



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΚΑΙ ΘΕΤΙΚΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ: Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΦΩΤΟΝΙΩΝ ΣΤΟ
ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ.**

**Πατσάκη Βαρβάρα-Παρασκευή
Υπεύθυνη καθηγήτρια: Ειρήνη Αθανασάκη**

Ηράκλειο

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

*Η μεταπτυχιακή αυτή διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο ανασοβιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης υπό την επίβλεψη της κυρίας **Αθανασάκη**. Πρώτα από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Αθανασάκη για την αμέριστη στήριξη της στο πρόσωπό μου. Το ρήμα «ευχαριστώ» στην συγκεκριμένη περίπτωση είναι μάλλον πολύ λίγο για να περιγράψει την ευγνωμοσύνη μου για τον συγκεκριμένο άνθρωπο που πάντοτε είναι δίπλα στα παιδιά του εργαστηρίου χωρίς **ίδιον όφελος**.*

*Παράλληλα οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ στους κύριους **Ιωάννη Δαμηλάκη, Χρήστο Τσατσάνη και Μιχάλη Μαζωνάκη** για την μέγιστη βοήθειά τους στην ολοκλήρωση της διατριβής.*

*Επίσης ευχαριστώ πολύ όλα τα μέλη του εργαστηρίου και ειδικότερα τη συνοδοιπόρο μου σε αυτό το ταξίδι **Κυριακή Λιούτα** που πρακτικά και ψυχολογικά έχει συνεισφέρει μέγιστα.*

Για το τέλος θέλω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου που υπήρξε πάντοτε δίπλα μου σε αυτό το ταξίδι, το οποίο δεν υπήρξε πάντα εύκολο όπως «εύκολη» δεν υπήρξα και εγώ!

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ABSTRACT.....	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1.1.1 Ακτίνες φωτονίων	6
1.1.2 Οι ακτίνες X και γ πρωταγωνιστούν στην διαγνωστική και επεμβατική ακτινολογία.....	6
1.1.3 Ακτινοθεραπείες	8
1.2.1 Το ανοσοποιητικό σύστημα.....	10
1.2.2 Οι υποπληθυσμοί των T-λεμφοκυττάρων.....	11
1.2.3 Οι ιντερλευκίνες 2 και 10 (IL-2 και IL-10).....	12
1.3 Ακτινοθεραπείες και Ανοσοποιητικό Σύστημα.....	13
1.4 Καρκίνος και ανοσοποιητικό σύστημα.....	14
1.5 Σκοπός Διατριβής.....	14
2. ΜΕΘΟΔΟΙ-ΥΛΙΚΑ.....	15
2.1 Πειραματόζωα-Χειρισμός.....	15
2.2. Κύτταρα.....	15
2.3. Ακτινοβολήση σπλήνα.....	15
2.4. Κυτταροκαλλιέργειες.....	16
2.5. Elisa (ENZYMELINKEDIMMUNOSORBENTASSAY)	16
2.6 Εξωτερικός ανοσοφθορισμός.....	17
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	19
3.1 ΕΞΩΤΕΡΙΚΟΣ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ.....	19
3.2 ELISA.....	20

4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	21
5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	22

ABSTRACT

During the recent years, photon radiation, such as X and gamma rays, is widely used in diagnostic and interventional radiology as well as in therapy, like in case of radiotherapy of cancer patients. Radiotherapy seems to play a dual role in the function of the immune system, leading to immunostimulation or immunosuppression. According to the literature, there has been an attempt to correlate the radiation dose provided during radiotherapy to stimulation or suppression of the immune system. Precisely, in a *C57BL/6* mouse model, radiation doses lower than 0,1 Gy seemed to stimulate the immune system, while doses greater than 2 Gy suppressed the immune system. Based on these results, in the present work we tried to investigate the correlation between immune stimulation or suppression with low doses of irradiation (0,04 and 0,1 Gy) and a high dose of irradiation (2Gy). To this extend, spleens were isolated from cancer and control mice, irradiated using the above doses, and after culturing splenic leucocytes, the profile of T- lymphocytes (*CD4*, *CD8*, *CD25*) as well as the production of cytokines IL-2 and IL-10 in the supernatants of the cell cultures were determined. Although the main goal of this study was to observe whether the immunostimulatory doses could reverse the immunosuppressive state caused by cancer, the obtained results could not clearly demonstrate such phenomena.

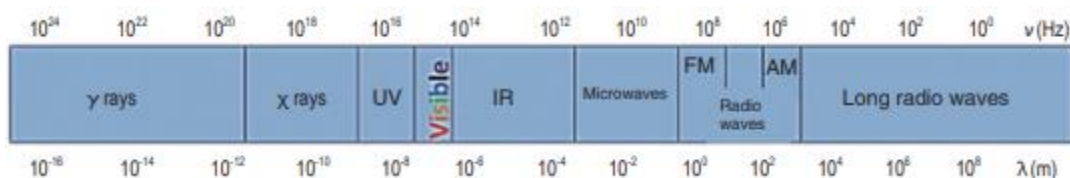
ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια φωτονιακές ακτινοβολίες όπως ακτίνες Χ και γ χρησιμοποιούνται ευρέως τόσο για διαγνωστικές επεμβατικές μεθόδους ακτινολογίας όσο και για θεραπευτικούς στόχους, όπως στην περίπτωση της ακτινοθεραπείας καρκινοπαθών. Η ακτινοθεραπεία φαίνεται να προκαλεί διττά αποτελέσματα στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος οδηγώντας άλλοτε σε ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος και άλλοτε σε καταστολή. Βιβλιογραφικά έχει γίνει προσπάθεια σύνδεσης της ανοσοδιέγερσης ή της ανοσοκαταστολής από τις ακτινοθεραπείες με την ποσότητα δόσεων ακτινοβολίας. Χαρακτηριστικά σε μοντέλα ποντικών C57BL/6 δόσεις ακτινοβολίας έως 0,1 Gy φαίνεται να ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό ενώ δόσεις μεγαλύτερες από 2 Gy προκαλούν ανοσοκαταστολή. Ορμώμενοι από τέτοιες έρευνες προχωρήσαμε σε διερεύνηση της αλληλεπίδρασης ανοσοποιητικού και ακτινοβολιών χαμηλών (0,04Gy και 0,1Gy) και υψηλών (2Gy) δόσεων σε *in vitro* σύστημα. Πιο συγκεκριμένα σπλήνες από υγιή και καρκινικά ζώα απομονώθηκαν, ακτινοβολήθηκαν για τις παραπάνω δόσεις και τα λευκοκύτταρά τους καλλιεργήθηκαν με στόχο των έλεγχου των πληθυσμών T-λεμφοκυττάρων (CD4, CD8, CD25) και των παραγόμενων ιντερλευκινών IL-2 και IL-10. Απώτερος στόχος ήταν να παρατηρήσουμε αν οι θεωρητικά διεγερτικές χαμηλές δόσεις είναι ικανές να αναστρέψουν την ανοσοκαταστολή που προκαλείται λόγω καρκίνου στους αντίστοιχους σπλήνες, ωστόσο κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε ξεκάθαρα.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1.1 Ακτίνες φωτονίων.

Οι ακτίνες X και η γ-ακτινοβολία αποτελούν ακτίνες φωτονίων δηλαδή ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία με μήκος κύματος πολύ μικρότερο από αυτό της ορατής ακτινοβολίας. Αυτό τις καθιστά ακτινοβολίες με μεγάλη ενέργεια και έντονη διεισδυτικότητα στα σώματα που διαπερνούν. Μάλιστα η ένταση των ακτινοβολιών X όταν διαπερνούν ένα σώμα μετράται σύμφωνα με τον τύπο $I=I_0 \cdot e^{-\mu l}$ που αποτελεί τον Νόμο του Beer-Lambert, όπου I_0 η προσπίπτουσα ένταση της ακτινοβολίας, μ ο συντελεστής απόσβεσης του σώματος στο οποίο προσπίπτει η ακτινοβολία και l το μήκος της διαδρομής που διάνυσε η ακτινοβολία (Chen et. al., 2013).

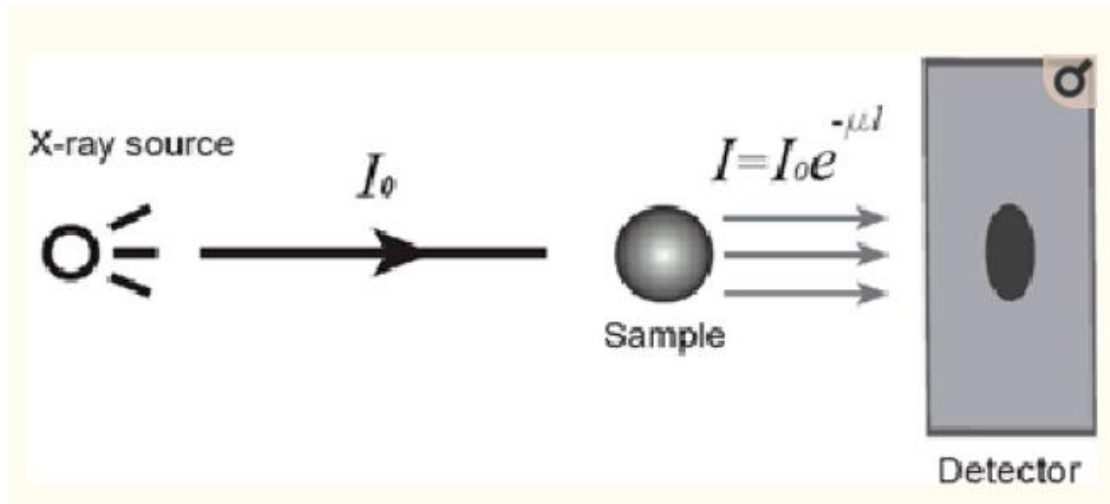


ΕΙΚΟΝΑ 1: Το φάσμα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (Zimmerman et. al., 2013)

Οι ακτίνες X ανακαλύφθηκαν τυχαία από τον φυσικό William Conrad Röntgen το 1895, όταν στην προσπάθειά του να φωτογραφήσει το χέρι της συζύγου του τις χρησιμοποίησε, χωρίς να γνωρίζει ιδιαίτερα για αυτές. Το αποτέλεσμα ήταν να αποτυπωθεί στο film σκιά του οστού της συζύγου του (Howell ,2016). Από τότε μέχρι σήμερα αυτή η ιδιότητα της απεικόνισης εσωτερικών στοιχείων του οργανισμού που διαφαινόταν για την ακτινοβολία αυτή έχει εξελιχθεί και επεκταθεί ακόμη και στον τομέα της θεραπείας ιστών.

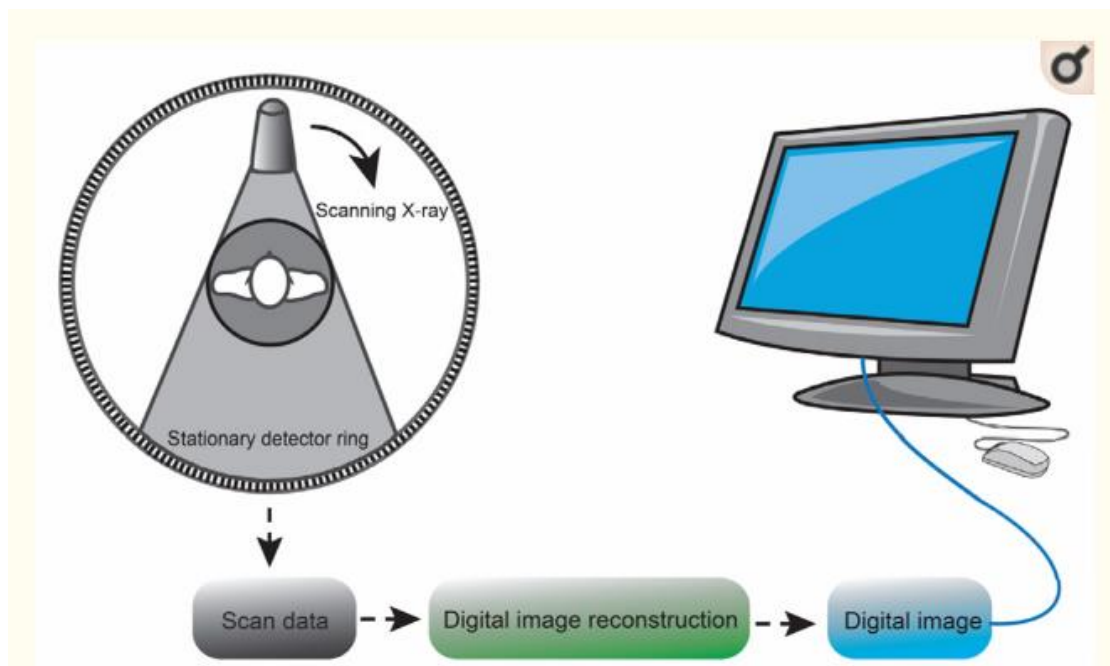
1.1.2 Οι ακτίνες X και γ πρωταγωνιστούν στην διαγνωστική και επεμβατική ακτινολογία.

Οι ακτίνες X και γ χρησιμοποιούνται ευρέως στον τομέα της διαγνωστικής ακτινολογίας, δηλαδή σε εξετάσεις που στηρίζονται στην απεικόνιση πάνω σε film ή σε κάμερα, της μορφής ενός ιστού ή οργάνου. Παράλληλα όμως συχνά οι τεχνικές απεικόνισης συνδυάζονται με θεραπευτικές επεμβατικές μεθόδους διαμορφώνοντας το πεδίο της επεμβατικής ακτινολογίας. Πιο συγκεκριμένα χαρακτηριστική μέθοδος απεικόνισης οστών στην οποία χρησιμοποιούνται οι ακτίνες X είναι η ακτινογραφία. Η λογική της στηρίζεται στην στοχευμένη ρίψη δεσμών φωτονίων δηλαδή ποσότητας ακτινοβολίας X από μία πηγή πάνω στο οστό στόχο. Αφού η ακτινοβολία διαπεράσει το οστό, η ένταση της εξερχόμενης ακτινοβολίας θα διαμορφώσει μία εικόνα για αυτό η οποία καταγράφεται πάνω σε film.



ΕΙΚΟΝΑ 2: Μέθοδος απεικόνισης οστών-ακτινογραφία (Chen, 2016)

Μία άλλη ευρέως γνωστή απεικονιστική μέθοδος είναι η αξονική τομογραφία (computed tomography- CT) που στηρίζεται στην λήψη εικόνων από διάφορες γωνίες για τον ιστό που θέλουμε να εξετάσουμε. Για τον λόγο αυτό η πηγή ακτίνων X περιστρέφεται και τα αποτελέσματα καταγράφονται μέσω κάμερας.



ΕΙΚΟΝΑ 3: Μέθοδος απεικόνισης αξονικής τομογραφίας (Chen , 2016)

Στην κατηγορία τέτοιου είδους τεχνικών ανήκει και η μαστογραφία. Το σπινθηρογράφημα αντίστοιχα στηρίζεται στην καταγραφή από κάμερα που αναγνωρίζει γ ακτινοβολία της εικόνας ιστών όπως ο θυρεοειδής αδένας ή οι όρχεις και συνήθως συνοδεύεται από χορήγηση ραδιενεργού φαρμάκου που βοηθά στην απεικόνιση του ιστού (Shearer et. al., 1974). Οι δόσεις ακτινοβολίας που χορηγούνται σε απεικονιστικές τεχνικές της διαγνωστικής ακτινοβολίας όπως η ακτινογραφία που προαναφέρθηκε χαρακτηρίζονται μικρές. Μονάδα μέτρησης της τοπικής απορροφόμενης ακτινοβολίας, δηλαδή της ακτινοβολίας που προσπίπτει στον ιστό ή όργανο στόχο αποτελεί το Gray (Gy) το οποίο δείχνει το ποσό της ενέργειας σε Joule που απορροφάται ανά 1 Kg μάζας. Μία αξονική τομογραφία μπορεί να φτάσει σε χορήγηση δόσης 40 m Gy (Chen et. al., 2012). Στις θεραπευτικές μεθόδους χρησιμοποιούνται πολύ υψηλότερες δόσεις ακτινοβολίας. Πέραν των απεικονιστικών τεχνικών ακτινολογίας υπάρχουν και οι επεμβατικές τεχνικές που στηρίζονται σε ακτινοβολίες όπως οι ακτίνες Χ. Μια τέτοια περίπτωση είναι και η αγγειογραφία κατά την οποία παράλληλα με την απεικόνιση των αντίστοιχων αγγείων πραγματοποιούνται μικροεπεμβάσεις, όπως στη στεφανιογραφία ή η αγγειοπλαστική επέμβαση αρτηριών.

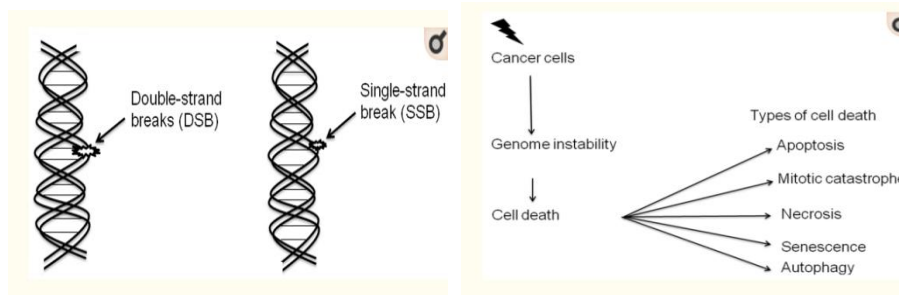
Αξίζει να σημειωθεί ότι πέραν από την τεχνητή χορήγηση φωτονιακών ακτινοβολιών, ο άνθρωπος γίνεται δέκτης ακτινοβολίας και από το περιβάλλον, για παράδειγμα μέσω της κοσμικής ακτινοβολίας.

1.1.3 Ακτινοθεραπείες

Οι παραπάνω ακτίνες φωτονίων χρησιμοποιούνται και για θεραπευτικούς στόχους. Ειδικότερα ακτίνες Χ χρησιμοποιούνται ευρέως στην αντιμετώπιση του καρκίνου. Ο καρκίνος αποτελεί μία πολυπαραγοντική ασθένεια που οδηγεί στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό κυττάρων με αποτέλεσμα τη δημιουργία νεοπλασιών, δηλαδή μαζών κυττάρων που ονομάζονται καρκινικοί όγκοι (Khan et. al., 2011). Η στοχευμένη ακτινοβόληση των καρκινικών όγκων με ακτίνες Χ προκαλεί DNA βλάβες στα νεοπλαστικά κύτταρα οδηγώντας τα στο θάνατο. Ο θάνατος αυτός επέρχεται σταδιακά γι αυτό τα καρκινοκύτταρα μπορεί να θανατωθούν μέρες ή και μήνες μετά την ακτινοβόληση. Οι DNA βλάβες που προκαλούνται οδηγούν με διάφορους τρόπους το καρκινικό κύτταρο σε θάνατο:

- **Απόπτωση:** Προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος που βασίζεται σε ένα σύνολο από συντονισμένες λειτουργίες όπως η συρρίκνωση των κυττάρων και η δημιουργία αποπτωτικών σωματιδίων, με τη κυτταρική μεμβράνη να μένει ανέπαφη.
- **Νέκρωση:** Η πλασματική μεμβράνη διαλύεται και το κύτταρο χάνει τα ενδοκυττάρια συστατικά του.
- **Γηρασμός:** Το κύτταρο χάνει την ιδιότητα του να πολλαπλασιάζεται, δεν διαιρείται και δεν συνθέτει DNA.

- **Αυτοφαγία:** Το κύτταρο κατακερματίζεται μέσω διαδικασιών που σχετίζονται με τη δημιουργία κυστιδίων από το λυσοσωμικό μονοπάτι.
- **Μιτωτικός κυτταρικός θάνατος:** Η ακτινοβόληση οδηγεί στην δημιουργία προβλημάτων στη μίτωση των καρκινικών κυττάρων προκαλώντας λάθος διαχωρισμούς των χρωμοσωμάτων στα θυγατρικά κύτταρα, γεγονός που τα οδηγεί σταδιακά στο θάνατο (Baskar et. al., 2012).



ΕΙΚΟΝΑ 4: Οι DNA βλάβες οδηγούν τα καρκινικά κύτταρα με διάφορους τρόπους στο θάνατο (Baskar et. al., 2012).

Οι ακτινοθεραπείες συχνά συνδυάζονται με άλλες θεραπευτικές τεχνικές όπως οι χημειοθεραπείες, η χειρουργική αφαίρεση του όγκου, ορμονοθεραπείες και ανοσοθεραπείες. Μπορεί να πραγματοποιηθούν τόσο πριν τη χειρουργική αφαίρεση του όγκου για τη συρρίκνωσή του, όσο και μετά για την εξάλειψη τυχόν υπολειμμάτων καρκινικών κυττάρων που ίσως έχουν διαφύγει.

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα τελευταία χρόνια προτείνεται η χρήση και σωματιδιακών ακτινοβολιών έναντι των φωτονιακών για τις ακτινοθεραπείες. Οι σωματιδιακές ακτινοβολίες στηρίζονται στη χρήση ιόντων άνθρακα ή πρωτονίων, έναντι της φωτονιακής δέσμης ηλεκτρονίων. Φαίνεται να είναι αποδοτικότερες καθώς διοχετεύεται σχεδόν ολόκληρη η ενέργεια στον ιστό στόχο και περιορίζονται οι παράπλευρες απώλειες σε παρακείμενους ιστούς (Fernandez-Gonzalo et. al., 2017).

Στις ακτινοθεραπείες η συνολική δόση που χορηγείται είναι μεγάλη, της τάξης των 60 Gy σε περιπτώσεις καρκίνων του μαστού ή 45 Gy σε περιπτώσεις καρκίνων του προστάτη (Rostein et. al., 1985). Ωστόσο, αφενός η συνολική δόση εξαρτάται από το είδος του καρκίνου και από την κλινική εικόνα του ασθενή και αφετέρου δεν χορηγείται απευθείας αλλά σταδιακά σε καθημερινές συνεδρίες. Η ακτινοβόληση των ασθενών συνήθως πραγματοποιείται από ειδικά μηχανήματα που επιταχύνουν ευθύγραμμες δέσμες φωτονίων ακτίνων X και ονομάζονται ευθύγραμμοι επιταχυντές.

1.2.1 Το ανοσοποιητικό σύστημα

Η λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος έγκειται στην αντίδραση του οργανισμού σε συστατικά φλεγμονωδών μικροβίων όπως μακρομόρια, πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες ή γενικώς σε οτιδήποτε αναγνωρισθεί ως ξένη ουσία για τον οργανισμό. Δεν λείπουν οι περιπτώσεις όπου ο οργανισμός αντιδρά ενάντια σε δικά του στοιχεία οπότε μιλάμε για καταστάσεις αυτοανοσίας. Η έννοια του ανοσοποιητικού συστήματος φαίνεται να εισάγεται ήδη από την εποχή του Θουκυδίδη όταν αυτός ανέλυε την μολυσματική ασθένεια πανώλης (λοιμός της Αθήνας). Ακόμη και προγενέστερα όμως οι αρχαίοι Κινέζοι ανακαλύπτουν την προστασία από την διέγερση του ανοσοποιητικού, όταν προκειμένου να οχυρώσουν τα μικρά παιδιά απέναντι στην ευλογιά τους χορηγούσαν εισπνεόμενη σκόνη από τις πληγές των ατόμων που είχαν ήδη νοσήσει. Έτσι εισάγεται και η έννοια του εμβολιασμού δηλαδή της εσκεμμένης διέγερσης του οργανισμού από κάποιο εξωγενές στοιχείο ώστε να είναι έτοιμος να το αντιμετωπίσει όταν έρθει ξανά σε επαφή με αυτό. Η πρώτη περίπτωση χειρισμού του ανοσοποιητικού συστήματος κάτω από πειραματικές συνθήκες ήταν από τον Edward Jenner ο οποίος παρατήρησε ότι παιδιά που είχαν ανακάμψει από μία ιική νόσο προερχόμενη από τις αγελάδες ήταν ανθεκτικά στην ευλογιά. Έτσι προχώρησε στην ένεση σε υγιή παιδιά υλικού από τα εξανθήματα αυτών που είχαν την ιική νόσο διεγείροντας το ανοσοποιητικό τους και προστατεύοντας τα από την ευλογιά (Abul K. Abbas and Andrew H. Lichtman Cellular and Molecular Immunology Saunders 2015).

Το ανοσοποιητικό σύστημα διαχωρίζεται στην έμφυτη και την προσαρμοστική ανοσία. Η έμφυτη ανοσία είναι φυλογενετικά γηραιότερη από την προσαρμοστική, περιλαμβάνει τόσο κύτταρα όσο και διαλυτά στοιχεία και η δράση της καταγράφεται λίγες μόνο ώρες μετά την επαφή του οργανισμού με το εξωγενές στοιχείο (αντιγόνο), ενώ σχετίζεται με φλεγμονώδεις αντιδράσεις (διαδικασία στρατολόγησης λευκών αιμοσφαιρίων και πρωτεϊνών του αίματος με στόχο την εξουδετέρωση του παθογόνου μικροοργανισμού)(Helen Chapel and Mansel Haeney, Essentials of Clinical Immunology). Οι μηχανισμοί της έμφυτης ανοσίας λειτουργούν ακριβώς με τον ίδιο τρόπο σε επαναλαμβανόμενες επαφές του οργανισμού με το αντιγόνο, είναι ειδικοί για μοτίβα κοινά μεταξύ των παθογόνων μικροοργανισμών και δεν εμφανίζει την εξειδίκευση της προσαρμοστικής ανοσίας. Συστατικό στοιχείο της είναι τα φυσικά και χημικά εμπόδια απέναντι στα αντιγόνα, όπως αντιμικροβιακές ουσίες που παράγονται σε επιθηλιακές επιφάνειες. Κύτταρα που συμμετέχουν στην έμφυτη ανοσία είναι τα φαγοκύτταρα (μακροφάγα, ουδετερόφιλα), δενδριτικά κύτταρα, οι φυσικοί φονιάδες NK καθώς και άλλα λεμφικά κύτταρα. Επιπλέον συμμετέχουν πρωτεΐνες του αίματος (πχ κυτοκίνες: ρυθμίζουν τις κινήσεις και δράσεις των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος) καθώς και παράγοντες έναρξης φλεγμονής. Σαν απόκριση στην φλεγμονή ενεργοποιούνται οι μηχανισμοί προσαρμοστικής ανοσίας. Αυτοί αποκρίνονται σε ένα πολύ μεγάλο φάσμα αντιγονικών επιτόπων και εμφανίζουν πολύ μεγάλη εξειδίκευση. Άλλη βασική τους διαφορά με την έμφυτη ανοσία είναι αυτή της μνήμης, δηλαδή σε επαναλαμβανόμενες επαφές με το ίδιο αντιγόνο δρουν πολύ ταχύτερα και αποτελεσματικότερα. Αυτό το

επιτυγχάνουν χάρη στα λεμφοκύτταρα (B και T) και κυρίως στην ιδιότητα τους να παράγουν δομές που ονομάζονται αντισώματα εξειδικευμένα ενάντια σε κάθε ξένο αντιγόνο. Αντίστοιχους υποδοχείς για τα αντιγόνα φέρουν και τα T λεμφοκύτταρα, τους TCR. Βασικό χαρακτηριστικό της προσαρμοστικής ανοσίας είναι επίσης η ιδιότητα της να δημιουργεί αντισώματα μόνο για ξένα στοιχεία και όχι αυτά του εαυτού.

Η προσαρμοστική ανοσία διαχωρίζεται σε χυμική και κυτταρική ανοσία. Η χυμική μεσολαβείται από τα B λεμφοκύτταρα τα οποία παράγουν τα εξειδικευμένα αντισώματα ενάντια σε εξωκυττάρια μικρόβια και τα προϊόντα αυτών (τοξίνες). Η πρόσδεση αντιγόνου αντισώματος ενεργοποιεί διάφορα μονοπάτια εξουδετέρωσης του αντιγόνου, όπως η καταστροφή τους από φαγοκύτταρα. Η κυτταρική ανοσία μεσολαβείται από T λεμφοκύτταρα που στοχεύουν στην άμεση εξουδετέρωση αντιγόνων από ενδοκυττάρια μικρόβια χωρίς να παράγουν εξειδικευμένα αντισώματα (Abul K. Abbas και Andrew H. Lichtman, *cellular and molecular immunology*, Saunders 2015).

Τα T λεμφοκύτταρα παράγονται και διαφοροποιούνται στον θύμο αδένα φέρουν εξειδικευμένο υποδοχέα αναγνώρισης για κάθε αντιγονικό επίτοπο στην επιφάνεια τους τον λεγόμενο TCR, ο οποίος μοιάζει με τη δομή των αντισωμάτων, ενώ ανάλογα με τους επιφανειακούς μάρτυρες που φέρουν διαχωρίζονται σε T βοηθούς, T κυτταροτοξικά και T κατασταλτικά κύτταρα. Οι T βοηθοί μέσω του υποδοχέα τους TCR αναγνωρίζουν τον αντιγονικό επίτοπο μόνο όταν αυτός βρίσκεται σε σύμπλοκο με εξειδικευμένα μόρια του μείζονος συμπλόκου ιστοσυμβατότητας MHC τάξης II πάνω στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (πχ μακροφάγα, δενδριτικά). Η αντίδραση αυτή θα έχει σαν αποτέλεσμα είτε την ενεργοποίηση των B λεμφοκυττάρων με σκοπό την παραγωγή εξειδικευμένου αντισώματος, είτε την άμεση καταστροφή από T κυτταροτοξικά κύτταρα (William E. Paul, *Fundamental immunology*, Lippincott Williams and Wilkins, 2013).

Τα B λεμφοκύτταρα παράγονται και ωριμάζουν στον μυελό των οστών. Η επαφή του οργανισμού με το αντιγόνο, έχει σαν αποτέλεσμα την μετατροπή των πρώιμων B κυττάρων σε πλασματοκύτταρα, που παράγουν εξειδικευμένα αντισώματα για κάθε αντιγόνο και κύτταρα μνήμης για κάθε επόμενη επαφή με αυτό. Τα B λεμφοκύτταρα μπορούν να αναγνωρίζουν ελεύθερο αντιγόνο σε αντίθεση με τα T, μέσω της εξειδικευμένης ανοσοσφαιρίνης. Ανάλογα με το αν ένα αντιγόνο χρειάζεται τους T βοηθούς για να διεγείρει την ενεργοποίηση των B ή όχι καλείται θυμοεξαρτώμενο ή θυμοανεξάρτητο αντίστοιχα (William E . Paul, *Fundamental immunology* και Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, *cellular and molecular immunology*) .Η ανοσολογική απόκριση πραγματοποιείται στα λεγόμενα δευτερογενή λεμφικά όργανα όπως είναι ο σπλήνας, οι λεμφαδένες, οι αμυγδαλές και ο λεμφικός ιστός κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα (Yue-Harn Ng et. al., 2010).

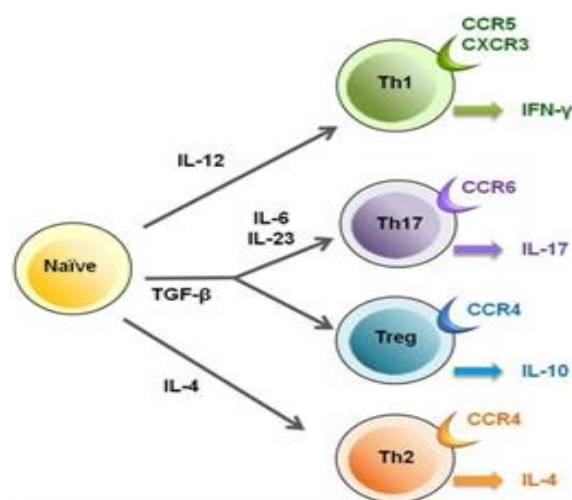
1.2.2 Οι υποπληθυσμοί των T-λεμφοκυττάρων.

Τα T-λεμφοκύτταρα ωριμάζουν και διαφοροποιούνται στον θύμο αδένα. Ο πρώτος υποπληθυσμός που εντοπίζεται είναι αυτός των Βοηθητικών T-λεμφοκυττάρων, τα οποία εκφράζουν τον επιφανειακό μάρτυρα CD4 και ο ρόλος τους είναι να αναγνωρίζουν το

συνδεδεμένο με τα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας τάξης II, το ξένο αντιγόνο στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, και στη συνέχεια να ενεργοποιούν τους υπόλοιπους πληθυσμούς κυττάρων που συμμετέχουν στην ανοσολογική απόκριση κατά του ξένου αντιγόνου. Ανάλογα με την παραγωγή ιντερφερόνης- γ ή ιντερλευκίνης IL-17 διαχωρίζονται περισσότερο σε T βοηθούς 1 (Th1) και T βοηθούς 17 (Th 17) (Εικόνα 5). Οι T βοηθοί 1 έχουν συνδεθεί με καταστάσεις αυτοανοσίας (Damsker et al. 2010).

Τα κύτταρα που εκφράζουν τον επιφανειακό μάρτυρα CD8 αποτελούν τα T- κυτταροτοξικά κύτταρα και αναγνωρίζουν το αντιγόνο που πρόκειται να αντιμετωπίσουν όταν είναι συνδεδεμένο με αντιγόνα ιστοσυμβατότητας τάξης I στην επιφάνεια των κυττάρων. Αντιγόνα στόχοι για τα T-κυτταροτοξικά κύτταρα είναι κύτταρα μολυσμένα από ιό, καρκινικά κύτταρα καθώς και κύτταρα με αντιγόνα ιστοσυμβατότητας διαφορετικά από αυτά του οργανισμού στον οποίο έχουν παραχθεί τα T-κυτταροτοξικά (κύτταρα από μεταμοσχευμένο ιστό).

Η επόμενη κατηγορία T κυττάρων είναι τα T-ρυθμιστικά κύτταρα που εκφράζουν τον επιφανειακό μάρτυρα CD25 και σχετίζονται με την παρεμπόδιση της ανοσολογικής απόκρισης. Παράλληλα εντοπίζονται T- κύτταρα μνήμης για τους υποπληθυσμούς των CD4 θετικών κυττάρων και CD8 θετικών κυττάρων αντίστοιχα, τα οποία σε επόμενη έκθεση στο ίδιο αντιγόνο ενεργοποιούνται ταχύτερα, προκαλώντας πολύ εντονότερη ανοσολογική απόκριση που επιτυγχάνει αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση του αντιγόνου.



Types of T Lymphocytes

ΕΙΚΟΝΑ 5. Τα είδη των T-λεμφοκυττάρων(Shailesh Budhathoki, Types of T-lymphocytes, 2019)

1.2.3 Οι ιντερλευκίνες 2 και 10 (IL-2 και IL-10).

Οι Ιντερλευκίνες αποτελούν μια κατηγορία των κυτοκινών, δηλαδή των πρωτεϊνών του ανοσοποιητικού συστήματος. Προσδένονται σε ειδικούς υποδοχείς πάνω στα κύτταρα

στόχους προκαλώντας διάφορες επιδράσεις ανάλογα με το ρόλο τους, συμπεριλαμβανομένων του πολλαπλασιασμού ή της θανάτωσης.

IL-2: Αποτελεί μία φλεγμονώδη ιντερλευκίνη, η οποία ενισχύει την έναρξη της ανοσολογικής απόκρισης όταν συνδέεται στον υποδοχέα της προωθώντας τον πολλαπλασιασμό των Βοηθητικών Τ-λεμφοκυττάρων και των Κυτταροτοξικών Τ-λεμφοκυττάρων. Παράλληλα συμμετέχει στην διαφοροποίηση των Τ-κυττάρων σε ρυθμιστικά(CD25⁺).

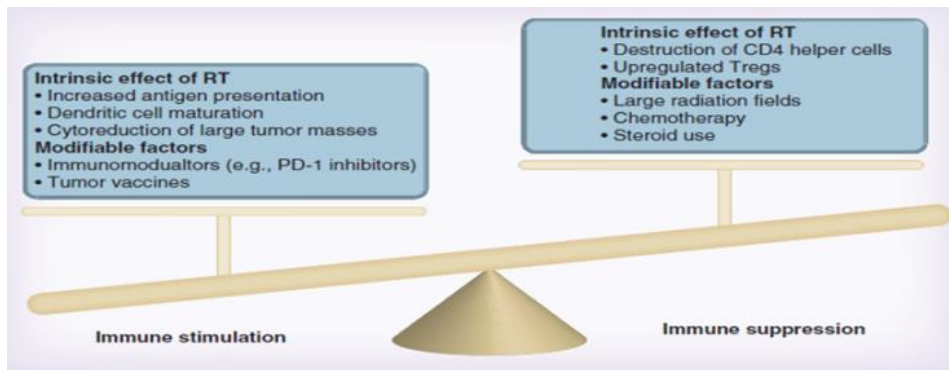
IL-10: Η ιντερλευκίνη 10 έχει αντίστροφη δράση από την IL-2. Έχει καταγραφεί η παραγωγή της τόσο από μακροφάγα όσο και από Β-λεμφοκύτταρα καθώς και από άλλες κατηγορίες κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Έχει αντιφλεγμονώδη δράση αποτρέποντας τον πολλαπλασιασμό των Τ-λεμφοκυττάρων και ειδικότερα των Τ-κυτταροτοξικών, και κατά συνέπεια έχει συνδεθεί με αναστολή της ανοσολογικής απόκρισης και εντοπίζεται συνήθως στη λήξη της, όταν το αντιγόνο έχει αντιμετωπιστεί (Couper et al., 2008). Χαρακτηριστικά την βλέπουμε στην Εικόνα 5 να εκκρίνεται από τα Τ-ρυθμιστικά κύτταρα που έχουν αρνητική ρύθμιση για την ανοσολογική απόκριση.

1.3 Ακτινοθεραπείες και Ανοσοποιητικό Σύστημα.

Οι ακτινοθεραπείες φαίνεται να έχουν διττή επίδραση στο ανοσοποιητικό σύστημα του ασθενή. Κατ' αρχάς θεωρείται ότι αυξάνουν την αντιγονικότητα του όγκου. Αυτό συμβαίνει καθώς, όπως προαναφέρθηκε, προκαλούνται DNA βλάβες στα καρκινικά κύτταρα με αποτέλεσμα την θανάτωση τους, και συνεπώς την αύξηση μέσω των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας τάξης I αντιμετώπισης των κυττάρων αυτών από τον οργανισμό. Επιπλέον άλλη θετική αλληλεπίδραση υπέρ της αντιμετώπισης των όγκων είναι η ωρίμανση δενδριτικών κυττάρων που συμμετέχουν στην αντιμετώπιση καρκινικών κυττάρων. Τέτοιου είδους συνέπειες μαρτυρούν την προκαλούμενη από ακτινοβολία ανάπτυξη ανοσοδιέγερσης.

Σε άλλες περιπτώσεις, όπως στο περιφερικό αίμα ασθενών με καρκίνο του προστάτη, η ακτινοβολία προκάλεσε λεμφοπενία δηλαδή απόπτωση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος και ιδιαίτερα των Τ- λεμφοκυττάρων, γεγονός το οποίο συνιστά ανοσοκατασταλτική επίδραση της ακτινοβολίας (Lawrence and Dicker, 2014).

Έχει γίνει προσπάθεια σύνδεσης της χορήγησης της δόσης με τη μία ή την άλλη κατεύθυνση. Πιο συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι σε ποντίκια C57BL/6 ημερήσιες δόσεις έως 0,1 Gy φαίνεται να ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα, ενώ δόσεις μεγαλύτερες της τάξης των 2 Gy ημερησίως φαίνεται να οδηγούν τα κύτταρα σε απόπτωση (Eικόνα 6) (Persa et. al., 2010).



ΕΙΚΟΝΑ 6: Διτή επίδραση ακτινοθεραπειών στο ανοσοποιητικό σύστημα (Lawrence and Dicker, 2014).

1.4 Καρκίνος και ανοσοποιητικό σύστημα.

Τα καρκινικά κύτταρα προκειμένου να επιβιώσουν δημιουργούν ένα περιβάλλον ανοσοκαταστολής δηλαδή μειώνουν τη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος. Αυτό επιτυγχάνεται με διάφορους τρόπους όπως η αύξηση των T- ρυθμιστικών κυττάρων τα οποία όπως επισημάνθηκε και προηγουμένως έχουν αρνητική ρύθμιση για το ανοσοποιητικό σύστημα. Ενδεικτικά τα ρυθμιστικά είναι υπεύθυνα για δραστηριότητες όπως η παρεμπόδιση των T- βοηθητικών και T- κυτταροτοξικών που είναι απαραίτητα για την αντιμετώπιση των καρκινικών όγκων. Επίσης προωθείται η έκφραση παραγόντων όπως ο PD-L1 και ο CTLA-4. Τα καρκινικά κύτταρα εκφράζουν τον παράγοντα PD-L1 ο οποίος προσδένεται στον υποδοχέα PD-1 των T-λεμφοκυττάρων, η πρόσδεση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα συνέπειες όπως η αδυναμία παραγωγής κυττάρων μνήμης και η καταστολή των CD4 και CD8 κυττάρων. Ο υποδοχέας CTLA-4 επίσης παρεμποδίζει δραστηριότητες όπως η ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων (Kalathil and Thanavala, 2016).

1.5 Σκοπός Διατριβής.

Ορμώμενοι από τις παραπάνω πρωταρχικές αναζητήσεις της επίδρασης των ακτινοθεραπειών στο ανοσοποιητικό σύστημα, στόχος αυτής της εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης χαμηλών και υψηλών δόσεων ακτινοβολίας στην επιβίωση/ανάπτυξη T-κυτταρικών πληθυσμών σπλήνα *in vitro*. Πιο συγκεκριμένα στόχος ήταν η καταγραφή του προφίλ των T-λεμφοκυττάρων καθώς και των 2 αντίθετης δράσης ιντερλευκινών IL-2 και IL-10 σε καλλιέργειες λευκοκυττάρων σπλήνα που απομονώθηκε τόσο από ποντίκια με καρκίνο όσο και υγιή ποντίκια, ώστε να παρατηρήσουμε αν ο φαινότυπος ανοσοκαταστολής που εντοπίζεται στον καρκίνο αναστρέφεται με τις χαμηλές δόσεις ή αν διατηρείται από την υψηλή.

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Πειραματόζωα-Χειρισμός.

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν θηλυκά BALB/c ποντίκια 7-9 μηνών, τα οποία βρίσκονται σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας στις εγκαταστάσεις του Τμήματος Βιολογίας του Παν/μίου Κρήτης. Σε κάθε ποντίκι χορηγήθηκε υποδόρια με τη χρήση σύριγγας ποσότητα 10.000 κυττάρων καρκινικής σειράς μαστού **4T1**. Η σειρά αυτή είναι ικανή να δημιουργήσει όγκο στα ποντίκια σε διάστημα 5 ημερών με μίας εβδομάδας. Παράλληλα στη μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν και ζώα ελέγχου. Μετά το πέρας των 5 ημερών τα ζώα θυσιάστηκαν, προκειμένου να απομονωθεί ο σπλήνας τους. Η απομόνωση του σπλήνα πραγματοποιείται σε στείρες συνθήκες με τη βοήθεια χειρουργικών εργαλείων. Μετά την απομόνωση ακολουθεί η ακτινοβολήση του σε γραμμικό επιταχυντή Infinity Elekta για δόσεις ακτινοβολίας 0, 0,04, 0,1 και 2 Gy. Κατόπιν ακτινοβολημένοι σπλήνες και μη υπέστησαν συγκεκριμένη επεξεργασία προκειμένου να αποκομίσουμε από αυτούς τα λευκά τους αιμοσφαίρια μέσα στα οποία περιέχονται τα T- λεμφοκύτταρα. Χρησιμοποιώντας αποστειρωμένη βελόνα δημιουργήσαμε οπές στον σπλήνα με στόχο να εξάγουμε τα κύτταρα που εμπεριέχονται στο εσωτερικό του. Στη συνέχεια αφού κάναμε πλύσεις με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και φυγοκεντρήσαμε (Kubota), χρησιμοποιήσαμε διάλυμα λύσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων και φυγοκεντρήσαμε ξανά, κατόπιν ξεπλένουμε τα κύτταρα με ρυθμιστικό διάλυμα, ανακτώντας έτσι τα λευκά αιμοσφαίρια που θα χρησιμοποιήσουμε στις καλλιέργειες.

2.2. Κύτταρα.

Για την παραγωγή καρκινικών ζώων χρησιμοποιήθηκε καρκινική σειρά κυττάρων μαστού 4T1 η οποία εμφανίζει μεγάλη επιθετικότητα και ικανότητα μετάστασης. Οι καλλιέργειες του πειράματος ήταν σπλενοκυττάρων σε στείρες εργαστηριακές συνθήκες. Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν DMEM high glucose (Gibco) ενώ τα κύτταρα επώαστηκαν σε συγκεκριμένες συνθήκες συνθήκες 5% CO₂ στους 37°C (Επωαστήρας Format Scientific, Automatic CO₂).

2.3. Ακτινοβολήση σπλήνα.

Σπλήνες τόσο από τα ζώα τα οποία είχαν αναπτύξει καρκινικούς όγκους λόγω της χορήγησης 4T1 όσο και τα ζώα ελέγχου ακτινοβολήθηκαν σε γραμμικό επιταχυντή Elekta Infinity (Τμήμα Ακτινοθεραπείας Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου- ΠΕ.ΠΑ.Γ.Ν.Η) με ποσότητες δόσεων 0 Gy, 0,04Gy, 0,1 Gy και 2 Gy. Οι σπλήνες μεταφέρθηκαν μέσα σε αποστειρωμένα τρυβλία petri ενώ γύρω από αυτά είχε τοποθετηθεί parafilm. Παράλληλα στη μεταφορά

χρησιμοποιήθηκε πάγος ώστε να εξασφαλισθεί η διατήρηση της ποιότητας του ιστού και των κυττάρων.

2.4. Κυτταροκαλλιέργειες.

Για τον έλεγχο των επιμέρους κυτταρικών πληθυσμών καθώς και των ιντερλευκινών που παράγονται από τα κύτταρα που υποβλήθηκαν σε ακτινοβολία πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες σπλενοκυττάρων μίας, δύο και επτά ημερών. Μετά από απομόνωση των σπλενοκυττάρων και τη λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων, δημιουργήθηκαν καλλιέργειες σε συγκέντρωση κυττάρων 1×10^6 κυτ/μl για καθεμία από τις παραπάνω δόσεις και τις 3 ημέρες. Το υπερκείμενο των καλλιεργειών αυτών ελέγχθηκε με την τεχνική της elisa για την ανίχνευση ιντερλευκινών, ενώ οι επιμέρους κυτταρικοί πληθυσμοί ελέγχθηκαν με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού. Όλες οι παραπάνω διαδικασίες πραγματοποιούνται σε στείρες συνθήκες.

2.5 Elisa (ENZYMELINKED IMMUNOSORBENT ASSAY).

Η ELISA αποτελεί μία εξαιρετικά ευαίσθητη βιοχημική τεχνική ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών σε δείγματα όπως ο ορός του αίματος και υπερκείμενα καλλιεργειών. Σε αυτό το πείραμα χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της παραγωγής των ιντερλευκινών IL-2 και IL-10 στα υπερκείμενα των παραπάνω καλλιεργειών ωστόσο μόνο για τις μέρες 1 και 2 καθώς σε κάποια πρώιμα πειράματα, παρατηρούνταν μηδενική παραγωγή κατά την έβδομη μέρα.

Υλικά και διαλύματα:

- Coating buffer(διάλυμα προσκόλλησης) Διαλύουμε 2.1gr Na_2CO_3 σε 500ml H_2O και 2.65gr NaCO_3 σε άλλα 500ml H_2O . Αναμειγνύουμε τα δύο διαλύματα ρυθμίζοντας το pH= 9.6.(Merck, Germany)
- PBS 10x(διάλυμα φωσφορικών αλάτων)
- PBS 1x, pH=7.4, 0,2 M φωσφορικού άλατος και 1,5M NaCl (Το διάλυμα παρασκευάζεται αρχικά σαν PBS 10x διαλύοντας 2,28g NaH_2PO_4 (0,038M) ή 2,62g $\text{NaH}_2\text{PO}_4(\text{H}_2\text{O})$, 11,5g $\text{Na}_2\text{HPO}_4(0,162\text{M})$ και 43,84g NaCl σε 500ml dH_2O .Ακολούθως ρυθμίζεται το pH στο 7,4 και το χρησιμοποιούμε σε τελική συγκέντρωση 1x).(Merck, Germany)
- Διάλυμα πλυσίματος : PBS, Tween-20 0.05% v/v (Merck, Germany)
- Διάλυμα blocking: PBS-BSA 2%
- Η BSA (λευκωματίνη βοοειδών ορών ή καζεΐνη) προστίθεται σε όλα τα wells, επειδή οι πρωτεΐνες ορών εμποδίζουν τη μη συγκεκριμένη προσρόφηση άλλων πρωτεϊνών στην plate, (SIGMA).

- Διάλυμα αντισωμάτων: PBS-BSA 0.1%w/v
- Υπόστρωμα: TMB Substrate Kit (Thermofisher,Scientific)
- Ορός από ποντίκι (positive control), 1/1000 v/v σε coating buffer
- Πλάκες καλλιέργειας flat bottom 96 οπών
- ELISA plate reader στα 450nm (ASYS HITECH-DigScan)
- Πολυπιπέτα Gilson 200μl
- Πιπέτες Gilson 20μl, 200μl, 1000μl
- Αντίσωματα , rat anti-mouse IL-2(BIOLEGEND), rat anti-mouse IL-10 (BIOLEGEND) (1/1000)
- Αντίσωμα HRP rabbit anti-rat IgG(SIGMA) (1/5000)
- Αναστολέας H₂SO₄

Μετά την 24ωρη επώαση των κυττάρων για τις καλλιέργειες της πρώτης μέρας και την 48ωρη επώαση των κυττάρων για τις καλλιέργειες της δεύτερης μέρας συλλέγουμε το υπερκείμενο. Αυτό αραιώνεται 1/1 με το προσκολλητικό διάλυμα αλάτων coating buffer (cb) σε τελικό όγκο 100μl(λ) ανά well. Τα δείγματα των υπερκειμένων μαζί με καθαρό cb και αραιωμένο ορό που αποτελούν το αρνητικό και θετικό control του πειράματος αντίστοιχα, επωάζονται για 16-18 ώρες στους 4⁰ C. Μετά το πέρας αυτού του διαστήματος το πρωτεϊνικό περιεχόμενο έχει προσκολληθεί στην plate οπότε πετάμε το υπερκείμενο και ξεπλένουμε 3X με 200λ ανά well PBS-tween 20. Στη συνέχεια προσθέτουμε 100λ ανά well blocking solution για να περιορίσουμε τις μη ειδικές αλληλεπιδράσεις του αντισώματος με αντιγονικούς επιτόπους στους οποίους δεν στοχεύει και επωάζουμε για 2 ώρες. Μετά το διάστημα αυτό αφαιρούμε το διάλυμα και ξεπλένουμε και πάλι 3X , έπειτα τοποθετούμε το πρώτο αντίσωμα anti-mouse IL-2 και anti-mouse IL-10 (100λ ανά well) για 1 1/2 ώρα. Κατόπιν αφαιρούμε, ξεπλένουμε και προσθέτουμε το δεύτερο αντίσωμα το οποίο είναι συνδεδεμένο με υπεροξειδάση (100 λ ανά well για μία ώρα). Μετά το πέρας της μίας ώρας ακολουθούμε τα ίδια βήματα και προσθέτουμε το χρωμογόνο υπόστρωμα. Εάν υπάρχει η πρωτεΐνη μας στο υπερκείμενο και αν έχει «πιαστεί» από το πρώτο ειδικό για αυτήν αντίσωμα τότε το τελευταίο θα προσδεθεί στο δεύτερο αντίσωμα. Τότε η υπεροξειδάση που φέρει το δεύτερο αντίσωμα θα αντιδράσει με το υπόστρωμα της με αποτέλεσμα να παρατηρούμε αλλαγή στο χρώμα των πηγαδιών (από διάφανο σε μπλε). Η αντίδραση αυτή λαμβάνει χώρα σε σκοτεινό χώρο για 10-15 λεπτά και σταματά με τη χρήση του θειικού οξέος. Στη συνέχεια μετράμε την απορρόφηση στον ELISA plate reader σε μήκος κύματος 450 nm.

2.6 Εξωτερικός ανοσοφθορισμός.

Ο εξωτερικός ανοσοφθορισμός αποτελεί μία τεχνική εκμετάλλευσης αντισωμάτων συνδεδεμένα με φθορίζουσες χρωστικές προκειμένου να ανιχνευθεί η ύπαρξη

παραγόντων στην περιφέρεια του κυττάρου. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε για την παρατήρηση της ύπαρξης των πρωτεϊνών-επιφανειακών μαρτύρων CD4, CD8 και CD25 που είναι ενδεικτικοί για την ύπαρξη των κυτταρικών πληθυσμών των Βοηθητικών Τ-λεμφοκυττάρων, των Τ-κυτταροτοξικών και των Τ-ρυθμιστικών κυττάρων αντίστοιχα .

Υλικά:

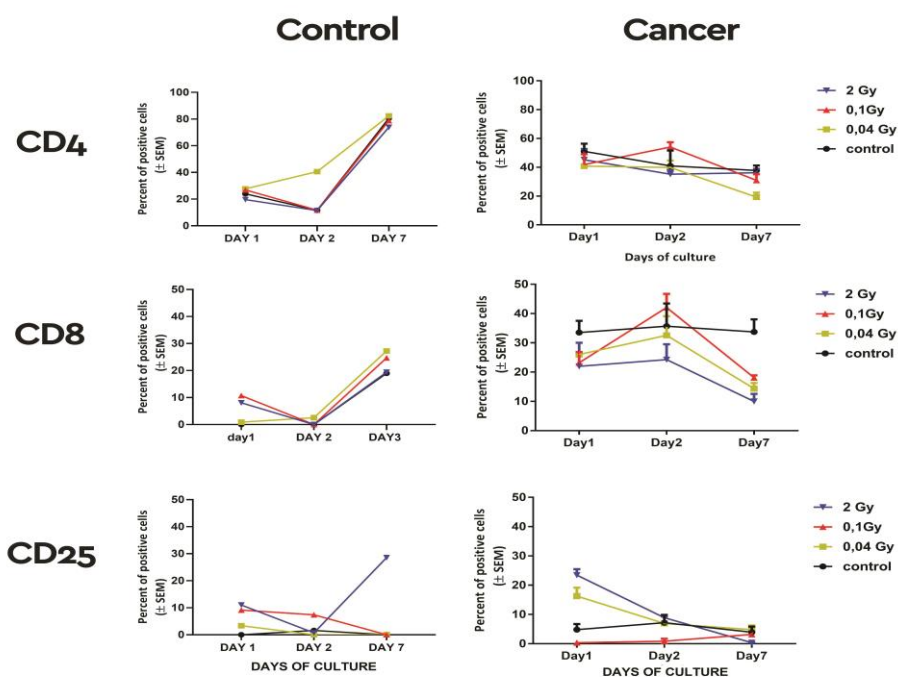
- 96-well plate V-bottom (SARSTEDT)
- Tubes 15ml
- Φυγόκεντρος Kubota
- Πιπέτες Pasteur
- Πιπέτες Gilson 20μl, 200μl, 1000μl
- Διάλυμα πλυσίματος: PBS 1x, pH=7.4, 0,2 M φωσφορικού άλατος και 1,5M NaCl (Το διάλυμα παρασκευάζεται αρχικά σαν PBS 10x διαλύοντας 2,28g NaH_2PO_4 (0,038M) ή 2,62g $\text{NaH}_2\text{PO}_4(\text{H}_2\text{O})$, 11,5g $\text{Na}_2\text{HPO}_4(0,162\text{M})$ και 43,84g NaCl σε 500ml dH_2O .Ακολούθως ρυθμίζεται το pH στο 7,4 και το χρησιμοποιούμε σε τελική συγκέντρωση 1x).
- Διάλυμα αντισωμάτων: PBS-BSA 0,1%
- Διάλυμα Μονιμοποίησης: Παραφορμαλδεύδη, PFA 4% in PBS
- FACScan (Becton Dickinson)
- Αντίσωματα CD4 anti-mouse FITC (EuroBioscience) , CD8 anti-mouse FITC (Eurobioscience), CD25 anti-mouse (1/300) (EuroBioscience), anti-RAT IgG FITC (TAGO) (1/600)

Αρχικά τα κύτταρα μοιράστηκαν σε πηγάδια plate 96 πηγαδιών. Αφού ξεπλύνουμε 3 φορές κάθε πηγάδι με PBS 1X (200 λ ανά well), προσθέτουμε 100λ PFA και επωάζουμε για 15 λεπτά στον πάγο. Στη συνέχεια φυγοκεντρούμε (1200rpm για 6 λεπτά) αφαιρούμε και ξεπλένουμε 3 φορές με PBS 1X. Κατόπιν προσθέτουμε το blocking buffer (100 λ ανά well) και επωάζουμε για 20 λεπτά. Έπειτα φυγοκεντρούμε και αφαιρούμε το υπερκείμενο , προσθέτουμε το πρώτο αντίσωμα σε συγκέντρωση 1/300 (100λ ανά well) και επωάζουμε για μισή ώρα. Στη συνέχεια πραγματοποιούμε φυγοκέντρηση και απορρίπτουμε το υπερκείμενο, ξεπλένουμε τρεις φορές με PBS 1X και τοποθετούμε δεύτερο αντίσωμα συνδεδεμένο με φθορίζουσα χρωστική μόνο για τα δείγματα που θα ελεγχθούν για το μάρτυρα CD25 (100λ ανά well, 1/600), τα υπόλοιπα διατηρούνται σε PBS 1X. Επωάζουμε για 45 λεπτά και στη συνέχεια φυγοκεντρούμε και απορρίπτουμε πάλι το υπερκείμενο. Τέλος ξεπλένουμε για τελευταία φορά 3 φορές με PBS 1X και στη συνέχεια συλλέγουμε όλα τα δείγματα σε FACS tubes αραιωμένα σε PBS 1X προκειμένου να πραγματοποιηθεί η μέτρηση.

3.Αποτελέσματα.

3.1 Αποτελέσματα εξωτερικού ανοσοφθορισμού.

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως σπλήνες τόσο από φυσιολογικά ποντίκια και ποντίκια με καρκινικό όγκο ακτινοβολήθηκαν τόσο για τις φερόμενες ως ανοσοδιεγερτικές δόσεις ακτινοβολίας (0,04Gy και 0,1Gy) όσο και για την μεγάλη ανοσοκατασταλτική 2 Gy δόση. Τα λευκοκύτταρα του σπλήνα ελέγχθηκαν μέσω κυτταρομετρίας ροής για συνδεδεμένα με FITC χρωστική αντισώματα για τους επιφανειακούς μάρτυρες CD4, CD8 και CD25. Έτσι στοχεύσαμε στην καταγραφή της μεταβολής των ποσοστών των T- βοηθητικών κυττάρων, των T- κυτταροτοξικών και των T-ρυθμιστικών κυττάρων σε καλλιέργειες μίας δύο και επτά ημερών μετά την ακτινοβολήση. Τα αποτελέσματα που πήραμε καταγράφονται στο διάγραμμα της παρακάτω εικόνας 7.



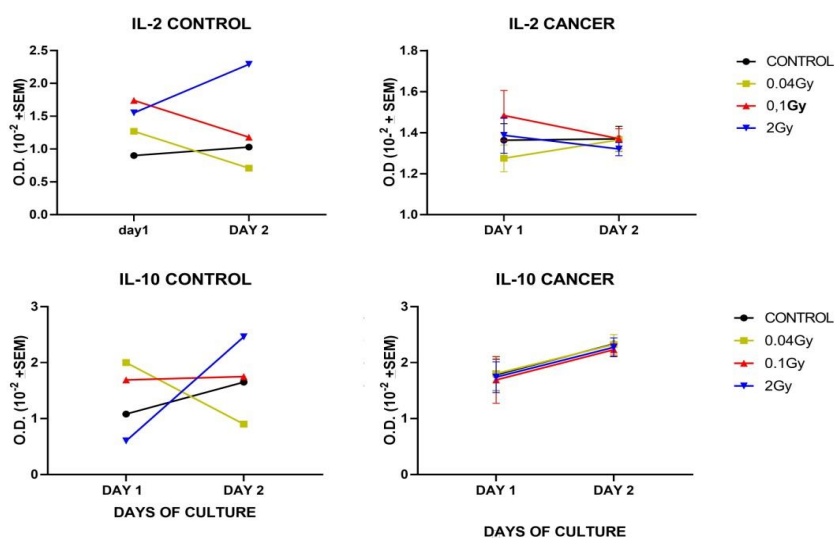
ΕΙΚΟΝΑ 7: Διάγραμμα μεταβολής του ποσοστού των πληθυσμών των CD4, CD8 και CD25 κυττάρων σε καλλιέργειες μίας, δύο και επτά ημερών.

Όπως παρατηρείται στον πληθυσμό των CD4 κυττάρων από σπλήνες φυσιολογικών ζώων οι ακτινοβολίες δεν φαίνεται να προκαλούν κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με σπλήνες αντίστοιχων ζώων που δεν ακτινοβολήθηκαν. Στατιστικά σημαντική πτώση των CD4 κυττάρων προκάλεσε η ακτινοβολία 0,04Gy σε σπλήνες προερχόμενους από ζώα με καρκίνο την έβδομη μέρα (*, $p=0.0357$). Παράλληλα τα CD8 κύτταρα εμφανίζουν στατιστικά σημαντική μείωση στους ακτινοβολημένους σπλήνες ποντικών με καρκίνο σε όλες τις ακτινοβολίες και όλες

τις ημέρες (*, $p=0.0419$). Τέλος για τα CD25 κύτταρα η ακτινοβολία των 2Gy προκάλεσε σημαντική αύξηση στα φυσιολογικά ζώα την έβδομη μέρα ενώ στα ζώα με καρκίνο, αν και αρχικά οι ακτινοβολίες 2Gy και 0,04 Gy προκάλεσαν αύξηση του συγκεκριμένου πληθυσμού, την έβδομη μέρα τα επίπεδά τους μειώνονται.

3.2 Αποτελέσματα ELISA.

Η αλληλεπίδραση των λεμφοκυττάρων με τις ακτινοβολίες καταγράφηκε και μέσω του ελέγχου των υπερκειμένων των καλλιιεργειών τους για την φλεγμονώδη ιντερλευκίνη IL-2 και την αντιφλεγμονώδη ιντερλευκίνη IL-10. Παρακάτω παρατίθεται το διάγραμμα παραγωγής των 2 αυτών κυτοκινών σε υπερκείμενα καλλιιεργειών μόνο για την πρώτη και την δεύτερη μέρα καθώς την έβδομη μέρα δεν παρατηρούνταν καθόλου έκφραση κυτοκινών.



ΕΙΚΟΝΑ 8: Διαγράμματα παραγωγής IL-2 και IL-10 σε υπερκείμενα καλλιιεργειών των ακτινοβολημένων σπληνών.

Στατιστικά σημαντική είναι η αύξηση της IL-2 στα φυσιολογικά ζώα για την δόση των 2 Gy και επίσης η μείωση της IL-10 στην μικρότερη δόση των 0.04 Gy για τα ίδια ζώα. Στα ζώα με καρκίνο δεν παρατηρήθηκαν ιδιαίτερες μεταβολές.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως στόχος της διατριβής ήταν η διερεύνηση της σχέσης αλληλεπίδρασης των ακτινοβολιών δόσεων 0, 0,04, 0,1 και 2 Gy με λεμφοκύτταρα προερχόμενα από σπλήνες τόσο ζώων με καρκίνο όσο και υγιών ζώων. Απώτερος σκοπός ήταν να εντοπίσουμε τυχόν σημάδια ανοσοδιέγερσης στις χαμηλές δόσεις (0,04 και 0,1 Gy) και ανασοκαταστολής στην υψηλή δόση (2Gy).

Όσον αφορά τα αποτελέσματα του ανοσοφθορισμού, οι διακυμάνσεις στους πληθυσμούς των κυττάρων σαφώς και πρέπει να υπολογιστούν, ωστόσο μείζονος σημασίας είναι η έβδομη μέρα οπότε θεωρούμε ότι υπάρχει μία σταθεροποίηση του φαινομένου. Πιο συγκεκριμένα για τον πληθυσμό των CD4 κυττάρων στα καρκινικά ποντίκια η δόση 0,04 Gy οδηγεί στην ελάττωσή τους, πράγμα το οποίο δεν συνιστά ανοσοδιεγερτική δράση, αφού τα CD4 κύτταρα είναι οι πρώτοι και σημαντικότεροι τελεστές της ανοσολογικής απόκρισης. Παράλληλα τα κυτταροτοξικά CD8 θετικά κύτταρα των ζώων με καρκίνο, τα οποία είναι απαραίτητα για την αντιμετώπιση καρκινικών κυττάρων μειώνονται δραστικά και στις 3 δόσεις, γεγονός που επίσης μαρτυρά μία κατάσταση ανοσοανεπάρκειας. Τέλος για τον πληθυσμό των CD25 ρυθμιστικών κυττάρων τα οποία συμμετέχουν σε διαδικασίες λήξης της ανοσολογικής απόκρισης, η αύξηση στον αριθμό τους που προκαλείται από την δόση 2 Gy στα υγιή ζώα συμφωνεί με την ανσοκατασταλτική δράση, όπως επισημαίνεται και στη βιβλιογραφία.

Προχωρώντας στα αποτελέσματα που σημειώθηκαν από την καταγραφή των ιντερλευκινών IL-2 και IL-10, η υψηλή δόση οδηγεί σε αύξηση της φλεγμονώδους IL-2 ενώ η χαμηλή ακτινοβολία οδηγεί σε μείωση της αντιφλεγμονώδους IL-10. Αυτό συνιστά ανοσοδιεγερτική ρύθμιση. Στα ζώα με καρκίνο δεν παρατηρούνται ιδιαίτερες μεταβολές.

Συμπερασματικά, στην όλη παραπάνω *in vitro* αντιμετώπιση εξάγουμε αποτελέσματα που χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης, καθώς και επαναλήψεων της πειραματικής διαδικασίας. Η απομόνωση ενός ιστού από τον οργανισμό μπορεί να δώσει αποτελέσματα προς την άμεση επίδραση των ακτινοβολιών σε υποπληθυσμούς των λεμφοκυττάρων, οι οποίοι θα πρέπει επιπλέον να ελεγχθούν για τη λειτουργικότητά τους και την ικανότητά τους να συμμετέχουν σε ανοσολογικές αποκρίσεις. Η πραγματοποίηση του πειράματος και στο *in vivo* σύστημα θα μπορεί να καταγράψει επιπλέον τις έμμεσες επιδράσεις των ακτινοβολιών στα παρακείμενα όργανα.

5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.

1. Abbas, K. A., Lichtman, A., Cellular and molecular immunology, Eighth edition 2015, Saunders.
2. Shearer, J. R., Constable, R. A., Girling, M., Hendry, F. W., Fergusson, D. J., (1974), Radioisotopic Bone Scintigraphy with the Gamma Camera in the Investigation of Prostatic Cancer, British Medical Journal, 2, 362-365
3. Βασιλείου, Μ. Α., (2016), Μελέτη χαμηλών δόσεων ιοντιζουσών ακτινοβολιών σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος με κυτταρογενετικές και μοριακές τεχνικές, Πανεπιστήμιο Κρήτης.
4. Bogdandi, N. E., Balogh, A., Felgyinszki, N., Szatmari, T., Persa, E., Hildebrandt, G., Safrany, G., Lumniczky, K. (2010), Effects of Low-Dose Radiation on the Immune System of Mice after Total-Body Irradiation, Radiation Research, 174, 480–489.
5. Chan, M., Almutairi, A., (2016), Nanogels as imaging agents for modalities spanning the electromagnetic spectrum, Materials Horizons, 3, 21-40.
6. Chapel, H., Haeney, M., Essentials of clinical Immunology, Sixth edition 2014, Wiley Blackwell.
7. Chen, H., Rogalski, M. M., Anker, N. J., (2012), Advances in functional X-ray imaging techniques and contrast agents, Physical chemistry Chemical physics, 14(39), 13469–13486.
8. Damsker, M. J., Hansen, M. A., Caspi, R. R., (2010), Th1 and Th17 cells: Adversaries and collaborators, New York Academy of Science, 1183, 211-221.
9. Donya, M., Radford, M., ElGuindy, A., Firmin, D., Yacoub, H. M., (2014), Radiation in medicine: Origins, risks and aspirations, Global Cardiology Science and Practice, 54.
10. Fernandez-Gonzalo, R., Baatout, S., Moreels, M. (2017), Frontiers in immunology.
11. Gorabi, M. A., Hajighasemi, S., Sathyapalan, T., Sahebkar, A., (2019), Cell transfer-based immunotherapies in cancer: A review, International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 1-11.
12. Howell, D. J., (2016), Early clinical use of the X-ray, Translations of the American Clinical and Climatological Association, 127.
13. Ionizing Radiation, Part 1: X- and Gamma (γ)-Radiation, and Neutrons, (2000), International Agency for Research on Cancer, Volume 85.
14. Kamran, C. S., Light, O. J., Efstathiou, A. J., (2019), Proton versus photon-based radiation therapy for prostate cancer: emerging evidence and considerations in the era of value-based cancer care, Prostate cancer and Prostatic Diseases, 22, 509-521.

- 15.Kaur, P., Asea, A. (2012), Radiation-induced effects and the immune system in cancer, *Frontiers in oncology*.
- 16.Khan, N., Mukhtar, H., (2010), Cancer and metastasis: prevention and treatment by green tea, *Cancer Metastasis*, 29, 435-445.
- 17.Kindt, J., T., Goldsby, R.,Osborne, A., B., Kuby immunology, Sixth edition 2007, W. H. Freeman company New York.
- 18.Lawrence, R. Y., Dicker, P. A. (2014), Radiation therapy and the immune system: learning to live together, *Future Oncology* 10(5) 777-780.
- 19.Ng, Y-H., Chalasani, G., (2010), Role of secondary lymphoid tissues in primary and memory T-cell responses to a transplanted organ, *Transplantation Reviews*, 24, 32-41.
- 20.Paul E. W.,*Fundamental Immunology*, Seventh edition, Lippincot Williams and Wilkins a Wolters Kluwer business.
- 21.Pulaski, B. A., (2001), Mouse 4T1 breast tumor model, *Current Protocols in Immunology*, 20.
- 22.Radiological protection of patients in diagnostic and interventional radiology, nuclear medicine and radiotherapy, (2001) Vienna, International Atomic Energy Agency.
- 23.Rostein, S., Blomgren, H., Petrini, B., Wasserman, J., Baral, E., (1984), Long term effects on the immune system following local radiation therapy for breast cancer I cellular composition of the peripheral blood lymphocyte population, *Radiation Oncology* 11 921-925.
- 24.Wang, G., Zhao, D., Spring, J. D., DePinho, A. R.,(2018), Genetics and biology of prostate cancer, 32, 17-18.
- 25.X-rays, (2017), National Institute of biomedical imaging and engineering, www.nibib.nih.gov.
- 26.Zimmerman, W. J., (2013), Targeted treatment of cancer with radiofrequency electromagnetic fields amplitude-modulated at tumor-specific frequencies, *Chinese Journal of cancer*, 32, 11.
- 27.Zschaek, S., Blumke, B., Wust, P., Kaul, D., Bahra, M., Riess, H., Klein, F., Sinn, M., Pelzer, U., Budach, V., Ghadjar, P., (2012), Dose-escalated radiotherapy for unresectableor locally recurrent pancreatic cancer: Dose volume analysis, toxicity and outcome of 28 consecutive patients, *Plos One*.