

# **ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΣΙΓΑΝΑΚΗ ΜΑΡΙΑ-ANNA**

## **ΤΙΤΛΟΣ**

**« Έκφραση αποπτωτικών δεικτών σε δείγματα πνευμονικού ιστού ασθενών με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια με ή χωρίς αστάθεια μικροδορυφορικού DNA »**

**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ**

*ΗΡΑΚΛΕΙΟ , ΙΟΥΝΙΟΣ 2010*

*Στην οικογένεια μου ,  
στον καθηγητή μου  
και  
στους συνεργάτες μου*

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΕΛΙΔΕΣ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	3
<b>1. Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια</b>	5
1.1. Ορισμός και επιδημιολογικά στοιχεία	5
1.2. Σταδιοποίηση της ΧΑΠ	11
1.3. Παθογένεια της ΧΑΠ	12
<b>2. Απόπτωση</b>	23
2.1. Εξωγενής αποπτωτική οδός	25
2.2. Ενδογενής αποπτωτική οδός	29
2.3. Καταρράκτης των κασπασών	37
<b>3. Απόπτωση και Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια</b>	39
3.1. Απόπτωση και ΧΑΠ	39
3.2. Απόπτωση και εξωπνευμονικές εκδηλώσεις της ΧΑΠ	48
<b>4. Αλληλεπίδραση της απόπτωσης με τους άλλους παθογενετικούς μηχανισμούς της ΧΑΠ</b>	51
4.1. Απόπτωση και φλεγμονή	52
4.2. Απόπτωση και διαταραχή πρωτεασών-αντιπρωτεασών	53
4.3. Απόπτωση και οξειδωτικό στρες	54
<b>5. Κυψελιδικά μακροφάγα - Πνευμονοκύτταρα τύπου II</b>	55
<b>– T -Λεμφοκύτταρα</b>	
5.1. Κυψελιδικά μακροφάγα	55
5.2. Πνευμονοκύτταρα τύπου II	57
5.3. T-Λεμφοκύτταρα	59

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

<b>I. Εισαγωγή</b>	63
<b>II. Υλικό και μέθοδοι</b>	65
<i>A. Πληθυσμός μελέτης</i>	65
<i>B. Προετοιμασία του ιστού</i>	67
<i>Γ. Western Blot</i>	68
<i>Δ. Ανοσοιστοχημεία</i>	69
<i>E. Στατιστική Ανάλυση</i>	72
<b>III. Αποτελέσματα</b>	72
<i>A. Κλινικά Χαρακτηριστικά των Ατόμων που Μελετήθηκαν</i>	72
<i>B. Western Blot</i>	72
<i>Γ<sub>1</sub>. Ανοσοιστοχημεία p53</i>	74
<i>Γ<sub>2</sub>. Ανοσοιστοχημεία bcl2</i>	75
<b>IV. Συζήτηση</b>	77
<b>V. Βιβλιογραφία</b>	87

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στη χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια ( ΧΑΠ ) παρατηρούνται μη φυσιολογικές αποπτωτικές διεργασίες που διαταράσσουν την κυτταρική ομοιόσταση και πιθανά παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου. Παρόλ'αυτά, οι μελέτες σε ανθρώπους σε αυτό το πεδίο έρευνας είναι περιορισμένες.

Μελετήθηκε η έκφραση των πρωτεϊνών p53 και bcl2 με στύπωμα κατά Western (Western Blots) σε δείγματα πνευμονικού ιστού 43 ασθενών (23 καπνιστές με ΧΑΠ και 20 καπνιστές χωρίς ΧΑΠ), χρησιμοποιώντας τη β-ακτίνη ως εσωτερικό μάρτυρα. Επιπρόσθετα εκτιμήθηκε το πρότυπο έκφρασης των πρωτεϊνών p53 και bcl2 με ανοσοϊστοχημική μέθοδο σε τομές δειγμάτων πνευμονικού ιστού, που είχε εμπεδωθεί σε παραφίνη μετά από μονιμοποίηση σε φορμόλη, των ίδιων ατόμων. Το στύπωμα κατά Western έδειξε στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης p53 στους καπνιστές με ΧΑΠ σε σύγκριση με τους καπνιστές που δεν έπασχαν από ΧΑΠ ( $p=0.038$ ), ενώ τα επίπεδα της πρωτεΐνης bcl2 δεν ήταν στατιστικά σημαντικά διαφορετικά στις δυο ομάδες ελέγχου. Η ανοσοϊστοχημεία έδειξε αυξημένη αναλογία θετικών ως προς τη χρώση για το p53 πνευμονοκυττάρων τύπου II/ σύνολο των πνευμονοκυττάρων τύπου II στους καπνιστές με ΧΑΠ σε σύγκριση με τους καπνιστές χωρίς ΧΑΠ ( $p=0.01$ ), ενώ η αναλογία των θετικών ως

προς τη χρώση για το p53 κυψελιδικών μακροφάγων και λεμφοκυττάρων δε διέφερε στατιστικά σημαντικά στις δυο ομάδες ελέγχου. Από την άλλη πλευρά η έκφραση της πρωτεΐνης bcl2 δε διέφερε ανάμεσα στις δυο ομάδες και στις τρεις κυτταρικές σειρές.

Η αυξημένη έκφραση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης p53 στα πνευμονοκύτταρα τύπου II των ασθενών με ΧΑΠ μη εξισορροπημένη από την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη bcl2 είναι δυνατό να αντανakλά αυξημένη απόπτωση στο κυψελιδικό επιθήλιο των ασθενών με ΧΑΠ. Τα αποτελέσματα μας επιβεβαιώνουν αυτά προηγούμενων πειραμάτων και υποστηρίζουν την υπόθεση της διαταραχής της ισορροπίας μεταξύ προ- και αντι-αποπτωτικών μεσολαβητών στη ΧΑΠ.

## **ABSTRACT**

Abnormal apoptotic events in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) subvert cellular homeostasis and may play a primary role in its pathogenesis. However, studies in human subjects are limited. p53 and bcl2 protein expression was measured by western blot on lung tissue specimens from 43 subjects (23 COPD smokers and 20 non-COPD smokers), using beta-actin as internal control. Additionally, p53 and bcl2 expression patterns were evaluated by immunohistochemistry in formalin-fixed, paraffin-embedded lung tissue sections from the same individuals.

Western blot analysis showed statistically significant increased p53 protein levels in COPD smokers in comparison with non-COPD smokers ( $p=0.038$ ), while bcl2 protein levels were not statistically different between the two groups. Lung immunohistochemistry showed increased ratio of positive p53-stained type II pneumocytes / total type II pneumocytes in COPD smokers compared to non-COPD smokers ( $p=0.01$ ), whereas the p53 staining ratio in alveolar macrophages and in lymphocyte-like cells did not differ statistically between the two groups. On the other hand, bcl2 expression did not differ between the two groups in all three cell types.

The increased expression of pro-apoptotic p53 in type II pneumocytes of COPD patients not counterbalanced by the anti-apoptotic bcl2 could reflect increased apoptosis in the alveolar epithelium of COPD patients. Our results confirm previous experiments and support the hypothesis of a disturbance in the balance between the pro- and anti-apoptotic mediators in COPD.



## **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **1. ΧΡΟΝΙΑ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑ ( ΧΑΠ )**

#### *1.1 Ορισμός και επιδημιολογικά στοιχεία*

Η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) αποτελεί μια σημαντική αιτία χρόνιας νοσηρότητας και θνησιμότητας και αντιπροσωπεύει ένα ουσιαστικό κοινωνικό και οικονομικό κόστος παγκοσμίως (1). Αποτελεί την τρίτη πιο κοινή αιτία θανάτου (8%) στις 25 χώρες - μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης, ενώ κατέχει την πρώτη θέση μεταξύ των παθήσεων που αφορούν τον πνεύμονα (2).

Η επίπτωση της νόσου αναμένεται να αυξηθεί τις επόμενες δεκαετίες τόσο στις αναπτυγμένες όσο και στις αναπτυσσόμενες χώρες, ενώ ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι η ΧΑΠ παραμένει υποδιαγνωσμένη ή λάθος διαγνωσμένη σε πολλές χώρες (3). Εμφανίζεται πλέον σε μικρότερες ηλικίες και συσχετίζεται λιγότερο με το φύλο(4, 5). Στη Ελλάδα οι περισσότεροι ασθενείς με ΧΑΠ είναι άνδρες (73.3%), και το 40% αυτών μεταξύ 40 και 60 ετών. Το μεγαλύτερο ποσοστό ζει σε αστικές περιοχές (68%). Οι περισσότεροι ασθενείς με ΧΑΠ (81.3%) ανέφεραν ιστορικό καπνίσματος  $\geq 15$  pack-years (6). Επιπρόσθετα μελέτες που έγιναν δείχνουν αύξηση του επιπολασμού της νόσου στις γυναίκες, οι οποίες από το 2000 υπερέχουν έναντι των ανδρών τόσο στον αριθμό των νοσηλειών όσο και στα ποσοστά θανάτου από ΧΑΠ (7). Είναι λοιπόν επιτακτική η ανάγκη να γίνει εντατική προσπάθεια αφύπνισης στη διάγνωση και την παρακολούθηση της ΧΑΠ (2).

Ο ορισμός της Χ.Α.Π. από την ATS/ERS (8) και την GOLD (9) φαίνεται στον Πίνακα 1. Και στους δύο ορισμούς τονίζεται ότι η ΧΑΠ είναι μια φλεγμονώδης νόσος, η οποία μπορεί να προληφθεί και να θεραπευθεί και χαρακτηρίζεται από περιορισμό της ροής του αέρα, που είναι συνήθως προοδευτικά επιδεινούμενος και μη πλήρως αναστρέψιμος. Επισημαίνεται η συστηματική και εξωπνευμονική συμμετοχή της νόσου καθώς και ο ρόλος της έκθεσης σε βλαπτικά σωματίδια ή αέρια αλλά κυρίως στον καπνό του τσιγάρου (2).

**Πίνακας 1.** Ορισμοί της Χρόνιας Αποφρακτικής Πνευμονοπάθειας (ΧΑΠ), (9).

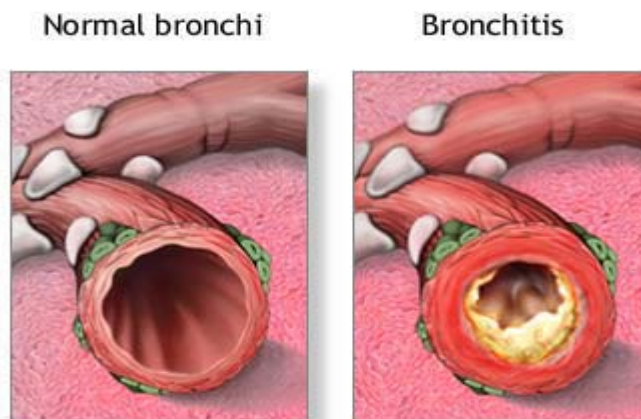
Πηγή	Ορισμός
ATS & ERS	«Η ΧΑΠ είναι μία νόσος που προλαμβάνεται και θεραπεύεται και η οποία χαρακτηρίζεται από απόφραξη των αεραγωγών, που δεν είναι πλήρως αναστρέψιμη. Η απόφραξη είναι προοδευτική και σχετίζεται με μία παθολογική φλεγμονώδη απάντηση των πνευμόνων σε βλαπτικά σωματίδια ή αέρια και κυρίως προκαλείται από το κάπνισμα τσιγάρων. Αν και η ΧΑΠ προσβάλλει βασικά τους πνεύμονες, προκαλεί επίσης συστηματικές εκδηλώσεις.»
GOLD	«Η ΧΑΠ είναι μια νόσος που μπορεί να προληφθεί και να θεραπευθεί με σημαντικές εξωπνευμονικές εκδηλώσεις, που μπορούν να συμβάλλουν στη βαρύτητα της, σε ορισμένους ασθενείς. Χαρακτηρίζεται από περιορισμό της ροής του αέρα, μη πλήρως αναστρέψιμο. Ο περιορισμός αυτός επιδεινώνεται συνήθως προοδευτικά και συνοδεύεται από μη φυσιολογική φλεγμονώδη αντίδραση του πνεύμονα σε επιβλαβή σωματίδια και αέρια».

Διακρίνουμε δυο βασικούς υποτύπους της ΧΑΠ : τη χρόνια βρογχίτιδα και το εμφύσημα (10). Η χρόνια βρογχίτιδα χαρακτηρίζεται από χρόνια ή περιοδική αύξηση των βρογχικών εκκρίσεων που προκαλούν απόχρεμψη. Ο παραγωγικός βήχας πρέπει να διαρκεί το λιγότερο τρεις μήνες το χρόνο για τουλάχιστον δυο συνεχόμενα χρόνια και να μη μπορεί να αποδοθεί σε άλλη πνευμονολογική ή καρδιολογική αιτία.

Η συμβολή της υπερέκκρισης βλέννης στον περιορισμό της ροής του αέρα στη ΧΑΠ δεν έχει επιβεβαιωθεί (Εικόνες 1.Α και Β). Φαίνεται πως συμμετέχει σε πολύ μικρό βαθμό στα αρχικά στάδια της νόσου καθώς η παραγωγή βλέννης σε καπνιστές με φυσιολογική αναπνευστική λειτουργία δε προδικάζει τη μελλοντική ανάπτυξη της ΧΑΠ.

(A)

(B)

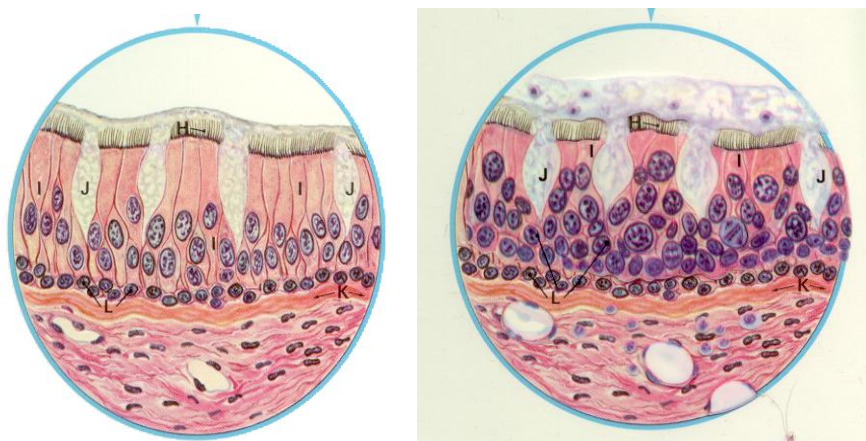


© ADAM, Inc.

**Εικ.1. Α και Β** : Βρόγχος φυσιολογικός (**A**) και ατόμου με χρόνια βρογχίτιδα (**B**), (1.1).

]

Στα προχωρημένα, όμως, στάδια της νόσου η υπερέκκριση βλέννης παίζει ρόλο, αφού συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο παροξύνσεων, που με τη σειρά τους επιταχύνουν το ρυθμό μείωσης της FEV1 (11).



(A)

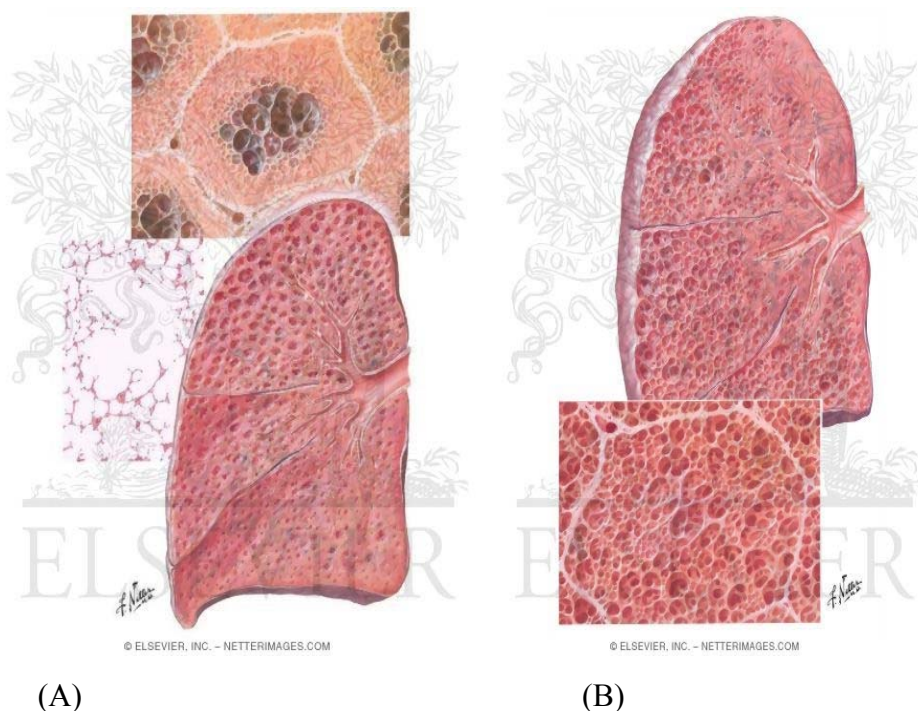
(B)

**Εικ.2. A και B :** Παρατηρείται αυξημένο πάχος των υποβλεννογόνιων αδένων (submucosa) στον πνεύμονα χρόνιου βρογχιτιδικού ασθενούς (B) σε σύγκριση με το φυσιολογικό βρόγχο (A), (1.2).

Παράλληλα η χρόνια υπερέκκριση βλέννης αντανακλά τη φλεγμονώδη απάντηση των υποβλεννογόνιων αδένων (Εικόνες 2.A και B). Τα φλεγμονώδη κύτταρα απελευθερώνουν πρωτεάσες της σερίνης που δυνητικά προκαλούν την παραγωγή βλέννης. Οξειδωτικοί παράγοντες που περιέχονται στον καπνό των τσιγάρων και άλλοι που απελευθερώνονται από τα φλεγμονώδη λευκοκύτταρα επάγουν την έκφραση του γονιδίου MUC5AC με αποτέλεσμα την υπερπαραγωγή βλέννης (12).

Το εμφύσημα ορίζεται παθολογοανατομικά και χαρακτηρίζεται από μόνιμη διάταση των απομακρυσμένων

κυψελίδων των τελικών βρογχιολίων και καταστροφή των μεσοκυψελιδικών διαφραγματιών, χωρίς να υπάρχει εμφανής ίνωση (Εικόνες 3.Α και Β).



**Εικόνα 3. Εμφύσημα** **A.** κεντρολοβιδιακό ( υψηλότερες ζώνες) **B.** πανλοβιδιακό (κατώτερες ζώνες). Στο κεντρολοβιδιακό εμφύσημα εμπλέκονται μόνο τα κεντρικά και τα εγγύς αναπνευστικά βρογχιόλια. Συνήθως αφορά τους άνω λοβούς του πνεύμονα και είναι ο πιο κοινός τύπος εμφυσήματος. Συνδέεται με το κάπνισμα και με τη σκόνη καολίνης. Στο πανλοβιδιακό εμφύσημα εμπλέκεται όλο το αναπνευστικό λοβίδιο (όλες οι κυψελίδες ενός αναπνευστικού λοβιδίου). Τυπικά αφορά τις κατώτερες ζώνες του πνεύμονα και την πρόσθια επιφάνειά του. Σχετίζεται με την έλλειψη της α1- αντιθρυψίνης (1.3).

Υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του βαθμού του εμφυσήματος και του ιστορικού της καπνιστικής συνήθειας, αλλά όχι πολύ ισχυρή, καθώς μόνο το 40% των βαρέων καπνιστών παρουσιάζουν ουσιαστική καταστροφή του

πνευμονικού παρεγχύματος, ενώ εμφύσημα μπορεί να αναγνωριστεί σε μερικά άτομα με φυσιολογική αναπνευστική λειτουργία.

Η διαφοροδιάγνωση της ΧΑΠ περιλαμβάνει το άσθμα, την συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια, τις βρογχεκτασίες, τη φυματίωση, τη βρογχιολίτιδα, και τη διάχυτη πανβρογχιολίτιδα (10). Το ιστορικό του ασθενούς, η ακτινογραφία θώρακος, ο λειτουργικός έλεγχος και οι απεικονιστικές μέθοδοι μπορούν να βοηθήσουν στην τελική διάγνωση. Σε μερικούς ασθενείς με βαρύ χρόνιο άσθμα δεν είναι δυνατός ο κλινικός διαχωρισμός από τη ΧΑΠ ακόμα και με τη βοήθεια των απεικονιστικών τεχνικών ή το λειτουργικό έλεγχο του αναπνευστικού. Σε αυτές τις περιπτώσεις καταλήγουμε ότι το βρογχικό άσθμα και η ΧΑΠ συνυπάρχουν (2, 10).



## 1.2 Σταδιοποίηση της ΧΑΠ

Η σταδιοποίηση της ΧΑΠ σύμφωνα με τη GOLD παρουσιάζεται στον ακόλουθο πίνακα, (Πίνακας 2), (9).

**Πίνακας 2.** ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΧΑΠ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΗ GOLD, (9).

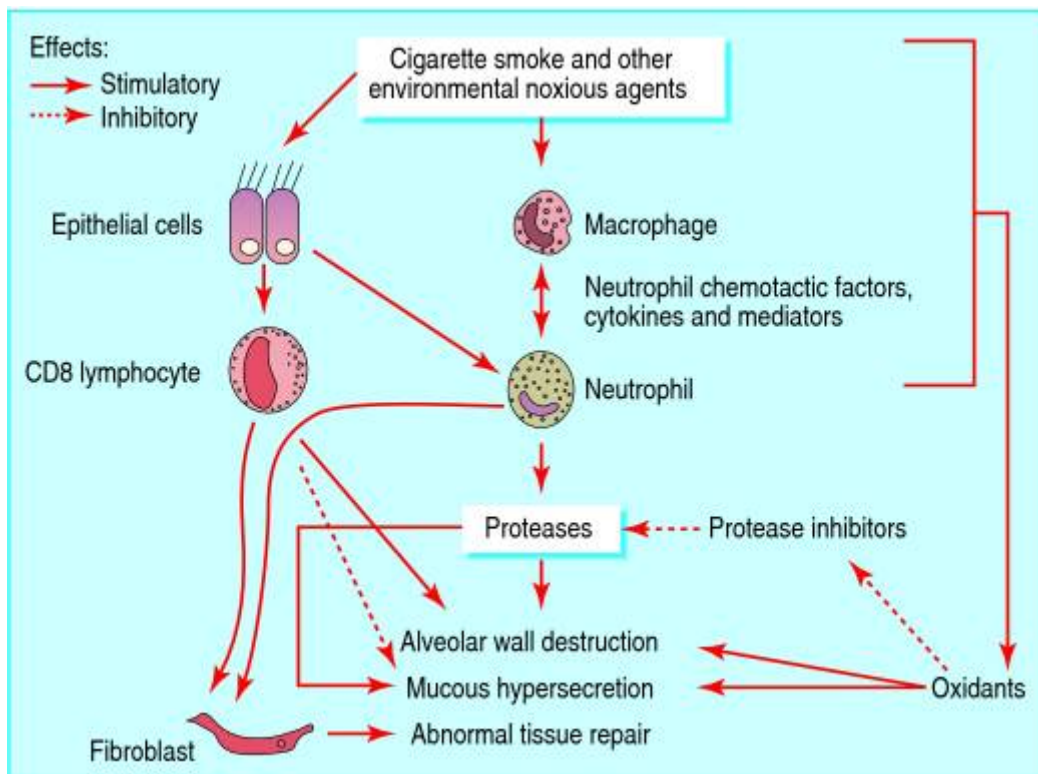
ΣΤΑΔΙΑ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	ΕΥΡΗΜΑΤΑ (σύμφωνα με τη μετά βρογχοδιαστολή FEV1)
0	Σε κίνδυνο	Παράγοντες κινδύνου και χρόνια συμπτώματα, αλλά με φυσιολογική σπιρομέτρηση
I	Ήπια	FEV1/FVC < 70% FEV1 τουλάχιστον 80% του προβλεπόμενου Πιθανή παρουσία συμπτωμάτων
II	Μέτρια	FEV1/FVC < 70% 50% < FEV1 < 80% του προβλεπόμενου Πιθανή παρουσία χρόνιων συμπτωμάτων
III	Σοβαρή	FEV1/FVC < 70% 30% < FEV1 < 50% του προβλεπόμενου Πιθανή παρουσία χρόνιων συμπτωμάτων
IV	Πολύ σοβαρή	FEV1/FVC < 70% FEV1 < 30% του προβλεπόμενου ή FEV1 < 50% του προβλεπόμενου και σοβαρά χρόνια συμπτώματα (χρόνια αναπνευστική ανεπάρκεια ή χρόνια πνευμονική καρδιά)

GOLD = Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease; FEV1 = forced expiratory volume in one second; FVC = forced vital capacity.

### 1.3 Παθογένεια της ΧΑΠ

Η ΧΑΠ χαρακτηρίζεται από χρόνια φλεγμονή σε όλη την έκταση των αεραγωγών, του πνευμονικού παρεγχύματος και του πνευμονικού αγγειακού δικτύου η οποία προκαλείται από την παρατεταμένη έκθεση σε εισπνεόμενα βλαβερά σωματίδια ή αέρια, με κυρίαρχο το ρόλο του καπνού των τσιγάρων. Εκτός όμως από το κάπνισμα και άλλοι παράγοντες όπως η ρύπανση της ατμόσφαιρας, η έκθεση σε σκόνη ή άλλες βλαβερές ουσίες στον εργασιακό ή στον οικιακό χώρο και οι ιογενείς λοιμώξεις φαίνεται πως συσχετίζονται με την ανάπτυξη της ΧΑΠ (13).

Κύριοι μηχανισμοί που ενέχονται στην παθογένεια της ΧΑΠ, εκτός από τη χρόνια φλεγμονή, είναι η αποτυχία εξισορρόπησης της δράσης μεταξύ πρωτεασών-αντιπρωτεασών, και το οξειδωτικό στρες (Εικόνα 4).



**Εικόνα 4.** Παθογένεια της ΧΑΠ, (1.4).

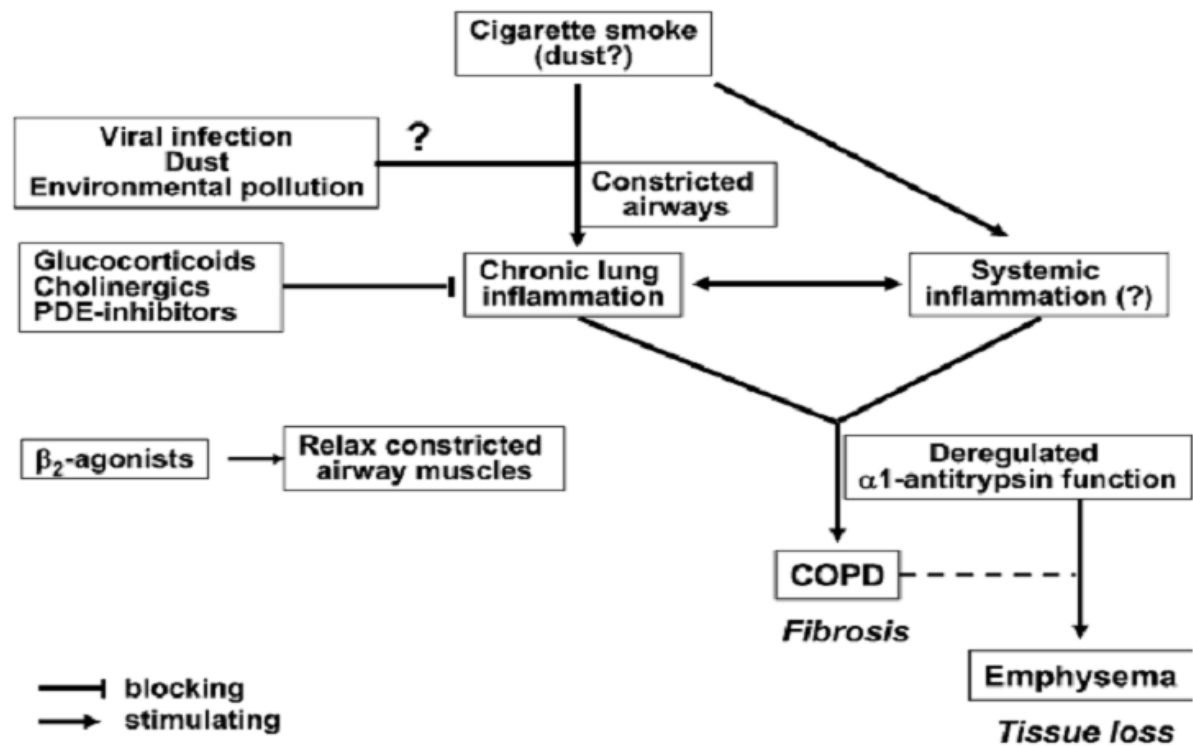


Παράλληλα τα τελευταία χρόνια μέσα από τη διεθνή βιβλιογραφία αναγνωρίζεται ο κομβικός ρόλος της διαταραχής των αποπτωτικών διεργασιών στην πολυπλοκότητα της παθογένειας της ΧΑΠ.

Μελέτες σε πνευμονικό ιστό, βρογχικές βιοψίες και προκλητά πτύελα έχουν αποδείξει την παρουσία **φλεγμονής** στον πνεύμονά σε όλους τους καπνιστές. Τόσο η εγγενής όσο και η επίκτητη φλεγμονώδης ανοσολογική απάντηση συμμετέχουν στη φλεγμονή του πνευμονικού ιστού στους καπνιστές. Ωστόσο η παθολογία των πνευμόνων των χρόνιων καπνιστών χωρίς ΧΑΠ δείχνει χαμηλού βαθμού διήθηση φλεγμονωδών κυττάρων στους μεγαλύτερους βρόγχους και στο πνευμονικό παρέγχυμα, ενώ στους καπνιστές που αναπτύσσουν ΧΑΠ, η φλεγμονώδης απάντηση είναι ενισχυμένη και εμμένει και μετά τη διακοπή του καπνίσματος. Συνδέεται δε με ιστική αναδιαμόρφωση (remodeling) με συνέπεια βλάβη του πνεύμονα που εκδηλώνεται με χρόνια βρογχίτιδα , απόφραξη των μικρών αεραγωγών, εμφύσημα και πνευμονική υπέρταση (14).

Η οξεία και χρόνια φλεγμονή των αεραγωγών στη ΧΑΠ είναι γνωστή από πολλές μελέτες ενώ τα τελευταία χρόνια γίνεται λόγος για τη συστηματική φλεγμονή των ασθενών με ΧΑΠ. Ένα από τα πιο σημαντικά αναπάντητα ερωτήματα είναι γιατί ενώ όλοι οι καπνιστές παρουσιάζουν χρόνια φλεγμονή του πνεύμονα ένα σχετικά μικρό ποσοστό αυτών εμφανίζει ΧΑΠ. Ακόμα, δεν είναι γνωστό γιατί σε άτομα που έχουν διακόψει το κάπνισμα πολλά χρόνια, εμμένει η χρόνια φλεγμονή των πνευμόνων.

Το κάπνισμα συνδέεται με τη διήθηση του πνεύμονα από μακροφάγα, ουδετερόφιλα και CD8+ T-λεμφοκυττάρων τα οποία ελευθερώνουν προ-φλεγμονώδεις παράγοντες . Η ένταση της διήθησης και της ενεργοποίησης των ανοσολογικών κυττάρων είναι ανάλογη με τη βαρύτητα της ΧΑΠ. Τα ενεργοποιημένα ανοσολογικά κύτταρα ελευθερώνουν ένα μεγάλο αριθμό προ-φλεγμονωδών, μιτογενετικών και προ-ινωτικών παραγόντων οι οποίοι τροποποιούν τη συμπεριφορά των επιθηλιακών κυττάρων, των ινοβλαστών και των λείων μυϊκών κυττάρων των αεραγωγών. Οι προ-φλεγμονώδεις παράγοντες που αποδεσμεύονται από τα ενεργοποιημένα ανοσολογικά κύτταρα διεγείρουν τα υπόλοιπα κύτταρα να εκκρίνουν επιπρόσθετους προ-φλεγμονώδεις παράγοντες προσελκύοντας περισσότερα ανοσολογικά κύτταρα στο σημείο φλεγμονής. Αυτός ο φαύλος κύκλος διατηρεί τη φλεγμονώδη διεργασία (Εικόνα 5). Παρόλο τον προφανή σημαντικό ρόλο της φλεγμονής στην παθογένεια της ΧΑΠ τα αποτελέσματα της αντιφλεγμονώδους θεραπείας είναι απογοητευτικά (15).



**Εικόνα 5.** Η επίδραση του καπνού του τσιγάρου και πιθανών άλλων παραγόντων στην ανάπτυξη της ΧΑΠ και του εμφυσήματος. Δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα εάν οι ιογενείς λοιμώξεις ή η έκθεση στην περιβαλλοντική ή στην εργασιακή σκόνη είναι επιπρόσθετοι παράγοντες ή μπορούν να επιτελέσουν από μόνοι τους παράγοντα ανάπτυξης ΧΑΠ. Τα σύγχρονα διαθέσιμα φάρμακα μειώνουν τη φλεγμονή ή χαλαρώνουν τον μυϊκό τόνο ( $\beta_2$ -αγωνιστές), (1.5).

Πιο συγκεκριμένα ένας μηχανισμός με τον οποίο συσσωρεύονται τα CD8<sup>+</sup> T λεμφοκύτταρα στους αεραγωγούς έχει συσχετιστεί με την αυξημένη έκφραση του CXCR3 υποδοχέα στα κύτταρα αυτά. Ο υποδοχέας CXCR3, που επιλεκτικά εκφράζεται από τα CD8<sup>+</sup> T λεμφοκύτταρα των ασθενών με ΧΑΠ, ενεργοποιείται από την πρωτεΐνη 10 που επάγεται από ιντερφερόνες και η οποία παρουσιάζει αυξημένη έκφραση από τα επιθηλιακά κύτταρα των βρογχιολίων ασθενών με ΧΑΠ (16). Επίσης ο χρόνιος αποικισμός της κατώτερης αναπνευστικής οδού ασθενών με ΧΑΠ από διάφορα

βακτηριακά ή ιογενή παθογόνα πιθανά ευθύνεται για την έντονη αυτή φλεγμονώδη απάντηση (17). Τα CD8+ Τ λεμφοκύτταρα με τη σειρά τους μπορούν δυνητικά να απελευθερώσουν TNF-α, περφορίνες και granzymes όπως και να ενεργοποιήσουν την αποπτωτική οδό μέσω του Fas-Fas ligand προκαλώντας προοδευτική καταστροφή του πνευμονικού παρεγχύματος (18).

Αυξημένος είναι και ο αριθμός των ενεργοποιημένων ουδετεροφίλων στα πτύελα ασθενών με ΧΑΠ, ενώ δεν παρατηρείται σημαντική αύξηση τους στο πνευμονικό παρέγχυμα πιθανά λόγω της ταχείας διόδου τους στους αεραγωγούς (19, 20). Τα ουδετερόφιλα ευθύνονται για την έκκριση πρωτεασών όπως η ελαστάση, η καθεψίνη G, η πρωτεΐνάση 3 καθώς και οι μεταλλοπρωτεϊνάσες της θεμέλιας ουσίας, όπως η MMP-8 και η MMP-9, οι οποίες αφενός συμβάλλουν στην κυψελιδική καταστροφή και αφετέρου αποτελούν ερέθισμα για την έκκριση βλέννης. Προσελκύονται από ποικίλους χημειοτακτικούς παράγοντες που είναι αυξημένοι επί ΧΑΠ, (όπως η λευκοτριένη B4, η IL-8, οι CXC-χημειοκίνες), προσκολλώνται στα ενδοθηλιακά κύτταρα και εν συνεχεία στα επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών μέσω της E-σελεκτίνης, ενός παράγοντα προσκόλλησης, που παρουσιάζει αυξημένη έκφραση στα επιθηλιακά κύτταρα ασθενών με ΧΑΠ. Επίσης μελέτες έχουν δείξει σαφή συσχέτιση μεταξύ των κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων και της μείωσης της FEV1 (21).

Παράλληλα παρατηρείται 5-10 φορές αύξηση του αριθμού των μακροφάγων στους αεραγωγούς, στο πνευμονικό

παρέγχυμα και στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ασθενών με ΧΑΠ, η οποία ενάγεται κυρίως από τον καπνό του τσιγάρου (22). Σε κάποιο βαθμό οφείλεται στην προσέλκυση των μονοκυττάρων από την κυκλοφορία από το χημειοτακτικό για μονοκύτταρα πεπτιδίο-1, το οποίο επίσης βρίσκεται αυξημένο στα πτύελα και στο BAL ασθενών με ΧΑΠ (23). Είναι ενδιαφέρον ότι στους καπνιστές και εντονότερα σε όσους πάσχουν από ΧΑΠ τα κυψελιδικά μακροφάγα παρουσιάζουν διαταραχή της φαγοκυτταρικής τους ικανότητας με αποτέλεσμα τη μη αποτελεσματική κάθαρση των αποπρωτικών επιθηλιακών κυττάρων, τη συσσώρευση των τελευταίων και δευτερογενώς την απελευθέρωση παραγόντων που επιτείνουν τη φλεγμονή (24). Τέλος, αυξημένος είναι και ο αριθμός των δενδριτικών κυττάρων στους αεραγωγούς και στις κυψελίδες καπνιστών. Ο ρόλος τους δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμα, όμως ενδέχεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην εγγενή και επίκτητη ανοσολογική απάντηση στη ΧΑΠ (25).

Η φλεγμονή που προκαλείται από το κάπνισμα συνδέεται με αυξημένη έκφραση των πρωτεασών, που εκφυλίζει τον εξωκυττάριο επιθηλιακό ιστό και ενάγει την ιστική αναδιαμόρφωση η οποία είναι γνωστό ότι συμβαίνει στους ασθενείς με ΧΑΠ.(14, 15).

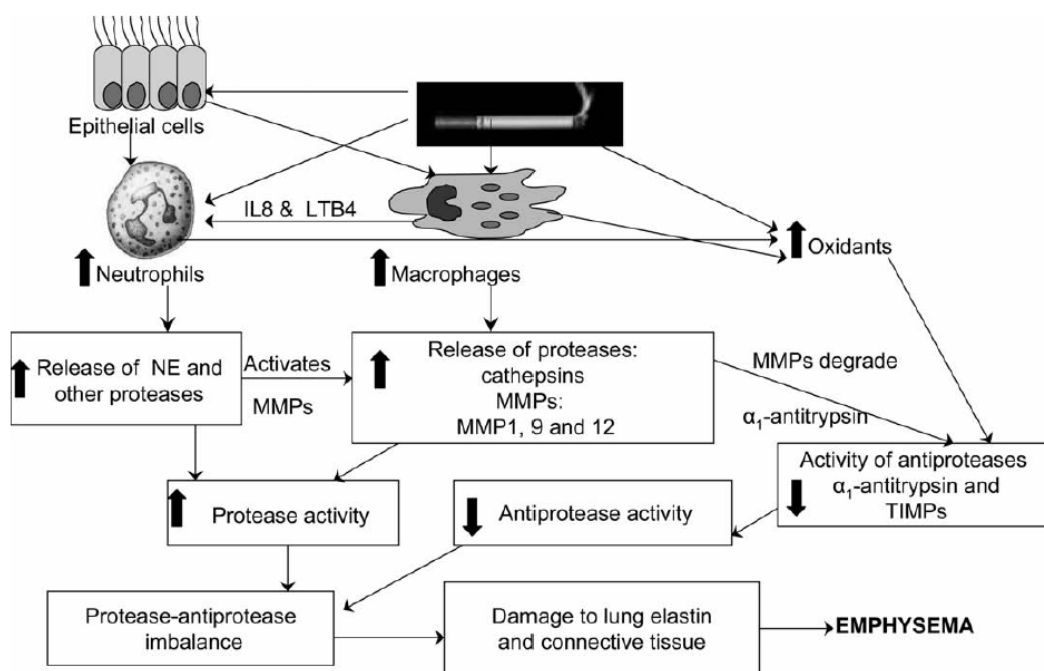
Η ανακάλυψη ότι η σοβαρή έλλειψη α1- αντιθρυψίνης (ο κύριος αναστολέας της ελαστάσης των ουδετερόφιλων) οδηγεί σε εμφύσημα, και η παρατήρηση ότι η ενδοτραχειακή ενστάλαξη πρωτεολυτικών ενζύμων σε ποντίκια προκαλεί εμφυσηματικές αλλοιώσεις άνοιξε το δρόμο για την «**πρωτεολυτική υπόθεση**» του εμφυσήματος. Σύμφωνα με

αυτήν την υπόθεση το κάπνισμα προκαλεί αύξηση των ουδετεροφίλων και των μακροφάγων στον πνεύμονα και ακολούθως απελευθέρωση πρωτεολυτικών ενζύμων από αυτά.

Η απελευθέρωση των ενζύμων που δεν αναστέλλονται πλήρως από τις αντι-πρωτεάσες προκαλούν πρωτεόλυση του συνδετικού πνευμονικού ιστού (πιο ειδικά της ελαστίνης) και κατά συνέπεια εμφύσημα (Εικόνα 6). Αλλά και σε ασθενείς με ΧΑΠ χωρίς έλλειψη α1-αντιθρυψίνης, παρατηρείται έλλειψη ισορροπίας των πρωτεασών-αντιπρωτεασών στον πνεύμονα. Το κάπνισμα διεγείρει τα επιθηλιακά κύτταρα να παράγουν κυτταροκίνες οι οποίες με τη σειρά τους διεγείρουν τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα. Επίσης ο καπνός του τσιγάρου μπορεί να δράσει άμεσα στα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα ενεργοποιώντας τα, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση πρωτεολυτικών ενζύμων (Εικόνα 6).

Φαίνεται ότι τα κυψελιδικά μακροφάγα έχουν σημαντικό ρόλο στη παθογένεια του εμφυσηματος, εκφράζοντας ελαστολυτικά ένζυμα, καθεψίνες και μεταλλοπρωτεάσες της θεμέλιας ουσίας (MMPs) που ενάγονται από τον καπνό του τσιγάρου. Οι καθεψίνες των μακροφάγων αναστέλλονται από την αντιπρωτεάση κυστατίνη C, ενώ οι MMPs αναστέλλονται από τις TIMPs (αναστολείς μεταλλοπρωτεασών). Μερικοί από τους προ-φλεγμονώδεις μεσολαβητές απελευθερώνουν MMPs από τα μακροφάγα (π.χ MMP1: κολλαγενάση, MMP 9: γελατινάση B), χωρίς όμως να προκαλείται σύγχρονη αύξηση των TIMPs, οδηγώντας κατ' αυτόν τον τρόπο στην έλλειψη ισορροπίας πρωτεασών-αντιπρωτεασών (Εικόνα 6). Μελέτες

των πρωτεασών των κυψελιδικών μακροφάγων, που λήφθηκαν από βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα και από πνευμονικό ιστό, έδειξαν αυξημένη έκφραση σε άτομα με ΧΑΠ σε σύγκριση με άτομα χωρίς ΧΑΠ (26).

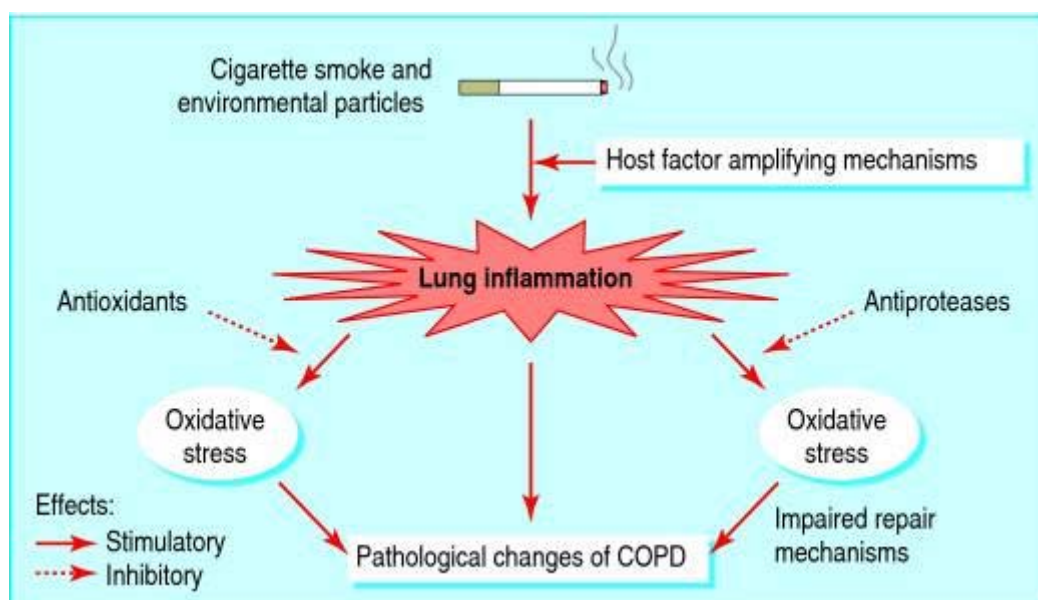


**Εικόνα 6.** Το παραπάνω διάγραμμα δείχνει τα μονοπάτια στα οποία οδηγεί το κάπνισμα με την προκαλούμενη έλλειψη ισορροπίας πρωτεασών- αντιπρωτεασών στον πνεύμονα. Το κάπνισμα προκαλεί την παραγωγή κυτταροκινών από τα επιθηλιακά κύτταρα οι οποίες με τη σειρά τους ενεργοποιούν τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα. Επίσης, ο καπνός του τσιγάρου περιέχει οξειδωτικά μόρια τα οποία μπορούν να απενεργοποιήσουν τις αντι-πρωτεάσες επιπρόσθετα με την απενεργοποίηση των αντι-πρωτεασών από τα οξειδωτικά στοιχεία που ελευθερώνονται από τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα. Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα αποδεσμεύουν πρωτεολυτικά ένζυμα. Η ουδετεροφιλική ελαστάση μπορεί να ενεργοποιήσει τις MMPs ενώ οι MMPs μπορούν να απενεργοποιήσουν την α1- αντιθρυψίνη. Στο διάγραμμα δε φαίνεται ο ρόλος της MMP-12 στην απελευθέρωση του TNF ο οποίος ενισχύει τη φλεγμονώδη αντίδραση. Αυτές οι διαδικασίες οδηγούν στη διαταραχή της ισορροπίας πρωτεασών- αντιπρωτεασών η οποία μπορεί να επιφέρει αποδόμηση της ελαστίνης και του συνδετικού ιστού και κατά συνέπεια εμφύσημα

IL: interleukin, LTB: leukotriene B, NE: neutrophil elastase, MMP: matrix metalloproteases, TIMP: tissue inhibitor of metalloproteases, TNF-a: tumor necrosis factor alpha, (1.6)



Αν και η παθογένεια της ΧΑΠ παραμένει μερικώς αδιευκρίνιστη η σημασία του **οξειδωτικού στρες** στον πνεύμονα έχει τεκμηριωθεί. Η πηγή του οξειδωτικού στρες είναι τα φλεγμονώδη κύτταρα, όπως τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα τα οποία, όταν ενεργοποιηθούν, παράγουν ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS). Αντίστοιχος είναι και ο ρόλος των εισπνεόμενων οξειδωτικών παραγώγων καθώς και των ενεργών παραγώγων του αζώτου (RNS), τα οποία βρίσκονται σε αφθονία στον καπνό του τσιγάρου και μπορούν να επιφέρουν μέγιστο οξειδωτικό φορτίο στον πνεύμονα (Εικόνα 7).



**Εικόνα 7.** Ο ρόλος του οξειδωτικού στρες στη ΧΑΠ, (1.4).

Στα υγιή άτομα υπάρχει ισορροπία μεταξύ των οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών στοιχείων διατηρώντας στο εξωκυττάριο περιβάλλον μειωμένα επίπεδα οξειδωτικών ουσιών. Ο καπνός του τσιγάρου ο οποίος περιέχει μαζική ποσότητα οξειδωτικών ουσιών σε αέρια φάση αλλά και σε μικροσωματίδια (περίπου  $10^{14}$  ελεύθερες ρίζες ανά «puff» )



είναι ο πιο σημαντικός αιτιολογικός παράγοντας για την ανάπτυξη της ΧΑΠ και υπάρχει μια σχέση δοσο-εξαρτώμενη μεταξύ του αθροιστικού συνόλου καπνίσματος και της επίπτωσης της νόσου. Το οξειδωτικό στρες επέρχεται όταν η επιβάρυνση των οξειδωτικών στοιχείων δεν αντισταθμίζεται από το αντιοξειδωτικό σύστημα άμυνας (27).

Η δράση και αλληλεπίδραση μεταξύ των παραπάνω μηχανισμών που συμμετέχουν στην παθογένεια της ΧΑΠ (χρόνια φλεγμονή, διαταραχή της ισορροπίας πρωτεασών-αντιπρωτεασών και οξειδωτικό στρες) προκαλούν διαφόρου βαθμού φυσικές μεταβολές στο επιθήλιο του πνεύμονα και απώλεια της δομικής ακεραιότητάς του. Άμεση είναι η απάντηση του οργανισμού με ενεργοποίηση επιδιορθωτικών μηχανισμών με στόχο την αποκατάσταση της βλάβης, διαδικασία η οποία είναι στενά συνδεδεμένη με βασικές αρχές που διέπουν την κυτταρική λειτουργία, όπως η κυτταρική ομοιόσταση.

Η **απόπτωση** αποτελεί μια ενεργή βιοχημική διαδικασία η οποία στοχεύει στην επιδιόρθωση των κυτταρικών δομών που έχουν υποστεί βλάβη και παράλληλα στη λύση της φλεγμονής. Δυστυχώς η διαταραχή των αποπτωτικών διεργασιών, τόσο σε επίπεδο αυξημένης απόπτωσης των επιθηλιακών κυττάρων όσο και σε επίπεδο ελαττωματικής κάθαρσης τους από τα γειτονικά κυψελιδικά μακροφάγα, αναγνωρίζεται πλέον ως σημαντικός παράγοντας που εμπλέκεται στην παθογένεια της ΧΑΠ (28). Πολλές είναι οι μελέτες που επιβεβαιώνουν την παρουσία μη φυσιολογικών αποπτωτικών λειτουργιών σε πνευμονικό ιστό, βρογχικές

βιοψίες, βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα και προκλητά πτύελα ασθενών με ΧΑΠ, συσχετίζοντας τις με την καταστροφή κυψελιδικών δομών και τη δημιουργία εμφυσήματος.

Ο καπνός του τσιγάρου αυξάνει άμεσα την απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων των αεραγωγών καθώς και των ινοβλαστών *in vitro* αλλά και σε μοντέλα πειραματοζώων (29, 30). Επίσης, σύμφωνα με μελέτη των Kasahara και συνεργατών παρατηρείται αυξημένη απόπτωση των κυψελιδικών ενδοθηλιακών κυττάρων σε εμφυσηματικούς πνεύμονες συγκριτικά με μη καπνιστές και καπνιστές χωρίς ΧΑΠ (31).

Παράλληλα η έκφραση των πρωτεϊνών VEGF και VEGFR2 καθώς και του mRNA τους ήταν σημαντικά μειωμένη στο εμφύσημα (31). Οι συγγραφείς διατύπωσαν την υπόθεση πως αυτή η μείωση των παραγόντων διατήρησης των ενδοθηλιακών κυττάρων με αποτέλεσμα τον κυτταρικό τους θάνατο είναι δυνατό να αποτελεί μέρος της παθογένειας του εμφυσήματος. Πρόσφατη δημοσίευση παρουσιάζει μια πιο σύνθετη προσέγγιση καθώς δείχνει πως το οξειδωτικό στρες και προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες συσχετίζονται με αυξημένη έκφραση προαποπτωτικών πρωτεϊνών σε ανθρώπινο πνευμονικό ιστό, γεγονός που εμπλέκει την αλληλεπίδραση τους στην παθογένεια του εμφυσήματος (32).

## **2. ΑΠΟΠΤΩΣΗ**

Η απόπτωση, ο «φυσιολογικός» ή «προγραμματισμένος» κυτταρικός θάνατος αποτελεί μια εγγενή διαδικασία που εξελικτικά έχει διατηρηθεί με την οποία τα κύτταρα συστηματικά απενεργοποιούν, αποσυναρμολογούν και υποβαθμίζουν τα δομικά και λειτουργικά τους στοιχεία. Ο όρος «απόπτωση» χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Kerr και τους συνεργάτες του το 1972 (33). Πρόκειται για ένα μηχανισμό κλειδί που επιτρέπει στους πολυκύτταρους οργανισμούς να ρυθμίσουν αυστηρά την κυτταρική ανάπτυξη (34).

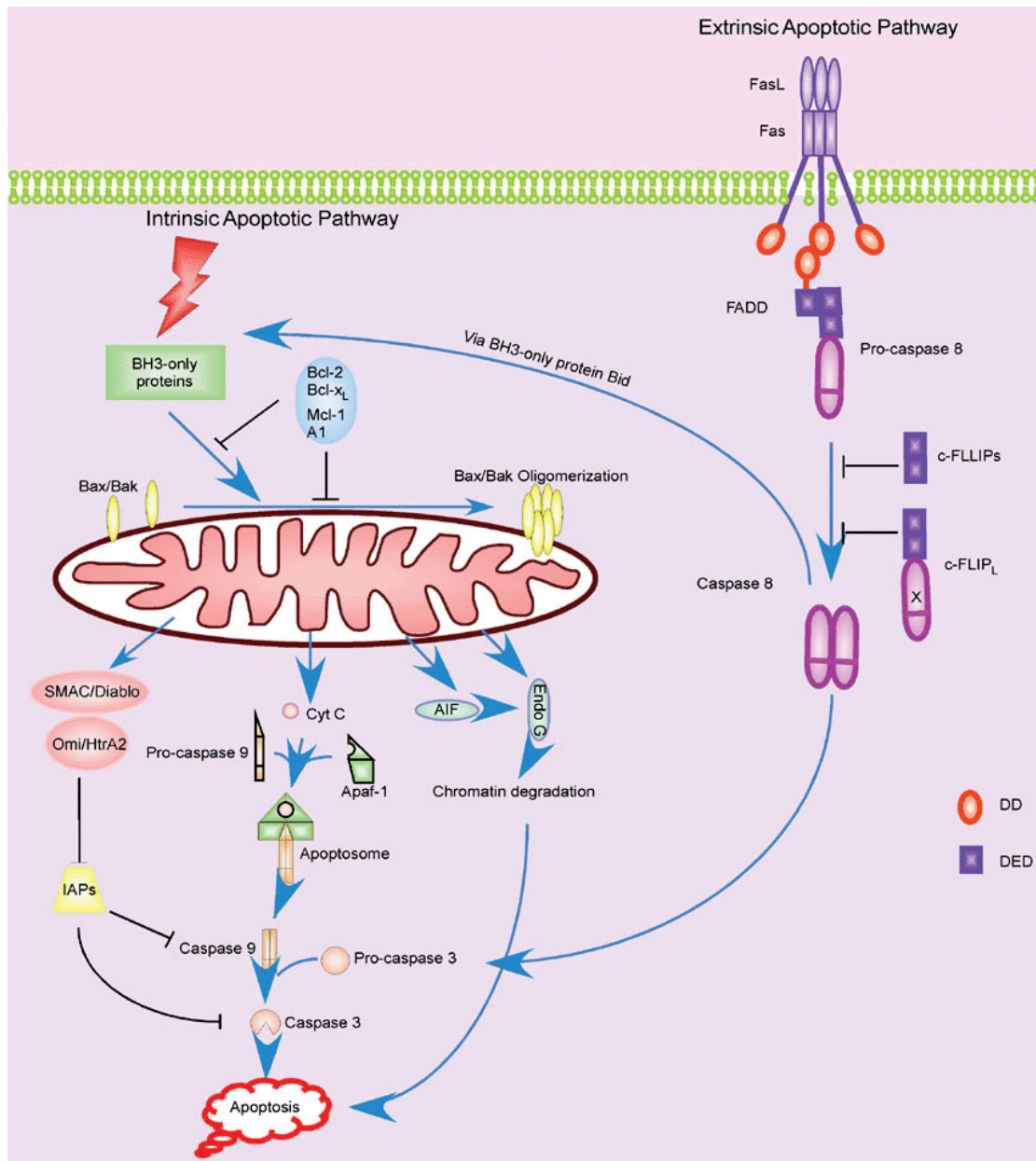
Η νέκρωση, ο «τυχαίος» κυτταρικός θάνατος είναι μια παθολογική διαδικασία που συμβαίνει όταν τα κύτταρα εκτεθούν σε σοβαρό χημικό ή φυσικό ερέθισμα. Κατά τη νέκρωση η απώλεια της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης οδηγεί σε εισροή ύδατος και εξωκυττάρων ιόντων. Τα ενδοκυττάρια οργανύλλια και ιδιαιτέρως τα μιτοχόνδρια αλλά και το σύνολο του κυττάρου εξοιδαίνονται και ρήγνυνται με αποτέλεσμα το κυτταροπλασματικό περιεχόμενο να απελευθερώνεται στο εξωκυττάριο υγρό.

Από την άλλη πλευρά την απόπτωση χαρακτηρίζουν συγχρονισμένες μορφολογικές και βιοχημικές αλλαγές που πραγματοποιούνται μέσα στον πυρήνα, τα οργανύλλια, το κυτταρόπλασμα και την κυτταρική μεμβράνη (35). Η χρωματίνη συμπυκνώνεται και αθροίζεται στην περιφέρεια του πυρήνα ενώ παρατηρείται και η κατάτμηση του πυρήνα σε τμήματα χρωματίνης. Τα άλλα κυτταροπλασματικά

οργανύλλια παραμένουν δομικά ανέπαφα αν και ο σχηματισμός πόρων στη μιτοχονδριακή μεμβράνη συνδέεται με την απόπτωση. Τα κύτταρα ακολούθως στρογγυλεύουν, αποκολλώνται από τα γειτονικά κύτταρα, συρρικνώνονται και σχηματίζουν προσεκβολές που περιβάλλονται από κυτταρική μεμβράνη και αποβάλλονται ως «αποπτωτικά σωμάτια» που περιέχουν τόσο κυτταροπλασματικά οργανύλλια όσο και πυρηνικό υλικό. Τα αποπτωτικά σωμάτια στους ιστούς φαγοκυτταρώνονται ταχέως από γειτονικά κύτταρα-φαγοκύτταρα (35), διαδικασία που καλείται εφεροκυττάρωση.

Γίνεται αντιληπτό επομένως πως η απόπτωση αποτελεί μια διαδικασία με στόχο τη διατήρηση της βιωσιμότητας των ιστών, γεγονός που δε γίνεται να επιτευχθεί με τη διαδικασία της νέκρωσης. Επιπρόσθετα είναι κριτικής σημασίας ο ρόλος της απόπτωσης στη διατήρηση της ομοιόστασης των κυττάρων και κατ' επέκταση και των οργανισμών.

Η απόπτωση βρίσκεται σε δυναμική ισορροπία με τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Είναι δυνατό να ενεργοποιηθεί μέσω δυο κυρίαρχων οδών, η μια εμπλέκει το σύστημα των υποδοχέων θανάτου που εδράζονται στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης και καλείται εξωγενής αποπτωτική οδός (extrinsic apoptotic pathway) και η άλλη την απελευθέρωση από τα μιτοχόνδρια του κυτοχρώματος C ως απάντηση σε σήματα χημικού ή φυσικού στρες και ονομάζεται ενδογενής αποπτωτική οδός (intrinsic apoptotic pathway), (Εικόνα 8), (36).

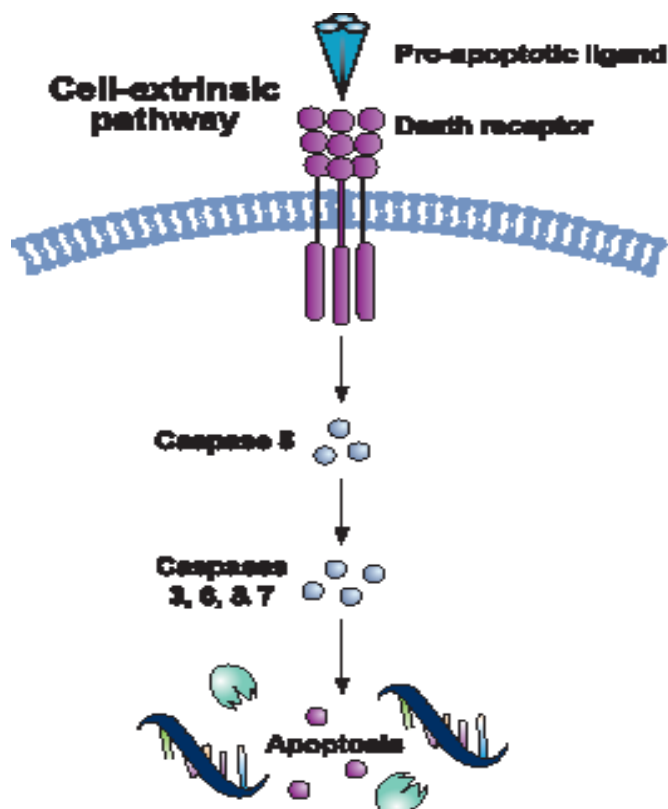


**Εικόνα 8.** Ενδογενής και εξωγενής αποπτωτική οδός, (1.7).

### 2.1 Εξωγενής αποπτωτική οδός

Η εξωγενής οδός της απόπτωσης αρχίζει μέσω της ενεργοποίησης συγκεκριμένων προ-αποπτωτικών υποδοχέων στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης με τη μεσολάβηση ειδικών μορίων, που είναι γνωστά ως προ-αποπτωτικοί συνδέτες (εικόνα 9), (37-40). Στους συνδέτες αυτούς περιλαμβάνονται οι Apo2L/TRAIL και CO95L/FASL καθώς

και μέλη της οικογένειας TNF όπως ο TNF- $\alpha$ , οι οποίοι ενώνονται με τους συγγενικούς τους υποδοχείς DR4/DR5, CD95/Fas και TNF-1 αντίστοιχα. Σε αντίθεση με την ενδογενή οδό απόπτωσης η εξωγενής οδός ενεργοποιείται ανεξάρτητα από τη δράση της πρωτεΐνης p53(41).



**Εικόνα 9.** Εξωγενής αποπτωτική οδός, (1.8).

Η ένωση του συνδέτη οδηγεί σε περαιτέρω ενεργοποίηση του συμπλέγματος του υποδοχέα και σε προσέλκυση της adaptor πρωτεΐνης Fas-associated death domain (FADD) καθώς και των κασπασών «επαγωγέων» 8 ή 10 με τη μορφή των προ-κασπασών σχηματίζοντας ένα σύμπλεγμα μορίων που επάγουν τον κυτταρικό θάνατο (death-inducing signaling complex :DISC), (42, 43)). Η δημιουργία του DISC φέρει τα μόρια των προ-κασπασών σε στενή επαφή μεταξύ τους, διευκολύνοντας με τον τρόπο αυτό την αυτοκαταλυτική

διαδικασία και την απελευθέρωση τους στο κυτταρόπλασμα, όπου εν συνεχεία ενεργοποιούν τις κασπάσες «τελεστές» 3, 6 και/ή 7 μεταπίπτοντας στην ενδογενή οδό της απόπτωσης (εικόνα 8).

Η αλλαγή της στερεοδομής του υποδοχέα μπορεί να είναι αποφασιστικής σημασίας για την ενεργοποίηση της κασπάσης 8 και η συσσώρευση των υποδοχέων και του επακόλουθου συμπλέγματος DISC είναι δυνατό να την επιτείνει ακόμη περισσότερο (45). Ο σχηματισμός του DISC ρυθμίζεται από ποικίλλους ανασταλτικούς μηχανισμούς μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται η πρωτεΐνη c-Fllice ( c-Fllice inhibitory protein : C-FLIP), η οποία ασκεί την επίδραση της στο DISC μέσω αλληλεπίδρασης με τη FADD μπλοκάροντας την ενεργοποίηση των κασπασών «επαγωγέων», καθώς και οι υποδοχείς «δολώματα», οι οποίοι δρουν είτε μπλοκάροντας τη σύνδεση του συνδέτη, είτε καταργώντας απευθείας την ενεργοποίηση του προ-αποπτωτικού υποδοχέα. Μετά την ενεργοποίηση του συμπλέγματος DISC η εξωγενής οδός υιοθετεί κοινό μηχανισμό με τις κασπάσες «τελεστές» που δρουν και στην ενδογενή οδό της απόπτωσης.

Είναι ενδιαφέρον το γεγονός πως η ενεργοποίηση της εξωγενούς οδού μέσω της σύνδεσης του CD95/FasL με το CD95/Fas οδηγεί σε δυο αποπτωτικά προγράμματα που καλούνται τύπου I και τύπου II. Τα κύτταρα που ακολουθούν το πρόγραμμα απόπτωσης τύπου I είναι δυνατό να υπερκεράσουν την ανάγκη της ενίσχυσης του σήματος του κυτταρικού θανάτου από τα μιτοχόνδρια καθώς παράγουν ικανά ποσά κασπάσης 8 που επιδρούν άμεσα στις κασπάσες

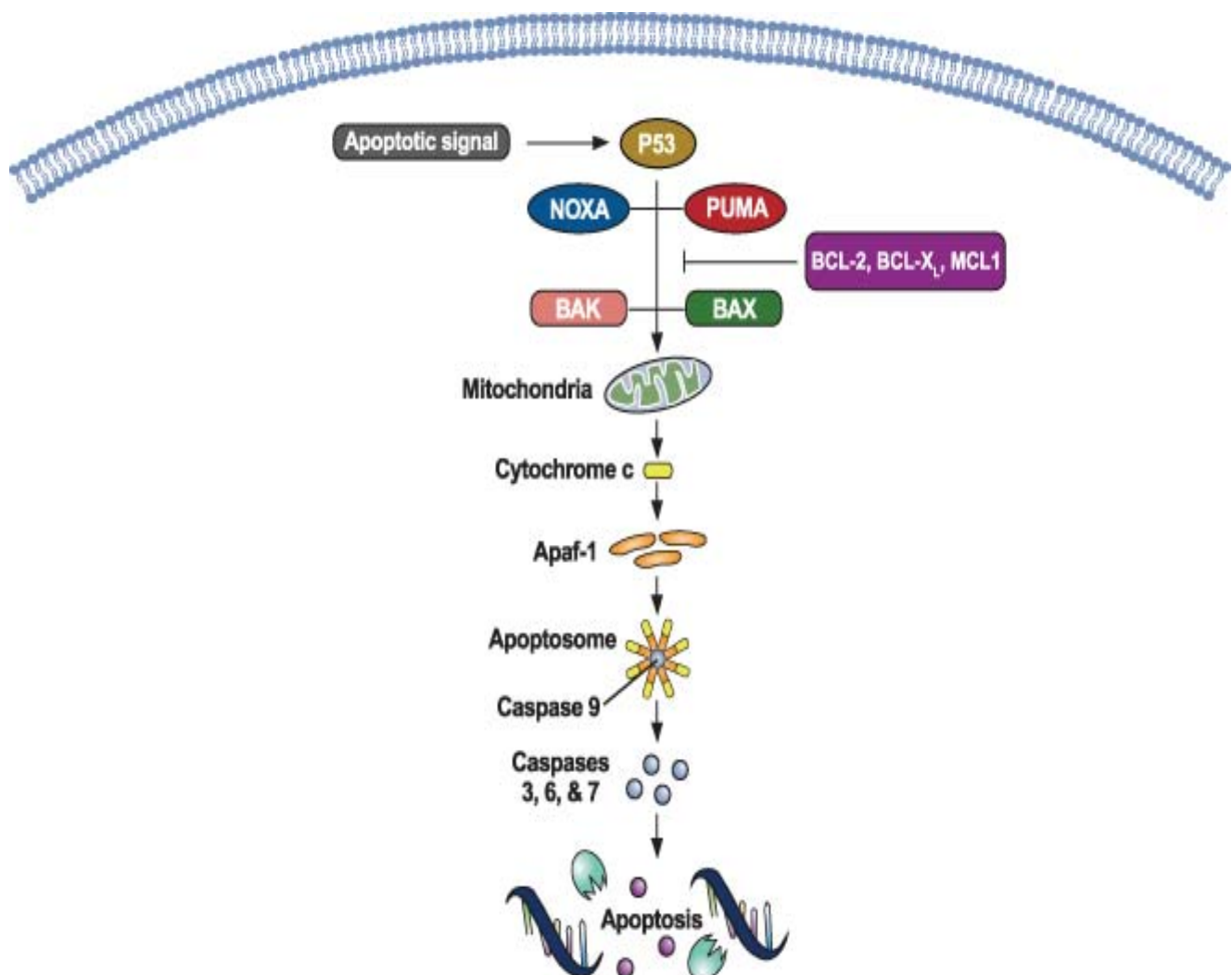
«τελεστές» και ολοκληρώνουν τη διαδικασία του κυτταρικού θανάτου (46). Επειδή τα κύτταρα αυτά ουσιαστικά προσπερνούν τη μιτοχονδριακή συμμετοχή σε ότι αφορά την απόπτωση που προκαλείται από CD95/Fas-CD95/FasL, η έκφραση τόσο της bcl2 όσο και της Bcl-X<sub>L</sub> δεν έχει καμία ανασταλτική επίδραση στο αποπτωτικό τους πρόγραμμα.

Από την άλλη πλευρά τα κύτταρα που ακολουθούν το πρόγραμμα απόπτωσης τύπου II παράγουν ελάχιστα ποσά ενεργού κασπάσης 8 και είναι απαραίτητη η ενίσχυση από τα μιτοχόνδρια του σήματος CD95. Πιο συγκεκριμένα το σήμα αυτό μεταδίδεται μέσω του προ-αποπτωτικού BH3 υποτόπου, που περιλαμβάνει μόνο μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών bcl2, όπως τη bid (46). Η διάσπαση της από την κασπάση 8 οδηγεί στη μετακίνηση της στα μιτοχόνδρια όπου ξεκινάει η απελευθέρωση μιτοχονδριακών παραγόντων που με τη σειρά τους επάγουν τον κυτταρικό θάνατο. Δεδομένου ότι τα κύτταρα αυτά (τύπου II) εξαρτώνται από τις μιτοχονδριακές αποπτωτικές λειτουργίες η έκφραση της bcl2 και της bcl-X<sub>L</sub> λειτουργούν προστατευτικά προσπαθώντας να αναστείλουν το αρχικό ερέθισμα CD95-mediated apoptosis. Παραμένει αδιευκρίνιστος ο λόγος των διαφορετικών προγραμμάτων απόπτωσης που παρατηρούνται στα κύτταρα τύπου I και τύπου II αν και είναι πιθανό να διαδραματίζει κάποιο ρόλο η διαφορετική έκφραση των αναστολέων των υποδοχέων του κυτταρικού θανάτου όπως της C-FLIP ή του X-linked αναστολέα της απόπτωσης (47).



## 2.2 Ενδογενής αποπτωτική οδός

Η ενδογενής οδός απόπτωσης, όπως χαρακτηριστικά προσδιορίζει και το όνομα της, ξεκινάει μέσα από το ίδιο το κύτταρο και αντανάκλα την απάντηση του κυττάρου σε βλάβη του DNA, σε έναν «ελαττωματικό» κυτταρικό κύκλο, στην υποξία, σε απώλεια παραγόντων απαραίτητων για την επιβίωση του κυττάρου ή και σε άλλους τύπους έντονου κυτταρικού στρες. Η οδός αυτή περιλαμβάνει την απελευθέρωση προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών οι οποίες ενεργοποιούν κασπάσες των μιτοχονδρίων, διαδικασία η οποία τελικά ενεργοποιεί την απόπτωση (Εικόνα 10), (38, 48) .



**Εικόνα 10.** Ενδογενής αποπτωτική οδός, (1.8).

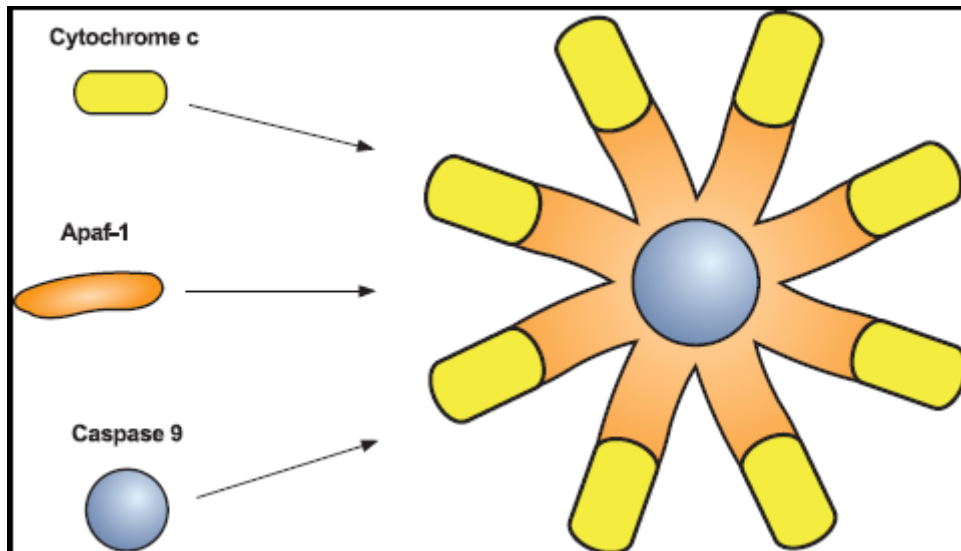
Η ενδογενής αποπτωτική οδός εξαρτάται από την ισορροπία της δράσης μεταξύ των προ- και αντι-αποπτωτικών μελών της οικογένειας πρωτεϊνών bcl2 [Πίνακας 3,(49)] η οποία λειτουργεί ρυθμίζοντας τη διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης (50).

**Πίνακας 3.** Προ- και αντι-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών BCL-2.

BCL-2 superfamily		
Pro-apoptotic		Anti-apoptotic
<b>BH3-only proteins</b>	<b>Multidomain (BH)</b>	<b>BCL-2</b>
<b>BIK</b>	<b>BAX</b>	<b>BCL-X<sub>L</sub></b>
<b>BAD</b>	<b>BAK</b>	<b>BCLW</b>
<b>BIM</b>	<b>BOK</b>	<b>MCL1</b>
<b>HRK</b>	<b>BOO</b>	<b>BCLB</b>
<b>BCLG</b>	<b>BCLG</b>	<b>+ viral homologs</b>
<b>HR</b>	<b>BCLB</b>	
<b>NOXA</b>	<b>BCL-RAMBO</b>	
<b>PUMA</b>		
<b>+ others</b>		

Τα μέλη της οικογένειας bcl2 περιέχουν ομόλογους τόπους με χαρακτηριστική δομή που καλούνται bcl2 homology domain (BH) και διακρίνονται στους BH1, BH2, BH3 και BH4 (51). Οι προαποπτωτικές bcl2 πρωτεΐνες διαχωρίζονται σε δυο υποομάδες που καθορίζονται από τον αριθμό των περιοχών BH που περιέχουν. Υπάρχουν αυτές με πολλαπλές BH περιοχές (όπως η Bax και η Bak) και αυτές που έχουν μόνο την BH3 περιοχή (όπως η Bid, η Bad, η Bim, η Bmf, η PUMA και η NOXA) οι οποίες ενεργοποιούν τις προαποπτωτικές πρωτεΐνες με πολλαπλές BH περιοχές Bax και/ ή Bak, που προκαλούν εν συνεχεία τη διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης (51).

Στις αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας bcl2 περιλαμβάνονται οι bcl2 και η bcl-X<sub>L</sub> που δρουν προσπαθώντας να αποτρέψουν τη διαπερατότητα της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης αναστέλλοντας τη δράση των προαποπτωτικών πρωτεϊνών Bax και/ ή Bak (Εικόνα 6 και 8). Αφότου επιτευχθεί η διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης τόσο το κυτόχρωμα C όσο και η προαποπτωτική πρωτεΐνη SMAC/DIABLO μπορούν να μεταφερθούν από το διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων στο κυτταρόπλασμα (51). Πιο συγκεκριμένα η SMAC/DIABLO ως μέρος της ενδογενούς οδού της απόπτωσης αφού απελευθερωθεί από τα μιτοχόνδρια προάγει την απόπτωση μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με πρωτεΐνες αναστολείς της απόπτωσης (IAPs) διαταράσσοντας την ικανότητα τους να απενεργοποιήσουν τις κασπάσες (52, 53). Εξηγείται λοιπόν γιατί πολλές φορές η ενδογενής αποπτωτική οδός αναφέρεται και ως μιτοχονδριακή οδός. Από την άλλη πλευρά το κυτόχρωμα C συνδέεται με τον πρωτεασικό παράγοντα ενεργοποίησης της απόπτωσης (Araf-1) σχηματίζοντας μια πολυπρωτεϊνική δομή γνωστή ως αποπτώσωμα (εικόνα 11).



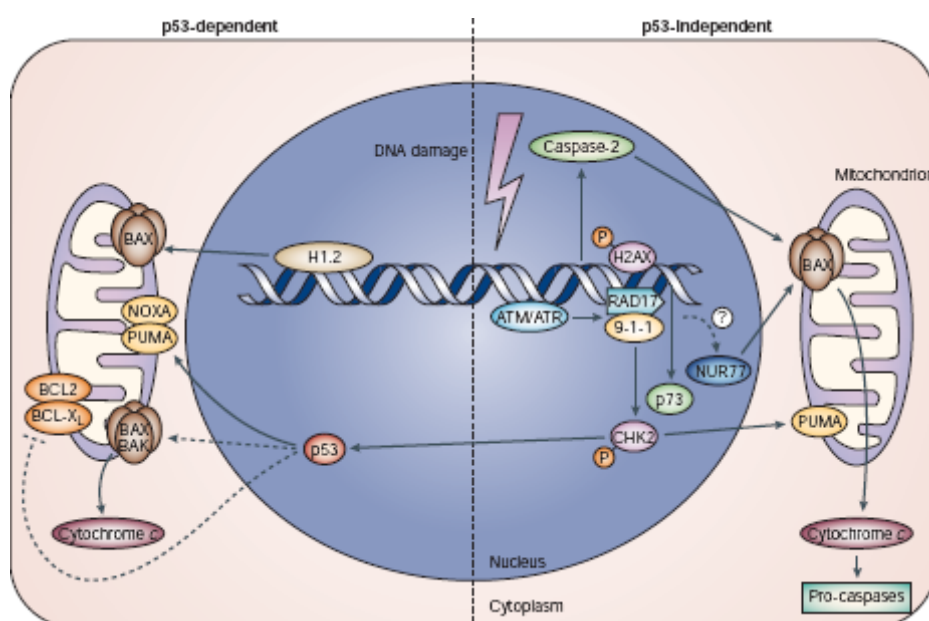
**Εικόνα 11.** Στοιχεία που συνθέτουν το αποπτόσωμα, (1.8).

Η συναρμολόγηση του αποπτοσώματος ρυθμίζεται σε μεγάλο βαθμό και πιθανά καθοδηγείται από νουκλεοτιδικούς παράγοντες (nucleotide exchange factors) και/ ή πρωτεΐνες ενεργοποιητές ΑΤΡάσης (45). Η πρωταρχική λειτουργία του αποπτοσώματος είναι ο πολυμερισμός και η αλλοστερική ρύθμιση της καταλυτικής δραστηριότητας των κασπασών. Η κασπάση «επαγωγέας» 9 προσελκύεται και συνδέεται με το αποπτόσωμα και ενεργοποιείται άμεσα με αποτέλεσμα στη συνέχεια την ενεργοποίηση των κασπασών «τελεστών» 3, 6 και 7 (52).

Εκτός από το ρόλο των πρωτεϊνών της οικογένειας bcl2 στο μονοπάτι αυτό των αντιδράσεων που περιγράψαμε καθοριστική είναι η συμβολή της προαποπτωτικής πρωτεΐνης p53 στην ενδογενή οδό της απόπτωσης. Στην ομάδα των προαποπτωτικών πρωτεϊνών ανήκει και η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 η οποία συμμετέχει στην απάντηση των ευκαρυωτικών κυττάρων σε βλάβη του DNA τους με δυο μηχανισμούς, είτε μέσω ενεργοποίησης του συστήματος

επιδιόρθωσης του DNA, είτε μέσω έναρξης των αποπτωτικών διεργασιών μετά από μια κριτική βλάβη του DNA.

Η p53 αλληλεπιδρά με μια σειρά από προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες από την οικογένεια bcl2 και συγκεκριμένα με τις Bax, Bip, PUMA και NOXA οι οποίες επάγουν τη διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης (MMP-mitochondrial membrane permeabilization) και επομένως απελευθερώνουν αποπτωτικούς παράγοντες από το διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων (54), (Εικόνα 12).



**Εικόνα 12.** Ο ρόλος της πρωτεΐνης p53 στην ενδογενή οδό της απόπτωσης, (1.9).

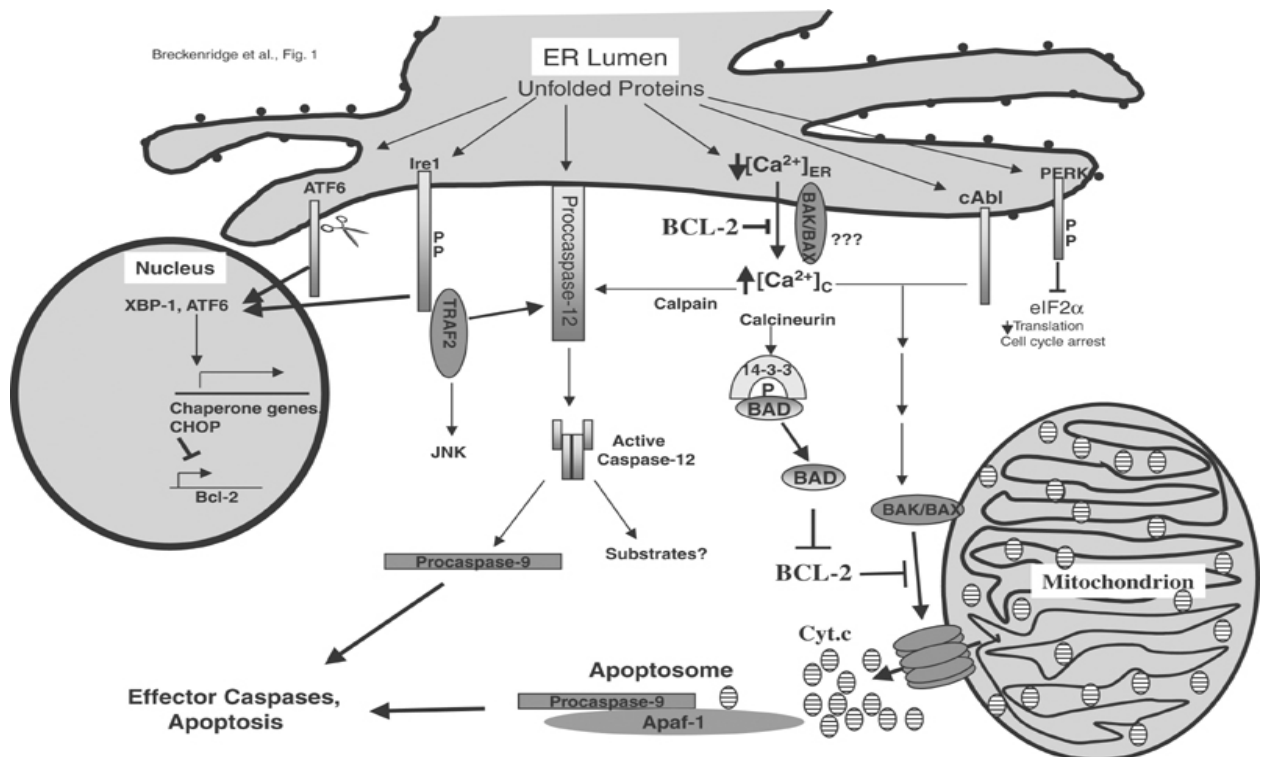
Η p53 ενισχύει τη δράση της πρωτεΐνης ASK ( ενεργοποιητής της κινάσης της S-φάσης, η οποία προάγει την ενεργοποίηση της Bax και την αλληλεπίδραση της με τα μιτοχόνδρια) καθώς και αρκετών άλλων πρωτεϊνών που απαντώνται στα μιτοχόνδρια. Οι πρωτεΐνες αυτές ευνοούν την

MMP μέσω οξειδωτικών αντιδράσεων όπως αυτές που καταλύονται από τη ρεδοκτάση της φερεδοξίνης και την οξειδάση της προλίνης ή μέσω άγνωστων μηχανισμών όπως αυτοί στους οποίους λειτουργούν ως μεσολαβητές οι p53AIP1 (p53-regulated apoptosis inducing protein 1) και η mtCLIC (mitochondrial chloride intracellular channel-4).

Επιπρόσθετα η p53 συνδέεται στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και ανταγωνίζεται τις αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες bcl2 και bcl-X<sub>L</sub> που η δράση τους στοχεύει στην αποτροπή της διαπερατότητας της μεμβράνης τους. Άλλο ένα πεδίο δράσης της p53 είναι η επίδραση της σε πρωτεϊνικά μόρια που βρίσκονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (π.χ η σκοτίνη) ή στην κυτταρική μεμβράνη όπως οι CD95, DR5 και PERP με τελικό αποτέλεσμα την έναρξη των αποπτωτικών λειτουργιών. Επιπλέον σε απάντηση σε βλάβη του DNA η πρωτεΐνη p53 είναι δυνατό να διεγείρει την απελευθέρωση από τον πυρήνα της ιστόνης H1.2 η οποία με τη σειρά της επιδρά στα μιτοχόνδρια και προκαλεί MMP (55).

Είναι απαραίτητο να επισημανθεί στην ενδογενή οδό της απόπτωσης και ο κριτικής σημασίας ρόλος του ενδοπλασματικού δικτύου (ΕΔ) που τα τελευταία χρόνια γίνεται όλο και πιο σαφής (56). Αναλυτικότερα η επίδραση στρεσογόνων παραγόντων στο ΕΔ αντανάκλαται στην αδυναμία φυσιολογικής αναδίπλωσης των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της απάντησης στις μη αναδιπλούμενες πρωτεΐνες (UPR – unfolded protein response), (Εικόνα 13) Αρχικά σημειώνεται γενικευμένη μείωση της πρωτεϊνικής σύνθεσης από το ΕΔ καθώς και ταυτόχρονη αύξηση της

παραγωγής σαπερονών [πρωτεΐνες με προστατευτικό ρόλο που αποτρέπουν το σχηματισμό μη επιθυμητών δεσμών και βοηθάνε στον ορθό τρόπο πύκωσης και ωρίμανσης άλλων κυτταρικών πρωτεϊνών,(57)]. Σε περίπτωση σοβαρού και παρατεταμένου στρεσογόνου ερεθίσματος η UPR αδυνατεί να αποκαταστήσει τη φυσιολογική κυτταρική λειτουργία οδηγώντας σε ενεργοποίηση της απόπτωσης (56).



**Εικόνα 13.** Συμμετοχή του ενδοπλασματικού δικτύου στις αποπτωτικές διεργασίες ,(1.10).

Στοιχεία που ανακύπτουν από μελέτες επισημαίνουν ότι το ΕΔ ρυθμίζει τις αποπτωτικές λειτουργίες τόσο μέσω ευαισθητοποίησης των μιτοχονδρίων σε μια ποικιλία ενδογενών και εξωγενών ερεθισμάτων όσο και μέσω άμεσης έναρξης της απόπτωσης από σήματα κυτταρικού θανάτου που

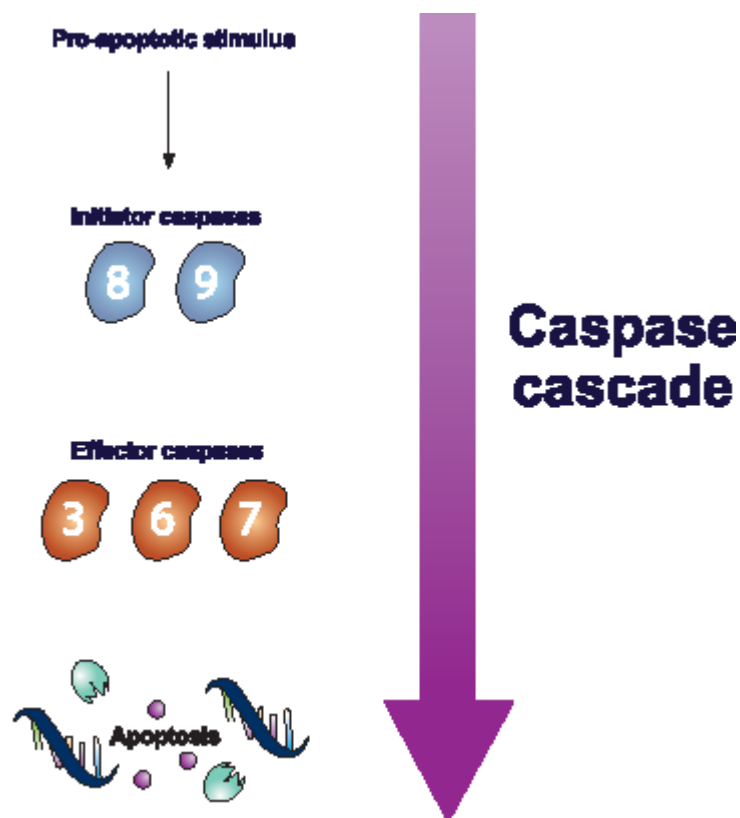
απορρέουν από το ίδιο το ΕΔ. Στη μεμβράνη του ΕΔ εδράζονται μέλη πρωτεϊνών και από τις τρεις ομάδες της οικογένειας bcl2 που φαίνεται πως επηρεάζουν την ομοιόσταση του οργανυλλίου, πιθανά επιδρώντας στη διαπερατότητα της μεμβράνης του (58). Η απελευθέρωση ασβεστίου για παράδειγμα από το ΕΔ, έχει ενοχοποιηθεί ως σύμβαμα-κλειδί σε πολλά αποπτωτικά μοντέλα και πιο συγκεκριμένα, από τον τρόπο απελευθέρωσης του εξαρτάται αν θα συμβεί άμεση ενεργοποίηση των «τελεστών» του κυτταρικού θανάτου, ή μόνο ευαισθητοποίηση των μιτοχονδρίων στις αποπτωτικές μεταβολές. Επιπρόσθετα ένας μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών του ενδοπλασματικού δικτύου παίζει ρόλο στις αποπτωτικές λειτουργίες είτε μέσω αλληλεπίδρασης με τις πρωτεΐνες της οικογένειας bcl2, είτε μέσω τροποποίησης της απάντησης του ΕΔ στα επίπεδα της απελευθέρωσης ασβεστίου, ενώ κάποιες από τις πρωτεΐνες του ΕΔ αποτελούν υπόστρωμα των κασπασών με αποτέλεσμα να υπάρχει η δυνατότητα ρύθμισης της φάσης εκτέλεσης της απόπτωσης (58).

Παράλληλα, πρόσφατες μελέτες σχετικά με τον τρόπο που στρεσογόνοι παράγοντες που δρουν στο ΕΔ συσχετίζονται με την απόπτωση έδειξαν πως το ενδοπλασματικό δίκτυο, όπως και τα μιτοχόνδρια, μπορεί άμεσα να ενεργοποιήσει τον καταρράκτη αντιδράσεων της απόπτωσης με πρωταγωνιστές τα μόρια των κασπασών (57,58).



### 2.3 Καταρράκτης των κασπασών

Ο καταρράκτης των αντιδράσεων των κασπασών (Εικόνα 14) παίζει ζωτικής σημασίας ρόλο στην εισαγωγή, μεταγωγή, ενίσχυση και εκτέλεση των αποπτωτικών σημάτων μέσα στο κύτταρο.



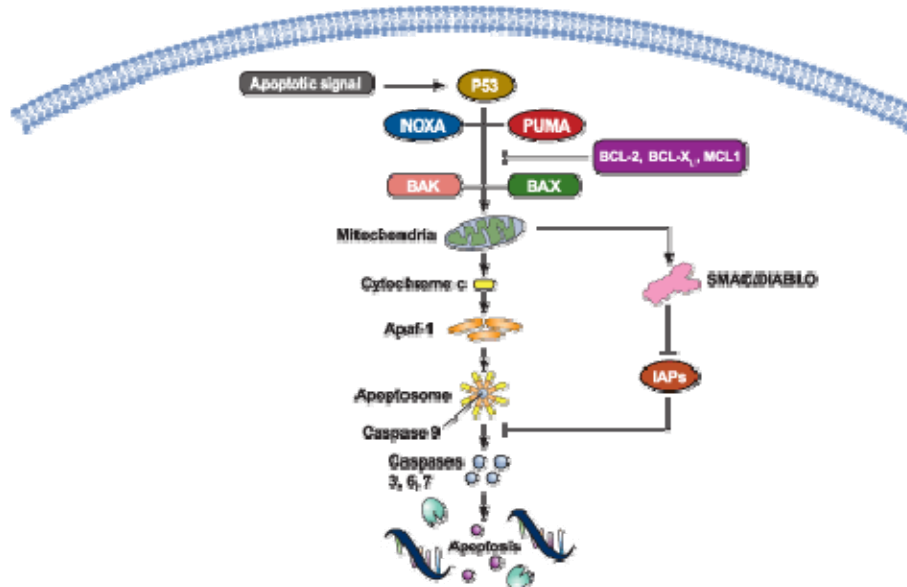
**Εικόνα 14.** Καταρράκτης ενεργοποίησης κασπασών, (1.8).

Οι κασπάσες αποτελούν μια ομάδα ενδοκυττάρων πρωτεϊνών κυστεΐνης, ένζυμα τα οποία αφού ενεργοποιηθούν μέσω τόσο της ενδογενούς όσο και της εξωγενούς οδού απόπτωσης καταστρέφουν βασικές κυτταρικές πρωτεΐνες

οδηγώντας σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Υπάρχουν δυο βαθμίδες ενεργοποίησης των κασπασών κατά τη διάρκεια της απόπτωσης.

Οι κασπάσες «επαγωγείς» ( κασπάσες 2, 8, 9 και 10) ενεργοποιούνται μέσω σημάτων των αποπτωτικών οδών και με τη σειρά τους ενεργοποιούν τις κασπάσες «τελεστές» (κασπάσες 3, 6 και 7) οι οποίες σε ένα εκτεταμένο καταρράκτη αντιδράσεων ολοκληρώνουν την κυτταρική απόπτωση (44) .

Ο καταρράκτης αντιδράσεων των κασπασών ξεκινάει από τη συγκέντρωση συμπλεγμάτων πολλαπλών πρωτεϊνών που ενεργοποιεί τις κασπάσες «επαγωγείς», οι οποίες απελευθερώνονται και είναι πλέον ικανές να ενεργοποιήσουν τις κασπάσες «τελεστές». Υπό φυσιολογικές συνθήκες η δραστηριότητα των κασπασών ελέγχεται από τις πρωτεΐνες C-FLIP και από αυτές της οικογένειας IAP ( πρωτεΐνες αναστολές της απόπτωσης - Inhibitor of Apoptosis family of Proteins), από τις οποίες τουλάχιστον δέκα έχουν αναγνωρισθεί και περιλαμβάνουν τις XIAP, cIAP1, cIAP2, MLIAP, SURVIVIN και BRUCE (44, 59). Οι IAPs χαρακτηρίζονται από την παρουσία συγκεκριμένων περιοχών (BIRs) οι οποίες συνδέονται άμεσα με την ανασταλτική δραστηριότητα τους έναντι των κασπασών. Χωρίς ωστόσο να εμπλέκονται άμεσα στα αποπτωτικά σήματα αυτά καθαυτά, κάποιες από αυτές τις πρωτεΐνες αποτρέπουν τον κυτταρικό θάνατο καταστέλλοντας τη δραστηριότητα κασπασών «επαγωγέων» και «τελεστών» (εικόνα 15).



**Εικόνα 15.** Ενδογενής αποπτωτική – Δράση των IAPs, (1.8).

Στοιχεία που ανακύπτουν από μελέτες πιθανολογούν το ρόλο των πρωτεϊνών IAPs στη ρύθμιση της κυτταρικής διαίρεσης. Επιπλέον οι SURVIVIN και cIAP1 υπερεκφράζονται σε ποικίλες κακοήθειες.

### 3. ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΚΑΙ ΧΑΠ

#### 3.1 Απόπτωση και ΧΑΠ

Η απόπτωση, μια φυσιολογική διαδικασία ζωτικής σημασίας για την κυτταρική ομοιόσταση, έχει αναγνωριστεί ως μηχανισμός που ενέχεται στην παθογένεια ποικίλων πνευμονικών νοσημάτων. Τα τελευταία χρόνια όλο και

περισσότερες δημοσιευμένες μελέτες τονίζουν το ρόλο της απόπτωσης στη ΧΑΠ καθώς έχουν καταγραφεί μη φυσιολογικές αποπτωτικές διεργασίες στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους του πνευμονικού παρεγχύματος.

Η σημασία της απόπτωσης στην παθογένεια του εμφυσήματος πηγάζει αρχικά, από μελέτες σε πειραματόζωα (ποντίκια). Είναι σημαντικό να επισημάνουμε πως αναλύοντας δεδομένα από μελέτες με πειραματικά μοντέλα ΧΑΠ πρέπει να λαμβάνουμε υπόψη μας τη ράτσα των ποντικιών καθώς από αυτήν εξαρτάται η ανάπτυξη εμφυσηματικών περιοχών στους πνεύμονες τους μετά την έκθεση τους σε καπνό τσιγάρου (60, 61).

Πιο συγκεκριμένα τα DBA/2 ποντίκια αναπτύσσουν εμβλωματικό εμφύσημα σε απάντηση στον καπνό του τσιγάρου πιο γρήγορα από τα C57BI/6J ποντίκια. Επίσης στα DBA/2 ποντίκια η ανάπτυξη εμφυσήματος προηγείται της εμφάνισης αποπτωτικών κυττάρων σε περιοχές με χαμηλό σήμα για τον υποδοχέα VEGF-R2 (60), ενώ δε συμβαίνει το ίδιο και στην περίπτωση των C57BI/6J ποντικιών. Επιπρόσθετα τα μοντέλα πειραματοζώων συχνά δεν εκπροσωπούν όλα τα χαρακτηριστικά της νόσου όπως αυτά παρουσιάζονται στους ανθρώπους.

Η σύγχρονη αντίληψη σχετικά με την παθογένεια της ΧΑΠ όπως προαναφέρθηκε περιλαμβάνει την τοπική συγκέντρωση φλεγμονωδών κυττάρων ως απάντηση στον καπνό του τσιγάρου τα οποία απελευθερώνουν ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και πρωτεολυτικά ένζυμα προκαλώντας αποδόμηση της μεσοκυττάριας ουσίας του πνεύμονα και το θάνατο των

δομικών κυττάρων του πνεύμονα. Παρολ'αυτά σε διάφορα μοντέλα πειραματοζών με ΧΑΠ η ανάπτυξη του εμφυσήματος παρατηρήθηκε παρόλη την απουσία αξιόλογης φλεγμονής του πνεύμονα. Οι μελέτες αυτές έδειξαν πως τουλάχιστο στα μοντέλα πειραματοζών η απόπτωση των κυψελιδικών και ενδοθηλιακών κυττάρων επαρκεί για να προκαλέσει εμφύσημα ακόμη και χωρίς τη συγκέντρωση φλεγμονωδών κυττάρων. Να προστεθεί δε πως στις συγκεκριμένες μελέτες οι εμφυσηματικές αλλοιώσεις προκλήθηκαν μέσω άμεσης στόχευσης των κυψελιδικών κυττάρων (62) ή μέσω απενεργοποίησης του VEGFR (63-65) ή του VEGF (66).

Πρώτος ο Kasahara και οι συνεργάτες του περιέγραψαν τη σχέση μεταξύ VEGF, απόπτωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων και εμφυσήματος (63). Οι ερευνητές αυτοί έδειξαν πως ο αποκλεισμός του υποδοχέα VEGF σε μοντέλα ποντικών οδήγησε σε απόπτωση των κυψελιδικών κυττάρων και διάταση των αεροχώρων. Επιπρόσθετα η θεραπεία με αναστολέα κασπασών απέτρεψε την απόπτωση των κυττάρων των μεσολοβίδιων διαφραγματιών (septal cells) καθώς και την ανάπτυξη εμφυσήματος σε απάντηση στον αποκλεισμό του υποδοχέα του VEGF. Παράλληλα έχει περιγραφεί πως η ενδοφλέβια χορήγηση σε ποντίκια α<sub>1</sub>-αντιθρυψίνης, εμποδίζει τη δημιουργία εμφυσήματος που απορρέει από τον αποκλεισμό του υποδοχέα VEGF.

Ο Aoshiba και οι συνεργάτες του έδειξαν πως η ενδοτραχειακή χορήγηση ενεργής κασπάσης-3 σε ποντίκια οδήγησε στην απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων, σε αυξημένη ελαστολυτική δραστηριότητα στο BAL και στην

ανάπτυξη εμφυσηματικών αλλοιώσεων (62). Πρόσφατα ο Petrache και οι συνεργάτες του ανέφεραν πως η ενδοτραχειακή ενστάλαξη σε ποντίκια κεραμιδίου, που αποτελεί ένα σημαντικό ρυθμιστικό σφιγγολιπίδιο ( highly regulated sphingolipid second messenger) , ενεργοποιεί την απόπτωση των επιθηλιακών κυψελιδικών και ενδοθηλιακών κυττάρων και επιτείνει την αύξηση των αεροχώρων (64). Παράλληλα υψηλά επίπεδα κεραμιδίων των πνευμόνων ανιχνεύθηκαν στους πνεύμονες ασθενών με ΧΑΠ επισημαίνοντας τον πιθανό ρόλο της αυξημένης έκφρασης τους στην παθογένεια της ΧΑΠ. Αυτή ήταν η πρώτη μελέτη που περιέγραψε την ανάμιξη ενός μη πρωτεϊνικού αποπτωτικού μεσολαβητή στην παθογένεια του εμφυσήματος.

Άλλες ερευνητικές ομάδες έδειξαν πως η εξαρτώμενη απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων από την καθεψίνη S, αποτελεί γεγονός κριτικής σημασίας στην παθογένεια του εμφυσήματος που επάγεται από την ιντερφερόνη-γ (67). Στηριζόμενοι σε αυτό το μοντέλο πρόσφατα αναδείχθηκε η ιντερφερόνη-γ ως δυναμικός ενεργοποιητής τόσο της εξωγενούς όσο και ενδογενούς αποπτωτικής οδού (68).

Επιπρόσθετα ο έλεγχος του χρόνου επίδρασης του καπνίσματος σε ποντίκια σύμφωνα με τον Cao και συνεργάτες έδειξε πως ο αριθμός των αποπτωτικών κυττάρων αλλά και αυτών που πολλαπλασιάζονταν ήταν αυξημένος στην ομάδα των πειραματοζώων που ο χρόνος έκθεσης τους ήταν μεγαλύτερος. Σε ότι αφορά δε την αναλογία PI/AI των επιθηλιακών κυττάρων (δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού/ δείκτης κυτταρικής απόπτωσης) ήταν

σημαντικά μικρότερη στις ομάδες που είχαν εκτεθεί στον καπνό του τσιγάρου σε σύγκριση με τους μάρτυρες (69).

Η παρατήρηση από τους Tsao και συνεργάτες ότι η υπερέκφραση του παράγοντα ανάπτυξης του πλακούντα (PIGF) από γενετικά τροποποιημένα ποντίκια προκαλεί αυξημένη απόπτωση των κυψελιδικών κυττάρων και πνευμονικό εμφύσημα συνδυάζεται με το δεδομένο πως ο PIGF είναι ομόλογος παράγοντας με τον VEGF. Ο PIGF δρα μέσω ρύθμισης της δραστηριότητας του VEGF ή μέσω ενεργοποίησης των ενδοκυττάρων σημάτων που αφορούν στην απόπτωση, στον πολλαπλασιασμό ή την αγγειογένεση (70).

Έχει προταθεί επίσης πως χυμικοί και CD4+ εξαρτώμενοι μηχανισμοί είναι δυνατό να οδηγήσουν στην απόπτωση των κυψελιδικών κυττάρων και στην ανάπτυξη εμφυσήματος (71). Η ενδοπεριτοναϊκή ένεση σε πειραματόζωα ενδοθηλιακών κυττάρων, οδήγησε σε παραγωγή αντισωμάτων έναντι των ενδοθηλιακών κυττάρων, εισροή CD4+ T-λεμφοκυττάρων στον πνεύμονα, επίταση της απόπτωσης των κυψελιδικών κυττάρων και ενεργοποίηση των μεταλλοπρωτεϊνών της θεμέλιας ουσίας οδηγώντας στην ανάπτυξη εμφυσήματος.

Εκτός από τις μελέτες που έχουν γίνει σε μοντέλα ΧΑΠ πειραματοζώων τα τελευταία χρόνια διαρκώς πληθαίνουν οι ερευνητικές ομάδες που μελετούν το ρόλο της απόπτωσης στην παθογένεια της ΧΑΠ χρησιμοποιώντας κυρίως δείγματα πνευμονικού ιστού από ασθενείς με ΧΑΠ και ομάδες ελέγχου (Πίνακες 4 και 5),(118 και 119).

**Πίνακας 4.** Μελέτες απόπτωσης στη ΧΑΠ, (118).

Cell type		Reference
<b>Epithelial and endothelial cells</b>		
Human studies	↑ apoptosis	Segura-Valdez (2000); Majo (2001)
	↓ VEGF, ↓ VEGF R2, ↓ VEGF KDR	Kasahara, Tuder, Cool (2000); Kasahara et al (2001)
	↑ bax	Yokohori (2004); Imai et al (2005)
	sFRP-1 gene expression	Imai and D'Armiento (2002)
	↑ bad	Imai et al (2005)
	↑ Fas	Hodge et al (2005)
	↑ p53	Hodge et al (2005)
	↑ activated caspases	Hodge et al (2005)
	↑ 4-HNE-modified proteins	Rahman et al (2002)
Animal and in vitro studies	VEGF R blockade → ↑ apoptosis	Kasahara, Tuder, Taraseviciene-Stewart, et al (2000); Tuder, Zhen, et al (2003)
	injection of caspase 3 or Chariot → ↑ apoptosis	Aoshiha et al (2003)
	PIGF transgenic mice → ↑ apoptosis, ↓ VEGF	Tsao et al (2004)
	↓ ingestion of apoptotic cells by macrophages	Hodge, Hodge, Scicchitano, et al (2003)
<b>Neutrophils</b>		
Human and animal studies	No difference in PBN apoptosis in stable COPD	Pletz et al (2004); Noguera et al (2004)
	↓ PBN apoptosis in acute exacerbations	Pletz et al (2004)
	↑ Mac-1, ↓ L-selectin of PBN	Noguera et al (2004)
	↓ apoptosis of BALF granulocytes (horses)	Turlej et al (2001)
<b>Lymphocytes</b>		
Human studies	↑ apoptosis, ↑ Fas, ↑ TNF-α, ↑ TNFR1, ↓ bcl2 in PBT	Hodge, Hodge, Reynolds, et al (2003); Hodge et al (2005)
	↑ apoptosis, ↑ p53, ↑ activated caspases in BALFT	Hodge et al (2005)
<b>Skeletal myocytes</b>		
Human studies	No difference in apoptosis between COPD-controls	Gosker et al (2003)
	↑ apoptosis in COPD with low BMI	Agusti et al (2002)
<b>Soluble apoptotic markers</b>		
Human studies	↑ plasma sFas in severe COPD	Yasuda et al (1998)
	No difference in plasma sFasL	Yasuda et al (1998); Takabatake et al (2000)

**Abbreviations:** BALF, bronchoalveolar lavage fluid; BALFT, BALF T-cells; BMI, body mass index; sFRP-1, frizzled-related protein; 4-HNE, 4-Hydroxy-2-nonenal; KDR, kinase insert domain-containing receptor; PBN, peripheral blood neutrophils; PBT, peripheral blood T-cells; PIGF, placenta growth factor; R, receptor; sFas, soluble Fas receptor; sFasL, soluble Fas ligand; TNF-α, tumor necrosis factor-α; VEGF, vascular endothelial growth factor.

Ο Segura-Valdez και οι συνεργάτες του περιέγραψαν αύξηση της απόπτωσης (χρησιμοποιώντας TUNEL) στα ενδοθηλιακά κύτταρα σε τομές πνευμονικού ιστού ασθενών με ΧΑΠ συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Αν και σε μικρότερο ποσοστό, παρατηρήθηκαν επίσης αποπτωτικά κυψελιδικά,



διάμεσα και φλεγμονώδη κύτταρα στους πνεύμονες ασθενών με ΧΑΠ ενώ δεν ίσχυε το ίδιο και για την ομάδα ελέγχου (72).

**Πίνακας 5.** Μελέτες απόπτωσης σε ανθρώπινο πνευμονικό ιστό, (119).

Reference	Patients	COPD defined by	Controls	Increased Apoptosis in patients	Increased Proliferation in patients
Segura-Valdez [23]	Chronic Bronchitis Emphysema	-Medical history -Pulmonary Function -Histology/CT	-Male individuals who died from other causes than lung diseases -smoking status unknown	-endothelial cells -alveolar epithelial cells -interstitial cells -inflammatory cells	NA
Majo [27]	Emphysema	-Pulmonary Function -Histology	-Never smokers -Smokers without emphysema	-No difference between groups	NA
Kasahara [28]	Emphysema	-Pulmonary Function -Histology/CT	Non smokers -Smokers without airway obstruction	-alveolar epithelial cells -endothelial cells	NA
Yokohori [25]	Emphysema	-Pulmonary Function -Histology	-Asymptomatic smokers -Asymptomatic nonsmokers	-alveolar epithelial cells type II	alveolar epithelial cells type II
Imai [24]	Emphysema	-Pulmonary Function -Histology	-accidental death victims -unused donor lungs for LTX -Smoking status unknown	-alveolar epithelial cells -endothelial cells -mesenchymal cells	Increased (cell type not specified)
Hodge [26]	COPD	-Medical history -Pulmonary Function	-Never smokers	-airway epithelial cells (obtained by BAL) -BAL T-cells	NA

BAL = bronchoalveolar lavage; CT = computed tomography; LTX = lung transplantation; NA = not available

Ο Imai και οι συνεργάτες κατέγραψαν αύξηση των αποπτωτικών κυττάρων (κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα και μεσεγχυματικά κύτταρα) στον εμφυσηματικό πνευμονικό ιστό καθώς και αύξηση των ενεργοποιημένων υποομάδων της κασπάσης 3 (μια σημαντική κασπάση «τελεστής» του καταρράκτη των αντιδράσεων της απόπτωσης) . Επιπρόσθετα η έκφραση των προαποπτωτικών πρωτεϊνών bax και bad περιγράφηκε σε εμφυσηματικούς ασθενείς, αλλά όχι στην ομάδα ελέγχου. Η αντιαποπτωτική πρωτεΐνη bcl2 δεν εντοπίστηκε ούτε στο φυσιολογικό ούτε στον

εμφυσηματικό πνευμονικό ιστό. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως στους εμφυσηματικούς πνεύμονες σημειώθηκε αυξημένος πολλαπλασιασμός των κυττάρων (73). Η ίδια ομάδα έλεγξε την έκφραση της sFRP-1, μιας πρωτεΐνης που επάγει τον κυτταρικό θάνατο, και παρατήρησε πως ήταν αυξημένη στους εμφυσηματικούς ασθενείς, ενώ γενικότερα η αύξηση του αποπτωτικού δείκτη στον πνευμονικό ιστό συνδεόταν στενά με τη σοβαρότητα της νόσου (73).

Παρόμοια ευρήματα περιγράφουν και άλλες μελέτες επισημαίνοντας αύξηση τόσο της απόπτωσης όσο και του πολλαπλασιασμού των κυψελιδικών κυττάρων σε ασθενείς με εμφύσημα σε σχέση με καπνιστές χωρίς ΧΑΠ ή με μη καπνιστές (74). Ο Hodge και οι συνεργάτες του αναφέρουν αυξημένη απόπτωση των κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων και των T-λεμφοκυττάρων στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ασθενών με ΧΑΠ συγκριτικά με μη καπνιστές (75). Η αυξημένη απόπτωση στους ασθενείς με ΧΑΠ επισημαίνεται και μετά τη διακοπή του καπνίσματος. Επόμενη μελέτη τους από υλικό προερχόμενο από βρογχικό brushing ανέδειξε αυξημένη έκφραση της προαποπτωτικής πρωτεΐνης p53, της Fas και των ενεργοποιημένων κασπασών στα επιθηλιακά κύτταρα ασθενών με ΧΑΠ (76).

Υπάρχουν όμως και αντικρουόμενες απόψεις καθώς στη διεθνή βιβλιογραφία έχει ανακοινωθεί πως δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στα αποπτωτικά κυψελιδικά κύτταρα σε πνευμονικό ιστό εμφυσηματικών καπνιστών και καπνιστών χωρίς εμφύσημα. Παρολ' αυτά η απόπτωση στους καπνιστές παρουσίασε μια αμφίδρομη σχέση

με το συνολικό ιστορικό καπνίσματος : ο αποπτωτικός δείκτης μειώθηκε στους καπνιστές χωρίς εμφύσημα σε ένα ελάχιστο όριο στα 40 πακέτα/έτη και ακολούθως αυξήθηκε απότομα όσο αυξάνονταν τα πακέτα/έτη στους καπνιστές με εμφύσημα.

Πολύ ενδιαφέροντα είναι τα ευρήματα των Kasahara και συνεργατών σύμφωνα με τα οποία παρατηρείται αύξηση των αποπτωτικών κυψελιδικών κυττάρων στους εμφυσηματικούς πνεύμονες σε σχέση με μη καπνιστές, καπνιστές χωρίς ΧΑΠ και ασθενείς με πρωτοπαθή πνευμονική υπέρταση. Επιπλέον η έκφραση των πρωτεϊνών VEGF και VEGFR2 καθώς και του mRNA τους ήταν σημαντικά μειωμένη στο εμφύσημα (31). Οι συγγραφείς διατύπωσαν την υπόθεση πως αυτή η μείωση των παραγόντων διατήρησης των ενδοθηλιακών κυττάρων με αποτέλεσμα τον κυτταρικό τους θάνατο είναι δυνατό να αποτελεί μέρος της παθογένειας του εμφυσηματος. Την υπόθεση αυτή επιβεβαιώνουν αποτελέσματα και άλλων μελετών που δείχνουν πως τα επίπεδα της πρωτεΐνης VEGF σε προκλητά πτύελα ασθενών με ΧΑΠ μειώνονται ανάλογα με τη σοβαρότητα της νόσου(78). Παρόλ' αυτά πρέπει να αναφερθεί πως αν και η έκφραση της VEGF σχετίζεται με τη διατήρηση των κυψελιδικών δομών ωστόσο ο 936C/T πολυμορφισμός του γονιδίου της VEGF που συνδέεται με χαμηλά επίπεδα VEGF στο πλάσμα δε συσχετίζεται με την ανάπτυξη ΧΑΠ (79).

### 3.2 Απόπτωση και εξωπνευμονικές εκδηλώσεις της ΧΑΠ

Η ΧΑΠ είναι μια πολύπλοκη πνευμονική νόσος με συστηματικές επιπλοκές που αφορούν πολλά όργανα (80). Δεδομένου ότι η απόπτωση των δομικών κυττάρων των πνευμόνων ασθενών με ΧΑΠ έχει καταδειχθεί, διάφορες ερευνητικές ομάδες έχουν περιγράψει αλλαγές στην απόπτωση ή στα σήματα της απόπτωσης τόσο σε ότι αφορά τη συστηματική κυκλοφορία όσο και σχετικά με τους σκελετικούς μυς ασθενών με ΧΑΠ.

Έχει παρατηρηθεί μια αυξημένη τάση των T κυττάρων του περιφερικού αίματος να αποπίπτουν (81). Το γεγονός αυτό συνοδεύεται από μια αυξημένη έκφραση διαφόρων μεσολαβητών που εμπλέκονται στην επαγωγή της απόπτωσης των T-κυττάρων όπως ο TNF- $\alpha$ /TNFR1, ο Fas και ο TGF $\beta$ . Οι συγγραφείς διατύπωσαν την υπόθεση πως αυξημένα επίπεδα απόπτωσης των T-κυττάρων οδηγούν σε διαταραχή της ομοιόστασης, σε ανεπαρκείς μηχανισμούς κάθαρσης και διαιώνιση της φλεγμονώδους απάντησης.

Ο Takabatake και οι συνεργάτες του περιέγραψαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα TNF- $\alpha$ , και sTNF-R55 και R75 στην κυκλοφορία ασθενών με ΧΑΠ, ενώ το επίπεδο των sFas-L, ενός επαγωγέα της απόπτωσης, στον ορό του αίματος και του υποδοχέα του sFas, ενός αναστολέα της απόπτωσης, στο πλάσμα, δεν ήταν αυξημένα στους ασθενείς με ΧΑΠ (82). Άλλοι ερευνητές σημείωσαν σημαντική αύξηση του sFas στο πλάσμα ασθενών με σοβαρή ΧΑΠ συγκριτικά με ασθενείς με

ήπια ή μέτρια ΧΑΠ, ενώ ο sFas-L ήταν σε φυσιολογικά επίπεδα σε όλες τις ομάδες ελέγχου (83).

Η ανεξήγητη απώλεια σωματικού βάρους και αδυναμία των περιφερικών μυών αποτελούν σημαντικό πρόβλημα για τους ασθενείς με ΧΑΠ δεδομένου ότι επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την ποιότητα ζωής τους. Σύμφωνα με τον Allen και τους συνεργάτες του η απόπτωση σε μονοπύρρηνα κύτταρα οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο ενώ στα πολυπύρρηνα κύτταρα όπως είναι και το μυϊκό κύτταρο προκαλεί μυϊκή ατροφία (84). Ένας πιθανός μηχανισμός, λοιπόν, της απώλειας μυϊκής μάζας μπορεί να είναι η μείωση του αριθμού των μυϊκών ινών ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των αποπτωτικών διεργασιών.

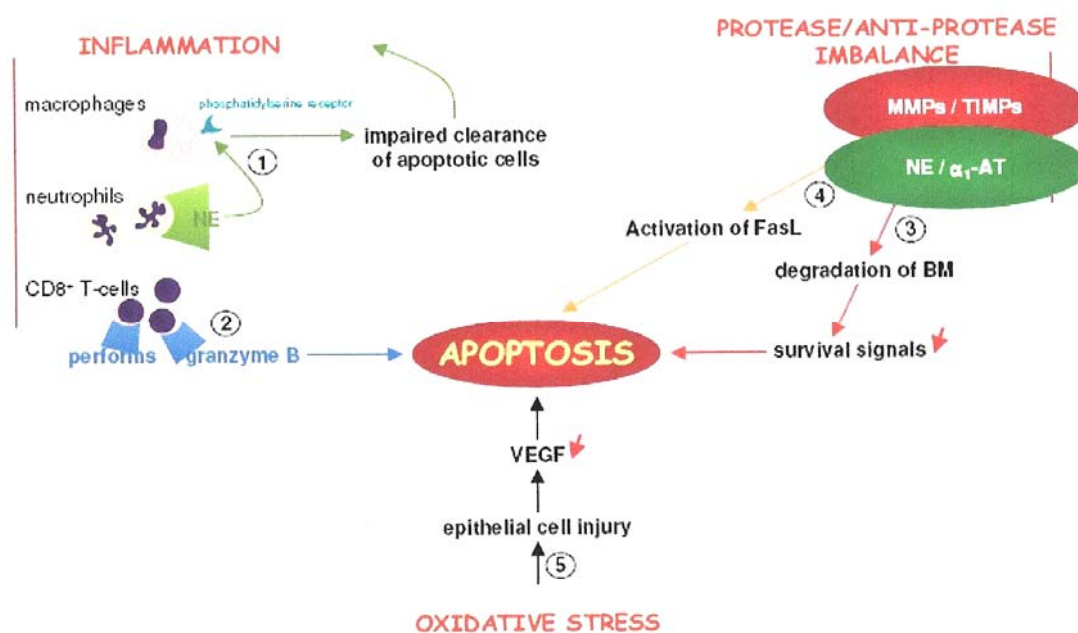
Ο Gosker και οι συνεργάτες ανέφεραν την απουσία απόπτωσης των μυϊκών ινών τουλάχιστο όχι σε μεγαλύτερο βαθμό στους ασθενείς με ΧΑΠ συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (85). Από την άλλη πλευρά ο Agustí και οι συνεργάτες του παρατήρησαν πως η απόπτωση των σκελετικών μυών ήταν αυξημένη σε ασθενείς με ΧΑΠ με χαμηλό δείκτη μάζας σώματος (BMI) σε σύγκριση με ασθενείς με ΧΑΠ με φυσιολογικό δείκτη μάζας σώματος, με υγιείς εθελοντές και με κατακεκλιμένους ασθενείς που υποβάλλονταν σε ορθοπεδικό χειρουργείο (86). Επιπρόσθετα βρήκαν πως σε ασθενείς με ΧΑΠ ο δείκτης μάζας σώματος είναι αντίστροφα ανάλογος με το επίπεδο απόπτωσης των σκελετικών μυών και ότι η απόπτωση των σκελετικών μυών σχετίζεται με μικρότερη αντοχή στην άσκηση παρόλο τον παρόμοιο βαθμό απώλειας της αναπνευστικής λειτουργίας. Μια απλή εξήγηση για τα διαφορετικά αποτελέσματα των δυο αυτών μελετών είναι πως

στη μελέτη του Gosker οι ασθενείς με ΧΑΠ που περιλήφθηκαν βρίσκονταν σε σταθερό σωματικό βάρος και είχαν παρόμοιο BMI με τα άτομα της ομάδας ελέγχου.

Η αυξημένη απόπτωση των σκελετικών μυών δε μπορεί να αποδοθεί στο γήρας, τη μειωμένη δραστηριότητα, το ιστορικό καπνίσματος, τη λήψη στεροειδών από το στόμα αλλά ούτε και στην μειωμένη αναπνευστική λειτουργία (86). Οι ασθενείς με ΧΑΠ και χαμηλό σωματικό βάρος ήταν νεότεροι από αυτούς με φυσιολογικό BMI, είχαν παρόμοια αναπνευστική λειτουργία (περιλαμβανομένης και της αρτηριακής υποξαιμίας) και ιστορικό καπνίσματος και κανείς δε λάμβανε στεροειδή από το στόμα. Το οξειδωτικό στρες και η συστηματική φλεγμονή αποτελούν προεξέχοντα χαρακτηριστικά της ΧΑΠ και δυνητικά μπορούν να επάγουν την απόπτωση (80, 87). Επιπρόσθετα με δεδομένο το σημαντικό ρόλο των μιτοχονδρίων στην απόπτωση, έχουν αναφερθεί διαταραχές σε μιτοχονδριακό επίπεδο στους σκελετικούς μυς ασθενών με ΧΑΠ. Η αύξηση της δραστηριότητας της οξειδάσης του κυτοχρώματος (88) και η παρουσία συγκεκριμένων βιο-ενεργητικών διαταραχών (ATS-ERS 1999) έχουν σημειωθεί στους σκελετικούς μυς ασθενών με ΧΑΠ. Στην απώλεια μυϊκής μάζας κεντρικό ρόλο μπορεί να έχει η κυτταροκίνη (TNF-α) η οποία αλληλεπιδρώντας με τον υποδοχέα της που εντοπίζεται στην επιφάνεια των σκελετικών μυϊκών κυττάρων ενεργοποιεί την απόπτωση (80).

#### 4. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΜΕ ΤΟΥΣ ΑΛΛΟΥΣ ΠΑΘΟΓΕΝΕΤΙΚΟΥΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥΣ ΤΗΣ ΧΑΠ

Η απόπτωση φαίνεται πως αλληλεπιδρά με τους άλλους τρεις παθογενετικούς μηχανισμούς της ΧΑΠ ( φλεγμονή, διαταραχή ισορροπίας μεταξύ πρωτεασών και αντιπρωτεασών και οξειδωτικό στρες) συμβάλλοντας στην πολυπλοκότητα της νόσου (Εικόνα 16).



**Εικόνα 16.** Αλληλεπίδραση της απόπτωσης με τους άλλους παθογενετικούς μηχανισμούς της ΧΑΠ, που περιλαμβάνουν τη φλεγμονή, το οξειδωτικό στρες και τη διαταραχή πρωτεασών-αντιπρωτεασών, (119).

#### 4.1 Απόπτωση και φλεγμονή

Πολλοί ερευνητές έχουν δείξει, τουλάχιστο σε μοντέλα πειραματοζώων, πως η απόπτωση τόσο των κυψελιδικών όσο και των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι ικανή να προκαλέσει πνευμονικό εμφύσημα ακόμα και χωρίς τη συγκέντρωση φλεγμονωδών κυττάρων. Ωστόσο στους πνεύμονες ασθενών με ΧΑΠ υπάρχει εντυπωσιακή εισροή φλεγμονωδών κυττάρων και θεωρείται πιο πιθανό να συμβαίνουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φλεγμονωδών και αποπτωτικών μηχανισμών σε πολλά επίπεδα.

Τα κυψελιδικά μακροφάγα ασθενών με ΧΑΠ είναι λιγότερο αποτελεσματικά στη φαγοκυττάρωση των αποπτωτικών επιθηλιακών κυττάρων των αεραγωγών συγκριτικά με αυτά των μαρτύρων (71). Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί ως ένα βαθμό στην παρουσία μεγάλου αριθμού ενεργοποιημένων ουδετεροφίλων στη ΧΑΠ (89, 90). Έχει καταδειχθεί ότι η ουδετεροφιλική ελασάση κατατέμνει τον υποδοχέα φωσφατιδυλσερίνης των μακροφάγων με αποτέλεσμα την ανεπαρκή κάθαρση των αποπτωτικών κυττάρων και την παραμονή-επίταση της φλεγμονής (91).

Είναι ενδιαφέρον ότι εκτός από τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα παρατηρείται αύξηση και των CD8+ T-λεμφοκυττάρων στους πνεύμονες ασθενών με ΧΑΠ (92, 93). Τα κυτταροτοξικά αυτά CD8+ T-λεμφοκύτταρα είναι δυνατό να προκαλέσουν την απόπτωση των κυψελιδικών κυττάρων μέσω απελευθέρωσης περφορίνης, granzyme-B και TNF- $\alpha$  (94, 95).



#### 4.2 Απόπτωση και διαταραχή πρωτεασών-αντιπρωτεασών

Η αυξημένη πρωτεολυτική δραστηριότητα στους πνεύμονες ασθενών με ΧΑΠ είναι δυνατό να συσχετίζεται με την απόπτωση με ποικίλους τρόπους (96). Στη βασική μεμβράνη εκτός των άλλων εντοπίζονται σήματα για την κυτταρική επιβίωση, η απώλεια των οποίων ( ως αποτέλεσμα της αποδομής της βασικής μεμβράνης από την επίδραση των μεταλλοπρωτεϊνών της θεμέλιας ουσίας) μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την έναρξη της απόπτωσης. Η διαδικασία αυτή της επαγωγής της απόπτωσης που απορρέει από την απώλεια των κατάλληλων συνδέσεων μεταξύ κυττάρων και θεμέλιας ουσίας αποτελεί μέρος της ομοιόστασης των ιστών, αφού στοχεύει στη διατήρηση του σωστού αριθμού κυττάρων μέσω της ταχείας αντικατάστασης των κυττάρων του επιθηλίου τους (97). Ο Aoshiba και οι συνεργάτες του έχουν ήδη προτείνει το ρυθμιστικό ρόλο των αλληλεπιδράσεων μεταξύ κυττάρων και εξωκυττάριας ουσίας στην απόπτωση του βρογχικού επιθηλίου (98). Επιπλέον ανέφεραν την ελαστολυτική δραστηριότητα των αποπτωτικών επιθηλιακών πνευμονικών κυττάρων σε ένα μοντέλο πειραματοζώων με εμφύσημα (62).

Επιπρόσθετα η απόπτωση μπορεί να επηρεαστεί άμεσα από την πρωτεόλυση από σήματα που επάγουν τον κυτταρικό θάνατο. Έχει δειχθεί πως η MMP-7 διαχέει και ενεργοποιεί τον συνδέτη Fas ο οποίος παράγεται από τα επιθηλιακά κύτταρα, ρυθμίζοντας με τον τρόπο αυτό τις αποπτωτικές διεργασίες (99). Πρόσφατα δεδομένα προτείνουν την αντιφλεγμονώδη δράση της MMP-8 στη φλεγμονή των

αεραγωγών που οφείλεται σε ρύθμιση από τα αποπτωτικά φλεγμονώδη κύτταρα (100).

#### *4.3 Απόπτωση και οξειδωτικό στρες*

Ο Tudor και οι συνεργάτες του σε πειραματικό μοντέλο με ποντίκια στα οποία προκλήθηκε εμφύσημα μέσω αποκλεισμού του υποδοχέα VEGFR έδειξαν ότι η απόπτωση κυριαρχεί σε περιοχές του πνεύμονα με έντονο οξειδωτικό στρες και επίσης ότι η πειραματική αναστολή των αποπτωτικών λειτουργιών μείωσε χαρακτηριστικά την έκφραση των δεικτών του οξειδωτικού στρες (64). Η χορήγηση παράγοντα με αντιοξειδωτική δράση απέτρεψε την ανάπτυξη στα κυψελιδικά κύτταρα της απόπτωσης καθώς και της διάτασης των αεροχώρων γεγονός το οποίο αναδεικνύει μια θετική ανατροφοδοτική αλληλεπίδραση μεταξύ οξειδωτικού στρες και απόπτωσης.

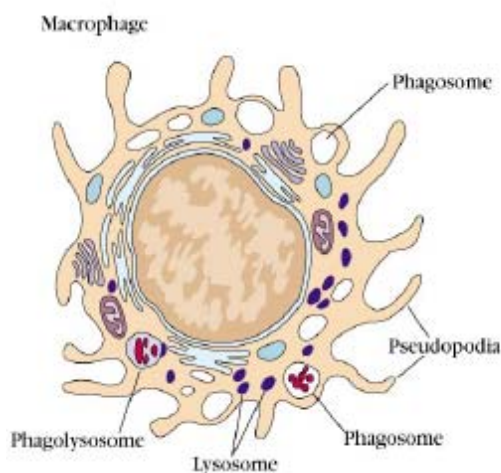
Άλλες ερευνητικές ομάδες έχουν δείξει ότι ποντίκια με διαταραχή στην έκφραση αντιοξειδωτικών γονιδίων παρουσιάζουν αυξημένο αριθμό αποπτωτικών κυψελιδικών κυττάρων ( κυρίως ενδοθηλιακών και τύπου II επιθηλιακών κυττάρων) και αναπτύσσουν πρόιμα και εκτεταμένα εμφυσηματικές αλλοιώσεις σε απάντηση στην έκθεση στον καπνό του τσιγάρου (101). Παράλληλα ο Kanazawa και οι συνεργάτες του ανέδειξαν αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού στρες και μια αντίστοιχη μείωση των επιπέδων του VEGF σε

προκλητά πτύελα ασθενών με ΧΑΠ (102), γεγονός που επιτείνεται με την επιδείνωση της νόσου. Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώνουν τη σχέση μεταξύ της διαταραχής οξειδωτικών-αντιοξειδωτικών ουσιών και της ομοιόστασης των κυψελιδικών κυττάρων που εξαρτάται από τον παράγοντα VEGF στους πνεύμονες ασθενών με ΧΑΠ. Έχει διατυπωθεί η υπόθεση πως η βλάβη των επιθηλιακών κυττάρων που οφείλεται στο οξειδωτικό στρες προκαλεί μείωση των επιπέδων του VEGF στον πνεύμονα οδηγώντας στην ανάπτυξη ΧΑΠ. Τα δεδομένα που υπάρχουν λοιπόν, αναδεικνύουν πως η απόπτωση δεν αποτελεί ένα μεμονωμένο γεγονός αλλά εμπλέκεται με όλους τους υποκείμενους παθογενετικούς μηχανισμούς της ΧΑΠ.

## **5. ΚΥΨΕΛΙΔΙΚΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ - ΠΝΕΥΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ ΤΥΠΟΥ II - Τ-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ**

### *5.1 Κυψελιδικά μακροφάγα*

Τα κυψελιδικά μακροφάγα έχουν ανώμαλο περίγραμμα και εμφανή ψευδοπόδια (Εικόνα 17). Το κυτταρόπλασμά τους περιέχει πολλά λυσοσώματα, φαγοσώματα και φαγολυσοσώματα. Στους καπνιστές, τα φαγολυσοσωματικά έγκλειστα είναι άφθονα και περιέχουν «σωματίδια πίσσας» και λεπτούς κρυστάλλους καολιτίνης. Το κυψελιδικό μακροφάγο είναι φυσιολογικός κάτοικος της κυψελίδας και εμφανίζει έντονη φαγοκυτταρική δραστηριότητα (103).



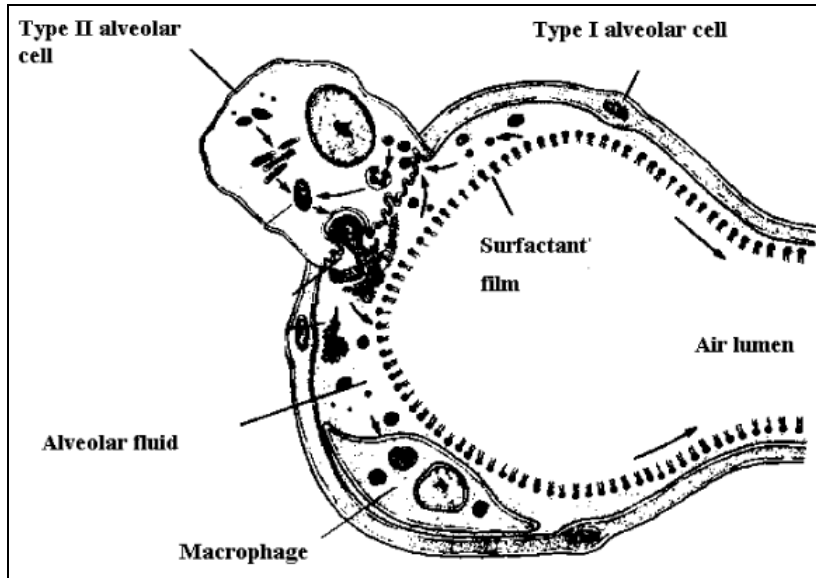
**Εικόνα 17.** Δομή μακροφάγου και απεικόνιση του σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, (1.11).

Τα μακροφάγα είναι κύτταρα με δυνατότητα παραγωγής μεγάλου αριθμού μεσολαβητών ανάλογα με το ερέθισμα μπορεί είτε να ενισχύσουν είτε να μειώσουν τη φλεγμονώδη αντίδραση. Προέρχονται από τα μονοκύτταρα του αίματος και κυκλοφορούν στους αεραγωγούς των αποφρακτικών ασθενών, ενώ ενεργοποιούνται μέσω των χαμηλής συγγένειας υποδοχέων της IgE (FcεRII) (104). Ένας μεγάλος αριθμός κυτταροκινών επηρεάζει τη μετανάστευσή τους και στον κυψελιδικό χώρο. Τα μονοκύτταρα/ μακροφάγα CD68<sup>+</sup> αυξάνονται σημαντικά σε αριθμό στο βρογχικό επιθήλιο του χρόνιου αποφρακτικού ασθενή (93, 105) και η αύξηση είναι ανάλογη με τη βαρύτητα της ΧΑΠ.(106). Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα συμμετέχουν στην απόφραξη των αεραγωγών και στη φλεγμονώδη αντίδραση με την έκκριση ουσιών με βλαπτική δράση στους βρόγχους όπως ένζυμα (107), παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF) (108), μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMP-9), ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, κυτταροκίνες κυρίως TNF-α (109), και ουσίες προαγωγής της έκκρισης της βλέννης (110).

Επίσης, δυνητικά συμμετέχουν στη ρύθμιση της διαδικασίας της επαναδιάταξης (remodeling) των αεραγωγών, μέσω της έκκρισης αυξητικών παραγόντων όπως ο PDGF (Platelet Derived Growth Factor),  $\beta$ -FGF (basic Fibroblast Growth Factor), και TGF (Transforming Growth Factor), που ενέχονται στην ίνωση των αεραγωγών (111). Από την άλλη πλευρά, τα μακροφάγα μπορεί να διαδραματίσουν αντιφλεγμονώδη ρόλο προστατεύοντας τον οργανισμό από την ανάπτυξη της φλεγμονώδους αντίδρασης (112). Τέλος τα μακροφάγα πιθανά δρουν και ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα των αλλεργιογόνων στα T-λεμφοκύτταρα (113).

## *5.2 Πνευμονοκύτταρα τύπου II*

Τα πνευμονοκύτταρα τύπου II είναι διπλάσια σε αριθμό από τα κύτταρα τύπου I αλλά λόγω του κυβικού τους σχήματος καλύπτουν μόνο το 7% της κυψελιδικής επιφάνειας (Εικόνα 18). Συχνά καταλαμβάνουν τις γωνίες της κυψελίδας και η επιφάνεια τους εμφανίζει άφθονες μικρολάχνες. Το κυτταρόπλασμά τους περιέχει μεγάλα μιτοχόνδρια με ευδιάκριτες ακρολοφίες, αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο, σύστημα Golgi και χαρακτηριστικές πεταλοειδείς δομές που χρώνονται όσμιο και αντιπροσωπεύουν τα εκκριτικά σωματίδια του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων (surfactant).



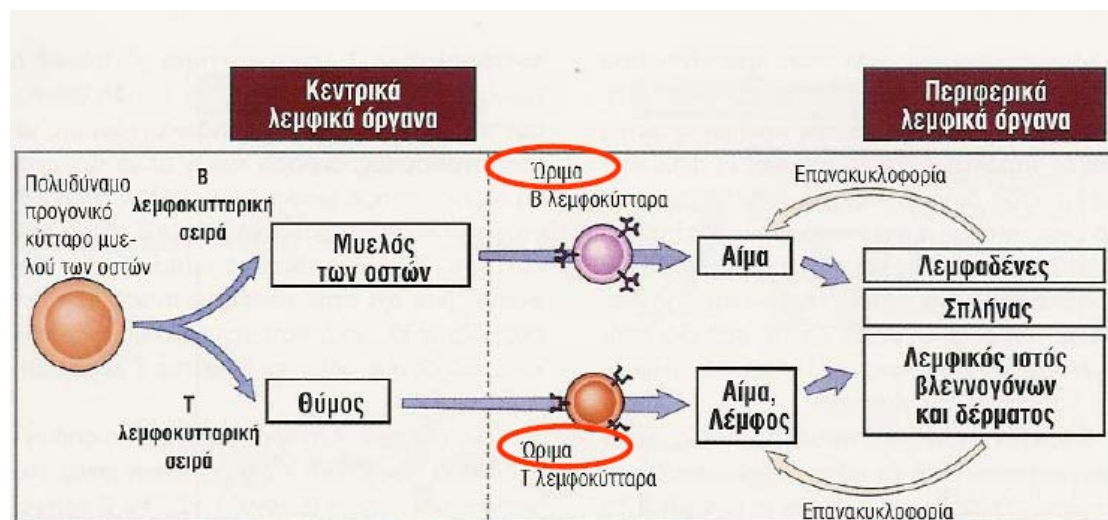
**Εικόνα 18.** Σχηματική απεικόνιση της κυψελίδας με πνευμονοκύτταρο τύπου I, II, και κυψελιδικό μακροφάγο, (1.12).

Ο ρόλος τους στην έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα έχει διευκρινιστεί με αυτοραδιογραφικές μελέτες ενσωμάτωσης πρόδρομων μορίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Με τεχνικές διαχωρισμού κυττάρων μελετήθηκαν *in vitro* αμιγή εναιωρήματα κυττάρων τύπου II και επιβεβαιώθηκε ότι αυτά τα κύτταρα εκκρίνουν τον επιφανειοδραστικό παράγοντα. Η εξωκυττάρια στοιβάδα του επιφανειοδραστικού παράγοντα φυσιολογικά καλύπτει όλη την κυψελίδα. Τα πνευμονοκύτταρα τύπου II είναι τα στελεχιαία κύτταρα από τα οποία αντικαθίστανται τα κατεστραμμένα τύπου I. Σε χρόνιες βλάβες τα πνευμονοκύτταρα τύπου II πολλαπλασιάζονται αλλά δε διαφοροποιούνται αρχικά, ενώ το κυψελιδικό τοίχωμα καλύπτεται από ένα κυβικό επιθήλιο που φαίνεται στο οπτικό μικροσκόπιο. Μελέτες σε ζώα έχουν δείξει ότι στο φυσιολογικό πνεύμονα ο χρόνος ανανέωσης των πνευμονοκυττάρων τύπου II είναι 25 ημέρες περίπου και η

μετατροπή των πνευμονοκυττάρων τύπου II σε πνευμονοκύτταρα τύπου I διαρκεί περίπου 2 ημέρες. Ο ρόλος των πνευμονοκυττάρων τύπου II στην παθογένεια της ΧΑΠ παραμένει αδιευκρίνιστος (114).

### 5.3 T-Λεμφοκύτταρα

Τα T-λεμφοκύτταρα κατέχουν κεντρικό ρόλο στην ανοσολογική απάντηση του οργανισμού στα ξένα αντιγόνα. Οφείλουν το όνομά τους στο γεγονός ότι διαφοροποιούνται στο θύμο αδένα (Thymus), (Εικόνα 19).



**Εικόνα 19.** Ωρίμανση λεμφοκυττάρων, (1.13)

Τα περισσότερα λεμφοκύτταρα είναι μικρά με διάμετρο  $\leq 10\mu\text{m}$  αν και σε μικρό ποσοστό υπάρχουν και μεγαλύτερα τα οποία περιέχουν αργυρόφιλα κοκκία στο κυτταρόπλασμα τους. Η πυρηνο-κυτταροπλασματική αναλογία των

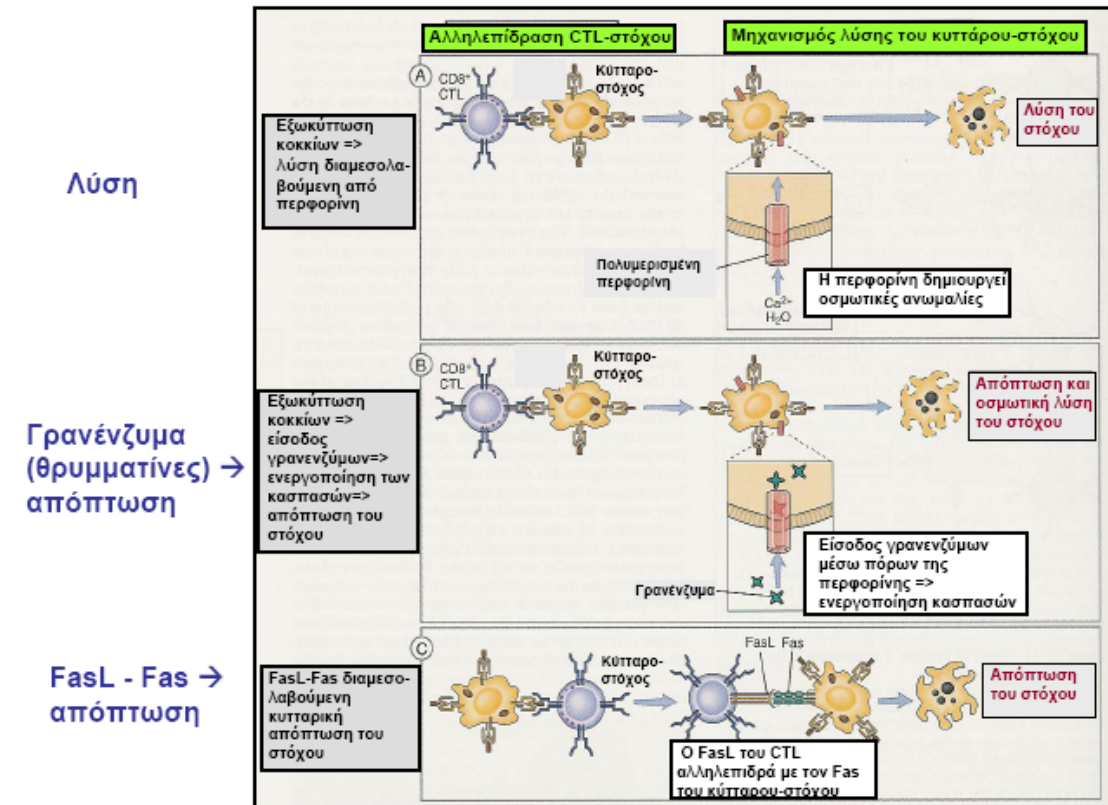
T-λεμφοκυττάρων είναι μεγάλη. Σε επίκρισμα αίματος με χρώση Romanovsky ο πυρήνας τους έχει βαθύ μωβ χρώμα, είναι συνήθως στρογγυλός ή ελαφρά δαντελωτός και αποτελείται από πυκνές συσσωρεύσεις χρωματίνης. Το κυτταρόπλασμα τους σχηματίζει ένα στενό στεφάνι στα μικρά λεμφοκύτταρα, μπορεί όμως να είναι άφθονο στα μεγαλύτερα. Περιέχει δε λίγα οργανύλλια όπως μιτοχόνδρια και συσκευή Golgi (115).

Τα T-λεμφοκύτταρα είτε κυκλοφορούν στο αίμα (συγκαταλέγονται στα λευκά αιμοσφαίρια), είτε είναι εγκατεστημένα στα όργανα του λεμφικού συστήματος (λεμφαδένες, σπλήνας κλπ). Κάθε T-λεμφοκύτταρο φέρει στην επιφάνειά του έναν υποδοχέα (TCR) που είναι εξειδικευμένος για τη σύνδεσή με ένα συγκεκριμένο αντιγόνο. Προκειμένου να αναγνωριστεί το αντιγόνο από τα T-λεμφοκύτταρα, θα πρέπει να έχει προηγηθεί η επεξεργασία του και η παρουσίασή του στην κατάλληλη μορφή από κάποιο αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο (μακροφάγο ή δενδριτικό κύτταρο) (115).

Τα T-λεμφοκύτταρα διαιρούνται σε βοηθητικά /επαγωγικά (που χαρακτηρίζονται από την παρουσία του δείκτη CD4 στην εξωτερική τους μεμβράνη) και σε κατασταλτικά /κυτταροτοξικά (που χαρακτηρίζονται από την παρουσία του δείκτη CD8 στην εξωτερική τους μεμβράνη). Τα κύτταρα της πρώτης κατηγορίας ενισχύουν την ανοσολογική απόκριση και βοηθούν στη διαφοροποίηση των B-λεμφοκυττάρων σε πλασματοκύτταρα. Τα κατασταλτικά



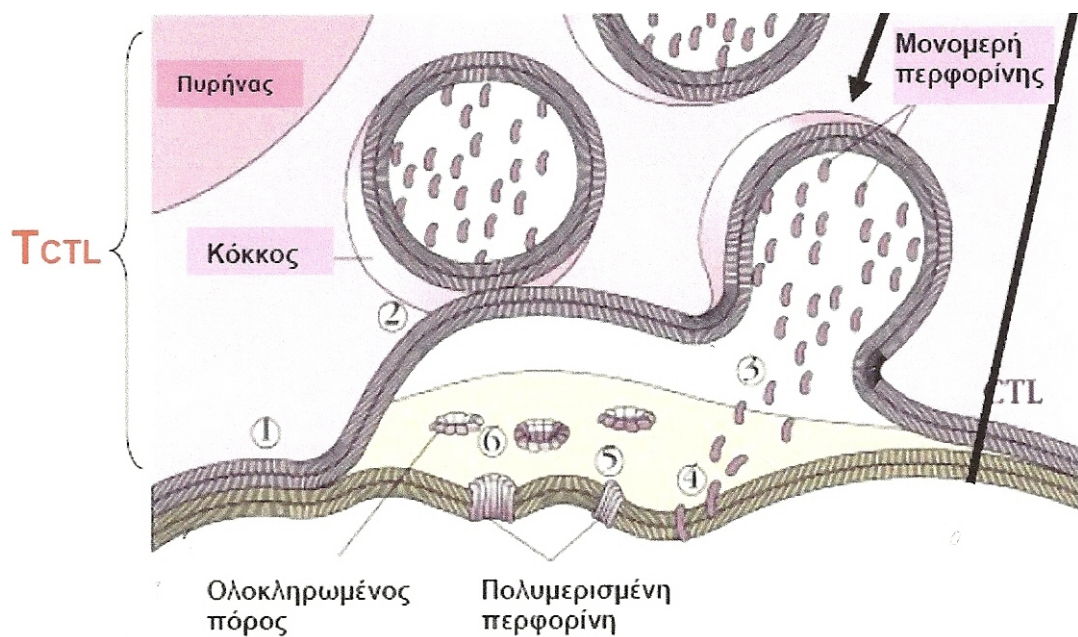
λεμφοκύτταρα έχουν ρυθμιστικό ρόλο, περιορίζοντας την ανοσολογική απάντηση. Τα κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα έχουν ως αποστολή τη λύση κυττάρων-στόχων μέσω έκκρισης ποικίλων μεσολαβητών (Εικόνα 20).



**Εικόνα 20.** Μηχανισμοί καταστροφής των κυττάρων-στόχων, (1.13).

Οι λεμφοκίνες που παράγονται από τα Τ-λεμφοκύτταρα έχουν ποικίλες δράσεις στις διεργασίες της ανοσολογικής απάντησης και της φλεγμονής. Για παράδειγμα, η ιντερλευκίνη 2 (IL-2) έχει αυτοκρινή δράση, καθώς προάγει τον πολλαπλασιασμό των ίδιων των Τ-λεμφοκυττάρων. Η ιντερλευκίνη 4 (IL-4) προάγει τη διαφοροποίηση των Β-λεμφοκυττάρων σε πλασματοκύτταρα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον

έχει η απελευθέρωση των πρωτεϊνών περφορίνης και granzyme από κοκκία των CD8+ T-λεμφοκυττάρων. Πιο συγκεκριμένα η περφορίνη εκκρίνεται και αφού πολυμεριστεί στη μεμβράνη του κυττάρου-στόχου οδηγεί στο σχηματισμό πόρων-καναλιών προκαλώντας εν συνεχεία τη λύση του (Εικόνες 20-21).



**Εικόνα 21.** Σχηματισμός πόρων στο κύτταρο στόχος με τη δράση της περφορίνης, (1.13).

Η granzyme είναι πρωτεάση που περιέχει σερίνη και ανήκει στην οικογένεια της χυμοθρυψίνης, εισέρχεται μέσω των πόρων της περφορίνης και ενεργοποιεί τις κασπάσες που προάγουν την κυτταρική απόπτωση (Εικόνα 20), (115).

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) αποτελεί παγκοσμίως μια σημαντική αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας στον ενήλικο πληθυσμό. (116). Σχετίζεται άμεσα με την καπνιστική συνήθεια και χαρακτηρίζεται από χρόνια φλεγμονή των αεραγωγών και προοδευτική καταστροφή του πνευμονικού παρεγχύματος οδηγώντας στην αναδιαμόρφωση των αεραγωγών (remodeling) και στο πνευμονικό εμφύσημα. (116). Στην παθογένεια της νόσου συμμετέχουν διάφοροι μηχανισμοί όπως η τοπική συσσώρευση φλεγμονωδών κυττάρων ,το οξειδωτικό στρες και η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ πρωτεολυτικών και αντιπρωτεολυτικών ενζύμων. Σύμφωνα με πρόσφατα δεδομένα, έχει περιγραφεί και τέταρτος σημαντικός παθογενετικός μηχανισμός στη ΧΑΠ που περιλαμβάνει την απορρύθμιση των αποπτωτικών διεργασιών σε κυτταρικό επίπεδο συμβάλλοντας στην καταστροφή του πνευμονικού ιστού (75,76,117-120)). Οι αποπτωτικές διεργασίες διακρίνονται στις εξωγενείς (μέσω ειδικών υποδοχέων) και στις ενδογενείς (μέσω των μιτοχονδρίων) (119).

Η ενδογενής αποπτωτική οδός είναι δυνατό να διεγερθεί τόσο από εσωτερικά όσο και από εξωτερικά ερεθίσματα και περιλαμβάνει ποικίλους μεσολαβητές που είναι δυνατό να προάγουν ή να αναστείλουν τη διαδικασία (76, 120). Οι πιο αντιπροσωπευτικοί ρυθμιστές του ενδογενούς

(μέσω των μιτοχονδρίων) συστήματος είναι το p53, που προάγει την απόπτωση και το bcl2 ένα μόριο με την αντίθετη δράση (121-123).

Το p53 είναι μια ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη που διατηρεί την ακεραιότητα του γονιδιώματος και προστατεύει από τις βλάβες που προκαλούνται στο DNA είτε μέσω ενεργοποίησης του συστήματος επιδιόρθωσης του DNA, είτε μέσω άμεσης έναρξης των αποπτωτικών διεργασιών στην περίπτωση εκτεταμένων βλαβών (121-122,124).

Η οικογένεια των bcl2 πρωτεϊνών παίζει κυρίαρχο ρόλο στις αποπτωτικές διεργασίες προστατεύοντας τα κύτταρα από μη αναστρέψιμες βλάβες αποτελώντας κομβικό σημείο για την πορεία που θα ακολουθήσουν μετά από ένα θανατηφόρο ερέθισμα. Περιλαμβάνει τόσο προ- όσο και αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες. Η πρωτεΐνη bcl2 βρίσκεται στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και δρα επιμηκύνοντας την επιβίωση των κυττάρων μέσω αναστολής της εξέλιξης τόσο των p53-εξαρτημένων όσο και των p53-ανεξάρτητων αποπτωτικών λειτουργιών.

Οι εισπνεόμενες οξειδωτικές ουσίες που περιέχονται στον καπνό του τσιγάρου καθώς και οι υψηλές στάθμες ελευθέρων ριζών οξυγόνου που παράγονται από τα φλεγμονώδη κύτταρα των αεραγωγών των ασθενών με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια προκαλούν σημαντικού βαθμού καταστροφή του DNA των κυττάρων του πνευμονικού παρεγχύματος. Άμεση απάντηση δίνεται με την ενεργοποίηση του ενδογενούς αποπτωτικού μηχανισμού με τη μεσολάβηση μη τυπικής ανοσολογικής συμμετοχής, όπου κυριαρχούν τα

CD8 κυτταροτοξικά κύτταρα (120, 125-126). Επιπρόσθετα σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της απόπτωσης και της επιτυχούς ανανέωσης των δομικών κυτταρικών στοιχείων του πνευμονικού ιστού, πιθανά εμπλέκεται στην παθογένεια της ΧΑΠ.

Στη μέχρι σήμερα βιβλιογραφία, δεν έχει μελετηθεί το πρότυπο έκφρασης του προ-αποπτωτικού δείκτη p53 και του αντι-αποπτωτικού μεσολαβητή bcl2, που και οι δυο συμμετέχουν στην ενδογενή οδό της απόπτωσης, σε πνευμονικό ιστό καπνιστών με ή χωρίς ΧΑΠ.

## **II. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### *II.A Πληθυσμός μελέτης*

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε δείγματα πνευμονικού ιστού από 43 άρρενα άτομα, που υποβλήθηκαν σε χειρουργική εκτομή μονήρους πνευμονικού όζου με ανοικτή θωρακοτομή. Τα υπό μελέτη άτομα διαιρέθηκαν σε δυο ομάδες :

- A) 23 καπνιστές με ΧΑΠ, σύμφωνα με τα κριτήρια της GOLD
- B) 20 καπνιστές χωρίς ΧΑΠ

Ως καπνιστές ορίστηκαν τα άτομα που είχαν τουλάχιστον 20 πακέτη-έτη ιστορικό καπνίσματος. (126). Όλα τα άτομα υποβλήθηκαν σε τυπικές δοκιμασίες πνευμονικής λειτουργίας, μετρήσεις αερίων αίματος και ακτινογραφία θώρακα. Η διάγνωση της ΧΑΠ στηρίχτηκε στα σπιρομετρικά κριτήρια ταξινόμησης της σοβαρότητας της ΧΑΠ της GOLD,

σύμφωνα με τις τιμές της μετά-βρογχοδιαστολή FEV<sub>1</sub>. Όλοι οι ασθενείς με ΧΑΠ που συμμετείχαν στη μελέτη ανήκαν στο στάδιο II κατά GOLD (FEV<sub>1</sub>/FVC<0.70, με 50%<FEV<sub>1</sub><80% του προβλεπόμενου) , (Πίνακας 6).

	Καπνιστές με ΧΑΠ	Καπνιστές χωρίς ΧΑΠ	Τιμή <b>p</b>
ΑΡΙΘΜΟΣ	23	20	
ΦΥΛΟ	23/0	20/0	
ΗΛΙΚΙΑ	64±7*	57±10*	0.03
ΚΑΠΝΙΣΤΙΚΗ ΣΥΝΗΘΕΙΑ	60±21*	50±27*	NS
<b>FEV<sub>1</sub></b> (% pred.)	64±16*	95±13*	0.0001
<b>FVC</b> (% pred)	80±18*	91±13*	0.02
<b>FEV<sub>1</sub>/FVC</b> (%)	63±6.5*	82±5*	0.0001
<b>Εισπνεόμενα αντιχολινεργικά</b> (δόση) <b>Ταχείας-δράσης</b> (Βρωμιούχο Ιπρατρόπιο) <b>ή</b> <b>Μακράς-δράσης</b> (Βρωμιούχο Τιοτρόπιο)	20mcg, τρεις φορές/ ημέρα  Μια φορά την ημέρα	N/A	
<b>Εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή</b> (δόση) (Βουδεσονίδη ή Μπεκλομεθαζόνη ή Φλουτικαζόνη)	100 mcg δυο φορές την ημέρα	N/A	

**Πίνακας 6.** Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά και σπυρομετρικές τιμές ασθενών με ΧΑΠ και καπνιστών χωρίς ΧΑΠ

Οι ασθενείς με ΧΑΠ λάμβαναν αγωγή με ταχείας ή μακράς δράσης εισπνεόμενα αντικολινεργικά (Πίνακας 6). Επιπρόσθετα προκειμένου να επιτύχουν την καλύτερη δυνατή πνευμονική λειτουργία περιεχειρητικά και να μειώσουν τον κίνδυνο μετεγχειρητικών επιπλοκών η ομάδα των ασθενών με ΧΑΠ έλαβε δυο φορές την ημέρα χαμηλές δόσεις εισπνεόμενων κορτικοστεροειδών για δέκα ημέρες συνολικά (2-3 ημέρες πριν το χειρουργείο και συνέχιση μέχρι την έξοδο τους από το νοσοκομείο). Τα δεδομένα ως προς το φαρμακευτικό σχήμα αναφέρονται στον πίνακα 6. Επιπλέον όλοι οι συμμετέχοντες στη μελέτη υπέγραψαν έντυπο συγκατάθεσης και η μελέτη εγκρίθηκε από την Επιτροπή Δεοντολογίας Ιατρικής Έρευνας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου του Ηρακλείου Κρήτης.

## *II.B Προετοιμασία του ιστού*

Τα δείγματα του ανθρώπινου πνευμονικού ιστού ελήφθησαν από υποϋπεζωκοτική περιοχή που δε συμμετείχε στη βλάβη και απείχε τουλάχιστον πέντε εκατοστά από το μονήρη όζο. Τα δείγματα ακολούθως πάγωναν άμεσα με υγρό άζωτο και αποθηκεύονταν στους  $-80^{\circ}\text{C}$  μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Για την ανοσοϊστοχημεία πρόσθετα μπλοκ ιστών τοποθετούνταν σε διάλυμα 10%φορμαλίνης για τουλάχιστον 24ώρες. Αφού ολοκληρωνόταν η προετοιμασία τους, κάθε μπλοκ ιστού εμπεδωνόταν με παραφίνη και

λαμβάνονταν τομές πάχους 5μm σύμφωνα με διαδικασίες ρουτίνας.

## *II.Γ Western Blot*

Η ανίχνευση με στύπωμα κατά Western (Western Blots) του p53, του bcl2 και της β-ακτίνης (η οποία χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας) πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με καθιερωμένα πρωτόκολλα. Πιο συγκεκριμένα, δείγματα πνευμονικού ιστού από κάθε συμμετέχοντα ομογενοποιήθηκαν ώστε να ληφθεί το αντίστοιχο πρωτεϊνικό εκχύλισμα. Η πρωτεάση προστέθηκε στο 1/3 του όγκου του SDS ρυθμιστικού διαλύματος προετοιμασίας ( NuPAGE LDS 4X LDS Sample Buffer, Invitrogen Corp., USA). Στα πλαίσια προετοιμασίας για την κάθε πρωτεΐνη (50ng) σε κάθε δείγμα έγινε διαχωρισμός με γέλη ηλεκτροφόρησης 12.5% SDS-πολυακρυλαμίδης. Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν με ηλεκτροφόρηση από τη γέλη σε μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Οι μεμβράνες επώαστηκαν είτε με αντι-p53 μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού (X77 Santa Cruz Biotechnology Inc, USA) είτε με αντι-bcl2 πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού (C21 Santa Cruz Biotechnology Inc, USA). Μετά την τοποθέτηση και του δευτερεύοντος αντισώματος πραγματοποιήθηκε ανοσοανίχνευση με ενισχυμένη χημειοφωταύγεια, εντοπιζόμενη σε X-ray φιλμ (Fuji films). Το αντι-actin αντίσωμα ποντικού (MAB 1501, Chemicon, Temecula, CA)

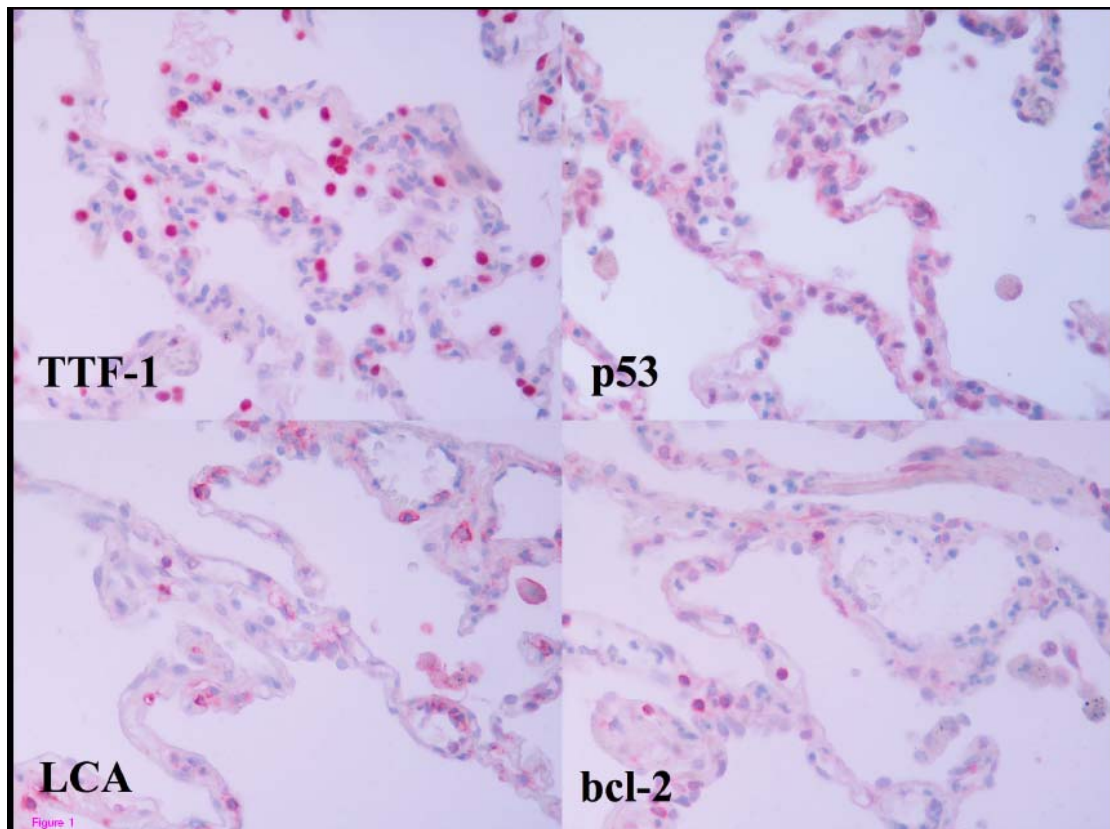


χρησιμοποιήθηκε ώστε να ομαλοποιηθεί η έκφραση των p53 και bcl2. Τα φιλμ στη συνέχεια μελετήθηκαν και οι λωρίδες των πρωτεϊνών ποσοτικοποιήθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος ανάλυσης εικόνων Photoshop CS2 (Adobe Systems Inc., CA).

## *II.Δ Ανοσοϊστοχημεία*

Ανοσοϊστοχημεία πραγματοποιήθηκε για την p53 και την bcl2 χρησιμοποιώντας καθορισμένα πρωτόκολλα. Τα δείγματα πνευμονικού ιστού τοποθετήθηκαν σε διάλυμα φορμαλίνης 10% και εμπεδώθηκαν με παραφίνη. Έγιναν διαδοχικές τομές του ιστού πάχους 5μm και κάθε μία τοποθετήθηκε σε ειδικό γυάλινο πλακίδιο Superfrost/Plus (Fischer Scientific). Η αποπαραφίνωση πραγματοποιήθηκε με θέρμανση των τομών για μια ώρα στους 60°C και ακολούθησαν τρεις διαδοχικές πλύσεις πέντε λεπτών η κάθε μια σε ξυλένιο (C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>-διμεθυλοβενζόλιο). Στη συνέχεια επανυδατώθηκαν σε διαλύματα 100%, 95%, 80%,70% εθανόλης τρεις φορές για πέντε λεπτά και τελικά ξεπλύθηκαν με απιονισμένο νερό. Την επώαση του πρωτογενούς αντισώματος ακολούθησε η ανίχνευση με ένα σημαντικό streptavidin –biotin peroxidase kit (DAKO LSAB kit). Εν συνεχεία οι τομές επιχρωματίστηκαν (χρώση που γίνεται ώστε να καταστεί κάποια άλλη χρώση εμφανέστερη) μπλε με αιματοξυλίνη. Θετικός μάρτυρας (καρκίνωμα μαστού με γνωστή θετικοποίηση) και αρνητικός (παράλειψη του

πρωτογενούς αντισώματος) χρησιμοποιήθηκε για κάθε αντίσωμα. Δεδομένου ότι τα κυψελιδικά μακροφάγα μοιάζουν με τα πνευμονοκύτταρα τύπου II πραγματοποιήσαμε TTF-1 χρώση , με μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού αντί-TTF-1 (Santa-Cruz Biotechnology, Inc), στα πνευμονοκύτταρα τύπου II χρησιμοποιώντας τα ουσιαστικά ως θετικούς μάρτυρες ( Εικόνα 22) καθώς περιλαμβάνονταν διαδοχικές τομές σε γειτονικές περιοχές (128). Παρομοίως, για την αναγνώριση των λεμφοκυττάρων χρησιμοποιήσαμε χρώση LCA ( lymphocyte common antigen; DAKO Carpinteria CA, USA), ( Εικόνα 22).



**Εικόνα 22.** Πνευμονοκύτταρα τύπου II TTF-1 και p53 θετικά σε διαδοχικές τομές από ασθενή με ΧΑΠ. Λεμφοκύτταρα LCA και bcl2 θετικά σε διαδοχικές τομές από ασθενή με ΧΑΠ, (μεγέθυνση 400×).

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι τομές των πέντε  $\mu\text{m}$  είναι επαρκώς λεπτές ώστε να διασφαλιστεί η παρουσία κάθε κυττάρου στις διαδοχικές τομές δεδομένου ότι η διάμετρος των πνευμονοκυττάρων τύπου II και των κυψελιδικών μακροφάγων είναι αρκετά μεγαλύτερο από 15-25 $\mu\text{m}$  (128-130).

Η εκτίμηση των συνολικών πνευμονοκυττάρων τύπου II (κιονοειδή κυψελιδικά κύτταρα), κυψελιδικών μακροφάγων (κύτταρα με ακανόνιστη κατανομή στις κυψελίδες με αφρώδες κυτταρόπλασμα και οδοντωτό πυρήνα) και λεμφοκυττάρων (διασκορπισμένα σφαιρικά, ωοειδή κύτταρα με πυκνόχρωματικό πυρήνα και μεγάλη αναλογία πυρήνα/κυτταροπλάσματος) στις χρωματισμένες τομές πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια ψηφιακής κάμερας (Sony) σε οπτικό μικροσκόπιο (Olympus), σε μεγέθυνση 40x από δυο επιστήμονες με εμπειρία στην ιστολογία του πνεύμονα (ABK, ΜΣ). Η εξαρτώμενη από τον παρατηρητή διακύμανση των μετρήσεων εκφράστηκε ως ποσοστό του συντελεστή απόκλισης και ήταν μικρότερη από 10%. Για την καταμέτρηση των κυτταρικών πληθυσμών χρησιμοποιήθηκε ημιδιάφανο ειδικό πλέγμα ισαπεχόντων διαστημάτων 1mm (grid) και σε κάθε τομή μετρήθηκαν είκοσι οπτικά πεδία. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως κύτταρα ανά  $\text{mm}^2$ .

## *II.E Στατιστική ανάλυση*

Στατιστικές διαφορές μεταξύ των ασθενών με ΧΑΠ και των ατόμων χωρίς ΧΑΠ, της καπνιστικής τους συνήθειας και των σπυρομετρικών τιμών καθώς και τα επίπεδα έκφρασης κάθε αποπτωτικού δείκτη εκτιμήθηκαν με το Mann-Whitney και Spearman τεστ χρησιμοποιώντας το στατιστικό λογισμικό πακέτο SPSS 17.0 ( SPSS Inc; Chicago, IL). Τιμή του  $p < 0.05$  θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική.

## **III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

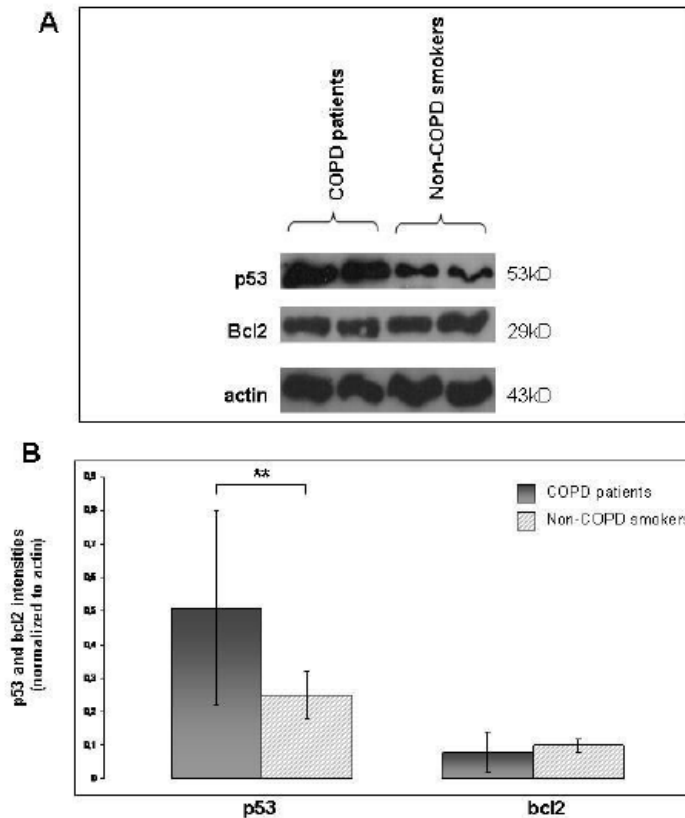
### *III.A Κλινικά Χαρακτηριστικά των Ατόμων που Μελετήθηκαν*

Τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά και οι σπυρομετρικές τιμές των καπνιστών με ή χωρίς ΧΑΠ αναγράφονται στον Πίνακα 6. Όπως αναμενόταν από τα κριτήρια επιλογής, οι καπνιστές με ΧΑΠ είχαν σημαντικά χαμηλότερη τιμή FEV<sub>1</sub> (% επί της προβλεπόμενης) και ποσοστό FEV<sub>1</sub>/FVC (%) συγκριτικά με τους καπνιστές χωρίς ΧΑΠ.

### *III.B Western blot*

Το στύπωμα κατά Western ανέδειξε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης p53 στους ασθενείς με ΧΑΠ σε σύγκριση με τους καπνιστές χωρίς

ΧΑΠ ( $0.51 \pm 0.29$  έναντι  $0.25 \pm 0.07$ ,  $p=0.03$ ) ( Εικόνα 22). Αντίθετα τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης bcl2 δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των δυο ομάδων που μελετήθηκαν ( $0.08 \pm 0.06$ , έναντι  $0.10 \pm 0.02$ ,  $p=0.52$ ), (Εικόνα 23).



**Εικόνα 23.** (Α) Αντιπροσωπευτικό στύψωμα κατά Western των πρωτεϊνών p53, bcl2 και β-ακτίνης σε ανθρώπινο πνευμονικό ιστό από δυο ασθενείς με ΧΑΠ και δυο καπνιστές χωρίς ΧΑΠ, (Β) Ποσοτική ανάλυση (μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση) του επιπέδου των πρωτεϊνών p53 και bcl2 σε καπνιστές με ΧΑΠ και καπνιστές χωρίς ΧΑΠ.

\*\*Στατιστικά σημαντικό ( $p < 0.05$ ).

### III.Γ ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΕΙΑ

#### III.Γ<sub>1</sub> Ανοσοϊστοχημεία p53

Η εικόνα 24Α δείχνει την p53 ανοσοϊστοχημική χρώση των πνευμονοκυττάρων τύπου II, των κυψελιδικών μακροφάγων και των λεμφοκυττάρων σε πνευμονικό ιστό ενός ασθενή καπνιστή με ΧΑΠ και η εικόνα 24Β σε πνευμονικό ιστό ενός καπνιστή χωρίς ΧΑΠ.

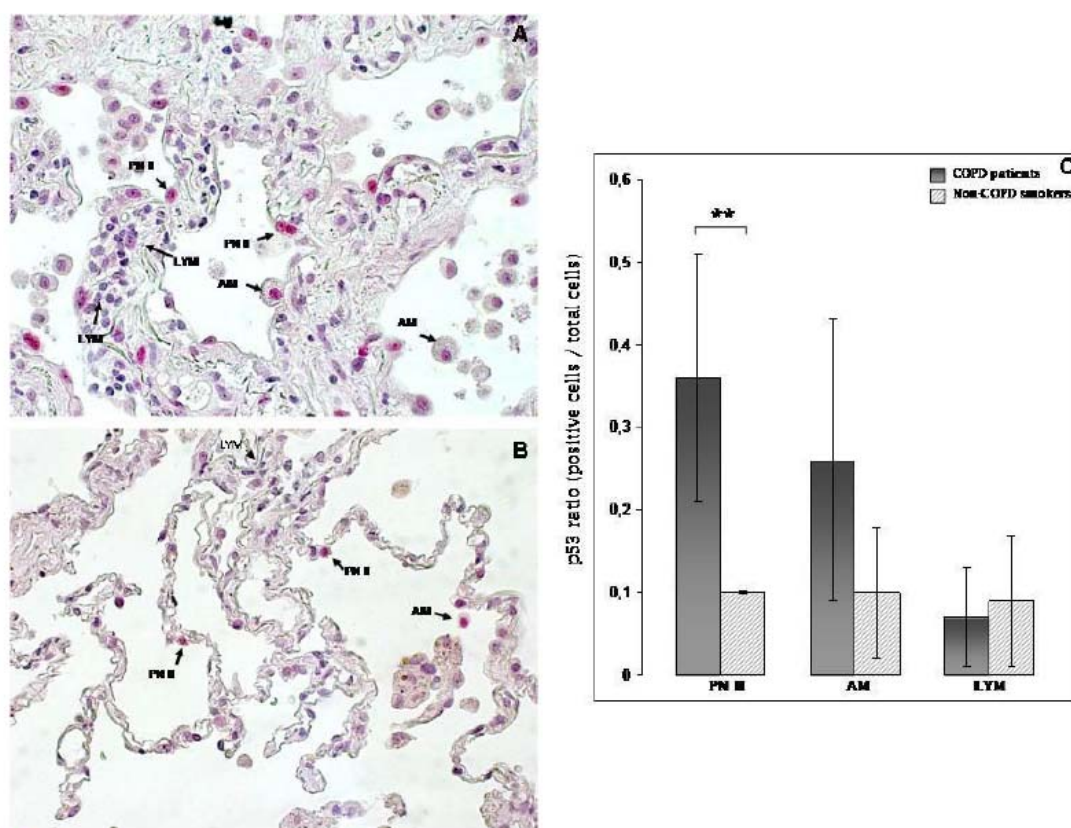


Figure 3

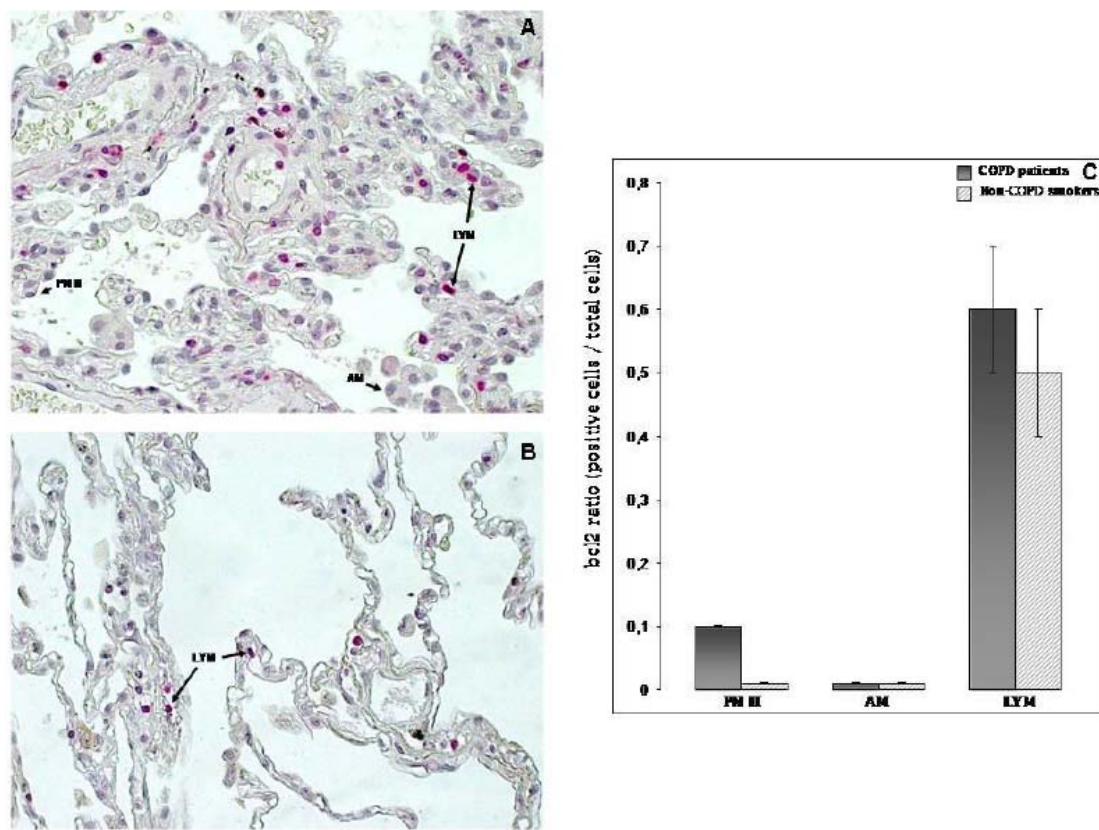
**Εικόνα 24.** Ανοσοϊστοχημική χρώση της πρωτεΐνης p53 σε ανθρώπινο πνευμονικό ιστό. Πνευμονοκύτταρα τύπου II και κυψελιδικά μακροφάγα p53-θετικά και λεμφοκύτταρα p53-αρνητικά σε (A) αντιπροσωπευτικό καπνιστή με ΧΑΠ και (B) καπνιστή χωρίς ΧΑΠ. (C) Ποσοτική ανάλυση (μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση) του ποσοστού έκφρασης της πρωτεΐνης p53 (θετικά κύτταρα / συνολικά κύτταρα) σε τρεις διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους ( PNII: πνευμονοκύτταρα τύπου II. AM: κυψελιδικά μακροφάγα, LYM: λεμφοκύτταρα), (\*\* $p < 0.05$ ).

Η αναλογία των p53 θετικών πνευμονοκυττάρων τύπου II (p53 θετικά πνευμονοκύτταρα τύπου II/Συνολικά πνευμονοκύτταρα τύπου II) ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη στους ασθενείς με ΧΑΠ σε σύγκριση με τους καπνιστές χωρίς ΧΑΠ (36% έναντι 10%,  $p=0.01$ ), ( εικόνα 24C).

Αντίθετα σε ότι αφορά την αναλογία των p53 θετικών κυψελιδικών μακροφάγων ( p53 θετικά κυψελιδικά μακροφάγα/ Συνολικά κυψελιδικά μακροφάγα) καθώς και αυτή των p53 θετικών λεμφοκυττάρων (p53 θετικά λεμφοκύτταρα/ Συνολικά λεμφοκύτταρα) δεν ήταν στατιστικά σημαντική ανάμεσα στις δυο ομάδες που μελετήθηκαν (25% έναντι 10%,  $p=0.07$  και 6% έναντι 8%,  $p=0.5$ , αντίστοιχα), ( εικόνα 24C).

### *III.Γ<sub>2</sub> Ανοσοϊστοχημεία bcl2*

Η πρωτεΐνη bcl2 εκφράστηκε ήπια στα πνευμονοκύτταρα τύπου II στους ασθενείς με ΧΑΠ, ενώ μηδενική ήταν η έκφραση της στα κυψελιδικά μακροφάγα στις δυο ομάδες που μελετήθηκαν (Εικόνα 25A, 25B).



**Εικόνα 25.** Ανοσοϊστοχημική χρώση της πρωτεΐνης *bcl2* σε ανθρώπινο πνευμονικό ιστό. Λεμφοκύτταρα *bcl2*-θετικά και πνευμονοκύτταρα τύπου II και κυψελιδικά μακροφάγα *bcl2*-αρνητικά (μαύρα βέλη) σε (A) αντιπροσωπευτικούς καπνιστές με ΧΑΠ, (B) αντιπροσωπευτικούς καπνιστές χωρίς ΧΑΠ. (C) Ποσοτική ανάλυση (μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση) του ποσοστού έκφρασης της πρωτεΐνης *bcl2* (θετικά κύτταρα /συνολικά κύτταρα) σε τρεις διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους (PNI:πνευμονοκύτταρα τύπου II. AM: κυψελιδικά μακροφάγα, LYM: λεμφοκύτταρα)

Από την άλλη πλευρά ενώ παρατηρήθηκε έκφραση της πρωτεΐνης *bcl2* στα λεμφοκύτταρα τόσο των ασθενών με ΧΑΠ όσο και των καπνιστών χωρίς ΧΑΠ, ωστόσο η αναλογία των θετικών *bcl2* λεμφοκυττάρων (*bcl2* θετικά λεμφοκύτταρα/Συνολικά λεμφοκύτταρα) δεν ήταν στατιστικά σημαντική ανάμεσα στις δυο ομάδες ( $0.6 \pm 0.1$  έναντι  $0.5 \pm 0.1$ ,  $p=0.5$ ), (Εικόνα 25C).



#### **IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

Η παρούσα μελέτη ανέδειξε υπερέκφραση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης p53 στον πνευμονικό ιστό ασθενών με ΧΑΠ συγκριτικά με τους καπνιστές χωρίς ΧΑΠ που όμως δεν εξισορροπείται από την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη bcl2. Από τα μέχρι τώρα δεδομένα είναι η πρώτη μελέτη που εκτιμάει ταυτόχρονα την έκφραση της p53 και της bcl2 σε πνευμονικό ιστό καπνιστών με ή χωρίς ΧΑΠ, με δυο διαφορετικές τεχνικές. Τα αποτελέσματα της επιβεβαιώνουν και δίνουν προέκταση σε παρατηρήσεις άλλων επιστημόνων (71, 73- 76, 131-133) σε ότι αφορά την διαταραχή της ισορροπίας των αποπτωτικών διεργασιών στη ΧΑΠ μέσω της μελέτης δυο θεμελιωδών πρωτεϊνών που σχετίζονται με την απόπτωση.

Τα αποτελέσματα που αποκαλύπτει η ανάλυση των δειγμάτων με Western Blot δείχνουν στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης p53 στους ασθενείς με ΧΑΠ συγκριτικά με τους καπνιστές χωρίς ΧΑΠ (Εικόνα 23), ενώ αυτά που απορρέουν από την ανοσοϊστοχημεία δείχνουν αυξημένη αναλογία p53 θετικών πνευμονοκυττάρων τύπου II στους ασθενείς με ΧΑΠ ( Εικόνα 24) σε σχέση με τους καπνιστές χωρίς ΧΑΠ. Τα αποτελέσματα

της μελέτης μας βρίσκονται σε συμφωνία με αυτά της μελέτης των Hodge et al (75), που αναφέρουν αυξημένα επίπεδα της p53 στα επιθηλιακά κύτταρα και T λεμφοκύτταρα, που συγκέντρωσαν μετά από brushing του βρογχικού βλεννογονού και από βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα, από ασθενείς με ΧΑΠ πρώην και νυν καπνιστές (75). Από την άλλη πλευρά, τα επίπεδα έκφρασης του αντι-αποπτωτικού μεσολαβητή bcl2 στους ασθενείς με ΧΑΠ ήταν ήπια στα πνευμονοκύτταρα τύπου II, ενώ δεν παρατηρήθηκε έκφραση του bcl2 στα κυψελιδικά μακροφάγα και στις δυο ομάδες που μελετήθηκαν (Εικόνα 25A, 25B). Παρόλο λοιπόν που η πρωτεΐνη bcl2 εκφράστηκε στα λεμφοκύτταρα και των δυο ομάδων δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στους καπνιστές με ή χωρίς ΧΑΠ ( Εικόνα 25C), αντικατοπτρίζοντας την έλλειψη ισορροπίας ανάμεσα στους επαγωγείς και αναστολείς της απόπτωσης με υπερίσχυση των αποπτωτικών διεργασιών στους ασθενείς με ΧΑΠ.

Μια πρόσφατη μελέτη από τους Weaver και Liu (133) σε ποντίκια μετά από έκθεση τους σε βενζένιο, έναν ευρέως διαδεδομένο περιβαλλοντικό παράγοντα μόλυνσης και ένα υποπροϊόν του καπνού των τσιγάρων, έδειξε σημαντική

αύξηση της έκφρασης της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης p53 στα πνευμονικά επιθηλιακά κύτταρα των ποντικών που είχαν εκτεθεί στο βενζένιο συγκριτικά με φυσιολογικούς μάρτυρες. Αντίθετα, καμία στατιστική διαφορά δεν παρατηρήθηκε στην έκφραση της πρωτεΐνης bcl2 στα επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών και στις δυο ομάδες ποντικών της μελέτης (133). Άλλες επιστημονικές ομάδες περιγράφουν αντίστοιχες παρατηρήσεις με αύξηση της απόπτωσης στα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα σε ασθενείς με εμφύσημα σε σύγκριση με καπνιστές χωρίς ΧΑΠ (73-74) και παράλληλα μη εντόπιση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης bcl2 τόσο στο φυσιολογικό όσο και στον εμφυσηματικό πνευμονικό ιστό (73).

Επιπρόσθετα, στοιχεία της μελέτης μας περιλαμβάνουν τα αυξημένα, αλλά όχι στατιστικά σημαντικά, επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης p53 στα κυψελιδικά μακροφάγα των ασθενών με ΧΑΠ σε σχέση με τους καπνιστές χωρίς ΧΑΠ (Εικόνα 24). Δεδομένου ότι τα κυψελιδικά μακροφάγα λειτουργούν ως «αποκομιδητές» των κυττάρων που έχουν υποστεί προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, θα αναμέναμε μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης της p53 στα κυψελιδικά μακροφάγα των ασθενών με ΧΑΠ ως αποτέλεσμα της αυξημένης

απόπτωσης των πνευμονοκυττάρων τύπου II. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει η παρατήρηση που έχει γίνει στο παρελθόν από πολλές ερευνητικές ομάδες πως τα κυψελιδικά μακροφάγα των ασθενών με ΧΑΠ είναι λιγότερο αποτελεσματικά στη φαγοκυττάρωση των επιθηλιακών κυττάρων που αποπίπτουν συγκρινόμενα με τους μάρτυρες (71, 131). Επιπλέον είναι γνωστή η εξασθενημένη δυνατότητα κάθαρσης από τα κυψελιδικά μακροφάγα των κυττάρων που αποπίπτουν λόγω της κατάτμησης του υποδοχέα της φωσφατιδυλσερίνης των κυψελιδικών μακροφάγων από την ουδετεροφιλική ελασάση (71). Η μη αποτελεσματική φαγοκυτταρική ικανότητα τους στους ασθενείς με ΧΑΠ είναι δυνατό να οδηγήσει σε ελλιπή εφεροκυττάρωση με αποτέλεσμα την περαιτέρω συσσώρευση των κυττάρων που αποπίπτουν. Η παραμονή με τη σειρά της των κυττάρων αυτών και η επακόλουθη απελευθέρωση από αυτά τοξικών προϊόντων είναι δυνατό να προκαλέσει ιστική καταστροφή και χρόνια φλεγμονή οδηγώντας σε επιδείνωση της ΧΑΠ.

Από την άλλη πλευρά, το αντι-αποπτωτικό μόριο bcl2 δεν εκφράστηκε στα κυψελιδικά μακροφάγα των ασθενών με ΧΑΠ αλλά και των καπνιστών χωρίς ΧΑΠ (Εικόνα 24), γεγονός

που μπορεί να συνδέεται με τους ομοιοστατικούς μηχανισμούς των κυψελιδικών μακροφάγων, οι οποίοι εμπλέκονται στην άμυνα του πνευμονικού παρεγχύματος (71).

Στον υποπληθυσμό των λεμφοκυττάρων και στις δυο ομάδες που μελετήθηκαν η αναλογία των θετικών κυττάρων για την πρωτεΐνη p53 ήταν μικρότερη (Εικόνα 24C) συγκριτικά με εκείνη που παρατηρήθηκε στα κυψελιδικά μακροφάγα και στα πνευμονοκύτταρα τύπου II , ενώ η αναλογία θετικών κυττάρων για την πρωτεΐνη bcl2 ήταν αυξημένη μόνο στον υποπληθυσμό των λεμφοκυττάρων και στις δυο ομάδες που μελετήθηκαν, αν και χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά (Εικόνα 25C). Η δυσαρμονία μεταξύ του προ-αποπτωτικού δείκτη p53 και του αντι-αποπτωτικού δείκτη bcl2 στα λεμφοκύτταρα με σαφή υπερίσχυση του bcl2 θα μπορούσε να ερμηνεύσει τη μακροχρόνια παραμονή των λεμφοκυττάρων στο πνευμονικό παρέγχυμα με συνοδό απελευθέρωση φλεγμονωδών μεσολαβητών συντηρώντας με τον τρόπο αυτό τη φλεγμονή στη ΧΑΠ.

Εδώ θα ήταν σκόπιμο να αναφερθούν και οι περιορισμοί αυτής της μελέτης. Πρώτον, αν και τα άτομα που μετείχαν στη μελέτη είχαν τα απαραίτητα χαρακτηριστικά ώστε να

αποτελέσουν ένα αξιόπιστο δείγμα, ωστόσο για ευνόητους λόγους τα δείγματα που λάβαμε προέρχονταν από ασθενείς που χειρουργούνταν για μονήρη πνευμονικό όζο κακοήθους αιτιολογίας. Είναι γνωστό πως ο καρκίνος του πνεύμονα είναι δυνατό να επηρεάσει την έκφραση τόσο της p53 όσο και της bcl2, όμως πρέπει να σημειωθεί ότι όλα τα άτομα που περιλήφθηκαν στη μελέτη είχαν την ίδια συνοσηρότητα.

Δεύτερον, οι βιοψίες πνευμονικού ιστού που λαμβάναμε κατά το χειρουργείο είχαν ως προϋπόθεση πως προέρχονταν από ασθενείς με όχι πολύ προχωρημένο στάδιο ΧΑΠ. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να σημαίνει την υποεκτίμηση των αποτελεσμάτων της μελέτης δεδομένου ότι τα στοιχεία που απορρέουν από αυτή συνδέουν τη βαρύτητα της νόσου με αντίστοιχη βαρύτητα διαταραχής των αποπρωτικών λειτουργιών.

Τρίτον, ένας πρόσθετος παράγοντας που θα μπορούσε να επηρεάσει τα αποτελέσματα μας είναι οι διαφορές στο θεραπευτικό σχήμα που ακολουθούσαν οι ασθενείς ιδιαίτερα σε ότι αφορά τη λήψη ή μη κορτικοστεροειδών. Τα εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή γενικά επάγουν την εγγενή ανοσία ενώ καταστέλλουν την επίκτητη ανοσία, ευνοώντας μεν την επιβίωση τόσο των ουδετεροφίλων όσο και των κυψελιδικών

μακροφάγων, επιταχύνοντας δε τις αποπτωτικές διεργασίες των δενδριτικών κυττάρων των αεραγωγών (134-135). Μελέτες έχουν δείξει πως τα κορτικοστεροειδή επάγουν την απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων των αεραγωγών και των ηωσινοφίλων στο άσθμα (134), ωστόσο παρόμοια δεδομένα δεν υπάρχουν για τη ΧΑΠ (120,135). Παρομοίως οι περισσότερες από τις προαναφερόμενες μελέτες δε διαχωρίζουν τους ασθενείς ανάλογα με το αν λάμβαναν εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή ή όχι (120). Σε ότι αφορά τη συγκεκριμένη μελέτη όλοι οι ασθενείς με ΧΑΠ είχαν βαρύτητα νόσου II κατά GOLD και λάμβαναν την αντίστοιχη θεραπεία, με ένα εισπνεόμενο αντιχολινεργικό μακράς ή ταχείας δράσης (Πίνακας 6). Μόνο περιεγχειρητικά (2-3 ημέρες πριν την επέμβαση και ακολούθως μέχρι την έξοδο τους από το νοσοκομείο: 10 ημέρες συνολικά) με στόχο να πετύχουν την καλύτερη δυνατή αναπνευστική λειτουργία και να αποφευχθεί πιθανή παρόξυνση μετεγχειρητικά, οι ασθενείς με ΧΑΠ έλαβαν χαμηλή δόση εισπνεομένων κορτικοστεροειδών δυο φορές την ημέρα (Πίνακας 6), (136, 137). Δεν είναι ξεκάθαρος ακόμα ο βαθμός που τα εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή σε χαμηλές δόσεις μπορούν να επηρεάσουν την απόπτωση και την

αναδιαμόρφωση (138). Υπάρχει μόνο μια αναφορά (139) στη διεθνή βιβλιογραφία που επισημαίνει την επίδραση των εισπνεομένων κορτικοστεροειδών στη φλεγμονή των αεραγωγών σε πτύελα υγιών εθελοντών, μετά από χρήση τουλάχιστον 0.5mg του φαρμάκου (139). Με δεδομένο ότι οι ασθενείς της μελέτης μας λάμβαναν πολύ μικρότερη δόση εισπνεομένων κορτικοστεροειδών (200mcg συνολικά/24ωρο), συμπεραίνουμε πως τα αποτελέσματα μας δε μπορεί να θεωρηθεί ότι υπόκεινται σε αυτόν τον περιορισμό. Εντούτοις χρειάζονται περισσότερες μελέτες για την αποσαφήνιση του ρόλου των εισπνεόμενων κορτικοστεροειδών σε αυτό το επίπεδο.

Το γεγονός τέλος, ότι στις δυο ομάδες που μελετήθηκαν οι ασθενείς που συμμετείχαν δεν ταίριαζαν απόλυτα ηλικιακά και ήταν όλοι άρρενες αποτελεί έναν περιορισμό που πρέπει να αναφερθεί (Πίνακας 6). Είναι ενδιαφέρον ότι παρόλο που μελέτες σε πειραματόζωα έχουν δείξει αυξημένα επίπεδα απόπτωσης των T-λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος με την αύξηση της ηλικίας (140), αντίστοιχες μελέτες σε ανθρώπους δεν ανέδειξαν καμία αξιοσημείωτη αλλαγή στα επίπεδα απόπτωσης των επιθηλιακών κυττάρων των αεραγωγών, ή των T-λεμφοκυττάρων από



βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα, ή των ουδετεροφίλων των πτυέλων με το πέρας της ηλικίας (75, 141). Ωστόσο στη μέχρι σήμερα βιβλιογραφία δεν υπάρχει καμία αναφορά σχετικά με την επίδραση της ηλικίας στην έκφραση τόσο της p53 όσο και της bcl2 στους ασθενείς με ΧΑΠ ή στους μάρτυρες καπνιστές. Επιπρόσθετα μελέτες που αφορούν στο συσχετισμό του επιπέδου της απόπτωσης ή της παραγωγής κυτταροκινών στα δυο φύλα, έδειξαν πως δε σημειώνεται καμία διαφορά ανάμεσα σε άνδρες και γυναίκες (81).

Συμπερασματικά η αυξημένη έκφραση του προ-αποπτωτικού δείκτη p53 στα πνευμονοκύτταρα τύπου II στους καπνιστές με ΧΑΠ είναι δυνατό να συμβάλλει στη διαταραχή της ακεραιότητας της κυψελιδικής μεμβράνης με αναπόφευκτο αποτέλεσμα τη μη φυσιολογική λειτουργία των ομοιοστατικών μηχανισμών των κυττάρων. Αντίθετα η αυξημένη έκφραση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης bcl2 στα λεμφοκύτταρα των καπνιστών με ΧΑΠ πιθανά ερμηνεύει την αυτό-συντήρηση, διατήρηση της μη φυσιολογικής εμμένουσας φλεγμονής στη ΧΑΠ.

Βεβαίως, είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθούν περισσότερες μελέτες προκειμένου να αποσαφηνισθεί ο ακριβής ρόλος της απόπτωσης στην παθογένεια της ΧΑΠ.

## **V. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. R.J. Halbert. Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J* 2006; 28: 523–532
2. Viegli G, Pistelli F, Sherrill DL, Maio S, Baldacci S, Carrozzi L. Definition, epidemiology and natural history of COPD. *Eur Respir J* 2007 Nov;30(5):993-1013.
3. William MacNee. Update in Chronic Obstructive Pulmonary Disease 2007 American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 2008; Vol 177. pp. 820-829.
4. Yannick M. T. A. van Durme. Prevalence, Incidence, and Lifetime Risk for the Development of COPD in the Elderly, The Rotterdam Study CHEST February 2009 vol. 135 no. 2 368-377
5. International variation in the prevalence of COPD (The BOLD Study): a population-based prevalence study. *The Lancet*, Volume 370, Issue 9589, Pages 741 - 750, 1 September 2007
6. Nikolaos Tzanakis, MD; Urania Anagnostopoulou, MD; Vassiliki Filaditaki, MD; Pandora Christaki, MD; and Nikolaos Siafakas, MD, PhD, FCCP. Prevalence of COPD in Greece; *Chest* 2004;125;892-900
7. David M. Mannino, M.D. Chronic Obstructive Pulmonary Disease Surveillance --- United States, 1971—2000 CDC August 2, 2002 / 51(SS06);1-16
8. Celli BR, MacNee W, ATS/ERS Task Force. Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. *Eur Respir J* 2004; 23: 932–946.
9. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. [www.goldcopd.com](http://www.goldcopd.com). Date last accessed: June 30, 2007.
10. Siafakas NM. Definition and differential diagnosis of chronic obstructive pulmonary disease. In: Siafakas NM, ed. *Management of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. *Eur Respir Mon* 2006; 38: 1–6.
11. William MacNee Airway Infection Does Not Accelerate Decline in Lung Function in Chronic Obstructive Pulmonary Disease *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, Volume 164, Number 10, November 2001, 1758-1759

12. Caramori G. MUC5AC expression is increased in bronchial submucosal glands of stable COPD patients. *Histopathology*. 2009 Sep;55(3):321-31.
13. Paul D. Scannon. Review article The pathogenesis and pathology of COPD :Identifying risk factors and improving morbidity and mortality Volume 4 (10A) November 2004
14. Néstor A. Molfino, Peter K. Jeffery. Chronic obstructive pulmonary disease: Histopathology, inflammation and potential therapies .*Pulm Pharmacol Ther*. 2007;20(5):462-72.
15. M. Roth. Pathogenesis of COPD. Part III. Inflammation in COPD. *INT J TUBERC LUNG DIS* 2008; 12(4):375–380
16. Marina Saetta Increased Expression of the Chemokine Receptor CXCR3 and Its Ligand CXCL10 in Peripheral Airways of Smokers with Chronic Obstructive Pulmonary Disease *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* Vol 165. pp. 1404-1409, (2002)
17. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, Pare PD. The nature of small airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004;350:2645–2653
18. Majo J, Ghezzo H, Cosio MG. Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. *Eur Respir J* 2001;17:946–953
19. Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor- $\alpha$  in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:530–534
20. Selby C, MacNee W. Factors affecting neutrophil transit during acute pulmonary inflammation: minireview. *Exp Lung Res* 1993;19:407–428
21. Sparrow D, Glynn RF, Cohen M, Weiss ST. The relationship of the peripheral leukocyte count and cigarette smoking to pulmonary function among adult men. *Chest* 1984;86:383–386.[
22. Russell RE, Culpitt SV, DeMatos C, Donnelly L, Smith M, Wiggins J, Barnes PJ. Release and activity of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;26:602–609

23. Capelli A, Di Stefano A, Gnemmi I, Balbo P, Cerutti CG, Balbi B, Lusuardi M, Donner CF. Increased MCP-1 and MIP-1 $\beta$  in bronchoalveolar lavage fluid of chronic bronchitis. *Eur Respir J* 1999;14:160–165
24. Sandra Hodge Smoking Alters Alveolar Macrophage Recognition and Phagocytic Ability *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. Vol. 37, pp. 748-755, 2007
25. Geert R. Van Pottelberge The Role of Dendritic Cells in the Pathogenesis of COPD: Liaison Officers in the Front Line. *Journal of COPD* Volume 6, Issue 4 August 2009 , pages 284 – 290
26. R. T. Abboud, S. Vimalanathan. Pathogenesis of COPD. Part I. The role of protease-antiprotease imbalance in emphysema *INT J TUBERC LUNG DIS* 2008;12(4):361–367
27. J. C. W. Mak. Pathogenesis of COPD. Part II. Oxidative-antioxidative imbalance *INT J TUBERC LUNG DIS* 2008; 12(4):368–374
28. K. Kuwano Apoptosis Signaling Pathways in Lung Diseases. *Medical Chemistry*, 2005, 1, 49-56
29. Lindsay Ramage et al Induction of apoptosis with tobacco smoke and related products in A549 lung epithelial cells *in vitro Journal of Inflammation* 2006, 3:3doi:10.1186/1476-9255-3-3
30. Shinsaku Togo et al Increased Sensitivity To Apoptosis In Lung Fibroblasts From Emphysema *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2010; 181: A4932
31. Kasahara Y, Tuder RM, Cool CD, Lynch DA, Flores SC, Voelkel NF. Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:737–744
32. MC Morissette Increased p53 level, BAX/BCL-XL ratio, and TRAIL receptors expression in human emphysema *Am J Respir Crit Care Med* (2008) 0.
33. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26:239–57.
34. Baetu TM, Hiscott J. 2002. On the TRAIL to apoptosis. *Cyt Growth Factor Rev*, 13:199–207.
35. Cohen JJ. 1993. Apoptosis. *Immunol Today*, 14:126–30.

36. <http://www.nature.com/cr/journal/v15/n10/images/7290345fl.gif>

37. Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumor-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:420-430.

38. Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*. 2006;25:4798-4811.

39. Debatin KM, Krammer PH. Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene*. 2004;23:2950-2966

40. Rowinsky EK. Targeted induction of apoptosis in cancer management: the emerging role of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor activating agents. *J Clin Oncol*. 2005;23:9394-9407.

41. Ravi R, Jain AJ, Schulick RD, et al. Elimination of hepatic metastases of colon cancer cells via p53-independent cross-talk between irinotecan and Apo2 ligand/TRAIL. *Cancer Res*. 2004;64:9105-9114

42. Boldin MP, Varfolomeev EE, Panczer Z, Mett IL, Camonis JH, Wallach D. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem*. 1995;270:7795-7798.

43. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J*. 1995;14:5579-5588

44. Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest*. 2005;115:2665-2672.

45. Bao Q, Shi Y. Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Diff*. 2007;14:56-65.

46. Barnhart BC, Alappat EC, Peter ME. The CD95 type I/type II model. *Sem Immunol*. 2003;15:185-193.

47. Walter D, Schmich K, Vogel S, et al. Switch from type II to I Fas/CD95 death signaling on *in vitro* culturing of primary hepatocytes. *Hepatology*. 2008;48:1942-1953.

48. Letai A. Pharmacological manipulation of Bcl-2 family members to control cell death. *J Clin Invest*. 2005;115:2648-2655

49. Mayer & Oberbauer. Mitochondrial regulation of apoptosis, *News Physiol Sci.* 2003;18:89-94.
50. Coultas L, Strasser A. The role of the Bcl-2 protein family in cancer. *Semin Cancer Biol.* 2003;13:115-123.
51. Ashkenazi A. Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonists. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7:1001-1012.
52. Henry-Mowatt J, Dive C, Martinou JC, James D. Role of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis and cancer. *Oncogene.* 2004;23:2850-2860.
53. Srinivasula SM, Datta P, Fan XJ, Fernandes-Alnemri T, Huang Z, Alnemri ES. Molecular determinants of the caspase-promoting activity of Smac/DIABLO and its role in the death receptor pathway. *J Biol Chem.* 2000;275:36152-36157.
54. Vousden, K. H. & Lu, X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nature Rev. Cancer* 2, 594–604 (2002).
55. Konishi, A. *et al.* Involvement of histone H1.2 in apoptosis induced by DNA double-strand breaks. *Cell* 114, 673–688 (2003)
56. Syed G. Hussain and Kolluru V. A. Ramaiah Endoplasmic reticulum: Stress, signalling and apoptosis Review Article CURRENT SCIENCE, VOL. 93, NO. 12, 25 DECEMBER 2007
57. [www.medscape.com/view\\_article/513972\\_sidebar1](http://www.medscape.com/view_article/513972_sidebar1)
58. Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways David G Breckenridge *Oncogene* (2003)22,8608  
8618.doi:10.1038/sj.onc.1207108
59. Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins—suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* 1999;13:239-252
- 60 . Ghezzi H, Triantafillopoulos A, Whittaker K, Hoidal JR, Cosio MG: The development of emphysema in cigarette smoke exposed mice is strain dependent. *Am J Respir Crit Care Med* 2004, 170:974-980.
61. Bartalesi B, Cavarra E, Fineschi S, Lucattelli M, Lunghi B, Martorana PA, Lungarella G: Different lung responses to cigarette smoke in two strains of mice sensitive to oxidants. *Eur Respir J* 2005, 25:15-22.

62. Aoshiba K, Yokohori N, Nagai A: Alveolar wall apoptosis causes lung destruction and emphysematous changes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003, 28:555-562.
63. Kasahara Y, Tuder RM, Taraseviciene-Stewart L, Le Cras TD, Abman S, Hirth PK, Waltenberger J, Voelkel NF: Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. *J Clin Invest* 2000, 106:1311-1319.
64. Tuder RM, Zhen L, Cho CY, Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Salvemini D, Voelkel NF, Flores SC: Oxidative stress and apoptosis interact and cause emphysema due to vascular endothelial growth factor receptor blockade. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003, 29:88-97.
65. Petrache I, Natarajan V, Zhen L, Medler TR, Richter AT, Cho C, Hubbard WC, Berdyshev EV, Tuder RM: Ceramide upregulation causes pulmonary cell apoptosis and emphysema-like disease in mice. *Nat Med* 2005, 11:491-498.
66. Tang K, Rossiter HB, Wagner PD, Breen EC: Lung-targeted VEGF inactivation leads to an emphysema phenotype in mice. *J Appl Physiol* 2004, 97:1559-1566
67. Zheng T, Kang MJ, Crothers K, Zhu Z, Liu W, Lee CG, Rabach LA, Chapman HA, Homer RJ, Aldous D, De Sanctis GT, Underwood S, Graupe M, Flavell RA, Schmidt JA, Elias JA: Role of cathepsin S dependent epithelial cell apoptosis in IFN-gamma-induced alveolar remodeling and pulmonary emphysema. *J Immunol* 2005, 174:8106-8115.
68. Ma B, Kang MJ, Lee CG, Chapoval S, Liu W, Chen Q, Coyle AJ, Lora JM, Picarella D, Homer RJ, Elias JA: Role of CCR5 in IFN-gamma induced and cigarette smoke-induced emphysema. *J Clin Invest* 2005, 115:3460-3472.
69. Cao Y, Linden P, Shima D, et al. 1996. In vivo angiogenic activity and hypoxia induction of heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial factor. *J Clin Invest*, 98:2507-11
70. Tsao PN, Su YN, Li H, et al. 2004. Overexpression of placenta growth factor contributes to the pathogenesis of pulmonary emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*, 169:505-11.
71. Hodge S, Hodge G, Scicchitano R, Reynolds PN, Holmes M: Alveolar macrophages from subjects with chronic obstructive pulmonary disease are deficient in their ability to phagocytose apoptotic airway epithelial cells. *Immunol Cell Biol* 2003, 81:289-296



72. Segura-Valdez L, Pardo A, Gaxiola M, Uhal BD, Becerril C, Selman M: Upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD. *Chest* 2000, 117:684-694.
73. Imai K, Mercer BA, Schulman LL, Sonett JR, D'Armiento JM: Correlation of lung surface area to apoptosis and proliferation in human emphysema. *Eur Respir J* 2005, 25:250-258
74. Yokohori N, Aoshiba K, Nagai A: Increased levels of cell death and proliferation in alveolar wall cells in patients with pulmonary emphysema. *Chest* 2004, 125:626-632.
75. Hodge S, Hodge G, Holmes M, Reynolds PN: Increased airway epithelial and T-cell apoptosis in COPD remains despite smoking cessation. *Eur Respir J* 2005, 25:447-454.
76. Hodge S, Hodge G, Holmes M, et al. 2005. Apoptosis in COPD. *Current Respiratory Medicine Reviews*, 1:33-41.
77. Majo J, Ghezzi H, Cosio MG: Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. *Eur Respir J* 2001, 17:946-953.
78. Kanazawa H, Yoshikawa J: Elevated Oxidative Stress and Reciprocal Reduction of Vascular Endothelial Growth Factor Levels With Severity of COPD. *Chest* 2005, 128:3191-3197
79. Sakao S, Tatsumi K, Hashimoto T, Igari H, Shino Y, Shirasawa H, Kuriyama T: Vascular endothelial growth factor and the risk of smoking-related COPD. *Chest* 2003, 124:323-327
80. Oudijk EJD, Lammers JWJ, Koenderman L. 2003. Systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*, 22:S5-13.
81. Hodge SJ, Hodge GL, Reynolds PN, Scicchitano R, Holmes M: Increased production of TGF-beta and apoptosis of T lymphocytes isolated from peripheral blood in COPD. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003, 285:L492-L499.
82. Takabatake N, Nakamura H, Inoue S, Terashita K, Yuki H, Kato S, Yasumura S, Tomoike H: Circulating levels of soluble Fas ligand and soluble Fas in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 2000, 94:1215-1220.
83. Yasuda N, Gotoh K, Minatoguchi S, Asano K, Nishigaki K, Nomura M, Ohno A, Watanabe M, Sano H, Kumada H, Sawa T, Fujiwara H: An

increase of soluble Fas, an inhibitor of apoptosis, associated with progression of COPD. *Respir Med* 1998, 92:993-999.

84. Allen DL, Linderman JK, Roy RR, et al. 1997. Apoptosis: a mechanism contributing to remodeling of skeletal muscle in response to hindlimb unweighting. *Am J Physiol*, 273:C579-87.

85. Gosker HR, Kubat B, Schaart G, et al. 2003. Myopathological features in skeletal muscle of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*, 22:280-5.

86. Agusti AGN, Sauleda J, Miralles C, et al. 2002. Skeletal muscle apoptosis and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 166:485-9.

87. Boots AW, Haenen GRMM, Bast A. 2003. Oxidant metabolism in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*, 22:S14-27.

88. Sauleda J, Garcia-Palmer FJ, Wiesner R, et al. 1998. Cytochrome oxidase activity and mitochondrial gene expression in skeletal muscle of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 157:1413-7.

89. Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ: Differences in interleukin- 8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996, 153:530-534.

90. Lacoste JY, Bousquet J, Chanez P, Van Vyve T, Simony-Lafontaine J, Lequeu N, Vic P, Enander I, Godard P, Michel FB: Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma, chronic bronchitis, and chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 1993, 92:537-548.

91. Vandivier RW, Fadok VA, Hoffmann PR, Bratton DL, Penvari C, Brown KK, Brain JD, Accurso FJ, Henson PM: Elastase-mediated phosphatidylserine receptor cleavage impairs apoptotic cell clearance in cystic fibrosis and bronchiectasis. *J Clin Invest* 2002, 109:661-670

92. Saetta M, Di Stefano A, Turato G, Facchini FM, Corbino L, Mapp CE, Maestrelli P, Ciaccia A, Fabbri LM: CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998, 157:822-826.

93. Saetta M, Baraldo S, Corbino L, Turato G, Braccioni F, Rea F, Cavallese G, Tropeano G, Mapp CE, Maestrelli P, Ciaccia A, Fabbri LM: CD8+ve cells in the lungs of smokers with chronic obstructive

- pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999, 160:711-717.
94. Barry M, Bleackley RC: Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol* 2002, 2:401-409.
95. Liu AN, Mohammed AZ, Rice WR, Fiedelvey DT, Liebermann JS, Whitsett JA, Braciale TJ, Enelow RI: Perforin-independent CD8(+) T-cell-mediated cytotoxicity of alveolar epithelial cells is preferentially mediated by tumor necrosis factor- $\alpha$ : relative insensitivity to Fas ligand. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999, 20:849-858
96. McCawley LJ, Matrisian LM: Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol* 2001, 13:534-540.
97. Frisch SM, Screaton RA: Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol* 2001, 13:555-562
98. Aoshiba K, Rennard SI, Spurzem JR: Cell-matrix and cell-cell interactions modulate apoptosis of bronchial epithelial cells. *Am J Physiol* 1997, 272:L28-L37.
99. Powell WC, Fingleton B, Wilson CL, Boothby M, Matrisian LM: The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis. *Curr Biol* 1999, 9:1441-1447
100. Gueders MM, Balbin M, Rocks N, Foidart JM, Gosset P, Louis R, Shapiro S, Lopez-Otin C, Noel A, Cataldo DD: Matrix metalloproteinase-8 deficiency promotes granulocytic allergen-induced airway inflammation. *J Immunol* 2005, 175:2589-2597
101. Rangasamy T, Cho CY, Thimmulappa RK, Zhen L, Srisuma SS, Kensler TW, Yamamoto M, Petrache I, Tudor RM, Biswal S: Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *J Clin Invest* 2004, 114:1248-1259.
102. Kanazawa H, Yoshikawa J: Elevated Oxidative Stress and Reciprocal Reduction of Vascular Endothelial Growth Factor Levels With Severity of COPD. *Chest* 2005, 128:3191-3197
103. G. J. Gibson, D.M. Geddes, U. Costabel, P.J. Sterk, B. Corrin, *Pneumology*, text book, third edition 2003;48-49
104. Poulter LW, Burke CM. Macrophages and allergic lung disease. *Immunobiology* 1996; 195: 574-587.
105. O'Shaughnessy TC, Ansari TW, Barnes NC, Jeffery PK. Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic

bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV1. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997 Mar;155(3):852-7

106. Di Stefano A, Capelli A, Lusuardi M, Balbo P, Vecchio C, Maestrelli P, Mapp CE, Fabbri LM, Donner CF, Saetta M. Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998 Oct;158(4):1277-85.

107. Joseph, M., A. B. Tonnel, G. Torpier, A. Capron, B. Arnoux, and J. Benveniste. 1983. Involvement of immunoglobulin E in the secretory processes of alveolar macrophages from asthmatic patients. *J. Clin. Invest.* 1983; 71: 221-230.

108. . Arnoux, B., E. Jouvin-Marche, A. Arnoux, J. Chrétien, and J. Benveniste. Release of PAF-acether from human monocytes. *Agents Action* 1982; 12: 713-716.

109. Wagner JG, Roth RA. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacol Rev.* 2000 Sep;52(3):349-74.

110. Sperber, K., P. Chanez, J. Bousquet, S. Goswami, and Z. Marom. Detection of a novel macrophage-derived mucus secretagogue (MMS-68) in bronchoalveolar lavage fluid of patients with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1995; 95: 868-876.

111. Kovacs, E., and L. DiPietro. Fibrogenic cytokines and connective tissue production. *FASEB J.* 1994; 8: 854-861.

112. Aldonyte R, Jansson L, Piitulainen E, Janciauskiene S. Circulating monocytes from healthy individuals and COPD patients. *Respir Res.* 2003;4:11.

113. Holt PG, McMenamin C. Defence against allergic sensitization in the healthy lung: the role of inhalation tolerance. *Clin Exp Allergy* 1989; 19: 255-262.

114 . G. J. Gibson, D.M. Geddes, U. Costabel, P.J. Sterk, B. Corrin, *Pneumonology*, text book, third edition 2003;46

115. John P Greer, John Foerster, George M Rodgers, Frixos Paraskevas, Bertil Glader, Wintrobe's Clinical Hematology, text book, twelfth edition Dec 2008: Volume 1; 300-302, 363-364, 376-377.

116. Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, Fukuchi Y, Jenkins C, Rodriguez-Roisin R, van Weel C, Zielinski J; Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007 Sep 15;176(6):532-55.
117. Sandra Hodge, Greg Hodge, Mark Holmes and Paul Reynolds. Increased peripheral blood T-cell apoptosis and decreased Bcl-2 in chronic obstructive pulmonary disease. *Immunology and Cell Biology* 2005; 83:160
118. Plataki M, Tzortzaki E, Rytala P, Makris D, Koutsopoulos A, Siafakas NM. Apoptotic mechanisms in the pathogenesis of COPD. *Internat J COPD* 2006;1(2);161-171
119. Demedts IK, Demoor T, Bracke KR, Joos GF, Brusselle GG. Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema. *Respir Res.* 2006 ;7:53.
120. Park JW, Ryter SW, Choi AM. Functional significance of apoptosis in chronic obstructive pulmonary disease. *COPD.* 2007;4(4):347-53
121. Schuler M, Green DR. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans.* 2001;29:684-8
122. Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci.* 2003 ;116:4077-85.
123. Martin DA, Elkon KB. Mechanisms of apoptosis. *Rheum Dis Clin North Am.* 2004;30(3):441-54.
124. Cyprian V. Weaver, Shi-Ping Liu. Differentially expressed pro- and antiapoptogenic genes in response to benzene exposure: Immunohistochemical localization of p53, Bag, Bad, Bax, Bcl-2 and Bcl-w in lung epithelia. *Exper Toxicol Pathol* 2008; 59: 265-272
125. Tzortzaki E, Siafakas N. A new hypothesis for the initiation of COPD. *Eur Resp J* 2009;34(2):310-5.
126. Agusti A, MacNee W, Donaldson K, Cosio M. Hypothesis: does COPD have an autoimmune component? *Thorax* 2003; 58 : 832-834
126. Jiménez-Ruiz C, Miravittles M, Sobradillo V, Gabriel R, Viejo JL, Masa JF, Fernández-Fau L, Villasante C. Can cumulative tobacco consumption, FTND score, and carbon monoxide concentration in expired air be predictors of chronic obstructive pulmonary disease? *Nicotine Tob Res.* 2004 Aug;6(4):649- 53.

127. Jiménez-Ruiz C, Miravittles M, Sobradillo V, Gabriel R, Viejo JL, Masa JF, Fernández-Fau L, Villasante C. Can cumulative tobacco consumption, FTND score, and carbon monoxide concentration in expired air be predictors of chronic obstructive pulmonary disease? *Nicotine Tob Res.* 2004 Aug;6(4):649- 53.
128. Vlachaki EM, Koutsopoulos AV, Tzanakis N, Neofytou E, Sigasaki M, Drositis I, Moniakos A, Schiza S, Siafakas NM, Tzortzaki EG. Altered surfactant protein-A (SP-A) expression in type II pneumocytes in COPD. *Chest* 2010;137(1):37-45.
129. Mascaretti RS, Mataloun MM, Dolhnikoff M, Rebello CM. Lung morphometry, collagen and elastin content: changes after hyperoxic exposure in preterm rabbits. *Clinics* 2009; 64(11):1099-104.
130. Ikeda K, Monden T, Kanoh T, Tsujie M, Izawa H, Haba A, Ohnishi T, Sekimoto M, Tomita N, Shiozaki H, Monden M. Extraction and Analysis of Diagnostically Useful Proteins from Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissue Sections. *J Histochem Cytochem* 1998; 46:397-403.
131. Bratton DL, Henson PM. Autoimmunity and apoptosis: refusing to go quietly. *Nat Med* 2005;11: 26-27.23. Henson PM, Cosgrove GP, Vandivier RW. Apoptosis and Cell Homeostasis in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3: 512-518
132. Henson PM, Cosgrove GP, Vandivier RW. Apoptosis and Cell Homeostasis in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3: 512-518
133. Weaver CV, Liu SP, Lu JF, Lin BS. The effects of benzene exposure on apoptosis in epithelial lung cells: localization by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) and the immunocytochemical localization of apoptosis-related gene products. *Cell Biol Toxicol.* 2007;23(3):201-20
134. de Souza PM, Lindsay MA. Apoptosis as a therapeutic target for the treatment of lung diseases. *Curr Opin Pharmacol* 2005, 5: 232-237
135. Schleimer RP. Glucocorticoids Suppress Inflammation but Spare Innate Immune Responses in Airway Epithelium. *Proc Am Thorac Soc* 2004; 1:222- 230.
136. Jenkins CR, Jones PW, Calverley PM, Celli B, Anderson JA, Ferguson GT, Yates JC, Willits LR, Vestbo J. Efficacy of salmeterol/fluticasone propionate by GOLD stage of chronic



obstructive pulmonary disease: analysis from the randomised, placebo-controlled TORCH study. *Respir Res.* 2009;10:59

137. Tashkin DP, Celli B, Senn S, Burkhart D, Kesten S, Menjoge S, Decramer M; UPLIFT Study Investigators. A 4-year trial of tiotropium in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 2008 Oct 9;359(15):1543-54.

138. Vignola AM, Riccobono L, Profita M, Foresi A, Di Giorgi R, Guerrera D, Gjomarkaj M, Di Blasi P, Paggiaro PL. Effects of low doses of inhaled fluticasone propionate on inflammation and remodelling in persistent-mild asthma. *Allergy* 2005;60(12):1511-7.

139. Alexis NE, Lay JC, Haczku A, Gong H, Linn W, Hazucha MJ, Harris B, Tal- Singer R, Peden DB. Fluticasone propionate protects against ozone-induced airway inflammation and modified immune cell activation markers in healthy volunteers. *Environ Health Perspect.* 2008 ;116(6):799-805

140. Pahlavani MA, Vargas DA. Aging but not dietary restriction alters the activation-induced apoptosis in rat T cells. *FEBS Lett* 2001; 491: 114–118

141. Makris D, Vrekoussis T, Izoldi M, Alexandra K, Katerina D, Dimitris T, Michalis A, Tzortzaki E, Siafakas NM, Tzanakis N. Increased apoptosis of neutrophils in induced sputum of COPD patients. *Respir Med.* 2009; 103(8):1130-5.

#### BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΦΟΡΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

1.1 National Heart, Lung and Blood Institute, [www.nlm.nih.gov/medlineplus/images/bronchitis.jpg](http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/images/bronchitis.jpg).

1.2 [www.joelspitzer.com/whyquit/joel/cilia1a.pg](http://www.joelspitzer.com/whyquit/joel/cilia1a.pg)

1.3 [www.som.tulane.edu/classware/pathology/medical\\_pathology/New\\_for\\_98/Lung\\_Review/Obstructive\\_disease/Emphysema\\_centripan.jpg](http://www.som.tulane.edu/classware/pathology/medical_pathology/New_for_98/Lung_Review/Obstructive_disease/Emphysema_centripan.jpg)

1.4 William MacNee. Pathology, pathogenesis and pathophysiology of COPD . ABC of COPD Ed. 2007 ; 4-6

1.5 M. Roth. Pathogenesis of COPD. Part III. Inflammation in COPD. *INT J TUBERC LUNG DIS* 2008; 12(4):375–380

- 1.5 R. T. Abboud, S. Vimalanathan. Pathogenesis of COPD. Part III. The role of protease-antiprotease imbalance in emphysema *INT J TUBERC LUNG DIS* 2008;12(4):361-367
- 1.6 Nu ZHANG, Heather Hartig, Ivan DZHAGALOV, David DRAPER and You Wen He. The role of apoptosis in the development and function of T lymphocytes. Cell research 2010 Shanghai institutes for biological Sciences ([www.nature.com](http://www.nature.com))
- 1.7 Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumor-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:420-430.
- 1.8 Boris Zhivotovsky and Guido Kroemer Apoptosis and genomic instability. Review, *Nature* 2004;Volume 5;752-762.
- 1.9 Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways David G Breckenridge *Oncogene* (2003)22,8608 8618.doi:10.1038/sj.onc.1207108
- 1.10 [www.hartnell.cc.ca.us/biology](http://www.hartnell.cc.ca.us/biology)
- 1.11 Hawgood & Clements, J.A. (1990) *J.Clin.Invest.*86,1-6
- 1.12 pdf Microsoft powerpoint -Abbas et al-outl6gf for pdf08