

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000265266





74

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ
ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΑΝΟΣΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ
ΠΝΕΥΜΟΝΑ ΣΕ ΑΤΟΜΑ ΜΕ ΜΗ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ
ΕΚΘΕΣΗ ΣΕ ΑΜΙΑΝΤΟ «ΠΝΕΥΜΩΝ ΜΕΤΣΟΒΟΥ».**

KARMEN MANTA-ΣΤΑΧΟΥΛΗ
Πνευμονολόγος

βυβλιν

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2008



« 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(νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».



Ημερομηνία αίτησης της κ. Κάρμεν Μαντά-Σταχούλη: 30-5-1996

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 305^α/18-6-1996

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Κωνσταντόπουλος Σταύρος Αναπληρωτής Καθηγητής Πνευμονολογίας

Μέλη

Σπύρος Παπίρης Επίκουρος Καθηγητής Πνευμονολογία

Δαλαβάγκα Παναγιώτα-Άννα, Επίκουρη Καθηγήτρια Ανατομίας

Ανασύσταση Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Αριθμ Συνεδρ. 489^α/4-2-2003

Επιβλέπων

Κωνσταντόπουλος Σταύρος Καθηγητής Παθολογίας- Πνευμονολογίας

Μέλη

Δαλαβάγκα Παναγιώτα-Άννα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ανατομίας-Ιστολογίας-

Εμβρυολογίας

Βασιλείου Μιλτιάδης Αναπληρωτής Καθηγητής Πνευμονολογίας

Ανασύσταση Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Αριθμ Συνεδρ.608^α/12-6-2007

Επιβλέπων

Κωνσταντόπουλος Σταύρος Καθηγητής Παθολογίας- Πνευμονολογίας

Μέλη

Δαλαβάγκα Παναγιώτα-Άννα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ανατομίας-Ιστολογίας-

Εμβρυολογίας

Στεφάνου Δημήτριος Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 24-7-1996

«Ενεργοποίηση ανοσοδραστικών κυττάρων πνεύμονα σε άτομα με μη επαγγελματική έκθεση σε αμιάντο-«Πνεύμων Μετσόβου»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 635/15-4-2008

1. Γουδέβενος Ιωάννης Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
2. Κωνσταντόπουλος Σταύρος Καθηγητής Πνευμονολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
3. Μπουραντάς Κωνσταντίνος Καθηγητής Παθολογίας-Αιματολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων



4. Δαλαβάγκα Παναγιώτα-Άννα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
5. Στεφάνου Δημήτριος Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
6. Χαραλαμπίδης Κωνσταντίνος Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην κλινική –Λειτουργική Φυσιολογία Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
7. Δασκαλόπουλος Γεώργιος Επίκουρος Καθηγητής Πνευμονολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 3-7-2008

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Γουδέβενος Ιωάννης

Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Σε μελέτη της Πανεπιστημιακής Πνευμονολογικής Κλινικής Ιωαννίνων ,το 1985 ανεδείχθη ότι η ενδημική εμφάνιση αποιτανώσεων υπεζωκότα σε Μετσοβίτες ,συνοδευόταν από υψηλή επίπτωση κακοήθους μεσοθηλιώματος (MPM)-300 φορές υψηλότερη συχνότερο απ' ότι στον γενικό πληθυσμό.

Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι τόσο οι αποιτανώσεις υπεζωκότα όσο και το υψηλό ποσοστό εμφάνισης κακοήθους μεσοθηλιώματος οφείλονταν σε μη επαγγελματική έκθεση σε αμίαντο τύπου τρεμολίτη που υπήρχε σε ένα υλικό λεγόμενο « λούτο» που χρησιμοποιούσαν οι κάτοικοι του Μετσόβου για το άσπρισμα των σπιτιών.

Επιπλέον τα περισσότερα μεσοθηλιώματα εμφανίστηκαν σε Μετσοβίτες χωρίς αποιτανώσεις υπεζωκότα στην Α/Α θώρακος. Η μελέτη που ακολούθησε, με ανάλυση του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (BAL) στους Μετσοβίτες , απέδειξε την ύπαρξη μιας λεμφοκυτταρικής κυψελιδίτιδας μόνο στην ομάδα με αποιτανώσεις (PC+).

Η παρούσα εργασία, επικεντρώθηκε στη ανάλυση των κυψελιδικών μακροφάγων (ΜΦ) και σε πιθανούς μηχανισμούς ενεργοποίησης ΜΦ και λεμφοκυττάρων καθώς και στην επακόλουθη κυψελιδίτιδα , πιθανόν υπεύθυνη για την « προστασία έναντι κακοηθείας » που παρατηρήθηκε στους Μετσοβίτες με αποιτανώσεις υπεζωκότα. Μελετήθηκαν Μετσοβίτες με και χωρίς αποιτανώσεις (PC+ και PC-) για την εκτίμηση των διαφορών των κυψελιδικών ΜΦ μεταξύ των δυο ομάδων.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής για την συμβολή τους στη περάτωση της διατριβής μου.

Ιδιαίτερα θέλω να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή Σταύρο Κωνσταντόπουλο, Καθηγητή της Πνευμονολογίας της Ιατρικής Σχολής , που με προέτρεψε να ασχοληθώ με αυτά τα σπάνια δείγματα και μου προσέφερε τη δυνατότητα ανάληψης πρωτοβουλιών.

Η ολοκλήρωση της Διατριβής αυτής θα ήταν αδύνατη χωρίς τη συνεχή επίβλεψη και τη συμπαράσταση και των άλλων μελών της συμβουλευτικής επιτροπής, ιδιαιτέρως της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Γιωτάννας Δαλαβάγκα , ενώ ο Αναπληρωτής



Καθηγητής Παθ/ανατομίας κύριος Δ Στεφάνου έδωσε σημαντικές συμβουλές για την τελική διαμόρφωση της μελέτης.

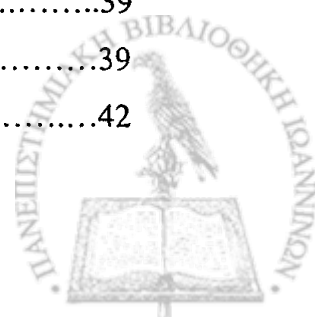
Επίσης ευχαριστώ, ιδιαίτερα την διδάκτορα Αρχιμανδρίτη Δήμητρα για την βοήθεια και τις τεχνικές συμβουλές.

Τέλος θέλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερα, την οικογένειά μου για την συμπαράσταση και την κατανόηση που έδειξαν κατά την διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	3
1.1.	Σκοπός της εργασίας.....	3
	ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	6
1.2.	ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΔΡΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ.....	6
1.2.1	ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΑ-ΚΥΨΕΛΙΔΙΚΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ.....	7
1.2.1.α.	Προέλευση των μακροφάγων.....	7
1.2.1.β.	Η μορφολογία των μακροφάγων	11
1.2.1.γ.	Πληθυσμοί πνευμονικών μακροφάγων-μορφολογικά χαρακτηριστικά.....	14
1.2.1.δ.	Ρόλος των Μακροφάγων.....	18
1.2.2.	ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ.....	25
1.2.2.α.	Μορφολογικά χαρακτηριστικά.....	25
1.3.	ΒΡΟΓΧΟΚΥΨΕΛΙΔΙΚΗ ΕΚΠΛΥΣΗ.....	27
1.4.	ΑΜΙΑΝΤΟΣ.....	30
1.5.	ΠΝΕΥΜΩΝ ΜΕΤΣΟΒΟΥ.....	33
	ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	37
2.	ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	39
2.1.	Πληθυσμός μελέτης.....	39
2.2.	Βρογχοκυψελιδική έκπλυση.....	39
2.2.1.	Επεξεργασία υλικού Βρογχοκυψελιδικής έκπλυσης.....	42



2.2.2.	Επεξεργασία κυττάρων	44
2.2.2.α.	Χρώση αιματοξυλίνης-ήωσίνης.....	44
2.2.2.β.	Ανοσοϊστοχημεία.....	45
2.2.2.γ.	Μονοκλωνικά αντισώματα	48
2.3.	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	50
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	53
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	65
5.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	75
6.	ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	79
7.	SUMMARY.....	81
8.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	85



ΕΙΣΑΓΩΓΗ



1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

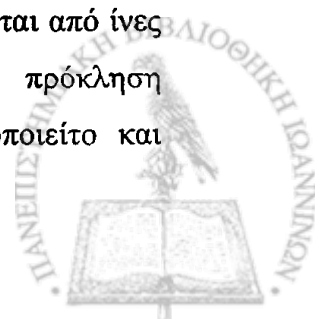
1.1. Σκοπός της εργασίας

Ο πληθυσμός της μελέτης αποτελείται από άτομα με περιβαλλοντική (μη επαγγελματική) έκθεση σε αμίαντο. Οι κάτοικοι της περιοχής Μετσόβου, προμηθεύονταν αμιαντούχο υλικό, (λούτο, ασπρόχωμα), το οποίο εξορυσσόταν από την περιοχή, το κονιορτοποιούσαν και το χρησιμοποιούσαν ως υλικό ασπρίσματος του εσωτερικού των σπιτιών τους. Τα άτομα αυτά, σύμφωνα με την μέχρι τώρα μελέτη τους από την ερευνητική μας ομάδα, χωρίζονται σε δύο ομάδες. Μία ομάδα α) με υπεζωκοτικές αποτιτανώσεις, λεμφοκυτταρική κυψελιδίτιδα και πρωτεΐνες, (πιθανότατα προϊόντα ενεργοποιημένων μακροφάγων), στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα και μία ομάδα β) χωρίς υπεζωκοτικές πλάκες και χωρίς αντίδραση από τις κυψελίδες. Δηλαδή μία ομάδα που εμφανίζει μία έντονη δραστηριότητα στις κυψελίδες της, σε αντίθεση με την έλλειψη, τουλάχιστον εμφανούς, τοπικής λεμφοκυτταρικής δραστηριότητας της άλλης ομάδας.

Η υπόθεσή μας είναι ότι βρισκόμαστε μπροστά σε διαφορετικό βαθμό ή τρόπο ενεργοποίησης των κυψελιδικών μακροφάγων και ότι αυτή η διαφορά είναι πολύ σημαντική στο επίπεδο της προστασίας από καρκίνο.

Έτσι το επόμενο βήμα θα έπρεπε να είναι μία εις βάθος έρευνα των κυψελιδικών μακροφάγων των δύο ομάδων Μετσοβιτών, σε σχέση με τυχόν διαφορές στην παρουσία υποπληθυσμών των μακροφάγων και παραγόντων που υποδεικνύουν πιθανές διαφορές στον τρόπο ενεργοποίησης τους .

Οι κάτοικοι της περιοχής Μετσόβου αποτελούν έναν πληθυσμό ατόμων με ιδιόρρυθμη έκθεση στον αμίαντο. Τον χρησιμοποιούσαν ως υλικό ασπρίσματος του εσωτερικού των σπιτιών τους δύο φορές τον χρόνο (Constantopoulos S.H, et al 1985) και το προτιμούσαν από τον παραδοσιακό ασβέστη διότι το επίχρισμα ήταν πιο ανθεκτικό. Από την αρχή της μελέτης μας δείξαμε ότι το υλικό αποτελείται από ίνες τρεμολίτη, δηλαδή αμφιβόλου αμιάντου, ιδιαίτερα ικανού για πρόκληση μεσοθηλιώματος. Το υλικό εξορυσσόταν από την περιοχή και κονιορτοποιείτο και



κατά την κονιορτοποίηση του λούτου (μπάλλες υλικού με αμίντο) , απελευθερώνονταν στο περιβάλλον τεράστιες ποσότητες ινών αμιάντου. Συνεπώς η έκθεση στον αμιάντο ήταν μεν μικρής χρονικής διάρκειας αλλά σε τεράστια ποσότητα ινών.

Συγκεκριμένα, μετρήσεις μας έχουν δείξει ότι κατά το “σπάσιμο“ του λούτο, εκλύονται >200 ίνες/ml, όταν το επιτρεπόμενο όριο για τις βιομηχανίες αμιάντου είναι 1 ίνα/ml (Constantopoulos S.H, et al 1985). Το υλικό αυτό το χρησιμοποιούσαν όλοι ανεξαιρέτως, μέχρι την δεκαετία του '50 και από τότε με την εμφάνιση πύο ευχρήστων υλικών, η χρήση του λούτου σταδιακά εγκατελήφθη, ώστε πρακτικώς σήμερα δεν χρησιμοποιείται. Το γεγονός ότι οι συνέπειες της εισπνοής αμιάντου δεν διαφέρουν μεταξύ ανδρών και γυναικών, οι οποίες κατ' εξοχήν ασχολούνταν με το άσπρισμα του σπιτιού έχοντας κοντά τους τα βρέφη και τα μικρά παιδιά τους, μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η έκθεση κατά την βρεφική και παιδική ηλικία αποτελεί πολύ σημαντικό παράγοντα, η δε περαιτέρω έκθεση των γυναικών είχε μικρότερη σημασία (Constantopoulos S.H, et al 1985).

Οι συνέπειες της εισπνοής αμιάντου, ήταν υπεζωκοτικές αποτιτανώσεις, εμφανείς στην απλή α/α θώρακος στο 47% του πληθυσμού (Constantopoulos S.H, et al 1987) και επιπολασμός κακοήθους Μεσοθηλιώματος 300 φορές υψηλότερος από τον αναμενόμενο στον κοινό πληθυσμό (Langer, et al 1987). Η περαιτέρω έρευνα έδειξε ότι οι ίνες αμιάντου που ανευρέθησαν σε διαβρογχικές βιοψίες ήταν ίδιες με του λούτο (Langer A.M, et al 1987). ενώ σωμάτια αμιάντου ανιχνεύθησαν στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα, η ανάλυση του οποίου απεκάλυψε δύο διαφορετικές ομάδες.

Μία ομάδα με αύξηση των λεμφοκυττάρων στις κυψελίδες και μία ομάδα με φυσιολογικό ποσοστό λεμφοκυττάρων. Τα άτομα με λεμφοκυταρική κυψελιδίτιδα ενεφάνιζαν υπεζωκοτικές πλάκες, οι οποίες απουσίαζαν από την ομάδα χωρίς κυψελιδίτιδα, στην οποία όμως εντοπίστηκε το σύνολο σχεδόν των μεσοθηλιωμάτων. Επίσης στην ομάδα με υπεζωκοτικές πλάκες και κυψελιδίτιδα ανιχνεύθησαν ηλεκτροφορητικώς, δύο επιπλέον πρωτεΐνες, οι οποίες φαίνεται ότι ανήκουν στην ομάδα των προϊόντων ενεργοποιημένων μακροφάγων (Constantopoulos S.H., et al 1992) (Galani V, et al 2002). Θεωρούμε ότι το κύτταρο κλειδί στην αντίδραση αυτή είναι το κυψελιδικό μακροφάγο το οποίο ανευρίσκεται στην επιφάνεια των κυψελίδων και είναι επιφορτισμένο με την προστασία τους από την δράση



εισπνεομένων σωματιδίων (Constantopoulos S.H et al 1985), (Langer et al 1987) (Constantopoulos S.H et al 1992). Τα κύτταρα αυτά αντιδρούν διαφορετικά στις δύο ομάδες ατόμων αν και ο εξωγενής τοξικός παράγων είναι κοινός και η έκθεση πανομοιότυπη. Ακόμα φαίνεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο και στην εκδήλωση νεοπλασίας, καθώς το σύνολο σχεδόν των νεοπλασιών στις 10 από τις 12 περιπτώσεις (Constantopoulos et al 1992) εντοπίζονται στην ομάδα χωρίς υπεζωκοτικές αποπιτανώσεις, χωρίς κυψελιδίτιδα, χωρίς επ ιπλέον πρωτεΐνες.

Όλα αυτά τα στοιχεία, θεωρούμε ότι ενισχύουν την αρχική μας υπόθεση ότι δηλαδή οι υπεζωκοτικές αποπιτανώσεις και η κυψελιδίτις αποτελούν έκφραση επιτυχούς προστασίας των ατόμων αυτών από νεοπλασίες (Galani V, et al 2002).

Πιστεύουμε ότι η υπόθεσή μας αυτή έπρεπε να μελετηθεί εις βάθος. Ετσι στην παρούσα ερευνητική προσπάθεια κεντρικό ρόλο παίζει η διερεύνηση της ενεργοποίησης των κυψελιδικών μακροφάγων στις δύο ομάδες των εκτεθέντων σε λούτο Μετσοβιτών. Στην μελέτη περιλαμβάνονται, ως ομάδα ελέγχου, ασθενείς με σαρκοείδωση, για να μελετηθούν παράμετροι σχετιζόμενοι αποκλειστικώς με την συσσώρευση λεμφοκυττάρων στις κυψελίδες.



ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.2.ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΔΡΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Οι πνεύμονες είναι το μοναδικό όργανο το οποίο είναι άμεσα εκτεθειμένο στα αντιγόνα του περιβάλλοντος μέσω των 10.000 lt αέρα που εισπνέονται καθημερινώς. Στους πνεύμονες εντοπίζεται πλήθος ανοσοδραστικών κυττάρων, μεταξύ των οποίων τα λεμφοκύτταρα και τα μακροφάγα τόσο τα κυψελιδικά όσο και τα του διάμεσου ιστού.

Τα λεμφοκύτταρα είναι επιτελικά και εκτελεστικά κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος και έχουν ως τόπο παραγωγής τους τον μυελό των οστών. Ειδικότερα η ενεργοποίηση των Β λεμφοκύτταρα γίνεται στον μυελό των οστών και των Τ λεμφοκυττάρων στον θύμο αδένα. Μετά την διαφοροποίηση τους τα λεμφοκύτταρα μεταναστεύουν στα δευτερογενή λεμφικά όργανα δηλ. στον σπλήνα, λεμφαδένες και διάχυτο λεμφικό ιστό (αμυγδαλές, παύερες, πλάκες, λεμφικός ιστός βρόγχων, αθροίσματα λεμφοκυττάρων στο χόριο βλεννογόνων).

Το ανοσολογικό σύστημα περιλαμβάνει εκτός από λεμφοκύτταρα και τα αντιγονοπαρουσιαστικά-βοηθητικά κύτταρα (μακροφάγα, δενδριτικά, κύτταρα Langerhans), τα οποία παράγονται επίσης στον μυελό των οστών, απ' όπου μεταναστεύουν στον λεμφικό και συνδετικό ιστό του οργανισμού.



1.2.1. ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΑ-ΚΥΨΕΛΙΔΙΚΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ

Τα πνευμονικά κυψελιδικά μακροφάγα είναι τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα του πνεύμονα και η πρωταρχική λειτουργία τους είναι η άμυνα του πνεύμονα εναντίον των εισπνεόμενων σωματιδίων. Το πνευμονικό κυψελιδικό μακροφάγο είναι ένα μοναδικό φαγοκύτταρο, διότι η θέση του στις πνευμονικές κυψελίδες το φέρνει σε άμεση επαφή με τον εισπνεόμενο αέρα και τα συστατικά του, αποτελώντας έτσι την πρώτη γραμμή άμυνας του πνευμονικού ιστού. Το αεροπληθές περιβάλλον των κυψελίδων συνετέλεσε ώστε τα κύτταρα αυτά να αποκτήσουν κατά την εξέλιξή τους ειδικές μεταβολικές και λειτουργικές ιδιότητες. Συγκεκριμένα το κυψελιδικό μακροφάγο συμμετέχει στην άμυνα του πνεύμονα κυρίως σαν φαγοκύτταρο και σε μικρότερο βαθμό σαν ανοσοδραστικό κύτταρο. Αν και δεν είναι ιδιαίτερος ισχυρό αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο, η έκκριση από αυτό ειδικών κυτταροκινών με τροποποιητική δράση έναντι άλλων ανοσοδραστικών κυττάρων, το καθιστά υπεύθυνο για την διατήρηση και εξέλιξη ανοσολογικών και φλεγμονωδών αντιδράσεων.

Τα κυψελιδικά μακροφάγα είναι τα μόνα μακροφάγα που είναι εκτεθειμένα στον αέρα και αποτελούν το 90 % των κυττάρων που ανευρίσκονται στην επιφάνεια του κυψελιδικού επιθήλιου. Επομένως αποτελούν έναν σημαντικό κυτταρικό πληθυσμό με έντονη δραστηριότητα στην άμυνα του αναπνευστικού συστήματος.

1.2.1.α. Προέλευση των μακροφάγων

Το σύστημα των μονοπυρήνων φαγοκυττάρων είναι ένα δυναμικό δίκτυο λειτουργικώς ετερογενών κυττάρων, της σειράς των μονοκυττάρων/μακροφάγων, που παίζει σημαντικό ρόλο στην άμυνα του οργανισμού.



Φυλογενετικά, τα μακροφάγα αποτελούν ένα από τα παλαιότερα και καλύτερα διατηρημένα συστήματα άμυνας του οργανισμού, ένα σύστημα του οποίου ηλικία υπερβαίνει τα 500 εκατομμύρια χρόνια.

Η προέλευση των μακροφάγων υπήρξε θέμα έντονης συζήτησης μεταξύ διαφόρων ερευνητών τα τελευταία χρόνια. Πρόγονος των μακροφάγων είναι το αιμοποιητικό πολυδύναμο αρχέγονο κύτταρο που προέρχεται από τον μυελό των οστών (stem cell), η διαφοροποίηση του οποίου οδηγεί στον μονοβλάστη και κατόπιν στο προμονοκύτταρο. Τα προμονοκύτταρα διαιρούνται δυο φορές στην πορεία της ανάπτυξής τους προς μονοκύτταρα. Τα ώριμα μονοκύτταρα μπαίνουν στην κυκλοφορία, παραμένουν εκεί περίπου 8 ώρες και κατόπιν μεταναστεύουν στον συνδετικό ιστό, όπου ωριμάζουν σε μακροφάγα των ιστών, τροποποιώντας ορισμένες τους ιδιότητες, αναλόγως του μικροπεριβάλλοντος στο οποίο ευρίσκονται. Έτσι αναγνωρίζονται:

- i) στο ήπαρ τα κύτταρα Kupffer,
- ii) στον πνεύμονα τα κυψελιδικά μακροφάγα αλλά και τα ιστικά μακροφάγα του διάμεσου πνευμονικού ιστού
- iii) τα μακροφάγα του περιτόναιου και υπεζωκότα
- iv) τα μακροφάγα του δέρματος
- v) τα μακροφάγα των λεμφαδένων
- vi) οι οστεοκλάστες του οστικού ιστού
- vii) τα μικρογλοιακά κύτταρα του νευρικού ιστού
- viii) τα μεσαγγειακά κύτταρα του νεφρικού σπειράματος κ.α.

(Hocking et al., 1979, Dethloff, 1988)

Ο μονοβλάστης είναι το αρχικό διαφοροποιούμενο κύτταρο του φαγοκυτταρικού συστήματος, ο βαθμός δε ωριμότητας του αντικατοπτρίζεται στην μορφολογία και στην δομή του. Είναι κύτταρο θετικό για λυσοζύμη και μη ειδικές εστεράσες, διαθέτει υποδοχείς για το Ig G και είναι ικανό να φαγοκυτταρώσει ερυθροκύτταρα συνδεδεμένα με Ig G.



Ο μονοβλάστης διαιρείται σε δυο προμονοκύτταρα, κύτταρα τα οποία διαφοροποιούμενα δίνουν τα μονοκύτταρα.

Τα προμονοκύτταρα αντιδρούν θετικά στην λυσοζύμη και σε μη ειδικές εστεράσες και επιπλέον διαθέτουν κοκκία στο κυτταρόπλασμα που αντιδρούν θετικά στην υπεροξειδάση. Στην πλειονότητα τους έχουν υποδοχείς στην επιφάνεια τους για Ig G Fc και C3b και φαγοκυτταρώνουν ερυθροκύτταρα συνδεδεμένα με το Ig G καθώς και βακτηρίδια. Σε μικρότερο βαθμό φαγοκυτταρώνουν και ερυθροκύτταρα συνδεδεμένα με το C3b τμήμα του συμπληρώματος.

Τα νέα δημιουργηθέντα μονοκύτταρα παραμένουν στον μυελό των οστών για λιγότερο από ένα 24ώρο πριν την είσοδο τους στο περιφερικό αίμα, ενώ στον φυσιολογικό ενήλικα το ποσοστό των μονοκυττάρων στο περιφερικό αίμα κυμαίνεται από 1 έως 6% του ολικού αριθμού των λευκοκυττάρων.

Η μετανάστευση των μονοκυττάρων του περιφερικού αίματος στους ιστούς όπου μετατρέπονται σε μακροφάγα, είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει:

1. την προσκόληση στο ενδοθήλιο
2. την διέλευση μεταξύ ενδοθηλιακών κυττάρων
3. την μετανάστευση μέσω των υποενδοθηλιακών στρωμάτων.

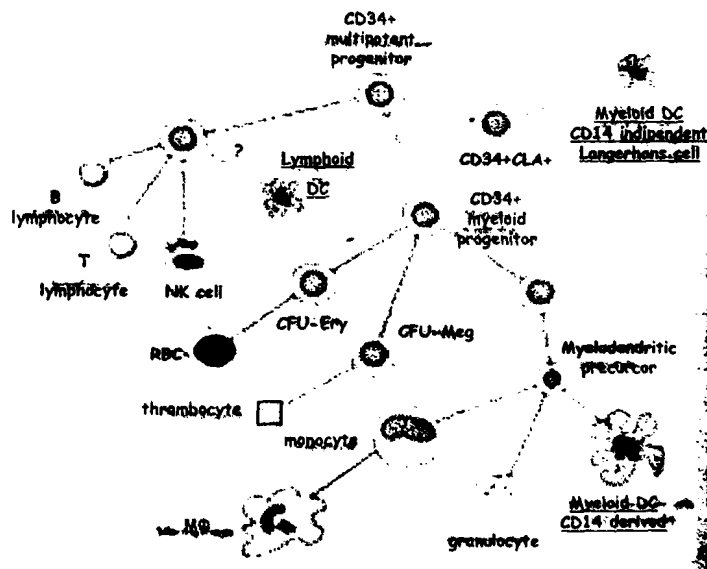
Η προσκόληση στο ενδοθήλιο των μονοκυττάρων πραγματοποιείται με την βοήθεια μεγάλου μοριακού βάρους γλυκοπρωτεϊνών όπως LFA-1 (Lymphocyte Function Associated Antigen-1) και CD11a/CD 18, που συνεργάζονται με τα μόρια προσκόλλησης ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1, CD54) τα οποία εκφράζονται στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα. (Dustin et al. 1986, Rothlein et al. 1986).

Κυτταροκίνες όπως η IL-1 και IFN- γ αυξάνουν την έκφραση των CD 54 μορίων από τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων και με αυτόν τον τρόπο διευκολύνουν την επιβράδυνση των μονοκυττάρων του αίματος, την προσκόλλησή τους στο ενδοθήλιο και εξαγγείωση και μετανάστευσή τους στο τόπο της φλεγμονής (Dustin et al. 1986). Επίσης μόρια CD31 εμπλέκονται στην διαενδοθηλιακή μετανάστευση των μονοκυττάρων (Muller and Randolph 1999).



Εφ'όσον τα μονοκύτταρα μεταναστεύουν στους περιφερικούς ιστούς, δεν επιστρέφουν ξανά στο περιφερικό αίμα και παραμένουν εκεί ως ιστικά μακροφάγα ακόμα και για μήνες.

Πάνω από 95% των ιστικών μακροφάγων προέρχονται από τα μονοκύτταρα του μυελού, ενώ σε ποσοστό περίπου 5% είναι δυνατόν να προέρχονται από την τοπική διαίρεση προϋπαρχόντων ιστικών μακροφάγων. Τα μακροφάγα σε ιστούς και κοιλότητες δεν αντιπροσωπεύουν έναν σταθερό πληθυσμό, αλλά ανανεώνονται τακτικά από την είσοδο νέων μονοκύτταρων από το αίμα.



Εικόνα 1: Προέλευση των μακροφάγων

1.2.1.β. Η μορφολογία των μακροφάγων

Τα ιστικά μακροφάγα είναι γενικώς μεγάλα κύτταρα με ανώμαλη επιφάνεια και σχήμα, με διάμετρο περίπου 25-50 μm . Περιέχουν έναν έκκεντρο, στογγυλό πυρήνα, και συχνά σαφές ορατό σύστημα Golgi στο κυτταρόπλασμα. Το κυτταρόπλασμα περιέχει μικρά και μεγάλα κοκκία καθώς και κυστίδια ποικίλου μεγέθους που όταν εντοπίζονται στην περιφέρεια αντικατοπτρίζουν την ενεργό ενδοκύττωση, χαρακτηριστική ιδιότητα των μακροφάγων, συνήθως η επιφάνειά τους εμφανίζει πτυχώσεις και ψευδοπόδια.

Τα μονοκύτταρα που κυκλοφορούν στο αίμα, είναι κύτταρα μικρότερου μεγέθους (περίπου 12-15 μm διάμετρος) με πυρήνα έκκεντρο, νεφροειδή ή στογγυλό που καταλαμβάνει τουλάχιστον το 50% του κυτταροπλάσματος το οποίο περιέχει κοκκία και μικρά κυστίδια.



Εικόνα 2: Μονοκύτταρο του αίματος

Ιστοχημεία των φαγοκυττάρων:

Τα μακροφάγα δίνουν PAS (-) αντίδραση, αν και μετά από φαγοκυττάρωση συγκεκριμένων ουσιών μπορεί να περιέχουν PAS (+) ενδοπλασματικά κοκκία και εκφράζουν στην επιφάνεια τους μη ειδικές εστεράσες, όξινη φωσφατάση και 5 νουκλεοτιδάση.

Υποδοχείς επιφανείας των μακροφάγων

Οι επιφανειακοί υποδοχείς των μακροφάγων ελέγχουν δραστηριότητες όπως, η ανάπτυξη, η διαφοροποίηση, η ενεργοποίηση και η μετανάστευση των κυττάρων, η αναγνώριση αντιγόνων, η ενδοκύττωση και η έκκριση διαφόρων κυτταροκινών.

1) Υποδοχείς Fc και τμημάτων του συμπληρώματος

A) Υποδοχείς για το Fc τμήμα των IgG, Ig A και Ig E ανοσοσφαιρινών (CD64, CDw32, CD16 για την IgG, CD23 για την IgE).

B) Υποδοχείς για το συμπλήρωμα (C3b, C3d, C3bi, C5a, C1q) οι οποίοι εμπλέκονται στην σύνδεση και φαγοκυττάρωση οψονοποιημένων μορίων. Ο υποδοχέας CR1 (CD35) αναγνωρίζει το C3b του συμπληρώματος και ο υποδοχέας CR3 αναγνωρίζει (CD 11b, CD18 ή MAC-1) αναγνωρίζει το τμήμα C3bi του συμπληρώματος.

2) Υποδοχείς για τις κυτταροκίνες

Τα μακροφάγα εκτός από την έκκριση διαφόρων κυτταροκινών διαθέτουν στην επιφάνεια τους υποδοχείς για άλλες διάφορες κυτταροκίνες που επηρεάζουν την λειτουργία των μακροφάγων, όπως η INF-γ (Gonwa et. Al., 1986), INF-α (Dinarello and Mier, 1987), TNF (Talmadge et. Al., 1988), IL-2 (Malkowsky, 1987), IL-4 (Paul and Ohava, 1987), M-CSF (Flanagan and Lader, 1998) και GM-CSF (Quesniaut and Jones, 1998).

3) Υποδοχείς για χημοκίνες



Αναγνωρίζονται πάνω από 60 και περιλαμβάνουν μέλη όλων των κατηγοριών των χημοκινών (C,CC,CXC,CX3C).

4)Υποδοχείς για λιποπρωτεΐνες

Οι υποδοχείς αυτοί όπως ο υποδοχέας της LDL που αναγνωρίζει την απολιποπρωτεΐνη E και B και ο υποδοχέας για το B-VLAC, εμπλέκονται στην φαγοκυττάρωση λιποπρωτεϊνών που περιέχουν χοληστερόλη και στην φαγοκυττάρωση χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών.

5)Υποδοχείς για τους AGE (advanced glycation end products)

Είναι ενεργά μόρια που σχηματίζονται κατά την αντίδραση γλυκόζης με πρωτεΐνες.

6)Υποδοχείς για lectin-like πρωτεΐνες

7)Υποδοχείς για προσκόλληση και μετανάστευση

Αντιγόνα επιφανείας

Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός μορίων στην επιφάνεια των μακροφάγων και μονοκυττάρων μέσω των οποίων αυτά τα κύτταρα αντιδρούν με το περιβάλλον. Ορισμένα από αυτά τα μόρια είναι υποδοχείς παραγόντων ανάπτυξης, άλλα είναι μόρια αναγνώρισης και προσκόλλησης και άλλα είναι ένζυμα ή υποδοχείς για ειδικούς συνδέτες. Κατά την διάρκεια της διαφοροποίησης και ενεργοποίησης των μακροφάγων, τα αντιγόνα επιφανείας αλλάζουν συνεχώς, ως απάντηση στις μεταβολές του εξωκυττάρου περιβάλλοντος. Το μόριο CD14 (Schutt,1999) είναι ένα από τα πιο χαρακτηριστικά αντιγόνα επιφανείας του φαγοκυτταρικού συστήματος (μονοκύτταρα και ιστικά μακροφάγα) αν και ανιχνεύεται σε μικρότερο ποσοστό και σε ουδετερόφιλα, και ως αναμένεται σε κύτταρα Langerhans καθώς και δενδριτικά σε κύτταρα. Από έρευνα του Gregory το 2000, το μόριο CD14 φαίνεται να λειτουργεί και ως υποδοχέας που εμπλέκεται στην αναγνώριση και φαγοκυττάρωση των αποπτωτικών κυττάρων. Το αντιγόνο CD68 είναι επίσης ένα ειδικό αντιγόνο επιφανείας για τα μονοκύτταρα και μακροφάγα.

1.2.1.γ. Πληθυσμοί πνευμονικών μικροφάγων - μορφολογικά χαρακτηριστικά

Ανάλογα με την εντόπιση τους και διαφοροποίηση τους τα πνευμονικά μακροφάγα διακρίνονται σε 3 κατηγορίες.



α-Κυψελιδικά μακροφάγα

β-Μακροφάγα του διάμεσου πνευμονικού ιστού

γ-Τα ενδαγγειακά μακροφάγα

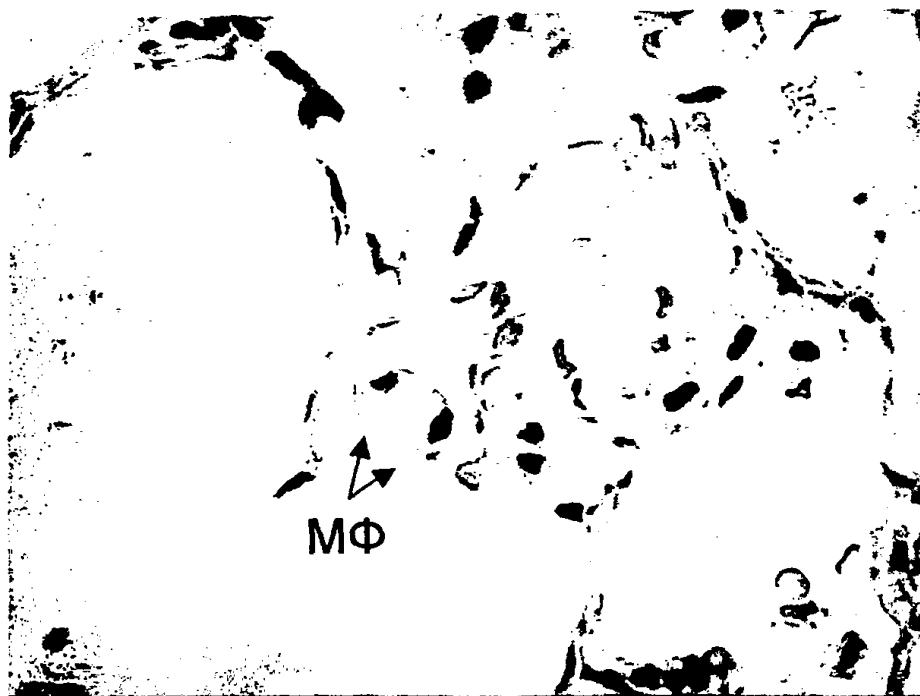
α- Κυψελιδικά μακροφάγα

είναι εγκατεστημένα στην επιφάνεια των κυψελίδων <<βυθισμένα>> στον επιφανειοδραστικό παράγοντα που παράγεται από τα πνευμονοκύτταρα τύπου II. Είναι τα μόνα μακροφάγα που είναι εκτεθειμένα στον αέρα, έχουν ισχυρή φαγοκυτταρική και μικροβιοκτόνο δράση . και επιπλέον είναι τα μόνα πνευμονικά μακροφάγα που συλλέγονται εύκολα με την βρογχοκυψελιδική έκπλυση (Striz et al.,1993).

Τα κυψελιδικά μακροφάγα που συλλέγονται με την βρογχοκυψελιδική έκπλυση, αποτελούν πληθυσμό κυττάρων μορφολογικά και λειτουργικά ανομοιογενή. Ποικίλλουν σε διάμετρο (15-20 μm) (Hahce et al.,1985), σχήμα και περιεχόμενο.

Με χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης, το κυτταρόπλασμα φαίνεται ροδόχρουν και περιέχει πολυάριθμα σκούρα κοκκία. Μορφολογικά τα κυψελιδικά μακροφάγα περιγράφονται σαν ώριμα μεγάλα ιστιοκύτταρα, η σχέση πυρήνα-κυτταροπλάσματος ποικίλλει (συνήθως είναι 1:3) .συχνά έχουν μεγάλα κενοτόπια και τότε ονομάζονται αφρώδη. Κυτταροχημικές μελέτες έδειξαν ότι τα κυψελιδικά μακροφάγα περιέχουν μεγάλες ποσότητες εστεράσης και βάφονται ερυθρά με την χρώση PAS(Periodic-Acid Schiff).



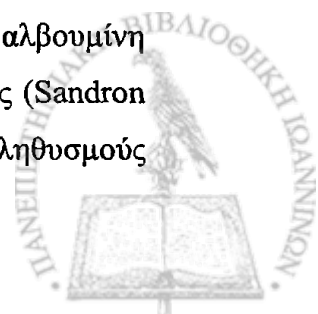


Εικόνα 3: Πνευμονικό παρέγχυμα-κυψελίδες. Με τα βέλη επισημαίνονται κυψελιδικά ΜΦ στο κυψελιδικό χώρο.

Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο φαίνεται ένας έκκεντρος πυρήνας, είναι όμως πιθανόν να υπάρχουν πολλοί πυρήνες. Τα κυτταροπλασματικά οργανίδια περιλαμβάνουν μια καλά ανεπτυγμένη συσκευή Golgi και μιτοχόνδρια, το ενδοπλασματικό δίκτυο δεν είναι καλά ανεπτυγμένο και υπάρχουν ελεύθερα ριβοσώματα και κοκκία γλυκογόνου.

Το κυριότερο δομικό χαρακτηριστικό των κυψελιδικών μακροφάγων είναι η αφθονία των κυτταροπλασματικών εγκλείστων. Αυτά περιέχουν καθεψίνες, λυσοζύμη, β-γλυκουρονιδάση, β-γαλακτοζιδάση και φωσφολιπάσες, ένζυμα που συνδέονται με λυσοσώματα (Du Bois et al.,1985, Dehring et al.,1989).

Βασιζόμενοι στις μορφολογικές και λειτουργικές διαφορές των κυψελιδικών μακροφάγων, πολλοί ερευνητές χρησιμοποίησαν κολλοειδείς ουσίες ή αλβουμίνη και χώρισαν τα κυψελιδικά μακροφάγα σε διαφορετικούς υποπληθυσμούς (Sandron et al.,1986). Η κατανομή των κυψελιδικών μακροφάγων σε υποπληθυσμούς



διαφέρει στα διάφορα στάδια νόσων. Έτσι σε οξεία φλεγμονή παρατηρείται αύξηση των μικρών μακροφάγων που μοιάζουν με μονοκύτταρα, ενώ οι χρόνιες πνευμονικές βλάβες συνδέονται με αύξηση των μεγαλύτερων ωρίμων μακροφάγων.

β- Μακροφάγα του διάμεσου πνευμονικού ιστού.

Είναι μικρότερα σε μέγεθος από τα κυψελιδικά μακροφάγα και μοιάζουν με μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος, παρουσιάζουν δε, αρνητική η ασθενώς θετική χρώση με εστεράση σε σύγκριση με τα κυψελιδικά μακροφάγα που βάφονται ερυθρά. Τα μακροφάγα του διάμεσου πνευμονικού ιστού παρουσιάζουν ελαττωμένες λειτουργικές ιδιότητες ως προς την άμυνα και την παρουσίαση του αντιγόνου και ίδιες ως προς την φαγοκυττάρωση με τα κυψελιδικά μακροφάγα.

γ- Τα ενδαγγειακά μακροφάγα.

Είναι τοποθετημένα ανάμεσα στα ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών και σε αντίθεση με τα μονοκύτταρα του αίματος, παρουσιάζουν υψηλή φαγοκυτταρική ικανότητα (Zwillin et al., 1982).

- Δενδριτικά κύτταρα

Ανήκουν στην ίδια οικογένεια με τα μακροφάγα και αποτελούν την κυρίαρχη ομάδα μεταξύ των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, των κυττάρων δηλαδή που δίνουν την εντολή στον οργανισμό να ξεκινήσει μία αμυντική δράση.

Περιγράφονται για πρώτη φορά το 1868 ως κύτταρα Langerhans στο δέρμα και η συστηματική τους μελέτη αρχίζει μόλις πριν 25 χρόνια, οπότε καθίσταται εφικτή τεχνικά η απομόνωση καθαρών πληθυσμών δενδριτικών κυττάρων.

Προέρχονται από τα πολυδύναμα αιμοποιητικά κύτταρα του μυελού των οστών που εκφράζουν στην επιφάνειά τους το αντιγόνο CD34.

Η πλειοψηφία των δενδριτικών κυττάρων αποτελείται από τα μυελοειδή δενδριτικά κύτταρα που φαίνεται ότι εξελίσσονται από κοινό πρόγονο, «προμυελοδενδριτικό», με τα μονοκύτταρα/μακροφάγα και τα κοκκιοκύτταρα. Η εξέλιξη αυτή είναι μάλλον διαδικασία ωρίμανσης παρά διαφοροποίησης, καθώς η δράση ποικίλων παραγόντων καθορίζει την τελική μορφή των κυττάρων (μακροφάγα ή δενδριτικά κύτταρα), ανάλογα με τις ανάγκες στον συγκεκριμένο τόπο και χρόνο.



Στους ιστούς, (δέρμα, αεραγωγοί, λεμφαδένες κλπ), τα ΔΚ εμφανίζουν σχήμα αστεροειδές, ενώ σε κυτταρολογικά παρασκευάσματα απομονωμένα ΔΚ προσκολλημένα σε πλακίδια, εμφανίζουν πολλές λεπτές δενδριτικές αποφυάδες.

Στο ΗΜ οι αποφυάδες τους είναι μακρτές (~10μ) και λεπτές, συνήθως με μορφή πέπλων.

Σε κυτταροκαλλιέργεια, με το μικροσκόπιο αντιθέτου φάσεως εμφανίζουν μακρτές λεπτοφυείς αποφυάδες κινούμενες προς όλες τις κατευθύνσεις.

Η μορφή τους είναι απολύτως ανάλογη με την λειτουργία τους που συνίσταται αφ' ενός στην ιχνηλάτηση του χώρου τους και την παγίδευση μορίων και μικροοργανισμών που παρεισφρύουν σ' αυτόν και αφ' ετέρου στην αναζήτηση σε επόμενη φάση των καταλλήλων Τ- λεμφοκυττάρων προς ενεργοποίηση.

Κατά την πορεία της ωρίμανσης διακρίνουμε δύο φάσεις στην ζωή των ΔΚ.

Τα ανώριμα ΔΚ απαντώνται σε όλους σχεδόν τους ιστούς, όπου μεταναστεύουν με το αίμα από τον μυελό των οστών (όπου παράγονται) είναι εξαιρετικώς ικανά φαγοκύτταρα, όχι όμως ακόμα ικανά να ενεργοποιήσουν τα Τ-λεμφοκύτταρα.

Η δουλειά τους είναι να εποπτεύουν τους ιστούς όπου εγκαθίστανται και να ενδοκυττώνουν εξωκυττάριο υλικό αδιακρίτως, συχνά δε και ελλείψει συγκεκριμένου ερεθίσματος.

Η φαγοκυττάρωση αντιγονικού υλικού αποτελεί ερέθισμα για την ωρίμανση των ΔΚ τα οποία σταδιακώς χάνουν την ικανότητα φαγοκυττάρωσης και αποκτούν χαρακτηριστικά αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων. Μεταναστεύουν στους επιχώριους λεμφαδένες όπου ως **ώριμα ΔΚ** παρουσιάζουν τα αντιγόνα τους και αναζητούν τα ομόλογα Τ-λεμφοκύτταρα, τα οποία στην συνέχεια ενεργοποιούν.



1.2.1.δ. Ρόλος των Μακροφάγων

A - Άμυνα του οργανισμού εναντίον μικροοργανισμών κυρίως ενδοκυττάρων

Τα κυψελιδικά μακροφάγα είναι τα ιδανικότερα φαγοκύτταρα και αυτό οφείλεται στην στρατηγική τους θέση στην κυψελίδα, όπου ο εισπνεόμενος αέρας και τα συστατικά του έρχονται σε επαφή με μια λεπτή στιβάδα κυττάρων που αποτελεί το φραγμό μεταξύ αέρα και του διάμεσου πνευμονικού ιστού. Χάρης σε αυτό υπό κανονικές συνθήκες ο πνεύμονας προφυλάσσεται από λοιμώξεις (Rich et al.,1987).

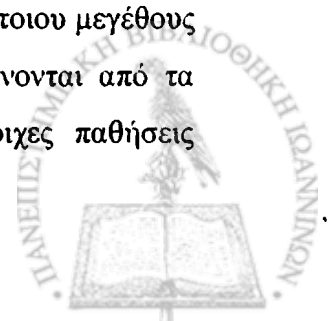
Η αποτελεσματικότητα της φαγοκυττάρωσης εξαρτάται από το είδος των μικροβίων. Υπάρχουν μικρόβια που καταστρέφονται ευκολότερα από την μικροβιοκτόνο ικανότητα των κυψελιδικών μακροφάγων, η οποία επίσης εξαρτάται και από τον αριθμό των μικροβίων. Μικρός αριθμός μικροβίων έως 10^6 , μπορεί να εξουδετερωθεί από τα κυψελιδικά μακροφάγα ενώ, μεγαλύτεροι αριθμοί μικροβίων, 10^6-10^7 χρειάζεται και την συνδρομή των ουδετερόφιλων, τα οποία έλκονται στο σημείο της δράσης από χημειοτακτικούς παράγοντες των μακροφάγων (Sibille et al.,1990). Για πληθυσμό μικροβίων 10^8 ο συνδυασμός κυψελιδικών μακροφάγων και ουδετερόφιλων δεν επαρκεί και η φαγοκυττάρωση υποβοηθείται από την ενεργοποίηση των T- και B-λεμφοκυττάρων (Ettensohn et al.,1990).

Τα κυψελιδικά μακροφάγα είναι στην πρώτη γραμμή άμυνας και στην περίπτωση των ιογενών λοιμώξεων. Στις ιογενείς λοιμώξεις παράγεται μεγάλη ποσότητα INF- α , INF- β , IL-6 και TNF από τα κυψελιδικά μακροφάγα, ενώ συμμετέχουν επίσης και τα ουδετερόφιλα με παραγωγή ελευθέρων ριζών O₂.

Γενικά έχειδειχτεί ότι όταν τα κυψελιδικά μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα έχουν ελαττωμένη αντιμικροβιακή δράση, έχουν και ελαττωμένη αντιϊκή δράση (Johnston RB,1988).

B- Απομάκρυνση κατεστραμμένων η νεκρών κυττάρων και ανόργανων ουσιών

Η κατανομή των εισπνεόμενων σωματιδίων στο αναπνευστικό σύστημα εξαρτάται από το μέγεθος και τις φυσικές ιδιότητες τους και μόρια διαμέτρου μικρότερης από 10 μ m μπορούν να φτάσουν στο κυψελιδικό χώρο. Τέτοιου μεγέθους είναι τα σωματίδια πυριτίου και αμιάντου, τα οποία φαγοκυτταρώνονται από τα κυψελιδικά μακροφάγα. Τα κυψελιδικά μακροφάγα στις αντίστοιχες παθήσεις



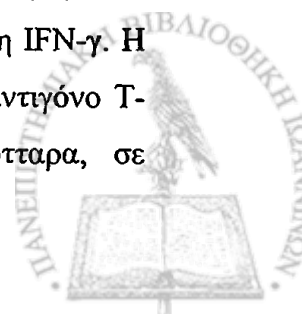
εκλύουν οξειδωτικές ρίζες και πρωτεολυτικά ενζυμα που καταστρέφουν παράλληλα με τα ξένα σωματίδια και δομικές πρωτεΐνες και βασικές μεμβράνες του πνευμονικού παρεγχύματος. Συνέπεια αυτών είναι η αυξημένη σύνθεση κολλαγόνου από τους ινοβλάστες στην προσπάθεια των τελευταίων να αποκαταστήσουν την βλάβη και η τελική χρόνια, μόνιμη βλάβη του διάμεσου ιστού που χαρακτηρίζει τις παθήσεις αυτές (Elias et al.,1985).

Γ- Αμφίδρομες αντιδράσεις με ανοσοκύτταρα

Η γένεση της ανοσολογικής απάντησης σε διάφορα αντιγόνα, προϋποθέτει την ενεργοποίηση των Τ-βοηθητικών λεμφοκυτάρων. Αυτή εξαρτάται από την παρουσίαση του αντιγόνου στα Τ-λεμφοκύτταρα, από ένα επικουρικό κύτταρο (accessory cell), (Karlreider et al.,1982,Muller-Kernheim et al.,1992).

Τα μονοκύτταρο/μακροφάγο είναι το κύριο κύτταρο που επεξεργάζεται το αντιγόνο και το παρουσιάζει, στην επιφάνεια του, στα Τ-λεμφοκύτταρα. Συνήθως η έναρξη της ανοσολογικής απόκριση γίνεται στους επιχωρίους λεμφαδένες. Εκεί μεταφέρεται το αντιγόνο από τα κυψελιδικά μακροφάγα τα οποία το έχουν ήδη φαγοκυτταρώσει και αποδομήσει, ενώ σε περίπτωση αντιγόνου ήδη γνωστού, η όλη διαδικασία εξαρτάται από κύτταρα μνήμης και συχνά επιτελείται "in situ" στον βλεννογόνο των αεραγωγών όπου υπάρχουν αθροίσματα λεμφοκυττάρων. Απαραίτητη προϋπόθεση για την παρουσίαση του αντιγόνου είναι η έκφραση των αντιγόνων DR στην επιφάνεια του μακροφάγου που κωδικοποιείται μέσω μορίων της τάξεως II του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας (MCH), (Venet et al.,1985).

Σε πρώτη φάση, τα Τ-βοηθητικά λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν τα σχηματισθέντα συμπλέγματα ξένου αντιγόνου - ιδίων αντιγόνων ιστοσυμβατότητας και συνδέονται με αυτά. Η διαμεμβρανική επαφή μεταξύ των κυττάρων, μακροφάγων και Τ-βοηθητικών λεμφοκυττάρων καθώς και η απελευθέρωση λεμφοκινών διεγείρουν τα μακροφάγα σε έκκριση IL-1 (Nacy et al.,1988). Στην συνέχεια η προκληθείσα αντιγονική διέγερση σε συνδυασμό με την δράση της IL-1 επάγει την έκφραση των υποδοχέων της IL-2, στην επιφάνεια των Τ-λεμφοκυττάρων .και η IL-1 διεγείρει τα Τ-λεμφοκύτταρα προς έκκριση διαφόρων λεμφοκινών, όπως η IL-2 και η IFN-γ. Η IL-2 είναι αυξητικός παράγοντας που διεγείρει τα ενεργοποιημένα από αντιγόνο Τ-βοηθητικά λεμφοκυτταρα, καθώς και τα κυτταροτοξικά Τ-λεμφοκύτταρα, σε



πολλαπλασιασμό. Η IFN- γ διεγείρει επίσης τα μακροφάγα με αποτέλεσμα αυτά να αποκτούν αυξημένη κυτταροτοξική ικανότητα (Weib et al.,1987). Ανταποκρινόμενα στην διεγερτική επίδραση της IL-1, τα μακροφάγα εκκρίνουν IL-6, η οποία συνδέεται με τα ενεργοποιημένα Β-λεμφοκύτταρα τα οποία διεγείρει σε πολλαπλασιασμό και σε διαφοροποίηση προς πλασματοκύτταρα.

Η IL-1 φαίνεται ότι διεγείρει αυτήν την επικουρική λειτουργία των μακροφάγων και άλλων κυττάρων που συμμετέχουν στην παρουσίαση του αντιγόνου (Aiello et al.,1990). Τα κυψελιδικά μακροφάγα που συλλέγονται με την βρογχοκυψελιδική έκπλυση εκφράζουν αντιγόνα DR στην επιφάνεια τους.

Η αυξημένη έκφραση των μορίων DR στα κυψελιδικά μακροφάγα δεν συμβαδίζει πάντα με αυξημένη λειτουργία ως αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων. Τα μακροφάγα του διάμεσου πνευμονικού ιστού εκφράζουν σχεδόν πάντα αντιγόνα DR στην επιφάνεια τους και όσον αφορά στην λειτουργία τους ως βοηθητικά κύτταρα, τα ιστικά αυτά μακροφάγα θεωρούνται λιγότερο ισχυρά επικουρικά κύτταρα.

Η αποτελεσματικότητα των πνευμονικών μακροφάγων στην ανοσολογική απάντηση εξαρτάται από τον βαθμό ενεργοποίησής τους, αλλά και από την συρροή μονοκυττάρων από το περιφερικό αίμα στην κυψελίδα. Η ενεργοποίηση αυτή μπορεί να είναι άμεση ή να οφείλεται σε έκλυση λεμφοκινών από τα ευαισθητοποιημένα T-λεμφοκύτταρα, όπως ο ανασταλτικός παράγοντας μετανάστευσης, MIF (Migration Inhibitory Factor), (Warren et al.,1990).

Δ- Έκκριση βιοδραστικών ουσιών που ρυθμίζουν λειτουργίες διαφόρων κυττάρων

Ο σημερινός κατάλογος των εκκριτικών προϊόντων των μακροφάγων περιλαμβάνει περισσότερα από 100 μόρια και μεταξύ αυτών βιολογικοί διαβιβαστές με μείζονα σημασία είναι:

i)-Οι μεταβολίτες του οξυγόνου

Το (ανιόν υπεροξείδιο O₂, το υπεροξείδιο του υδρογόνου και η ρίζα του υδροξυλίου), παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια άμυνα των κυψελιδικών μακροφάγων εναντίον των μικροοργανισμών.



Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα εκκρίνουν διάφορες ενώσεις που περιέχουν οξυγόνο, οι οποίες είναι σε θέση να φονεύουν νεοπλασματικά και μικροβιακά κύτταρα μέσα σε διάστημα λίγων ωρών, σε αντίθεση με τα μακρότερα διαστήματα (24 ώρες και 72 ώρες) που απαιτούνται για την λύση των κυττάρων-στόχων από ορισμένες κυτταροκίνες, όπως ο TNF- α . Οι μεταβολίτες που περιέχουν ενεργό οξυγόνο παίζουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην προκαλούμενη από τα μακροφάγα ενδοκυττάρια καταστροφή διαφόρων μικροοργανισμών, καθώς επίσης και στην καταστροφή των νεοπλασματικών κυττάρων (Drysdale et al., 1988, Strausz et al., 1990).

Εκτός από την αντιμικροβιακή δράση οι ελεύθερες ρίζες συμμετέχουν και στην βλάβη του πνευμονικού παρεγχύματος που είναι αναπόφευκτη σε τέτοιες διεργασίες, μαζί με τις ελεύθερες ρίζες που παράγονται από άλλα κύτταρα, (ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηνα, ενδοθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες) (Schaberg et al., 1993, Nathan, 1987).

ii)- Ένζυμα

Η πρωτεολυτική δραστηριότητα των κυψελιδικών μακροφάγων είναι μια από τις κυριότερες ιδιότητες των φαγοκυττάρων αυτών. Η λυσοζύμη είναι το κύριο ένζυμο που εκκρίνεται από τα κυψελιδικά μακροφάγα. Τα κυψελιδικά μακροφάγα εκκρίνουν επίσης ελαστάνες παρόμοιες με αυτές των ουδετεροφίλλων, πρωτεϊνάσες με ελαστολυτική δράση, κολλαγενάσες που υποδομούν το κολλαγόνο, ενεργοποιητή του πλασμινογόνου κ.λ.π. (Mayer et al., 1993).

Η ποικιλία αυτή των ενζύμων δίνει τη δυνατότητα στα κυψελιδικά μακροφάγα να συμμετέχουν στην άμυνα ενάντια των μικροβίων, στην ενεργοποίηση του συμπληρώματος, στην ινωδολύση και στην αναδόμηση του πνευμονικού παρεγχύματος που παρατηρείται στις διάμεσες πνευμονοπάθειες.



iii)- Κυτταροκίνες.

Τα κυψελιδικά μακροφάγα εκκρίνουν IL-1,IL-6,TNF,TGF-β,FGF (fibroblast growth factor),INF-α,INF-β,χημειοτακτικούς παράγοντες,PDGF (platelet derived growth factor) και CSFs(colony stimulating factors).

Η παραγωγή των κυτταροκινών αυτών επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από το είδος του ερεθίσματος που προκαλεί την ενεργοποίηση των μακροφάγων.Τα κυριότερα ερεθίσματα είναι λιποσακχαρίτες μικροβίων και ιών (Kelly et al.,1990,Kern et al.,1988). Αρκετές από τις κυτταροκίνες των κυψελιδικών μακροφάγων όπως,η IL-1,PDGF,TNF,FGF, ευοδώνουν τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών καθώς και την σύνθεση κολλαγόνου (Wewers et al.,1984,Skerrett et al.,1994,Rolfe et al.,1993).

Πολλές μελέτες έδειξαν ότι ένας κύριος τρόπος αντικαρκινικής κυτταροκτόνου δράσης των ενεργοποιημένων μονοκυττάρων/μακροφάγων είναι η σύνθεση του παράγοντα νέκρωσης των όγκων-α (TNF-α) την οποία σύνθεση ενεργοποιούν ορισμένα συστατικά της κυτταρικής μεμβράνης των νεοπλασματικών κυττάρων (Janicke et al.,1990,Klostergaad,1987). Εν τούτοις δεν είναι όλες οι νεοπλασματικές κυτταρικές σειρές ευαίσθητες ή εξίσου επιδεκτικές στην δράση του TNF-α.

Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την ύπαρξη συνεργικών, εναλλακτικών ή συμπληρωματικών μηχανισμών, όπως η INF-γ συνεργική δράση με τον TNF-α, στην καταστροφή ευαίσθητων στον TNF-α νεοπλασματικών κυττάρων (Nii et al.,1990,Fidler et al.,1988).

iv)- Βιοδραστικά λιπίδια

Μετά από διέγερση in vitro με ανοσοσυμπλέγματα, IgG ή IgE, καθώς και με ενεργοποιητές της κυτταρικής μεμβράνης όπως το PMA (phorbol myristate acetate) και το ιονοφόρο CaA23187, τα κυψελιδικά μακροφάγα εκλύουν μεταβολίτες του αραχιδονικού οξέος, μέσω της οδού της κυκλοοξυγενάσης (θρομβοξάνες, Tx, Προσταγλανδίνες, PG) και μέσω της οδού της λιποξυγενάσης (λευκοτριένια-LT, εικοσιτετραενοϊκά οξέα, HETEs). Οι μεταβολίτες αυτοί παίζουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση φλεγμονωδών αντιδράσεων (Striz et al.,1992,Sibille et al.,1989).



Επιπλέον τα κυψελιδικά μακροφάγα αποτελούν πηγή του PAF (platelet activating factor) ο οποίος ενεργοποιεί την συσσώρευση αιμοπεταλίων, αλλά έχει και φλεγμονώδη δράση.

γ)-Κυτταροστατικά που συμμετέχουν στον έλεγχο των νεοπλασιών

Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα εμφανίζουν πολύ μεγαλύτερη κυτταροκτόνο δράση έναντι των νεοπλασματικών κυττάρων από ότι τα μη ενεργοποιημένα μακροφάγα. Η αντικαρκινική δράση των μακροφάγων πραγματοποιείται με δυο, κυρίως τρόπους.

- Ο πρώτος τρόπος δεν απαιτεί προηγηθείσα ευαισθητοποίηση του μακροφάγου και επιτελείται με προσκόλληση των μακροφάγων σε καρκινικά κύτταρα (μέσω χημειοταξίας) ενεργοποίηση τους (μέσω INF-γ, TNF-α) και έκκριση κυτταρολυτικών πρωτεασών με αποτέλεσμα την λύση του κυττάρου στόχου (Lohmann-Matthes,1989,Dumont et al.,1990).

- Ο δεύτερος τρόπος προϋποθέτει την σύνδεση αντιγόνων επιφανείας των νεοπλασματικών κυττάρων, με αντισώματα που παράγονται εναντίον τους και επακολουθεί ενεργοποίηση τόσο των μακροφάγων όσο και του συμπληρώματος από τα σχηματισθέντα ανοσοσυμπλέγματα. Και εδώ το αποτέλεσμα είναι η λύση του καρκινικού κυττάρου η οποία στην περίπτωση των μακροφάγων σχετίστηκε με την παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου και ειδικότερα με το υπεροξειδίο του υδρογόνου (Lohman-Matters et al.,1994,Weissler et al.,1986). Όπως φαίνεται σε αντίθεση με τα λεμφοκύτταρα, τα μακροφάγα δεν είναι αντιγόνο-ειδικά, αλλά δρούν μη ειδικά, ως προς το αντιγόνο, κυρίως ως βοηθητικά (accessory) κύτταρα (Higuchi et al.,1990,Peri et al.,1990).



Κυτταροκίνες	<p>IL-1a,IL-1b,IL-6,IL-8,IL-10 TNF-a</p> <p>INF-a,INF-B,INF-γ</p> <p>CSF-s,TGF-β,FGF</p> <p>Neutrophil activating factor</p> <p>Neutrophil chemotactic factor</p> <p>PDGF</p> <p>Histamine releasing factor</p>
Ένζυμα	<p>Λυσοζύμη, υδρολάσες, ελαστάση, κολλαγενάσες, πρωτεϊνάσες,</p> <p>Ενεργοποιητής του πλασμινογόνου, καθεψίνη L.</p>
Βιοδραστικά λιπίδια	<p>Μεταβολίτες της κυκλοοξυγενάσης (TxA2, PGE2, PGD2, PGF2a)</p> <p>Μεταβολίτες της λιποοξυγενάσης (HETEs, LTB4, LTC4, LTD4)</p> <p>Μεταβολίτες του O2 (O2-,H2O2,OH)</p> <p>PAF</p>
Πρωτεΐνες	<p>Αντιπρωτεάσες</p> <p>Αναστολείς: IL-1, μετανάστευσης ουδετερόφιλων και ινοβλαστών.</p> <p>Γλυκοπρωτεΐνες (Ινοσυνεκτίνη)</p> <p>Παράγοντες του συμπληρώματος (C2,C4)</p> <p>Τρανσφερίνη, φεριτίνη</p> <p>Παράγοντες πήξεως (V,VII)</p>

Πίνακας 1 :Κύρια προϊόντα που εκλύονται από τα κυψελιδικά μακροφάγα



1.2.2. ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

Τα λεμφοκύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανοσολογική επιτήρηση και εξουδετέρωση εξωγενών αντιγόνων και μικροοργανισμών. Το κάθε λεμφοκύτταρο είναι εξειδικευμένο να απαντά σε ένα αντιγόνο ή μια μικρή ομάδα δομικά συγγενών αντιγόνων. Η εξειδίκευση αυτή προϋπάρχει και οφείλεται στην ύπαρξη ειδικών υποδοχέων στην επιφάνεια του, γενετικά καθορισμένων να αναγνωρίζουν το αντιγόνο αυτό ή κάποιο τμήμα του (T-cell Receptor, TcR) (Sprent, 1977)

Έτσι ένας πληθυσμός ή κλώνος λεμφοκυττάρων διαφέρει από έναν άλλο κλώνο στο είδος των αντιγόνων που το διεγείρουν, ενώ η ικανότητα του οργανισμού να απαντά σε οποιοδήποτε αντιγόνο, οφείλεται στην ύπαρξη ενός τεράστιου αριθμού διαφορετικών λεμφοκυτταρικών κλώνων, που ο καθένας τους έχει υποδοχείς για διαφορετικό αντιγόνο.

Τα λεμφοκύτταρα διακρίνονται σε δυο κατηγορίες:

- Τα Β-λεμφοκύτταρα είναι πρόδρομοι των κυττάρων που παράγουν αντισώματα (πλασματοκύτταρα) και είναι υπεύθυνα για την χυμική ανοσία (Bienenstock et al., 1973)
- Τα Τ-λεμφοκύτταρα είναι υπεύθυνα αφενός για την κυτταρική ανοσία και αφετέρου για διάφορες ρυθμιστικές λειτουργίες που διευρύνουν ή καταστέλλουν την ανοσολογική απόκριση, κυτταρική ή χυμική (Wassmer et al., 1985).

1.2.2.α. Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Τα λεμφοκύτταρα αποτελούν μια οικογένεια σφαιρικών κυττάρων με παρόμοια χαρακτηριστικά. Στην επιφάνεια τους φέρουν αντιγόνα που μπορούν να αναγνωριστούν με ανοσοκυτταροχημικές μεθόδους. Τα λεμφοκύτταρα που έχουν διάμετρο 6-8 μm χαρακτηρίζονται σαν μικρά λεμφοκύτταρα. Στο περιφερικό αίμα βρίσκεται ένας μικρός αριθμός με λεμφοκύτταρα μεσαίου και μεγάλου μεγέθους με διάμετρο μέχρι 18 μm. Αυτή η διάκριση έχει λειτουργική σημασία επειδή τα μεγαλύτερα λεμφοκύτταρα θεωρούνται ότι είναι κύτταρα ενεργοποιημένα από ειδικά αντιγόνα και τα οποία θα διαφοροποιηθούν σε εκτελεστικά Τ και Β λεμφοκύτταρα.



Το μικρό λεμφοκύτταρο που υπερέχει στο αίμα έχει σφαιρικό πυρήνα και ελάχιστο κυτταροπλάσμα. Η χρωματίνη του είναι συμπυκνωμένη, με αποτέλεσμα ο πυρήνας να χρωματίζεται έντονα και το λεμφοκύτταρο να αναγνωρίζεται εύκολα.

Το κυτταρόπλασμα του μικρού λεμφοκυττάρου είναι ελάχιστο, ελαφρώς βασεόφιλο, μπορεί να περιέχει κυανά κοκκία, έχει λίγα μιτοχόνδρια και μικρό σύμπλεγμα Golgi, περιέχει πολλά ελεύθερα ριβοσώματα και πολυριβοσώματα (Zucker-Franklin et al.,1981).



Figure 1-5 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Εικόνα 4: Λεμφοκύτταρο α) χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης, β) ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

1.3 ΒΡΟΓΧΟΚΥΨΕΛΙΔΙΚΗ ΕΚΠΛΥΣΗ / BAL

(BRONCHOALVEOLAR LAVAGE)

Η Βρογχοκυψελιδική Έκπλυση (Bronchoalveolar Lavage, BAL), αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο στην διερεύνηση των παθήσεων του πνεύμονα, ενώ πλέον όλο και πίο συχνά παίρνει μέρος και στην διαγνωστική προσέγγιση του αναπνευστικού ασθενούς. Αυτό οφείλεται εν μέρει, στην εφαρμογή πολυπλοκοτέρων μεθόδων για την ανάλυση του λαμβανομένου υλικού από όλο και περισσότερα πνευμονολογικά κέντρα και κυρίως στην συνεργασία των κλινικών γιατρών με επιστήμονες άλλων ειδικοτήτων.

Η μεθοδος συνίσταται στην έγχυση φυσιολογικού ορού μέσω του αυλού βιοψίας του ευκάμπτου βρογχοσκοπίου και άμεση επαναρρόφησή του. Το επαναρροφούμενο υλικό, εμπλουτίζεται με κύτταρα και διαλυτές ουσίες από την επιφάνεια των μικρών αεραγωγών, η οποία 'ξεπλένεται' από τον φυσιολογικό ορό. Η ανάλυση του υλικού αυτού μας δίνει πληροφορίες για την κατάσταση που επικρατεί στην επιφάνεια κυψελίδων και μικρών αεραγωγών κατά την στιγμή της εξέτασης. Μελετώνται τόσο τα κύτταρα που λαμβάνονται, όσο και τα διαλυτά μόρια (πρωτεΐνες, λιπίδια, ανόργανες ουσίες)

Το 90-95% των κυττάρων του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος σε φυσιολογικές καταστάσεις αποτελείται από μακροφάγα. Η δεύτερη σε ποσοστιαία αναλογία ομάδα κυττάρων, (5-10%), είναι η ομάδα των λεμφοκυττάρων ενώ τα πολυμορφοπύρρηνα (ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα, βασεόφιλα) εμφανίζονται σε πολύ μικρά ποσοστά. Ανάλογα με τις διαφορές ασθένειες, αυτές οι αναλογίες των κυττάρων διαφοροποιούνται σημαντικά.

Οι πρωτεΐνες που έχουν μετρηθεί στην υγρά φάση του εκπλύματος υγιών ατόμων, αντιστοιχούν σε 15 mg σε όγκο περίπου 150ml εκπλύματος. Οι πρωτεΐνες αυτές στο μεγαλύτερο ποσοστό τους προέρχονται από το αίμα, σε μικρότερο ποσοστό παράγονται από τα κύτταρα του πνεύμονα ενώ κατά την διάρκεια παθολογικών καταστάσεων, παράγονται και από τα φλεγμονώδη κύτταρα που συρρέουν στην περιοχή. Οι πρωτεΐνες που ανιχνεύουμε σε μεγαλύτερες ποσότητες είναι η αλβουμίνη, που αποτελεί το (30-35% των συνολικών πρωτεϊνών) και οι



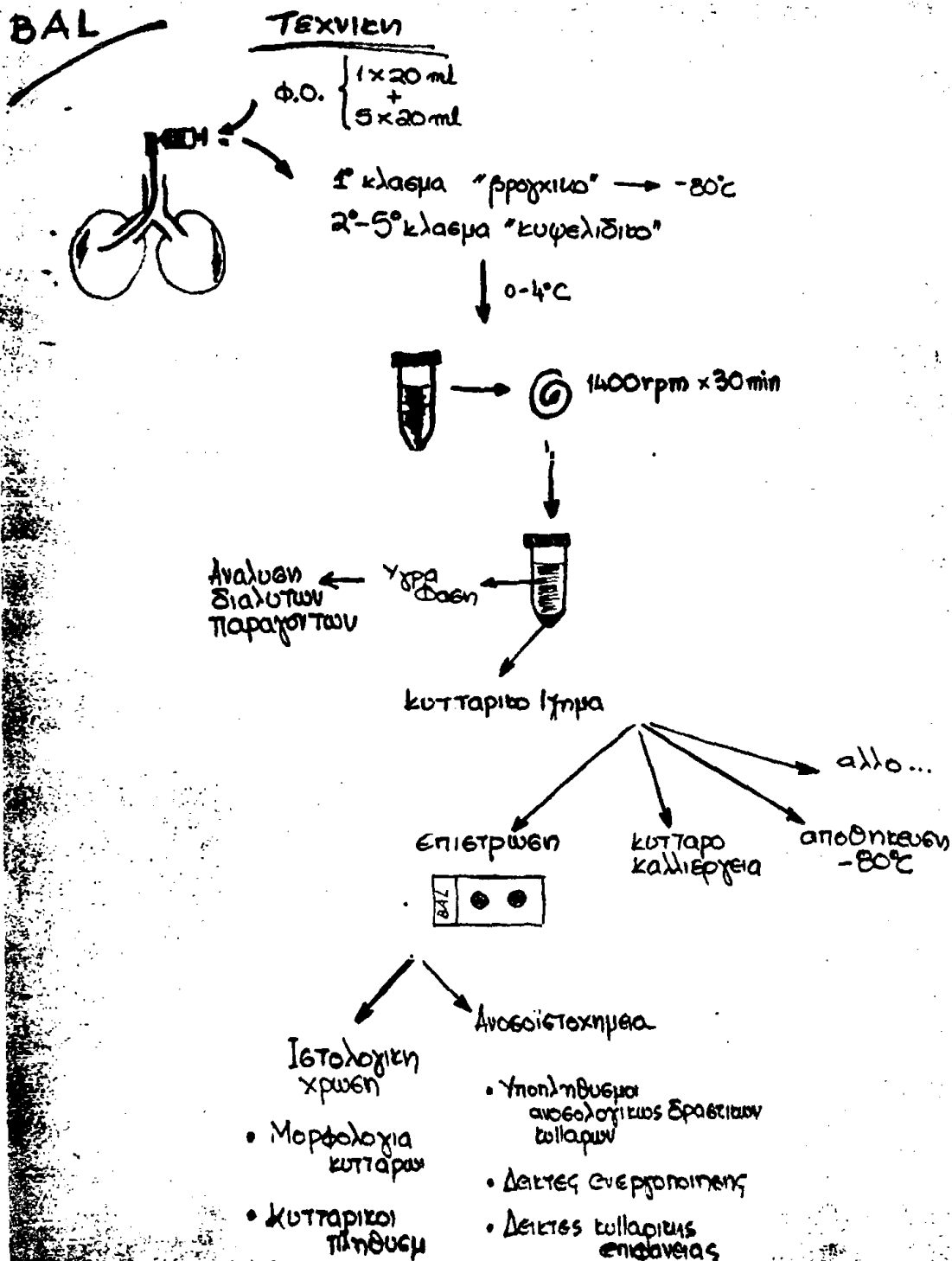
ανοσοσφαιρίνες, οι IgG που αποτελούν το (15%) και οι IgA που αποτελούν το (5% του συνόλου των πρωτεϊνών). Άλλες πρωτεΐνες που ανιχνεύονται σταθερά είναι παράγοντες του συμπληρώματος (C4,C3,C6), ανοσοσυμπλέγματα, τρανσφερίνη, α-1 αντιθρυσίνη, και πολλά ένζυμα και άλλα προϊόντα των κυψελιδικών μακροφάγων.

Αν και η μέθοδος είναι διαγνωστική σε πολύ λίγες παθήσεις, η συμβολή της στην διάγνωση αυτών των νοσηρών καταστάσεων είναι αποφασιστική και αποτρέπει την ανάγκη επεμβατικών διαγνωστικών μεθόδων, όπως η ανοικτή βιοψία πνεύμονα. Στις περιπτώσεις έκθεσης σε ανόργανες κόνεις και ίνες, η ανίχνευση της ουσίας είναι επίσης διαγνωστικής σημασίας, ενώ σε περιπτώσεις όπου η μέθοδος δεν οδηγεί σε σαφή διάγνωση, συνήθως κατευθύνει την διαφορική διαγνωστική.

Πέραν της κλινικής πράξης η Βρογχοκυψελιδική έκπλυση είναι μέθοδος της οποίας τα ευρήματα, συμβάλλουν κυρίως στην μελέτη παθογενετικών μηχανισμών διαφόρων νοσημάτων, αλλά και της πορείας των νοσημάτων αυτών, καθώς εκτός των άλλων είναι μέθοδος ασφαλής για τον εξεταζόμενο και αρκετά απλή για τον εξετάζοντα.

Οι επιπλοκές, σπάνιες σχετικά, είναι σε γενικές γραμμές εκείνες που αναμένονται από μια απλή βρογχοσκόπηση με εύκαμπτο βρογχοσκόπιο υπό τοπική αναισθησία, καθώς και εκείνες που οφείλονται στην έγχυση φυσιολογικού ορού δηλαδή παροδική πυρετική κίνηση που δεν χρειάζεται αντιμετώπιση .



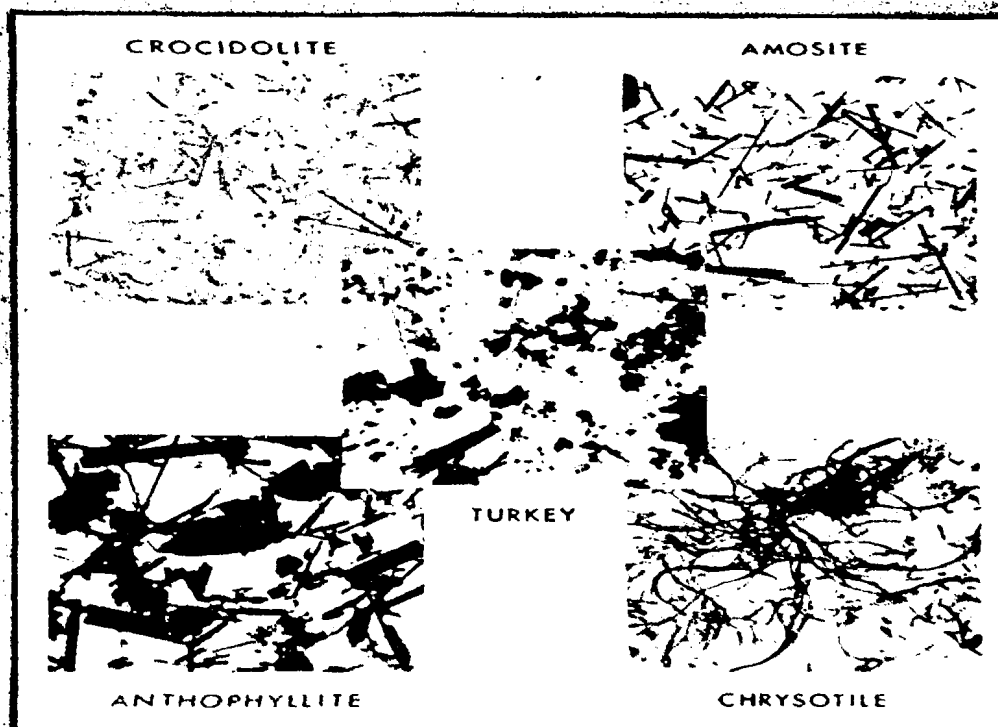


Εικόνα 5 : Η Βρογχοκυψελιδική Εκπλύση (Bronchoalveolar Lavage, BAL), εξακολουθεί να είναι από τα σημαντικά εργαλεία στην διερεύνηση των παθήσεων του πνεύμονα, όλο και πιο συχνά παίρνει μέρος και στην διαγνωστική προσέγγιση του αναπνευστικού ασθενούς.



1.4 ΑΜΙΑΝΤΟΣ

Αμίαντος (asbestos) είναι ο γενικός όρος για μια κατηγορία ορυκτών πυριτικής φύσης, που διαφέρουν στην στοιχειομετρική τους σύνθεση, αλλά έχουν παραπλήσιες ιδιότητες και αποτελούνται από ίνες διαφόρων μεγεθών. Όλοι οι τύποι αμιάντου είναι ένυδρα πυριτικά άλατα και με βάση τα ορυκτολογικά τους χαρακτηριστικά ταξινομούνται σε δυο ομάδες, τους σερπαντίνες και τους αμφιβολίτες (εικ 6) (Craighead JE. Et. Al.,1982).



Εικόνα 6Α: Οι διάφοροι τύποι αμιάντου. Ο τρεμολιτικός αμίαντος (τρεμολίτης) αποτελείται από αμφίβολες ίνες (amphiboles) και είναι παρόμοιος με τον κροκιδολίτη (κροκιδόλιθο) και τον αμοσίτη.

i) Οι (αμφίβολοι amphiboles) είναι άκαμπτες ίνες, βελονοειδείς με υψηλή ανθεκτικότητα σε χημική και βιολογική επεξεργασία. Ταξινομούνται σε 5 υποομάδες, δυο με εμπορική χρήση, (κροκιδολίτες αμοσίτες), και τρεις μη εμπορικές ομάδες που ανευρίσκονται μαζί με άλλα ορυκτά, (τρεμολίτες, ανθοφυλίτες και ακτινολίτες).



ii) Οι σερπεντίνες έχουν “σγουρή” διαμόρφωση και διασπώνται εύκολα σε μικρότερες ίνες καθώς καταστρέφονται στους ιστούς. Οι μόνες σερπεντίνες ίνες είναι οι χρυσοτίλες.

Το ενδιαφέρον εστιάστηκε σε πιθανές διαφορές της τοξικότητας μεταξύ των δυο ομάδων ινών, πιθανόν επειδή το 80 με 90% του εμπορικού αμιάντου είναι χρυσοτίλης. Γενικώς οι αμφιβολίτες περιγράφονται ως πιο τοξικές ίνες από τους σερπεντίνες, με πιο στενή συσχέτιση με διάφορες παθήσεις του υπεζωκότα και κυρίως με το μεσοθηλίωμα. Παρ’ ότι σε *in vitro* έρευνες, η τοξικότητα και των δυο ομάδων ινών είναι ίδια, η εντύπωση της μεγαλύτερης τοξικότητας των αμφιβολιτών στον άνθρωπο μπορεί να οφείλεται σε μεγαλύτερη παραμονή του στους ιστούς.

Στις αρχές του 20^{ου} αιώνα, με την αύξηση της χρήσης του αμιάντου, εμφανίζονται οι πρώτες ιατρικές ανακοινώσεις για τις βλαπτικές του επιδράσεις και το 1920 ενοχοποιείται για την πνευμονική ίνωση .

Το 1960 γίνεται αντιληπτό ότι μικρή χρονικά έκθεση σε αμιάντο, μπορεί να προκαλέσει ύστερα από χρόνια, κακήθες μεσοθηλίωμα του υπεζωκότα (Wagner et.,1960). ενώ το 1967 αναγνωρίζεται η σχέση του με τον καρκίνο των βρόγχων. (Selikoff et al., 1967).

Ο υπεζωκότας είναι ορογόνος χιτώνας που περιβάλλει τον πνεύμονα. Αποτελείται από δύο πέταλα, περίτονο (τοιχωματικό, *parietal*) και σπλαχνικό (*visceral*), τα οποία ενώνονται στην περιοχή της πύλης του πνεύμονα. Τα δύο πέταλα επενδύονται από μεσοθηλιακά κύτταρα των οποίων ο υποκείμενος συνδετικός ιστός σχηματίζει λεπτή στιβάδα, που περιέχει κολλαγόνες και ελαστικές ίνες (Selikoff et al., 1968).

Υπεζωκοτική πλάκα (*pleural plaque*) είναι βλάβη που οφείλεται στην έκθεση σε αμιάντο και αποτελεί περιγεγραμμένη περιοχή συνδετικού ιστού, πλούσια σε κολλαγόνο, που εντοπίζεται στο περίτονο πέταλο του υπεζωκότα. Συχνά λόγω της εναπόθεσης ασβεστίου είναι εύκολα ορατή στην απλή ακτινογραφία σαν αποτιάνωση (Hirsch, 1975).

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει συσχέτιση έκθεσης σε αμιάντο και εμφάνισης υπεζωκοτικών πλακών και είναι γενικά αποδεκτό ότι μεσολαβεί μεγάλο χρονικό διάστημα από την αρχή της έκθεσης μέχρι την εμφάνιση των πλακών (τουλάχιστον 15-20 χρόνια , Anderson,1978)



Σε πιο τμήμα του αναπνευστικού συστήματος θα εγκατασταθούν οι ίνες του αμιάντου εξαρτάται από το σχήμα και τις διαστάσεις τους. Τελικά οι μεγάλες ίνες θα εναποτεθούν στο ανώτερο αναπνευστικό, ενώ οι μικρότερες θα φθάσουν στους τελικούς αεραγωγούς και τις κυψελίδες όπου ανιχνεύονται ίνες μήκους $<5\mu$ και διαμέτρου $<0,5\mu$ (Craighead et al., 1982).

Οι ίνες χρυσοτίλη, επειδή έχουν "σγουρή" διαμόρφωση, εμφανίζουν αεροδυναμικά μεγάλη διάμετρο διατομής και παγιδεύονται σε μεγάλους βρόγχους. Αντίθετα οι ίνες των αμιφβολιτών με διαμόρφωση δόρατος, αεροδυναμικά συμπεριφέρονται σαν «ακόντια» με διάμετρο συχνά $<0,5\mu$ και για αυτό φθάνουν εύκολα στο πνευμονικό παρέγχυμα (Becklake , 1976).

Ο παθογενετικός μηχανισμός δράσης των ινών αμιάντου δεν είναι σαφής σίγουρα όμως ενοχοποιείται και η άμεση τοξική βλάβη στην κυτταρική μεμβράνη και σε ενδοκυττάρια οργανίδια. Ένας από τους τρόπους που οι ίνες αμιάντου προκαλούν ιστική βλάβη είναι μέσω παραγωγής τοξικών ριζών οξυγόνου. Η ικανότητα του αμιάντου να ευοδώνει την παραγωγή ελευθέρων ριζών εξαρτάται από τις φυσικοχημικές του ιδιότητες. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες του αμιάντου συσχετίζονται με την κυτταροτοξική και μεταλλαξιογόνο δράση του και επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από την προσρόφηση, στην επιφάνειά του, βιολογικών μορίων όπως είναι οι πρωτεΐνες (Folini G, et al 2006).



1.5. ΠΝΕΥΜΩΝ ΜΕΤΣΟΒΟΥ

Σε μεγάλο αριθμό των κατοίκων τεσσάρων χωριών της περιοχής Μετσόβου (Μέτσοβο, Ανήλιο, Μηλιά και Βοτονόσι), βρέθηκε από την ερευνητική ομάδα της Πνευμονολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, ότι η μη επαγγελματική έκθεση σε αμιαντιούχο υλικό ασπρίσματος είχε προκαλέσει υπεζωκοτικές αποτιτανώσεις και κακοήγη μεσοθηλιώματα (Constantopoulos et al., 1985). Αρχικά, με τη συλλογή των πρώτων ακτινογραφιών, έγινε αντιληπτό ότι αποτιτανώσεις, εμφανίζονται αποκλειστικά σε άτομα από τα τέσσερα χωριά της περιοχής Μετσόβου και μάλιστα σε ηλικίες άνω των 30 ετών. Σχεδόν ο ένας στους δύο από τους κατοίκους που ελέχθηκαν εμφάνιζε αποτιτανώσεις του υπεζωκότα. Αποτιτανώσεις υπήρχαν και στα δύο φύλα, ενώ η συχνότητα και το μέγεθος τους αυξανόταν σταθερά με την ηλικία (Constantopoulos et al., 1985)

Έτσι από τα πρώτα στάδια της μελέτης μετά την ανάλυση των ακτινολογικών ευρημάτων και την διαπίστωση ότι το φαινόμενο είναι ενδημικό, φάνηκε η πιθανότητα για την περιβαλλοντική έκθεση των κατοίκων σε αμίαντο. Άλλωστε ο συνδυασμός των αποτιτανώσεων και των μεσοθηλιωμάτων στον ίδιο πληθυσμό ήταν που οδήγησε στη σκέψη για πιθανή έκθεση σε αμίαντο. Όπως οι αποτιτανώσεις έτσι και η συχνότητα μεσοθηλιώματος σε κατοίκους της περιοχής ήταν πολύ υψηλή (300 φορές μεγαλύτερη συχνότητα από την προβλεπόμενη στον γενικό πληθυσμό) συχνότητα που μπορεί να συγκριθεί μόνο με αυτή που παρατηρείται σε άτομα με επαγγελματική έκθεση σε αμίαντο. Αφού λοιπόν αποτιτανώσεις και μεσοθηλιώματα είναι όλες εκδηλώσεις έκθεσης σε αμίαντο, ήταν φυσικό να διερευνηθεί στη συνέχεια εάν το φαινόμενο σχετίζεται με εισπνοή ινών αμιάντου. Σε όλα τα ιστικά δείγματα που ελήφθησαν με διαβρογικές βιοψίες, η εργαστηριακή ανάλυση έδειξε ίνες τρεμολίτη και μάλιστα σε μεγάλη πυκνότητα (Constantopoulos, 1985). Μετά την διαπίστωση ότι οι αποτιτανώσεις πλέον σχετίζονται με εισπνοή ινών τρεμολίτη άρχισε η αναζήτηση της πηγής των ινών στο περιβάλλον. Έτσι η έρευνα για υλικά που είχαν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν οδήγησε σε ένα ορυκτό που οι κάτοικοι το ονομάζουν «λούτο» (άσπρος πηλός). Η εξόρυξη του υλικού αυτού γινόταν από επιφανειακά στρώματα του



εδάφους κοντά στο χωριό Μηλιά και πουλιόνταν στα άλλα 3 χωριά. Μέτσοβο, Ανήλιο, Βοτονόσι.

Το λούτο αναλύθηκε εργαστηριακά και βρέθηκε ότι αποτελείται από ίνες τρεμολίτη και φαίνεται πια καθαρά ότι είναι ο υπεύθυνος παράγοντας της ενδημικής αμιάντωσης στην περιοχή Μετσόβου (Langer et al,).

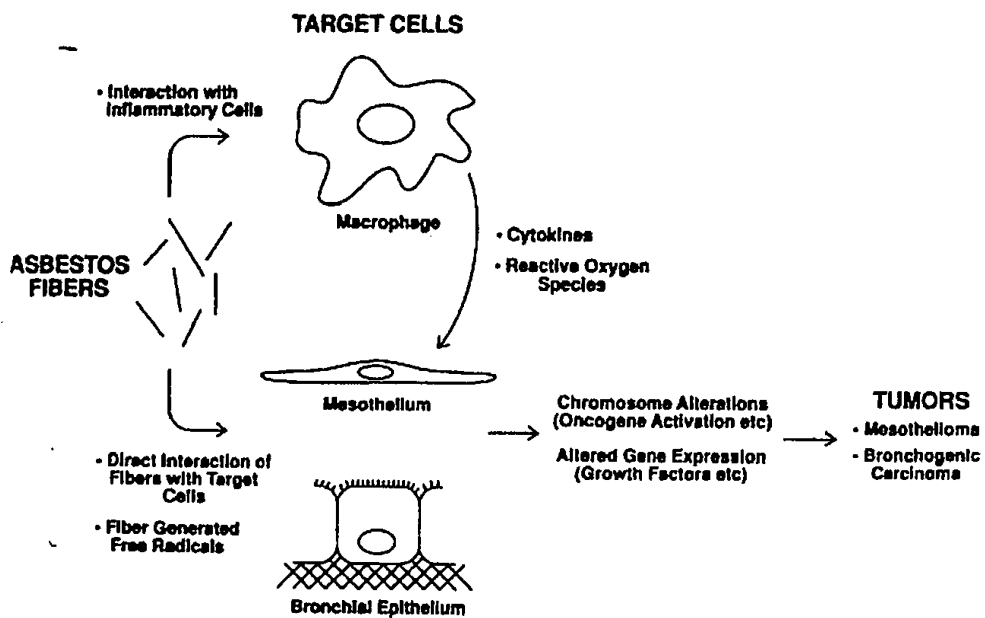
Στην περιοχή του Μετσόβου διενεργήθηκε και βρίσκεται σε εξέλιξη, μια μεγάλη μελέτη σε άτομα που εκτέθηκαν και εισέπνευσαν μια μόνο ποικιλία ινών αμιάντου τον τρεμολίτη.

Τα άτομα της μελέτης, κάτοικοι της περιοχής που χρησιμοποιούσαν το αμιαντούχο υλικό, σύμφωνα με την μέχρι τώρα διερεύνησή τους από την ερευνητική μας ομάδα, χωρίζονται σε δύο ομάδες. Μία ομάδα α) με υπεζωκοτικές αποτιτανώσεις, λεμφοκυτταρική κυψελιδίτιδα και πρωτεΐνες, πιθανότατα προϊόντα ενεργοποιημένων μακροφάγων, στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα και μία ομάδα β) χωρίς υπεζωκοτικές πλάκες και χωρίς αντίδραση από τις κυψελίδες. Δηλαδή μία ομάδα που εμφανίζει μία έντονη δραστηριότητα στις κυψελίδες της, σε αντίθεση με την έλλειψη, τουλάχιστον εμφανούς, τοπικής λεμφοκυτταρικής δραστηριότητας της άλλης ομάδας.

Η υπόθεσή μας είναι ότι βρισκόμαστε μπροστά σε διαφορετικό βαθμό ή τρόπο ενεργοποίησης των κυψελιδικών μακροφάγων και ότι αυτή η διαφορά είναι πολύ σημαντική στο επίπεδο της προστασίας από καρκίνο.

Ήταν λοιπόν φυσικό το επόμενο βήμα της μελέτης να αποτελεί, μία εις βάθος έρευνα των κυψελιδικών μακροφάγων των δύο ομάδων Μετσοβιτών, για την διαπίστωση τυχόν διαφορών στην παρουσία υποπληθυσμών των μακροφάγων και αναζήτηση παραγόντων που να υποδεικνύουν πιθανές διαφορές στον τρόπο ενεργοποίησής τους, κάτι που επιχειρείται στην παρούσα εργασία.





Εικόνα 7: Ο μηχανισμός επίδρασης των ινών αμιάντου με τους διαφόρους τύπους κυττάρων.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ -ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ



THE MIDDLE EASTERN JOURNAL



ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη το βρογχοκυψελιδικό εκπλυμα (BAL) από ασθενείς με γνωστή μη επαγγελματική έκθεση σε αμίαντο και από ασθενείς με τεκμηριωμένη Σαρκοείδωση

A) 31 Μετσοβίτες από τους οποίους

- ✓ 13 με αποπτανώσεις υπεζωκότα και
- ✓ 18 χωρίς αποπτανώσεις.

B) 12 ασθενείς με Σαρκοείδωση

2.2 ΒΡΟΓΧΟΚΥΨΕΛΙΔΙΚΗ ΕΚΠΛΥΣΗ

Η βρογχοκυψελιδική έκπλυση έγινε με εύκαμπτο βρογχοσκόπιο Olympus DF-ITR υπό τοπική αναισθησία (ξυλοκαΐνη 0,2%) στο Βρογχοσκοπικό Τμήμα της Πνευμονολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Μετά πλήρη βρογχοσκόπηση, το εύκαμπτο βρογχοσκόπιο ενσφηνώνεται συνήθως σε έναν υποτιμητικό βρόγχο του μέσου, εκτός εάν υπάρχει ένδειξη για κάποια άλλη συγκεκριμένη περιοχή. Μέσω του αυλού αναρρόφησης, γίνεται έγχυση 100-300ml φυσιολογικού ορού θερμοκρασίας 30°. Ποσότητες μικρότερες των 100ml δεν είναι επαρκείς για λήψη αντιπροσωπευτικού υλικού, ενώ υπέρβαση του ποσού των 300ml αυξάνει την συχνότητα και βαρύτητα των επιπλοκών, χωρίς κατ' ουσίαν να προσφέρει καλύτερο υλικό. Η έγχυση γίνεται αργά με σύριγγα που εφαρμόζεται στον αυλό αναρρόφησης του βρογχοσκοπίου, σε κλάσματα των 20ml και ακολουθεί αναρρόφηση, αμέσως μετά την έγχυση του κάθε κλάσματος, με την ίδια σύριγγα και με τον ίδιο ρυθμό. Η αναρρόφηση μπορεί να γίνει και με αντλία κενού. Εδώ



χρειάζεται προσοχή ώστε να χρησιμοποιηθούν πολύ ήπιες αρνητικές πιέσεις, για να αποφευχθεί ο κίνδυνος τραυματισμού του βρογχικού τοιχώματος. Το υγρό που αναρροφάται συλλέγεται σε αποστειρωμένα σωληνάρια φυγοκέντρου των 50ml ή 15 ml με κωνικό πυθμένα και βιδωτό πάμα. Το κλάσμα των πρώτων 20ml φυλάσσεται χωριστά καθ'όσον θεωρείται ότι περιέχει στοιχεία αντιπροσωπευτικά κυρίως των αεραγωγών (βρογχικό δείγμα).

Δεν υπάρχει απόλυτη ομοφωνία ως προς τον όγκο των κλασμάτων της έκπλυσης. Πάντως στα διάφορα εργαστήρια χρησιμοποιούνται όγκοι από 20 έως 60ml, χωρίς όπως φαίνεται να υπάρχουν ουσιαστικές διαφορές στην σύσταση των κλασμάτων ούτε ως προς τα κύτταρα που περιέχουν, ούτε ως προς τα διαλυτά τους στοιχεία. Η επιλογή από το δικό μας εργαστήριο των 20ml, έγινε με γνώμονα κυρίως την ευκολία για τον εξεταζόμενο και συνίσταται από την διεθνή ομάδα μελέτης του BAL (Klech et al, 1989). Με αυτόν τον όγκο έγχυσης αποφεύγουμε τον ερεθισμό του βρογχικού δένδρου και επομένως και τον βήχα. Το μόνο μειονέκτημα είναι ίσως ο μειωμένος όγκος επαναρρόφησης του πρώτου κλάσματος, ο οποίος είναι ούτως ή άλλως μειωμένος, οποιοσδήποτε και αν είναι ο όγκος κλάσματος που θα χρησιμοποιηθεί.

Ο όγκος του επαναρροφούμενου υγρού αποτελεί ένα ακόμα θέμα που απασχολεί όσους ασχολούνται με την βρογχοκυψελιδική έκπλυση. Όλοι φαίνεται να συμφωνούν ότι όγκοι επαναρρόφησης μικρότεροι των 10ml, δεν είναι επαρκείς. Το πρόβλημα αυτό είναι υπαρκτό, όταν μελετάμε χρόνιες αποφρακτικές πνευμονοπάθειες, όπου το ποσοστό επαναρρόφησης φαίνεται να έχει γραμμική σχέση με την FEV1, πνευμονίες ή ARDS. Γενικώς πάντως, αν και έχει δειχθεί ότι χαμηλά ποσοστά επαναρρόφησης ομοσχετίζονται θετικά με ελάττωση του αριθμού των κυττάρων του εκπλύματος, δεν έχει καθορισθεί ένα κατώτατο όριο επαναρρόφησης. Σε δική μας μελέτη παρατηρήσαμε ότι ποσοστά επαναρρόφησης μέχρι και 10%, δεν φαίνεται να επηρεάζουν την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη, αν και τα δείγματα με τόσο χαμηλό ποσοστό επαναρρόφησης ήταν ελάχιστα.



Όλα τα δείγματα φυλάσσονται σε πάγο μέχρι την μεταφορά τους στον χώρο επεξεργασίας τους.

Παρά το γεγονός ότι η πάροδος λίγων ωρών δεν φαίνεται να επηρεάζει την βιωσιμότητα των κυττάρων, καλόν είναι η μεταφορά να γίνεται το συντομότερο δυνατόν. Ο χρόνος αποκτά ιδιαίτερη σημασία όταν τα κύτταρα πρόκειται να χρησιμοποιηθούν σε βιολογικές μεθόδους, η όταν πρόκειται να αναλυθούν πρωτεΐνες που εύκολα αποδομούνται η αλλοιώνονται.

Δείγμα αίματος λαμβάνεται πριν από την βρογχοσκόπηση, καθώς όταν αναλύονται πρωτεΐνες του εκπλύματος, είναι συχνά απαραίτητο, να υπάρχει αντίστοιχη ανάλυση και του ορού.



2.2.1.ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΥΛΙΚΟΥ ΒΡΟΓΧΟΚΥΨΕΛΙΔΙΚΗΣ ΕΚΠΛΥΣΗΣ

1. Διαχωρισμός των κυττάρων απο την υγρά φάση, με ήπια φυγοκέντρηση του δείγματος σε κωνικά σωληνάρια φυγοκέντρου με βιδωτό καπάκι, των 15 ή 50ml, (1200rpmx40min). Το πρώτο εγχυθέν κλάσμα των 20 ml που θεωρούμε ότι αντιπροσωπεύει το βρογχικό δείγμα, το επεξεργαζόμαστε πάντοτε χωριστά. Όλα τα υπόλοιπα κλάσματα, που αντιπροσωπεύουν το κυψελιδικό δείγμα, αναμιγνύονται σε αυτήν ή την επομένη φάση.

**Εάν το δείγμα έχει πολύ βλέννη το περνάμε πριν από την φυγοκέντρηση, από μια μονή γάζα που τοποθετούμε στο στόμιο καθαρού σωληναρίου, στο οποίο μεταγγίζουμε το δείγμα. Ακολουθεί η φυγοκέντρηση ως ανωτέρω.

2. Μεταφορά του υπερκειμένου σε άλλα σωληνάρια, με προσοχή να μη διαταραχθεί το κυτταρικό ίζημα. Καλό είναι να διαμοιράζεται το υπερκείμενο και να φυλάσσονται και μικρά κλάσματα των 2ml (2-3 σωληνάρια erendorff) και των 10ml (1-2 σωληνάρια), έτσι ώστε να μην αναγκαζόμαστε να αποψύχουμε όλο τον όγκο του υπερκειμένου κάθε φορά που χρειαζόμαστε κάποια ποσότητα για διάφορες αναλύσεις.

Το 1^ο, βρογχικό, δείγμα το συλλέγουμε χωριστά.

3. Αποθήκευση των υπερκειμένων σε καταψύκτη κατά προτίμηση στους -70° ή στους -25° C.

4. Προσθήκη 1ml φυσιολογικού ορού στο κυτταρικό ίζημα. Εάν έχουμε περισσότερα του ενός κυψελιδικά δείγματα, τα αναμιγνύουμε ως εξής: προσθέτουμε 1ml φυσιολογικού ορού στο κυτταρικό ίζημα ενός σωληναρίου. Αναδεύουμε τα κύτταρα με την πιπέττα πολλές φορές για να διαλύσουμε τυχόν συσσωματώματα. Μεταφέρουμε τα κύτταρα στο επόμενο σωληνάριο και τα αναδεύουμε πολλές φορές έτσι ώστε να διαλυθούν και τα συσσωματώματα του 2^{ου} σωληναρίου και να



αναμιχθούν τα κύτταρα των δύο σωληναρίων. Συνεχίζουμε με τον ίδιο τρόπο για όσα δείγματα έχουμε.

5. Εκπλυση των κυτάρων με φυσιολογικό ορό. Γεμίζουμε με φυσιολογικό ορό το σωληνάριο που περιέχει τα κύτταρα και φυγοκεντρούμε στις 1200rpmX20min.

6. Πετάμε το υπερκείμενο. Προσθέτουμε στο κυτταρικό ίζημα 1ml φυσιολογικού ορού και αναδεύουμε πολλές φορές με την πιπέτα για να διαλυθούν τα συσσωματώματα.

7. Καταμέτρηση των κυττάρων σε αιμοκυττόμετρο με παράλληλο έλεγχο βιοσιμότητας με trypan blue.

Εφόσον μετρηθούν τα κύτταρα, ένα μέρος αυτών, σε πυκνότητα $2,5 \times 10^6$ κυτ./ml, επιστρώνεται σε γυάλινες αντικειμενοφόρους πλάκες (που έχουν σκουπιστεί με χαρτί εμποτισμένο με αλκοόλη 70%).

Επίστρωση των κυττάρων σε 20-40 πλακίδια (12-15λ/πλακάκι)

Τα πλακίδια φυλάσσονται σε καταψύκτη (-30 έως -80°C), έως ότου αναλυθούν.

Τα υπόλοιπα κύτταρα μπορούν να καταψυχθούν, σε πυκνότητα $5-10 \times 10^6$ κυτ./ml, με προσθήκη normal (ή fetal) calf serum (10-20% του όγκου του κυτταρικού εναιωρήματος) και Dimethylsulfoxide (DMSO) (10%), που εξασφαλίζει την επιβίωση τους στους -70°C, όπου και φυλάσσονται.

Ο ορός ο οποίος λαμβάνεται μετά από την φυγοκέντρηση του αίματος,

(5000rpmx10min), φυλάσσεται επίσης σε καταψύκτη έως ότου αναλυθεί.

Ιστολογική χρώση για την μορφολογική ανάλυση του δείγματος. (Αιματοξυλίνη-Ηωσίνη, MayGrunvald-Giemsa, DiffQuiq κλπ). Μετρώνται τουλάχιστον 500 κύτταρα από διαφορετικά πεδία και υπολογίζονται οι εκατοστιαίες αναλογίες των διαφόρων κυτταρικών τύπων.



2.2.2. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

2.2.2.α. Χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης (H & E)

1. Βγάζουμε τα πλακίδια από τον καταψύκτη και τα αφήνουμε να στεγνώσουν επί 15min.
2. Μονιμοποίηση σε φορμαλίνη (διάλυμα 10% κατ'όγκον Παραφορμαλδεΐδης 37%) X2min
3. Έκπλυση σε απεσταγμένο νερό X1min
4. Αιματοξυλίνη Harris 80% (80 μέρη αιματοξυλίνης και 20 μέρη νερό και φιλτράρισμα) X 25sec
5. Έκπλυση σε νερό βρύσης X5min
6. Αλκοόλη 80% X1min
7. Ηωσίνη X 1.5min
8. Αλκοόλη 80% X 1min
9. Αλκοόλη 95% X 1min
10. Απόλυτη αλκοόλη X 1min
11. Απόλυτη αλκοόλη X 1min
12. Ξυλόλη X 1min
13. Ξυλόλη X 1min
14. mounting medium (μονιμοποιητικό υλικό) και καλυπτρίδα



2.2.2.β. Ανοσοϊστοχημεία

Μέθοδος αβιδίνης-βιοτίνης-υπεροξειδάσης

Αρχές

Ο καθορισμός των υποπληθυσμών των λεμφοκυττάρων και η ανίχνευση ενεργοποιημένων κυττάρων έγινε με τη μέθοδο της ανοσοϋπεροξειδάσης με γέφυρα αβιδίνης – βιοτίνης (Su-Ming Hsu et al., 1981).

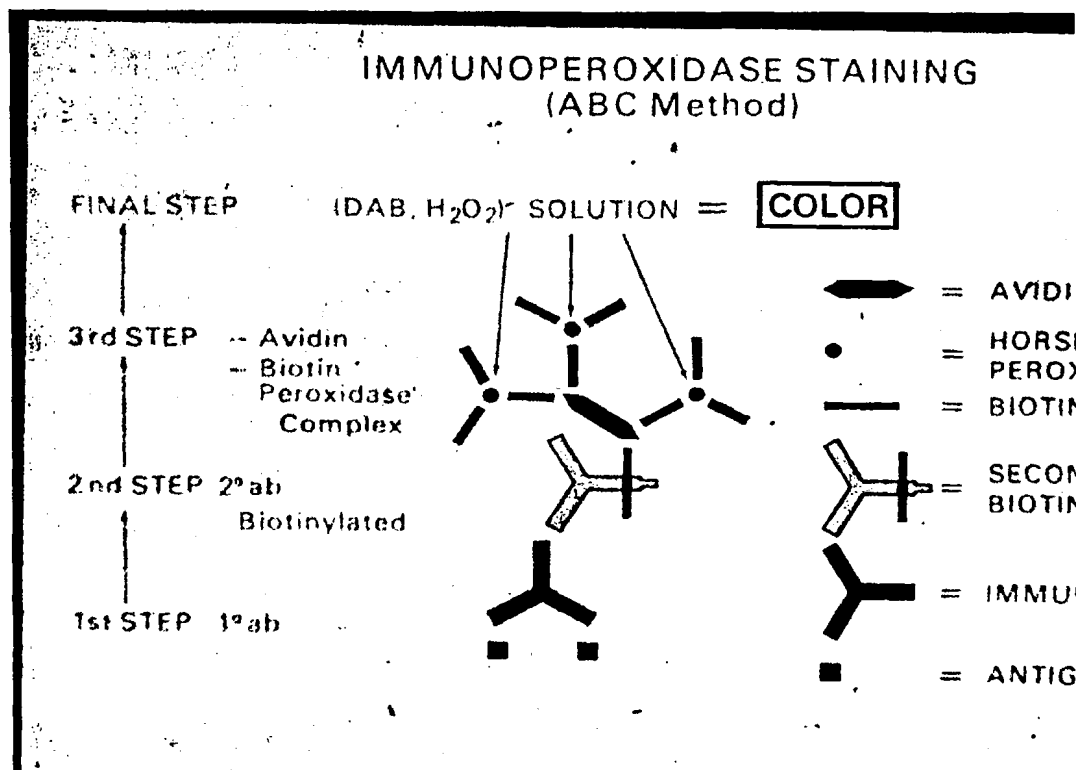
Η μέθοδος συνίσταται στην οπτικοποίηση των ανοσοσυμπλεγμάτων που σχηματίζονται στην κυτταρική επιφάνεια, όταν ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ενωθεί με το ομόλογό του αντιγόνο της κυτταρικής αυτής επιφανείας. Στην ανοσοϊστοχημική αυτή τεχνική χρησιμοποιούνται αντισώματα σεσημασμένα με ένα ένζυμο. Η οπτικοποίηση του συμπλέγματος αντιγόνου-αντισώματος-ενζύμου επιτυγχάνεται με την επίδραση στο τελικό στάδιο του υποστρώματος του ενζύμου και η επακόλουθη παραγωγή χρώματος (Wilker et al., 1984). Συνήθως χρησιμοποιείται η έμμεση τεχνική, όπου το αντίσωμα κατά του μελετώμενου μορίου είναι καθαρό και η ανίχνευσή του γίνεται με δεύτερο αντίσωμα που στρέφεται εναντίον του πρώτου και το οποίο πλέον είναι σεσημασμένο. Η έμμεση τεχνική είναι πιο ευαίσθητη εξαιτίας της ενίσχυσης του σήματος που παρέχει η χρήση περισσότερων του ενός αντισωμάτων.

Στην προκειμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος αβιδίνης-βιοτίνης-υπεροξειδάσης. Εδώ το τελικό σήμα ενισχύεται περισσότερο με την προσθήκη ενός ακόμα αντιδραστηρίου και ενός ακόμα βήματος, που καταλήγουν στην δημιουργία περισσότερων συμπλεγμάτων μορίων, τα οποία είναι δυνατόν να οπτικοποιηθούν. Για τον λόγο αυτόν σχηματίζονται συμπλέγματα αβιδίνης-βιοτίνης, δύο μορίων τα οποία συνδέονται με πολύ ισχυρό δεσμό (Green et al., 1979, Diamandis et al., 1991). Η βιοτίνη είναι βιταμίνη του συμπλέγματος βιταμινών Β, η οποία απαντάται σε μικροποσότητες σε όλα τα ζωντανά κύτταρα (Bonjour et al., 1984). Η αβιδίνη είναι γλυκοπρωτεΐνη του ωολευκώματος, η οποία αναγνωρίζει εκλεκτικά και δεσμεύει πολύ ισχυρά το μόριο της βιοτίνης (Green et al., 1975).



Στην μέθοδο αβιδίνης-βιοτίνης, η βιοτίνη ενσωματώνεται στο δεύτερο αντίσωμα, ενώ η αβιδίνη ιχνηθετείται με το ένζυμο υπεροξειδάση και αντιδρά με τα σχηματισθέντα ανοσοσυμπλέγματα. Η βιοτίνη λειτουργεί ως γέφυρα και ενώνει τα ανοσοσυμπλέγματα που πρόκειται να καταδειχθούν με το σύμπλεγμα αβιδίνης-ενζύμου. Στην τελική φάση η επίδραση του υποστρώματος του ενζύμου οπτικοποιείται σχηματίζοντας συμπλέγματα αντιγόνου-αντισώματος-αντιαντισώματος-βιοτίνης-αβιδίνης-ενζύμου, σχηματίζοντας χρώμα στις θέσεις που αντιδρά με το ένζυμο.

Κάθε μόριο σεσημασμένης αβιδίνης, συνδέεται θεωρητικά με 4 μόρια βιοτίνης με αποτέλεσμα την ενίσχυση του τελικού οπτικού σήματος (Bayer et al., 1990 Wichek et al., 1990). Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται συνήθως για την σήμανση της αβιδίνης είναι η υπεροξειδάση και η αλκαλική φωσφατάση.



Εικόνα 1: Σχηματική παράσταση των αρχών της μεθόδου αβιδίνης-βιοτίνης-υπεροξειδάσης

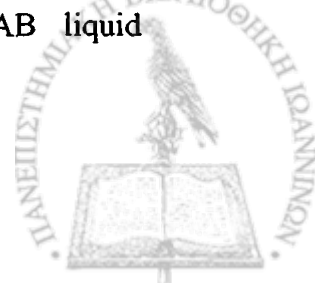


Μέθοδος της ανοσοϊστοχημείας πλακιδίου με την τεχνική αβιδίνης – βιοτίνης –
υπεροξειδάσης

Τεχνική

1. Μονιμοποίηση 4-5 λεπτά σε ακετόνη ή γλουταραλδεΐδη.
2. Έκπλυση σε TBS, 5 λεπτά .
3. Επώαση των πλακών σε TBS που περιέχει 5% βόιο ορό (προστατευτικό διάλυμα για κατάληψη των θέσεων που πιθανόν να συνδέονται μη ειδικά με τις ανοσοσφαιρίνες των επόμενων βημάτων) 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Προσθήκη 20μl του ειδικού αντισώματος σε κατάλληλη αραιώση 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Εκπλύσεις σε TBS, 2x 5 λεπτά
6. Προσθήκη 20μl διαλύματος του βιοτινυλιωμένου δεύτερου αντισώματος επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.(Anti-mouse IGG FAB SPECIFIC SIGMA)
7. Εκπλύσεις σε TBS , 2x 5 λεπτά
8. Προσθήκη 20 μl διαλύματος αβιδίνης-βιοτίνης (Streptavidin-Peroxidase Polymer SIGMA διάλυμα 1:200 αραιωμένο σε TBS) επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
9. Εκπλύσεις σε TBS, 2x 5 λεπτά
10. Τα κύτταρα επωάζονται με 20μl DAB (3,3' – diaminobenzidine) επί περίπου 1 λεπτό.
11. Χρώση με 4% methyl green σε μεθανόλη ή αιματοξυλίνη 20% σε απεσταγμένο νερό.
12. Απόλυτη αλκοόλη X2 εκπλύσεις
13. Ξυλόλη X2 εκπλύσεις.
14. mounting medium (μονιμοποιητικό υλικό) και καλυπτρίδα.

- (Η παρασκευή διαλύματος DAB (υπόστρωμα του ενζύμου υπεροξειδάση) γίνεται λίγα λεπτά πριν τη χρήση της με την προσθήκη διαλύματος 1 μl χρωμογόνου: με 10 μl ρυθμιστικού διαλύματος (1:10 DAB liquid



Chromagen:DAB liquid Buffer SIGMA). 10X TBS: 60,57 g Tris ,87,67 g NaCl ,1 lit H₂O, Ρύθμιση του pH 7,6 με πυκνό HCl).

2.2.2.γ. Μονοκλωνικά αντισώματα

Τα κυψελιδικά μακροφάγα αντιπροσωπεύουν μια ομάδα των μονοπυρηνικών φαγοκυττάρων με διάφορα στάδια ενεργοποίησης και διαφοροποίησης. Αυτά τα κύτταρα είναι ικανά να αλλάζουν το φαινότυπο τους και τις λειτουργικές τους ιδιότητες ως απάντηση σε εξωγενή ερεθίσματα. Η τροποποίηση των αντιγόνων επιφανείας πιθανόν βοηθά τα μακροφάγα να ελέγχουν την φαγοκυτταρική δραστηριότητα τους στο πνευμονικό μικροπεριβάλλον.

CD Markers(Clusters of Differentiation) είναι μόρια επιφανείας των λευκοκυττάρων/θρομβοκυττάρων και ανιχνεύονται με μονοκλωνικά αντισώματα.

Τα μονοκλωνικά αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στρέφονται εναντίον των ακόλουθων αντιγόνων επιφανείας:

- ❖ CD3 αντιγόνο επιφανείας όλων των λεμφοκυττάρων.
- ❖ CD4 αντιγόνο επιφανείας των βοηθητικών T-λεμφοκυττάρων.
- ❖ CD8 αντιγόνο επιφανείας των κατασταλτικών/κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων.
- ❖ CD11c/MAC εκφράζεται στην επιφάνεια πολλών μακροφάγων, πολυμορφοπύρηνων, NK κύτταρων και B-λεμφοκυττάρων .
- ❖ CD14 εκφράζεται σε μονοκύτταρα και ιστικά μακροφάγα και κύτταρα LangerhanCD 16 εκφράζεται σε NK, μακροφάγα και πολυμορφοπύρηννα (υποδοχέας III του τμήματος Fc του συμπληρώματος).



- ❖ CD19 εκφράζεται σε Β-λεμφοκύτταρα CD25 εκφράζεται σε ενεργοποιημένα μακροφάγα, Β- και Τ-λεμφοκύτταρα (αντίσωμα κατά της IL-2).
- ❖ CD122 εκφράζεται σε NK, μακροφάγα, Τ- και Β-λεμφοκύτταρα (μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της αλυσίδας β- του υποδοχέα της IL-2).
- ❖ CDw127 (υποδοχέας του IL-7) κυτταροκίνη των μακροφάγων/ μονοκυττάρων
- ❖ CD45 RO-εκφράζεται από υποπληθυσμούς των Τ-λεμφοκυττάρων Β-λεμφοκύτταρα, από NK-κύτταρα, από μονοκύτταρα, από μακροφάγα και κοκκιοκύτταρα.
- ❖ CD45 RA-αντιγόνο επιφανείας σε υποπληθυσμούς των Τ-λεμφοκυττάρων, σε Β-λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα.
- ❖ CD25 εκφράζεται στην αλυσίδα του υποδοχέα IL-2 συνδέεται με το CD122 και την αλυσίδα IL-2R β , η κυτταρική του έκφραση εμφανίζεται στα ενεργοποιημένα Τ, Β και μονοκύτταρα.
- ❖ CD54 (ICAM-1)-μόριο προσκόλλησης
- ❖ CD71 εκφράζεται από τα ενεργοποιημένα ιστικά μακροφάγα στο τελικό στάδιο της διαφοροποίησής τους. (μονοκλωνικό αντίσωμα του υποδοχέα της τρανσφαιρίνης)
- ❖ CD1-a-αντιγόνο επιφανείας των δενδριτικών και των Langerhans κυττάρων.
- ❖ HLA-DR εκφράζεται από ενεργοποιημένα μακροφάγα και Τ-λεμφοκύτταρα



2.3.ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Για την στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήσαμε το SPSS-Statistical Pachage for Social Sciences. Μέσω του προγράμματος αναλύθηκε η συχνότητα (frequency) και υπολογίστηκε ο μέσος όρος των τιμών του αριθμού των μακροφάγων και λεμφοκυττάρων που προέκυψε από τα πειράματα . Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε το t-test για την επεξεργασία των τιμών(αποτελεσμάτων) από το πρόγραμμα SPSS. Ελήφθησαν οι τιμές που είχαν στατιστική σημαντική διαφορά $p\text{-value}(\text{significance}) < 0.05$.



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η παρούσα εργασία επικεντρώνεται στην μελέτη των κυψελιδικών ΜΦ από βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ατόμων με μη επαγγελματική έκθεση σε αμίαντο

Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκε ανοσοϊστοχημικά η έκφραση στην επιφάνεια των ΜΦ, πρωτεϊνών που σχετίζονται με φλεγμονώδεις αντιδράσεις και γενικότερα με ενεργοποίηση των κυττάρων.

Τα άτομα με μη επαγγελματική έκθεση σε αμίαντο χωρίστηκαν σε δύο ομάδες: την ομάδα με υπεζωκοτικές αποτιτανώσεις (PC+) και λεμφοκυτταρική κυψελιδίτιδα, και την ομάδα χωρίς υπεζωκοτικές πλάκες (PC-) ούτε κυψελιδίτιδα.

Μία ομάδα ασθενών με Σαρκοείδωση χρησιμοποιήθηκε ως ομάδα σύγκρισης καθώς η σαρκοείδωση αποτελεί συστηματική νόσο με ενεργοποιημένους τους μηχανισμούς φλεγμονώδους αντίδρασης.

Σύγκριση με φυσιολογικά άτομα δεν έγινε διότι δεν υπήρχε επαρκής αριθμός δειγμάτων ώστε να μπορεί να δώσει στατιστικώς αξιόπιστα αποτελέσματα.

Οι δείκτες που παρουσίασαν αξιολογή διακύμανση μεταξύ των ομάδων και επέτρεψαν στατιστική αξιολόγηση, περιορίστηκαν στα εξής μόρια :

CD14, CD11c, CD71, HLA-DR, CD54, CD25.

Η ανάλυση των ευρημάτων έδωσε τα ακόλουθα αποτελέσματα:

A) οι Μετσοβίτες ως σύνολο (PC+ PC-) σε σχέση με την ομάδα των ασθενών με Σαρκοείδωση, φαίνεται ότι δεν διαφέρουν ως προς την έκφραση δεικτών των ΜΦ που χαρακτηρίζουν κύτταρα σε κατάσταση ετοιμότητας ή και χρόνιας φλεγμονής (πίν.3.1), Παρατηρούμε δηλαδή, ότι σε γενικές γραμμές, η αντίδραση των Μετσοβιτών στον αμίαντο ακολουθεί το γενικό πρότυπο της φλεγμονώδους αντίδρασης που παρατηρείται και στην σαρκοείδωση με παρόμοια διακύμανση στην έκφραση του υποδοχέα της Ιντερλευκίνης 2 (IL-2R/CD25) (πιν.3.3), του υποδοχέα της τρανσφερρίνης (CD71) (πιν.3.4) και του μορίου προσκόλλησης CD54 (πιν.3.5).



B) Οι δύο ομάδες των εκτεθέντων σε αμίαντο, η ομάδα **PC+** (με υπεζωκοτικές πλάκες και αυξημένη παρουσία λεμφοκυττάρων στο BAL) και η ομάδα **PC-** (χωρίς πλάκες και λεμφοκύτταρα), εμφανίζουν διαφορές στην έκφραση τριών μορίων της κυτταρικής επιφανείας (πιν.3.2).

Παρατηρείται ένας ιδιαίτερος τρόπος αντίδρασης των ΜΦ της ομάδας **PC-**:

-αυξημένη έκφραση των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας τάξεως II (MHC class II/HLA-DR) (πιν.3.6),

-αυξημένη έκφραση μιάς ιντεγκρίνης-α (CD11c) (πιν.3.7) και

-αυξημένη έκφραση του μορίου CD14 (υποδοχέας της LPS) (πιν.3.8).

Οι δείκτες αυτοί εμφανίζονται αυξημένοι στην ομάδα των Μετσοβιτών χωρίς αποτιτανώσεις (αν και στην περίπτωση του CD11c χωρίς στατιστικώς σημαντική διαφορά).

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.1

	Pc+ %(ΜΦ)	Pc- %(ΜΦ)	Sarc %(ΜΦ)	Pc+/Pc-	Pc+/Sarc	Pc-/Sarc
CD 25	84,6	79,8	80,6	0,9	0,56	0,78
CD 71	89,5	93,2	92	0,408	0,48	0,9
CD 54	83,7	68	77	0,123	0,858	0,224
HLA-DR	86	93	86	■	0,9	0,067
Leu-M5	88,6	93	83	0,144	0,38	0,081
CD 14	75,3	89,6	83	■	■	0,256

Έκφραση ανοσολογικώς δραστικών μορίων από τα Μακροφάγα (ΜΦ) του BAL

Διαφορές μεταξύ των ομάδων (στατιστικώς σημαντική διαφορά, όπου $p < 0.05$)

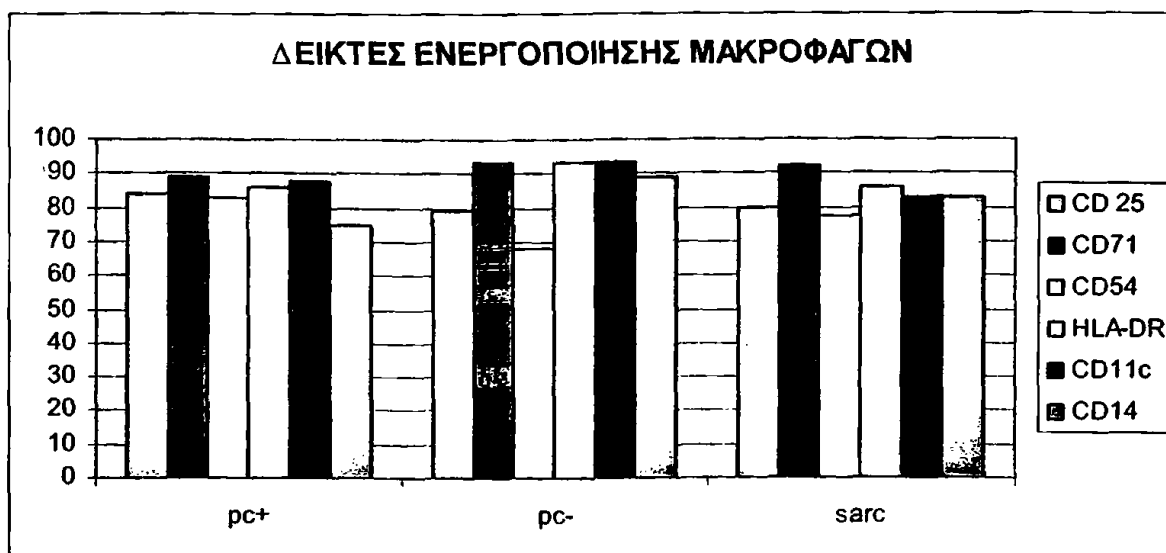


ΠΙΝΑΚΑΣ 3.2

%	CD 25	CD 71	CD54	HLA-DR	CD 11c	CD14
Pc+	85	90	84	86	89	75
Pc-	80	93	68	93	93	90
Sarco	80	92	77	86	83	83

Δείκτες χρόνιας φλεγμονής, με παρόμοια κινητικότητα σε όλες τις ομάδες

Ειδική συμπεριφορά των Pc(-)ΜΦ ενδεικτική εντονότερης (?) ενεργοποίησης, με επιπτώσεις ενδεχομένως επί της ρυθμίσεως του κυτταρικού κύκλου .



Διάγραμμα 3.3 : ποσοτικές σχέσεις των δεικτών ενεργοποίησης μακροφάγων, των τριών υπό εξέτασιν ομάδων: Pc(+)/Μετσοβίτες με αποτιτανώσεις, Pc(-)/Μετσοβίτες χωρίς αποτιτανώσεις, και sarc/σαρκοείδωση.

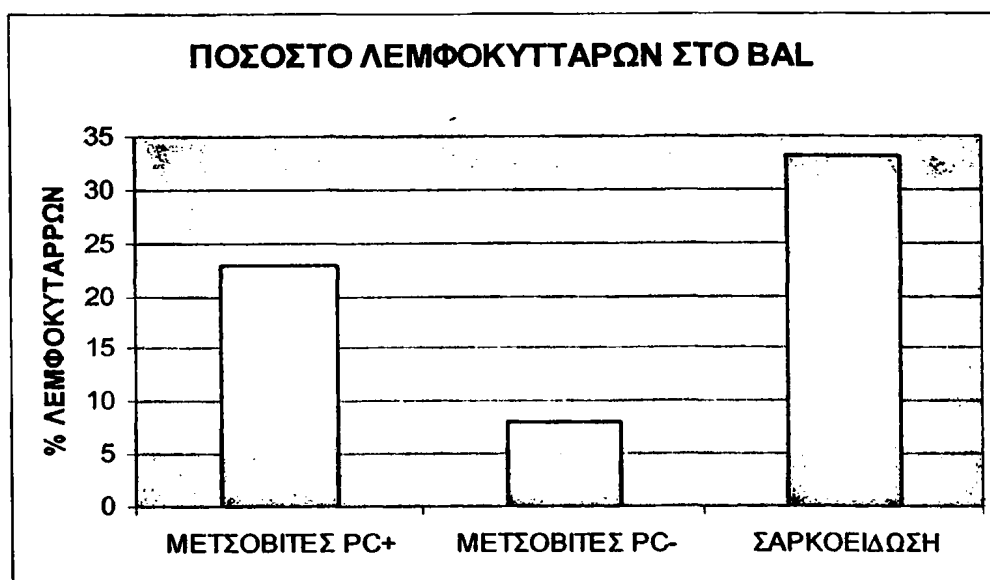
3.3 Αναλυτικοί πίνακες

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.3.1

Ομάδα	%L	Pc+/Pc- P(sig)	Pc+/sarco	Pc-/sarco
Pc+	22,88±13,36	0,000	0,021	-
Pc-	7,97±2,66	0,000	-	0,059
Sarco	33,10±7,28	-	0,021	0,059

Ποσοστό λεμφοκυττάρων BAL

Διαφορές μεταξύ των ομάδων (στατιστικώς σημαντική διαφορά, όπου $p < 0.05$)



Διάγραμμα 3.3.1: τιμές λεμφοκυττάρων των τριών υπό εξέταση ομάδων:

Pc(+)/Μετσοβίτες με αποπιτανώσεις, Pc(-)/Μετσοβίτες χωρίς αποπιτανώσεις, και sarco/σαρκοείδωση.

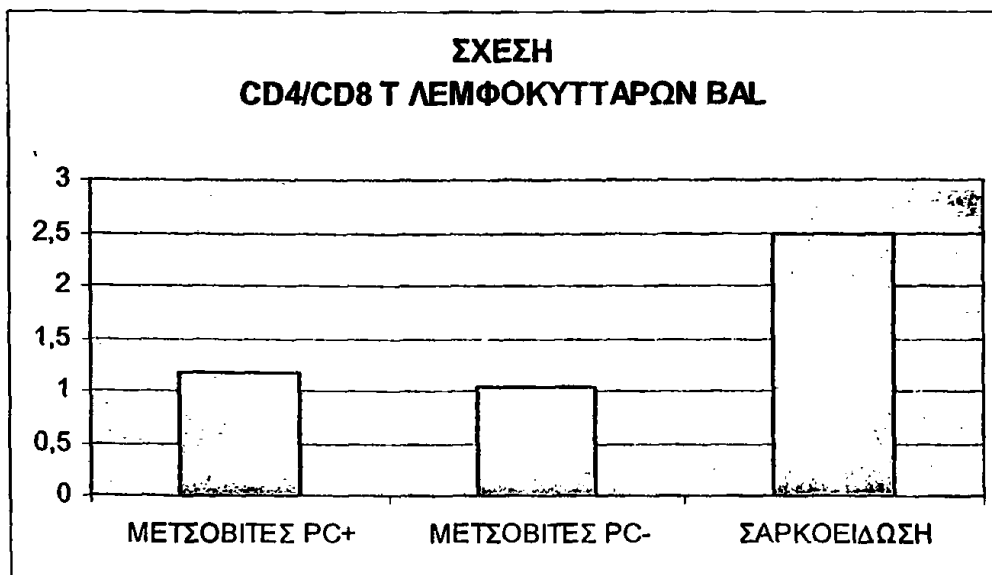


ΠΙΝΑΚΑΣ 3.3.2

Ομάδα	CD4/CD8	Pc+/Pc- P(sig)	Pc+/sarco	Pc-/sarco
Pc+	1,18±0,22	0,046	0,175	-
Pc-	1,03±0,08	0,046	-	0,001
Sarco	2,50±0,31	-	0,175	0,001

Σχέση CD4/CD8 των T λεμφοκυττάρων στις τρεις ομάδες μελέτης

Διαφορές μεταξύ των ομάδων (στατιστικώς σημαντική διαφορά, όπου $p < 0.05$)



Διάγραμμα 3.3.2 :σχέση CD4/CD8 στις υπό εξέταση ομάδες: Pc(+) / Μετσοβίτες με αποτιτανώσεις, Pc(-) / Μετσοβίτες χωρίς αποτιτανώσεις, και σαρκοείδωση.

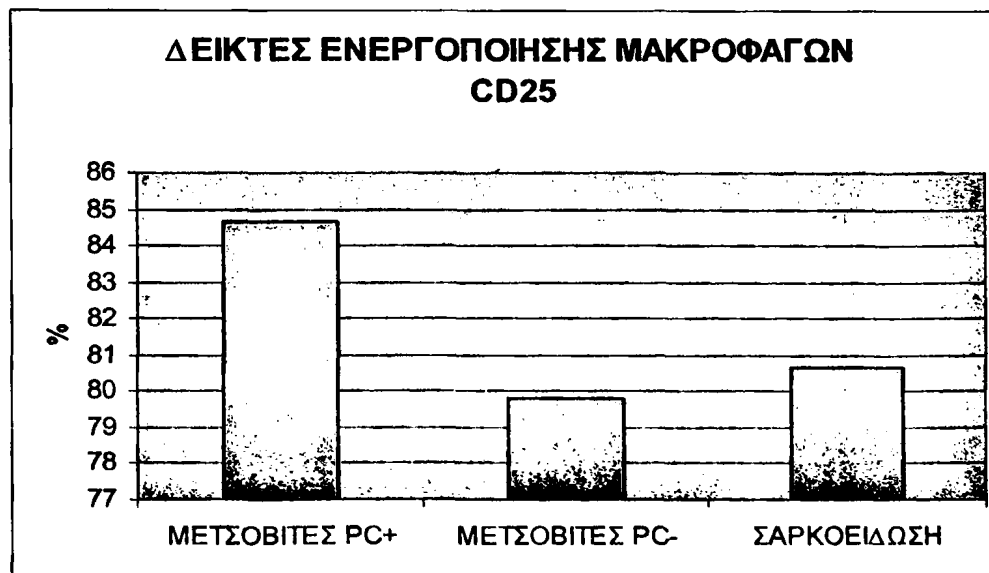


ΠΙΝΑΚΑΣ 3.3.3

Ομάδα	CD25	Pc+/Pc- P(sig)	Pc+/sarco	Pc-/sarco
Pc+	84,66±9,02	0,905	0,569	-
Pc-	79,80±11,27	0,905	-	0,780
Sarco	80,66±11,89	-	0,569	0,780

Έκφραση του μορίου CD25 από τα Μακροφάγα του BAL

Διαφορές μεταξύ των ομάδων (στατιστικώς σημαντική διαφορά, όπου $p < 0.05$)



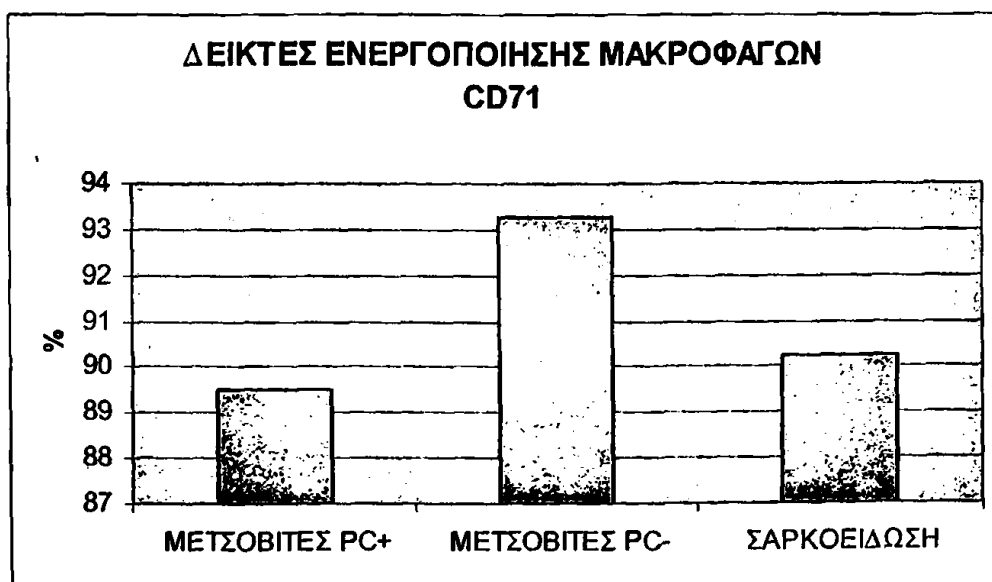
Διάγραμμα 3.3.3: δείκτης ενεργοποίησης των μακροφάγων CD 25 των τριών υπό εξέταση ομάδων: Pc(+) / Μετσοβίτες με αποτιτανώσεις, Pc(-)/Μετσοβίτες χωρίς αποτιτανώσεις, και σαρκοειδωση.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.3.4

Ομάδα	CD71	Pc+/Pc- P(sig)	Pc+/sarco	Pc-/sarco
Pc+	89,50±7,32	0,408	0,485	-
Pc-	93,25±4,34	0,408	-	0,902
Sarco	92,00±4,35	-	0,485	0,902

Έκφραση του μορίου CD71 από τα Μακροφάγα του BAL

Διαφορές μεταξύ των ομάδων (στατιστικώς σημαντική διαφορά, όπου $p < 0.05$)



Διάγραμμα 3.3.4: δείκτης ενεργοποίησης των μακροφάγων CD 71 των τριών υπό εξέταση ομάδων: Pc(+) / Μετσοβίτες με αποτιτανώσεις, Pc(-) / Μετσοβίτες χωρίς αποτιτανώσεις, και σαρκοείδωση.

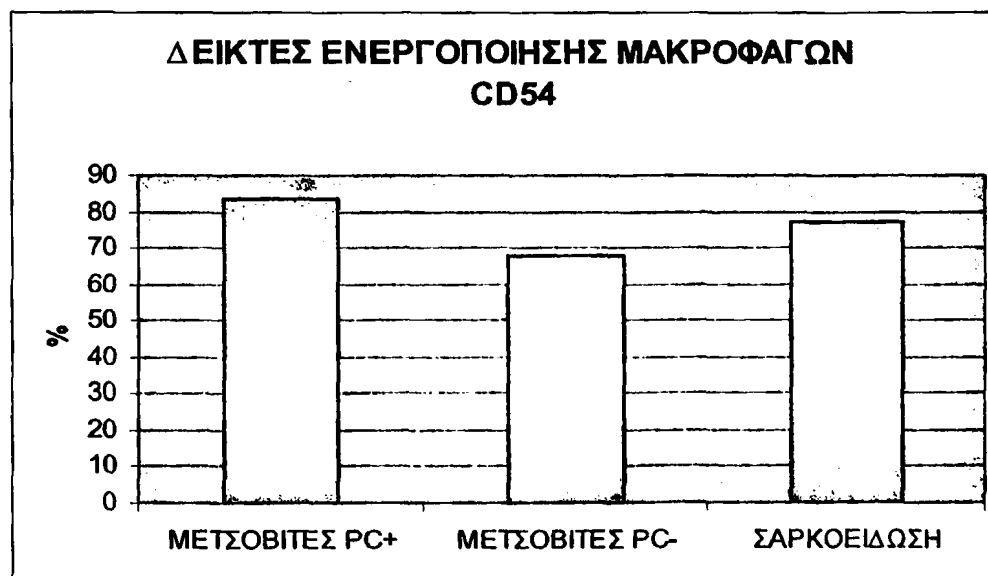


ΠΙΝΑΚΑΣ 3.3.5

Ομάδα	CD54	Pc+/Pc- P(sig)	Pc+/sarco	Pc-/sarco
Pc+	83,77±10,17	0,123	0,858	-
Pc-	68,14±19,11	0,123	-	0,224
Sarco	77,33±11,69	-	0,858	0,224

Έκφραση του μορίου CD54 από τα Μακροφάγα του BAL

Διαφορές μεταξύ των ομάδων (στατιστικός σημαντική διαφορά, όπου $p < 0.05$)



Διάγραμμα 3.3.5: δείκτης ενεργοποίησης των μακροφάγων CD 54, των τριών υπό εξέταση ομάδων: Pc(+)/Μετσοβίτες με αποτιτανώσεις, Pc(-)/Μετσοβίτες χωρίς αποτιτανώσεις, και σαρκοειδωση.

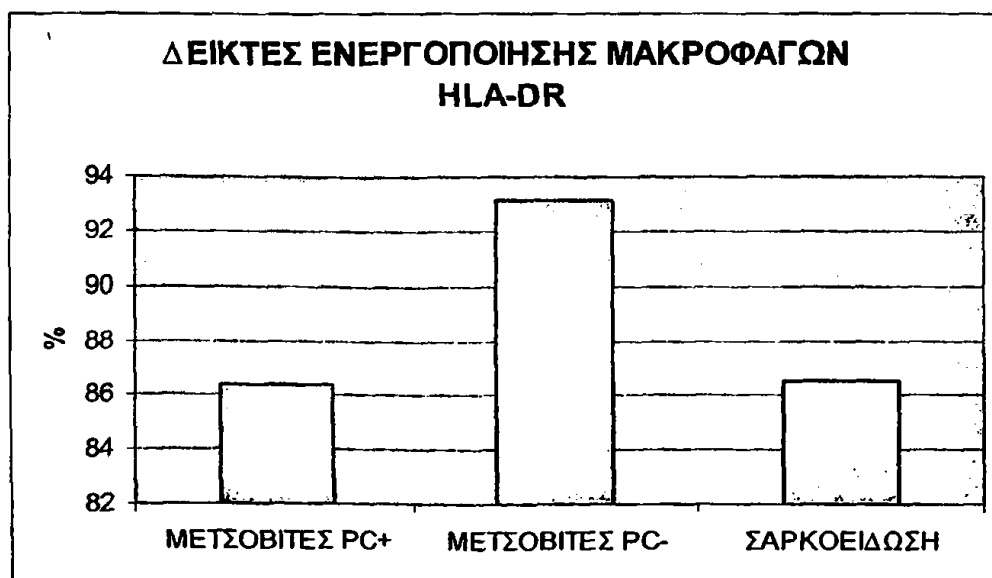


ΠΙΝΑΚΑΣ 3.3.6

Ομάδα	HLA-DR	Pc+/Pc- P(sig)	Pc+/sarco	Pc-/sarco
Pc+	86,36±8,85	■	0,903	-
Pc-	93,12±2,47	■	-	0,067
Sarco	86,50±9,97	-	0,903	0,067

Έκφραση του μορίου HLA-DR από τα Μακροφάγα του BAL

Διαφορές μεταξύ των ομάδων (στατιστικά σημαντική διαφορά, όπου $p < 0.05$)



Διάγραμμα 3.3.6 :δείκτης ενεργοποίησης των μακροφάγων HLA-DR των τριών υπό εξέταση ομάδων: Pc(+)/Μετσοβίτες με αποπτανώσεις, Pc(-)/Μετσοβίτες χωρίς αποπτανώσεις, και σαρκοειδωση.

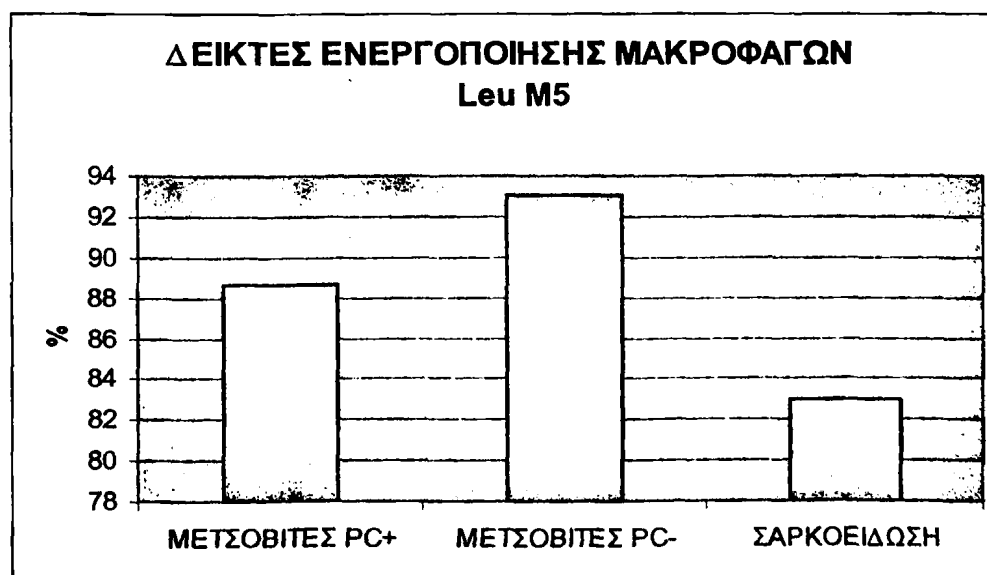


ΠΙΝΑΚΑΣ 3.3.7

Ομάδα	CD11c	Pc+/Pc- P(sig)	Pc+/sarco	Pc-/sarco
Pc+	88,66±9,27	0,144	0,383	-
Pc-	93,00±6,16	0,144	-	0,081
Sarco	83,00±13,49	-	0,383	0,081

Έκφραση του μορίου CD11c (LeuM5) από τα Μακροφάγα του BAL

Διαφορές μεταξύ των ομάδων (στατιστικός σημαντική διαφορά, όπου $p < 0.05$)



Διάγραμμα 3.3.7 : δείκτης ενεργοποίησης των μακροφάγων Leu M5 των τριών υπό εξέταση ομάδων: Pc(+) / Μετσοβίτες με αποτιτανώσεις, Pc(-) / Μετσοβίτες χωρίς αποτιτανώσεις, και sarco/σαρκοειδωση.

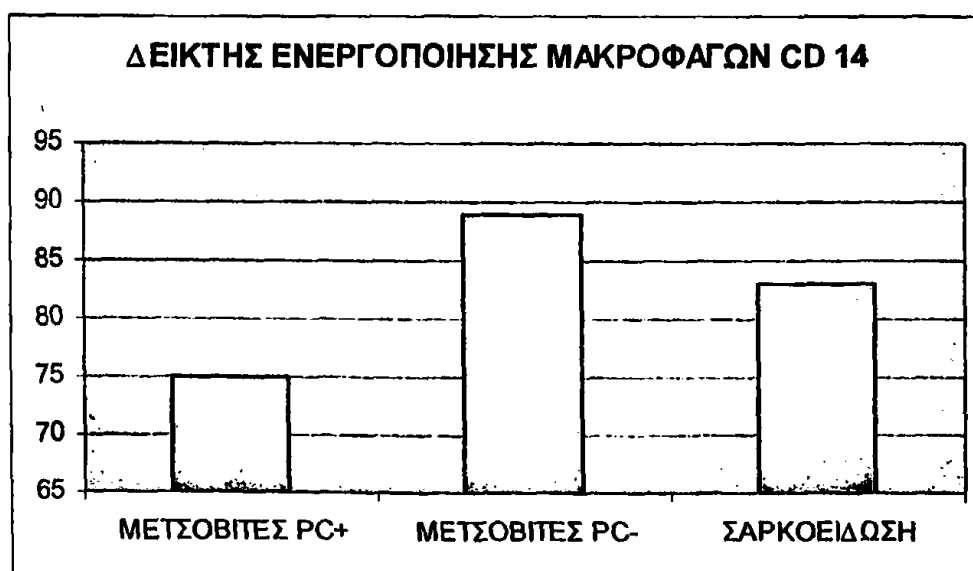


ΠΙΝΑΚΑΣ 3.3.8

Ομάδα	CD14	Pc+/Pc- P(sig)	Pc+/sarco	Pc-/sarco
Pc+	75,33±12,84	■	0,012	-
Pc-	89,62±6,32	■	-	0,256
Sarco	83,20±5,26	-	0,012	0,256

Έκφραση του μορίου CD14 από τα Μακροφάγα του BAL

Διαφορές μεταξύ των ομάδων (στατιστικώς σημαντική διαφορά, όπου $p < 0.05$)



Διάγραμμα 3.3.8: τιμές δείκτη ενεργοποίησης των μακροφάγων CD 14 των τριών υπό εξέταση ομάδων: Pc(+)/Μετσοβίτες με αποτιτανώσεις, Pc(-)/Μετσοβίτες χωρίς αποτιτανώσεις, και σαρκοειδωση.



ΣΥΖΗΤΗΣΗ



4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Υπό τον γενκόν όρο “αμίαντος” αναφερόμαστε σε μία ομάδα ένυδρων ενώσεων του πυριτίου που οργανώνονται σε ίνες, ανευρίσκονται στην φύση σε αφθονία και οι φυσικές και χημικές τους ιδιότητες τις κατέστησαν ιδανικές ως οικοδομικό και μονωτικό υλικό (Kamp D.W et al, 1999, Upadhyay D et al, 2003, Roblero R, et al 1999). Στο Μέτσοβο και την γύρω περιοχή, εξορυσσόμενο αμιαντούχο υλικό χρησιμοποιείτο στο παρελθόν για το άσπρισμα των σπιτιών.

Σε μορφή σκόνης, ο αμίαντος, εφ’ όσον εισπνευσθεί, μπορεί να προκαλέσει βλάβες στον πνευμονικό παρέγχυμα, η βαρύτητα των οποίων εξαρτάται από την ποσότητα και τον χρόνο έκθεσης .

Μικρής έντασης εισπνοή ινών αμιάντου προκαλεί παροδική ή υποκλινική φλεγμονή στο πνευμονικό παρέγχυμα, όπου εντοπίζονται και ΜΦ γεμάτα θραύσματα ινών, ενώ δεν διαταράσσεται η αρχιτεκτονική του ιστού (Robledo R et al ,1999, Quinlan T.R et al, 1995, Constantopoulos S.H et al,1987). Μεγαλύτερη σε ένταση έκθεση οδηγεί σε έντονη φλεγμονή και σταδιακά σε πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων και των ινοβλαστών και τελικώς σε ίνωση (Robledo R et al, 1999, BeruBe K.A et al, 1996a) .Η εισπνοή ινών αμιάντου, μπορεί να προκαλέσει στον πνεύμονα, διάχυτη ίνωση, υπεζοκωτικές βλάβες και νεοπλασίες όπως κακόηθες μεσοθηλίωμα και βρογχογενή καρκίνο.

Ο τεράστιος αριθμός μελετών που εστιάζουν στα κλινικά σύνδρομα και στους παθογενετικούς μηχανισμούς της βλάβης από τον αμίαντο, είναι ενδεικτικός του μεγέθους του προβλήματος.

Ο αμίαντος είναι πλέον τεκμηριωμένο ότι αποτελεί παράγοντα τοξικό όχι μόνο σε επίπεδο ιστών αλλά και σε επίπεδο DNA, αφού έχει δειχθεί ότι προκαλεί βλάβες στο DNA των εκτεθέντων κυττάρων, με αποτέλεσμα σημαντικές μεταβολές στην μεταγραφή γονιδίων και την έκφραση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και θανάτου και στην φλεγμονή (Mossman B.T et al, 1990, Mossman B.T et al , 1996, Rom W.N ,1991, Mossman B.T et al ,1998).



Οι βλάβες του πνεύμονα από τον αμίαντο έχουν συσχετισθεί με τις φυσικές-χημικές ιδιότητες του ορυκτού, (Mossman B.T et al 1990, Mossman B.T et al , 1996, Kamp D.W et al 1992, Rom W.N .,1991, Mossman B.T et al 1998).

με το μέγεθος της έκθεσης (Mossman B.T et al ,1998), με την πρόσληψη των ινών από τα επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών (Churg A. 1996) με την δημιουργία ελευθέρων ριζών (Kamp D.W et al. 1992, Rom W.N 1991, Mossman B.T et al ,1990 Mossman B.T et al 1996, Kamp D.W, et al 1997, Landrigan P.J, 1998, Cordier S, et al. 1987, Nicholson W.J, 1982).

με τις βλάβες του DNA, (Jaurand M-C. et al 1997, Lechner J.F, et al 1998) με κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες (Rom W.N, et al 1991, Mossman B.T et al 1998, Jaurand M-C. ,1997) και με το κάπνισμα (Mossman B.T et al 1998 Rom W.N, 1991).

Προφανώς η ανάπτυξη τέτοιων βλαβών είναι πολυπαραγοντική φαίνεται όμως ότι ορισμένες παράμετροι έχουν ιδιαίτερη βαρύτητα.

Στην βιβλιογραφία υπάρχουν πολύ σημαντικά στοιχεία για την συμμετοχή των ελευθέρων ριζών στην βλάβη του πνεύμονα από τον αμίαντο (Robledo R., et al 1999, Upadhyay D et al. 2003, Kamp D.W et al 1992, Mossman B.T 1996a, Hardy J.A, et al 1995, Halliwell B,1998 σελ 464, 700).

Ελεύθερη ρίζα νοείται κάθε χημικό στοιχείο ή ένωση που μπορεί να υπάρξει ως αυτόνομη οντότητα και περιλαμβάνει στην δομή του ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια (Halliwell B, 1998, σελ 23). Αποτελεί συνεπώς απαραίτητο στοιχείο στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις.

Η τοξικότητα των ελευθέρων ριζών έγκειται κυρίως στην εμπλοκή τους στην αναστολή της λειτουργίας πλείστων ενζύμων (Halliwell B. 1998 σελ. 22).

Πέραν των ελευθέρων ριζών ($H\cdot$, $OH\cdot$, $O_2\cdot$, $NO\cdot$, $NO_2\cdot$), και άλλα παράγωγα του Οξυγόνου και του Αζώτου εμφανίζονται εξ ίσου τοξικά, όπως το υπεροξείδιο του Υδρογόνου (H_2O_2) και ο Υπεροξνιτρίτης (NO_3^-)(Halliwell B, 1998 σελ. 37,73), αποκαλούμενα αδιακρίτως ενεργά παράγωγα οξυγόνου / ROS (Reactive Oxygen Species) ή αζώτου / RNS (Reactive Nitrogen Species).



Ο αμιάντος προκαλεί την παραγωγή ROS και RNS με δύο τρόπους. Έναν άμεσο που οφείλεται στον σίδηρο που περιέχει και έναν έμμεσο μέσω των μακροφάγων του κυψελιδικού χώρου και του πνευμονικού παρεγχύματος, που προσπαθούν να τον φαγοκυτταρώσουν.

Η χημική σύνθεση του αμιάντου περιλαμβάνει δισθενή σίδηρο (Fe^{2+}) είτε ως σταθερό συστατικό του είτε προσροφημένο στην επιφάνειά του, καθιστώντας τον έτσι ικανό για την δημιουργία ελευθέρων ριζών ακόμα και σε ακύτταρα συστήματα. (Hardy J.A, et al 1995, Lund L.G, et al 1990, Halliwell B, 1998, σελ. 464). Ο σίδηρος στην επιφάνεια του αμιάντου ευοδώνει τη δημιουργία δραστικών μορίων υδροξυλίου ($OH\cdot$) δια της οξείδωσης του δισθενούς σιδήρου σε τρισθενή (Fe^{3+}), σύμφωνα με την αντίδραση Fenton (Halliwell B, 1998, σελ 49,133, Kamp D.W et al, 1999).

Σίδηρος όμως κινητοποιείται και από το κυτταρόπλασμα των ΜΦ όπου αποθηκεύεται αφού αποδεσμευθεί από τις κατεστραμμένες ίνες αμιάντου και μεταφερθεί στο εσωτερικό του κυττάρου, ενωμένος με τρανσφερίνη ή φεριτίνη που είναι πρωτεΐνες μεταφοράς σιδήρου (Mateos F et al, 1998). Σίδηρος ελεύθερος στον εξωκυττάριο χώρο προέρχεται από ΜΦ κατεστραμμένα στο πλαίσιο της φλεγμονής, που προκαλείται από την είσοδο των ινών αμιάντου στον πνεύμονα. Μηχανική καταστροφή αφ' ενός, αφού ΜΦ κατακερματίζονται από τις ίνες, αλλά και χημική μέσω ROS/RNS ως προϊόντα της φλεγμονώδους αντίδρασης και ενεργοποίησης των κυττάρων στην παρουσία των ινών.

Ελεύθερες ρίζες και δραστικά παράγωγα Οξυγόνου και Αζώτου παράγονται συνεχώς στα κύτταρα μέσα στα πλαίσια των φυσιολογικών τους λειτουργιών. Η περίσσεια των ενώσεων αυτών, είναι τοξική όχι μόνο για μικρόβια ή μόρια που πρέπει να αδρανοποιηθούν μέσω αυτών, αλλά και για τα ίδια τα κύτταρα. Η αδρανοποίηση των τοξικών αυτών ενώσεων, επιτυγχάνεται μέσω αντιοξειδωτικών προστατευτικών μηχανισμών των κυττάρων (Burke B, Lewis E.C. 2002).

Τα μακροφάγα είναι τα κατ' εξοχήν κύτταρα της "κάθαρσης". Παράγουν μεγάλο αριθμό ενζύμων και δραστικών παραγόντων για την αντιμετώπιση εξωγενών ή ενδογενών μορίων που αντιπροσωπεύουν κάποιον κίνδυνο για τον ιστό.

Εισπνεόμενες ίνες αμιάντου ενεργοποιούν μηχανισμούς αντιμετώπισης τους στα ΜΦ. Τα ΜΦ φαγοκυτταρώνουν τις ίνες, όταν αυτό είναι εφικτό, ή κατακερματίζονται από αυτές. Και στις δύο περιπτώσεις παράγουν ένζυμα, κυτταροκίνες, αυξητικούς



παράγοντες και ROS/RNS. Όμως η φαγοκυττάρωση των ινών από τα ΜΦ και η συνεπαγόμενη ενεργοποίησή τους, δεν είναι η μόνη πηγή ROS. Οι ίδιες οι ίνες φέρουν σίδηρο στην επιφάνειά τους και αυτό τις καθιστά ικανές να ενεργοποιήσουν την παραγωγή τέτοιων ενώσεων (Kamp D.W. et al, 1999, Mateos F et al, 1998, Halliwell B, 1998).

Ακόμα σίδηρος που προέρχεται από κατεστραμμένες ίνες μεταφέρεται με ειδικές μεταφορικές πρωτεΐνες, κυρίως φερριτίνη και τρανσφερίνη, στα ΜΦ όπου αποθηκεύεται (Corhay J.L, et al 1992). Η πρόσληψη του δεσμευμένου με τρανσφερίνη σιδήρου, γίνεται μέσω υποδοχέως (CD71), στην επιφάνεια του ΜΦ. Το σύμπλεγμα ενδοκυττώνεται, η τρανσφερίνη απελευθερώνεται και επαναχρησιμοποιείται (Mateos F et al 1998, Dautry-Varsat A, 1986).

Η έκφραση των υποδοχέων της τρανσφερίνης ποικίλει στις διάφορες παθήσεις του διαμέσου ιστού (Haslam P.L et al, 1990, Pérez Arellano J.L et al,1993, Andreesen R et al, 1984).

Τα ΜΦ ατόμων με έκθεση σε αμίαντο περιέχουν μεγαλύτερα ποσά αποθηκευμένου σιδήρου, που είναι κυρίως ενωμένος με φερριτίνη ή "ελεύθερος" αλλά περιχαρακωμένος στον μιτοχονδριακό και λυσοσωματικό χώρο και άρα αδρανής σχετικώς, στον ενδοκυττάριο χώρο (Mateos F et al, 1998, Quan S.G et al ,1981, Costabel U et al, 1984). Ο "ελεύθερος" σίδηρος καθίσταται ιδιαίτερος επικίνδυνος εφ' όσον το κύτταρο καταστραφεί και απελευθερωθεί στον εξωκυττάριο χώρο. Τότε μέσω κυρίως παραγωγής δραστικών παραγώγων Οξυγόνου και Αζώτου, προκαλεί σημαντικές ιστικές βλάβες, με σημαντικότερη επίπτωση εκείνη επί του DNA των κυττάρων του ιστού, τα οποία επί συνεχούς παρουσίας των ινών (δεν αποκαθαίρονται ποτέ τελείως) αντιμετωπίζει σημαντικό κίνδυνο μετάλλαξης και ενδεχομένως ανάπτυξης νεοπλασίας (Halliwell B, 1998, Kamp D.W. et al, 1999, Mateos F et al, 1998, Upadhyay D et al, 2003, Robledo R et al, 1999).

Στην παρούσα μελέτη των ΜΦ του υλικού μας από άτομα με μη επαγγελματική έκθεση σε αμίαντο, σημειώνουμε κάποιες διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων των εκτεθέντων. Την ομάδα με υπεζωκοτικές πλάκες και αυξημένη παρουσία λεμφοκυττάρων στο BAL και την ομάδα χωρίς πλάκες και λεμφοκύτταρα.



Η μελέτη επικεντρώνεται στην καταγραφή πρωτεϊνικών μορίων που εκφράζονται στην επιφάνεια των ΜΦ και σχετίζονται με φλεγμονώδεις αντιδράσεις και γενικότερα ενεργοποίηση των κυττάρων.

Η ομάδα ασθενών με Σαρκοείδωση χρησιμοποιήθηκε ως ομάδα σύγκρισης καθώς η σαρκοείδωση αποτελεί συστηματική νόσο με ενεργοποιημένους τους μηχανισμούς φλεγμονώδους αντίδρασης και λεμφοκυτταρική κυψελιδίτιδα.

Σύγκριση με φυσιολογικά άτομα δεν έγινε διότι δεν υπήρχε επαρκής αριθμός δειγμάτων ώστε να μπορεί να δώσει στατιστικώς αξιόπιστα αποτελέσματα.

Φαίνεται ότι στους Μετσοβίτες γενικώς, υπάρχει μία αυξητική τάση δεικτών των ΜΦ που εκφράζουν μάλλον κύτταρα σε κατάσταση ετοιμότητας. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με τα ευρήματα της ανάλυσης των πρωτεϊνών του BAL Μετσοβιτών, από μέλος της ερευνητικής μας ομάδας, (Δ.Α. διδ.δια. 2007), όπου εκφράζονται πιο έντονα πρωτεΐνες ενδεικτικές χρόνιας φλεγμονής, σε σχέση με φυσιολογικούς μάρτυρες.

Πιο συγκεκριμένα, οι δείκτες που παρουσίασαν διακύμανση μεταξύ των ομάδων περιλαμβάνουν τα εξής μόρια : CD14, CD11c, CD71, HLA-DR (MHC class II), CD54 και CD25.

Όλα αυτά τα μόρια εμπλέκονται στους μηχανισμούς ενεργοποίησης των κυττάρων που συμμετέχουν στην άμυνα του πνεύμονα.

Ορισμένοι από τους δείκτες αυτούς εμφανίζονται αυξημένοι, αν και όχι πάντα με στατιστικώς σημαντική διαφορά, στην ομάδα των Μετσοβιτών χωρίς αποτιτανώσεις.

Παρατηρούμε ότι σε γενικές γραμμές η αντίδραση των Μετσοβιτών στον αμίαντο ακολουθεί το γενικό πρότυπο της φλεγμονώδους αντίδρασης που παρατηρείται και στην σαρκοείδωση με παρόμοια διακύμανση στην έκφραση του υποδοχέα της Ιντερλευκίνης 2 (IL-2R/CD25), του CD71 και του CD54.

Η έκφραση του CD25 σε παρόμοια ποσοστά σε όλες τις ομάδες υποδηλώνει ενεργοποίηση των ΜΦ από την IL-2, η οποία είναι γνωστό ότι αποτελεί κυτταροκίνη ενδεικτική ενεργοποίησης και συγκεκριμένα ευοδώνει την δραστηριότητα του παράγοντα ενεργοποίησης των Μακροφάγων (MAF/Macrophage-activating factor). Πολλές δραστηριότητες των ΜΦ όπως η καταστροφή ενδοκυττάρων παρασίτων και η καταστροφή καρκινικών κυττάρων σχετίζονται με αυτού του είδους την ενεργοποίηση,



που κατά κύριο λόγο στηρίζεται στην παραγωγή ROS. (Burke B, Lewis E.C. 2002, σελ.19).

Με τον ίδιο τρόπο κινείται και η έκφραση του CD71. Το μόριο αυτό αποτελεί τον υποδοχέα της Τρανσφερίνης. Η τρανσφερίνη είναι πρωτεΐνη που δεσμεύει και μεταφέρει σίδηρο στα κύτταρα που τον χρησιμοποιούν ή τον φαγοκυτταρώνουν (Fe). Ο δισθενής σίδηρος συμμετέχει ενεργά στον σχηματισμό ROS/RNS συνεπώς η αυξημένη έκφραση του υποδοχέα της πρωτεΐνης μεταφοράς του, είναι ενδεικτική ενεργοποίησης τέτοιων μηχανισμών.

Και τα δύο αυτά μόρια είναι ενδεικτικά ενεργοποίησης των ΜΦ, τα οποία στη περίπτωση των Μετσοβιτών φαίνεται να συντηρούν την κατάσταση αυτή της εγρήγορσης ακόμα και δεκαετίες μετά την διακοπή της έκθεσης στον αιτιολογικό παράγοντα της φλεγμονής

Το CD54 κινείται λίγο διαφορετικά. Δεν εμφανίζει μεν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων, όμως παρατηρείται μειωμένη έκφρασή του στην ομάδα χωρίς αποτιτανώσεις (PC-), σε σχέση με τις δύο άλλες ομάδες (κυρίως με PC+ και λιγότερο με την σαρκοείδωση). Το CD54 είναι μόριο προσκόλλησης, ICAM-1 (intracellular adhesion molecule), του οποίου η έκφραση αυξάνεται σε φλεγμαίνοντες ιστούς υπό την επίδραση φλεγμονωδών παραγόντων όπως LPS, IL-1, IFN- γ, TNF και διευκολύνει την προσκόλληση μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων μέσω του μορίου LFA-1 της επιφανείας τους και την συρροή τους στην περιοχή της φλεγμονής ((Burke B, Lewis E.C. 2002 ,σελ.24) . Ενδεχομένως η μειωμένη έκφρασή του στα ΜΦ της ομάδας των PC-, να σχετίζεται με την απουσία λεμφοκυτταρικής κυψελιδίτιδας στα άτομα αυτά.

Παρατηρείται όμως και ένας ιδιαίτερος τρόπος αντίδρασης των ΜΦ της ομάδας χωρίς αποτιτανώσεις.

Αυξημένη έκφραση των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας τάξεως II (MHC class II/HLA-DR), αυξημένη έκφραση μιάς ιντεγκρίνης-α (CD11c) και αυξημένη έκφραση του μορίου CD14 (υποδοχέας της LPS).

Η βασική λειτουργία των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας τάξεως I και II συνίσταται στην σύνδεσή τους με πρωτεϊνικά κομμάτια προερχόμενα από παθογόνους μικροοργανισμούς και έκφραση του σχηματιζόμενου συμπλέγματος στην επιφάνεια του κυττάρου ώστε να αναγνωριστεί από ομόλογα T λεμφοκύτταρα (Janeway σελ183).



Τα **HLA-DR** αντιγόνα αποτελούν δείκτη ενεργοποίησης των ανοσοδραστικών κυττάρων και εκφράζονται σταθερά στα μονοκύτταρα και μακροφάγα (Burke B, Lewis E.C. 2002 σελ.25). Αυξημένη έκφραση των αντιγόνων αυτών είναι ενδεικτική ιδιαίτερης δραστηριότητας των κυττάρων και επάγεται από κυτταροκίνες όπως οι ιντερφερόνες (Janeway 2005, σελ.121). Ενδεχομένως η αυξημένη έκφραση των μορίων αυτών στην ομάδα χωρίς αποτιτανώσεις και κυψελιδίτιδα σημαίνει διαφορετικού τύπου ενεργοποίηση από εκείνη της χρόνιας φλεγμονής που παρατηρείται στους Μετσοβίτες με αποτιτανώσεις.

Τα **CD11c** μόρια κατατάσσονται στα μόρια προσκόλησης και ανήκουν στις α-ιντεγκρίνες. Αποτελούν τον υποδοχέα CR4 για παράγοντες του συμπληρώματος, πιθανότατα το μόριο C3bi. Οι υποδοχείς του συμπληρώματος στην επιφάνεια των ΜΦ είναι επιφορτισμένοι με την δέσμευση και ενδοκύττωση οψωνοποιημένων σωματιδίων (Burke B, Lewis E.C. 2002 ,σελ.19). Κατάληψη των υποδοχέων αυτών σηματοδοτεί ενεργοποίηση των συστημάτων ενδοκυττάριας πέψης άρα και την δημιουργία δραστικών παραγώγων οξυγόνου και ελευθέρων ριζών. Η αυξημένη έκφραση των υποδοχέων αυτών στην επιφάνεια των PC- ΜΦ πιθανότατα υποδεικνύει μία κατάσταση αυξημένης ενεργοποίησης στον χώρο αυτό.

Το **CD14** μόριο είναι το πλέον χαρακτηριστικό αντιγόνο της επιφάνειας των μονοκυττάρων/μακροφάγων. Αποτελεί τον υποδοχέα της ενδοτοξίνης (LPS/lipopolysaccharide) (Burke B, Lewis E.C. 2002).

Κατάληψη του υποδοχέα με αντι-CD14 αντισώματα προκαλεί οξειδωτικό στρες στο κύτταρο. Γεγονός που εξηγεί την δράση του μορίου αυτού.

Το γονίδιο του εδράζεται στο χρωμόσωμα 5 στην περιοχή όπου εντοπίζεται ένα σύνολο γονιδίων που κωδικοποιούν αυξητικούς παράγοντες και τους υποδοχείς τους (GM-CSF, IL-3, IL-5, ECGSF, CSF-1, CSF-1R, PDGFR).

Φαίνεται επίσης ότι το CD14 αποτελεί τον υποδοχέα που αναγνωρίζει, δεσμεύει και ενδοκυττώνει κύτταρα που έχουν εισέλθει σε διαδικασία απόπτωσης, ελέγχοντας έτσι την αποδόμηση τους χωρίς πρόκληση φλεγμονής (Burke B, Lewis E.C. 2002, Gregory 2000) .

Είναι φανερό ότι η ομάδα αυτών των μορίων HLA-DR, CD11c CD14 που εκφράζονται εντονότερα στα κυψελιδικά ΜΦ των ατόμων χωρίς αποτιτανώσεις, είναι μόρια που



συμμετέχουν ενεργά σε μηχανισμούς ενδοκύττωσης και ενδοκυττάριας αποδόμησης βλαπτικών ουσιών. Ο πρωταρχικός τους ρόλος έγκειται στην αντιμετώπιση παθογόνων μικροοργανισμών. Την αναγνώριση, την δέσμευση, την ενδοκύττωση, την αποδομή. Έτσι οι πρωτεΐνες αυτές είναι επιφορτισμένες με την ενεργοποίηση των μηχανισμών που διέπουν τις λειτουργίες αυτές.

Τους ίδιους μη ειδικούς μηχανισμούς χρησιμοποιούν τα ΜΦ και για να αντιμετωπίσουν τις ίνες αμιάντου. Όμως οι ίνες αμιάντου παρουσιάζουν ένα τεράστιο πρόβλημα. Δεν αποδομούνται καθόλου εύκολα. Οι δε μακρές και λεπτές ίνες των αμιφύλων, είναι συχνά αδύνατον ακόμα και να φαγοκυτταρωθούν. Αντ' αυτού κατακερματίζουν τα ΜΦ που το επιχειρούν. Τα ΜΦ που έχουν ήδη ενεργοποιηθεί και είναι εξοπλισμένα με λυσοσωματικά ένζυμα και ενεργοποιημένα τα συστήματα παραγωγής ROS/RNS καταστρέφονται και ελευθερώνουν το τοξικό περιεχόμενό τους στον διάμεσο ιστό. Η επακόλουθη ιστική βλάβη, ενεργοποιεί μηχανισμούς φλεγμονής σε μεγαλύτερη ένταση και έκταση.

Η παρουσία σιδήρου στη επιφάνεια των ινών αμιάντου αυξάνει σε υπερθετικό βαθμό την παραγωγή ROS / RNS. Η δράση των ενώσεων αυτών είναι άμεσα κυτταροτοξική.

Ακόμα πιο επικίνδυνη η δράση των ενώσεων αυτών στο DNA, όπου προκαλεί βλάβες που οδηγούν σε καρκινογένεση.

Κύτταρα όπως τα PC- ΜΦ που εκφράζουν σε μεγαλύτερη πυκνότητα στην επιφάνειά τους πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε τέτοιες διαδικασίες, είναι πολύ πιθανόν να αυξάνουν τις πιθανότητες για μεταλλάξεις, των κυττάρων του χώρου τους, σε σχέση με τα PC+ ΜΦ. Και αυτό συμφωνεί με την παρατήρηση ότι στην ομάδα αυτή εντοπίζονται τα περισσότερα μεσοθηλιώματα. Ακόμα, ενισχυτικό στοιχείο της υπόθεσης της "ομάδας υψηλού κινδύνου αποτελούν τα ευρήματα από την ανάλυση των πρωτεϊνών του εκπλύματος όπου στην ομάδα αυτήν εκφράζονται έντονα πρωτεΐνες που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο και πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση και την καρκινογένεση.

Φαίνεται η υπόθεση της διαφορετικής αντίδρασης του πνεύμονα στην παρουσία ινών αμιάντου ενισχύεται ακόμα περισσότερο με τα ευρήματα της παρούσας μελέτης.

Ακόμα φαίνεται ότι ο τρόπος ενεργοποίησης των ατόμων χωρίς αποτιτανώσεις είναι ίσως πιο δυναμικός, ενέχει όμως κινδύνους που εκφράζονται με τον αυξημένο επιπολασμό κακοηθείας στην ομάδα αυτή.



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ



5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην περιοχή του Μετσόβου διενεργήθηκε και βρίσκεται σε εξέλιξη, μια μεγάλη μελέτη σε άτομα που εκτέθηκαν και εισέπνευσαν μια μόνο ποικιλία ινών αμιάντου τον τρεμολίτη.

Σε μεγάλο αριθμό κατοίκων τεσσάρων χωριών της περιοχής Μετσόβου (Μέτσοβο, Ανήλιο, Μηλιά, Βοτονόσι), βρέθηκε ότι η έκθεση σε αμιαντούχο υλικό ασπρίσματος έχει προκαλέσει υπεζωκοτικές αποτιτανώσεις και κακοήγη μεσοθηλιώματα.

Η παρατήρηση ότι υπάρχουν δύο ομάδες Μετσοβιτών που αντιδρούν διαφορετικά στην μη επαγγελματική έκθεση σε αμιάντο:

- ❖ ομάδα 1 : με αποτιτανώσεις, λεμφοκυτταρική κυψελιδίτιδα, σχετική

“προστασία“ έναντι νεοπλασίας και

- ❖ ομάδα 2 : χωρίς αποτιτανώσεις / κυψελιδίτιδα, αλλά αυξημένη επίπτωση

μεσοθηλιώματος

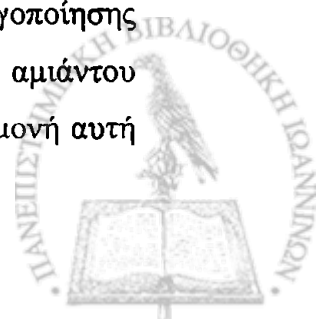
μας οδήγησε να μελετήσουμε τον ρόλο των κυψελιδικών μακροφάγων, αναλύοντας δείκτες κυτταρικής επιφανείας ενδεικτικούς ενεργοποίησης των κυττάρων αυτών.

Συγκρίναμε:

i) Μετσοβίτες με “θετική“ ομάδα ελέγχου (ασθενείς με σαρκοείδωση) και

ii) Μετσοβίτες της ομάδας 1 (PC+) με Μετσοβίτες της ομάδας 2 (PC-).

i) Οι Μετσοβίτες ως σύνολο εμφανίζουν παρόμοια κατανομή δεικτών ενεργοποίησης των μακροφάγων με τους ασθενείς με σαρκοείδωση. Φαίνεται ότι, οι ίνες αμιάντου κρατούν τον πνεύμονα σε κατάσταση συνεχούς φλεγμονής, αν και η φλεγμονή αυτή δεν εκφράζεται κλινικά όπως η σαρκοείδωση.



ii) Η σύγκριση μεταξύ των δύο ομάδων των Μετσοβιτών (PC+, PC-) έδειξε αυξημένη έκφραση αντιγόνων ιστοσυμβατότητας τάξεως II, αυξημένη έκφραση μίας ιντεγκρίνης α και αυξημένη έκφραση του υποδοχέα της ενδοτοξίνης στην ομάδα χωρίς αποτιτανώσεις. Όλα αυτά τα μόρια συμμετέχουν και συνεργάζονται σε μηχανισμούς ενδοκύττωσης και ενδοκυττάριας αποδόμησης βλαπτικών ουσιών. Δηλαδή σε μη ειδικούς μηχανισμούς που χρησιμοποιούν τα ΜΦ και για να αντιμετωπίσουν τις ίνες αμιάντου. Όμως οι ίνες αμιάντου δεν αποδομούνται καθόλου εύκολα. Άντ' αυτού κατακερματίζουν τα ΜΦ που το επιχειρούν. Τα ΜΦ που έχουν ήδη ενεργοποιηθεί και είναι εξοπλισμένα με λυσοσωματικά ένζυμα και ενεργοποιημένα τα συστήματα παραγωγής ROS / RNS καταστρέφονται και ελευθερώνουν το τοξικό περιεχόμενό τους στον διάμεσο ιστό. Η επακόλουθη ιστική βλάβη, ενεργοποιεί μηχανισμούς φλεγμονής σε μεγαλύτερη ένταση και έκταση. Η παρουσία σιδήρου στη επιφάνεια των ινών αμιάντου αυξάνει σε υπερθετικό βαθμό την παραγωγή ROS / RNS. Η δράση των ενώσεων αυτών είναι άμεσα κυτταροτοξική. Ακόμα πιο επικίνδυνη η δράση των ενώσεων αυτών στο DNA, όπου προκαλεί βλάβες που οδηγούν σε καρκινογένεση.

Κύτταρα όπως τα κυψελιδικά μακροφάγα της ομάδας PC-, που εκφράζουν εντονότερα στην επιφάνειά τους αυτά τα μόρια, πιθανόν μέσω τέτοιων μηχανισμών ιστικής βλάβης, να αυξάνουν τις πιθανότητες μετάλλαξης κυττάρων του χώρου τους συγκριτικά με τα μακροφάγα της ομάδας PC+. Αυτό συμφωνεί και με το γεγονός ότι στην ομάδα PC- εντοπίζονται τα περισσότερα μεσοθηλιώματα.



6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΤΗΣ

Κάρμεν Μαντά-Σταχούλη

Σε μελέτη της Πανεπιστημιακής Πνευμονολογικής Κλινικής Ιωαννίνων ,το 1985 ανεδείχθη ότι η ενδημική εμφάνιση αποτιτανώσεων υπεζωκότα σε Μετσοβίτες ,συνοδευόταν από υψηλή επίπτωση κακοήθους μεσοθηλιώματος (MPM)-300 φορές υψηλότερη συχνότερο απ' ότι στον γενικό πληθυσμό.

Περαιτέρω μελέτες ανέδειξαν ότι τόσο οι αποτιτανώσεις υπεζωκότα όσο και το υψηλό ποσοστό εμφάνισης κακοήθους μεσοθηλιώματος οφείλονταν σε έκθεση σε αμιάντο τύπου τρεμολίτη που υπήρχε σε ένα υλικό λεγόμενο « λούτο» που χρησιμοποιούσαν οι κάτοικοι του Μετσόβου για το άσπρισμα των σπιτιών.

Επιπλέον τα περισσότερα μεσοθηλιώματα εμφανίστηκαν σε Μετσοβίτες χωρίς αποτιτανώσεις υπεζωκότα στην Α/Α θώρακος. Η μελέτη που ακολούθησε, με ανάλυση του βρογχοκυψελιδικού εκκλύματος (BAL) στους Μετσοβίτες , απέδειξε την ύπαρξη μιας λεμφοκυτταρικής κυψελιδίτιδας μόνο στην ομάδα με αποτιτανώσεις (PC+).

Η παρούσα εργασία, επικεντρώθηκε στη ανάλυση των κυψελιδικών μακροφάγων (ΜΦ) στην προσέλκυση των λεμφοκυττάρων και η επακόλουθη κυψελιδίτιδα , πιθανόν υπεύθυνη για την « προστασία έναντι κακοήθειας » που παρατηρήθηκε στους Μετσοβίτες με αποτιτανώσεις υπεζωκότα. Μελετήθηκαν Μετσοβίτες με και χωρίς αποτιτανώσεις (PC+ και PC-) για την εκτίμηση των διαφορών των κυψελιδικών ΜΦ μεταξύ των δυο ομάδων.

Επίσης συγκρίθηκαν οι δυο ομάδες Μετσοβιτών (ως σύνολο) με μια ομάδα ,ασθενών με σαρκοείδωση και λεμφοκυτταρική κυψελιδίτιδα.



Τα αποτελέσματα ήταν τα ακόλουθα:

- 1) Οι Μετσοβίτες ανέδειξαν παρόμοια κατανομή των δεικτών ενεργοποίησης των κυψελιδικών ΜΦ με τους ασθενείς που έπασχαν από σαρκοείδωση . Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν την ύπαρξη μιας χρόνιας φλεγμονής, που σε αντίθεση με την σαρκοείδωση δεν είχε κλινική επίπτωση.
- 2) Η σύγκριση μεταξύ των δυο ομάδων των Μετσοβιτών (PC+ ,PC-) έδειξαν αυξημένη έκφραση των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας MHC class II, μιας ιντεγκρίνης α (CD11c) και του υποδοχέα ενδοτοξίνης(CD14) στην επιφάνεια των κυψελιδικών μακροφάγων στην ομάδα PC(-). Όλα τα αναφερθέντα μόρια συμμετέχουν στην ενδοκύττωση ,καταστροφή και αδρανοποίηση τοξικών ουσιών. Αυτούς τους μηχανισμούς, χρησιμοποιούν τα ΜΦ στην έκθεση τους σε ίνες αμιάντου. Οι ίνες αμιάντου είναι πολύ ανθεκτικές στην δράση των λυτικών ενζύμων των ΜΦ και πολύ συχνά προκαλούν την καταστροφή των ενεργοποιημένων αυτών ΜΦ και την απελευθέρωση ενζύμων και ROS/RNS στον εξωκυττάριο χώρο με συνέπεια την ιστική βλάβη και ενεργοποίηση των μηχανισμών φλεγμονής. Η παρουσία σιδήρου στην επιφάνεια των ινών αυξάνει την παραγωγή ROS/RNS προκαλώντας περαιτέρω ιστική βλάβη.

Επιπλέον αυτά τα μόρια είναι ικανά να προκαλέσουν βλάβη του DNA και καρκινογένεση . Είναι πιθανόν η αυξημένη έκφραση αυτών των μορίων στα ΑΜΦ των Μετσοβιτών με PC(-) να συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο για μεταλλάξεις στους γύρο ιστούς σε σύγκριση με την ομάδα PC(+) γεγονός που είναι σύμφωνο με την αυξημένη επίπτωση κακοήθους μεσοθηλιώματος στην ομάδα χωρίς αποτιτανώσεις και κυψελιδίτιδα PC(-) .



7. SUMMARY

DOCTORATE THESIS BY

Carmen Manda-Stachouli

More than 20 years ago the Pulmonary Department of University of Ioannina, showed that the endemic pleural calcifications (PCs) seen in Metsovites were accompanied by a very high prevalence of malignant pleural mesothelioma (MPM) (300 times higher than expected).

Further studies revealed that both are the results of exposure to a tremolite asbestos-containing material (“luto”) used for interior whitewashing.

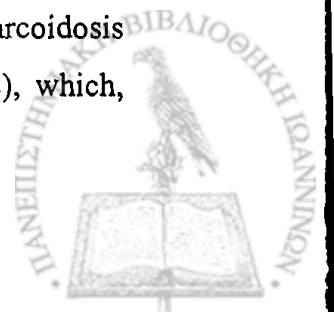
Interestingly, most mesotheliomas occurred in Metsovites without PCs in their chest X-ray. This prompted further study with the use of bronchoalveolar lavage (BAL) to evaluate the local (pulmonary) immune reaction to the asbestos fiber in these two groups; Metsovites with and without calcifications (PC+ and PC-). BAL disclosed lymphocytic alveolitis only in the PC+ group.

This prompted a further step, which is analyzed in the present study, namely the role of alveolar macrophages (AMΦ) in the attraction of lymphocytes and the subsequent alveolitis possibly responsible for the “protection against neoplasia” seen in Metsovites with calcifications.

We examined Metsovites with and Metsovites without calcifications (PC+ and PC-) in order to evaluate differences in the number and function of AMΦ between the two groups.

Also we compared the two groups of Metsovites (as a whole) with a “positive” control group; patients with sarcoidosis and lymphocytic alveolitis. Our results showed that:

- i) Metsovites showed similar distribution of AMΦ activation markers with sarcoidosis patients. This speaks for an account, ongoing inflammation (alveolitis), which, unlike sarcoidosis, has no clinical sequel.



ii) The comparison between the two groups of Mesotheliomas (PC+, PC-), revealed increased expression of MHC class II antigens, an integrin (CD11c) and the endotoxin receptor (CD14) on the surface of the alveolar macrophages from the PC- group. All the above mentioned molecules are involved in endocytosis, degradation and detoxification processes; and these are the common processes AMΦs are using to deal with asbestos fibers. Asbestos fibers are extremely resistant to the action of AMΦ-lytic enzymes and very often cause the cell's destruction and liberation of the cell content, rich in enzymes and ROS/RNS, in the extracellular space. The consequence is tissue damage and activation of inflammatory mechanisms. The presence of Fe on the fibers surface amplifies ROS/RNS production causing further tissue damage. Moreover these molecules are able to cause DNA damage and carcinogenesis.

It is possible that the increased expression of these molecules on the AMΦs of the PC-group, are indicative of increased risk of mutations in the surrounding tissue, compared with the PC+ group. This is in agreement with the increased incidence of mesothelioma in the PC- group.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Andreesen R, Osterholz J, Bodemann H, et al. Expression of transferrin receptors and intracellular ferritin during terminal differentiation of human monocytes. *Blut* 1984, 49,195–202.

Αρχιμανδρίτη Δ. Βιοχημική μελέτη προϊόντων κυττάρων του πνεύμονα σε άτομα με μη επαγγελματική έκθεση σε αμίαντο.(2007). Παθολογικός τομέας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Becklake M.R., Asbestos-related diseases of the lung and other organs: Their epidemiology and implications for clinical practice. State of art., *Am.Re.Resp.Dis.*, 1976, 114,187.

Bienenstock J, Johnston N, Perey DY. Bronchial lymphoid tissue. I. Morphologic characteristics.*Lab Invest.* 1973,28(6),686-92.

Berube K.A, Quinlan T.R, Moulton G, Hemenway D, O'Shaughnessy P, Vacek P, Mossman BT. Comparative proliferative and his-topathologic changes in rat lungs after inhalation of chrysotile or crocidolite asbestos. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1996a., 137,67–74.

Burke B, Lewis E.C. *The macrophages*.second edition Oxford Medical Press. (2002) pp.19,24,25,28.

Dautry-Varsat A. Receptor-mediated endocytosis: the intracellular journey of transferrin and its receptor. *Biochimie* 1986,68,375–81.



Dehring D.J, Wismar B.L. Intravascular macrophages in pulmonary capillaries of humans. *Am Rev Respir Dis.* 1989 ,139(4),1027-9.

Dethloff L.A, Lehnert B.E. Pulmonary interstitial macrophages: isolation and flow cytometric comparisons with alveolar macrophages and blood monocytes. *J Leukoc Biol.* 1988 ,43(1),80-90.

Dinareello CA, Mier J.W. Lymphokines. *N Engl J Med.* 1987,317(15),940-5.

Drysdale B.E, Agarwal S, Shin H.S. Macrophage-mediated tumoricidal activity: mechanisms of activation and cytotoxicity. *Prog Allergy.* 1988,40,111-61.

Dustin M.L, Rothlein R, Bhan A.K, Dinareello C.A, Springer T.A.
Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1).
J Immunol. 1986,137(1),245-54.

Du Bois M, Bowman P.D, Goldstein G.W. Cell proliferation after ischemic injury in gerbil brain. An immunocytochemical and autoradiographic study. *Cell Tissue Res.* 1985,242(1),17-23.

Dumont S, Mabondzo A, Hartmann D, Gilgenkrantz J.L, Kessler R, Poindron P, Bartholeyns J. Study of the dependence of human monocytes and macrophages antitumoral properties upon TNF-alpha expression or release. *Anticancer Res.* 1990,10(4),949-54.

Craighead J.E., Abraham J.L., Churg A., Green F.H., Kleinerman J., Pratt PC., Seemayer T.A., Vallyathan V., Weill H.,. The pathology of asbestos-associated diseases of the lungs and pleural cavities: diagnostic criteria and proposed grading schema. Report of the Pneumoconiosis Committee of the College of American Pathologists and the National Institute for Occupational Safety and Health. *Arch Pathol Lab Med.* 106. 1982 ,11,544-96.



Craighead J.E., Mossman B.T. The pathogenesis of asbestos-associated diseases. *N Engl. J. Med.*, 1982, 306, 1446.

Churg A. The uptake of mineral particles by pulmonary epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996, 154, 1124-40.

Corhay J.L., Weber G, Bury Th, et al. Iron content in human alveolar macrophages. *Eur Respir J.* 1992, 5, 804-9.

Costabel U, Osterholz J, Bodemann H, et al. Transferrin receptors and intracellular ferritin in human alveolar macrophages. *Am Rev Respir Dis* 1984, 129, A290.

Constantopoulos S.H., Dalavanga Y.A., Sakellariou K., Goudevenos J., Kotoulas O.B. Lymphocytic alveolitis and pleural calcifications in non-occupational asbestos exposure. Protection against neoplasia? *AMERICAN REVIEW OF RESPIRATORY DISEASES*, 1992. 146, 1565-1570,

Constantopoulos S.H., Langer A.M., Saratzis N., Nolan R.P.: Regional findings in Metsovo Lung. *LANCET*. 1987, ii: 452-453.

Constantopoulos S.H., Goudevenos J.A., Saratzis N.A., Langer A.E., Selikof I.J., Moutsopoulos H.M. Metsovo Lung: pleural calcifications & restrictive lung function in NW Greece; environmental exposure to mineral fiber as etiology. *Environmental Research*. 1985, 38(2), 319-331.

Constantopoulos S.H., Saratzis N.A., Goudevenos J.A., Kontogiannis D., Karantanis A., Katsiotis P.: Tremolite white-washing and pleural calcifications. *CHEST*, 1987, 92, 709-712.

Cordier S, Lazar P, Brochard P, et al. Epidemiologic investigation of respiratory effects related to environmental exposure to asbestos inside insulated buildings. *Arch Environ Health* 1987, 42, 303-9.



Elias J.A, Schreiber A.D, Gustilo K, Chien P, Rossman M.D, Lammie P.J, Daniele R.P. Differential interleukin 1 elaboration by unfractionated and density fractionated human alveolar macrophages and blood monocytes: relationship to cell maturity. *J Immunol.* 1985,135(5),3198-204.

Flanagan A.M, Lader C.S. Update on the biologic effects of macrophage colony-stimulating factor. *Curr Opin Hematol.* 1998,5(3):,181-5.

Folini G., Foresti E., Lesci I., Lunelli B., Sabatino P and Roveri N., Interaction of Bovine Serum Albumin with Chrysotile: Spectoscopic and Morphological Studies. *Chemistry a European Journal Chem. Eur.*,2006, 12,1968-1974.

Galani V., Constantopoulos S.H., Manda-Stachouli C., Frangou-Lazaridis Mavridis M.A., Vassiliou M., Dalavanga Y.. Additional proteins in bronchoalveolar lavage fluid of Metsovites environmentally exposed to asbestos. More evidence of "protection" against neoplasia. *CHEST* 2002; 121: 273-278.

Gregory C.D. CD14-dependent clearance of apoptotic cells: relevance to the immune system. *Curr Opin Immunol.* 2000,12(1),27-34.

Gonwa T.A, Frost J.P, Karr R.W. All human monocytes have the capability of expressing HLA-DQ and HLA-DP molecules upon stimulation with interferon-gamma. *J Immunol.* 1986,137(2),519-24.

Halliwel B, Gutteridge Free radicals in biology and medicine. Third edition Oxford University Press. (1998). pp 22,23,37,49,73,133,464,700.

Hardy J.A, Aust A.E. Iron in asbestos chemistry and carcinogenicity. *Chem Rev* 1995,95,97-118.

Haslam P.L, Parker D.J, Townsend P.J. Increases in HLA-DQ, DP, DR and transferrin receptors on alveolar macrophages in sarcoidosis and allergic alveolitis compared with fibrosing alveolitis. *Chest* .1990,97,651-61.



Hocking W.G, Golde D.W.The pulmonary-alveolar macrophage (second of two parts).N Engl J Med. 1979,301(12),639-45.

Higuchi M, Higashi N, Taki H, Osawa T.Cytolytic mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages.J Immunol. 1990,144(4),1425-31.

Hirsch A.,Pulmonary immune cells in health and disease:Dentic cells and Langerhan's cells.Eur.Respir.J.1975, 6,1213-1220.

Jänicke F, Pache L, Schmitt M, Ulm K, Thomssen C, Prechtl A, Graeff H.
Both the cytosols and detergent extracts of breast cancer tissues are suited to evaluate the prognostic impact of the urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor, plasminogen activator inhibitor type 1.Cancer Res. 1994,54(10),2527-30.

Janway, Travers, Walport,Shlomchik.Immunobiology, the immune system in health and disease 6th edition 2005 Garland Science Taylor & Francis Group. New York and London.

Jaurand M-C. Mechanisms of fibre-induced genotoxicity. Environ Health Perspect .1997, 105(Suppl 5), 1073-84.

Kamp D.W, Graceffa P,Prior WA,et al. The role of free radicals in asbestos induced diseases. Free Radic Biol Med.1992,12,293-315.

Kamp D.W, Weitzman S.A. The molecular basis of asbestos induced lung injury.Thorax. 1999, 54(7),638-52.

Kaltreider H.B.Alveolar macrophages. Enhancers or suppressors of pulmonary immune reactivity?Chest. 1982,82(3),261-2.



Kelly W.J, Hudson I, Phelan P.D, Pain M.C, Olinsky A. Atopy in subjects with asthma followed to the age of 28 years. *J Allergy Clin Immunol.* 1990,85(3),548-57.

Kern J.A, Lamb R.J, Reed J.C, Elias J.A, Daniele R.P. Interleukin-1-beta gene expression in human monocytes and alveolar macrophages from normal subjects and patients with sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis.* 1988 ,137(5),1180-4.

Klech, H.; Pohl, W. Technical recommendations and guidelines for bronchoalveolar lavage (BAL). *Eur Respir J.* 1989, 2,561-85.

Klostergaard J. Monokine mediated release of intracellular iron in tumor target cells in vitro. *Lymphokine Res.* 1987,6(1),19-28.

Landrigan P.J. Asbestos—still a carcinogen. *N Engl J Med* 1998,338,1618–9.

Langer A.M, R.P.Nolan, Constantopoulos S.H., Moutsopoulos H.M.: Association of Metsovo Lung and pleural mesothelioma with exposure to tremolite-containing whitewash. *LANCET I.* 1987,25, 965-967.

Langer A.M, Nolan R.P, Constantopoulos S.H, Moutsopoulos H.M. Association of Metsovo lung and pleural mesothelioma with exposure to tremolite-containing white wash. *Lancet.* 1987,1,965-7.

Lohmann-Matthes M.L. Interaction of macrophages and cytokines. *Curr Opin Immunol.* 1989,2(1),33-8.

Lechner J.F, Tesfaigzi J, Gerwin B.I. Oncogenes and tumor suppressor genes in mesothelioma—a synopsis. *Environ Health Perspect.* 1998, 105(Suppl 5),1061–7.

Lund L.G, Aust A.E. Iron mobilization from asbestos by chelators and ascorbic acid. *Arch Biochem Biophys.* 1990,278, 60–4.



Malkovský M, Loveland B, North M, Asherson GL, Gao L, Ward P, Fiers W. Recombinant interleukin-2 directly augments the cytotoxicity of human monocytes. *Nature*. 1987,325(6101),262-5.

Mateos F, Brock J.H, Pérez-Arellano J.L. Iron metabolism in the lower respiratory tract. *Thorax*. 1998,53(7),594-600.

Mayer A.M, Pittner R.A, Lipscomb G.E, Spitzer J.A. Effect of in vivo TNF administration on superoxide production and PKC activity of rat alveolar macrophages. *Am J Physiol*. 1993,264(1 Pt 1),L43-52.

Mossman B.T, Bignon J, Corn M, et al. Asbestos: scientific developments and implications for public policy. *Science*. 1990, 247,294-301.

Mossman B.T, Churg A. Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998,157,1666-80.

Mossman B.T, Kamp D.W, Weitzman S.A. Mechanisms of carcinogenesis and clinical features of asbestos-associated cancers. *Cancer Invest*. 1996,14,464-78.

Muller WA, Randolph GJ. Migration of leukocytes across endothelium and beyond: molecules involved in the transmigration and fate of monocytes. *J Leukoc Biol*. 1999,66(5),698-704.

Müller-Quernheim J, Pfeifer S, Männel D, Strausz J, Ferlinz R.

Lung-restricted activation of the alveolar macrophage/monocyte system in pulmonary sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis*. 1992,145(1),187-92.

Nacy C.A, Belosevic M, Crawford R.M, Healy A.T, Schreiber R.D, Meltzer M.S. Lymphokine regulation of macrophage effector activities. *Adv Exp Med Biol*. 1988,239,1-11.

Nathan C.F. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest*. 1987,79(2),319-26.



Nicholson W.J, Perkel G, Selikoff I.J. Occupational exposure to asbestos: population at risk and projected mortality:1980–2030. *Am J Ind Med* 1982,3,259–311.

Nii A, Fidler I.J.The incubation of human blood monocytes with tumor necrosis factor-alpha leads to lysis of tumor necrosis factor-sensitive but not resistant tumor cells.*Lymphokine Res.* 1990,9(2),113-24.

Paul W.E, Ohara J.B-cell stimulatory factor-1/interleukin 4.*Annu Rev Immunol.* 1987,5,429-59.

Pérez Arellano J.L, Losa García J.E, Orfao Matos A, et al. Comparison of two techniques (flow cytometry and alkaline immunophosphatase) in the evaluation of alveolar macrophage immunophenotype. *Diagn Cytopathol* 1993,9,259–65.

Quesnieux, V.F.J. and Groot, P.HGranulocyte-macrophage colony stimulating factor. In Tomson , A.(ed.).*The Cytokine Handbook* , 3rd edn.Academic Press , (1998). San Diego, pp.635-70.

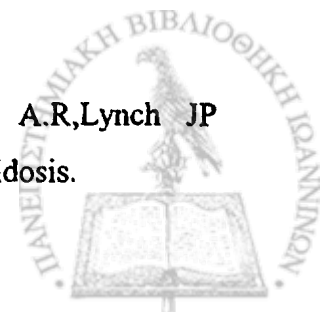
Quinlan T.R, BeruBe K.A, Marsh J.P, Janssen Y.M.W, Taishi P, Leslie K.O, Hemenway D, O'Shaughnessy P.T, Vacek P, Mossman B.T.Patterns of inflammation, cell proliferation, and related geneexpression in lung after inhalation of chrysotile asbestos. *Am JPathol.*1995,147,728–739.

Rom W.N, Travis W.D, Brody A.R. Cellular and molecular basis of asbestos-related diseases. *Am Rev Respir Dis.*1991,143,408–22.

Rothlein R, Dustin M.L, Marlin S.D, Springer T.A.A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1.*J Immunol.* 1986,137(4),1270-4.

Robledo R, Mossman B. Cellular and molecular mechanisms of asbestos-induced fibrosis. *J Cell Physiol.* 1999,180(2),158-66.

Rolfe M.W,Standiford T.J,Kunkel S.L, Burdick M.D, Gilbert A.R,Lynch JP 3rd,Strieter R.M. Interleukin-1 receptor antagonist expression in sarcoidosis.



Am Rev Respir Dis. 1993,148(5),1378-84.

Rich S, Dantzker D.R, Ayres S.M, Bergofsky E.H, Brundage B.H, Detre K.M, Fishman A.P, Goldring R.M, Groves B.M, Koerner S.K, et al. Primary pulmonary hypertension. A national prospective study. Ann Intern Med. 1987,107(2),216-23.

accessory cells. J Immunol. 1985 ,135(4),2237-42.

Sandron D, Reynolds H.Y, Laval A.M, Venet A, Israel-Biet D, Chretien J.

Human alveolar macrophage subpopulations isolated on discontinuous albumin gradients. Cytological data in normals and sarcoid patients. Eur J Respir Dis. 1986,68(3),177-85.

Schaberg T, Rau M, Stephan H, Lode H. Increased number of alveolar macrophages expressing surface molecules of the CD11/CD18 family in sarcoidosis and idiopathic pulmonary fibrosis is related to the production of superoxide anions by these cells. Am Rev Respir Dis. 1993 ,147(6 Pt 1),1507-13.

Schütt C. CD14. Int J Biochem Cell Biol. 1999,31(5),545-9.

Selikoff I.J., Bader R.A., Bader ME., Churg J., Hammond E.C. Asbestosis and neoplasia (1967). Editorial Am.j.

Selikoff I.J., Hammond E.C., Churg J. Asbestos exposure, smoking and neoplasia. JAMA. 1968,,204,106.

Skerrett S.J, Martin T.R. Intratracheal interferon-gamma augments pulmonary defenses in experimental legionellosis. Am J Respir Crit Care Med. 1994,149(1),50-8.

Sibille Y, Reynolds H.Y. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. Am Rev Respir Dis. 1990,141(2),471-501.

Sibille Y, Merrill W.W, Naegel G.P, Care S.B, Cooper J.A, Reynolds H.Y. Human alveolar macrophages release a factor that inhibits phagocyte function. Am J Respir Cell Mol Biol. 1989 ,1(5),407-16.

Sprent J.F, Jones H.I. Toxocariasis. Aust Fam Physician. 1977,6(12):1519-25.



Semenzato G., Cipriani A., Marcer G. in: Romagnani S., Moretta L. Immunologia e immunopatologia. (1989) USES ed scientifica Fi., 580-602.

Strausz J, Müller-Quernheim J.[In vitro models for the analysis of inflammatory processes in sarcoidosis] Pneumologie. 1990 ,44(3),694-8.

Strausz J, Müller-Quernheim J, Stepling H, Nagel M, Ferlinz R.

[Oxygen radical production by alveolar macrophages in sarcoidosis in relation to activity status of bronchoalveolar lavage lymphocytes] Pneumologie. 1990,44 Suppl 1,222-3.

Striz I, Costabel U. The role of integrins in the immune response.

Sarcoidosis. 1992,9(2),88-94.

Striz I, Wang Y.M, Svarcová I, Trnka L, Sorg C, Costabel U.

The phenotype of alveolar macrophages and its correlation with immune cells in bronchoalveolar lavage.Eur Respir J. 1993,6(9),1287-94.

Σαραντζής Ν., Μελέτη των υπεζωκοτικών αποτιτανώσεων της περιοχής του Μετσόβου. Διδακτορική διατριβή (1988) σελ.82-85. Παθολογικός τομέας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Talmadge J.E, Phillips H, Schneider M, Rowe T, Pennington R, Bowersox O, Lenz B.Immunomodulatory properties of recombinant murine and human tumor necrosis factor.Cancer Res. 1988,48(3),544-50.

Zwilling B.S, Campolito L.B, Reiches N.A.Alveolar macrophage subpopulations identified by differential centrifugation on a discontinuous albumin density gradient. Am Rev Respir Dis. 1982 ,125(4),448-52.

Johnston R.B Jr.Current concepts: immunology. Monocytes and macrophages.N Engl J Med. 1988 ,318(12),747-52.

Venet A, Sandron D, Israel-Biet D.Bronchoalveolar lavage in interstitial lung diseases.Bull Eur Physiopathol Respir. 1985 ,21(6),465-76.



Warren J.S, Barton P.A, Mandel D.M, Matrosic K. Intrapulmonary tumor necrosis factor triggers local platelet-activating factor production in rat immune complex alveolitis. *Lab Invest.* 1990,63(6),746-54.

Upadhyay D, Kamp D.W. Asbestos-induced pulmonary toxicity: role of DNA damage and apoptosis. *Exp Biol Med (Maywood).* 2003,228(6),650-9.

Wagner J.C., Sleggs C.A., Marchand P. Diffuse pleural mesothelioma and asbestos exposure in MW CAPE province. *Brit J. Indust Med.* 1960,17,260.

Wassmer P, Chan C, Lögdberg L, Shevach EM. Role of the L3T4-antigen in T cell activation. II. Inhibition of T cell activation by monoclonal anti-L3T4 antibodies in the absence of accessory cells. *J Immunol.* 1985 ,135(4),2237-42.

Zucker-Franklin D, Lavie G, Franklin E.C. Wewers M.D, Rennard S.I, Hance A.J, Bitterman P.B, Crystal R.G. Normal human alveolar macrophages obtained by bronchoalveolar lavage have a limited capacity to release interleukin -1. *J Clin Invest.* 1984,74(6),2208.

Weissler J.C, Lipscomb M.F, Lem V.M, Toews G.B. Tumor killing by human alveolar macrophages and blood monocytes. Decreased cytotoxicity of human alveolar macrophages. *Am Rev Respir Dis.* 1986 ,134(3),532-7.

Zucker-Franklin D, Lavie G, Franklin E.C. Demonstration of membrane-bound proteolytic activity on the surface of mononuclear leukocytes. *J Histochem Cytochem.* 1981 ,29(3A Suppl),451.

