

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ  
ΑΝΤΙΑΠΟΠΤΩΤΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ Bcl-2 ΣΤΟΥΣ  
ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ ΤΟΥ  
ΒΡΟΓΧΟΚΥΨΕΛΙΔΙΚΟΥ ΕΚΠΛΥΜΑΤΟΣ  
ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΙΔΙΟΠΑΘΗ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΙΝΩΣΗ  
ΚΑΙ ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ**

Χαράλαμπος Μ. Μερμίγκης

Επιμελητής Πνευμονολογικής Κλινικής 401 ΓΣΝΑ

Έγκριση αίτησης έναρξης εκπόνησης Διδακτορικής Διατριβής : 27/4/1999 ,

Αριθ. Πρωτ. 364/4-6-99.

Επιβλέπων Καθηγητής: Κος Μπούρος Δημοσθένης

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Κος Σιαφάκας Νικόλαος,

Κος Γεωργόπουλος Δημήτριος.

# ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## **ΑΠΟΠΤΩΣΗ**

Ο όρος "απόπτωση" χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στην ιατρική βιβλιογραφία και ορολογία το 1972 από τους Kehr, Wyllie και Currie<sup>6</sup> για την περιγραφή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, ενός από τα πλέον σημαντικά φαινόμενα στις διαδικασίες ομοίωσης των πολυκύτταρων οργανισμών.

Ο αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος αποτελεί ένα φυσιολογικό φαινόμενο που λαμβάνει χώρα στο σύνολο των ιστών του ανθρωπίνου σώματος. Αποσκοπεί στη λύση και καταστροφή των κυττάρων που εμφανίζουν έκπτωση ή διαταραχή της λειτουργικότητας των, οφειλόμενη σε κυτταρική γήρανση είτε επίδραση ποικίλων ενδογενών ή εξωγενών κυτταροτοξικών ουσιών<sup>6,10</sup>.

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος είναι μια σύνθετη παθοφυσιολογική διεργασία και αποτελεί γνώρισμα του υψηλότερου επιπέδου εξέλιξης των πολυκύτταρων οργανισμών. Το κύτταρο αποτελεί όπως είναι γνωστό την βασική δομική και λειτουργική μονάδα των ζώντων οργανισμών. Η αρμονική δομή και λειτουργία του ανθρωπίνου σώματος, αλλά και των υπολοίπων εξελιγμένων ζωικών οργανισμών, απαιτεί απόλυτη προσαρμογή των μεμονωμένων κυτταρικών μονάδων στα λειτουργικά και δομικά πλαίσια του εκάστοτε ιστού και οργάνου. Οι βασικές συνιστώσες της αρμονικής αυτής συνεργασίας που καλείται "ομοίωση" είναι τρεις: ο κυτταρικός

πολλαπλασιασμός, η κυτταρική διαφοροποίηση και ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος. Η ομαλή σχέση των ξεχωριστών αυτών παραμέτρων ξεκινά ήδη από την εμβρυογένεση και συνεχίζεται καθόλη την διάρκεια της ζωής του εκάστοτε οργανισμού. Το κάθε κύτταρο ανάλογα με την χωροταξική του θέση στον οργανισμό επιτελεί ορισμένη λειτουργική αποστολή μεταφράζοντας την γενετική πληροφορία (πυρηνικό DNA) σε λειτουργία (πρωτεϊνοσύνθεση, κινητοποίηση ενζυμικών συστημάτων). Η καθορισθείσα λειτουργική αποστολή μπορεί να είναι περισσότερο ή λιγότερο πολύπλοκη και επίπονη για τις επιμέρους κυτταρικές δομές, πχ διαφορετική και πιο απλή θεωρείται η αποστολή ενός λιπώδους κυττάρου από εκείνη ενός κυττάρου του νευρικού συστήματος ή ενός φαγοκυττάρου που οφείλει άμεσα να κινηθεί στην περιοχή της φλεγμονής και να εξουδετερώσει τον εξωγενή παράγοντα με οξειδωτικούς και μη μηχανισμούς. Είναι λοιπόν προφανές ότι οι διαδικασίες κυτταρικής γήρανσης πέρα από τις γενετικά καθορισμένες παραμέτρους εξαρτώνται εξίσου από την συνεχή καταπόνηση των κυτταρικών δομών λόγω της λειτουργικής αποστολής του κάθε κυττάρου. Καθώς το κύτταρο πλησιάζει στο τέλος του κύκλου ζωής του εμφανίζει αδυναμία στην αποτελεσματική επιτέλεση της λειτουργικής του αποστολής, πράγμα επιβλαβές για την ιστική δομή στην οποία ανήκει. Τότε λοιπόν το ίδιο το κύτταρο αποφασίζει το θάνατο και την διαδικασία αυτοκαταστροφής του. Η όλη διαδικασία του θανάτου δεν γίνεται με τρόπο τυχαίο ή παθητικό, αλλά αποτελεί ενεργητικό φαινόμενο και επιτελείται από συγκεκριμένες πρωτεΐνες και μέσω ορισμένης οδού, η οποία βρίσκεται κάτω από γονιδιακό έλεγχο<sup>7,8,10,11</sup>.

Οι παρατηρήσεις ερευνητών για το φαινόμενο του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου ξεκινούν ήδη από το 1900, ο όρος όμως απόπτωση, ο

οποίος προέρχεται από την ελληνική γλώσσα, χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1972 από τους Kehr, Wyllie και Currie<sup>6,8</sup>. Οι ερευνητές αυτοί ήταν οι πρώτοι που μελέτησαν και περιέγραψαν λεπτομερώς τα μορφολογικά στάδια του συγκεκριμένου φαινομένου. Χρησιμοποίησαν την ελληνική λέξη "απόπτωση", η οποία αναφέρεται στον τρόπο με τον οποίο ένα δένδρο ρίχνει τα φύλλα του, προκειμένου να επισημάνουν το γεγονός ότι αυτή η μορφή κυτταρικού θανάτου είναι προγραμματισμένη και ενεργητική και σε καμία περίπτωση τυχαία. Η πτώση των φύλλων ενός φυλλοβόλου δένδρου γίνεται σε καθορισμένη εποχή, δύναται δε να μετατοπισθεί χρονικά από έτος σε έτος ανάλογα με τις εκάστοτε κλιματολογικές συνθήκες. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι ο φυτικός οργανισμός αντιλαμβάνεται τις αλλαγές στο περιβάλλον του (στην προκειμένη περίπτωση τις αλλαγές θερμοκρασίας) και αποφασίζει την στιγμή της πτώσης των φύλλων. Με παρόμοιο, αλλά βεβαίως πιο σύνθετο και εξαρτώμενο από περισσότερες παραμέτρους τρόπο, το κύτταρο αποφασίζει την χρονική στιγμή του θανάτου του, προκειμένου να εξυπηρετήσει με τον καλύτερο τρόπο τις διαδικασίες ομοιόστασης του οργανισμού στον οποίο ανήκει<sup>7,8,72,80</sup>.

Το αποπτωτικό κύτταρο ολοκληρώνει την διαδικασία θανάτου του σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα (4 έως 6 ώρες). Στα αρχικά στάδια της ανωτέρω διαδικασίας παρουσιάζει σημεία δυσλειτουργίας, όπως για παράδειγμα ελάττωση της χημειοτακτικής και φαγοκυτταρικής ικανότητας, αν πρόκειται για κύτταρο της λευκής σειράς ή μακροφάγο<sup>8,10</sup>.

Το κάθε κύτταρο καθόλη τη διάρκεια του κύκλου ζωής του είναι αποδέκτης πολλαπλών ερεθισμάτων, φυσιολογικών ή παθολογικών που άλλοτε προάγουν και άλλοτε αναστέλλουν την απόπτωση του. Στους φυσιολογικούς

παράγοντες περιλαμβάνονται ορμόνες ή άλλοι πρωτεϊνικοί παράγοντες όπως οι TNF, αυξητικοί παράγοντες, νευροδιαβιβαστικές ουσίες κλπ. Παθολογικοί παράγοντες που επιδρούν στην απόπτωση είναι η ακτινοβολία, κυττατοτοξικά φάρμακα, κορτικοστεροειδή, τοξικές ρίζες οξυγόνου, αυξητικοί παράγοντες ή άλλες πρωτεϊνικές ουσίες εκλυόμενες από καρκινικά κύτταρα κλπ. Το σύνολο των παραγόντων που αποτελούν σήματα για συνέχιση της ζωής ενός κυττάρου αναφέρονται στη βιβλιογραφία και ως "τροφικοί" παράγοντες (trophic factors)<sup>7,8,9</sup>. Η μελέτη των τελευταίων έχει ξεκινήσει από τις αρχές του 20ου αιώνα σε κύτταρα νευρικού ιστού προερχόμενα από πειραματόζωα. Δύο εκ των σημαντικότερων τροφικών παραγόντων είναι ο νευρικός αυξητικός παράγων (nerve growth factor, NGF) και η νευροτροφίνη 3 (neurotrophin 3, NT3) η επίδραση των οποίων στην κυτταρική ομοιόσταση γίνεται μετά την σύνδεση τους με ειδικούς υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας<sup>8,11,12,80</sup>.

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος παρουσιάζει συγκεκριμένες μορφολογικές αλλοιώσεις της κυτταρικής δομής, οι οποίες έχουν καθορισθεί με παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο<sup>6,7,8</sup>. Τα αρχικά ευρήματα συνίστανται σε πύκνωση και περιφερική διάταξη της πυρηνικής χρωματίνης. Επακολουθεί ο κατακερματισμός του πυρήνα και εν συνεχεία η εμφάνιση κυτταροπλασματικών πτυχώσεων, οι οποίες περιβάλλουν τα διασπασθέντα πυρηνικά τμήματα. Στο τελικό στάδιο παρατηρείται διάσπαση του κυττάρου στα καλούμενα "αποπτωτικά σωμάτια". Τα τελευταία ουσιαστικά αποτελούν τμήματα του κυτταροπλάσματος και του διασπασθέντος πυρήνος περιβαλλόμενα από κυτταρική μεμβράνη. Τα αποπτωτικά σωμάτια αποτελούν το τελευταίο μορφολογικό εύρημα στην διαδικασία απόπτωσης, την κάθαρση του οργανισμού εκ των οποίων αναλαμβάνουν γειτονικά κύτταρα με

φαγοκυτταρικές ικανότητες ή ιστικά μακροφάγα<sup>7,8,9</sup>. Ο καταβολισμός των κυτταροπλασματικών και πυρηνικών υπολειμμάτων γίνεται από τα λυσοσωματικά ένζυμα των φαγοκυττάρων.

Οι πρώτες μελέτες σχετικά με τους μοριακούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στο φαινόμενο της απόπτωσης έγιναν σε σωματικά κύτταρα του νηματώδους σκώληκα *Caenorhabditis Elegans*<sup>7,8</sup>. Απεδείχθει ότι η όλη διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου δεν γίνεται με τυχαίο τρόπο, αλλά βρίσκεται κάτω από γονιδιακό έλεγχο. Όσα σωματικά κύτταρα του σκώληκα *C. Elegans* έφεραν τα γονίδια CED-3 και CED-4 ή κάποιες μεταλλάξεις αυτών δεν ξεκινούσαν τις διαδικασίες προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Τα γονίδια αυτά ρυθμίζουν την σύνθεση και λειτουργικότητα ενδοκυττάρων πρωτεασών κυστεΐνης που όπως απεδείχθει αργότερα ανήκουν στην ευρύτερη ομάδα των "κασπασών". Επιπρόσθετα σε μεταγενέστερες έρευνες διεπιστώθει ότι τα γονίδια CED-3 και CED-4 βρίσκονται υπό τον έλεγχο του γονιδίου CED-9. Η δυνατότητα του τελευταίου να σχηματίζει διμερή με τα γονίδια CED-3 και CED-4 ουσιαστικά καθορίζει την πορεία του αποπτωτικού θανάτου μέσω ενεργοποίησης ή αναστολής της ενεργοποίησης των ενδοκυττάρων κασπασών. Η μελέτη και ανάλυση του γονιδίου CED-9 του σκώληκα *C. Elegans* έδειξε σε μεταγενέστερες μελέτες<sup>68-70</sup> ότι είναι ομόλογο του ανθρώπινου γονιδίου *bcl-2*, το οποίο θα αναλυθεί λεπτομερώς στη συνέχεια.

Η απόπτωση αποτελεί, όπως προαναφέρθηκε ανωτέρω, ένα ενεργητικό φαινόμενο, το οποίο είναι εντελώς διαφορετικό από την παθητική διαδικασία που καλείται "*κυτταρική νέκρωση*". Πιο αναλυτικά, η απόπτωση αφορά καταστροφή-λύση μεμονωμένων κυττάρων, ενώ η κυτταρική νέκρωση αφορά

θάνατο ομάδων κυττάρων. Στην περίπτωση της απόπτωσης δεν διαταράσσεται η ακεραιότητα των μεμβρανών, τα δε κύτταρα εμφανίζουν ρίκνωση και τελικώς σχηματισμό αποπτωτικών σωματίων. Αντιθέτως στην κυτταρική νέκρωση επέρχεται αιφνίδια διαταραχή της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης. Ακολουθούν διαταραχές στη διακίνηση νερού και ηλεκτρολυτών με συνέπεια εμφάνιση ωσμωτικών διαταραχών στο εσωτερικό των κυττάρων και διόγκωση αυτών. Οι κυτταροπλασματικές ωσμωτικές διαταραχές οδηγούν σε απελευθέρωση των ενδοκυττάρων ενζύμων και λύση-αυτοπεψία των κυττάρων. Κατά την παρατήρηση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο στην περίπτωση της κυτταρικής νέκρωσης διεπιστούται ασαφής άθροιση της πυρηνικής χρωματίνης σε αντίθεση με το πρότυπο της περιφερικής διάταξης και πύκνωσης της χρωματίνης που χαρακτηρίζει την απόπτωση. Ο αποπτωτικός θάνατος απαιτεί την κατανάλωση ενέργειας από το κύτταρο, σχετίζεται με μεταγραφή και έκφραση γονιδίων και μη τυχαία διανουκλεοσωματική κλασματοποίηση του DNA. Αντίθετα η κυτταρική νέκρωση, ως παθητικό φαινόμενο, δεν απαιτεί κατανάλωση ενέργειας, δεν συνδυάζεται με μεταγραφή και έκφραση γονιδίων, η δε διάσπαση του πυρηνικού DNA γίνεται με τρόπο εντελώς ακανόνιστο και τυχαίο<sup>8,66,67</sup>.

Η επέλευση του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου εξαρτάται από την δυναμική σχέση και ισορροπία ανάμεσα στους αποπτωτικούς και αντιαποπτωτικούς παράγοντες, η σύνθεση και έκφραση των οποίων βρίσκεται κάτω από γονιδιακή ρύθμιση. Η επικράτηση των παραγόντων προαγωγής είτε καταστολής του κυτταρικού θανάτου σχετίζεται τόσο με τους ενδογενείς μηχανισμούς ομοίωσης (διαδικασία κυτταρικής γήρανσης) όσο και με την επίδραση ποικίλων εξωγενών παραγόντων (ακτινοβολία , χημειοθεραπευτικοί

παράγοντες, ιογενείς λοιμώξεις, τοξικά μίγματα οξυγόνου κλπ) <sup>11,72,80</sup>. Η έναρξη των μηχανισμών κυτταρικής απόπτωσης ουσιαστικά ενεργοποιεί τις ενδοκυττάριας κασπάσες και λοιπές πρωτεάσες, οι οποίες ξεκινούν την διαδικασία αποδόμησης των κυτταροπλασματικών δομών. Ο ακρογωνιαίος όμως λίθος για την έναρξη της απόπτωσης είναι η ενεργοποίηση της ενδογενούς DNAασης<sup>72,74</sup>, η οποία ξεκινά την διαδικασία διάσπασης του πυρηνικού DNA. Αρχικά γίνεται διάσπαση του DNA σε μεγάλα τμήματα (200-300 kb) και ακολούθως στα τελικά μικρά τμήματα των 200 pb, τα οποία περιβάλλονται μαζί με κυτταροπλασματικά υπολείμματα από τμήματα της κυτταρικής μεμβράνης προς σχηματισμό των αποπτωτικών σωματίων. Η κυτταρική DNAαση βρίσκεται φυσιολογικά αποθηκευμένη μέσα σε κυτταροπλασματικά κοκκία. Η έκλυση της DNAασης και η έναρξη των αποπτωτικών διεργασιών σχετίζεται, σύμφωνα με τις έως τώρα υπάρχουσες ενδείξεις, με την αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ιόντων ασβεστίου. Η αύξηση αυτή οφείλεται είτε σε αυξημένη διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών για το ιόν αυτό είτε σε απελευθέρωση των ενδοκυττάριας αποθεμάτων ασβεστίου. Στο σημείο αυτό, όπως θα αναλυθεί λεπτομερώς στη συνέχεια, επιδρά η αντιαποπτωτική πρωτεΐνη bcl-2 εμποδίζοντας την αύξηση της μεμβρανικής διαπερατότητας για το ασβέστιο και την επακόλουθη αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης αυτού. Ένα άλλο σημαντικό σημείο στην διαδικασία της απόπτωσης είναι η απώλεια της ασυμμετρίας στη διάταξη των φωσφολιπιδίων στην κυτταρική μεμβράνη, γεγονός που επιτρέπει την αναγνώριση των αποπτωτικών σωματίων από τα φαγοκύτταρα του οργανισμού και την κινητοποίηση των μηχανισμών φαγοκυττάρωσης και πέψης αυτών.



Ένας από τους πλέον σημαντικούς αντιαποπτωτικούς παράγοντες είναι η πρωτεΐνη bcl-2, η οποία εντοπίζεται κυρίως στην μεμβράνη των μιτοχονδρίων, αλλά ενίοτε και σε άλλες ενδοπλασματικές μεμβράνες. Η παραγωγή τόσο της bcl-2 όσο και άλλων πρωτεϊνών της ίδιας οικογένειας που είτε δρουν συνεργικά (Bcl-Xl) είτε την ανταγωνίζονται λειτουργικά (Bax) βρίσκεται κάτω από γονιδιακό έλεγχο. Το γονίδιο της bcl-2 μελετήθηκε αρχικά σε περιπτώσεις λεμφωμάτων και λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας<sup>68,69</sup> όπου διεπιστώθει ότι παρουσιάζει υπερέκφραση πιθανώς σχετιζόμενη με την παθογένεια και εξέλιξη των συγκεκριμένων νοσημάτων.

Πριν την ανάλυση της οικογένειας των γονιδίων και πρωτεϊνών bcl-2 θα γίνει μια σύντομη αναφορά σε άλλους μελετημένους έως σήμερα παράγοντες που σχετίζονται με την απόπτωση, συγκεκριμένα των παραγόντων Myc, Max, Mad, Fas/apo-1 και p53.

Το Myc αποτελεί ένα ογκογονίδιο, του οποίου η συμμετοχή στους αποπτωτικούς μηχανισμούς είναι εμφανής μόνον επί περιπτώσεων ταχέως κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η ρύθμιση της δράσης του γονιδίου Myc εξαρτάται από δύο γονίδια συγγενούς οικογένειας, τα Max και Mad, τα οποία συνδέονται με το Myc προς σχηματισμό ετεροδιμερών. Η δημιουργία διμερών δεν παρουσιάζει ενδιαφέρον, όταν το κύτταρο βρίσκεται σε κατάσταση ηρεμίας, διότι τότε οι ποσότητες του υπάρχοντος Myc στο κύτταρο είναι ελάχιστες και μη ανιχνεύσιμες. Όταν όμως το κύτταρο βρεθεί σε φάση έντονου κυτταρικού πολλαπλασιασμού, συνεπεία ποικίλων μιτογόνων παραγόντων, επέρχεται ταχύτατη αύξηση των ενδοκυττάρων συγκεντρώσεων του Myc και σχηματισμός διμερών με το Max, του οποίου σημειωτέον οι συγκεντρώσεις δεν παρουσιάζουν ουσιώδεις διαφοροποιήσεις μεταξύ κατάστασης ηρεμίας και

πολλαπλασιασμού του κυττάρου. Η ενδοκυττάρια αύξηση της συγκεντρώσεως του Myc σε καταστάσεις έντονου κυτταρικού πολλαπλασιασμού οδηγεί σε ταχεία αύξηση των διμερών Myc/Max, τα οποία προκαλούν έναρξη των μηχανισμών απόπτωσης μετριάζοντας έτσι τον έντονο κυτταρικό πολλαπλασιασμό προς όφελος της κυτταρικής ομοιόστασης<sup>83,84</sup>.

Ένας άλλος καλά μελετημένος αποπτωτικός παράγοντας είναι η πρωτεΐνη Fas<sup>13,34,35</sup>, η οποία υπάγεται στην ευρύτερη ομάδα των παραγόντων νέκρωσης των όγκων ( TNF, Tumor necrosis factors). Η πρωτεΐνη Fas εντοπίζεται στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης και ουσιαστικά αποτελεί τον κυτταρικό υποδοχέα μιας άλλης πρωτεΐνης της FasL ( Fas ligant), η οποία παράγεται από τα T λεμφοκύτταρα. Η σύνδεση των παραγόντων Fas και FasL πάνω στην κυτταρική μεμβράνη αποτελεί το σήμα για την έναρξη της κυτταρικής απόπτωσης.

Ένας άλλος ρυθμιστικός παράγοντας της απόπτωσης είναι το ογκογονίδιο p53<sup>85,86,87</sup>. Το γονίδιο αυτό ρυθμίζει την παραγωγή πρωτεϊνών, οι οποίες είναι απαραίτητες για την επιδιόρθωση του κυτταρικού DNA σε περιπτώσεις αλλοιώσεων και βλαβών αυτού συνεπεία ποικίλων ενδογενών ή εξωγενών παραγόντων ( ακτινοβολία, κυτταροτοξικά φάρμακα κλπ). Το p53 πέρα από την προαναφερθείσα κύρια αποστολή συμμετέχει κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες στους μηχανισμούς κυτταρικής διαίρεσης και απόπτωσης. Σε περιπτώσεις εμφάνισης δομικών διαταραχών του πυρηνικού DNA επέρχεται υπερέκφραση του p53. Με τον τρόπο αυτό επέρχεται στάση στον κυτταρικό κύκλο σε φάση G1 ή G2 και δίδεται χρόνος στους ενδοκυττάριους ενζυμικούς μηχανισμούς να επιδιορθώσουν τις βλάβες του DNA, ώστε το κύτταρο να μπορέσει να συνεχίσει κανονικά την λειτουργική του αποστολή. Το σταμάτημα

του κυτταρικού κύκλου που αναφέρθηκε γίνεται από την πρωτεΐνη p21 η παραγωγή της οποίας ακολουθεί την γονιδιακή υπερέκφραση του p53. Σε περίπτωση που η βλάβη στη δομή του DNA είναι μη επιδιορθώσιμη η αποστολή του p 53 αλλάζει και το συγκεκριμένο γονίδιο προάγει τον αποπτωτικό θάνατο του συγκεκριμένου κυττάρου. Η απόπτωση στην περίπτωση αυτή θεωρείται απαραίτητη για διατήρηση της ομοιόστασης, αφού το συγκεκριμένο κύτταρο λόγω της βλάβης στο γεννητικό του υλικό αδυνατεί να ανταπεξέλθει στην λειτουργική του αποστολή. Πέρα όμως από τα βραχυπρόθεσμα οφέλη η απόπτωση και εξαφάνιση του δεδομένου κυττάρου αποτρέπει την πιθανότητα εμφάνισης μεταλλάξεων σε νέα κύτταρα που θα προκύψουν μετά την αντιγραφή του αλλοιωμένου DNA. Στην συγκεκριμένη περίπτωση διαφαίνεται μια διαδικασία "φυσικής επιλογής", η οποία απαλλάσσει τον οργανισμό από μη λειτουργικά αλλά και μελλοντικά επικίνδυνα (λόγω μεταλλάξεων) κύτταρα.

Η εργαστηριακή ανίχνευση του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου γίνεται με την εφαρμογή διάφορων τεχνικών, μεταξύ των οποίων οι συχνότερα εφαρμοζόμενες είναι οι ακόλουθες: ηλεκτροφόρηση DNA, τεχνικές *in situ* σήμανσης των αποπτωτικών σωματίων με μεθόδους υβριδισμού, ανίχνευση ασυμμετρίας των φωσφολιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών με την μέθοδο της αννεξίνης V, ανοσοϊστοχημικός προσδιορισμός αποπτωτικών ( Fas, Bax, p53 κλπ.) και αντιαποπτωτικών (bcl-2, CED-9) παραγόντων με χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων.

Με την τεχνική της *ηλεκτροφόρησης του DNA*, το διεσπασθέν DNA του ιστού που εμφανίζει απόπτωση απομονώνεται σε γέλη αγαρόζης και δίδει

χαρακτηριστική εικόνα λόγω της ύπαρξης πολλαπλών μικρών διανουκλεοσωματικών τμημάτων DNA.

Η τεχνική της *in situ* σήμανσης των αποπτωτικών κυττάρων<sup>73,74,78,79</sup> βασίζεται στην σύνδεση των 3'-OH άκρων των διανουκλεοσωματικών κλασμάτων του DNA με σημασμένα νουκλεοτίδια. Διακρίνονται δύο μέθοδοι ανάλογα με το είδος του χρησιμοποιούμενου ενζύμου για την επίτευξη της ανωτέρω διαδικασίας. Η πρώτη είναι η μέθοδος TUNEL (Terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated d-UTP nick end labeling), η οποία χρησιμοποιεί το ένζυμο τελική δεοξυνουκλεοδική τρανφεράση (TdT) και οδηγεί σε ενσωμάτωση σημασμένων νουκλεοτιδίων στα 3'-OH άκρα των τμημάτων του DNA. Η δεύτερη μέθοδος γνωστή ως ISEL (in situ end labeling) χρησιμοποιεί το ένζυμο DNA πολυμεράση 1 για την ενσωμάτωση σημασμένων νουκλεοτιδίων στα 3'-OH άκρα των τμημάτων του DNA. Η σύγκριση των δύο μεθόδων από πλευράς ευαισθησίας και ειδικότητας δίνει σαφές προβάδισμα στην μέθοδο TUNEL. Η συνοπτική περιγραφή των σταδίων των ανωτέρω τεχνικών περιλαμβάνει : αρχική ενυδάτωση και αποπαραφίνωση των ιστικών δομών, επεξεργασία με πρωτεΐνάση K, προσθήκη διαλύματος H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> για ανάλωση της δραστηριότητας της ενδογενούς υπεροξειδάσης, επώαση των παρασκευασμάτων για μία ώρα στους 37 βαθμούς Κελσίου με διάλυμα που περιέχει το εξωγενές ένζυμο ( Tdt ή DNA πολυμεράση) και δεοξυνουκλεοτίδια, d UTP σημασμένα με βιοτίνη,διγοξυγενίνη ή φθορίζουσα χρωστική.Το τελευταίο στάδιο της τεχνικής αυτής περιλαμβάνει την έκπλυση των παρασκευασμάτων με ρυθμιστικό διάλυμα και την ανίχνευση των σημασμένων νουκλεοτιδίων με ειδική τεχνική (στρεπταβιδίνη, αλκαλική φωσφατάση ή φθορίζουσα μικροσκόπηση).

Η απλή παρατήρηση των ιστικών ή κυτταρικών παρασκευασμάτων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο για την ανίχνευση των γνωστών της απόπτωσης μεταβολών στην μορφολογία του πυρήνα (περιφερική διάταξη και πύκνωση της χρωματίνης) δεν παρέχει πλήρη ακρίβεια στον προσδιορισμό της απόπτωσης για τους εξής λόγους: 1) υπάρχει δυσκολία στη διάκριση των αποπτωτικών κυττάρων με κριτήριο την περιφερική διάταξη και πύκνωση της χρωματίνης, διότι το ίδιο εύρημα μπορεί να υπάρχει κατά την τελόφαση επί ζώντων κυττάρων, 2) η εμφάνιση των αλλαγών στην χρωματίνη επηρεάζεται σημαντικά από τον τρόπο επεξεργασίας του ιστικού δείγματος και γ) η φάση πύκνωσης της χρωματίνης καταλαμβάνει μικρό χρονικό διάστημα (περίπου 3-5 λεπτά) στο σύνολο της διάρκειας της διαδικασίας απόπτωσης (3-4 ώρες) οπότε μπορεί εύκολα να διαλάθει της προσοχής οδηγώντας σε υποεκτίμηση του ποσοστού απόπτωσης.

Η μέθοδος της αννεξίνης V<sup>65</sup> βασίζεται σε δύο γνωρίσματα της κυτταρικής μεμβράνης των αποπτωτικών κυττάρων, την ασυμμετρία στην διάταξη των φωσφολιπιδίων και στην παρουσία φωσφατιδυλσερίνης εντός της κυτταρικής μεμβράνης. Η ουσία αννεξίνη V αφού προηγουμένα σημανθεί με φθορίζουσα χρωστική έχει την ιδιότητα να συνδέεται με την φωσφατιδυλσερίνη της κυτταρικής μεμβράνης των αποπτωτικών κυττάρων. Η ακόλουθη παρατήρηση του παρασκευάσματος σε μικροσκόπιο φθορίζοντος φωτισμού επιτρέπει την διάκριση και ταυτοποίηση των αποπτωτικών κυττάρων.

Οι ανοσοϊστοχημικοί μέθοδοι ανίχνευσης αποπτωτικών ή αντιαποπτωτικών παραγόντων που εντοπίζονται είτε στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης (όπως το Fas) είτε στο κυτταρόπλασμα (όπως η bcl-2) αναλύονται διεξοδικά στο ειδικό μέρος, αφού αποτελούν τις μεθόδους που

εφαρμόσθηκαν στην μελέτη μας. Συνοπτικά μόνον αναφέρεται ότι γίνονται με χρήση της μεθόδου της αλκαλικής φωσφατάσης και ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι του παράγοντος που θέλουμε να ανιχνεύσουμε.

Η απόπτωση εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία πολλών νοσημάτων, όπως τα κακοήθη νοσήματα, οι αυτοάνοσες παθήσεις, διάφορες ιογενείς λοιμώξεις, εκφυλιστικά νοσήματα του νευρικού ιστού, AIDS και μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα.

Στην περίπτωση των νεοπλασματικών νοσημάτων<sup>60,63,72</sup> θεωρείται ότι η ανεξέλεγκτη αύξηση του όγκου οφείλεται σε συνδυασμό τόσο του αυξημένου πολλαπλασιασμού, όσο και της μείωσης του ρυθμού απόπτωσης. Υπάρχουν μάλιστα και ερευνητικές εργασίες, όπως του Folkman<sup>91</sup> που διαπιστώνουν ότι ο ρόλος της αναστολής της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων είναι σημαντικότερος από την αύξηση του πολλαπλασιασμού αυτών. Σύμφωνα με τα υπάρχοντα δεδομένα η καρκινογένεση οφείλεται σε σταδιακή συσσώρευση μεταλλάξεων σε κρίσιμα για την επιβίωση του κυττάρου γονίδια. Όταν μια μετάλλαξη δεν μπορεί να επιδιορθωθεί, το κύτταρο ενεργοποιεί τους μηχανισμούς αυτοκαταστροφής του, ώστε να εμποδίσει την μετάδοση γονιδιακών διαταραχών σε θυγατρικά κύτταρα. Σε περίπτωση όμως αναστολής της διαδικασίας προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου καθίσταται δυνατή η επιβίωση κυττάρων με σταδιακά συσσωρευόμενες γονιδιακές ανωμαλίες που τελικώς δίδουν γένεση σε κακοήθεις κυτταρικούς κλώνους<sup>63,160</sup>. Τα νεοπλασματικά κύτταρα αναπτύσσουν μηχανισμούς αντίστασης στον αποπτωτικό θάνατο τόσο στις θέσεις της πρωτοπαθούς τους εντόπισης όσο και στις μεταστατικές εστίες. Κύριος εκφραστής αυτής της

αντίστασης είναι η αντιαποπτωτική πρωτεΐνη bcl-2, η οποία διεπιστώθει ότι υπερέκφράζεται επί διαφόρων κακοήθων όγκων<sup>71,75,77</sup>.

Οι αποπτωτικοί μηχανισμοί εμπλέκονται σημαντικά και σε περιπτώσεις ιογενών λοιμώξεων<sup>88,89</sup>. Οι κυριότερες μελέτες αφορούν περιπτώσεις λοιμώξεων με ιούς έρπητος και αδενοϊούς. Ο ιός, όπως είναι γνωστό, προσπαθεί να διακόψει την φυσιολογική πρωτεϊνοσύνθεση του κυττάρου ξενιστή, προκειμένου να χρησιμοποιήσει τα κυτταρικά ενζυμικά συστήματα αποκλειστικά για τον δικό του πολλαπλασιασμό. Το κύτταρο αντιλαμβανόμενο τον κίνδυνο ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού του ιού ενεργοποιεί τους μηχανισμούς απόπτωσης και αυτοκαταστροφής του προκειμένου να προστατέψει λοιπά κύτταρα του ιστού όπου ανήκει από τον εξωγενή εισβολέα. Διάφοροι ιοί, όπως οι αδενοϊοί και ερπητοϊοί, προκειμένου να αποφύγουν την καταστροφή τους μαζί με το αποπτωτικό κύτταρο ξενιστή, αναπτύσσουν μηχανισμούς αναστολής της κυτταρικής απόπτωσης μέσω ενεργοποίησης και υπερέκφρασης της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης bcl-2. Στην περίπτωση του συνδρόμου επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας ο ιός HIV προκαλεί μείωση του αριθμού των CD4 βοηθητικών T λεμφοκυττάρων που σε σημαντικό βαθμό οφείλεται σε αύξηση του ρυθμού απόπτωσης αυτών. Ο πιθανός μηχανισμός της διαταραχής αυτής είναι η υπερέκφραση του αποπτωτικού παράγοντος Fas και η επακόλουθη αύξηση του ρυθμού απόπτωσης.

Στις περιπτώσεις νευροεκφυλιστικών νοσημάτων (νόσος Parkinson, νόσος Alzheimer, πλάγια μυατροφική σκλήρυνση)<sup>81</sup> θεωρείται ότι ποικίλοι παράγοντες όπως νευροδιαβιβαστές, διαταραχές μιτοχονδριακής δομής, οξειδωτικό stress προκαλούν παθολογική αύξηση του ρυθμού απόπτωσης

των νευρικών κυττάρων. Αντιθέτως η υπερέκφραση της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης bcl-2, μετά από φαρμακευτική αγωγή ή εξαιτίας μη καθορισμένων ιδιοσυστασιακών λόγων, συνδυάζεται με ευνοϊκότερη πορεία και έκβαση των νοσημάτων αυτών.

### **ΑΝΤΙΑΠΟΠΤΩΤΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ bcl-2**

Η πρωτεΐνη bcl-2 αποτελεί έναν από τους σπουδαιότερους και περισσότερο μελετημένους παράγοντες της ρύθμισης του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου. Σύμφωνα με τα υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα η αποστολή της bcl-2 είναι η αναστολή της απόπτωσης και η παράταση της επιβίωσης των κυττάρων <sup>14,15,49</sup>.

Όπως αναφέρθηκε ανωτέρω η αλληλουχία του ανθρώπινου γονιδίου bcl-2 (υπεύθυνου για την σύνθεση της ομόνυμης πρωτεΐνης) ανευρέθη αρχικά στο γενετικό υλικό του σκώληκα *C. Elegans* <sup>7,8</sup>, όπου έφερε την ονομασία γονίδιο CED-9.

Ο προσδιορισμός της πρωτεΐνης bcl-2 σε ανθρώπινα κύτταρα έγινε αρχικά σε περιπτώσεις λεμφωμάτων <sup>68,70</sup>. Συγκεκριμένα διεπιστώθει υπερέκφραση της bcl-2 στο 85% των θυλακιωδών(follicular) λεμφωμάτων και στο 20% των B- λεμφωμάτων τα οποία έφεραν την χαρακτηριστική χρωματοσωματική διαμετάθεση t ( 14; 18).

Η μελέτες της επίδρασης της bcl-2, πέρα των αρχικών πειραμάτων του παρεμφερούς γονιδίου CED-9 στο *C. Elegans*, έγιναν με πειράματα



υβριδισμού σε πειραματόζωα (ποντίκια). Ανευρέθη ότι η υπερέκφραση της bcl-2 επί των B- λεμφοκυττάρων οδηγεί στην ανάπτυξη λεμφοζιδιακής υπερπλασίας, η οποία ενίοτε εξελίσσεται σε υψηλής κακοήθειας μονοκλωνικό λέμφωμα <sup>70,71,81</sup>. Όταν η υπερέκφραση αφορούσε τα T-λεμφοκύτταρα περίπου το ένα τρίτον των πειραματοζώων ανέπτυξε περιφερικά T λεμφώματα. Το γεγονός βέβαια ότι δεν εξελίσσονται όλες οι υπερπλασίες σε κακοήθεια και στις περιπτώσεις που τελικώς αυτό γίνεται μεσολαβεί μακρά λανθάνουσα περίοδος, σημαίνει πιθανότατα ότι πλην της bcl-2 πρέπει να συμμετέχουν και άλλοι ογκογόνοι παράγοντες προκειμένου να γίνει κακοήθης εξαλλαγή. Ένας τέτοιος παράγοντας είναι το ογκογονίδιο Myc που αναφέρθηκε σε προηγούμενο σημείο <sup>11,76</sup>. Τα πειράματα αυτά καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η διαταραχή των φυσιολογικών μηχανισμών απόπτωσης στο λεμφικό ιστό με υπερέκφραση αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών, συνεπεία χρωμοσωματικών διαμεταθέσεων, οδηγούν σε διαταραχές του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και ογκογένεση.

Άλλα ενδιαφέροντα πειραματικά δεδομένα για τον ρόλο της bcl-2 προέρχονται από προσβολή κυτταροκαλλιιεργειών από ιούς <sup>32,82,88</sup>. Ο αδενοϊός για παράδειγμα, αναστέλλει την απόπτωση του κυττάρου ξενιστή μέσω έκφρασης της πρωτεΐνης E1B αλλά και υπερέκφρασης της bcl-2. Αμφότεροι οι προαναφερθέντες παράγοντες επιτυγχάνουν τον στόχο τους, δηλαδή την παράταση της ζωής του κυττάρου, εξουδετερώνοντας το ειδικό αποπτωτικό γονίδιο του ιού E1A αλλά και τον αποπτωτικό παράγοντα p53 του κυττάρου ξενιστή.

Σε ότι αφορά την δομική σύνθεση της bcl-2, έχει αποδειχθεί ότι πρόκειται για πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 25 kd. Μελέτες ανοσοϊστοχημείας και

ανοσοφθορισμού έδειξαν ότι η bcl-2 εντοπίζεται στον ενδοκυττάριο χώρο. Συγκεκριμένα ανευρίσκεται κατά κύριο λόγο στην μεμβράνη των μιτοχονδρίων και σπανιότερα στις μεμβράνες του λείου ενδοπλασματικού δικτύου και στην πυρηνική μεμβράνη. Όπως προκύπτει από μελέτες μιτοχονδρίων *in vitro*, το πολυπεπτιδίο της bcl-2 είναι προσκολλημένο με το καρβοξυτελικό του άκρο στην εξωτερική επιφάνεια του μιτοχονδρίου. Με τον τρόπο αυτό το μεγαλύτερο μέρος του πολυπεπτιδίου της bcl-2 βρίσκεται ελεύθερο εντός του κυτταροπλάσματος δυνάμενο έτσι ευχερώς να αλληλεπιδρά με πρωτεάσες και άλλα ένζυμα του κυτταροπλάσματος. Μετακίνηση της πρωτεΐνης bcl-2 στην εσωτερική πλευρά της μιτοχονδριακής μεμβράνης, μέσω σύνδεσης με την ειδική μεμβρανική πρωτεΐνη Map 70p, προκαλεί σχεδόν πλήρη εξαφάνιση της ικανότητας της bcl-2 να αναστέλλει την απόπτωση. Από όλα αυτά γίνεται κατανοητό ότι η σωστή λειτουργία της bcl-2 δεν απαιτεί μόνον ακεραιότητα του δομικού της μορίου, αλλά επίσης κατάλληλη θέση αυτού στην επιφάνεια της μιτοχονδριακής μεμβράνης και σπανιότερα και άλλων ενδοπλασματικών μεμβρανών <sup>14,15,49,60</sup>.

Ο μηχανισμός δράσης της bcl-2 παραμένει σε πολλά σημεία του αδιευκρίνιστος, η δε επικρατέστερη θεωρία είναι εκείνη της επίδρασης της bcl-2 στην ενδοκυττάρια ομοιόσταση των ιόντων ασβεστίου <sup>14,16</sup>. Έχει αποδειχθεί ότι η αύξηση της συγκεντρώσεως του ασβεστίου εντός του μιτοχονδρίου προκαλεί απελευθέρωση του κυτοχρώματος C, το οποίο εντοπίζεται φυσιολογικά εντός της μιτοχονδριακής μεμβράνης, μέσα στο κυτταρόπλασμα. Η απελευθέρωση του κυτοχρώματος C αποτελεί μήνυμα για την έναρξη των κυτταρικών αποπτωτικών διεργασιών. Επιπρόσθετα το αυξημένο ασβέστιο προάγει την απόπτωση και με άλλους τρόπους, συγκεκριμένα με την

ενεργοποίηση του συστήματος των ενδοκυττάρων κασπασών<sup>12,14</sup> καθώς και της ενδογενούς DNAασης. Η τελευταία αποτελεί καθοριστικό παράγοντα έναρξης της απόπτωσης, καθότι διασπά το πυρηνικό DNA σε μικρότερα τμήματα, οδηγώντας στα αρχικά μορφολειτουργικά χαρακτηριστικά του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου<sup>8,13</sup>. Η bcl-2 μπορεί να αναστείλει τις διαδικασίες έναρξης του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου εμποδίζοντας την αύξηση του ενδοκυττάρου ασβεστίου. Το τελευταίο επιτυγχάνεται, σύμφωνα με τις υπάρχουσες ενδείξεις, μέσω αναστολής διέλευσης του ασβεστίου διαμέσου των ενδοπλασματικών μεμβρανών.

Μια άλλη, όχι όμως εξίσου αποδεκτή θεωρία σχετικά με τον μηχανισμό δράσης της bcl-2, αναφέρεται στην δυνατότητα αυτής να αναστέλλει την απόπτωση που οφείλεται σε οξειδωτικό stress<sup>143,155</sup>. Η εξωτερική επιφάνεια της μιτοχονδριακής μεμβράνης, οι μεμβάνες του λείου ενδοπλασματικού δικτύου καθώς και η πυρηνική μεμβράνη αποτελούν θέσεις που άμεσα ή έμμεσα σχετίζονται με την παραγωγή ενεργών παραγώγων του οξυγόνου (ROS, reactive oxygen species). Η εντόπιση της bcl-2 στα συγκεκριμένα αυτά σημεία οδήγησε τους ερευνητές στην αναζήτηση τυχόν σχέσεων μεταξύ απελευθέρωσης ενεργών παραγώγων οξυγόνου και προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Η παρουσία παραγώγων του οξυγόνου, όπως το υπεροξειδίο του οξυγόνου, οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και το t-butyl hydroperoxide σε χαμηλές συγκεντρώσεις προκαλούν ήπιο οξειδωτικό stress, το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή του κυττάρου μέσω ενεργοποίησης των μηχανισμών απόπτωσης. Η bcl-2 μπορεί σε τέτοιες περιπτώσεις να αναστείλλει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Παρόμοια δράση μπορεί να έχουν και άλλοι παράγοντες, όπως η N-

ακετυλοκουστεΐνη, η γλουταθειόνη και η δεσφεριοξαμίνη. Σε περιπτώσεις που παραβλάπτεται η λειτουργία του κύριου ενδοκυττάρου αντιοξειδωτικού συστήματος, δηλαδή της γλουταθειόνης, η bcl-2 μπορεί να αναλάβει ρόλο "προστάτη" του κυττάρου από πιθανό ενδοκυτταριο οξειδωτικό stress. Πιθανός τρόπος δράσης της bcl-2 προτείνεται η αναστολή της οξειδώσεως ενδοκυττάρων λιπιδίων που μπορούν να οδηγήσουν σε οξειδωτικές βλάβες. Άλλες μελέτες <sup>14</sup> βέβαια δεν αποδέχονται την δυνατότητα της bcl-2 να προστατεύει από το οξειδωτικό stress ή ακόμη αμφιβάλλουν για την σημασία και τον ρόλο των ενεργών παραγώγων οξυγόνου στις διαδικασίες έναρξης του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου.

Η εκτενέστερη μελέτη των μηχανισμών απόπτωσης οδήγησε στην ανίχνευση και άλλων μελών της ευρύτερης οικογένειας BCL-2, μερικοί εκ των οποίων μάλιστα δεν αναστέλλουν, αλλά αντίθετα προάγουν την κυτταρική απόπτωση. Έτσι η οικογένεια των πρωτεϊνών BCL-2 διαχωρίσθηκε σε παράγοντες που αναστέλλουν την απόπτωση (death repressors) που είναι οι παράγοντες bcl-2, bcl-XI, E1B-19K, CED-9 και σε παράγοντες που προάγουν τον κυτταρικό θάνατο (death promoters) που είναι οι παράγοντες Bax, BCL-XS, BAK, BAD.

Μερικοί εκ των παραγόντων αυτών δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς και πιθανότατα έχουν μικρό ή ενίοτε βοηθητικό ρόλο στις αποπτωτικές διεργασίες. Τη δεύτερη θέση από πλευράς σπουδαιότητας μετά την αντιαποπτωτική πρωτεΐνη bcl-2 ( και τον αντίστοιχο παράγοντα CED-9 στο *C. Elegans*) έχει πιθανότατα ο παράγοντας Bax, ο οποίος προάγει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο.

Οι μελέτες σχετικά με τη δομή και λειτουργία της πρωτεΐνης bcl-2 ξεκίνησαν ήδη από το 1980 με αποτέλεσμα το σημερινό γνωστικό πεδίο για την συγκεκριμένη πρωτεΐνη να είναι ευρύ. Αντίθετα οι έρευνες για τις άλλες πρωτεΐνες της ευρύτερης ομάδος BCL-2 είναι περισσότερο πρόσφατες και τα αποτελέσματά τους, όπως θα εκτεθούν στη συνέχεια, είναι συχνά αντικρουόμενα και όχι ευρέως αποδεκτά.

Η πρωτεΐνη bax<sup>161-165</sup> αποτελεί έναν αποπτωτικό παράγοντα που θεωρείται ότι μπορεί, τουλάχιστον μερικώς, να επηρεάζει τη δράση της πρωτεΐνης bcl-2. Η bax είναι μια πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 21 Kd, η οποία παρουσιάζει δύο ομόλογες ομάδες αμινοξέων με την bcl-2, τις περιοχές BH1 και BH2. Μέσω των περιοχών αυτών η πρωτεΐνη bax σχηματίζει είτε ομοδιμερή με όμοιες πρωτεΐνες είτε ετεροδιμερή με την bcl-2. Όταν η πρωτεΐνη bcl-2 υπερεκφράζεται σε ένα κύτταρο τα μόρια αυτής σχηματίζουν διμερή μεταξύ τους αλλά και με τις υπάρχουσες ποσότητες πρωτεΐνης bax. Με τον τρόπο αυτό αναστέλλεται η απόπτωση και παρατείνεται η ζωή του κυττάρου. Η απουσία έκφρασης της bcl-2 σε ένα κύτταρο, συνεπεία ενδογενών ή εξωγενών παραγόντων, έχει ως αποτέλεσμα οι υπάρχουσες ποσότητες bax να σχηματίζουν μόνον ομοδιμερή μεταξύ τους, προάγοντας έτσι τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο. Η εντόπιση της bax είναι κατά κύριο λόγο στην μιτοχονδριακή μεμβράνη με την οποία συνδέεται με το υδρόφοβο καρβοξυτελικό του άκρο. Η πρωτεΐνη bax σχηματίζει ετεροδιμερή και με άλλες πρωτεΐνες πλην της bcl-2, συγκεκριμένα με τις Bcl-Xl, MCL1 και A1. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι η δράση της είναι ιδιαίτερα σύνθετη και απαιτούνται αρκετές ακόμη έρευνες, ώστε να καθορισθεί πλήρως.

Μια άλλη πρωτεΐνη της οικογένειας BCL-2 είναι η BCL-X, η οποία παρασκευάστηκε από την bcl-2 μετά από πειράματα υβριδισμού σε πειραματόζωα. Η BCL-X<sup>14,162,164</sup> παρουσιάζει στο 44% τις ίδιες αλληλουχίες αμινοξέων με την bcl-2. Διακρίνονται δύο μορφές, η BCL-XI που αποτελεί όπως και η bcl-2 αναστολέα του αποπτωτικού θανάτου και την BCL-Xs, η οποία αποτελεί παράγοντα που προάγει την απόπτωση. Η BCL-XI δύναται να σχηματίσει ετεροδιμερή με τον αποπτωτικό παράγοντα BAK. Ο καθορισμός της σημασίας των δύο μορφών της BCL-X στην ρύθμιση του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου προβλέπεται να αποτελέσει το αντικείμενο έρευνας μελλοντικών μελετών.

Ενδιαφέρουσες είναι τέλος οι παρατηρούμενες φαινοτυπικές ανωμαλίες σε πειραματόζωα<sup>70,75,77,81</sup>, στα οποία με γενετικές μεθόδους εμποδίσθηκε πλήρως η έκφραση της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης bcl-2. Τα πειραματόζωα (ποντίκια) εμφάνισαν πολυκυστικούς νεφρούς και διάταση του πυελοκαλυκτικού τους συστήματος, γεγονός που οδήγησε στην ανάπτυξη νεφρικής ανεπάρκειας σε σύντομο χρονικό διάστημα. Ιστοπαθολογική σύγκριση των νεφρών των εμβρύων πειραματοζώων με τους αντίστοιχους των ζώντων πειραματοζώων που δεν παρουσίαζαν καμία έκφραση της bcl-2 έδειξε στα τελευταία σημαντική μείωση του αριθμού των νεφρώνων και αυξημένη παρουσία αποπτωτικών δεικτών.

Ο λεμφικός ιστός των πειραματόζωων, συγκεκριμένα ο σπλήνας και ο θύμος, δεν παρουσίαζαν εμφανείς διαταραχές κατά την γέννηση των πειραματόζωων με πλήρη έλλειψη bcl-2. Τα θυμοκύτταρα όσο και τα B και T λεμφοκύτταρα εμφάνιζαν αρχικώς φυσιολογική δομή και λειτουργία. Παρόλα αυτά, 4 έως 8 εβδομάδες αργότερα τα όργανα του λεμφικού ιστού

παρουσίαζαν φαινόμενα μαζικής απόπτωσης μη δυνάμενα να διατηρήσουν μια ομοιόσταση στους πληθυσμούς των Β και Τ λεμφοκυττάρων λόγω της έλλειψης bcl-2.

Επιπρόσθετα τα συγκεκριμένα πειραματόζωα εμφάνιζαν σε σύντομο χρονικό διάστημα αποχρωματισμό του δέρματός τους. Το τελευταίο πιθανόν οφειλόταν σε αυξημένους αποπτωτικούς ρυθμούς των μελανοκυττάρων και την ανεπαρκή προστασία αυτών από τα αποπτωτικά σήματα, τα προερχόμενα από τις οξειδωτικές ουσίες που παράγονταν κατά την ενδοκυττάρια σύνθεση της μελανίνης.

Η πλήρης απουσία της πρωτεΐνης BCL-X από τα πειραματόζωα προκαλεί πολύ σοβαρότερες αλλοιώσεις από την έλλειψη bcl-2 και τα γεννούμενα πειραματόζωα είναι θνησιγενή. Συγκεκριμένα παρατηρείται μαζική εμφάνιση αποπτωτικών διεργασιών στον εγκέφαλο και νωτιαίο μυελό που είναι άλλωστε και οι κύριες θέσεις εντόπισης της συγκεκριμένης πρωτεΐνης.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση ότι τα πειραματόζωα με πλήρη έλλειψη της πρωτεΐνης bax δεν παρουσίαζαν διαταραχές στην υγεία τους. Το τελευταίο υποδηλώνει την σαφώς υποδεέστερη και πιθανότατα μόνον βοηθητική συμβολή της πρωτεΐνης bax στους μηχανισμούς ρύθμισης του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου.

Ευρύ θεωρείται το πεδίο έρευνας σχετικά με την κλινική σημασία των ερευνητικών παρατηρήσεων κυτταρικής υπερέκφρασης ή ενίοτε υποέκφρασης της bcl-2 στον άνθρωπο. Οι αρχικές μελέτες της υπερέκφρασης της bcl-2 σε περιπτώσεις θυλακιωδών λεμφωμάτων <sup>14,60</sup> συνεπεία της γνωστής πλέον χρωματοσωμικής διαμετάθεσης t(14,18) αφορούσε 20 συνολικά ασθενείς στους οποίους διεπιστώθει ότι η εμφανιζόμενη

υπερέκφραση της bcl-2 συνδυαζόταν με φτωχή πρόγνωση. Μεταγενέστερες έρευνες όμως, οι οποίες περιελάμβαναν μεγαλύτερο αριθμό ασθενών δεν επιβεβαίωσαν τον αναφερόμενο συσχετισμό. Το σημαντικότερο όμως συμπέρασμα από τις μελέτες αυτές είναι το γεγονός ότι η υπερέκφραση της bcl-2 δεν θεωρείται ικανή από μόνη της να προκαλέσει νεοπλασματική εξαλλαγή του κυττάρου. Πιθανότατα η συμμετοχή της σε μια τέτοια διεργασία είναι μόνον συνεργική ομού μετά άλλων προς το παρόν άγνωστων παραγόντων.

Έκφραση της bcl-2 έχει διαπιστωθεί και σε όγκους μη σχετιζόμενους με τον λεμφικό ιστό<sup>37,71,73,157,158</sup>. Συγκεκριμένα διεπιστώθει ότι σε μερικές περιπτώσεις καρκίνου του μαστού, του προστάτου αλλά και μη μικροκυτταρικού πνευμονικού καρκινώματος παρατηρείται έκφραση της bcl-2. Στις περιπτώσεις μάλιστα των καρκινωμάτων του μαστού η έκφραση της πρωτεΐνης bcl-2 στα καρκινικά κύτταρα συνδυαζόταν με παρουσία σε αυτά υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστερόνης και συνεπώς καλύτερη πρόγνωση.

Ο αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος όμως δεν παριστά μόνον φαινόμενο της φυσιολογικής ομοιόστασης των οργανισμών, αλλά δύναται να προσδιορίσει τον τρόπο θανάτου των καρκινικών κυττάρων όταν αυτά καταπολεμούνται με τα ποικίλα χημειοθεραπευτικά φάρμακα<sup>159</sup>. Γενικότερα είναι αποδεκτό ότι η εμμονή των κυττάρων στην έκφραση της bcl-2 αποτελεί δείκτη ανθεκτικότητας στα χορηγούμενα χημειοθεραπευτικά φάρμακα και πιθανής κακής έκβασης της όλης θεραπείας.

Μια πιθανή προσέγγιση στην αντιμετώπιση του καρκίνου πιθανόν να είναι η αναστολή της έκφρασης της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης bcl-2 στα καρκινικά



κύτταρα με χρήση μοριακών τεχνικών. Η διαδικασία αυτή πιθανότατα θα οδηγούσε τα καρκινικά κύτταρα στη διαδικασία του αποπτωτικού θανάτου και της καταστροφής τους, αναστέλλοντας τους μηχανισμούς αντίστασης αυτών στην απόπτωση λόγω υπερέκφρασης της bcl-2. Κάτι τέτοιο παρουσιάζει βέβαια αρκετές δυσκολίες, αφενός μεν διότι η bcl-2 αποτελεί μόνον έναν παράγοντα στο σύνθετο φαινόμενο του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου, αφετέρου δε διότι η αναστολή της έκφρασης της bcl-2 θα έπρεπε να περιοριστεί στο καρκινικά κύτταρα και όχι στο γύρω ευρισκόμενα υγιή κύτταρα για τα οποία πιθανώς θα ήταν επιβλαβής<sup>11,37,63,71,73</sup>.

## ***ΙΔΙΟΠΑΘΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΙΝΩΣΗ (ΙΠΙ)***

Η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση, γνωστή και ως κρυπτογενής ινοποιός κυψελιδίτις, συγκαταλέγεται μεταξύ των συνηθέστερων διάχυτων διηθητικών πνευμονοπαθειών. Αποτελεί νόσημα που προσβάλλει αμιγώς τον πνεύμονα, η δε αιτιολογία του παραμένει ακόμη άγνωστη, όπως άλλωστε υποδηλώνει το πρόθεμα "ιδιοπαθής ή κρυπτογενής". Η πρόγνωση του συγκεκριμένου νοσήματος παραμένει ελλείπει ειδικής θεραπείας ιδιαίτερα δυσμενής, με το σύνολο σχεδόν των ασθενών να αποθνήσκει εντός 3 έως 5 ετών από την αρχική διάγνωση<sup>2,17,57</sup>.

Μέχρι πρόσφατα επικρατούσε αρκετή σύγχυση σχετικά με την διάγνωση των διαμέσων πνευμονοπαθειών, με αποτέλεσμα σε μελέτες του παρελθόντος κάτω από τον όρο *ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση* να

περιλαμβάνονται πολλά ετερογενή νοσήματα ( όπως πχ COP, ηωσινοφιλικές πνευμονίες, πνευμονικές ινώσεις απότοκες αυτοάνοσων νοσημάτων κλπ).

Οι πρόσφατα ανακοινωθείσες θέσεις ομοφωνίας της Αμερικανικής και Ευρωπαϊκής Πνευμονολογικής Εταιρείας <sup>17,57</sup> βοηθούν στην διελεύκανση του θολού πεδίου των διαμέσων πνευμονοπαθειών, αποσαφηνίζοντας τα κριτήρια διάγνωσης και το ιστολογικό πρότυπο σε κάθε ένα εκ των νοσημάτων της κατηγορίας αυτής.

Σύμφωνα με την τελευταία αναθεωρημένη παθολογοανατομική ταξινόμηση της Katzenstein <sup>3</sup> η ομάδα των διαμέσων πνευμονοπαθειών περιλαμβάνει τις ακόλουθες νοσολογικές οντότητες: Συνήθης διάμεση πνευμονία ( UIP, usual interstitial pneumonia), μη ειδική διάμεση πνευμονία (NSIP, non specific interstitial pneumonia), οξεία διάμεση πνευμονία (AIP, acute interstitial pneumonia), αποφολιδωτική διάμεση πνευμονία (DIP, desquamative interstitial pneumonia), αποφρακτική βρογχιολίτιδα-διάμεση πνευμονική νόσος (RB/ILD, respiratory bronchiolitis-associated interstitial lung disease), κρυπτογενής οργανούμενη πνευμονία (COP, cryptogenic organizing pneumonia) και λεμφοκυτταρική διάμεση πνευμονία (LIP, lymphocytic interstitial pneumonia).

Σύμφωνα με τα ισχύοντα πλέον κριτήρια, ως ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση ορίζεται η ειδική μορφή της χρόνιας ινοποιού διαμέσου πνευμονίας, της οποίας η ιστολογική εικόνα (όπως θα προκύψει από παρασκευάσμα πνευμονικού ιστού ληφθέν με θωρακοσκοπική ή ανοικτή βιοψία πνεύμονος) είναι εκείνη της συνήθους διαμέσου πνευμονίας (UIP). Επί απουσίας ιστοικού παρασκευάσματος η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση μπορεί να διαγνωσθεί με ικανοποιητική ακρίβεια όταν ο ασθενής πληρεί όλα τα μείζονα και τρία

τουλάχιστον από τα τέσσερα ελάσσονα κριτήρια της νόσου, όπως αυτά καθορίστηκαν από τις πρόσφατες θέσεις ομοφωνίας της Αμερικανικής Πνευμονολογικής Εταιρείας (τα συγκεκριμένα κριτήρια αναλύονται λεπτομερώς στο ειδικό μέρος).

Η νόσος απαντά συχνότερα στους άνδρες και ιδιαίτερα κατά την μέση ηλικία (τα 2/3 των ασθενών είναι ηλικίας άνω των 60 ετών, ενώ κάτω των 40 ετών δεν φαίνεται να έχουν ανακοινωθεί παρά ελάχιστες περιπτώσεις στη διεθνή βιβλιογραφία). Είναι επίσης άγνωστο εάν υπάρχει ανάλογη νοσολογική οντότητα στα παιδιά και αν τελικώς συμβαίνει αυτό είναι ιδιαίτερος σπάνιο<sup>112</sup>.

Η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση δεν φαίνεται να προσβάλλει με αυξημένη συχνότητα κάποια ιδιαίτερη φυλή, αν και τα περισσότερα καταγεγραμμένα περιστατικά αφορούν άτομα της καυκάσιας φυλής..

Τα επιδημιολογικά χαρακτηριστικά της νόσου προέρχονται κυρίως από μελέτες με μικρό αριθμό περιστατικών και συνεπώς δεν είναι παρά μόνον ενδεικτικά της συχνότητας της νόσου<sup>100,101,104</sup>. Ο Former<sup>60</sup> εκτιμά ότι η συχνότητα της νόσου κυμαίνεται από 3 έως 6 περιστατικά ανά 100.000 πληθυσμού. Μελέτη του Coutlas και συν.<sup>1</sup> στο New Mexico αναφέρει μια επίπτωση της τάξης των 20 περιπτώσεων ανά 100.000 πληθυσμού στους άνδρες και 13 περιπτώσεις ανά 100.000 γυναικείου πληθυσμού. Η συχνότητα και επίπτωση της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης παρουσιάζει σημαντική αύξηση με την πάροδο της ηλικίας. Ενδεικτικά, η επίπτωση της νόσου σε άτομα ηλικίας άνω των 75 ετών είναι 250 περιστατικά ανά 100.000 άνδρες και 160 ανά 100.000 γυναίκες ανά έτος.

Η ανάλυση που θα ακολουθήσει θα αφορά κυρίως στοιχεία σχετικά με την παθογένεια και παθοφυσιολογία της νόσου καθώς και ανάλυση των

ευρημάτων του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος, καθότι όλα τα ανωτέρω σχετίζονται με το σκοπό και τα ευρήματα της μελέτης μας.

Σύμφωνα με τα υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα στην παθογένεια της νόσου εμπλέκονται διάφοροι παράγοντες όπως περιβαλλοντικοί, ιογενείς, γενετικοί και ανοσολογικοί. Η θέση εμπλοκής του κάθε ενός εξ αυτών δεν φαίνεται να είναι γνωστή προς το παρόν.

Σχετικά με την καπνιστική συνήθεια τονίζεται το γεγονός ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση είναι καπνιστές, αλλά ο δείκτης πακέτα-έτη(pack-years) δεν φαίνεται να επηρεάζει την συχνότητα με την οποία εμφανίζεται η νόσος.

Η παρατεταμένη έκθεση του ατόμου σε κόνεις μετάλλου, όπως το ασάλι και ο μόλυβδος μπορεί να σχετίζεται με αυξημένη συχνότητα εμφάνισης της νόσου. Παρόμοια αποτελέσματα δύναται να έχει η έκθεση του ατόμου σε περιβάλλον με ρινίσματα ξύλου<sup>102-105</sup>.

Πολλές είναι οι μελέτες που ενοχοποιούν ιούς ως αίτια της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης, χωρίς όμως τελικώς κάποια εξ αυτών να αποδεικνύει κάτι τέτοιο<sup>106,107,109,110</sup>. Οι κυριότερα ενοχοποιούμενοι ιοί είναι οι αδενοϊοί, ο ιός Epstein-Barr και ο ιός της ηπατίτιδος C.

Οι Vergnon και συν.<sup>108</sup> υπέθεσαν ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του ιού Epstein-Barr και ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης διότι ανίχνευσαν στον ορό των ασθενών αντισώματα IgA ενάντια στο αντιγόνο της κάψας του ιού. Παρόλα αυτά το γένωμα του συγκεκριμένου ιού δεν ανευρέθη σε παρασκεύασμα πνευμονικού ιστού ή βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος.

Σχετικά με τον ιό της ηπατίτιδος C μελέτες από τη Ιαπωνία τον συσχετίζουν με την ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση λόγω ανεύρεσης στον ορό των ασθενών

αντισωμάτων έναντι του συγκεκριμένου ιού. Τα δεδομένα όμως των μελετών αυτών δεν επιβεβαιώθηκαν από αντίστοιχες εργασίες στις ΗΠΑ και τη Μεγάλη Βρετανία.

Πρόσφατες ανακοινώσεις των Kuwano και συν<sup>152</sup>. ανέδειξαν την ύπαρξη DNA αδενοϊού E1A σε πνευμονικό ιστό ασθενών με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση ληφθέν με διαβρογχική βιοψία πνεύμονος. Παρόλα αυτά, οι ίδιοι ερευνητές θεωρούν απίθανο το γεγονός ο συγκεκριμένος ιός να σχετίζεται αιτιολογικά με την ΙΠΙ. Μάλιστα επισημαίνουν ότι πρόκειται για λανθάνουσα λοίμωξη από αδενοϊό, η οποία επαναδραστηριοποιείται συνεπεία της πτώσης των ανοσολογικών αμυντικών μηχανισμών από την χορήγηση κορτικοειδών στους ασθενείς αυτούς<sup>109,110</sup>.

Το πιθανό γενετικό υπόστρωμα της ΙΠΙ<sup>112</sup> πιθανολογείται λόγω ύπαρξης οικογενούς μορφής της νόσου με τους ίδιους κλινικούς, ακτινολογικούς και παθολογοανατομικούς χαρακτήρες, αλλά πρωϊμότερη εμφάνιση. Η ανεύρεση ελάττωσης των αντιγόνων HLA-DW3 και αύξηση των HLA-B8, HLA-B12, HLA-B15, HLA-DW6 και HLA-DR12 αποτελούν στοιχεία που χρήζουν περαιτέρω μελέτης στο μέλλον.

Η ανοσολογική αντίδραση, παρά το γεγονός ότι δεν έχει διευκρινισθεί ο πλήρης μηχανισμός αναπτύξεως της, θεωρείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της ΙΠΙ<sup>17,57,60</sup>. Παρόμοιες ανοσολογικές αντιδράσεις παρατηρούνται στα διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα, όπως τα νοσήματα του συνδετικού ιστού, η αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία, η πρωτοπαθής χολική κίρρωση, η χρόνια ενεργός ηπατίτις, η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου, η νόσος Hashimoto, η μασσθένεια Gravis. Επί ΙΠΙ σπάνια απαντώνται τα συστηματικά συμπτώματα των αυτοάνοσων νοσημάτων (πυρετός,

αρθραλγίες,φαινόμενο Raynaud),παρά το γεγονός ότι τα αντιπυρηνικά αντισώματα ανευρίσκονται θετικά σε ποσοστό 7-25%, ο ρευματοειδής παράγοντας σε ποσοστό 15% και οι κρουσφαιρίνες σε ποσοστό 40% περίπου. Επιπρόσθετα αρκετά συχνή είναι η ανεύρεση ανοσοσυμπλεγμάτων στον ορό αλλά και στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα των ασθενών με ΙΠΙ.

Ο μηχανισμός με τον οποίο οι φλεγμονώδεις και ανοσολογικοί παράγοντες προκαλούν τις ιστικές αλλοιώσεις στο πνευμονικό παρέγχυμα παραμένει αμφιλεγόμενος. Ένα όμως από τα σημαντικότερα βήματα στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας της ΙΠΙ αποτέλεσε η αναγνώριση του κεντρικού ρόλου που διαδραματίζει η χρόνια φλεγμονώδης διεργασία (κυψελιδίτις) στην καταστροφή και ακανόνιστη αναπόθεση συνδετικού ιστού στο κατώτερο αναπνευστικό σύστημα<sup>18</sup>. Οι φλεγμονώδεις διεργασίες αφορούν τόσο τα κυψελιδικά τοιχώματα και τον διάμεσο ιστό, όσο και τα αναπνευστικά βρογχιόλια και τους μικρούς αεραγωγούς.

Οι μελέτες που σχετίζονται με την διερεύνηση του προτύπου της φλεγμονής (κυψελιδίτιδος) που λαμβάνει χώρα στην ΙΠΙ ουσιαστικά προσέφεραν τις περισσότερες πληροφορίες στην προσπάθεια κατανόησης των παθοφυσιολογικών δρώμενων επί ΙΠΙ. Οι περισσότερες μελέτες οριοθετούν το πολυμορφοπύρρηνο και σε μικρότερο βαθμό το ηωσινόφιλο σαν κύτταρα "κλειδιά" της φλεγμονώδους κυψελιδίτιδος της ΙΠΙ. Ο ρόλος του μακροφάγου παραμένει αμφιλεγόμενος. Κάποιες παλαιότερες μελέτες που δεν τηρούν τα κριτήρια διάγνωσης της ΙΠΙ, όπως προαναφέρθηκαν, τονίζουν τον ρόλο του λεμφοκυττάρου στην κυψελιδίτιδα πιθανότατα διότι μελετούν ετερογενή νοσήματα υπό τον γενικό τίτλο "πνευμονική ίνωση", χωρίς αυτά να είναι απαραίτητα περιπτώσεις ΙΠΙ με βάση τα σημερινά δεδομένα.

Οι φλεγμονώδεις διεργασίες που λαμβάνουν χώρα σε κυψελιδικό επίπεδο πιθανότατα αποτελούν τον παράγοντα που πρέπει να διερευνηθεί περισσότερο από κάθε άλλον για την ανεύρεση επιτυχούς θεραπείας για την ΙΠΙ. Η φλεγμονή είναι πιθανά αναστρέψιμη αλλοίωση σε αντίθεση με την επακόλουθη εναπόθεση ινώδους συνδετικού ιστού και τις τελικές πνευμονικές βλάβες (πνεύμων εν ηδη μελικηρύθρας) που είναι μόνιμες και μη αντιστρεπτές αλλοιώσεις, καθορίζουν όμως την φυσική πορεία της νόσου σε αναπνευστική αναπηρία και ακολούθως θάνατο<sup>18,113,114,116,123,134</sup>.

Η παρουσία μετρίως αυξημένου αριθμού ηωσινοφίλων στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα των ασθενών με ΙΠΙ αποτελεί ένα δεύτερο και μικρότερης σημασίας εύρημα σε σχέση με τον αυξημένο αριθμό πολυμορφοκυττάρων. Τα ηωσινόφιλα κύτταρα είναι ικανά να προκαλέσουν μεγάλες αλλοιώσεις στο πνευμονικό παρέγχυμα μέσω των πρωτεϊνών που εκλύουν, όπως η ηωσινοφιλική κατιονική πρωτεΐνη, αλλά και μια ειδική κολλαγενάση που διασπά το κολλαγόνο τύπου 1 και 3 που αποτελούν κύρια δομικά συστατικά του διάμεσου πνευμονικού ιστού<sup>119,120</sup>.

Η αύξηση του αριθμού των ινοβλαστών στο πνευμονικό παρέγχυμα επί ΙΠΙ οφείλεται σε ποικίλους αυξητικούς παράγοντες που απελευθερώνονται τόσο από τα μακροφάγα, όσο και από τους ίδιους τους ινοβλάστες. Ακόμα και σήμερα παραμένει αμφιλεγόμενο το θέμα του κατά πόσον σε ασθενείς με ΙΠΙ υπάρχει αύξηση της ποσότητας του κολλαγόνου ή μεταβολή της δομής του κολλαγόνου τύπου 1 και 3. Σύμφωνα με την πιο πιθανή εκδοχή ο κύριος λόγος της αρχιτεκτονικής αλλοίωσης του πνεύμονος επί ΙΠΙ είναι οι οι αλλαγές στην διάταξη και το πάχος των ινών του κολλαγόνου τύπου 1<sup>124,125,127,132,135</sup>.

Σε πλέον πρόσφατες μελέτες επισημαίνεται ο ρόλος των ανοσοσυμπλεγμάτων που σχηματίζονται μετά από την αρχική αλλοίωση του κυψελιδικού τοιχώματος συνεπεία κάποιου ενδογενούς ή εξωγενούς παράγοντος<sup>18,60</sup>. Τα παραγόμενα ανοσοσυμπλέγματα αποτελούν πιθανόν χημειοτακτικό παράγοντα για τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα. Η παρατεταμένη παρουσία των ανοσοσυμπλεγμάτων στους κυψελιδικούς χώρους φαίνεται ότι αποτελεί έναν μόνον και μάλλον όχι τον μοναδικό παράγοντα ενάρξεως και διαιωνίσεως της φλεγμονής. Το υπεύθυνο αντιγόνο για τον σχηματισμό των ανοσοσυμπλεγμάτων παραμένει προς το παρόν άγνωστο.

### ***Το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα επί ιδιοπαθούς πνευμονικής ινώσεως***

Η αξία του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (BAL) στην σημερινή κλινική πρακτική στην διάγνωση και έρευνα σχετικά με την ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση (ΙΠΙ) καθορίζεται με αρκετή ακρίβεια στις πρόσφατες θέσεις ομοφωνίας της Αμερικανικής Θωρακικής Εταιρείας<sup>17,57</sup>. Ο ενθουσιασμός που επικράτησε όταν πρωτοεισήχθη το BAL στην επεμβατική πνευμονολογία στις αρχές του 1970 δεν υπάρχει πλέον . Αντίθετα, η εμπειρία και τα δεδομένα που προέκυψαν από την εφαρμογή του επί 30 περίπου έτη, έχουν αποσαφηνίσει τις περιπτώσεις των διαμέσων νοσημάτων στις οποίες το BAL είναι διαγνωστικό εργαλείο και εκείνες που αποτελεί μόνον μέσον έρευνας και πειραματικών εργασιών<sup>17,60</sup>.



Σε κάποια εκ των διαμέσων νοσημάτων όπως το ηωσινόφιλο κοκκίωμα, η σαρκοείδωση ή η κυψελιδική πρωτεΐνωση το BAL μπορεί να θέσει την διάγνωση του νοσήματος. Στην περίπτωση όμως της ΙΠΙ είναι πλέον σαφές ότι το BAL δεν είναι αρκετό για την διάγνωση της νόσου, η οποία για να τεθεί με ασφάλεια απαιτεί βιοψία πνεύμονος. Ο βασικός ρόλος του BAL επί ΙΠΙ, όπως καθορίζεται στο τέταρτο εκ των κυρίων κριτηρίων για την διάγνωση της νόσου αυτής (θέσεις ομοφωνίας ATS, ERS), είναι ο αποκλεισμός άλλων νοσημάτων των οποίων η κλινική και ακτινολογική εμφάνιση μοιάζει με την αντίστοιχη της ΙΠΙ<sup>17,57</sup>. Τέτοια νοσήματα μπορεί να είναι οι κακοήθειες(βρογχοκυψελιδικό καρκίνωμα), το ηωσινόφιλο κοκκίωμα, η αμιάντωση, η ηωσινοφιλική πνευμονία, ειδικές λοιμώξεις όπως φυματίωση ή λοιμώξεις σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς.

Ένας δεύτερος ρόλος του BAL επί ΙΠΙ είναι ο ερευνητικός, ο οποίος πιθανότατα θα αποδειχθεί ιδιαίτερα σημαντικός στο μέλλον, αφού όπως έχει αναφερθεί το BAL αποτελεί ουσιαστικά ένα "παράθυρο" για την εκτίμηση των παθοφυσιολογικών διεργασιών και των φλεγμονωδών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στις κυψελίδες.

Το κύτταρο "κλειδί" στην κυψελιδίτιδα της ΙΠΙ είναι το πολυμορφοπύρρηνο του οποίου τόσο ο απόλυτος αριθμός όσο και η σχετική αναλογία εμφανίζεται αυξημένη στο συγκεκριμένο νόσημα<sup>17,22,57,60,115</sup>. Οι έκλυση πρωτεασών και οξειδωτικών παραγόντων από τα πολυμορφοπύρρηνα οδηγεί σε αλλαγές της δομής και αρχιτεκτονικής του πνευμονικού παρεγχύματος. Το 70 έως 90% των ασθενών με ΙΠΙ παρουσιάζει αύξηση του αριθμού των πολυμορφοπυρήνων στο BAL (άνω του 5%).

Ένα άλλο κύτταρο με δευτερεύοντα ρόλο στην παθοφυσιολογία της κυψελιδίτιδος της ΙΠΙ είναι το ηωσινόφιλο. Τα κύτταρα αυτά συνδράμουν στην πρόκληση δομικών αλλοιώσεων στο πνευμονικό παρέγχυμα μέσω των ουσιών που απελευθερώνουν ( ηωσινοφιλική κατιονική πρωτεΐνη, πρωτεάσες κλπ). Τα ηωσινόφιλα βρίσκονται αυξημένα (> 5%) στο 40-60% των ασθενών με ΙΠΙ. Βέβαια δεν παρατηρούνται τα ποσοστά αύξησης των ηωσινοφικών πνευμονιών, όπου αποτελούν τα κύρια κύτταρα της κυψελιδίτιδας, αλλά και στην ΙΠΙ ο ρόλος τους παραμένει επίσης σημαντικός<sup>18,60,119,120</sup>.

Ο αριθμός των λεμφοκυττάρων του BAL είναι αυξημένος μόνον σε ποσοστό 10% των ασθενών με ΙΠΙ και σχεδόν πάντοτε η αύξηση αυτή συνδυάζεται με αύξηση και των πολυμορφοπυρήνων ή/και ηωσινοφίλων. Σε περίπτωση όμως που ανευρεθεί αύξηση μόνον των λεμφοκυττάρων (πράγμα εξαιρετικά σπάνιο για ΙΠΙ) πρέπει να αναζητηθεί άλλη διάγνωση, η δε διενέργεια βιοψίας πνεύμονος καθίσταται μάλλον απαραίτητη<sup>17,117,118</sup>. Εάν υπάρχει ιστολογική επιβεβαίωση της ΙΠΙ (εικόνα UIP), τότε ο ιατρός οφείλει να επανεκτιμήσει το ιστολογικό παρασκεύασμα και αν όντως πρόκειται για UIP οφείλει να σκεφθεί και συνύπαρξη δεύτερου νοσήματος πλην της ΙΠΙ (όπως εξωγενή αλλεργική κυψελιδίτιδα, NSIP, COP, κολλαγονικό νόσημα).

Η κατά καιρούς επιχειρηθείσα συσχέτιση του αριθμού των πολυμορφοπυρήνων, ηωσινοφίλων ή λεμφοκυττάρων του BAL με την πρόγνωση της νόσου ή την πιθανή ανταπόκριση στα κορτικοειδή (συγκεκριμένα θεωρήθηκε ο αυξημένος αριθμός πολυμορφοπυρήνων ή/και ηωσινοφίλων ως κακός προγνωστικός δείκτης , ο δε αυξημένος αριθμός λεμφοκυττάρων σαν δείκτης καλής πρόγνωσης και ευνοϊκής απάντησης στα

κορτικοειδή) δεν φαίνεται να αποτελεί σήμερα θέση ομοφωνίας, καθότι τα αποτελέσματα των ερευνών ήταν αντιφατικά<sup>4,5,31,118</sup>.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα ευρήματα μελέτης των Augusti και συνεργατών<sup>170</sup>, οι οποίοι αναζήτησαν διαφορές στην κυτταρική σύνθεση του BAL όταν γινόταν λήψη αυτού από διάφορους λοβούς με βάση τα ευρήματα της αξονικής θώρακος υψηλής ευκρίνειας (HRCT). Διεπιστώθει σημαντική διαφορά στον απόλυτο και σχετικό αριθμό των πολυμορφοπυρήνων του BAL μεταξύ των διαφόρων λοβών. Το πιο ενδιαφέρον σημείο όμως ήταν ότι η αύξηση του αριθμού των πολυμορφοπυρήνων παρατηρείτο σε πνευμονικά τμήματα που αντιστοιχούσαν σε περιοχές θαμβής υάλου(ground-glass) στην HRCT. Οι περιοχές αυτές αποτελούν τα σημεία που η ειδική κυψελιδίτιδα της ΙΠΙ λαμβάνει την πιο ολοκληρωμένη της μορφή.

## **ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ**

Η σαρκοείδωση αποτελεί χρόνια πολυοργανική νόσο αγνώστου αιτιολογίας, η οποία χαρακτηρίζεται από ιστική βλάβη του πνεύμονος και άλλων ιστών (δέρμα, οφθαλμοί, κεντρικό νευρικό σύστημα κλπ) και σχηματισμό χαρακτηριστικού μη τυροειδοποιούμενου κοκκιώματος εξ επιθηλιοειδών κυττάρων.

Οι κυριότερες κλινικοεργαστηριακές εκδηλώσεις της νόσου σχετίζονται με την προσβολή του αναπνευστικού συστήματος, αν και ουσιαστικά η νόσος

δύναται να προσβάλλει όλα τα συστήματα του ανθρώπινου οργανισμού (με συχνότερη θέση εντόπισης, μετά το αναπνευστικό σύστημα, το δέρμα και τους οφθαλμούς). Η κλινική πορεία της νόσου παρουσιάζει σημαντική ετερογένεια. Αυτόματη ίαση περιγράφεται στα 2/3 περίπου των ασθενών. Η εξελικτική πορεία της νόσου στο εκάστοτε όργανο μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη μη αντιστρεπτών αλλοιώσεων ίνωσης με επακόλουθη ανεπάρκεια του οργάνου. Θανατηφόρες περιπτώσεις σαρκοειδώσεως αναφέρονται σε ποσοστό 1-4% των προσβληθέντων ασθενών<sup>54</sup>.

Προσβάλλει άτομα μικρότερης ηλικίας συγκριτικά με την ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση, συγκεκριμένα τις ηλικίες μεταξύ 20 και 40 ετών. Η ακριβής επίπτωση της νόσου είναι δύσκολο να προσδιορισθεί λόγω των μεγάλων διακυμάνσεων ανάλογα με την γεωγραφική κατανομή, για δε τις ΗΠΑ και τη Μεγάλη Βρετανία φθάνει τα 10 περιστατικά ανά 100.000 πληθυσμού ετησίως<sup>54,56</sup>. Η σαρκοείδωση είναι οκτώ έως δέκα φορές συχνότερη σε άτομα της μαύρης φυλής σε σχέση με την λευκή και επίσης ελαφρώς συχνότερη στον γυναικείο πληθυσμό σε σχέση με τον ανδρικό.

Η νόσος ανάλογα με τα ακτινολογικά της ευρήματα κατατάσσεται σε στάδια (0 έως 4). Πιο συγκεκριμένα: στάδιο 0 επί απουσίας ακτινολογικών ευρημάτων, στάδιο 1 επί παρουσίας πυλαίας και μεσοθωρακικής λεμφαδενοπάθειας χωρίς παρεγχυματική νόσο, στάδιο 2 επί πυλαίας και μεσοθωρακικής λεμφαδενοπάθειας με συνοδά ευρήματα εκ του πνευμονικού παρεγχύματος του τύπου των κυψελιδικών και διαμέσων σκιάσεων, στάδιο 3 επί παρεγχυματικής προσβολής του πνεύμονος χωρίς λεμφαδενοπάθεια και τέλος στάδιο 4 επί εμφάνισης ακτινολογικής εικόνας πνευμονικής ίνωσης.

Η πορεία της νόσου παρουσιάζει σημαντικές διαφοροποιήσεις ανάλογα με το ακτινολογικό στάδιο κατά την διάγνωση. Συγκεκριμένα, επί σταδίου 1 παρατηρείται ύφεση εντός πενταετίας σε ποσοστό 75-80%. Σε νόσο σταδίου 2 50% των ασθενών παρουσιάζει ύφεση εντός πεναετίας, ενώ ποσοστό 25% παραμένει σταθερό και 25% επιδεινούνται. Πλήρης ίαση στο στάδιο 3 παρατηρείται σε ποσοστό 20-40%, ενώ δεν έχει περιγραφεί ίαση σε νόσο σταδίου 4 <sup>54,56,98</sup>.

Το χαρακτηριστικό παθολογοανατομικό εύρημα επί σαρκοειδώσεως είναι το *"επιθηλιοειδές ή ανοσολογικό κοκκίωμα"*. Τα κοκκιώματα ανοσολογικού τύπου ονομάζονται *"επιθηλιοειδή"* διότι το προεξάρχον κύτταρο είναι το επιθηλιοειδές κύτταρο, το οποίο προέρχεται από την σειρά των μονοπύρηνων μακροφάγων. Το κοκκίωμα, πλην των επιθηλιοειδών κυττάρων, περιβάλλεται και από λεμφοκύτταρα και άλλα ώριμα μακροφάγα. Επίσης το σαρκοειδικό κοκκίωμα περιλαμβάνει και γιγαντοκύτταρα, τα οποία προέρχονται από τα μονοπύρηννα μακροφάγα και χαρακτηρίζονται από την παρουσία πολλαπλών πυρήνων στο εσωτερικό τους. Τα κύτταρα που παρεμβάλλονται μεταξύ των επιθηλιοειδών κυττάρων είναι κυρίως βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα, στην δε περιφέρεια του κοκκιώματος μπορεί να ανευρεθούν πρώιμες ινωτικές αλλοιώσεις.

Στο πεδίο της παθοφυσιολογίας και αιτιοπαθογένειας<sup>41-44,47,48</sup> της σαρκοειδώσεως οι περισσότερες μελέτες αναφέρονται στους γενετικούς και ανοσολογικούς παράγοντες που εμπλέκονται στη νόσο. Σχετικά με τους γενετικούς παράγοντες, πρόσφατες μελέτες διαπιστώνουν αυξημένη πυκνότητα αντιγόνων ιστοσυμβατότητας τύπου 2 (DR,DQ,DP) επί των κυψελιδικών μακροφάγων των ασθενών με σαρκοειδωση. Όπως είναι

γνωστό, μια από τις πλέον σημαντικές λειτουργίες του μακροφάγου είναι η "παρουσίαση" αντιγόνων στα λεμφοκύτταρα σε συνδυασμό με μόρια τύπου 2 του συστήματος MHC. Κατά συνέπεια τα ευρήματα που προαναφέρθηκαν πιθανόν να σχετίζονται με την αυξημένη δυνατότητα των κυψελιδικών μακροφάγων επί σαρκοειδώσεως να παρουσιάζουν ένα, προς το παρόν άγνωστο, αντιγόνο στα βοηθητικά T λεμφοκύτταρα προκαλώντας συσσώρευση αυτών στις περιοχές των αλλοιώσεων και έναρξη των φλεγμονωδών διεργασιών<sup>41,47,48</sup>.

Οι ανοσολογικοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στην σαρκοείδωση σίγουρα αποτελούν από τα πιο ενδιαφέροντα σημεία στην παθοφυσιολογία της νόσου. Ήδη από παλαιότερες μελέτες είναι γνωστή η λεμφοκυτταρική κυψελιδίτιδα, με επικράτηση των βοηθητικών T λεμφοκυττάρων που χαρακτηρίζει την σαρκοείδωση<sup>42-44,54,55</sup>. Το κύτταρο όμως, το οποίο "ενορχηστρώνει" τις φλεγμονώδεις διεργασίες επί σαρκοειδώσεως δεν είναι το λεμφοκύτταρο, αλλά το κυψελιδικό μακροφάγο<sup>41</sup>. Ο ρόλος του μακροφάγου είναι καθοριστικός, αφού αποτελεί το κύτταρο που παρουσιάζει το άγνωστο έως τώρα "σαρκοειδικό αντιγόνο" στα λεμφοκύτταρα. Η παρουσίαση του αντιγόνου και η συνοδός απελευθέρωση ιντερλευκίνης 1 από τα κυψελιδικά μακροφάγα προκαλεί συσσώρευση βοηθητικών T λεμφοκυττάρων και επακόλουθη ενεργοποίηση αυτών στο επίπεδο των πνευμονικών κυψελίδων. Το αρχικό χημειοτακτικό "σήμα" των μακροφάγων ενισχύεται από την απελευθέρωση ιντερλευκίνης 2 από τα βοηθητικά T λεμφοκύτταρα που αρχικώς συσσωρεύονται στις κυψελίδες καθώς και από έκφραση υποδοχέων ιντερλευκίνης 2 από άλλους υποπληθυσμούς λεμφοκυττάρων<sup>44,46</sup>. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η μετακίνηση μεγάλου αριθμού ενεργοποιημένων T-

λεμφοκυττάρων στις κυψελίδες. Μια άλλη σημαντική φλεγμονώδης διεργασία αποτελεί η μετακίνηση κυττάρων της μονοκυτταρικής σειράς από τα πνευμονικά αγγεία στον διάμεσο πνευμονικό ιστό και από εκεί στις κυψελίδες. Τα κύτταρα αυτά τελικώς διαφοροποιούνται σε "επιθηλιοειδή" κύτταρα που αποτελούν, όπως προαναφέρθηκε, το κύριο συστατικό των ανοσολογικών σαρκοειδικών κοκκιωμάτων. Ουσίες που πιθανόν σχετίζονται με την διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε επιθηλιοειδή κύτταρα, αλλά και την συνένωση μακροφάγων σε πολυπύρηνους κυτταρικούς σχηματισμούς που καλούνται γιγαντοκύτταρα, είναι η ιντερλευκίνη 1 και η ιντερφερόνη-γ. Άλλες απελευθερούμενες κυττοκίνες που συμβάλλουν με διάφορους τρόπους στην έναρξη και συντήρηση της σαρκοειδικής κυψελιδίτιδος είναι οι ιντερλευκίνες 6 και 8, ο TNF-α(tumor necrosis factor α)<sup>39</sup>, ο αυξητικός παράγοντας 1 και η χημειοτακτική πρωτεΐνη των μονοκυττάρων (MCP-1).

### ***Το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα επί σαρκοειδώσεως***

Το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για την διάγνωση της σαρκοειδωσης αλλά και την κατανόηση των παθοφυσιολογικών μηχανισμών που χαρακτηρίζουν τη νόσο αυτή.

Η σαρκοειδωση μαζί με την εξωγενή αλλεργική κυψελιδίτιδα και την φυματίωση αποτελούν τα νοσήματα που τυπικώς χαρακτηρίζονται από λεμφοκυτταρική κυψελιδίτιδα. Ο ολικός αριθμός κυττάρων στο BAL επί σαρκοειδώσεως ελέγχεται μετρίως αυξημένος ή ενίοτε και φυσιολογικός. Η διαφορά όμως βρίσκεται στον αριθμό των λεμφοκυττάρων του BAL. Έτσι ενώ

στα φυσιολογικά άτομα (μη καπνιστές) τα λεμφοκύτταρα στο BAL αποτελούν μόνον το 5-10% του συνόλου των κυττάρων, στην περίπτωση της σαρκοειδωσης η ποσοστιαία αναλογία τους κυμαίνεται μεταξύ 30-60%.

Ο ολικός όμως αριθμός των λεμφοκυττάρων του BAL παρουσιάζει σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των ασθενών και δεν μπορεί να αποτελέσει διαγνωστικό κριτήριο της σαρκοειδωσης. Αντίθετα ιδιαίτερη σημασία έχει ο τύπος των T λεμφοκυττάρων. Συγκεκριμένα παρατηρείται μια αύξηση των CD4 βοηθητικών λεμφοκυττάρων με αποτέλεσμα μια αύξηση του λόγου CD4/CD8 λεμφοκυττάρων (φυσιολογική τιμή περίπου 1). Το 60% περίπου των ασθενών με σαρκοειδωση παρουσιάζει σχέση CD4/CD8 άνω του 3,5. Σύμφωνα με μελέτες των Costabel και συν. όταν η σχέση CD4/CD8 βρεθεί άνω του 3,5 έχει ειδικότητα 92% και ευαισθησία 53% στην διάγνωση της σαρκοειδωσης. Όσο η σχέση αυτή αυξάνεται η ειδικότητα μεγαλώνει αλλά ταυτόχρονα μειώνεται και η ευαισθησία (λόγος CD4/CD8=10 έχει ειδικότητα 100% αλλά ευαισθησία μόνον 10%)<sup>54,55,94,95</sup>.

Η ανάλυση των υποπληθυσμών λεμφοκυττάρων επί σαρκοειδωσης φανερώνει ότι ο αριθμός των CD57 NK (natural killer cells) δεν παρουσιάζει διαφοροποιήσεις στη νόσο αυτή. Το τελευταίο είναι ενίοτε χρήσιμο στη διαφορική διάγνωση της σαρκοειδωσης από την εξωγενή αλλεργική κυψελιδίτιδα, όπου ο αριθμός των NK κυττάρων είναι αυξημένος.

Η πορεία της νόσου, επί λήψης ή μη θεραπευτικής αγωγής, χαρακτηρίζεται από σχετική μείωση του αριθμού των λεμφοκυττάρων του BAL και ομαλοποίηση της σχέσεως CD4/CD8. Μια μέτρια λεμφοκυττάρωση με φυσιολογικό λόγο CD4/CD8 συχνά ανευρίσκεται σε περιπτώσεις μη ενεργού σαρκοειδωσης<sup>94,95,117</sup>. Η παρουσία ινωτικών αλλοιώσεων στο πνευμονικό



παρέγχυμα προκαλεί μεταβολές στην κυτταρική εικόνα του BAL. Συγκεκριμένα προκαλεί αύξηση των πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων καθιστώντας έτσι την διαφορική διάγνωση με άλλα νοσήματα που προκαλούν πνευμονική ίνωση μη εφικτή, με βάση πάντα τα ευρήματα του BAL.

Οι μελέτες που προσπαθούν να συσχετίσουν τον αριθμό των λεμφοκυττάρων στο BAL με την εξέλιξη της νόσου δεν καταλήγουν σε συμπεράσματα με προγνωστική αξία. Οι Laviolette και συν.<sup>171</sup> μελετώντας 100 περίπου ασθενείς με σαρκοείδωση για διάστημα άνω των 2 ετών διαπίστωσαν ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του αριθμού λεμφοκυττάρων του BAL και της εξέλιξης της νόσου. Αντιφατικά ήταν επίσης τα αποτελέσματα μελετών σχετικά με τον πιθανό συσχετισμό της σχέσης CD4/CD8 με την πορεία της νόσου<sup>98,99</sup>.

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΣΚΟΠΟΣ**

Σκοπός της συγκεκριμένης ερευνητικής εργασίας ήταν η μελέτη της έκφρασης της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης bcl-2 στους επιμέρους κυτταρικούς πληθυσμούς του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος ασθενών με ιδιοπαθή

πνευμονική ίνωση και σαρκοείδωση , δηλαδή των δύο συχνότερων διαμέσων πνευμονοπαθειών. Για την σύγκριση και στατιστική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε ομάδα ελέγχου αποτελούμενη από υγιή άτομα.

Από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας δεν ανευρέθησαν δημοσιευμένες ερευνητικές εργασίες που να μελετούν την έκφραση της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης bcl-2 σε κύτταρα βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (BAL) σε ασθενείς με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση(ΙΠΙ) ή σαρκοείδωση.

Μελέτες σχετικά με την έκφραση της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης bcl-2 καθώς και διαφόρων αποπτωτικών παραγόντων (κύρια του Fas/Fas-ligand) έχουν γίνει σε πνευμονικό ιστό ασθενών με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση(ΙΠΙ). Συγκεκριμένα, σε μελέτη παρασκευάσματος πνευμονικού ιστού ασθενών με ΙΠΙ παρατηρήθηκε έκφραση της bcl-2 επί των μονοκυττάρων της περιφερικής λεμφοζιδιακής ζώνης, ενώ στα ίδια παρασκευάσματα η αποπτωτική πρωτεΐνη Fas εκφραζόταν σε σαφώς ευρύτερο πεδίο (λεία μυικά κύτταρα, επιθηλιακά κύτταρα, μυοινοβλάστες)<sup>33</sup>. Παρόμοια αποτελέσματα, συγκεκριμένα αυξημένη έκφραση του αποπτωτικού παράγοντα Fas σε επιθηλιακά κύτταρα πνευμονικού ιστού επί ΙΠΙ, τα οποία πιθανώς σχετίζονται με ενεργοποίηση ενδοκυττάρων κασπασών, διεπιστούνται και σε άλλη πρόσφατη ερευνητική εργασία<sup>141</sup>.

Μια άλλη ενδιαφέρουσα εργασία<sup>32</sup> προσπαθεί να συσχετίσει τις διαφοροποιήσεις στην έκφραση της bcl-2 σε πνευμονικό ιστό ασθενών με λεμφοκυτταρική διάμεση πνευμονία (LIP) σε σχέση με ιστικά παρασκευάσματα πνευμονικού ιστού ασθενών με ΙΠΙ καθώς και φυσιολογικών ατόμων. Οι συγκεκριμένοι ερευνητές παρατήρησαν σημαντικά

μεγαλύτερη έκφραση της bcl-2 σε πνευμονικό ιστό περιπτώσεων LIP σε σχέση με τις περιπτώσεις UIP και φυσιολογικών παρασκευασμάτων. Το ενδιαφέρον είναι ότι η υπερέκφραση της bcl-2 σε περιπτώσεις LIP συνδυάζεται και με αυξημένη ανίχνευση της πρωτεΐνης LMP1 του ιού Epstein-Barr, κάτι που πιθανόν υποδηλώνει ότι ο συγκεκριμένος ιός προκαλεί εκτροπή των αντιαποπτωτικών μηχανισμών.

Οι υπάρχουσες μελέτες του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου σε βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα αφορούν αποκλειστικά παράγοντες που προάγουν την απόπτωση (Fas, TNFR1 κλπ). Μελέτες σαρκοειδικών ασθενών καταδεικνύουν αυξημένη έκφραση αποπτωτικών παραγόντων (Fas, TNFR1) σε μακροφάγα βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος<sup>36,38,39</sup>. Μελέτη σχετικά με την έκφραση του παράγοντα Fas/Fas-ligand σε ασθενείς με ΙΠΙ, ίνωση απότοκη κολλαγονικών νοσημάτων και κρυπτογενή οργανούμενη πνευμονία(COP) διαπιστώνει αύξηση στην έκφραση της πρωτεΐνης Fas σε όλες τις αναφερθείσες ομάδες, αλλά σε ποσοστό στατιστικά σημαντικό( $p < 0,05$ ) σε σχέση με ομάδα υγιών μαρτύρων μόνον στις περιπτώσεις ίνωσης απότοκης κολλαγονικών νοσημάτων και σε περιπτώσεις COP<sup>140,145</sup>. Παρόμοια αποτελέσματα, συγκεκριμένα αύξηση της έκφρασης της Fas/FasL διεπιστώθει σε άλλες μελέτες με πειραματόζωα μετά από πρόκληση πνευμονικής ίνωσης με ενδοτραχειακή έγχυση μπλεομυκίνης<sup>153</sup>.

Από την ανωτέρω σύντομη βιβλιογραφική ανασκόπηση καταδεικνύεται η έλλειψη δεδομένων σχετικά με τους μηχανισμούς αναστολής του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, οι οποίοι βέβαια είναι εξίσου σημαντικοί με τους μηχανισμούς που προάγουν το συγκεκριμένο φαινόμενο. Τα λίγα υπάρχοντα δεδομένα για την bcl-2 αφορούν κυρίως ασθενείς με

λεμφοκυτταρική διάμεση πνευμονία<sup>32,33</sup> πιθανώς λόγω της στενής σχέσεως της τελευταίας με λεμφώματα και λευχαιμίες που όπως έχει προαναφερθεί αποτελούν τα αρχικά νοσήματα, στα οποία διεπιστώθει η υπερέκφραση της bcl-2.

Η ερευνητική μας εργασία έχει ως απώτερο στόχο της την προσθήκη νέων δεδομένων στην έρευνα του σύνθετου παθοφυσιολογικού φαινομένου που καλείται απόπτωση σε περιπτώσεις των πιο συχνών για τη σημερινή εποχή διάμεσων πνευμονοπαθειών (δηλ. σαρκοείδωσης και ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης). Το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα αποτελεί ιδιαίτερα πρόσφορο πεδίο έρευνας καθότι αποτελεί ένα "παράθυρο" μελέτης της ιδιαίτερης κυψελιδίτιδας για το εκάστοτε διάμεσο νόσημα. Η κυψελιδίτιδα της ΙΠΙ χαρακτηρίζεται από αυξημένη παρουσία πολυμορφοκυττάρων και ηωσινοφίλων. Η ανάδειξη αδυναμίας των κυττάρων αυτών να πραγματοποιήσουν τον φυσιολογικά επερχόμενο ενεργητικό θάνατο-λύση πιθανόν εξηγεί την συνεχιζόμενη παρεγχυματική φλεγμονή και την δυσμενή εξέλιξη που χαρακτηρίζει το νόσημα αυτό. Η σαρκοείδωση δεν αποτελεί βέβαια πρόβλημα υπό την έννοια της δυσμενούς εξέλιξης αφού σε ποσοστό άνω του 70% τελικώς ιάται εντός διαιτίας, αλλά προσφέρει ένα διαφορετικό πρότυπο κυψελιδίτιδας όπου κυρίαρχο κύτταρο είναι το λεμφοκύτταρο με σημαντικό όμως "ενορχηστρωτή" της φλεγμονής το μακροφάγο<sup>41,54</sup>. Η σύγκριση των αντιαποπτωτικών μηχανισμών σε δύο διαφορετικά πρότυπα κυψελιδίτιδος (ΙΠΙ και σαρκοείδωση) πάντα σε σχέση με τα φυσιολογικά δεδομένα (υγιείς μάρτυρες) σίγουρα θα οδηγήσει στην εξαγωγή χρήσιμων συμπερασμάτων.

## ΥΛΙΚΟ

Η ερευνητική μας μελέτη περιλαμβάνει 28 ασθενείς (15 ασθενείς με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση και 13 με πνευμονική σαρκοείδωση), οι οποίοι νοσηλεύτηκαν στην Γ' Πνευμονολογική Κλινική του Σισμανογλείου ΓΠΝΑ κατά την τριετία Φεβρουάριος 1998 - Ιούνιος 2001. Για σύγκριση και στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε ομάδα υγιών μαρτύρων, αποτελούμενη από 10 άτομα (μη καπνιστές, με φυσιολογική ακτινογραφία θώρακος και φυσιολογική σπιρομέτρηση).

### **1) Ασθενείς με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση**

Μελετήθηκαν 15 ασθενείς, συγκεκριμένα 13 άνδρες και 2 γυναίκες με μέση ηλικία τα 68 έτη (εύρος ηλικιών από 57 έως 78 ετών). (Πίνακας 2, σελ. 93)

Η διάγνωση της ΙΠΙ βασίστηκε στα πρόσφατα καθορισθέντα κριτήρια και θέσεις ομοφωνίας της Αμερικανικής Εταιρείας Νοσημάτων Θώρακος<sup>17</sup> : 1) Κλινικά ευρήματα : δύσπνοια κατά την άσκηση, μη παραγωγικός βήχας, 2) Λειτουργικός έλεγχος αναπνευστικού : περιοριστική συνδρομή, μειωμένη διαχυτική ικανότητα (DLCO) και μειωμένη PO<sub>2</sub> ή αυξημένη κυψελιδοαρτηριακή διαφορά οξυγόνου κατά την ηρεμία ή μετά από άσκηση, 3) Απεικονιστικός έλεγχος : συμβατά ευρήματα στην αξονική τομογραφία θώρακος υψηλής ευκρίνειας (HRCT): δικτυοζιδιακού τύπου σκιάσεις με χαρακτηριστική υποϋπεζοκωτική κατανομή, βρογχεκτασίες εξ έλξεως, εικόνα

μεληκυρήθρας, 4) Ευρήματα εκ του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος : αυξημένος αριθμός πολυμορφοπυρήνων με ή χωρίς συνοδό αύξηση των ηωσινοφίλων.

Από την μελέτη εξαιρέθηκαν ασθενείς με γνωστό ιστορικό έκθεσης σε οργανικές ή ανόργανες κόνεις και λήψης φαρμακευτικών ουσιών που σχετίζονται με πρόκληση πνευμονικής ινώσεως. Επίσης δεν συμπεριελήφθησαν ασθενείς που κατά την διάρκεια του διαγνωστικού ελέγχου διεπιστώθει ότι η πνευμονική ίνωση ήταν απότοκη νοσήματος του συνδετικού ιστού, καθώς και άτομα που ελάμβαναν κορτικοειδή ( λόγω της βιβλιογραφικά τεκμηριωμένης επίπτωσης αυτών στην απόπτωση<sup>59</sup>).

Σε 5 εκ των 15 ασθενών η διάγνωση της ΙΠΙ, πλην των συμβατών κλινικοεργαστηριακών ευρημάτων, τεκμηριώθηκε με την ανεύρεση του ιστολογικού προτύπου της συνήθους διαμέσου πνευμονίας (UIP, Usual Interstitial Pneumonia) σε παρασκευάσμα πνευμονικού ιστού ληφθέν μετά από θωρακοσκοπική ή ανοικτή βιοψία πνεύμονος. Το προαναφερθέν ιστολογικό πρότυπο χαρακτηρίζεται από την χρονική ετερογένεια των ευρημάτων (συνύπαρξη περιοχών ινώσεως, κυψελιδίτιδος, πνεύμονος εν είδη μεληκυρήθρος και φυσιολογικού πνευμονικού ιστού στο ίδιο ιστολογικό παρασκευάσμα)<sup>3</sup>.

Στους υπόλοιπους 10 ασθενείς η βιοψία πνεύμονος δεν κατέστη δυνατή είτε λόγω παρουσίας αντενδείξεων για τη διενέργεια αυτής (μεγάλη ηλικία, συνυπάρχον νόσημα κλπ), είτε λόγω αρνήσεως του ασθενούς. Στις περιπτώσεις αυτές η διάγνωση της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης ετέθη από την παρουσία όλων των μειζόνων και 3 τουλάχιστον εκ των 4 ελασσόνων κριτηρίων, όπως αυτά διατυπώθηκαν στις θέσεις ομοφωνίας Αμερικανικής

αλλά και Ευρωπαϊκής Θωρακικής Εταιρείας<sup>17,57</sup> ήτοι: A) Μείζονα κριτήρια: 1) αποκλεισμός γνωστών αιτίων που μπορούν να προκαλέσουν ιστολογική εικόνα UIP (νοσήματα κολλαγόνου, τοξικότητα φαρμάκων, εισπνοή κόνεων), 2) παθοφυσιολογική εικόνα περιοριστικού συνδρόμου (πτώση FEV1 και φυσιολογική ή αυξημένη σχέση FEV1/FVC) και/ή διαταραχή της ανταλλαγής των αερίων, όπως αυτή προκύπτει από την αύξηση της κυψελιδοαρτηριακής διαφοράς οξυγόνου κατά την ηρεμία ή κατά την άσκηση, είτε από την πτώση της διαχυτικής ικανότητας των πνευμόνων για το μονοξείδιο του άνθρακος (DLCO), 3) Αμφοτερόπλευρες δικτυωτές σκιάσεις στις βάσεις των πνευμόνων με ελάχιστο ή μηδενικό στοιχείο τύπου θαμβής υάλου (ground glass) στην HRCT, 4) η διαβρογχική βιοψία ή το BAL να μην παρουσιάζουν στοιχεία τα οποία να συνηγορούν υπέρ άλλου νοσήματος.

B) Ελάσσονα κριτήρια:

1) ηλικία άνω των 50 ετών, 2) ύπουλη εισβολή δύσπνοιας κατά την κόπωση, η οποία δεν μπορεί να εξηγηθεί με άλλο τρόπο, 3) διάρκεια νόσου άνω των 3 μηνών, 4) αμφοτερόπλευροι τρίζοντες (Velcro type) στις βάσεις των πνευμόνων.

**1) Ασθενείς με πνευμονική σαρκοείδωση**

Μελετήθηκαν 13 ασθενείς με πνευμονική σαρκοείδωση, 7 άνδρες και 6 γυναίκες (εύρος ηλικιών 22 έως 58 ετών, μέση ηλικία 37 έτη)(Πίνακας 1, σελ. 92). Το σύνολο των ασθενών νοσηλεύτηκε στην Γ' Πνευμονολογική Κλινική Σισμανογλείου την τριετία 1998-2001 όπου και ετέθη η διάγνωση της

πνευμονικής σαρκοείδωσης, ενώ κανείς εξ αυτών δεν ελάμβανε αγωγή με κορτικοειδή. Οι ασθενείς εισήχθησαν για διερεύνηση είτε λόγω κλινικής σημειολογίας ( βήχας με ξηρούς χαρακτήρες, δύσπνοια) και ύποπτων για σαρκοείδωση ακτινολογικών ευρημάτων είτε στα πλαίσια διερεύνησης αμφοτερόπλευρης πυλαίας λεμφαδενοπάθειας, η οποία αποτελούσε τυχαίο ακτινολογικό εύρημα.

Δέκα (10) ασθενείς παρουσίαζαν πνευμονική σαρκοείδωση σταδίου 1 (αμφοτερόπλευρη πυλαία λεμφαδενοπάθεια χωρίς ευρήματα εκ του πνευμονικού παρεγχύματος) και 3 ασθενείς νόσο σταδίου 2 (αμφοτερόπλευρη πυλαία λεμφαδενοπάθεια και προσβολή πνευμονικού παρεγχύματος).

Η διάγνωση της σαρκοείδωσης ετέθη κατά κύριο λόγο με τη βοήθεια βρογχοσκοπικού ελέγχου, ήτοι 1) διαβρογχική βιοψία πνεύμονος με ανάδειξη του τυπικού μη τυροειδοποιούμενου επιθηλιοειδούς κοκκιώματος (τεμάχιο εκ του βιοπτικού υλικού εστάλη για καλλιέργεια για βάκιλο Koch και μύκητες και ήταν αρνητικό ως προς αυτά) , 2) TBNA ( διαβρογχική αναρρόφηση ιστού από υποκείμενο λεμφαδένα μέσω βελόνης) και ανάδειξη του προαναφερθέντος κοκκιώματος, είτε τέλος 3) βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα με λεμφοκυτταρικό κυτταρικό τύπο και σχέση CD4/CD8 μεγαλύτερη του 3,5<sup>54,55</sup>. Στις περιπτώσεις μη διαγνωστικών βρογχοσκοπικών υλικών (διαβρογχική, BAL, TBNA) είτε αδυναμίας εκτελέσεως του συνόλου των ανωτέρω βρογχοσκοπικών τεχνικών, αλλά υπάρξεως ύποπτων για σαρκοείδωση κλινικοακτινολογικών ευρημάτων, διενεργήθηκε μεσοθωρακοσκόπηση για λήψη λεμφαδενικού βιοπτικού υλικού.

Πιο αναλυτικά, στους 9 ασθενείς η διάγνωση ετέθη με την ανεύρεση επιθηλιοειδούς μη τυροειδοποιούμενου κοκκιώματος σε υλικό διαβρογχικής



βιοψίας (σε συνδυασμό ή μη με συμβατά ευρήματα από το BAL) ενώ σε έναν ασθενή από υλικό ληφθέν με TBNA και στους υπόλοιπους 3 με μεσοθωρακοσκοπική λεμφαδενική βιοψία.

## **2) Ομάδα φυσιολογικών μαρτύρων**

Λόγω της απουσίας βιβλιογραφικών στοιχείων για την έκφραση της bcl-2 σε κύτταρα βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος φυσιολογικών ατόμων συστάθηκε ομάδα φυσιολογικών μαρτύρων για την εκτίμηση και στατιστική αξιολόγηση των ευρημάτων. Στην συγκεκριμένη ομάδα περιελήφθησαν υγιείς εθελοντές με τα ακόλουθα κριτήρια: ήταν μη καπνιστές, η φυσική εξέταση του αναπνευστικού, η ακτινογραφία θώρακος και ο σπιρομετρικός έλεγχος ήταν χωρίς παθολογικά ευρήματα. Η μέση ηλικία των ατόμων της ομάδος ελέγχου ήταν τα 43 έτη, με εύρος ηλικιών από 27 έως 70 έτη (Πίνακας 3, σελ. 94).

## **ΜΕΘΟΔΟΣ**

Οι ασθενείς και οι φυσιολογικοί μάρτυρες υπεβλήθησαν σε βρογχοσκοπικό έλεγχο και λήψη βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος με βάση τις κοινώς αποδεκτές θέσεις ομοφωνίας για την ως άνω διαδικασία καθώς και προηγούμενα ανακοινωθείσες μελέτες-αναφορές<sup>21,22,30,31</sup>.

Από την διενέργεια βρογχοκυψελιδικής έκπλυσης απεκλείοντο ασθενείς με μη επιτρεπτά ευρήματα εκ της σπιρομέτρησης ή/και της ανάλυσης αερίων αίματος ( FEV1 μικρότερη του ενός λίτρου ή/και PaO<sub>2</sub> μικρότερη των 60 mm Hg). Η προετοιμασία των ασθενών για τη βρογχοσκόπηση περιελάμβανε την ενδομυϊκή χορήγηση 0,5 mg ατροπίνης και 0,5 mg πεθιδίνης 30 λεπτά πριν την έναρξη της εξέτασης. Καθόλη την διάρκεια της βρογχοσκόπησης εδίδετο συμπληρωματικά οξυγόνο μέσω ρινικής κάνουλας. Πριν την διαρινική είσοδο του βρογχοσκοπίου γινόταν αναισθησία του ρινοφάρυγγος με τοπική ενστάλαξη διαλύματος ξυλοκαΐνης.

Μετά την διαρινική είσοδο του βρογχοσκοπίου εντός του τραχειοβρογχικού δένδρου γινόταν χαλαρή ενσφήνωση αυτού σε τμηματικό βρόγχο του μέσου λοβού ή της γλωσσιδός (παρέχουν καλύτερη επιστροφή BAL λόγω της ανατομικής τους θέσης). Η ως άνω περιγραφείσα θέση ενσφήνωσης του βρογχοσκοπίου αφορούσε το σύνολο της ομάδος των υγιών μαρτύρων και τους ασθενείς με πνευμονική σαρκοείδωση σταδίου 1, δηλαδή χωρίς ακτινολογικά σημεία επινέμεσης του παρεγχύματος. Στις περιπτώσεις ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης και σαρκοείδωσης σταδίου 2, ως περιοχή ενσφήνωσης επιλεγόταν εκείνη των μεγίστων αλλοιώσεων, με βάση τα ευρήματα της αξονικής τομογραφίας θώρακος υψηλής ευκρίνειας ( HRCT).

Μετά την ενσφήνωση του βρογχοσκοπίου γινόταν έγχυση συνολικής ποσότητας 180 ml φυσιολογικού ορού θερμοκρασίας 37 βαθμών Κελσίου ( 3 διαδοχικές σύριγγες των 60 ml). Λίγα δευτερόλεπτα μετά την έγχυση κάθε σύριγγος γινόταν αναρρόφηση του υγρού μέσω του αυλού του βρογχοσκοπίου και συλλογή αυτού εντός ειδικού δοχείου (ειδική επικάλυψη του εσωτερικού αυτού με σιλικόνη για την αποφυγή προσκόλλησης κυττάρων

επί του τοιχώματος). Μια επιστροφή υγρού της τάξης άνω του 50% και χωρίς πρόσμιξη αίματος θεωρείτο απαραίτητη για την περαιτέρω επεξεργασία και μελέτη του δείγματος.

Την ολοκλήρωση λήψης βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος ακολουθούσε η άμεση μεταφορά αυτού, μέσα σε ειδικό δοχείο με πάγο, στο κυτταρολογικό εργαστήριο. Προκειμένου να γίνει κατακράτηση της βλέννης, η συνολική ποσότητα του BAL διηθείτο μέσω γάζης εμποτισμένης με φυσιολογικό ορό.

Η διαδικασία μελέτης του BAL γινόταν με βάση υπάρχουσες βιβλιογραφικά τεκμηριωμένες αρχές καθώς και προηγούμενες μελέτες-αναφορές<sup>30,40</sup>. Αρχικά γινόταν προσδιορισμός του συνολικού αριθμού κυττάρων με την ειδική κάμερα Neubauer (έκφραση αριθμού κυττάρων ανά ml αναρροφηθέντος υγρού). Ακολουθούσε διαχωρισμός των κυττάρων από την υγρά φάση με χρήση κυτταροφυγόκεντρου ( Cytospin II ; Shandon Ltd ,Runcorn, Cheshire, UK) και ήπια φυγοκέντρηση (1200-1500 rpm για 15 λεπτά). Μέσω της ανωτέρω διαδικασίας γινόταν έκπλυση των κυττάρων και επίστρωση αυτών σε γυάλινες αντικειμενοφόρους πλάκες, οι οποίες αφήνονταν να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Το επόμενο βήμα ήταν η χρώση των δειγμάτων με χρώσεις Giemsa και Παπανικολάου και μικροσκοπική παρατήρηση (μεγέθυνση των 100) μέχρις ανευρέσεως και ταυτοποίησεως τουλάχιστον 500 κυττάρων. Με τον τρόπο αυτό καθοριζόταν η ποσοστιαία αναλογία του εκάστοτε κυτταρικού τύπου στο εξετασθέν δείγμα BAL.

Μετά την ολοκλήρωση των ανωτέρω διαδικασιών ακολουθούσε η ανοσοϊστοχημική χρώση με την χρωστική μέθοδο της αλκαλικής φωσφατάσης

(Shandon Kwic Kits ,Universal streptavidin/biotin detection systems ,cat. No 407050 immunoalkaline phosphatase with fast red chromogen )

Η βήμα προς βήμα ανάλυση των σταδίων της εφαρμοσθείσας ανοσοϊστοχημικής χρώσης αφορά τα ακόλουθα<sup>23-29</sup>:

- 1) Μονιμοποίηση των προς εξέταση πλακιδίων με κρύο διάλυμα ακετόνης για 10 λεπτά.
- 2) Τοποθέτηση των πλακιδίων σε ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer T.B.S) για 10 λεπτά.
- 3) Έναρξη ανοσοϊστοχημικής χρώσης
  - A) Προσθήκη πρωτεϊνικού δεσμευτικού παράγοντα (protein blocking agent).
  - B) Προσθήκη του κυρίου αντισώματος(primary antibody) anti-bcl-2 (special monoclonal mouse anti-bcl-2 protein , Zymed Laboratories, INC). Αναμονή 15-20 λεπτών για ολοκλήρωση της διαδικασίας.
  - Γ) Έκπλυση των πλακιδίων σε buffer για 1-2 λεπτά.
  - Δ) Προσθήκη του δευτερογενούς αντισώματος (biotinylated secondary antibody) και αναμονή για 10 λεπτά.
  - Ε) Έκπλυση σε buffer για 1-2 λεπτά.
  - ΣΤ) Προσθήκη streptavidin-alkaline phosphatase reagent και αναμονή για διάστημα 5-7 λεπτών.
  - Ζ) Προσθήκη χρωμογόνου παράγοντα (chromogen solution) και αναμονή για 15-20 λεπτά.
  - Η) Έκπλυση πλακιδίων σε buffer για 1-2 λεπτά.Στη συνέχεια τα πλακίδια αφήνοντο να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου.

Μετά την ολοκλήρωση της προαναφερθείσας ανοσοϊστοχημικής χρώσης ακολουθούσε ο προσδιορισμός της ποσοστιαίας έκφρασης της πρωτεΐνης bcl-2 στον εκάστοτε κυτταρικό τύπο (μακροφάγα, ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα, λεμφοκύτταρα). Συγκεκριμένα γινόταν μικροσκοπική παρατήρηση μέχρις ανευρέσεως και καθορισμού της θετικής ή αρνητικής κυτταροπλασματικής χρώσης bcl-2 σε 500 ταυτοποιηθέντα κύτταρα.

## **ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ**

Η στατιστική επεξεργασία και ηλεκτρονική καταγραφή των τιμών έγινε με χρήση στατιστικού φύλλου εργασίας Microsoft Excel 97. Τα αποτελέσματα αναφέρονται ως μέση τιμή  $\pm$  σταθερή απόκλιση (SD). Ο στατιστικός συσχετισμός έγινε με εφαρμογή της δοκιμασίας student (t-test) και ως στατιστικά σημαντικές διαφορές θεωρήθηκαν αυτές με  $p < 0,05$ .

## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

Τα αποτελέσματα αναλύονται διεξοδικά κατωτέρω και συνοψίζονται στους πίνακες 1-4 και τα γραφήματα 1-4(σελ. 94-97).

**A) Απλή μελέτη BAL (χρώσεις Giemsa και Παπανικολάου), προσδιορισμός ολικού αριθμού κυττάρων και ποσοστιαίας αναλογίας επιμέρους κυτταρικών πληθυσμών.**

#### **Ασθενείς με σαρκοείδωση:**

Ο ολικός αριθμός των κυττάρων του BAL ελέγχεται αυξημένος σε σχέση με τα φυσιολογικά άτομα ( $20,2 \pm 2,3 \times 10^4$  /ml έναντι  $12 \pm 1 \times 10^4$  /ml κύτταρα).

Κατά την μικροσκοπική παρατήρηση ανευρέθη η χαρακτηριστική της σαρκοειδώσεως λεμφοκυτταρική κυψελιδίτις, με μια ποσοστιαία αναλογία λεμφοκυττάρων της τάξης του  $38,5 \pm 4,9\%$  (έναντι ποσοστού  $12,6 \pm 1\%$  της ομάδος ελέγχου).

Ο αριθμός των μακροφάγων του BAL των ασθενών με σαρκοείδωση ελέγχεται μειωμένος, ως προς την ποσοστιαία αναλογία, σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες (ποσοστά  $58,2 \pm 4,6\%$  και  $85,3 \pm 1\%$  αντίστοιχα). Μικρές είναι οι διαφοροποιήσεις στους πληθυσμούς των πολυμορφοπυρήνων ( $2,4 \pm 1,3$  επί σαρκοειδώσεως έναντι  $1,6 \pm 0,6$  επί των φυσιολογικών μαρτύρων) και των ηωσινοφίλων λευκοκυττάρων ( $0,9 \pm 1,2\%$  στους ασθενείς με σαρκοείδωση έναντι ποσοστού  $< 0,5\%$  της ομάδος ελέγχου).

## **1) Ασθενείς με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση**

Ο ολικός αριθμός κυττάρων του BAL ελέγχεται αυξημένος σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ( $22,4 \pm 2,5 \times 10^4$  /ml επί ΙΠΙ σε σχέση με  $12 \pm 1 \times 10^4$ /ml της ομάδος ελέγχου).

Η μικροσκοπική εξέταση καταδεικνύει την χαρακτηριστική κυψελιδίτιδα της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης, η οποία χαρακτηρίζεται από αυξημένους αριθμούς πολυμορφοπυρήνων και σε μικρότερο βαθμό ηωσινοφίλων. Συγκεκριμένα ανευρέθη ποσοστιαία αναλογία πολυμορφοπυρήνων της τάξης του  $26,7 \pm 11,5$  % (έναντι  $1,6 \pm 0,6$  % των φυσιολογικών ατόμων) και ηωσινοφίλων της τάξης του  $10,6 \pm 6,2$  % (έναντι ποσοστού  $< 0,5$  % της ομάδος ελέγχου). Η ποσοστιαία αναλογία των μακροφάγων ελέγχεται μειωμένη επί ΙΠΙ σε σχέση με τα φυσιολογικά άτομα ( $51,9 \pm 15,7$  % στους ασθενείς με ΙΠΙ έναντι  $85,3 \pm 1$ % στα φυσιολογικά άτομα). Οι αναλογίες των λεμφοκυττάρων του BAL δεν παρουσιάζουν ουσιώδεις διαφοροποιήσεις μεταξύ των δύο ομάδων ( $10,7 \pm 2,9$  επί ΙΠΙ έναντι  $12,6 \pm 1$ % επί των υγιών μαρτύρων).

***B) Ανοσοϊστοχημικός προσδιορισμός ποσοστιαίας έκφραση πρωτεΐνης bcl-2 στους κυτταρικούς πληθυσμούς.***

## **1) Ασθενείς με σαρκοείδωση**

Παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντικά διαφορά ( $p < 0,001$ ) στην έκφραση της bcl-2 τόσο στα λεμφοκύτταρα όσο και στα μακροφάγα του BAL των ασθενών με σαρκοείδωση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Πιο συγκεκριμένα η bcl-2 παρουσίαζε έκφραση στο  $80,7 \pm 8,5$  % των λεμφοκυττάρων και στο  $77,4 \pm 8,9$  % των μακροφάγων σε περιπτώσεις σαρκοειδώσεως (έναντι ποσοστών  $32,2 \pm 13,8\%$  και  $19,6 \pm 7,6$  % της ομάδος ελέγχου αντίστοιχα).

Αντίθετα με τα ανωτέρω δεν παρατηρήθηκε έκφραση της bcl-2 επί των πολυμορφοπυρήνων και ηωσινοφίλων, τόσο στην ομάδα των ασθενών με σαρκοείδωση όσο και σε εκείνη των φυσιολογικών ατόμων (ποσοστά έκφρασης της bcl-2 μικρότερα του 1% και στις δύο περιπτώσεις).

## **2) Ασθενείς με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση**

Παρατηρήθηκε μια στατιστικώς σημαντική διαφορά ( $p < 0,001$ ) στις ποσοστιαίες αναλογίες έκφρασης της bcl-2 στους κυτταρικούς πληθυσμούς τόσο των πολυμορφοπυρήνων όσο και των ηωσινοφίλων σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Συγκεκριμένα, διεπιστώθει έκφραση της bcl-2 σε ποσοστό  $82,5 \pm 7,1$  % στα πολυμορφοπύρηνα και  $65,5 \pm 10,4$  στα ηωσινόφιλα. Αντιθέτως, δεν ανευρέθη έκφραση της bcl-2 επί των πολυμορφοπυρήνων και ηωσινοφίλων της ομάδος ελέγχου (ποσοστά  $< 1\%$ ). Τα μακροφάγα παρουσίαζαν μια μικρή, στατιστικά μη σημαντική ( $p < 0,10$ ), αύξηση στην έκφραση της bcl-2 επί ΙΠΙ σε σχέση με τα φυσιολογικά άτομα (ποσοστά  $22,5 \pm 7,4$  % και  $19,6 \pm 7,6\%$  αντίστοιχα). Δεν παρατηρήθηκε έκφραση της bcl-2



στα λεμφοκύτταρα των ασθενών με ΙΠΙ σε αντίθεση με την ομάδα ελέγχου, όπου η συγκεκριμένη πρωτεΐνη εκφραζόταν στο ένα τρίτον περίπου των περιπτώσεων ( $32,2 \pm 13,8$ ,  $p < 0,001$ ).

## **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

Η συγκεκριμένη μελέτη αποτελεί την πρώτη βιβλιογραφική αναφορά σχετικά με τους αντιαποπτωτικούς μηχανισμούς, συγκεκριμένα την έκφραση της bcl-2, σε παρασκεύασμα βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος στις δύο συχνότερες για την εποχή μας διάχυτες διηθητικές πνευμονοπάθειες, την ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση (ΙΠΙ) και την σαρκοείδωση. Η επιλογή των νοσημάτων αυτών έγινε με βάση το γεγονός ότι αποτελούν άνω των 2/3 του συνόλου των διαμέσων πνευμονοπαθειών, παρότι ουσιαστικά είναι εντελώς διαφορετικά νοσήματα (διαφορές στην ηλικία εμφάνισης, στο ακτινολογικό πρότυπο, την ιστολογική εικόνα, τα χαρακτηριστικά της παρατηρούμενης κυψελιδίτιδος, την πρόγνωση και πορεία, την ανταπόκριση στα κορτικοστεροειδή). Με βάση τα ανωτέρω είναι προφανές ότι η εξαγωγή συμπερασμάτων είναι χρήσιμο να γίνει για κάθε νόσημα ξεχωριστά με μια προσπάθεια ανεύρεσης κοινών συσχετισμών στο τέλος της συγκεκριμένης ενότητας.

Τα αποτελέσματα της μελέτης επαλήθευσαν την αρχική μας υπόθεση σχετικά με την ύπαρξη σημαντικών διαφορών στην έκφραση της

αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης bcl-2 στους κυτταρικούς πληθυσμούς του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος ασθενών με ΙΠΙ. Η συμβολή των μελετών σχετικά με το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL) στην εξαγωγή χρήσιμων διαγνωστικών πληροφοριών στο πεδίο έρευνας της παθοφυσιολογίας της ΙΠΙ χαίρει γενικότερης βιβλιογραφικής αποδοχής<sup>4,5,17,22,31,94</sup>. Πιο συγκεκριμένα, η ΙΠΙ (ιστολογικό πρότυπο UIP) παρουσιάζει συνήθως (67-90% των περιπτώσεων) μια κυψελιδίτιδα, η οποία χαρακτηρίζεται από αύξηση του ποσοστού των πολυμορφοπυρήνων και/ή των ηωσινοφίλων στο BAL. Η απουσία της συγκεκριμένης εικόνας κυψελιδίτιδος θέτει υπό σοβαρή αμφισβήτηση την διάγνωση της ΙΠΙ (ακόμη και επί εκπλήρωσης όλων των υπόλοιπων κριτηρίων) και καθιστά αναγκαία τη διενέργεια βιοψίας πνεύμονος (θωρακοσκοπικής ή ανοικτής) για την τελική διάγνωση. Για παράδειγμα, η ανεύρεση αυξημένου αριθμού λεμφοκυττάρων στο BAL, παρά τα συμβατά με ΙΠΙ κλινικοεργαστηριακά ευρήματα, υποδηλώνει ύπαρξη άλλης νοσολογικής οντότητας (όπως LIP, COP, σαρκοείδωση κλπ.).

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της παρούσης μελέτης καταδεικνύει την υπερέκφραση της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης bcl-2 (σε στατιστικά σημαντικό ποσοστό,  $p < 0,001$ ) στα πολυμορφοπύρηνα και ηωσινόφιλα του BAL, δηλαδή στα κύτταρα που διαμορφώνουν το κυτταρικό "προφίλ" στην κυψελιδίτιδα επί ΙΠΙ. Το εύρημα αυτό πιθανότατα σχετίζεται με τους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς της νόσου, καθότι αντίσταση ενός κυττάρου στην απόπτωση σημαίνει επιμήκυνση του χρόνου επιβίωσης και αντίσταση στο σύνολο των παραγόντων εκείνων που προάγουν τον φυσιολογικό του θάνατο. Από την άλλη μεριά, η έκφραση της bcl-2 επί των μακροφάγων δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική αύξηση σε σχέση με τα υγιή άτομα, ενώ

στην περίπτωση των λεμφοκυττάρων απουσιάζει πλήρως η έκφραση της bcl-2 επί ΙΠΙ ενώ αυτή εκφράζεται στο ένα τρίτο περίπου των λεμφοκυττάρων των φυσιολογικών ατόμων. Τα ευρήματα αυτά πιθανώς σχετίζονται με την απουσία σημαντικής συμμετοχής των μακροφάγων και λεμφοκυττάρων στα "παθοφυσιολογικά δρώμενα" της κυψελιδίτιδος σε περιπτώσεις ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης.

Με βάση τα πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα ποικίλες φλεγμονώδεις και ανοσολογικές αντιδράσεις συνδέονται αιτιολογικά με την καταστροφή των κυψελιδικών μονάδων επί ΙΠΙ<sup>18,60,113,114,116,132</sup>. Υπάρχει επίσης μια σημαντική διαφοροποίηση στην σύνθεση αλλά και την λειτουργικότητα των φλεγμονωδών κυττάρων του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος των ασθενών με ΙΠΙ. Η φλεγμονή κατ' ουσίαν αποτελεί τον παράγοντα "κλειδί" στην πρόκληση ινωτικών αλλά και καταστροφικών αλλοιώσεων (πνεύμων εν είδη μελικηρύθρας) στη αρχιτεκτονική δομή του πνεύμονα. Η αναστολή του αποπτωτικού θανάτου των πολυμορφοπυρήνων αλλά και ηωσινοφίλων του κατώτερου αναπνευστικού θα μπορούσε, εν μέρει τουλάχιστον, να ερμηνεύσει την απόλυτη αλλά και σχετική (ως ποσοστό) αύξηση του αριθμού των κυττάρων αυτών που όπως προαναφέρθηκε αποτελούν ακρογωνιαίο λίθο στις συμβαίνουσες φλεγμονώδεις διεργασίες. Ο σημαντικός ρόλος της bcl-2 στην αναστολή του αποπτωτικού θανάτου των πολυμορφοπυρήνων λευκοκυττάρων έχει τεκμηριωθεί με προηγούμενες μελέτες και αναφορές<sup>49,61,163</sup>. Η απόπτωση ουσιαστικά τερματίζει την ενεργό φλεγμονή και συνεπώς την κυτταρική απελευθέρωση κυτταροκινών και πρωτεασών που άμεσα ή έμμεσα οδηγούν σε καταστροφή και αναδόμηση του πνευμονικού παρεγχύματος, με συνέπεια την διαταραχή της φυσιολογικής αρχιτεκτονικής

δομής του πνεύμονος και τις φυσιολογικά επακολουθούσες κλινικές και λειτουργικές διαταραχές. Το εάν η bcl-2 αποτελεί απλά μια έκφραση της ενεργού κυψελιδικής φλεγμονής ή έναν κύριο παράγοντα επιμήκυνσης και αναστολής της λύσεως αυτής αποτελεί μια νέα προκλήση στο πεδίο έρευνας.

Το σύνολο των ασθενών με ΙΠΙ που μελετήθηκαν δεν ελάμβανε φάρμακα (κορτικοειδή ή ανοσοκατασταλτικά), ούτε εκτίθετο εμφανώς σε εξωγενείς παράγοντες ( επαγγελματική έκθεση σε ανόργανες ή οργανικές κόνεις) που θα μπορούσαν να επηρεάσουν τους μελετηθέντες αποπτωτικούς μηχανισμούς. Με βάση αυτά, οι διαφοροποιήσεις στους αντιαποπτωτικούς μηχανισμούς δεν μπορεί παρά να σχετίζονται με την ίδια την νοσολογική οντότητα της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης. Τα ευρήματά μας από το BAL έρχονται να ενισχύσουν προηγούμενες μελέτες που διεπίστωσαν σημαντικές διαφοροποιήσεις της έκφρασης της bcl-2 σε παρασκευάσματα πνευμονικού ιστού ασθενών με ΙΠΙ<sup>32,33</sup>.

Και στην περίπτωση της πνευμονικής σαρκοείδωσης η αρχική υπόθεση της μελέτης, σχετικά με την ύπαρξη σημαντικών διαφορών στους αντιαποπτωτικούς μηχανισμούς σε σχέση με τα φυσιολογικά άτομα, επαληθεύτηκε. Οι υπάρχουσες έως τώρα δημοσιευμένες εργασίες<sup>36,38,39</sup> ελέγχουν τους μηχανισμούς απόπτωσης στους κυτταρικούς πληθυσμούς του BAL (έκφραση αποπτωτικών παραγόντων όπως Fas/FasL ή υποδοχείς TNF) ασθενών με σαρκοείδωση, επισημαίνουν όμως ότι η κατανόηση του όλου φαινομένου απαιτεί μελέτη και της άλλης πλευράς, δηλαδή των αντιαποπτωτικών μηχανισμών. Στο συγκεκριμένο ερευνητικό πεδίο η παρούσα μελέτη έδωσε τα πρώτα χρήσιμα στοιχεία και συμπεράσματα.

Στην πνευμονική σαρκοείδωση η υπάρχουσα κυψελιδίτιδα διαφέρει ουσιαστικά από εκείνη που περιγράφηκε στην ΙΠΙ, εκτός ίσως από το τελευταίο στάδιο της νόσου (ινωτικό) όπου τα ευρήματα είναι παρεμφερή. Το γεγονός αυτό δεν αφορά την συγκεκριμένη εργασία, αφού το σύνολο των μελετηθέντων ασθενών ήταν στα στάδια 1 και 2. Πιο συγκεκριμένα, η κυψελιδίτιδα επί σαρκοειδώσεως χαρακτηρίζεται από ποσοστιαία αύξηση των λεμφοκυττάρων και μάλιστα των βοηθητικών CD4 T λεμφοκυττάρων. Η ύπαρξη λεμφοκυτταρικής κυψελιδίτιδος με λόγο CD4/CD8 >3,5 επί υπάρξεως συμβατής κλινικοακτινολογικής εικόνας θεωρείται πλέον διαγνωστική της σαρκοειδώσεως, ακόμη και επί απουσίας βιοπτικού υλικού<sup>54,55</sup> (ευαισθησία 53% και ειδικότητα 93%). Ενώ όμως ο ρόλος του λεμφοκυττάρου είναι ευρύτερα αποδεκτός και μελετημένος πιο πρόσφατες εργασίες<sup>41-44</sup> οριοθετούν ως βασικό ενορχηστρωτή της σαρκοειδικής κυψελιδίτιδος το μακροφάγο, παρά το γεγονός της απουσίας ποσοστιαίας αύξησης των κυττάρων αυτών στο BAL ασθενών με σαρκοείδωση. Η παρουσίαση από τα μακροφάγα άγνωστης προς το παρόν αντιγονικής ουσίας και έκκριση ιντερλευκίνης 1 οδηγεί στην ενεργοποίηση των βοηθητικών T λεμφοκυττάρων. Τα τελευταία μέσω έκλυσης προφλεγμονωδών κυτταροκινών οδηγούν τελικά σε μορφολειτουργική διαφοροποίηση των μακροφάγων και σχηματισμό του σαρκοειδικού κοκκιώματος<sup>54,58,166</sup>. Ανεξάρτητα πάντως από το εάν το μακροφάγο ή το λεμφοκύτταρο αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο της σαρκοειδικής κυψελιδίτιδος, το βέβαιο είναι ότι τα δύο αυτά κύτταρα συνιστούν το ειδικό κυτταρικό "προφίλ" του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος στο νόσημα αυτό.

Η ανοσοϊστοχημική χρώση της πρωτεΐνης bcl-2 έδειξε ότι η αντιαποπτωτική αυτή πρωτεΐνη υπερεκφράζεται σε στατιστικά σημαντικό ποσοστό, τόσο επί των λεμφοκυττάρων, όσο και επί των μακροφάγων στο BAL των σαρκοειδικών ασθενών. Δεν διεπιστώθησαν διαφορές στο ποσοστό της υπερέκφρασης μεταξύ ασθενών με νόσο σταδίου 1 και σταδίου 2. Αντίθετα με τα παρατηρηθέντα σε μακροφάγα και λεμφοκύτταρα, η bcl-2 δεν παρουσίασε έκφραση επί των πολυμορφοπυρήνων και ηωσινοφίλων του BAL ( ποσοστά μικρότερα του 1%), γεγονός που πιθανόν σχετίζεται με την απουσία σημαντικής συμμετοχής των κυττάρων αυτών στα παθοφυσιολογικά δρώμενα της σαρκοειδικής κυψελιδίτιδος.

Η υπερέκφραση αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών από μακροφάγα και λεμφοκύτταρα ουσιαστικά υποδηλώνει αντίσταση των κυττάρων αυτών στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο και επομένως αντίσταση στους μηχανισμούς λύσεως της ενεργού κυψελιδίτιδος. Το σύνολο των εξετασθέντων ευρίσκετο σε ενεργό στάδιο της νόσου και δεν ελάμβανε φάρμακα, όπως τα κορτικοστεροειδή που θα μπορούσαν να επηρεάσουν τους αποπτωτικούς μηχανισμούς . Το γεγονός αυτό σημαίνει ότι η υπερέκφραση της bcl-2 αφορά αποκλειστικά την ενεργό πορεία της νόσου και δεν σχετίζεται με άλλους εξωγενείς παράγοντες.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει ο συσχετισμός των ευρημάτων μας με αντίστοιχες εργασίες του παρελθόντος που όπως προαναφέρθηκε μελετούν αποκλειστικά έκφραση αποπτωτικών παραγόντων. Συγκεκριμένα οι Costabel και συν.<sup>36</sup> διαπίστωσαν αυξημένη έκφραση των αποπτωτικών παραγόντων FasR και TNFR1 επί των μακροφάγων του BAL σαρκοειδικών ασθενών , ενώ οι Kunitake και συν.<sup>38</sup> και Semenzato και συν.<sup>39</sup> διεπίστωσαν αυξημένη έκφραση

των αποπτωτικών παραγόντων FasL ,CD 27 και CD55/Fas επί των λεμφοκυττάρων του BAL. Στο σύνολο των προαναφερθέντων μελετών υποσημαίνεται ότι η επέλευση του αποπτωτικού θανάτου είναι σύνθετο φαινόμενο και η παρατηρηθείσα έκφραση αποπτωτικών παραγόντων δεν αποτελεί παρά μόνον μια εκ των πολλών πτυχών του φαινομένου. Η συζήτηση του όλου θέματος μετά την παράθεση και των δικών μας αποτελεσμάτων, σχετικά με τους αντιαποπτωτικούς μηχανισμούς, έγινε στο πρώτο Παγκόσμιο Συνέδριο Διαμέσων Νοσημάτων WASOG ( Βενετία, Ιούνιος 2001)<sup>90</sup>. Η επικρατούσα άποψη ήταν εκείνη της ευχερέστερης ερμηνείας της ενεργού κυψελιδικής φλεγμονής επί σαρκοειδώσεως επί αποδοχής της αντίστασης των "ενεργών" κυττάρων,ήτοι μακροφάγων και λεμφοκυττάρων στην απόπτωση. Βέβαια επισημάνθηκε ότι λόγω της σπανιότητας της νόσου ο αριθμός των περιστατικών που περιελήφθησαν στο σύνολο των εργασιών αυτών είναι σχετικά μικρός για την εξαγωγή ασφαλών τελικών συμπερασμάτων. Τέλος τονίσθηκε ότι η μελέτη αποπτωτικών και αντιαποπτωτικών μηχανισμών θα αποδειχθεί πιθανότατα χρήσιμη για τον έλεγχο της πορείας της νόσου προς ίαση ή εγκατάσταση μόνιμων ινωτικών αλλοιώσεων.

Συμπερασματικά τονίζεται ότι το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα αποτελεί ένα "παράθυρο" στις κυψελίδες και τα εκεί παθοφυσιολογικά δρώμενα επί των συχνότερων διαχύτων διαμέσων πνευμονοπαθειών, δηλαδή της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης και της σαρκοειδώσεως. Κάθε μια εκ των νόσων αυτών χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένη κυψελιδική κυτταρική εικόνα , η οποία άμεσα ή έμμεσα επιδρά στην πορεία και πρόγνωση της νόσου. Η απόπτωση

αποτελεί έναν ενεργητικό ομοιοστατικό μηχανισμό με τον οποίο τα κύτταρα οδηγούνται σε έναν φυσιολογικό θάνατο. Η αντίσταση κάποιων κυττάρων στο φυσιολογικό αυτό γεγονός συνεπεία ποικίλων εξωγενών ή ενδογενών παραγόντων, οι οποίοι στην πλειοψηφία τους παραμένουν άγνωστοι προς το παρόν, οδηγεί σε παράταση της ζωής και λειτουργίας των κυττάρων με αποτέλεσμα την παράταση φλεγμονωδών και μη εξεργασιών.

Η διαπιστωθείσα κατά την μελέτη μας αντίσταση στον αποπτωτικό θάνατο των χαρακτηριστικών για κάθε μια νόσο κυττάρων του BAL, ήτοι των πολυμορφοκυττάρων και ηωσινοφίλων επί ΙΠΙ και των μακροφάγων και λεμφοκυττάρων επί σαρκοειδώσεως σίγουρα δεν αποτελεί τυχαίο γεγονός. Αντανακλά στην παράταση των εκάστοτε φλεγμονωδών διεργασιών σε κυψελιδικό επίπεδο. Σίγουρα ο αριθμός των μελετηθέντων ασθενών δεν είναι μεγάλος, όπως άλλωστε και στις περισσότερες μη πολυκεντρικές εργασίες για τα νοσήματα αυτά, λόγω της σπανιότητας των σε σχέση με άλλα αναπνευστικά νοσήματα. Βέβαιο είναι όμως ότι η μελέτη μας αποτελεί την πρώτη βιβλιογραφικά δημοσιευμένη αναφορά στους αντιαποπτωτικούς μηχανισμούς επί ΙΠΙ και σαρκοειδώσεως σε επίπεδο BAL. Το εάν η έκφραση της bcl-2 αποτελεί κύριο παράγοντα ρύθμισης του αποπτωτικού θανάτου, όπως αρχικά θεωρήθηκε όταν αυτή προσδιορίστηκε το 1986<sup>14</sup> ή αποτελεί μόνον έναν από τους πολλαπλούς κρίκους στο φαινόμενο που αποκαλείται απόπτωση αποτελεί αντικείμενο μελλοντικής έρευνας.



## **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

**ΘΕΜΑ: ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΑΠΟΠΤΩΤΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ Bcl-2 ΣΤΟΥΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ ΤΟΥ ΒΡΟΓΧΟΚΥΨΕΛΙΔΙΚΟΥ ΕΚΠΛΥΜΑΤΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΙΔΙΟΠΑΘΗ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΙΝΩΣΗ ΚΑΙ ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ**

Χαράλαμπος Μ. Μερμίγκης

Πνευμονολόγος, 401 ΓΣΝΑ

### **ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΣΚΟΠΟΣ**

Η απόπτωση, γνωστή και ως προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος αποτελεί ένα φυσιολογικό φαινόμενο με ιδιαίτερη σημασία στις διαδικασίες ομοιόστασης των πολυκύτταρων οργανισμών. Ο αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος πιθανόν σχετίζεται με τα παθοφυσιολογικά "δρώμενα" στην κυψελιδίτιδα της σαρκοείδωσης και της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης (ΙΠΙ). Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης ήταν η ανεύρεση διαφοροποιήσεων στην έκφραση της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης bcl-2, ενός από τους πλέον σημαντικούς ανασταλτικούς παράγοντες της απόπτωσης, στους κυτταρικούς πληθυσμούς του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (BAL) ασθενών με ΙΠΙ και σαρκοείδωση

## ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ

Διενεργήθηκε βρογχοσκοπικός έλεγχος και BAL σε 15 ασθενείς με ΙΠΙ, 13 ασθενείς με σαρκοειδωση (δέκα με νόσο σταδίου 1 και τρεις με σταδίου 2) και 10 υγιείς μάρτυρες. Κανείς εκ των ασθενών που μελετήθηκαν δεν ελάμβανε κορτικοειδή ή άλλα ανοσοκατασταλτικά φάρμακα. Η λήψη του BAL γινόταν από τις περιοχές των μεγίστων αλλοιώσεων (με βάση τα ευρήματα της αξονικής τομογραφίας θώρακος υψηλής ευκρίνειας) στις περιπτώσεις ΙΠΙ και σαρκοειδώσεως σταδίου 2 και από την περιοχή του μέσου λοβού ή της γλωσσίδος στις περιπτώσεις των υγιών μαρτύρων και σαρκοειδώσεως σταδίου 1.

Ο καθορισμός της ποσοστιαίας αναλογίας των επιμέρους κυττάρων γινόταν με μικροσκοπική παρατήρηση μετά από εφαρμογή χρώσεων Giemsa και Παπανικολάου. Ο προσδιορισμός της κυτταρικής έκφρασης της bcl-2 γινόταν με χρήση ανοσοϊστοχημικής χρώσης (μέθοδος αλκαλικής φωσφατάσης) και μονοκλωνικών αντι-bcl-2 αντισωμάτων.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στις περιπτώσεις των ασθενών με ΙΠΙ διεπιστώθει μια στατιστικώς σημαντική ( $p < 0,001$ ) αύξηση στην έκφραση της bcl-2 στα πολυμορφοπύρρηνα και ηωσινόφιλα του BAL σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Τα μακροφάγα παρουσίαζαν μια μικρή, στατιστικά μη σημαντική, αύξηση στην έκφραση της bcl-2 επί ΙΠΙ. Δεν παρατηρήθηκε έκφραση της bcl-2 στα λεμφοκύτταρα ασθενών με ΙΠΙ σε αντίθεση με την ομάδα ελέγχου, όπου η συγκεκριμένη πρωτεΐνη εκφραζόταν στο ένα τρίτον περίπου των περιπτώσεων.

Στις περιπτώσεις ασθενών με σαρκοείδωση παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική ( $p < 0,001$ ) αύξηση στην έκφραση της bcl-2 τόσο στα λεμφοκύτταρα όσο και στα μακροφάγα του BAL σε σχέση πάντα με την ομάδα ελέγχου. Αντίθετα δεν διεπιστώθηκε έκφραση της bcl-2 επί των πολυμορφοπυρήνων και ηωσινοφίλων τόσο στην ομάδα των ασθενών με σαρκοείδωση, όσο και σε εκείνη των φυσιολογικών ατόμων.

### ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της παρούσης μελέτης καταδεικνύει την υπερέκφραση της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης bcl-2 (σε στατιστικά σημαντικό ποσοστό) στα πολυμορφοπύρηνα και ηωσινόφιλα του BAL επί ΙΠΙ και στα λεμφοκύτταρα και μακροφάγα επί πνευμονικής σαρκοειδώσεως, ουσιαστικά δηλαδή στα κύτταρα που διαμορφώνουν το ιδιαίτερο "κυτταρικό προφίλ" της κυψελιδίτιδας σε κάθε ένα εκ των νοσημάτων αυτών. Το εύρημα αυτό πιθανότατα σχετίζεται με τους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς του κάθε νοσήματος, αφού αντίσταση ενός κυτάρου στην απόπτωση σημαίνει επιμήκυνση της ζωής του και αντίσταση στο σύνολο των παραγόντων εκείνων που προάγουν τον φυσιολογικό του θάνατο. Επιπρόσθετα, η μελέτη της bcl-2 πέρα από τα στοιχεία που δίνει για τα παθοφυσιολογικά δρώμενα σε κυψελιδικό επίπεδο θα μπορούσε να αποτελέσει χρήσιμο δείκτη της ενεργότητας της νόσου (ΙΠΙ είτε σαρκοείδωση) αλλά και πιθανής ανταπόκρισης αυτής σε τυχόν εφαρμοζόμενη θεραπευτική αγωγή.

## **SUMMARY**

*SUBJECT: EXPRESSION OF Bcl-2 ANTI-APOPTOTIC PROTEIN IN BRONCHOALVEOLAR LAVAGE CELL POPULATIONS FROM PATIENTS WITH IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS AND SARCOIDOSIS.*

Charalampos M. Mermigkis, MD.

Pulmonologist, 401 General Army Hospital Athens

## **BACKGROUND-AIM**

Apoptosis, also known as programmed cell death is a normal procedure of importance in the "homeostasis" of multicellular organisms. Apoptotic cellular death probably correlates to the pathophysiologic mechanisms of alveolitis in sarcoidosis and idiopathic pulmonary fibrosis (IPF).

Our purpose was to investigate changes in the expression of the antiapoptotic protein bcl-2, one of the most important inhibiting factors of apoptosis, on bronchoalveolar lavage fluid (BALF) cell populations in patients with IPF and sarcoidosis.

## **MATERIALS AND METHODS**

Fiberoptic bronchoscopy and BAL was performed in 15 patients with IPF and 13 patients with sarcoidosis (10 patients with stage I and 3 with stage II

disease based on chest radiography). None of them was under treatment with corticosteroids or other immunosuppressive agents. For comparison and statistical evaluation of results, 10 normal subjects served as control group (nonsmokers, with normal chest radiography and spirometry).

BAL was performed in the area of maximal radiographic shadowing (based on high-resolution computed tomography findings) at patients with IPF and sarcoidosis stage II and in the middle lobe or lingula in cases of stage I sarcoidosis or normal subjects

Differential counts of BAL cell types were determined by microscopic observation after staining with Giemsa and Papanikolaou stain. Cellular bcl-2 expression was identified using an immunoperoxidase staining method with monoclonal anti-bcl-2 antibodies.

## RESULTS

A statistically significant ( $p < 0,001$ ) increase in the expression of bcl-2 in BAL neutrophils and eosinophils was observed in patients with IPF compared to controls. BAL macrophages exhibited a slight (statistically insignificant) increase in bcl-2 expression in IPF patients. No bcl-2 expression was observed in BAL lymphocytes from IPF patients in contrast to the control group, where this certain protein was expressed in approximately one third of the cases.

Both lymphocytes and macrophages in sarcoid patients' BAL exhibit a significant increase in the expression of bcl-2 compared to control group ( $p < 0,001$ ). On the contrary, no expression of bcl-2 was observed on

neutrophils and eosinophils nor in the sarcoid patients group either in the normal volunteer control group.

## CONCLUSIONS

Our results suggest that the antiapoptotic protein bcl-2 is overexpressed (in statistically significant percentage) on BAL neutrophils and eosinophils in IPF patients and on lymphocytes and macrophages in sarcoid patients, namely the cells that characterise the special cellular profile of each one of these diseases. This finding probably correlates with the pathophysiologic mechanisms of these diseases because apoptosis resistance means prolongation of cellular survival and cellular resistance against factors that promote its functional impairment and consequent destruction. In addition to the information on pathophysiological facts at alveolar level obtained by the study of bcl-2, our data could also prove to be a useful marker of disease activity (IPF or sarcoidosis) and probably it's response to treatment.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Coultas DB, Zumwalt RE, Black WC, Sobonya RE. The epidemiology of interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150: 967-72.
2. Bouros D, Psathakis K, Siafakas N. Quality of life in diffuse interstitial lung diseases. *Eur Respir Rev* 1997;7:66-70.
3. Katzenstein AL, Myers JL. Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical relevance of pathologic classification. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157: 1301-1315.
4. Watters LC, Schwarz MI, Cherniak RM, Waldron TL, Dunn RE, Stanford and TE King. Idiopathic pulmonary fibrosis: pretreatment bronchoalveolar lavage cellular constituents and their relationships to lung histopathology and clinical response to therapy. *Am Rev Respir Dis* 1987;135:696-704.
5. Boomars KA, Wagenaar SS, Mulder PG, Van Velzen-Blad H, Van den Bosch JM. Relationship between cells obtained by bronchoalveolar lavage and survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* 1995; 50:1087-1092.
6. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:2239-257.
7. Bosman FT, Visser BC, Van Oeveren J. Apoptosis: Pathophysiology of programmed cell death. *Path Res Pract* 1996; 192:676-683.
8. Lodish H, Berk A, Zipurski S, Matsudaire P, Baltimore D, Darnell J. Cell death and its regulation. *Molecular Cell Biology* . Fourth Edition(2000), Chapter 23.

9. Golstein P, Ojcius DM, Young DE. Cell death mechanism and the immune system. *Immunol Rev* 1991;121:29-65.
10. Bingisser R, Stey C, Weller M, Frei K. Apoptosis in human alveolar macrophages is induced by endotoxin and is modulated by cytokines. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996;15: 64-74.
11. Fisher DE. Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell* 1994; 78:539-545.
12. Martin SJ, Green DR. Protease activation during apoptosis: Death by thousand cuts. *Cell* 1995; 82:349-359.
13. Kroemer G. The biochemistry of programmed cell death. *FASEB* 1995;9: 1277-1291.
14. Yang E, Korsmeyer J. Molecular Thanatoptosis: A Discourse on the Bcl-2 Family in cell death. *Blood* 1996;88: 386-401
15. Reed J. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994;124: 1-6 .
16. Lam M, Dubyak G, Chen L, Nunez G, Miesfeld RL, Distelhorst CW. Evidence that BCL-2 repress apoptosis by regulating endoplasmic reticulum associated Ca<sup>2+</sup> fluxes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 6569-6573.
17. American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: Diagnosis and treatment. International consensus statement. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000; 161; 646-664.
18. Selman M, King TM, Pardo A. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med* 2001;134:136-151.



19. Wells AU, Hansell DM, Rubens MB, Cullinan P, Black CM, du Bois RM. The predictive value of appearances on thin-section computed tomography in fibrosing alveolitis. *Am Rev Respir* 1993;148:1076-1082.
20. Nishimura K, Kitaichi M, Izumi T, Nagai S, Kanoaka M, Itoh H. Usual interstitial pneumonia :histologic correlation with high-resolution CT. *Radiology* 1992;182:337-342.
21. Technical recommendations and guidelines for bronchoalveolar lavage (BAL). Report of the European Society of Pneumology Task Group. *Eur Respir J* 1989;2:561-85.
22. Wells AU, Hansell DM, Haslam PL, Rubens MB, Cailles J, Black CM, and du Bois RM. Bronchoalveolar lavage cellularity. Lone cryptogenic fibrosing alveolitis compared with the fibrosing alveolitis of systemic sclerosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:1474-1482.
23. Giorno R. A comparison of two immunoperoxidase staining methods based on the avidin-biotin interaction. *Diagnostic Immunology* 1984;2:161-166.
24. Falini, B., and C.R. Taylor. New developments in immunoperoxidase techniques and their application. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1983;107:105-17.
25. Borowitz MJ, Crocker BP, Burchete J. Immunocytochemistry detection of lymphocyte surface antigen in fixed tissue sections. *J Histochem Cytochem* 1982;30 :171-176.
26. Giorno R. Technical considerations in immunohistology of lymphoid cell membrane antigens. *Surv Synth Pathol Res* 1984;3:165-170.
27. Maynard JH. Rapid immunoperoxidase staining. *J Histotech* 1984;7:187-195.

28. Naritoku WY, Taylor CR. A comparative study of the use of monoclonal antibodies using three different immunohistochemical methods: An evaluation of monoclonal and polyclonal antibodies against human prostatic acid phosphatase. *J Histochem Cytochem* 1982;30:253-265.
29. Bross, K. J., G. A. Pangalis, C. G. Staats. Demonstration of cell surface antigens and their antibodies by the peroxidase-antiperoxidase method. *Transplantation* 1978;25: 331-334.
30. Ulrich Constabel. Atlas of bronchoalveolar lavage. Edition 1998. *Immunocytology*: 67-69.
31. Turner-Warwick M, Haslam P. The value of serial bronchoalveolar lavages in assessing the clinical progress of patients with cryptogenic fibrosing alveolitis. *Am Rev Respir Dis* 1987;135: 26-34.
32. Kaan PM, Hegele RG, Hayashi S, Hogg JC. Expression of bcl-2 and Epstein-Barr virus LMP1 in lymphocytic interstitial pneumonia. *Thorax* 1997 Jan;52:12-16.
33. Kazufumi M, Sonoko N, Masanori K, Takateru I, Akira O. Expression of bcl-2 protein and APO-1 (Fas antigen) in the lung tissue from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Microsc Res Tech* 1997 Sep 1;38:480-487.
34. Kuwano K, Miyazaki H, Hagimoto N, Hara N. The involvement of Fas-Fas ligand pathway in fibrosing lung diseases. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999 Jan;20:53-60.
35. Domegale-Kulawik J, Droscher P, Kreszewskat I, Chezan R. Expression of Fas antigen in the cells from bronchoalveolar lavage fluid. *Folie Histochem Cytobiol* 2000;38:185-8.

36. Dai H, Guzman J, Costabel U. Increased expression of apoptosis signaling receptors by alveolar macrophages in sarcoidosis. *Eur Respir J* 1999 Jun;13:1451-1454.
37. Kaiser U, Schilli M, Haag U, Havemann K. Expression of bcl-2 protein in small cell lung cancer. *Lung Cancer* 1996 Aug;15:31-40.
38. Kunitake R, Kuwano K, Miyazaki H, Hagimoto N, Nomoto Y, Hara N. Apoptosis in the course of granulomatous inflammatory inflammation in pulmonary sarcoidosis. *Eur Respir J* 1999 Jun;13:1329-37.
39. Agostini C, Zambello R, Sancetta R, Cerutti A, Milani A, Tassinari C, Facco M, Cipriani A, Semenzato G. Expression of Tumor Necrosis Factor-Receptor Superfamily Members by lung T Lymphocytes in interstitial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;Vol 153:1359-1367.
40. Thompson A, Teschler H, Wang Y, Konietzko N, Costabel U. Preparation of bronchoalveolar lavage fluid with microscope slide smears. *Eur Resp J* 1996; 9:603-608.
41. Solabach W, Moll H, Rollinghoff M. Lymphocytes play the music but the macrophage calls the tune. *Immunol Today* 1991;12:4-6.
42. Hunninghake G . Release of interleukin-1 by alveolar macrophages of patients with active pulmonary sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis* 1984;129:569-581
43. Hunninghake G, Crystal R. Pulmonary sarcoidosis: A disorder mediated by excess helper T-lymphocyte activity at sites of disease activity. *New Engl J Med* 1981;305:429-434

44. Muller-Quernheim J, Saltini P, Sondermeyer P, Crystal G. Compartmentalized activation of the interleukin-2 gene by lung T-lymphocytes in active pulmonary sarcoidosis. *J Immunol* 1986;137:3475-3483.
45. Muller-Quernheim J, Pfeifer S, Strausz J, Ferlinz R. Correlation of clinical and immunologic parameters of the inflammatory activity of pulmonary sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis* 1991;144:1322-29.
46. Pinkston P, Bitterman P, Crystal C. Spontaneous release of interleukin-2 by lung T-lymphocytes in active pulmonary sarcoidosis. *New Engl J Med* 1983;308:793-800.
47. Rossi G, Sacco O, Cosulich E. Pulmonary sarcoidosis: excess of T-lymphocytes and T-cell subset imbalance at sites of disease activity. *Thorax* 1984;39:143-49.
48. Rossi G, Sacco O, Cosulich E, Risso A, Balbi B, Ravazzoni C. Helper T-lymphocytes in pulmonary sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis* 1986;133:1086-90.
49. Akbar AN, Salmon M, Savill J, Janossy G. The role of bcl-2 in T cell memory a "balancing act" between cell death and survival. *Immunol Today* 1993;14:256-260.
50. Lenardo MJ. Fas and the art of lymphocyte maintenance. *J Exp Med* 1996;183:721-724.
51. Smith CA, Farrah T, Goodwin RG. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation and death. *Cell* 1994;76:959-62.

52. Alderson MR, Tough TW, Davis-Smith T. Fas ligand mediates activation induced cell death in human T-lymphocytes. *J Exp Med* 1995;181:71-82.
53. Striz I, Zheng L, Wang YM. Soluble CD14 is increased in bronchoalveolar lavage of active sarcoidosis and correlates with alveolar macrophage membrane-bound CD14. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:544-547.
54. Costabel U, Hunninghake G. ATS/ERS/WASOG Statement on Sarcoidosis. *Eur Respir J* 1999;14: 735-737.
55. Costabel U. CD4/CD8 ratios in bronchoalveolar lavage fluid of value for diagnosing sarcoidosis. *Eur Respir J* 1997;10:2699-700.
56. Costabel U. Sarcoidosis: clinical update. *Eur Respir J Suppl* 2001;32:565-568.
57. Costabel U, King T,E. International consensus statement on idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2001;17:163-167.
58. Crystal R, Roberts MC, Hunninghake G, Gadek E, Fulmer D, Line B. Pulmonary sarcoidosis: A disease characterized and perpetuated by activated lung T-lymphocytes. *Ann Intern Med* 1984;94:73-94.
59. Dorscheid DR, Wojcik KR, Sun S, Merroquin B, White SR. Apoptosis of airway epithelial cells induced by corticosteroids. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:1939-47
60. King TE. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Interstitial Lung Disease*. Third edition. Edited by MI Schwarz, TE King. Hamilton, Ontario, Canada, Decker, 1998, pp 597-644.
61. Lagasse E, Weissman IL. Bcl-2 inhibits apoptosis of neutrophils but not their engulfment by macrophages. *J Exp Med* 1994;179:1047-1052.

62. Mermigkis C, Tsakanika K, Polychronopoulos V, Karagianidis N, Mermigkis D, Bouros D. Expression of bcl-2 protein in bronchoalveolar lavage cell populations from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Acta Cytologica* 2001;45:914-918.
63. Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis: Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73:1994, 2013-2026.
64. Kumar S, Lavin MF. The ICE family of cysteine proteases as effectors of cell death. *Cell Death Differ* 3: 1996, 255-267.
65. Koopman G, Reuterlingsperger CPM, Kuijten GM, Keehnen RJ, Pals ST, Van Oers MHJ. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*: 1994, 1415-1420.
66. Salomon R, Diaz-Cano S. Introduction to apoptosis. *Diagn Mol Pathol* 1995: 4, 235-238.
67. Stewart BW. Mechanisms of apoptosis: Integration of genetic, biochemical and cellular indicators. *J Natl Cancer Inst*, 1994:82, 1286-1296.
68. Tsujimoto Y, Croce CM. Analysis of the structure, transcripts and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1986:83,5214-5218.
69. Hockenbery D, Zutter M, Hinckley W. Bcl-2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc. Natl Acad Sci USA* 1991:88,6961-6965.
70. Mc Donnell TJ, Deanne N, Platt FM, Nunez G, Jaeger U, McKearn JP, Korsmeyer SJ. Bcl-2 -immunoglobulin transgenic mice demonstrate

extended B cells survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* 1989: 57,79

71. McDonnell TJ, Korsmeyer SJ. Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14;18). *Nature* 1991;349, 6306-9.
72. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995: 267,1456-1462.
73. Patsuris E, Davaki P, Kapranos N, Davaris P, Papageorgiou K. A study of apoptosis in brain tumors by in situ end-labeling method. *Clinical Neuropathology*, 1996: 15, 337-341.
74. Mundle S, Gao XZ, Khani S, Gregory SA, Preisler HD, Raza A. Two in situ labeling techniques reveal different patterns of DNA fragmentation during spontaneous apoptosis in vivo and induced apoptosis in vitro. *Anticancer Res*, 1995;15, 1895-1904.
75. Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes. *Blood*, 1992: 80, 879-885.
76. Marin MC, Hsu B, Stephens LC, Brisbay S, McDonnell TJ. The functional basis of c-myc and bcl-2 complementation during multistep lymphomagenesis in vivo. *Exp Cell Res*, 1995: 217, 240-252.
77. Batistatou A, Merry DE, Korsmeyer SJ, Green LA. Expression of Bcl-2 proto-oncogene rescues PC12 cells from death caused by withdrawal of trophic support. *J Neurosci.*, 1993: 13, 4422-4434.
78. Negoescu A, Lorimier P, Labat-Moleur F, Drouet C, Robert C, Guillermet C, Brambilla C, Brambilla E. In situ apoptotic cell labeling by TUNEL

- method. Improvement and evaluation on cell preparations. *J Histochem*, 1996: 44, 959-968.
79. Migheli A, Cavala P, Marino S, Schiffer D. A study of apoptosis in normal and pathologic nervous tissue after in situ end labeling of DNA strand breaks. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1994: 606-616.
80. Hockenbery D. Defining apoptosis. *Am J Pathol*, 1995: 146, 16-19.
81. Martinou J, Dubois-Dauphin M, Staple JK, Rondriguez I, Frankowski H, Missotten M, Albertini P, Tabalot D, Catsicas S, Pietra C, Huarte J. Overexpression of bcl-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron*, 1994: 13, 1017-1030.
82. Chiou S, Tseng C, Rao L, White E. Functional complementation of the adenovirus E1B 19-kilodalton protein with bcl-2 in the inhibition of apoptosis in infected cells. *J Virol*, 1994: 68, 6553-72.
83. Blackwood EM, Eisenman RN. Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science* 1991;251:1211-17.
84. Evan GL, Wyllie AH, Gilbert CS. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 1992;69:119-128.
85. Oren M. Relationship of p-53 to the control of apoptotic cell death. *Semin Cancer Biol* 1994; 5:221-27.
86. Shaw PH. The role of p-53 in cell cycle regulation. *Path Res Pract* 1996;192:669-75.
87. Miyashita T, Reed J. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 1995;80:293-99.



88. Henderson S, Rowe M, Rickinson A. Induction of bcl-2 expression by Epstein Barr virus latent membrane protein protects B-cells from programmed cell death. *Cell* 1991;65:1107-1115.
89. Lane S, Wells M. Human papillomaviruses p-53 and cervical neoplasia. *J Pathol* 1994;172:299-301.
90. Mermigkis CH, Tsakanika K, Polychronopoulos V, Karagianidis N, Mermigkis D, Bouros D. Overexpression of bcl-2 on bronchoalveolar lavage lymphocytes and macrophages in sarcoidosis.. *Sarcoidosis, vasculitis and diffuse lung diseases ( Official Journal of WASOG, 1<sup>st</sup> International WASOG Conference on diffuse lung diseases)* 2001;18(Sup.1):31.
91. Folkman J. Angiogenesis inhibitors generated by tumors . *Mol Med* 1995; 1:120-22.
92. Hunninghake GW, Crystal RG. Pulmonary sarcoidosis; a disorder mediated by excess helper T-lymphocyte activity in sites with disease activity. *N Engl J Med* 1981; 305:429-434.
93. Semenzato G, Agostini C, Trentin L. Evidence of cells bearing interleukin-2 receptor at sites of disease activity in sarcoid patients. *Clin Exp Immunol* 1984;57:331-337.
94. Costabel U, Bross KJ, Ruhle KH. Ia-like antigens on T-cells and their subpopulations in pulmonary sarcoidosis and in hypersensitivity pneumonitis. Analysis of bronchoalveolar lavage and blood lymphocytes. *Am Rev Resp Dis* 1985;131:337-342.
95. Costabel U, Zaiss AW, Guzman J. Sensitivity and specificity of BAL findings in sarcoidosis. In: Izumi T, ed. *Proceedings of the 1991 XII World*

- Congress on Sarcoidosis. Milan:Sigilim s.r.l. Edizioni Bongraf, 1992:211-214.
96. Reynolds HY. Bronchoalveolar lavage . Am Rev Resp Dis 1987;135:250-263.
97. Lawrence EC, Teague RB, Gootlieb MS. Serial changes in markers of disease activity with corticosteroid treatment in sarcoidosis. Am J Med 1983;74:747-756.
98. Bjermer L, Rosenhall L, Angstrom T, Hallgren R. Predictive value of bronchoalveolar lavage cell analysis in sarcoidosis. Thorax 1989;43:284-288.
99. Foley MM, Coral AP, Tung K. Bronchoalveolar lavage cell counts as a predictor of short term outcome in pulmonary sarcoidosis. Thorax 1989;44:732-738
100. Johnston IDA, Prescott RJ, Chalmers JC, Rudd RM. British Thoracic Society study of cryptogenic fibrosing alveolitis: current presentation and initial management. Fibrosing Alveolitis Subcommittee of the Research Committee of the British Thoracic Society. Thorax, 1997;52: 38-44.
101. Mannino DM, Etzel RA, Parrish RG. Pulmonary fibrosis deaths in the United States, 1979-1991. An analysis of multiple-cause mortality data. Am J Resp Crit Care Med. 1996; 153: 1548-52.
102. Scott J, Johnston I, Britton J. What causes cryptogenic fibrosing alveolitis? A case control study of environmental exposure to dust. Br Med J. 1990; 301:1015-17.

103. Hubbard R, Lewis S, Richards K, Johnston I, Britton J. Occupational exposure to metal or wood dust and aetiology of cryptogenic fibrosing alveolitis. *Lancet*. 1996; 347:284-9.
104. Iwai K, Mori T, Yamada N, Yamaguchi M, Hosoda Y. Idiopathic pulmonary fibrosis. Epidemiologic approaches to occupational exposure. *Am J Resp Crit Care Med*. 1994;150:670-75.
105. Baumgartner KB, Samet JM, Coutlas DB, Stidley CA, Hunt WC, Colby TV, Waldron JA. Occupational and environmental risk factors for idiopathic pulmonary fibrosis: a multicenter case control study. Collaborating Centers. *Am J Epidemiol*. 2000; 152: 307-15.
106. Jakab GJ. Sequential virus infections, bacterial superinfections, and fibrogenesis. *Am Rev Resp Dis* 1990;142: 374-9.
107. Egan JJ, Woodcock AA, Stewart JP. Viruses and idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Resp J*. 1997;10:1433-7.
108. Vergnon JM, Vincent M, DeThe G, Mornex JF, Weynants P, Brune J. Cryptogenic fibrosing alveolitis and Epstein-Barr virus: an association? *Lancet*. 1984; 2:768-71
109. Egan JJ, Stewart JP, Hasleton PS, Arrand JR, Carroll KB, Woodcock AA. Epstein-Barr virus replication within pulmonary epithelial cells in cryptogenic fibrosing alveolitis. *Thorax*, 1995;50:1234-9.
110. Stewart JP, Egan JJ, Ross AJ, Kelly BG, Lok SS, Hasleton PS. The detection of Epstein-Bar virus DNA in lung tissue from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Resp Crit Care Med*. 1999;159:1336-41.

111. Irving WL, Day S, Johnston ID. Idiopathic pulmonary fibrosis and hepatitis C virus infection. *Am Rev Respir Dis.* 1993;148:1683-84.
112. Bitterman PB, Rennard SI, Keogh BA, Wewers MD, Adelberg S, Crystal RG. Familial idiopathic pulmonary fibrosis. Evidence of lung inflammation in unaffected family members. *N Engl J Med* 1986;314:1343-47.
113. Keogh BA, Crystal RG. Alveolitis: the key to the interstitial lung disorders(Editorial) . *Thorax.* 1982;37:1-10.
114. Adamson IY, Young L, Bowden DH. Relationship of alveolar epithelial injury and repair to the induction of pulmonary fibrosis. *Am J Path.* 1988; 130:377-383.
115. Haslam PL, Turton CW, Heard B, Lukoszek A, Collins JV, Salsbury AJ. Bronchoalveolar lavage in pulmonary fibrosis: comparison of cells obtained with lung biopsy and clinical features. *Thorax.* 1980;35:9-18.
116. Hunninghake GW, Kawanami O, Ferrans VJ, Young RC, Roberts WC, Crystal RG. Characterization of the inflammatory and immune cells in lung parenchyma of patients with interstitial lung disease. *Am Rev Resp Dis.* 1981;123:407-12.
117. Paradis IL, Dauber JH, Rabin BS. Lymphocyte phenotypes in bronchoalveolar lavage and lung tissue in sarcoidosis and idiopathic pulmonary fibrosis. *Am Rev Resp Dis.* 1986; 133:855-60.
118. Rudd RM, Haslam PL, Turner-Warwick M. Cryptogenic fibrosing alveolitis: relationships of pulmonary physiology and bronchoalveolar lavage to treatment and prognosis. *Am Rev Resp Dis.* 1981;124:1-8.

119. Peterson MW, Monick M, Hunninghake GW. Prognostic role of eosinophils in pulmonary fibrosis. *Chest*. 1987;92:51-56.
120. Gharaee-Kermani M, Phan SH. The role of eosinophils in pulmonary fibrosis (Review). *Int J Mol Med* . 1998;1:43-53.
121. Nishimura K, Kitaichi M, Izumi T, Nagai S, Kanaoka M, Itoh H. Usual interstitial pneumonia: histologic correlation with high-resolution CT. *Radiology*. 1992;182:337-42.
122. Wells AU, Rubens MB, du Bois RM, Hansell DM. Functional impairment in fibrosing alveolitis: relationship to reversible disease on thin section computed tomography. *Eur Respir J*. 1997;10:280-85.
123. Kuhn C, Boldt J, King TE, Crouch E, Vartio T, McDonald JA. An immunohistochemical study of architectural remodeling and connective tissue synthesis in pulmonary fibrosis. *Am Rev Resp Dis*. 1989;140:1693-703.
124. Kuhn C, McDonald JA. The roles of myofibroblast in idiopathic pulmonary fibrosis: ultrastructural and immunohistochemical features of sites of active extracellular matrix synthesis. *Am J Pathol*. 1991; 138: 1257-65.
125. Kawanami O, Ferrans VJ, Crystal RG. Structure of alveolar epithelial cells in patients with fibrotic lung disorders. *Lab Invest*. 1982; 46:39-53.
126. Kasper M, Koslowski R, Luther T, Schuh D, Muller M, Wenzel KW. Immunohistochemical evidence for loss of ICAM-1 by alveolar epithelial cells in pulmonary fibrosis. *Histochem Cell Biol*. 1995; 104:397-405.
127. Imokawa S, Sato A, Hayakawa H, Kotani M, Urano T, Takada A. Tissue factor expression and fibrin deposition in the lungs of patients with

- idiopathic pulmonary fibrosis and systemic sclerosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997; 156:631-6.
128. Nash JR, McLaughlin PJ, Butcher D, Corrin B. Expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in cryptogenic fibrosing alveolitis. *Histopathology.* 1993;22:343-347.
129. Uhal BD, Joshi I, Hughes WF, Ramos C, Pardo A, Selman M. Alveolar epithelial cell death adjacent to underlying myofibroblasts in advanced fibrotic human lung. *Am J Physiol.* 1998;275:1192-9.
130. Wang R, Ramos C, Joshi I, Zagariya A, Pardo A, Selman M. Human lung myofibroblast-derived inducers of alveolar epithelial apoptosis identified as angiotensin peptides. *Am J Physiol.* 1999;277:1158-64.
131. Kuwano K, Kunitake R, Kawasaki M, Nomoto Y, Hagimoto M, Nakanishi Y. P21Waf1/Cip1/Sdi1 and p53 expression in association with DNA strand breaks in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;154:477-83.
132. Raghu G, Striker LJ, Hudson LD, Striker GE. Extracellular matrix in normal and fibrotic human lungs. *Am Rev Respir Dis.* 1985; 131: 281-289.
133. Selman M, Montano M, Ramos C, Chapela R. Concentration, biosynthesis and degradation of collagen in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax.* 1986; 41:355-9.
134. Crouch E. Pathobiology of pulmonary fibrosis. *Am J Physiol.* 1990;259: 159-84.
135. Ramos C, Montano M, Garcia-Alvarez J, Ruiz V, Uhal BD, Selman M, Pardo A. Fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis and normal lungs

- differ in growth rate, apoptosis and tissue inhibitor of metalloproteinases expression. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 24: 591-8.
136. Desmouliere A, Redard M, Darby I, Gabiani G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol.* 1995;146:55-66.
137. Lappi-Blanco E, Sioni Y, Paakko P. Apoptotic activity is increased in the newly formed fibromyxoid connective tissue in bronchiolitis obliterans organizing pneumonia. *Lung.* 1999; 177:367-76.
138. Tan A, Levrey H, Dahm C, Polunovsky VA, Rubins J, Bitterman PB. Lovostatin induces fibroblast apoptosis in vitro and in vivo. A possible therapy for fibroproliferative disorders. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;159:220-227.
139. Barbas-Filho JV, Ferreira MA, Sesso A, Kairalla RA, Carvalho CR, Capelozzi VL. Evidence of type II pneumocyte apoptosis in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)/usual interstitial pneumonia (UIP). *J Clin Pathol* 2001;2:132-8.
140. Domegala-Kulawik J, Droszcz P, Kraszewska I, Chazan R. Expression of Fas antigen in the cells from bronchoalveolar lavage fluid (BALF). *Folia Histochem Cytobiol* 2000;38:185-8.
141. Maeyama T, Kuwano K, Kawasaki M, Kunitake R, Hagimoto N, Matsuba T, Yoshimi M, Inoshima L, Yoshida K, Hara N. Upregulation of Fas-signalling molecules in epithelial cells from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2001; 17:180-9.

142. Hedden HL, Henke CA. Induction of lung fibroblast apoptosis by soluble fibronectin peptides. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:1553-60.
143. Rehman I, MacNee N. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur Respir J* 2000;16:534-54.
144. Wang R, Ibarra-Sunga O, Verlinski L, Pick R, Uhal BD. Abrogation of bleomycin-induced epithelial apoptosis and lung fibrosis by captopril or by caspase inhibitor. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279: 142-152.
145. Kuwano K, Kawasaki M, Maegam T, Hagimoto N, Nakamura N, Shirakama K, Hara N. Soluble Fas and Fas-ligand in BAL fluid from patients with pulmonary fibrosis and bronchiolitis obliterans organizing pneumonia. *Chest* 2000; 118: 451-8.
146. Aoshiba K, Yesnis S, Tamaoki J, Negai A. The Fas/Fas-ligand system is not required for bleomycin induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:695-700.
147. Kuwano K, Hagimoto N, Tanaka T, Kawasaki M, Kunitake R, Miyazaki H, Kaneko Y, Matsuba T, Maegama T, Hara N. Expression of apoptosis-regulatory genes in epithelial cells in pulmonary fibrosis in mice. *J Pathol* 2000; 190:221-9.
148. Kuwano K, Hagimoto N, Tanaka T, Kawasaki M, Kunitake R, Miyazaki H, Kaneko Y, Matsuba T, Maegama T, Hara N. Expression of B7-1, B7-2 and interleukin-12 in anti-Fas antibody-induced pulmonary fibrosis in mice. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 119:112-15.



149. Kuwano K, Hagimoto N, Tanaka T, Kawasaki M, Kunitake R, Miyazaki H, Kaneko Y, Matsuba T, Maegama T, Hara N. Essential roles of Fas-Fas ligant pathway in the development of pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 1999;104:13-19.
150. Kuwano K, Miyazaki H, Hagimoto N, Kawasaki M, Fujita M, Kunitake R., Hara N. The involvement of Fas-Fas ligant pathway in fibrosing lung Diseases. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20:53-60.
151. Chepman HA . A Fas pathway to pulmonary fibrosis. *J Clin I Invest* 1999;104:1-2.
152. Kuwano K, Nomoto Y, Kunitake R. Detection of adenovirus E1A DNA in pulmonary fibrosis using nested polymerase chain reaction. *Eur Resp J* 1997;10:1445-49.
153. Hagimoto N, Kuwano K, Nomoto Y, Kunitake R, HaraN. Apoptosis and expression of Fas/Fas ligant Mrna in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;16:91-101.
154. Saita N, Yamanaka T, Kohrogi H, Matsumoto M, Suga M, Ando M, Hirashima M. Expression of apoptosis-related antigen on eosinophils in chronic eosinophilic pneumonia. *Int Arch Allergy Immunol* 1997;114;64-66.
155. McClintock DS, Santore MT, Lee VY, Brunelle J, Budinger GR, Zong WX, Thompson CB, Hay N, Chandel NS. Bcl-2 family members and functional electron transport chain regulate oxygen deprivation-induced cell death. *Mol Cell Biol* 2002;22 ;94-104.
156. Rutherford RM, Kehren J, Staedtler F, Chibout SD, Egan JJ, Tamm M, Gilmartin JJ, Brutsche MH. Functional genomics in sarcoidosis-reduced or increased apoptosis. *Swiss Med WKLY* 2001;131:459-470.

157. Wang Y, Zhou Q, Liu J, Zhang W, Jing H, Liu L, Chen J. Transcriptional expression of apoptosis suppression gene bcl-2 in non-small cell lung carcinoma. *Zhonghua Yi Xue Chuan Xue Za Zhi* 2000;17:262-65.
158. Usiki J, Horiba K, Chu SC, Moss J, Ferrans VJ. Immunohistochemical analysis of protein of the Bcl-2 family in pulmonary lymphangiomatosis: association of bcl-2 expression with hormone receptor status. *Arch Pathol Lab Med* 1998;122:895-902.
159. Barry BA, Benhke CA, Eastman A. Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin and other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. *Biochem Pharmacol* 1990;40: 2353-2362.
160. Kennedy MM, Lamb D, King G, Kerr KM. Cell proliferation , cell loss and expression of bcl-2 in human pulmonary neoplasms. *Br J Cancer* 1997;75:545-47.
161. Reed JC. Regulation of apoptosis by bcl-2 family proteins and its role in cancer and chemoresistance. *Curr Opin Oncol* 1995;7:541-546.
162. Carton P, Moreau C, Oliver L, Verlette FM. Involvement of the N-terminus of bax in its intracellular localization and function. *FEBS Lett* 2002;512: 95-100.
163. Yokoyama T, Tanahashi M, Kobayashi Y, Yamakawa Y, Fujii Y. The expression of Bcl-2 family proteins ( bcl-2,bax,Bcl-x,Bak) in human lymphocytes. *Immunol Lett* 2002;81:107-113.
164. Martin S, Toquet C, Oliver L, Vallete FM. Expression of bcl-2, bax,bcl-xl in human gliomas *J Neurooncol* 2001;52:129-39.

165. Gajkowska B, Motyl T, Gniadecki R, Korokiewisz M. Structural association of bax with nuclear matrix and cytomatrix revealed by embedment-free immunogold electron microscopy. *Cell Biol* 2000;24: 649-50.
166. Agostini C, Perin A, Semenzato G. Cell apoptosis and granulomatous lung diseases. *Curr Opin Pulm Med* 1998;4:261-6.
167. Pabst R, Schuster M, Tschernig T. Lymphocyte dynamics in the pulmonary microenvironment: implications for the pathophysiology of pulmonary sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 1999;16:197-202.
168. Herry I, Bonay M, Bouchonnet F, Schuller MP, Lecossier D, Tazi A, Lynch DM, Hance AJ. Extensive apoptosis of lung T-lymphocytes maintained in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996;15: 339-47.
169. Cree IA, Nurbhai S, Milne G, Beck JB. Cell death in granulomata: the role of apoptosis. *J Clin Pathol* 1987;40: 1314-9.
170. Augusti C, Xaubet A, Luburich P. Computed tomography-guided bronchoalveolar lavage in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* 1996;51:841-845.
171. Laviolette M, La Forge G, Tennina S, Boulet LP. Prognostic value of bronchoalveolar lavage lymphocyte count in recently diagnosed pulmonary sarcoidosis. *Chest* 1991;100:380-84.

## ΠΙΝΑΚΕΣ

Ασθενείς A/a	Ηλικία (Έτη)	Φύλο (Α: Άρρεν Θ: Θήλυ)	Ακτινολο- γικό στάδιο νόσου	Κάπνισμα (Κ:Καπνιστές ΜΚ:Μη καπνιστές)	Συνοπάρχοντα νοσήματα	Λαμβανόμενα φάρμακα
1	22	Θ	1	ΜΚ	-	-
2	43	Θ	2	Κ	Σιδηροπενική αναιμία	Ferrum
3	58	Θ	2	ΜΚ	Επιληψία	Epanutin, Tegretol
4	25	Α	1	Κ	-	-
5	45	Α	1	Κ	-	-
6	50	Θ	1	ΜΚ	-	-
7	31	Α	1	ΜΚ	-	-
8	37	Α	1	Κ	-	-
9	42	Α	2	Κ	-	-
10	20	Α	1	ΜΚ	-	-
11	24	Α	1	ΜΚ	-	-
12	40	Θ	1	ΜΚ	Θυροειδοπάθεια	T3
13	39	Θ	1	Κ	-	-
	ΜΤ: 37 έτη	Α:54% Θ:46%		Κ:54% ΜΚ:46%		

Πίνακας 1: Δημογραφικά στοιχεία ασθενών με σαρκοείδωση.

Ασθενείς Α/α	Ηλικία (Έτη)	Φύλο (Α: Άρρεν Θ: Θήλυ)	Κάπνισμα (Κ: Καπνιστές ΜΚ: Μη καπνιστές)	Συνοπάρχοντα νοσήματα	Λαμβανόμενα φάρμακα
1	70	Θ	ΜΚ	Οστεοπόρωση	–
2	71	Α	ΜΚ	Στεφανιαία νόσος	Monosordil
3	65	Α	Κ	–	–
4	75	Α	ΜΚ	Υπέρταση	Norvasc
5	68	Α	ΜΚ	–	–
6	74	Α	Κ	Στεφανιαία νόσος, κολπική μαρμαρυγή	Digoxin, Frumil
7	63	Α	Κ	–	–
8	62	Θ	ΜΚ	Πεπτικό έλκος	Zantac
9	60	Α	Κ	–	–
10	69	Α	Κ	–	–
11	66	Α	Κ	Σακχαρώδης διαβήτης	Diamicron
12	73	Α	Κ	Κήλη μεσοσπονδυλίου (ΟΜΣΣ)	–
13	67	Α	Κ	ΧΑΠ	Berivent
14	78	Α	Κ	Στεφανιαία νόσος	Pancoran
15	57	Α	Κ	–	–
	ΜΤ: 68 έτη	Α: 87% Θ: 13%	Κ: 62% ΜΚ: 38%		

**Πίνακας 2:** Δημογραφικά στοιχεία ασθενών με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση

Ασθενείς Α/α	Ηλικία (Έτη)	Φύλο (Α:Άρρεν Θ: Θήλυ)	Κάπνισμα (Κ:Καπνιστές ΜΚ:Μη καπνιστές)	Συνοπάρχοντα νοσήματα	Λαμβανόμενα φάρμακα
1	34	Α	ΜΚ	–	–
2	70	Θ	ΜΚ	Γαστρίτις	–
3	52	Α	ΜΚ	–	–
4	41	Α	ΜΚ	–	–
5	37	Θ	ΜΚ	–	–
6	27	Α	ΜΚ	–	–
7	45	Θ	ΜΚ	Υπέρταση	Zestril
8	24	Α	ΜΚ	–	–
9	37	Α	ΜΚ	–	–
10	63	Α	ΜΚ	–	–
	ΜΤ: 43 έτη	Α:77% Θ:23%	ΜΚ:100%		

**Πίνακας 3 :** Δημογραφικά στοιχεία ατόμων ομάδος ελέγχου.

	Ολικός αριθμός κυττάρων (ανά ml)	Μακροφάγα (%)	Λεμφοκύτταρα (%)	Πολυμορφοπύρρηνα (%)	Ηωσινόφιλα (%)
Ασθενείς με σαρκοείδωση	20,2±2,3 X 10 <sup>4</sup>	58,2 ± 4,6	38,5 ± 4,9	2,4 ± 1,3	0,9 ± 1,2
Φυσιολογικά άτομα	12±1 X 10 <sup>4</sup>	85,3 ± 1	12,6 ± 1	1,6 ± 0,6	< 0,5

**Πίνακας 4:** Κυτταρικοί πληθυσμοί (ποσοστιαίες αναλογίες) στο BAL ασθενών με σαρκοείδωση και φυσιολογικών ατόμων.

	Ολικός αριθμός κυττάρων (ανά ml)	Μακροφάγα (%)	Λεμφοκύτταρα (%)	Πολυμορφοπύρρηνα (%)	Ηωσινόφιλα (%)
Ασθενείς με ΙΠΙ	22,4 ± 2,5 X 10 <sup>4</sup>	51,9 ± 15,7	10,7 ± 2,9	26,7 ± 11,5	10,6 ± 6,2
Φυσιολογικά άτομα	12±1 X 10 <sup>4</sup>	85,3 ± 1	12,6 ± 1	1,6 ± 0,6	< 0,5

**Πίνακας 2 :** Κυτταρικοί πληθυσμοί (ποσοστιαίες αναλογίες) στο BAL ασθενών με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση (ΙΠΙ) και φυσιολογικών ατόμων.

	Μακροφάγα (%)	Λεμφοκύτταρα (%)	Πολυμορφοπύρρηνα (%)	Ηωσινόφιλα (%)
Ασθενείς με σαρκοείδωση	77,4 ± 8,9	80,7 ± 8,5	< 1	< 1
Φυσιολογικά άτομα	19,6 ± 7,6	32,2 ± 3,8	< 1	< 1

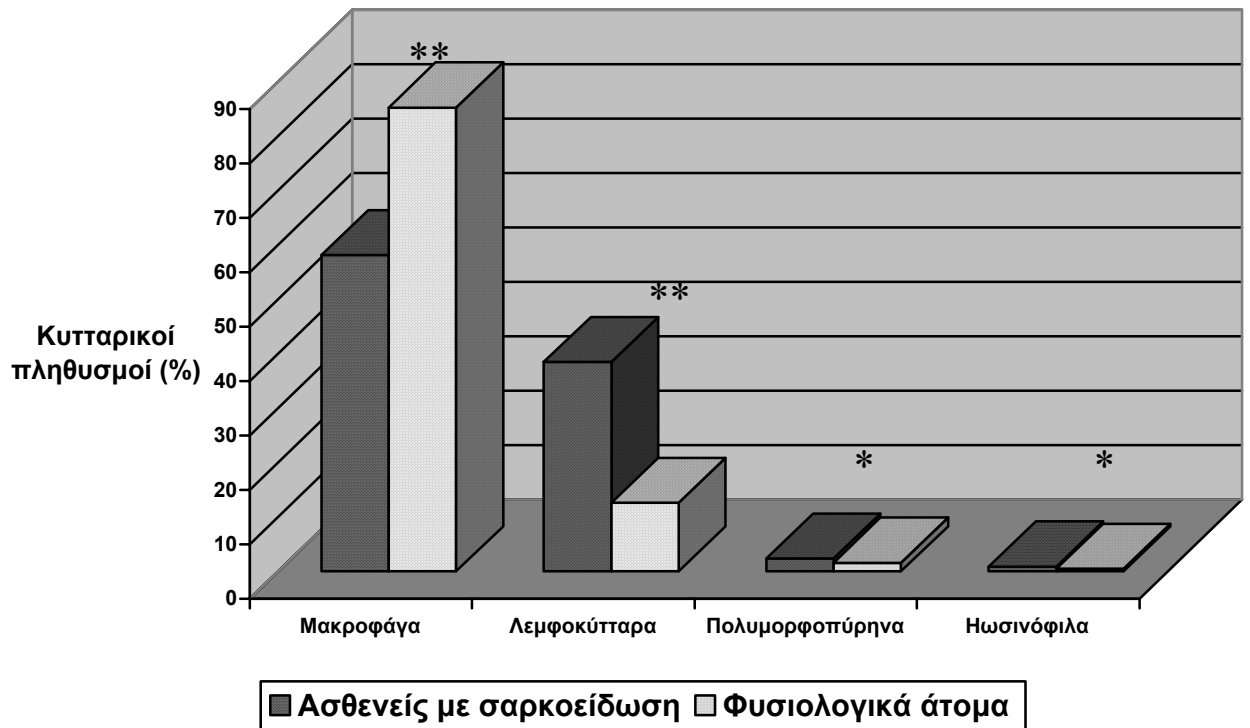
**Πίνακας 3 :** Έκφραση πρωτεΐνης bcl-2 (ποσοστιαίες αναλογίες) επί των κυτταρικών πληθυσμών του BAL ασθενών με σαρκοείδωση και φυσιολογικών ατόμων.

	Μακροφάγα (%)	Λεμφοκύτταρα (%)	Πολυμορφοπύρρηνα (%)	Ηωσινόφιλα (%)
Ασθενείς με ΙΙΙ	22,5 ± 7,4	<1	82,5 ± 7,1	65,5 ± 10,4
Φυσιολογικά άτομα	19,6 ± 7,6	32,2 ± 3,8	< 1	< 1

**Πίνακας 4 :** Έκφραση πρωτεΐνης bcl-2 (ποσοστιαίες αναλογίες) επί των κυτταρικών πληθυσμών του BAL ασθενών με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση και φυσιολογικών ατόμων.



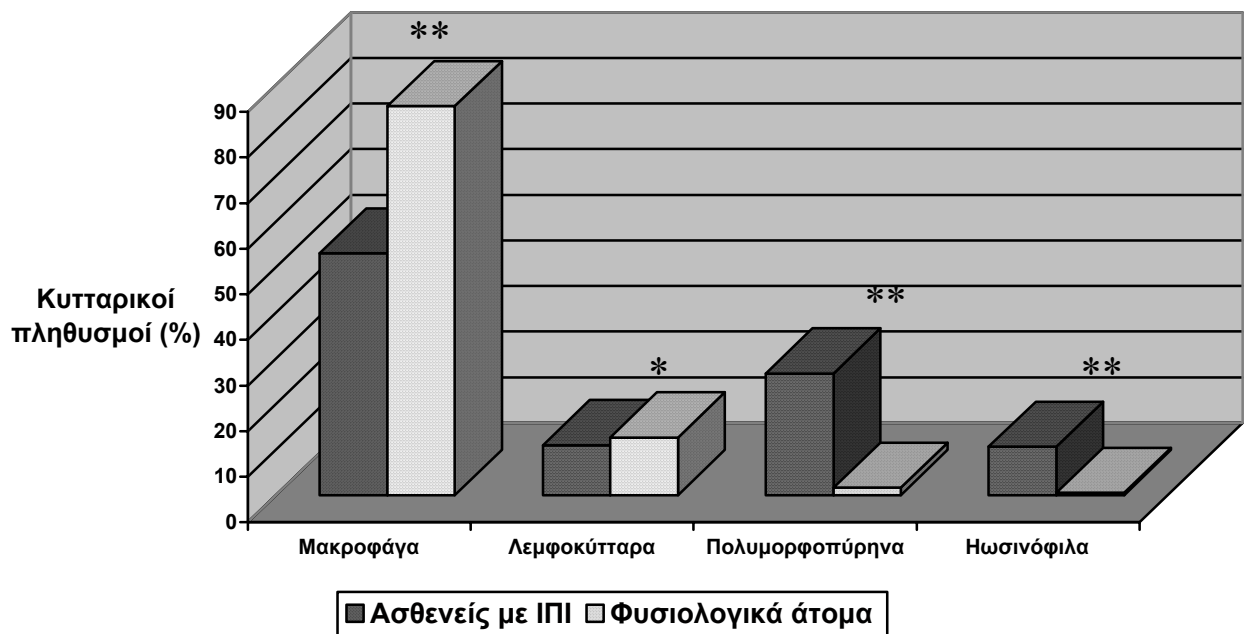
## ΓΡΑΦΗΜΑΤΑ



**Γράφημα 1:** Κυτταρικοί πληθυσμοί (ποσοστιαίες αναλογίες) στο BAL ασθενών με σαρκοείδωση και φυσιολογικών ατόμων.

\* :  $p < 0,10$

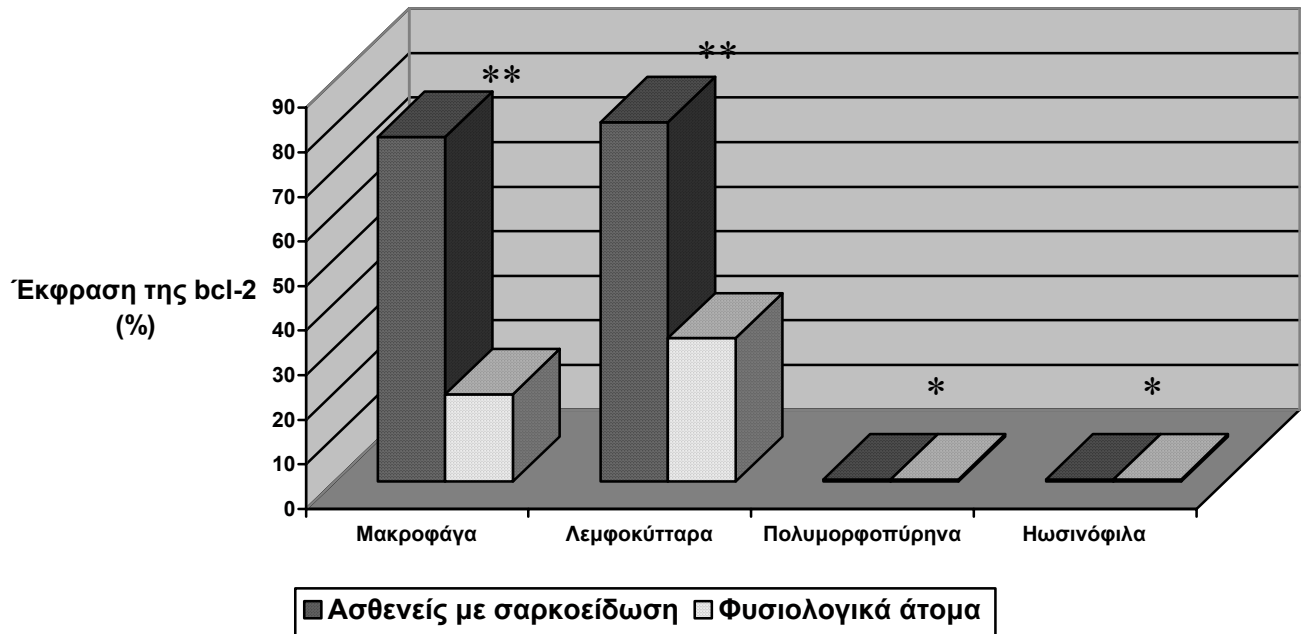
\*\* :  $p < 0,001$



**Γράφημα 2:** Κυτταρικοί πληθυσμοί (ποσοστιαίες αναλογίες) στο BAL ασθενών με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση (ΙΠΙ) και φυσιολογικών ατόμων.

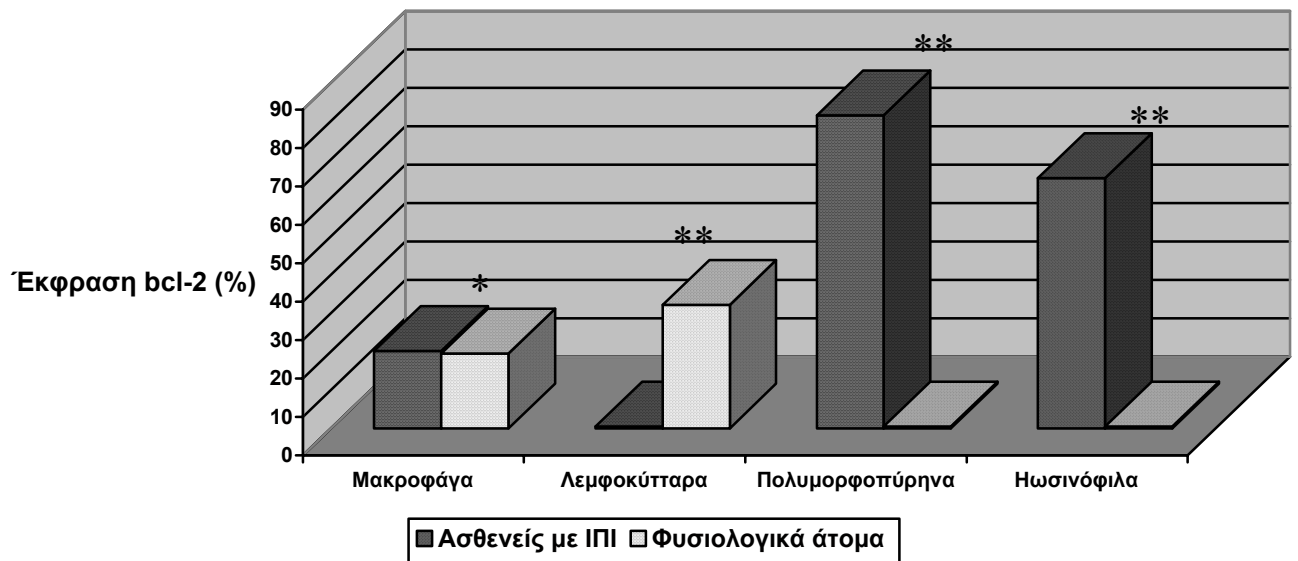
\* :  $p < 0,10$

\*\* :  $p < 0,001$



**Γράφημα 3 :** Έκφραση της πρωτεΐνης bcl-2 στους κυτταρικούς πληθυσμούς του BAL ασθενών με σαρκοείδωση και φυσιολογικών ατόμων.

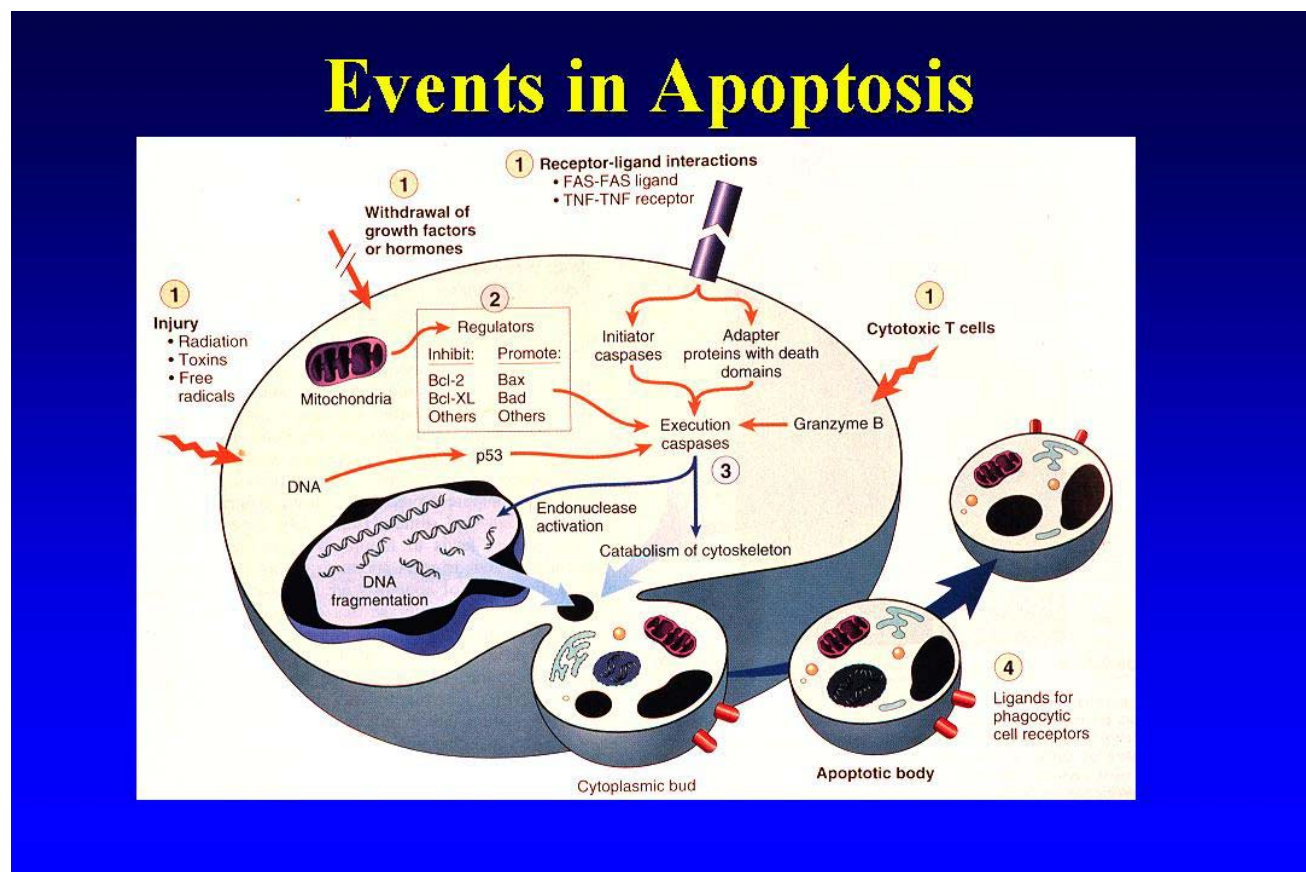
\* :  $p < 0,10$       \*\* :  $p < 0,001$



**Γράφημα 4 :** Έκφραση της πρωτεΐνης bcl-2 στους κυτταρικούς πληθυσμούς του BAL ασθενών με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση (ΙΠΙ) και φυσιολογικών ατόμων.

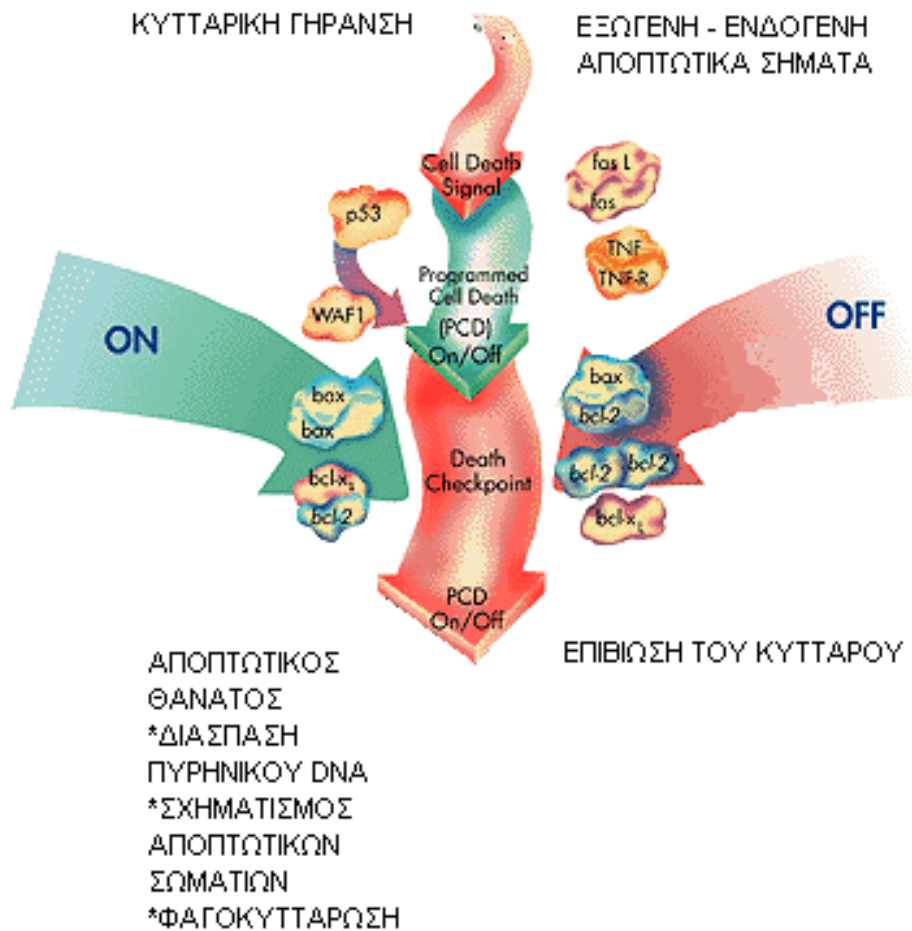
\* :  $p < 0,10$       \*\* :  $p < 0,001$

## ΕΙΚΟΝΕΣ



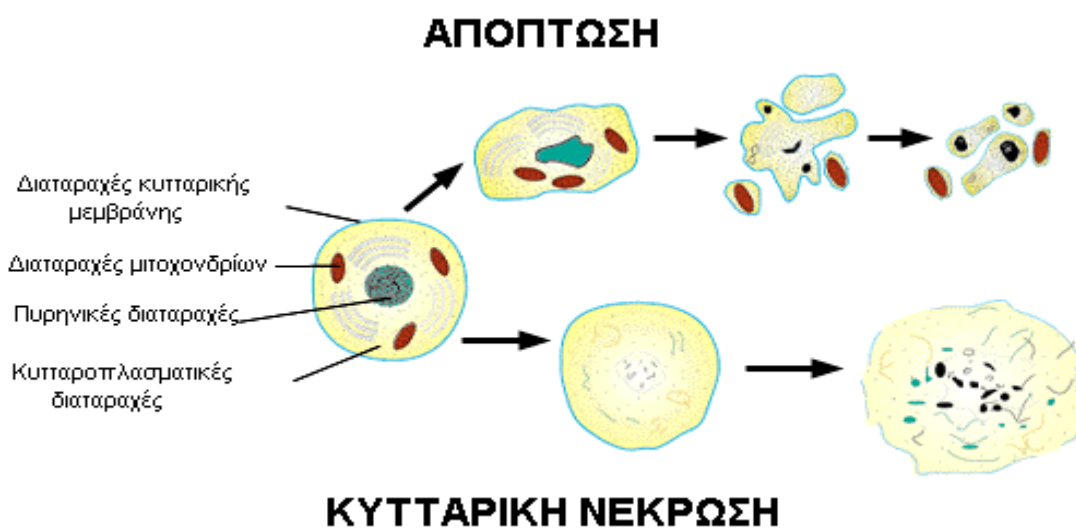
### ΕΙΚΟΝΑ 1:

Σχηματική παράσταση σταδίων αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου και παραγόντων που σχετίζονται με την επέλευση αυτού.



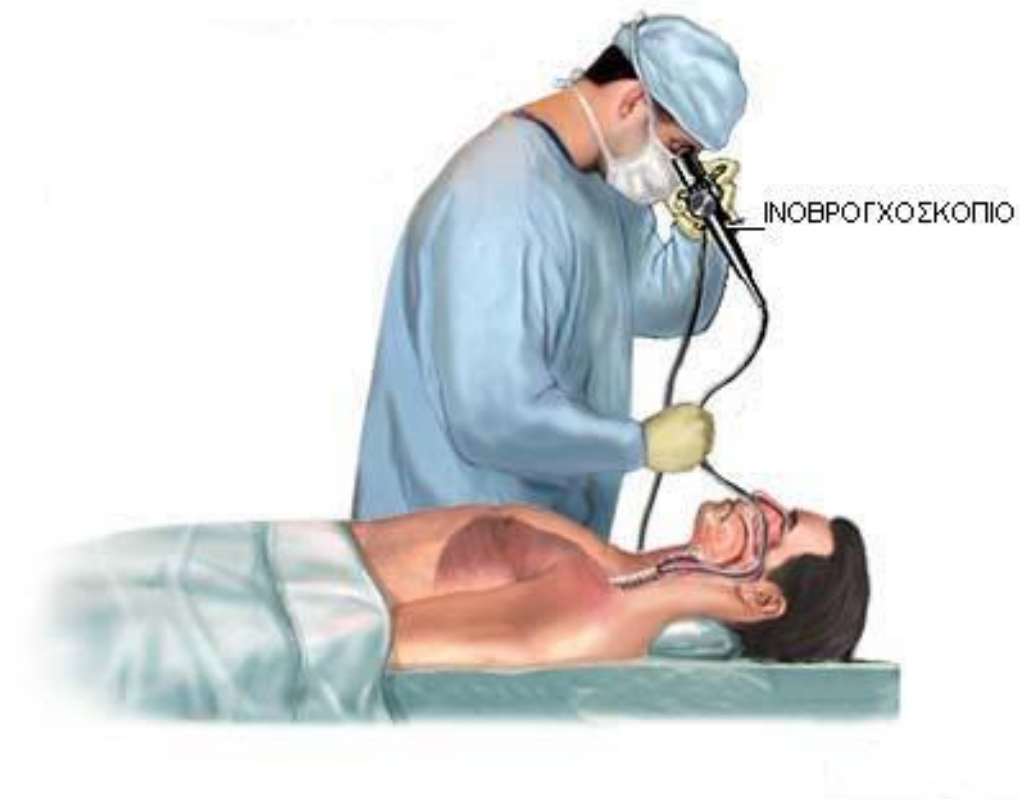
**ΕΙΚΟΝΑ 2:**

Επίδραση της οικογένειας BCL-2 και άλλων αποπτωτικών παραγόντων στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο.

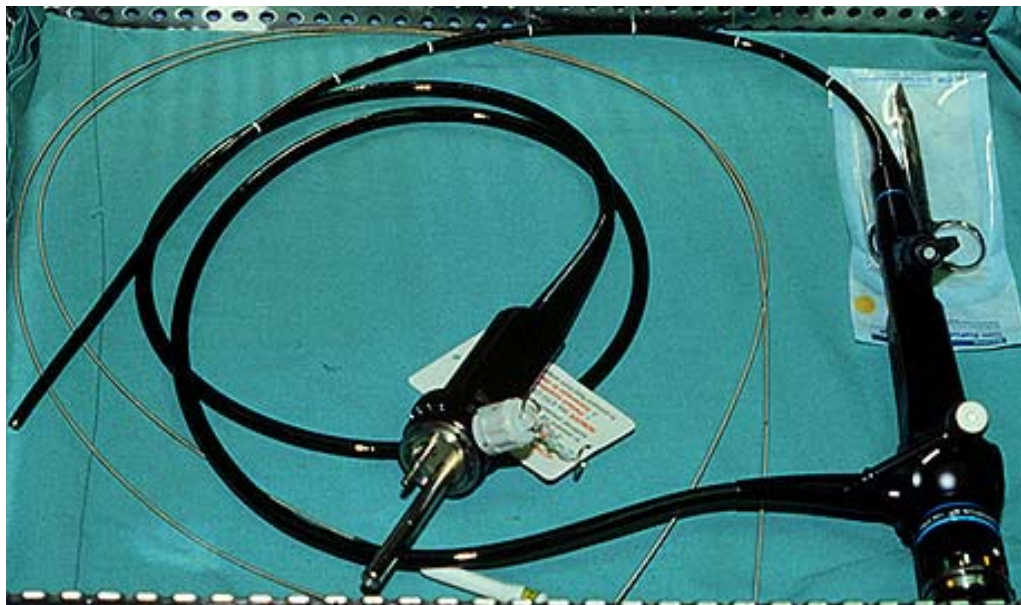


**ΕΙΚΟΝΑ 3:**

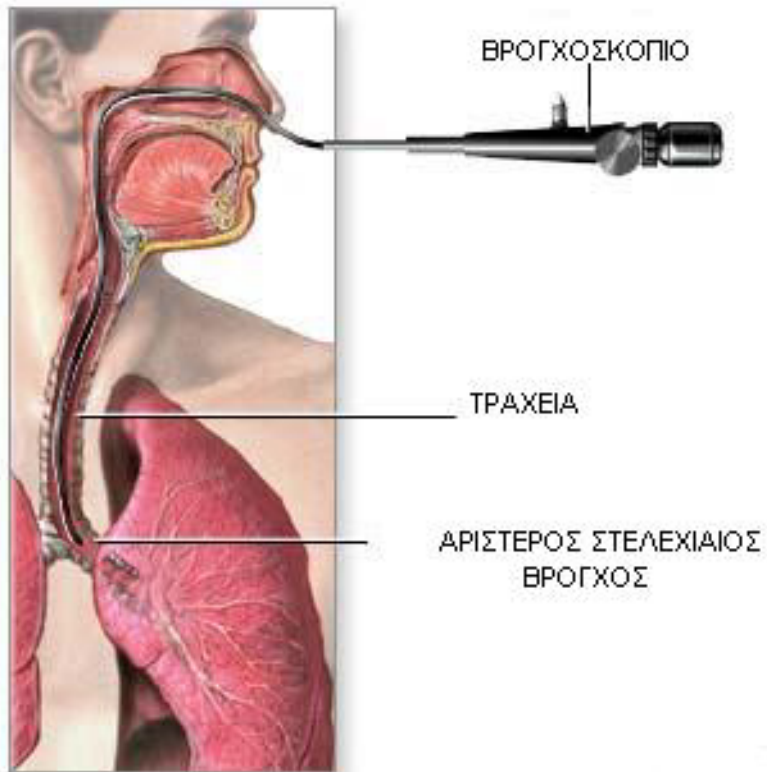
Μορφολειτουργικές διαφορές αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου και κυτταρικής νέκρωσης.



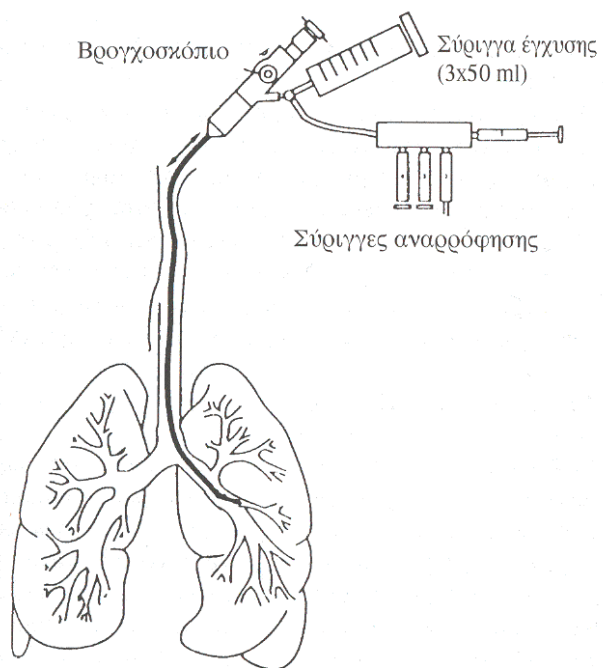
**ΕΙΚΟΝΑ 4 :**  
Βρογχοσκόπηση ασθενούς με εύκαμπτο ινοβρογχοσκόπιο.



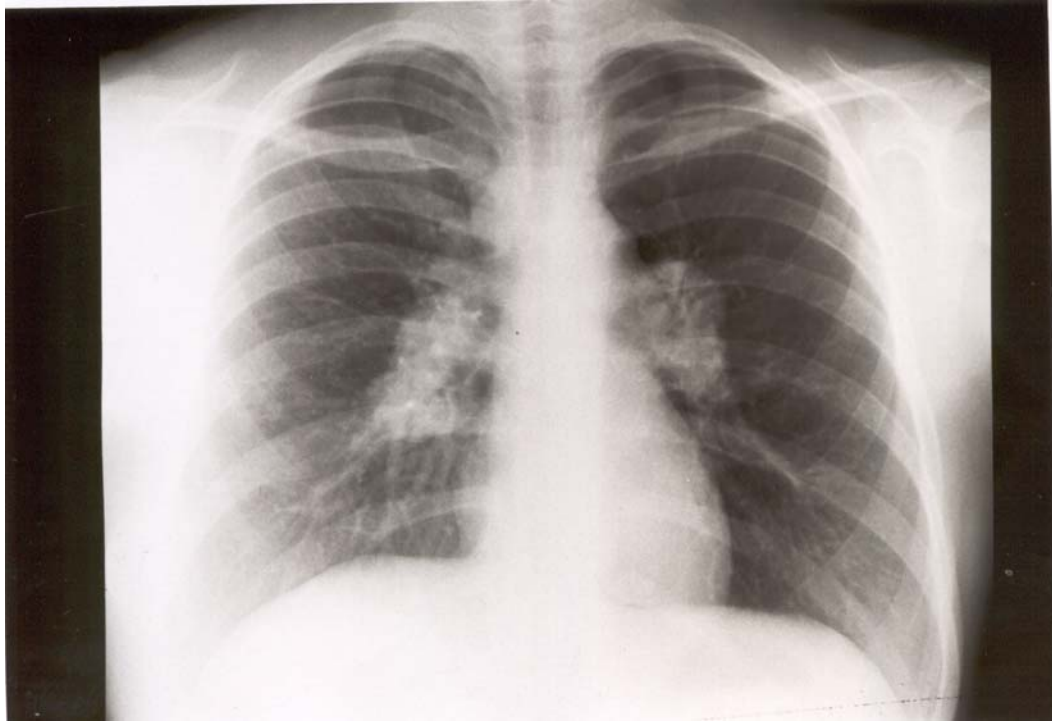
**ΕΙΚΟΝΑ 5:**  
Εύκαμπτο ινοβρογχοσκόπιο.



**ΕΙΚΟΝΑ 6:**  
Διαρινική είσοδος βρογχοσκοπίου.



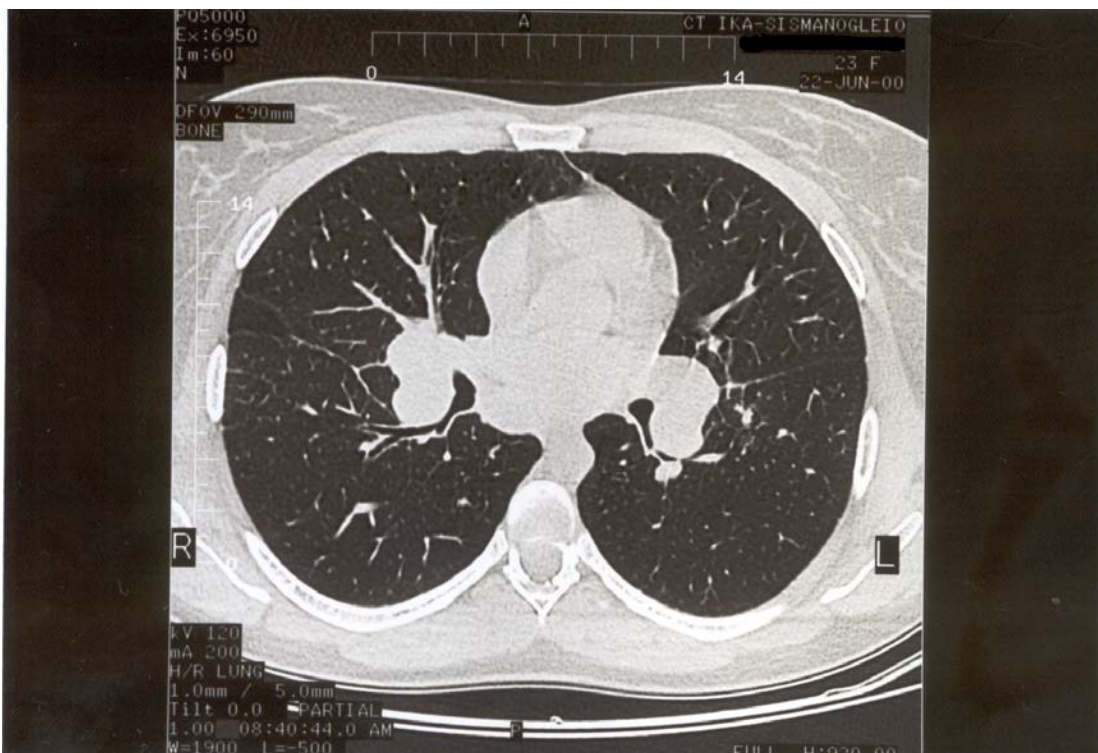
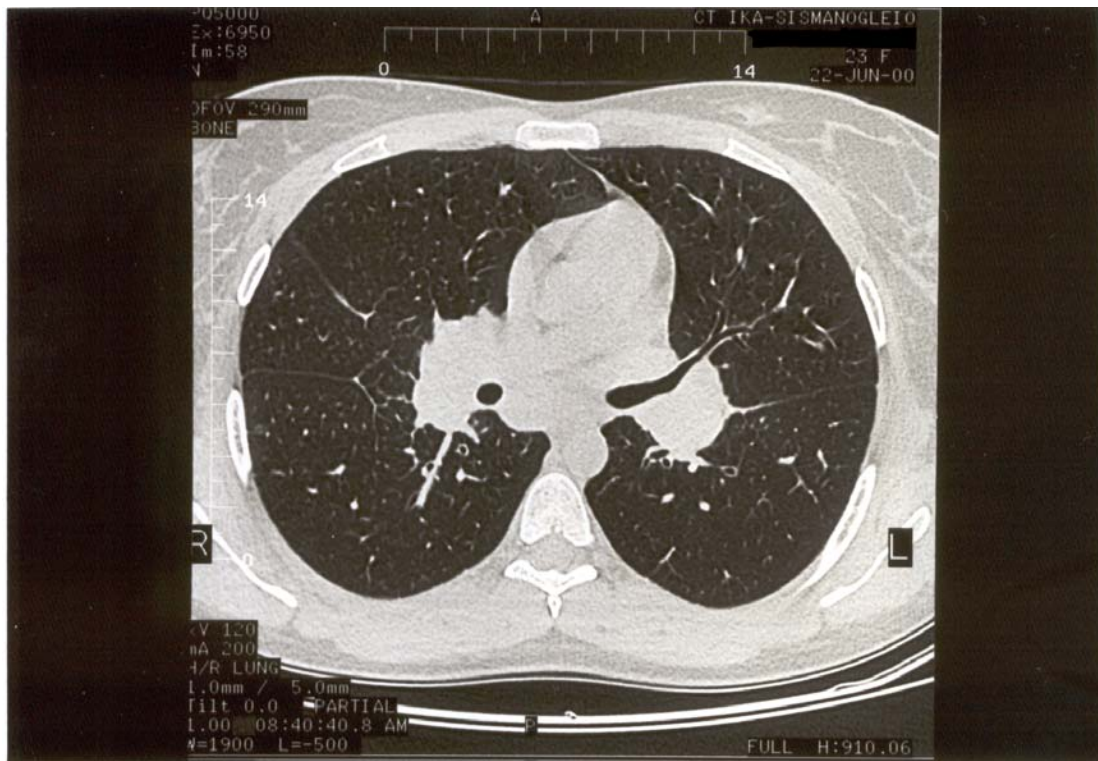
**ΕΙΚΟΝΑ 7:**  
Τεχνική λήψεως BAL.



**ΕΙΚΟΝΑ 8:**  
Ακτινογραφία θώρακος ασθενούς με σαρκοείδωση σταδίου 1. Παρουσία αμφοτερόπλευρης διόγκωσης πυλαίων και μεσοθωρακικών λεμφαδένων χωρίς ακτινολογική επινέμεση του πνευμονικού παρεγχύματος.



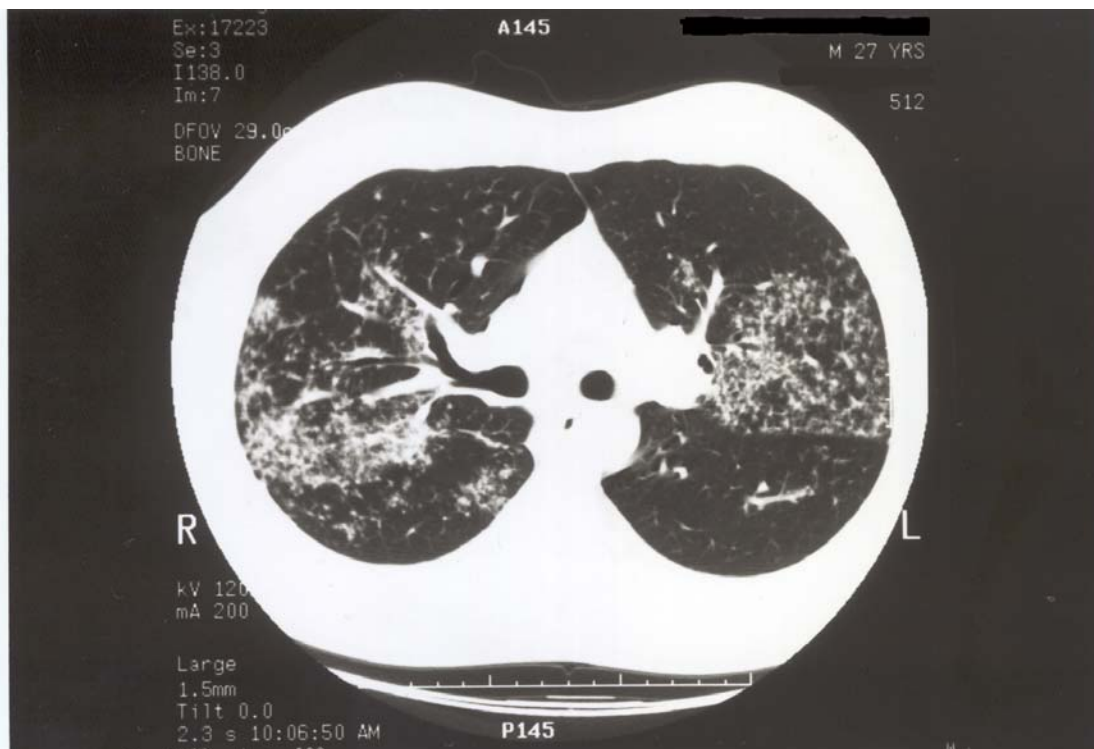
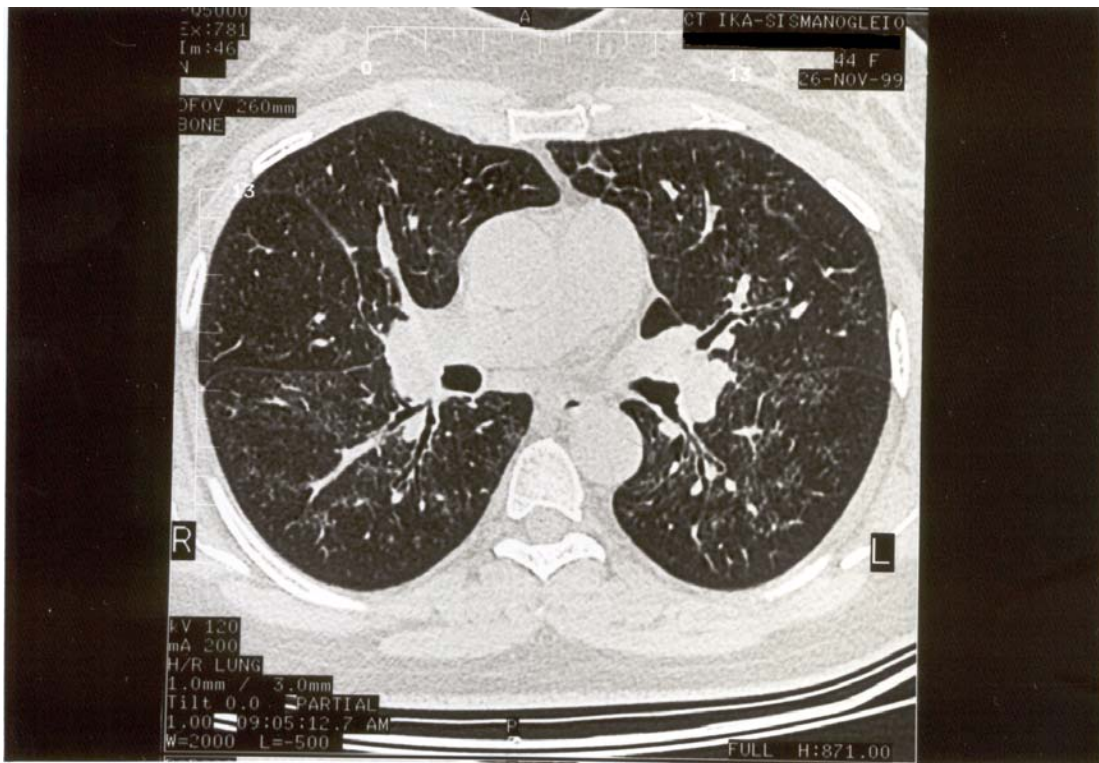
**ΕΙΚΟΝΑ 9:**  
Ακτινογραφία θώρακος ασθενούς με σαρκοείδωση σταδίου 2. Παρουσία αμφοτερόπλευρης διόγκωσης πυλαίων λεμφαδένων με ταυτόχρονη προσβολή του πνευμονικού παρεγχύματος(διαμέσου και κυψελιδικού τύπου σκιάσεις).



**ΕΙΚΟΝΑ 10:**

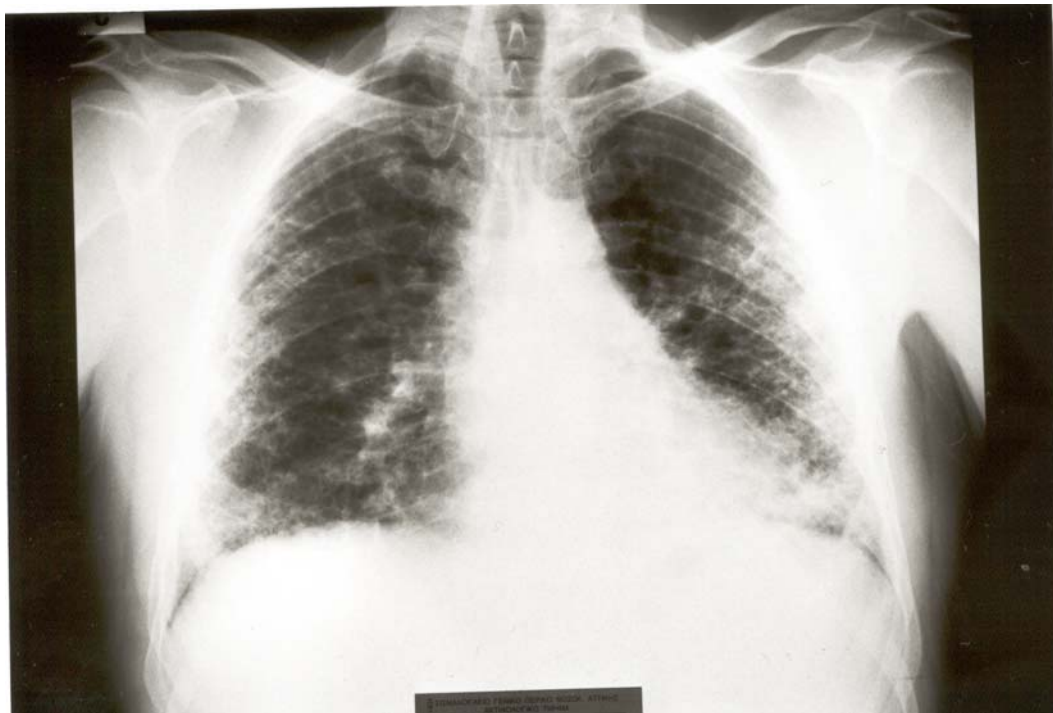
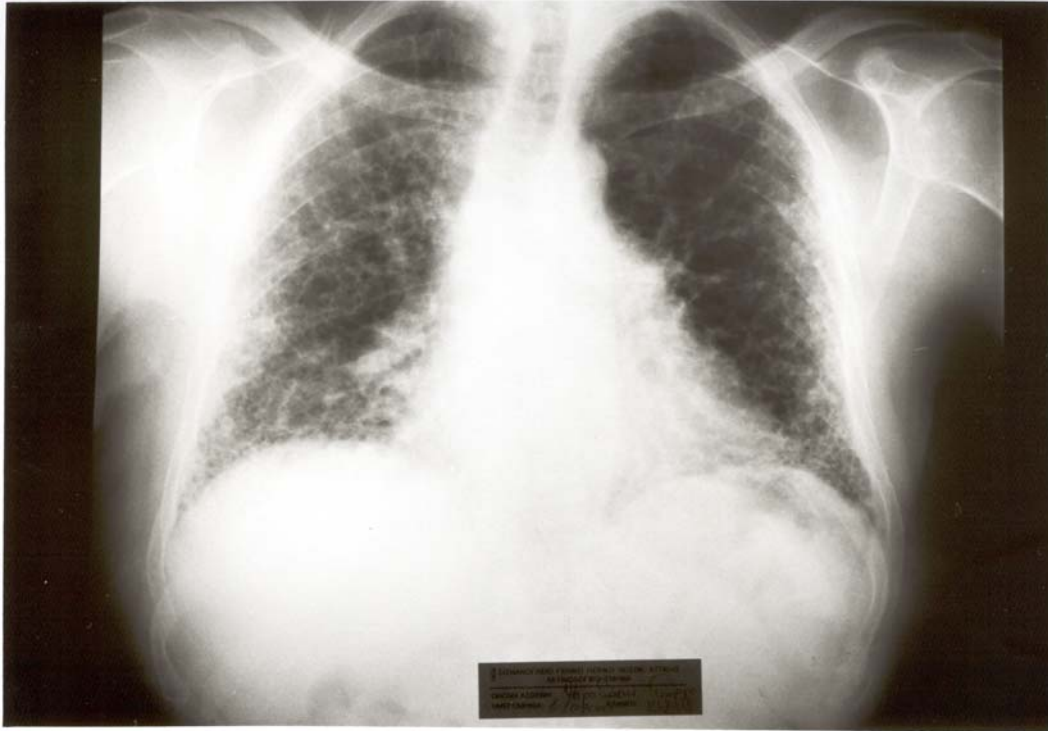
Αξονικές τομογραφίες θώρακος ασθενούς με σαρκοειδωση σταδίου 1. Διακρίνεται αμφοτερόπλευρη διόγκωση πυλαίων λεμφαδένων και απουσία προσβολής του πνευμονικού παρεγχύματος.





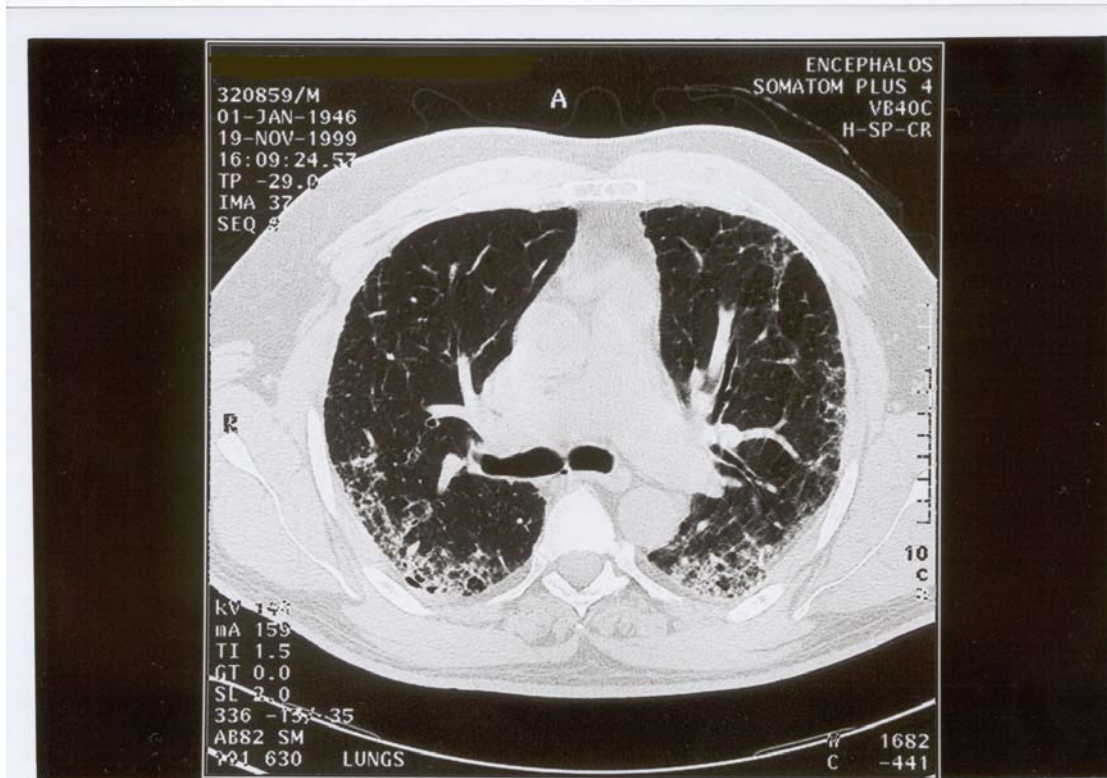
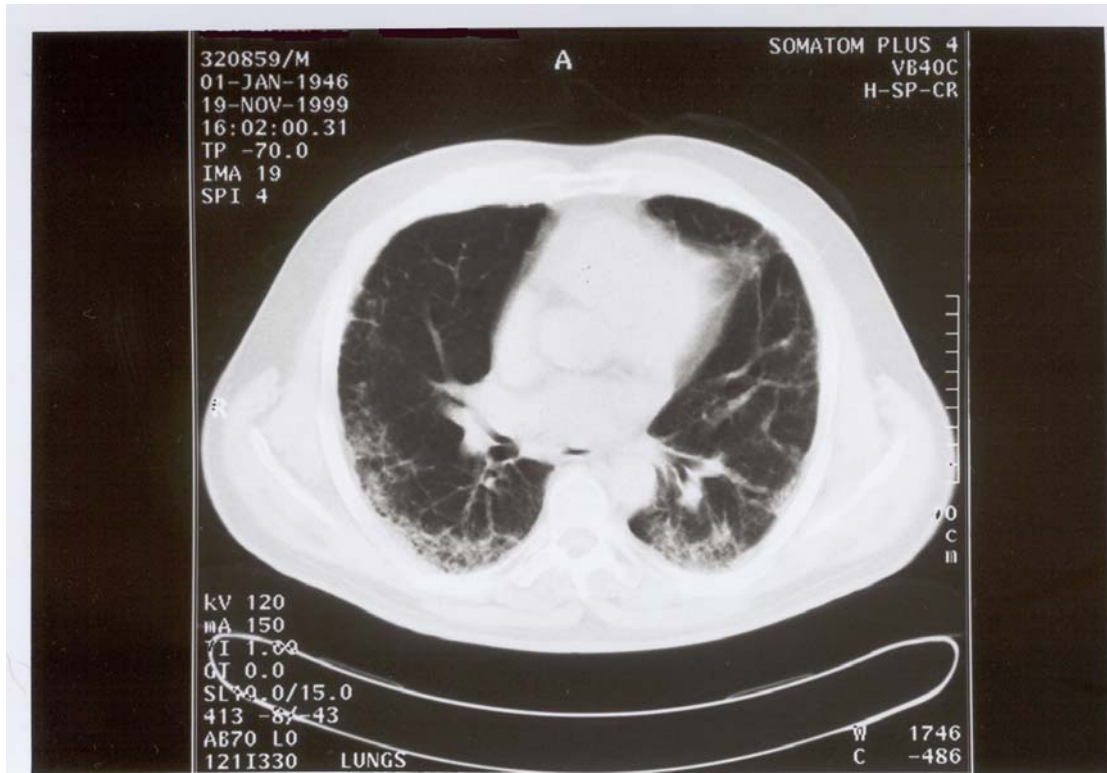
**ΕΙΚΟΝΑ 11:**

Αξονικές τομογραφίες θώρακος ασθενών με σαρκοείδωση σταδίου 2. Διακρίνεται αμφοτερόπλευρη διόγκωση πυλαίων λεμφαδένων και ταυτόχρονη προσβολή του πνευμονικού παρεγχύματος.

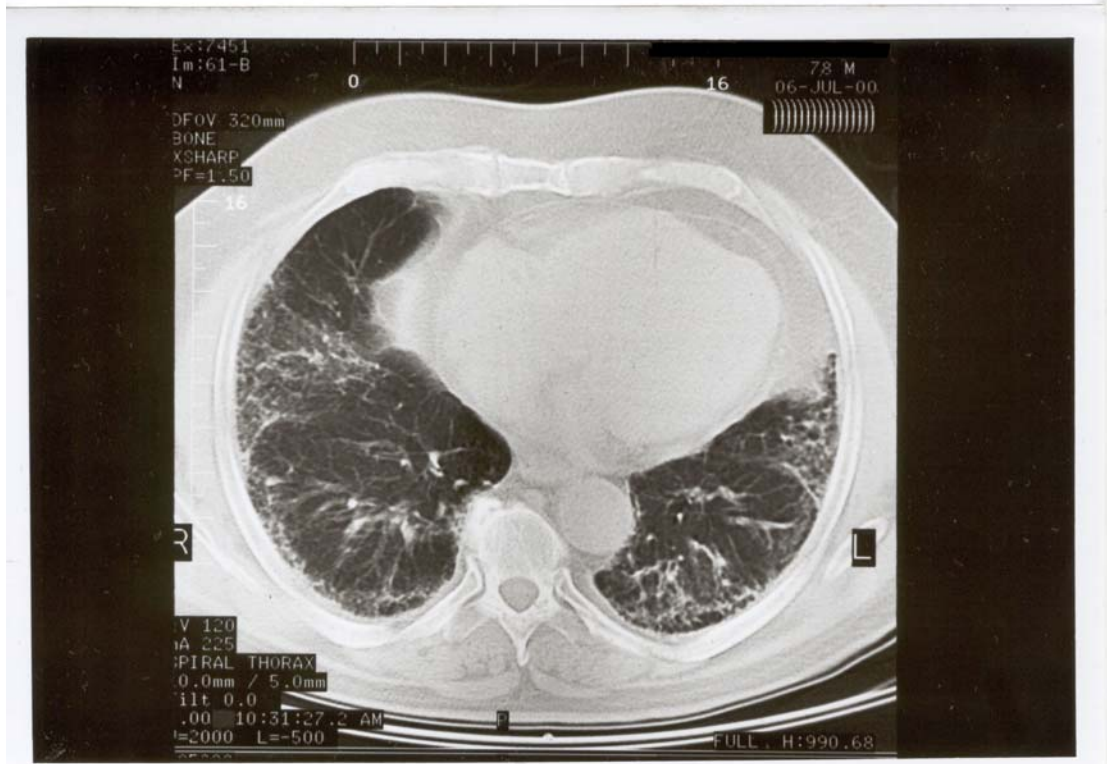
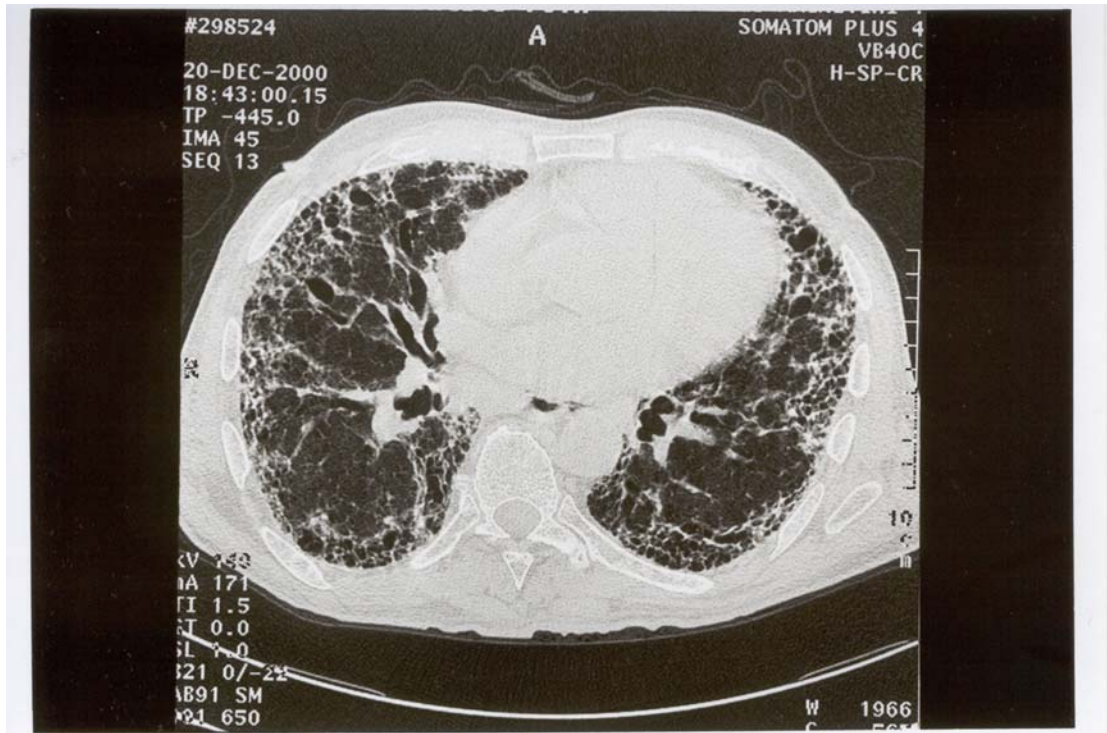


**ΕΙΚΟΝΑ 12:**

Ακτινογραφίες θώρακος ασθενών με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση. Παρουσία αμφοτερόπλευρων δικτυοζιδιακών σκιάσεων και κατά τόπους κυστικών αλλοιώσεων (honeycombing) με περιφερική εντόπιση (επιδιαφραγματική, υποϋπεζωκοτική).

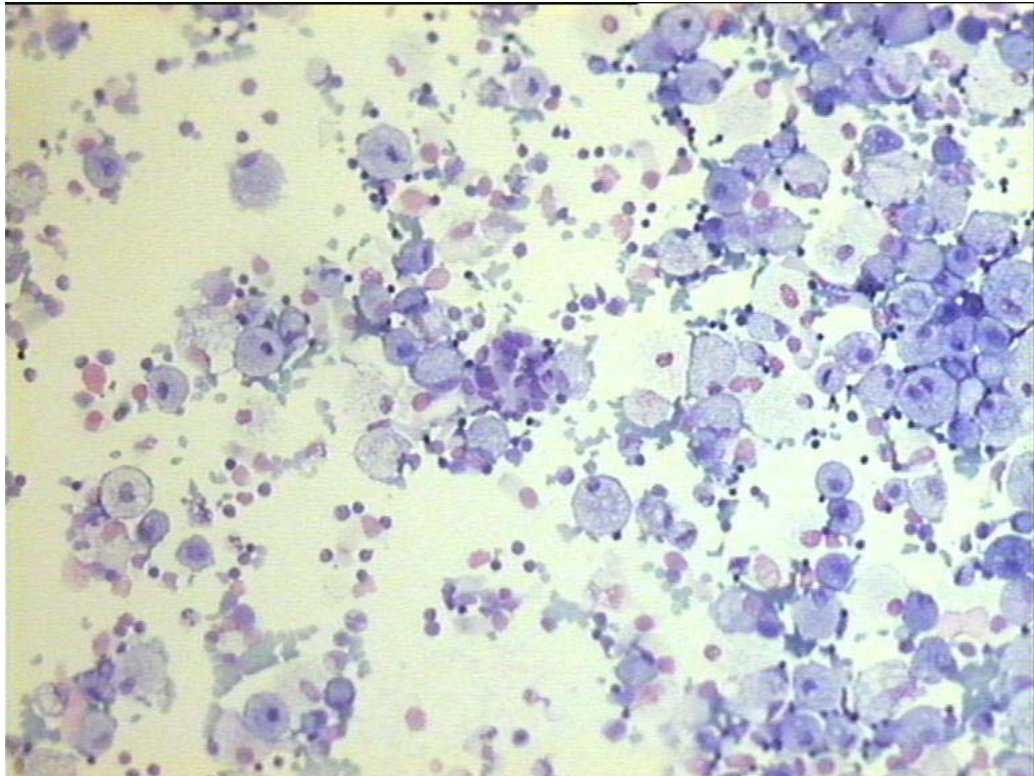


**ΕΙΚΟΝΑ 13:**  
Συνέχεια εικόνας-σχόλια στην επόμενη σελίδα (108).



**ΕΙΚΟΝΑ 13 (συνέχεια):**

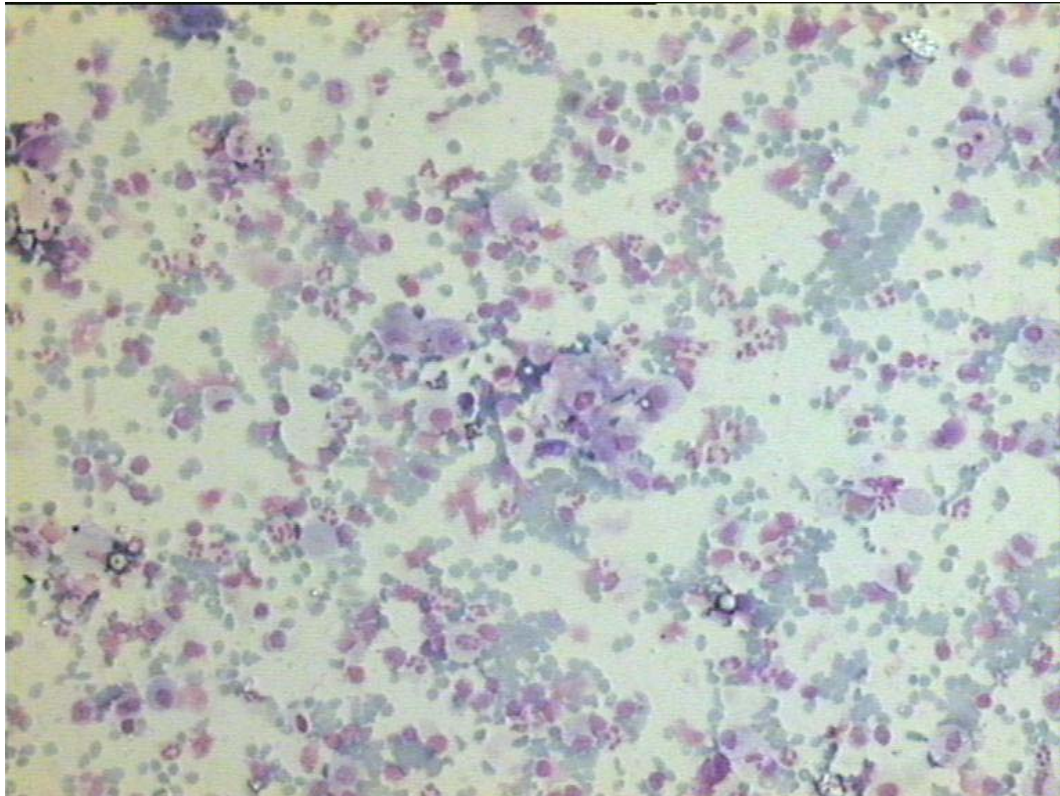
Αξονικές τομογραφίες θώρακος ασθενών με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση. Παρουσία αμφοτερόπλευρων δικτυοζιδιακών σκιάσεων, βρογχεκτασιών εξ έλξεως και honeycombing με κατανομή στα κατώτερα πνευμονικά πεδία και την περιφέρεια.



**ΕΙΚΟΝΑ 14:**  
Παρασκεύασμα BAL ασθενούς με σαρκοείδωση. Χαρακτηριστική λεμφοκυτταρική κυψελιδίτιδα (χρώση Giemsa, x 40)

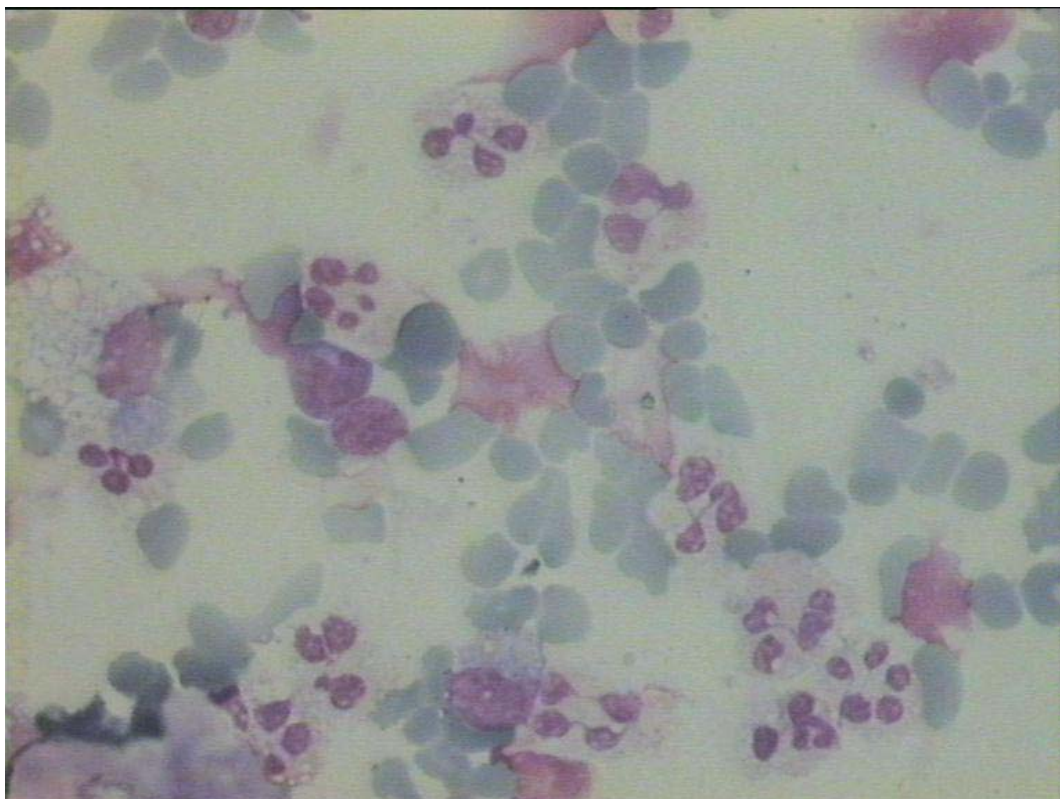


**ΕΙΚΟΝΑ 15:**  
Παρασκεύασμα BAL ασθενούς με σαρκοείδωση.  
Παρουσία ομάδος λεμφοκυττάρων (χρώση Giemsa, x 400)



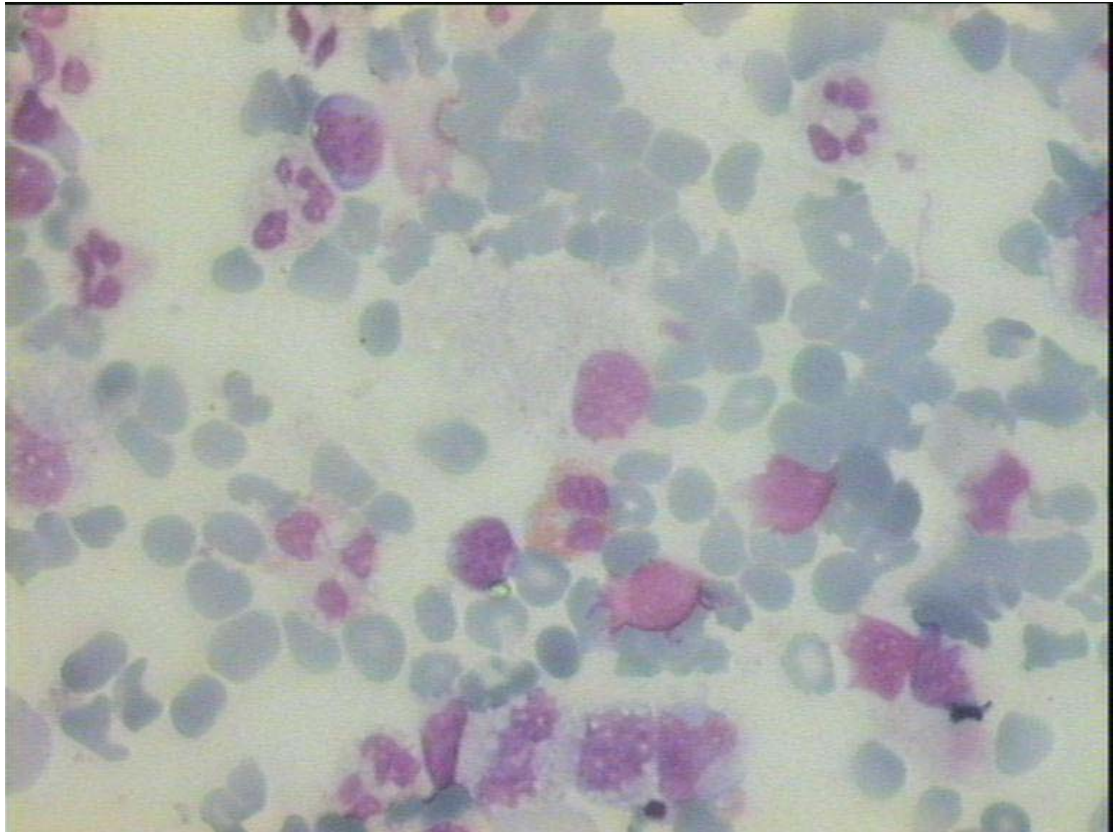
**ΕΙΚΟΝΑ 16:**

Παρασκευάσμα BAL ασθενούς με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση. Χαρακτηριστική πολυμορφοπυρηνική κυψελιδίτιδα (χρώση Giemsa, x 40)



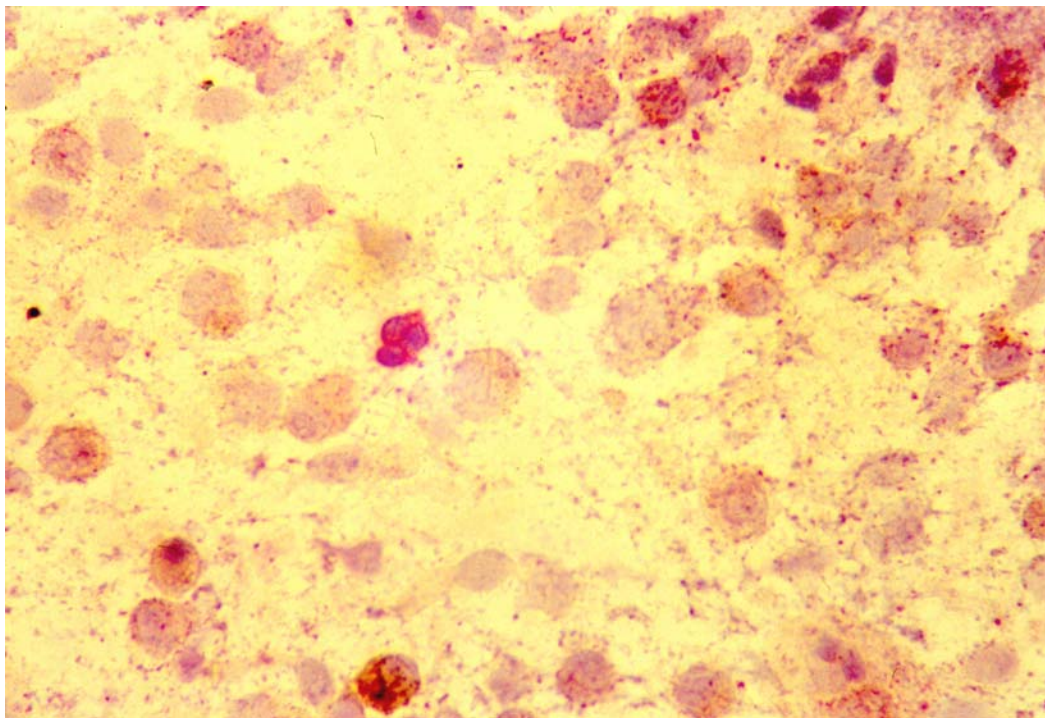
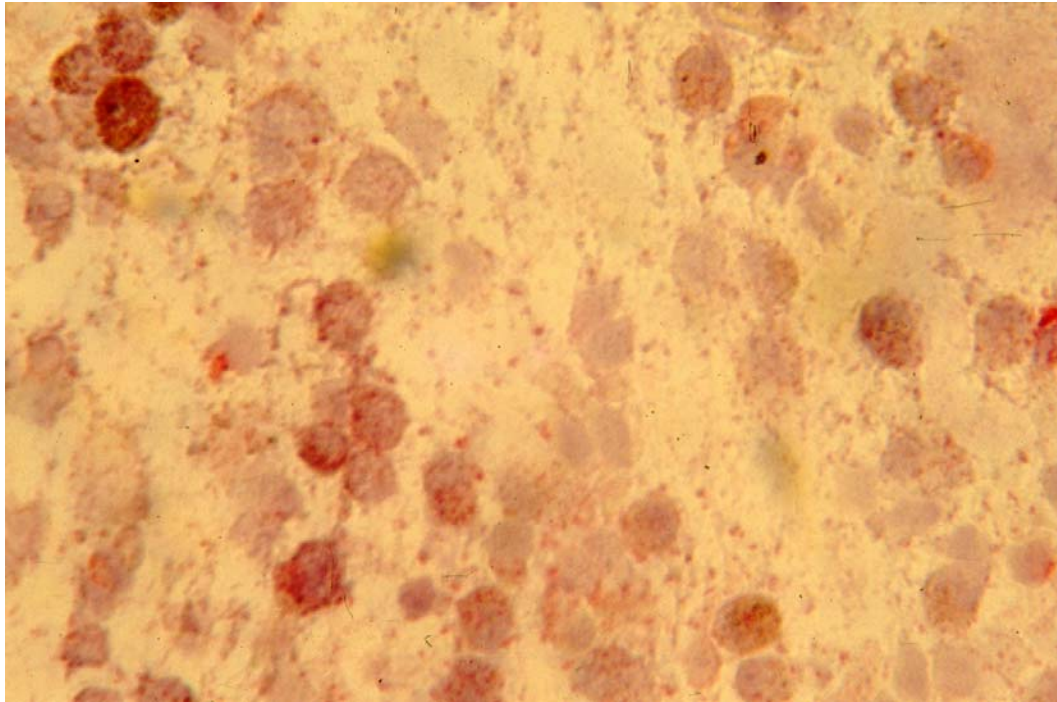
**ΕΙΚΟΝΑ 17:**

Παρασκευάσμα BAL ασθενούς με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση. Χαρακτηριστική πολυμορφοπυρηνική κυψελιδίτιδα (χρώση Giemsa, x 400)



**ΕΙΚΟΝΑ 18:**

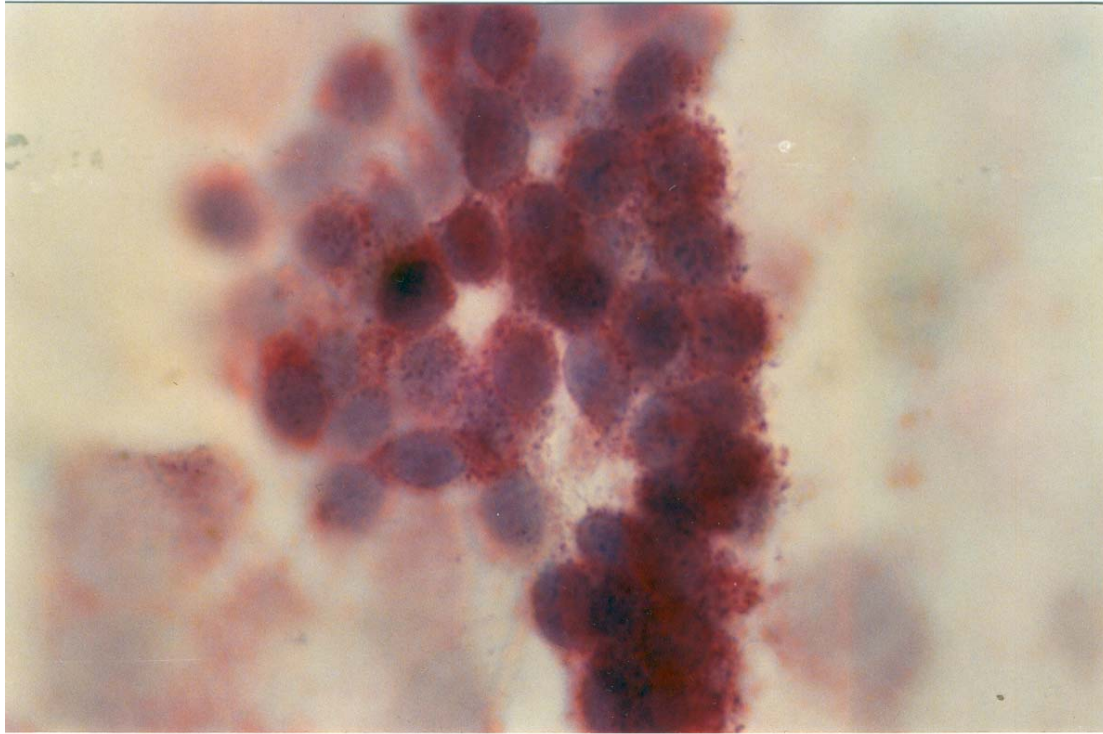
Παρασκεύασμα BAL ασθενούς με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση. Παρουσία πολυμορφοπυρήνων, ηωσινοφίλων, μακροφάγων (χρώση Giemsa, x 400)



**ΕΙΚΟΝΑ 19:**

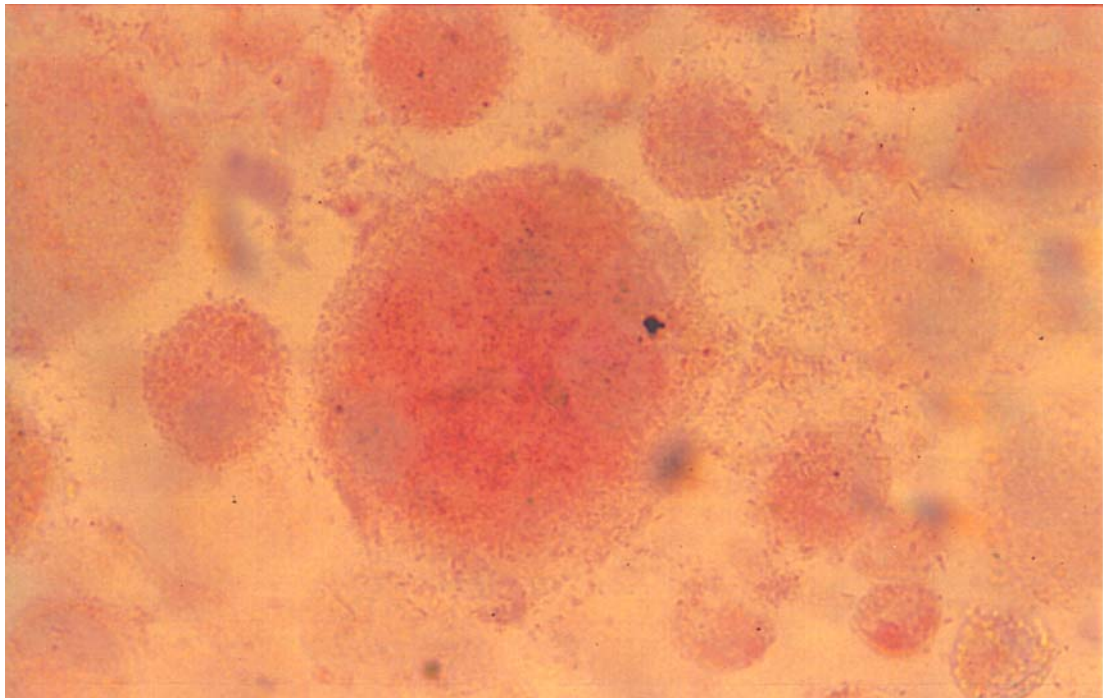
Παρασκεύασμα BAL σε άτομο της ομάδας έλεγχου. Ανοσοϊστοχημική χρώση bcl-2 (ερυθρά κυτταρική χρώση) σε μακροφάγα. (Μέθοδος αλκαλικής φωσφατάσης, x400).





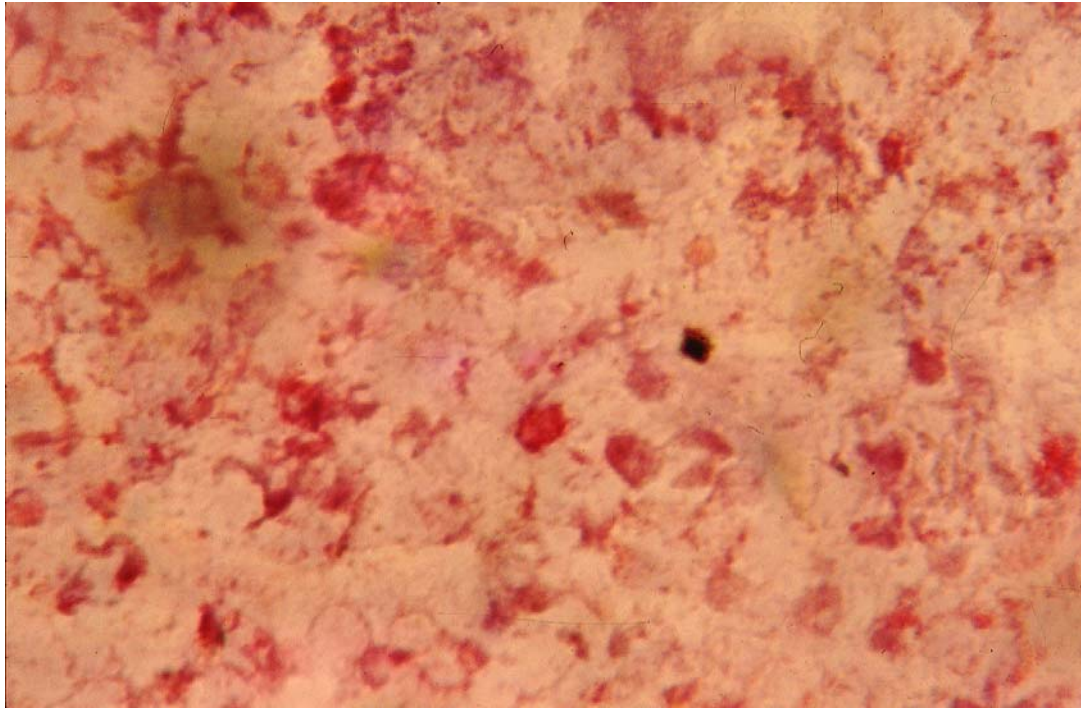
**ΕΙΚΟΝΑ 20:**

Παρασκεύασμα BAL ασθενούς με σαρκοειδωση. Ανοσοϊστοχημική χρώση bcl-2 (ερυθρά κυτταρική χρώση) σε ομάδα λεμφοκυττάρων.(Μέθοδος αλκαλικής φωσφατάσης, x100).



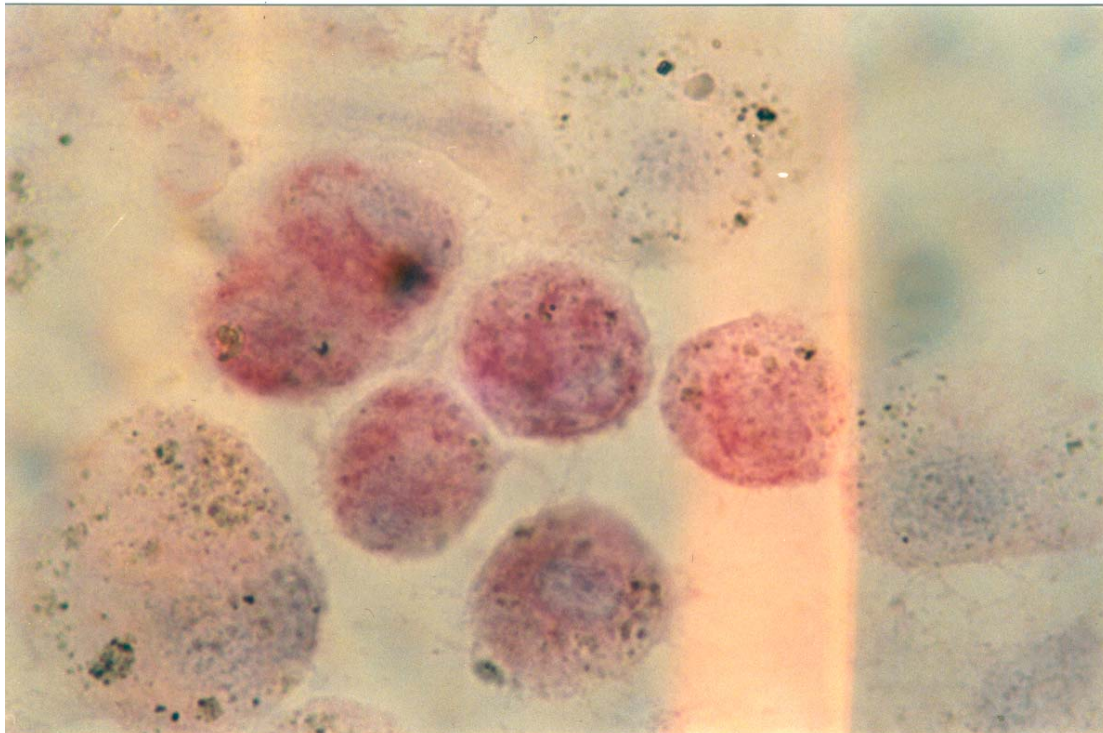
**ΕΙΚΟΝΑ 21:**

Παρασκεύασμα BAL ασθενούς με σαρκοειδωση. Ανοσοϊστοχημική χρώση bcl-2 (ερυθρά κυτταρική χρώση) σε πολυπύρρηνο μακροφάγο.(Μέθοδος αλκαλικής φωσφατάσης, x1000).



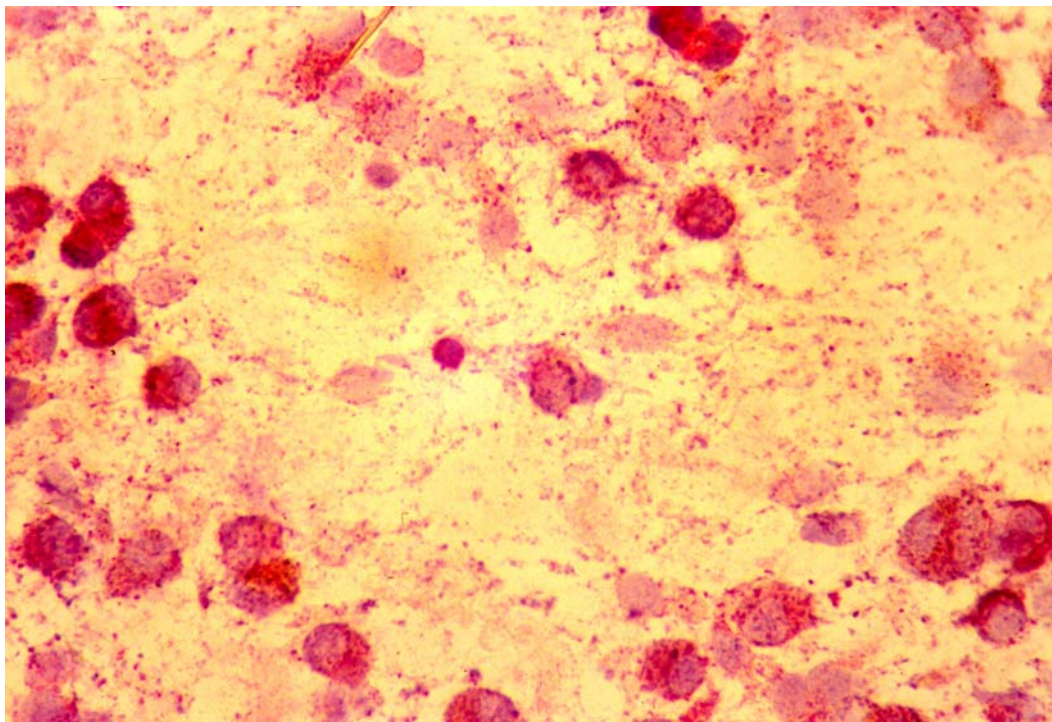
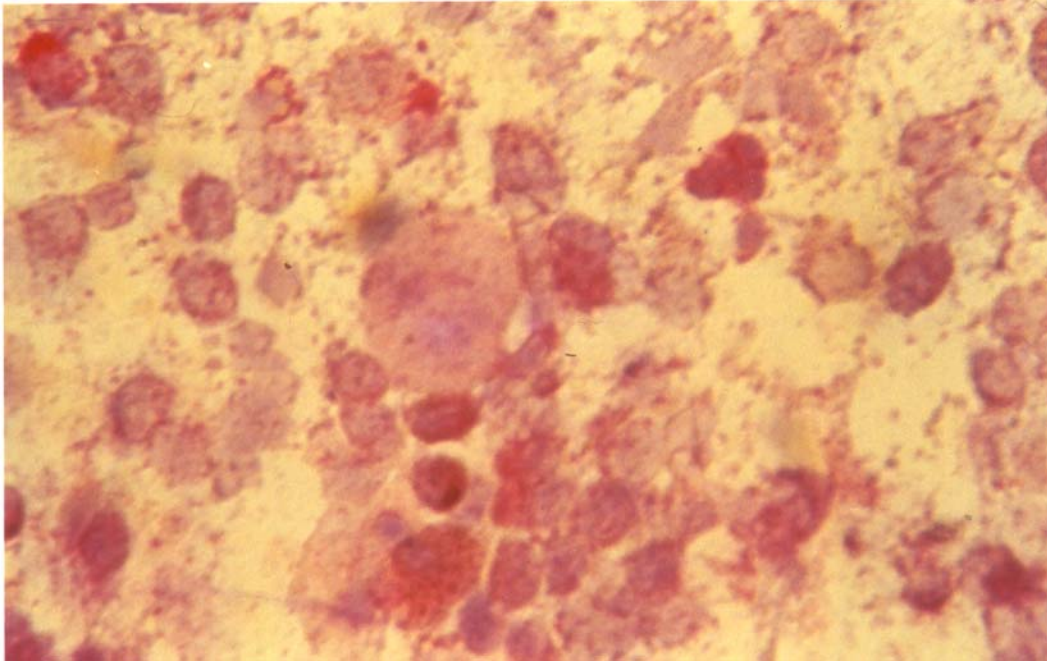
**ΕΙΚΟΝΑ 22:**

Παρασκεύασμα BAL ασθενούς με ΙΠΙ. Ανοσοϊστοχημική χρώση bcl-2 (ερυθρά κυτταρική χρώση) σε μακροφάγα, πολυμορφοπύρηνα και ηωσινόφιλα. (Μέθοδος αλκαλικής φωσφατάσης, x400).



**ΕΙΚΟΝΑ 23:**

Παρασκεύασμα BAL ασθενούς με ΙΠΙ. Ανοσοϊστοχημική χρώση bcl-2 (ερυθρά κυτταρική χρώση) σε ομάδα μακροφάγων. (Μέθοδος αλκαλικής φωσφατάσης, x1000).



**ΕΙΚΟΝΑ 24:**

Παρασκεύασμα BAL ασθενούς με ΙΠΙ. Ανοσοϊστοχημική χρώση bcl-2 (ερυθρά κυτταρική χρώση) σε πολυμορφοπύρρηνα, ηωσινόφιλα, μακροφάγα. (Μέθοδος αλκαλικής φωσφατάσης, x400).