



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΕΡΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ι. ΧΑΤΖΗΣ

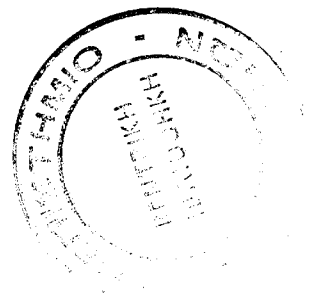
**" ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟΥ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ
ΣΕ ΔΕΡΜΑΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΚΟΗΘΕΙΕΣ "**

ΟΥΡΑΝΙΑ Δ. ΖΩΗ

ΔΕΡΜΑΤΟΛΟΓΟΣ-ΑΦΡΟΔΙΣΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2004



«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα»

Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2.

ΑΙΤΗΣΗ ΕΚΠΟΝΗΣΗΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ: 16-02-1999
ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: Γ.Σ. 380α/18-05-1999

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ:

Ιωάννης Χατζής, Καθηγητής Δερματολογίας

ΜΕΛΗ:

Νίκη Ι. Αγκάντη, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής
 Κωνσταντίνος Μπασσιούκας, Επίκουρος Καθηγητής Δερματολογίας

ΑΝΑΣΥΣΤΑΣΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: Συν. Αριθ.: 506α/10-06-2003

ΜΕΛΗ ΝΕΑΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ:

Κωνσταντίνος Μπασσιούκας, Επίκουρος Καθηγητής Δερματολογίας

ΜΕΛΗ:

Ιωάννης Μπασσιούκας, Αναπληρωτής Καθηγητής Δερματολογίας
 Νίκη Ι. Αγκάντη, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής

ΟΡΙΣΜΟΣ ΘΕΜΑΤΟΣ: 02-07-1999

ΚΑΤΑΘΕΣΗ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ: 12-11-2003

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ:

Επαμεινώντας Τσιάνος, Καθηγητής Παθολογίας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Νίκη Ι. Αγκάντη, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής
 Βασιλική Μαλάμου-Μήτση, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας
 Κωνσταντίνος Μπουραντάς, Καθηγητής Παθολογίας-Αιματολογίας
 Θεόδωρος Φώτσης, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας
 Δημήτριος Στεφάνου, Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας
 Ιωάννης Μπασσιούκας, Αναπληρωτής Καθηγητής Δερματολογίας
 Κωνσταντίνος Μπασσιούκας, Επίκουρος Καθηγητής Δερματολογίας

ΒΑΘΜΟΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ:

«Άριστα»

Η Γραμματέας

ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΤΣΑΓΓΑΛΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Τα τελευταία 15 χρόνια αποτέλεσαν για τη δερματολογία περίοδο μεγάλης προόδου. Οι μεγάλες εξελίξεις στη βιοχημεία, τη μοριακή βιολογία, την ανοσολογία και τη γενετική βοήθησαν ώστε να μελετήσουμε, να περιγράψουμε και να κατανοήσουμε ιδιαίτερα σύνθετες και δυσνόητες λειτουργίες του φυσιολογικού δέρματος αλλά και των περισσότερων δερματικών παθήσεων.

Η περιγραφή των οδών της απόπτωσης και των ογκογονιδίων, η αγγειογένεση, η ανοσοθεραπεία και οι εξελίξεις στη βιοτεχνολογία είναι μόνο μερικά από τα πεδία στα οποία εστιάζεται η σύγχρονη έρευνα.

Η πρόοδος αυτή και ο όγκος των γνώσεων που αθροίστηκε μέχρι σήμερα γίνεται προσπάθεια να αξιοποιηθεί στο κλινικό επίπεδο προς όφελος των ασθενών που πάσχουν από χρόνια βαρείας πρόγνωσης δερματικά νοσήματα ή καρκίνο του δέρματος. Είναι προφανές ότι το πεδίο της έρευνας είναι ακόμη διάπλατα ανοικτό, τόσο για τη μελέτη της βιολογίας του δέρματος όσο και για την ανακάλυψη και την ανάπτυξη νέων δραστικών φαρμακευτικών ουσιών.

Ένας από τους δημοφιλέστερους και πολλά υποσχόμενους τομείς της έρευνας της τελευταίας δεκαετίας είναι το κεφάλαιο του κυτταρικού θανάτου και μάλιστα ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος ή απόπτωση. Η απόπτωση είναι ένας απαραίτητος φυσιολογικός ρυθμιστικός μηχανισμός, συμπληρωματικός του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, δια του οποίου περιττοί ιστοί και κύτταρα αποβάλλονται κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης. Με τον τρόπο αυτό διατηρείται σταθερός κυτταρικός αριθμός και επιπλέον καταστρέφονται κύτταρα στα οποία έχουν προκληθεί ανεπανόρθωτες βλάβες του γενετικού τους υλικού.

Υπάρχουν ενδείξεις ότι ο φυσιολογικός μηχανισμός της απόπτωσης διαταράσσεται τόσο σε αυτοάνοσης αιτιολογίας νοσήματα όσο και σε κακοήθη νοσήματα. Στο δέρμα οι αποπτωτικοί μηχανισμοί φαίνεται να παίζουν ουσιαστικό ρόλο στην κυκλική ανανέωση των επιδερμικών κυττάρων, στη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων, στον κύκλο της τρίχας, στην παθογένεση διαφόρων δερματικών παθήσεων και στην ανοσοδιαφυγή δερματικών όγκων.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση των φαινομένων της απόπτωσης σε νεοπλάσματα του δέρματος, επιθηλιακής και λεμφικής προέλευσης, ώστε να ριχθεί περισσότερο φως στην παθοφυσιολογία, την κλινική πορεία και την πρόγνωση των νοσημάτων αυτών. Η εργασία πραγματοποιήθηκε στην Πανεπιστημιακή Κλινική Δερματικών και Αφροδισίων Νοσημάτων στα Ιωάννινα και

στην Πανεπιστημιακή Δερματολογική Κλινική του "Free University" Hospital στο Amsterdam.

Θέλοντας να ευχαριστήσω όλους όσους βοήθησαν στην πραγματοποίηση αυτής της διατριβής, θα πρέπει πρώτα να σταθώ στον Καθηγητή κ. Ι. Χατζή, τον οποίο είχα την τύχη να γνωρίσω από τα φοιτητικά μου χρόνια. Με το παράδειγμά του με έκανε να αγαπήσω τη Δερματολογία και από τότε μέχρι σήμερα υπήρξε σπουδαίος δάσκαλος. Χάρη στις παραινέσεις, την επιμονή και την υπομονή του ολοκληρώθηκε αυτή η επίπονη εργασία.

Ευχαριστώ επίσης τον Καθηγητή κ. Rein Willemze για την προθυμία με την οποία δέχθηκε να εργασθώ στο τμήμα του, την αμέριστη συμπαράστασή του, τις δημιουργικές συζητήσεις και όλα όσα μου δίδαξε στο διάστημα που είχα την τύχη να εργάζομαι κοντά του στο νοσοκομείο Free University Hospital του Amsterdam.

Ευχαριστώ όλους τους ασθενείς που συμμετείχαν στη μελέτη. Χωρίς τη συνεργασία και την υπομονή τους κατά τη λήψη των πολλαπλών βιοψιών δε θα ήταν δυνατή η συγκέντρωση του απαραίτητου υλικού για την εργασία.

Για τους γονείς μου οι λέξεις δεν αρκούν να τους ευγνωμονήσω, διότι στάθηκαν πάντα με αυτοθυσία δίπλα μου.

Το ίδιο ισχύει και για το σύζυγό μου Χρήστο, ο οποίος με στήριξε επιστημονικά, υλικά και ψυχολογικά όλα τα χρόνια που χρειάστηκαν για να ολοκληρωθεί η παρούσα διατριβή.

Αφιερώσεις

Στο Χρήστο,
την Όλγα και το Φώτη

Στους γονείς μου

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	11
1) ΕΙΣΑΓΩΓΗ	12
Α. ΟΡΙΣΜΟΣ.....	12
Β. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ.....	13
Γ. ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΚΑΙ ΝΕΚΡΩΣΗΣ.....	13
2) ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΣΤΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ	17
3) Η ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ	19
4) ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ	23
5) ΡΥΘΜΙΣΤΕΣ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ	25
Α. ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ	25
Β. ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΡΥΘΜΙΣΤΕΣ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ	26
(1) <i>Κασπάσες</i>	26
(2) <i>Πρωτεΐνες της Οικογένειας bcl-2</i>	28
(3) <i>Επιφανειακοί (Μεμβρανικοί) Υποδοχείς Κυτταρικού Θανάτου</i>	30
6) ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΣΕ ΚΑΚΟΗΘΕΙΣ ΔΕΡΜΑΤΟΠΑΘΕΙΕΣ	40
Α) ΒΑΣΙΚΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ	40
Β) ΑΚΑΝΘΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ.....	43
Γ) ΚΑΚΟΗΘΕΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑ	44
Δ) ΔΕΡΜΑΤΙΚΑ ΛΕΜΦΩΜΑΤΑ	44
1) <i>Σπογγοειδής Μυκητίαση</i>	48
2) <i>Πρωτοπαθείς CD30-θετικές λεμφονεπλαστικές διαταραχές</i>	49
3) <i>CD30- αρνητικό δερματικό λέμφωμα από μεγάλα T-κύτταρα</i>	51
4) <i>Πρωτοπαθές δερματικό B-λέμφωμα από κύτταρα του τύπου του λεμφοξιδιακού κέντρου</i>	51
5) <i>Πρωτοπαθές δερματικό ανοσοκίττωμα</i>	52
6) <i>Πρωτοπαθές δερματικό λέμφωμα ποδός από μεγάλα B-κύτταρα</i>	53
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	54
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	55

ΥΛΙΚΟ.....	56
ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	56
1. ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΜΕΝΩΝ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΣΤΑ ΒΑΣΙΚΟΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ.....	59
Α. ΥΛΙΚΟ.....	59
Β. ΜΕΘΟΔΟΙ – ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	59
Γ. ΜΑΡΤΥΡΕΣ.....	60
Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	60
Ε. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	65
2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΜΕΝΩΝ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΣΤΑ ΠΡΩΤΟΠΑΘΗ ΔΕΡΜΑΤΙΚΑ ΛΕΜΦΩΜΑΤΑ Β- ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΑΡΧΗΣ.....	68
Α. ΥΛΙΚΟ.....	68
Β. ΜΕΘΟΔΟΙ - ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	69
Γ. ΜΑΡΤΥΡΕΣ.....	69
Δ. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	70
Ε. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	71
ΣΤ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	81
3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΜΕΝΩΝ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΣΤΑ ΠΡΩΤΟΠΑΘΗ ΔΕΡΜΑΤΙΚΑ ΛΕΜΦΩΜΑΤΑ Τ-ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΑΡΧΗΣ.....	85
Α. ΥΛΙΚΟ.....	85
Β. ΜΕΘΟΔΟΙ – ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	86
Γ. ΜΑΡΤΥΡΕΣ.....	86
Δ. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΧΡΩΣΕΩΝ.....	87
Ε. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	88
ΣΤ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	93
ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	97
SUMMARY AND CONCLUSIONS.....	100
ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ.....	103
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	106

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1) ΕΙΣΑΓΩΓΗ

α. Ορισμός

Η γνώση ότι η κυτταρική διαφοροποίηση και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός ακολουθούν προγραμματισμένα πρότυπα τυγχάνει ευρείας αποδοχής στην παγκόσμια επιστημονική κοινότητα από πολλών ετών. Αντιστρόφως, η κατανόηση ότι ένα παρόμοιο πρόγραμμα δύναται να ελέγχει τον κυτταρικό θάνατο αποτελεί πρόσφατη εξέλιξη στη μοριακή βιολογία. Ο κυτταρικός θάνατος, είτε ως προγραμματισμένο γεγονός κατά την εξέλιξη και ανανέωση των ιστών, είτε ως τελικό αποτέλεσμα τοξικών ή παθολογικών επιδράσεων, φαίνεται να περιλαμβάνει σχετικά περιορισμένο αριθμό εκτελεστικών οδών.

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος ή απόπτωση, αποτελεί μία ιδιαίτερη μορφή κυτταρικού θανάτου με χαρακτηριστικές μορφολογικές αλλοιώσεις, αλλά και γενετικά προγραμματισμένες μοριακές και βιοχημικές αλληλεπιδράσεις. Κατά την απόπτωση το κύτταρο ενεργοποιεί εσωτερικούς μηχανισμούς αυτοκτονίας, οι οποίοι οδηγούν μέσα σε λίγες ώρες στις χαρακτηριστικές μακροσκοπικές εικόνες της συρρίκνωσης, της πύκνωσης της χρωματίνης και του σχηματισμού αποπτωτικών σωματίων(1), οι οποίες θα αναφερθούν στη συνέχεια και μάλιστα διαφοροποιούν την απόπτωση από την άλλη μορφή κυτταρικού θανάτου, τη νέκρωση.

Αν και ο όρος χρησιμοποιείται από τριακονταετίας (1), το ερευνητικό ενδιαφέρον για τον έλεγχο, τους εκλυτικούς και ανασταλτικούς μηχανισμούς της απόπτωσης παραμένει δικαιολογημένα τεράστιο. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι ο κυτταρικός θάνατος που επισυμβαίνει κατά την εμβρυογένεση, τη μεταμόρφωση, την ορμονοεξαρτώμενη ιστική ατροφία και την ανανέωση των φυσιολογικών ιστών διαμεσολαβείται από τη διαδικασία της απόπτωσης. Ένα άλλο χαρακτηριστικό που επικουρεί τη σημασία της απόπτωσης είναι η ανεύρεσή της σε ποικιλία διαφορετικών φυλογενετικά πολυκυτταρίων οργανισμών, όπως ο νηματοσκώληκας *C. elegans*, η *Drosophila* αλλά και τα θηλαστικά(2-4). Στα ακόλουθα κεφάλαια θα περιγράψουμε τα βασικά μορφολογικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης και τις διαφορές της από τη νέκρωση. Επίσης θα αναφερθούμε στη βιολογική σημασία της τόσο στους φυσιολογικούς ιστούς όσο και στην παθογένεση σημαντικών νοσολογικών οντοτήτων. Τέλος θα περιγράψουμε τους υπεύθυνους μηχανισμούς και τους παράγοντες που ρυθμίζουν την απόπτωση, με ιδιαίτερο ενδιαφέρον στο φυσιολογικό δέρμα και σε χρόνιες φλεγμονώδεις ή νεοπλασματικές δερματοπάθειες.

β. Ιστορική Αναδρομή

Μικροσκοπικές περιγραφές για τον κυτταρικό θάνατο δεν υπάρχουν στην ιατρική βιβλιογραφία, λόγω ανυπαρξίας ιστολογικών χρώσεων, έως το 1858. Αξίζει μάλιστα να σημειώσουμε ότι από την εποχή του Γαληνού έως τον R. Virchow ο όρος “νέκρωση” χρησιμοποιείται για να δηλώσει το προχωρημένο στάδιο κυτταρικής καταστροφής, παρόμοιο με αυτό που θα χαρακτηρίζαμε σήμερα μακροσκοπικά ως “γάγγραινα”. Το γεγονός του κυτταρικού θανάτου συζητείται στο Μάθημα XV της “Κυτταρικής Παθολογίας” του Virchow, στο κεφάλαιο “Παθητικές διαδικασίες και εκφύλιση”. Ο Virchow αναφέρει στα συγγράμματά του τους όρους “νεκροβίωση” και “εκφύλιση”, ενώ μαθητές του όπως ο C.Weigert αναφέρουν τον όρο «πηκτική νέκρωση» εννοώντας το λευκό έμφρακτο. Από την ίδια περίοδο προέρχονται οι όροι «αυτόλυση», «πύκνωση», «καρυόλυση» και «καρυορρηξία», κανένας όμως δεν αντιστοιχεί στον σημερινό προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο(5).

Πρώτος ο W.Flemming χρησιμοποίησε το χαρακτηρισμό «αυτόματος κυτταρικός θάνατος» (ο ίδιος W.Flemming που καθιέρωσε τους όρους “χρωματίνη” και “μίτωση”) και εισήγαγε τον όρο “χρωματόλυση” εννοώντας αυτό που λέμε σήμερα απόπτωση(6). Τις μελέτες του W. Flemming επέκτεινε ο γερμανός ανατόμος L.Grafer το 1914(7) και αργότερα ο εμβρυολόγος A. Glucksman το 1950(8). Την ίδια χρονιά κινηματογραφήθηκε τυχαία για πρώτη φορά η αποπτωτική διαδικασία κατά τη διάρκεια μιας μελέτης για τον κυτταρικό θάνατο, παραδόξως χωρίς να αναγνωρισθεί(9).

Ο ρόλος της αποδόμησης των πρωτεϊνών στον κυτταρικό θάνατο αναγνωρίστηκε μόλις το 1960, ενώ ο όρος «απόπτωση» (από τις ελληνικές λέξεις «από» και «πίπτω»), που θεωρείται ο πλέον επιτυχημένος, χρησιμοποιείται μόλις από το 1972. Ο JFKerr εισήγαγε τον όρο για να περιγράψει τις χαρακτηριστικές μορφολογικές αλλοιώσεις των κυττάρων κατά τη διαδικασία του προγραμματισμένου θανάτου, επιθυμώντας επιπλέον να τις διακρίνει από τις αλλοιώσεις της νέκρωσης(1;10).

γ. Διαφορές Απόπτωσης και Νέκρωσης

Μορφολογικά η διάκριση μεταξύ των δύο γνωστών μορφών κυτταρικού θανάτου, της απόπτωσης (προγραμματισμένος θάνατος) και της νέκρωσης (τυχαίος θάνατος) είναι σαφής (Σχήμα 1).

Η απόπτωση χαρακτηρίζεται από ενεργητική απέκκριση ύδατος που οδηγεί στην συρρίκνωση του κυττάρου. Το κυτταρόπλασμα συμπυκνώνεται και το κύτταρο στρογγυλοποιείται και αποκολλάται από τα γεινιάζοντα κύτταρα. Τα κυτταροπλασματικά οργανίδια, ειδικά τα μιτοχόνδρια, στοιβάζονται ενώ διατηρούν σχετικά φυσιολογική τη μορφολογία τους. Η λειτουργία τους αντιθέτως διακόπτεται νωρίς στη διαδικασία της απόπτωσης. Ταυτόχρονα με την απώλεια της λειτουργίας των μιτοχονδρίων, η πυρηνική χρωματίνη συμπυκνώνεται σε μια μεγάλη στρογγυλή μάζα, επαπτόμενη με την πυρηνική μεμβράνη. Η κυτταρική μεμβράνη παραμένει ακέραια ενώ τμήματα του κυττάρου αποπίπτουν, δημιουργώντας τα αποκαλούμενα «αποπτωτικά σωμάτια», τα οποία στην συνέχεια εγκυστεύονται στο κυτταρόπλασμα γειτονικών κυττάρων ή φαγοκυτταρώνονται(10) (Σχήμα 1).

Η νέκρωση, αντίθετα, είναι μία «παθολογική» μορφή θανάτου, συνέπεια οξέως κυτταρικού τραυματισμού. Μορφολογικά χαρακτηρίζεται από ταχεία εξοίδηση του κυττάρου και των μιτοχονδρίων, διάσπαση και λύση της κυτταρικής μεμβράνης και διασπορά του κυτταροπλάσματος στο περιβάλλον με αποτέλεσμα τη φλεγμονή (Σχήμα 1). Ο κατακερματισμός του γενετικού υλικού γίνεται σε τυχαία κομμάτια από ιστόνες (Πίνακας1).

Η πιο σημαντική όψη της απόπτωσης δεν είναι η απουσία ενδοκυτταρίου οιδήματος και φαινομένων φλεγμονής, αλλά η διάσπαση του DNA. Με τη δράση ειδικών ενζύμων, των νουκλεασών, διασπάται το πυρηνικό DNA δημιουργώντας χαρακτηριστική «κλίμακα» σε ηλεκτροφόρηση γέλης αγαρόζης αποτελούμενη από τμήματα ολιγονουκλεοσωμίων (πολλαπλάσια 180-200 βάσεων). Αυτός ο τρόπος διάσπασης του DNA μαζί με τη διατήρηση της ακεραιότητας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης προλαμβάνει τόσο τη διασπορά DNA σε περιβάλλοντες ιστούς, αποφεύγοντας την πρόκληση φλεγμονωδών αντιδράσεων, όσο και τη διασπορά καταστροφικών αλληλουχιών DNA στα κύτταρα τα οποία θα φαγοκυτταρώσουν τα αποπτωτικά σωμάτια(11;12).

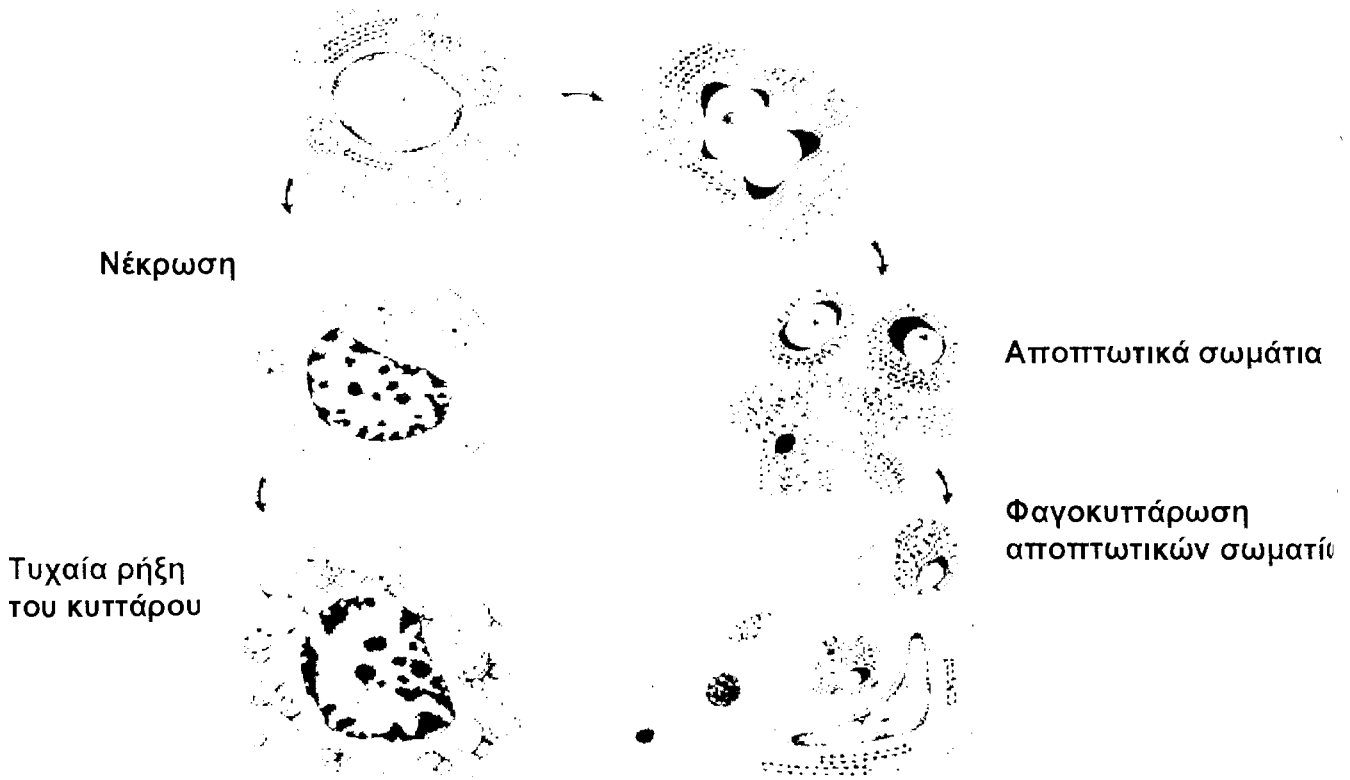
Αξίζει να σημειωθεί ότι η αποπτωτική διαδικασία μπορεί να ολοκληρωθεί πολύ σύντομα, ακόμα και σε λεπτά, με αποτέλεσμα να μην ανευρίσκεται συχνά σε ιστικές τομές. Σε τομές ρουτίνας ο καλύτερος κυτταρολογικός δείκτης απόπτωσης είναι η καρυορρηξία, ιδιαίτερα μεμονωμένων κυττάρων(13;14).

Συμπερασματικά θα λέγαμε ότι υπάρχουν τρία βασικά στοιχεία που διαφοροποιούν μορφολογικά την απόπτωση από τη νέκρωση:

- 1) η απουσία οιδήματος και στοιχείων φλεγμονής
- 2) ο κατακερματισμός του DNA σε πολλαπλάσια των 180-200 νουκλεοτιδίων (και όχι σε τυχαία κομμάτια)
- 3) η εμπλοκή μεμονωμένων κυττάρων (και όχι ομάδων κυττάρων).

Φυσιολογικό κύτταρο

Απόπτωση



Σχήμα 1. Μορφολογικές διαφορές μεταξύ απόπτωσης και νέκρωσης

Πίνακας 1. Διαφορές μεταξύ αποπτωσης και νέκρωσης

ΑΠΟΠΤΩΣΗ	ΝΕΚΡΩΣΗ
<ul style="list-style-type: none"> • Γενετικά προκαθορισμένη διαδικασία • Ενεργητική διαδικασία • Ακέραια κυτταρική μεμβράνη και οργανίδια • Απώλεια δια-κυτταρικής επικοινωνίας • Συμπύκνωση κυτταροπλάσματος και χρωματίνης • Μείωση κυτταρικού μεγέθους (Συρρίκνωση) • Ενδονουκλεοσωμική διάσπαση DNA • Διάσπαση του πυρήνα σε τεμάχια περιβαλλόμενα από μεμβράνη • Δημιουργία αποπτωτικών σωμάτων περιβαλλόμενων από κυτταρική μεμβράνη • Δεν δημιουργεί φλεγμονή 	<ul style="list-style-type: none"> • Τυχαία διαδικασία • Παθητική διαδικασία • Ρήξη κυτταρικής μεμβράνης • Διατήρηση δια-κυτταρικής επικοινωνίας • Διάσπαση μιτοχονδρίων • Αύξηση κυτταρικού μεγέθους (Εξοίδηση) • • Τυχαία διάσπαση DNA • Πλήρης διάσπαση πυρήνα • Τυχαία ρήξη κυτάρου • Φλεγμονώδης αντίδραση

2) Βιολογική Σημασία της Απόπτωσης Στο Φυσιολογικό Οργανισμό

Η απόπτωση είναι ένας απαραίτητος φυσιολογικός ρυθμιστικός μηχανισμός, συμπληρωματικός του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, δια του οποίου περιττοί ιστοί και κύτταρα αποβάλλονται κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης. Με τον τρόπο αυτό διατηρείται στους διαφοροποιημένους ιστούς σταθερός κυτταρικός αριθμός και ισορροπία μεταξύ κυτταρικής απώλειας και κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Έχει υπολογισθεί ότι σε ένα μέσο ενήλικα, περίπου 50-70 δισεκατομμύρια κύτταρα πεθαίνουν με προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, μία διαδικασία με την οποία κάθε άτομο στη διάρκεια ενός έτους θα παράγει και θα καταστρέψει μάζα κυττάρων ίση με το σωματικό του βάρος.

Με το μηχανισμό της απόπτωσης καταστρέφονται επιπλέον κύτταρα στα οποία έχουν προκληθεί ανεπανόρθωτες βλάβες του γενετικού τους υλικού. Με άλλα λόγια, η απόπτωση αποτελεί μία μορφή γενετικά προκαθορισμένης κυτταρικής αυτοκτονίας με σκοπό την ομοιοστασία και τη διατήρηση ακέραιου γονιδιώματος. Αντίθετα, η νέκρωση θεωρείται πάντοτε «παθολογική», αποτέλεσμα οξέως τραυματισμού.

Κύτταρα σε ιστούς που πολλαπλασιάζονται γρήγορα είναι περισσότερο ευάλωτα στην απόπτωση, όπως για παράδειγμα τα κύτταρα των εντερικών κρυπτών, τα σπερματογόνια, τα εμβρυικά κύτταρα και τα κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος. Αποτέλεσμα αποπτωτικών μηχανισμών είναι η εξουδετέρωση των αυτό-αντιδραστικών T-λεμφοκυττάρων στο θύμο αδένα (15) και η επιλογή των B-λεμφοκυττάρων στα βλαστικά κέντρα των λεμφαδένων κατά τις ανοσοαπαντήσεις μέσω χυμικής ανοσίας(16). Επίσης, μέσω της απόπτωσης γίνεται η απομάκρυνση των γηρασμένων πολυμορφοπυρήνων ουδετεροφίλων και των μεγακαρυοκυττάρων που έχασαν το μεγαλύτερο μέρος του κυτταροπλάσματός τους κατά το σχηματισμό αιμοπεταλίων(17;18). Με τον τρόπο αυτό οι μηχανισμοί της απόπτωσης εξασφαλίζουν την αυτο-ανοχή απομακρύνοντας τα αυτο-αντιδραστικά T-λεμφοκύτταρα και τερματίζοντας τις περιφερικές ανοσολογικές απαντήσεις με την εξουδετέρωση των αντιδραστικών T- και B- κυτταρικών κλώνων και την απομάκρυνση των αποπτωτικών σωματίων με φαγοκυττάρωση από τα μακροφάγα κοκκιοκύτταρα(19).(20)

Πέραν τούτων, η απόπτωση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εξουδετέρωση από το ανοσολογικό σύστημα καρκινικών ή μολυσμένων από ιούς

Πίνακας 2. Σημασία της απόπτωσης στο φυσιολογικό οργανισμό

1	Αποβολή περιττών ιστών και κυττάρων κατά την εμβρυογένεση και τη διαφοροποίηση	Ισορροπία μεταξύ κυτταρικής απώλειας και πολλαπλασιασμού
2	Απομάκρυνση κυττάρων με επιβλαβές γενετικό υλικό	Διατήρηση ακεραίου γονιδιώματος
3	Απομάκρυνση αυτο-αντιδραστικών κυττάρων και τερματισμός των περιφερικών ανοσολογικών αντιδράσεων	
4	Απομάκρυνση μολυσμένων από ιούς κυττάρων και καρκινικών κυττάρων μέσω των κυτταροτοξικών Τ-λεμφοκυττάρων	

κυττάρων, μέσω των κυτταροτοξικών Τ-λεμφοκυττάρων (αντιδράσεις στις οποίες θα αναφερθούμε λεπτομερέστερα παρακάτω)(21). (22) Όπως εύκολα συμπεραίνει κανείς, αυτή η διαδικασία της απόπτωσης απαιτεί αυστηρούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς. Η απόπτωση βρίσκεται κάτω από αυστηρό γενετικό έλεγχο και ενεργοποιείται από ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες όπως ορμόνες, κυτταροκίνες, κύτταρα δολοφόνους (Natural Killer, NK), χημικούς παράγοντες (χημειοθεραπευτικά μέσα, γλυκοκορτικοειδή), φυσικούς παράγοντες (ακτινοβολίες, θερμότητα) ή ιογενείς παράγοντες και εν γένει κάθε βλάβη στο κυτταρικό DNA(23).(24)

Τυχόν βλάβες στους αποπτωτικούς μηχανισμούς οδηγούν σε παρατεταμένη κυτταρική επιβίωση αυξάνοντας την πιθανότητα νεοπλασματικής μετατροπής. Παρατεταμένη κυτταρική επιβίωση επίσης δημιουργεί δυνητικά ικανό μικροπεριβάλλον για γενετική αστάθεια και άθροιση μεταλλάξεων. Επιπλέον, βλάβες στις αποπτωτικές οδούς δημιουργούν αντίσταση στη χημειοθεραπεία, στην ακτινοθεραπεία και στην εξουδετέρωση ανεπιθυμητών κυττάρων μέσω των κυτταροτοξικών αντιδράσεων του ανοσοποιητικού συστήματος.

Η σημασία της απόπτωσης για το φυσιολογικό οργανισμό αναφέρεται περιληπτικά στον Πίνακα 2. Περιβαλλοντικοί, φαρμακολογικοί ή και φυσιολογικοί παράγοντες που μπορούν να ενεργοποιήσουν το μηχανισμό της απόπτωσης αναγράφονται στον Πίνακα 3.

3) Η Απόπτωση στην Παθοφυσιολογία Νοσημάτων

Αναφέραμε ήδη την ιδιαίτερη βιολογική σημασία των μηχανισμών της απόπτωσης στους φυσιολογικούς ιστούς. Είναι προφανές ότι δυσλειτουργία ή αντίθετα υπέρ-λειτουργία των μηχανισμών αυτών μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές βλάβες και επιπλοκές στους ιστούς (Πίνακας 4). Η διαλεύκανση του ρόλου της απόπτωσης στις ανοσολογικές αντιδράσεις οδήγησε σε βαθύτερη γνώση της παθοφυσιολογίας πολλών αυτοανόσων νοσημάτων, ρόλοι που αναλύονται διεξοδικά από τους Eckert και Vaux, καθώς και τους Peter, Ehret και Bernt Krammer (25-27).

Η λεπτομερής γνώση των υποδοχέων και των οδών μεταφοράς των ερεθισμάτων για αποπτωτικό θάνατο διαλεύκανε μείζονα θέματα στην ανεπάρκεια των CD4+ λεμφοκυττάρων στη νόσο του AIDS(28;29), στην απόρριψη μοσχευμάτων(30) και στην παθογένεση αυτοανόσων (συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, αρθρίτιδα, νεφρίτιδα) ή λεμφοπερπλαστικών διαταραχών(31).(32) Το

Πίνακας 3. Πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη ρύθμιση της απόπτωσης

ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΤΕΣ	→ ΔΙΑΜΕΣΟΛΑΒΗΤΕΣ → (ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΤΕΣ)	ΣΤΟΧΟΙ	→ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ · → ΘΑΝΑΤΟ
Χημειοθεραπεία	FADD/TRAF/MORT	Caspase 1/ICE	ICAD
Ακτινοβολίες	TRADD/RIP/FLICE-	Caspase 2/ICH-1L	PARP
Υποξία	MACH	Caspase	DNA
Υπερθερμία	FLIP	3/Cpp32/Yama	c-fodrin
Διαταραχές προσκόλλησης	Toso	Caspase 4/TX/ICH-2	lamins
Διαταραχές ατράκτου	Daxx	Caspase 5/ICE rel III	Topoisomerase-1
		Caspase 6/Mch-2	β-actin
Γλυκοκορτικοειδή	Bcl-2, BCL-XI, Bag, MCL1	Caspase 7/Mch-3	U1SnRNP
Στέρωση αυξητικών παραγόντων	Bax, Bad, Bak, BCL-Xs Cytochrome-C, dATP, Apaf-1	Caspase 8/Flice/Mach Caspase 9 /ICE-Lap6 Caspase 10/Mch4	NuMA RB Prall-1B
Fas/TNF/TRAIL	IAP1-2, XIAP, survivin	Caspase 11/mICH-3 Caspase 12/mICH-4 Caspase 13/ERICE	Bcl-2 Bcl-X Bid
	P53, RB, p15, p16, Waf, p27, Myc, E1A, MDM-2, Cyclins		
	Transcription factors, HSC70, Kinases, Phosphatases		

γνωστότερο πειραματικό μοντέλο είναι το μοντέλο μυός MRL-lpr / lpr στο οποίο υπάρχει ελλειματικό αποπτωτικό γονίδιο Fas(33). Όπως θα αναφερθεί στη συνέχεια, η παρουσία του επιφανειακού υποδοχέα Fas είναι απαραίτητη για την απομάκρυνση του κυττάρου από τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα. Στα ποντίκια του πειραματικού αυτού μοντέλου έχουμε έλλειψη του υποδοχέα Fas, με αποτέλεσμα ανάπτυξη λεμφουπερπλαστικών και αυτοανώσων διαταραχών του τύπου του συστηματικού λύκου(34).

Η απορρύθμιση της απόπτωσης των ουδετεροφίλων και εωσινοφίλων κοκκιοκυττάρων εμπλέκεται στην παθογένεση του Συνδρόμου Αναπνευστικής Δυσχέρειας Ενηλίκων (γνωστού ως ARDS), της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης, της ελκώδους κολίτιδος, της ρευματοειδούς αρθρίτιδος, του άσθματος και άλλων αλλεργικών νοσημάτων(35).(36-38)

Αποπτωτικοί μηχανισμοί εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία λοιμωδών νοσημάτων: ένας από τους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς βακτηριακής λοίμωξης είναι η ενδοκυττάρια ενεργοποίηση της απόπτωσης μετά από φαγοκυττάρωση των βακτηριδίων από τα μακροφάγα, με αποτέλεσμα το θάνατο του μακροφάγου(39). Η μεγάλη ιστική καταστροφή στην κεραυνοβόλο ηπατίτιδα C αποδίδεται στην υπερέκκριση επιφανειακού υποδοχέα Fas από τα μολυσμένα με τον ιό της ηπατίτιδας ηπατοκύτταρα(40).

Αποπτωτικοί μηχανισμοί ενοχοποιούνται για την απώλεια νευρικών κυττάρων σε χρόνια νευρολογικά εκφυλιστικά νοσήματα, όπως η νόσος Alzheimer, η νόσος Parkinson, η πλαγία αμυοτροφική σκλήρυνση και η λοιμώδης εγκεφαλοπάθεια(41;42).

Η απόπτωση επίσης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία νοσολογικών οντοτήτων που μέχρι σήμερα εθεωρούνται εξαρτώμενες αποκλειστικά από τη διαδικασία της νέκρωσης, όπως το ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο, το έμφραγμα του μυοκαρδίου και η καρδιακή ανεπάρκεια(43).

Παρόλα όσα ήδη αναφέρθηκαν, το πιο ενδιαφέρον κεφάλαιο της απόπτωσης παραμένει η συσχέτισή της με την ογκογένεση. Η απόπτωση παρατηρείται, σε άλλοτε άλλο βαθμό, σε όλους τους όγκους, χωρίς απαραίτητα να έχει γίνει θεραπευτική παρέμβαση(44). Αίτια που να δικαιολογούν αυτή την παρατήρηση υπάρχουν πολλά. Η απόπτωση σε όγκους είναι ιδιαίτερα προφανής κοντά σε εστίες νέκρωσης, πιθανότατα λόγω ήπιας ιστικής ισχαιμίας (εκλυτικός παράγοντας απόπτωσης, βλέπε Πίνακα 3)(10). Απόπτωση μπορεί να προκληθεί επίσης από έκφραση ογκογονιδίων, απελευθέρωση τοπικά κυτταροκινών από τα μακροφάγα

Πίνακας 4.

Νοσήματα σχετιζόμενα με αναστολή της απόπτωσης	Νοσήματα σχετιζόμενα με αυξημένη απόπτωση
<p>Νεοπλάσματα</p> <ul style="list-style-type: none"> Λεμφώματα Καρκίνος με μεταλλαγμένο p53 Ορμονοεξαρτώμενα νεοπλάσματα <ul style="list-style-type: none"> Καρκίνος μαστού Καρκίνος προστάτου Καρκίνος ωοθηκών <p>Αυτοάνοσα νοσήματα</p> <ul style="list-style-type: none"> Συστηματικός ερυθηματώδης λύκος Σπειραματονεφρίτιδες <p>Ιογενείς λοιμώξεις</p> <ul style="list-style-type: none"> Herpesviruses Poxviruses Adenoviruses 	<p>AIDS</p> <p>Νευροεκφυλιστικά νοσήματα</p> <ul style="list-style-type: none"> Νόσος Alzheimer's Νόσος Parkinson's Retinitis pigmentosa <p>Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα</p> <ul style="list-style-type: none"> Απλαστική αναιμία <p>Ισχαιμία</p> <ul style="list-style-type: none"> Ισχαιμία μυοκαρδίου Αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο Τραυματισμός επαναιμάτωσης <p>Ηπατική βλάβη από τοξίνες</p> <ul style="list-style-type: none"> Αιθανόλη

που διηθούν τον όγκο ή ως αποτέλεσμα κυτταροτοξικών αντιδράσεων με T-λεμφοκύτταρα που επίσης διηθούν τον όγκο περιφερικά(23;45).

Αυξημένη απόπτωση παρατηρείται και σε προκαρκινωματώδεις βλάβες. Πιθανόν ο οργανισμός στα αρχικά στάδια της ογκογένεσης να επιχειρεί να αντισταθμίσει τις επαπειλούμενες βλάβες οδηγώντας σε αποπτωτικό θάνατο τα νεοπλασματικά κύτταρα. Στην πορεία της νόσου ο αμυντικός αυτός μηχανισμός χάνεται ή τροποποιείται. Υπάρχουν ουσιαστικές ενδείξεις ότι η αποτυχία ενεργοποίησης των οδών της απόπτωσης, μετά από τραυματισμό ή διαταραχή του γενετικού υλικού μπορεί να οδηγήσει στην καρκινογένεση(45;46). Πέραν αυτού, οι αποπτωτικοί μηχανισμοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν από επιθετικά νεοπλάσματα εναντίον των φυσιολογικών κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος: καρκινικά κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα FasL στην επιφάνειά τους μπορούν να ενεργοποιήσουν την απόπτωση σε κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα που φέρουν επιφανειακά Fas, χρησιμοποιώντας το μηχανισμό αυτό για ανοσοδιαφυγή(47).

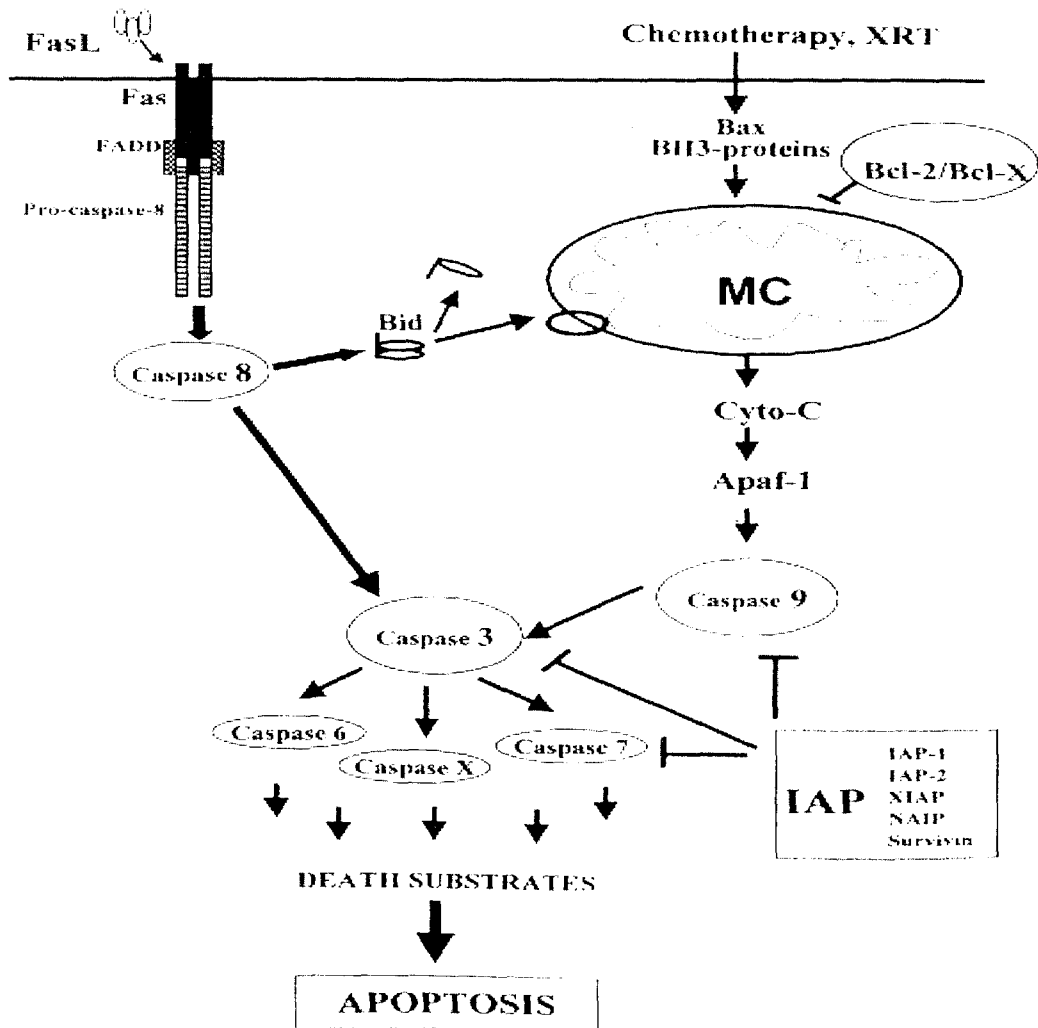
4) Μηχανισμοί Απόπτωσης

Τρεις κύριες οδοί που επάγουν την απόπτωση έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα(48).

- α) Η πρώτη αποπτωτική οδός είναι η οδός μιτοχονδρίων-κυτοχρώματος, η οποία άγεται κυρίως από μέλη της οικογένειας του πρωτο-ογκογονιδίου bcl-2, και έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των Araf-1, κασπάσης-9 και κασπάσης-3 (Σχήμα 2).
- β) Η δεύτερη αποπτωτική οδός σηματοδοτεί τη σύνδεση υποδοχέων της οικογένειας TNF (πχ υποδοχέων Fas και TRAIL) και ενεργοποιεί διαδοχικά την κασπάση-8 και την κασπάση-3.
- γ) Η τρίτη αποπτωτική οδός στηρίζεται στη διαμεσολάβηση ορισμένων πρωτεασών της σερίνης (granzymes A, B) και της περφορίνης (perforin), οι οποίες είναι κυτταροτοξικές πρωτεΐνες στο κυτταρόπλασμα κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων και κυττάρων δολοφόνων (NK). Τα μόρια αυτά διασπών και ενεργοποιούν απευθείας διάφορες κασπάσες με τελικό αποτέλεσμα τον αποπτωτικό θάνατο.

Και οι τρεις αποπτωτικές οδοί οδηγούν στην ενεργοποίηση της κασπάσης-3, μίας πρωτεάσης κυστίνης η οποία διασπά υποστρώματα μετά από υπολείμματα ασπαρτικού οξέως. Ανεξάρτητα από την οδό επαγωγής του σήματος για τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, η τελική απόφαση εκτέλεσης του θανάτου λαμβάνεται πάντα ενδοκυττάρια. Στο ενδοκυττάριο επίπεδο, πραγματοποιείται η

Σχήμα 2. Αποπτωτική οδός Fas-FasL



ενεργοποίηση των CED-3 / κασπάσων, που έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία των χαρακτηριστικών αποπτωτικών σωματίων με συρρίκνωση του κυτταροπλάσματος και της χρωματίνης καθώς και κατακερμάτησης του DNA(49).

5) Ρυθμιστές της Απόπτωσης

Η διαδικασία της απόπτωσης απαιτεί, λόγω της σπουδαιότητάς της, αυστηρούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς. Όπως ήδη αναφέρθηκε, βρίσκεται κάτω από αυστηρό γενετικό έλεγχο και ενεργοποιείται από ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες (Πίνακας 3). Οι ενδογενείς ρυθμιστές της απόπτωσης διακρίνονται σε γονιδιακούς, σε μοριακούς και σε υποδοχείς κυτταρικής επιφανείας.

α. Γονιδιακή ρύθμιση της απόπτωσης

Η απόπτωση είναι μία γενετικά προκαθορισμένη διαδικασία. Υπάρχουν γονίδια που παράγουν πρωτεΐνες ευοδωτικές ή ανασταλτικές της απόπτωσης, όπως φαίνεται στον πίνακα 3.

Ο κυτταρικός θάνατος έχει μελετηθεί σε βάθος στη διάρκεια ανάπτυξης του νηματώδους σκώληκα *C. Elegans*. Εμπλέκει τα μόρια CED-3 και CED-4, τα οποία είναι απαραίτητα για την επαγωγή κυτταρικού θανάτου και το μόριο CED-9 που προστατεύει τα κύτταρα από τον θάνατο. Στα θηλαστικά, τα ομόλογα του CED-3 αντιπροσωπεύουν μία ομάδα από πρωτεάσες κυστεΐνης με ειδικότητα ασπαρτικού, οι οποίες μέχρι προσφάτως ονομαζόταν οικογένεια ICE (interleukin-1alpha-converting enzyme) και τώρα ονομάζονται κασπάσες(50).

Οι κασπάσες θεωρούνται οι πρωτεΐνες κλειδί για την εκτέλεση της απόπτωσης στα θηλαστικά. Η ανακάλυψη ότι το ανθρώπινο πρωτο-ογκογονίδιο *bcl-2* έχει δομικές και λειτουργικές ομοιότητες με το CED-9, καταδεικνύει ότι ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος στα κύτταρα των θηλαστικών εκτελείται με αυστηρά διατηρημένο μηχανισμό όπως η απόπτωση στο νηματώδη σκώληκα(50). Εκτός από το γονίδιο *bcl-2*, τα συχνότερα γονίδια που έχουν μελετηθεί σε συσχέτισμό με την απόπτωση είναι το *p53* και το *ras*(51-53). Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *p53* παράγει μία πρωτεΐνη η οποία δρα ως "αστυφύλακας" για την ακεραιότητα του γονιδιώματος. Αν προκληθεί βλάβη στο DNA, η πρωτεΐνη *p53* αθροίζεται και καθυστερεί τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G1, μέχρι να επιδιορθωθεί

η βλάβη. Εφόσον η βλάβη δεν επιδιορθώνεται, προκαλείται αποπτωτικός θάνατος του κυττάρου που φέρει το ελαττωματικό γενετικό υλικό(54).

Η ενεργοποίηση ογκογονιδίων και η έλλειψη ογκοκατασταλτικών γονιδίων πιθανότατα να αναστέλλει την απόπτωση σε κύτταρα με διαταραχές στο γενετικό υλικό, δημιουργώντας υπόστρωμα για καρκινογένεση. Είναι γεγονός ότι συχνά παρατηρείται εξάλειψη προ-αποπτωτικών ρυθμιστικών γονιδίων όπως το p53 στους συχνότερους ανθρώπινους καρκίνους. Όμως, η αναφερόμενη συχνότητα στον ανθρώπινο καρκίνο ελλειμματικών γονιδίων που εμπλέκονται στις οδούς της απόπτωσης, είναι σχετικά χαμηλή, παρά τις αναφορές για πιθανές μεταλλάξεις στο γονίδιο του αποπτωτικού επιφανειακού υποδοχέα Fas. Επίσης σε πειραματόζωα με γενετικά ελλειμματικό Fas οι όγκοι δεν εμφανίζονται ιδιαίτερα αυξημένοι. Το πιθανότερο στην καρκινογένεση είναι η συνύπαρξη πολλαπλών παραλλήλων οδών, οι οποίες με άλλοτε άλλο τρόπο αδρανοποιούνται ή ευοδώνονται(55).

Τα τελευταία χρόνια αντικείμενο μελέτης στην καρκινογένεση είναι η αγγειογένεση, η οποία θεωρείται και υπεύθυνη για τη μεταστατική ικανότητα του όγκου. Υπάρχει πάντως συσχέτιση-αλληλεπίδραση μεταξύ των ρυθμιστικών γονιδίων της απόπτωσης και της αγγειογένεσης(π.χ. p53, VEGF, TSP-1)(56).

β. Μοριακοί Ρυθμιστές της Απόπτωσης

Στους μοριακούς ρυθμιστές της απόπτωσης περιλαμβάνονται οι κασπάσες και οι πρωτείνες της οικογένειας Bcl-2.

(1) Κασπάσες

Οι κασπάσες είναι ζυμογόνα. Υφίστανται με τη μορφή αδρανών πολυπεπτιδίων τα οποία μπορούν να ενεργοποιηθούν με αφαίρεση μιας ρυθμιστικής πρόδρομης αλληλουχίας και να μετατραπούν σε μια ετερομερή ενεργό πρωτεάση. Είναι πρωτεάσης κυστίνης οι οποίες διασπούν υποστρώματα στη θέση υπολλειμμάτων ασπαρτικού οξέως (cysteine-containing asp-ases). Το πρώτο γνωστό μέλος της οικογένειας είναι ο ICE, ο αναστολέας της κυτταροκίνης Il-1β, ο οποίος όμως δε φαίνεται να παίζει ιδιαίτερο ρόλο στη διαδικασία της απόπτωσης. Επί του παρόντος η οικογένεια των κασπασών αποτελείται από 13 μέλη(57).

Τα μέλη της οικογένειας ταξινομούνται σε τρεις υποομάδες με βάση την ειδικότητά τους. Η πρώτη υποομάδα ή ICE περιλαμβάνει τις κασπάσες-1, -4 και -5 και πιστεύεται ότι παίζει πρωτεύοντα ρόλο στις φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Αντίθετα,

η δεύτερη υποομάδα (κασπάσες-2, -3 και -7) και η τρίτη (κασπάσες-6, -8, -9 και -10) είναι οι κυρίως εμπλεκόμενες στην απόπτωση(58).

Κάθε μέλος της οικογένειας των κασπασών περιλαμβάνει μία αλληλουχία θανάτου (death domain, DD), μία αλληλουχία εκτέλεσης του θανάτου (death effector domain, DED), και μία αλληλουχία στρατολόγησης κασπασών από το κυτταρόπλασμα (caspase-recruitment domain, CARD). Οι αλληλουχίες DED και CARD είναι ιδιαίτερα σημαντικές για τη συγκέντρωση των κασπασών πριν την ενεργοποίησή τους. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η αποπτωτική διαδικασία που ενεργοποιείται από το κυτόχρωμα C και το dATP προάγεται με σύνδεση της κασπάσης-9 στην Araf-1 με την αλληλεπίδραση των αλληλουχιών CARD/CARD. Η κασπάση-9, αφού ενεργοποιηθεί, ενεργοποιεί ακολούθως και την κασπάση-3. Για την ενεργοποίηση της κασπάσης-3 απαιτούνται το ομόλογο Ced-4, η Araf-1, η προ-κασπάση-9, το dATP και το κυτόχρωμα C(59).

Μετά από ενεργοποίησή τους, οι κασπάσες κατευθύνονται σε πολλαπλούς ενδοκυτταρίους στόχους με αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο δια κατακερματισμού. Στόχους των κασπασών αποτελούν οι πρωτείνες του κυτταρικού σκελετού (πυρηνικές λαμίνες, ακτίνες, γελσολίνες), οι ρυθμιστές της επιδιόρθωσης του DNA (poly ADP-ribose polymerase, PARP), και η αποδόμηση του πυρηνικού DNA με την ενεργοποίηση πρωτεϊνών κινάσης και την απενεργοποίηση ανασταλτικών πρωτεϊνών (ICAD). Στόχοι κασπασών είναι επίσης η πρωτεΐνη U1 που διασπά το RNA, η πυρηνική πρωτεΐνη που είναι υπεύθυνη για τη μίτωση (NuMA) και πρωτείνες του κυτταρικού κύκλου (Rb,p21-activated kinase)(60).

Οι κασπάσες μπορούν να εμπλακούν και σε εξωκυτάρια αποπτωτικά γεγονότα, όπως η απομάκρυνση των αποπτωτικών σωματίων και η μεταφορά φωσφατιδυλ-σερίνης στην κυτταρική μεμβράνη. Μετά την ενεργοποίηση των κασπασών φαίνεται να αδρανοποιούνται, τουλάχιστον λειτουργικά, οι πρωτείνες που αναστέλλουν την απόπτωση. Σε πρόσφατες μελέτες οι κασπάσες φαίνεται να αναστέλλουν τις αντιαποπτωτικές πρωτείνες Bcl-2 και Bcl-xl. Η παρατήρηση αυτή αποκτά ιδιαίτερη σημασία λόγω της αυξανόμενης φαρμακευτικής αντίστασης των καρκινικών κυττάρων στα χημειοθεραπευτικά μέσα. Απευθείας ενεργοποίηση των κασπασών θα αποτελούσε μια αποτελεσματική στρατηγική για τα ανθεκτικά καρκινικά κύτταρα(59).

Εκτός από τους ενεργοποιητές υπάρχουν και φυσικοί αναστολείς των κασπασών. Φυσικοί αναστολείς είναι διάφορες πρωτείνες ιών, η πρωτεΐνη p35 που αναστέλλει όλες σχεδόν τις κασπάσες και η πρωτεΐνη FLICE-inhibitory protein (FLIP), που εμποδίζει τη σύνδεση του FLICE στο FADD μετά από σύνδεση των

επιφανειακών υποδοχέων της απόπτωσης (βλέπε ακολούθως στους μεμβρανικούς υποδοχείς)(61;62).

Τελειώνοντας την αναφορά μας στις κασπάσες θα πρέπει να τονίσουμε και την ύπαρξη μιας καινούργιας ομάδας πρωτεϊνών που αναστέλλουν τις αποπτωτικές πρωτεΐνες και έχουν περιγραφεί πρόσφατα τις IAPs (Inhibitors of Apoptosis Proteins). Οι πρωτεΐνες αυτές υπάρχουν σε όλα τα κύτταρα και αριθμούν αρκετά μέλη, μεταξύ των οποίων και την πρωτεΐνη Survivin. Η πρωτεΐνη Survivin αναστέλλει την κασπάση-9 και παρεμποδίζει την ενεργοποίηση των κασπασών -3, -6 και -7. Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν ανευρίσκεται σε καλά διαφοροποιημένους υγιείς ιστούς. Αντίθετα, απαντάται σε μεταλλαγμένες κυτταρικές σειρές και στους συνηθέστερους καρκίνους όπως πνεύμονα, εντέρου, παγκρέατος, προστάτη, μαστού και στα υψηλής κακοήθειας Non-Hodgkin λεμφώματα. Η πρωτεΐνη Survivin εκφράζεται εκλεκτικά στη φάση G2-M (φάση μίτωσης) του κυτταρικού κύκλου και σχετίζεται άμεσα με τα μικροσώματα της ατράκτου κατά τη μίτωση(63).

(2) Πρωτεΐνες της Οικογένειας bcl-2

Το πρωτο-ογκογονίδιο bcl-2 ανακαλύφθηκε το 1984 κατά τη μελέτη της χρωμοσωμικής αντιμετάθεσης t14;18 που απαντάνται στη λευχαιμία από Β-κύτταρα και στα μη-Hodgkin συστηματικά θυλακικά λεμφώματα(64). Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη 24kd, την πρωτεΐνη Bcl-2, η οποία εκφράζεται στον πυρηνικό φάκελο, το ενδοπλασματικό δίκτυο και τις μιτοχονδριακές μεμβράνες(65).

Η Bcl-2 ανήκει σε μία μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνών που περιλαμβάνει αναστολείς και ενεργοποιητές της απόπτωσης. Υπάρχουν τέσσερα δομικά ομόλογα πρότυπα Bcl-2 : BH1, BH2 , BH3 και BH4. Τα τρία πρώτα απαντούν τόσο σε υπο-ομάδες με προ-αποπτωτικές όσο και σε υπο-ομάδες με αντι-αποπτωτικές ιδιότητες. Το BH4 απαντάται αποκλειστικά μεταξύ των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών(66).

Οι περισσότερες αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας περιέχουν αλληλουχίες BH1 και BH2, όσες μάλιστα προσομοιάζουν στην Bcl-2 περιέχουν και τις τέσσερις αλληλουχίες. Οι προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες σχηματίζουν δύο υπο-ομάδες. Η υπο-ομάδα Bax περιλαμβάνει τις Bax, Bak και Bok (Mtd), μοιάζει με την Bcl-2 και περιέχει τις αλληλουχίες BH1, BH2 και BH3. Η υποομάδα της αλληλουχίας BH3 περιλαμβάνει επτά μέλη (Bik, Blk, Hrk, BNIP3, Bim, Bad, Bid) τα οποία διαθέτουν μόνο την αλληλουχία BH3 που είναι απαραίτητη για τη λειτουργία τους(66).

Πολλά μέλη της οικογένειας Bcl-2 μπορούν να σχετίζονται με άλλα μέλη, σχηματίζοντας ένα πολύπλοκο δίκτυο από ομο-ή ετεροδιμερή με αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αλληλουχιών τους. Η Bcl-2 σχηματίζει ομοδιμερή ή ετεροδιμερή με τις

Bax, Bcl-xl, Bcl-xs, Mcl-1 και Bad. Η αναλογία προ-αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών διμερών καθορίζει την αντίσταση του κυττάρου στην απόπτωση, αν και η απόλυτη λειτουργική σημασία αυτών των συμπλεγμάτων δεν έχει ακόμα πλήρως διερευνηθεί. Πρόσφατες μελέτες καταδεικνύουν ότι ο βαθμός προστασίας από την απόπτωση καθορίζεται μάλλον από το ποσό της ελεύθερης Bcl-2 και όχι από τα ετεροδιμερή Bcl-2- Bax, όπως πιστεύαμε μέχρι πρόσφατα.

Η λειτουργία της Bcl-2 επηρεάζεται από τη φωσφορυλίωση και από τη δράση των κασπασών (αδρανοποίηση Bcl-2). Με τη σειρά της η έκφραση Bcl-2 αναστέλλει, τουλάχιστον εν μέρει, την αποπτωτική οδό Fas-FasL(57).

Έκφραση Bcl-2 έχει περιγραφεί σε μία πληθώρα κυττάρων του αιμοποιητικού συστήματος, σε μη-νεοπλασματικά επιθήλια (ορμονοεξαρτώμενα και μη) καθώς και σε νεοπλασίες μεσεγγυματικής προέλευσης. Αν και η πλειοψηφία των επιθηλιακών κυττάρων που εκφράζουν Bcl-2 βρίσκεται σε ζώνες υπερπλασίας, η Bcl-2 σχετίζεται επίσης με τη διαφοροποίηση και μορφογένεση αρχέγονων κυττάρων. Το πλεονέκτημα επιβίωσης που παρέχει το γονίδιο bcl-2, επιτρέπει στα επιθηλιακά αρχέγονα κύτταρα να πολλαπλασιαστούν και να διαφοροποιηθούν(67).

Εκτός της λευχαιμίας από B-κύτταρα και των μη-Hodgkin θυλακικών λεμφωμάτων, υψηλή έκφραση Bcl-2 έχει περιγραφεί σε πολλές λεμφουπερπλαστικές διαταραχές(68-71), σε μελανοκυτταρικά νεοπλάσματα(72), σε επιθηλιακά νεοπλάσματα όπως το μικροκυτταρικό και το μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα(73;74), στα ρινοφαρυγγικά καρκινώματα σε έδαφος ιού Epstein-Barr, στον καρκίνο του μαστού και του προστάτη(75).

Φυσιολογικοί ιστοί ενηλίκων επίσης εκφράζουν Bcl-2, όπως τα επιθήλια των εξωκρινών αδένων, τα κύτταρα των εντερικών κρυπτών, τα κύτταρα της βασικής στιβάδας του δέρματος, τα ορμονοεξαρτώμενα επιθηλιακά κύτταρα στο ενδομήτριο, τον προστάτη και το μαστό. Στο εμβρυϊκό δέρμα υψηλά επίπεδα Bcl-2 ανευρίσκονται γύρω από τον εμβρυϊκό τριχικό θύλακο.

Στο φυσιολογικό δέρμα η κατανομή Bcl-2 περιλαμβάνει τα κερατινοκύτταρα της βασικής στιβάδας της επιδερμίδας, των θηλαίων καταδύσεων γύρω από τους τριχοφόρους θυλάκους, τις κερατινοποιημένες στιβάδες των Huxley και Henle και τα κύτταρα του ισθμού και του βολβού της τρίχας. Επιπλέον έντονη χρώση Bcl-2 παρατηρείται στους εκκρινείς ιδρωτοποιούς αδένες(76).

(3) Επιφανειακοί (Μεμβρανικοί) Υποδοχείς Κυτταρικού Θανάτου

α) Γενικά περί των επιφανειακών υποδοχέων

Τα κύτταρα έχουν ανάγκη από ενδοκυττάριους αλλά και εξωκυττάριους ρυθμιστικούς μηχανισμούς ενεργοποίησης των κασπασών και του θανάτου. Οι επιφανειακοί ή μεμβρανικοί υποδοχείς κυτταρικού θανάτου μεταδίδουν αποπτωτικά σήματα ως απάντηση σε εξωτερικά ερεθίσματα. Τέτοια ερεθίσματα αποτελούν η αλληλεπίδραση με τον αντίστοιχο «σύνδεσμο θανάτου», η ένδεια αυξητικών παραγόντων ή η επίδραση χημειοθεραπευτικών ουσιών. Οι μεμβρανικοί υποδοχείς θανάτου ανήκουν στην οικογένεια TNF(tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor family). Όλα τα μέλη της οικογένειας έχουν μια πλούσια σε κυστεΐνη εξωκυττάρια αλληλουχία και μία ενδοκυττάρια "αλληλουχία θανάτου" που μεταδίδει το αποπτωτικό σήμα(57;77) (Σχήμα 2). Οι υποδοχείς αυτοί μπορούν να προκαλέσουν αποπτωτικό θάνατο μέσα σε λίγες ώρες από τη σύνδεσή τους με τον αντίστοιχο σύνδεσμο, ανάλογα πάντα με τον τύπο του κυττάρου και την κατάσταση ενεργοποίησης στην οποία βρίσκεται.

Το πιο γνωστό ζευγάρι υποδοχέα-συνδέσμου στην κατηγορία αυτή είναι οι Fas-FasL, στους οποίους θα αναφερθούμε με λεπτομέρεια στη συνέχεια. Άλλοι υποδοχείς θανάτου είναι οι TNFR1, TNFR2, p75NTR, DR3, DR4 και DR5(57). Επιπλέον έχουν ανευρεθεί σε φυσιολογικούς ιστούς και οι παρεμφερείς υποδοχείς DcR1 και DcR2, οι οποίοι όμως δε μεταδίδουν αποπτωτικά μηνύματα. Σύνδεσμος των υποδοχέων αυτών θεωρείται ο TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand, APO2-L), ο οποίος αποτελεί ακόμη αντικείμενο μελέτης, καθώς φαίνεται να προκαλεί απόπτωση μόνο σε κυτταρικές σειρές κακοήθων κυττάρων και όχι σε σειρές φυσιολογικών κυττάρων(78).

β) Επιφανειακοί υποδοχείς Fas-FasL

Καθώς η μελέτη μας επικεντρώνεται στους υποδοχείς Fas-FasL, θα αναφερθούμε με λεπτομέρεια στο ζευγάρι αυτό υποδοχέα-συνδέσμου και στο ρόλο του για τα κύτταρα και τους ιστούς του ανθρώπινου οργανισμού.

Η πρωτεΐνη Fas (APO-1, CD95) είναι μία τύπου I διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη βάρους 45 kd, η οποία ανήκει στην οικογένεια των TNFR (tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor family) και λειτουργεί ως υποδοχέας κυτταροκινών. Υφίσταται επίσης στη διαλυτή μορφή των 40-42kd, σε τέσσερις ισομορφές (εναλλακτικές διασπάσεις mRNA). Το γονίδιο για την πρωτεΐνη Fas

εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 10 (q23)(79;80). Το καρβοξυτελικό άκρο του Fas συνδέεται με το καρβοξυτελικό άκρο του συμπλέγματος πρωτεϊνών DISC (death initiating signalling complex) που ονομάζεται FADD . Το αμινοτελικό άκρο του FADD συνδέεται ακολούθως ενδοκυττάρια με το αμινοτελικό άκρο του FLICE (fas-activated protein like ICE) και ενεργοποιεί την αλληλουχία των κασπασών(81;82).

Ο σύνδεσμος της πρωτεΐνης Fas (Fas ligand, FasL) είναι μία τύπου II διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη βάρους 40kd που ανήκει στην οικογένεια TNF. Υπάρχει επίσης διαλυτή μορφή sFasL (πρωτεΐνη 26kd), η οποία απελευθερώνεται μετά από δράση μεταλλοπρωτεϊνών και υφίσταται με τη μορφή τριμερούς, όπως ο TNFα. Το γονίδιο για την πρωτεΐνη FasL εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 1(q23)(77).

γ) Έκφραση Fas-FasL στους ιστούς του ανθρώπινου οργανισμού

Ο υποδοχέας Fas εκφράζεται ευρέως από μία πληθώρα κυττάρων του αιμοποιητικού συστήματος, όπως τα ενεργοποιημένα B- και T-λεμφοκύτταρα, τα ενεργοποιημένα κύτταρα φυσικοί δολοφόνοι (NK) και τα μυελοειδή κύτταρα. Επίσης εκφράζεται από μία ποικιλία επιθηλιακών κυττάρων, από τους ινοβλάστες, από μολυσμένα με ιούς κύτταρα (με EBV, HIV, HTLV-1) καθώς και από καλά διαφοροποιημένα κύτταρα στο θύμο, το ήπαρ, τις ωοθήκες, τον πνεύμονα και την καρδιά(83;84).

Ο υποδοχέας Fas ανιχνεύεται σε όλες τις υποκατηγορίες T- λεμφοκυττάρων και κυρίως στα CD45RO+ T-λεμφοκύτταρα. Σημειώνεται ότι μόνο μία μειοψηφία μη-ενεργοποιημένων (σε «ηρεμία») B- και T-λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος εκφράζουν την πρωτεΐνη Fas. Τα μονοκύτταρα και τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα εκφράζουν Fas ακόμα και σε κατάσταση ηρεμίας(85).

Ο σύνδεσμος FasL εκφράζεται από ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα και NK κύτταρα, ενεργοποιημένα B-κύτταρα, μακροφάγα και ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα(86;87). Δεν εκφράζεται από CD45RA+ ή CD45RO+ λεμφοκύτταρα που βρίσκονται σε ηρεμία. Ανευρίσκεται κυρίως σε Th1 κλώνους (λιγότερο σε Th0 και σε λίγα Th2)(88). Όργανα που τα κύτταρά τους εκφράζουν FasL είναι οι όρχεις (κύτταρα Sertoli, κύτταρα Leydig, κύτταρα γονάδων), ο οφθαλμός (κύτταρα προσθίου θαλάμου και αμφιβληστροειδούς), ο σπλήνας και ο θύμος αδένας(83).

Παθολογικά κύτταρα που εκφράζουν FasL είναι τα νεοπλασματικά κύτταρα σε λεμφώματα από NK κύτταρα και στη λεμφοκυτταρική λευχαιμία κοκκώδους σειράς από T- ή NK-κύτταρα(89). Στα συμπαγή νεοπλασμάτα έχει ανιχνευθεί στον καρκίνο του ορθού, στο μελάνωμα, στο αστροκύτωμα και στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα.

Υπάρχουν ενδείξεις για έκφραση του FasL στο κεντρικό νευρικό σύστημα, τον προστάτη, τα επινεφρίδια, στον καρκίνο της ωοθήκης, του παγκρέατος και στα καρκινώματα από πλακώδη κύτταρα της κεφαλής και του τραχήλου(47;90-92).

δ) Λειτουργία Fas-FasL

Η πρωτεΐνη Fas εμπλέκεται στη διατήρηση της ομοιόστασης των πληθυσμών των T- και B- λεμφοκυττάρων με τους ακόλουθους μηχανισμούς(93) :

- 1) Προκαλεί αποπτωτικό θάνατο μέσω των κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων.
- 2) Μειώνει τον αριθμό των περιφερικών αντιδραστικών T-λεμφοκυττάρων μετά το τέλος της ανοσολογικής αντίδρασης, εξασφαλίζοντας την περιφερική αυτοανοχή (self-tolerance)(94).
- 3) Εξουδετερώνει τα μη-φυσιολογικά ενεργοποιημένα B-κύτταρα(85).
- 4) Λειτουργεί ως υποδοχέας κυτταροκινών, επηρεάζοντας την αύξηση, τη διαφοροποίηση και το θάνατο των κυττάρων(95;96).

Η διαλυτή πρωτεΐνη sFas μπορεί να ανταγωνίζεται τη δράση της μεμβρανικής πρωτεΐνης Fas. Διέγερση με ιντερφερόνη-γ (INF-γ) και ιντερλευκίνη-2 (IL-2) αυξάνουν την έκφραση Fas(97). Αξίζει να σημειωθεί ότι η ενεργοποίηση του υποδοχέα Fas επιφέρει αντίθετα αποτελέσματα ανάλογα με την κατάσταση στην οποία βρίσκεται το κύτταρο, δηλαδή αποτελεί είτε “σήμα” για αποπτωτικό θάνατο σε ευαισθητοποιημένο κύτταρο, είτε “σήμα” για ενεργοποίηση και πολλαπλασιασμό. Η απόπτωση τέλος των T-κυττάρων στο θύμο αδένα φαίνεται να γίνεται με τρόπο ανεξάρτητο των υποδοχέων Fas και FasL(57).

Η πρωτεΐνη FasL:

- 1) Ενεργοποιεί τη διαδικασία της απόπτωσης μετά από σύνδεση με τον υποδοχέα Fas(85).
- 2) Επικουρεί τη διατήρηση ανοσολογικών «πλεονεκτημάτων» σε ειδικές ανατομικές περιοχές (οφθαλμοί, εγκέφαλος, όρχεις), προστατεύοντας από τη διείσδυση φλεγμονωδών κυττάρων ή επιμολυσμένων κυττάρων(98).
- 3) Διευκολύνει την ανοσοδιαφυγή σε ορισμένους όγκους, όπως το μελάνωμα, το οστεοσάρκωμα, το μη-μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα, ο καρκίνος του μαστού, του ορθού, του νεφρού, και οι όγκοι κεφαλής/τραχήλου(47;91).
- 4) Προλαμβάνει την απόρριψη μοσχευμάτων(99).

Ταυτόχρονη έκφραση των Fas και FasL έχει παρατηρηθεί σε ιστούς με γρήγορη ανανέωση κυττάρων, όπως ο προστάτης, η μήτρα, το έντερο, ο σπλήνας και ο θύμος αδένας(83).

ε) Συσχέτιση Fas - FasL με άλλα μόρια

Η πρωτεΐνη FAP-1 (tyrosine phosphatase **Fas Associated Protein-1**) είναι μία ενδοκυττάρια πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με το καρβοξυτελικό άκρο του Fas και δρα ως «αρνητικός ρυθμιστής» της απόπτωσης. Υπερέκφραση της FAP-1 προκαλεί αναστολή της απόπτωσης μέσω Fas(100).

Το πρωτοογκογονίδιο bcl-2 δύναται, έστω και μερικώς, να αναστείλει την αποπτωτική διαδικασία μέσω Fas-FasL. Άλλα μόρια, των οποίων η δράση ακόμα ερευνάται είναι η αντιαποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-xl, το γονίδιο p53, το προσκολλητικό μόριο ICAM-1 και οι υποδοχείς CD40/CD40L(57).

στ) Αντίσταση στην απόπτωση μέσω Fas

Με τον όρο “αντίσταση” χαρακτηρίζουμε την αδυναμία εξέλιξης της διαδικασίας της απόπτωσης προς το θάνατο του κυττάρου, παρά την ενεργοποίηση του μηχανισμού του κυτταρικού θανάτου με τη σύνδεση Fas-FasL. Η αντίσταση μπορεί να οφείλεται σε “προσυναπτικά” αίτια (παράγοντες που επιδρούν πριν τη σύνδεση των υποδοχέων) ή “μετασυναπτικά” αίτια (επίδραση ενδοκυτταρίων παραγόντων, παρά τη σύνδεση Fas-FasL στο επίπεδο της κυτταρικής μεμβράνης). Πέραν των αιτίων αυτών, στη βιβλιογραφία αναφέρονται τόσο αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυτταροτοξικών φαρμάκων και μεμβρανικών υποδοχέων απόπτωσης, όσο και κατάργηση των κλασικών αποπτωτικών οδών σε ιδιαίτερα επιθετικά νεοπλάσματα(101-103).

α) Προσυναπτικά αίτια αντίστασης: ο διαλυτός Fas (sFas) ανταγωνίζεται το μεμβρανικό Fas στη σύνδεση με τον FasL και με τα αντισώματα κατά του Fas.

β) Μετασυναπτικά αίτια αντίστασης: σε ενδοκυττάριο επίπεδο τα μόρια FAP-1, bcl-2 και bcl-xl μπορούν να αναστείλλουν, τουλάχιστον μερικώς, την απόπτωση. Επίσης, κύτταρα που εκφράζουν ενδοκυτταρίους αναστολείς πρωτεασών (π.χ. αναστολείς πρωτεασών σερίνης, serine protease inhibitors) μπορούν να διαφύγουν του αποπτωτικού θανάτου από κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα ή κύτταρα φυσικούς δολοφόνους(NK). Διαταραχές στις κινάσες PITSLRE, έχουν ως αποτέλεσμα αντίσταση στην απόπτωση μέσω Fas(104;105).

γ) Η αυξημένη έκφραση FasL στη μεμβράνη των νεοπλασματικών κυττάρων μπορεί να οδηγήσει σε αντίσταση του όγκου στα κυτταροτοξικά φάρμακα. Παράδειγμα αποτελούν η δοξορουμπικίνη και η μπλεομυκίνη, οι οποίες διεγείρουν την έκφραση FasL σε Fas-αρνητικούς όγκους, επικουρώντας τοιούτοτρόπως την ανοσοδιαφυγή

του όγκου: τα καρκινικά κύτταρα που είναι Fas (-) / FasL(+) επιτίθενται και σκοτώνουν τα διεγερμένα φυσιολογικά Fas (+) / FasL(+) T-λεμφοκύτταρα που διηθούν τον όγκο.

δ) Σε ιδιαίτερα επιθετικά νεοπλάσματα οι κλασσικές αποπτωτικές οδοί, συμπεριλαμβανομένης και της οδού Fas-FasL, παρουσιάζονται αδρανοποιημένες.

Πιθανότατα στο μέλλον οι αντικαρκινικές θεραπείες να στοχεύουν στην παραγωγή κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων, τα οποία να φέρουν στην επιφάνειά τους υποδοχείς Fas, FasL, περφορίνη και μεμβρανικό TNF, ώστε να μην εξουδετερώνονται από νεοπλασματικά κύτταρα που παράγουν FasL(106).

ζ) Μέθοδοι ανίχνευσης Fas και FasL

Για την ανίχνευση των υποδοχέων Fas και FasL σε κύτταρα και ιστούς μπορούν να χρησιμοποιηθούν ανοσοιστοχημικές μέθοδοι, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCP, RT-PCR), Southern blot analysis και η κυτταρομετρία ροής (FACS analysis)(107).

η) Έκφραση Fas και FasL στο δέρμα

Στο φυσιολογικό δέρμα

Με βάση τα αποτελέσματα των ερευνών των τελευταίων ετών, οι μηχανισμοί της απόπτωσης στο δέρμα φαίνεται να παίζουν ουσιαστικό ρόλο στην κυκλική ανανέωση των επιδερμικών κυττάρων, στη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων και στον κύκλο της τρίχας(108).

Στη φυσιολογική επιδερμίδα διακρίνονται ανοσοιστοχημικά δύο μορφολογικοί τύποι έκφρασης της πρωτεΐνης Fas: α) ένας ενδοκυττάριος και β) ένας εστιακός μεμβρανικός, συχνότερος στις περιπτώσεις που υπάρχουν πυκνά λεμφοκυτταρικά διηθήματα στο χόριο(109;110). Κατά ανάλογο τρόπο, ενδοκυττάρια ή μεμβρανικά, εκφράζεται σε ανοσοιστοχημικές τομές της επιδερμίδας και ο FasL(111).

Στους πίνακες 5 και 6 αναγράφονται αντίστοιχα η έκφραση του υποδοχέα Fas και του FasL στο φυσιολογικό δέρμα(112;113). Επίσης, συγκριτικά δίνεται στον πίνακα 7 η έκφραση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 στο φυσιολογικό δέρμα.

Η έκφραση του υποδοχέα Fas στη φυσιολογική επιδερμίδα μειώνεται καθώς προχωρούμε από τη βασική στιβάδα προς την κερατίνη και τελικά σχεδόν εξαφανίζεται μετά την κοκκώδη στιβάδα. Η έκφραση Fas είναι εντονότερη και διάχυτη σε όλο το πάχος της επιδερμίδας σε χρονίως ηλιοεκτεθειμένες περιοχές του

Πίνακας 5. Έκφραση Fas στο φυσιολογικό δέρμα

κερατινοκύτταρα, ιδιαίτερα πλησίον της βασικής μεμβράνης
 επιδερμικά δενδριτικά κύτταρα
 λεμφοκύτταρα που διηθούν το χόριο
 ινοβλάστες
 αποκρινείς αδένες
 εκκρινείς ιδρωτοποιοί αδένες
 σμηγματογόνοι αδένες
 ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων
 θύλακοι των τριχών
 λίγα φυσιολογικά μελανοκύτταρα
 (στην πλειοψηφία τους τα μελανοκύτταρα ανευρίσκονται αρνητικά για Fas)

Σημειώνεται ότι τον υποδοχέα Fas δεν εκφράζουν τα νευρικά κύτταρα του δέρματος και τα λιποκύτταρα

Πίνακας 6. Έκφραση FasL στο φυσιολογικό δέρμα

Κερατινοκύτταρα (αρκετά σε ηλιοεκτεθειμένες περιοχές)
 Σμηγματογόνοι αδένες
 Ιδρωτοποιοί αδένες

Πίνακας 7. Έκφραση Bcl-2 στο φυσιολογικό δέρμα

Διάσπαρτα κύτταρα βασικής στιβάδας επιδερμίδας
 Εκκρινείς ιδρωτοποιοί αδένες
 Αποκρινείς αδένες
 Σμηγματογόνοι αδένες

σώματος(114). Σημειώνεται ότι τον υποδοχέα Fas δεν εκφράζουν τα νευρικά κύτταρα του δέρματος και τα λιποκύτταρα(112).

Στα φυσιολογικά κερατινοκύτταρα ο υποδοχέας Fas εκφράζεται μαζί με το προσκολλητικό μόριο ICAM-1 και μάλιστα η έκφρασή του ενισχύεται μετά από επώαση με ιντερφερόνη- γ (INF- γ) ή ιντερλευκίνη-2 (IL-2) για 24 ώρες(97). Το μόριο ICAM-1 εκφράζεται από τα φυσιολογικά επιδερμικά κερατινοκύτταρα μετά από έκθεση σε κυτταροκίνες μονοκυττάρων, και βοηθά στη σταθερότερη σύνδεση του κυττάρου στόχου με το κυτταροτοξικό T-λεμφοκύτταρο(115). Η ικανότητα παραγωγής Fas και granzyme B-περφορίνης από τα κερατινοκύτταρα ενισχύει το αμυντικό σύστημα της επιδερμίδας απέναντι σε μικρόβια και ιούς(116). Επίσης, οι κυτταροτοξικές αντιδράσεις μέσω Fas και granzymeB-περφορίνης θεωρούνται σημαντικές για τις αντιδράσεις υπερευαισθησίας μέσω CD8(+)T-λεμφοκυττάρων(117).

Ο υποδοχέας FasL έχει ανιχνευθεί σε αρκετά φυσιολογικά κερατινοκύτταρα, ταυτόχρονα με την παρουσία του υποδοχέα Fas, με τη μεθοδο της RT-PCR (118). Το εκ πρώτης όψεως παράδοξο αυτό γεγονός φαίνεται να έχει τη φυσιολογική σημασία του, που είναι η διευκόλυνση της ανανέωσης των κυττάρων της επιδερμίδας. Εκκρίνοντας επιπλέον διαλυτό υποδοχέα Fas (sFas) τα φυσιολογικά κερατινοκύτταρα μπορούν να αποφύγουν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο υποδοχέας FasL εκφράζεται κυρίως στο ηλιοεκτεθειμένο δέρμα(111).

Σε φλεγμονώδεις δερματοπάθειες

Ανοσοιστοχημικές μελέτες του Sayama και των συνεργατών του(97) έδειξαν έντονη έκφραση Fas στα κερατινοκύτταρα της βεβλαμμένης επιδερμίδας σε μία σειρά από νοσήματα με διαφορετικούς παθογενετικούς μηχανισμούς, όπως φαίνεται στον Πίνακα 8.

Στον ομαλό λειχήνα και στις λειχηνοειδείς αντιδράσεις τα γνωστά "κολλοειδή σωμάτια" ή σωμάτια του Civatte, είναι αποπτωτικά κερατινοκύτταρα. Τα κερατινοκύτταρα αυτά που φέρανε στην επιφανειά τους τον υποδοχέα Fas, εξουδετερώθηκαν από κυτταροτοξικά FasL(+)T-λεμφοκύτταρα με αλληλεπίδραση Fas-FasL ή μέσω της οδού περφορίνης-granzyme B.

Σε βλάβες δερματικού λύκου, ο υποδοχέας Fas εκφράζεται από λεμφοκύτταρα και κερατινοκύτταρα. Ο FasL εκφράζεται από μέρος των CD4(+) λεμφοκυττάρων που διηθούν το χόριο και από ιστιοκύτταρα. Τα τελευταία μετά από χρώση διαπιστώνεται ότι είναι CD68(+) μακροφάγα, τα οποία διηθούν και

Πίνακας 8. Ανίχνευση Fas σε φλεγμονώδεις δερματοπάθειες

Ομαλός λειχήνας και λειχηνοειδείς βλάβες του ερυθρηματώδους
λύκου

Λειχηνοειδή φαρμακευτικά εξανθήματα

Χρόνιο έκζεμα και ατοπική δερματίτιδα

Αλλεργική δερματίτιδα εξ επαφής

Πολύμορφο ερύθημα

Έρπηης ζωστήρας

Πέμφιγα και πομφολυγώδες πεμφιγοειδές (ασθενέστερη χρώση)

Ψωρίαση

καταστρέφουν εξαρτήματα όπως οι θύλακοι των τριχών, τα κύτταρα των οποίων είναι Fas(+) (119).

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε με ανοσοιστοχημικές μεθόδους και χρήση της ανάλυσης κυτταρομετρίας ροής πάνω σε ψωριασικά κερατινοκύτταρα, βρέθηκε ότι αυτά εκφράζουν υψηλότερα επίπεδα Fas (διάχυτα και όχι μόνο ως το ύψος της κοκκώδους στιβάδας) και Bcl-x, σε σχέση με τα κερατινοκύτταρα του φυσιολογικού επιθηλίου. Η υπερέκφραση του αντι-αποπτωτικού γονιδίου Bcl-x στην ψωρίαση πιθανόν να συνεισφέρει στη μακροβιότητα των κυττάρων αυτών, αναστέλλοντας την αποπτωτική διαδικασία και τη διαφοροποίηση των επιδερμικών κερατινοκυττάρων(120). Η έντονη έκφραση Fas μπορεί να είναι και αποτέλεσμα διέγερσης από έκκριση κυτταροκινών. Την έντονη έκφραση Fas από τα ψωριασικά κερατινοκύτταρα, εκμεταλλεύεται η φωτοθεραπεία με υπεριώδη ακτινοβολία Α (UVA), για την εξουδετέρωση των λεμφοκυτταρικών διηθημάτων σε χρόνιες φλεγμονώδεις δερματοπάθειες. Η έκθεση στη UVA διεγείρει την παραγωγή FasL στα κερατινοκύτταρα, ενώ ταυτόχρονα καταστέλλεται η δράση των αντιγονο-παρουσιαστικών κυττάρων(121).

Στη γενικευμένη φλυκταινώδη ψωρίαση η παρουσία διαλυτού sFas, TNF-α και ιντερλευκίνης-6 (IL-6) θεωρείται υπεύθυνη για τα φλεγμονώδη φαινόμενα και τη βαρειά γενική κατάσταση των ασθενών(122).

Κατά παρόμοιο τρόπο με τη φλυκταινώδη ψωρίαση, έχει παρατηρηθεί συμμετοχή της αποπτωτικής οδού Fas-FasL στην τοξική επιδερμική νεκρόλυση (TEN). Έχει δημοσιευθεί αναστολή της εξέλιξης της TEN μετά από ενδοφλέβια χορήγηση ανθρώπινης υπεράνοσης γ-σφαιρίνης, λόγω δέσμευσης του υποδοχέα FasL από την υπεράνοση γ-σφαιρίνη. Οι ασθενείς με TEN βρέθηκε ότι εκκρίνουν FasL, ο οποίος αλληλεπιδρά με τον Fas που εκφράζουν φυσιολογικά τα κερατινοκύτταρα, με αποτέλεσμα τη λύση της επιδερμίδας(123).

Στην κατηγορία των φλεγμονωδών δερματοπαθειών θα συμπεριλάβουμε και το ηλιακό έγκαυμα. Όπως γνωρίζουμε, κύτταρα με βλάβη στο γενετικό τους υλικό έχουν τη δυνατότητα να επιδιορθώσουν τη βλάβη ή να απομακρυνθούν μέσω ελεγκτικών ομοιοστατικών μηχανισμών. Η απομάκρυνση κυττάρων με βεβλαμμένο γενετικό υλικό μετά από την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας, μπορεί να γίνει μέσω του σχηματισμού των λεγομένων "κυττάρων εγκαύματος" (αποπτωτικών κερατινοκυττάρων). Ο σχηματισμός των "κυττάρων εγκαύματος" είναι θεμελιώδης για την εξουδετέρωση προκαρκινωματοδών βλαβών στην επιδερμίδα και εξαρτάται από την παρουσία FasL, του οποίου η παραγωγή από τα κερατινοκύτταρα διεγείρεται με την έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία. Η αξία της παραγωγής FasL από τα

κερατινοκύτταρα αποδεικνύεται πειραματικά από την παρατήρηση ότι χρόνια έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία ποντικών με έλλειψη του γονιδίου που κωδικοποιεί την έκφραση FasL, οδήγησε το 70% αυτών σε άθροιση πολλαπλών μεταλλάξεων του επανορθωτικού γονιδίου p53(111;124;125). Η ανοσολογική ανοχή μετά από τη δράση υπεριώδους ακτινοβολίας διαμεσολαβείται από το σύστημα Fas-FasL. Καταστέλλεται η δράση των αντιγόνο-παρουσιαστικών κυττάρων και εγκαθίσταται ανοχή στην ανάπτυξη καρκινωμάτων βλαβών(126).

Η αλληλεπίδραση μεταξύ κερατινοκυττάρων και Τ-λεμφοκυττάρων μέσω Fas-FasL ρυθμίζεται από κυτταροκίνες. Κυτταροκίνες που αυξάνουν τόσο τον ενδοκυττάριο όσο και τον μεμβρανικό FasL είναι η ιντερλευκίνη-1β (IL-1 β), η ιντερφερόνη-γ (INF- γ), η ιντερλευκίνη-15 (IL-15) και ο TNF-α(127).

Κλείνοντας την αναφορά μας στις φλεγμονώδεις δερματοπάθειες θα λέγαμε ότι, παρά τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα των ερευνών των τελευταίων ετών πάνω στον υποδοχέα Fas, παραμένουν ακόμα πολλά ερωτήματα για το ρόλο και τη λειτουργία του. Για παράδειγμα, ένα πιθανό ερώτημα θα ήταν εάν ο Fas που εκφράζεται από τη φυσιολογική επιδερμίδα είναι “λειτουργικός” ή ενεργοποιείται μετά από την επίδραση της ιντερφερόνης-γ. Επίσης ένα εύλογο ερώτημα θα ήταν εάν η έντονη έκφραση Fas σχετίζεται με τη λεμφοκυτταρική διήθηση ή με την απόπτωση που παρατηρείται στα χρόνια φλεγμονώδη νοσήματα.

Στους επιθηλιακούς όγκους του δέρματος

Ο υποδοχέας Fas εκφράζεται διάχυτα στους ινοβλάστες του δερματοινώματος. Σε μελέτες πάνω στα βασικοκυτταρικά καρκινώματα (BKK) δεν ανιχνεύθηκε έκφραση Fas(112). Αντιθέτως, σε πρόσφατη έρευνα διαπιστώθηκε ότι τα BKK μπορούν εκφράζουν FasL (128).

Στα ακανθοκυτταρικά καρκινώματα (ΑΚΚ) ανιχνεύθηκε τόσο FasL όσο και Fas, σε ποικίλη μάλιστα ένταση. Η έκφραση Fas ήταν ιδιαίτερα έντονη στην περιφέρεια των όγκων και μάλιστα σε περιοχές κοντά σε μονοκυτταρικά λεμφοκυτταρικά διηθήματα (πιθανόν λόγω διέγερσης από την παραγώμενη ιντερφερόνη -γ)(128).

Στους μελαγχρωματικούς όγκους του δέρματος

Στις υπάρχουσες μελέτες σε μελαγχρωματικούς όγκους του δέρματος αναφέρεται επιφανειακή χρώση Fas σε χοριακούς σπιλοκυτταρικούς σπίλους και σε φωλιές σπιλοκυττάρων στους μικτούς κυτταρικούς σπίλους, ιδιαίτερα πλησίον του δερμοεπιδερμικού ορίου. Θετικοί για Fas ανευρίσκονται και οι σπίλοι του

Spitz(129). Αντίθετα, όπως άλλωστε σημειώνεται και στην αναφορά μας για το φυσιολογικό δέρμα, η πλειοψηφία των μελανοκυττάρων του δέρματος δεν εκφράζει Fas.

Στους κοινούς σπίλους και ιδιαίτερα τους χοριακούς, η αποπτωτική δραστηριότητα είναι συχνά σημαντική, ενώ είναι μέτρια στους σπίλους του Spitz. Κύτταρα θετικά για FasL μπορούν να παρατηρηθούν σε μικρούς αριθμούς τόσο στους κοινούς σπίλους όσο και στους σπίλους του Spitz(129).

Στα κακοήθη μελανώματα του δέρματος, ο υποδοχέας Fas ανιχνεύθηκε ασθενώς σε λιγότερα από τα μισά μελανώματα που έχουν μελετηθεί, και μάλιστα κυρίως σε επιπολής εξαπλούμενα μελανώματα. Σε μελέτη του M.Hahne παρουσιάστηκε για πρώτη φορά έντονη έκφραση FasL από σημαντικό αριθμό κυττάρων κακοήθων μελανωμάτων(91). Ο FasL εκφραζόταν κυρίως στην περιφέρεια των βλαβών, σε μελανώματα με ικανό πάχος βλάβης και σε μεταστατικές βλάβες μελανώματος. Στις τελευταίες, διηθήματα από Fas (+) διεγερμένα T-λεμφοκύτταρα ανιχνεύθηκαν πλησίον σε FasL (+) νεοπλασματικά κύτταρα(130), υπονοώντας ίσως κάποιο πιθανό ρόλο στην ανοσοδιαφυγή του όγκου. Παρόλα ταύτα, καθώς η αποπτωτική δραστηριότητα είναι ελάχιστη στα κακοήθη μελανώματα, η έκφραση FasL πιθανόν να είναι δείκτης προχωρημένου σταδίου της νόσου παρά τρόπου διαφυγής(131).

Σε άλλους όγκους του δέρματος

Η αποπτωτική οδός Fas-FasL δε φαίνεται να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην παθοφυσιολογία ή τη βιολογική συμπεριφορά του σαρκώματος Karosi. Επανελλιημένες ανοσοιστοχημικές χρώσεις βλαβών βρέθηκαν αρνητικές τόσο για Fas όσο και για FasL(132).

6) Σημασία της Απόπτωσης σε Κακοήθεις Δερματοπάθειες

α) Βασικοκυτταρικό Καρκίνωμα

Το δέρμα εκτίθεται σταθερά στην ηλιακή ακτινοβολία και συχνά αναπτύσσει δερματικούς όγκους, όπως είναι τα Βασικοκυτταρικά Καρκινώματα (ΒΚΚ)(133). Οι όγκοι αυτοί αυξάνονται με πολύ αργούς ρυθμούς, διαφεύγουν για μεγάλο διάστημα της προσοχής των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος και εν τέλει διηθούν το χόριο(134). Τα ΒΚΚ αποτελούν μέρος της παρούσας μελέτης και για το λόγο αυτό

Πίνακας 9. Σύμφωνα με την Ιστοπαθολογία Δέρματος του Lever υπάρχουν πολλοί ιστολογικοί τύποι βασικοκυτταρικού καρκινώματος

ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΥΠΟΣ	ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ
Επιπολής εξαπλούμενο	Μικρές αθροίσεις από πασαλοειδή νεοπλασματικά κύτταρα που εκτείνονται παράλληλα προς τον επιμήκη άξονα της επιδερμίδας.
Οζώδες ή συμπαγές	Συμπαγή νησίδια από πασαλοειδή νεοπλασματικά κύτταρα που εκτείνονται ενδοφυτικά στο δικτυωτό χόριο.
Κυστικό	Όπως το οζώδες, με επιπλέον κυστικούς χώρους μεταξύ των νεοπλασματικών οζιδίων (νέκρωση ή παραγωγή βλέννης).
Αδενοειδές	Όπως το οζώδες, με δικτυωτό πρότυπο, συχνά αρκετή βλέννη. Μπορεί να προσομοιάζει σε αδενοειδή σχηματισμό.
Υπερκερατωσικό	Όπως το οζώδες με κεντρικά σφαίρες κερατίνης - μπορεί να μιμείται το τριχοεπιθηλίωμα.
Σκληρυντικό (τύπου μορφέας)	Λεπτές ταινίες διηθητικών πασαλοειδών κυττάρων μέσα σε ινώδες στρώμα.
Διηθητικό	Στοιχεία οζώδους και σκληρυντικού ΒΚΚ.
Μετατυπικό	Συνδυασμός στοιχείων ΒΚΚ και ακανθοκυτταρικού καρκινώματος.
Μελαγχρωματικό	Μελανίνη και μελανοκύτταρα ανευρίσκονται μέσα στον όγκο.
Εκκρινές επιθηλίωμα	Όπως το οζώδες, με εστίες διαφοροποίησης σε ιδρωτοποιούς αδένες.
Σμηγματογόνο επιθηλίωμα	Όπως το οζώδες, με εστίες διαφοροποίησης σε σμηγματογόνους αδένες.
Ινοεπιθηλίωμα του Pinkus	

(Lever WF, Schaumburg-Lever G: Histopathology of the Skin. Philadelphia, PA, Lippincott, 1990, pp622-634).

θα αναφέρουμε εν συντομία σε λίγα κλινικά και στατιστικά στοιχεία, καθώς και σε στοιχεία σχετικά με την πιθανή παθοφυσιολογία των όγκων αυτών .

Τα ΒΚΚ του δέρματος αποτελούν τη συχνότερη ανθρωπίνη κακοήθεια με περίπου 450.000 νέα περιστατικά το χρόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες(135). Το ΒΚΚ ανευρίσκεται σε δέρμα που φέρει τριχοφόρους θυλάκους και ιδιαίτερα στο πρόσωπο. Κλινικά το τυπικό ΒΚΚ εμφανίζεται σα μία ζελατινώδης ή κηρώδης βλατίδα, σαφώς αφοριζόμενη, με λεπτά αγγεία κάτω από την επιφάνεια. Η βλατίδα μεγενθύνεται βραδέως και σχηματίζει ογκίδιο σπιλπνό με κεντρικό εντύπωμα, εφελκίδα ή διάβρωση. Έχουν περιγραφεί πολλές κλινικές ποικιλίες ΒΚΚ όπως: οζώδες-ελκωτικό, επιπολής εξαπλούμενο, μελαγχρωματικό, σκληρυντικό ή τύπου μορφέας, και ΒΚΚ των ρινοπαρειικών αυλάκων(102).

Από παθολογοανατομικής πλευράς, το ΒΚΚ του δέρματος χαρακτηρίζεται από ομοιόμορφα νεοπλασματικά κύτταρα που ομοιάζουν με τα κύτταρα της βασικής στιβάδας της επιδερμίδας. Ο πυρήνας είναι μεγάλος, βαθυχρωματικός, οβάλ ή επιμήκης. Το κυτταρόπλασμα είναι λιγυστό και τα όρια των κυττάρων προσδιορίζονται δύσκολα. Τα νεοπλασματικά κύτταρα διατάσσονται πασαλοειδώς στην περιφέρεια των βλαβών, οι οποίες άρχονται από την επιδερμίδα, τον τριχικό θύλακο ή εντοπίζονται στο χόριο, στο οποίο μπορεί να υπάρχει ελάστωση. Ανάμεσα στις βλάστες του όγκου υπάρχει στρώμα συνδετικού ιστού, το οποίο ενίοτε περιέχει βλέννη. Γύρω από τον όγκο ανευρίσκονται ποικίλλου βαθμού μονοκυτταρικά διηθήματα(136;137). Υπάρχουν πολλές παθολογοανατομικές ποικιλίες ΒΚΚ, οι οποίες αναφέρονται στον πίνακα 9.

Προδιαθεσικοί παράγοντες για την ανάπτυξη ΒΚΚ θεωρούνται η ηλιακή ακτινοβολία, οι ακτίνες Χ, οι ουλές εγκαυμάτων και η έκθεση σε αρσενικό (αν και το τελευταίο προκαλεί συχνότερα ακανθοκυτταρικά καρκινώματα)(102).

Αν και ο όγκος πολύ σπάνια δίνει μεταστάσεις (0,3%)(138) τα ΒΚΚ μπορούν να οδηγήσουν σε αισθητικά δυσάρεστα αποτελέσματα, κυρίως λόγω της τοπικής διήθησης και καταστροφής των περιβαλλόντων ιστών. Συνήθως θεραπεύονται αποτελεσματικά με κρυοθεραπεία, διαθερμοπηξία ή ακτινοβολία, ανάλογα πάντα με το μέγεθος της βλάβης, τη θέση και την ηλικία του ασθενούς. Θεραπεία εκλογής παραμένει η χειρουργική εξαίρεση της βλάβης σε υγιή όρια.

Ένα 3-4% των ασθενών υποφέρουν από τοπικές υποτροπές μέσα στα πέντε πρώτα χρόνια από χειρουργείο(139). Το ποσοστό αυτό είναι υψηλότερο εάν δεν έχει γίνει καλός χειρουργικός καθαρισμός κατά την αρχική αφαίρεση της βλάβης. Επιπλέον, σε άγνωστο ποσοστό βλαβών ο υπολειμματικός όγκος μπορεί να παρουσιάσει αυτόματη υποχώρηση. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνεται σε

περιπτώσεις ΒΚΚ μετά από διαγνωστικές βιοψίες, όπου ο αρχικός όγκος δεν ανευρίσκεται κατά την χειρουργική εξαίρεση.

Για την «αργή» εξέλιξη των ΒΚΚ έχουν διατυπωθεί πολλές υποθέσεις όπως: νεοπλασματική παράταση της φάσης S του κυτταρικού κύκλου όπου γίνεται η σύνθεση του DNA (140), υποχώρηση του όγκου ως αποτέλεσμα ανοσολογικών αντιδράσεων(142), ή μηχανική αντίσταση των περιβαλλόντων ιστών στην επέκταση του όγκου(143).

Οι παραπάνω υποθέσεις ενισχύθηκαν παλιότερα από τα ακόλουθα στοιχεία: α) μόνο ένα ποσοστό του συνολικού όγκου του ΒΚΚ πολλαπλασιάζεται ενεργά(141), β) το αντιγόνο Ki-67 που είναι ενδεικτικό ενεργού πολλαπλασιασμού εντοπίζεται στους πυρήνες των πασαλοειδών κυτάρων της περιφέρειας των ΒΚΚ(144), γ) η ενεργοποίηση των ογκογονιδίων *ras*, τα οποία συσχετίζονται με αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ανευρίσκεται σπάνια στους επιθηλιακούς όγκους του δέρματος(145), δ) έχει περιγραφεί ακανόνιστη έκφραση p53 στα ΒΚΚ(146). Ο “άγριος” τύπος του γονιδίου p53 λειτουργεί ως ογκο-κατασταλτικό γονίδιο, βάζοντας φρένο στην ογκογένεση και διορθώνοντας το βεβλαμένο γενετικό υλικό. Αν το τελευταίο δεν επιδιορθωθεί, το p53 προκαλεί απόπτωση του κυττάρου. Η παρουσία μεταλλαγμένου p53 δρα αντι-αποπτωτικά περίπου σαν το bcl-2(147).

B) Ακανθοκυτταρικό Καρκίνωμα

Οι μεταλλάξεις στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 είναι πολύ συχνές στους ανθρώπινους καρκίνους. Ανιχνεύονται σε άνω του 90% των Ακανθοκυτταρικών Καρκινωμάτων του δέρματος (ΑΚΚ), ιδιαίτερα μάλιστα στις πρώιμες βλάβες, τις Ακτινικές Υπερκερατώσεις. Από τα υπάρχοντα επιστημονικά δεδομένα διαφαίνεται μία έντονη θετική συσχέτιση ανάμεσα στα πρώιμα αποτελέσματα της υπεριώδους ακτινοβολίας στο p53 του δέρματος και στην ανάπτυξη ΑΚΚ και Ακτινικών Υπερκερατώσεων. Η υπεριώδης ακτινοβολία προκαλεί μεταλλάξεις του p53 και τα μεταλλαγμένα κύτταρα κλωνοειδώς περιβαλλόμενα από φυσιολογικά κερατινοκύτταρα. Έκφραση Bcl-2 δεν έχει ανιχνευθεί στα ΑΚΚ ή τις πρόδρομες αυτών βλάβες(148).

Σε κυτταρικές καλλιέργειες από σειρές ΑΚΚ ανιχνεύθηκε κυρίως Fas και λιγότερο FasL, σε ποικίλη ένταση. Σε ανοσοιστοχημικές χρώσεις από βιοψίες βλαβών, η έκφραση Fas ήταν ιδιαίτερα έντονη στην περιφέρεια των όγκων και μάλιστα σε

περιοχές κοντά σε μονοκυτταρικά λεμφοκυτταρικά διηθήματα (πιθανόν λόγω διέγερσης από την παραγόμενη ιντερφερόνη γ)(128).

Γ) Κακόηθες Μελάνωμα

Σύμφωνα με τα νεώτερα δεδομένα της παγκόσμιας βιβλιογραφίας, τα κύτταρα του κακοήθους μελανώματος δύνανται να αυτο-καταστραφούν μέσω προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, δηλαδή μέσω της απόπτωσης. Στους όγκους αυτούς, οι μοριακοί μηχανισμοί της απόπτωσης περιλαμβάνουν θετικούς (αποπτωτικούς) και αρνητικούς (αντι-αποπτωτικούς) ρυθμιστές. Θα αναφερθούμε πολύ περιληπτικά στους ρυθμιστές αυτούς, καθώς τα κακοήθη μελανώματα δεν αποτελούν μέρος της παρούσας εργασίας.

Θετικοί ρυθμιστές, δηλαδή ευνοικοί για την απόπτωση στα κακοήθη μελανώματα, θεωρούνται οι ακόλουθοι: p53, Bid, Noxa, PUMA, Bax, TNF, TRAIL, Fas/FasL, PITSLRE, c-KIT/SCF και ιντερφερόνες. (104)

Αρνητικοί ρυθμιστές, δηλαδή ανασταλτικοί της απόπτωσης, θεωρούνται οι ακόλουθοι: Bcl-2, Bcl-X(L), Mcl-1, NF-(K)B, survivin, livin και ML-IAP. (104)

Εναλλακτικά, ορισμένα μόρια όπως τα TRAF-2, c-Myc, οι ενδοθηλίνες (endothelins) και οι ιντεγκρίνες (integrins) μπορούν να έχουν τόσο αποπτωτική όσο και αντι-αποπτωτική δράση στα κύτταρα του κακοήθους μελανώματος. (104)

Ορισμένα από τα μόρια αυτά παρουσιάζουν δυνατότητες μελλοντικής θεραπευτικής χρήσης, όπως: (1) το γονίδιο p53, το οποίο επηρεάζει την αντίσταση στη χημειοθεραπεία, (2) οι πρωτείνες Mcl-1 και Bcl-X(L), που μπορούν να παρακάμψουν την απόπτωση, (3) ο υποδοχέας TRAIL, ο οποίος έχει εκλεκτικά θανατηφόρο δράση στα κακοήθη κύτταρα, (4) ο υποδοχέας NF-(K)B, ο οποίος όταν καταστέλλεται η έκφρασή του καθιστά τα κακοήθη κύτταρα πιο ευαίσθητα στη δράση των υποδοχέων TRAIL και TNF, (5) οι κινάσες PITSLRE, των οποίων διαταραχές έχουν ως αποτέλεσμα αντίσταση στην απόπτωση μέσω Fas, (6) οι ιντερφερόνες, που ευαισθητοποιούν τα κύτταρα σε άλλους παράγοντες, και τέλος (7) η survivin και άλλες IAPs που αναστέλλουν την απόπτωση(104;105).

Δ) Δερματικά Λεμφώματα

Τα τελευταία χρόνια πραγματοποιήθηκαν πολλές μελέτες για την εκτίμηση της έκφρασης αποπτωτικών δεικτών σε νεοπλασμάτα λεμφικής προέλευσης, ιδιαίτερα μάλιστα των υποδοχέων Fas και FasL. Όπως έχει αναφερθεί, η απόπτωση

απαντάται ιδιαίτερα σε ιστούς που ανανεώνονται γρήγορα, όπως άλλωστε συμβαίνει με το λεμφικό σύστημα. Οι μελέτες που υπάρχουν μέχρι σήμερα αφορούν κατεξοχήν συστηματικά λεμφώματα, θα τις αναφέρουμε όμως λόγω ελλείψεως αναλόγων μελετών αποκλειστικά για τα δερματικά λεμφώματα. Επίσης, καθώς τα δερματικά λεμφώματα αποτελούν κύριο μέρος της παρούσας διατριβής, θα αναφερθούμε λεπτομερέστερα στην ταξινόμηση, την κλινική εικόνα, τη διάγνωση και την πρόγνωση των κυριότερων κατηγοριών δερματικών λεμφωμάτων Β- και Τ-κυτταρικής αρχής, ώστε να κατανοήσουμε καλύτερα το σκοπό και τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής. Υπάρχει η πεποίθηση ότι ο έλεγχος της έκφρασης των πρωτεϊνών Fas και FasL, τόσο στα καρκινικά κύτταρα όσο και στα αντιδραστικά κύτταρα, μπορεί να παράσχει πληροφορίες για τον πιθανό ρόλο του αποπτωτικού δρόμου Fas-FasL στην αντι-καρκινική απάντηση (anti-tumor response) του οργανισμού(55).

Μελέτες της έκφρασης του υποδοχέα Fas σε διάφορων τύπων λεμφώματα Β-αρχής υποδηλώνουν ότι τα νεοπλασματικά κύτταρα κατά κανόνα διατηρούν το φαινότυπο των μη-νεοπλασματικών τους αναλόγων. Έτσι, τα λεμφώματα του τύπου του λεμφοζιδιακού κέντρου και τα Β-λεμφώματα από κύτταρα της περιοχής της «ζώνης», παρουσιάζουν την εντονότερη έκφραση Fas, γεγονός συμβατό με την έκφραση Fas στα αντιδραστικά λεμφοζιδιακά κέντρα και τα «μετα-λεμφοζιδιακά» λεμφοκύτταρα(110;149;150). Αντίθετα, η χρόνια Β-λεμφοκυτταρική λευχαιμία και το λέμφωμα από κύτταρα του μανδύα, τα οποία αντιστοιχούν σε λεμφοκύτταρα σε «φάση ηρεμίας», εμφανίζουν ελάχιστη ή καθόλου έκφραση του Fas(151;152).

Ποικίλλα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν σε λεμφώματα από διάχυτα μεγάλα Β-κύτταρα. Στην τελευταία αυτή κατηγορία η απουσία της έκφρασης Fas συσχετίστηκε με μία πιο επιθετική κλινική συμπεριφορά(149;151;153). Μία παρόμοια συσχέτιση έχει επίσης αναφερθεί και αφορά την απουσία άλλων μορίων που εμπλέκονται στη σταθερή σύνδεση καρκινικού κυττάρου-δραστικού κυττάρου (effector cell), όπως LFA-1 (CD11a), ICAM-1 (CD54) και τα μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας HLA class I και II(154-156).

Όσον αφορά την έκφραση του FasL, ανοσοιστοχημικές μελέτες σε λεμφοπερπλαστικές διαταραχές Β-κυτταρικής αρχής υπάρχουν επί του παρόντος ελάχιστες. Σε μία εξ αυτών περιγράφεται έντονη έκφραση FasL σε τομές παραφίνης από λεμφώματα με διάχυτα μεγάλα Β-κύτταρα και λέμφωμα Burkitt (υψηλής κακοήθειας), ενώ παρατηρείται απουσία έκφρασης FasL σε χαμηλής κακοήθειας Β-λεμφώματα(157).

Από τις ήδη υπάρχουσες εργασίες για τα συστηματικά λεμφώματα Τ-κυτταρικής αρχής, διαπιστώνουμε ότι τα κύτταρα Reed Sternberg στη νόσο του Hodgkin εκφράζουν Fas, ενώ FasL εκφράζουν σε χαμηλό ποσοστό τα αντιδραστικά

Πίνακας 10.

**ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΕΟΡΤΣ ΓΙΑ ΤΑ ΠΡΩΤΟΠΑΘΗ ΔΕΡΜΑΤΙΚΑ ΛΕΜΦΩΜΑΤΑ
Β-ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΑΡΧΗΣ**

Χαμηλής κακοήθειας : Λέμφωμα από κύτταρα του τύπου του λεμφοζιδιακού κέντρου
Ανοσοκύττωμα

Ενδιάμεσης κακοήθειας: Λέμφωμα κάτω άκρου από μεγάλα Β-κύτταρα

Αταξινόμητα: Ενδοαγγειακό λέμφωμα από μεγάλα Β-κύτταρα
Πλασματοκύττωμα

Πίνακας 11.

**ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΕΟΡΤC ΓΙΑ ΤΑ ΠΡΩΤΟΠΑΘΗ ΔΕΡΜΑΤΙΚΑ ΛΕΜΦΩΜΑΤΑ
Τ-ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΑΡΧΗΣ**

Χαμηλής κακοήθειας :	<p>Σπογγοειδής Μυκητίαση Σπογγοειδής Μυκητίαση + θυλακική βλεννίνωση <i>Πατζετοειδής Δικτύωση</i> CD30-θετικά δερματικά λεμφώματα από μεγάλα T-κύτταρα Λεμφωματοειδής Βλατίδωση</p>
Υψηλής Κακοήθειας:	<p>Σύνδρομο Sezary CD30-αρνητικά δερματικά λεμφώματα από μεγάλα T-κύτταρα</p>
Αταξινόμητα:	<p>Κοκκιωματώδες χαλαρό δέρμα Δερματικά λεμφώματα από πλεόμορφα μικρού / μεσαίου μεγέθους T-κύτταρα Δερματικό T-λέμφωμα υπό μορφή υποδερματίτιδας.</p>

T-λεμφοκύτταρα που διηθούν τον όγκο (151;158;159). Στα Non-Hodgkin λεμφώματα ο FasL εκφράζεται σε ποικίλλο βαθμό. Πιθανόν ο Fas να υπερεκφράζεται στα CD30-θετικά συστηματικά λεμφώματα από αναπλαστικά μεγάλα κύτταρα(158). Επίσης υψηλά επίπεδα διαλυτού sFasI έχουν βρεθεί σε ασθενείς με επιθετικά λεμφώματα από κύτταρα φυσικούς δολοφόνους(89). Αξίζει πάντως να σημειωθεί ότι ακόμα και σε κυτταρικές σειρές από Fas(+) B- και T- συστηματικά λεμφώματα ο εκφραζόμενος υποδοχέας Fas δεν ήταν λειτουργικός.

Ο όρος «πρωτοπαθή δερματικά λεμφώματα» χρησιμοποιείται για να προσδιορίσει μία ετερογενή ομάδα non-Hodgkin λεμφωμάτων τα οποία εμφανίζονται στο δέρμα, χωρίς ένδειξη εξω-δερματικής νόσου κατά τη διάγνωσή τους και τους πρώτους 6 μήνες από αυτή. Η συχνότητα των λεμφωμάτων αυτών είναι 1 / 100.000, και είναι περίπου 75% T- και 25% B- κυτταρικής αρχής(160).

Τα πρωτοπαθή δερματικά λεμφώματα αποτελούν μία δύσκολη ομάδα νοσημάτων, τόσο για τον κλινικό γιατρό όσο και για τον παθολογοανατόμο. Η δυσκολία για τον παθολογοανατόμο έγκειται στο γεγονός ότι τα λεμφώματα αυτά δεν μπορούν να ταξινομηθούν με ακρίβεια αποκλειστικά από την ιστολογική τους εικόνα. Επίσης από την πλευρά του κλινικού γιατρού τα λεμφώματα αυτά αποτελούν μία ιδιόμορφη ομάδα νοσημάτων, καθότι εμφανίζουν κλινική συμπεριφορά πολύ διαφορετικότερη από τα συστηματικά λεμφώματα του ίδιου ιστολογικού τύπου.

Μια καινούρια ταξινόμηση των δερματικών λεμφωμάτων που προτείνεται από τον EORTC (European Organisation for Research and Treatment of Cancer) (Πίνακες 10 και 11), φαίνεται λογική και επιπλέον πρακτικότερη όλων των προηγούμενων (Κιέλου, REAL)(160). Η ταξινόμηση αυτή στηρίζεται σε ένα συνδυασμό κλινικών, ιστολογικών και ανοσοφαινοτυπικών κριτηρίων και περισσότερο προσδιορίζει νοσολογικές οντότητες παρά ιστολογικές υποομάδες. Στη συνέχεια θα αναπτύξουμε εν συντομία τα κυριότερα χαρακτηριστικά των συχνότερων κατηγοριών δερματικών λεμφωμάτων T- και B-κυτταρικής αρχής.(154;160-173).

1) Σπογγοειδής Μυκητίαση

Ορισμός : πρόκειται για επιδερμοτροπικό δερματικό T-λέμφωμα, με υπερπλασία μικρών και μεσαίου μεγέθους νεοπλασματικών T-λεμφοκυττάρων που έχουν νεφροειδή πυρήνα (κύτταρα Lutzner / Sezary).

Κλινική εικόνα : ανευρίσκονται χαρακτηριστικές ερυθρηματώδεις, ερυθρο-καφεοειδείς πλάκες με ελαφρό λέπι, κατά κανόνα κνησμώδεις. Η νόσος εμφανίζει 3 στάδια εξέλιξης: κηλίδα-πλάκα-όγκος.

Ιστολογικά ευρήματα: το χαρακτηριστικότερο εύρημα είναι ο επιδερμοτροπισμός.

Υπάρχουν μπάντες διηθημάτων που περιλαμβάνουν το θηλώδες χόριο. Τα διηθήματα αποτελούνται από μικρού, μεσαίου και μεγάλου μεγέθους μονοπύρρηνα κύτταρα με υπερχρωματικό νεφροειδή πυρήνα (κύτταρα Lutzner / Sezary) και ποικίλο αριθμό ηωσινοφίλων, ιστιοκυττάρων, πλασματοκυττάρων και δενδριτικών κυττάρων. Επίσης παρατηρείται πασσαλοειδής διάταξη λεμφοκυττάρων στη βασική μεμβράνη και rautrier μικροαποστημάτια.

Ανοσοφαινότυπος: τα κύτταρα είναι CD3+, CD4+, CD45RO+, CD8-, CD30-.

Στο στάδιο των όγκων συνήθως υπάρχει απώλεια όλων των T- αντιγόνων.

Μοριακή βιολογία: κλωνική αντιμετάθεση TCR γονιδίου σε πάνω από το 90%.

(εξετάζεται ακόμη ο ρόλος του HTLV-1)

Πενταετής επιβίωση: > 85% για το στάδιο των πλακών, ενώ σπάνια από το στάδιο των όγκων μπορεί να υπάρξει μετατροπή σε CD30-θετικό ή CD30-αρνητικό δερματικό λέμφωμα από μεγάλα T-κύτταρα.

Θεραπεία : ανάλογα με το στάδιο της νόσου μπορούν να χρησιμοποιηθούν

- Κορτικοστεροειδή (σε πολύ αρχικά στάδια)
- PUVA
- Nitrogen mustard τοπικά
- Chlormustine (BCNU) τοπικά
- Ακτινοβολία - Total electron beam irradiation
- PUVA + ρετινοειδή
- PUVA + INF-a
- Χημειοθεραπεία

2) Πρωτοπαθείς CD30-θετικές λεμφουπερπλαστικές διαταραχές

Υπό τον όρο αυτό περιλαμβάνονται δύο παρεμφερή νοσήματα, το CD30-θετικό Δερματικό Λέμφωμα από μεγάλα T-λεμφοκύτταρα (αναπλαστικό, ανοσοβλαστικό, πλεόμορφο) και η Λεμφωματοειδής Βλατίδωση, στα οποία θα αναφερθούμε στη συνέχεια με λεπτομέρεια.

2α. CD30-θετικό δερματικό T-λέμφωμα

Ορισμός : δερματικό λέμφωμα αποτελούμενο από μεγάλα νεοπλασματικά κύτταρα, η πλειοψηφία των οποίων είναι CD30-θετικά. Επιπλέον, απουσία ιστορικού ή κλινικής υποψίας για Λεμφωματοειδή Βλατίδωση, Σπογγοειδή Μυκητίαση ή άλλο δερματικό

T-λέμφωμα. Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται τόσο τα αναπλαστικά όσο και τα μη-αναπλαστικά λεμφώματα.

Κλινική εικόνα :εμφανίζεται σε ενήλικες ως μονήρες, εντοπισμένο οζίδιο ή όγκος με εξέγκωση. Αξίζει να σημειωθεί ότι στο 25% των ασθενών εμφανίζει αυτόματη υποχώρηση, ενώ ένα άλλο 25% μπορεί να δώσει λεμφαδενικές μεταστάσεις.

Ιστολογικά ευρήματα : διάχυτα μη-επιδερμοτροπικά διηθήματα από CD30-θετικά νεοπλασματικά κύτταρα, που έχουν συνήθως τη μορφολογία αναπλαστικών κυττάρων (στρογγυλό, οβάλ η ανώμαλο πυρήνια, ηωσινοφιλικά πυρήνια, πλούσιο κυτταρόπλασμα). Σπανιότερα η εμφάνιση είναι πλειόμορφη ή ανοσοβλαστική. Ανευρίσκονται επίσης αντιδραστικά λεμφοκύτταρα στην περιφέρεια, ενώ μερικές περιπτώσεις θυμίζουν Λεμφωματοειδή Βλατίδωση.

Ανοσοφαινότυπος: συνήθως CD4+ με ποικίλη απώλεια των CD2, CD3, CD5.

Απαραίτητως περισσότερα από 75% των νεοπλασματικών κυττάρων πρέπει να είναι CD30+, EMA(-), CD15(-).

Μοριακή βιολογία: κλωνική αντιμετάθεση TCR γονιδίου (πιθανολογείται 2;5 αντιμετάθεση)

Πενταετής επιβίωση: 90%, εκτός εάν αναπτύσσονται σε έδαφος Σπογγοειδούς Μυκητίασης(χειρότερη πρόγνωση)

Θεραπεία :ακτινοβολία για την εντοπισμένη νόσο και χημειοθεραπεία για την εκτεταμένη.

2β.Λεμφωματοειδής Βλατίδωση

Ορισμός: χρόνια, υποτροπιάζουσα, αυτοιώμενη, βλατιδο-οζώδης ή βλατιδονεκρωτική δερματοπάθεια, με ιστολογικά ευρήματα που υποδηλώνουν δερματικό T.

Κλινική εικόνα :βλατίδες, βλατιδονεκρωτικές βλάβες η οζίδια σε διαφορετικά στάδια εξέλιξης. Οι βλάβες αυτοιώνται σε 3-6 εβδομάδες. Η νόσος διαδράμει χρονίως (3μηνες - 40 έτη). Στο 10-20% των ασθενών προηγείται η έπεται κάποιο άλλο λέμφωμα (Σπογγοειδή Μυκητίαση, CD30-θετικό λέμφωμα από μεγάλα T-κύτταρα, νόσος Hodgkin).

Ιστολογικά ευρήματα : έχουν περιγραφεί τρεις ιστολογικοί τύποι

Λεμφωματοειδής Βλατίδωση τύπου A: διηθήματα, αρχικά μη-επιδερμοτροπικά, σαν “ζυγαριά”, με αθροίσεις μεγάλων, άτυπων, συχνά πολυπύρηνων η δίκην Reed-Sternberg κυττάρων που βάφουν CD30-θετικά.Το διήθημα περιλαμβάνει ακόμα ιστοκύτταρα, μικρά λεμφοκύτταρα, ουδετερόφιλα και / η ηωσινόφιλα.

Λεμφωματοειδής Βλατίδωση τύπου B: ομοιάζουσα με Σπογγοειδή Μυκητίαση.

Λεμφωματοειδής Βλατίδωση τύπου Γ: ομοιάζουσα με CD30-θετικό λέμφωμα από μεγάλα T-κύτταρα.

Ανοσοφαινότυπος: τα μεγάλα άτυπα κύτταρα στη Λεμφωματοειδή Βλατίδωση τύπου Α και Γ βάφουν όπως αυτά των CD30-θετικών λεμφωμάτων από μεγάλα T-κύτταρα. Τα άτυπα νεφροειδή κύτταρα στη Λεμφωματοειδή Βλατίδωση τύπου Β είναι CD3+, CD4+, CD8+, CD30-.

Μοριακή βιολογία: κλωνική αντιμετάθεση TCR γονιδίου στο 50%

Πενταετής επιβίωση: 100%

Θεραπεία :δεν υπάρχει αποτελεσματική (PUVA, τοπική χημειοθεραπεία, μεθοτρεξάτη)

3) CD30- αρνητικό δερματικό λέμφωμα από μεγάλα T-κύτταρα

Ορισμός : δερματικό λέμφωμα αποτελούμενο από μεγάλα CD30-αρνητικά νεοπλασματικά κύτταρα. Μπορεί να συνυπάρχει με Σπογγοειδή Μυκητίαση ή να τη διαδεχθεί.

Κλινική εικόνα : μονήρεις, εντοπισμένες η γενικευμένες πλάκες, οζίδια η όγκοι με ταχεία επιδείνωση.

Ιστολογικά ευρήματα : οζώδη η διάχυτα διηθήματα από μεσαίου η μεγάλου μεγέθους πλειόμορφα T- κύτταρα (χωρίς νεφροειδή πυρήνα) και ανοσοβλάστες. Θα πρέπει τα νεοπλασματικά κύτταρα να αποτελούν πάνω από το 30% των κυττάρων του διηθήματος.

Ανοσοφαινότυπος: CD4+, CD30-.

Μοριακή βιολογία: κλωνική αντιμετάθεση TCR γονιδίου

Πενταετής επιβίωση: χαμηλή έως 15%

Θεραπεία : είναι συνήθως ανεπαρκής και περιλαμβάνει ακτινοβολία και συστηματική χημειοθεραπεία.

Θεραπεία: ίσως θα μπορούσαν να προσφέρουν η ακτινοβολία, η χρήση κυκλοφωσφαμίδης και η INF-a.

4) Πρωτοπαθές δερματικό Β-λέμφωμα από κύτταρα του τύπου του λεμφοζιδιακού κέντρου

Το λέμφωμα αυτό αποτελεί τη συχνότερη κατηγορία μεταξύ των πρωτοπαθών δερματικών λεμφωμάτων Β-κυτταρικής αρχής. Στο 90% των περιπτώσεων εμφανίζεται με τη μορφή όγκων ή ογκιδίων, εντοπισμένων στην κεφαλή (κυρίως στο κρανίο) και στον κορμό, και προσβάλλει κατεξοχήν ηλικιωμένα

άτομα. Το λέμφωμα αυτό στον κορμό είχε αναγνωρισθεί ως ξεχωριστή παθολογική οντότητα από το 1951 και είχε χαρακτηριστεί ως δικτυοιστιοκύττωμα (reticulohistiocytoma dorsii).

Ιστολογικά τα λεμφώματα αυτά παρουσιάζουν μια ποικιλία εικόνων, ανάλογα με την ηλικία του ασθενούς και τη διάρκεια των βλαβών που βιοψούνται. Μικρές και πρώιμες βλάβες περιέχουν ένα μίγμα από μικρά λεμφοκύτταρα, τα λεγόμενα κεντροκύτταρα, λίγους κεντροβλάστες και πολλά αντιδραστικά T-λεμφοκύτταρα. Μπορούν επίσης να ανιχνευθούν υπολλείμματα αντιδραστικών θυλακικών κέντρων, ενώ τα νεοπλασματικά θυλακικά κέντρα είναι πολύ σπάνια. Βλάβες του τύπου των όγκων παρουσιάζουν την ιστολογική εικόνα λεμφώματος από διάχυτα μεγάλα B-κύτταρα, με ποικίλλου βαθμού προσμίξεις από κεντροβλάστες, λίγα κεντροκύτταρα, πολυλοβώδη κύτταρα και ανοσοβλάστες.

Σε αντίθεση με τα συστηματικά λεμφώματα του τύπου του λεμφοζιδιακού κέντρου στους λεμφαδένες και σε άλλες θέσεις, στο αναφερόμενο B-λέμφωμα η εξέλιξη-μετατροπή σε λέμφωμα από διάχυτα μεγάλα B-κύτταρα δε συνοδεύεται από επιδείνωση της πρόγνωσης. Το γεγονός αυτό πιθανόν να συνδέεται και με την εξαιρετικά σπάνια τάση του λεμφώματος αυτού να δίνει μεταστάσεις σε εξωδερματικές θέσεις. Ανεξάρτητα πάντως από την ιστολογική εικόνα, τα λεμφώματα αυτά έχουν εξαιρετική πρόγνωση με πενταετή επιβίωση μεγαλύτερη του 95%. Θεραπευτικά χρησιμοποιείται τοπική ακτινοβολία ή χημειοθεραπεία.

5) Πρωτοπαθές δερματικό ανοσοκύττωμα

Με βάση τα κριτήρια της ταξινόμησης του Κιέλου όλα τα δερματικά λεμφώματα που παρουσιάζουν υπερπλασία μικρών λεμφοκυττάρων, λεμφοπλασματοκυττοειδών κυττάρων και πλασματοκυττάρων, χαρακτηρίζονται ως πρωτοπαθή δερματικά ανοσοκυττώματα. Με βάση την ταξινόμηση REAL αυτά τα εξω-αδενικά ανοσοκυττώματα έχουν συμπεριληφθεί σε μία ομάδα εξω-αδενικών B-λεμφωμάτων "ζώνης" (marginal zone) ή τύπου MALT. Ιστολογικά παρατηρούνται οζώδη ή διάχυτα διηθήματα από μικρά λεμφοκύτταρα, λεμφοπλασματοκυττοειδή κύτταρα και πλασματοκύτταρα που εκφράζουν μονοτυπική Ig ελαφρά αλυσίδα. Σε μερικές περιπτώσεις ανευρίσκονται αθροίσεις από κύτταρα που μοιάζουν με κεντροκύτταρα. Επίσης ανιχνεύονται στις περισσότερες περιπτώσεις κεντροβλάστες ή ανοσοβλάστες. Τα κύτταρα που παράγουν τη μονοτυπική ανοσοσφαιρίνη εντοπίζονται κυρίως στην περιφέρεια των διηθημάτων, ενώ στις κεντρικές περιοχές μπορεί να υπάρχουν αντιδραστικά θυλακικά κέντρα.

Κλινικά, οι ασθενείς αυτοί παρουσιάζουν μονήρεις ή πολλαπλούς (υπο)δερματικούς όγκους, κατά κανόνα στα άκρα. Όχι σπάνια οι όγκοι αυτοί σχετίζονται με λοίμωξη από *Borrelia burgdorferi*. Η πρόγνωση των λεμφωμάτων αυτών είναι εξαιρετική.

6) Πρωτοπαθές δερματικό λέμφωμα ποδός από μεγάλα Β-κύτταρα

Πρώτη φορά το 1987 έγινε η παρατήρηση ότι τα πρωτοπαθή δερματικά Β-λεμφώματα από κύτταρα του τύπου του λεμφοζιδιακού κέντρου που εντοπίζονται στα πόδια έχουν διαφορετική κλινική συμπεριφορά από εκείνα της κεφαλής και του κορμού και αποτελούν διακριτή υποομάδα πρωτοπαθών δερματικών λεμφωμάτων Β-αρχής. Πιο πρόσφατες μελέτες επιβεβαίωσαν αυτή την παρατήρηση. Τα λεμφώματα αυτά προσβάλλουν συχνότερα γυναίκες, έχουν υψηλό αριθμό υποτροπών και χειρότερη πρόγνωση (πενταετής επιβίωση 58%) από τα μορφολογικά πανομοιότυπα λεμφώματα της κεφαλής και του τραχήλου.

Ιστολογικά αποτελούνται από από μεγάλα Β-κύτταρα με ποικίλλες προσμίξεις από κεντροβλάστες, μεγάλα κεντροκύτταρα και ανοσοβλάστες. Ταξινομούνται συνήθως με τους όρους «κεντροβλαστικό λέμφωμα» ή «Β-ανοσοβλαστικό λέμφωμα». Πρόσφατες μελέτες καταδεικνύουν ότι, σε αντίθεση με τα πρωτοπαθή δερματικά Β-λεμφώματα από κύτταρα του τύπου του λεμφοζιδιακού κέντρου της κεφαλής και του κορμού, είναι σταθερά αρνητικά για τα προσκολλητικά μόρια ICAM-1 και LFA-1, ενώ εκφράζουν έντονα Bcl-2 σε απουσία της αντιμετάθεσης t(14;18).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σκοπός της Μελέτης

Σκοπός της μελέτης μας ήταν να διερευνήσουμε τους αποπτωτικούς μηχανισμούς που διέπουν δερματικούς όγκους διαφορετικής προελεύσεως, συγκεκριμένα επιθηλιακής και λεμφικής, και να επισημάνουμε τυχόν διαφορές ανάλογα με την κλινική συμπεριφορά και το στάδιο της νόσου.

Διαλέξαμε την ομάδα των βασικοκυτταρικών καρκινωμάτων (ΒΚΚ) του δέρματος, τα οποία χαρακτηρίζονται από πολύ αργή εξέλιξη με τοπική κυρίως διήθηση και για τα οποία πρόσφατες μελέτες καταδεικνύουν ότι εκφράζουν υψηλά ποσοστά της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 (174). Στόχος μας ήταν να μελετήσουμε την έκφραση του αποπτωτικού υποδοχέα Fas, απαραίτητου για την εξουδετέρωση του νεοπλασματικού κυττάρου από τα κυτταροτοξικά Τ-λεμφοκύτταρα του οργανισμού, σε συνδυασμό με την έκφραση της Bcl-2 σε ΒΚΚ διαφορετικών ιστολογικών τύπων (οζώδη και διηθητικά).

Στο δεύτερο μέρος της μελέτης μας συμπεριλάβαμε ένα σημαντικό αριθμό ασθενών με δερματικά λεμφώματα Β-κυτταρικής αρχής. Όπως ήδη αναφέρθηκε στο γενικό μέρος, τα λεμφώματα αυτά αντιπροσωπεύουν μια σπάνια αλλά διακριτή ομάδα νεοπλασιών από Β-κύτταρα, με διαφορετική κλινική και βιολογική συμπεριφορά όχι μόνο από τους επιθηλιακούς όγκους του δέρματος όπως τα ΒΚΚ, αλλά και από τα μορφολογικά παρόμοια συστηματικά Β-λεμφώματα που προσβάλλουν δευτεροπαθώς το δέρμα. Επιπλέον, μέσα στην ομάδα των πρωτοπαθών αυτών Β-λεμφωμάτων διακρίνονται με βάση την πρόγνωση διαφορετικές υποομάδες. Μεταξύ πρωτοπαθών και συστηματικών Β-λεμφωμάτων επιδείχθηκαν σε προηγούμενες εργασίες διαφορές στην έκφραση Bcl-2 καθώς και των προσκολλητικών μορίων ICAM-1/CD54, LFA-1 που σταθεροποιούν τη σύνδεση νεοπλασματικού κυττάρου-κυτταροτοξικού λεμφοκυττάρου. Στην παρούσα εργασία διερευνήσαμε ανοσοιστοχημικά την έκφραση των Fas και FasL σε ένα μεγάλο αριθμό πρωτοπαθών και δευτεροπαθών δερματικών Β-λεμφωμάτων. Τα αποτελέσματα συσχετίστηκαν με την έκφραση Bcl-2, του προσκολλητικού μορίου ICAM-1, καθώς και με την κλινική συμπεριφορά των λεμφωμάτων.

Τέλος στο τρίτο μέρος της παρούσας εργασίας διερευνήσαμε την έκφραση Fas και FasL σε ένα μεγάλο αριθμό ασθενών με δερματικά λεμφώματα Τ-κυτταρικής αρχής, τα οποία επίσης αποτελούνται από υπο-ομάδες λεμφωμάτων με σημαντικές διαφορές στην κλινική πορεία και την πενταετή επιβίωση (βλέπε γενικό μέρος), με σκοπό τη χρησιμοποίησή τους ως δείκτες ταξινόμησης ή πρόγνωσης.

Υλικό

Το υλικό για την παρούσα εργασία προέρχεται από ασθενείς της Κλινικής Δερματικών και Αφροδισίων Νοσημάτων του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων (Καθηγητής Ι. Χατζής), καθώς και από ασθενείς της Δερματολογικής Πανεπιστημιακής Κλινικής του Free University Hospital Amsterdam (Καθηγητές R.Willemze, T.Starink). Σε όλες τις περιπτώσεις των ασθενών χρησιμοποιήθηκαν φρέσκιες κατεψυγμένες τομές (αποθήκευση σε υγρό άζωτο) και επιπλέον τομές παραφίνης από τους ίδιους όγκους.

Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήσαμε βιοπτικό υλικό από:

- 16 ασθενείς με βασικοκυτταρικά καρκινώματα του δέρματος
- 32 ασθενείς με δερματικά λεμφώματα Β-κυτταρικής αρχής, εκ των οποίων 24 ασθενείς είχαν πρωτοπαθή και οι υπόλοιποι 8 δευτεροπαθή εντόπιση στο δέρμα (όπως περιγράφηκαν στο γενικό μέρος «Δερματικά Λεμφώματα»)
- 52 ασθενείς με δερματικά λεμφώματα Τ-κυτταρικής αρχής : 23 ασθενείς με σπογγοειδή μυκητίαση, 10 ασθενείς με λεμφωματοειδή βλατίδωση, 10 ασθενείς με CD30-θετικό λέμφωμα από μεγάλα Τ-κύτταρα και 9 ασθενείς με CD30-αρνητικό λέμφωμα από μεγάλα Τ-κύτταρα (όπως περιγράφηκαν στο γενικό μέρος «Δερματικά Λεμφώματα»).

Σε όλες τις περιπτώσεις των ασθενών με δερματικά λεμφώματα κρατήθηκε υλικό από βιοψίες δέρματος των βλαβών πριν από την έναρξη της θεραπείας.

Μέθοδος και Μεθοδολογία

Για το σκοπό της μελέτης έγιναν χρώσεις με τα ακόλουθα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι:

- του Fas : δύο μονοκλωνικά αντισώματα, το CH11 (IgM; Upstate Biotechnology, Inc, Lake Placid, NY) και το FAS6 (ευγενική προσφορά του Dr Lucien A.Aarden).
- του Bcl-2 : κλώνος 124 (DAKO, Glostrup, Denmark).
- του FasL : κλώνος 33 (Transduction Laboratories, Lexington, U.S.A.).
- του ICAM-1/CD54 : MEM-111 (Sanbio, Uden, The Netherlands).
- του HLA-DR: H2-5.10 (Dutch Red Cross Central Laboratory of Blood Transfusion, Amsterdam, The Netherlands).

Στις κατεψυγμένες τομές ακολουθήθηκε για όλα τα αντισώματα, πλην του αντισώματος κατά FasL, η εξής διαδικασία:

- 1) Κόπηκαν σε κρουτόμο κατεψυγμένες τομές πάχους 5μm και αφέθηκαν σε στεγνώσουν σε ανεμιστήρα για 45 λεπτά.
- 2) Οι τομές σταθεροποιήθηκαν σε ασετόνη για 10 λεπτά.
- 3) Ακολούθως επωάστηκαν με το πρωτογενές αντίσωμα (CH11 1/200, Fas6 1/200 για Fas και κλώνος 124, 1/300 για Bcl-2) για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- 4) Ξεπλύθηκαν με PBS (phosphate-buffered saline), δύο φορές από 10 λεπτά.
- 5) Επωάστηκαν με αντίσωμα αιγούς κατά μυός σεσημασμένου με βιοτίνη 1/500 (biotinylated goat-anti-mouse, DAKO) για 30 λεπτά.
- 6) Ξεπλύθηκαν σε PBS, δύο φορές από 10 λεπτά.
- 7) Ακολούθως εκτέθηκαν σε 0,3mg/ml amino-ethylcarbazole σε οξικό ρυθμιστικό διάλυμα (acetate buffer pH 5,0) για 1 λεπτό.
- 8) Τέλος βάφτηκαν σε αιματοξυλίνη Mayer για 120 δευτερόλεπτα.

Για τη χρώση του FasL στις κατεψυγμένες τομές ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

- 1) Κόπηκαν τομές πάχους 5μm.
- 2) Μονιμοποιήθηκαν σε 4% παραφορμαλδεύδη για 10 λεπτά.
- 3) Πλύθηκαν σε PBS.
- 4) Επωάστηκαν για 10 λεπτά σε μίγμα μεθανόλης με 0,3 % H₂O₂.
- 5) Ξεπλύθηκαν με απεσταγμένο νερό.
- 6) Ξεπλύθηκαν με PBS.
- 7) Επωάστηκαν για 20 λεπτά με φυσιολογικό ορό αιγούς (normal goat serum 1/50 DAKO).
- 8) Επωάστηκαν με το μονοκλωνικό αντίσωμα anti-FasL (1/400, κλώνος 33) για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- 9) Ξεπλύθηκαν με PBS (phosphate-buffered saline), δύο φορές από 10 λεπτά.
- 10) Επωάστηκαν με αντίσωμα αιγούς κατά μυός σεσημασμένου με βιοτίνη 1/500 (biotinylated goat-anti-mouse, DAKO) για 30 λεπτά.
- 11) Ξεπλύθηκαν σε PBS, δύο φορές από 10 λεπτά.
- 12) Ακολούθως εκτέθηκαν σε 0,3mg/ml amino-ethylcarbazole σε οξικό ρυθμιστικό διάλυμα (acetate buffer pH 5,0) για 1 λεπτό.
- 13) Τέλος βάφτηκαν σε αιματοξυλίνη Mayer για 120 δευτερόλεπτα.

Για τη χρώση του FasL και της πρωτεΐνης Bcl-2 σε τομές παραφίνης ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία, η οποία περιελάμβανε την τεχνική των τριών διαδοχικών βημάτων στρεπταβιδίνης-βιοτίνης-περοξειδάσης:

- 1) Κόπηκαν τομές παραφίνης πάχους 4μm, οι οποίες επικολλήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες επενδυμένες με πολύ-L-λυσίνη.
- 2) Αφέθηκαν να στεγνώσουν όλη νύχτα στους 37 βαθμούς Κελσίου.
- 3) Αφαιρέθηκε η παραφίνη με εμβάπτιση σε ξυλόλη.
- 4) Εμβάπτιστηκαν σε αλκοόλη.
- 5) Επώαστηκαν για 30 λεπτά σε μίγμα 0,3% υπεροξειδίου του υδρογόνου με μεθανόλη για εξουδετέρωση της ενδογενούς περοξειδάσης.
- 6) Ξεπλύθηκαν σε απεσταγμένο νερό.
- 7) Τοποθετήθηκαν σε 10 mmol / L ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέως (pH 6,0 ή 6,1) και θερμάνθηκαν διαδοχικά για τρεις φορές από 5 λεπτά σε φούρνο μικροκυμάτων στα 180 Watt, για επανάκτηση των ιστικών αντιγόνων.
- 8) Ξεπλύθηκαν σε απεσταγμένο νερό.
- 9) Τοποθετήθηκαν σε PBS.
- 10) Επώαστηκαν για 10 λεπτά με φυσιολογικό ορό κονίκλου 2% (DAKO) σε PBS.
- 11) Επώαστηκαν χωρίς ξέπλυμα για 60 λεπτά με το μονοκλωνικό αντίσωμα κατά FasL (κλώνος 33, 1/400) και κατά Bcl-2 (κλώνος 124, 1/300, DAKO).
- 12) Ξεπλύθηκαν τρεις φορές με PBS.
- 13) Επώαστηκαν για 30 λεπτά με αντίσωμα κονίκλου κατά μυός (1:500) σεσημασμένου με βιοτίνη σε PBS.
- 14) Ξεπλύθηκαν τρεις φορές με PBS.
- 15) Επώαστηκαν για 60 λεπτά με 1:200 σύμπλεγμα στρεπταβιδίνης-HRP (A+B complex, streptavidin-biotin horseradish peroxidase complex) σε PBS.
- 16) Ξεπλύθηκαν με PBS.
- 17) Χρωματίστηκαν για 5 λεπτά με DAB (35 μl 30% H₂O₂ σε 50ml 3.3 diaminobenzidine-tetrahydrochloride, Sigma, St Louis, MO)
- 18) Χρωματίστηκαν με αιματοξυλίνη για 40 δευτερόλεπτα και ξεπλύθηκαν με νερό βρύσης.

1. Μελέτη των Φαινομένων της Απόπτωσης στα Βασικοκυτταρικά Καρκινώματα του Δέρματος

α. Υλικό

Εξετάσθηκε βιοπτικό υλικό από 16 ασθενείς, ηλικίας 57-92 ετών, με βασικοκυτταρικά καρκινώματα του δέρματος (ΒΚΚ). Η μελέτη περιελάμβανε 10 άνδρες και 6 γυναίκες (μέση ηλικία ανδρών: 75,4 έτη, μέση ηλικία γυναικών: 81,6 έτη). Όλες οι βλάβες αφαιρέθηκαν από ηλιοεκτεθειμένες περιοχές (Πίνακας 12). Στη μελέτη συμπεριλάβαμε για σύγκριση 4 ασθενείς (2 άνδρες και 2 γυναίκες) με ακανθοκυτταρικά καρκινώματα του δέρματος (ΑΚΚ). Όπως είναι γνωστό τα ΑΚΚ θεωρείται ότι προέρχονται από διαφορετικά αρχέγονα κύτταρα σε σύγκριση με τα ΒΚΚ και εμφανίζουν διαφορετική (επιθετικότερη) κλινική συμπεριφορά. Θα είχε λοιπόν ενδιαφέρον να διερευνηθεί εάν οι διαφορές αυτές σχετίζονται και με διαφορετική έκφραση αποπτωτικών υποδοχέων μεταξύ ΒΚΚ και ΑΚΚ.

Κάθε βλάβη εκτιμήθηκε αρχικά από ειδικό παθολογοανατόμο, αφού έγιναν διαγνωστικές χρώσεις αιματοξυλίνης-ηωσίνης, με σκοπό τον προσδιορισμό του συγκεκριμένου ιστολογικού τύπου ΒΚΚ. Στην παρούσα μελέτη συμπεριλήφθηκαν αποκλειστικά οι μορφές του οζώδους και του διηθητικού ΒΚΚ, με βάση καθορισμένα παθολογοανατομικά κριτήρια(136;137). «Οζώδες» ΒΚΚ χαρακτηρίστηκε εκείνο που εμφάνιζε ενδοφυτική οζώδη επέκταση στο θηλώδες χόριο από άτυπα πασσαλοειδή νεοπλασματικά κύτταρα. «Διηθητικό» ΒΚΚ χαρακτηρίστηκε εκείνο που η μορφολογία του ήταν ενδιάμεση μεταξύ οζώδους ΒΚΚ και σκληρυντικού ΒΚΚ, δηλαδή εμφάνιζε ανώμαλες φωλιές και ταινιοειδή διηθήματα νεοπλασματικών κυττάρων μέσα σε ένα ελαφρώς δεσμοπλαστικό ή και βλεννώδες στρώμα. Η ομάδα των 16 ασθενών με ΒΚΚ της μελέτης μας συμπεριλάμβανε 8 ασθενείς με οζώδες ΒΚΚ και 8 ασθενείς με διηθητικό ΒΚΚ.

β. Μέθοδοι – Μεθοδολογία

Για το σκοπό της μελέτης έγιναν χρώσεις με μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του Fas (CH11, IgM; Upstate Biotechnology, Inc., Lake Placid, NY) και του Bcl-2 (κλώνος 124; DAKO, Glostrup, Denmark), σε κατεψυγμένες τομές και τομές

παραφίνης, σύμφωνα με τις διαδικασίες που περιγράφηκαν στην αρχή του ειδικού μέρους στην ενότητα "Μέθοδοι και Μεθοδολογία".

γ. Μάρτυρες

Ως μάρτυρα για τις χρώσεις Fas και Bcl-2 χρησιμοποιήσαμε το παρακείμενο των βλαβών υγιές δέρμα καθώς και τομές από φυσιολογικό δέρμα (5 ασθενείς) (Εικόνες 1, 2).

Στις χρώσεις με Bcl-2 (σε κατεψυγμένες τομές και τομές παραφίνης) εσωτερικός θετικός μάρτυρας ήταν τα θετικά για Bcl-2 κύτταρα που παρατηρούνται στη βασική στιβάδα της επιδερμίδας, στους θυλάκους των τριχών και στους αδένες. Στις χρώσεις με Fas ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα επιδερμδικά κερατινοκύτταρα, τα κύτταρα των τριχοφόρων θυλάκων, των σμηγματογόνων και ιδρωτοποιών αδένων, τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων και τα αντιδραστικά T-λεμφοκύτταρα.

δ. Αποτελέσματα

Η αξιολόγηση των χρώσεων για Fas και Bcl-2 έγινε "τυφλά" από δύο ανεξάρτητους ερευνητές και καταγράφηκε το αποτέλεσμα στο οποίο υπήρχε ομοφωνία. Τα αποτελέσματα των ανοσοιστοχημικών χρώσεων καθώς και τα κύρια κλινικά δεδομένα αναγράφονται στον πίνακα 12.

Ο υποδοχέας Fas απουσίαζε παντελώς από όλα τα νεοπλασματικά κύτταρα και στα 16 ΒΚΚ που μελετήθηκαν, τόσο στα οζώδη όσο και στα διηθητικά (Εικόνα 3). Αντιθέτως, ο Fas ανιχνεύθηκε σε μεγάλο αριθμό νεοπλασματικών κυττάρων (έως 75-100%) και στα τέσσερα ΑΚΚ (Πίνακας 13). Τα θετικά για Fas κύτταρα εμφάνισαν μεμβρανική και κυτταροπλασματική χρώση του υποδοχέα.

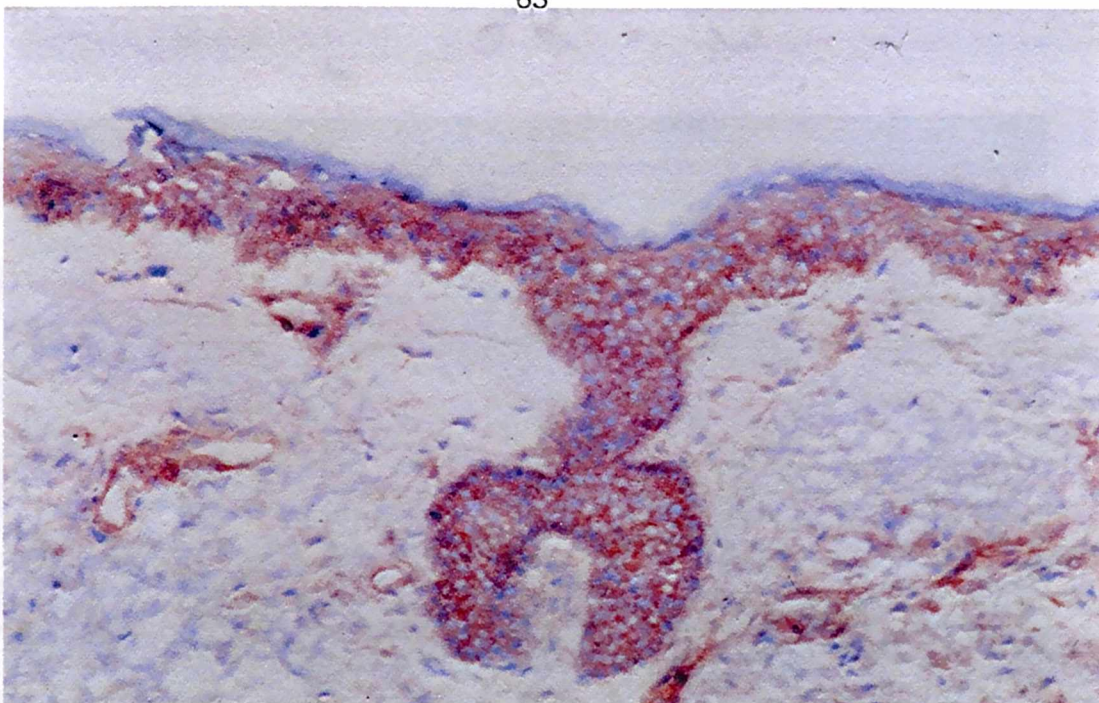
Υψηλή έκφραση Bcl-2 (σε 90-100% των νεοπλασματικών κυττάρων) παρατηρήθηκε σε 12 (8 οζώδη και 4 διηθητικά) από τα 16 ΒΚΚ (Εικόνα 4). Η χρώση για Bcl-2 ήταν ομοιογενής και διάχυτη στο κυτταρόπλασμα των νεοπλασματικών κυττάρων. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στις χρώσεις φρέσκων κατεψυγμένων τομών και τομών παραφίνης. Στα υπόλοιπα 4 διηθητικά ΒΚΚ η έκφραση Bcl-2 απουσίαζε. Αρνητικά για Bcl-2 βρέθηκαν όλα τα νεοπλασματικά κύτταρα και στα 4 ΑΚΚ.

ΠΙΝΑΚΑΣ 12. Κλινικά στοιχεία και αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικών χρώσεων σε 16 βασικοκυτταρικά καρκινώματα (ΒΚΚ) του δέρματος.

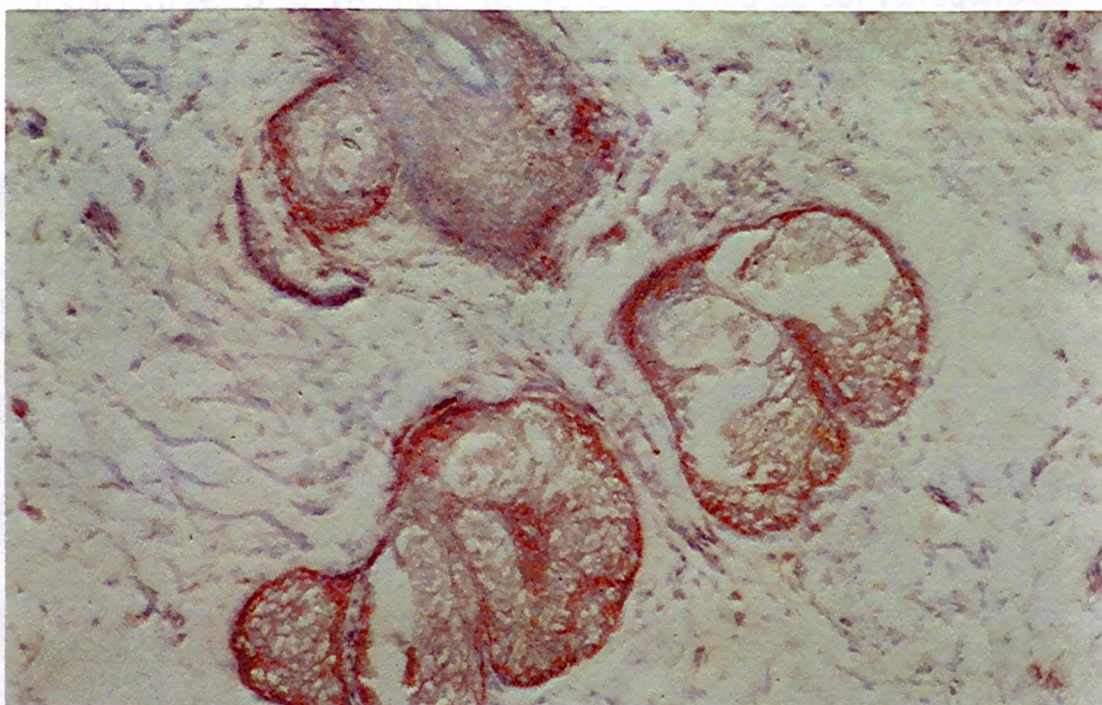
	Ηλικία	Φύλο	Εντόπιση	Ιστολογική Εικόνα	Fas (% κύτταρα)	Bcl-2 (% κύτταρα)
1.	64	A	Μέτωπο	ΒΚΚ οζώδες	-	100
2.	87	A	Παρειά	ΒΚΚ οζώδες	-	100
3.	73	A	Βρεγματική περιοχή	ΒΚΚ οζώδες	-	100
4.	78	Γ	Μέτωπο	ΒΚΚ οζώδες	-	100
5.	81	A	Κροταφική περιοχή	ΒΚΚ οζώδες	-	100
6.	76	Γ	Ακρορρίνιο	ΒΚΚ οζώδες	-	100
7.	89	Γ	Ρινοπαρειακή αύλακα	ΒΚΚ οζώδες	-	100
8.	57	A	Κάτω γνάθος	ΒΚΚ οζώδες	-	100
9.	92	A	Κροταφική περιοχή	ΒΚΚ διηθητικό	-	100
10.	85	A	Τράχηλος	ΒΚΚ διηθητικό	-	-
11.	59	A	Ράχη ρινός	ΒΚΚ διηθητικό	-	-
12.	84	Γ	Παρειά	ΒΚΚ διηθητικό	-	-
13.	79	A	Ρινοπαρειακή αύλακα	ΒΚΚ διηθητικό	-	> 90
14.	81	Γ	Μέτωπο	ΒΚΚ διηθητικό	-	-
15.	83	Γ	Κάτω γνάθος	ΒΚΚ διηθητικό	-	> 90
16.	77	A	Αντιβράχιο	ΒΚΚ διηθητικό	-	100

ΠΙΝΑΚΑΣ 13. Κλινικά στοιχεία και αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικών χρώσεων σε 4 ακανθοκυτταρικά καρκινώματα του δέρματος.

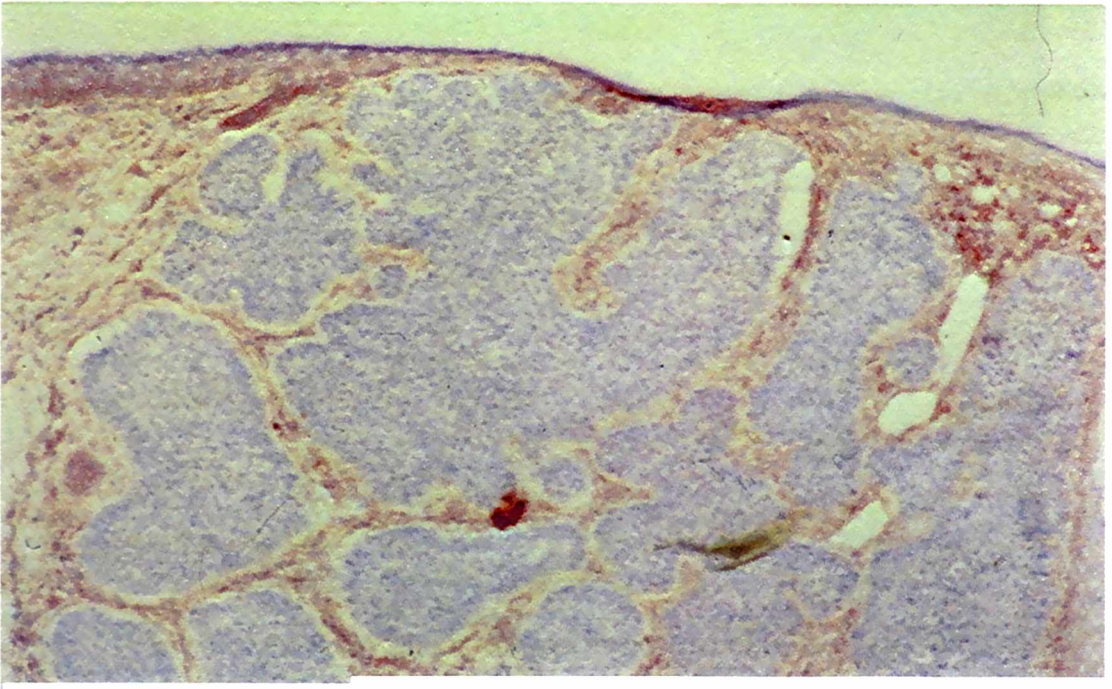
	Ηλικία	Φύλο	Εντόπιση	Fas (% κύτταρα)	Bcl-2 (% κύτταρα)
1.	65	A	Μέτωπο	> 75	-
2.	71	Γ	Έξω ους	5-10	-
3.	83	Γ	Τράχηλος	> 75	-
4.	78	A	Άνω χείλος	100	-



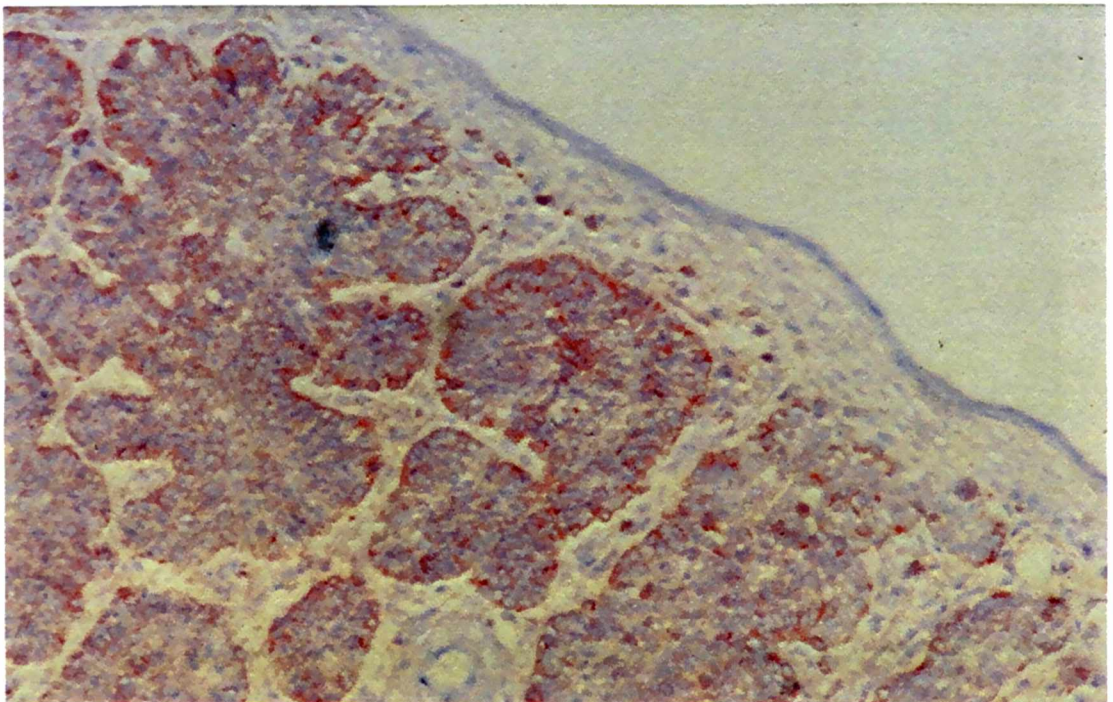
Εικόνα 1. Έκφραση Fas στο φυσιολογικό δέρμα ανιχνεύεται στα κερατινοκύτταρα της επιδερμίδας, στα κύτταρα των τριχοφόρων θυλάκων και του ενδοθηλίου των αγγείων (κατεψυγμένη τομή).



Εικόνα 2. Έκφραση Fas στο φυσιολογικό δέρμα από τα κύτταρα των σμηγματογόνων αδένων (κατεψυγμένη τομή)



Εικόνα 3. Απουσία έκφρασης Fas από κύτταρα των βασικοκυτταρικών καρκινωμάτων του δέρματος (κατεψυγμένη τομή). Αντίθετα Fas ανιχνεύεται στα κερατινοκύτταρα της επιδερμίδας.



Εικόνα 4. Έκφραση Bcl-2 από τα κύτταρα των βασικοκυτταρικών καρκινωμάτων του δέρματος (τομή παραφίνης).

ε. Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη στα ΒΚΚ του δέρματος διαπιστώθηκαν ξεκάθαρες διαφορές στην έκφραση του επιφανειακού υποδοχέα Fas που ευνοεί την απόπτωση και στην πρωτεΐνη Bcl-2 που αναστέλλει την απόπτωση.

Όσον αφορά την έκφραση Bcl-2, θετική χρώση ανιχνεύθηκε διάχυτα σε 12 από τα 16 ΒΚΚ της μελέτης, συγκεκριμένα σε όλα τα οζώδη (100%) και στα μισά από τα διηθητικά (50%). Όσον αφορά την έκφραση Fas, όλα ανεξαιρέτως τα ΒΚΚ που εξετάστηκαν, τόσο τα οζώδη όσο και τα διηθητικά, βρέθηκαν εντελώς αρνητικά. Συγκριτικά, τα κύτταρα στα ΑΚΚ ήταν στην πλειοψηφία τους θετικά για Fas (75-100%) και εντελώς αρνητικά για Bcl-2.

Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα περιορισμένων προηγούμενων μελετών, δικαιολογώντας την επιβίωση των κυττάρων των ΒΚΚ χάρη στην έλλειψη απόπτωσης(112;175). Η θετική χρώση για Bcl-2 των νεοπλασματικών κυττάρων του ΒΚΚ ενισχύει την υπόθεση ότι ο όγκος αυτός άρχεται από τα κύτταρα της βασικής μεμβράνης της επιδερμίδας και του τριχοφόρου θυλάκου. Η πρωτεΐνη Bcl-2 που αυξάνει τη διάρκεια ζωής των κυττάρων και αναστέλλει την απόπτωση εκφράζεται φυσιολογικά από τα κύτταρα της βασικής στιβάδας της επιδερμίδας, όχι όμως από τα κύτταρα των ανωτέρων στιβάδων. Η πρωτεΐνη Bcl-2 σχετίζεται επίσης με τη διαφοροποίηση και μορφογένεση αρχέγονων κυττάρων. Το πλεονέκτημα επιβίωσης που παρέχει το Bcl-2, επιτρέπει στα επιθηλιακά αρχέγονα κύτταρα να πολλαπλασιαστούν και να διαφοροποιηθούν(67).

Στο εμβρυικό δέρμα υψηλά επίπεδα Bcl-2 ανευρίσκονται γύρω από τον εμβρυικό τριχικό θύλακο. Με τη μέθοδο της αυτοραδιογραφίας οι μιτώσεις στη φυσιολογική επιδερμίδα ανιχνεύονται ακριβώς στους πρώτους δύο στοίχους των κυττάρων της βασικής μεμβράνης (Χατζής Ι, προσωπική επικοινωνία). Συνεπώς, τα νεοπλασματικά κύτταρα στα ΒΚΚ διατηρούν χαρακτηρισες αδιαφοροποίητων αρχεγόνων κερατινοκυττάρων.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η απώλεια της ικανότητας έκφρασης Bcl-2 από τα μισά διηθητικά ΒΚΚ, τα οποία σταματούν να «υποδύονται» το αρχέγονο μητρικό κύτταρο. Βιβλιογραφικά υφίσταται μία μόνο αναφορά για διαφορετική έκφραση Bcl-2 ανάμεσα στα οζώδη ΒΚΚ και στα διηθητικά ΒΚΚ(176). Η απώλεια έκφρασης Bcl-2 στα διηθητικά ΒΚΚ επισημαίνεται στη μελέτη μας και έχει περιγραφεί και σε άλλα χαμηλής κακοήθειας νεοπλάσματα, τα οποία μεταπίπτουν σε επιθετικότερες μορφές.

Η ανεύρεση Bcl-2 φαίνεται να αποτελεί σταθερή παρατήρηση στις περισσότερες μελέτες σε ΒΚΚ αλλά και σε κακοήθη μελανώματα, ενώ απουσιάζει από τα ΑΚΚ και τις πρόδρομες βλάβες αυτών, τις ακτινικές υπερκερατώσεις(177-180). Το ΑΚΚ είναι ένα νεόπλασμα που άρχεται από τα κερατινοκύτταρα άνωθεν της βασικής στιβάδας της επιδερμίδας, τα οποία εμφανίζουν ποικίλλου βαθμού διαφοροποίηση και κερατινοποίηση. Τα κύτταρα αυτά στη φυσιολογική επιδερμίδα δεν εκφράζουν Bcl-2.

Η έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2 προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση, τόσο άμεσα όσο και έμμεσα αναστέλλοντας την αποπτωτική οδό Fas-FasL(57). Για την ενεργοποίηση της αποπτωτικής αυτής οδού είναι απαραίτητη η έκφραση του υποδοχέα Fas στην επιφάνεια του νεοπλασματικού κυττάρου. Ως εκ τούτου, κύτταρα που εκφράζουν Bcl-2 και δεν εκφράζουν Fas μπορούν να επιβιώσουν επί μακρότερον.

Η απουσία έκφρασης Fas στα ΒΚΚ συνεπάγεται αδυναμία εξουδετέρωσης των νεοπλασματικών κυττάρων από τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα που φέρουν στην επιφάνειά τους τον σύνδεσμο του Fas, τον FasL (Βλέπε Σχήμα γενικό μέρος). Η σύνδεση του FasL με τον Fas επάγει την απόπτωση στο κύτταρο-στόχο. Σε πρόσφατες μελέτες ανιχνεύθηκε έκφραση FasL από τα ίδια τα νεοπλασματικά κύτταρα των ΒΚΚ στην περιφέρεια των βλαβών(181;182). Όσον αφορά την έντονη έκφραση Fas στα ΑΚΚ, θα μπορούσαμε να πούμε ότι αυτή συμβαδίζει με την ανεύρεση σημαντικά μεγαλύτερου αριθμού αποπτωτικών κυττάρων στα ΑΚΚ σε σχέση με τα ΒΚΚ(112).

Με τα νεώτερα δεδομένα για τους μηχανισμούς της απόπτωσης, ερμηνεύεται σήμερα η αποτελεσματικότητα της ενδοβλαβικής έγχυσης ιντερφερόνης-α (INF- α) στην πρόκληση υποστροφής σε βλάβες ΒΚΚ, καθώς και η (σπάνια) υποστροφή του όγκου μετά από διαγνωστική βιοψία(181;183). Η έγχυση INF- α διεγείρει την έκφραση Fas στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων, ο οποίος αλληλεπιδρά με τον FasL των γειτονικών καρκινικών κυττάρων ή των κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων, με τελική συνέπεια αντίστοιχα την "αυτοκτονία " ή τη "δολοφονία" του όγκου.

Στο γενικό μέρος ανασκοπήσαμε τις παλιότερες υποθέσεις για την αργή εξέλιξη των ΒΚΚ. Με τα σημερινά δεδομένα θα προσθέταμε έναν επιπλέον παράγοντα μακροβιότητας : την ικανότητα ανοσοδιαφυγής. Συμπερασματικά θα λέγαμε ότι τα νεοπλασματικά κύτταρα στα ΒΚΚ διαθέτουν τέσσερις τουλάχιστον ανοσολογικούς τρόπους για να διαφύγουν από την αναγνώριση του ανοσολογικού συστήματος και να εξουδετερώσουν τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα :

α) δεν εκφράζουν τα αντιγόνα επιφανείας του συμπλέγματος μείζονος ιστοσυμβατότητας MHC class II (HLA-DR) και το διακυτταρικό προσκολλητικό μορίο 1(CD54), τα οποία υποβοηθούν τη σταθερή σύνδεση του κυτταροτοξικού T-λεμφοκυττάρου με το καρκινικό κύτταρο-στόχο(184).

β) παράγουν IL-10, μια κυτταροκίνη που καταστέλλει την έκφραση των ενισχυτικών μορίων B7-1 (CD80) και B7-2 (CD86) από τα δενδριτικά αντιγόνο-παρουσιαστικά κύτταρα, παρεμποδίζοντας έτσι την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων(185-187).

γ) υπερεκφράζουν προϊόντα γονιδίων κυτταρικής επιβίωσης όπως το Bcl-2.

δ) δεν εκφράζουν το αντιγόνο Fas, με αποτέλεσμα να μην μπορούν να εξουδετερωθούν από κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα που φέρουν τον υποδοχέα FasL.

Δημιουργείται έτσι ένα ευνοϊκό περιφερικό ανοσοκατασταλτικό μικρο-περιβάλλον, το οποίο συντηρεί τον όγκο για μεγάλο χρονικό διάστημα και επικουρεί την επέκτασή του.

2. Μελέτη των Φαινομένων της Απόπτωσης στα Πρωτοπαθή Δερματικά Λεμφώματα Β- Κυτταρικής Αρχής

α. Υλικό

Όπως ήδη αναφέρθηκε στην αρχή του ειδικού μέρους, χρησιμοποιήθηκε βιοπτικό υλικό από 32 ασθενείς με δερματικά λεμφώματα Β-κυτταρικής αρχής. Οι 24 ασθενείς (9 άνδρες, 15 γυναίκες) παρουσίαζαν πρωτοπαθή εντόπιση του λεμφώματος στο δέρμα και οι υπόλοιποι 8 ασθενείς (5 άνδρες, 3 γυναίκες) δευτεροπαθή εντόπιση.

Η ομάδα των 24 ασθενών με πρωτοπαθή δερματικά Β-λεμφώματα περιελάμβανε :

- 14 ασθενείς (6 άνδρες, 8 γυναίκες) με πρωτοπαθή δερματικά λεμφώματα του τύπου του λεμφοζιδιακού κέντρου, τα οποία θεωρούνται αργής εξέλιξης και έχουν καλή πρόγνωση (βλέπε γενικό μέρος «Δερματικά λεμφώματα»). Οι δερματικές βλάβες στους ασθενείς αυτούς ήταν περιορισμένες στην κεφαλή (ασθενείς 1-7) ή στον κορμό (ασθενείς 8-14) (Πίνακας 14α).
- 6 ασθενείς (2 άνδρες, 4 γυναίκες) με πρωτοπαθή δερματικά λεμφώματα ποδός από μεγάλα Β-κύτταρα, τα οποία θεωρούνται επιθετικά και έχουν χειρότερη πρόγνωση (βλέπε γενικό μέρος «Δερματικά λεμφώματα»). Οι δερματικές βλάβες στους ασθενείς αυτούς ήταν περιορισμένες στο ένα ή και στα δύο κάτω άκρα (ασθενείς 15-20) (Πίνακας 14β).
- 4 ασθενείς (1 άνδρας, 3 γυναίκες) με πρωτοπαθή δερματικά ανοσοκυττώματα, τα οποία έχουν πολύ καλή πρόγνωση με 100% πενταετή επιβίωση (βλέπε γενικό μέρος «Δερματικά λεμφώματα») (ασθενείς 21-24) (Πίνακας 14γ).

Επιπλέον, τρία ψευδο-λεμφώματα από Β-κύτταρα συμπεριλήφθηκαν στην έρευνα ως ομάδα ελέγχου και σύγκρισης.

Στους 14 ασθενείς με πρωτοπαθή δερματικά λεμφώματα του τύπου του λεμφοζιδιακού κέντρου οι βιοψίες ελήφθησαν από ογκώδεις δερματικές βλάβες και ιστολογικά παρουσίαζαν την εικόνα λεμφώματος από διάχυτα μεγάλα κύτταρα με ποικίλλο αριθμό μεγάλων κεντροκυττάρων και κεντροβλαστών.

Στο σύνολο των 24 ασθενών η σταδιοποίηση της νόσου, η οποία περιελάμβανε φυσική εξέταση, αιματολογικό έλεγχο, ακτινογραφία θώρακα, αξονική τομογραφία

κοιλίας και βιοψία μυελού των οστών, απέτυχε να εντοπίσει εξωδερματική νόσο. Οι 8 ασθενείς με δευτεροπαθή δερματικά λεμφώματα Β-αρχής (5 άνδρες και 3 γυναίκες, ασθενείς 25-32) (Πίνακας 14δ), θεωρήθηκε ότι παρουσίασαν προηγούμενα ή ταυτόχρονα συστηματικό λέμφωμα.

Πριν την αποθήκευση του βιοπτικού υλικού πραγματοποιήθηκαν διαγνωστικά ανοσοιστοχημικές χρώσεις ρουτίνας σε όλες τις βιοψίες για τον προσδιορισμό του ανοσοφαινοτύπου των βλαβών. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε μια σειρά από μονοκλωνικά αντισώματα έναντι των Β-λεμφοκυττάρων (anti-Ig, CD20, CD22), των Τ-λεμφοκυττάρων (CD2, CD3, CD4, CD5, CD8) καθώς και αντιγόνων της σειράς των μονοκυττάρων – μακροφάγων (CD68). Η λήψη των βιοψιών έγινε πριν την έναρξη της θεραπείας.

β. Μέθοδοι - Μεθοδολογία

Για το σκοπό της μελέτης έγιναν χρώσεις με μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του Fas (FAS6 αντίσωμα, ευγενική προσφορά του Dr Lucien A.Aarden)(188), του FasL (κλώνος 33; Transduction Laboratories, Lexington, U.S.A.), του ICAM-1/CD54 (MEM-111; Sanbio, Uden, The Netherlands), του HLA-DR (H2-5.10; Dutch Red Cross Central Laboratory of Blood Transfusion, Amsterdam, The Netherlands) και του Bcl-2 (κλώνος 124; DAKO, Glostrup, Denmark). Οι χρώσεις έγιναν σε κατεψυγμένες τομές και στους 32 ασθενείς, όπως ήδη περιγράφηκε στην αρχή του ειδικού μέρους («Μέθοδοι-Μεθοδολογία»).

Σε 22 από τους 32 ασθενείς της μελέτης έγινε επίσης επώαση σε τομές παραφίνης με μονοκλωνικά αντισώματα κατά του FasL και κατά της Bcl-2 με την τεχνική των τριών διαδοχικών βημάτων στρεπταβιδίνης-βιοτίνης-περοξειδάσης, η οποία επίσης περιγράφηκε στην αρχή του ειδικού μέρους («Μέθοδοι-Μεθοδολογία»).

γ. Μάρτυρες

Για τη χρώση Bcl-2, τόσο στις κατεψυγμένες τομές όσο και στις τομές παραφίνης, τα θετικά για Bcl-2 αντιδραστικά Τ-λεμφοκύτταρα χρησίμευσαν ως εσωτερικός θετικός μάρτυρας.

Για τη χρώση με Fas, ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τομές από λεμφοζιδιακά κέντρα αμυγδαλών (2 ασθενείς) ή αντιδραστικών λεμφαδένων (2 ασθενείς), τα οποία χρωματίζονται έντονα θετικά. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν τομές φυσιολογικού δέρματος (5 ασθενείς), όπου ο υποδοχέας Fas εκφράζεται από τα

επιδερμικά κερατινοκύτταρα, τα κύτταρα των τριχοφόρων θυλάκων, τους σμηγματογόνους και ιδρωτοποιούς αδένες, τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων και τα αντιδραστικά T-λεμφοκύτταρα.

Για την επιβεβαίωση της ειδικότητας της χρώσης του αντισώματος για FasL έγιναν τα ακόλουθα :

- 1) μελετήθηκαν Jurkat T- λεμφοκύτταρα, τα οποία έδειξαν γρήγορη έκφραση του FasL μετά από διέγερση με PHA για 2 ώρες(107)
- 2) βάφτηκαν κατεψυγμένες τομές και τομές παραφίνης από μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (2 ασθενείς), με σκοπό να χρησιμοποιηθούν ως θετικοί μάρτυρες. Οι τομές εμφάνισαν κοκκώδη κυτταροπλασματική και μεμβρανική χρώση για το αντίσωμα FasL(92).
- 3) χρησιμοποιήθηκαν τομές φυσιολογικού δέρματος (5 ασθενείς), όπου ο υποδοχέας FasL εκφράζεται από τα κερατινοκύτταρα, τους σμηγματογόνους και ιδρωτοποιούς αδένες (όπως ήδη έχει αναφερθεί στο γενικό μέρος).
- 4) Χρησιμοποιήθηκαν τομές από αντιδραστικούς λεμφαδένες (2 ασθενείς) και αμυγδαλή (2 ασθενείς) όπου ο FasL εκφράζεται από ένα μέρος των κυττάρων των λεμφοζιδιακών κέντρων, καθώς και από διάσπαρτα κύτταρα στη ζώνη του μανδύα και στις περιοχές μεταξύ των θυλακικών κέντρων(149).

δ. Στατιστικές Μέθοδοι

Οι καμπύλες επιβίωσης διαμορφώθηκαν με τη μέθοδο Kaplan-Meier. Ο χρόνος επιβίωσης μετρήθηκε από το χρόνο της αρχικής διάγνωσης του λεμφώματος έως το χρόνο του θανάτου από τη νόσο ή την απώλεια της κλινικής επανεκτίμησης του ασθενούς.

Οι διαφορές ανάμεσα στις καμπύλες επιβίωσης αναλύθηκαν με τη δοκιμασία log-rank. Πραγματοποιήθηκε πολυπαραγοντική ανάλυση με τη χρήση του Cox-proportional hazards model (όριο εισαγωγής και απομάκρυνσης 0.1). Όλες οι αξίες p βασίστηκαν σε δίπτυχη στατιστική ανάλυση. Όσες αξίες p βρέθηκαν κάτω από 00.5 θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές. Όλες οι αναλύσεις έγιναν με τη χρήση του προγράμματος SPSS (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

ε. Αποτελέσματα

Η αξιολόγηση των χρώσεων για Fas, FasL, Bcl-2 και ICAM-1 έγινε “τυφλά” από δύο ανεξάρτητους ερευνητές. Στις λίγες περιπτώσεις όπου υπήρξε διαφορετική εκτίμηση οι τομές διαβάστηκαν από κοινού από τους δύο ερευνητές σε οπτικό μικροσκόπιο διπλής κεφαλής και καταγράφηκε το αποτέλεσμα στο οποίο υπήρχε συμφωνία. Προσδιορίστηκαν τέσσερις κατηγορίες για τα αποτελέσματα των χρώσεων:

1. αρνητική (-) = κανένα ή σποραδικά θετικά νεοπλασματικά Β-λεμφοκύτταρα,
2. ασθενώς θετική (+) = 5-25 % των νεοπλασματικών κυττάρων θετικά,
3. μετρίως θετική (++) = 25-50% των νεοπλασματικών κυττάρων θετικά,
4. έντονα θετική (+++) = άνω του 50 % των νεοπλασματικών κυττάρων θετικά.

Τα αποτελέσματα των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων αναγράφονται στους πίνακες 15,16 και 17.

A) Ο υποδοχέας Fas εκφράστηκε από την πλειοψηφία (>50%) των νεοπλασματικών κυττάρων στις 22 από τις 32 περιπτώσεις ασθενών, καθώς και σε λιγότερο από το 50% των κυττάρων σε άλλες τρεις περιπτώσεις (Πίνακας 15):

- τα 14 πρωτοπαθή δερματικά λεμφώματα του τύπου του λεμφοζιδιακού κέντρου της κεφαλής και του κορμού ήταν έντονα θετικά για Fas (Εικόνα 5).
- 4 από τα 6 πρωτοπαθή δερματικά λεμφώματα από μεγάλα Β-κύτταρα των κάτω άκρων βρέθηκαν έντονα θετικά για Fas.
- τα 4 πρωτοπαθή δερματικά ανοσοκυτώματα βρέθηκαν έντονα θετικά για Fas.
- 3 από τα 8 συστηματικά λεμφώματα ήταν θετικά για Fas, ενώ τα υπόλοιπα πέντε ήταν εντελώς αρνητικά (Πίνακες 14δ και 15).

B) Η χρώση για τον υποδοχέα FasL έδωσε ποικίλλα αποτελέσματα (Πίνακας 15):

- 5 από τα 14 λεμφώματα του τύπου του λεμφοζιδιακού κέντρου της κεφαλής και του κορμού έδειξαν ποικίλλη έκφραση FasL.
- κανένα από τα ανοσοκυτώματα δεν παρουσίασε έκφραση FasL.
- τα 6 λεμφώματα από μεγάλα Β-κύτταρα των κάτω άκρων παρουσίασαν ποικιλία έκφρασης FasL σε ποσοστό 5-75% των νεοπλασματικών κυττάρων.
- τα 8 συστηματικά λεμφώματα ήταν θετικά για FasL (Εικόνα 6).

Πίνακας 14α. Στοιχεία κλινικής παρακολούθησης και αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικών χρώσεων σε 24 πρωτοπαθή και 8 συστηματικά δερματικά λεμφώματα Β-κυτταρικής αρχής.

Πρωτοπαθή δερματικά λεμφώματα τύπου λεμφοζιδιακού κέντρου (πρόγνωση καλή)							
Αρ.	Φ/Η	Θεραπεία	F-up	Fas	FasL	Bcl-2	ICAM-1
1.	Γ/62	ΧΜΘ	Z ⁰ , 98	+++	-	-	
2.	Γ/76	ΧΜΘ	N ⁺ , 41	+++	++	-	+++
3.	Γ/40	ΑΚΘ	Z ⁰ , 105	+++	+	-	+++
4.	Γ/69	ΑΚΘ	Z ⁰ , 127	+++	-	-	+++
5.	Γ/52	ΑΚΘ	Z ⁰ , 41	++	+++	-	+++
6.	A/61	ΑΚΘ	Z ⁺ , 9	+++	-	-	+++
7.	A/69	Χειρ/κη	Z ⁺ , 9	+++	-	-	++
8.	A/50	ΑΚΘ	Z ⁰ , 89	+++	-	-	
9.	A/69	ΑΚΘ	Z ⁰ , 71	+++	+	-	+++
10.	A/71	ΑΚΘ	Z ⁰ , 127	+++	-	-	+++
11.	Γ/61	ΑΚΘ	Z ⁰ , 79	+	++	-	+++
12.	Γ/59	ΧΜΘ	Z ⁰ , 120	+++	-	+++	+++
13.	Γ/64	ΑΚΘ	Z ⁰ , 47	+++	-	-	+++
14.	A/58	ΧΜΘ	Z ⁰ , 32	+++	-	+	+++

ΧΜΘ: χημειοθεραπεία, ΑΚΘ: ακτινοβολία Z⁰: ζών και υγιής, Z⁺: ζών με νόσο, N⁺: νεκρός από τη νόσο.

+++ : >50% των κυττάρων θετικά, ++: 25% έως 50% των κυττάρων θετικά, +: 5% έως 25% των κυττάρων θετικά, -: κανένα ή σποραδικά νεοπλασματικά κύτταρα θετικά

Πίνακας 14β. Στοιχεία κλινικής παρακολούθησης και αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικών χρώσεων σε 24 πρωτοπαθή και 8 συστηματικά δερματικά λεμφώματα Β-κυτταρικής αρχής.

Πρωτοπαθή δερματικά λεμφώματα ποδός από μεγάλα Β-κύτταρα (πρόγνωση μέτρια)							
Αρ.	Φ/Η	Θεραπεία	F-up	Fas	FasL	Bcl-2	ICAM-1
15.	Γ/75	ΑΚΘ	Z ⁰ , 54	+++	+	+++	+++
16.	Γ/83	ΑΚΘ	N ⁺ , 24	+++	++	+++	-
17.	Γ/92	ΑΚΘ	N ⁺ , 9	-	+	+++	-
18.	A/91	ΑΚΘ	N ⁺ , 11	-	+++	+++	+
19.	A/73	ΧΜΘ	N ⁺ , 21	+++	+++	+++	+++
20.	Γ/84	ΑΚΘ	Z ⁰ , 20	+++	++	+++	+++

ΧΜΘ: χημειοθεραπεία, ΑΚΘ: ακτινοβολία

Z⁰: ζών και υγιής, Z⁺: ζών με νόσο, N⁺: νεκρός από τη νόσο.

+++ : >50% των κυττάρων θετικά, ++: 25% έως 50% των κυττάρων θετικά, +: 5% έως 25% των κυττάρων θετικά, -: κανένα ή σποραδικά νεοπλασματικά κύτταρα θετικά

Πίνακας 14γ. Στοιχεία κλινικής παρακολούθησης και αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικών χρώσεων σε 24 πρωτοπαθή και 8 συστηματικά δερματικά λεμφώματα Β-κυτταρικής αρχής.

Πρωτοπαθή δερματικά ανοσοκυττώματα (πρόγνωση άριστη)							
Αρ.	Φ/Η	Θεραπεία	F-up	Fas	FasL	Bcl-2	ICAM-1
21.	Γ/61	ΑΚΘ	Z ⁰ , 66	+++	-	+++	+++
22.	A/47	ΧΜΘ	Z ⁰ , 70	+++	-	+++	+++
23.	Γ/38	ΑΚΘ	Z ⁺ , 38	++	-	+++	+++
24.	Γ/74	ΑΚΘ	Z ⁺ , 15	+++	-	+++	+++

ΧΜΘ: χημειοθεραπεία, ΑΚΘ: ακτινοβολία

Z⁰: ζών και υγιής, Z⁺: ζών με νόσο, N⁺: νεκρός από τη νόσο.

+++ : >50% των κυττάρων θετικά, ++: 25% έως 50% των κυττάρων θετικά, +: 5% έως 25% των κυττάρων θετικά, -: κανένα ή σποραδικά νεοπλασματικά κύτταρα θετικά

Πίνακας 14δ. Στοιχεία κλινικής παρακολούθησης και αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικών χρώσεων σε 24 πρωτοπαθή και 8 συστηματικά δερματικά λεμφώματα Β-κυτταρικής αρχής.

Συστηματικά Β-λεμφώματα (πρόγνωση δυσμενής)							
Αρ.	Φ/Η	Θεραπεία	F-up	Fas	FasL	Bcl-2	ICAM-1
25.	Γ/72	ΑΚΘ+CHOP	N ⁺ , 43	-	+++	+++	-
26.	Γ/67	ΧΜΘ	N ⁺ , 56	-	+++	+++	-
27.	Α/71	ΧΜΘ	N ⁺ , 59	-	+++	+++	+++
28.	Α/83	ΧΜΘ	N ⁺ , 4	-	++	+++	-
29.	Α/71	ΧΜΘ	N ⁺ , 12	-	+++	+++	-
30.	Α/72	ΧΜΘ	N ⁺ , 18	+++	+	+++	-
31.	Α/59	ΧΜΘ	Z ⁰ , 15	+++	++	+++	+++
32.	Γ/71	ΧΜΘ	Z ⁺ , 25	+++	+++	+++	+++

ΧΜΘ:χημειοθεραπεία, ΑΚΘ: ακτινοβολία

Z⁰: ζών και υγιής, Z⁺: ζών με νόσο, N⁺: νεκρός από τη νόσο.

+++ : >50% των κυττάρων θετικά, ++: 25% έως 50% των κυττάρων θετικά, +: 5% έως 25% των κυττάρων θετικά, -: κανένα ή σποραδικά νεοπλασματικά κύτταρα θετικά

Πίνακας 15. Έκφραση Fas και Fas-L από τα νεοπλασματικά κύτταρα σε πρωτοπαθή και συστηματικά λεμφώματα Β-κυτταρικής αρχής

Διάγνωση	N	Fas (ποσοστό %θετικής χρώσης)				Fas-L (ποσοστό% θετικής χρώσης)			
		0%	5-25%	25-50%	>50%	0%	5-25%	25-50%	>50%
Πρωτοπαθή δερματικά λεμφώματα τύπου λεμφοζιδιακού κέντρου κεφαλής-κορμού	14	0	1	1	12	9	2	2	1
Πρωτοπαθή δερματικά λεμφώματα ποδός από μεγάλα Β-κύτταρα	6	2	0	0	4	0	2	2	2
Πρωτοπαθή ανοσοκυττώματα	4	0	0	1	3	4	0	0	0
Συστηματικά Β- λεμφώματα με δερματική εντόπιση	8	5	0	0	3	0	1	2	5

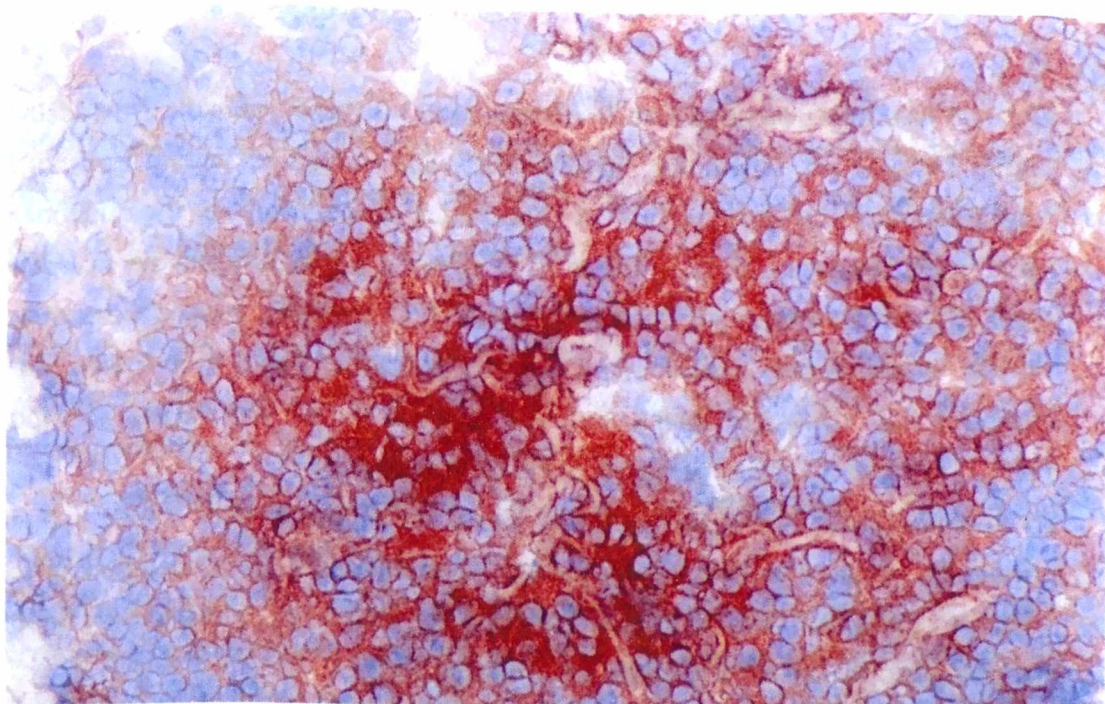
Πίνακας 16. Έκφραση Bcl-2 από τα νεοπλασματικά κύτταρα σε πρωτοπαθή και συστηματικά λεμφώματα Β-κυτταρικής αρχής

Διάγνωση	N	Bcl-2 (ποσοστό %θετικής χρώσης)			
		0%	5-25%	25-50%	>50%
Πρωτοπαθή δερματικά λεμφώματα τύπου λεμφοζιδιακού κέντρου κεφαλής-κορμού	14	12	1	0	1
Πρωτοπαθή δερματικά λεμφώματα ποδός από μεγάλα B-κύτταρα	6	0	0	0	6
Πρωτοπαθή ανοσοκυττώματα	4	0	0	0	4
Συστηματικά Β-λεμφώματα με δερματική εντόπιση	8	0	0	0	8

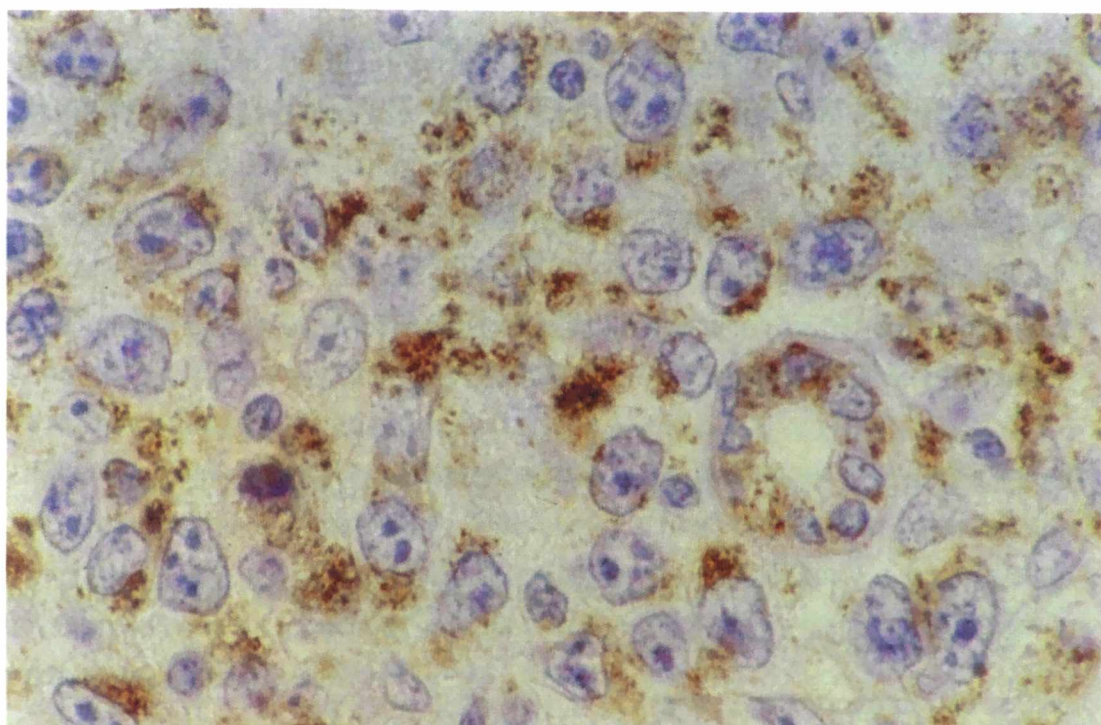
Πίνακας 17. Συσχέτιση της έκφρασης Fas και FasL από τα νεοπλασματικά Β-κύτταρα με την επιβίωση σε 28 ασθενείς με πρωτοπαθή και συστηματικά λεμφώματα Β-κυτταρικής αρχής.

Fas	FasL	Αρ. ασθενών	Z ⁰	Z ⁺	N ⁰	N ⁺	Μέση επιβίωση σε μήνες (διακύμανση)
+	-	9	7	2	-	-	89 (9-127)
-	+	7	-	-	-	7	12 (4-59)
+	+	12	6	2	-	4	33 (15-105)

Z⁰: ζωντανοί και υγιείς, **Z⁺**: ζωντανοί με νόσο, **N⁰**: νεκροί, άσχετα από τη νόσο, **N⁺**: νεκροί από τη νόσο.



Εικόνα 5. Πρωτοπαθές δερματικό λέμφωμα κεφαλής του τύπου του λεμφοζιδιακού κέντρου. Έκφραση Fas ανιχνεύθηκε σε περισσότερα από 75% των νεοπλασματικών κυττάρων (κατεψυγμένη τομή).



Εικόνα 6. Μεταστατικό δερματικό Β-λέμφωμα. Πάνω από 50% των νεοπλασματικών κυττάρων εκφράζει FasL (τομή παραφίνης).

Στα τρία ψευδο-λεμφώματα από Β-κύτταρα που συμπεριλήφθηκαν στην έρευνα ως ομάδα ελέγχου και σύγκρισης, τα αποτελέσματα των χρώσεων για Fas και FasL ήταν πανομοιότυπα με εκείνα των αντιδραστικών λεμφαδένων και της αμυγδαλής. Ο υποδοχέας Fas εκφράστηκε έντονα από τα κύτταρα των λεμφοζιδιακών κέντρων, όχι όμως από τα Β-κύτταρα της ζώνης του μανδύα. Οι περιοχές ανάμεσα στα θυλακικά κέντρα παρουσίασαν ασθενέστερη χρώση για Fas. FasL ανιχνεύθηκε σε ένα ποσοστό των κυττάρων των βλαστικών κέντρων και σε διάσπαρτα κύτταρα του μανδύα και των περιοχών μεταξύ των θυλακικών κέντρων.

Τα αποτελέσματα των χρώσεων για FasL σε κατεψυγμένες τομές και τομές παραφίνης υπήρξαν ταυτόσημα σε 18 από 22 περιπτώσεις. Σε τέσσερις περιπτώσεις ο FasL ανιχνεύθηκε μόνο σε κατεψυγμένες τομές, ενώ οι τομές παραφίνης βρέθηκαν αρνητικές ακόμη και για τα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Γ) Τα αποτελέσματα των χρώσεων για την πρωτεΐνη Bcl-2 (Πίνακας 16), που αναστέλλει την απόπτωση και παρατείνει τη ζωή των κυττάρων, ήταν συμβατά με εκείνα προηγούμενων ερευνών(164;189;190):

- μόνον 2 από τα 14 λεμφώματα του τύπου του λεμφοζιδιακού κέντρου της κεφαλής και του κορμού παρουσίασαν έκφραση Bcl-2.
- τα 6 λεμφώματα από μεγάλα Β-κύτταρα των κάτω άκρων παρουσίασαν έντονη έκφραση Bcl-2.
- τα 8 συστηματικά λεμφώματα ήταν έντονα θετικά για Bcl-2.
- όλα τα ανοσοκυττώματα ήταν έντονα θετικά για Bcl-2.

Εάν εξαιρέσουμε τα ανοσοκυττώματα, η έκφραση Bcl-2 συμβάδιζε με την έκφραση FasL σε 21 από 28 ασθενείς.

Δ) Έκφραση του προσκολλητικού μορίου ICAM-1 ανιχνεύθηκε (Πίνακες 14α, 14β, 14γ και 14δ):

- στα 12 από τα 12 λεμφώματα του τύπου του λεμφοζιδιακού κέντρου της κεφαλής και του κορμού που εξετάστηκαν.
- σε όλα τα ανοσοκυττώματα
- σε 3 από τα 6 λεμφώματα από μεγάλα Β-κύτταρα των κάτω άκρων.
- σε 3 από τα 8 συστηματικά λεμφώματα.

Η έκφραση του Fas συσχετιζόταν με την έκφραση του ICAM-1 στις 26 από τις 30 περιπτώσεις.

Ε) Τέλος, το αντιγόνο HLA-DR εκφραζόταν σταθερά από τη μεγάλη πλειοψηφία των νεοπλασματικών Β-κυττάρων και στις 29 περιπτώσεις όπου μελετήθηκε, με την εξαίρεση τριών λεμφωμάτων από μεγάλα Β-κύτταρα στο πόδι.

ΣΤ) Συσχέτιση Της Έκφρασης Fas, FasL, Bcl-2 και ICAM-1 με την Κλινική Πορεία

Στατιστική ανάλυση εφαρμόστηκε σε 28 από τις 32 περιπτώσεις ασθενών που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη. Από τη στατιστική ανάλυση εξαιρέθηκε η ομάδα των τεσσάρων ασθενών με πρωτοπαθή δερματικά ανοσοκυτώματα, τα μοναδικά λεμφώματα από “μικρά Β-κύτταρα”.

Η μονοπαραγοντική ανάλυση επιβίωσης έδειξε ότι όλες οι μεταβλητές που ελέγχθηκαν, δηλαδή ο ιστολογικός τύπος του δερματικού λεμφώματος, η ηλικία του ασθενούς, τα επίπεδα έκφρασης των Fas, FasL, Bcl-2 και ICAM-1, σχετίζονται σε σημαντικό βαθμό με την κλινική πορεία του ασθενούς. Η έκφραση των Fas και ICAM-1 στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων σχετίζεται με ευνοική για τον ασθενή πρόγνωση (p values 0.0001 και 0.0006 αντίστοιχα). Η έκφραση FasL και Bcl-2 από τα καρκινικά κύτταρα συνδέεται με επιθετικότερη συμπεριφορά και χειρότερη πρόγνωση (p values 0.008 και 0.002 αντίστοιχα).

Είναι χαρακτηριστικό ότι 11 από τους 19 ασθενείς που παρουσίασαν FasL-θετικό δερματικό λέμφωμα απεβίωσαν από τη νόσο (Πίνακας 18). Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε αντιπαράθεση με το γεγονός ότι κανένας από τους εννέα ασθενείς με FasL-αρνητικό δερματικό λέμφωμα δεν κατέληξε από τη νόσο. Ο συνδυασμός έκφρασης FasL από τα νεοπλασματικά κύτταρα με ταυτόχρονη απουσία έκφρασης Fas, φαίνεται να προσδιορίζει μία ομάδα ασθενών με φτωχή πρόγνωση. Στην έρευνά μας όλοι οι ασθενείς που παρουσίαζαν αυτό το συνδυασμό (7 στους 7) απεβίωσαν από τη νόσο (Πίνακας 18).

Εάν όλες οι μεταβλητές συμπεριληφθούν για πολυπαραγοντική ανάλυση στο μοντέλο πιθανότητας κινδύνου Cox, διαφαίνεται ότι μόνο η ηλικία του ασθενούς και ο ιστολογικός τύπος του δερματικού λεμφώματος παρουσιάζονται ως ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράμετροι. Όλες οι υπόλοιπες μεταβλητές δε φαίνεται να διαθέτουν επιπλέον προγνωστική αξία.

στ. Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη ανευρέθηκαν διαφορετικά πρότυπα έκφρασης των υποδοχέων της απόπτωσης Fas και FasL, σε καλά διαχωρισμένες ομάδες πρωτοπαθών και δευτεροπαθών δερματικών λεμφωμάτων Β-κυτταρικής αρχής.

Τα πρωτοπαθή δερματικά λεμφώματα του τύπου του λεμφοζιδιακού κέντρου με βλάβες περιορισμένες στην κεφαλή και τον κορμό παρουσίασαν έντονη έκφραση του Fas (14 στις 14 περιπτώσεις) και του ICAM-1 (12 στις 12 περιπτώσεις). Στα ίδια αυτά λεμφώματα η πρωτεΐνη Bcl-2 και ο FasL δεν εκφράστηκαν καθόλου ή εκφράστηκαν σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα λεμφώματα αυτά, αν και έχουν αρκετά συχνά την ιστολογική εικόνα ενός λεμφώματος από διάχυτα μεγάλα Β-κύτταρα (ιδιαίτερα όταν οι βλάβες έχουν τη μορφή ογκιδίων), έχουν πολύ καλή πρόγνωση με πενταετή επιβίωση μεγαλύτερη του 95%(165;169;191).

Κατά παρόμοιο τρόπο, τα πρωτοπαθή δερματικά ανοσοκυττώματα παρουσίασαν έντονη έκφραση του Fas χωρίς καθόλου έκφραση FasL. Τα πρωτοπαθή δερματικά ανοσοκυττώματα έχουν επίσης εξαιρετική πρόγνωση και επί του παρόντος δεν έχει αναφερθεί κανένας θάνατος από τη νόσο στη βιβλιογραφία(192).

Τα πρωτοπαθή δερματικά λεμφώματα από μεγάλα Β-κύτταρα των κάτω άκρων, έχουν προσφάτως περιγραφεί ως ξεχωριστή ομάδα πρωτοπαθών δερματικών λεμφωμάτων Β-κυτταρικής αρχής(166). Τα λεμφώματα αυτά προσβάλλουν κυρίως ηλικιωμένα άτομα, εμφανίζουν μεγαλύτερη συχνότητα υποτροπών και συστηματικής νόσου, έχουν δε χειρότερη πρόγνωση από τα πρωτοπαθή δερματικά λεμφώματα του τύπου του λεμφοζιδιακού κέντρου της κεφαλής και του κορμού. Τέσσερις από τους έξι ασθενείς που περιλαμβανόταν στην παρούσα μελέτη με δερματικά λεμφώματα ποδός από μεγάλα Β-κύτταρα απεβίωσαν από τη νόσο 9-24 μήνες από τη διάγνωση. Οι χρώσεις για Fas και FasL στην ομάδα αυτή έδωσαν ποικιλία αποτελεσμάτων. Έχει όμως ενδιαφέρον το γεγονός ότι οι δύο περιπτώσεις που βρέθηκαν εντελώς αρνητικές στο Fas είχαν και τη μικρότερη επιβίωση (ασθενείς 17 και 18, Πίνακας 14β). Επιπλέον, τα λεμφώματα αυτής της κατηγορίας εμφανίζουν χαμηλή ή καθόλου έκφραση του προσκολλητικού μορίου ICAM-1 (που υποβοηθά τη σταθερή σύνδεση νεοπλασματικού κυττάρου με τα κυτταροτοξικά Τ-λεμφοκύτταρα) και έντονη έκφραση της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2, αποτέλεσμα συμβατό με τα αποτελέσματα προηγούμενων ερευνών(154;164).

Τα συστηματικά δερματικά λεμφώματα Β-κυτταρικής αρχής, ιδιαίτερα μάλιστα εκείνα που προέρχονται από λεμφώματα με διάχυτα μεγάλα Β-κύτταρα, έχουν δυσμενέστερη πρόγνωση από τα πρωτοπαθή δερματικά λεμφώματα Β-κυτταρικής αρχής(164). Στους οκτώ ασθενείς της κατηγορίας αυτής που μελετήσαμε, τα νεοπλασματικά Β-κύτταρα παρουσίασαν μέτρια έως έντονη έκφραση FasL σε συνδυασμό μάλιστα με έντονη έκφραση Bcl-2. Ο υποδοχέας Fas ανιχνεύθηκε σε τρεις μόνο περιπτώσεις ασθενών, οι οποίοι χαρακτηριστικά εμφάνιζαν συστηματικό λέμφωμα του τύπου των λεμφοζιδιακών κέντρων στους λεμφαδένες. Στις

υπόλοιπες πέντε περιπτώσεις δεν ανιχνεύθηκε καθόλου Fas. Η ανεύρεση υψηλής έκφρασης Fas και Bcl-2 σε συστηματικά λεμφώματα του τύπου των λεμφοζυδιακών κέντρων έχει επιβεβαιωθεί βιβλιογραφικά και από προηγούμενες μελέτες(149;151;153).

Η στατιστική ανάλυση απέδειξε ότι η έκφραση Fas και ICAM-1 από τα νεοπλασματικά κύτταρα ενός λεμφώματος σχετίζεται με ευνοϊκή πρόγνωση, σε αντίθεση με την έκφραση FasL και Bcl-2 που σχετίζεται με πολύ δυσμενέστερη πρόγνωση. Παρά το γεγονός ότι με την πολυπαρογοντική ανάλυση, τόσο η έκφραση Fas και FasL, όσο και έκφραση ICAM-1 και Bcl-2, αποδείχθηκαν ανεξάρτητες προγνωστικές παράμετροι, οι διαφορές στην ανίχνευσή τους μπορούν (τουλάχιστον εν μέρει) να ερμηνεύσουν και τη διαφορετική κλινική συμπεριφορά μεταξύ των διαφόρων υποομάδων δερματικών λεμφωμάτων B-κυτταρικής αρχής.

Γενικεύοντας, από τη μέχρι σήμερα έρευνα, διαπιστώνεται ότι στην επέκταση και μετάσταση των όγκων εμπλέκονται τουλάχιστον τρεις μηχανισμοί, οι οποίοι ουσιαστικά είναι και ενδεικτικοί επιθετικότερης συμπεριφοράς :

Αρχικά παρατηρείται απώλεια της έκφρασης των υποδοχέων Fas και ICAM-1 από τα νεοπλασματικά B-κύτταρα, με αποτέλεσμα διαταραχή της σύνδεσης του νεοπλασματικού κυττάρου με τα κυτταροτοξικά T- λεμφοκύτταρα (που φέρουν στην επιφάνειά τους FasL) και παρεμπόδιση της εξόντωσης αυτού από τα κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος .

Κατά δεύτερο σκοπό, διαπιστώνεται έκφραση του υποδοχέα FasL από τα νεοπλασματικά κύτταρα, μέσω της οποίας αυτά αποκτούν τη δυνατότητα να σκοτώνουν φυσιολογικά διεγερμένα κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος (που φέρουν στην επιφάνειά τους Fas).

Τρίτον, ανιχνεύεται αυξημένη έκφραση Bcl-2 από τα νεοπλασματικά κύτταρα, η οποία δύναται να τα καταστήσει «αναίσθητα» στους μηχανισμούς της απόπτωσης και κατά συνέπεια αθάνατα (όπως ήδη αναφέρθηκε στο γενικό μέρος, η πρωτεΐνη Bcl-2 μπορεί να αναστείλλει, τουλάχιστον εν μέρει, την αποπτωτική οδό Fas-FasL).

Όσον αφορά την έκφραση Fas, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης καθώς και τα στοιχεία από τη βιβλιογραφία, καθαρά συνηγορούν υπέρ του γεγονότος ότι συνοδεύεται από ευνοϊκότερη πρόγνωση. Απώλεια της έκφρασης ή λειτουργική αδρανοποίηση του Fas σχετίζεται με επιθετικότερη νεοπλασματική συμπεριφορά(151;193). Επί παραδείγματι, στα ηπατοκυτταρικά καρκινώματα τα κακοήγη κύτταρα απωλείουν κατά την εξέλιξη της νόσου τον υποδοχέα Fas και αρχίζουν να εκφράζουν τον υποδοχέα FasL(47). Έτσι καθίστανται λιγότερο ευάλωτα στον αποπτωτικό θάνατο μέσω κυτταροτοξικών T-κυττάρων που φέρουν στην επιφάνειά τους τον υποδοχέα FasL.

Συμβατό με όσα αναφέρθηκαν είναι το γεγονός ότι στην παρούσα μελέτη και οι επτά ασθενείς με Fas-αρνητικά λεμφώματα απεβίωσαν από συστηματικό λέμφωμα σε διάστημα 4-59 μηνών από τη διάγνωση (μέσος όρος 12 μήνες). Η παρατήρηση αυτή είναι σημαντική αν την συγκρίνουμε με τον αριθμό των ασθενών με Fas-θετικό λέμφωμα, οι οποίοι απεβίωσαν από συστηματική νόσο και οι οποίοι ήταν μόνο 4 από τους 25 ασθενείς. Η δυσμενής εξέλιξη στους τρεις από τους τέσσερις αυτούς ασθενείς με Fas-θετικό λέμφωμα (ασθενείς 16, 19 και 30, Πίνακες 14β,γ,δ) μπορεί να ερμηνευθεί από το γεγονός ότι τα λεμφώματα αυτά εξέφραζαν έντονα την πρωτεΐνη Bcl-2. (194-196).

Όσον αφορά την έκφραση FasL, σημειώνουμε ότι 11 από τους 19 ασθενείς με FasL-θετικό λέμφωμα απεβίωσαν τελικά από τη νόσο. Αντίθετα, κανένας από τους 13 ασθενείς με FasL-αρνητικό λέμφωμα δεν κατέληξε. Τις παρατηρήσεις αυτές ενισχύει πρόσφατη έρευνα σε συστηματικά λεμφώματα Β-κυτταρικής αρχής, όπου επιδεικνύεται έντονη έκφραση FasL σε επιθετικά λεμφώματα και ασθενής ή απύουσα έκφραση σε μη-επιθετικά(157).

Υψηλή έκφραση FasL έχει ανευρεθεί σε νεοπλασματικά κύτταρα από μελανώματα, αστροκυτώματα, καρκινώματα του πνεύμονα και του παχέως εντέρου(90-92;193;197). Η έκφραση FasL από τους όγκους αυτούς πιθανόν να επικουρεί την ανοσοδιαφυγή των νεοπλασματικών κυττάρων με τρεις τουλάχιστον τρόπους. Πρώτον, τα FasL-θετικά νεοπλασματικά κύτταρα μπορούν να σκοτώσουν τα περιβάλλοντα Fas-θετικά κοκκιοκύτταρα και μακροφάγα. Έτσι καταστέλλονται πρώιμες φλεγμονώδεις αντιδράσεις και ελαττώνεται η τοπική συσσώρευση φλεγμονωδών κυτταροκινών(91;197).

Δεύτερον, τα FasL-θετικά νεοπλασματικά κύτταρα μπορούν να σκοτώσουν τα Fas-θετικά κυτταροτοξικά Τ-λεμφοκύτταρα που διηθούν τον όγκο. Τρίτον, η αυξημένη παραγωγή μεμβρανικού FasL μπορεί να προκαλέσει απέκκριση διαλυτού sFasL με αυτοκρινικό τρόπο, ο οποίος ανταγωνίζεται τον μεμβρανικό FasL στη σύνδεσή του με τον Fas. Ο sFasL μπορεί να συνδεθεί με μεμβρανικό Fas σε νεοπλασματικά κύτταρα, το σύμπλεγμα sFasL – Fas να φαγοκυτταρωθεί και να καταστείλει την έκφραση Fas στα νεοπλασματικά κύτταρα(198). Ο μηχανισμός αυτός θα μπορούσε να ερμηνεύσει τη μετατροπή Fas+/FasL- όγκων σε Fas-/FasL+ κατά την εξέλιξη της νόσου, καθώς και τη συχέτιση έκφρασης FasL και επιθετικότερου φαινοτύπου(47;157).

3. Μελέτη των Φαινομένων της Απόπτωσης στα Πρωτοπαθή Δερματικά Λεμφώματα Τ-Κυτταρικής Αρχής

α. Υλικό

Χρησιμοποιήθηκαν βιοψίες 56 δερματικών βλαβών από 52 ασθενείς με δερματικά λεμφώματα Τ-κυτταρικής αρχής. Οι βιοψίες ελήφθησαν πριν την έναρξη της θεραπείας. Στο γενικό μέρος της παρούσας εργασίας (βλέπε «Δερματικά λεμφώματα») αναλύθηκαν με ιδιαίτερη έμφαση οι διαφορές στην κλινική πορεία και πρόγνωση μεταξύ των διαφόρων υποομάδων δερματικών Τ-λεμφωμάτων. Η ομάδα των ασθενών περιελάμβανε:

- 23 ασθενείς με Σπογγοειδή Μυκητίαση
- 10 ασθενείς με Λεμφωματοειδή Βλατίδωση
- 10 ασθενείς με CD30- θετικό λέμφωμα από μεγάλα Τ-κύτταρα
- 9 ασθενείς με CD30-αρνητικό λέμφωμα από μεγάλα Τ-κύτταρα

Στους ασθενείς με Σπογγοειδή Μυκητίαση οι βιοψίες ελήφθησαν από βλάβες του σταδίου των πλακών σε 11 ασθενείς και από βλάβες στο στάδιο των όγκων σε 8 ασθενείς. Επιπλέον, σε 4 ασθενείς ελήφθησαν βιοψίες από βλάβες του τύπου των πλακών κατά τη διάγνωση και ακολούθως κατά την εξέλιξη της νόσου από βλάβες του τύπου των όγκων.

Η διάγνωση βασίστηκε σε ένα συνδυασμό κλινικών, ιστολογικών και ανοσοφαινοτυπικών κριτηρίων, όπως ήδη περιγράφηκε στο γενικό μέρος. Σε όλους τους ασθενείς με CD30-θετικά ή CD30-αρνητικά λεμφώματα από μεγάλα Τ-κύτταρα, έγινε λεπτομερής σταδιοποίηση με κλινική εξέταση, γενική αίματος, ακτινογραφία θώρακα, αξονική τομογραφία θώρακα και κοιλιάς και βιοψία μυελού. Ο προαναφερόμενος έλεγχος έγινε επιπλέον για τον αποκλεισμό εξωδερματικής εντόπισης της νόσου κατά τη διάγνωση.

Πριν την αποθήκευση του βιοψτικού υλικού εφαρμόστηκαν διαγνωστικά ανοσοιστοχημικές χρώσεις ρουτίνας σε όλες τις βιοψίες για τον προσδιορισμό του ανοσοφαινοτύπου των βλαβών. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε μια σειρά από μονοκλωνικά αντισώματα έναντι των Τ-λεμφοκυττάρων (CD2, CD3, CD4, CD5, CD8), των Β-λεμφοκυττάρων (CD20, CD79a), καθώς και αντιγόνων της σειράς των μονοκυττάρων–μακροφάγων (CD68) και του CD30 αντιγόνου.

β. Μέθοδοι – Μεθοδολογία

Για το σκοπό της μελέτης έγιναν χρώσεις με μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του Fas (FAS6, προσφορά του Dr Lucien A.Aarden)(188), και του FasL (κλώνος 33; Transduction Laboratories, Lexington, U.S.A.), σε κατεψυγμένες τομές με τη διαδικασία που αναφέρθηκε στην αρχή του ειδικού μέρους («Μέθοδοι-Μεθοδολογία»).

Σε 40 από 51 ασθενείς της μελέτης (συμπεριλαμβανομένων όλων των ασθενών με Σπογγοειδή Μυκητίαση) τομές βιοψιών μονιμοποιημένων σε παραφίνη από τις ίδιες βλάβες (31 ασθενείς) ή παρόμοιες ταυτόχρονες βλάβες (9 ασθενείς), επώαστηκαν με μονοκλωνικά αντισώματα κατά του υποδοχέα FasL (κλώνος 33) με την τεχνική των τριών διαδοχικών βημάτων στρεπταβιδίνης-βιοτίνης-περοξειδάσης, η οποία έχει επίσης περιγραφεί στην αρχή του ειδικού μέρους («Μέθοδοι-Μεθοδολογία»).

γ. Μάρτυρες

Για τη χρώση με Fas, ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τομές από λεμφοζιδιακά κέντρα αμυγδαλών (2 ασθενείς) ή αντιδραστικών λεμφαδένων (2 ασθενείς), τα οποία χρωματίζονται έντονα θετικά(150). Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν τομές φυσιολογικού δέρματος (5 ασθενείς), όπου ο υποδοχέας Fas εκφράζεται από τα επιδερμικά κερατινοκύτταρα, τα κύτταρα των τριχοφόρων θυλάκων, τους σμηγματογόνους και ιδρωτοποιούς αδένες, τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων και τα αντιδραστικά T-λεμφοκύτταρα.

Για την επιβεβαίωση της ειδικότητας της χρώσης του αντισώματος για FasL χρησιμοποιήθηκαν :

- 1)κατεψυγμένες τομές και τομές παραφίνης από μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (2 ασθενείς). Οι τομές εμφάνισαν κοκκώδη κυτταροπλασματική και μεμβρανική χρώση για το αντίσωμα FasL(92).
- 2)τομές φυσιολογικού δέρματος (5 ασθενείς), όπου ο υποδοχέας FasL εκφράζεται από τα κερατινοκύτταρα, τους σμηγματογόνους και ιδρωτοποιούς αδένες (βλέπε γενικό μέρος)
- 3)τομές από αντιδραστικούς λεμφαδένες (2 ασθενείς) και αμυγδαλή (2 ασθενείς) όπου ο FasL εκφράζεται από ένα μέρος των κυττάρων των λεμφοζιδιακών κέντρων,

καθώς και από διάσπαρτα κύτταρα στη ζώνη του μανδύα και στις περιοχές μεταξύ των θυλακικών κέντρων(150).

Σημειώνεται ότι η σύγκριση της έκφρασης FasL σε τομές παραφίνης και κατεψυγμένες τομές των θετικών μαρτύρων έδωσε ταυτόσημα αποτελέσματα.

δ. Αξιολόγηση χρώσεων

Η αξιολόγηση των χρώσεων για Fas και FasL, έγινε τυφλά από δύο ανεξάρτητους ερευνητές. Στις λίγες περιπτώσεις όπου υπήρξε διαφορετική εκτίμηση οι τομές διαβάστηκαν από κοινού σε οπτικό μικροσκόπιο διπλής κεφαλής και καταγράφηκε το αποτέλεσμα στο οποίο υπήρχε συμφωνία.

Η αξιολόγηση των ποσοστών των νεοπλασματικών T-κυττάρων που εκφράζουν Fas έγινε σε κατεψυγμένες τομές. Η αξιολόγηση των ποσοστών των νεοπλασματικών κυττάρων που εκφράζουν FasL έγινε τόσο σε κατεψυγμένες τομές όσο και σε τομές παραφίνης. Σημειώνεται ότι δεν ανευρέθηκαν ουσιαστικές διαφορές στην έκφραση FasL ανάμεσα στις κατεψυγμένες τομές και τις τομές παραφίνης. Γενικά πάντως, λόγω της ανωτερότητας στη μορφολογική απεικόνιση των βλαβών, οι τομές παραφίνης προτιμήθηκαν.

Τη διάκριση ανάμεσα στα νεοπλασματικά T-κύτταρα και τα αντιδραστικά T-λεμφοκύτταρα διευκόλυναν: 1) το μέγεθος των νεοπλασματικών T-κυττάρων στα πρωτοπαθή δερματικά CD30-θετικά ή CD30-αρνητικά λεμφώματα από μεγάλα T-κύτταρα, τη Λεμφωματοειδή Βλατίδωση και στους περισσότερους ασθενείς με Σπογγοειδή Μυκητίαση του σταδίου των όγκων, 2) η ανάγνωση διαδοχικών τομών βαμμένων για τα επιφανειακά αντιγόνα CD3, CD4, CD8, CD30 και CD68, και 3) στην περίπτωση της χρώσης για FasL, η σύγκριση με τα αποτελέσματα στις τομές παραφίνης σε 40 από τους 51 ασθενείς.

Στις τομές παραφίνης από ασθενείς με Σπογγοειδή Μυκητίαση του σταδίου των πλακών, τα θετικά για FasL νεοπλασματικά T-κύτταρα αναγνωρίστηκαν εύκολα από το νεφροειδή (εγκεφαλοειδή) πυρήνα τους, την εμφάνιση "άλου" και τη χαρακτηριστική στοίχισή τους στο δερμοεπιδερμικό όριο.

Περισσότερο δύσκολος αποδείχθηκε ο ακριβής προσδιορισμός των Fas-θετικών ή Fas-αρνητικών νεοπλασματικών T-κυττάρων στις κατεψυγμένες τομές βλαβών Σπογγοειδούς Μυκητιάσεως του σταδίου των πλακών. Για το λόγο αυτό τα ποσοστά των νεοπλασματικών T-κυττάρων που εκφράζουν Fas ή FasL αξιολογήθηκαν με τη χρήση των ακολούθων τριών ευρέων κατηγοριών:

- 1) αρνητική (κανένα ή σποραδικά <5% θετικά νεοπλασματικά T-λεμφοκύτταρα)
- 2) ασθενώς έως μετρίως θετική (5-50% των νεοπλασματικών κυττάρων θετικά)

3) έντονα θετική (άνω του 50 % των νεοπλασματικών κυττάρων θετικά)

ε. Αποτελέσματα

Σπογγοειδής μυκητίαση

Σε όλες τις περιπτώσεις ασθενών με νόσο στο στάδιο των πλακών, όπου η πρόγνωση είναι πολύ καλή, ο υποδοχέας Fas εκφράστηκε από όλα τα επιδερμικά T-λεμφοκύτταρα, τόσο τα νεοπλασματικά όσο και τα αντιδραστικά (Πίνακας 18). Παρόλα ταύτα, αθροίσεις ενδοεπιδερμικές μεγάλων νεοπλασματικών T- κυττάρων σε 15 περιπτώσεις ασθενών ήταν καθαρά αρνητικές για Fas.

Ανοσοιστοχημικές χρώσεις σε παραφίνη για FasL από βλάβες στο στάδιο των πλακών, έδωσαν κοκκώδη ενδοκυτταροπλασματική χρώση στην πλειψηφία των νεοπλασματικών T-κυττάρων σε εννέα περιπτώσεις, ενώ σε άλλες έξι περιπτώσεις το 25-50% των νεοπλασματικών κυττάρων εξέφραζαν FasL. Τα ενδοεπιδερμικά νεοπλασματικά T-κύτταρα (χαρακτηριστικά της Σπογγοειδούς Μυκητιάσεως) ήταν κατά γενικό κανόνα FasL-θετικά.

Στη Σπογγοειδή Μυκητίαση του σταδίου των όγκων, όπου η πρόγνωση επιβαρύνεται, τα νεοπλασματικά T-κύτταρα ήταν εντελώς Fas-αρνητικά σε 6 από 12 περιπτώσεις (Εικόνα 7), ενώ σε άλλες δύο περιπτώσεις μία μειοψηφία νεοπλασματικών T-κυττάρων εξέφραζε Fas. Στις υπόλοιπες τέσσερις περιπτώσεις, άνω του 50% των νεοπλασματικών κυττάρων ήταν θετικά για Fas, συμπεριλαμβανομένου και ενός αξιολογού ποσοστού (περίπου 15%) ανάμικτων CD30-θετικών βλαστικών κυττάρων σε δύο ασθενείς.

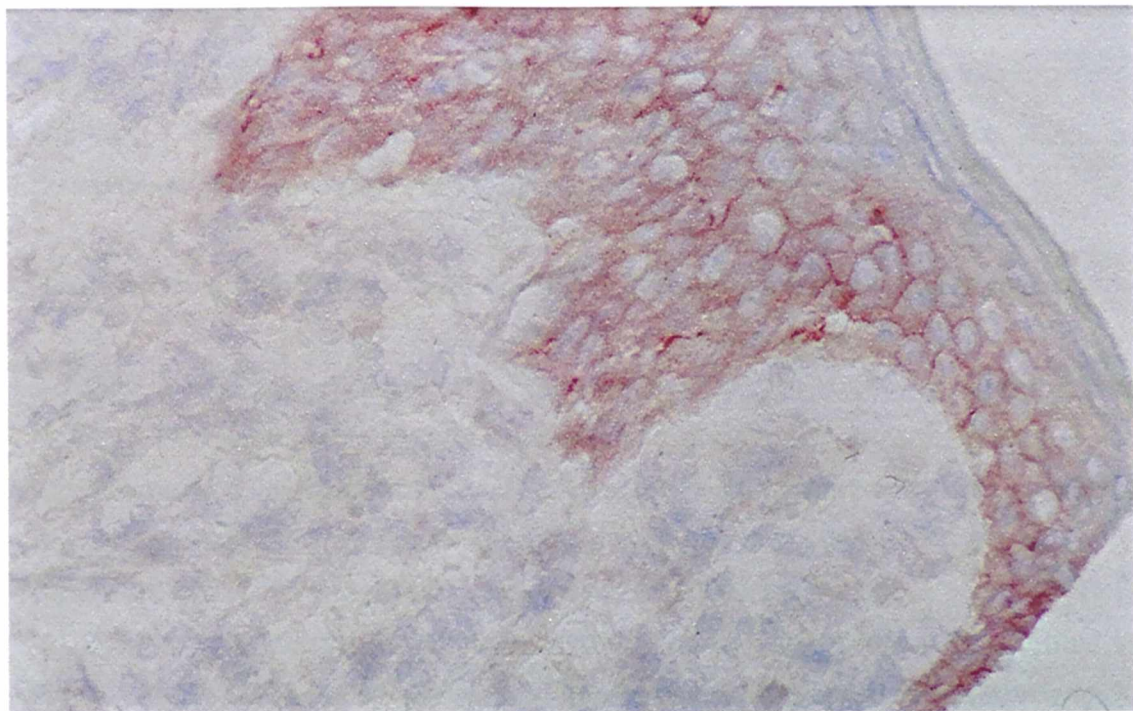
Έκφραση του FasL παρατηρήθηκε σε πάνω από το 50% των νεοπλασματικών T-κυττάρων σε 10 από 12 ασθενείς. Επιπλέον, σε άλλες δύο περιπτώσεις το 40% των κυττάρων του όγκου ήταν FasL-θετικά (Πίνακας 18). Σε τρεις από τους τέσσερις ασθενείς όπου μελετήθηκαν βλάβες τόσο από το στάδιο των πλακών όσο και από το στάδιο των όγκων (κατά την εξέλιξη της νόσου), παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στην έκφραση του υποδοχέα Fas κατά τη μετάπτωση της νόσου από το στάδιο των πλακών σε εκείνο των όγκων.

Η παρακολούθηση της κλινικής πορείας των ασθενών με Σπογγοειδή Μυκητίαση στο χρόνο έδειξε ότι 8 από τους 12 ασθενείς με νόσο στο στάδιο των όγκων απεβίωσαν από τη νόσο σε διάστημα 4-89 μηνών (κατά μέσο όρο 12 μήνες) από την ανάπτυξη δερματικών όγκων. Επίσης δύο ασθενείς απεβίωσαν από αίτια μη σχετιζόμενα με τη νόσο, ενώ δύο ασθενείς εξακολουθούσαν να βρίσκονται εν ζωή με

ενεργό νόσο, 36 και 56 μήνες μετά τη διάγνωση. Συσχετίζοντας την έκφραση Fas με την κλινική πορεία παρατηρήσαμε ότι επτά από τους οχτώ ασθενείς με χαμηλή ή

Πίνακας 18. Έκφραση Fas και Fas-L από τα νεοπλασματικά κύτταρα σε διάφορους τύπους δερματικών T- λεμφωμάτων

Διάγνωση	N	Fas (ποσοστό %θετικής χρώσης)			Fas-L (ποσοστό% θετικής χρώσης)		
		0-5%	5-50%	>50%	0-5%	5-50%	>50%
Σπογγοειδής Μυκητίαση :							
Στάδιο πλάκας	15	0	0	15	0	6	9
Στάδιο όγκου	12	6	2	4	0	2	10
Λεμφωματοειδής Βλατίδωση	10	0	0	10	0	0	10
CD30-θετικά Λεμφώματα από μεγάλα T-κύτταρα	10	0	0	10	0	1	9
CD30-αρνητικά Λεμφώματα από μεγάλα T-κύτταρα	9	6	1	2	0	1	8



Εικόνα 7. Σπογγοειδής μυκητίαση σταδίου όγκων. Η ανοσοϊστοχημική χρώση παρουσιάζει έκφραση Fas από τα κερατινοκύτταρα, όχι όμως από τα νεοπλασματικά T-κύτταρα (κατεψυγμένη τομή).

καθόλου έκφραση Fas από τα κακοήθη κύτταρα απεβίωσαν από τη νόσο, σε σύγκριση με έναν μόνο από τους τέσσερις Fas-θετικούς ασθενείς.

Πρωτοπαθείς Δερματικές CD30-θετικές Λεμφουπερπλαστικές Διαταραχές

Στην ομάδα των πρωτοπαθών δερματικών CD30-θετικών λεμφωμάτων από μεγάλα T-κύτταρα και στη Λεμφωματοειδή Βλατίδωση, όλα τα CD30-θετικά νεοπλασματικά T-κύτταρα έδειξαν έντονη μεμβρανική χρώση για Fas και στις 20 περιπτώσεις ασθενών που μελετήθηκαν. Η ομάδα αυτή δερματικών T-λεμφωμάτων, όπως ήδη αναφέρθηκε, έχει εξαιρετική πενταετή επιβίωση (100%).

Ο FasL βρέθηκε έντονα θετικός στο 75-100% των CD30-θετικών T-κυττάρων σε 9 από τα 10 CD30-θετικά λεμφώματα από μεγάλα T-κύτταρα καθώς και στις 10 περιπτώσεις Λεμφωματοειδούς Βλατίδωσης που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη. Η παρακολούθηση της κλινικής πορείας των ασθενών αυτών έδειξε ότι 19 από τους 20 ασθενείς παρέμειναν εν ζωή 19-256 μήνες (μέσος όρος 63 μήνες) από τη διάγνωση, ενώ ένας ασθενής απεβίωσε από αίτιο μη σχετιζόμενο με τη νόσο.

Πρωτοπαθή Δερματικά CD30-αρνητικά Λεμφώματα από Μεγάλα T-Κύτταρα

Στην ομάδα των πρωτοπαθών δερματικών CD30-αρνητικών λεμφωμάτων από μεγάλα T-κύτταρα (την επιθετικότερη υποομάδα δερματικών T-λεμφωμάτων), τα νεοπλασματικά κύτταρα ήταν εντελώς αρνητικά για Fas σε 6 από 9 περιπτώσεις (Πίνακας 18). Σε μία επιπλέον περίπτωση μόνο το 25% των νεοπλασματικών κυττάρων, τα οποία αντιστοιχούσαν σε ανάμιξη από μεγάλα CD30-θετικά νεοπλασματικά κύτταρα, βρέθηκαν Fas θετικά ενώ τα μεγάλα πλεόμορφα CD30-αρνητικά T-κύτταρα ήταν αρνητικά για Fas.

Ο υποδοχέας FasL εκφράστηκε σε περισσότερο από το 75% των νεοπλασματικών T-κυττάρων σε 8 από τα 9 λεμφώματα. Στο ένα αυτό περιστατικό ο FasL εκφράστηκε μόνο από το 10% των κυττάρων.

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα, θα λέγαμε ότι τα νεοπλασματικά T-κύτταρα παρουσίασαν φαινότυπο Fas-αρνητικό / FasL-θετικό σε έξι περιπτώσεις, Fas-αρνητικό / FasL -αρνητικό σε μία περίπτωση και Fas-θετικό / FasL-θετικό σε δύο περιπτώσεις ασθενών. Τα στοιχεία από την παρακολούθηση των ασθενών έδειξαν ότι και οι εννέα ασθενείς κατέληξαν από τη νόσο σε διάστημα 6-55 μηνών (μέσος όρος 24 μήνες) από τη διάγνωση.

στ. Συζήτηση

Κατά την παρούσα μελέτη παρουσιάστηκαν ξεκάθαρες διαφορές στην έκφραση του υποδοχέα Fas ανάμεσα στις διαφορετικές υποομάδες δερματικών λεμφωμάτων T-κυτταρικής αρχής.

Ξεκινώντας από τη Σπογγοειδή Μυκητίαση, θα λέγαμε ότι στο στάδιο των πλακών όλα τα T-κύτταρα που διηθούν το χόριο και τη βασική μεμβράνη εμφανίζουν έντονη μεμβρανική χρώση Fas, τόσο τα νεοπλασματικά όσο και τα αντιδραστικά T-λεμφοκύτταρα. Παρόλα αυτά, σε 4 από τις 15 περιπτώσεις ΣΜ που μελετήθηκαν, οι ενδοεπιδερμικές αθροίσεις νεοπλασματικών T-κυττάρων ήταν καθαρά αρνητικές για Fas.

Η έντονη έκφραση Fas από τα νεοπλασματικά T-κύτταρα στη Σπογγοειδή Μυκητίαση του σταδίου των πλακών συμβαδίζει με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών(199). Εκεί όπου διαφοροποιούνται τα ευρήματα της παρούσας μελέτης είναι στα αποτελέσματα των χρώσεων σε βλάβες του σταδίου των όγκων. Στις βλάβες αυτές έκφραση Fas σε πάνω από 50% των νεοπλασματικών κυττάρων ανευρέθηκε μόνο σε 4 από τις 12 περιπτώσεις (μεταξύ αυτών μάλιστα υπήρχαν και δύο περιπτώσεις με σημαντική ανάμειξη από CD30-θετικά βλαστικά κύτταρα). Η διαφορά στην έκφραση Fas ανάμεσα στο στάδιο των πλακών και στο στάδιο των όγκων της υποδηλώνει απώλεια της έκφρασης Fas κατά την εξέλιξη της νόσου. Με το συμπέρασμα αυτό συμφωνεί και η διαπίστωση ότι σε τρεις από τους τέσσερις ασθενείς, στους οποίους υπήρχαν διαθέσιμες βιοψίες από διαφορετικά κλινικά στάδια της νόσου, παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης Fas κατά την πρόοδο από την πλάκα στον όγκο.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση ότι τα ενδοεπιδερμικά νεοπλασματικά κύτταρα με τους νεφροειδείς πυρήνες στα μικροαποστημάτια Pautrier βρέθηκαν αρνητικά για Fas σε 4 ασθενείς. Στις βλάβες των υπολοίπων 11 ασθενών με Σπογγοειδή Μυκητίαση του σταδίου των πλακών, οι οποίες εμφάνιζαν διάσπαρτα νεοπλασματικά κύτταρα ενδοεπιδερμικά χωρίς αποστημάτια Pautrier, η απώλεια του μεμβρανικού υποδοχέα Fas ήταν αδύνατο να εκτιμηθεί λόγω της *έντονης έκφρασης Fas από τα περιεκείμενα λεμφοκύτταρα*. Εάν η απώλεια του Fas από τα ενδοεπιδερμικά νεοπλασματικά κύτταρα είναι αποτέλεσμα απέκκρισης του υποδοχέα μετά από τοπική διέγερση ή αντανάκλα εξ' αρχής έναν επιθετικότερο και κακοηθέστερο κλώνο, αυτό παραμένει ακόμη άγνωστο.

Όσον αφορά τα πρωτοπαθή δερματικά CD30-θετικά λεμφώματα από μεγάλα T-κύτταρα και τη Λεμφωματοειδή Βλατίδωση, παρατηρούμε ότι ο Fas εκφράστηκε έντονα σε όλες τις περιπτώσεις από τη συντριπτική πλειοψηφία των

CD30-θετικών βλαστικών κυττάρων. Αξίζει να σημειώσουμε συγκριτικά ότι σε 6 από τα πρωτοπαθή δερματικά CD30-αρνητικά λεμφώματα από μεγάλα T-κύτταρα (που είναι η ομάδα με τη δυσμενέστερη πρόγνωση) τα νεοπλασματικά T-κύτταρα ήταν εντελώς αρνητικά για Fas.

Η βιολογική σημασία της έντονης έκφρασης Fas, σε συνδυασμό με την έντονη έκφραση FasL (βλέπε παρακάτω), στις πρωτοπαθείς δερματικές CD30-θετικές λεμφουπερπλαστικές διαταραχές είναι ακόμα άγνωστη. Οι αλληλεπιδράσεις Fas και FasL έχουν ως αποτέλεσμα τόσο τον κυτταρικό θάνατο όσο και την ενεργοποίηση ή τον πολλαπλασιασμό, ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου, την κατάσταση ενεργοποίησής του και την ενδοκυττάρια οδό μετάδοσης του αποπτωτικού μηνύματος, όπως ήδη περιγράψαμε στο γενικό μέρος της παρούσας εργασίας(157). Στην έντονη ταυτόχρονη έκφραση Fas και FasL από τα νεοπλασματικά κύτταρα πιθανόν να οφείλεται η ευνοϊκότερη πρόγνωση των νοσημάτων αυτών και η αυτόματη υποχώρηση που συχνά παρατηρείται. Επί του παρόντος πάντως άμεση συσχέτιση ανάμεσα στην αυτόματη υποστροφή και στην παρουσία Fas / FasL δεν ανευρέθηκε. Επιπλέον, έντονη ταυτόχρονη έκφραση Fas και FasL παρατηρήθηκε και σε άλλες κατηγορίες δερματικών λεμφωμάτων με διαφορετική κλινική συμπεριφορά, όπως σε δύο περιπτώσεις Σπογγοειδούς Μυκητιάσεως του σταδίου των όγκων και σε ένα πρωτοπαθές δερματικό CD30-αρνητικό λέμφωμα από μεγάλα T-κύτταρα, έχει δε περιγραφεί βιβλιογραφικά σε συστηματικά CD30-θετικά αναπλαστικά λεμφώματα από μεγάλα T-κύτταρα και στη νόσο του Hodgkin(107;157;158).

Τα συγκεντρωτικά στοιχεία της έρευνάς μας υποδεικνύουν υψηλά επίπεδα Fas στις υποομάδες πρωτοπαθών δερματικών λεμφωμάτων T-κυτταρικής αρχής με καλή πρόγνωση, καθώς επίσης χαμηλή ή απύουσα έκφραση Fas σε δερματικά T-λεμφώματα με δυσμενή πρόγνωση. Απώλεια της έκφρασης ή λειτουργίας του Fas έχει αναφερθεί σε μολυσμένα από ιούς κύτταρα και σε νεοπλασματικά κύτταρα ως μέσο ανοσοδιαφυγής. Σε αδενοϊούς έχει βρεθεί ότι το πολυπεπτιδικό σύμπλεγμα 10,4 - 14,5 kDa, το οποίο κωδικοποιεί την περιοχή E3, διαμεσολαβεί για την απώλεια του μεμβρανικού Fas προκαλώντας αντίσταση στον αποπτωτικό θάνατο μέσω Fas(200). Η αποπτωτική οδός του Fas δύναται ακόμη να διαταραχθεί κατά την εξέλιξη της νόσου σε προχωρημένα στάδια (στάδιο όγκων) ως αποτέλεσμα καταστολής της έκφρασης του μεμβρανικού Fas ή ελαττωματικής μετάδοσης του αποπτωτικού σήματος σε ενδοκυττάρια επίπεδο(151;201). Επί παραδείγματι, στα ηπατοκυτταρικά καρκινώματα, τα καρκινικά κύτταρα απωλείουν τον υποδοχέα Fas κατά την εξέλιξη της νόσου(47). Επίσης στον καρκίνο του παχέως εντέρου και στα συστηματικά λεμφώματα από διάχυτα μεγάλα B-κύτταρα η απώλεια της έκφρασης

του υποδοχέα Fas έχει συσχετιστεί με περισσότερο επιθετική συμπεριφορά(151;193).

Στο προηγούμενο σκέλος της μελέτης μας πάνω στα πρωτοπαθή και δευτεροπαθή δερματικά λεμφώματα Β-κυτταρικής αρχής, αναδείξαμε μία θετική συσχέτιση ανάμεσα στην απώλεια του υποδοχέα Fas και την επιδείνωση της κλινικής εικόνας. Στην παρούσα μελέτη, απώλεια της έκφρασης Fas από περισσότερα των 50% των νεοπλασματικών Τ-κυττάρων παρατηρήθηκε σε 7 από τους 9 ασθενείς με CD30-αρνητικό λέμφωμα και σε 9 από τους 12 ασθενείς με Σπογγοειδή Μυκητίαση του σταδίου των όγκων. Αξίζει να σημειωθεί ότι 14 από τους 15 αυτούς ασθενείς (93%) κατέληξαν από τη νόσο 2-93 μήνες (μέσος όρος 16 μήνες) μετά τη διάγνωση. Αντιθέτως, απεβίωσε από τη νόσο μόνο το 10% των ασθενών, των οποίων οι δερματικές βιοψίες κατά τη διάγνωση εμφάνιζαν >50% των νεοπλασματικών κυττάρων θετικά για Fas. Στο τελευταίο αυτό ποσοστό συμπεριλαμβάνονται δύο ασθενείς με Σπογγοειδή Μυκητίαση του σταδίου των πλακών (οι οποίοι μετέπεσαν κατά την πορεία της νόσου στο στάδιο των όγκων) και δύο ασθενείς με CD30-αρνητικό λέμφωμα. Οι ανωτέρω παρατηρήσεις με σαφήνεια υποδεικνύουν ότι και στα δερματικά λεμφώματα Τ-κυτταρικής αρχής η απώλεια του υποδοχέα Fas συνοδεύεται και από δυσμενή πρόγνωση.

Όσον αφορά τώρα την έκφραση FasL, τόσο σε τομές παραφίνης όσο και σε κατεψυγμένες τομές, τα θετικά κύτταρα εμφάνισαν ένα κοκκιώδες ενδοκυτταροπλασματικό πρότυπο χρώσης παρόμοιο με εκείνο των κυτταροτοξικών πρωτεϊνών όπως το granzyme B και η περιφορίνη(202). Πρόσφατες μελέτες in vitro παρέχουν μία ερμηνεία για το συγκεκριμένο πρότυπο χρώσης FasL, παρουσιάζοντας την παρατήρηση ότι ο FasL που παράγεται τόσο από τα Τ-λεμφοκύτταρα όσο και από τα κύτταρα φυσικούς δολοφόνους NK αποθηκεύεται σε εξειδικευμένα εκκριτικά λυσοσώματα, τα οποία αποκοκκιώνονται και η πρωτεΐνη μεταφέρεται στην κυτταρική επιφάνεια ως απάντηση στην αναγνώριση του κυττάρου-στόχου(203).

Εάν θέλουμε να συγκρίνουμε τα αποτελέσματα των ανοσοιστοχημικών χρώσεων FasL με εκείνα του Fas, παρατηρούμε ότι οι διαφοροποιήσεις στην έκφραση FasL στις διαφορετικές υποομάδες δερματικών Τ-λεμφωμάτων είναι λιγότερο προφανείς. Ο FasL εκφράστηκε από την πλειοψηφία των νεοπλασματικών Τ-κυττάρων σε 9 από 15 (60%) ασθενείς με Σπογγοειδή Μυκητίαση του σταδίου των πλακών, σε 10 από 12 (83%) ασθενείς με νόσο του σταδίου των όγκων, σε 19 από 20 (95%) ασθενείς με CD30-θετικές λεμφουπερπλαστικές διαταραχές και σε 8 από 9 (89%) ασθενείς με CD30-αρνητικά λεμφώματα από μεγάλα Τ-κύτταρα. Η σχεδόν

σταθερή ανίχνευση του FasL στις περισσότερες βλάβες, συμβαδίζει με τη γνώση ότι τα νεοπλασματικά T-κύτταρα στα δερματικά T-λεμφώματα προέρχονται από τη νεοπλασματική εξαλλαγή ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων του δέρματος, τα οποία ως γνωστόν εκφράζουν FasL(204).

Όπως ήδη αναφέρθηκε σε πρόσφατες εργασίες, η έκφραση FasL από τα νεοπλασματικά κύτταρα δύναται να ενεργοποιήσει το μηχανισμό της απόπτωσης σε Fas-θετικά κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα, παρεμβαίνοντας τοιουτοτρόπως στην ανοσολογική απάντηση κατά του καρκινικού κυττάρου(198). Ο μηχανισμός αυτός, ο οποίος διευκολύνει τα καρκινικά κύτταρα να ανοσοδιαφεύγουν, έχει περιγραφεί για το μελάνωμα, τον καρκίνο του παχέως εντέρου και του πνεύμονα, καθώς και για το αστροκύτωμα(90-92;197). Όλοι οι όγκοι αυτοί παρουσιάζονται ανοσοιστοχημικά έντονα θετικοί για FasL. Προσφάτως έχει περιγραφεί επιπλέον ένας ακριβώς αντίστροφος ρόλος για τον FasL, σύμφωνα με τον οποίο ο FasL μπορεί ανεξαρτήτως να μεταδίδει σήματα για ανάπαυση του κυτταρικού κύκλου και κυτταρικό θάνατο σε FasL-θετικά CD4-θετικά T-λεμφοκύτταρα(205). Κατ'αυτόν τον τρόπο αναστέλλεται ο κυτταρικός κύκλος και επάγεται ο κυτταρικός θάνατος σε FasL-θετικά CD4-θετικά νεοπλασματικά T-κύτταρα ως απάντηση σε σήμα του FasL.

Παρά τις παρατηρήσεις αυτές, η βιολογική σημασία της έκφρασης FasL από τα νεοπλασματικά T-κύτταρα στα δερματικά λεμφώματα T-κυτταρικής αρχής παραμένει ακόμα αδιευκρίνιστη και, σε αντίθεση με τα αποτελέσματα του προηγούμενου σκέλους της εργασίας μας για τα δερματικά λεμφώματα B-κυτταρικής αρχής, δε φαίνεται η έκφραση FasL να επηρεάζει την πρόγνωση και επιβίωση των ασθενών με δερματικό T-λέμφωμα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη διερευνήσαμε τους αποπτωτικούς μηχανισμούς που διέπουν δερματικούς όγκους διαφορετικής προελεύσεως, συγκεκριμένα επιθηλιακής και λεμφικής, με στόχο να επισημάνουμε τυχόν διαφορές ανάλογα με την κλινική συμπεριφορά και το στάδιο της νόσου. Χρησιμοποιήσαμε βιοπτικό υλικό από 16 ασθενείς με βασικοκυτταρικά καρκινώματα του δέρματος, 32 ασθενείς με δερματικά λεμφώματα Β-κυτταρικής αρχής και 52 ασθενείς με δερματικά λεμφώματα Τ-κυτταρικής αρχής και διερευνήσαμε ανοσοιστοχημικά την έκφραση των υποδοχέων Fas και FasL, της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 και του προσκολλητικού μορίου ICAM-1.

(1)Όσον αφορά τα Βασικοκυτταρικά Καρκινώματα (ΒΚΚ) του δέρματος, στη μελέτη μας παρατηρείται παντελής απουσία έκφρασης του αποπτωτικού μεμβρανικού υποδοχέα Fas σε όλα τα ΒΚΚ, τόσο στα οζώδη όσο και στα διηθητικά. Η απουσία αυτή της έκφρασης Fas συνεπάγεται αδυναμία εξουδετέρωσης των νεοπλασματικών κυττάρων από τα κυτταροτοξικά Τ-λεμφοκύτταρα που εκφράζουν στην επιφάνειά τους το φυσικό σύνδεσμο του Fas (FasL) και διηθούν τον όγκο περιφερικά. Αντίθετα, η υψηλή έκφραση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 αποτελεί σταθερό εύρημα στην πλειοψηφία των ΒΚΚ. Η έκφραση Bcl-2 από τα νεοπλασματικά κύτταρα ενισχύει την υπόθεση ότι ο όγκος άρχεται από τα κύτταρα της βασικής στιβάδας της επιδερμίδας, διατηρώντας ένα από τα χαρακτηριστικά του αρχέγονου μητρικού κυττάρου. Η απώλεια της έκφρασης Bcl-2 στα μισά διηθητικά ΒΚΚ της μελέτης μας πιθανότατα συνεπάγεται επιθετικότερη κλινική συμπεριφορά, καθώς το νεοπλασματικό κύτταρο απομακρύνεται από τους χαρακτήρες του αρχέγονου μητρικού κυττάρου. Η προγνωστική σημασία της απώλειας του Bcl-2, σε συνδυασμό με την πιθανότητα υποτροπών, χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

(2)Όσον αφορά τα δερματικά λεμφώματα Β-κυτταρικής αρχής συμπεραίνουμε ότι στη μελέτη μας ανευρέθηκαν σημαντικές διαφορές στην έκφραση του αποπτωτικού υποδοχέα Fas, του συνδέσμου αυτού FasL, της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 και του προσκολλητικού μορίου ICAM-1, σε καλά διαχωρισμένες ομάδες πρωτοπαθών και δευτεροπαθών δερματικών Β-λεμφωμάτων. Οι διαφορές αυτές μπορούν πολύ καλά να συνεισφέρουν στη διαφορετική κλινική συμπεριφορά και πρόγνωση των λεμφωμάτων αυτών. Στην παρούσα μελέτη καταδείξαμε θετική συσχέτιση ανάμεσα στην απώλεια του υποδοχέα Fas και την επιδείνωση της κλινικής εικόνας, καθώς επίσης και μία αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση FasL και

την επιβίωση. Οι υποομάδες με καλή πρόγνωση παρουσίασαν φαινότυπο Fas(+), ICAM-1(+), FasL(-), Bcl-2(-). Τα πρωτοπαθή δερματικά Β-λεμφώματα κεφαλής και τραχήλου, που έχουν εξαιρετική πενταετή επιβίωση, βρέθηκαν κυρίως Fas(+), ICAM-1(+). Οι υποομάδες με δυσμενή πρόγνωση παρουσίασαν φαινότυπο Fas(-), ICAM-1(-), FasL(+), Bcl-2(+). Τα μεταστατικά Β-λεμφώματα βρέθηκαν Fas(-), FasL(+), και Bcl-2(+). Τα αποτελέσματα της μελέτης είναι συμβατά με τα στοιχεία της πρόσφατης βιβλιογραφίας. Η απώλεια της έκφρασης του υποδοχέα Fas καθιστά τα νεοπλασματικά κύτταρα λιγότερο ευάλωτα στον αποπτωτικό θάνατο μέσω κυτταροτοξικών Τ-λεμφοκυττάρων που φέρουν στην επιφάνειά τους FasL. Επιπλέον, η έκφραση FasL από τα νεοπλασματικά κύτταρα επικουρεί περαιτέρω την ανοσοδιαφυγή του όγκου.

(3) Όσον αφορά τα δερματικά λεμφώματα Τ-κυτταρικής αρχής, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας καταδεικνύουν ξεκάθαρες διαφορές στην έκφραση Fas μεταξύ των διαφόρων τύπων δερματικών Τ-λεμφωμάτων. Στα πρώιμα στάδια (στάδιο πλακών) της Σπογγοειδούς Μυκητιάσεως και στα καλής πρόγνωσης δερματικά Τ-λεμφώματα (πρωτοπαθείς δερματικές CD30 -θετικές λεμφουπερπλαστικές διαταραχές), ο Fas εκφράζεται έντονα. Αντιθέτως, στη Σπογγοειδή Μυκητίαση του σταδίου των όγκων, καθώς και σε επιθετικά δερματικά Τ-λεμφώματα (πρωτοπαθή δερματικά CD30-αρνητικά λεμφώματα από μεγάλα Τ-κύτταρα) η έκφραση του Fas μειώνεται ραγδαία. Η διαφορά στην έκφραση Fas μεταξύ σταδίου πλακών και όγκων, καθαρά υποδηλώνει απώλεια του Fas κατά την εξέλιξη του όγκου. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει επιπλέον η παρατήρηση ότι τα ενδο-επιδερμικά νεοπλασματικά κύτταρα με την εγκεφαλοειδή μορφολογία ήταν εμφανώς αρνητικά για Fas. Η βιολογική σημασία της έντονης έκφρασης Fas, σε συνδυασμό με την έντονη έκφραση FasL στις πρωτοπαθείς δερματικές CD30-θετικές λεμφουπερπλαστικές διαταραχές είναι ακόμα άγνωστη. Οι αλληλεπιδράσεις Fas και FasL έχουν ως αποτέλεσμα τόσο τον κυτταρικό θάνατο όσο και την ενεργοποίηση ή τον πολλαπλασιασμό, ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου, την κατάσταση ενεργοποίησής του και την ενδοκυττάρια οδό μετάδοσης του αποπτωτικού μηνύματος. Στην έντονη ταυτόχρονη έκφραση Fas και FasL από τα νεοπλασματικά κύτταρα πιθανόν να οφείλεται η ευνοικότερη πρόγνωση των νοσημάτων αυτών, ακόμα και η αυτόματη υποχώρηση που συχνά παρατηρείται. Από την άλλη πλευρά, η σχεδόν σταθερή ανίχνευση του FasL σε όλες τις ομάδες δερματικών Τ-λεμφωμάτων, συμβαδίζει με τη γνώση ότι τα νεοπλασματικά Τ-κύτταρα στις διαταραχές αυτές προέρχονται από τη νεοπλασματική εξαλλαγή ενεργοποιημένων Τ-λεμφοκυττάρων του δέρματος, τα οποία ως γνωστόν εκφράζουν FasL. Παρόλα ταύτα, σε αντίθεση με τα δερματικά λεμφώματα Β-κυτταρικής αρχής, η έκφραση FasL

δε φαίνεται να επηρεάζει την πρόγνωση και επιβίωση των ασθενών με δερματικό T-λέμφωμα και η διαλεύκανση του λειτουργικού του ρόλου χρήζει περαιτέρω διερεύνηση.

Από τα αποτελέσματα της εργασίας μας, προκύπτει ότι τα μεν φυσιολογικά κύτταρα διαφορετικών ιστών έχουν κοινούς τρόπους «αυτοκτονίας», ενώ αντίθετα τα νεοπλασματικά κύτταρα διαφορετικής ιστικής προέλευσης έχουν κοινούς τρόπους επιβίωσης. Στα αρχικά στάδια της νόσου, το κύτταρο διατηρεί τους μηχανισμούς προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, οι οποίοι όμως αργότερα κατά την πορεία της νόσου διαταράσσονται, με αποτέλεσμα το κύτταρο να αδυνατεί να ακολουθήσει το «φυσιολογικό» αποπτωτικό θάνατο.

Summary and Conclusions

In the present study we investigated the apoptotic mechanisms in skin tumours of different origin, namely epithelial and lymphoid, in order to indicate differences associated with the clinical behaviour and the stage of the disease. We used biopsies from 16 patients with basal cell carcinomas, 32 patients with cutaneous B-cell lymphomas and 52 patients with cutaneous T-cell lymphomas and investigated the immunohistochemical expression of Fas, FasL, the anti-apoptotic protein Bcl-2 and the adhesion molecule ICAM-1.

(1) With respect to the basal cell carcinomas (BCC) of the skin in our study, complete absence of expression of the apoptotic cell membrane receptor Fas was detected in all BCCs, both nodular and infiltrative. This absence of Fas expression correlates with inability to eliminate the neoplastic cells by cytotoxic T-lymphocytes which express the natural ligand of Fas (FasL) on their surface and infiltrate the periphery of the tumors. On the contrary, high expression of the anti-apoptotic protein Bcl-2 was found constantly in the majority of BCCs. Bcl-2 expression by the neoplastic cells strengthens the hypothesis that BCCs originate from the cells of the stratum basale of the epidermis, preserving characteristics of the stem cell. Loss of the expression of Bcl-2 by the neoplastic cells in half of the cases of infiltrative BCCs may correlate with more aggressive clinical behaviour, widening the distance between the neoplastic cell and the stem cell. The prognostic significance of the loss of Bcl-2 expression, in combination with the possibility of disease relapse, needs further evaluation.

(2) With respect to the cutaneous B-cell lymphomas, we conclude that in our study different staining patterns for the apoptotic receptor Fas, its ligand FasL, the anti-apoptotic protein Bcl-2 and the adhesion molecule ICAM-1, were detected in well-defined groups of primary and secondary cutaneous B-cell lymphomas. These differences may very well contribute to the different clinical behaviour and prognosis of these lymphomas. In the present study we demonstrated a positive correlation between loss of the Fas receptor and a more aggressive clinical behaviour, as well as a negative correlation between FasL expression and survival. The subgroups with the favourable prognosis showed a phenotype of Fas(+), ICAM-1(+), FasL(-) and Bcl-2(-). Primary cutaneous B-cell lymphomas of the head and neck, which have an excellent 5-year survival rate, were found mostly Fas(+) and ICAM-1(+). The subgroups with the poor prognosis showed a phenotype of Fas(-), ICAM-1(-), FasL(+) and Bcl-2(+). Secondary (metastatic) cutaneous B-cell lymphomas were found Fas(-)/FasL(+) and Bcl-2(+). The results of the study are compatible with the data from recent literature. Loss of Fas receptor expression, seems to render

neoplastic cells less sensitive to apoptotic death via cytotoxic T-lymphocytes who carry on their surface FasL. Moreover, FasL expression on the neoplastic cells further augments the escape from immune surveillance.

(3) With respect to the cutaneous T-cell lymphomas, the results of the present study demonstrate clear-cut differences in the expression of Fas between different types of cutaneous T-cell lymphomas. In early stages (patch/plaque stage) of Mycoses Fungoides and in indolent types of cutaneous T-cell lymphomas (primary cutaneous CD30-positive lymphoproliferations), Fas is aberrantly expressed. In contrast, in tumor-stage Mycoses Fungoides as well as in aggressive cutaneous T-cell lymphomas (primary cutaneous CD30-negative large T-cell lymphomas) the expression of Fas ceases rapidly. This difference in Fas expression between plaque-stage and tumor-stage, clearly suggests loss of Fas during tumour progression. Of particular interest is the observation that, intraepidermal tumor cells with cerebriform morphology were clearly Fas negative. The biological significance of the strong Fas expression together with a strong expression of FasL in the primary cutaneous CD30-positive lymphoproliferations remains unknown. Fas-FasL interactions may result either in cell death, activation or proliferation, dependent on the cell type, the activation state of the cell and the tuning of the Fas signal transduction pathway. The strong coexpression of Fas and FasL by the neoplastic cells may be related to the favourable prognosis of these lymphomas, or even to the occurrence of spontaneous remission, which is frequently observed in this group. On the other hand, the almost constant expression of FasL in all the groups of cutaneous T-cell lymphomas, is consistent with the notion that the neoplastic T-cells in these disorders are malignant counterparts of activated skin-homing T-cells, which are known to express FasL. Nevertheless, unlike in cutaneous B-cell lymphomas, FasL expression does not seem to play any prognostic role in cutaneous T-cell lymphomas and its functional significance awaits further study.

The results of our study, indicate that normal cells of different tissues have common ways to commit "suicide", but also neoplastic cells of different tissue origin have common pathways to survive. At the first stages of the disease the cell retains the programmed cell death pathways; during the advance of the disease these pathways are obstructed, with the result of the cell remaining unable to undergo a "normal" apoptotic death.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ

AKK	= Ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα
Apaf-1	= Apoptotic protease activating factor 1
Bad	= μέλος οικογένειας Bcl-2
Bak	= μέλος οικογένειας Bcl-2
Bax	= μέλος οικογένειας Bcl-2
BCC	= basal cell carcinoma =βασικοκυτταρικό καρκίνωμα
Bcl-2	= πρωτεΐνη που παράγεται από το ομώνυμο πρωτο-ογκογονίδιο
bcl-2	= πρωτο-ογκογονίδιο που αναστέλλει την απόπτωση
bcl-xl	= γονίδιο ανασταλτικό της απόπτωσης
Bcl-xl	= μέλος οικογένειας Bcl-2
Bcl-xs	= μέλος οικογένειας Bcl-2
BH1, BH2, BH3, BH4	= τα τέσσερα δομικά ομόλογα πρότυπα της πρωτεΐνης Bcl-2
Bid	= μέλος οικογένειας Bcl-2
Bik	= μέλος οικογένειας Bcl-2
Bim	= μέλος οικογένειας Bcl-2
BKK	= Βασικοκυτταρικό καρκίνωμα
Blk	= μέλος οικογένειας Bcl-2
BNIP3	= μέλος οικογένειας Bcl-2
Box	= μέλος οικογένειας Bcl-2
CARD	= Caspase Recruitment Domain=αλληλουχία στρατολόγησης κασπασών από το κυτταρόπλασμα
CD45RA(+)/T	= μη ενεργοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα (παρθένα)
CD45RO(+)/T	= ενεργοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα (μνήμης)
CED-3, CED-4, CED-9	= πρωτο-ογκογονίδια νηματώδους σκώληκα C.elegans
c-Myc	= πρωτεΐνη που παράγεται από το ομώνυμο ογκογονίδιο
DcR1	= επιφανειακός υποδοχέας κυτταρικού θανάτου
DcR2	= επιφανειακός υποδοχέας κυτταρικού θανάτου
DD	= Death Domain = αλληλουχία «θανάτου» σε κασπάση
DED	= Death Effector Domain = αλληλουχία «θανάτου» σε κασπάση
DISC	= FADD = death initiating signalling complex

DNA	= δεσοξυριβονουκλεικό οξύ, γενετικό υλικό
DR3	= επιφανειακός υποδοχέας κυτταρικού θανάτου
DR4	= επιφανειακός υποδοχέας κυτταρικού θανάτου
DR5	= επιφανειακός υποδοχέας κυτταρικού θανάτου
EBV	= Epstein Barr virus= ιός Epstein Barr
FACS	= μέθοδος κυτταρομετρίας ροής
FADD	= DISC
FAP-1	= tyrosine phosphatase Fas associated protein-1= ενδοκυττάρια πρωτεΐνη ανασταλτική της απόπτωσης
Fas	= μεμβρανικός αποπτωτικός υποδοχέας
FasL	= σύνδεσμος ομώνυμου υποδοχέα
FLICE	= fas-activated protein like ICE
FLIP	= FLICE-inhibitory protein=εμποδίζει τη σύνδεση FLICE στο FADD
G2/M	= φάση μίτωσης κυτταρικού κύκλου
HIV	= Human Immunodeficiency virus= ιός ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (AIDS)
Hrk	= μέλος οικογένειας Bcl-2
HTLV-1	= Human t-cell leukaemia/lymphoma virus-1 = ιός ανθρώπινης λευχαιμίας/λεμφώματος από T-κύτταρα
IAPs	= inhibition of apoptosis proteins = ενδοκυττάρια πρωτεΐνες που αναστέλλουν την απόπτωση
ICAM-1	= intercellular adhesion molecule-1 = προσκολλητικό μόριο που σταθεροποιεί τη σύνδεση αντιγονο-παρουσιαστικού κυττάρου και κυττάρου-στόχου
ICE	= interleukin 1-alpha converting enzyme = ένζυμο που αναστέλλει τη μετατροπή της ιντερλευκίνης1α, κασπάση
IL-15	= ιντερλευκίνη-15
IL-1β	= ιντερλευκίνη-1β
IL-2	= ιντερλευκίνη-2
INF-γ	= ιντερφερόνη-γ
kd	= kilo dalton
Mcl-1	= μέλος οικογένειας Bcl-2
mRNA	= αγγελιοφόρο ριβονουκλεικό οξύ
NK	= natural killer cells = κύτταρα φυσικοί δολοφόνοι
NuMA πρωτεΐνη	= πυρηνική πρωτεΐνη υπεύθυνη για τη μίτωση

p53	= ογκοκατασταλτικό γονίδιο
P75NTR	= επιφανειακός υποδοχέας κυτταρικού θανάτου
PCR	= polymerase chain reaction = αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PITSLRE	= κινάσες που αναστέλλουν την απόπτωση
ras	= ογκογονίδιο
RT-PCR	= reverse transcriptase-polymerase chain reaction = αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με τη μέθοδο της ανάστροφης μεταγραφάσης
sFas	= διαλυτός Fas
sFasL	= διαλυτός FasL
TCR	= T-cell-receptor = υποδοχέας T-λεμφοκυττάρου
TEN	= toxic epidermal necrolysis = τοξική επιδερμική νεκρόλυση
Th0, Th1, Th2	= υποκατηγορίες T-λεμφοκυττάρων
TNF	= tumor necrosis factor = παράγοντας νέκρωσης του όγκου
TNFR	= TNF-receptor = μεμβρανικός υποδοχέας TNF
TNFR1	= επιφανειακός υποδοχέας κυτταρικού θανάτου
TNFR2	= επιφανειακός υποδοχέας κυτταρικού θανάτου
TRAIL	= TNF-related apoptosis inducing ligand, APO2-L = αποπτωτικός μεμβρανικός υποδοχέας
U1 πρωτεΐνη	= πρωτεΐνη που διασπά το ριβονουκλεικό οξύ
UVA	= υπεριώδης ακτινοβολία

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26(4):239-257.
- (2) Ellis RE, Jacobson DM, Horvitz HR. Genes required for the engulfment of cell corpses during programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 1991; 129(1):79-94.
- (3) Ellis RE, Horvitz HR. Two *C. elegans* genes control the programmed deaths of specific cells in the pharynx. *Development* 1991; 112(2):591-603.
- (4) Hengartner MO. Programmed cell death in invertebrates. *Curr Opin Genet Dev* 1996; 6(1):34-38.
- (5) Virchow R. Cellular Pathology as Based upon Physiological and Pathological Histology. In: Dover Publications NY, editor. *Cellular Pathology as Based upon Physiological and Pathological Histology*. 1971: 356-382.
- (6) Flemming W. Über die Bildung von Richtungsfiguren in Säugetiereiern beim Untergang Graafscher Follikel. *Arch Anat Entw Gesch* , 221-244. 1885.
Ref Type: Generic
- (7) Graper L. Eine neue Anschauung über physiologische Zellausschaltung. *Arch Zellforsch* 12, 373-394. 1914.
Ref Type: Generic
- (8) Glucksmann A. Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol Rev Camb Philow Soc* 26, 59-86. 1951.
Ref Type: Generic
- (9) Bessis MC. Death of a cell, 16-mm film. New York, Swift Motion Picture Laboratories . 1958.
Ref Type: Generic
- (10) Kerr JF. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J Pathol* 1971; 105(1):13-20.

- (11) Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980; 68:251-306.
- (12) Arends MJ, Wyllie AH. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol* 1991; 32:223-254.
- (13) Weedon D, Searle J, Kerr JF. Apoptosis. Its nature and implications for dermatopathology. *Am J Dermatopathol* 1979; 1(2):133-144.
- (14) Weedon D, Searle J, Kerr JF. Apoptosis. Its nature and implications for dermatopathology. *Am J Dermatopathol* 1979; 1(2):133-144.
- (15) Smith CA, Williams GT, Kingston R, Jenkinson EJ, Owen JJ. Antibodies to CD3/T-cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in thymic cultures. *Nature* 1989.
- (16) Liu YJ, Joshua DE, Williams GT, Smith CA, Gordon J, MacLennan IC. Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature* 1989; 342(6252):929-931.
- (17) Savill JS, Wyllie AH, Henson JE, Walport MJ, Henson PM, Haslett C. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest* 1989; 83(3):865-875.
- (18) Radley JM, Haller CJ. Fate of senescent megakaryocytes in the bone marrow. *Br J Haematol* 1983; 53(2):277-287.
- (19) Jersmann HP, Ross KA, Vivers S, Brown SB, Haslett C, Dransfield I. Phagocytosis of apoptotic cells by human macrophages: Analysis by multiparameter flow cytometry. *Cytometry* 2003; 51A(1):7-15.
- (20) Hall SE, Savill JS, Henson PM, Haslett C. Apoptotic neutrophils are phagocytosed by fibroblasts with participation of the fibroblast vitronectin receptor and involvement of a mannose/fucose-specific lectin. *J Immunol* 1994; 153(7):3218-3227.
- (21) Cohen JJ. Programmed cell death in the immune system. *Adv Immunol* 1991; 50:55-85.

- (22) Golstein P, Ojcius DM, Young JD. Cell death mechanisms and the immune system. *Immunol Rev* 1991; 121:29-65.
- (23) Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; 73(8):2013-2026.
- (24) Wyllie AH. Apoptosis: an overview. *Br Med Bull* 1997; 53(3):451-465.
- (25) Ekert PG, Vaux DL. Apoptosis and the immune system. *Br Med Bull* 1997; 53(3):591-603.
- (26) Ekert PG, Silke J. Till death do us part. *Cell Death Differ* 2001; 8(7):662-664.
- (27) Peter ME, Ehret A, Berndt C, Krammer PH. AIDS and the death receptors. *Br Med Bull* 1997; 53(3):604-616.
- (28) Debatin KM, Fahrig-Faissner A, Enenkel-Stoodt S, Kreuz W, Benner A, Krammer PH. High expression of APO-1 (CD95) on T lymphocytes from human immunodeficiency virus-1-infected children. *Blood* 1994; 83(10):3101-3103.
- (29) Meyaard L, Otto SA, Jonker RR, Mijnster MJ, Keet RP, Miedema F. Programmed death of T cells in HIV-1 infection. *Science* 1992; 257(5067):217-219.
- (30) Theofilopoulos AN, Balderas RS, Gozes Y, Aguado MT, Hang LM, Morrow PR et al. Association of lpr gene with graft-vs.-host disease-like syndrome. *J Exp Med* 1985; 162(1):1-18.
- (31) Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kiefer MC et al. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 1994; 263(5154):1759-1762.
- (32) Cohen PL, Eisenberg RA. Lpr and gld: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease. *Annu Rev Immunol* 1991; 9:243-269.
- (33) Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 1992; 356(6367):314-317.

- (34) Singer GG, Carrera AC, Marshak-Rothstein A, Martinez C, Abbas AK. Apoptosis, Fas and systemic autoimmunity: the MRL-lpr/lpr model. *Curr Opin Immunol* 1994; 6(6):913-920.
- (35) Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989; 320(6):365-376.
- (36) Meagher LC, Savill JS, Baker A, Fuller RW, Haslett C. Phagocytosis of apoptotic neutrophils does not induce macrophage release of thromboxane B2. *J Leukoc Biol* 1992; 52(3):269-273.
- (37) Haslett C, Savill JS, Whyte MK, Stern M, Dransfield I, Meagher LC. Granulocyte apoptosis and the control of inflammation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1994; 345(1313):327-333.
- (38) Stern M, Geddes D. Cystic fibrosis: basic chemical and cellular mechanisms. *Br J Hosp Med* 1996; 55(5):237-240.
- (39) Zychlinsky A, Sansonetti P. Perspectives series: host/pathogen interactions. Apoptosis in bacterial pathogenesis. *J Clin Invest* 1997; 100(3):493-495.
- (40) Hiramatsu N, Hayashi N, Katayama K, Mochizuki K, Kawanishi Y, Kasahara A et al. Immunohistochemical detection of Fas antigen in liver tissue of patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1994; 19(6):1354-1359.
- (41) Dowling P, Shang G, Raval S, Menonna J, Cook S, Husar W. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system in multiple sclerosis brain. *J Exp Med* 1996; 184(4):1513-1518.
- (42) Isacson O. On neuronal health. *Trends Neurosci* 1993; 16(8):306-308.
- (43) Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA et al. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med* 1997; 336(16):1131-1141.
- (44) Wyllie AH. The biology of cell death in tumours. *Anticancer Res* 1985; 5(1):131-136.
- (45) Griffiths SD, Clarke AR, Healy LE, Ross G, Ford AM, Hooper ML et al. Absence of p53 permits propagation of mutant cells following genotoxic damage. *Oncogene* 1997; 14(5):523-531.

- (46) Lowe SW, Jacks T, Housman DE, Rulley HE. Abrogation of oncogene-associated apoptosis allows transformation of p53-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(6):2026-2030.
- (47) Strand S, Hofmann WJ, Hug H, Muller M, Otto G, Strand D et al. Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells--a mechanism of immune evasion? *Nat Med* 1996; 2(12):1361-1366.
- (48) Jaattela M. Programmed cell death: many ways for cells to die decently. *Ann Med* 2002; 34(6):480-488.
- (49) Waterhouse NJ, Trapani JA. CTL: Caspases Terminate Life, but that's not the whole story. *Tissue Antigens* 2002; 59(3):175-183.
- (50) Hengartner MO, Horvitz HR. *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell* 1994; 76(4):665-676.
- (51) Oren M. p53: the ultimate tumor suppressor gene? *FASEB J* 1992; 6(13):3169-3176.
- (52) Dammann R, Schagdarsurengin U, Strunnikova M, Rastetter M, Seidel C, Liu L et al. Epigenetic inactivation of the Ras-association domain family 1 (RASSF1A) gene and its function in human carcinogenesis. *Histol Histopathol* 2003; 18(2):665-677.
- (53) Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Jr., Butel JS et al. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 1992; 356(6366):215-221.
- (54) Lane DP. Cancer. A death in the life of p53. *Nature* 1993; 362(6423):786-787.
- (55) Reichmann E. The biological role of the Fas/FasL system during tumor formation and progression. *Semin Cancer Biol* 2002;309-315.
- (56) Catalano A, Romano M, Martinotti S, Procopio A. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) plays a critical role in the tumor progression potential induced by simian virus 40 large T antigen. *Oncogene* 2002; 21(18):2896-2900.
- (57) Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997; 88(3):355-365.

- (58) Denault JB, Salvesen GS. Caspases: keys in the ignition of cell death. *Chem Rev* 2002; 102(12):4489-4500.
- (59) Kumar S. Mechanisms mediating caspase activation in cell death. *Cell Death Differ* 1999; 6(11):1060-1066.
- (60) Bratton SB, Walker G, Srinivasula SM, Sun XM, Butterworth M, Alnemri ES et al. Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes. *EMBO J* 2001; 20(5):998-1009.
- (61) Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 1997 Jul 10;388(6638):190-5 1997; 388(6638):190-195.
- (62) Ekert PG, Silke J, Vaux DL. Caspase inhibitors. *Cell Death Differ* 1999; 6(11):1081-1086.
- (63) Schmidt SM, Schag K, Mueller MR, Weck MM, Appel S, Kanz L et al. Survivin is a shared tumor associated antigen expressed in a broad variety of malignancies and recognized by specific cytotoxic T-cells. *Blood* 2003; epub ahead of print.
- (64) Ngan BY, Chen-Levy Z, Weiss LM, Warnke RA, Cleary ML. Expression in non-Hodgkin's lymphoma of the bcl-2 protein associated with the t(14;18) chromosomal translocation. *N Engl J Med* 1988; 318(25):1638-1644.
- (65) Monaghan P, Robertson D, Amos TA, Dyer MJ, Mason DY, Greaves MF. Ultrastructural localization of bcl-2 protein. *J Histochem Cytochem* 1992; 40(12):1819-1825.
- (66) Tsujimoto Y, Shimizu S. Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Lett* 2000; 466(1):6-10.
- (67) LeBrun DP, Warnke RA, Cleary ML. Expression of bcl-2 in fetal tissues suggests a role in morphogenesis. *Am J Pathol* 1993; 142(3):743-753.
- (68) Gaulard P, d'Agay MF, Peuchmaur M, Brousse N, Gisselbrecht C, Solal-Celigny P et al. Expression of the bcl-2 gene product in follicular lymphoma. *Am J Pathol* 1992; 140(5):1089-1095.

- (69) Jiwa NM, Kanavaros P, van d, V, Walboomers JM, Horstman A, Vos W et al. Expression of c-myc and bcl-2 oncogene products in Reed-Sternberg cells independent of presence of Epstein-Barr virus. *J Clin Pathol* 1993; 46(3):211-217.
- (70) Schena M, Larsson LG, Gottardi D, Gaidano G, Carlsson M, Nilsson K et al. Growth- and differentiation-associated expression of bcl-2 in B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 1992; 79(11):2981-2989.
- (71) Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c- myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 1988; 335(6189):440-442.
- (72) Cerroni L, Soyer HP, Kerl H. bcl-2 protein expression in cutaneous malignant melanoma and benign melanocytic nevi. *Am J Dermatopathol* 1995; 17(1):7-11.
- (73) Ben Ezra JM, Kornstein MJ, Grimes MM, Krystal G. Small cell carcinomas of the lung express the Bcl-2 protein. *Am J Pathol* 1994; 145(5):1036-1040.
- (74) Pezzella F, Turley H, Kuzu I, Tungekar MF, Dunnill MS, Pierce CB et al. bcl-2 protein in non-small-cell lung carcinoma. *N Engl J Med* 1993; 329(10):690-694.
- (75) McDonnell TJ, Troncoso P, Brisbay SM, Logothetis C, Chung LW, Hsieh JT et al. Expression of the protooncogene bcl-2 in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res* 1992; 52(24):6940-6944.
- (76) Rodriguez-Villanueva J, Colome MI, Brisbay S, McDonnell TJ. The expression and localization of bcl-2 protein in normal skin and in non-melanoma skin cancers. *Pathol Res Pract* 1995 Jun;191(5):391-8 1995; 191(5):391-398.
- (77) Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 1993; 75(6):1169-1178.
- (78) Uno K, Inukai T, Kayagaki N, Goi K, Sato H, Nemoto A et al. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) frequently induces apoptosis in

Philadelphia chromosome-positive leukemia cells. *Blood* 2002; epub ahead of print.

- (79) Oehm A, Behrmann I, Falk W, Pawlita M, Maier G, Klas C et al. Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *J Biol Chem* 1992 May 25;267(15):10709-15 1992; 267(15):10705-10715.
- (80) Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M et al. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 1991; 66(2):233-243.
- (81) Hsu H, Huang J, Shu HB, Baichwal V, Goeddel DV. TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor- 1 signaling complex. *Immunity* 1996; 4(4):387-396.
- (82) Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 1995; 14(22):5579-5588.
- (83) Xerri L, Devilard E, Hassoun J, Mawas C, Birg F. Fas ligand is not only expressed in immune privileged human organs but is also coexpressed with Fas in various epithelial tissues. *Mol Pathol* 1997; 50(2):87-91.
- (84) Takahashi T, Tanaka M, Inazawa J, Abe T, Suda T, Nagata S. Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity. *Int Immunol* 1994; 6(10):1567-1574.
- (85) Lynch DH, Ramsdell F, Alderson MR. Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses. *Immunol Today* 1995; 16(12):569-574.
- (86) Badley AD, McElhinny JA, Leibson PJ, Lynch DH, Alderson MR, Paya CV. Upregulation of Fas ligand expression by human immunodeficiency virus in human macrophages mediates apoptosis of uninfected T lymphocytes. *J Virol* 1996; 70(1):199-206.
- (87) Liles WC, Kiener PA, Ledbetter JA, Aruffo A, Klebanoff SJ. Differential expression of Fas (CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes:

- implications for the regulation of apoptosis in neutrophils. *J Exp Med* 1996; 184(2):429-440.
- (88) Klas C, Debatin KM, Jonker RR, Krammer PH. Activation interferes with the APO-1 pathway in mature human T cells. *Int Immunol* 1993; 5(6):625-630.
- (89) Tanaka M, Suda T, Haze K, Nakamura N, Sato K, Kimura F et al. Fas ligand in human serum. *Nat Med* 1996; 2(3):317-322.
- (90) O'Connell J, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F. The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. *J Exp Med* 1996; 184(3):1075-1082.
- (91) Hahne M, Rimoldi D, Schroter M, Romero P, Schreier M, French LE et al. Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* 1996; 274(5291):1363-1366.
- (92) Niehans GA, Brunner T, Frizelle SP, Liston JC, Salerno CT, Knapp DJ et al. Human lung carcinomas express Fas ligand. *Cancer Res* 1997; 57(6):1007-1012.
- (93) Peter ME, Krammer PH. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* 2003; 10(1):26-35.
- (94) Kagi D, Vignaux F, Ledermann B, Burki K, Depraetere V, Nagata S et al. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* 1994; 265(5171):528-530.
- (95) Freiberg RA, Spencer DM, Choate KA, Duh HJ, Schreiber SL, Crabtree GR et al. Fas signal transduction triggers either proliferation or apoptosis in human fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1997; 108(2):215-219.
- (96) Alderson MR, Armitage RJ, Maraskovsky E, Tough TW, Roux E, Schooley K et al. Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes. *J Exp Med* 1993; 178(6):2231-2235.
- (97) Sayama K, Yonehara S, Watanabe Y, Miki Y. Expression of Fas antigen on keratinocytes in vivo and induction of apoptosis in cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1994; 103(3):330-334.

- (98) Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 1995; 270(5239):1189-1192.
- (99) Bellgrau D, Gold D, Selawry H, Moore J, Franzusoff A, Duke RC. A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature* 1995; 377(6550):630-632.
- (100) Sato T, Irie S, Kitada S, Reed JC. FAP-1: a protein tyrosine phosphatase that associates with Fas. *Science* 1995; 268(5209):411-415.
- (101) Landowski TH, Qu N, Buyuksal I, Painter JS, Dalton WS. Mutations in the Fas antigen in patients with multiple myeloma. *Blood* 1997; 90(11):4266-4270.
- (102) Χατζής Ι. Βασική Δερματολογία-Αφροδισιολογία. Πρώτη ed. Εκδόσεις Λίτσας, 1993.
- (103) Reed CJ. Apoptosis and cancer: strategies for integrating programmed cell death. *Semin Hematol* 2000; 37(4 Suppl 7):9-16.
- (104) Hussein MR, Haemel AK, Wood GS. Apoptosis and melanoma: molecular mechanisms. *J Pathol* 2003; 199(3):275-288.
- (105) Redondo P, Solano T, VAzquez B, Bauza A, Idoate M. Fas and Fas ligand: expression and soluble circulating levels in cutaneous malignant melanoma. *Br J Dermatol* 2002 Jul;147(1):80-6 2002; 147(1):80-86.
- (106) Fellenberg J, Mau H, Scheuerpflug C, Ewerbeck V, Debatin KM. Modulation of resistance to anti-APO-1-induced apoptosis in osteosarcoma cells by cytokines. *Int J Cancer* 1997; 72(3):536-542.
- (107) Xerri L, Devilard E, Hassoun J, Haddad P, Birg F. Malignant and reactive cells from human lymphomas frequently express Fas ligand but display a different sensitivity to Fas-mediated apoptosis. *Leukemia* 1997; 11(11):1868-1877.
- (108) Teraki Y, Shiohara T. Apoptosis and the skin. *Eur J Dermatol* 1999; 9(5):413-425.
- (109) Oishi M, Maeda K, Sugiyama S. Distribution of apoptosis-mediating Fas antigen in human skin and effects of anti-Fas monoclonal antibody on human

- epidermal keratinocyte and squamous cell carcinoma cell lines. Arch Dermatol Res 1994; 286(7):396-407.
- (110) Leithauser F, Dhein J, Mechtersheimer G, Koretz K, Bruderlein S, Henne C et al. Constitutive and induced expression of APO-1, a new member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor superfamily, in normal and neoplastic cells. Lab Invest 1993; 69(4):415-429.
- (111) Leverkus M, Yaar M, Gilchrist BA. Fas/Fas ligand interaction contributes to UV-induced apoptosis in human keratinocytes. Exp Cell Res 1997; 232(2):255-262.
- (112) Oishi M, Maeda K, Sugiyama S. Distribution of apoptosis-mediating Fas antigen in human skin and effects of anti-Fas monoclonal antibody on human epidermal keratinocyte and squamous cell carcinoma cell lines. Arch Dermatol Res 1994; 286(7):396-407.
- (113) Teraki Y, Shiohara T. Apoptosis and the skin. Eur J Dermatol 1999; 9(5):413-425.
- (114) Filipowicz E, Adegboyega P, Sanchez RL, Gatalica Z. Expression of CD95 (Fas) in sun-exposed human skin and cutaneous carcinomas. Cancer 2002; 94(3):814-819.
- (115) Taylor RS, Griffiths CE, Brown MD, Swanson NA, Nickoloff BJ. Constitutive absence and interferon-gamma-induced expression of adhesion molecules in basal cell carcinoma. J Am Acad Dermatol 1990; 22(1):721-726.
- (116) Berthou C, Michel L, Soulie A, Jean-Louis F, Flageul B, Dubertret L et al. Acquisition of granzyme B and Fas ligand proteins by human keratinocytes contributes to epidermal cell defense. J Immunol 1997; 159(11):5293-5300.
- (117) Kehren J, Desvignes C, Krasteva M, Ducluzeau MT, Assossou O, Horand F et al. Cytotoxicity is mandatory for CD8(+) T cell-mediated contact hypersensitivity. J Exp Med 1999; 189(5):779-786.
- (118) Aragane Y, Kulms D, Metze D, Wilkes G, Poppelmann B, Luger TA et al. Ultraviolet light induces apoptosis via direct activation of CD95 (Fas/APO-1) independently of its ligand CD95L. J Cell Biol 1998; 140(1):171-182.

- (119) Nakajima M, Nakajima A, Kayagaki N, Honda M, Yagita H, Okumura K. Expression of Fas ligand and its receptor in cutaneous lupus: implication in tissue injury. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 83(3):223-229.
- (120) Wrone-Smith T, Johnson T, Nelson B, Boise LH, Thompson CB, Nunez G et al. Discordant expression of Bcl-x and Bcl-2 by keratinocytes in vitro and psoriatic keratinocytes in vivo. *Am J Pathol* 1995; 146(5):1079-1088.
- (121) Morita A, Werfel T, Stege H, Ahrens C, Karmann K, Grewe M et al. Evidence that singlet oxygen-induced human T helper cell apoptosis is the basic mechanism of ultraviolet-A radiation phototherapy. *J Exp Med* 1997; 186(10):1763-1768.
- (122) Seishima M, Seishima M, Takemura M, Saito K, Kitajima Y. Increased serum soluble Fas, tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 concentrations in generalized pustular psoriasis. *Dermatology* 1998; 196(3):371-372.
- (123) Viard I, Wehrli P, Bullani R, Schneider P, Holler N, Salomon D et al. Inhibition of toxic epidermal necrolysis by blockade of CD95 with human intravenous immunoglobulin. *Science* 1998; 282(5388):490-493.
- (124) Hill LL, Ouhitit A, Loughlin SM, Kripke ML, Ananthaswamy HN, Owen-Schaub LB. Fas ligand: a sensor for DNA damage critical in skin cancer etiology. *Science* 1999; 285(5429):898-900.
- (125) Hill LL, Shreedhar VK, Kripke ML, Owen-Schaub LB. A critical role for Fas ligand in the active suppression of systemic immune responses by ultraviolet radiation. *J Exp Med* 1999; 189(8):1285-1294.
- (126) Schwarz A, Grabbe S, Grosse-Heitmeyer K, Roters B, Riemann H, Luger TA et al. Ultraviolet light-induced immune tolerance is mediated via the Fas/Fas-ligand system. *J Immunol* 1998; 160(9):4262-4270.
- (127) Arnold R, Seifert M, Asadullah K, Volk HD. Crosstalk between keratinocytes and T lymphocytes via Fas/Fas ligand interaction: modulation by cytokines. *J Immunol* 1999; 162(12):7140-7147.
- (128) Lee SH, Jang JJ, Lee JY, Kim SY, Park WS, Shin MS et al. Fas ligand is expressed in normal skin and in some cutaneous malignancies. *Br J Dermatol* 1998; 139(2):186-191.

- (129) Sprecher E, Bergman R, Meilick A, Kerner H, Manov L, Reiter I et al. Apoptosis, Fas and Fas-ligand expression in melanocytic tumors. *J Cutan Pathol* 1999; 26(2):72-77.
- (130) Ferrarini M, Imro MA, Sciorati C, Heltai S, Protti MP, Pellicciari C et al. Blockade of the Fas-triggered intracellular signaling pathway in human melanomas is circumvented by cytotoxic lymphocytes. *Int J Cancer* 1999; 81(4):573-579.
- (131) Terheyden P, Siedel C, Merkel A, Kampgen E, Brocker EB, Becker JC. Predominant expression of Fas (CD95) ligand in metastatic melanoma revealed by longitudinal analysis. *J Invest Dermatol* 1999; 112(6):899-902.
- (132) Fernandez-Figueras MT, Armengol P, Puig L, Molinero JL, Esquius M, Sirera G et al. Absence of Fas (CD95) and FasL (CD95L) immunohistochemical expression suggests Fas/FasL-mediated apoptotic signal is not relevant in cutaneous Kaposi's sarcoma lesions. *J Cutan Pathol* 1999; 26(9):417-423.
- (133) Epstein JH. Photocarcinogenesis, skin cancer, and aging. *J Am Acad Dermatol* 1983; 9(4):487-502.
- (134) Novick NL, Kest E, Gordon M. Advances in the biology and carcinogenesis of basal cell carcinoma. *N Y State J Med* 1988; 88(7):367-370.
- (135) Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, Ward E, Thun MJ. Cancer statistics, 2003. *CA Cancer J Clin* 2003; 53(1):5-26.
- (136) Sexton M, Jones DB, Maloney ME. Histologic pattern analysis of basal cell carcinoma. Study of a series of 1039 consecutive neoplasms. *J Am Acad Dermatol* 1990; 23(6 Pt 1):1118-1126.
- (137) Lever WF S-LG. *Histopathology of the Skin*. 1990.
- (138) Mikhail GR, Nims LP, Kelly AP, Jr., Ditmars DM, Jr., Eyller WR. Metastatic basal cell carcinoma: review, pathogenesis, and report of two cases. *Arch Dermatol* 1977; 113(9):1261-1269.
- (139) Dubin N, Kopf AW. Multivariate risk score for recurrence of cutaneous basal cell carcinomas. *Arch Dermatol* 1983; 119(5):373-377.

- (140) Heenen M, Galand P. Decreased rate of DNA-chain growth in human basal cell carcinoma. *Nature* 1980; 285(5762):265-267.
- (141) Grimwood RE, Ferris CF, Mercill DB, Huff JC. Proliferating cells of human basal cell carcinoma are located on the periphery of tumor nodules. *J Invest Dermatol* 1986; 86(2):191-194.
- (142) Hunt MJ, Halliday GM, Weedon D, Cooke BE, Barnetson RS. Regression in basal cell carcinoma: an immunohistochemical analysis. *Br J Dermatol* 1994; 130 AB -(1):1-8.
- (143) Baum HP, Meurer I, Unteregger G. Ki-67 antigen expression and growth pattern of basal cell carcinomas. *Arch Dermatol Res* 1993; 285(5):291-295.
- (144) Baum HP, Meurer I, Unteregger G. Ki-67 antigen expression and growth pattern of basal cell carcinomas. *Arch Dermatol Res* 1993; 285(5):291-295.
- (145) Campbell C, Quinn AG, Rees JL. Codon 12 Harvey-ras mutations are rare events in non-melanoma human skin cancer. *Br J Dermatol* 1993; 128(2):111-114.
- (146) Rady P, Scinicariello F, Wagner RF, Jr., Tyring SK. p53 mutations in basal cell carcinomas. *Cancer Res* 1992; 52(13):3804-3806.
- (147) Marx J. How p53 suppresses cell growth. *Science* 1993; 262(5140):1644-1645.
- (148) Leffell DJ. The scientific basis of skin cancer. *J Am Acad Dermatol* 2000; 42(1 Pt 2):18-22.
- (149) Kondo E, Yoshino T, Yamadori I, Matsuo Y, Kawasaki N, Minowada J et al. Expression of Bcl-2 protein and Fas antigen in non-Hodgkin's lymphomas. *Am J Pathol* 1994; 145(2):330-337.
- (150) Kondo E, Yoshino T, Nishiuchi R, Sakuma I, Nishizaki K, Kayagaki N et al. Expression of Fas ligand mRNA in germinal centres of the human tonsil. *J Pathol* 1997; 183(1):75-79.
- (151) Nguyen PL, Harris NL, Ritz J, Robertson MJ. Expression of CD95 antigen and Bcl-2 protein in non-Hodgkin's lymphomas and Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 1996; 148(3):847-853.

- (152) Molica S, Mannella A, Dattilo A, Levato D, Iuliano F, Peta A et al. Differential expression of BCL-2 oncoprotein and Fas antigen on normal peripheral blood and leukemic bone marrow cells. A flow cytometric analysis. *Haematologica* 1996;302-309.
- (153) Moller P, Henne C, Leithauser F, Eichelmann A, Schmidt A, Bruderlein S et al. Coregulation of the APO-1 antigen with intercellular adhesion molecule- 1 (CD54) in tonsillar B cells and coordinate expression in follicular center B cells and in follicle center and mediastinal B-cell lymphomas. *Blood* 1993; 81(8):2067-2075.
- (154) Beljaards RC, Van Beek P, Willemze R. Relation between expression of adhesion molecules and clinical behavior in cutaneous follicle center cell lymphomas. *J Am Acad Dermatol* 1997; 37(1):34-40.
- (155) Freedman AS. Expression and function of adhesion receptors on normal B cells and B cell non-Hodgkin's lymphomas. *Semin Hematol* 1993; 30(4):318-328.
- (156) Vacca A, Ranieri G, Ribatti D, Di Stefano R, Caloro D, Serio G et al. Differential expression of two ICAM-1 epitopes and LFA-1 chains in B- cell non-Hodgkin's lymphomas. *Eur J Haematol* 1994; 53(2):85-92.
- (157) Mullauer L, Mosberger I, Chott A. Fas ligand expression in nodal non-Hodgkin's lymphoma. *Mod Pathol* 1998; 11(4):369-375.
- (158) Xerri L, Carbuccia N, Parc P, Hassoun J, Birg F. Frequent expression of FAS/APO-1 in Hodgkin's disease and anaplastic large cell lymphomas. *Histopathology* 1995; 27(3):235-241.
- (159) Lee RK, Spielman J, Zhao DY, Olsen KJ, Podack ER. Perforin, Fas ligand, and tumor necrosis factor are the major cytotoxic molecules used by lymphokine-activated killer cells. *J Immunol* 1996; 157(5):1919-1925.
- (160) Willemze R, Kerl H, Sterry W, Berti E, Cerroni L, Chimenti S et al. EORTC classification for primary cutaneous lymphomas: a proposal from the Cutaneous Lymphoma Study Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. *Blood* 1997; 90(1):354-371.

- (161) Bakels V, van Oostveen JW, Gordijn RL, Walboomers JM, Meijer CJ, Willemze R. Diagnostic value of T-cell receptor beta gene rearrangement analysis on peripheral blood lymphocytes of patients with erythroderma. *J Invest Dermatol* 1991; 97(5):782-786.
- (162) Beljaards RC, Willemze R. The prognosis of patients with lymphomatoid papulosis associated with malignant lymphomas. *Br J Dermatol* 1992; 126(6):596-602.
- (163) Beljaards RC, Meijer CJ, Van der Putte SC, Hollema H, Geerts ML, Bezemer PD et al. Primary cutaneous T-cell lymphoma: clinicopathological features and prognostic parameters of 35 cases other than mycosis fungoides and CD30- positive large cell lymphoma. *J Pathol* 1994; 172:53-60.
- (164) Geelen FA, Vermeer MH, Meijer CJ, Van der Putte SC, Kerkhof E, Kluin PM et al. bcl-2 protein expression in primary cutaneous large B-cell lymphoma is site-related. *J Clin Oncol* 1998; 16(6):2080-2085.
- (165) Rijlaarsdam JU, Toonstra J, Meijer OW, Noordijk EM, Willemze R. Treatment of primary cutaneous B-cell lymphomas of follicle center cell origin: a clinical follow-up study of 55 patients treated with radiotherapy or polychemotherapy. *J Clin Oncol* 1996; 14(2):549-555.
- (166) Vermeer MH, Geelen FA, van Haselen CW, Voorst Vader PC, Geerts ML, van Vloten WA et al. Primary cutaneous large B-cell lymphomas of the legs. A distinct type of cutaneous B-cell lymphoma with an intermediate prognosis. Dutch Cutaneous Lymphoma Working Group. *Arch Dermatol* 1996; 132(11):1304-1308.
- (167) Willemze R, Meyer CJ, van Vloten WA, Scheffer E. The clinical and histological spectrum of lymphomatoid papulosis. *Br J Dermatol* 1982; 107(2):131-144.
- (168) Willemze R, van Vloten WA, Hermans J, Damsteeg MJ, Meijer CJ. Diagnostic criteria in Sezary's syndrome: a multiparameter study of peripheral blood lymphocytes in 32 patients with erythroderma. *J Invest Dermatol* 1983; 81(5):392-397.
- (169) Willemze R, Meijer CJ, Sentis HJ, Scheffer E, van Vloten WA, Toonstra J et al. Primary cutaneous large cell lymphomas of follicular center cell origin. A

- clinical follow-up study of nineteen patients. *J Am Acad Dermatol* 1987; 16(3 Pt 1):518-526.
- (170) Willemze R, Beljaards RC. Spectrum of primary cutaneous CD30 (Ki-1)-positive lymphoproliferative disorders. A proposal for classification and guidelines for management and treatment. *J Am Acad Dermatol* 1993; 28(6):973-980.
- (171) Nickoloff BJ. Light-microscopic assessment of 100 patients with patch/plaque-stage mycosis fungoides. *Am J Dermatopathol* 1988; 10(6):469-477.
- (172) Smoller BR, Bishop K, Glusac E, Kim YH, Hendrickson M. Reassessment of histologic parameters in the diagnosis of mycosis fungoides. *Am J Surg Pathol* 1995; 19(12):1423-1430.
- (173) Sentis HJ, Willemze R, Scheffer E. Histopathologic studies in Sezary syndrome and erythrodermic mycosis fungoides: a comparison with benign forms of erythroderma. *J Am Acad Dermatol* 1986; 15(6):1217-1226.
- (174) Verhaegh ME, Sanders CJ, Arends JW, Neumann HA. Expression of the apoptosis-suppressing protein Bcl-2 in non-melanoma skin cancer. *Br J Dermatol* 1995; 132(5):740-744.
- (175) Messer G, Kick G, Ranki A, Koskimies S, Reunala T, Meurer M. Polymorphism of the tumor necrosis factor genes in patients with dermatitis herpetiformis. *Dermatology* 1994; 189 Suppl 1:135-137.
- (176) Crowson AN, Magro CM, Kadin ME, Stranc M. Differential expression of the bcl-2 oncogene in human basal cell carcinoma. *Hum Pathol* 1996; 27(4):355-359.
- (177) Morales-Ducret CR, van de RM, Smoller BR. bcl-2 expression in melanocytic nevi. Insights into the biology of dermal maturation. *Arch Dermatol* 1995; 131(8):915-918.
- (178) Morales-Ducret CR, van de RM, LeBrun DP, Smoller BR. bcl-2 expression in primary malignancies of the skin. *Arch Dermatol* 1995; 131(8):909-912.

- (179) Rodriguez-Villanueva J, Colome MI, Brisbay S, McDonnell TJ. The expression and localization of bcl-2 protein in normal skin and in non-melanoma skin cancers. 1995.
- (180) Mills AE. Solar keratosis can be distinguished from superficial basal cell carcinoma by expression of bcl-2. *Am J Dermatopathol* 1997; 19(5):443-445.
- (181) Buechner SA, Wernli M, Harr T, Hahn S, Itin P, Erb P. Regression of basal cell carcinoma by intralesional interferon-alpha treatment is mediated by CD95 (Apo-1/Fas)-CD95 ligand-induced suicide. *J Clin Invest* 1997; 100(11):2691-2696.
- (182) Bachmann F, Buechner SA, Wernli M, Strebel S, Erb P. Ultraviolet light downregulates CD95 ligand and TRAIL receptor expression facilitating actinic keratosis and squamous cell carcinoma formation. *J Invest Dermatol* 2001; 117(1):59-66.
- (183) Buechner S, Wernli M, Bachmann F, Harr T, Erb P. Intralesional interferon in basal cell carcinoma: how does it work? *Recent Results Cancer Res* 2002; 160:246-250.
- (184) Taylor RS, Griffiths CE, Brown MD, Swanson NA, Nickoloff BJ. Constitutive absence and interferon-gamma-induced expression of adhesion molecules in basal cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 1990; 22(5):721-726.
- (185) Mitra RS, Judge TA, Nestle FO, Turka LA, Nickoloff BJ. Psoriatic skin-derived dendritic cell function is inhibited by exogenous IL-10. Differential modulation of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression. *J Immunol* 1995; 154(6):2668-2677.
- (186) Kim J, Modlin RL, Moy RL, Dubinett SM, McHugh T, Nickoloff BJ et al. IL-10 production in cutaneous basal and squamous cell carcinomas. A mechanism for evading the local T cell immune response. *J Immunol* 1995; 155(4):2240-2247.
- (187) Nestle FO, Burg G, Fah J, Wrone-Smith T, Nickoloff BJ. Human sunlight-induced basal-cell-carcinoma-associated dendritic cells are deficient in T cell co-stimulatory molecules and are impaired as antigen-presenting cells. *Am J Pathol* 1997; 150(2):641-651.