λοιμώδεις μικροοργανισμούς στο κυτταρόπλασμά τους.

Τα T λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν τα αντιγόνα μέσω του υποδοχέα τους TCR. Ο υποδοχέας αυτός είναι ένα ετεροδιμερές δύο διαμεμβρανικών πολυπεπτιδικών αλυσίδων, οι οποίες ενώνονται μεταξύ τους ομοιοπολικά. Η πλειοψηφία των T λεμφοκυττάρων εκφράζουν TCR τύπου αβ, ο οποίος αναγνωρίζει πεπτίδια, ενώ 10% των λεμφοκυττάρων εκφράζει TCR τύπου γδ, ο οποίος επιπρόσθετα φαίνεται να αναγνωρίζει λιπίδια και άλλα μη πεπτιδικά αντιγόνα. Ο TCR αναγνωρίζει αντιγόνα, αλλά όπως και οι ανοσοσφαιρίνες της μεμβράνης των B κυττάρων, δεν μπορεί να μεταβιβάσει σήματα προς τα T κύτταρα. Υπεύθυνα για αυτή τη λειτουργία είναι δύο άλλα μόρια, τα οποία συνδέονται με τον TCR, τα μόρια CD3 και η αλυσίδα ζ. Ο υποδοχέας TCR αναγνωρίζει αντιγόνα, τα οποία έχουν συνδεθεί στα μόρια του

μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (ΜΣΙ) στην επιφάνεια των κυττάρων που είναι υπεύθυνα για την παρουσίαση του αντιγόνου, τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα.

Κάθε ώριμο Τ λεμφοκύτταρο περιορισμένο από ΜΣΙ, εκφράζει είτε CD4 είτε CD8 μόρια, τα οποία ονομάζονται «συνυποδοχείς», επειδή λειτουργούν μαζί με τον TCR, ώστε να συνδεθούν με μόρια ΜΣΙ. Τα CD4+T κύτταρα δρουν σαν βοηθητικά κύτταρα που παράγουν κυτταροκίνες και αναγνωρίζουν αντιγόνα που προσλαμβάνονται από το εξωκυττάριο περιβάλλον και παρουσιάζονται από μόρια ΜΣΙ τάξης II, τα οποία εκφράζονται μόνο από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (δενδριτικά κύτταρα, μονοκύτταρα φαγοκύτταρα, Β λεμφοκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα, επιθήλιο του θύμου). Τα CD8+T κύτταρα δρουν σαν κυτταρολυτικά Τ λεμφοκύτταρα (CTLs), τα οποία αναγνωρίζουν πεπτίδια που προέρχονται από κυτταροπλασματικούς οργανισμούς και συνδέονται με μόρια ΜΣΙ τάξης I, τα οποία εκφράζονται από όλα τα εμπύρηννα κύτταρα (Στέα, χ.η.).



Εικόνα 2: Διαφορές χημικής και κυτταρικής ανοσίας. Πηγή:

<http://ebooks.edu.gr/modules/ebook/show.php/DSGL-C106/151/1086,3992/>

### 1.3 Φάσεις της ανοσολογικής αντίδρασης

Στην ειδική ανοσία, μετά από έκθεση σε κάποιον εξωγενή παράγοντα που έχει ιδιότητες αντιγόνου, η ανοσολογική αντίδραση μπορεί να διακριθεί σε τρεις φάσεις:

- i. Την *επαγωγική* φάση, όπου γίνεται ένα είδος εξέτασης του αντιγόνου κατά την οποία τα μακροφάγα το περιεργάζονται. Στη συνέχεια γίνεται η παρουσίασή του στα λεμφοκύτταρα από τα λεγόμενα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (συνήθως μακροφάγα)
- ii. Τη φάση *ενεργοποίησης*, όπου γίνεται η ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων (διέγερση και πολλαπλασιασμός) έτσι ώστε να διαμορφωθούν τα κύτταρα που θα αναλάβουν την ειδική δράση

- iii. Την *εκτελεστική* φάση, η οποία χαρακτηρίζεται από την παραγωγή των προϊόντων της ανοσολογικής αντίδρασης, που είναι τα αντισώματα ή τα ευαισθητοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα, προκειμένου να στραφούν εναντίων του αντιγόνου (Καρακάση- Γαρδούνη και συν, 2003).

#### **1.4 Χαρακτηριστικά της ειδικής ανοσίας**

Η ειδική ανοσία έχει τέσσερα κύρια χαρακτηριστικά:

1. *Ικανότητα αναγνώρισης* του εισβολέα: το ανοσολογικό σύστημα είναι σε θέση να ξεχωρίζει αν κάποια ουσία με την οποία έρχεται σε επαφή δε μοιάζει, από πλευράς δομής, με τα συστατικά του ίδιου του οργανισμού και την αναγνωρίζει ως «ξένη».
2. *Ειδικότητα*: η αντίδραση του ανοσολογικού συστήματος είναι τέτοια ώστε να στρέφεται ειδικά εναντίων του παράγοντα που προκάλεσε την ανοσολογική αντίδραση.
3. *Ποικιλομορφία*: στην ειδική ανοσία υπάρχει μια ποικιλία κυττάρων και ουσιών που συμμετέχουν στην αντιμετώπιση του αντιγόνου.
4. *Μνήμη*: είναι η ικανότητα των κυττάρων του ανοσολογικού συστήματος να διατηρούν την “ανάμνηση” ενός αντιγόνου με το οποίο έχουν έρθει σε επαφή κατά το παρελθόν, με αποτέλεσμα την ικανότητα του συστήματος να εμφανίζει εντονότερη και ταχύτερη αντίδραση σε περίπτωση νέας επαφής με το αντιγόνο (Καρακάση-Γαρδούνη και συν, 2003).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

### ΕΙΔΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑ

Στην κυτταρική ανοσία τα προϊόντα της ανοσολογικής αντίδρασης είναι κύτταρα και συγκεκριμένα ευαισθητοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα. Πρόκειται για μία προσαρμοστική διαδικασία της ανάπτυξης αντιγόνου (Ag) από εξειδικευμένα Τ λεμφοκύτταρα προκειμένου να εξαλειφθούν ιοί, βακτήρια ή παρασιτικές λοιμώξεις ή κακοήθη κύτταρα που εισέβαλλαν στον οργανισμό. Η ιδιαιτερότητα των Τ λεμφοκυττάρων βασίζεται στην αναγνώριση του «εισβολέα» μέσω του Τ κυτταρικού υποδοχέα (TCR).

Η κυτταρική ανοσία είναι το κεντρικό στοιχείο του προσαρμοστικού ανοσοποιητικού συστήματος και περιλαμβάνει μια πρωτογενή απόκριση από κύτταρα Τ, λειτουργίες τελεστή από ενεργοποιημένα Τ κύτταρα και την αναγνώριση, σε επαναληπτική επαφή με το αντιγόνο, από τα Τ κύτταρα μνήμης. Η κυτταρική ανοσία αποτελεί μέρος μιας σύνθετης και συντονισμένης ανοσοαπόκρισης και περιλαμβάνει και άλλα κύτταρα τελεστές όπως τα μακροφάγα, φυσικά κύτταρα φονείς (Natural killer cells), μαστοκύτταρα, βασεόφιλα, ηωσινόφιλα, και ουδετερόφιλα (Parham, 2009).



Εικόνα 3: Μακροφάγο σε δράση. Πηγή: [www.biocourse.com](http://www.biocourse.com)

#### 2.1 Τ κύτταρα: Η προκαλούμενη από κύτταρα ανοσολογική απόκριση

Η κυτταρική ανοσολογική απόκριση, πραγματοποιείται από τα Τ κύτταρα και προστατεύει τον οργανισμό από λοιμώξεις από τους ιούς και τον καρκίνο,

σκοτώνοντας ανώμαλα ή μολυσμένα με ιό κύτταρα του σώματος. Μόλις σε ένα βοηθητικό T κύτταρο, που ενεργοποιεί αυτή την απόκριση, παρουσιάζεται ξένο αντιγόνο μαζί με πρωτεΐνες MHC από ένα μακροφάγο ή άλλο κύτταρο παρουσίασης αντιγόνου, ένα σύμπλοκο εκκινεί σειρά βημάτων. Αναπόσπαστο μέρος αυτής της διαδικασίας είναι η έκκριση των αυτοκρινών ρυθμιστικών μορίων γενικά γνωστών ως «κυτοκίνες» ή πιο συγκεκριμένα ως «λεμφοκίνες», αν εκκρίνονται από τα λεμφοκύτταρα.

Όταν η κυτοκίνη ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά, ονομάστηκε σύμφωνα με τη βιολογική της δράση (όπως ο παράγοντας B στα κύτταρα διεγέρσεως). Ωστόσο, επειδή κάθε κυτοκίνη έχει πολλές διαφορετικές ενέργειες, οι επιστήμονες συμφώνησαν να χρησιμοποιούν το όνομα «ιντερλευκίνη», ακολουθούμενο από έναν αριθμό, για να δείξει μία κυτοκίνη, της οποίας η αλληλουχία αμινοξέων έχει προσδιοριστεί. Η ιντερλευκίνη-1, για παράδειγμα, εκκρίνεται από τα μακροφάγα και μπορεί να ενεργοποιήσει το σύστημα των T κυττάρων. Η ιντερλευκίνη-2 απελευθερώνεται από βοηθητικά T κύτταρα και, μεταξύ των αποτελεσμάτων της, απαιτείται για την ενεργοποίηση των κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων (Parham, 2009).

Όταν τα μακροφάγα επεξεργάζονται τα ξένα αντιγόνα, εκκρίνουν ιντερλευκίνη-1, η οποία διεγείρει την κυτταρική διαίρεση και τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων. Μόλις τα βοηθητικά T κύτταρα έχουν ενεργοποιηθεί από τα αντιγόνα που τους παρουσιάζονται από τα μακροφάγα εκκρίνουν «κυτοκίνες», γνωστές ως «παράγοντες διέγερσης αποικιών μακροφάγων» και «γ- ιντερφερόνη», που προωθούν την δραστηριότητα των μακροφάγων. Επιπλέον, τα βοηθητικά T κύτταρα εκκρίνουν ιντερλευκίνη-2, η οποία διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των κυτταροτοξικών T κυττάρων που είναι ειδικά για το αντιγόνο. Τα κυτταροτοξικά T κύτταρα μπορούν να καταστρέψουν μολυσμένα κύτταρα μόνο αν αυτά τα κύτταρα εμφανίζουν το ξένο αντιγόνο μαζί με πρωτεΐνες τους MHC-I.

---

## ΚΥΤΤΑΡΑ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

### Βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα



Ανιχνεύουν τον κίνδυνο και ενεργοποιούν την απάντηση των T και B λεμφοκυττάρων

### Κατασταλτικά T-λεμφοκύτταρα

Σταματούν την ανοσοβιολογική απόκριση μετά την επιτυχή αντιμετώπιση του αντιγόνου

### Κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα

Ενεργοποιούνται από τα βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα και καταστρέφουν καρκινικά κύτταρα ή κύτταρα που έχουν προσβληθεί από ιό

### T-λεμφοκύτταρα μνήμης

Παράγονται μετά την έκθεση του οργανισμού σε ένα αντιγόνο και έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούνται αμέσως μετά από επόμενη έκθεση του οργανισμού σ' αυτό

### B-κύτταρα



Συμμετέχουν στην χημική ανοσία.



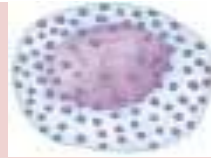
---

### Πλασματοκύτταρα



Βιοχημικό εργοστάσιο που διατίθεται για την παραγωγή αντισωμάτων, τα οποία κατευθύνονται εναντίων ξένων αντιγόνων

### Μαστοκύτταρα



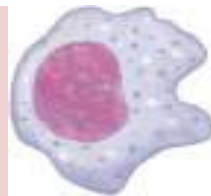
Βοηθούν στις αλλεργικές αντιδράσεις, με την άφιξη λευκοκυττάρων στην εστία της λοίμωξης

### Μονοκύτταρα



Πρόδρομος των μακροφάγων

### Μακροφάγα



Η πρώτη κυτταρική δομή άμυνας του οργανισμού. Χρησιμεύει επίσης ως κύτταρο και “καταπίνει” τα αντισώματα που είναι καλυμμένα με κύτταρα

### Natural killer cell



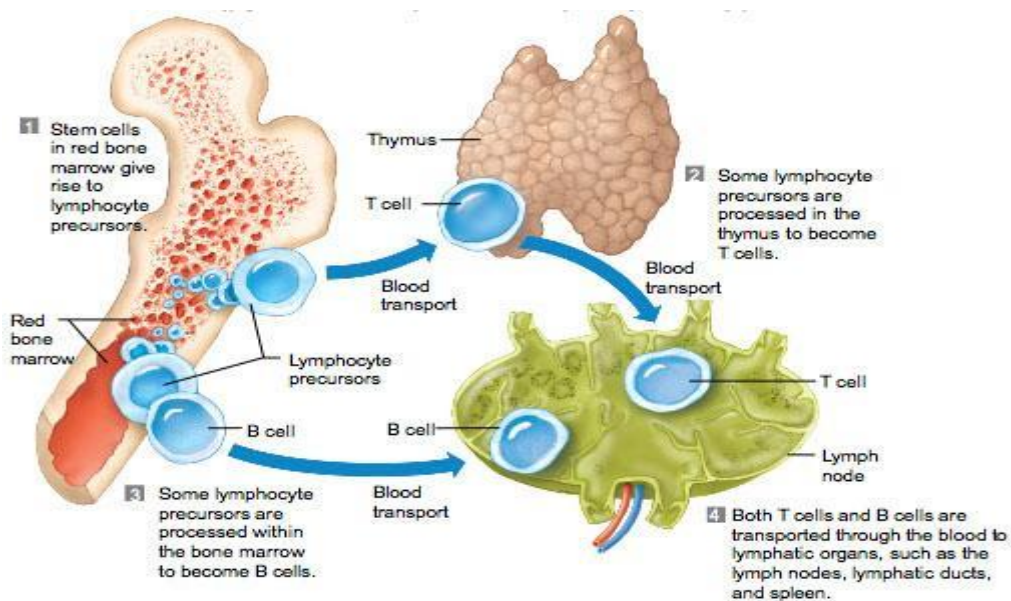
Αναγνωρίζουν και σκοτώνουν τα μολυσμένα κύτταρα του σώματος. Οι φυσικοί φονείς Natural Killer (NK) ανιχνεύουν και σκοτώνουν κύτταρα που έχουν μολυνθεί από ευρύ φάσμα εισβολέων. Τα killer cell (K), επιτίθενται μόνο σε κύτταρα καλυμμένα με αντίσωμα.

Εικόνα 4: Κύτταρα που συμμετέχουν στην ανοσολογική απόκριση, Πηγή: Peter Parham (2009) *The Immune System, Garland Science (pdf)*

### 2.1.1 Ο θύμος αδένας

Είναι ιδιαίτερα ανεπτυγμένος στα νεογνά κι έχει βάρος περίπου 13g. Κατά την ηλικία της εφηβείας φτάνει τα 35-40g για να αρχίσει στη συνέχεια να υποπλάσεται και να αντικαθίσταται από ινολιπώδη ιστό. Βρίσκεται πίσω από τη λαβή του στέρνου στο θυμικό τρίγωνο που είναι τμήμα του άνω μεσοπνευμονίου χώρου.

Ο θύμος αποτελείται από δύο πλάγιους λοβούς, αριστερό και δεξιό, που συνδέονται προς τα κάτω μεταξύ τους με συνδετικό ιστό. Έτσι, το όργανο παίρνει σχήμα δικόρυφης πυραμίδας με την αριστερή κορυφή να βρίσκεται ψηλότερα. Από άποψη κατασκευής, ο θύμος αποτελείται από φλοιώδη και μυελώδη ουσία. Η πρώτη αποτελείται κυρίως από θυμοκύτταρα και δικτυωτό υπόστρωμα, καθώς και μικρά λεμφοκύτταρα, ενώ στη μυελώδη ουσία παρατηρούνται ανάμεσα σε λεμφοκύτταρα, τα επιθηλιακά σωματίδια του Hassall. Ο θύμος αγγειώνεται από κλάδους των έσω μαστικών των κάτω θυρεοειδών αγγείων, νευρώνεται δε από το φυτικό νευρικό σύστημα.



Εικόνα 5: Ο θύμος αδένας και τα T και B λεμφοκύτταρα. Πηγή: [www.studyblue.com](http://www.studyblue.com)

Ο θύμος σχετίζεται άμεσα με την ανάπτυξη και την εξέλιξη, τόσο της κυτταρικής ανοσίας (Τ-λεμφοκύτταρα) όσο και της χημικής ανοσίας (Β-λεμφοκύτταρα). Χωρίς να είναι απόλυτα εξακριβωμένο, πιστεύεται ότι η δράση του στα λεμφοκύτταρα εξασκείται με ορισμένους «ορμονικούς παράγοντες» όπως είναι η θυμοσίνη, η θυμίνη, ο θυμικός χημικός παράγοντας, που εκκρίνονται από τα επιθηλιακά τους στοιχεία.

Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν πειραματικές δοκιμασίες για τη λειτουργική σχέση του θύμου και άλλων ενδοκρινών αδένων και παραγωγή (σε πειραματόζωα) ουσιών με καθαρά ορμονική δράση, στον άνθρωπο δεν υπάρχουν στοιχεία που να αποδεικνύουν ότι ο θύμος υπεισέρχεται και σε άλλες λειτουργίες πέρα από την ανάπτυξη ορισμένων ανοσολογικών μηχανισμών (Χατζημπούγιας, 2003).

## 2.2 Κύτταρα και πρωτεΐνες εναντίων μικροβίων

Τα κύτταρα που σκοτώνουν τα εισβάλλοντα μικρόβια, είναι λευκά αιμοσφαίρια που ονομάζονται «λευκοκύτταρα». Υπάρχουν τρία βασικά είδη αυτών των κυττάρων, και κάθε σκοτώνει την εισβολή μικροοργανισμών διαφορετικά.

**Μακροφάγα κύτταρα:** είναι μεγάλα, ακανόνιστου σχήματος κύτταρα που σκοτώνουν τα μικρόβια από την πρόσληψή τους μέσω φαγοκυττάρωσης. Μοιάζουν σαν αμοιβάδα που καταπίνει ένα σωματίδιο τροφής. Εντός του μακροφάγου, το *κενοτόπιο*, δεσμευμένο σε μεμβράνη που περιέχει το βακτήριο, συνδυάζεται με λυσοσώμα. Η συγχώνευση αυτή ενεργοποιεί λυσοσωμικά ένζυμα που σκοτώνουν το μικρόβιο απελευθερώνοντας μεγάλες ποσότητες ελεύθερων ριζών οξυγόνου. Τα μακροφάγα μπορούν να καταπιούν και τους ιούς, τα κυτταρικά υπολείμματα και τη σκόνη από σωματίδια στους πνεύμονες. Κυκλοφορούν συνεχώς στο εξωκυττάριο υγρό. Σε απάντηση σε μία λοίμωξη, τα μονοκύτταρα (μη διαφοροποιημένα λευκοκύτταρα) που βρέθηκαν στην κυκλοφορία του αίματος μέσω των τριχοειδών αγγείων, μετατρέπονται σε μακροφάγα.

Τα **ουδετερόφιλα** είναι λευκοκύτταρα που, όπως τα μακροφάγα, καταπίνουν και σκοτώνουν τα βακτήρια με φαγοκυττάρωση. Επιπλέον, τα ουδετερόφιλα

απελευθερώνουν χημικές ουσίες, που σκοτώνουν άλλα βακτήρια που τυχόν βρίσκονται στην περιοχή, καθώς επίσης και τα ίδια τα ουδετερόφιλα.

Τα **φυσικά φονικά κύτταρα (Natural Killer Cells - NKC)** δεν επιτίθενται στα μικρόβια, αλλά σκοτώνουν τα κύτταρα του σώματος που έχουν μολυνθεί με ιούς. Δεν σκοτώνουν με φαγοκυττάρωση, αλλά με τη δημιουργία μιας οπής στη μεμβράνη του κυττάρου στόχου. **Πρωτεΐνες**, που ονομάζονται *perforins*, απελευθερώνονται από τα φυσικά φονικά κύτταρα και τοποθετούνται στη μεμβράνη του κυττάρου-στόχου, σχηματίζοντας έναν πόρο. Αυτός ο πόρος επιτρέπει να μπει νερό στο κύτταρο - στόχο με αποτέλεσμα να διογκώνεται και να σκάει. Φυσικά, τα NKC επιτίθενται επίσης στα καρκινικά κύτταρα, συχνά πριν αυτά τα καρκινικά κύτταρα να έχουν την ευκαιρία να αναπτύξουν ανιχνεύσιμο όγκο. Η γρήγορη επιτήρηση και δράση τους αποτελεί μία από τις πιο ισχυρές άμυνες του οργανισμού κατά του καρκίνου.

Από την πλευρά τους, οι πρωτεΐνες του συστήματος συμπληρώματος μπορούν να αυξήσουν τα αποτελέσματα των άλλων αμυνών του σώματος. Κάποιες ενισχύουν τη φλεγμονώδη ανταπόκριση με την απελευθέρωση της ισταμίνης. Άλλοι προσελκύουν φαγοκύτταρα στην περιοχή της μόλυνσης και ακόμα άλλοι εισβάλλουν στα μικροβιακά κύτταρα, επιτρέποντας έτσι ώστε τα φαγοκύτταρα να μπορούν να συνδεθούν μαζί τους πιο εύκολα.

Μια άλλη κατηγορία πρωτεϊνών που παίζουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα του οργανισμού είναι οι «ιντερφερόνες». Χωρίζονται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες: Ιντερφερόνη α, Ιντερφερόνη β και Ιντερφερόνη γ. Σχεδόν όλα τα κύτταρα στο σώμα παρουσιάζουν α και β ιντερφερόνες. Αυτά τα πολυπεπτίδια δρουν ως αγγελιοφόροι που προστατεύουν τα φυσιολογικά κύτταρα στην περιοχή της μόλυνσης. Αν και οι ιοί είναι ακόμη σε θέση να διεισδύσουν στα γειτονικά κύτταρα, οι α και β ιντερφερόνες αντιγράφουν τον ιό και εμφανίζουν την πρωτεΐνη σε αυτά τα κύτταρα. Η Γ ιντερφερόνη παράγεται μόνο σε ειδικά λεμφοκύτταρα και στα NKC. Η έκκριση γ ιντερφερόνης από τα κύτταρα αυτά, είναι μέρος της ανοσολογικής άμυνας έναντι της μόλυνσης και του καρκίνου (Parham, 2009).

## 2.3 Βιολογία των Τ λεμφοκυττάρων

Τα Τ-λεμφοκύτταρα, είναι λεμφικά κύτταρα από το μυελό των οστών, τα οποία μεταναστεύουν στο θύμο αδένα, όπου αναπτύσσονται σε ώριμα, διαφοροποιημένα λεμφοκύτταρα, τα οποία διακινούνται μεταξύ αίματος και λέμφου, εξυπηρετώντας ως ένα από τα πρωτογενή κύτταρα της ανοσολογικής αντίδρασης. Τα ανώριμα Τ λεμφοκύτταρα καλούνται «θυμοκύτταρα». Τα θυμοκύτταρα είναι εκείνα που δεν έχουν ακόμη αντιμετωπίσει ξένα αντιγόνα (Ag) και δεν έχουν ακόμη ενεργοποιηθεί οι αντιγονικές τους ιδιότητες (Broere et al, 2011).

Τα πεπτίδια παρουσιάζονται στα θυμοκύτταρα σε δευτερογενή λεμφικά όργανα από δενδριτικά κύτταρα (DC). Τα DC παρέχουν συνδιεγερτικά σήματα για την αποτελεσματική ενεργοποίηση των Τ κυττάρων. Τα DC αποκτούν αντιγονικότητα Ag σε μη λεμφοειδείς ιστούς σε όλο το σώμα και προκειμένου να μεταναστεύσουν σε δευτεροβάθμια λεμφικά όργανα, καθοδηγούνται από φλεγμονώδη ερεθίσματα και κυτοκίνες. Τα κύτταρα APC (Ag-presenting cells) δημιουργούν αντιγονικά πεπτίδια από έναν παθογόνο παράγοντα ή από την επεξεργασία του αντιγόνου, και εμφανίζονται στην επιφάνεια του κυττάρου, στο πλαίσιο των μορίων MHC. Ο κυτταρικός υποδοχέας TCR, από την άλλη πλευρά, εξασφαλίζει ότι τουλάχιστον μερικά Τ θυμοκύτταρα θα μπορούν να δεσμεύσουν έναν αντιγονικό πεπτίδιο που προέρχεται από σχεδόν κάθε παθογόνο. Η δέσμευση του TCR πυροδοτεί μια σειρά ενδοκυτταρικά συμβάντα σηματοδότησης, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των Τ-κυττάρων. Τα ενεργοποιημένα Τ κύτταρα πολλαπλασιάζονται ταχέως (κλωνική επέκταση), μεταναστεύουν μέσω των ιστών στις θέσεις της παρουσίας του αντιγόνου Ag, και εκτελούν λειτουργίες όπως κυτταροτοξικότητα και παραγωγή διαφόρων κυτοκινών (διαλυτοί μεσολαβητές της ανοσοαπάντησης). Τα κυτταροτοξικά CD8 + Τ κύτταρα είναι πολύ αποτελεσματικά σε άμεση λύση των μολυσμένων ή κακοήθων κυττάρων που φέρουν το αντιγόνο Ag, ενώ τα CD4 + Τ βοηθητικά κύτταρα παράγουν κυτοκίνες και μπορεί να είναι άμεσα τοξικά για τα κύτταρα-στόχους καθώς διεγείρουν άλλες κυτταρικές λειτουργίες Τ και Β κυττάρων στην παραγωγή αντισωμάτων, όπως επίσης και την κινητοποίηση ισχυρών φλεγμονωδών μηχανισμών. Τα περισσότερα δραστικά Τ κύτταρα θα εξαφανιστούν αφού ο αντιγονικός παράγοντας εξαλείφεται, αν και άλλοι θα παραμένουν και θα σχηματίζουν τα Τ κύτταρα μνήμης, έτσι ώστε αν επανέλθει ο ιός στον οργανισμό, να αναγνωριστεί άμεσα.

Σε αντίθεση με τα υπόλοιπα T κύτταρα που παραμένουν για λίγους μήνες ζωντανά ή εξαφανίζονται στο τέλος της ανοσολογικής απόκρισης, τα T-λεμφοκύτταρα μνήμης μπορεί να επιβιώσουν για χρόνια σε λεμφοειδή όργανα και περιφερικούς ιστούς και να εξαπολύσουν μια δευτερεύουσα ανοσολογική απάντηση, αν το ίδιο αντιγόνο εμφανιστεί ξανά. Τα T κύτταρα Μνήμης ανταποκρίνονται πολύ πιο γρήγορα στο Ag. Έτσι, στην περίπτωση μόλυνσης, βοηθούν στην εξάλειψη των παθογόνων σε ένα πρώιμο στάδιο, εμποδίζοντας έτσι αποτελεσματικά την εξάπλωση της νόσου (Broere et al, 2011).

Η ανοσολογική ανοχή διατηρείται τουλάχιστον εν μέρει από τα κύτταρα ρυθμιστικών T (Treg). Αντιγόνα που διεγείρουν τα αυτό-αντιδραστικά T κύτταρα μπορούν επίσης να ενεργοποιήσουν τα φυσικά κύτταρα Treg, διατηρώντας έτσι κυρίαρχη την αυτό - ανοχή. Αντίθετα, κάποιες γενετικές ανωμαλίες ή διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες, που ειδικώς ή κυρίως επηρεάζουν τα κύτταρα Treg, προκαλούν ή προδιαθέτουν στην αυτοανοσία. Με τις πρόσφατες προόδους στην κατανόηση της ανάπτυξης των κυττάρων Treg στον θύμο αδένα και το μοριακό μηχανισμό της μεσολάβησης των κυττάρων καταστολής Treg, οι νέοι τρόποι κατεργασίας ανοσολογικών ασθενειών μέσω της στόχευσης των κυττάρων Treg σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο αναμένονται.

Η περιφερική ανοχή διαμεσολαβείται από πολλαπλούς μηχανισμούς όπως ανενεργή ή / και ενεργή καταστολή των δραστικών T κυττάρων με τα ρυθμιστικά κύτταρα T (Tr). Μεταξύ των CD4 (+) Tr, τα T ρυθμιστικά κύτταρα τύπου 1 (Tr1) έχουν δειχθεί ότι ρυθμίζουν τις ανοσοαποκρίσεις μέσω της παραγωγής των ανοσοκατασταλτικών κυτοκινών IL-10 και TGF-β. Τα κύτταρα TR1 διατηρούν την περιφερική ανοχή, τον έλεγχο της αυτοανοσίας και την πρόληψη της απόρριψης μοσχεύματος έναντι οπουδήποτε ξενιστή (GvHD). Η κυτταρική θεραπεία με ex vivo περιλαμβάνει τη δημιουργία κυττάρων Tr1 κι έχει αποδειχθεί ότι είναι αποτελεσματική σε πολλά προκλινικά μοντέλα μεσολάβησης κυττάρων T σε παθολογικά κύτταρα και ως εκ τούτου, αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για την κλινική εφαρμογή (Battaglia et al, 2006).

### 2.3.1 Σύνθεση του δικτύου των T - κυττάρων

A) Πρωτογενή λεμφοειδή όργανα - ο μυελός των οστών και ο θύμος αδένας - είναι περιοχές της αιμοποίησης και της κλωνικής επιλογής των T κυττάρων. Η T κυτταρική ανοσοαπόκριση αρχίζει στα δευτερεύοντα λεμφικά όργανα: σπλήνα, λεμφαδένες και το οργανωμένο δίκτυο λεμφικών ιστών που σχετίζεται με τις βλεννογονικές επιφάνειες συμπεριλαμβανομένης τις παυέριες πλάκες, αμυγδαλές, βρογχική, ρινική, και ιστούς που σχετίζονται με το έντερο.

B) Τα δευτερεύοντα λεμφικά όργανα έχουν ειδικευτεί σε περιοχές πλούσιες με T κύτταρα, όπου τα θυμοκύτταρα (T-λεμφοκύτταρα που είναι στο αρχικό στάδιο και δεν έχουν έρθει σε επαφή με αντιγόνα - Naive) στον σπλήνα, όπου διαμένουν για λίγες ώρες και τους λεμφαδένες όπου διαμένουν για περίπου 1 ημέρα, πριν φύγουν μέσω τις φλέβες του σπλήνα. Όταν τελικά φτάσουν στην κυκλοφορία του αίματος επανεισάγονται εκ νέου σε λεμφικά όργανα, επαναλαμβάνοντας τον κύκλο έως ότου ενεργοποιηθούν από αντιγονικά πεπτίδια ή να πεθάνουν από αμέλεια. Ένα μικρό κλάσμα των T κυττάρων διαμένουν στο δέρμα και σε ορισμένες επιφάνειες των βλεννογόνων, και μπορεί να παίζουν ένα ρόλο στην αρχική απάντηση της μικροβιακής εισβολής.

Δύο σημαντικά μόρια, τα CD4 και CD8, ορίζουν δύο χωριστές καταγωγές των T κυττάρων με διαφορετικές λειτουργίες. Τα CD4 + T κύτταρα αναγνωρίζουν τα Ag στο πλαίσιο των μορίων MHC κατηγορίας II και παράγουν κυτοκίνες. Τα CD8 + T λεμφοκύτταρα ενεργοποιούνται από αντιγονικά πεπτίδια που παρουσιάζονται από μόρια MHC τάξης I (που εκφράζεται σε όλα τα εμπύρηνα κύτταρα) και ονομάζονται «κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (CTL)».

Από την άλλη πλευρά, η λειτουργική κατάσταση των T κυττάρων επιτρέπει τη διάκριση εκτεταμένης ποικιλομορφίας από την άποψη του φαινοτύπου και τη λειτουργία. Τα αρχικά κύτταρα T είναι πιο ομοιογενής εκπρόσωποι των CD4 + και CD8 +. Κατά την ενεργοποίηση, ωστόσο, μπορούν να διακριθούν περαιτέρω. Έτσι, τα ενεργοποιημένα CD4 + T βοηθητικά κύτταρα μπορούν να υποδιαιρεθούν σε Th1, Th2, Th17 και Treg.

Στην περίπτωση της διχοτόμησης Th1 / Th2, οι χαρακτηριστικές κυτοκίνες είναι: IFN- $\gamma$  (Th1) έναντι IL-4, IL-5 (Th2) (Mosmann et al, 2005). Τα CD8 + λεμφοκύτταρα

μπορεί επίσης να ανατεθούν σε Tc1 ή Tc2 υποσύνολα σύμφωνα με το προφίλ της κυτοκίνης τους (Croft et al, 1994), αν και δεν παράγουν τις ίδιες ποσότητες κυτοκινών ως βοηθοί CD4 + και δεν είναι αποτελεσματικά στην ενεργοποίηση των B κυττάρων.

Επιπλέον, υπάρχουν υποσύνολα ρυθμιστικά T (Treg) κύτταρα που κάνουν την ετερογένεια των T κυττάρων ακόμη πιο περίπλοκη. Τα κύτταρα Treg μπορεί να υποδιαιρεθούν σε φυσικά κύτταρα (nTreg-natural) που δημιουργούνται στο θύμο, και επαγώγιο Treg (iTreg), που μετατρέπεται σε Treg με την ενεργοποίηση στην περιφέρεια. Πολλοί από τις ειδικούς δείκτες κυτταρικής επιφάνειας μπορεί να είναι πολύ χρήσιμοι στο σχεδιασμό των φαρμάκων για την επιλεκτική χειραγώγηση της ανοσολογικής απόκρισης.

Τα κύτταρα T που κυκλοφορούν στο αίμα, εκφράζουν την L-σελεκτίνη (CD62L), CC υποδοχέα χημειοκινών 7 (CCR7) και τη λειτουργία των λευκοκυττάρων στο αντιγόνο-1 ιντεγκρίνη αLβ2 LFA-1). Αυτά μεσολαβούν στη κύλιση, πρόσφυση και εξαγγείωση των κυττάρων μέσα από τα ενδοθηλιακά φλεβίδια (εξειδικευμένα φλεβίδια που βρέθηκαν στους λεμφικούς ιστούς) σε περιφερικούς λεμφαδένες και άλλα λεμφοειδή όργανα.

Αλληλεπιδράσεις υψηλής συγγένειας TCR με το ξένο αντιγονικό πεπτίδιο / MHC στην ώριμη APC μετά την ενεργοποίηση αντικατοπτρίζονται σε αλλαγές του φαινοτύπου. Τα ενεργοποιημένα T κύτταρα εκφράζουν το αντιγόνο CD69 (ένα αντιγόνο που ενεργοποιείται άμεσα) και το CD25 (IL-2Ra). Άλλοι σημαντικοί υποδοχείς στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων T κυττάρων είναι: CD40, η οποία διεγείρει τα APC (Ag-presenting cells) μέσω σύνδεσης προς CD40, οδηγώντας σε ρύθμιση του CD80 (B7-1) και CD86 (B7-2) ενισχύοντας έτσι τον αυξητικό παράγοντα (IL-2) και την αύξηση της παραγωγής ενεργοποίησης των T κυττάρων (Veldhoen et al, 2008).

Η απουσία των CCR7 και CD62L επιτρέπει τα T κύτταρα να μεταναστεύσουν σε φλεγμονή μη λεμφικών ιστών, όπως του πνεύμονα ή του εντέρου και να καταργήσουν τους παθογόνους παράγοντες που βρίσκονται σε αυτούς τους ιστούς.

Από την πλευρά τους, τα T κύτταρα μνήμης, είναι ικανά να κυκλοφορούν σε λεμφοειδή και μη-λεμφοειδή διαμερίσματα. Σύμφωνα με την τοποθεσία,



τα T κύτταρα μνήμης εκφράζουν αντίστοιχους δείκτες επιφάνειας. Για παράδειγμα, μεταξύ των φαινοτύπων CD8 + κύτταρα μνήμης που έχουν εντοπιστεί (CD45RA-, CCR7 +, CD45RA-, CCR7-, CD45RA +, CCR7-), οι CCR7+ T κύτταρα είναι μη-κυτταροτοξικά κεντρικά κύτταρα μνήμης, ενώ τα CCR7- είναι κυτταροτοξικά κύτταρα. Κατά την επαφή με το κατάλληλο Ag, τα κύτταρα μνήμης τελεστών μπορούν να εκτελέσουν λειτουργίες αμέσως, ενώ τα κεντρικά ή λεμφικά κύτταρα μνήμης μπορούν γρήγορα να πολλαπλασιαστούν, να επεκταθούν και να επιτεθούν στα παθογόνα κύτταρα. Τα κεντρικά κύτταρα μνήμης εκφράζουν τα CCR7 και CD62L και διαμένουν σε λεμφικά όργανα, που παράγουν IL-2 μετά από διέγερση. Ορισμένα από αυτά έχουν βρεθεί να μεταναστεύουν σε ορισμένες περιοχές της φλεγμονής, ανάλογα με την έκφραση των υποδοχέων των χημειοκινών όπως τα CCR4, CCR6 και CXCR3 (Sallusto & Lanzavecchia, 2009).

Δύο σημαντικές λειτουργίες των βοηθητικών T υποπληθυσμών διακρίνονται από τα προφίλ της κυτοκίνης τους. Τα Th1 κύτταρα παράγουν κυρίως IPN-γ, αλλά επίσης και IL-2, TNF-α, και λεμφοτοξίνη. Τα Th1 κύτταρα ενισχύουν την προ-φλεγμονώδη κυτταρική ανοσία και δείχθηκε ότι επάγουν καθυστερημένου τύπου υπερευαισθησία (DTH), ενώ μεσολαβούν ως ανοσοαπάντηση σε λοιμώξεις πρωτόζωων, όπως *Leishmania* και *Trypanosoma* (Battaglia et al, 2006). Τα Th2 κύτταρα εκκρίνουν IL-4, -5, -6, -10 και -13 και βοηθούν στην προώθηση της μη-φλεγμονώδους άμεσης ανοσοποιητικής απάντησης. Επίσης, έχουν αποδειχθεί ότι είναι απαραίτητα στην παραγωγή B κυττάρων του IgG, IgA, και IgE. Η διαδρομή των Th1 και Th2 φαίνεται να είναι αμοιβαία ανταγωνιστική. Αυτό έχει οδηγήσει στο μοντέλο της πόλωσης της ανοσολογικής απόκρισης σύμφωνα με τη φύση του Ag και τη γύρω στο περιβάλλον κυτοκίνη. Για παράδειγμα, οι IPN-γ και IL-12 είναι γνωστά για την υποστήριξη Th1 κυττάρων, ενώ οι IL-4 και IL-10 θα βοηθήσουν στην ανάπτυξη Th2 (Broere et al, 2011).

Τα κύτταρα Th17 θεωρούνται πολύ σημαντικά με ιδιαίτερες προ-φλεγμονώδεις δράσεις σε ασθένειες όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η ψωρίαση και η νόσος του Crohn. Η συμβολή των Th1 κυττάρων σε φλεγμονώδεις ασθένειες εξακολουθεί να είναι δυνατή, αν και πολύπλοκη, δεδομένου των επιπρόσθετα ρυθμιστικών συνεισφορών της IL-12 και IPN-γ σε φλεγμονή. Στην πραγματικότητα, τα Th17 είναι το πρώτο υποσύνολο κυττάρων που παράγονται

κατά τη διάρκεια της λοίμωξης. Ο υποδοχέας IL-17 εκφράζεται σε ινοβλάστες, επιθηλιακά κύτταρα και κερατινοκύτταρα. Επαφή με IL-17 οδηγεί σε παραγωγή κυττάρων της IL-6 και χημειοκινών όπως CXCL8 και CXCL2 και τη διέγερση μακροφάγων κοκκιοκυττάρων (GM-CSF). Συνολικά, αυτό οδηγεί σε πρόσληψη ουδετερόφιλων και μακροφάγων στη θέση της μόλυνσης και ενισχύει την παραγωγή του μυελού των οστών (Linterman et al, 2009). Αυτά τα κύτταρα συνεργάζονται με τα IL-17 στην επαγωγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων, όπως β-αμυντίνες σε επιδερμικά κερατινοκύτταρα, ενισχύοντας έτσι την έμφυτη οξεία φλεγμονώδη απόκριση στη μόλυνση.

Υπάρχουν πλέον αρκετές υποομάδες οι οποίες ενδέχεται να έχουν τη δυνατότητα να παράγουν ανοσολογική ασθένεια. Σύμφωνα με τους επιστήμονες, η κολίτιδα σε ποντικούς παράγεται από τα Th1, Th2, Th17 και Th9 κύτταρα, ενώ μπορούν να μεσολαβήσουν στην παθολόγο απόκριση αντισώματος σε πειραματικά μοντέλα λύκου (Linterman et al, 2009).

### **2.3.2 Μηχανισμοί ενεργοποίησης T λεμφοκυττάρων, παρουσία αντιγόνου**

Το κεντρικό γεγονός της κυτταρομεσολαβητικής ανοσοαπόκρισης είναι η ενεργοποίηση και ο κλωνικός πολλαπλασιασμός των T κυττάρων. Η ενεργοποίησή τους ξεκινά με την αλληλεπίδραση του συμπλέγματος TCR-CD3 με ένα επεξεργασμένο αντιγονικό πεπτίδιο, προσδεδεμένο σε ένα μόριο MHC είτε της τάξης I (CD8 κύτταρα) είτε της τάξης II (CD4 κύτταρα), στην επιφάνεια ενός αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου. Η αλληλεπίδραση αυτή και τα προκαλούμενα από αυτή διεγερτικά σήματα, εμπλέκουν επίσης ποικίλα επικουρικά μεμβρανικά μόρια του T κυττάρου και του αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου. Η αλληλεπίδρασή τους σηματοδοτεί την έναρξη μιας σειράς βιοχημικών διεργασιών, οι οποίες οδηγούν τα T κύτταρα που βρίσκονται σε φάση ηρεμίας να εισέλθουν στον κυτταρικό κύκλο, να πολλαπλασιαστούν και να διαφοροποιηθούν προς κύτταρα μνήμης ή ανοσοδραστικά κύτταρα. Πολλά από τα γονιδιακά προϊόντα που εκφράζονται κατά την αλληλεπίδραση των T κυττάρων με το αντιγόνο μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με το πόσο νωρίς μπορούν να ανιχνευθούν μετά την αντίδραση του αντιγόνου:

- Άμεσα γονίδια τα οποία αναγνωρίζονται μέσα σε μισή ώρα από την αναγνώριση του αντιγόνου και κωδικοποιούν διάφορους παράγοντες όπως ο o-Fos, o-Myc, o-Jun.
- Πρώιμα γονίδια τα οποία εκφράζονται μέσα σε 1-2 ώρες από την αναγνώριση του αντιγόνου και κωδικοποιούν την IL2, τον IL-2R (υποδοχέας της IL-2) και πολλές άλλες πρωτεΐνες.
- Όψιμα γονίδια, τα οποία εκφράζονται σε περισσότερες από 2ημέρες μετά την αναγνώριση του αντιγόνου και κωδικοποιούν διάφορα μόρια κυτταρικής προσκόλλησης.

Αυτές οι σημαντικές μεταβολές είναι το αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των οδών μεταγωγής μηνυμάτων από τη σύνδεση του TCR με τα συμπλέγματα MHC-πεπτιδίου. (Kindt T., Goldsby R., Osborne B. 2013)

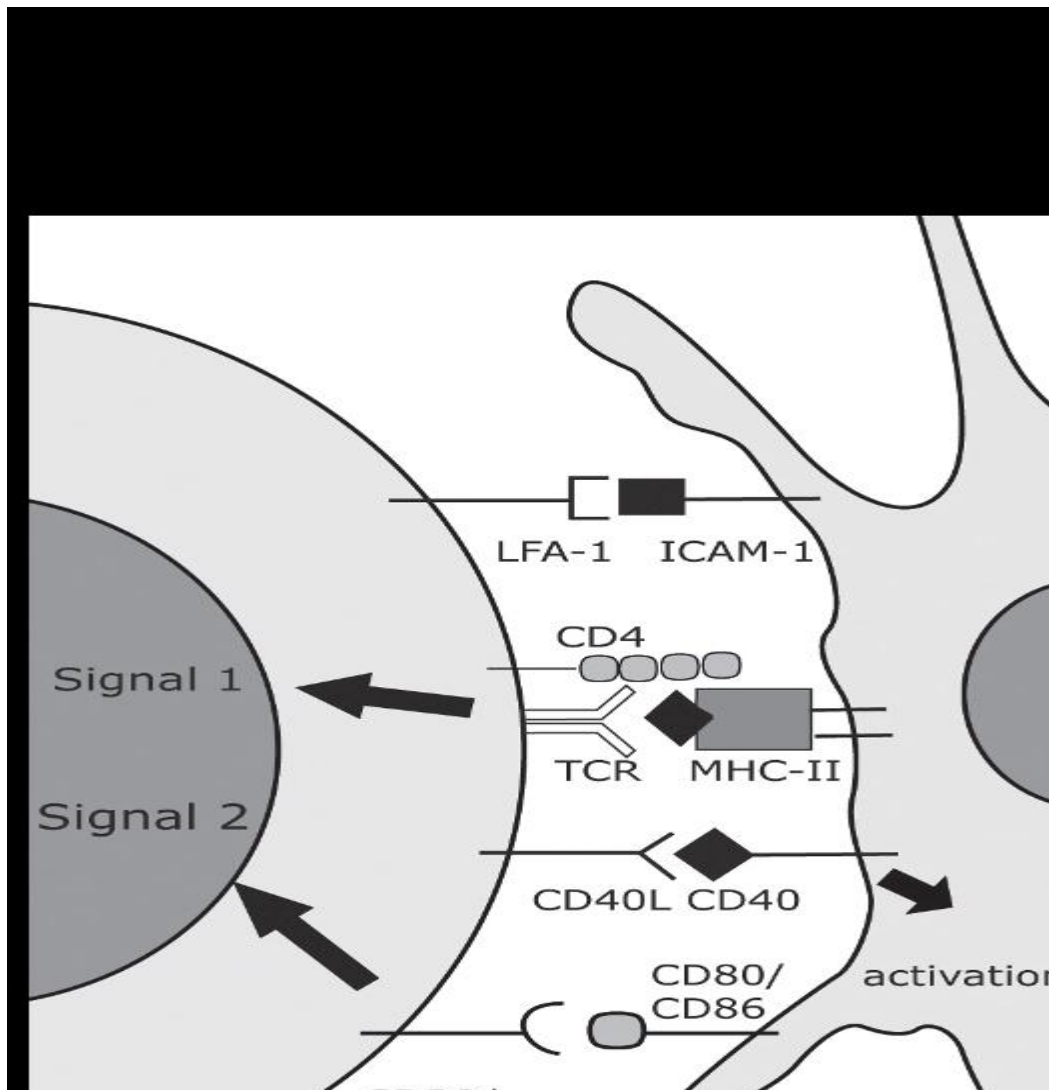
Τα αντιγονικά πεπτίδια που προέρχονται από διαφορετικούς μοριακούς μηχανισμούς επεξεργασίας από παθογόνα Ag κατοικούν είτε στο κυτταρόπλασμα ή σε φυσαλιδώδη διαμερίσματα του μολυσμένου κυττάρου. Μόρια MHC τάξης I συνδέονται με τα αντιγονικά πεπτίδια, τα οποία προέρχονται από το κυτοσόλιο του APC ως αποτέλεσμα ενός πολυμοριακού συγκροτήματος πρωτεασών (πρωτεασωμάτων) και μεταφέρονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο του TAP-1 και TAP-2 (μεταφορέας που σχετίζεται με την επεξεργασία των Ag). Τα πρόσφατα συναρμολογημένα σύμπλοκα MHC / πεπτιδίου στο ενδοπλασματικό δίκτυο στη συνέχεια μετατοπίζεται μέσω του Golgi στην κυτταρική επιφάνεια. Σχεδόν όλα τα κύτταρα του σώματος εκφράζουν MHC τάξης I μόρια σε διαφορετικές επίπεδα και έτσι παρουσιάζουν αντιγονικά πεπτίδια ενός CD8 + CTL και να γίνει πιθανός στόχος καταστροφής, ανάλογα με το αντιγόνο. Τα μόρια MHC κατηγορίας II, αντίθετα, συνδέουν πεπτίδια που προέρχονται από παθογόνα που εμφανίζονται στα ενδοκυτταρικά κυστίδια του κυττάρου ή από εξωκυτταρικές πρωτεΐνες.. Μόρια MHC κατηγορίας II μεταφέρονται από το Golgi ενός τα ενδοσώματα και λυσοσώματα ως ένα σύμπλοκο συνδεδεμένο με το μη πολυμορφική αμετάβλητη αλυσίδα ενός πεπτιδίου. Ακολούθως, η αμετάβλητη αλυσίδα του πεπτιδίου αποδομείται και αντικαθίσταται με πεπτίδια που δημιουργούνται από πρωτεάσες φυσαλιδώδους οξέως σε οξύ pH στα διαμερίσματα του ενδοσωματίου. Στην επιφάνεια του συμπλόκου MHC τάξης II / πεπτιδίου εμφανίζονται μόνο λίγοι τύποι

ανοσοκυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των μακροφάγων, των Β κυττάρων και DC (Gallegos, & Bevan, 2004).

Ένας σημαντικός μηχανισμός είναι η διασταυρωμένη παρουσίαση (cross-presentation) του αντιγόνου Ag, μια διαδικασία στην οποία η ώριμη APC μπορεί να παρουσιάσει ένα αντιγόνο που μεταφέρθηκε από άλλο κύτταρο. Αυτό το γεγονός επιτρέπει το εξωκυττάριο Ag να παρουσιαστεί από MHC κατηγορίας I και να ενεργοποιηθεί η CTL (Germain, 1994).

### **2.3.3.Δραστηριοποίηση των μοριακών μηχανισμών των λεμφοκυττάρων**

Η ενεργοποίηση των κυττάρων είναι το πιο κρίσιμο στάδιο στην ανάπτυξη αλυσίδας και απαιτεί μια σύνθετη αλληλεπίδραση του TCR, συν-υποδοχέων και βοηθητικά μόρια επί της επιφανείας του κυττάρου επί του APC.



Εικόνα 6: Η ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων (Broere et al, 2011 pdf)

Η αλληλεπίδραση TCR-Ag / MHC παρέχει ένα βήμα αναγνώρισης του Ag και ενεργοποιεί την ενδοκυττάρια σηματοδότηση. Συν-υποδοχείς CD4 και CD8 βοηθούν το σήμα TCR. Συνδιεγερτικά μόρια τα CD28 και CTLA-4 ξεκινούν το δικό ενδοκυτταρικό σήμα, με το οποίο ενισχύουν ή ρυθμίζουν το σήμα TCR. Βοηθητικά μόρια τα LFA-1 ή CD2 παράσχουν πρόσφυση στο σημείο επαφής των κυττάρων, ενισχύοντας την αλληλεπίδραση μεταξύ κυττάρου και APC και επιτρέποντας μεταγωγές του σήματος. Οι αλυσίδες αβ του TCR είναι μη-ομοιοπολικά συνδεδεμένες με αμετάβλητες αλυσίδες του CD3 σύμπλοκου (ζ, δ, ε, και γ). Τα ενδοκυτταρικά τμήματα των αλυσίδων CD3 περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση ενός ή πολλαπλών ανοσοϋποδοχέων τυροσίνης και ενεργοποιούν μοτίβα (ITAMs). Η Src

οικογένεια PTK Fyn και Lck φωσφορυλιώνει ITAMs τη διασταυρούμενη σύνδεση TCR με Ag / MHC, και η πλήρως φωσφορυλιωμένη ITAMs προσλαμβάνει PTK ZAP-70 στο συγκρότημα μέσω των περιοχών SH2. Αυτό επιτρέπει την LCK να ενεργοποιήσει την ZAP-70. Η ενεργοποιημένη ZAP-70 αλληλεπιδρά και φωσφορυλιώνει SLP-76 και LAT. Η SLP-76 φαίνεται να εμπλέκεται σε αλλαγές στον σκελετό του κυττάρου ενώ η LAT είναι μία μεμβράνη συναφής με τη μεμβράνη της πρωτεΐνης ώστε κατά την φωσφορυλίωση παρέχει θέσεις πρόσδεσης για έναν αριθμό κρίσιμων σηματοδοτικών πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων των Grb2, Ras, και PLC- $\gamma$ . Η πρωτεΐνη PLC- $\gamma$  παίζει έναν κρίσιμο ρόλο στην ρύθμιση του Ca<sup>2+</sup>, καθώς διασπά την 4,5-διφωσφορική (PIP<sub>2</sub>) διακυλογλυκερόλη (DAG) και ινοσιτόλη 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) κατά την ενεργοποίηση από την κινάση PI3. Η DAG διεγείρει την PKC, ενώ η συσσώρευση IP<sub>3</sub> είναι το αρχικό έναυσμα για την απελευθέρωση του ενδοκυτταρικού Ca<sup>2+</sup> το οποίο με τη σειρά του, ενεργοποιεί το άνοιγμα μεμβράνης Ca<sup>2+</sup> του πλάσματος και αφήνει να ενεργοποιηθούν τα κανάλια του Ca<sup>2+</sup> (CRAC). Στη συνέχεια οι ενέργειες σηματοδότησης οδηγούν τελικά στην ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων NP-AT, ELK-1, Jun, και ATF-2 και την έκφραση του ανοσοποιητικού γονιδίου (Broere et al, 2011).

Παρά το γεγονός ότι συμβαίνουν τα πρώτα γεγονότα φωσφορυλίωσης μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα από την εγκάρσια σύνδεση του TCR, η παρατεταμένη επαφή και η αλληλεπίδραση των κυττάρων με την APC είναι που απαιτείται για την πλήρη ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων. Πρόσφατες μελέτες εμπλοκής TCR έχουν επικεντρωθεί σε ανοσολογικές συνάψεις (IS) –Δυναμική ομαδοποίηση των διαφόρων μορίων που βρίσκονται στο σημείο επαφής μεταξύ των κυττάρων και APC που περιλαμβάνουν TCR / CD3, συν-υποδοχείς, και άλλα μόρια (Grakoui et al, 1999). Πρόσφατες μελέτες έχει αναφερθεί σε μια δομή δακτυλίου που σχηματίζεται από TCR-Ag / MHC γύρω από ένα σύμπλεγμα του LFA-1 και μεσοκυττάρια προσκόλλησης μόριο-1 (ICAM-1) που ακολουθείται από αναστροφή δομής, η μετεγκατάσταση των TCR / pMHC με το κέντρο, και ο σχηματισμός των διαχωρισμένων περιοχών συμπλοκών με υπερμοριακή ενεργοποίηση (SMAC). Ζευγάρι IS περιέχει κεντρικό SMAC ( $\gamma$ -SMAC), ένα σύμπλεγμα TCR δεσμεύεται με το σύμπλοκο Ag / MHC, και CD4 ή CD8, CD3, CD2, CD2AP, CD28, και PTKLck. Η c-SMAC περιβάλλεται από περιφερική SMAC, η οποία περιέχει LFA-1, ICAM-1,

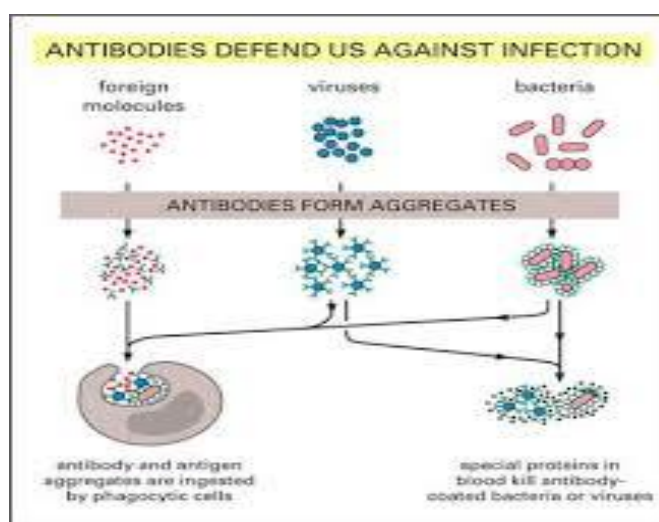
και Talin. Έτσι, σχηματίζεται επί της επιφάνειας του κυττάρου η δυνατότητα να παρέχει παρατεταμένη κυτταρική αλληλεπίδραση και σηματοδότηση, που οδηγούν στη ροή  $Ca^{2+}$ , ακτίνη και την πλήρη άνθηση των κυττάρων δραστηριοποίησης. Διαπιστώθηκε ότι η συσσώρευση των κυτταρολυτικών κόκκων σε CTL κατευθύνεται από IS και ότι η απελευθέρωση των κόκκων λαμβάνει χώρα εντός p-SMAC (Broere et al, 2011).

## 2.4 Ανοχή

Ένα σημαντικό μέρος της κυτταρικής ανοσίας είναι η ανάπτυξη της μη-ανταπόκρισης φυσικού Ag, αντί για την τοποθέτηση αποτελεσματικής ανοσοποιητικής απάντησης εναντίον «ξένων» αντιγόνων. Η κατανομή της αυτοανοχής θα οδηγήσει στην ανάπτυξη των αυτοάνοσων νοσημάτων. Τα αντιδραστικά κύτταρα και τα δύο  $CD4^{+}$  και  $CD8^{+}$ , έχουν δειχθεί ότι είναι υπεύθυνα για την έναρξη και διαμεσολάβηση βλάβης του ιστού σε πολλά πειραματικά ζωικά μοντέλα αυτοανοσίας καθώς και σε ανθρώπινες μελέτες (Broere et al, 2011).

Η ανοσολογική ανοχή επιτυγχάνεται με διαφορετικούς μηχανισμούς σε διαφορετικά στάδια. Αρχικά, τα δυναμικά αντιδραστικά λεμφοκύτταρα διαγράφουν την ανάπτυξη των κυττάρων στον θύμο αδένα. Η αλληλεπίδραση υψηλής συγγένειας TCR με τα ανώριμα θυμοκύτταρα και με τα Ag παρόντα σε θυμικά κύτταρα οδηγεί σε απόπτωση και αποβολή αυτών των κυττάρων στην διαδικασία που είναι γνωστή ως “αρνητική επιλογή”. Τα κύτταρα έχουν χαμηλή έως μέτρια συγγένεια με τα TCR με αποτέλεσμα τα Ag να αποδρούν από τον θύμο αδένα και να μεταναστεύουν στα περιφερειακά κύτταρα. Αυτά τα κύτταρα έχουν συνήθως «άγνοια» για να αναγνωρίσουν τα Ag ή να αναπτύξουν ανοχή μετά την αρχική ενεργοποίηση. Αν και οι Ag-ειδικών TCRs των κυττάρων δεν έχουν έναν εγγενή μηχανισμό για να διακρίνουν τον εαυτό από τα μη-αυτό-πεπτίδια, η ενεργοποίηση από την Ag είναι διαφορετική από ότι με το «ξένο» Ag, κυρίως λόγω απουσίας συνδιεγερτικών σημάτων από μη ενεργοποιημένα APC. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με την ενεργοποιημένη APC που ρυθμίζουν τα συνδιεγερτικά μόρια κατά τη διάρκεια της φλεγμονής, σε λοιμώξεις, ή παθολογικές καταστάσεις. Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα συνδιεγερτικά μόρια θα δώσουν άμεση απάντηση στα κύτταρα είτε

ενεργοποίηση είτε ανοχή. Απλή απουσία των συνδिएγερτικών σημάτων δείχθηκε ότι επάγει ανέργια σε δραστικά Κύτταρα σε νίνο και in vitro δοκιμασίες, ενώ τα αφελή (naïve) κύτταρα μπορεί να απαιτούν ένα αρνητικό σήμα δέσμευσης CTLA-4 για την ανάπτυξη ανέργιας και να γίνον ανεκτικά. Τα κύτταρα μπορούν να υποβληθούν σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο μετά από επανέκθεση στο ίδιο Ag σε μια διαδικασία που αποκαλείται “ενεργοποίηση κυτταρικού θανάτου” (EKA). Η AICD διαμεσολαβείται από τους υποδοχείς θανάτου (FAS / FAS-με αλληλεπίδραση των CD4 + κυττάρων και με TNFRII / TNF αλληλεπίδραση των CD8 + κύτταρα) που περιλαμβάνουν αλληλεπίδραση και σηματοδότηση που επάγει θάνατο στα συμπλέγματα (DISC).



Εικόνα 7: Αντισώματα εναντίων μόλυνσης. Πηγή: [routsias-lab.gr](http://routsias-lab.gr)

Περιφερική ανοχή μπορεί να ελέγχεται από την ανοσοποιητική απόκλιση των κυτοκινών και από τα κύτταρα Treg. Και οι δύο φυσικοί και προσαρμοστικοί CD4 + ρυθμιστικά κύτταρα έχουν εμπλακεί στη ρύθμιση αυτοάνοσης απάντησης. Τα κύτταρα του Θύμου αδένα, που προέρχονται από κύτταρα CD25 + nTreg καταστέλλουν τύπους κυτταρικής ενεργοποίησης με μεγάλο βαθμό άγνωστων μηχανισμών. Απαιτούν ισχυρή συνδिएγερτικά σήματα για την επαγωγή και τη συντήρηση, με Foxp3 έκφραση. Προσαρμογή στα αντιγόνα που προκαλείται από τα κύτταρα Treg δημιουργείται στην περιφέρεια από τα υπό-βέλτιστα αντιγονικά σήματα και βασίζονται σε κυτοκίνες την IL-10 και TOP-β για την καταστολή των αντιγόνων. Αυτά τα κύτταρα ποικίλου φαινοτύπου εμφανίζονται συχνά κάτω από



ειδικές συνθήκες, χρόνιες ιογενείς λοιμώξεις. Η παρουσία των κυττάρων Treg δίνει νέες δυνατότητες για τη θεραπεία των αυτοάνοσων νοσημάτων και για τη συντήρηση των μεταμοσχευμένων οργάνων (Broere et al, 2011).

## **2.5 Η κυτταρική ανοσία στα όργανα του σώματος**

Ο οργανισμός έχει έμφυτη άμυνα, σε περίπτωση που εισβάλλει κάποιος ιός, και μπορεί να δράσει αμέσως και να πετύχει την απόκρουση μόλυνσης, αλλά αν δεν ακολουθείται από μια σειρά που προκαλεί από νωρίς την ανοσοαπάντηση, τότε η μόλυνση θα αναπτυχθεί. Εξειδικευμένα υποσύνολα των κυττάρων τα οποία μπορούν να θεωρηθούν ως ενδιάμεσα μεταξύ έμφυτης και προσαρμοστικής ανοσίας, δεδομένου ότι αυτές φέρουν μία χαρακτηριστική αναδιάταξη υποδοχέων, είναι σημαντικά για τον καθορισμό του λειτουργικού χαρακτήρα των αναπτυσσόμενων αντιγόνο-ειδικών κυττάρων.

Οι βλεννογόνοι του ανοσοποιητικού συστήματος λειτουργούν ως ένα χωριστό διαμέρισμα του περιφερειακού ανοσοποιητικού συστήματος και παρουσιάζουν μια χαρακτηριστική ανατομία και ποικιλία λεμφοκυττάρων. Ο έντερο-λεμφοειδής ιστός δείχνει μια αξιοσημείωτη ικανότητα να διακρίνει μεταξύ διαφορετικών τύπων ξένων αντιγόνων, ανταποκρινόμενα διαφορετικά σε αντιγόνα των τροφίμων, στην αβλαβή φυσιολογική χλωρίδα του εντέρου, και διαφορετικά σε παθογόνα, που εισβάλλουν στον οργανισμό προκειμένου να αναπτυχθεί λοίμωξη ή φλεγμονή. Μια προσαρμοστική ανοσοαπόκριση είναι τοποθετημένη στον εξειδικευμένο λεμφικό ιστό που εξυπηρετεί την ιδιαίτερη θέση λοίμωξης και διαρκεί αρκετές ημέρες για να αναπτυχθούν, καθώς τα Β λεμφοκύτταρα πρέπει να συναντούν το ειδικό αντιγόνο τους, για να πολλαπλασιαστούν και διαφοροποιηθούν σε δραστικά κύτταρα. Οι αποκρίσεις των κυττάρων, που εξαρτώνται από τα Β-κύτταρα, δεν μπορούν να ξεκινήσουν έως ότου το αντιγόνο-ειδικών κυττάρων να έχει την ευκαιρία να πολλαπλασιαστεί και να διαφοροποιηθεί. Μόλις εμφανιστεί η προσαρμοστική ανοσολογική απόκριση, τα αντισώματα και τα δραστικά κύτταρα διασπείρονται μέσω της κυκλοφορίας για να βρουν μολυσμένους ιστούς. Η λοίμωξη τότε συνήθως ελέγχεται και το παθογόνο κύτταρο εξαλείφεται. Οι τελικοί μηχανισμοί των κυττάρων χρησιμοποιούνται για να καθαρίσουν μια μόλυνση, γεγονός που εξαρτάται από τον τύπο του μολυσματικού παράγοντα, και οι περισσότερες περιπτώσεις είναι τα

ίδια με εκείνα που χρησιμοποιούνται στα πρώτα στάδια της άμυνας του ανοσοποιητικού συστήματος.

Μια αποτελεσματική προσαρμοστική ανοσολογική απόκριση οδηγεί σε κατάσταση προστατευτικής ανοσίας. Αυτή η κατάσταση αποτελείται από την παρουσία των κυττάρων και μόρια που παράγονται κατά την αρχική απόκριση και την ανοσολογική μνήμη. Η ανοσολογική μνήμη είναι η αυξημένη ικανότητα του οργανισμού να ανταποκριθεί σε παθογόνους οργανισμούς που έχει αντιμετωπίσει στο παρελθόν και με επιτυχία είχε εξαλείψει. Ο ακριβής μηχανισμός της ανοσολογικής μνήμης, ο οποίος είναι αναμφισβήτητα το πιο κρίσιμο χαρακτηριστικό της προσαρμοστικής ανοσίας, παραμένει ο ενεργός τομέας της πειραματικής επιστήμης, και τώρα επιτέλους αποδίδει τα μυστικά του. Η τεχνητή επαγωγή προστατευτικής ανοσίας μέσω του εμβολιασμού, ο οποίος περιλαμβάνει ανοσολογική μνήμη, είναι το πιο σημαντικό επίτευγμα της ανοσολογίας στο πεδίο της ιατρικής (Broere et al, 2011).

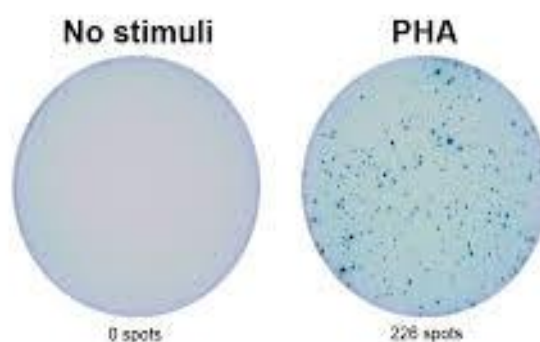
## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ**

### **ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑ**

Οι περισσότερες δοκιμασίες για την κυτταρική ανοσία βασίζονται στην έκκριση κυτοκίνης, ως δείκτης της κυτταρικής απόκρισης. Υπάρχει μία μεγάλη ποικιλία

δοκιμασιών, αλλά εκείνη που χρησιμοποιείται περισσότερο είναι η δοκιμασία του συνδεδεμένου ενζύμου ανοσοκηλίδας (ELISPOT), η οποία αναπτύχθηκε αρχικά ως μέθοδος για τον προσδιορισμό του αριθμού των Β κυττάρων που εκκρίνουν αντισώματα. Αργότερα, η μέθοδος ήταν προσαρμοσμένη στο να προσδιοριστεί ο αριθμός των κυττάρων που εκκρίνουν κυτοκίνες. Δοκιμασίες ELISPOT εκτελούνται σε πλάκες μικροτιτλοδότησης επικαλυμμένες με το σχετικό αντιγόνο. Τα μονοπύρνα κύτταρα (PBMCs) προστίθενται σε αυτό και στη συνέχεια επωάζονται. Τα PBMCs είναι λευκά κύτταρα του αίματος είναι τα λεμφοκύτταρα και τα μονοκύτταρα. Όταν τα κύτταρα που εκκρίνουν την ειδική κυτοκίνη, σχηματίζουν διακριτά έγχρωμες κηλίδες τότε μπορούν να μετρηθούν. Ένας τρόπος από τους πιο δημοφιλείς αυτού του τύπου δοκιμασιών, που γίνονται για να αξιολογηθεί η κυτταρική απόκριση του ανοσοποιητικού είναι η INP- $\gamma$  ELISPOT δοκιμασία, μία δοκιμασία για τη δραστικότητα CTL. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως «κηλίδες» που σχηματίζουν τα κύτταρα ανά εκατομμύριο μονοπύρνα κύτταρα περιφερικού αίματος (SPC / 106 PMBC). Άλλοι τύποι δοκιμασιών είναι η δοκιμασία ELISPOT IL-2, η IL-4 ELISPOT δοκιμασία, κλπ.

### Human IL-4 ELISpot (HRP)



Εικόνα 8: Δοκιμασία ELISPOT. Πηγή [www.mabtech.com](http://www.mabtech.com)

Η δοκιμασία fluorospot είναι μια τροποποίηση μιας δοκιμασίας ELISPOT και βασίζεται στη χρήση πολλαπλών φθορίζουσών αντικυτοκινών, η οποία καθιστά δυνατό να εντοπίζει δύο κυτοκίνες στην ίδια δοκιμασία. Οι δοκιμασίες όπου μπορεί

να ποσοτικοποιηθεί ο αριθμός των αντιγόνων-ειδικών κυττάρων είναι η «δοκιμασία ενδοκυτταρικής κυτοκίνης» και η «δοκιμασία τετραμερούς». Η κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιεί αρχές διάχυσης του φωτός και εκπομπής φθοριόχρωμων μορίων για να μετρήσει τα κύτταρα. Τα κύτταρα επισημαίνονται με ένα φθορόχρωμα, μία φθορίζουσα χρωστική που χρησιμοποιείται για τη χρώση βιολογικών δειγμάτων. Ένα διάλυμα με κύτταρα εγχέεται στο κυτταρόμετρο ροής, και τα κύτταρα στη συνέχεια εξαναγκάζονται σε ένα ρεύμα μονών κυττάρων μέσω μιας υδροδυναμικής εστίασης. Όταν τα κύτταρα υποκλέπτουν φως από μια πηγή, συνήθως ένα λέιζερ, διασκορπίζουν το φως και γίνεται η συνειδητοποίηση φθοριοχρωμάτων. Η ενέργεια απελευθερώνεται ως ένα φωτόνιο με ειδικές φασματικές ιδιότητες μοναδική για το φθορόχρωμα (Becton & Dickinson, 2006).

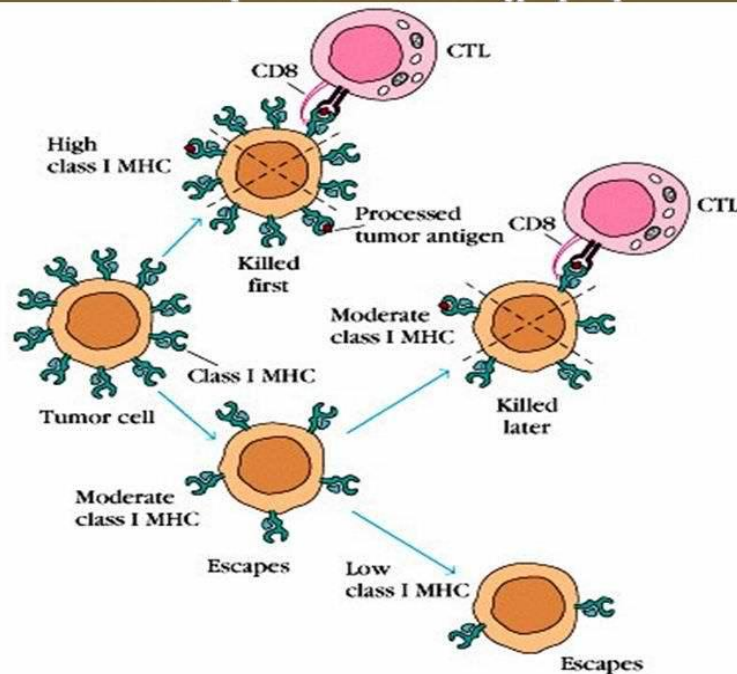
### **3.1 Δοκιμασίες κυτταρικής ανοσίας για την ανοσοθεραπεία των καρκινικών κυττάρων**

Η ανάπτυξη στρατηγικών για την ενεργό τόνωση μιας ανοσολογικής απόρριψης των όγκων, στο παρελθόν αποτελούσε απατηλό στόχο. Ωστόσο, σήμερα έχει επιταχυνθεί καθώς έχουν αποκαλυφθεί τρόποι για την ανίχνευση αντιγόνων και την σύνδεσή τους με τα κύτταρα. Εμβόλια ολόκληρων όγκων αναμειγνύονται με το ανοσοενισχυτικό, όγκοι με τροποποιημένα γονίδια, που κωδικοποιούν αντιγόνα ιικών φορέων, πρωτεΐνες και αντιγόνα πεπτιδίου, και δενδριτικά κύτταρα φορτωμένα με αντιγόνο όγκου είναι αυτά που μελετώνται πλέον για κλινικές δοκιμές.

Όσον αφορά τους κυτταροτοξικούς παράγοντες, ο δείκτης τους είναι συνήθως η υποχώρηση του όγκου. Στην ανοσοθεραπεία, ένας τέτοιος δείκτης θα είναι η διέγερση ενός όγκου αντιγόνου με ειδική ανοσολογική απόκριση ανιχνεύσιμη σε μία ή περισσότερες ανοσολογικές δοκιμασίες. Αν και τελεστές τα μονοκύτταρα, φυσικά κύτταρα φονείς, και αντισώματα μπορούν να έχουν ένα σημαντικό ρόλο στην ανοσία κατά του όγκου, οι περισσότεροι θεωρούν ότι είναι απαραίτητο να χρησιμοποιήσουν δοκιμασίες που αξιολογούν τον αριθμό και τη λειτουργία των CTLs CD8 + που αναγνωρίζουν άμεσα τα πεπτίδια όγκου που παρουσιάζονται από τα μόρια MHC στην επιφάνεια των κυττάρων όγκου ως έναυσμα για την άμεση κυτταρόλυση και τα CD4 + βοηθητικά κύτταρα, που οδηγούν σε παραγωγή CTL. Αριθμός δοκιμασιών

δείχνουν ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μέθοδοι για την ποσοτικοποίηση και χαρακτηρίζουν την απόκριση κυττάρων σε εμβολιασμούς και για την παρακολούθηση αυτών των σειριακών αποκρίσεων. Αυτές οι δοκιμές ανοσίας περιλαμβάνουν λειτουργικά μέτρα *in vivo*, *in vitro* δοκιμασίες φαινοτυπικές, και *in vitro* λειτουργικές δοκιμασίες (Clay et al, 2001).

## Τρόποι διαφυγής των καρκινικών κυττάρων από την ανοσοεπιτήρηση



Εικόνα 9: Τρόποι διαφυγής των καρκινικών κυττάρων από την ανοσοεπιτήρηση. Πηγή: [slideplayer.gr](http://slideplayer.gr)

### **3.2 In Vivo Δοκιμασίες αντιγόνου-ειδικής ανοσίας DTH**

Στη δοκιμή DTH, αντιγόνο σε μορφή διαλυτής πρωτεΐνης ή ως πλήρες αντιγόνο φορτώνεται σε αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα ενδοδερμικά, και η διάμετρος του ερυθήματος ή σκλήρυνση μετρείται μετά από 48-72 h. Τα CD4 + βοηθητικά κύτταρα, που αναγνωρίζουν το αντιγόνο που παρουσιάζεται σε τοπικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, μεσολαβούν στην απόκριση απελευθερώνοντας κυτοκίνες που αυξάνουν την αγγειακή διαπερατότητα και την πρόσληψη μονοκυττάρων και άλλων φλεγμονωδών κυττάρων στη συγκεκριμένη θέση. Λιγότερο συχνά, μια παρόμοια απόκριση μπορεί να προκαλείται από τα CD8 + κύτταρα (Puccetti et al, 1994). Η αποκοπή για μια θετική απάντηση δεν έχει τυποποιηθεί ούτε έχει τη δόση για τη δοκιμή DTH, αν και τα πρωτεϊνικά αντιγόνα χορηγούνται γενικά από 10-50 μg σε 0,1 ml. Αυτή η χαμηλή δόση θεωρείται αρκετά μικρή ώστε να μην προκαλέσει μια συστηματική ανοσοαπόκριση ή να προκαλέσει υπερβολική τοξικότητα του δέρματος, αλλά είναι επαρκούς μεγέθους για να προκληθεί μια ανιχνεύσιμη τοπική απάντηση (Clay et al, 2001).

Η DTH παραμένει μια από τις πιο συχνές ανοσοποιητικές δοκιμές που εκτελούνται σε μελέτες ανοσοθεραπείας (Simons et al, 1999), αλλά θα πρέπει να ληφθούν υπόψη διάφορα ζητήματα. Το πρώτο είναι αν η DTH απόκριση είναι πραγματικά απόκριση ειδικού αντιγόνου. Άλλα συστατικά του ανοσοποιητικού παράγοντα μπορεί να συμβάλλουν στην DTH απόκριση. (McNeel et al, 1999).

### **3.3 In Vitro δοκιμασίες μιας Ανοσολογικής Απάντησης**

Οι In vitro ανοσολογικές αναλύσεις απαιτούν μια επαρκή πηγή των κυττάρων με μία συχνότητα και λειτουργική δραστηριότητα που αντικατοπτρίζουν την πραγματική ανοσολογική απόκριση στην ανοσοποίηση. Σαφώς, το περιφερικό αίμα είναι η πιο βολική πηγή των κυττάρων, αλλά τουλάχιστον μία μελέτη έχει το ερώτημα κατά πόσον η δραστηριότητα των κυττάρων του περιφερικού αίματος συσχετίζεται με την κλινική ανταπόκριση (Lee et al, 1999), όπου εμβολιάστηκαν ασθενείς με πεπτιδίο gp100 με ή χωρίς IL-2 και παρατηρήθηκε ότι, παρά την ανίχνευση αντιγόνου στο περιφερικό αίμα ορισμένων ατόμων που ανοσοποιήθηκαν με gp100, κανένας δεν είχε κλινικά σημάδια υποχώρησης του όγκου. Αντιστρόφως, σε ex vivo από PBMCs

ασθενών gp100 συν IL-2, αυτά ήταν τα μόνα άτομα στα οποία εμφανίστηκαν παλινδρομήσεις όγκου. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι το αντιγόνο είχε μεταναστεύσει έξω από το περιφερικό αίμα, ίσως σε όγκο ή ιστούς. Αν και οι όγκοι μπορούν να περιέχουν το αντιγόνο (Panelli et al, 2000), η ανίχνευση μιας λεμφοκυτταρικής διείσδυσης σε έναν όγκο δεν συσχετίζεται με μία βελτιωμένη πρόγνωση σε ασθενείς με καρκίνο, και σε μία μελέτη, τα όγκο-διηθητικά λεμφοκύτταρα δείχθηκαν να έχουν ελαττώματα στην έκφραση του TCR που σχετίζεται με μόριο CD3, ειδικά στην αλυσίδα ζ. Οι λεμφαδένες μπορεί να περιέχουν τα πιο πρόσφατα διεγερμένα κύτταρα, αλλά έχει αποδειχθεί ότι ακόμη και υγιείς, μη-φέροντα όγκο άτομα μπορεί να έχουν λεμφαδένες που φιλοξενούν MART-1-αντιγόνο (Pittet et al, 1999). Τέλος, τα κύτταρα ειδικά για το αντιγόνο έχουν κλωνοποιηθεί από DTH θέσεις, και αν και αυτό μπορεί να χρησιμεύσει ως υποκατάστατο για διήθηση του όγκου, οι συνθήκες σε μία θέση ένεσης δέρματος είναι πιθανό να είναι διαφορετικές από τον ίδιο ιστό του όγκου. Ως εκ τούτου, παρά τις θεωρητικές ανησυχίες, η δειγματοληψία των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος έχει παραμείνει η πρότυπη. Σημαντικές εκτιμήσεις για δειγματοληψία περιφερικού αίματος περιλαμβάνει τη χρονική στιγμή της συλλογής, πριν και μετά την ανοσοποίηση (Clay et al, 2001).

### **3.4 In Vitro Φαινοτυπικά μέτρα ανοσοαποκρίσεων αντιγόνου-ειδικών κυτταρικών**

Το μέγεθος ενός αντιγόνου μπορεί να προσδιοριστεί με απαρίθμηση των κυττάρων σύμφωνα με ένα φαινοτυπικό σημειωτή, το TCR, χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής ή τεχνικές που βασίζονται σε PCR. Επεκτάσεις του TCRs που εκφράζουν συγκεκριμένη μεταβλητή (V) περιοχή-α ή V-β αλυσίδες μπορεί να ανιχνευθούν με κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιώντας αντισώματα που αναγνωρίζουν διαφορετικές μεταβλητές ή ενώνει υποοικογένειες στην περιοχή των α TCR ή αλυσίδες β. Η αύξηση του αριθμού των κυττάρων που εκφράζουν μια συγκεκριμένη J-α, J-β, V-α ή μία αλυσίδα V-β θα έδειχνε ανάπτυξη ολιγοκλωνικότητας, μια πιθανή ένδειξη επαγωγής της ειδικής ανοσολογικής απόκρισης.

Αυτή η προσέγγιση έχει περιορισμένη αξία για διάφορους λόγους:

- (α) μόνο μια μειοψηφία των κυττάρων που εκφράζουν ένα συγκεκριμένο J-α, J-β, V-α, ή συνδυασμός V-β θα είναι ειδική για ένα συγκεκριμένο αντιγόνο
- (β) η απάντηση στα περισσότερα αντιγόνα είναι αρκετά διαφορετική και ενώνει διαφορετικές και μεταβλητές περιοχές
- (γ) μονοειδικά αντισώματα δεν είναι διαθέσιμα για οικογένειες γονιδίων J, και, ως εκ τούτου, η ανάλυση αυτή είναι ελλιπής στην καλύτερη περίπτωση. Παρ' όλα αυτά, εάν τα αντιγόνα που είναι ο στόχος της ανοσολογικής απόκρισης είναι άγνωστα, αυτή η μέθοδος μπορεί ακόμη να έχει κάποια χρησιμότητα (Clay et al, 2001).

### 3.5 Τετραμερές Πεπτίδιο MHC

Πιο πρόσφατα, έχει καταστεί δυνατό να απεικονιστεί αντιγόνο με κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιώντας διαλυτά, με φθορισμό, πολυμερικά σύμπλοκα MHC-πεπτιδίου (Altman et al, 1996) που δεσμεύουν σταθερά, ειδικά, και με μεγάλη προσοχή το αντιγόνο. Κατά τη διάρκεια ανάλυσης κυτταρομετρίας ροής, μπορεί κανείς να δει τα CD8 + κύτταρα και να αναζητήσει την έκφραση του αντιγόνου-ειδικών TCRs. Το μεγαλύτερο σώμα των στοιχείων σχετικά με τη χρησιμότητα των τετραμερών προέρχεται από μελέτες του ιικού επιτόπου-ειδικών CTLs. Η ανάλυση των κυττάρων περιφερικού αίματος ειδικά για CMV και EBV απέδειξαν ότι μεταξύ 0,2 και 2,5% των κυκλοφορούντων κυττάρων CD8 + ήταν ειδικά για πεπτίδια που αντιπροσωπεύουν αυτά τα αντιγόνα. Έχει βρεθεί συσχέτιση του MHC τετραμερούς με θετικότητα και κυτταροτοξικότητα σε παραδοσιακές δοκιμασίες μικροκυτταροτοξικότητας (Altman et al, 1996), και η ένταση της χρώσης των CD8 + κυττάρων με το τετραμερές πεπτίδιο MHC φαίνεται να συσχετίζονται με συνοχή των κυττάρων για το αντιγόνο (Yee et al, 1999), αλλά τετραμερούς θετικά κύτταρα ενίοτε αποτυγχάνουν να σκοτώσουν στόχους που εκφράζουν το ειδικό επίτοπο. Αρκετές πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει την χρησιμότητα της ανάλυσης κυτταρομετρίας ροής χρησιμοποιώντας τετραμερές πεπτιδίου MHC, για να ποσοτικοποιηθούν τα CD8 + κύτταρα ειδικά για αντιγόνα όγκου ή αντιγόνα ελέγχου που χρησιμοποιείται συχνά σε πρωτόκολλα ανοσοθεραπείας (Lee et al, 1999; Dhodapkar et al, 1999; Romero et al, 1998).



Παρά το γεγονός ότι τα τετραμερή πεπτιδία MHC αποτελούν ισχυρά εργαλεία, έχουν ορισμένους περιορισμούς. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο για την ανίχνευση ανοσολογικών αποκρίσεων σε γνωστά αντιγόνα, γιατί το πεπτίδιο ενδιαφέροντος πρέπει να φορτωθεί μέσα στο τετραμερές πεπτίδιο MHC και έτσι πρέπει να είναι ήδη γνωστά και να συντίθεται. Επιπλέον, μόνο τάξης I MHC τετραμερών ήταν διαθέσιμα συνήθως για ευρεία χρήση, αν και έχουν περιγραφεί τετραμερή κατηγορίας II. Τέλος, λόγω μιας εξαιρετικής ευαισθησίας του τετραμερούς πεπτιδίου MHC για την ποσοτικοποίηση αντιγόνου, ένα ενδιαφέρον ερώτημα έχει τεθεί σχετικά με το αν τα CD8 (+) κύτταρα που δεσμεύονται με το πεπτίδιο MHC τετραμερών είναι ανώριμα ή έμπειρα (κύτταρα μνήμης). Παρατηρήθηκε ότι 10 από ενός 13 ασθενείς με μελάνωμα και 6 από τα 10 υγιή άτομα είχαν υψηλές συχνότητες ( $\geq 1$  2500 CD8 + κύτταρα) του Melan-A αντιγόνου στο περιφερικό αίμα. Όλα αυτά τα Melan-A αντιγόνα από τα υγιή άτομα και επτά από ασθενείς παρουσίασαν ανώριμα CD45RA (hi) / RO (-) φαινότυπο. (Pittet et al, 1999). Σε τρεις ασθενείς, τα T κύτταρα μνήμης CD45RA (LO) παρατηρήθηκαν με RO (+) Melan-A αντιγόνο και ένας ασθενής παρατηρήθηκε να έχει μια εξέλιξη στο φαινότυπο με την πάροδο του χρόνου. Αυτό υποδηλώνει ότι εκτός από απλή ανίχνευση του πεπτιδίου MHC-θετικών κυττάρων, μπορεί να είναι σημαντικό να αξιολογηθεί κατά πόσον το αντιγόνο είναι ανώριμο ή έχει διεγερθεί από τη στρατηγική ανοσοποίησης.

### 3.6 TCR

Αντιγόνα μπορεί να ανιχνευθούν Φαινοτυπικά με τεχνικές PCR όπως και για την ανίχνευση ενός περιορισμένου ρεπερτορίου TCR (Kalams et al, 1994) με αλληλούχιση τρίτης περιοχής CDR (CDR3) του TCR. Η περιοχή CDR3 κωδικοποιεί το πολυμορφικό τμήμα του TCR υπεύθυνο για την αναγνώριση συμπλοκών πεπτιδίων-MHC. Για την αλυσίδα β, η περιοχή CDR3 κωδικοποιεί το τμήμα V-D και D-J κόμβους ανά τμήμα, και για την α-αλυσίδα, κωδικοποιεί την διασταύρωση V-J. Χρησιμοποιώντας περιοχές V, D, J ή υποοικογένειες με ειδικούς εκκινητές PCR, η PCR μπορεί να πραγματοποιηθεί για την ανίχνευση γονιδίου TCR (McKee et al, 1999; Kourilsky et al, 1998). Μελέτες σε ασθενείς με μελάνωμα (Salvi et al, 1995; Sensi et al, 1993) και ασθενείς με νεφρικό καρκίνωμα (Weidmann et al, 1993) έχουν εντοπίσει περιορισμένη χρήση του γονιδίου TCR. Είναι πολύ νωρίς για να

προσδιοριστεί ο ρόλος μίας τεχνολογίας στην παρακολούθηση των ανοσολογικών αποκρίσεων σε κλινικές δοκιμές, και απαιτούνται περισσότερες μελέτες. Παρ' όλα αυτά, τα πλεονεκτήματά του περιλαμβάνουν την μικρή ποσότητα δείγματος που απαιτείται, την ικανότητά του να εκτελεί την ανάλυση από κύτταρα που απομονώθηκαν απευθείας από το αίμα για να αποφευχθεί η εισαγωγή άλλων ιών, που προκαλούνται από *ex vivo* δοκιμές και την αναπαραγωγικότητα των συστημάτων ελέγχου που επιτρέπουν την ανάλυση των δειγμάτων που συλλέχθηκαν σε διαφορετικούς χρόνους. Πρόσφατα, έχει αναπτυχθεί μια πιο αυτοματοποιημένη και ταχεία μέθοδος με βάση φθορισμό για CDR3 ανάλυση μήκους, η οποία εκφράζει οικογένειες γονιδίων TCR που ήταν σε θέση να διακρίνουν μεταξύ πολυκλωνικών, ολιγοκλωνικών και μονοκλωνικών διανομών CDR3 (Lue et al, 1998).

### **3.7 Ειδικές ανοσοαποκρίσεις**

Σε συγκεκριμένες δοκιμασίες ο αριθμός των κυττάρων και η λειτουργία τους ανιχνεύονται από μια δραστηριότητα παραγωγής κυτοκινών.

#### **Λέμφο-πολλαπλασιαστική δοκιμή.**

Η ικανότητα των κυττάρων να πολλαπλασιάζονται σε απόκριση ενός αντιγόνου έχει χρησιμοποιηθεί παραδοσιακά ως δείκτης παρουσίας του αντιγόνου-ειδικών CD4 + βοηθητικών κυττάρων. Τυπικά, το δείγμα των κυττάρων ή PBMCs αναμιγνύεται με διάφορες αραιώσεις του αντιγόνου. Μετά από 72-120 ώρες, προστίθεται θυμιδίνη και η σύνθεση του DNA (ως μέτρο του πολλαπλασιασμού) ποσοτικοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ένα μετρητή  $\gamma$  για να μετρηθεί η ποσότητα του ραδιοσημασμένου ποσοστού θυμιδίνης που ενσωματώνεται στο DNA. Ο δείκτης διέγερσης μπορεί να υπολογιστεί διαιρώντας τον αριθμό των cpm για το δείγμα με τον αριθμό των cpm στα κύτταρα που επώαστηκαν χωρίς αντιγόνο. (Clay et al, 2001).

Η δοκιμασία πολλαπλασιασμού έχει χρησιμοποιηθεί συχνά σε κλινικές δοκιμές για να συγκρίνουν αποκρίσεις κυττάρων πριν και μετά την ανοσοποίηση (Salgaller et al, 1998; Disis et al, 1999; Sandmaier et al, 1999; Rucker et al, 1999; Khleif et al, 1999).

Ανάλογα με την στρατηγική ανοσοποίησης, ένα μικρό ποσοστό των ασθενών (Rucker et al, 1999; Khleif et al, 1999) σχεδόν οι μισοί (Sandmaier et al, 1999) ή όλοι (Disis et al, 1999) οι ασθενείς έχουν βρεθεί να παρουσιάζουν διαφορετικά ποσοστά κυττάρων με προσδιορισμούς πολλαπλασιασμού. Το μεγάλο πλεονέκτημα του τεστ είναι η ικανότητα να διεξαχθεί η δοκιμασία απευθείας σε δείγματα περιφερικού αίματος, δίνοντας μια εικόνα δραστηριότητας των κυττάρων που υπάρχουν στο βιολογικό περιβάλλον (αν και η *in vitro* περίοδος καλλιέργειας μπορεί να μπερδέψει τα αποτελέσματα). Τα μειονεκτήματά του είναι ότι αυτό δεν συμβαίνει στη μέτρηση δραστηριότητας στην απόρριψη του όγκου, καθώς αυτό δεν έχει ακόμη πειστικά τεκμηριωθεί στην κλινική έκβαση (Khleif et al, 1999) γιατί μπορεί να επηρεαστεί από την μη ειδική ανοσολογική λειτουργία των ασθενών, και ο δείκτης διέγερσης δεν σχετίζεται υποχρεωτικά με τον αριθμό αντιγόνου-ειδικών κυττάρων που είναι παρόντα στο βιολογικό περιβάλλον. Τα υψηλά επίπεδα πολλαπλασιασμού από μερικά κύτταρα ή τα χαμηλά επίπεδα πολλαπλασιασμού από πολλά κύτταρα θα δώσει έναν παρόμοιο δείκτη διέγερσης. Μια πρόσφατη κυτταρομετρία ροής για τη μέτρηση του προσδιορισμού των βαφών που χρησιμοποιούνται για τη χρώση της κυτταρικής μεμβράνης σε θυγατρικά κύτταρα που παράγονται κατά την διάρκεια του πολλαπλασιασμού, επιτρέπει την ανάγνωση του αριθμού των κυττάρων του αντιγόνου που αποκρίνεται σε μία δοκιμασία διέγερσης.(Givan et al, 1999).

### **3.8 Ανίχνευση των εκκρινόμενων κυτοκινών από ELISA και ELISPOT**

Έκκριση κυτοκίνης από τα κύτταρα σε απόκριση του αντιγόνου μπορεί να ανιχνευθεί με μέτρηση είτε παραγωγής κυτοκίνης (με ELISA) ή απαρίθμηση επιμέρους κυτταροκινητικών στοιχείων παραγόντων κυττάρων (από ELISPOT). Στην δοκιμασία ELISA, τα δείγματα PBMC επωάζονται με αντιγόνο (με ή χωρίς κύτταρα παρουσίασης αντιγόνου), και μετά από ένα καθορισμένο χρονικό διάστημα, το υπερκείμενο από την καλλιέργεια συλλέγεται και προστίθενται σε πλάκες επικαλυμμένες με αντίσωμα για κυτοκίνες, η IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , ή IL-2. Τα αντισώματα τελικά συνδέονται με ένα ανιχνεύσιμο μόριο και οι πλάκες πλένονται και μικροσκοπούνται. Γενικά, ένα μόριο κυτοκίνης μετράται, αν και μια προσφάτως περιγραφείσα τροποποίηση επιτρέπει μέχρι 15 κυτοκίνες να μπορούν να μετρηθούν

σε ένα μόνο δείγμα (Carson & Vignati, 1999). Στη διαδικασία αυτή, τα αντισώματα σε κυτοκίνες που ενδιαφέρουν είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένα με μικροσφαιρίδια με ομοιόμορφες, διακριτικές αναλογίες με κόκκινες και πορτοκαλί φθορίζουσες χρωστικές. Τα αντισώματα αντίχενωσης με πράσινο φθορίζον χρώμα προστίθενται και η κυτταρομετρία ροής εκτελείται. Τα χρώματα των χρωστικών κόκκινου και πορτοκαλί είναι δυνατόν να προσδιορίσουν ποσοτικά την ποσότητα κυτοκίνης που είναι ανάλογη την ποσότητα του πράσινου φθορισμού. Η δοκιμασία ELISA έχει χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση σε αρκετές κλινικές μελέτες (Sandmaier et al, 1999; Salgaller et al, 1998), αν και ο ορισμός θετικού αποτελέσματος διαφέρει. Επειδή πρόκειται για μια δοκιμασία παραγωγής κυτοκινών πληθυσμού κυττάρων, δεν δίδονται πληροφορίες για μεμονωμένα κύτταρα και δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την απαρίθμηση των αντιγόνο-ειδικών κυττάρων. Επιπλέον, δεν μετρούν το πραγματικό προφίλ κυτοκίνης των κυττάρων αυτών *in vivo*, αλλά μάλλον, την ικανότητα των κυττάρων να εκκρίνουν κυτοκίνη όταν εκτίθενται σε ένα αντιγονικό ερέθισμα. Η δοκιμασία ELISA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των επιπέδων των κυτοκινών στον ορό ή άλλα σωματικά υγρά. Αν και αυτό μπορεί να δώσει μια γενική εικόνα μιας φλεγμονώδους κατάστασης ενός ασθενούς, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση του προφίλ κυτοκίνης σε κύκλους των πραγματικών κυττάρων του όγκου.

Τα βασικά βήματα μιας δοκιμασίας ELISPOT (Czerkinsky et al, 1998) είναι:

- (α) επικάλυψη ενός πλακιδίου μικροτιτλοδοσίσεως με καθαρισμένη κυτοκίνη ως ειδικό αντίσωμα
- (β) το “κλείδωμα” της πλάκας για την πρόληψη απορροφήσεως των τυχαίων πρωτεϊνών
- (γ) επώαση των κυτοκινών που εκκρίνουν τα κύτταρα με κύτταρα διεγέρτες σε διαφορετικές αραιώσεις
- (δ) λύση των κυττάρων με απορρυπαντικό
- (ε) προσθήκη ενός επισημασμένου δευτέρου αντισώματος και

(στ) ανίχνευση του συμπλόκου αντισώματος-κυτοκίνης. Το προϊόν του τελικού σταδίου είναι συνήθως μία αντίδραση ενζύμου / υποστρώματος που παράγει ένα έγχρωμο προϊόν που μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με μικροσκόπιο, οπτικά, ή ηλεκτρονικά. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει ένα μόνο κύτταρο που εκκρίνει την κυτοκίνη ενδιαφέροντος. Το αντιγόνο-ειδικό πρόδρομο καθορίζεται διαιρώντας τον αριθμό των κηλίδων με τον αριθμό των κυττάρων. Η δοκιμασία ELISPOT έχει αποδειχθεί για την αξιόπιστη ανίχνευση του αριθμού των αντιγόνο-ειδικών κυττάρων σε πειράματα στα οποία γνωστές ποσότητες αντιγόνου-ειδικών κυττάρων προστέθηκαν σε παρασκευάσματα PBMC. Αν και αυστηρή στατιστική ανάλυση δεν έχει πραγματοποιηθεί ακόμα, υπάρχει ενδιαφέρον για να καθοριστεί αν η δοκιμασία ELISPOT συσχετίζεται με την επιβίωση (Enk et al, 1998).

Οι μηχανογραφικοί μέθοδοι παρέχουν εξαιρετική διάκριση των ειδικών απαντήσεων για το αντιγόνο από το φόντο και το ELISPOT είναι μια εξαιρετική επιλογή για την ανοσολογική δοκιμασία ελέγχου σε μια μελέτη μεγάλης κλίμακας. Περαιτέρω τροποποιήσεις που μπορεί να αυξήσει τη χρησιμότητα ELISPOT περιλαμβάνουν μια διπλή μέθοδο με χρώση για την αξιολόγηση δύο διαφορετικών προτύπων απελευθέρωσης κυτοκίνης σε έναν χρόνο (Okamoto et al, 1998) και τη χρήση των PBMCs φορτωμένα με φορείς ιού που κωδικοποιούν το αντιγόνο ενδιαφέροντος ως διεγέρτες έτσι ώστε οι ασθενείς να μπορούν να συμπεριληφθούν σε αναλύσεις (Larsson et al, 1999).

### **3.9 Μέτρηση των επιπέδων των κυτοκινών mRNA με πραγματικού χρόνου ποσοτική RT-PCR**

Πρόκειται για μια ιδιαίτερα ακριβή μοριακή μέθοδο για τη μέτρηση των επιπέδων των μεταγραφών ενός γονιδίου ή γονιδίων σε RNA δείγμα (Heid et al, 1996). Σε επιστημονική μελέτη χρησιμοποιήθηκαν εμβόλια που βασίζονται σε πεπτίδια για την ανίχνευση μελανώματος (Kammula et al, 1999). Τα δείγματα αίματος και των ιστών του όγκου που λήφθηκαν με αναρρόφηση με λεπτή βελόνα αξιολογήθηκαν. Για τα δείγματα PBMC, η μέθοδος εφαρμόστηκε στα κύτταρα απόψυξη και στη συνέχεια επώαση των κυττάρων είτε με το πεπτίδιο που χρησιμοποιείται στο εμβόλιο ή ένα άσχετο πεπτίδιο, που ακολουθείται από την απομόνωση του συνολικού RNA.

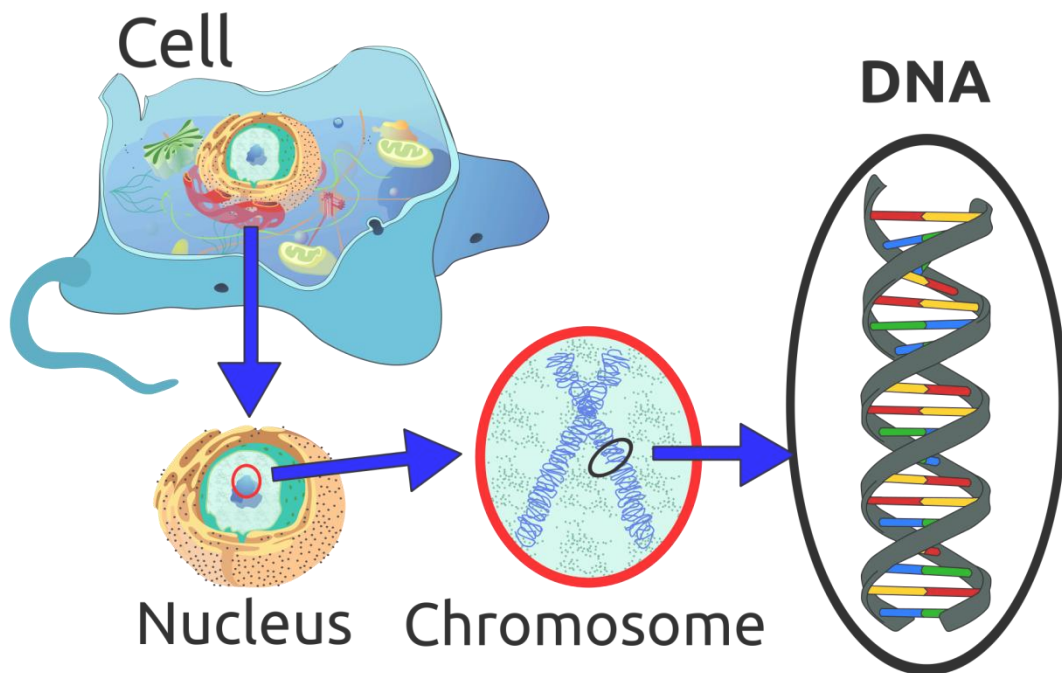
Ποσοτική RT-PCR χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για τη μέτρηση των επιπέδων του mRNA κυτοκίνης στα δείγματα. Αυτή η μελέτη έδειξε ότι η ποσοτική RT-PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση ειδικών για το αντιγόνο αποκρίσεων των κυττάρων σε δείγματα περιφερικού αίματος. Επιπλέον, ο εντοπισμός των αντιγόνο-ειδικών κυττάρων σε θέσεις όγκου καταδείχθηκε με ανάλυση δειγμάτων βιοψίας χωρίς *in vitro* διέγερση.

### 3.10 Δοκιμασία DNA -ATP

Η βοήθεια που δύναται να προσφέρει το DNA στην ειδική κυτταρική ανοσία φαίνεται να είναι ιδιαίτερα σημαντική (Sottong et al, 2000) Η πολλαπλασιαστική απόκριση συχνότερα προσδιορίζεται με υπολογισμό του ποσού [<sup>3</sup>H] θυμιδίνης που ενσωματώνεται εντός νεοσυντιθέμενου DNA. Η διαδικασία [<sup>3</sup>H] θυμιδίνης απαιτεί τη χρήση ραδιοϊσοτόπων καθώς και χρονοβόρες περιόδους επώασης (> 72 ώρες). Μια εναλλακτική μέθοδος για την εκτίμηση ενεργοποίησης των T λεμφοκυττάρων σε καλλιέργειες ολικού αίματος περιλαμβάνει τη μέτρηση του νουκλεοτιδίου ATP αντί [<sup>3</sup>H] θυμιδίνης. Επιπλέον, η δοκιμασία *Luminetics* των μέτρων ενεργοποίησης των T κυττάρων, μέσω ειδικών αποκρίσεων T λεμφοκυττάρων με τη χρήση παραμαγνητικών σωματιδίων, τα οποία είναι επικαλυμμένα με μονοκλωνικά αντισώματα και δρουν κατά των αντιγόνων CD. Αυτή η δοκιμασία επιτρέπει την ταχεία ανάλυση (μέσα σε 24 ώρες) των απαντήσεων ενεργοποίησης των λεμφοκυττάρων σε μιτογόνα υποσύνολα και αντιγόνα ανάκλησης σε μικρές ποσότητες αίματος.

Η δοκιμασία πολλαπλασιασμού των κυττάρων έχει δειχθεί ότι είναι χρήσιμη για την παρακολούθηση της ανοσολογικής κατάστασης των κυττάρων. Παρομοίως, η ενεργοποίηση των κυττάρων, μετρήθηκε με τον προσδιορισμό αύξησης στο ενδοκυτταρικό ATP, και έχει συσχετισθεί με τον πολλαπλασιασμό. Μετά από μια αρχική περίοδο κατανάλωσης (White et al, (1989), η αύξηση των επιπέδων ATP, αναπτύσσεται μία γραμμική σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης των κυττάρων και το επίπεδο του ATP, η οποία είναι ανάλογη με την ένταση του φωτός. Η μετρούμενη φωταύγεια έχει ευνοϊκά συσχετισθεί με τον αριθμό των κυττάρων (Sottong et al,

2000; Crouch et al, 1993) και ο βαθμός ενεργοποίησης των μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος (Bulanova et al, 1995) σε μελέτες για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.



Εικόνα 10: DNA. ΠΗΓΗ: [en.wikipedia.org](http://en.wikipedia.org)

Πιο πρόσφατα, το πλήρες αίμα έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για τύπους μελετών (Kramer et al, 1999). Το ολικό αίμα είναι ιδιαίτερα χρήσιμο όταν πρέπει να υποβάλλεται σε επεξεργασία για μεγάλο αριθμό δειγμάτων αίματος σε μια δεδομένη ημέρα, όταν ο όγκος του αίματος είναι περιορισμένος ή όταν οι εγκαταστάσεις και η εμπειρογνομosύνη είναι περιορισμένες.

Η δοκιμή πολλαπλασιασμού των κυττάρων δεν χρησιμοποιείται ευρέως σε κλινικές ρυθμίσεις λόγω του σχετικά μεγάλου χρονικού διαστήματος που απαιτείται για την επίτευξη αποτελεσμάτων (3 έως 10 ημέρες), η έλλειψη τυποποίησης δοκιμασίας και η απαίτηση για την χρήση των ισοτόπων. Σε έρευνα χρησιμοποιήθηκε πλήρες αίμα, χωρίς τη χρήση των ισοτόπων, και έχει το πρόσθετο πλεονέκτημα του προσδιορισμού του ειδικού υποσυνόλου των T- κυττάρων που εμπλέκονται (Sottong et al, 2000). Η

δοκιμασία *Luminetics* ενεργοποίησης κυττάρων, που παρέχεται σε μορφή kit που περιλαμβάνει διαλύτες, ρυθμιστικά πλύσης, μονοκλωνικό αντίσωμα-επικαλυμμένο, τα πρότυπα και ελέγχους, είναι κατάλληλο για χρήση σε ένα κλινικό εργαστήριο.

Για τη σύγκριση της δοκιμασίας ATP ενεργοποίησης των κυττάρων με τη δοκιμασία του πολλαπλασιασμού των κυττάρων ( $[^3\text{H}]$  θυμιδίνης), μετρήθηκαν οι αποκρίσεις των λεμφοκυττάρων σε μιτογόνα και αντιγόνα σε μικροκαλλιέργειες του ολικού αίματος από υγιείς ενήλικες ανθρώπους, που λήφθηκε πριν και μετά τον αναμνηστικό εμβολιασμό με τοξοειδές του τετάνου (TT ) και τοξοειδές διφθερίτιδας.

Στη μελέτη αυτή δέκα υγιείς ενήλικες αφαιμάσσονταν δύο φορές σε ένα διάστημα 6 εβδομάδων. Αμέσως μετά την πρώτη αιμοληψία (P1), σε έξι άτομα πραγματοποιήθηκε αναμνηστικός εμβολιασμός του TT και τοξοειδές διφθερίτιδας. Σε τέσσερις δεν χορηγήθηκε το αναμνηστικό εμβόλιο. Έξι εβδομάδες μετά την πρώτη συλλογή αίματος, όλοι υποβλήθηκαν σε αφαίμαξη για δεύτερη φορά (P2). Και οι δύο μεθοδολογίες δοκιμής κινήθηκαν μέσα σε 4 ώρες μετά τη συλλογή του αίματος. Πλήρες αίμα συλλέχθηκε σε σωληνάρια Vacutainer που περιέχουν 45 μονάδες USP ηπαρίνης νατρίου (Becton-Dickinson, Rutherford, N.J.) και διατηρήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι την επεξεργασία, περίπου 2 με 3 ώρες. Το αίμα αραιώθηκε 1: 4 με μέσο RPMI 1640 (Gibco BRL). Φυτοαιμαγλουτινίνη L (PHA-L, Sigma Chemical Co.), κονκαναβαλίνη A (ConA, Sigma Chemical Co.), και καθαρισμένο TT (Connaught Laboratories, Swiftwater, PA) αραιώθηκαν σε RPMI 1640 και χρησιμοποιήθηκαν σε αμφότερα τα συστήματα εξέτασης.

Στη μέθοδο δοκιμασίας ATP, 100  $\mu$ l 1: 4-αραιωμένο αίμα προστέθηκε σε 25 ml ενός διαλύματος από κάθε διεγερτικό εις τριπλούν με στρογγυλό πυθμένα φρεάτια μικροτιτλοδότησης. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν για μία νύχτα σε υγροποιημένο 37 ° C επωαστή με 5% CO<sub>2</sub>. Περίπου 18 έως 24 ώρες αργότερα, 100 ml ενός εναιωρήματος πλύθηκε με παραμαγνητικά σφαιρίδια (107 σύνολο, Perseptive Biosystems) επικαλύφθηκαν με μονοκλωνικό αντίσωμα (αντί-CD4) που προστέθηκε σε κάθε καλλιέργεια. Μετά οι καλλιέργειες αναμίχθηκαν και στη συνέχεια επώαστηκαν στους 4 ° C για 30 λεπτά, τα κύτταρα CD4 + συλλέχθηκαν στο πλάι της καλλιέργειας χρησιμοποιώντας ένα ισχυρό μαγνήτη που συγκρατήθηκε στη θέση του για 5 λεπτά. Τα κύτταρα που ήταν ασύνδετα με τα μαγνητικά σωματίδια



απομακρύνθηκαν και τα συνδεδεμένα κύτταρα πλύθηκαν τρεις φορές με διάλυμα φυσιολογικού ορού ρυθμισμένο με φωσφορικό. Μετά την τελική πλύση, ρυθμιστικού λύσης (200 ml) προστέθηκε για να απελευθερώσει το ενδοκυτταρικό ATP. Από το καθένα, αφαιρέθηκαν 100 ml και το ATP ποσοτικοποιήθηκε με τη χρήση ενός συστήματος ενζύμου λουσιφερίνης-λουσιφεράσης (Sigma Chemical Co.) και ένα φωτόμετρο Berthold (Lumat LB9501). Χρησιμοποιώντας πανομοιότυπα δείγματα, η υπερπλαστική αντίδραση μετρήθηκε με προσθήκη 50 ml από κάθε διεγερτικό ξεχωριστά εις τριπλούν που το καθένα περιέχει 50 ml 1:4-αραιωμένο αίμα. Μετά την προσθήκη 100 ml RPMI 1640 στο κάθε ένα, οι καλλιέργειες επώαστηκαν σε 5% CO<sub>2</sub>-95% υγραποιημένο αέρα σε 37 ° C για 96 h (PHA-L και ConA) ή 120 h (TT). Τις τελικές 18 ώρες επώασης, προστέθηκε 37 kBq (1,0 μCi) [<sup>3</sup>H] θυμιδίνης σε κάθε καλλιέργεια. Οι καλλιέργειες συλλέχθηκαν σε φίλτρα υαλοβάμβακα, και μεταφέρθηκαν σε υγρό σπινθηρισμού, και η ενσωμάτωση [<sup>3</sup>H] θυμιδίνης μετρήθηκε σε ένα μετρητή σπινθηρισμού.

Οι αποκρίσεις της δόσης σε διάφορες συγκεντρώσεις PHA-L ή ConA στη δοκιμασία ATP συσχετίστηκαν με πολλαπλασιασμό. Ανταπόκριση στην PHA-L ή ConA σε P2 δεν επηρεάστηκε από την προηγούμενη χορήγηση εμβολίου κατά του τετάνου και της διφθερίτιδας. Για τη μέτρηση του, μια σειρά αραιώσεων που κυμαίνεται από 0,625 έως 40,0 μg αντιγόνου / ml χρησιμοποιήθηκε σαν ένα διεγερτικό τόσο στον πολλαπλασιασμό όσο και στον προσδιορισμό ATP. Από αποκρίσεις των λεμφοκυττάρων στα αντιγόνα ανάκλησης εξαρτάται από τον αριθμό των ειδικώς αποκριτικών κυττάρων, τείνουν να είναι ασθενέστερα από ό, τι η αντίστοιχη απόκριση στα μιτογόνα του PHA ή μιτογόνο φυτολάκκας. Με βάση την t ζευγαρωτή δοκιμή, η δοκιμασία Luminetics ήταν σε θέση να διακρίνει καταστάσεις με μεγαλύτερη από 95% πιθανότητα (P <0,05) για συγκεντρώσεις των διεγερτικών που χρησιμοποιούνται εκτός από το χαμηλότερο (0.625 μg / ml? P <0,1 ).

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι μικροκαλλιέργειες ολικού αίματος μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση των αποκρίσεων των T -λεμφοκυττάρων μέσω αξιολόγησης των αυξήσεων των επιπέδων είτε ATP ή στη σύνθεση του DNA σε σύγκριση με εκείνες των μη διεγερμένων ελέγχων. Μια ποικιλία από μιτογόνα και αντιγόνα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις. Σε αντίθεση με την μέτρηση ενσωμάτωσης θυμιδίνης [<sup>3</sup>H], η οποία λαμβάνει 96 έως 120

ώρες, τα αποτελέσματα του ATP μπορούν να επιτευχθούν σε 24 ώρες. Επιπλέον, επειδή δεν υπάρχουν ραδιενεργά υλικά που χρησιμοποιούνται, ο χειρισμός και η διάθεση των αποβλήτων είναι απλουστευμένη. Ενώ τα CD4 υποσύνολα των κυττάρων μετρήθηκαν αποκλειστικά σε αυτή τη μελέτη, άλλα υποσύνολα μπορούσαν εύκολα να επιλεγούν για τη μέτρηση, ταυτόχρονα, με τη δημιουργία κατάλληλων όμοιων δειγμάτων αναφέρουν οι ερευνητές.

Τα λεμφοκύτταρα διεγείρονται από μιτογόνα ή αντιγόνα σε μια σειρά γεγονότων ενεργοποίησης. Αυτά περιλαμβάνουν ομαδοποίηση των υποδοχέων κυτταρικής επιφάνειας, αυξημένη πρόσληψη των μεταβολιτών και των ιόντων, αύξηση του κύκλου εργασιών των φωσφολιπιδίων, τη σύνθεση των κυτοκινών, και αλλαγές στα επίπεδα ενδοκυτταρικού ATP.

Καθώς η ανοσοποιητική ανασύσταση γίνεται όλο και πιο σημαντική για την αξιολόγηση διαχείρισης της νόσου και οι θεραπείες κυτοκινών είναι διαθέσιμες, θα υπάρξει μια αυξανόμενη ανάγκη για τη μέτρηση της κυτταρικής ανοσολογικής λειτουργίας πιο γρήγορα. Το σύστημα δοκιμασίας ATP παρέχει μια ταχύτερη, ευκολότερη στη χρήση μέθοδο μέτρησης ενεργοποίησης των T-κυττάρων σε απόκριση σε μία ποικιλία ερεθισμάτων. Έχει σαφείς εφαρμογές στην παρακολούθηση των λοιμωδών νοσημάτων, την αποτελεσματικότητα του εμβολίου, την αποδοχή μοσχεύματος, καθώς και απόκριση στη θεραπεία του καρκίνου. Στο μέλλον, μπορεί να αποδειχθεί χρήσιμη στον προσδιορισμό αποκρίσεων σε συμπληρώματα διατροφής και στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων γήρανσης (Sottong et al, 2000).

## **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

Η ειδική κυτταρική ανοσία περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων. Ανάπτυξη μιας αποτελεσματικής ανοσολογικής απόκρισης απαιτεί την κατάλληλη ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων σε δευτερογενή λεμφοειδή όργανα και μετανάστευσή σε θέσεις με παρουσία αντιγόνου στον οργανισμό.

Η αποτελεσματικότητα ενεργοποίησης των Τ κυττάρων στα όργανα του σώματος εξαρτάται από τη συγκέντρωση του αντιγονικού πεπτιδίου και τα κύτταρα που αναγνωρίζουν το αντιγόνο και το παρουσιάζουν (APC). Οποιοδήποτε κύτταρο έχει στην επιφάνειά του προϊόντα ΜHC τάξης II, μπορεί να λειτουργήσει ως APC (μακροφάγα, ενδοθηλιακά κύτταρα).

Τα Τ λεμφοκύτταρα ωριμάζουν στο θύμο αδένα και αποτελούν τα βασικά στοιχεία της κυτταρικής ανοσίας. Φέρουν ειδικούς αντιγονικούς υποδοχείς και αναγνωρίζουν τα αντιγόνα. Ωστόσο, μπορούν να αναγνωρίσουν μόνο πεπτιδικά αντιγόνα που βρίσκονται πάνω σε ένα μόριο ΜHC ενός κυττάρου κι όχι ελεύθερα. Όταν

ενεργοποιηθούν μετατρέπονται σε κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα, που φονεύουν το κύτταρο που φέρει το αντιγόνο ή σε βοηθητικά τα οποία διεγείρουν την παραγωγή αντισώματος από τα B κύτταρα, τα οποία συμβάλλουν στην χυμική ανοσία.

Μόλις το T λεμφοκύτταρο επιτεθεί στο αντιγόνο τότε η φλεγμονή εξασθενεί, τερματίζοντας έτσι την ανοσολογική απόκριση ενώ διατηρείται η μνήμη του αντιγόνου ώστε αν επανέλθει στον οργανισμό να αναγνωρισθεί και να εμποδιστεί η εξάπλωση ενός λοίμωξης.

Πλέον η επιστημονική κοινότητα έχει στη διάθεσή διάφορες δοκιμασίες (τεστ) για την ειδική κυτταρική ανοσία.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

### **ΔΙΕΘΝΗΣ**

Altman J. D., Moss P. A. H., Goulder P. J. R., Barouch D. H., McHeyzer-Williams M. G., Bell J. I., McMichael A. J., Davis M. M. (1996). Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* (Washington DC), 274: 94-96  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8810254>

Battaglia M, Gregori S, Bacchetta R, Roncarolo MG.(2006). Tr1 cells: from discovery to their clinical application. *Semin Immunol*. 2006 Apr;18(2):120-7. Epub 2006 Feb 7.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16464609>

Becton and Dickinson (2006). ELISPOT SET-INSTRUCTION MANUAL

[https://www.bdbiosciences.com/documents/Elispot\\_set\\_instruction\\_manual.pdf](https://www.bdbiosciences.com/documents/Elispot_set_instruction_manual.pdf)

Broere Femke, Sergei G. Apasov, Sitkovsky Michail V., Willem Van Eden. (2011). T cell subsets and T cell-mediated immunity. (Pdf)

[http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-0346-0136-8\\_2](http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-0346-0136-8_2)

Bulanova E G, Budagyan V M, Romanova N, Brovko L, Ugarova N. Bioluminescent assay for human lymphocyte blast transformation. *Immunol Lett.* 1995;46:153–155

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7590912>

Carson R. T., Vignati D. A. (1999). Simultaneous quantitation of 15 cytokines using a multiplexed flow cytometric assay. *J. Immunol. Methods*, 227: 41-52

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10485253>

Crouch S P M, Kozlowski R, Slater K J, Fletcher J. (1993). The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J Immunol Methods.* 1993;160:81–88 (abstract)

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/002217599390011U>

Czerkinsky C., Andersson G., Ekre H. P., Nilsson L. A., Klareskog L., Ouchterlony O. (1988). Reverse ELISPOT assay for clonal analysis of cytokine production. I. Enumeration of  $\gamma$ -interferon-secreting cells. *J. Immunol. Methods*, 110: 29-36

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022175988900798>

Dhodapkar M. V., Steinman R. M., Sapp M., Desai H., Fossella C., Krasovsky J., Donahoe S. M., Dunbar P. R., Cerundolo V., Nixon D. F., Bhardwaj N. (1999). Rapid generation of broad T-cell immunity in humans after a single injection of mature dendritic cells. *J. Clin. Investig.*, 104: 173-180

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC408478/>

Disis M. L., Schiffman K., Gooley T. A., McNeel D. G., Rinn K., Knutson K. L. (2000). Delayed-type hypersensitivity response is a predictor of peripheral blood T-cell immunity after HER-2/neu peptide immunization. *Clin. Cancer Res.*, 6: 1347-1350 <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/6/4/1347.long>

Disis M. L., Grabstein K. H., Sleath P. R., Cheever M. A. (1999). Generation of immunity to the HER-2/neu oncogenic protein in patients with breast and ovarian cancer using a peptide-based vaccine. *Clin. Cancer Res.*, 5: 1289-1297

<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/5/6/1289.long>

Enk A. H., Wolfel T., Knop J. (1999). Decreased rate of progression and induction of tumor-specific immune response by adjuvant immunotherapy in stage IV melanoma. *Hautarzt*, 50: 103-108

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10097952>

Gallegos, A.M., and Bevan, M.J. (2004). Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation. *J. Exp. Med.* 200, 1039–1049.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2211843/>

Germain RN (1994) MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 76: 287–299

[http://www.cell.com/cell/abstract/0092-8674\(94\)90336-](http://www.cell.com/cell/abstract/0092-8674(94)90336-0?_returnURL=http%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2F0092867494903360%3Fshowall%3Dtrue)

[0?\\_returnURL=http%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2F0092867494903360%3Fshowall%3Dtrue](http://www.cell.com/cell/abstract/0092-8674(94)90336-0?_returnURL=http%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2F0092867494903360%3Fshowall%3Dtrue)

Goldrath Ananda W. ,C. John Luckey Richard Park, Christophe Benoist and Diane Mathis (2004). The molecular program induced in T cells undergoing homeostatic proliferation *Proceedings of National Academy of Sciences of the U S A.* 2004 Nov 30;101(48):16885-90. Epub 2004 Nov 17.

<http://www.pnas.org/content/101/48/16885.long>

Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM et al (1999) The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285: 221–227 <http://science.sciencemag.org/content/285/5425/221.long>

Givan A. L., Fisher J. L., Waugh M., Ernstoff M. S., Wallace P. K. (1999). A flow cytometric method to estimate the precursor frequencies of cells proliferating in response to specific antigens. *J. Immunol. Methods*, 230: 99-112

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10594357>

Heid C. A., Stevens J., Livak K. J., Williams P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res.*, 6: 986-994 <http://genome.cshlp.org/content/6/10/986.long>

Kalams S. A., Johnson R. P., Trocha A. K., Dynan M. J., Ngo H. S., D'Aquila R. T., Kurnick J. T., Walker B. D. (1994). Longitudinal analysis of T-cell receptor (TCR) gene usage by human immunodeficiency virus 1 envelope-specific cytotoxic T lymphocyte clones reveals a limited TCR repertoire. *J. Exp. Med.*, 179: 1261-1271  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2191456/>

Kammula U. S., Lee K-H., Riker A. I., Wang E., Ohnmacht G. A., Rosenberg S. A., Marincola F. M. (1999). Functional analysis of antigen-specific T lymphocytes by serial measurement of gene expression in peripheral blood mononuclear cells and tumor specimens. *J. Immunol.*, 163: 6867-6875  
<http://www.jimmunol.org/content/163/12/6867.long>

Khleif S. N., Abrams S. I., Hamilton J. M., Bergmann-Leitner E., Chen A., Bastian A., Bernstein S., Chung Y., Allegra C. J., Schlom J. (1999). A Phase I vaccine trial with peptides reflecting ras oncogene mutations of solid tumors. *J. Immunother.*, 22: 155-165  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10093040>

Kourilsky P., Bousso P., Calbo S., Gapin L. (1998). Immunological issues in vaccine trials: T-cell responses. *Dev. Biol. Stand.*, 95: 117-124  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9855421>

Kramer T R. Committee on Military Nutrition Research (ed.) 1999. Application of whole-blood cultures to field study measurements of cellular immune function in vitro; pp. 249–262. Military strategies for sustainment of nutrition and immune function in the field. National Academy Press, Washington, D.C.  
<https://www.nap.edu/read/6450/chapter/16>

Larsson M., Jin X., Ramratnam B., Ogg G. S., Engelmayer J., Demoitie M. A., McMichael A. J., Cox W. I., Steinman R. M., Nixon D., Bhardwaj N. (1999). A recombinant vaccinia virus-based ELISPOT assay detects high frequencies of Pol-specific CD8 T cells in HIV-1-positive individuals. *AIDS*, 13: 767-777

[http://journals.lww.com/aidsonline/Fulltext/1999/05070/A\\_recombinant\\_vaccinia\\_virus\\_based\\_ELISPOT\\_assay.5.aspx](http://journals.lww.com/aidsonline/Fulltext/1999/05070/A_recombinant_vaccinia_virus_based_ELISPOT_assay.5.aspx)

Lee K. H., Wang E., Nielsen M. B., Wunderlich J., Migueles S., Connors M., Steinberg S. M., Rosenberg S. A., Marincola F. M. (1999). Increased vaccine-specific T cell frequency after peptide-based vaccination correlates with increased susceptibility to in vitro stimulation but does not lead to tumor regression. *J. Immunol.*, 163: 6292-6300

<http://www.jimmunol.org/content/163/11/6292.long>

Lue C., Mitani Y., Crew M. D., George J. F., Fink L. M., Schichman S. A. (1999). An automated method for the analysis of T-cell receptor repertoires. Rapid RT-PCR fragment length analysis of the T-cell receptor  $\beta$  chain complementarity-determining region 3. *Am. J. Clin. Pathol.*, 111: 683-690

<http://ajcp.oxfordjournals.org/content/111/5/683.long>

Maraveyas A., Baban B., Kennard D., Rook G. A., Westby M., Grange J. M., Lydyard P., Stanford J. L., Jones M., Selby P., Dalglish A. G. Possible improved survival of patients with stage IV AJCC melanoma receiving SRL 172 immunotherapy: correlation with induction of increased of intracellular interleukin-2 in peripheral blood lymphocytes. *Ann. Oncol.*, 10: 817-824, 1999

<http://annonc.oxfordjournals.org/content/10/7/817.long>

Marchand M., van Baren N., Weynants P., Brichard V., Dreno B., Tessier M. H., Rankin E., Parmiani G., Arienti F., Humblet Y., Bourlond A., Vanwijck R., Lienard D., Beauduin M., Dietrich P. Y., Russo V., Kerger J., Masucci G., Jager E., De Greve J., Atzpodien J., Bresseur F., Coulie P. G., van der Bruggen P., Boon T. (1999). Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA- A1. *Int. J. Cancer*, 80: 219-230



[http://onlineibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19990118\)80:2%3C219::AID-IJC10%3E3.0.CO;2-S/epdf](http://onlineibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-0215(19990118)80:2%3C219::AID-IJC10%3E3.0.CO;2-S/epdf)

McKee M. D., Clay T. M., Rosenberg S. A., Nishimura M. I. (1999). Quantitation of T-cell receptor frequencies by competitive PCR: generation and evaluation of novel TCR subfamily and clone specific competitors. *J. Immunother.*, 22: 93-102

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10093034>

McNeel D. G., Schiffman K., Disis M. L. (1999). Immunization with recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as a vaccine adjuvant elicits both a cellular and humoral response to recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*, 93: 2653-2659

<http://www.bloodjournal.org/content/93/8/2653.long?sso-checked=true>

Morse M. A., Deng Y, Coleman D., Hull S., Kitrell-Fisher E., Nair S., Schlom J., Ryback M. E., Lysterly H. K. (1999). A Phase I study of active immunotherapy with carcinoembryonic antigen peptide (CAP-1)-pulsed, autologous human cultured dendritic cells in patients with metastatic malignancies expressing carcinoembryonic antigen. *Clin. Cancer Res.*, 5: 1331-1338

<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/5/6/1331.long>

Okamoto Y., Abe T., Niwa T., Mizuhashi S., Nishida M. (1998). Development of a dual color enzyme-linked immunospot assay for simultaneous detection of murine T helper type 1- and T helper type 2-cells. *Immunopharmacology*, 39: 107-116

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9716257>

Panelli M. C., Riker A., Kammula U., Wang E., Lee K-H., Rosenberg S. A., Marincola F. M. (2000). Expansion of tumor-T cell pairs from fine needle aspirates of melanoma metastases. *J. Immunol.*, 164: 495-504

<http://www.jimmunol.org/content/164/1/495.long>

Parham Peter (2009) *The Immune System*, Garland Science (pdf)

<https://www.scribd.com/doc/251845127/The-Immune-System-Parham-Peter-SRG>

Pittet M. J., Valmori D., Dunbar P. R., Speiser D. E., Lienard D., Lejeune F., Fleischhauer K., Cerundolo V., Cerottini J. C., Romero P. (1999). High frequencies of I Melan-A/MART-1-specific CD8(+) T cells in a large proportion of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2 individuals. *J. Exp. Med.*, 190: 705-715  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2195613/>

Puccetti P., Bianchi R., Fioretti M. C., Ayroldi E., Uyttenhove C., Van Pel A., Boon T., Grohmann U. (1994). Use of a skin test assay to determine tumor-specific CD8+ T cell reactivity. *Eur. J. Immunol.*, 24: 1  
[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/eji.1830240631/epdf?r3\\_referer=wol&tracking\\_action=preview\\_click&show\\_checkout=1&purchase\\_referrer=www.ncbi.nlm.nih.gov&purchase\\_site\\_license=LICENSE\\_DENIED\\_NO\\_CUSTOMER](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/eji.1830240631/epdf?r3_referer=wol&tracking_action=preview_click&show_checkout=1&purchase_referrer=www.ncbi.nlm.nih.gov&purchase_site_license=LICENSE_DENIED_NO_CUSTOMER)

Romero P., Pannetier C., Herman J., Jongeneel C. V., Cerottini J. C., Coulie P. G. (1995). Multiple specificities in the repertoire of a melanoma patient's cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen MAGE-1.A1. *J. Exp. Med.*, 182: 1019-1028  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2192298/>

Romero P., Dunbar P. R., Valmori D., Pittet M., Ogg G. S., Rimoldi D., Chen J. L., Lienard D., Cerottini J. C., Cerundolo V. (1998). Ex vivo staining of metastatic lymph nodes by class I major histocompatibility complex tetramers reveals high numbers of antigen-experienced tumor-specific cytolytic T lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 188: 1641-1650  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2212507/>

Rucker R., Bresler H. S., Heffelfinger M., Kim J. A., Martin E. W., Jr., Triozzi P. L. (1999). Low-dose monoclonal antibody CC49 administered sequentially with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Immunother.*, 22: 80-84  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9924703>

Salvi S., Segalla F., Rao S., Arienti F., Sartori M., Bratina G., Caronni E., Anichini A., Clemente C., Parmiani G., Sensi M. (1995). Overexpression of the T-cell receptor  $\beta$ -chain variable region TCRBV14 in HLA-A2-matched primary human melanomas. *Cancer Res.*, 55: 3374-3379

<http://cancerres.aacrjournals.org/content/55/15/3374.full-text.pdf>

Sandmaier B. M., Oparin D. V., Holmberg L. A., Reddish M. A., MacLean G. D., Longenecker B. M. (1999). Evidence of a cellular immune response against sialyl-Tn in breast and ovarian cancer patients after high-dose chemotherapy, stem-cell rescue, and immunization with Theratope STn-KLH cancer vaccine. *J. Immunother.*, 22: 54-66

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9924700>

Sensi M., Salvi S., Castelli C., Maccalli C., Mazzocchi A., Mortarini R., Nicolini G., Herlyn M., Parmiani G., Anichini A. (1993). T-cell receptor (TCR) structure of autologous melanoma-reactive cytotoxic T lymphocyte (CTL) clones: tumor-infiltrating lymphocytes overexpress in vivo the TCR  $\beta$  chain sequence used by an HLA-A2-restricted and melanocyte-lineage-specific CTL clone. *J. Exp. Med.*, 178: 1231-1246

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2191209/pdf/je17841231.pdf>

Simons J. W., Mikhak B., Chang J. F., DeMarzo A. M., Carducci M. A., Lim M., Weber C. E., Baccala A. A., Goemann M. A., Clift S. M., Ando D. G., Levitsky H. I., Cohen L. K., Sanda M. G., Mulligan R. C., Partin A. W., Carter H. B., Piantadosi S., Marshall F. F., Nelson W. G. (1999). Induction of immunity to prostate cancer antigens: results of a clinical trial of vaccination with irradiated autologous prostate tumor cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using ex vivo gene transfer. *Cancer Res.*, 59: 5160-5168

<http://cancerres.aacrjournals.org/content/59/20/5160.long>

Sottong P. R., J. A. Rosebrock, J. A. Britz, and T. R. Kramer (2000) Measurement of T-Lymphocyte Responses in Whole-Blood Cultures Using Newly Synthesized DNA and ATP *Clin Diagn Lab Immunol.* Mar; 7(2): 307–311.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC95867/>

Turner B., Haendle I., Roder C., Dieckmann D., Keikavoussi P., Jonuleit H., Bender A., Maczek C., Schreiner D., von den Driesch P., Brocker E. B., Steinman R. M., Enk A., Kampgen E., Schuler G. (1999). Vaccination with Mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces

regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J. Exp. Med.*, 190: 1669-1678 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2195739/>

Waldrop S. L., Pitcher C. J., Peterson D. M., Maino V. C., Picker L. J. (1997). Determination of antigen-specific memory/effector CD4+ T cell frequencies by flow cytometry: evidence for a novel, antigen-specific homeostatic mechanism in HIV-associated immunodeficiency. *J. Clin. Investig.*, 99: 1739-1750  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC507995/pdf/991739.pdf>

Weidmann E., Logan T. F., Yasumura S., Kirkwood J. M., Trucco M., Whiteside T. L. (1993). Evidence for oligoclonal T-cell response in a metastasis of renal cell carcinoma responding to vaccination with autologous tumor cells and transfer of in vitro-sensitized vaccine-draining lymph node lymphocytes. *Cancer Res.*, 53: 4745-4749  
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/53/20/4745.long>

Yee C., Savage P. A., Lee P. P., Davis M. M., Greenberg P. D. (1999) Isolation of high avidity melanoma-reactive CTL from heterogeneous populations using peptide-MHC tetramers. *J. Immunol.*, 162: 2227-2234  
<http://www.jimmunol.org/content/162/4/2227.long>

## ΕΛΛΗΝΙΚΗ

Αδαμαντιάδου ΣΜ., Γεωργάτου Μ., Γιαπιτζάκης Χ., Λακκα Λ.,  
Νοταράς Δ., Φλωρεντιν Ν., Χατζηγεωργίου Γ., Χαντηκωντη ΟΛ., (2013) *ΒΙΟΛΟΓΙΑ*  
Γενικής Παιδείας. Υπουργείο Εθνικής Παιδείας και Θρησκευμάτων. Διαδραστικά  
σχολικά βιβλία [http://ebooks.edu.gr/modules/ebook/show.php/DSGL-  
C106/151/1085,3989/](http://ebooks.edu.gr/modules/ebook/show.php/DSGL-C106/151/1085,3989/)

Καρακάση- Γαρδούνη Α., Κατσούλας Χ.Λ., Μιχαηλίδης Σ.Α., (2003).  
*ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑ: 2<sup>ος</sup> Κύκλος ειδικότητας: Βοηθών Ιατρικών και Βιολογικών*  
*εργαστηρίων. Τομέας Υγείας και Πρόνοιας Οργανισμός Εκδόσεων Διδακτικών*  
*Βιβλίων*

Στέα Ε. (χ.η.) Ενόσ λεμφοκύτταρα [http://www.megamed.gr/wp-  
content/uploads/%CE%A4-  
%CE%BB%CE%B5%CE%BC%CF%86%CE%BF%CE%BA%CF%8D%CF%84%CF%84%CE%B1%CF%81%CE%B1.pdf](http://www.megamed.gr/wp-content/uploads/%CE%A4-%CE%BB%CE%B5%CE%BC%CF%86%CE%BF%CE%BA%CF%8D%CF%84%CF%84%CE%B1%CF%81%CE%B1.pdf)

Kindt Thomas J. / Richard A. Goldsby / Barbara A. Osborne (2013) *Ανοσολογία Kubi 2<sup>η</sup>*  
*Ελληνική έκδοση ' Broken Hill Publishers LTD:303-306*

## ΛΙΣΤΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Διάκριση ανοσίας. Πηγή: [docplayer.gr](http://docplayer.gr)

Εικόνα 2: Διαφορές χημικής και κυτταρικής ανοσίας. Πηγή:  
<http://ebooks.edu.gr/modules/ebook/show.php/DSGL-C106/151/1086,3992/>

Εικόνα 3: Μακροφάγο σε δράση. Πηγή: [www.biocourse.com](http://www.biocourse.com)

Εικόνα 4: Κύτταρα που συμμετέχουν στην ανοσολογική απόκριση, Πηγή: Peter Parham (2009.  
)*The Immune System*, Garland Sciense (pdf)

Εικόνα 5: Ο θύμος αδένας και τα T και B λεμφοκύτταρα. Πηγή: [www.studyblue.com](http://www.studyblue.com)

Εικόνα 6: Η ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων (Broere et al,2011 pdf)

Εικόνα 7: Αντισώματα εναντίων μόλυνσης. Πηγή: [routsias-lab.gr](http://routsias-lab.gr)

Εικόνα 8: Δοκιμασία ELISPOT. Πηγή [www.mabtech.com](http://www.mabtech.com)

Εικόνα 9: Τρόποι διαφυγής των καρκινικών κυττάρων από την ανοσοεπιτηρηση. Πηγή:  
[slideplayer.gr](http://slideplayer.gr)

Εικόνα 10: Το DNA : [en.wikipedia.org](http://en.wikipedia.org)

