ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής και Κυτταρολογίας

Διευθυντής: Καθηγητής Διονύσιος Σπ. Μπονίκος

ΚαρδιοΘωρακοχειρουργική Κλινική

Διευθυντής: Καθηγητής Δημήτριος Δουγένης

Νευρολογική Κλινική

Διευθυντής: Αν. Καθηγητής Παναγιώτης Παπαθανασόπουλος

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών

«Κλινικές-Κλινικοεργαστηριακές Ιατρικές Ειδικότητες»

"Έκφραση των δεικτών απόπτωσης bcl-2, bax, bcl-x, Fas, και Fasl, των δεικτών κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki67 και PCNA και του ογκογονιδίου p53 σε παρασκευάσματα θυμεκτομών από ασθενείς με βαρεία μυασθένεια και συσχέτιση με τη μετεγχειρητική επιβίωση ασθενών και τους κλασικούς προγνωστικούς δείκτες της νόσου".

ΣΤΑΥΡΟΥΛΑ ΣΑΛΑΚΟΥ

ΙΑΤΡΟΣ-ΝΕΥΡΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Πάτρα 2006

Στον Χρήστο

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Διονύσιος Σπ. Μπονίκος, Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής

Επιβλέπων Καθηγητής

Δημήτριος Δουγένης, Καθηγητής Καρδιοθωρακοχειρουργικής

Θόδωρος Παπαπετρόπουλος, Καθηγητής Νευρολογίας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Διονύσιος Σπ. Μπονίκος, Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής

Επιβλέπων Καθηγητής

Δημήτριος Δουγένης, Καθηγητής Καρδιοθωρακοχειρουργικής

Σωτήριος Γαρταγάνης, Καθηγητής Οφθαλμολογίας

Θεόδωρος Πέτσας, Αναπληρωτής Καθηγητής Ακτινολογίας

Δημήτριος Καρδαμάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής Ακτινοθεραπείας

Ευστράτιος Αποστολάκης, Επίκουρος Καθηγητής Καρδιοθωρακοχειρουργικής

Βασιλική Ζολώτα, Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής

Δημοσιεύσεις-ανακοινώσεις από τα αποτελέσματα της διατριβής

1. Salakou S, Tsamandas AC, Bonikos DS, Papapetropoulos T, Dougenis D. The potential role of bcl-2, bax, and Ki67 expression in thymus of patients with myasthenia gravis, and their correlation with clinicopathologic parameters. **Eur J Cardiothorac Surg.** 20: 712-721, 2001.
2. Salakou S, Tsamandas AC, Tsibri E, Dougenis D, Bonikos DS, Papapetropoulos T. FAS expression and apoptosis in thymus of patients with myasthenia gravis, and their correlation with clinicopathologic parameters. **J Neurol Sci** 199: S88, 2002.
3. Salakou S, Tsamandas AC, Tsibri E, Dougenis D, Bonikos DS, Papapetropoulos T. Bcl-2, bax and p53 expression in thymus of patients with myasthenia gravis, and their correlation with clinicopathologic parameters. **J Neurol Sci** 199: S96, 2002
4. Salakou S, Tsamandas AC, Tsibri E, Dougenis D, Bonikos D, Papapetropoulos T. The potential role of bcl-2, bax and p53 expression in thymus of patients with myasthenia gravis and their correlation with clinicopathologic parameters. **Eur J Neurol** 10(S1):120, 2003.
5. Salakou S, Tsamandas AC, Tsibri E, Dougenis D, Bonikos D, Papapetropoulos T. FAS expression, apoptosis and cell proliferation in thymus of patients with myasthenia gravis and their correlation with clinicopathologic parameters. **Eur J Neurol** 10(S1):193, 2003
6. Salakou S, Tsamandas AC, Tsibri E, Dougenis D, Bonikos D, Papapetropoulos T. Increased bax/bcl-2 ratio upregulates caspase-3 and increeases apoptosis in thymus of patients with myasthenia gravis. **J Neurol** 251(S3):III175, 2004.
7. Salakou S, Tsamandas AC, Tsibri E, Apostolakis E, Bonikos D, Papapetropoulos T, Dougenis D. Bax/Bcl-2 Ratio as a Predictive Marker for Therapeutic Response, after Thymectomy in Patients with Myasthenia Gravis. **Modern Pathology** 18(S1), 294A, 2005.
8. Salakou S, Tsamandas AC, Tsibri E, Apostolakis E, Bonikos D, Papapetropoulos T, Dougenis D. Bax/Bcl-2 Ratio as a Predictive Marker for Therapeutic Response, after Thymectomy in Patients with Myasthenia Gravis. **Lab Investigation** 85(S1), 294A, 2005.

9. Salakou S, Tsamandas AC, Tsibri E, Apostolakis E, Bonikos D, Papapetropoulos T, Dougenis D. Bax/Bcl-2 Ratio as a Predictive Marker for Therapeutic Response, after Thymectomy in Patients with Myasthenia Gravis. **Journal of Neurology** 85(S1), 294A, 2005.
10. Salakou S, Tsamandas AC, Tsibri E, Apostolakis E, Bonikos D, Papapetropoulos T, Dougenis D. Bax/Bcl-2 Ratio as a Predictive Marker for Therapeutic Response, after Thymectomy in Patients with Myasthenia Gravis. **European Journal of Neurology** 12(S), 157, 2005.
11. Σαλάκου Σ, Τσαμαντάς Α, Μπονίκος Δ, Τσιμπρή Ε, Δουγένης Δ, Παπαπετρόπουλος Θ. Αναζήτηση της παρουσίας του αντιγόνου FAS και της αποπτωτικής διεργασίας σε παρασκευάσματα θύμου σε ασθενείς με βαρεία μυασθένεια και συσχέτιση με τους κλασσικούς κλινικοπαθολογοανατομικούς παράγοντες της νόσου. **Νευρολογία,** 9(3): 182, 2000.
12. Σαλάκου Σ, Τσαμαντάς Α, Μπονίκος Δ, Τσιμπρή Ε, Δουγένης Δ, Παπαπετρόπουλος Θ. Έκφραση των πρωτεϊνών απόπτωσης bcl-2 και bax, και κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki67 σε παρασκευάσματα θύμου μετά θυμεκτομή, σε ασθενείς με βαρεία μυασθένεια και συσχέτιση με τους κλασσικούς κλινικοϊστοπαθολογικούς παράγοντες της νόσου. **Νευρολογία,** 9(3): 183, 2000.
13. Σαλάκου Σ, Τσαμαντάς ΑΧ, Τσιμπρή Ε, Δουγένης Δ, Μπονίκος Δ, Παπαπετρόπουλος Θ. Έκφραση των πρωτεϊνών απόπτωσης Bcl-2 και Bax και του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 σε παρασκευάσματα θύμου μετά θυμεκτομή, σε ασθενείς με βαρεία μυασθένεια. **Νευρολογία** 11(3): 141, 2002.
14. Bax/Bcl-2 Ratio as a Predictive Marker for Therapeutic Response, after Thymectomy in Patients with Myasthenia Gravis. Salakou S, Tsamandas AC, Tsibri E, Apostolakis E, Bonikos D, Papapetropoulos T, Dougenis D. *94th Annual USCAP meeting, February 26-March 4, 2005, San Antonio TX, USA.*
15. Bax/Bcl-2 Ratio as a Predictive Marker for Therapeutic Response, after Thymectomy in Patients with Myasthenia Gravis. Salakou S, Tsamandas AC, Tsibri E, Apostolakis E, Bonikos D, Papapetropoulos T, Dougenis D. *15th ENS Congress, June 18-22, 2005,Vienna Austria.*
16. Bax/Bcl-2 Ratio as a Predictive Marker for Therapeutic Response, after Thymectomy in Patients with Myasthenia Gravis. Salakou S, Tsamandas AC, Tsibri E, Apostolakis E, Bonikos D, Papapetropoulos T, Dougenis D. *9th Congress of EFNS, September 17-20, 2005, Athens Greece.*

Πρόλογος

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Πανεπιστήμιο Πατρών και αφορά σε ασθενείς με βαρεία μυασθένεια. Οι ασθενείς αυτοί νοσηλεύθηκαν στην Νευρολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Πατρών και στα πλαίσια της θεραπείας της μυασθένειας υποβλήθηκαν σε τροποποιημένη μεγίστη θυμεκτομή στην Καρδιοθωρακοχειρουργική Κλινική του Πανεπιστημίου Πατρών. Όλα τα χειρουργικά παρασκευάσματα των θυμεκτομών από αυτούς τους ασθενείς επεξεργάσθηκαν ιστοπαθολογικά στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημίου Πατρών.

Ευχαριστώ τον καθηγητή κ. Θόδωρο Παπαπετρόπουλο για την βοήθεια και την υποστήριξη που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια πραγματοποίησης της διατριβής καθώς και για όλες τις πληροφορίες που έθεσε στη διάθεσή μου από το προσωπικό του αρχείο, σχετικά με την κλινική κατάσταση των ασθενών πριν και μετά τη θυμεκτομή.

Ευχαριστώ τον καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής κ. Διονύσιο Σπ. Μπονίκο για τη δυνατότητα που μου παρείχε να χρησιμοποιήσω το Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, αλλά και για το αρχειακό υλικό του Εργαστηρίου, που ευγενώς παραχώρησε, για την εκτέλεση των τεχνικών ανοσοϊστοχημείας και in-situ υβριδισμού.

Ευχαριστώ επίσης τον καθηγητή Καρδιοθωρακοχειρουργικής κ. Δημήτριο Δουγένη, ο οποίος διενήργησε τις θυμεκτομές, για τις πληροφορίες που μου παρείχε καθόλη τη διάρκεια της διατριβής αναφορικά με την περιεγχειρητική πορεία των ασθενών.

Τέλος επιθυμώ να ευχαριστήσω την κ. Ευαγγελία Τσιμπρή, επιμελήτρια Α’ ΕΣΥ της Νευρολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Πατρών για τις πληροφορίες που μου παρείχε σχετικά με την κλινική κατάσταση των ασθενών πριν και μετά τη θυμεκτομή.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ Σελ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ **10**

Ι. ΘΥΜΟΣ 11

1. Ανατομία του θύμου 11

2. Ιστολογία του θύμου 13

3. Φυσιολογία του θύμου 15

4. Παθήσεις του θύμου 15

ΙΙ. ΒΑΡΕΙΑ ΜΥΑΣΘΕΝΕΙΑ 16

1. Επιδημιολογία της μυασθένειας 16

2. Παθοφυσιολογία της μυασθένειας 18

α. Ανατομία και φυσιολογία της νευρομυϊκής σύναψης 20

β. Παθογένεια της βαρείας μυασθένειας 27

3. Κλινικές εκδηλώσεις της μυασθένειας 34

α. Κλινική πορεία 37

β. Κλινική ταξινόμηση της μυασθένειας ως προς τη βαρύτητα 38

4. Διάγνωση της μυασθένειας 41

α. Φαρμακολογικές δοκιμασίες 41

β. Ηλεκτροφυσιολογικές δοκιμασίες 43

γ. Ορολογικές (ανοσολογικές) δοκιμασίες 48

5. Θεραπεία της μυασθένειας 50

α. Συμπτωματική θεραπεία 51

β. Ανοσοτροποποιητικές θεραπείες 52

ΙΙΙ. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ-ΑΠΟΠΤΩΣΗ 71

1. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός 72

3. Αίτια της απόπτωσης 75

4. Μορφολογικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης 78

5. Βιοχημικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης 79

6. Μηχανισμοί της απόπτωσης 81

α. Το εξωγενές μονοπάτι της απόπτωσης 83

β. Το ενδογενές (μιτοχονδριακό) μονοπάτι της απόπτωσης 85

γ. Η εκτελεστική φάση 86

δ. Απομάκρυνση των νεκρών κυττάρων 88

7. Απορύθμιση της απόπτωσης σε διάφορες νόσους 89

8. Σύνοψη 90

9. Αποπτωτικά γονίδια 91

10. Απόπτωση και θύμος 102

11. Θύμος και αποπτωτικά γονίδια 107

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ **112**

Ι. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 113

1. Ασθενείς 113

α. Κλινική κατάσταση των ασθενών μετά τη θυμεκτομή 113

2. Μέθοδοι 114

α. Ιστοπαθολογικές μελέτες ρουτίνας 114

β. Μελέτες ανοσοϊστοχημείας και in situ υβριδισμού 114

γ. Μορφομετρική ανάλυση 128

δ. Στατιστική ανάλυση 129

ΙΙ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 130

1. Κλινικοεπιδημιολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με βαρεία μυασθένεια 130

2.Έκφραση των διαφόρων μοριακών δεικτών 139

α. Bcl-2 139

β. Bax 140

γ. Αναλογία bax/bcl-2 143

δ. Bcl-Xl 149

ε. Fas, Fasl 149

στ. PCNA και Ki67 151

ζ. p53 157

η. Αποπτωτικός δείκτης 158

3. Πολυπαραγοντική ανάλυση κατά Cox 159

ΙΙΙ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ 164

ΠΕΡΙΛΗΨΗ **179**

ABSTRACT **182**

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ **185**

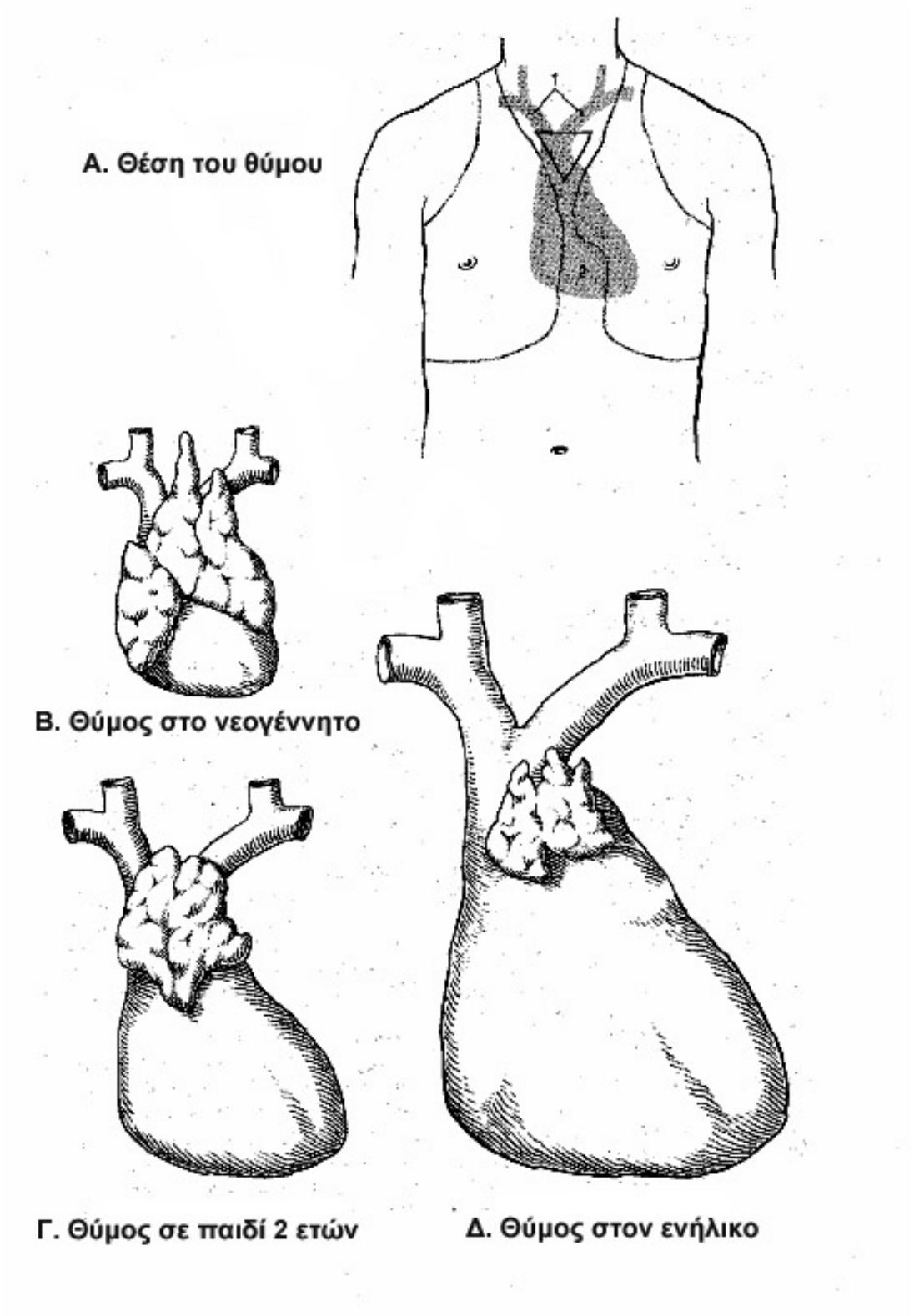
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΘΥΜΟΣ

Στον άνθρωπο ο θύμος αποτελεί κεντρικό λεμφικό όργανο.

ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΤΟΥ ΘΥΜΟΥ

Ο θύμος αποτελείται από δύο ωοειδούς σχήματος λοβούς ενωμένους μεταξύ τους. Βρίσκεται στο μεσοθωράκιο πάνω από το περικάρδιο, μπροστά από την αριστερή ανώνυμη και την άνω κοίλη φλέβα, πίσω από το στέρνο και μεταξύ των δύο μεσοπνευμόνιων πετάλων του υπεζωκότα. Κατά την παιδική ηλικία εκτείνεται προς τα κάτω μέχρι την $4^{η}$ στερνοπλευρική διάρθρωση και στις ακτινογραφίες μπορεί να προκαλεί διαπλάτυνση της σκιάς της βάσης της καρδιάς. Οι λοβοί προς τα άνω φτάνουν τα κάτω άκρα του θυρεοειδούς αδένα. Βρίσκονται κάτω από τη μέση τραχηλική περιτονία. Στην περίπτωση υπερβολικής ανάπτυξης δίνει προσεκβολή ακόμη υψηλότερα στον τράχηλο. Μετά την αφαίρεση της λεπτής κάψας του από ινώδη συνδετικό ιστό, διακρίνονται ομαλά λόβια, διαμέτρου 0.5-1εκ, τα οποία κρέμονται γύρω από ένα κεντρικό αγγειοβριθή μίσχο. Κάθε λόβιο αποτελείται από μικρότερα λόβια στα οποία μικροσκοπικά διακρίνεται ο φλοιός και ο μυελός (Kahle W, et al, 1985), (εικόνα 1).



Εικόνα 1: Ανατομία του θύμου. **Α1**. ανώνυμες φλέβες, **Α2** καρδιά. **Τρίγωνο**: θυμικό τρίγωνο. **ΒΓΔ.** Ο θύμος παίρνει την πλήρη του ανάπτυξη στα παιδιά και τους εφήβους, στους ενήλικους όμως υποπλάσσεται και κατά μεγάλο μέρος μετατρέπεται σε λιπώδη ιστό (Από: Kahle W, et al, 1985).

ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΘΥΜΟΥ

Ο θύμος των παιδιών έχει χαρακτηριστική κατασκευή. Τα λόβια συνάπτονται στους αγγειώδεις μίσχους και σε κάθε λόβιο διακρίνονται ο φλοιός και ο μυελός (εικόνα 2).

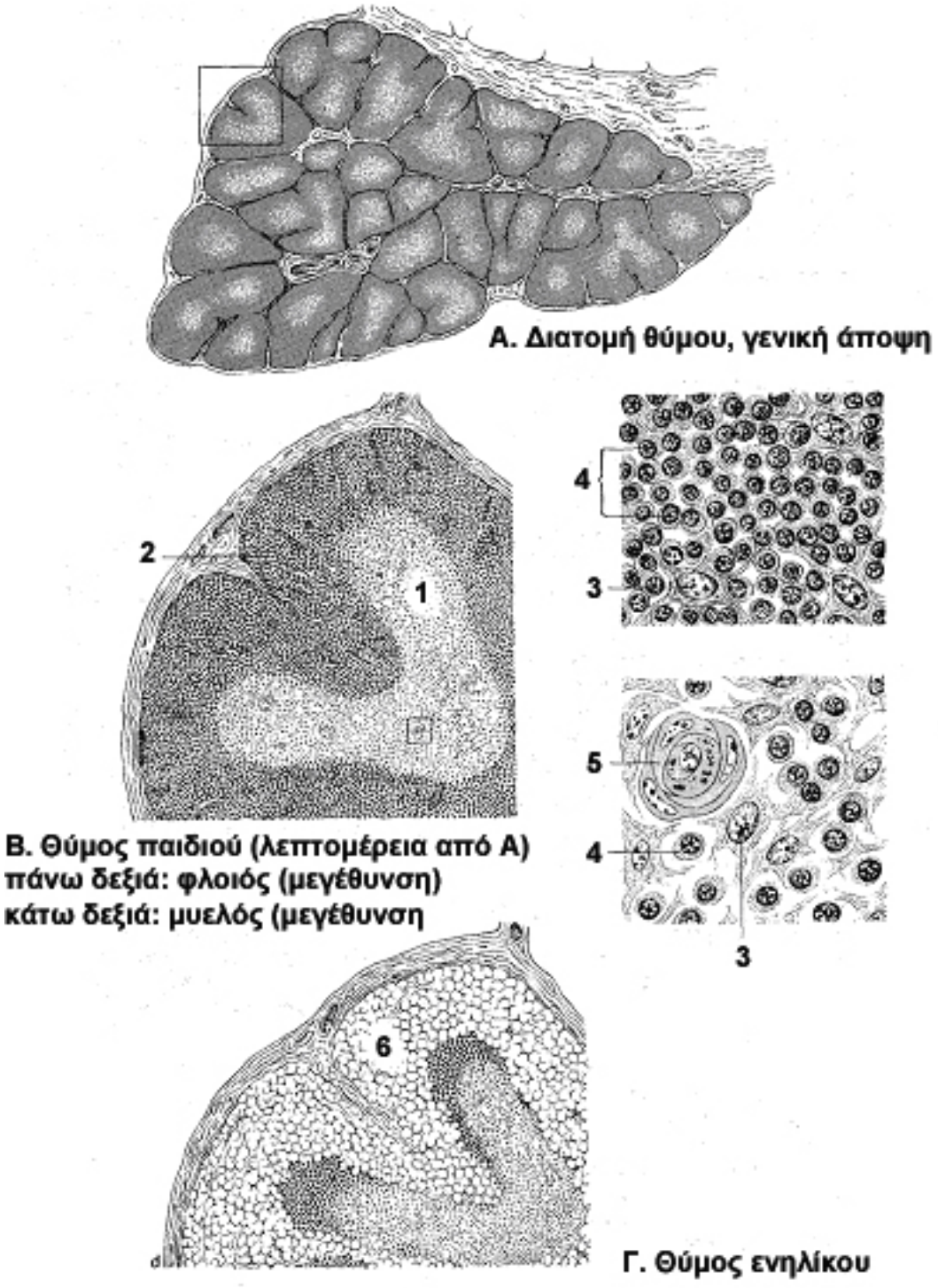
Φλοιός

Το δίκτυο του στρώματος του φλοιού είναι γεμάτο από μικρά Τ-λεμφοκύτταρα, τα θυμοκύτταρα. Σε σχέση με τα λεμφοζίδια τα βλαστικά κέντρα είναι σπάνια.

Μυελός

Το δίκτυο του στρώματος είναι στενότερο από του φλοιού με λιγότερα Τ-λεμφοκύτταρα (θυμοκύτταρα). Σποραδικά υπάρχουν συγκεντρικά διατεταγμένα κύτταρα – τα σωμάτια του Hassal. Υπάρχουν γύρω στο 1 εκατομμύριο τέτοια σωμάτια στο θύμο του νεογέννητου και 1.5 εκατομμύρια στον έφηβο. Στον $20^{ο}$ χρόνο της ζωής υπάρχουν ακόμη γύρω στις 700000 αλλά μετά το $40^{ο}$ έτος ζωής βρίσκονται μόνο γύρω στις 250000. Κάθε σωμάτιο Hassal αποτελείται από λίγα κύτταρα ή μπορεί να μετατραπεί σε κύστη διαμέτρου 0.1-0.5mm που περιέχει κυτταρικά συγκρίματα. Η λειτουργία αυτών των σωματίων δεν είναι γνωστή αλλά φαίνεται ότι σχηματίζονται σε σχέση με τις ανοσολογικές διεργασίες. Το στρώμα του θύμου χωρίζεται από την επιφάνειά του και από τα αιμοφόρα αγγεία με τη βασική μεμβράνη. Η τελευταία θεωρείται ότι έχει σχέση με το θυμικο-αιματικό φραγμό, λόγω του οποίου διάφορες ουσίες, όπως πρωτεΐνες, μεγάλα μόρια χρωστικής και πολλά αντιγόνα, δεν μπορούν να περάσουν από τα αιμοφόρα αγγεία στο θύμο.

Μετεφηβική ατροφία. Μετά το $18^{ο}$ έτος ο θύμος αρχίζει να ατροφεί και να αντικαθίσταται εν μέρει από λιπώδη ιστό αν και ποτέ δεν εξαφανίζεται τελείως. Σχεδόν πάντοτε η μικροσκοπική εξέταση του περικαρδιακού λίπους αποκαλύπτει νησίδες θυμικού ιστού (Kahle W, et al, 1985).



Εικόνα 2: Ιστολογία του θύμου. Φλοιός Β2 και μυελός Β1: μυελός, Β2: φλοιός. Β3: στρώμα φλοιού ή μυελού, Β4: Τ-λεμφοκύτταρα (θυμοκύτταρα). Β5: σωμάτια Hassal. Γ6: λιπώδης ιστός. (Από: Kahle W, et al, 1985).

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΘΥΜΟΥ

Πειράματα σε ζώα κατά την εμβρυϊκή ζωή και στα νεογέννητα έχουν αποδείξει ότι ο θύμος ρυθμίζει την ανάπτυξη του ανοσολογικού συστήματος κατά δύο τρόπους: 1) Τα χωρίς ανοσολογικές ικανότητες κύτταρα μετατρέπονται στο θύμο σε Τ λεμφοκύτταρα με ανοσολογικές ικανότητες. Από εκεί μεταναστεύουν και εγκαθίστανται στα λεμφοκυττογόνα όργανα. 2) Ο δικτυωτός ιστός των λεμφικών οργάνων ερεθίζεται και ωριμάζει ένα χυμικό παράγοντα που εκκρίνει ο θύμος. Αν αφαιρεθεί ο θύμος από ένα νεογέννητο ζώο, ο αριθμός των λεμφοκυττάρων, και επομένως και η κυτταρική ανοσία, ελαττώνεται, ενώ δεν επηρεάζεται η χυμική ανοσία, όμως τα λεμφικά όργανα είναι υποπλαστικά. Τέτοια ζώα παθαίνουν εκφυλιστικές νόσους (καθυστερημένη ανάπτυξη σώματος, μειωμένη τριχοφυΐα, εντερικές διαταραχές και αυξημένη θνησιμότητα). Εμφυτεύματα ξένων ιστών δεν απορρίπτονται από τα θυμεκτομηθέντα ζώα. Η συγγενής έλλειψη του θύμου στον άνθρωπο συνοδεύεται από παρόμοια φαινόμενα που βελτιώνονται με μοσχεύματα θύμου. Μετά την πλήρη ανάπτυξη του κυτταρικού ανοσολογικού συστήματος, ο θύμος χάνει τη σημασία του (Kahle W, et al, 1985).

ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΤΟΥ ΘΥΜΟΥ

Ο πίνακας 1 δείχνει τις κυριότερες παθήσεις του θύμου.

Πίνακας 1: Οι κυριότερες παθήσεις του θύμου (Rosai J, 2004)

Πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες, δυσπλασία του θύμου, κύστεις
Άλλες μη νεοπλασματικές παθήσεις
- Έκτοπος θύμος, οξεία υποστροφή του θύμου
- Αληθής υπερπλασία του θύμου
- Λεμφοζιδιακή υπερπλασία του θύμου

Όγκοι
- Θύμωμα
- Θυμικό καρκίνωμα
- Επιδερμοειδές κερατινοποιούμενο καρκίνωμα
- Επιδερμοειδές μη κερατινοποιούμενο καρκίνωμα
- Λεμφοεπιθηλίωμα

ΒΑΡΕΙΑ ΜΥΑΣΘΕΝΕΙΑ

Η βαρεία μυασθένεια είναι μία χρόνια νόσος που χαρακτηρίζεται από διαταραχή στη νευροδιαβίβαση στο επίπεδο της νευρομυϊκής σύναψης.

ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΒΑΡΕΙΑΣ ΜΥΑΣΘΕΝΕΙΑΣ

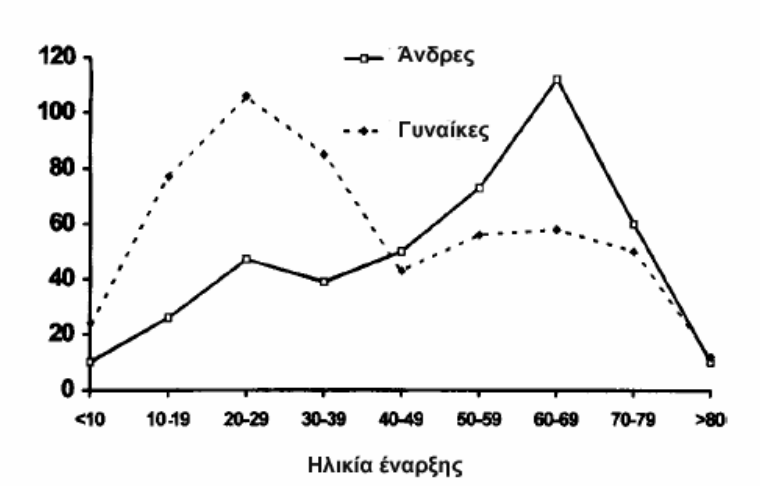
Η βαρεία μυασθένεια μπορεί να συμβεί σε οποιαδήποτε ηλικία από τη γέννηση έως τη δέκατη δεκαετία ζωής. Το peak έναρξης της επίκτητης βαρείας μυασθένειας στις γυναίκες είναι ανάμεσα στην εφηβεία και την τρίτη δεκαετία ζωής, ενώ στους άνδρες μεταξύ 50-70 ετών (Perlo VP, et, al, 1966). Ωστόσο οι καμπύλες έναρξης της νόσου είναι δικόρυφες (Somnier FE, et al, 1991) με μία ομάδα πρώιμης έναρξης και μία άλλη όψιμης έναρξης και για τα δύο φύλα (εικόνα 3).

Η πρώιμης έναρξης αυτοάνοση μυασθένεια (κάτω από την ηλικία των 40 ή 50 ετών) σχετίζεται, στους Καυκάσιους ασθενείς με μυασθένεια, με την παρουσία των HLA-B8 και DRW3, ενώ η όψιμης έναρξης μυασθένεια (σε ασθενείς άνω των 50 ετών), σχετίζεται με μία ποικιλία άλλων HLA δεικτών (Compston DAS, et al, 1980, Somnier FE, et al, 1991, Aarli JA, 1999). Μία ξεχωριστή, τρίτη ομάδα, που αποτελεί το 10-15% όλων των ασθενών με βαρεία μυασθένεια, αποτελείται από αυτούς στους οποίους συνυπάρχει θύμωμα. Η καμπύλη έναρξης της νόσου σε αυτούς τους ασθενείς φθάνει στην κορυφή (peak) σε μεγαλύτερες ηλικίες και δεν υπάρχει συσχέτιση με HLA (Aarli JA, 1999). Παρ' όλο που τα συμπτώματα με τα οποία εμφανίζεται η μυασθένεια είναι παρόμοια σε νέους αλλά και πιο ηλικιωμένους ασθενείς, ασθενείς άνω των 50 ετών τείνουν να εμφανίζουν εξέλιξη σε πιο σοβαρή μορφή της νόσου (Donaldson DH, et al, 1990).

Ο αριθμός των ασθενών με βαρεία μυασθένεια ανά τον κόσμο έχει αυξηθεί σταθερά με το πέρασμα των χρόνων (Phillips LH, Torner JC, 1996). Και τούτο διότι πιθανόν τόσο ο γενικός πληθυσμός όσο και οι ασθενείς με μυασθένεια έχουν

μακρύτερη επιβίωση. Παρ' όλο που ο μέσος επιπολασμός της βαρείας μυασθένειας για τη δεκαετία 1980-1989 ήταν 60 ανά εκατομμύριο πληθυσμού (Phillips LH, Torner JC, 1996), αρκετές πρόσφατες μελέτες από διάφορες Ευρωπαϊκές χώρες και τις ΗΠΑ αναφέρουν επιπολασμό 100-150 ανά εκατομμύριο (Phillips LH, Torner JC, 1996) ενώ σε τελευταία μελέτη, ο επιπολασμός για τις ΗΠΑ υπολογίζεται σε 200 ανά εκατομμύριο πληθυσμού (Phillips LH, 2003).

Ο αριθμός των νέων ασθενών ανά έτος – η ετήσια επίπτωση – επίσης αυξάνει αν και ίσως όχι τόσο γρήγορα όσο ο επιπολασμός (Phillips LH, Torner JC, 1996). Μία πρόσφατη μελέτη από την Ισπανία αναφέρει συνολική ετήσια επίπτωση 21 νέες περιπτώσεις βαρείας μυασθένειας ανά εκατομμύριο κατοίκων, με μια αξιοσημείωτη αύξηση με την ηλικία· η ετήσια επίπτωση της μυασθένειας σε άτομα άνω των 65 ετών, υπολογίσθηκε σε 63 ανά εκατομμύριο και εξηγήθηκε ότι οφείλεται στη γήρανση του πληθυσμού (Aragonès JM, et al, 2003). Η μεγαλύτερη ηλικία έναρξης της βαρείας μυασθένειας που έχει αναφερθεί έως τώρα είναι τα 98 έτη (Phillips LH, Juel VC, 1999).



Εικόνα 3: Η ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων της νόσου, ανά δεκαετίες ζωής, σε 906 ασθενείς με μυασθένεια χωρίς θύμωμα. Οι δικόρυφες καμπύλες υποδηλώνουν την παρουσία πρώιμης και όψιμης έναρξης μυασθένειας και στα δύο φύλα (Sanders DB, et al, 1997).

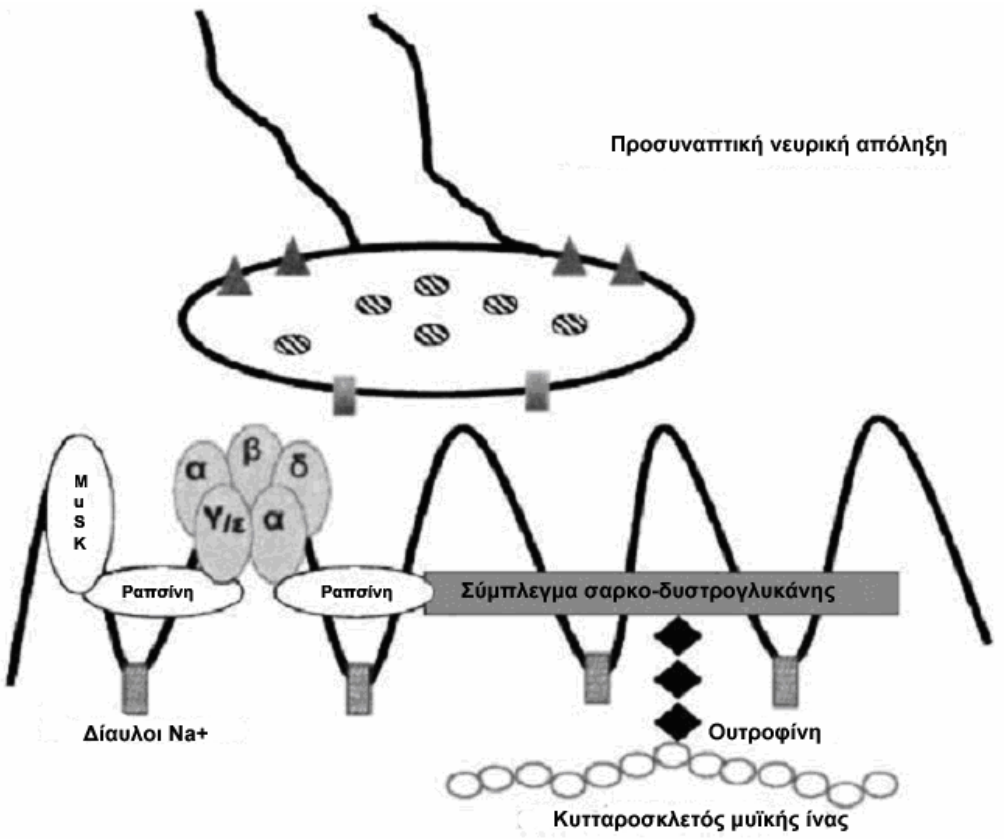
Σε επιδημιολογική μελέτη που έγινε από το τμήμα Βιοχημείας του Ελληνικού Ινστιτούτου Pasteur και την Πανεπιστημιακή Νευρολογική Κλινική της Πάτρας, μελετήθηκαν 843 ασθενείς θετικοί για αντισώματα κατά των υποδοχέων ακετυλοχολίνης και υπολογίστηκαν διάφοροι επιδημιολογικοί δείκτες. Η ετήσια επίπτωση για την περίοδο 1992-1997, υπολογίστηκε σε 7,4 ανά εκατομμύριο πληθυσμού. Η μέση ηλικία εμφάνισης για τον ελληνικό πληθυσμό ήταν τα 46,5 έτη (40,16 για τις γυναίκες και 54,46 για τους άνδρες) ενώ επιβεβαιώθηκε η δικόρυφη κατανομή. Ο επιπολασμός της νόσου υπολογίστηκε στη μελέτη αυτή, σε 70,63 ανά εκατομμύριο πληθυσμού (Poulas K, et al, 2000, Poulas K, et al, 2001).

Υπάρχουν διαφορές μεταξύ των Ασιατικών και των Καυκάσιων πληθυσμών όσον αφορά τις κλινικές και ανοσολογικές εκδηλώσεις της μυασθένειας. Η πρώτη ομάδα (Ασιάτες), εμφανίζει περισσότερες περιπτώσεις μυασθένειας που περιορίζονται στους οφθαλμοκινητικούς μύες, ενώ σε ποσοστό μέχρι 30% των ασθενών αυτών, η νόσος εκδηλώνεται πριν την ηλικία των 10 ετών (Chen WH, et al, 1993). Αυτή η νεανικής έναρξης οφθαλμική μυασθένεια στους Ασιατικούς πληθυσμούς, σχετίζεται ισχυρά με την παρουσία των HLA-Bw46 και DR9 (Hawkins BR, et al, 1984).

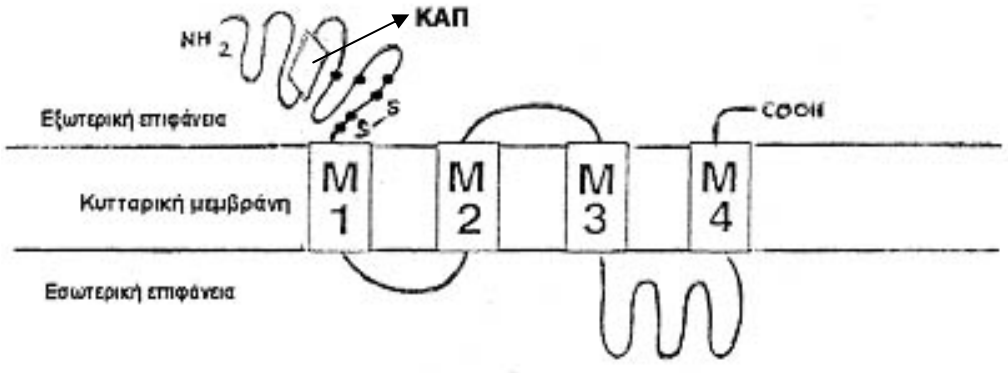
Τέλος να αναφέρουμε ότι το ποσοστό θνησιμότητας που παλιότερα ξεπερνούσε το 30%, κατά τα πρώτα χρόνια της νόσου, τώρα είναι μικρότερο από 5% και οι περισσότεροι ασθενείς ζουν παραγωγική ζωή (Victor M, Ropper AH, 2004).

ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΒΑΡΕΙΑΣ ΜΥΑΣΘΕΝΕΙΑΣ

Για να κατανοήσει κανείς την παθοφυσιολογία της βαρείας μυασθένειας, χρειάζεται να γνωρίζει την ανατομία και τη φυσιολογία της νευρομυϊκής σύναψης (ΝΜΣ) (Engel AG, 1999, Sanes JR, Lichtman JW, 2001, Boonyapisit K, et al, 1999, Ruff RL, 2003, Kaminski HJ, 2003).



Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση της νευρομυϊκής σύναψης στα θηλαστικά. Το σχήμα δείχνει τις κύριες πρωτεΐνες που βρίσκονται στην ΝΜΣ των θηλαστικών. Η προσυναπτική τελική περιοχή του νεύρου περιέχει συναπτικά κυστίδια (ριγέ ωοειδή), διαύλους καλίου (τρίγωνα), και διαύλους ασβεστίου (γκρι ορθογώνια παραλληλόγραμμα). Ο υποδοχέας της ακετυλοχολίνης απεικονίζεται με την πενταμερή του δομή. Οι δίαυλοι νατρίου (ριγέ ορθογώνια παραλληλόγραμμα), η ειδική του μυός κινάση (MuSK), η ραπσίνη, η ουτροφίνη και το σύμπλεγμα σαρκο-δυστρογλυκάνης εντοπίζονται στην μετασυναπτική μεμβράνη (από Hughes BW, et al, 2004).



Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση της α-υπομονάδας του Υ- ΑΚΧ. ΚΑΠ: κύρια ανοσογόνος περιοχή.

ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΝΕΥΡΟΜΥΪΚΗΣ ΣΥΝΑΨΗΣ

Προσυναπτική επιφάνεια

Καθώς το κινητικό νεύρο προσεγγίζει ένα μυ, διακλαδίζεται, και νευρώνει πολλές μυϊκές ίνες, δίνοντας μια μονήρη αμύελη νευρική απόληξη σε κάθε μία από τις ίνες. Η νευρομυϊκή σύναψη (ΝΜΣ) είναι μία εξειδικευμένη σύναψη, η οποία διαβιβάζει νευρικά ερεθίσματα από τη νευρική απόληξη στον μυ, μέσω του χημικού διαβιβαστή ακετυλοχολίνη (ΑΚΧ), η οποία αποθηκεύεται στην νευρική απόληξη μέσα σε συναπτικά κυστίδια (εικόνα 4). Αυτά τα κυστίδια εντοπίζονται κοντά στις θέσεις απελευθέρωσης που καλούνται «ενεργείς ζώνες», όπου οι δίαυλοι ασβεστίου διατάσσονται σε παράλληλες διπλές σειρές. Όταν ένα δυναμικό ενεργείας φθάνει στην νευρική απόληξη, δίαυλοι ασβεστίου P/Q-τύπου ενεργοποιούνται, το ασβέστιο φθάνει στην προσυναπτική τελική περιοχή και η τοπική συγκέντρωση ασβεστίου αυξάνει σημαντικά, πυροδοτώντας τα κυστίδια να απελευθερώσουν το περιεχόμενό τους (Hughes BW, et al, 2004).

Η ποσότητα της ΑΚΧ που περιέχεται σε κάθε συναπτικό κυστίδιο (περίπου 10 χιλιάδες μόρια ΑΚΧ), είναι γνωστή ως quantum ή «πακέτο» ΑΚΧ. Η άφιξη στην απόληξη του νεύρου του δυναμικού ενεργείας, προκαλεί την απελευθέρωση 50-300 συναπτικών κυστιδίων. Παράλληλα με την έκλυση ΑΚΧ απελευθερώνεται και ΑΤΡ από τα κυστίδια το οποίο και επηρεάζει την έκλυση της ΑΚΧ. Η ΑΚΧ, μετά την απελευθέρωσή της διαχέεται ταχέως κατά μήκος της συναπτικής σχισμής (Παπαπετρόπουλος Θ, 1990).

Συναπτική σχισμή

Ανάμεσα στο νεύρο και την μυϊκή κυτταροπλασματική μεμβράνη υπάρχει ένας χώρος περίπου 50 nm που καλείται «συναπτική σχισμή» (Εικ. 4). Η εξωκυττάρια ουσία της συναπτικής σχισμής είναι μία σύνθετη συλλογή από πρωτεΐνες οι οποίες

ρυθμίζουν τη σύνθεση των μετασυναπτικών πρωτεϊνών και τη συγκέντρωση της ακετυλοχολινεστεράσης (Hughes BW, et al, 2004). Είναι εμπλουτισμένη σε κολλαγόνο και περιέχει διάφορες μορφές λαμινίνης, οι οποίες συνδέονται όλες με την α-δυστρογλυκάνη στην μετασυναπτική μεμβράνη. Οι λαμινίνες σχηματίζουν έναν σκελετό (network) στο συναπτικό χώρο, ο οποίος κατακρατεί άλλες πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας (Abbas L, 2003). Μετά την απελευθέρωση από τα συναπτικά κυστίδια, η διάχυση της ΑΚΧ κατά μήκος της σχισμής είναι ταχεία, λόγω της μικρής απόστασης που διανύει και του υψηλού ρυθμού διάχυσής της (Sanes JR, Lichtman JW, 2001).

Η ακετυλοχολινεστεράση συγκεντρώνεται στη βασική στοιβάδα της μετασυναπτικής μεμβράνης και η υδρόλυση που προκαλεί στην ΑΚΧ καθώς και η διάχυση της ΑΚΧ έξω από την συναπτική σχισμή, οδηγεί σε ταχεία ελάττωση της συγκέντρωσης ΑΚΧ (Arber S, et al, 2002). Αυτό εμποδίζει την ενεργοποίηση του υποδοχέα ακετυλοχολίνης (Υ-ΑΚΧ) περισσότερο από μία φορά, ως απάντηση στην ΑΚΧ. Οι αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης, όπως η πυριδοστιγμίνη και το εδροφώνιο, επιμηκύνουν τη διάρκεια της δράσης της ΑΚΧ στην μετασυναπτική μεμβράνη. Σε διαταραχές της νευρομυϊκής διαβίβασης όπου η βλάβη βρίσκεται στη μετασυναπτική περιοχή, η αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης επαυξάνει τη δράση της ΑΚΧ και επάγει την επίτευξη ενός τέτοιου δυναμικού τελικής κινητικής πλάκας, το οποίο θα οδηγήσει σε γενικευμένο μυϊκό δυναμικό. Τα κύτταρα Schwann τα οποία περιβάλλουν την τελική νευρική απόληξη, έχει βρεθεί ότι εκκρίνουν μία πρωτεΐνη που δεσμεύει την ΑΚΧ, γεγονός που μπορεί να μειώσει τη συγκέντρωση της ΑΚΧ στη συναπτική σχισμή και να διαδραματίσει ρόλο στην τροποποίηση της νευρομυϊκής διαβίβασης (Smit AB, et al, 2001, Brejc K, et al, 2001).

Μετασυναπτική επιφάνεια

Αφού η ΑΧΧ διασχίσει τη συναπτική σχισμή, δεσμεύεται στους Υ-ΑΧΧ που συγκεντρώνονται απέναντι από τις « ενεργείς ζώνες» της νευρικής απόληξης. (Εικ. 4) (Hughes BW, et al, 2004). Η δέσμευση αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη διάνοιξη του ιοντικού καναλιού των Υ-ΑΧΧ και την είσοδο κατιόντων, κυρίως νατρίου, μέσα στον μυ, γεγονός που οδηγεί στην παραγωγή του δυναμικού της τελικής κινητικής πλάκας. Όταν επιτυγχάνεται μια καθορισμένη ουδός εκπόλωσης, δίαυλοι νατρίου, στον πυθμένα των μετασυναπτικών πτυχών, ανοίγουν, επιτρέποντας την είσοδο περισσότερων ιόντων νατρίου με αποτέλεσμα να προκαλείται δυναμικό ενεργείας του μυός και σύσπαση αυτού (Ruff RL, 2003).

Η μετασυναπτική επιφάνεια των σκελετικών μυών χαρακτηρίζεται από εγκολπώσεις της κυτταροπλασματικής μεμβράνης οι οποίες καλούνται «δευτερογενείς συναπτικές πτυχές» (Sanes JR, Lichtman JW, 2001). Αυτές οι πτυχές αυξάνουν το εμβαδόν επιφανείας της μετασυναπτικής μεμβράνης και η αρχιτεκτονική τους επιτρέπει στην εκπόλωση της τελικής κινητικής πλάκας να εστιάζει στο βάθος αυτών (Wood SJ, Slater CR, 2001). Οι Υ-ΑΧΧ συγκεντρώνεται στις οροφές (ανώτερα μέρη) των δευτερογενών συναπτικών πτυχών, και «αγκυροβολούν» στο σύμπλεγμα πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη δυστροφίνη, διαμέσου της ραπσίνης, μίας πρωτεΐνης που ενέχεται στην συσσώρευση των Υ-ΑΧΧ στην ΝΜΣ κατά τη διάρκεια ανάπτυξης της σύναψης (Sanes JR, Lichtman JW, 2001). Οι ομάδες των Υ-ΑΧΧ συνδέονται με στοιχεία του κυτταροσκελετού μέσω των συμπλεγμάτων πρωτεϊνών δυστρογλυκάνης και σαρκογλυκάνης και της ουτροφίνης (Vincent A, 2001). Στη συσσώρευση των Υ-ΑΧΧ στην περιοχή, συμβάλλει και το γεγονός ότι οι πυρήνες της μυϊκής ίνας που βρίσκονται κοντά στην ΝΜΣ εκφράζουν κατά προτίμηση γονίδια που κωδικοποιούν τις υπομονάδες του Υ-ΑΧΧ (Merlie JP,

Sanes JR, 1985).

Οι δίαυλοι νατρίου εμφανίζουν υψηλή συγκέντρωση στη βάση των συναπτικών πτυχών της μετασυναπτικής μεμβράνης, διαντιδρώντας με αγκυρίνη, το σύμπλεγμα σαρκογλυκάνης, το σύμπλεγμα δυστρογλυκάνης, τις δυστρομπρεβίνες (dystrobrevins) και την δυστροφίνη/ουτροφίνη (Εικ.4) (Hughes BW, et al, 2004).

Ο υποδοχέας ακετυλοχολίνης (Υ-ΑΚΧ)

Η εικόνα 5 απεικονίζει την α-υπομονάδα του Υ-ΑΚΧ. Ο υποδοχέας ακετυλοχολίνης (Υ-ΑΚΧ) είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτείνη. Αποτελείται από 4 υπομονάδες και ανευρίσκεται σε 2 ισομορφές (Kaminski HJ, Ruff RL, 1993, Lindstrom J, 2000, Lindstrom J, 2003). Ο Υ-ΑΚΧ στον ενήλικα αποτελείται από δύο α-υπομονάδες και ένα αντίγραφο από κάθε μία από τις β-, δ-, και ε-υπομονάδες, ενώ ο εμβρυϊκός Υ-ΑΚΧ περιέχει μια γ- αντί της ε-υπομονάδας. Μεταξύ των υπομονάδων του Υ-ΑΚΧ υπάρχει υψηλή ομολογία στην αλληλουχία των αμινοξέων, με κάθε μία υπομονάδα να περιέχει τέσσερις α-έλικες (Μ1 έως Μ4) οι οποίες εκτείνονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Τα εξωκυττάρια τμήματα των υπομονάδων, που αποτελούνται από τα αμινοτελικά και καρβοξυτελικά άκρα και την περιοχή μεταξύ Μ2 και Μ3, δημιουργούν ένα μεγάλο εξωκυττάριο «προθάλαμο» (vestibule) ο οποίος περιβάλλει το εξωκυττάριο στόμιο του διαύλου. Οι περιοχές μεταξύ Μ1 και Μ2 και μεταξύ Μ3 και Μ4 σχηματίζουν ένα μικρότερο «προθάλαμο» γύρω από το ενδοκυττάριο στόμιο του ιοντικού διαύλου (Unwin N, et al, 1988, Unwin N, 1996). Ο νικοτινικός Υ-ΑΚΧ του σκελετικού μυός έχει μία μεγάλη εξωκυττάρια επιφάνεια που του δίνει τη δυνατότητα να σχηματίζει πολλούς επιτόπους για σύνδεση με αυτοαντισώματα και να διευκολύνει την ταυτόχρονη δέσμευση διαφορετικών αντισωμάτων (Hughes BW, et al, 2004).

Το σημείο σύνδεσης της ακετυλοχολίνης είναι στην εξωτερική επιφάνεια του

εξωκυττάριου τμήματος του Υ-ΑΚΧ . Το κανάλι του υποδοχέα για να ανοίξει συνήθως απαιτεί σύνδεση με δύο μόρια ακετυλοχολίνης. Η κύρια ανοσογόνος περιοχή (ΚΑΠ) βρίσκεται στην ανώτερη εξωτερική θέση της εξωκυττάριας μοίρας του Υ-ΑΚΧ (Beroukhim R, Unwinn N, 1995). Η περιοχή αυτή είναι το σημείο όπου κατευθύνονται τα περισσότερα αντισώματα στην κλινική και πειραματική αυτοάνοση μυασθένεια (Tzartos SJ, Lindstrom J, 1980, Tzartos Sj, et al, 1998). Κάθε Υ-ΑΚΧ έχει δυο κύριες ανοσογόνες περιοχές πού ευρίσκονται στην αμινοτελική απόληξη της α-υποομάδας μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων 67 και 76 της α-υπομονάδας (Tzartos SJ, Lindstrom J, 1980, Tzartos Sj, et al, 1998). Η ενδοκυττάρια μοίρα του Υ-ΑΚΧ είναι μικρή και αρνητικά φορτισμένη, έχει δε σημεία σύνδεσης για κυτταροσκελετικές και ρυθμιστικές πρωτεΐνες όπως είναι οι πρωτεϊνοκινάσες (Tzartos SJ, Lindstrom J, 1980, Qu Z, et al, 1990).

Ο Υ-ΑΚΧ του ενήλικα μπορεί να διαχωρισθεί από τον εμβρυϊκό Υ-ΑΚΧ με βάση ηλεκτροφυσιολογικά χαρακτηριστικά. Οι δίαυλοι στον ενήλικα έχουν βραχύτερους μέσους χρόνους διάνοιξης και η αγωγιμότητά τους είναι 50% μεγαλύτερη σε σχέση με τους διαύλους του εμβρύου. Οι διαφορές μεταξύ των διαύλων του Υ-ΑΚΧ στον ενήλικα και το έμβρυο οφείλονται στην αντικατάσταση της γ- με την ε-υπομονάδα. Η φωσφορυλίωση αλλά και άλλες μορφές μεταμεταφραστικής τροποποίησης, μπορούν να μεταβάλλουν τις ιδιότητες του Υ-ΑΚΧ, και ιδιαίτερα η φωσφορυλίωση υπομονάδων του φαίνεται ότι ρυθμίζει την απευαισθητοποίηση η οποία επάγεται από αγωνιστές (Kaminski HJ, Ruff RL, 1993, Hughes BW, et al, 2004).

<u>Σχηματισμός της νευρομυϊκής σύναψης και η ειδική για τον μυ κινάση (MuSK)</u>

Η ανάπτυξη της ΝΜΣ απαιτεί σύνθετες διαντιδράσεις μεταξύ των αναπτυσσόμενων κινητικών νευρώνων και των μυϊκών ινών (Sanes JR, Lichtman J,

2001, Arber S, et al, 2002). Η παρούσα γνώση εισηγείται, ότι η αγκρίνη (agrin), μία πρωτεΐνη η οποία συντίθεται από τους κινητικούς νευρώνες και εναποτίθεται σταθερά μέσα στη συναπτικό βασικό πέταλο(synaptic basal lamina), διεγείρει μία ειδική για τον μυ κινάση (Muscle-specific kinase, MuSK), έναν υποδοχέα κινάσης της τυροσίνης, που εκφράζεται εκλεκτικά στον σκελετικό μυ (Hughes BW, et al, 2004).

Η πρωτεΐνη MuSK πιστεύεται ότι προκαλεί τη συσσώρευση στην ΝΜΣ, σημαντικών μετασυναπτικών πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων των Y-AKX (εικόνα 4) (Ruegg MA, Bixby JL, 1998).

Επίμυες οι οποίοι έχουν ένδεια αγκρίνης ή MuSK αδυνατούν να σχηματίσουν νευρομυϊκές συνάψεις και ως αποτέλεσμα αυτού πεθαίνουν στη γέννηση, λόγω αδυναμίας να κινηθούν ή να αναπνεύσουν (Gautam M, Noakes PG, et al, 1996, Glass DJ, Bowen DC, et al, 1996). Επίμυες με μεταλλαγμένη MuSK δεν συγκεντρώνουν Y-AKX ή άλλες συναπτικές πρωτεΐνες στην ΝΜΣ, αλλά μάλλον αυτές οι πρωτεΐνες εκφράζονται ομοιόμορφα κατά μήκος της μυϊκής ίνας.

Ο ακριβής μηχανισμός μέσω του οποίου η αγκρίνη ενεργοποιεί την MuSK δεν έχει ξεκαθαρισθεί (Wickelgren I, 1996, Wallace B, 1997). Η αγκρίνη διεγείρει την ταχεία φωσφορυλίωση υπολειμμάτων τυροσίνης της MuSK, εύρημα το οποίο είναι συμβατό με την ιδέα ότι η MuSK είναι ένας υποδοχέας (ή συστατικό ενός σύνθετου υποδοχέα), για την αγκρίνη. Από την άλλη πλευρά, αναγκαστική έκφραση της MuSK σε ινοβλάστες ή μυοβλάστες δεν οδηγεί στην φωσφορυλίωσή της από την αγκρίνη (Glass DJ, et al, 1996). Επίσης ανασυνδυασμένη αγκρίνη δεν συνδέεται με τη MuSK in vitro, γεγονός που εισηγείται ότι επιπλέον συστατικά, τα οποία μπορεί να εκφράζονται στις σκελετικές μυϊκές ίνες, αλλά όχι στους μυοβλάστες ή τους ινοβλάστες, αποτελούν ουσιαστικά στοιχεία κατά τη διαδικασία ενεργοποίησης της MuSK από την αγκρίνη. Όπως θα περιγραφεί παρακάτω, η MuSK έχει αναγνωρισθεί

ως ένας αντιγονικός στόχος σε ασθενείς με μυασθένεια, οι οποίοι είναι οροαρνητικοί για αντισώματα εναντίον του Y-AKX (Hughes BW, et al, 2004).

Παράγων ασφαλείας για τη νευρομυϊκή σύναψη

Διαταραχή του παράγοντος ασφαλείας για τη νευρομυϊκή διαβίβαση είναι συνήθης σε όλες τις παθήσεις της νευρομυϊκής διαβίβασης (Wood SJ, Slater CR, 2001). Ως παράγων ασφαλείας ορίζεται ο λόγος του εύρους του δυναμικού τελικής κινητικής πλάκας προς της διαφορά μεταξύ του δυναμικού ενεργείας της μεμβράνης και της ουδού του δυναμικού που απαιτείται για την έναρξη ενός δυναμικού ενεργείας. Φυσιολογικά, οι τελικές νευρικές απολήξεις απελευθερώνουν AKX σε επαρκή ποσότητα για να επάγει ένα δυναμικό τελικής κινητικής πλάκας, το οποίο είναι μεγαλύτερο από την ουδό που απαιτείται για να αρχίσει ένα δυναμικό ενεργείας και συνεπώς, ο παράγων ασφαλείας είναι αρκετά μεγάλος. Η απελευθέρωση της AKX από τα κυστίδια υπό μορφή «πακέτων AKX», οι ιδιότητες αγωγιμότητας των Y-AKX, η πυκνότητα των Y-AKX, και η δραστηριότητα της ακετυλοχολινεστεράσης συνεισφέρουν θετικά στο δυναμικό της τελικής κινητικής πλάκας και στον παράγοντα ασφαλείας. Η συγκέντρωση των διαύλων νατρίου στη μετασυναπτική επιφάνεια επηρεάζει τον παράγοντα ασφαλείας, κάνοντας την ουδό του δυναμικού ενεργείας να μπορεί να επιτευχθεί πιο εύκολα. Επιπροσθέτως, η αρχιτεκτονική των συναπτικών πτυχών η οποία επιτρέπει στο «ρεύμα» να συγκεντρώνεται στους διαύλους νατρίου, μεγενθύνει το δυναμικό της τελικής κινητικής πλάκας. Η δραστηριότητα της ακετυλοχολινεστεράσης τερματίζει τη δράση της AKX και η αναστολή της θα μεγεθύνει την ενεργοποίηση του Y-AKX. Μετασυναπτικοί παράγοντες επηρεάζουν και αυτοί τον παράγοντα ασφαλείας. Η επαναλαμβανόμενη διέγερση μειώνει την απελευθέρωση της AKX, γεγονός που κάτω από φυσιολογικές συνθήκες θα ελαττώσει το δυναμικό της τελικής κινητικής πλάκας, αλλά όχι σε

τέτοιο βαθμό ώστε να εμποδίσει τη δημιουργία δυναμικού ενεργείας. Όμως σε παθολογικές καταστάσεις, όπως η μυασθένεια, αυτή η ελάττωση μπορεί να είναι αρκετή ώστε να οδηγήσει σε ανεπάρκεια της νευρομυϊκής μεταβίβασης (Hughes BW, et al, 2004).

ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΒΑΡΕΙΑΣ ΜΥΑΣΘΕΝΕΙΑΣ

Η μυασθένεια πληροί τα κριτήρια τα οποία ορίζουν τις δια αντισώματος μεσολαβούμενες αυτοάνοσες διαταραχές: 1) αντισώματα εναντίον των Y-AKX ανιχνεύονται σε 80-90% των ασθενών (Lindstrom JM, et al, 1976), 2) υπάρχει εναπόθεση ανοσοσφαιρίνης G (IgG) στη νευρομυϊκή σύναψη, που είναι η περιοχή που προσβάλλεται στη μυασθένεια (Engel AG, et al, 1977), 3) η χορήγηση IgG από ασθενείς με μυασθένεια σε πειραματόζωα, αναπαράγει τις χαρακτηριστικές κλινικές εκδηλώσεις της νόσου (Toyka KV, et al, 1977), 4) θεραπείες οι οποίες ελαττώνουν τη συγκέντρωση στον ορό των αντι- Y-AKX αντισωμάτων, βελτιώνουν τη μυϊκή αδυναμία (Pinching AJ, et al, 1976), και 5) μυασθένεια επάγεται σε ζώα μετά από ανοσοποίηση με «καθαρμένο» Y-AKX, γεγονός το οποίο υποστηρίζει επίσης την άποψη ότι μια ανοσολογική αντίδραση που κατευθύνεται εναντίον του Y-AKX ευθύνεται για τη νόσο (Patrick J, Lindstrom J, 1973, Hughes BW, et al, 2004).

Τα αντισώματα εναντίον των Y-AKX είναι πολυκλωνικά και αναγνωρίζουν ένα ετερογενές ρεπερτόριο επιτόπων, το οποίο ποικίλει μεταξύ των ασθενών (Lindstrom J , 2000, Lindstrom J, 2003, Conti-Fine B, et al, 1997, Conti-Fine BM, Kaminski HJ, 2001).

Η πρόσδεση των αυτοαντισωμάτων στον Y-AKX οδηγεί σε απώλεια των λειτουργικά διαθέσιμων υποδοχέων στην νευρομυϊκή σύναψη μέσω τριών μηχανισμών (εικόνα 6):

1) Αντιγονική τροποποίηση. Τα αυτοαντισώματα επειδή είναι δισθενή, συνδέουν

γειτονικούς Υ-ΑΚΧ στην επιφάνεια του κυττάρου, με αποτέλεσμα την αύξηση του ρυθμού ενδοκυττάρωσής τους κατά 2-3 φορές. Κατά την ενδοκυττάρωση σχηματίζονται αβαθείς εγκολπώσεις που κλείνουν με τη δημιουργία ασκιδίων τα οποία πιθανώς είναι σχηματισμοί κλαθρίνης και καταλήγουν στα λυσοσώματα. Ακολουθεί ενζυμική αποδόμηση των Υ-ΑΚΧ. 2) Δράση του συμπληρώματος. Πρόσδεση του συμπληρώματος στο σύμπλοκο Υ-ΑΚΧ–αντίσωμα, επιφέρει λύση και καταστροφή της μυϊκής μεμβράνης που περιέχει τους Υ-ΑΚΧ. Παρουσία C3 και C9 σε θραύσματα μεμβράνης έχει διαπιστωθεί με ηλεκτρονική μικροσκοπία (Hughes BW, et al, 2004). Ο πιο σημαντικός μηχανισμός βλάβης της νευρομυϊκής μεταβίβασης είναι η δια αντισώματος μεσολαβούμενη ενεργοποίηση του συμπληρώματος, και αυτό υποστηρίζεται από αρκετές πειραματικές μελέτες (Sahashi K, et al, 1980, Nakano S, Engel AG, 1993, Lennon VA, et al, 1978, Corey AL, et al, 1987, Miwa T, Song WC, 2001, Lin F, et al, 2002, Walport MJ, 2001).

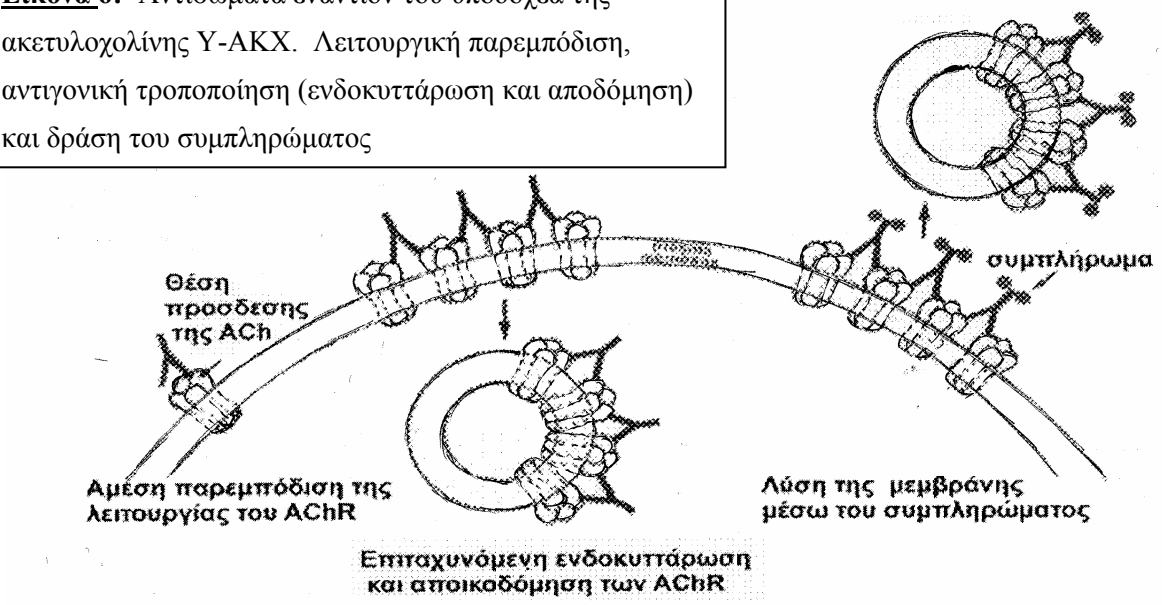
3) Λειτουργική παρεμπόδιση. Ένα μικρό κλάσμα των αντισωμάτων εναντίον των Υ-ΑΚΧ προσδένονται κοντά ή και πάνω στη θέση πρόσδεσης της ακετυλοχολίνης, παρεμποδίζοντας τη λειτουργία του υποδοχέα (Τζάρτος Σ, 1990, Τζάρτος Σ, Πουλάς Κ, 2004)

Γενικά, θεωρείται ότι στην παθογένεια της μυασθένειας, δεν συνεισφέρει σημαντικά η απευθείας, άμεση, επίδραση των αντισωμάτων στη λειτουργία των Υ-ΑΚΧ, αλλά ορισμένοι ασθενείς έχουν και τέτοια αντισώματα. Τα αντισώματα αυτά μπορούν να συνεισφέρουν στην μυασθενική αδυναμία και θα μπορούσαν να προκαλέσουν οξεία μυασθενική κρίση. Σε ζώα επάγουν την εμφάνιση μίας μοναδικής μορφής σοβαρής πειραματικής αυτοάνοσης μυασθένειας (Gomez CM, Richman DP, 1985, Hughes BW, et al, 2004).

Τα πιο παθογόνα αντισώματα εναντίον των Υ-ΑΚΧ προσδένονται σε ένα

εξωκυττάριο τμήμα της α-υπομονάδας του υποδοχέα που καλείται «κύρια ανοσογόνος περιοχή» (ΚΑΠ) (Tzartos S, et al, 1982). Η ΚΑΠ περιοχή, όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, είναι διαφορετική από τη θέση πρόσδεσης της ακετυλοχολίνης και δεν εμπλέκεται στη λειτουργία του ιονικού καναλιού. Το κύριο τμήμα της εκτείνεται μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων 67 και 76 της α-υπομονάδας του υποδοχέα. Πρόκειται για μια φυλογενετικά συντηρημένη περιοχή που προβάλει στην κορυφή του μορίου και ίσως σχηματίζει ένα ευκίνητο τμήμα που εύκολα προσεγγίζεται από τα ανοσοειδικά κύτταρα, γεγονός που εξηγεί την ισχυρή αντιγονικότητά της (Τζάρτος Σ, 1994).

Εικόνα 6: Αντισώματα εναντίον του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης Y-AKX. Λειτουργική παρεμπόδιση, αντιγονική τροποποίηση (ενδοκυττάρωση και αποδόμηση) και δράση του συμπληρώματος



Αν και η ΚΑΠ είναι εντοπισμένη σε μία μικρή περιοχή, φαίνεται ότι αποτελείται από αλληλοεπικαλυπτόμενους αντιγονικούς καθοριστές, όπως συμπεραίνεται από την ετερογένεια που έχουν τα αντι-ΚΑΠ αντισώματα και από τη μικρή έκταση διασταυρωτών αντιδράσεων με αντιϊδιοτυπικά αντισώματα (Τζάρτος Σ, 1994).

Μια σειρά από πειραματικό δεδομένα υποστηρίζουν τον κεντρικό ρόλο της ΚΑΠ

στη μυασθένεια. Τα αντι-ΚΑΠ μονοκλωνικά αντισώματα είναι πολύ αποτελεσματικά στην επιτάχυνση της καταστροφής των υποδοχέων μέσω του μηχανισμού της αντιγονικής τροποποίησης σε καλλιέργειες μυϊκών κυττάρων (Tzartos SJ, et al, 1985), καθώς και στην πρόκληση αντιγονικής τροποποίησης in vivo (Loutrari H, et al, 1992). Έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν το συμπλήρωμα in vivo και in vitro. Είναι επίσης αποτελεσματικά στη μεταφορά της πειραματικής μυασθένειας σε επίμυες. Τέλος, τα δισθενή $F(ab')_2$ θραύσματα των αντι-ΚΑΠ μονοκλωνικών αντισωμάτων διατηρούν την ικανότητα πρόκλησης αντιγονικής τροποποίησης (Loutrari H, et al, 1992).

Αντίθετα από τα δισθενή αντι-ΚΑΠ μονοκλωνικά, τα μονοσθενή Fab θραύσματά τους δεν προκαλούν καταστροφή των Υ-ΑΚΧ σε κυτταροκαλλιέργειες ούτε προκαλούν μυασθένεια σε πειραματόζωα, προφανώς επειδή δεν διασυνδέουν τους Υ-ΑΚΧ και δεν προσδένουν το συμπλήρωμα. Αντίθετα, τα Fab αυτά όταν δοθούν σε καλλιέργειες μυϊκών κυττάρων προσδένονται στους Υ-ΑΚΧ και τους προστατεύουν από την αποικοδομητική δράση των μετέπειτα προστιθέμενων ορών από μυασθενικούς ασθενείς (Tzartos SJ, et al, 1985). Η παρατήρηση αυτή δείχνει ότι τα αντι-ΚΑΠ αντισώματα των ασθενών με μυασθένεια (δηλαδή αυτά που παρεμποδίζονται να προσδεθούν στην Υ-ΑΚΧ) είναι το κυρίως παθογόνο κλάσμα των αντισωμάτων εναντίον των Υ-ΑΚΧ.

Είναι πλέον σαφές ότι η μυασθένεια οφείλεται σε αντισώματα τα οποία προσδένονται στον μυϊκό Υ-ΑΚΧ και τον εξαφανίζουν ή αδρανοποιούν (Τζάρτος Σ, 1994).

Το αίτιο που προκαλεί και συντηρεί την ανοσολογική απάντηση κατά του Υ-ΑΚΧ στη μυασθένεια είναι άγνωστο. Πιθανά υπάρχουν πολλαπλοί μηχανισμοί σε διάφορες ομάδες ασθενών με τελική κοινή κατάληξη την αυτοάνοση απάντηση (Τζάρτος Σ,

1994, Πουλάς Κ, Τζάρτος Σ, 2004).

Η αυξημένη συχνότητα συγκεκριμένων δεικτών αντιγόνων ιστοσυμβατότητας όπως είναι οι Β8 και DA3 σε ομάδες ασθενών με μυασθένεια, υποδεικνύει ότι άτομα με ορισμένα γονίδια ανοσοαπάντησης είναι πιο ευπαθή στη νόσο. Η γενετική αυτή προδιάθεση δεν είναι απόλυτη καθώς ένας αριθμός αγνώστων περιβαλλοντολογικών παραγόντων παίζει σημαντικό ρόλο στην πυροδότηση της ανοσοαπάντησης.

Είναι γνωστό ότι η παραγωγή των αντισωμάτων εναντίον των Υ-ΑΚΧ στη μυασθένεια, είναι εξαρτώμενη από τα Τ–λεμφοκύτταρα. Για την ενεργοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων απαιτείται αναγνώριση του συμπλόκου ΜΗC-αντιγόνου από τον υποδοχέα των Τ-λεμφοκυττάρων («καθοριζόμενη από το ΜΗC αναγνώριση αντιγόνου»). Η ενεργοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων επιτυγχάνεται είτε μέσω των συμβατικών μακροφάγων (δενδριτικών κυττάρων) είτε μέσω των ειδικών για τον Υ-ΑΚΧ Β-λεμφοκυττάρων, που φέρουν στην επιφάνειά τους τα αντισώματα ενάντια στους Υ-ΑΚΧ (Willcox N, 1993, Zhang Y, et al, 1988). Και στις δύο περιπτώσεις έχουμε ενδοκυττάρωση του Υ-ΑΚΧ, πέψη, επεξεργασία και παρουσίαση των πεπτιδίων του στα Τ-λεμφοκύτταρα. Τα ενεργοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες και παράγοντες διαφοροποίησης για τα Β-λεμφοκύτταρα. Αυτοί δρουν κυρίως στα αντι-Υ-ΑΚΧ Β-λεμφοκύτταρα, όχι με ειδικό τρόπο, αλλά μάλλον επειδή τα τελευταία βρίσκονται σε επαφή με τα Τ-λεμφοκύτταρα, ενώ τα μη ειδικά Β-λεμφοκύτταρα είναι απομακρυσμένα (Τζάρτος Σ, 1994).

Οι περισσότερες θέσεις πρόσδεσης των Τ-λεμφοκυττάρων επί του Υ-ΑΚΧ είναι διαφορετικές από αυτές των Β. Μεταξύ των ειδικών για τον Υ-ΑΚΧ Τ -λεμφοκυττάρων, τα πιο αποτελεσματικά είναι εκείνα έναντι της α υπομονάδας του Υ-ΑΚΧ. Δυστυχώς, φαίνεται ότι υπάρχει μεγάλη ετερογένεια στους επίτοπους του Υ-ΑΚΧ για τα Τ-λεμφοκύτταρα, γεγονός που δημιουργεί σοβαρά εμπόδια στον

σχεδιασμό ειδικών θεραπευτικών προσεγγίσεων (Wilcox N, 1993, Drachman DB, et al, 1993, Τζάρτος Σ, 1994).

Στον ορό ασθενών με μυασθένεια έχουν βρεθεί επίσης και αντισώματα εναντίον των παρακάτω πρωτεϊνών των σκελετικών μυών: της τιτίνης, του υποδοχέα της ρυανοδίνης, της μυοσίνης, τροπομυοσίνης, τροπονίνης, α-ακτινίνης και ακτίνης (Aarli JA, et al, 1990, Skeie GO, et al, 1995, Skeie GO, et al, 1998).

Η αιτιοπαθογενετική σημασία αυτών των αντισωμάτων δεν είναι γνωστή (Hughes BW, et al, 2004).

Οι ασθενείς που έχουν μεγαλύτερη ηλικία κατά την έναρξη της νόσου, εμφανίζουν συχνότερα αντισώματα εναντίον της δομικής πρωτεΐνης τιτίνης και η νόσος είναι συνήθως βαρύτερη (Skeie GO, et al, 1995). Οι ασθενείς με θύμωμα τείνουν να είναι θετικοί όχι μόνο για αντισώματα εναντίον της τιτίνης, αλλά και για αντισώματα εναντίον του υποδοχέα της ρυανοδίνης. Τέτοιοι ασθενείς έχει βρεθεί να εμφανίζουν συνοδό μυοκαρδίτιδα ή μυοσίτιδα (Mygland Å, et al, 2000).

Περίπου 10-20% των ασθενών με γενικευμένη μυασθένεια είναι αρνητικοί για αντισώματα εναντίον του Y-AKX και έχει πρόσφατα βρεθεί ότι ποσοστό περίπου 30-40% από αυτούς τους ασθενείς έχουν αυτοαντισώματα εναντίον της πρωτεΐνης MuSK(muscle-specific kinase) (Hoch W, et al, 2001, Evoli A, et al, 2003, Vincent A, et al, 2003). Όπως έχει προηγούμενα αναφερθεί η MuSK είναι μια κινάση της τυροσίνης, η οποία παίζει ρόλο στη συσσώρευση των Y-AKX στη μετασυναπτική μεμβράνη σε συνεργασία με την αγκρίνη, μια εκκρινόμενη στη νευρομυϊκή σύναψη πρωτεΐνη.

Αν και ορισμένα αντι-MuSK αντισώματα διαταράσσουν τη λειτουργία των Y-AKX, εν τούτοις δεν έχουν προσδιορισθεί συγκεκριμένοι παθογενετικοί μηχανισμοί.

Κάποιοι θεωρούν ότι τα MuSK αντισώματα διαταράσσουν την νευρομυϊκή μεταβίβαση επηρεάζοντας την συσσώρευση των Υ-ΑΚΧ στην νευρομυϊκή σύναψη. Το προφίλ των αντισωμάτων στους ασθενείς με μυασθένεια εισηγείται διαφορές στην ανοσοπαθογένεια της νόσου (Hughes BW, et al, 2004).

Ο ρόλος του θύμου στην παθογένεια της μυασθένειας

Ο θύμος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην επαγωγή της ανοχής προς τα αντιγόνα «του ιδίου» και στην ανταπόκριση των λεμφοκυττάρων στα ξένα αντιγόνα (Conti-Fine BM, Kaminski HJ, 2001, Vincent A, et al, 2001). Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, αρχέγονα κύτταρα (stem cells) του μυελού των οστών εμφανίζονται στο υποκαψικό επιθήλιο του θύμου, όπου αρχίζει να λαμβάνει χώρα μία τυχαία διαδικασία αναδιάταξης γονιδίων. Αυτή η διαδικασία συμβαίνει στις περιοχές που θα κωδικοποιούν τους υποδοχείς αντιγόνων των Τ-κυττάρων. Τα ανώριμα Τ- κύτταρα περνούν διαμέσω του φλοιού του θύμου και εκείνα τα οποία αναγνωρίζουν τα αντιγόνα του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC), περνούν στον μυελό. Η πλειοψηφία των ανώριμων Τ- κυττάρων τα οποία δεν αναγνωρίζουν τα «ίδια» αντιγόνα του MHC, εξαλείφονται. Κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου στο φλοιό του θύμου, τα Τ-κύτταρα τα οποία θα αντιδρούσαν εναντίον αντιγόνων του «ιδίου», απομακρύνονται επίσης. Ωστόσο οι μηχανισμοί μέσω των οποίων συμβαίνει αυτό, δεν είναι γνωστοί. Τα Τ- κύτταρα που περνούν στο μυελό, διαφοροποιούνται σε επικουρικά και κατασταλτικά Τ-κύτταρα και τελικά απελευθερώνονται στην περιφέρεια (Hughes BW, et al, 2004).

Υπάρχουν πολλές ενδείξεις που υποστηρίζουν το γεγονός ότι ο θύμος εμπλέκεται στην παθογένεια της μυασθένειας (Hughes BW, et al, 2004). Παθολογικές διαταραχές, όπως η λεμφοζιδιακή υπερπλασία και η ύπαρξη θυμώματος είναι συχνές σε ασθενείς με μυασθένεια (Holed R, Wekerle H, 1994). Πιο συγκεκριμένα στο 70%

των ασθενών υπάρχει υπερπλασία (Παπαπετρόπουλος Θ, 1990, Nicolle MW, 2002) και στο 10-15% των ασθενών θύμωμα (Kesler KA, et al, 2004).

Ο μυασθενικός θύμος περιέχει ανώμαλα αυξημένες ποσότητες ωρίμων Τ-λεμφοκυττάρων. Τα θυμώματα και ο μυασθενικός θύμος είναι «εμπλουτισμένα» σε Υ-ΑΚΧ-αντιδραστικά Τ-κύτταρα (Sommer N, et al, 1990). Όταν τμήματα μυασθενικού θύμου μεταμοσχεύονται σε επίμυες με σοβαρή συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια, αυτοί παράγουν ανθρώπινα αντισώματα τα οποία συνδέονται στον Υ-ΑΚΧ (Schonbeck S, et al, 1992). Οι περισσότεροι μυασθενικοί θύμοι, ιδιαίτερα οι υπερπλαστικοί θύμοι με βλαστικά κέντρα, περιέχουν Β- κύτταρα ικανά να παράγουν αντισώματα εναντίον των Υ-ΑΚΧ. Στον άνθρωπο, φυσιολογικοί και μυασθενικοί θύμοι εκφράζουν προϊόντα μεταγραφής γονιδίων και επιτόπους όλων των υπομονάδων των Υ-ΑΚΧ (Zheng Y, et al, 1999, Kaminski HJ, et al, 1993, Navaneetham D, et al, 2001). Η έκφραση στο θύμο αντιγονικά παρόμοιων πρωτεϊνών με τους Υ-ΑΚΧ θα μπορούσε να παρέχει μία πηγή αντιγόνων για αυτοευαισθητοποίηση των Τ-κυττάρων εναντίον των Υ-ΑΚΧ των σκελετικών μυών. Επιπλέον, η θυμεκτομή εμφανίζεται να βελτιώνει την κλινική πορεία ασθενών με μυασθένεια (Gronseth GS, Barohn RJ, 2000, Hughes BW, et al, 2004).

ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΜΥΑΣΘΕΝΕΙΑΣ

Η μυϊκή αδυναμία αποτελεί το κυρίαρχο σύμπτωμα της μυασθένειας. Κατά σειρά συχνότητας προσβάλλονται οι οφθαλμικοί, οι προμηκικοί, οι μύες των άκρων και του κορμού. Όλοι οι γραμμωτοί μύες, ακόμη και οι εξωτερικοί σφιγκτήρες της κύστης και του ορθού, μπορούν να προσβληθούν (Παπαπετρόπουλος Θ, 1990).

Η συμπτωματολογία, που καθορίζεται από τις μυϊκές ομάδες που συμμετέχουν, όταν αφορά στους οφθαλμικούς μύες περιλαμβάνει διπλωπία ή απλή ασάφεια των ορίων των αντικειμένων, στραβισμό, πτώση του άνω βλεφάρου. Οι λείοι μύες της

κόρης, όπως και όλοι οι λείοι μύες, δεν προσβάλλονται και η κόρη διατηρεί φυσιολογικό μέγεθος. Οι σφιγκτήρες των κορών σπάνια παρουσιάζουν αποκάμνωση. Σε μια οφθαλμοπληγία, στην οποία η κόρη διατηρεί φυσιολογική διάμετρο και αντιδραστικότητα, η περισσότερο πιθανή διάγνωση είναι βαρεία μυασθένεια.

Οι μύες του προσώπου επίσης μπορεί να προσβληθούν και προκαλείται δυσχέρεια στο σφύριγμα και κάποτε χαρακτηριστική παραμόρφωση του χαμόγελου που θυμίζει περισσότερο σκυθρώπιασμα (γκρίνια, snarl) (Παπαπετρόπουλος Θ, 1990).

Η προσβολή των προμηκικών μυών εκδηλώνεται με δυσχέρεια στη μάσηση, την κατάποση και την ομιλία. Η επέκταση της μυϊκής αδυναμίας προς τους α-ναπνευστικούς μύες συνοδεύεται με δύσπνοια και κυάνωση και μπορεί άμεσα να απειλήσει τη ζωή του ασθενούς εάν δεν υπάρξει έγκαιρη αντιμετώπιση (τραχειοστομία-αναπνευστική υποστήριξη). Στην περιοχή του αυχένα θίγονται κυρίως οι εκτείνοντες μύες της κεφαλής και ο άρρωστος στηρίζει το κεφάλι, τοποθετώντας το χέρι του στο πηγούνι. Προκειμένου για τα άκρα υπάρχει συνήθως κάποια προτίμηση στους κεντρομελικούς μύες, τουλάχιστον στις ελαφρές ή αρχόμενες περιπτώσεις (Παπαπετρόπουλος Θ, 1990).

Εκείνο που ιδιαίτερα χαρακτηρίζει την πάθηση είναι η κυμαινόμενη μυϊκή αδυναμία και η γρήγορη εξάντληση των σκελετικών μυών κατά την προσπάθεια. Αυτό έχει σαν συνέπεια τα ευρήματα να ποικίλλουν από τη μία εξέταση στην άλλη και η συμπτωματολογία να επηρεάζεται από την σωματική κόπωση.

Το διάβασμα ή η παρακολούθηση τηλεόρασης εκλύουν διπλωπία ή επιδεινώνουν την ήδη υπάρχουσα διπλωπία. Η ομιλία στο ξεκίνημά της έχει φυσιολογική χροιά και ένταση αλλά προοδευτικά γίνεται ένρινη, αδύνατη, ακατάληπτη. Το ίδιο επιδεινώνεται η μάσηση, αλλά και όλες οι κινητικές λειτουργίες, με την παράταση της μυϊκής προσπάθειας. Αντίθετα, η ανάπαυση και φυσικά ο ύπνος, βελτιώνουν ή

και εξαφανίζουν πολλά από τα συμπτώματα. Οι άρρωστοι τις πρωινές ώρες είναι γενικά καλύτερα, σε σύγκριση με τις βραδινές ώρες, ή ακόμα μπορεί να είναι και ελεύθεροι συμπτωμάτων όταν ξυπνούν. Η μοναδική για τη μυασθένεια, συμπεριφορά των σκελετικών μυών στην άσκηση, αξιοποιείται μαζί με το ιστορικό των διακυμάνσεων της συμπτωματολογίας στο διάστημα του εικοσιτετραώρου, για τη διάγνωση της παθήσεως (Παπαπετρόπουλος Θ, 1990).

Ο ασθενής υποβάλλεται σε κλινικές δοκιμασίες κόπωσης και καταγράφονται οι επιπτώσεις. Θα του ζητηθεί για παράδειγμα να κοιτάξει παρατεταμένα προς τα πάνω (θα προκληθεί τότε πτώση των βλεφάρων ή διπλωπία) ή να κάνει επανειλημμένα βαθιά καθίσματα (δεν θα μπορέσει να αντέξει περισσότερο από 3-5) ή θα του ζητηθεί να κρατήσει το άνω άκρο σε έκταση (σύντομα τα χέρια του θα πέσουν). Η σωματική ανάπαυση πρέπει να τονισθεί ότι στις προχωρημένες περιπτώσεις απλώς βελτιώνει τη μυϊκή ισχύ. Παραμένει όμως μυϊκή αδυναμία, η οποία δύσκολα κάποτε ανατάσσεται, ακόμη και με τη φαρμακευτική αγωγή (Παπαπετρόπουλος Θ, 1990).

Εκτός από τη μυϊκή αδυναμία με τα επακόλουθα συμπτώματα και σημεία, η νευρολογική εξέταση δεν προσθέτει άλλα ουσιαστικά ευρήματα. Τα τενόντια αντανακλαστικά είναι φυσιολογικά ή κάποτε ζωηρά. Εάν ένα αντανακλαστικό παραχθεί πολλές φορές, τελικά παύει να παράγεται (καταργείται). Ο μυϊκός όγκος είναι συνήθως φυσιολογικός αλλά μυϊκή ατροφία είναι δυνατόν να παρατηρηθεί σε μεμονωμένους μύες. Σε προχωρημένες περιπτώσεις μπορεί να υπάρχει γενικευμένη ατροφία (καχεξία), η οποία είναι κυρίως συνέπεια της αχρησίας των μυών.

Αισθητικές διαταραχές μπορεί να παρατηρηθούν στην μυασθένεια, αλλά αυτές είναι υποκειμενικού τύπου. Είναι συχνό το μυϊκό άλγος, ιδιαίτερα στον αυχένα και γύρω από τα μάτια και αποδίδεται στην παρατεταμένη προσπάθεια των υγιών μυών

να αναπληρώσουν άλλους μύες, η ισχύς των οποίων έχει εκπέσει. Οι μετωπιαίοι μύες για παράδειγμα βρίσκονται σε μάταια υπερπροσπάθεια για να ανελκύσουν τα πεσμένα βλέφαρα, με συνέπεια άλγος στις προσφύσεις τους

ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

Περίπου στο ήμισυ των περιπτώσεων η εισβολή της παθήσεως γίνεται από τους οφθαλμοκινητικούς μύες, στο 1/3 από τους προμηκικούς και μόνο στο 1/5 από τους μύες των άκρων. Η πορεία της μυασθένειας κυμαίνεται σε ευρέα όρια. Αυτό έχει σαν συνέπεια, η πρόβλεψη της έκβασης της νόσου σε οποιονδήποτε ασθενή με πρόσφατη έναρξη συμπτωμάτων να είναι εξαιρετικά δύσκολη αν όχι αδύνατη. Η μυασθένεια σε μερικές περιπτώσεις παραμένει εντοπισμένη στην περιοχή ενάρξεως, για παράδειγμα, στους οφθαλμικούς μύες (οφθαλμική μυασθένεια) ή συνηθέστερα επεκτείνεται με άλλοτε άλλη ταχύτητα (σε εβδομάδες ή μήνες), για να συμπεριλάβει τη μια μυϊκή ομάδα μετά την άλλη. Άλλοτε υπάρχει από την αρχή γενικευμένη βαριά αδυναμία και η πρόγνωση είναι βαρύτερη (Παπαπετρόπουλος Θ, 1990, Keesey JC, 2004).

Ακόμη όμως και οι περιπτώσεις που έχουν σταθεροποιηθεί σε κάποιο επίπεδο, εμφανίζουν έκδηλη διακύμανση στη βαρύτητα των παραλύσεων.

Να σημειωθεί επίσης ότι στα πρώτα 1-2 χρόνια από την έναρξη της μυασθένειας είναι δυνατόν να παρατηρηθούν αυτόματες υφέσεις των συμπτωμάτων, διάρκειας ενός μηνός ή και περισσότερο.

Και η εισβολή και η υποτροπή της νόσου μπορεί να συνδεθούν με διαφόρους εκλυτικούς παράγοντες (ψυχική τάση, λοιμώξεις, εγκυμοσύνη κ.λ.π). Οι υποτροπές ιδιαίτερα, συνδέονται με την κλιμακτήριο, με εμβολιασμούς, με τη λήψη ορισμένων φαρμάκων (αντιβιοτικών, όπως αμινογλυκοσίδες-τετρακυκλίνες, κινίνης, μορφίνης, ορισμένων αναισθητικών κ.α.) και με δυσμενείς κλιματολογικές συνθήκες (πολύ

κρύο ή ζέστη) (Παπαπετρόπουλος Θ, 1990, Keesey JC, 2004).

Παλαιότεροι ερευνητές, οι οποίοι είχαν λιγότερες δυνατότητες για θεραπευτική παρέμβαση σε σχέση με σήμερα, υποστήριζαν ότι η πλήρης έκταση της μυϊκής προσβολής ήταν συνήθως εμφανής μέσα σε 3 έως 7 χρόνια από την έναρξη της μυασθένειας, παρόλο που κάποιοι ασθενείς εμφάνιζαν υποτροπή ακόμη και 10 με 20 χρόνια από την έναρξη της. Οι νεότερες θεραπείες και κυρίως τα ανοσοκατασταλτικά φάρμακα αλλά και η θυμεκτομή, έχουν ευνοϊκά επηρεάσει την εξέλιξη της παθήσεως.

ΚΛΙΝΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΗΣ ΜΥΑΣΘΕΝΕΙΑΣ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗ ΒΑΡΥΤΗΤΑ

Μεταξύ των ασθενών με μυασθένεια, υπάρχει διαφορά στις μυϊκές ομάδες που κυρίως προσβάλλονται, αλλά και στη σοβαρότητα της μυϊκής προσβολής, η οποία μπορεί να ποικίλει από πολύ ήπια έως πολύ σοβαρή μυϊκή αδυναμία (Keesey JC, 2004). Επιπλέον οι ασθενείς με μυασθένεια διαφέρουν ως προς την ταχύτητα με την οποία οι μύες τους εξαντλούνται και γίνεται εμφανής η μέγιστη μυϊκή αδυναμία. Η έκταση, η σοβαρότητα και η κλινική εξέλιξη της μυασθένειας φαίνονται να είναι σημαντικές παράμετροι και σχετίζονται με την πρόγνωση και την επιλογή της θεραπείας(Keesey JC, 2004).

Η κλασική (παραδοσιακή) ταξινόμηση της μυασθένειας κατά Osserman, (Osserman KE, 1958) που έγινε πριν 50 περίπου χρόνια, προσπάθησε να λάβει υπόψη όλα αυτά τα στοιχεία. Αρχικά ο Osserman διέκρινε την παιδιατρική μυασθένεια σε νεογνική (σε βρέφη μητέρων με μυασθένεια) και νεανική (σε βρέφη μη μυασθενικών μητέρων). Στη συνέχεια διέκρινε την μυασθένεια των ενηλίκων (adult-onset) σε αυτή που περιορίζεται στους οφθαλμικούς μύες (τύπος Ι, οφθαλμική μυασθένεια) και στη γενικευμένη μυασθένεια. Η γενικευμένη μυασθένεια διακρίνεται περαιτέρω σε ήπιας βαρύτητας (τύπος ΙΙΑ), μέτριας βαρύτητας (τύπος ΙΙΒ), ενώ η σοβαρή γενικευμένη

μυασθένεια διακρίνεται περαιτέρω σε οξεία σοβαρή με προμηκικά συμπτώματα (τύπος ΙΙΙ) και όψιμη σοβαρή (τύπος IV), που αναπτύσσεται τουλάχιστον δύο χρόνια μετά την έναρξη της νόσου.

Πίνακας 2: Κλινική ταξινόμηση βαρείας μυασθένειας κατά Osserman (Osserman KE, 1958)

I	Οφθαλμική μυασθένεια
IIA	Ήπια γενικευμένη μυασθένεια χωρίς μυασθενικές κρίσεις και καλή φαρμακευτική ανταπόκριση
IIB	Μέτριας βαρύτητας γενικευμένη μυασθένεια με βαρύτερη αδυναμία, χωρίς κρίσεις αλλά μικρότερη φαρμακευτική ανταπόκριση
III	Οξεία βαρεία μυασθένεια. Γρήγορη εξέλιξη με μυασθενικές κρίσεις και κακή ανταπόκριση στα φάρμακα. Συχνά θύμωμα, μεγάλη θνησιμότητα
IV	Όψιμη βαρεία μυασθένεια. Έχει τους χαρακτήρες της III, και προέρχεται από εξέλιξη της I και της II. Κρίσεις μυασθενικές, μεγάλη θνησιμότητα

Το κύριο πρόβλημα με την κατάταξη αυτή είναι ο υποκειμενικός και ασαφής χαρακτήρας των προσδιορισμών «ήπια», «μέτρια» και «σοβαρή» μυϊκή αδυναμία. Ό,τι ένας ασθενής ή ένας κλινικός γιατρός θεωρεί ήπια μυϊκή αδυναμία, μπορεί από άλλον ασθενή ή γιατρό να θεωρείται μέτρια ή σοβαρή. Επιπλέον κάποιοι έμπειροι κλινικοί πιστεύουν ότι η προσβολή των στοματοφαρυγγικών μυών είναι πιο επικίνδυνη και ίσως διαφορετική από την προσβολή των μυών των άκρων και έτσι θα πρέπει να σημειώνεται ξεχωριστά στο σύστημα κλινικής ταξινόμησης. Επίσης κάποιοι κλινικοί πιστεύουν ότι η μυασθενική κρίση (αναπνευστική ανεπάρκεια που χρειάζεται διασωλήνωση και υποβοηθούμενο αερισμό) είναι το αποτέλεσμα συνυπάρχουσας λοίμωξης του ανώτερου αναπνευστικού σε ευαίσθητους, ευπαθείς ασθενείς, ενώ άλλοι πιστεύουν ότι η μυασθενική κρίση αποτελεί το έσχατο σημείο σοβαρότητας της μυασθένειας (Keesey JC, 2004).

Τα παραπάνω συζητήθηκαν εκτενώς από μια ομάδα ειδικών (Task Force) που συστήθηκε από το Αμερικάνικο ίδρυμα για τη βαρεία μυασθένεια (Myasthenia Gravis Foundation of America) και η οποία προτείνει μία νέα κλινική ταξινόμηση,

κατανοώντας την ανάγκη μιας ευρέως αποδεκτής ταξινόμησης που θα χρησιμοποιείται στη συγκριτική ανάλυση διαφόρων θεραπευτικών παρεμβάσεων στη μυασθένεια. Παρ' όλο που αρχικά σχεδιάσθηκε για ερευνητικούς λόγους, μπορεί να είναι χρήσιμη για τους κλινικούς γιατρούς στην αξιολόγηση και αντιμετώπιση των ασθενών με μυασθένεια και να συμπληρώσει ή να αντικαταστήσει τις μέχρι τώρα υπάρχουσες ταξινομήσεις. Αυτή η ταξινόμηση φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 3: Κλινική ταξινόμηση του Αμερικανικού Ιδρύματος για τη μυασθένεια (MGFA) (Jaretzki A, et al, 2000)

I		Οποιαδήποτε μυϊκή αδυναμία οφθαλμικών μυών. Μπορεί να υπάρχει αδυναμία στη σύγκλιση των οφθαλμών. Η μυϊκή ισχύς σε όλους τους άλλους μύες είναι φυσιολογική.
II		Ήπια μυϊκή αδυναμία που αφορά μη οφθαλμικούς μύες. Μπορεί να υπάρχει αδυναμία οφθαλμικών μυών όποιας βαρύτητας.
	IIa	Κυρίως προσβολή μυών των άκρων, αξονικών μυών ή και τα δύο. Μπορεί να υπάρχει μικρότερη προσβολή στοματοφαρυγγικών μυών.
	IIb	Κυρίως προσβολή στοματοφαρυγγικών, αναπνευστικών μυών ή και τα δύο. Μπορεί να υπάρχει μικρότερη ή ίση προσβολή μυών των άκρων, αξονικών μυών ή και τα δύο.
III		Μέτρια μυϊκή αδυναμία που αφορά μη οφθαλμικούς μύες Μπορεί να υπάρχει αδυναμία οφθαλμικών μυών όποιας βαρύτητας.
	IIIa	Κυρίως προσβολή μυών των άκρων, αξονικών μυών ή και τα δύο. Μπορεί να υπάρχει μικρότερη προσβολή στοματοφαρυγγικών μυών.
	IIIb	Κυρίως προσβολή στοματοφαρυγγικών, αναπνευστικών μυών ή και τα δύο. Μπορεί να υπάρχει μικρότερη ή ίση προσβολή μυών των άκρων, αξονικών μυών ή και τα δύο.
IV		Σοβαρή μυϊκή αδυναμία που αφορά μη οφθαλμικούς μύες Μπορεί να υπάρχει αδυναμία οφθαλμικών μυών όποιας βαρύτητας.
	IVa	Κυρίως προσβολή μυών των άκρων και/ ή αξονικών μυών. Μπορεί να υπάρχει μικρότερη προσβολή στοματοφαρυγγικών μυών.
	IVb	Κυρίως προσβολή στοματοφαρυγγικών, αναπνευστικών μυών ή και τα δύο. Μπορεί να υπάρχει μικρότερη ή ίση προσβολή μυών των άκρων, αξονικών μυών ή και τα δύο
V		Διασωλήνωση με ή χωρίς μηχανικό αερισμό, εκτός από την περίπτωση που αυτή πραγματοποιείται στη διάρκεια συνήθους μετεγχειρητικής αντιμετώπισης. Η χρήση σωλήνα διατροφής χωρίς διασωλήνωση θέτει τον ασθενή στην κατηγορία IVb.

Η παραπάνω ομάδα ειδικών προτείνει επίσης, πιο πολύ για ερευνητικούς σκοπούς, ένα ποσοτικό σκορ για τη βαρύτητα της μυασθένειας με σκοπό τον πιο αντικειμενικό προσδιορισμό της ήπιας, μέτριας ή σοβαρής μυϊκής προσβολής.

Αυτό σύστημα βαθμολόγησης βασίζεται σε ποσοτικές δοκιμασίες επιλεγμένων μυϊκών ομάδων (Jaretzki A, et al, 2000).

ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΜΥΑΣΘΕΝΕΙΑΣ

Το ιστορικό και η νευρολογική εξέταση παρέχουν τα πιο σημαντικά στοιχεία στα οποία βασίζεται η διάγνωση της μυασθένειας. Η μυασθένεια, όπως προαναφέρθηκε, προκαλεί αδυναμία η οποία είναι πιο έκδηλη σε ορισμένες μυϊκές ομάδες, τυπικά παρουσιάζει διακυμάνσεις, ενώ το κύριο χαρακτηριστικό της είναι η γρήγορη εξάντληση των σκελετικών μυών κατά την προσπάθεια. Φαρμακολογικές, ηλεκτροφυσιολογικές και ορολογικές δοκιμασίες χρησιμοποιούνται με σκοπό να επιβεβαιώσουν την κλινική διάγνωση της μυασθένειας (Παπαπετρόπουλος Θ, 1990, Meriggioli MN, Sanders DB, 2004).

ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ

Η κλινική παρατήρηση της ανταπόκρισης μετά από χορήγηση φαρμακολογικών παραγόντων που επηρεάζουν τη νευρομυϊκή διαβίβαση, αποτελεί τη βάση για αρκετές διαγνωστικές δοκιμασίες. Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται κατά τις δοκιμασίες αυτές είναι δύο κατηγοριών. Αυτά που ενισχύουν την νευρομυϊκή διαβίβαση και προκαλούν βελτίωση της μυϊκής ισχύος (π.χ. εδροφώνιο, πυριδοστιγμίνη) και αυτά που την μπλοκάρουν με αποτέλεσμα να επιτείνουν την μυϊκή αδυναμία (π.χ. κουράριο). Αξίζει να σημειώσουμε ότι μετά την ανάπτυξη και χρήση ευαίσθητων ηλεκτροφυσιολογικών δοκιμασιών, η τελευταία δοκιμασία (κουράριο) έχει πλέον εγκαταλειφθεί (Παπετρόπουλος Θ, 1990, Meriggioli MN,

Sanders DB, 2004).

Δοκιμασία με χλωριούχο εδροφώνιο (Tensilon)

Η χρήση του χλωριούχου εδροφώνιου (Tensilon) σε διαγνωστική δοκιμασία για τη μυασθένεια περιγράφηκε το 1952. Χορηγείται πάντοτε ενδοφλεβίως, ενώ η ταχεία έναρξη (περίπου σε 30 δευτερόλεπτα) και η βραχεία διάρκεια (περίπου 5 λεπτά) της δράσης του, καθιστούν το χλωριούχο εδροφώνιο ουσία ιδεώδη για διαγνωστικό σκοπό. Μέσω αναστολής της φυσιολογικής δράσης της ακετυλοχολινεστεράσης, το χλωριούχο εδροφώνιο και οι άλλοι αναστολείς της χολινεστεράσης επιτρέπουν στα μόρια της ακετυλοχολίνης να διαχέονται ευρέως διαμέσω της συναπτικής σχισμής και να αλληλεπιδρούν συνεχώς με τους υποδοχείς της ακετυλοχολίνης, με αποτέλεσμα να υπάρχει μεγαλύτερο και πιο παρατεταμένο δυναμικό τελικής κινητικής πλάκας (Παπετρόπουλος Θ, 1990, Meriggioli MN, Sanders DB, 2004).

Η δόση του εδροφώνιου που θα οδηγήσει σε βελτίωση ποικίλει ανάμεσα στους ασθενείς και δεν μπορεί να καθορισθεί εκ των προτέρων. Μία πολύ υψηλή δόση μπορεί να επιτείνει τη μυϊκή αδυναμία σε ασθενείς με διαταραχή της νευρομυϊκής διαβίβασης. Γι΄ αυτό το εδροφώνιο χορηγείται αργά και σε βαθμιαία αυξανόμενες δόσεις, αρχίζοντας τη δοκιμασία με δόση 2 mg, και συνεχίζοντας με δόσεις των 3 και 5 mg. Πρέπει πάντοτε να υπάρχει διαθέσιμη ατροπίνη (0.5 mg ενδοφλέβια) για να αντιμετωπίσει πιθανές μουσκαρινικές παρενέργειες, αν και η δόση του εδροφώνιου που τυπικά χρειάζεται για τη διάγνωση της μυασθένειας σπανίως είναι περισσότερη από 5 mg και έτσι δεν είναι σύνηθες να δημιουργήσει σημαντικά προβλήματα. Σχετικές αντενδείξεις για τη δοκιμασία με εδροφώνιο αποτελούν το βρογχικό άσθμα και οι καρδιακές αρρυθμίες. Η βελτίωση της βλεφαρόπτωσης ή η βελτίωση στην μυϊκή ισχύ τουλάχιστον ενός εξωοφθαλμικού μυός με πάρεση, αποτελούν τα πιο αξιόπιστα τελικά σημεία της δοκιμασίας. Αν και χρησιμοποιείται ευρέως και είναι

γενικά αποδεκτή, η δοκιμασία με το εδροφώνιο δεν είναι ούτε απολύτως ευαίσθητη, ούτε ειδική για τη μυασθένεια. Ο περιορισμός έγκειται στο ότι η μέθοδος εξαρτάται από την προσπάθεια που καταβάλει ο ασθενής κατά την εξέταση της μυϊκής ισχύος, τόσο πριν όσο και μετά τη χορήγηση του φαρμάκου. Γι΄αυτό το λόγο, η διαγνωστική ευαισθησία και ειδικότητα είναι αποδεκτές μόνο σε ασθενείς με σαφή μυϊκή αδυναμία, η οποία μπορεί να εκτιμηθεί με αντικειμενικότητα (π.χ. πτώση του βλεφάρου, ή πάρεση οφθαλμοκινητικού μυός) (Παπετρόπουλος Θ, 1990, Meriggioli MN, Sanders DB, 2004).

Άλλοι αναστολείς της χολινεστεράσης

Ορισμένοι ασθενείς με μυασθένεια δεν εμφανίζουν βελτίωση μετά από χορήγηση εδροφώνιου αλλά ανταποκρίνονται στη χορήγηση νεοστιγμίνης methylsulfate (προστιγμίνης) . Η δράση της μετά από ενδομυϊκή χορήγηση δόσης 1,5mg ξεκινά σε περίπου 5 με15 λεπτά και διαρκεί 2,5 με 4 ώρες. Αυτή η μεγαλύτερη περίοδος δράσης σε σχέση με το εδροφώνιο παρέχει άνεση χρόνου για να ελεγχθούν πολλές μυϊκές ομάδες. Παρομοίως, η χορήγηση πυριδοστιγμίνης από το στόμα (Mestinon) ως θεραπευτική δοκιμασία μπορεί να έχει ένα υποκειμενικό ευεργετικό αποτέλεσμα στη μυϊκή ισχύ αλλά και στην αντοχή των μυών στην κόπωση, το οποίο να μην είναι εμφανές μετά από μία δόση εδροφώνιο. Ακόμη μία φορά, συστήνεται προσοχή στην ερμηνεία και την αξιολόγηση αυτών των δοκιμασιών, καθώς αυτές στηρίζονται σε μεγάλο βαθμό στις υποκειμενικές παρατηρήσεις του ασθενούς (Παπετρόπουλος Θ, 1990, Meriggioli MN, Sanders DB, 2004).

ΗΛΕΚΤΡΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ

Οι ηλεκτροφυσιολογικές δοκιμασίες γίνονται σε ασθενείς στους οποίους υπάρχει η υποψία ότι πάσχουν από μυασθένεια με σκοπό να πιστοποιήσουν την ύπαρξη διαταραχής στη νευρομυϊκή διαβίβαση. Οι δύο κύριες ηλεκτροφυσιολογικές

δοκιμασίες είναι ο επαναληπτικός νευρικός ερεθισμός και το ηλεκτρομυογράφημα μονήρους μυϊκής ίνας.

Επαναληπτικός νευρικός ερεθισμός (δοκιμασία Desmedt)

Η δοκιμασία αυτή είναι το ηλεκτροφυσιολογικό ισοδύναμο της κλινικής δοκιμασίας κόπωσης. Με την συγκεκριμένη μέθοδο μελετάται η συμπεριφορά του σύνθετου μυϊκού δυναμικού ενεργείας σε επαναληπτικούς, ηλεκτρικούς ερεθισμούς του νεύρου (Τερζής Σ, 1996, Meriggioli MN, Sanders DB, 2004).

Πάνω στον μυ που επιλέγεται για να μελετηθεί τοποθετείται επιφανειακό καταγραφικό ηλεκτρόδιο. Με ένα άλλο ηλεκτρόδιο ερεθισμού, ερεθίζεται το νεύρο που νευρώνει αυτόν τον μυ, σε διάφορες συχνότητες και σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα. Σε κάθε ερεθισμό καταγράφεται από ένα μυϊκό δυναμικό (Τερζής Σ, 1996, Meriggioli MN, Sanders DB, 2004).

Για την δοκιμασία επιλέγεται συνήθως κάποιος μικρός μυς του χεριού στο θέναρ ή το οπισθέναρ με ερεθισμό του μέσου ή ωλένιου νεύρου αντίστοιχα. Μπορεί να επιλεγεί και κάποιος κεντρομελικός μυς (π.χ. δικέφαλος βραχιόνιος) με ερεθισμό του μυοδερματικού νεύρου στη μασχάλη ή κάποιος μυς του προσώπου (π.χ. σφιγκτήρας του βλεφάρου) με ερεθισμό του προσωπικού νεύρου (Τερζής Σ, 1996, Meriggioli MN, Sanders DB, 2004).

Βασικό μέλημα αποτελεί η ακινητοποίηση του καταγραφικού ηλεκτροδίου πάνω στον μυ, ώστε να διασφαλισθεί η ομοιομορφία στη λήψη των δυναμικών και να αποφευχθούν τα παράσιτα. Η χρησιμοποίηση βελονοειδούς καταγραφικού πρέπει να αποφεύγεται, γιατί τούτο, με τις συνεχείς συσπάσεις του μυ, μπορεί να μετακινηθεί. Κατ' αρχήν δίνουμε ερεθίσματα ανεβάζοντας λίγο-λίγο την ένταση του ρεύματος μέχρι να λάβουμε μυϊκό δυναμικό στο μέγιστο του εύρους του. Μετά ανεβάζουμε την ένταση κατά 20% της προηγούμενης (υπερμέγιστο ερεθισμό) και στη συνέχεια

δίνοντας μια σειρά πέντε (5) υπερμεγίστων ερεθισμών συχνότητας 3-Hz καταγράφουμε τα λαμβανόμενα μυϊκά δυναμικά. Ακολούθως δίνουμε μια δεύτερη παρόμοια σειρά ερεθισμών αφού όμως έχει περάσει χρονικό διάστημα 1 λεπτού από την προηγούμενη σειρά και καταγράφουμε πάλι τα μυϊκά δυναμικά. Κατόπιν δίνουμε υπερμέγιστο ερεθισμό πάλι πέντε (5) τον αριθμό συχνότητας 10Hz και στη συνέχεια τετανικό ερεθισμό ≥30 Hz και καταγράφουμε τα λαμβανόμενα δυναμικά. Αμέσως μετά, και μετά 1 και 2 λεπτά επαναλαμβάνουμε την καταγραφή 5 ερεθισμών στα 3 Hz . Αντί του προτελευταίου τετανικού ερεθίσματος μπορούμε να προκαλέσουμε την μεγίστη κόπωση παραγγέλλοντας στον ασθενή να συσπά τον μυ επί 5 λεπτά. Μετά το πέρας των δοκιμασιών έχουμε στα χέρια μας αποτυπωμένες στο χαρτί έξι (6) σειρές δυναμικών ανά πεντάδα. Αυτό που έχει τώρα σημασία είναι να μετρηθεί το εύρος(ύψος) των δυναμικών αυτών ένα προς ένα (Τερζής Σ, 1996, Meriggioli MN, Sanders DB, 2004).

Σε ένα φυσιολογικό μυ τα δυναμικά μέσα σε μια πεντάδα ή από την μια πεντάδα στην άλλη ή μεταξύ πρώτης και τελευταίας πεντάδας, δεν έχουν διαφορά στο ύψος μεγαλύτερη του 10%. Σ' ένα φυσιολογικό άτομο, το τελευταίο δυναμικό μιας σειράς μπορεί να είναι ίσο, ελάχιστα εκπεσμένο (λιγότερο από 10% του αρχικού του εύρους), ή και λίγο υψηλότερο του πρώτου (λόγω της όδωσης στην απελευθέρωση ακετυλοχολίνης, συνεπεία του επαναληπτικού ερεθισμού). Στη μυασθένεια το τελευταίο δυναμικό κάθε σειράς είναι μικρότερο του πρώτου περισσότερο του 10%. Επιπλέον συμβαίνει έκπτωση των δυναμικών βαθμιαία καθώς ξετυλίγεται η κάθε σειρά. Μετά την άσκηση ή την τετανική σύσπαση μπορεί να προκληθεί μία πρόσκαιρη όδωση του δυναμικού, γρήγορα όμως αναφαίνεται πάλι η μείωσή του στους επόμενους ερεθισμούς των 3 Hz (μάλιστα αυτή η μείωση είναι πιο εμφανής). Η δοκιμασία επαναληπτικού νευρικού ερεθισμού στις μικρές και μεγάλες συχνότητες -

όπως περιγράφεται – χαρακτηρίζεται σαν θετική εφ' όσον επισυμβαίνει αυτή η μείωση του εύρους(ύψους) των δυναμικών, και γίνεται ηλεκτροδιαγνωστικό εύρημα της μυασθένειας (Τερζής Σ, 1996, Meriggioli MN, Sanders DB, 2004).

Ωστόσο η δοκιμασία αυτή όταν ελέγχεται κάποιος μυς των άκρων (π.χ. κάποιος μικρός μυς του χεριού) είναι θετική μόνο σε περίπου 50% των ασθενών με μυασθένεια και είναι πιο ευαίσθητη στη γενικευμένη μορφή της νόσου. Η δοκιμασία επαναληπτικού νευρικού ερεθισμού είναι πιθανότερο να είναι θετική όταν ελέγχεται κάποιος κεντρομελικός μυς (θετική περίπου σε 65% των ασθενών), ή κάποιος μυς του προσώπου (σε περίπου 80% των ασθενών με μυασθένεια) . Καλό είναι να ελέγχονται πολλοί μύες ώστε να επιτυγχάνεται το μέγιστο διαγνωστικό αποτέλεσμα.

Ο ερεθισμός του ωλένιου, μέσου και μυοδερματικού νεύρου είναι χρήσιμος, εάν τα συμπτώματα του ασθενούς είναι πιο έκδηλα στα άκρα. Όταν τα σημεία και συμπτώματα της μυασθένειας περιορίζονται σε οφθαλμικούς ή προμηκικούς μύες, δεν είναι ασύνηθες η δοκιμασία επαναληπτικού νευρικού ερεθισμού να είναι εντελώς φυσιολογική όταν ελέγχονται μόνο μύες των άκρων. Το διαγνωστικό αποτέλεσμα μπορεί να βελτιωθεί εάν κανείς υποβάλει στη δοκιμασία μύες του προσώπου ή τον μασητήρα μυ, ειδικότερα σε ασθενείς με αμιγώς οφθαλμικά ή οφθαλμοπρομηκικά συμπτώματα. Τα περισσότερα εργαστήρια θεωρούν ότι μία πλήρης εκτίμηση διαταραχής της νευρομυϊκής σύναψης περιλαμβάνει επαναληπτικό ερεθισμό νεύρου τουλάχιστον σε 3 μύες (Τερζής Σ, 1996, Meriggioli MN, Sanders DB, 2004).

Ηλεκτρομυογράφημα μονήρους μυϊκής ίνας

Είναι η πιο ευαίσθητη κλινική δοκιμασία για την ανίχνευση διαταραχής στη νευρομυϊκή διαβίβαση. Η δοκιμασία αυτή πραγματοποιείται είτε στη διάρκεια ήπιας εκούσιας σύσπασης του μυός που ελέγχεται είτε με μικροερεθισμό κινητικών νευρικών ινών που νευρώνουν τον συγκεκριμένο μυ.

Με τη χρησιμοποίηση κατάλληλου ηλεκτροδίου καταγράφονται τα δυναμικά ενέργειας δύο χωριστών μυϊκών ινών της ίδιας κινητικής ομάδας. Τα δυναμικά που καταγράφονται δεν είναι απόλυτα σύγχρονα, αλλά εμφανίζουν μία χρονική διαφορά, η οποία, σε επαναλαμβανόμενες διαδοχικές εκφορτίσεις του ζεύγους των μυϊκών ινών δεν διατηρείται σταθερή αλλά κυμαίνεται (από 10 έως 50 μsec). Αυτή η διακύμανση της χρονικής διαφοράς, μεταξύ των δυναμικών ενέργειας του ζεύγους των μυϊκών ινών, έχει ονομασθεί φαινόμενο jitter (Παπετρόπουλος Θ, 1990, Meriggioli MN, Sanders DB, 2004).

Μελετώντας έναν μυ, παρακολουθούμε ένα ζεύγος μυϊκών ινών να εκπυρσοκροτούν διαδοχικά πολλές φορές (τουλάχιστον 50). Στη συνέχεια παρακολουθούμε και άλλα ζεύγη μυϊκών ινών (τουλάχιστον 20) σε διαφορετικές θέσεις μέσα στο μυ.

Μία μελέτη είναι παθολογική όταν το μέσο jitter για όλα τα ζεύγη των μυϊκών ινών που ελέγχθηκαν υπερβαίνει το ανώτερο φυσιολογικό όριο για το jitter στο συγκεκριμένο μυ ή όταν πάνω από 10% των μυϊκών ζευγών που ελέγχθηκαν έχουν jitter που υπερβαίνει το ανωτέρω όριο (Παπετρόπουλος Θ, 1990, Meriggioli MN, Sanders DB, 2004).

Οι τιμές αναφοράς για το jitter στους διάφορους μύες έχουν καθορισθεί μέσω μίας πολυκεντρικής μελέτης.

Το ηλεκτρομυογράφημα μονήρους μυϊκής ίνας αναδεικνύει αυξημένο jitter ουσιαστικά σε όλους τους ασθενείς με μυασθένεια, αν η δοκιμασία γίνεται στους κατάλληλους μύες. Το jitter είναι μεγαλύτερο στους αδύναμους μύες, αλλά συνήθως είναι αυξημένο ακόμη και σε μύες με φυσιολογική μυϊκή ισχύ. Μύες που συχνά ελέγχονται είναι: κοινός εκτείνων τους δακτύλους, σφιγκτήρας βλεφάρου, μετωπιαίος, μασητήρας, εκτείνοντες αυχένα, δελτοειδής, δικέφαλος, τετρακέφαλος,

πρόσθιος κνημιαίος (Παπετρόπουλος Θ, 1990, Meriggioli MN, Sanders DB, 2004).

Οι μύες του προσώπου εμφανίζουν πιο συχνά διαταραχή σε σχέση με τους μύες των άκρων στους περισσότερους ασθενείς με μυασθένεια, αλλά μπορεί να είναι απαραίτητο να εξετασθούν αρκετοί μύες προκειμένου να καταδειχθεί παθολογικό jitter σε ασθενείς με ήπια ή αμιγή οφθαλμική μυϊκή αδυναμία. Το εύρημα ενός φυσιολογικού jitter σε έναν κλινικά αδύναμο μυ, ουσιαστικά αποκλείει τη διαταραχή στη νευρομυϊκή σύναψη ως αίτιο της μυϊκής αδυναμίας. Είναι σημαντικό να κατανοήσει κανείς ότι η αυξημένη ευαισθησία του ηλεκτρομυογραφήματος μονήρους μυϊκής ίνας έρχεται ως αντίβαρο στην ελαττωμένη ειδικότητα. Το jitter μπορεί να αυξάνει σε πρωτοπαθή πάθηση των νεύρων ή των μυών, και αυτές οι διαταραχές πρέπει να αποκλείονται με τις κατάλληλες ηλεκτροφυσιολογικές και κλινικές εξετάσεις πριν καταλήξει κανείς στη διάγνωση της μυασθένειας (Παπετρόπουλος Θ, 1990, Meriggioli MN, Sanders DB, 2004).

ΟΡΟΛΟΓΙΚΕΣ (ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΕΣ) ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ

Αντισώματα εναντίον των υποδοχέων ακετυλοχολίνης(Υ-ΑΚΧ)

Τα αντισώματα εναντίον των Υ-ΑΚΧ θεωρούνται ως ο πλέον αξιόπιστος διαγνωστικός δείκτης για την μυασθένεια. Τα αντισώματα αυτά ανιχνεύονται στον ορό, με ραδιοανοσοχημικό προσδιορισμό, σε περίπου 85-90% των ασθενών με γενικευμένη μυασθένεια. Ωστόσο στην οφθαλμική μορφή της νόσου ανιχνεύονται σε ποσοστό κάτω του 60-70% των ασθενών. Τα επίπεδα ορού των αντισωμάτων εναντίον των Υ-ΑΚΧ ποικίλλουν ευρέως ανάμεσα σε μυασθενικούς ασθενείς με παρόμοιο βαθμό μυϊκής αδυναμίας. Επίσης η συγκέντρωση των αντισωμάτων αυτών μπορεί να είναι χαμηλή κατά την έναρξη των συμπτωμάτων της μυασθένειας και να αυξάνει αργότερα, οπότε επανάληψη της εξέτασης αναζήτησής τους μπορεί να είναι απαραίτητη, όταν οι αρχικές τιμές είναι φυσιολογικές. Φυσιολογικές συγκεντρώσεις

για τα αντισώματα εναντίον των Υ-ΑΚΧ δεν αποκλείουν τη διάγνωση, ακόμη και σε περιπτώσεις γενικευμένης μυασθένειας. Πρακτικά, όλοι οι ασθενείς με μυασθένεια και θύμωμα θα έχουν αυξημένους τίτλους αντισωμάτων εναντίον των Υ-ΑΚΧ (Παπετρόπουλος Θ, 1990, Meriggioli MN, Sanders DB, 2004). Η διαγνωστική ειδικότητα των αντισωμάτων αυτών για την μυασθένεια είναι αρκετά καλή, αν και αυξημένοι τίτλοι μπορεί σπανίως να βρεθούν σε περιπτώσεις αυτοάνοσης ηπατικής νόσου, συστηματικού ερυθηματώδους λύκου, φλεγμονώδους νευροπάθειας, πλάγιας μυατροφικής σκλήρυνσης, όπως και σε ασθενείς με θύμωμα χωρίς μυασθένεια, σε συγγενείς πρώτου βαθμού ασθενών με επίκτητη αυτοάνοση μυασθένεια και σε ασθενείς με μυασθενικό σύνδρομο Lambert-Eaton (Lennon VA, 1994).

Αντισώματα εναντίον της πρωτεΐνης MuSK

Σε ένα ποσοστό ασθενών με γενικευμένη «οροαρνητική» μυασθένεια (μυασθένεια χωρίς αντισώματα εναντίον των Υ-ΑΚΧ), έχουν ανιχνευθεί IgG αντισώματα εναντίον της MuSK, μίας πρωτεΐνης της νευρομυϊκής σύναψης, η οποία, όπως έχει αναφερθεί νωρίτερα, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη συσσώρευση των Υ-ΑΚΧ στη μετασυναπτική μεμβράνη. Πιο συγκεκριμένα, αντι-MuSK αντισώματα έχουν αναφερθεί σε 38-71% των ασθενών με γενικευμένη οροαρνητική μυασθένεια (Hoch W, et al, 2001, Scuderi F, et al, 2002, Sanders DB , et al, 2003) αλλά δεν έχουν ανιχνευθεί σε οφθαλμική μυασθένεια ή γενικευμένη μυασθένεια με θετικά αντισώματα εναντίον των Υ-ΑΚΧ. Πιο πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι αντι-MuSK αντισώματα υπάρχουν σε ποσοστό περίπου 30-40% των ασθενών με γενικευμένη μυασθένεια οι οποίοι δεν έχουν αντισώματα εναντίον των Υ-ΑΚΧ (Evoli A, et al, 2003, Vincent A, et al, 2003). Ασθενείς με τέτοια αντισώματα είναι πιο συχνά νεαρές γυναίκες και κλινικά εμφανίζουν συνήθως έκδηλη αδυναμία σε προμηκικούς μύες ενώ συχνά υπάρχει και αδυναμία αναπνευστικών μυών. Η ανταπόκριση σε

χορήγηση αναστολέων χολινεστεράσης μπορεί να μην είναι ικανοποιητική, αλλά συνήθως υπάρχει βελτίωση με πλασμαφαίρεση καθώς και με επιλεγμένη ανοσοκατασταλτική θεραπεία. Τέλος οι ασθενείς αυτοί έχουν φυσιολογική ιστολογία θύμου και δεν φαίνεται, τουλάχιστον με τα υπάρχοντα σήμερα στοιχεία, ότι η θυμεκτομή σε αυτούς βελτιώνει την έκβαση (Romi F, et al, 2005, Vincent A, et al, 2004).

Η ανίχνευση των αντι-MuSK αντισωμάτων θεωρείται πλέον σαφής ένδειξη ύπαρξης μυασθένειας. Και αυτά τα αντισώματα ανιχνεύονται με ραδιοανοσοχημικό προσδιορισμό. Όπως αναφέρθηκε, οι οροθετικοί ασθενείς για αντισώματα εναντίον των Υ-ΑΚΧ δεν έχουν αντι-MuSK αντισώματα. Επομένως ο αντι-MuSK έλεγχος συνιστάται να γίνεται μόνο όταν δεν ανιχνεύονται αντισώματα εναντίον του Υ-ΑΚΧ (Τζάρτος Σ, Πουλάς Κ, 2004, Meriggioli MN, Sanders DB, 2004).

ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΜΥΑΣΘΕΝΕΙΑΣ

Όπως δείχνει ο πίνακας 4, η θεραπεία της μυασθένειας διακρίνεται στην συμπτωματική και σε αυτή που στοχεύει στο ανοσολογικό σύστημα (ανοσοτροποποιητικές θεραπείες). Εδώ περαιτέρω διακρίνουμε θεραπείες μακροχρόνιες και βραχυχρόνιες

Πίνακας 4: Θεραπεία της μυασθένειας

Συμπτωματική
- Αναστολείς χολινεστεράσης

Ανοσοτροποποιητικές (στοχεύουν στο ανοσολογικό σύστημα)
- Μακροχρόνιες
  - Θυμεκτομή
  - Ανοσοκατασταλτικά (κορτικοστεροειδή, αζαθειοπρίνη, κυκλοσπορίνη, κυκλοφωσφαμίδη, mycophenolate mofetil, tacrolimus)
- Βραχυχρόνιες
  - Πλασμαφαίρεση
  - γ-σφαιρίνη

ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η συμπτωματική θεραπεία της μυασθένειας περιλαμβάνει τους **αναστολείς χολινεστεράσης**.

Τα φάρμακα αυτά αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου που διασπά την ακετυλοχολίνη και προκαλούν έτσι αύξηση της συγκέντρωσής της στη νευρομυϊκή σύναψη και παράταση της δράσης της στους μειωμένους αριθμητικά υποδοχείς της (Παπαπετρόπουλος Θ, 1990, Richman DP, Agius MA., 2003).

Αρκετοί αναστολείς χολινεστεράσης είναι διαθέσιμοι, όπως **πυριδοστιγμίνη** (mestinon), **νεοστιγμίνη** (prostigmine), **εδροφώνιο** (tensilon), **ambenonium** (mytelase) και **διστιγμίνη** (ubretid), όμως η πυριδοστιγμίνη (mestinon) είναι το χολινεργικό που κατά κύριο λόγο χρησιμοποιείται στη θεραπεία της μυασθένειας.

Η δόση και η συχνότητα χορήγησής του προσαρμόζεται στον κάθε ασθενή, ώστε να έχουμε την καλύτερη κλινική ανταπόκριση με τις λιγότερες παρενέργειες.

Οι παρενέργειες των αναστολέων χολινεστεράσης σχετίζονται με την αύξηση της συγκέντρωσης ακετυλοχολίνης στις μουσκαρινικές και νικοτινικές συνάψεις (Παπαπετρόπουλος Θ, 1990, Rigman DP, Agius MA, 2003). Συνήθεις μουσκαρινικές ανεπιθύμητες ενέργειες περιλαμβάνουν: διάρροιες, κοιλιακό άλγος, εφίδρωση, σιελόρροια, αύξηση βρογχικών εκκρίσεων, βραδυκαρδία. Στις νικοτινικές παρενέργειες αναφέρονται δεσμιδώσεις και κράμπες.

Ωστόσο αυξημένες ποσότητες χολινεργικών φαρμάκων μπορούν να επιτείνουν τις παραπάνω εκδηλώσεις και να εμφανισθεί επιπλέον μεγάλη επιδείνωση στη μυϊκή αδυναμία που οφείλεται σε μπλοκ εκπόλωσης. Μιλάμε τότε για χολινεργική κρίση η οποία μπορεί να έχει και μοιραία κατάληξη (Παπαπετρόπουλος Θ. 1990, Richman DP, Agius MA., 2003).

Έτσι στη μυασθένεια χορηγούνται συνήθως 3-5 δισκία mestinon των

60mgr/ημέρα τα οποία γίνονται καλά ανεκτά. Δόσεις μεγαλύτερες καλό είναι να αποφεύγονται (Παπαπετρόπουλος Θ, 1994).

Οι αναστολείς της χολινεστεράσης είναι φάρμακα που δεν επηρεάζουν τον υποκείμενο παθογενετικό μηχανισμό της μυασθένειας, όλοι όμως οι ασθενείς, τουλάχιστον σε κάποια φάση της νόσου τους, θα τα χρησιμοποιήσουν (Παπαπετρόπουλος Θ, 1994). Είναι συνήθως αποτελεσματικά στα πρώιμα στάδια ή σε ασθενείς με ήπια συμπτώματα, πιθανόν γιατί υπάρχει ακόμη επαρκής αριθμός υποδοχέων ακετυλοχολίνης (Richman DP, Agius MA, 2003).

Ένα σύνηθες σενάριο είναι να υπάρχει σημαντική βελτίωση με την έναρξη της θεραπείας, αλλά καθώς ο καιρός περνά, ολοένα και μεγαλύτερη δόση να απαιτείται για το ίδιο θεραπευτικό αποτέλεσμα (Richman DP, Agius MA, 2003). Τότε απαιτούνται, πλέον των χολινεργικών, πιο δραστικές θεραπείες.

ΑΝΟΣΟΤΡΟΠΟΠΟΙΗΤΙΚΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ

Οι πιο αποτελεσματικές θεραπείες για ασθενείς με μυασθένεια είναι αυτές που στοχεύουν στο ανοσολογικό σύστημα. Αυτές είτε τροποποιούν την παραγωγή αντισωμάτων κατά των υποδοχέων ακετυλοχολίνης, είτε τροποποιούν την βλάβη που προκαλείται στη νευρομυϊκή σύναψη από αυτά τα αντισώματα.

Περαιτέρω διακρίνονται σε **μακροχρόνιες** και **βραχυχρόνιες** θεραπείες.

Σκοπός των θεραπειών αυτών είναι πρώτον να οδηγήσουν σε ύφεση των συμπτωμάτων, και εν συνεχεία να διατηρήσουν την ύφεση αυτή με την μικρότερη αναλογία κόστος προς ωφέλεια.

<u>Μακροχρόνιες ανοσοτροποποιητικές θεραπείες</u>

Εδώ ανήκουν τα **ανοσοκατασταλτικά φάρμακα** και η **θυμεκτομή**.

Η **θυμεκτομή** αποτελεί κλασική, χειρουργική, μακροχρόνια θεραπεία της

μυασθένειας με στόχο το ανοσολογικό σύστημα και θα γίνει γι' αυτή εκτενής αναφορά στη συνέχεια.

Αναφορικά με τα **ανοσοκατασταλτικά φάρμακα**, τα **κορτικοστεροειδή** αποτελούν τον κύριο εκπρόσωπό τους στη θεραπεία της μυασθένειας (Παπαπετρόπουλος Θ, 1994).

Η κύρια δράση των κορτικοστεροειδών είναι αντιφλεγμονώδης, μέσω μείωσης της παραγωγής φλεγμονωδών κυτοκινών και μορίων προσκόλλησης και επίσης μέσω μείωσης της κυκλοφορίας φλεγμονωδών κυττάρων. Υψηλές δόσεις μπορεί επίσης να επάγουν την απόπτωση σε κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος (Case JP, 2001, Barnes PJ, 2001).

Κατάλληλη χορήγηση των κορτικοστεροειδών μπορεί να οδηγήσει σε ύφεση των συμπτωμάτων σε τουλάχιστον 50% των ασθενών με μυασθένεια και το ποσοστό αυτό μπορεί να φτάσει ως και 80-85% (Παπαπετρόπουλος Θ, 1994, Richman DP, Agius MA., 2003).

Ας σημειωθεί εδώ ότι η αποτελεσματικότητά τους στη μυασθένεια δεν έχει μελετηθεί σε επαρκείς διπλές-τυφλές ελεγχόμενες με εικονικό φάρμακο μελέτες (Παπαπετρόπουλος Θ, 1994, Richman DP, Agius MA., 2003). Ωστόσο έλλειψη δεδομένων από ελεγχόμενες μελέτες, υπάρχει για τις περισσότερες διαθέσιμες σήμερα θεραπείες της μυασθένειας, παρά τα αναμφισβήτητα στοιχεία που υπάρχουν για μείωση της νοσηρότητας και θνητότητας ως αποτέλεσμα των θεραπειών αυτών (Nicolle MW, 2002).

Είναι γνωστό ότι 50-60% των ασθενών με οφθαλμική μορφή της νόσου μεταπίπτουν στη γενικευμένη, τυπικά μέσα σε δύο χρόνια από την έναρξη των συμπτωμάτων (Παπαπετρόπουλος Θ, 1990, Bever CT Jr, et al, 1983). Τελευταία έχουν δημοσιευθεί μελέτες, που δείχνουν ότι σε ασθενείς με οφθαλμική μυασθένεια η

θεραπεία με κορτιζόνη μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο ανάπτυξης γενικευμένης μυασθένειας (Kupersmith JB, et al, 2003, Monsul NT, et al, 2004).

Υπάρχουν διάφορα σχήματα χορήγησης των κορτικοστεροειδών. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε **πρεδνιζόνη**, ή **πρεδνιζολόνη** (Nicolle MW, 2002). Στην κλινική μας, με βάση τα βιβλιογραφικά δεδομένα και την εμπειρία που υπάρχει, χορηγούμε πρεδνιζολόνη κάθε δεύτερη μέρα σε εφ' άπαξ πρωινή δόση, με σταδιακή αύξηση έως 60-100mgr (Παπαπετρόπουλος Θ, 1990, Παπετρόπουλος Θ, 1994). Όταν τα συμπτώματα υφεθούν, συνεχίζουμε τη θεραπεία στην ίδια δόση για 2-3 μήνες ακόμη, ώστε να σταθεροποιηθεί η κατάσταση και μετά επιχειρούμε σταδιακά να μειώσουμε και τελικά να διακόψουμε την πρεδνιζολόνη (Παπαπετρόπουλος Θ, 1990, Παπετρόπουλος Θ, 1994). Αν στην πορεία υπάρξει υποτροπή των συμπτωμάτων, επιστρέφουμε στην προηγούμενη δόση. Συνήθως η αγωγή παρατείνεται για 6-8 μήνες (Παπαπετρόπουλος Θ, 1990, Παπετρόπουλος Θ, 1994). Είναι σημαντικό να τροποποιούμε και να προσαρμόζουμε το πρόγραμμα μείωσης των κορτικοστεροειδών ανάλογα με τα συμπτώματα του ασθενούς (Richman DP, Agius MA, 2003). Υπάρχουν ασθενείς που χρειάζονται μακροχρόνια θεραπεία σε χαμηλές δόσεις για να διατηρηθεί ένα καλό θεραπευτικό αποτέλεσμα.

Παρενέργειες από τη θεραπεία με κορτικοστεροειδή συμβαίνουν σε ποσοστό από 20 έως 80% των ασθενών και μπορεί να είναι σοβαρές (Nicolle MW, 2002). Συνήθεις παρενέργειες είναι: αύξηση βάρους, υπέρταση, σακχαρώδης διαβήτης, πεπτικό έλκος, ψυχιατρικές εκδηλώσεις (άγχος, κατάθλιψη, αϋπνία), οστεοπόρωση, μυοπάθεια, ευκαιριακές λοιμώξεις, άσηπτη νέκρωση μεγάλων αρθρώσεων, καταρράκτης, γλαύκωμα, προσωπείο Cushing (Richman DP, Agius MA, 2003). Στο σχήμα ανά διήμερο αυτές είναι σπανιότερες, χωρίς να μειώνεται η αποτελεσματικότητα της θεραπείας (Παπαπετρόπουλος Θ, 1990).

Μη ανταπόκριση στα κορτικοστεροειδή μπορεί να οφείλεται σε βαριά μορφή της νόσου, χαμηλές δόσεις φαρμάκου, ανεπαρκή διάρκεια θεραπείας, μη συμμόρφωση του ασθενούς στις οδηγίες λήψης του φαρμάκου, γρήγορη μείωση της δόσης ή σε λάθος διάγνωση (Nicolle MW, 2002).

Η **αζαθειοπρίνη** (azathioprine) είναι ανοσοκατασταλικό φάρμακο που έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς στη θεραπεία της μυασθένειας (Richman DP, Agius MA, 2003).

Δρα αναστέλλοντας τη σύνθεση των πουρινών και συνεπώς τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Elion GB, 1972). Οι κυτταρικοί πληθυσμοί που επηρεάζονται περισσότερο είναι αυτοί που εμφανίζουν υψηλό βαθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού π.χ. τα λεμφοκύτταρα.

Η δόση στην οποία χορηγείται είναι 2-3mgr/kg βάρους/ημέρα. Βελτίωση αρχίζει να φαίνεται μετά από 2 έως 10 μήνες θεραπείας, ενώ η μέγιστη βελτίωση είναι δυνατόν να απαιτεί θεραπεία για 12 ως και 24 μήνες (Nicolle MW, 2002, Massey JM, 1997).

Υπάρχουν λίγες μελέτες που δείχνουν ότι η αζαθειοπρίνη είναι αποτελεσματική όταν χρησιμοποιείται μόνη της και αρκετές που τη μελετούν σε συγχορήγηση με κορτικοειδή, όπου και πάλι φαίνεται αποτελεσματική (Myasthenia Gravis Clinical Study Group, 1993, Kuks JB et al, 1991, Witte AS et al, 1984, Matell G, 1987). Μία μεγάλη διπλή τυφλή τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο μελέτη, απέδειξε ότι η προσθήκη αζαθειοπρίνης επέτρεψε σημαντική μείωση ή και διακοπή της δόσης κορτιζόνης που απαιτείτο για να διατηρηθεί η ύφεση (Palace J, et al, 1998).

Η αζαθειοπρίνη έχει λιγότερες παρενέργειες από τα κορτικοστεροειδή. Αυτές περιλαμβάνουν: αυξημένη ευαισθησία σε λοιμώξεις, γαστρεντερικές διαταραχές,

ηπατοτοξικότητα, λευκοπενία, θρομβοπενία. Λιγότερο συχνά δερματικό εξάνθημα, έντονα γριππώδη συμπτώματα, αλωπεκία, παγκρεατίτιδα.

Συνολικά, η αζαθειοπρίνη είναι εξαιρετικά χρήσιμη όταν υπάρχει αντένδειξη στη χρήση των κορτικοστεροειδών. Επίσης όταν απαιτούνται μεγάλες δόσεις, ή χρονικά παρατεταμένη χορήγηση κορτικοστεροειδών για να διατηρηθεί ένα καλό θεραπευτικό αποτέλεσμα. Οπότε προσθήκη αζαθειοπρίνης επιτρέπει τη μείωση ή και τη διακοπή της κορτιζόνης (Massey JM, 1997).

Η **κυκλοσπορίνη** (neoral), ανοσοκατασταλτικός παράγοντας και αυτή, δρα αναστέλλοντας τη λειτουργία των Τ-επικουρικών κυττάρων (Matsuda S, Koyasu S, 2000).

Έχει χρησιμοποιηθεί σε ασθενείς με μυασθένεια σε δόση 2-5mgr/kg βάρους/ημέρα (Nicolle MW, 2002).

Μία μεγάλη διπλή τυφλή τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο μελέτη, έδειξε ήπια αποτελεσματικότητα της κυκλοσπορίνης στο να επιτρέψει μείωση της δόσης των κορτικοστεροειδών που ελάμβαναν ασθενείς με μυασθένεια για τον έλεγχο των συμπτωμάτων τους (Tindall RS, et al, 1993). Μικρότερες μελέτες έχουν δείξει ότι μπορεί να επιφέρει βελτίωση των συμπτωμάτων όταν χορηγηθεί μόνη της (Tindall RS, et al, 1987).

Οι παρενέργειες από τη χρήση της περιλαμβάνουν: νεφροτοξικότητα, υπέρταση και επίσης ηπατοτοξικότητα, γαστρεντερικές διαταραχές, υπερτρίχωση, τρόμο, κεφαλαλγία (Nicolle MW, 2002).

Η κυκλοσπορίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ασθενείς με μυασθένεια που δεν ανέχονται την αζαθειοπρίνη (Richman DP, Agius MA, 2003).

Η **κυκλοφωσφαμίδη** (endoxan) είναι επίσης ένα ανοσοκατασταλτικό φάρμακο, χρήσιμο στη θεραπεία ασθενών με μυασθένεια (Richman DP, Agius MA, 2003).

Είναι ισχυρός αλκυλιωτικός παράγοντας που δρα στο DNA αναστέλλοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Έχει μεγαλύτερη δράση στα Β απ' ότι στα Τ λεμφοκύτταρα και συνεπώς είναι πολύ χρήσιμη για παθήσεις που σχετίζονται με τη δράση αντισωμάτων (Zhu LP et al, 1987). Έχει χρησιμοποιηθεί στη μυασθένεια σε p.os δόση 1,5-5mgr/kg βάρους/ημέρα αλλά και σε ενδοφλέβια επαναλαμβανόμενα σχήματα (Nicolle MW, 2002).

Δεν υπάρχουν μεγάλες ελεγχόμενες μελέτες. Μικρές μελέτες δείχνουν ότι είναι σχεδόν τόσο αποτελεσματική όσο τα κορτικοστεροειδή στο να επιφέρει ύφεση των συμπτωμάτων (Perez MC et al, 1981, Niakan E et al, 1988, De Feo LG et al, 2002). Ο κίνδυνος όμως παρενεργειών είναι μεγαλύτερος. Οι παρενέργειες της κυκλοφωσφαμίδης περιλαμβάνουν: σοβαρή καταστολή του μυελού των οστών με κίνδυνο για ευκαιριακές λοιμώξεις, αιμορραγική κυστίτιδα, ίνωση ουροδόχου κύστης, γαστρεντερικές διαταραχές, ηπατοτοξικότητα αλωπεκία και κίνδυνο ανάπτυξης νεοπλασιών (σχετιζόμενο με τη δόση) (Nicolle MW, 2002).

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ασθενείς με σοβαρή μυασθένεια που δεν ανέχονται τα κορτικοστεροειδή ή που δεν ανταποκρίνονται καλά στη θεραπεία παρά τις υψηλές δόσεις κορτικοστεροειδών (Richman DP, Agius MA, 2003).

Ένας αριθμός από νεότερα ανοσοκατασταλτικά φάρμακα έχουν τελευταία μελετηθεί για ασθενείς με μυασθένεια και περισσότερο απ' όλα το **mycophenolate mofetil** (cellcept) (Richman DP, Agius MA, 2003).

Αυτό μπλοκάρει τη σύνθεση των πουρινών σε ενεργοποιημένα Τ- και Β-λεμφοκύτταρα και εκλεκτικά αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό τους, ενώ αφήνει άλλες κυτταρικές σειρές ανέπαφες (Allison AC, Eugui EM, 2000). Αρχικά χρησιμοποιήθηκε για την πρόληψη οξείας απόρριψης σε μεταμοσχεύσεις συμπαγών οργάνων.

Τελευταία έχουν δημοσιευθεί μελέτες για τη χρήση του στη θεραπεία της μυασθένειας (Chaudhry V, et al, 2001, Ciafaloni E, et al, 2001, Meriggioli MN, Ciafaloni E, et al, 2003, Meriggioli MN, Rowin J, et al, 2003). Η προσθήκη mycophenolate mofetil φάνηκε να οδηγεί σε ύφεση ασθενείς με μυασθένεια που, ενώ ελάμβαναν επαρκή θεραπεία με άλλα ανοσοκατασταλτικά, τα συμπτώματά τους δεν ελέγχονταν ικανοποιητικά. Επίσης φάνηκε χρήσιμο στο να επιτρέψει τη μείωση της δόσης των κορτικοστεροειδών. Είναι ασαφές το αν μπορεί να επιφέρει ύφεση όταν χρησιμοποιηθεί μόνο του.

Η δόση στην οποία έχει χρησιμοποιηθεί στη μυασθένεια είναι 1-3gr/ημέρα. Το mycophenolate mofetil είναι γενικά καλά ανεκτό φάρμακο. Οι κύριες παρενέργειες που σχετίζονται με τη χρήση του είναι: διάρροια, έμετος, ευαισθησία σε ορισμένες λοιμώξεις, λευκοπενία.

Υπάρχουν ενδείξεις ότι η μακροχρόνια χορήγηση ανοσοκατασταλτικών όπως η αζαθειοπρίνη (Herrlinger U, et al, 2000), κυκλοσπορίνη (Ciafaloni E, et al, 2000) ή κυκλοφωσφαμίδη (Radis CD, et al, 1995) μπορεί να αυξάνουν τον κίνδυνο ανάπτυξης ορισμένων νεοπλασιών. Η ασφάλεια από τη μακροχρόνια χρήση του mycophenolate mofetil δεν είναι γνωστή, αλλά σε μεταμοσχευμένους ασθενείς που λαμβάνουν χρονίως το φάρμακο αυτό, η συχνότητα εμφάνισης κακοήθειας δεν φαίνεται να αυξάνει (Haberal M, et al, 2002).

Ωστόσο μεγαλύτερες προδρομικές τυχαιοποιημένες ελεγχόμενες μελέτες απαιτούνται για να επιβεβαιώσουν την αποτελεσματικότητα του mycophenolate mofetil στη μυασθένεια και να καθορίσουν καλύτερα το θεραπευτικό του ρόλο και την ασφάλεια από τη χρήση του.

Το **tacrolimus (FK506)** (prograf) είναι νεότερο ανοσοκατασταλτικό φάρμακο που δρα αναστέλλοντας την ενεργοποίηση των Τ-επικουρικών κυττάρων (Kino T, et

al, 1987). Χρησιμοποιήθηκε αρχικά σε μεταμοσχευμένους για την πρόληψη της απόρριψης του μοσχεύματος.

Τελευταία έχουν δημοσιευθεί μικρές μη ελεγχόμενες μελέτες όπου το φάρμακο αυτό δόθηκε σε χαμηλή δόση (3-5mgr/ημέρα) σε ασθενείς με μυασθένεια και οδήγησε σε βελτίωση των συμπτωμάτων τους (Wakata N και συν, 2003, Konishi T, et al, 2003).

Χρειάζονται όμως οπωσδήποτε περαιτέρω μελέτες για να επιβεβαιωθεί η αποτελεσματικότητά του στη μυασθένεια.

Η **mitoxantrone** (novantrone) και το **rituximab** (mabthera) είναι ανοσοκατασταλτικά που δρουν στα Β-λεμφοκύτταρα.

Έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικά σε άλλες αυτοάνοσες παθήσεις και αποτελούν φάρμακα υποψήφια για μελέτη σε ασθενείς με μυασθένεια (Richman DP, Agius MA, 2003).

Βραχυχρόνιες ανοσοτροποποιητικές θεραπείες

Εδώ ανήκουν η **πλασμαφαίρεση** και η **ενδοφλέβια χορήγηση γ-σφαιρίνης**.
Και οι δύο έχουν γρήγορη έναρξη δράσης, αλλά η διάρκεια της δράσης τους είναι σχετικά μικρή.

Για την **πλασμαφαίρεση**, ο μηχανισμός δράσης της στη μυασθένεια θεωρείται πως είναι η απομάκρυνση κυκλοφορούντων παθογενετικών στοιχείων, όπως τα αντισώματα κατά των υποδοχέων της ακετυλοχολίνης (Massey JM, 1997).

Συγκεκριμένο θεραπευτικό σχήμα δεν έχει διαμορφωθεί. Συνήθως αφαιρούνται 40-50ml πλάσματος/kg βάρους κάθε μέρα ή κάθε δεύτερη μέρα και πραγματοποιούνται συνολικά 3-5 συνεδρίες.

Δεν υπάρχουν μεγάλες ελεγχόμενες μελέτες (Gajdos P, et al, 2002). Πολλές μικρότερες έχουν δείξει ότι η πλασμαφαίρεση είναι αποτελεσματική σε ασθενείς με

μυασθένεια, με έναρξη της βελτίωσης μέσα στην πρώτη εβδομάδα. Η δράση της όμως διαρκεί έναν έως δύο μήνες (Massey JM, 1997).

Παρενέργειες αναφέρονται σε ποσοστό 12-40% των ασθενών και αυτές περιλαμβάνουν (Nicolle MW, 2002): υπόταση ή υπέρταση, ταχυκαρδία, ρίγη, πυρετό, ναυτία, έμετο, υπασβεστιαιμία, υπολευκωματιναιμία, μεταβολές στην πηκτικότητα (με θρομβοκυτταροπενία ή αιμορραγία) και θρομβοφλεβίτιδα σχετιζόμενη με τη χρήση φλεβοκαθετήρων (Massey JM, 1997).

Η **ενδοφλέβια χορήγηση γ-σφαιρίνης** αποτελεί πιο πρόσφατη θεραπευτική προσέγγιση της μυασθένειας (Παπαπετρόπουλος Θ, 1994).

Σημαντική πρόοδος έχει σημειωθεί τα τελευταία χρόνια στην κατανόηση, εν μέρει, των μηχανισμών μέσω των οποίων η γ-σφαιρίνη ασκεί ανοσοτροποποιητική δράση σε αυτοάνοσες και συστηματικές φλεγμονώδεις παθήσεις. Ο τρόπος δράσης της είναι πολύπλοκος και αποτελεί ακόμη αντικείμενο έρευνας (Bayry J, et al, 2003). Περιλαμβάνει:

1. Εξουδετέρωση παθογενετικών αυτοαντισωμάτων και έλεγχο των αυτοαντιδραστικών κλώνων των Β-κυττάρων.
2. Επαγωγή των αντιφλεγμονωδών κυτοκινών.
3. Περιορισμό της βλάβης που διαμεσολαβείται από το συμπλήρωμα.
4. Τροποποίηση και διακοπή της λειτουργίας των Fc υποδοχέων των μακροφάγων.
5. Αλληλεπίδραση με μόρια της κυτταρικής μεμβράνης των Τ- και Β-λεμφοκυττάρων.
6. Αλληλεπίδραση με τα δενδριτικά κύτταρα.

Το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο θεραπευτικό σχήμα συνίσταται σε χορήγηση πολυκλωνικής ανθρώπινης γ-σφαιρίνης σε δόση 0,4gr/kgr βάρους/ημέρα για 5 συνεχείς ημέρες (Arsura EL, et al, 1986)

Η βελτίωση των ασθενών με μυασθένεια συνήθως ξεκινάει μέσα σε λίγες ημέρες

από την έναρξη της θεραπείας αλλά διαρκεί συνήθως έναν έως δύο μήνες.

Οι παρενέργειες από τη χρήση γ-σφαιρίνης συμβαίνουν σε ποσοστό όχι μεγαλύτερο από 10% των ασθενών και φαίνονται στον πίνακα 2 (Dalakas M, 2002, Brannagan TH, 2002).

Πίνακας 5: Παρενέργειες από τη χορήγηση της γ-σφαιρίνης.

Συχνές, ήπιες, αναστρέψιμες, σχετιζόμενες με το ρυθμό έγχυσης	*Σπάνιες, δυνητικά πιο σοβαρές*
Κεφαλαλγία	Θρομβοεμβολικά επεισόδια
Μυαλγίες	(αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, έμφραγμα
Ρίγη	μυοκαρδίου, εν τω βάθει φλεβοθρόμβωση,
Πυρετός	πνευμονική εμβολή)
Ναυτία	Εγκεφαλικός αγγειόσπασμος
Έμετος	Συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια
Σφίξιμο στο στήθος	Νεφρική ανεπάρκεια
Ταχυκαρδία	Άσηπτη μηνιγγίτιδα
Αίσθημα παλμών	Δερματικές αντιδράσεις, αλωπεκία
Μεταβολές στην αρτηριακή πίεση	Αναφυλακτική αντίδραση (πιο συχνά σε ανεπάρκεια IgA σφαιρίνης)
	Λευκοπενία, αιμολυτική αναιμία

Μία πολυκεντρική τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη μελέτη συνέκρινε πλασμαφαίρεση με χορήγηση γ-σφαιρίνης σε ασθενείς που παρουσίαζαν επιδείνωση των συμπτωμάτων της μυασθένειας και έδειξε ίση αποτελεσματικότητα των δύο θεραπειών (μετά από δύο εβδομάδες) αλλά λιγότερες και λιγότερο σοβαρές παρενέργειες με τη γ-σφαιρίνη (Gajdos P, et al, 1997).

Οι δύο παραπάνω θεραπείες, πλασμαφαίρεση και γ-σφαιρίνη είναι χρήσιμες σε περιπτώσεις μυασθένειας που έχουμε ταχεία επιδείνωση της μυϊκής αδυναμίας, ιδιαίτερα όταν αυτή αφορά και τους προμηκικούς και αναπνευστικούς μύες, γιατί οδηγούν σε γρήγορη βελτίωση των συμπτωμάτων. Επίσης προσφέρονται για την προετοιμασία ασθενών για χειρουργείο, για παράδειγμα θυμεκτομή. Επιπλέον είναι χρήσιμες σε περιπτώσεις ασθενών με βαριά συμπτωματολογία που δεν φαίνεται να αντιδρούν ικανοποιητικά στα άλλα είδη θεραπείας (Richman DP, Agius MA, 2003,

Massey JM, 1997).

Με βάση τα στοιχεία που υπάρχουν ως τώρα, στη θεραπεία της μυασθένειας, ευνοείται η χρήση της γ-σφαιρίνης σε σχέση με την πλασμαφαίρεση, αφού θεωρείται πιο ασφαλής και η χορήγησή της είναι εύκολη (Richman DP, Agius MA, 2003, Antozzi C, 2003). Ωστόσο χρειάζονται περαιτέρω μελέτες για να αποδείξουν αν οι δύο θεραπείες είναι εξίσου αποτελεσματικές ή αν κάποιοι ασθενείς ευνοούνται περισσότερο από τη μία ή την άλλη θεραπεία, όπως για παράδειγμα σε περίπτωση μυασθενικής κρίσης (Antozzi C, 2003, Gajdos P, et al, 2002). Επίσης να δείξουν αν μπορούν οι δύο θεραπείες μέσω της ανοσοτροποποιητικής τους δράσης να επηρεάσουν την μακροχρόνια εξέλιξη της νόσου (Antozzi C, 2003, Gajdos P, et al, 2003).

Ο στόχος της θεραπείας της μυασθένειας όπως αναφέρθηκε και πριν είναι η πρόκληση παρατεταμένης ή μόνιμης ύφεσης. Η απόφαση αναφορικά με την επιλογή της καλύτερης θεραπείας μπορεί να είναι δύσκολη εξ' αιτίας του περιορισμένου αριθμού τυχαιοποιημένων μελετών που έχουν γίνει σε ασθενείς με μυασθένεια.

Θυμεκτομή

Η θυμεκτομή όπως προαναφέρθηκε αποτελεί κλασική, χειρουργική, μακροχρόνια θεραπεία της μυασθένειας με στόχο το ανοσολογικό σύστημα.

Η πρώτη αναφορά του θεραπευτικού ρόλου της θυμεκτομής έγινε από τον Blalock και συν, το 1939, που παρατήρησαν ύφεση των συμπτωμάτων γενικευμένης μυασθένειας σε γυναίκα 21 ετών, μετά τη χειρουργική αφαίρεση θυμώματος. Έκτοτε η θυμεκτομή, ανεξάρτητα από την ύπαρξη θυμώματος, έγινε ευρέως αποδεκτή ως μία μορφή θεραπείας για τη μυασθένεια (Saperstein DS, Barohn RJ, 2004).

Αποτελεί την πρώτη απόπειρα «ανοσοθεραπείας» στη μυασθένεια και συνεχίζει να είναι μία από τις συχνότερα χρησιμοποιούμενες θεραπευτικές προσεγγίσεις της

νόσου (Saperstein DS, Barohn RJ, 2004).

Υπάρχει ωστόσο προβληματισμός αναφορικά με το αν όλοι οι ασθενείς με μυασθένεια θα πρέπει να κάνουν θυμεκτομή και πότε πρέπει αυτή να πραγματοποιείται. Επίσης σχετικά με το ποιοι ασθενείς είναι πιο πιθανό να ανταποκριθούν, καθώς και ποιος τύπος θυμεκτομής είναι ο καλύτερος (Saperstein DS, Barohn RJ, 2004).

Οι συζητήσεις πάνω στα θέματα αυτά και οι αντιγνωμίες επιμένουν, κυρίως επειδή δεν υπάρχουν ελεγχόμενες προδρομικές μελέτες (Jaretzki III A, et al, 2004).

Οι Gronseth και Barohn πρόσφατα ανασκόπησαν αναδρομικές, ελεγχόμενες μη τυχαιοποιημένες μελέτες που περιέγραφαν την έκβαση της μυασθένειας μεταξύ θυμεκτομηθέντων και μη ασθενών (Gronseth GS, Barohn RJ, 2000). Συνολικά ανασκοπήθηκαν 28 μελέτες, δημοσιευμένες από το1953 έως το 1988 και αφορούσαν 8490 ασθενείς. Φάνηκε ότι οι ασθενείς που έκαναν θυμεκτομή, είχαν περισσότερες πιθανότητες να παρουσιάσουν ύφεση χωρίς να χρειάζονται φαρμακευτική αγωγή, να γίνουν ασυμπτωματικοί ή να τουλάχιστον να εμφανίσουν κλινική βελτίωση, σε σύγκριση με τους ασθενείς οι οποίοι δεν έκαναν θυμεκτομή [σχετικά διάμεσα ποσοστά (median relative rates): 2.1, 1.6, και 1.7 αντίστοιχα]. Ωστόσο μεταξύ των θυμεκτομηθέντων ασθενών, τα διάμεσα ποσοστά ύφεσης, ασυμπτωματικής κατάστασης και βελτίωσης ήταν μόνο 25, 39, και 70% αντίστοιχα (τα αντίστοιχα μέσα ποσοστά ήταν περίπου 50% χαμηλότερα). Συνεπώς, αν και οι ασθενείς που κάνουν θυμεκτομή μπορεί να έχουν 2 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να εμφανίσουν βελτίωση, σε σχέση με αυτούς που δεν κάνουν θυμεκτομή, ωστόσο στην πλειονότητά τους οι ασθενείς αυτοί δεν θα παρουσιάσουν ύφεση ούτε θα γίνουν τελείως ασυμπτωματικοί. Επιπλέον σε όλες τις μελέτες που ανασκοπήθηκαν, υπήρχαν διαφορές σε χαρακτηριστικά με πιθανή προγνωστική σημασία ανάμεσα στις

ομάδες των θυμεκτομηθέντων και μη θυμεκτομηθέντων ασθενών. Τελικά οι συγγραφείς με βάση τα ευρήματά τους κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το όφελος από τη θυμεκτομή, σε μυασθένεια χωρίς θύμωμα, δεν έχει ολοκληρωτικά αποδειχθεί. Μία πρόσφατη πολυκεντρική μελέτη σε 756 ασθενείς με βαρεία μυασθένεια έδειξε ότι η θυμεκτομή σχετίζεται σημαντικά με ύφεση της νόσου (ωστόσο το odds ratio ήταν μόνο 1.6) (Mantegazza R, et al., 2003).

Ακόμη όμως και στις πιο ευνοϊκές αναφορές, η ανταπόκριση στη θυμεκτομή δεν ήταν άμεση και αυτό πρέπει να το έχουν υπόψη τους τόσο οι γιατροί όσο και οι ασθενείς (Saperstein DS, Barohn RJ, 2004).

Σε μια παλαιότερη μελέτη (1971), φάνηκε ότι, μεταξύ ασθενών με ύφεση συμπτωμάτων, μόνο το 25% αυτών εμφάνισε την ύφεση κατά τη διάρκεια του πρώτου έτους μετά την αφαίρεση του θύμου, το 40% στο δεύτερο έτος και το 55% στο τρίτο έτος (Perlo VP,et al,1971). Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι η ύφεση από τη θυμεκτομή μπορεί να χρειασθεί ακόμη και 7-10 χρόνια για να εμφανισθεί (Rodriguez M, et al, 1983, Mulder DG, et al, 1989).

Αυτοί οι παρατεταμένοι χρόνοι μέχρι τη βελτίωση, εγείρουν το ερώτημα μήπως υπάρχουν και άλλοι παράγοντες οι οποίοι συντελούν στην εμφάνιση του θεραπευτικού οφέλους (Saperstein DS, Barohn RJ, 2004).

Επίσης δεν είναι ακόμη δυνατόν να προβλέψει κανείς, εξαρχής, ποιος ασθενής θα ωφεληθεί περισσότερο από τη θυμεκτομή, ενώ ακόμη και όταν εμφανισθεί το θεραπευτικό όφελος, υπάρχει ακόμα μια μικρή πιθανότητα για επακόλουθη υποτροπή. Ωστόσο η ίδια η θυμεκτομή σπάνια επιβαρύνει την μακροχρόνια πορεία της μυασθένειας (Keesey JC, 2004).

Αυτή τη στιγμή δεν υπάρχει ομοφωνία αναφορικά με τα πλεονεκτήματα της χειρουργικής αφαίρεσης του θύμου σε σχέση με την ηλικία**,** το φύλο, ή τη διάρκεια

της νόσου (Jaretzki A, et al, 2004). Κάποιοι συγγραφείς εισηγούνται ότι η θυμεκτομή είναι πιο αποτελεσματική όταν πραγματοποιείται νωρίς μετά από τη διάγνωση της μυασθένειας, μέσα στον πρώτο χρόνο από την έναρξη της νόσου (Rubin JW, et al, 1981, Monden Y, et al, 1984, DeFilippi VJ, et al, 1994, Kaminski HJ, 2003) αλλά λείπει η επιβεβαίωση αυτής της παρατήρησης από προδρομικές μελέτες (Jaretzki A, et al, 2004).

Για μυασθενικούς ασθενείς ηλικίας άνω των 65 ετών, σε πολλά κέντρα, υπάρχει προβληματισμός αναφορικά με την απόφαση για θυμεκτομή. Και αυτό γιατί πιθανόν στους ηλικιωμένους η θυμεκτομή είναι λιγότερο αποτελεσματική λόγω ατροφίας του θύμου (Saperstein DS, Barohn RJ, 2004). Επιπλέον ο κίνδυνος του χειρουργείου αυξάνει με την ηλικία (Jaretzki A, et al, 2004). Παρόλο που ανώτερο όριο ηλικίας για θυμεκτομή δεν έχει θεσπισθεί, φαίνεται ότι, για ηλικίες άνω των 65 ετών η απόφαση για χειρουργείο θα πρέπει να εξατομικεύεται (Jaretzki A, et al, 2004). Θυμεκτομή επίσης μπορεί να γίνει και σε παιδιά, αλλά πιθανόν θα πρέπει να αποφεύγεται κατά τη διάρκεια των πρώτων χρόνων της ζωής (Saperstein DS, Barohn RJ, 2004, Rodriguez M, et al, 1983).

Όσον αφορά το ερώτημα αν οι ασθενείς με οφθαλμική μυασθένεια πρέπει να κάνουν θυμεκτομή, υπάρχουν αντικρουόμενες απόψεις και αρκετοί ερευνητές δεν την συνιστούν (Saperstein DS, Barohn RJ, 2004). Πιθανόν ενδείκνυται σε ασθενείς στους οποίους τα συμπτώματα τους εμποδίζουν στην καθημερινή τους ζωή ή εργασία και όταν η ανοσοκατασταλτική ή άλλη θεραπεία δεν είναι αποτελεσματικές ή αντενδείκνυνται (Jaretzki A, et al, 2004, Schumm F, et al, 1985, Evoli A, et al, 2001).

Ο πιθανός ρόλος της θυμεκτομής στο να προλάβει ή να ελαχιστοποιήσει γενίκευση της οφθαλμικής μυασθένειας μένει να ερευνηθεί (Gronseth GS, Barohn RJ, 2000 Nicolle MW, 2002).

Η θυμεκτομή θα πρέπει να παρουσιάζεται σε όλους μυασθενικούς ασθενείς σαν μια μορφή θεραπείας για τη νόσο τους. Θα πρέπει να τους επισημαίνεται ότι η θυμεκτομή μπορεί να προσφέρει αυξημένη πιθανότητα για βελτίωση, εξηγώντας τους όμως ταυτόχρονα και τους περιορισμούς που υπάρχουν με βάση τα έως σήμερα στοιχεία. Να υπογραμμίζεται επιπλέον το ότι οι περισσότεροι ασθενείς, παρά το χειρουργείο δεν θα παρουσιάσουν ύφεση ούτε θα γίνουν τελείως ασυμπτωματικοί (Saperstein DS, Barohn RJ, 2004). Με βάση τα υπάρχοντα στοιχεία η θυμεκτομή θα πρέπει να συνιστάται στους περισσότερους ασθενείς χωρίς θύμωμα, με συμπτώματα γενικευμένης μυασθένειας τα οποία είναι παραπάνω από πολύ ήπια, ανεξάρτητα από τη διάρκειά τους ή την ηλικία του ασθενούς (Jaretzki A, et al, 2004).

Η παρουσία θυμώματος αποτελεί τη μόνη απόλυτη ένδειξη για θυμεκτομή, καθώς οι όγκοι αυτοί είναι δυνητικά διηθητικοί. (Saperstein DS, Barohn RJ, 2004, Richman DP, Agius MA, 2003). Έτσι όλοι οι νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με μυασθένεια πρέπει να υποβάλλονται σε αξονική ή μαγνητική τομογραφία μεσοθωρακίου για τον αποκλεισμό θυμώματος (Saperstein DS, Barohn RJ, 2004).

Πρέπει επίσης να αναφέρουμε ότι επειδή απουσιάζουν ελεγχόμενες προδρομικές μελέτες που να συγκρίνουν τα αποτελέσματα και τη νοσηρότητα των διαφόρων τεχνικών θυμεκτομής, δεν είναι δυνατόν να πει κανείς με βεβαιότητα, ποια από αυτές είναι η μέθοδος εκλογής (Jaretzki A, et al, 2004).

Με βάση την ανάλυση των υπαρχόντων σήμερα στοιχείων, φαίνεται ότι όσο πιο ευρεία είναι η αφαίρεση των ιστών που μπορεί να περιέχουν θύμο αδένα, τόσο καλύτερα είναι μακροπρόθεσμα τα αποτελέσματα (Jaretzki A, et al, 2004).

Τέσσερις είναι οι κύριοι **τύποι θυμεκτομής**: η διατραχηλική, η κλασική διαστερνική, η εκτεταμένη διαστερνική και η μεγίστη (Αποστολάκης Σ, Δουγένης Δ, 2004).

Η διατραχηλική προσπέλαση δεν επιτρέπει την πλήρη εκτομή του θυμικού ιστού από το μεσοθωράκιο. Επιπλέον η εκτομή διηθητικού θυμώματος είναι δυσχερής έως αδύνατη μέσω τραχηλικής τομής. Λόγω των μειονεκτημάτων της, η μέθοδος αυτή προοδευτικά εγκαταλείπεται (Αποστολάκης Σ, Δουγένης Δ, 2004).

Η κλασική διαστερνική προσπέλαση προσφέρει τη δυνατότητα πληρέστερης θυμεκτομής, είναι όμως δυνατόν να παραμείνει έκτοπος θυμικός ιστός στο μεσοθωράκιο ή στον τράχηλο (Αποστολάκης Σ, Δουγένης Δ, 2004).

Στην εκτεταμένη διαστερνική και στην μεγίστη θυμεκτομή εκτελείται en block εκτομή όλου του λιπώδους ιστού του πρόσθιου μεσοθωρακίου, από το διάφραγμα έως την ανώνυμη φλέβα και από τη μια πύλη του πνεύμονα έως την άλλη. Επίσης συναφαιρούνται τα αντίστοιχα τμήματα του μεσοθωρακικού υπεζωκότα, σε μια προσπάθεια να απομακρυνθεί τυχόν έκτοπος ιστός. Στην μεγίστη θυμεκτομή εκτελείται, εκτός της μέσης στερνοτομής, και μια επιπλέον τραχηλική τομή για πληρέστερη διερεύνηση του προσθίου τραχήλου μέχρι τους άνω πόλους του θυρεοειδούς αδένα για έκτοπο θυμικό ιστό (Αποστολάκης Σ, Δουγένης Δ, 2004).

Στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Πατρών εφαρμόζεται η **τροποποιημένη μεγίστη θυμεκτομή** (εικόνα 7). Με αυτή, εκτός της εύκολης και πλήρους θυμεκτομής, επιτυγχάνεται εκτομή του λιπώδους ιστού όχι μόνο του μεσοθωρακίου, αλλά και του τραχήλου μέχρι το θυρεοειδή αδένα. Αναγνωρίζονται τα παλίνδρομα λαρυγγικά νεύρα, τόσο στο θώρακα όσο και στον τράχηλο και παρασκευάζονται οι αγγειακοί κλάδοι του αορτικού τόξου, η βραγχιοκεφαλική φλέβα και το φρενικό νεύρο εκατέρωθεν. Οι μεσοθωρακικοί υπεζωκότες αφαιρούνται εκατέρωθεν. Το περικάρδιο διαφυλάσσεται εκτός αν υπάρχει υποψία διηθητικού θυμώματος οπότε αφαιρείται 2-3 εκ. περιφερικά της διήθησης. Η τροποποιημένη μεγίστη θυμεκτομή όπως περιγράφηκε, προσφέρει τα πλεονεκτήματα της εκτεταμένης και τη ριζικότητα

της μεγίστης, χωρίς όμως την επιπλέον τραχηλική τομή (Αποστολάκης Σ, Δουγένης Δ, 2004).

Εικόνα 7: Παρασκεύασμα μετά από τροποποιημένη μεγίστη θυμεκτομή

Επίσης πρόσφατα έχει αναπτυχθεί η video-θωρακοσκοπική χειρουργική και στη θεραπεία της μυασθένειας. Η μέθοδος αυτή έχει υποσχόμενα αποτελέσματα αν και δεν έχει πλήρως τεκμηριωθεί η αξία της στη μυασθένεια.

Επομένως επί του παρόντος η διαστερνική ανοιχτή μέθοδος θεωρείται ως προσπέλαση εκλογής στη χειρουργική θεραπεία της μυασθένειας (Αποστολάκης Σ, Δουγένης Δ, 2004).

Την τελευταία 20ετία η θνητότητα της θυμεκτομής έχει σταδιακά ελαττωθεί από 10% στο 1% για τη μυασθένεια χωρίς θύμωμα, ενώ η θνητότητα όταν συνυπάρχει θύμωμα, κυμαίνεται σήμερα στο 5-9%. Η νοσηρότητα της επέμβασης υπολογίζεται σε 4-21%. Τα κύρια αίτια θνητότητας και νοσηρότητας παραμένουν οι αναπνευστικές

επιπλοκές. Κύριες μετεγχειρητικές επιπλοκές είναι: μυασθενική κρίση, αναπνευστική ανεπάρκεια, ατελεκτασία, πνευμονία, σπανιότερα οστεομυελίτιδα του στέρνου, εμπύημα και πνευμονική εμβολή (Αποστολάκης Σ, Δουγένης Δ, 2004).

Θα πρέπει να τονίσουμε εδώ ότι στους ασθενείς με μυασθένεια, εφαρμόζονται τόσο η φαρμακευτική όσο και η χειρουργική θεραπεία (θυμεκτομή), οι οποίες αλληλοσυμπληρώνονται και η αγωγή κατ΄ εξοχήν εξατομικεύεται, με στόχο πάντα να πετύχουμε ύφεση των συμπτωμάτων της νόσου.

Ο πίνακας που ακολουθεί (πίνακας 6) περιγράφει κριτήρια που καθόρισε το Αμερικάνικο ίδρυμα για τη βαρεία μυασθένεια (Myasthenia Gravis Foundation of America), με βάση τα οποία εκτιμάται και καθορίζεται καλύτερα, η κλινική κατάσταση των μυασθενικών ασθενών, ανά πάσα χρονική στιγμή, μετά από οποιαδήποτε θεραπευτική παρέμβαση (Jaretzki A, et al, 2000).

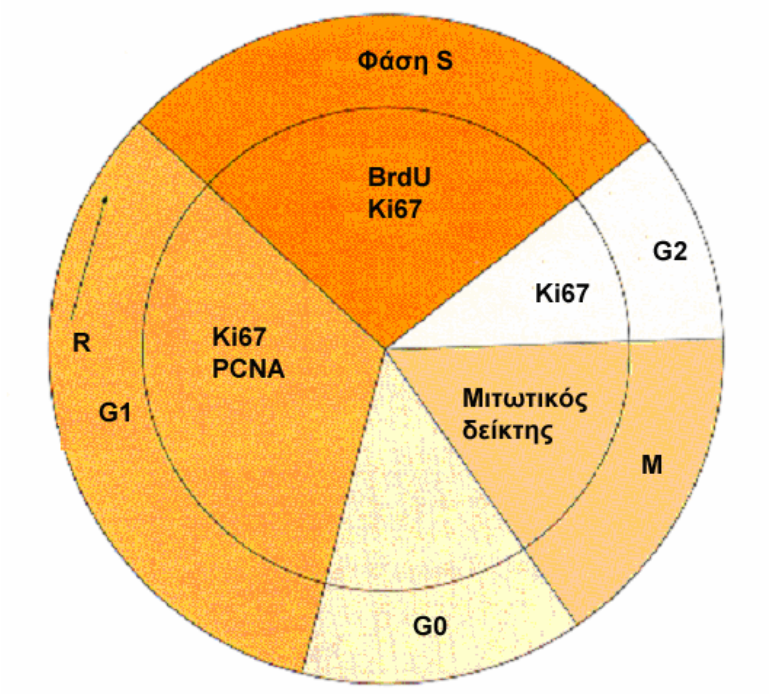
Με τις υπάρχουσες σήμερα θεραπευτικές δυνατότητες έχει αλλάξει η «φυσική ιστορία» της βαρείας μυασθένειας σε τέτοιο βαθμό ώστε κάποιοι να μην θεωρούν πλέον την ονομασία της πάθησης απόλυτα ορθή. Ο προσδιορισμός «βαρεία» όταν δόθηκε στις αρχές του προηγούμενο αιώνα, ήθελε να τονίσει τη σοβαρή, συχνά απειλούσα τη ζωή, φύση της πάθησης (Phillips LH, 2003). Σήμερα η θνησιμότητα από την πάθηση έχει μειωθεί πάρα πολύ και οι περισσότεροι ασθενείς, με την κατάλληλη θεραπεία, έχουν ικανοποιητική ποιότητα ζωής. Ωστόσο υπάρχουν ακόμη περιθώρια για ακόμη καλύτερη αντιμετώπιση της νόσου. Ελπίζουμε ότι μελλοντικές θεραπευτικές στρατηγικές θα στοχεύουν σε μια πιο ειδική ανοσολογική ρύθμιση που θα εστιάζει σε συγκεκριμένα αντισώματα ή κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος ώστε να επιτύχουν καλύτερα θεραπευτικά αποτελέσματα (Keesey JC, 2004).

Πίνακας 6: Κατάσταση μετά τη θεραπευτική παρέμβαση [Από το Αμερικανικό Ίδρυμα για τη Μυασθένεια (MGFA))

ΠΛΗΡΗΣ ΣΤΑΘΕΡΗ ΥΦΕΣΗ (ΠΣΥ)		Ο ασθενής δεν έχει συμπτώματα βαριάς μυασθένειας (ΒΜ) για τουλάχιστον 1 χρόνο και δεν λαμβάνει θεραπεία στη διάρκεια αυτού του χρόνου. Δεν υπάρχει μυϊκή αδυναμία σε κανένα μυ κατά την φυσική εξέταση. Μεμονωμένη μυϊκή αδυναμία στη σύγκλιση του βλεφάρου είναι αποδεκτή.
ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΗ ΥΦΕΣΗ (ΦΥ)		Τα ίδια κριτήρια όπως και στη ΠΣΥ εκτός του ότι ο ασθενής συνεχίζει να λαμβάνει κάποιας μορφής θεραπεία για ΒΜ. Ασθενείς που λαμβάνουν αναστολείς χολινεστεράσης εξαιρούνται από αυτή την κατηγορία γιατί η χρήση τέτοιων φαρμάκων υποδηλώνει μυϊκή αδυναμία.
ΕΛΑΧΙΣΤΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ (ΕΕ)		Ο ασθενής δεν έχει συμπτώματα λειτουργικής έκπτωσης από την ΒΜ αλλά έχει κάποια μυϊκή αδυναμία κατά την φυσική εξέταση σε κάποιους μύες. Αυτή η κατηγορία αναγνωρίζει ότι κάποιοι ασθενείς που σε άλλη περίπτωση θα θεωρείτο ότι βρίσκονται σε ΠΣΥ ή ΦΥ έχουν μυϊκή αδυναμία που είναι διακριτή μόνο με προσεκτική φυσική εξέταση.
	ΕΕ-0	Ο ασθενής δεν έχει πάρει θεραπεία για ΒΜ για τουλάχιστον 1 χρόνο.
	ΕΕ-1	Ο ασθενής συνεχίζει να παίρνει κάποιο είδος ανοσοκαταστολής, αλλά όχι αναστολείς χολινεστεράσης ή άλλη συμπτωματική θεραπεία.
	ΕΕ-2	Ο ασθενής έχει πάρει χαμηλή δόση αναστολέων χολινεστεράσης (<120 mg πυριδοστιγμίνης/ μέρα) για τουλάχιστον 1 χρόνο.
	ΕΕ-3	Ο ασθενής έχει πάρει αναστολείς χολινεστεράσης ή άλλη συμπτωματική θεραπεία και κάποιο είδος ανοσοκαταστολής τον τελευταίο χρόνο.
		ΑΛΛΑΓΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ
ΒΕΛΤΙΩΣΗ (Β)		Σημαντική μείωση των προ θεραπείας κλινικών εκδηλώσεων ή σημαντική μείωση των φαρμάκων της ΒΜ
ΣΤΑΘΕΡΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ (Σ)		Όχι σημαντική αλλαγή των προ θεραπείας κλινικών εκδηλώσεων ή μείωση των φαρμάκων της ΒΜ.
ΕΠΙΔΕΙΝΩΣΗ (Ε)		Σημαντική αύξηση των προ θεραπείας κλινικών εκδηλώσεων ή σημαντική αύξηση των φαρμάκων της ΒΜ
ΥΠΟΤΡΟΠΗ (Υ)		Ασθενείς που πληρούσαν τα κριτήρια για ΠΣΥ, ΦΥ ή ΕΕ αλλά μετέπειτα παρουσίασαν κλινικά ευρήματα σοβαρότερα από αυτά που επιτρέπουν τα κριτήρια αυτά.
ΘΑΝΑΤΟΣ ΑΠΟ ΜΥΑΣΘΕΝΕΙΑ (Θ)		Ασθενείς που πέθαναν από ΒΜ, από επιπλοκές της θεραπείας για ΒΜ ή μέσα σε 20 μέρες μετά τη θυμεκτομή.

ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ-ΑΠΟΠΤΩΣΗ

Σήμερα είναι γενικώς αποδεκτό ότι η εμφάνιση μη νεοπλασματικών (υπερπλαστικών ή ατροφικών) και νεοπλασματικών διαταραχών, είναι αποτέλεσμα των μεταβολών που προκαλούν γενετικές δράσεις στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση του φυσιολογικού κυττάρου. Στο παρελθόν η διαταραχή της ανάπτυξης εξηγείτο κατά το μεγαλύτερο μέρος από την αύξηση του κυτταρικού πληθυσμού. Μία συνήθης μέθοδος για την εκτίμηση του βαθμού του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ενός ιστού, είναι η αναγνώριση των κυττάρων που βρίσκονται σε φάση πολλαπλασιασμού. Στην εικόνα 8 φαίνονται οι διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου και η έκφραση των διαφόρων δεικτών κυτταρικού πολλαπλασιασμού.



Εικόνα 8: Οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου και η έκφραση των διαφόρων δεικτών κυτταρικού πολλαπλασιασμού

ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ

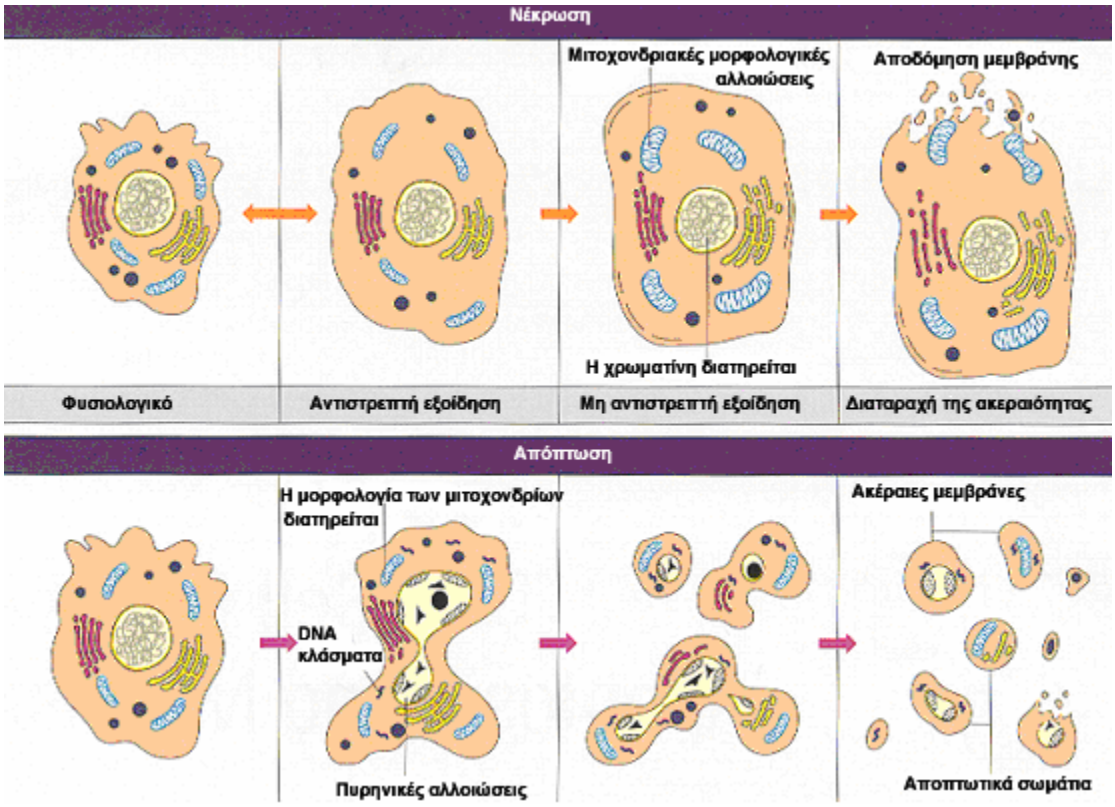
Το PCNA (proliferating cell nuclear antigen) είναι μία από τις διάφορες πρωτεΐνες οι οποίες σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο και οι οποίες εμφανίζουν τη μέγιστη αύξησή τους στην όψιμη G1 και S φάση των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων. Η σημασία του PCNA ως δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού, σχετίζεται με την ικανότητά του να ανιχνεύεται σε υψηλό ποσοστό σε ιστούς που έχουν μονιμοποιηθεί στη φορμόλη. Έτσι αποτελεί πιο κατάλληλο δείκτη σε σχέση με άλλους δείκτες πολλαπλασιασμού όπως η DNA πολυμεράση και η βρωμοδεοξυουριδίνη (Tsuji T, et al, 1995). Δυστυχώς το PCNA έχει μεγάλο χρόνο ημιζωής και έτσι μετά την έξοδο από τη φάση M, τα κύτταρα έχουν ακόμη ανιχνεύσιμα επίπεδα PCNA για παρατεταμένες χρονικές περιόδους. Έχει αναφερθεί ότι άλλοι δείκτες, όπως ο MIB-1, είναι πιο εξειδικευμένοι για να εκτιμήσουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε τομές παραφίνης.

Έτσι, ένας πιο ειδικός δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ο οποίος εκφράζει τη μέγιστη έκφραση κατά τη φάση S, είναι το αντιγόνο Ki67 το οποίο αποδομείται γρήγορα μετά τη μίτωση. Το αρχικό αντίσωμα που αναπτύχθηκε εναντίον αυτής της 395 kD πρωτεΐνης του Ki67 (pKi67), είναι ένα πρωτότυπο για τα άλλα αντισώματα και αναγνωρίζει επιτόπους στην πρωτεΐνη Ki67, όπως το MIB-1 (Brown DC, Gatter KC, 2002). Το MIB-1 είναι ένα αντίσωμα το οποίο ανιχνεύει το αντιγόνο Ki67 σε τομές παραφίνης (Li T-J, et al, 1995). Το Ki67 είναι μία μη ιστονική πρωτεΐνη η οποία εκφράζεται αρχικά στο μέσον της φάσης G1, αυξάνει τα επίπεδά του στις φάσεις S και G2 και φθάνει στα υψηλότερα επίπεδα στη φάση M. Έχει αναφερθεί ότι η χρώση για το Ki67 είναι πιο ακριβής από τη μέτρηση των μιτώσεων ή τη χρήση της χρώσης για το PCNA. Ο εκτιμώμενος χρόνος ημιζωής είναι 60-90 λεπτά (Brown DC, Gatter KC, 2002). Όμως, δεν βρίσκονται σε φάση ενεργού πολλαπλασιασμού όλα τα

κύτταρα τα οποία περιέχουν το αντιγόνο Ki67, και έτσι η χρήση του Ki67 στην εκτίμηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού δεν συνιστάται σε ιστούς οι οποίοι υπερεκφράζουν p53 ή p21 (Van Oijen MGCT, et al, 1998). Πρέπει να υπογραμμισθεί ότι η συσχέτιση ανάμεσα στο μιτωτικό δείκτη αλλά και το ποσοστό των κυττάρων που δίνουν θετική χρώση για το Ki67(+) ποικίλλει (Rudolph P, et al, 1998).

Όσον αφορά το θύμο και τις παθήσεις αυτού, έχει αναφερθεί ότι ασθενείς με θυμώματα, με ή χωρίς συνοδό βαρεία μυασθένεια, εμφανίζουν υψηλότερη έκφραση του Ki67 και αυτή η έκφραση σχετίζεται με το βάρος του θύμου (Gilhaus NE , et al, 1995). Άλλη μελέτη σε επιθηλιακούς όγκους του θύμου (Comin CE et al, 2004) έδειξε συσχέτιση μεταξύ έκφρασης του Ki67 και ιστολογικών υποτύπων αλλά καμία σχέση μεταξύ αυτού του παράγοντα και της μυασθένειας.

Σήμερα όμως είναι ευρέως αποδεκτό ότι η κυτταρική ομοιόσταση επιτυγχάνεται με την ισορροπία ανάμεσα την κυτταρική απόπτωση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την διακοπή της ανάπτυξης. Επομένως η ανάπτυξη ενός ιστού (και ειδικότερα κατά την εμφάνιση ενός όγκου) δεν είναι μόνο αποτέλεσμα του αυξημένου κυτταρικού πολλαπλασιασμού αλλά και της επιμήκυνσης του κύκλου ζωής των κυττάρων (μέσω αναστολής της απόπτωσης) (Hannun YA, 1998). Η απόπτωση αποτελεί μορφολογικώς διακριτή, γενετικώς κατευθυνόμενη μορφή κυτταρικού θανάτου, η οποία χαρακτηρίζεται από κυτταροπλασματική κατάτμηση και πυρηνική συμπύκνωση και αποτελεί μέρος φυσιολογικών ή/και παθολογικών διεργασιών (Cummings MC, et al, 1997). Σε αντίθεση με την κυτταρική νέκρωση, η απόπτωση εμφανίζεται σε μεμονωμένα κύτταρα τα οποία περιβάλλονται από άλλα υγιή και δεν συνοδεύεται από την παρουσία φλεγμονωδών στοιχείων (Cummings MC, et al, 1997, Cohen JJ, 1993, Kerr JF, et al, 1994, Steller H, 1995). Η εικόνα 9 και ο πίνακας 7 παρουσιάζουν τις διαφορές μεταξύ κυτταρικής νέκρωσης και απόπτωσης.



Εικόνα 9: Διαφορές μεταξύ νέκρωσης και απόπτωσης

Πίνακας 7: Χαρακτηριστικά κυτταρικής νέκρωσης και απόπτωσης (Από Kumarr V, et al, 2004)

Χαρακτηριστικό	**Νέκρωση**	**Απόπτωση**
Μέγεθος κυττάρου	Διόγκωση (εξοίδηση)	Ελάττωση (συρρίκνωση)
Πυρήνας	Πύκνωση → καρρυόρηξη → καρρυόλυση	Κατακερματισμός σε τεμάχια που έχουν το μέγεθος νουκλεοσώματος
Κυτταρική μεμβράνη	Διερρηγμένη	Άθικτη-μεταβολή της δομής και ειδικότερα του προσανατολισμού των λιπιδίων
Περιεχόμενα του κυττάρου	Ενζυμική πέψη-μπορεί να διαρρέουν έξω από το κύτταρο	Άθικτα-μπορεί να απελευθερώνονται στα αποπτωτικά σωμάτια
Παρακείμενη φλεγμονή	Συχνή	Όχι
Ρόλος σε φυσιολογικές ή παθολογικές καταστάσεις	Σχεδόν πάντα παθολογικός (καλπασμός της μη αντιστρεπτής κυτταρικής βλάβης)	Συχνά φυσιολογικός, σημαίνει την εξάλειψη των «άχρηστων κυττάρων». Μπορεί να είναι παθολογικός σε μερικές περιπτώσεις κυτταρικής βλάβης του DNA

Όπως είπαμε η απόπτωση αποτελεί μια μορφή κυτταρικού θανάτου, η οποία επάγεται από ένα αυστηρά ρυθμιζόμενο εκδοκυτταρικό πρόγραμμα. Σύμφωνα με το πρόγραμμα αυτό, τα κύτταρα τα οποία προορίζονται να «πεθάνουν», ενεργοποιούν ένζυμα και αυτά με τη σειρά τους, αποδομούν το DNA του ίδιου του κυττάρου και τις πυρηνικές και κυτταροπλασματικές του πρωτεΐνες. Η κυτταρική μεμβράνη παραμένει άθικτη, αλλά η δομή της αλλάζει κατά τέτοιο τρόπο, ώστε το αποπτωτικό κύτταρο να καθίσταται στόχος για φαγοκυττάρωση. Το «νεκρό» κύτταρο απομακρύνεται γρήγορα, πριν υπάρξει διαρροή του «περιεχομένου» του στον εξωκυττάριο χώρο και γι΄ αυτό, αυτή η μορφή κυτταρικού θανάτου, δεν πυροδοτεί φλεγμονώδη αντίδραση στον ξενιστή. Έτσι, η απόπτωση διαφέρει θεμελιωδώς από τη νέκρωση, η οποία χαρακτηρίζεται από απώλεια της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης, ενζυμική πέψη των κυττάρων και συχνά φλεγμονώδη αντίδραση του ξενιστή. Ωστόσο η απόπτωση και η νέκρωση μερικές φορές συνυπάρχουν και μπορεί να μοιράζονται κοινά χαρακτηριστικά και μηχανισμούς.

ΑΙΤΙΑ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ

Η απόπτωση αναγνωρίσθηκε αρχικά το 1972, από τη διακριτή της μορφολογία και πήρε το όνομά της από τον ελληνικό όρο απόπτωση (από + πτώσις), ο οποίος αναφέρεται στο πέσιμο των γηρασμένων φύλλων από τα δένδρα, το φθινόπωρο (Kerr JF, et al, 1972). Συμβαίνει φυσιολογικά σε πολλές περιπτώσεις και χρησιμεύει για να εξαλείφει τα ανεπιθύμητα ή δυνητικά βλαπτικά κύτταρα, καθώς και τα κύτταρα που έχουν εξαντλήσει τη χρησιμότητά τους. Αποτελεί επίσης παθολογικό φαινόμενο που συμβαίνει όταν σε περιπτώσεις βλάβης του κυττάρου, ιδιαίτερα στο DNA του, το κύτταρο αποτυγχάνει να επιδιορθώσει αυτή τη βλάβη. Σε αυτές τις περιπτώσεις το συγκεκριμένο αυτό κύτταρο, απομακρύνεται μέσω απόπτωσης. Η απόπτωση είναι

υπεύθυνη για πολυάριθμες φυσιολογικές, προσαρμοστικές και παθολογικές καταστάσεις που αναφέρονται παρακάτω.

ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ

Ο θάνατος μέσω απόπτωσης είναι ένα φυσιολογικό φαινόμενο το οποίο χρησιμεύει στο να απομακρύνει κύτταρα τα οποία δεν χρειάζονται πλέον, όπως επί παραδείγματι κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, αλλά και στο να διατηρεί σταθερούς τους διάφορους κυτταρικούς πληθυσμούς στους ιστούς. Είναι σημαντική στις ακόλουθες φυσιολογικές καταστάσεις:

- Την προγραμματισμένη καταστροφή κυττάρων κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, περιλαμβανομένων της εμφύτευσης, οργανογένεσης και μεταμόρφωσης (Metzstein MM, et al, 1998).
- Την ορμονοεξαρτώμενη υποστροφή ιστών στον ενήλικα, όπως η αποδόμηση των ενδομητρικών κυττάρων κατά τη διάρκεια του έμμηνου κύκλου, η υποστροφή του μαστού μετά τη διακοπή του θηλασμού, και η ατροφία του προστάτου μετά από ορχεκτομή.
- Την εξάλειψη κυττάρων σε πολλαπλασιαζόμενους κυτταρικούς πληθυσμούς, όπως το κρυπτικό επιθήλιο του εντέρου, ώστε να διατηρείται ένας σταθερός αριθμός ζώντων κυττάρων.
- Τον θάνατο των κυττάρων του ξενιστή τα οποία έχουν ολοκληρώσει τη χρήσιμη αποστολή τους, όπως τα ουδετερόφιλα σε μία οξεία φλεγμονώδη αντίδραση και τα λεμφοκύτταρα στο τέλος μίας ανοσολογικής αντίδρασης. Σε αυτές τις καταστάσεις τα κύτταρα υφίστανται απόπτωση διότι στερούνται των απαραίτητων σημάτων επιβίωσης, όπως είναι οι αυξητικοί παράγοντες.
- Την εξάλειψη των δυνητικά επιβλαβών αυτο-αντιδραστικών λεμφοκυττάρων, είτε πριν ή αφού έχουν συμπληρώσει την ωρίμανσή τους.

- Τον κυτταρικό θάνατο που επάγεται από τα κυτταροτοξικά Τ-κύτταρα, έναν μηχανισμό άμυνας εναντίον ιών και όγκων ο οποίος χρησιμεύει στο να εξαλείψει κύτταρα μολυσμένα από ιούς και νεοπλασματικά κύτταρα. Ο ίδιος μηχανισμός είναι υπεύθυνος για την κυτταρική απόρριψη στη μεταμόσχευση.

ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΣΕ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ

Ο θάνατος μέσω απόπτωσης είναι επίσης υπεύθυνος για την απώλεια κυττάρων σε μία ποικιλία παθολογικών καταστάσεων:

- Τον κυτταρικό θάνατο που προέρχεται από διάφορα βλαπτικά ερεθίσματα. Για παράδειγμα, η ακτινοβολία και τα κυτταροτοξικά αντινεοπλασματικά φάρμακα καταστρέφουν το DNA και εάν οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης δεν μπορούν να αποκαταστήσουν την βλάβη, το κύτταρο «σκοτώνει» τον εαυτό του με το μηχανισμό της απόπτωσης. Σε αυτές τις καταστάσεις η εξάλειψη του κυττάρου μπορεί να αποτελεί καλύτερη εναλλακτική λύση, από να διακινδυνεύσει κανείς μεταλλάξεις και αντιμεταθέσεις στο κατεστραμμένο DNA, γεγονός το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε κακοήθη εξαλλαγή. Αυτά τα βλαπτικά ερεθίσματα, όπως επίσης η θερμότητα και η υποξία, μπορεί να προκαλέσουν απόπτωση εάν η βλάβη είναι ήπια, αλλά σε μεγάλες δόσεις τα ίδια ερεθίσματα μπορεί να προκαλέσουν κυτταρικό θάνατο μέσω νέκρωσης.
- Την κυτταρική βλάβη σε ορισμένες ιογενείς παθήσεις, όπως η ιογενής ηπατίτιδα, στην οποία η απώλεια των μολυσμένων κυττάρων οφείλεται κυρίως στο θάνατο μέσω απόπτωσης.
- Την παθολογική ατροφία σε παρεγχυματικά όργανα μετά από απόφραξη πόρων, όπως συμβαίνει στο πάγκρεας, την παρωτίδα και τον νεφρό.
- Τον κυτταρικό θάνατο σε όγκους, πιο συχνά κατά τη διάρκεια της υποστροφής αυτών αλλά επίσης και στους αναπτυσσόμενους όγκους.

Ακόμη και σε περιπτώσεις στις οποίες ο κυτταρικός θάνατος συμβαίνει κυρίως μέσω νέκρωσης, ο μηχανισμός της απόπτωσης μπορεί και αυτός να συνεισφέρει. Π.χ. βλαπτικά ερεθίσματα τα οποία προκαλούν αυξημένη μιτοχονδριακή διαπερατότητα πυροδοτούν την απόπτωση.

ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ

Τα κύτταρα που υφίστανται απόπτωση, χαρακτηρίζονται από τα ακόλουθα μορφολογικά χαρακτηριστικά, τα οποία είναι περισσότερο ευδιάκριτα με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Συρρίκνωση του κυττάρου. Το κύτταρο είναι μικρότερο σε μέγεθος, το κυτταρόπλασμά του είναι πυκνό και τα οργανίδια, αν και σχετικά φυσιολογικά, βρίσκονται πιο κοντά το ένα στο άλλο (συμπλησιάζουν).

Πύκνωση της χρωματίνης. Αυτό είναι το κυριότερο χαρακτηριστικό της απόπτωσης. Η χρωματίνη συσσωρεύεται στην περιφέρεια, κάτω από την πυρηνική μεμβράνη και σχηματίζει πυκνές μάζες ποικίλου μεγέθους και σχήματος. Ο πυρήνας μπορεί να διασπασθεί από μόνος του και να σχηματίσει δύο ή περισσότερα τμήματα.

Σχηματισμός κυτταροπλασματικών φυσαλίδων και αποπτωτικών σωματίων. Το αποπτωτικό κύτταρο αρχικά χαρακτηρίζεται από εκτεταμένο σχηματισμό φυσαλίδων στην επιφάνεια. Στη συνέχεια υφίσταται διάσπαση σε αποπτωτικά σωμάτια καλυμμένα από μεμβράνη, τα οποία περιέχουν κυτταρόπλασμα και οργανίδια που βρίσκονται κοντά το ένα στο άλλο, ενώ τμήματα πυρήνα μπορεί να περιέχονται μπορεί και όχι.

Φαγοκυττάρωση των αποπτωτικών κυττάρων ή αποπτωτικών σωματίων, συνήθως από μακροφάγα. Τα αποπτωτικά σωμάτια αποδομούνται γρήγορα από τα λυσοσώματα μακροφάγων και παρακείμενα υγιή κύτταρα μεταναστεύουν ή πολλαπλασιάζονται προκειμένου να καλύψουν το χώρο που καταλάμβανε το

αποπτωτικό κύτταρο.

Η κυτταρική μεμβράνη πιστεύεται ότι παραμένει άθικτη κατά τη διάρκεια της απόπτωσης, έως τα τελευταία στάδια, όπου και γίνεται διαπερατή για ουσίες οι οποίες υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν είναι διαπερατές. Αυτή η κλασική περιγραφή είναι ακριβής όσον αφορά την απόπτωση που συμβαίνει σε φυσιολογικές καταστάσεις, όπως η εμβρυογένεση και η εξάλειψη των κυττάρων της ανοσίας. Ωστόσο μορφές κυτταρικού θανάτου που εμφανίζουν τα χαρακτηριστικά της νέκρωσης αλλά και της απόπτωσης ταυτόχρονα, δεν είναι ασυνήθεις μετά από επίδραση βλαπτικών ερεθισμάτων (Wyllie AH, 1997). Κάτω από τέτοιες συνθήκες, η βαρύτητα παρά η ειδικότητα του ερεθίσματος, καθορίζει το είδος του θανάτου που λαμβάνει χώρα. Εάν τα νεκρωτικά χαρακτηριστικά επικρατούν, τότε συμβαίνει πρώιμη καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης και εξοίδηση παρά συρρίκνωση του κυττάρου. Στην ιστολογική εξέταση, μετά από χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης, βλέπουμε την απόπτωση σε μονήρη κύτταρα ή μικρές αθροίσεις κυττάρων. Το αποπτωτικό κύτταρο εμφανίζεται ως στρογγύλη ή ωοειδής μάζα με έντονο ηωσινοφιλικό κυτταρόπλασμα και πυκνά κλάσματα πυρηνικής χρωματίνης. Επειδή η συρρίκνωση του κυττάρου και ο σχηματισμός των αποπτωτικών σωματίων είναι γρήγορος και τα κλάσματα φαγοκυτταρώνονται γρήγορα, ένας σημαντικός βαθμός απόπτωσης μπορεί να λαμβάνει χώρα στους ιστούς, προτού γίνει ορατή στις ιστολογικές τομές. Επιπροσθέτως, η απόπτωση, σε αντίθεση με τη νέκρωση, δεν χαρακτηρίζεται από την παρουσία φλεγμονής, γεγονός που καθιστά την ανίχνευσή της στις ιστολογικές τομές ακόμη πιο δύσκολη.

ΒΙΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ

Διάσπαση πρωτεϊνών. Ένα ειδικό χαρακτηριστικό της απόπτωσης είναι η υδρόλυση πρωτεϊνών που προκαλείται κατόπιν ενεργοποίησης μελών μίας οικογένειας

πρωτεασών της κυστεϊνης που ονομάζονται κασπάσες (Strasser A, et al, 2000). Πολλές κασπάσες υπάρχουν σε φυσιολογικά κύτταρα ως ανενεργά προ-ένζυμα και χρειάζεται να ενεργοποιηθούν ώστε να επάγουν την απόπτωση. Οι ενεργείς κασπάσες διασπούν πολλές ζωτικής σημασίας κυτταρικές πρωτεΐνες, όπως τις λαμίνες και έτσι προκαλούν διάλυση του κυτταροσκελετού. Επιπλέον οι κασπάσες ενεργοποιούν τις DNάσες οι οποίες αποδομούν το πυρηνικό DNA. Αυτές οι μεταβολές είναι υπεύθυνες για τις πυρηνικές και κυτταροπλασματικές δομικές αλλοιώσεις που βλέπουμε στα αποπτωτικά κύτταρα.

Αποδόμηση DNA. Ένα από τα βασικά βιοχημικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης είναι ο κατακερματισμός του DNA από τη δράση ενδονουκλεασών. Η αρχική διάσπαση του DNA γίνεται σε τμήματα 50-300 χιλιάδων ζευγών βάσεων και συνήθως ακολουθείται από διάσπαση σε μικρότερα ενδονουκλεοσωμικά τμήματα μεγέθους 180-200 ζευγών βάσεων (Vaux D, Silke J, 2003). Συνέπεια του γεγονότος αυτού είναι η εμφάνιση ενός κλιμακωτού προτύπου κατά την ηλεκτροφόρηση του DNA σε γέλη αγαρόζης (McCarthy NJ, Evan GI, 1998). Θα πρέπει βέβαια να σημειωθεί ότι το φαινόμενο του κατακερματισμού του DNA δεν παρατηρείται αποκλειστικά στην απόπτωση αλλά μπορεί επίσης να συμβεί και κατά τον κυτταρικό θάνατο μέσω νέκρωσης (Schulte-Herman R, et al 1995).

Φαγοκυτταρική αναγνώριση. Τα αποπτωτικά κύτταρα εκφράζουν φωσφατιδυλοσερίνη στις εξωτερικές στοιβάδες της κυτταρικής τους μεμβράνης η οποία έχει έλθει από τις εσωτερικές στοιβάδες (λόγω αυτών των μεταβολών, τα αποπτωτικά κύτταρα μπορούν να ανιχνευθούν με ειδικές χρώσεις όπως αννεξίνη V). Σε ορισμένους τύπους απόπτωσης, εκφράζεται στην επιφάνεια των αποπτωτικών σωματίων η θρομβοσπονδίνη, μια γλυκοπρωτείνη προσκόλλησης. Και άλλες πρωτεΐνες που εκκρίνονται από τα φαγοκύτταρα μπορεί να δεσμεύουν τα αποπτωτικά

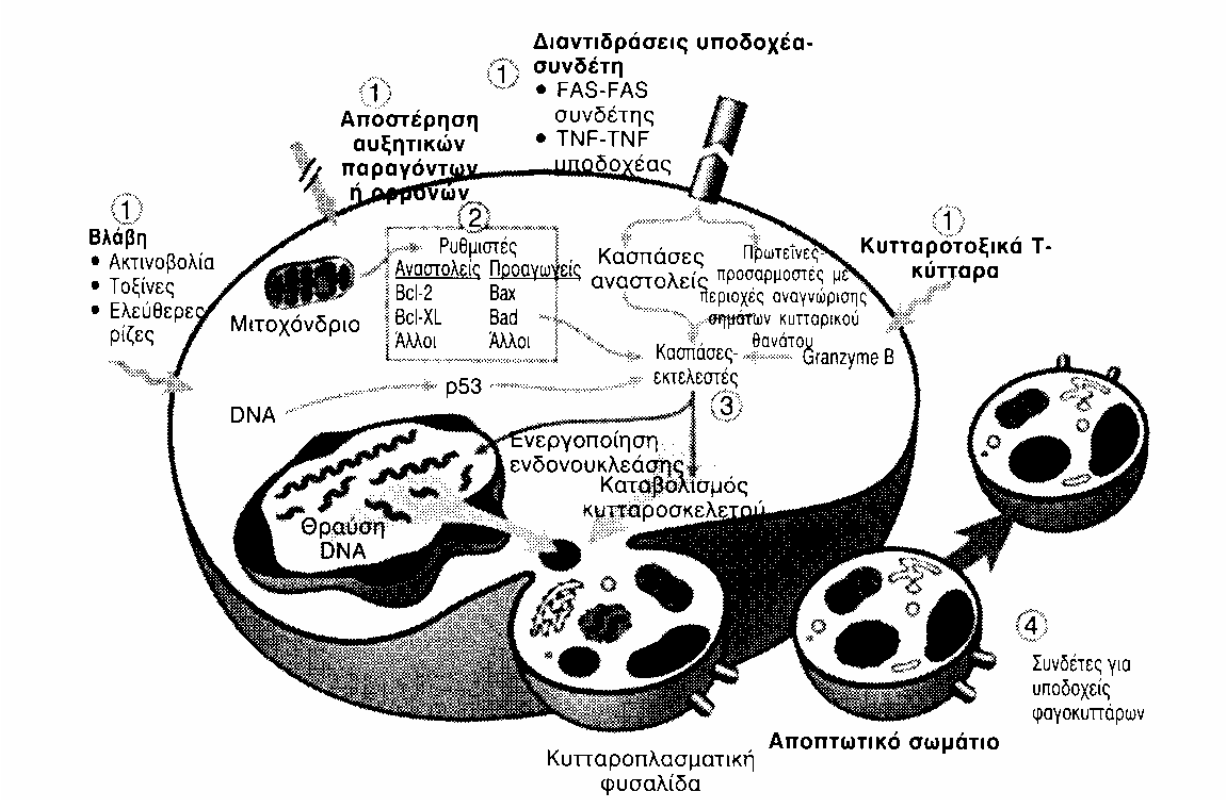
κύτταρα και να προκαλούν οψωνινοποίηση για φαγοκυττάρωση (Hanayama R, et al. 2002). Αυτές οι μεταβολές επιτρέπουν την πρώιμη αναγνώριση των νεκρών κυττάρων από τα μακροφάγα και οδηγούν στη φαγοκυττάρωση χωρίς απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτταρικών στοιχείων (Savill J, Fadok V, 2000). Με αυτό τον τρόπο η αποπτωτική διεργασία απομακρύνει τα κύτταρα με ελάχιστη βλάβη στον περιβάλλοντα ιστό.

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ

Η απόπτωση επάγεται από έναν καταρράκτη μοριακών γεγονότων, τα οποία μπορεί να αρχίζουν με διαφορετικό τρόπο και κορυφώνονται με την ενεργοποίηση των κασπασών (εικόνα 10) (Strasser A, et al, 2000). Επειδή πάρα πολύ ή πολύ λίγη απόπτωση πιστεύεται ότι χαρακτηρίζει πολλές παθήσεις, όπως εκφυλιστικές νόσους και τον καρκίνο, υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον στο να κατανοήσει κανείς τους μηχανισμούς αυτής της μορφής κυτταρικού θανάτου. Τα τελευταία χρόνια έχει επιτευχθεί πολύ μεγάλη πρόοδος στην κατανόηση των μηχανισμών της απόπτωσης, ιδιαίτερα στα μετάζωα. Είναι σημαντικό ότι οι βασικοί μηχανισμοί της απόπτωσης διατηρούνται σε όλα τα μετάζωα (Vaux DL, Strasser A, 1996). Πράγματι, μελέτες στον νηματοσκώληκα Caenorhabditis elegans, ο οποίος υφίσταται ένα είδος προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, επέτρεψαν την ταυτοποίηση ειδικών γονιδίων (τα ονομαζόμενα ced από το C. Elegans death), τα οποία προκαλούν την έναρξη της απόπτωσης ή αναστέλλουν την απόπτωση.

Η διαδικασία της απόπτωσης διακρίνεται σε μία εναρκτήρια φάση, κατά την οποία οι κασπάσες γίνονται καταλυτικά ενεργείς, και σε μία εκτελεστική φάση κατά την οποία αυτά τα ένζυμα δρουν για να προκαλέσουν κυτταρικό θάνατο. Η έναρξη της απόπτωσης συμβαίνει πρωταρχικά με την παρουσία σημάτων από δύο διακριτά

αλλά συγκλίνοντα μονοπάτια -το εξωγενές ή αυτό που ξεκινά μέσω υποδοχέων θανάτου, και το ενδογενές ή μιτοχονδριακό-. Και τα δύο μονοπάτια οδηγούν στην ενεργοποίηση των κασπασών.

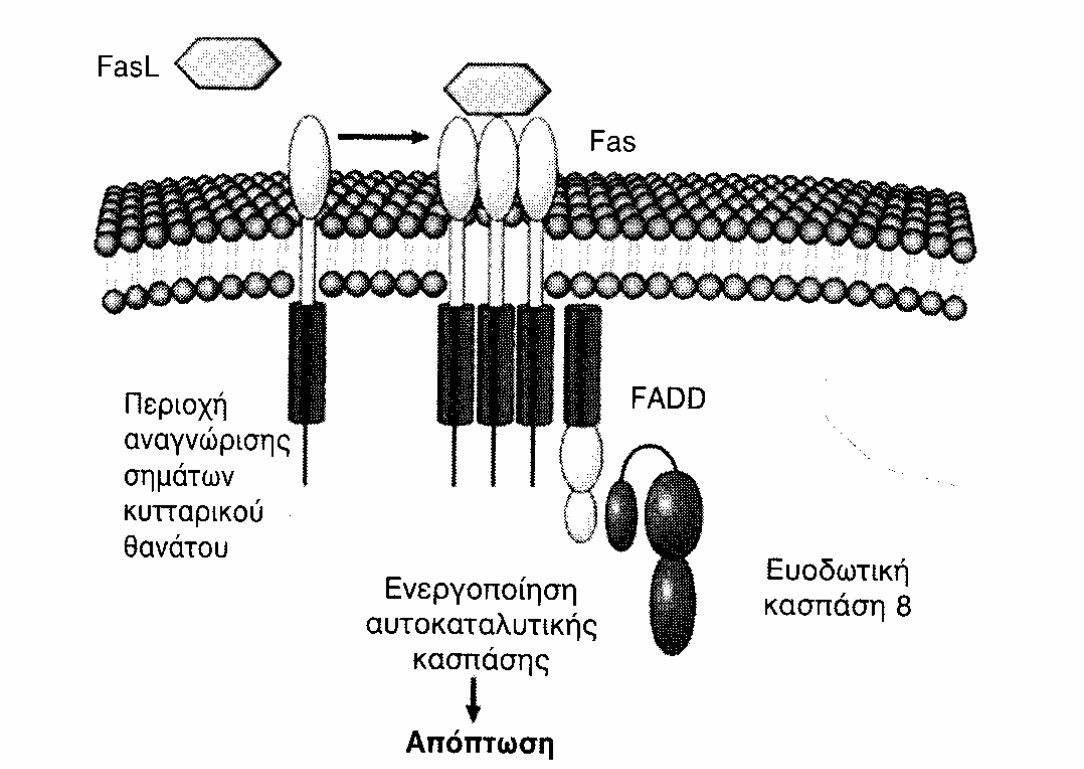


Εικόνα 10: Μηχανισμοί της απόπτωσης. (1) Ορισμένοι από τους μείζονες επαγωγείς της απόπτωσης. Αυτοί περιλαμβάνουν ειδικούς συνδέτες θανάτου [παράγων νέκρωση όγκου (TNF) και Fas ligand], απόσυρση αυξητικών παραγόντων ή ορμονών και βλαπτικούς παράγοντες (π.χ. ακτινοβολία). Ορισμένα ερεθίσματα (όπως κυτταροτοξικά κύτταρα) ενεργοποιούν απευθείας τις εκτελεστικές κασπάσες (δεξιά). Άλλα δρουν μέσω πρωτεϊνών προσαρμογής και κασπασών έναρξης, ή μέσω μιτοχονδριακών γεγονότων που εμπλέκουν το κυτόχρωμα *c*. (2) Έλεγχος και ρύθμιση επηρεάζονται από μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών bcl-2, οι οποίες μπορεί να αναστέλλουν ή να επάγουν τον κυτταρικό θάνατο. (3) Οι εκτελεστικές κασπάσες ενεργοποιούν λανθάνουσες κυτταροπλασματικές ενδονουκλεάσες και πρωτεάσες οι οποίες αποδομούν πυρηνικές και κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες. Αυτό οδηγεί σε ένα καταρράκτη ενδοκυττάριας αποδόμησης, περιλαμβανομένης της κλασματοποίησης της πυρηνικής χρωματίνης και αποδόμησης του κυτταροσκελετού. (4) Το τελικό αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός των αποπτωτικών σωματίων που περιέχουν ενδοκυττάρια οργανίδια και άλλα συστατικά του κυτταροπλάσματος. Αυτά τα σωμάτια εκφράζουν νέους συνδέτες για σύνδεση και απορρόφηση από τα φαγοκύτταρα (Από Robbins SL, et al, 2003).

ΤΟ ΕΞΩΓΕΝΕΣ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ

Αυτό το μονοπάτι αρχίζει με τη σύνδεση των υποδοχέων θανάτου στην επιφάνεια μιάς ποικιλίας κυττάρων (Wallach D, et al, 1999). Οι υποδοχείς θανάτου είναι μέλη της οικογένειας των υποδοχέων του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF). Περιέχουν ένα κυτταροπλασματικό τμήμα που εμπλέκεται σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών και το οποίο καλείται τμήμα θανάτου διότι παίζει ουσιαστικό ρόλο στο να παραδίδει τα αποπτωτικά σήματα. Ορισμένα μέλη της οικογένειας των TNF υποδοχέων δεν περιέχουν κυτταροπλασματικό τμήμα θανάτου και ο ρόλος τους στην πυροδότηση της απόπτωσης είναι λιγότερο ξεκάθαρος. Οι καλύτερα γνωστοί υποδοχείς θανάτου είναι ο TNF υποδοχέας τύπου 1 (TNFR1) και μία σχετιζόμενη πρωτεΐνη που καλείται Fas (CD95), αλλά έχουν περιγραφεί και άλλοι. Ο μηχανισμός της απόπτωσης που επάγεται από αυτούς τους υποδοχείς θανάτου απεικονίζεται καλά μέσω του Fas (εικόνα 11). Όταν το Fas συνδέεται διασταυρούμενα με τον συνδέτη του, τον FasL, τρία ή περισσότερα μόρια του Fas συμπλησιάζουν και τα κυτταροπλασματικά τους τμήματα θανάτου δημιουργούν μία δεσμευτική θέση για μία πρωτεΐνη- προσαρμοστή, η οποία επίσης περιέχει τμήμα θανάτου και καλείται FADD (Fas-associated death domain). Η FADD που προσκολλάται στους υποδοχείς θανάτου, συνδέει μία ανενεργό μορφή της κασπάσης-8 (και στους ανθρώπους της κασπάσης-10), πάλι μέσω ενός τμήματος θανάτου. Πολλαπλά μόρια προ-κασπάσης-8 έρχονται σε εγγύτητα και προκαλούν διάσπαση το ένα στο άλλο ώστε να παραχθεί η ενεργός κασπάση-8. Το ένζυμο αυτό στη συνέχεια πυροδοτεί έναν καταρράκτη ενεργοποίησης κασπασών. Αυτό γίνεται με διάσπαση και ενεργοποίηση άλλων προ-κασπασών και στη συνέχεια τα ενεργά ένζυμα (ενεργείς κασπάσες) διαμεσολαβούν την εκτελεστική φάση της απόπτωσης. Αυτό το μονοπάτι της απόπτωσης μπορεί να ανασταλεί από μία πρωτεΐνη που ονομάζεται FLIP. Αυτή δεσμεύεται στην προ-

κασπάση-8 αλλά δεν μπορεί να προκαλέσει διάσπαση και ενεργοποίηση του ενζύμου διότι στερείται ενζυμικής δραστηριότητας (Thome M, Tschopp J, 2001). Ορισμένοι ιοί και φυσιολογικά κύτταρα παράγουν FLIP και χρησιμοποιούν αυτή την ανασταλτική πρωτεΐνη για να προστατεύσουν τα μολυσμένα και φυσιολογικά κύτταρα από την απόπτωση που διαμεσολαβείται μέσω Fas. Το κεραμίδιο του σφιγγολιπιδίου έχει ενοχοποιηθεί ως ένας διάμεσος παράγων μεταξύ των υποδοχέων θανάτου και της ενεργοποίησης των κασπασών, αλλά ο ρόλος αυτού του μονοπατιού δεν είναι ξεκάθαρος (van Blitterswijk WJ, et al, 2003).



Εικόνα 11: Μοντέλο σηματοδότησης μέσω Fas, ενεργοποίησης κασπάσης και επαγωγής ενός σήματος θανάτου. Ο Fas-συνδέτης αντιδρά με τον Fas μετατρέποντας τον υποδοχέα σε τριμερές, με αποτέλεσμα τη σύνδεση της κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης-προσαρμοστή FADD μέσω μιας περιοχής αναγνώρισης σημάτων θανάτου. Στη συνέχεια, η πρωτεΐνη-προσαρμοστής ενεργοποιεί την ευοδωτική κασπάση 8 πυροδοτώντας τη φάση εκτέλεσης του κυτταρικού θανάτου (Από Robbins SL, et al, 2003).

ΤΟ ΕΝΔΟΓΕΝΕΣ (ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ) ΜΟΝΟΠΑΤΙ

Αυτό το μονοπάτι της απόπτωσης είναι το αποτέλεσμα της αυξημένης μιτοχονδριακής διαπερατότητας και της απελευθέρωσης των προ-αποπτωτικών μορίων στο κυτταρόπλασμα και δεν παίζουν ρόλο οι υποδοχείς θανάτου (Ravagnan L, et al, 2002, Scorrano L, Korsmeyer SJ, 2003). Αυξητικοί παράγοντες και άλλα σήματα επιβίωσης διεγείρουν την παραγωγή των αντιαποπτωτικών μελών της οικογένειας πρωτεϊνών bcl-2 (Cory S, Adams JM, 2002).

Η οικογένεια αυτή ονομάσθηκε έτσι μετά την ταυτοποίηση του bcl-2, ως ένα ογκογονίδιο που υπάρχει στο λέμφωμα από Β-κύτταρα και είναι ομόλογο της πρωτεΐνης του C. elegans, Ced-9. Υπάρχουν περισσότερες από 20 πρωτεΐνες σε αυτή την οικογένεια, όλες δε λειτουργούν για να ρυθμίσουν την απόπτωση. Οι δύο κύριες αντιαποπτωτικές είναι οι bcl-2 και bcl-x. Αυτές οι αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες φυσιολογικά βρίσκονται στις μιτοχονδριακές μεμβράνες και στο κυτταρόπλασμα. Όταν τα κύτταρα στερούνται των σημάτων επιβίωσης ή υπόκεινται σε stress, τα bcl-2 και/ή bcl-x εξαφανίζονται από τη μιτοχονδριακή μεμβράνη και αντικαθίστανται από προ-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας, όπως τα bak, bax, και bim. Όταν τα επίπεδα των bcl-2/bcl-x ελαττώνονται, η διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης αυξάνει και απελευθερώνονται διάφορες πρωτεΐνες που μπορεί να ενεργοποιήσουν τον καταρράκτη των κασπασών (εικόνα 12). Μία από αυτές τις πρωτεΐνες είναι το κυτόχρωμα c, το οποίο είναι αρκετά γνωστό για το ρόλο του στην μιτοχονδριακή αναπνοή. Στο κυτταρόπλασμα, το κυτόχρωμα c συνδέεται σε μία πρωτεΐνη που ονομάζεται Apaf-1 (παράγων ενεργοποίησης της απόπτωσης-1, ομόλογος με το Ced-4 του C. Elegans), και το σύμπλεγμα ενεργοποιεί την κασπάση-9 (Reed JC, 1997). (Το bcl-2 και το bcl-x μπορεί επίσης να αναστέλλουν απευθείας την ενεργοποίηση του Apaf-1 και η απώλειά τους από τα κύτταρα μπορεί να επιτρέπει την

ενεργοποίηση του Apaf-1). Άλλες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες, όπως ο παράγων που επάγει την απόπτωση (AIF), μπαίνουν στο κυτταρόπλασμα, όπου συνδέονται και εξουδετερώνουν διάφορους αναστολείς της απόπτωσης, των οποίων η φυσιολογική λειτουργία είναι ο αποκλεισμός της ενεργοποίησης των κασπασών (Salvesen GS, Duckett CS, 2002). Το καθαρό αποτέλεσμα είναι η έναρξη του καταρράκτη των κασπασών. Έτσι, το ουσιαστικό για το ενδογενές μονοπάτι είναι η ισορροπία μεταξύ των προ-αποπτωτικών και προστατευτικών μορίων, τα οποία ρυθμίζουν την μιτοχονδριακή διαπερατότητα, και της απελευθέρωσης των επαγωγέων θανάτου, οι οποίοι φυσιολογικά είναι απομονωμένοι μέσα στα μιτοχόνδρια.

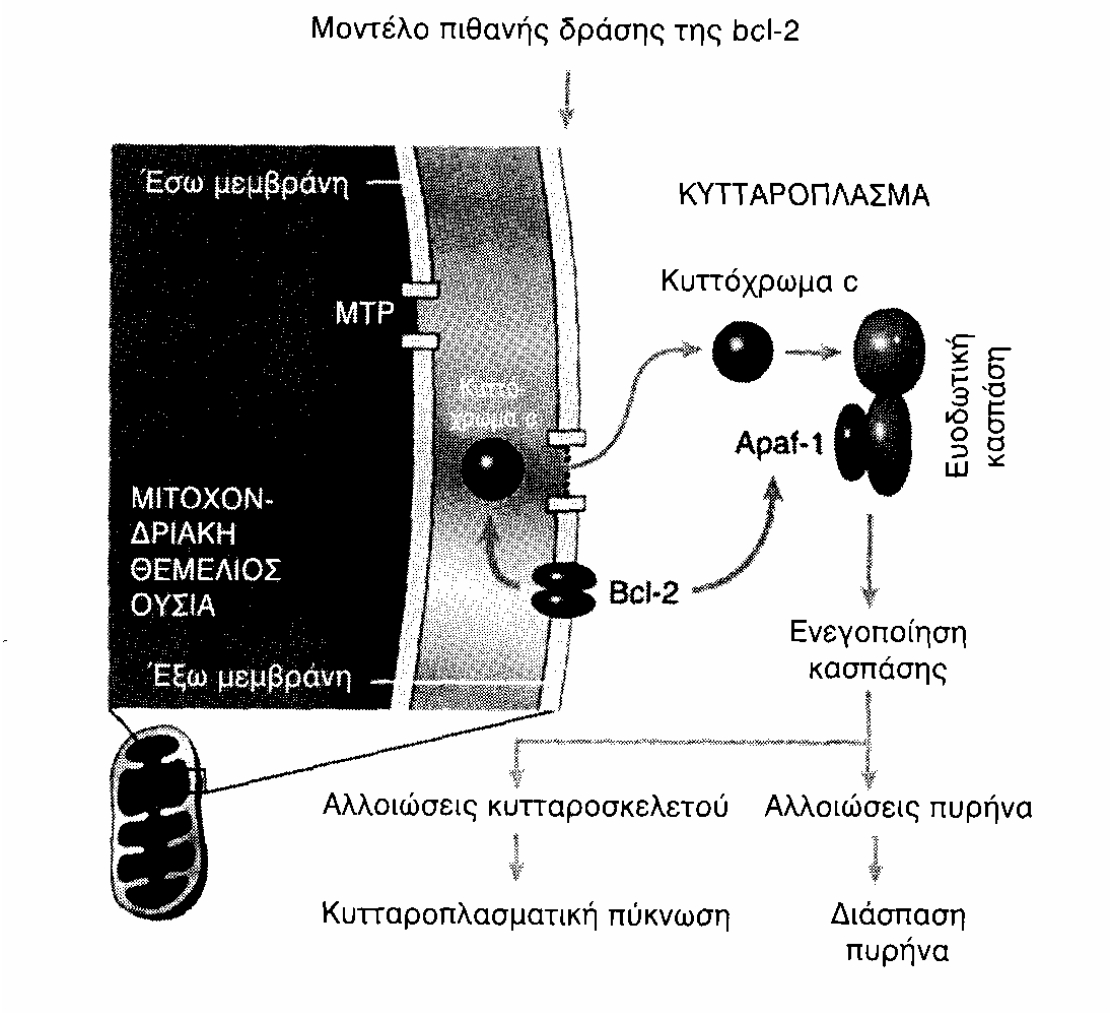
Υπάρχουν πολλά ευρήματα ότι το ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης μπορεί να πυροδοτείται χωρίς να παίζουν ρόλο τα μιτοχόνδρια (Joza N, et al 2002). Όμως αυτά τα μονοπάτια της απόπτωσης που αφορούν την μη εξαρτώμενη από τα μιτοχόνδρια έναρξη, δεν είναι καλά ορισμένα. Πολλές φορές μπορεί να υπάρχει αλληλοεπικάλυψη ανάμεσα στο ενδογενές και εξωγενές μονοπάτι της απόπτωσης. Π.χ. στα ηπατοκύτταρα, το Fas ενεργοποιεί ένα προ-αποπτωτικό μέλος της οικογένειας bcl το οποίο ονομάζεται bid, το οποίο στη συνέχεια ενεργοποιεί το μιτοχονδριακό μονοπάτι. Δεν είναι γνωστό εάν τέτοιες «συνεργατικές» αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αποπτωτικών μονοπατιών συμβαίνουν σε άλλους τύπους κυττάρων.

Η ΕΚΤΕΛΕΣΤΙΚΗ ΦΑΣΗ

Αυτή η τελική φάση της απόπτωσης διαμεσολαβείται από ένα πρωτεολυτικό καταρράκτη. Οι πρωτεάσες οι οποίες διαμεσολαβούν την εκτελεστική φάση ανήκουν στη οικογένεια των κασπασών, όπως αναφέρθηκε και προηγούμενα.

Η οικογένεια των κασπασών περιλαμβάνει τώρα περισσότερα από 10 μέλη και διακρίνεται λειτουργικά σε δύο ομάδες, τις εκκινητήριες και τις εκτελεστικές. Αυτή

η ταξινόμηση εξαρτάται από τη σειρά με την οποία αυτές ενεργοποιούνται κατά τη διάρκεια της απόπτωσης (Salvesen GS, Dixit VM, 1997). Οι εκκινητήριες κασπάσες περιλαμβάνουν την κασπάση-8 και την κασπάση-9. Άλλες κασπάσες όπως η κασπάση-3 και η κασπάση-6 δρουν ως εκτελεστικές.



Εικόνα 12: Το ενδογενές (μιτοχονδριακό) μονοπάτι της απόπτωσης. Γεγονότα που αφορούν στα μιτοχόνδρια και τις δράσεις της bcl-2 κατά την απόπτωση. Οι διαμεσολαβητές θανάτου προκαλούν αλλοιώσεις στην έσω μιτοχονδριακή μεμβράνη, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιτοχονδριακής διαπερατότητας μετάβασης (MPT) και απελευθέρωση στο κυτταρόπλασμα κυτοχρώματος c με, προς το παρόν, ασαφείς μηχανισμούς. Η απελευθέρωση κυτοχρώματος c διακόπτει τη σύνδεση μεταξύ bcI-2 και του παράγοντα ενεργοποίησης της ευοδωτικής της απόπτωσης πρωτεάσης (Apaf). Το τελευταίο γεγονός ενεργοποιεί μία κασπάση-πυροδότη, προκαλώντας την έναρξη πρωτεολυτικών αντιδράσεων, οι οποίες τελικά φονεύουν το κύτταρο. Έτσι, η bcI-2 καταστέλλει την απόπτωση μέσω αναστολής της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c, απενεργοποιώντας με αυτό τον τρόπο την Apaf-l (Από Robbins SL, et al, 2003).

Όπως και με τις περισσότερες πρωτεάσες, οι κασπάσες υπάρχουν ως ανενεργά προ-ένζυμα, ή ζυμογόνα και πρέπει να διασπασθούν ώστε να ενεργοποιηθούν και να αρχίσει η απόπτωση. Οι κασπάσες έχουν τις δικές τους θέσεις διάσπασης και μπορεί να υδρολυθούν από άλλες κασπάσες αλλά μπορεί και να αυτοκαταλυθούν. Όταν μία εκκινητήρια κασπάση υφίσταται διάσπαση ώστε να παραχθεί η ενεργός της μορφή, το ενζυμικό πρόγραμμα θανάτου τίθεται σε κίνηση από μία γρήγορη και συνεχή ενεργοποίηση άλλων κασπασών. Οι εκτελεστικές κασπάσες δρουν σε πολλά κυτταρικά συστατικά. Προκαλούν διάσπαση των πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού και του πυρήνα και έτσι προκαλούν ρήξη του κυτταροσκελετού και οδηγούν σε αποδόμηση του πυρήνα (Salvesen GS, Dixit VM, 1997). Στον πυρήνα, οι στόχοι της ενεργοποίησης των κασπασών περιλαμβάνουν πρωτεΐνες που ενέχονται στην μεταγραφή, τον αναδιπλασιασμό και την επιδιόρθωση του DNA. Ειδικότερα, η ενεργοποίηση της κασπάσης-3 μετατρέπει μία κυτταροπλασματική DNάση σε ενεργό μορφή. Αυτή η DNάση επάγει τη χαρακτηριστική ενδονουκλεοσωματική διάσπαση του DNA, η οποία περιγράφηκε νωρίτερα.

ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΤΩΝ ΝΕΚΡΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Στα πρώιμα στάδια της απόπτωσης, τα κύτταρα που «πεθαίνουν», εκκρίνουν διαλυτούς παράγοντες, οι οποίοι ελκύουν φαγοκύτταρα (Ravichandran KS, 2003). Αυτό το γεγονός διευκολύνει την ταχεία κάθαρση των αποπτωτικών κυττάρων, πριν αυτά να υποστούν δευτεροπαθή νέκρωση και απελευθερώσουν τα κυτταρικά τους συστατικά (γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε φλεγμονή). Όπως ήδη αναφέρθηκε, τα αποπτωτικά κύτταρα και τα κλάσματά τους έχουν μοριακούς δείκτες επιφανείας, οι οποίοι επιτυγχάνουν τη πρώιμη αναγνώριση από παρακείμενα κύτταρα ή φαγοκύτταρα, ώστε να ακολουθήσει φαγοκυττάρωση και απομάκρυνση. Στη σύνδεση και ενσωμάτωση των αποπτωτικών κυττάρων έχει βρεθεί ότι ενέχονται

πολυάριθμοι υποδοχείς των μακροφάγων. Επιπλέον, τα μακροφάγα μπορεί να εκκρίνουν ουσίες οι οποίες δεσμεύονται ειδικά στα αποπτωτικά αλλά όχι στα ζωντανά κύτταρα και προκαλούν οψωνινοποίηση αυτών των κυττάρων για φαγοκυττάρωση. Σε αντίθεση με τους δείκτες των αποπτωτικών κυττάρων, τα ζωντανά κύτταρα εμποδίζουν την ενσωμάτωσή τους από τα φαγοκύτταρα διαμέσου έκφρασης συγκεκριμένων μορίων επιφανείας (όπως το CD31). Αυτή η διαδικασία της φαγοκυττάρωσης των αποπτωτικών σωματίων είναι τόσο αποτελεσματική, ώστε τα νεκρά κύτταρα εξαφανίζονται χωρίς να αφήνουν πίσω τους υπολείμματα και δεν εμφανίζεται φλεγμονή.

ΑΠΟΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΝΟΣΟΥΣ

Η έννοια της δυσλειτουργίας της απόπτωσης ("πολύ λίγο ή πάρα πολύ") υιοθετήθηκε για να εξηγήσει επί μέρους στοιχεία ενός ευρέως φάσματος νόσων. Υπάρχουν δύο γενικά *σ*ενάρια για τις διαταραχές της αποπτωτικής λειτουργίας:

Διαταραχές που σχετίζονται με αναστολή της απόπτωσης και αυξημένη κυτταρική επιβίωση. Ο πολύ χαμηλός ρυθμός απόπτωσης μπορεί να επιμηκύνει την επιβίωση μη φυσιολογικών κυττάρων. Η άθροιση των κυττάρων αυτών δίνει γένεση: 1) σε καρκίνους, ιδιαίτερα σε καρκινώματα με μεταλλάξεις του p53 ή σε ορμονοεξαρτώμενους όγκους, όπως του μαστού, προστάτη ή ωοθηκών και 2) σε αυτοάνοσα νοσήματα, τα οποία μπορούν να εμφανιστούν, εάν αυτοαντιδραστικά λεμφοκύτταρα δεν απομακρυνθούν μετά από μια ανοσοαντίδραση με τα αντιγόνα του ιδίου.

Διαταραχές που σχετίζονται με αυξημένη απόπτωση και εξεσημασμένο κυτταρικό θάνατο. Οι παθήσεις αυτές χαρακτηρίζονται από εκσεσημασμένη απώλεια φυσιολογικών ή προστατευτικών κυττάρων και περιλαμβάνουν: (1) νευροεκφυλιστικές νόσους, που χαρακτηρίζονται από την απώλεια συγκεκριμένων

ομάδων νευρώνων, όπως συμβαίνει στις νωτιαίες μυϊκές ατροφίες, (2) ισχαιμική βλάβη, όπως στο έμφραγμα του μυοκαρδίου και το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο και (3) λεμφοκυτταρική αποστέρηση επαγόμενη από ιούς, όπως συμβαίνει *στο* σύνδρομο της επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (AIDS).

ΣΥΝΟΨΗ

Η απόπτωση είναι μια συγκεκριμένη μορφή κυτταρικού θανάτου που εκδηλώνεται με χαρακτηριστική πύκνωση της χρωματίνης και κατακερματισμό του DNA, σκοπός της οποίας είναι η εξάλειψη κυττάρων κατά τη φυσιολογική ανάπτυξη του οργανισμού, την οργανογένεση, τη λειτουργία του συστήματος ανοσίας και την αύξησης των ιστών, αλλά που μπορεί επίσης να επάγεται από παθολογικά ερεθίσματα. Οι μηχανισμοί της απόπτωσης περιλαμβάνουν ορισμένες φάσεις-κλειδιά: (1) Υπάρχουν πολλαπλοί οδοί που υπαγορεύουν τον κυτταρικό θάνατο, (2) υπάρχει μια φάση ελέγχου, κατά την οποία καθορίζεται ο αποπτωτικός ουδός με την επάρκεια των διαφόρων θετικών και αρνητικών ρυθμιστικών παραγόντων και (3) υπάρχει μια φάση εκτέλεσης, στην οποία ενέχεται η ενεργοποίηση κασπασών οι οποίες και θα εκτελέσουν την τελική πρωτεόλυση. Επίσης, σε αυτή τη ρυθμιζόμενη διεργασία υπάρχουν πολλοί αναστολείς. Στη συνέχεια, τα αποπτωτικά σωμάτια φαγοκυτταρώνονται από μακροφάγα μέσω της δράσης ειδικών υποδοχέων. Η απορύθμιση αυτής της διεργασίας μπορεί να συμβάλλει σε μερικές παθολογικές καταστάσεις (Robbins SL, et al, 2003)

Αν και σήμερα είναι γνωστό ότι η απόπτωση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μορφοποίηση της ανοσολογικής απάντησης, οι μηχανισμοί για την επαγωγή αυτής και η πολυπλοκότητα των ρυθμιστικών μηχανισμών που επηρεάζουν την ευαισθησία στον κυτταρικό θάνατο, διερευνώνται συνεχώς (Rathmell JC, Thompson CB, 1999, King KL, Cidlowski JA, 1995).

Πολλά πράγματα τα οποία έχουν καταστήσει κατανοητή τη μοριακή ρύθμιση του

κυτταρικού θανάτου, προέρχονται από μελέτες που αφορούν την οικογένεια του γονιδίου bcl-2 (Motyl T , 1999).

ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ

Bcl-2

Το ογκογονίδιο bcl-2 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 18q21 και κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη 26KD που εντοπίζεται στις περιοχές εκείνες όπου η έσω μιτοχονδριακή μεμβράνη αντιτάσσεται με την έξω μιτοχονδριακή μεμβράνη, αλλά και στο πυρηνικό περίβλημα, την περιπυρηνική μεμβράνη και το ενδοπλασματικό δικτυωτό (Akao Y, et al, 1994, Hockenbery D, et al, 1990, Hockenbery D, et al, 1991, και συν, 1990, Krajewski S, et al, AkaoY, et al, 1994). Το bcl-2 αναστέλλει την αποπτωτική διεργασία χωρίς να επηρεάζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Hockenbery D, et al, 1990, Bissonnette RP, et al 1992). Το γονίδιο αυτό πιστεύεται ότι παρεμβαίνει σε "κεντρικό σημείο" στη διαδικασία του κυτταρικού θανάτου, αναστέλλοντας τη διαδικασία της απόπτωσης ή/και προστατεύει τα κυτταρικά συστατικά που αποτελούν στόχο της αποπτωτικής διαδικασίας**,** διαδραματίζοντας τελικά κατασταλτικό ρόλο στην αποπτωτική διεργασία (Reed JC, 1994). Περιγράφηκε για πρώτη φορά σε μελέτες που αφορούσαν αντιμετάθεση του χρωμοσώματος t σε λέμφωμα από Β κύτταρα (Cleary ML, Sklar J, 1985, Korsmeyer SJ, 1992) και αργότερα σε μη αιμοποιητικούς ιστούς και διάφορα νεοπλάσματα (αιμοποιητικού και λεμφικού ιστού, προστάτη, νεφρού, πνεύμονος, γαστρεντερικού και στο μελάνωμα) (Lu QL, et al, 1993, Zutter M, et al, 1991, Colombel M, et al, 1993, Pezzella F, et al, 1993). Σε ορισμένες μελέτες έχει συσχετισθεί με καλύτερη κλινική πρόγνωση (Doglioni C, et al, 1994) ενώ σε άλλες δεν έχει συσχετισθεί με την πρόγνωση (Owen-Schaub LB, et al, 1994).

Σήμερα, έχει πιστοποιηθεί ότι το bcl-2 αποτελεί ένα μέλος μιας πολυγονιδιακής οικογένειας η οποία αποτελείται από πρωτεΐνες που αναστέλλουν την απόπτωση (όπως bcl-xL,MCL-1 και bcl-2) και πρωτεΐνες που επιταχύνουν την απόπτωση, όταν έχει υπάρξει επαγωγή αυτής όπως bax, (Oltvai Z, et al, 1993), bcl-x (Boise LH et al, 1993) και bad (Yang E, et al. 1995)

Το bcl-2 καταστέλλει την απόπτωση με τους παρακάτω τρόπους:

Με απευθείας δράση στα μιτοχόνδρια αποτρέπει την αύξηση της διαπερατότητάς τους. Το bcl-2, το οποίο είναι το ομόλογο του αντιαποπτωτικού γονιδίου ced 9 του C. elegans στα θηλαστικά, βρίσκεται κυρίως εκεί όπου η έσω αντιτάσσεται με την έξω μιτοχονδριακή μεμβράνη. Η λειτουργία του ρυθμίζεται από άλλα μέλη της οικογένειας bcl-2. Η διαπερατότητα των μιτοχονδρίων καθορίζεται από την αναλογία, στη μεμβράνη, ευοδωτικών της απόπτωσης και αντιαποπτωτικών μελών της οικογένειας bcl-2 (Robbins SL, et al, 2003).

Με δράσεις που επάγονται από την αλληλοαντίδραση με άλλες πρωτεΐνες. Η bcl-2 λειτουργεί επίσης και ως πρωτεΐνη "ελλιμενισμού" (dockíng protein), με το να συνδέεται με πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος και να τις περιχαρακώνει στη μιτοχονδρακή μεμβράνη. Όταν το κυτόχρωμα c απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια, συνδέεται με τον παράγοντα που ενεργοποιεί την ευοδωτική της από-πτωσης πρωτεάση (Apaf-l), ομόλογο του γονιδίου CED-4 του νηματοσκώληκα στα θηλαστικά και το ενεργοποιεί, πυροδοτώντας τις κασπάσες και θέτοντας σε κίνηση πρωτεολυτικούς μηχανισμούς που τελικά οδηγούν το κύτταρο στο θάνατο (Robbins, 2003).

Bax

Η πρωτεΐνη bax αποτελεί ομόλογο του γονιδίου bcl-2 που έχει αναγνωριστεί πρόσφατα και αποτελεί επαγωγέα της απόπτωσης. Έχει μοριακό βάρος 21KDa και

παρουσιάζει σε ποσοστό 21% ομολογία αμινοξέων με την πρωτεΐνη bcl-2 (Oltvai Z, et al, 1993). Ένα μόριο bax μπορεί να συνδέεται με ένα μόριο bcl-2 και να σχηματίζει το ετεροδιμερές bcl-2/bax ή να συνδέεται με ένα άλλο μόριο bax και να σχηματίζει ομοδιμερή bax/bax. Η αναλογία bax/bcl-2 καθορίζει την ευαισθησία του κυττάρου στην διαδικασία της απόπτωσης. Σε κύτταρα με υπερέκφραση bax επικρατούν τα ομοδιμερή bax/bax και μεγεθύνεται η ευαισθησία των συγκεκριμένων κυττάρων στα αποπτωτικά ερεθίσματα. Τα ετεροδιμερή bcl-2/bax επικρατούν σε κύτταρα που υπερεκφράζουν bcl-2, με αποτέλεσμα να ελαττώνεται η ευαισθησία τους σε αποπτωτικά ερεθίσματα (Oltvai Z, et al, 1993, Yang E, Korsmeyer S, 1996). Πάντως φαίνεται ότι και άλλα μόρια τα οποία δεν ανήκουν σε αυτή την οικογένεια μπορούν να επηρεάσουν τις επάγουσες η αναστέλλουσες τον κυτταρικό θάνατο δραστηριότητες των μελών της οικογένειας bcl-2 (Dietrich JB, 1997, St. Clair EG, et al, 1997).

Η πρωτεΐνη bax έχει ανιχνευθεί σε διάφορους ιστούς περιλαμβανομένων του πνεύμονος του θύμου και του στομάχου και του νευρικού συστήματος (κεντρικού και περιφερικού) (Oltvai Z, et al, 1993, Krajewski S, et al, 1997, Penault-Llorca F, et al, 1998).

Η ανοσοϊστοχημική ανάλυση έχει δείξει ότι το bax εκφράζεται πιο ευρέως σε σχέση με το bcl-2 (Krajewski S, et al, 1994). Παρατηρήσεις που έχουν γίνει σε θυμοκύτταρα τρωκτικών έχουν δείξει ότι το bcl-2 συνδέεται αποκλειστικά με τη μεμβράνη ενώ το bax υπάρχει κυρίως στο κυτταρόπλασμα. Αφ' ής στιγμής η απόπτωση στα θυμοκύτταρα τρωκτικών που επάγεται από δεξαμεθαζόνη ή γ-ακτινοβολία, αλλάζει τις υποκυττάριες εντοπίσεις των bax και bcl-xL, εικάζεται ότι αυτές οι κινήσεις μπορεί να αντιπροσωπεύουν ένα σημαντικό βήμα στο μονοπάτι με το οποίο τα μέλη της οικογένειας bcl-2 ρυθμίζουν την απόπτωση (Hsu YT, et al,

1997)

Ποιος όμως είναι ο μηχανισμός δράσης της πρωτεΐνης bax; Η έκφραση της πρωτεΐνης bax γίνεται στο κυτταρόπλασμα και υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν επηρεάζει την λειτουργικότητα των κυττάρων. Μετά από ένα αποπτωτικό ερέθισμα όμως, η bax ενσωματώνεται στις ενδοκυττάριες μεμβράνες, ειδικά στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (αλλά και στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου), όπου επάγει την διάνοιξη ειδικού πόρου διαπερατότητας, την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και την ενεργοποίηση της οδού των κασπασών (Hsu YT, et al, 1997). Η απελευθέρωση ιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}) από την μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου, επιταχύνει την μετακίνηση της bax από το κυτταρόπλασμα στις ενδοκυττάριες μεμβράνες, με αποτέλεσμα την επαγωγή της αποπτώσεως. Ένα σημα για την απόπτωση είναι η απομάκρυνση του Ca^{2+} από το ενδοπλασματικό δίκτυο και όχι η αύξηση της συγκεντρώσεως του κυτταροπλασματικού Ca2+ ενώ η υπερέκφραση της bax οδηγεί στην εξάλειψη των αποθηκών Ca2+ από το ενδοπλασματικό δίκτυο και την αύξηση της συγκεντρώσεως Ca2+ στα μιτοχόνδρια. (Pan Z, et al, 2001, Nutt LK, et al, 2002). Η συσσώρευση της πρωτείνης bax στις κυτταρικές μεμβράνες προηγείται της ενεργοποιήσεως της κασπάσης 3, γεγονός το οποίο υποδηλώνει ότι η αναδιάταξη της πρωτεΐνης αυτής αποτελεί ένα πρώιμο φαινόμενο κατά την αποπτωτική διαδικασία (Marzo I, et aI, 1998).

Τέλος να πούμε ότι σε πολλά συστήματα, η αναλογία bax/bcl-2 αποτελεί έναν ροοστάτη ο οποίος καθορίζει την ευαισθησία του κυττάρου στην απόπτωση (Korsmeyer SJ, 1999, Oltvai Z, et al, 1993). Πρόσφατα, διάφορες μελέτες έχουν διερευνήσει τη σημασία της αναλογίας bax/bcl-2 ή bcl-2/bax και κυρίως κακοήθων νεοπλασμάτων. Πιο συγκεκριμένα έχει αναφερθεί ότι η αναλογία bcl-2/bax αποτελεί

μεταξύ άλλων προγνωστικό δείκτη α) σε ασθενείς με καρκίνωμα του ορθού οι οποίοι υπέστησαν εκλεκτική κολεκτομή και έλαβαν μετεγχειρητική ακτινο- και χημειο-θεραπεία (Scopa CD, et al, 2001) και β) σε καρκινώματα ωοθήκης (Lohmann CM, et al, 2000). Όσον αφορά τις μη νεοπλασματικές παθήσεις, προηγούμενες μελέτες σε πειραματικά μοντέλα νεφρικής και ηπατικής ίνωσης αλλά και σε περιπτώσεις χρονίας ηπατίτιδος Β και C, αναφέρουν ότι η αναλογία bax/bcl-2 σχετίζεται ευθέως με το βαθμό απόπτωσης αλλά και την εξέλιξη της ίνωσης σε αυτά τα μοντέλα, προς νόσο τελικού σταδίου (Yang B , et al, 2002, Kalogeropoulou C, et al, 2004, Tsamandas AC, et al, 2004, Tsamandas AC, et al, 2005).

Bcl-x

Το γονίδιο bcl-x εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 20q11 του ανθρώπου και αποτελεί έναν ρυθμιστή της αποπτώσεως ανεξάρτητο του bcl-2 (Packham G, et al 1998). Είναι σε θέση να κωδικοποιεί μέσω εναλλακτικής διατομής (altemative splicing) δύο πρωτείνες με αντίθετες, όσον αφορά την απόπτωση, ιδιότητες. Η bcl-xL, η μεγαλύτερη από αυτές, αποτελείται από 241 αμινοξέα και αναστέλλει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Η δεύτερη πρωτεΐνη η οποία προάγει την απόπτωση, ονομάζεται bcl-xS και αποτελείται από 178 αμινοξέα. Το μικρότερο μέγεθός της οφείλεται στην απουσία των περιοχών ομολογίας BH1 και BH2 συνολικού μεγέθους 63 αμινοξέων (Ogura E, et a1, 1999).

Η πρωτεΐνη bcl-xS εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και είναι σε θέση να σχηματίζει ομοδιμερή ή ετεροδιμερή με τις πρωτεΐνες bcl-xL και bcl-2 (Lindenboim L, et al, 2001). Έχει αποδειχθεί ότι προάγει την απόπτωση σε αρκετές κυτταρικές σειρές (PC12, 3T3) χωρίς την ενεργοποίηση κασπασών (Fridman JS, et al, 1999). Η προαγωγή του κυτταρικού θανάτου από την πρωτεΐνη bcl-xS θεωρείται ότι συντελείται μετά την σύνδεσή της με τα αντιαποπτωτικά μέλη της οικογένειας του

bcl-2 (π.χ. bcl-xL, bcl-2) και την αναστολή της δράσεως των τελευταίων (Fridman JS, et al, 2001).

Η πρωτεΐνη bcl-xL αποτελεί πιθανότατα ισχυρότερο αναστολέα της αποπτώσεως από την bcl-2 (Gottschalk AR, et al, 1994). Εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα (Antonsson & Martinou 2000) και προάγει την κυτταρική επιβίωση τροποποιώντας την ηλεκτροχημική και οσμωτική ομοιοστασία των μιτοχονδρίων. Συγκεκριμένα αποτρέπει την έξοδο του κυτοχρώματος c μέσω του διαύλου VDAC (voltage-dependent anion channel) της εξωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων (Shimizu S, et al, 1999). Για να ασκήσει την αντιαποπτωτική της δράση δεν προαπαιτείται αλληλεπίδραση με την πρωτείνη bax (Cheng EH, et a1,1996).

Η πρωτεΐνη bcl-xL αποτελεί την κύρια μορφή της bcl-x στον άνθρωπο και ανευρίσκεται σε ιστούς, οι οποίοι περιλαμβάνουν μακρόβια μεταμιτωτικά κύτταρα, όπως οι νευρώνες του εγκεφάλου (Gonzalez Garcia M, et al, 1994). Τα καρκινικά κύτταρα, όταν εκφράζουν την πρωτεΐνη bcl-xL είναι σε θέση να διαφεύγουν της αποπτώσεως, η οποία επάγεται από το p53. Η υπερέκφραση επίσης της πρωτείνης bcl-xL σε διαγονιδιακά πειραματόζωα, αύξησε δραματικά την συχνότητα εξαλλαγής καλοήθων νεοπλασιών (Pena JC, et al, 1998).

Fas-Fasl

Ο υποδοχέας Fas, μοριακού βάρους 45KD, αναγνωρίσθηκε για πρώτη φορά το 1989 ως στόχος αντισωμάτων, τα οποία επάγουν την απόπτωση σε διάφορες κυτταρικές σειρές (Trauth BC, et al, 1989). Εκφράζεται σε έναν μεγάλο αριθμό λεμφοειδών και μη κυττάρων όπως το ήπαρ, οι ωοθήκες, η καρδιά, οι πνεύμονες, οι νεφροί και το δέρμα. Χρόνια πριν την κλωνοποίηση του συνδέτη του Fas (Fasl), είχε παρατηρηθεί ότι τα ενεργοποιημένα CD4+ Τ κύτταρα εμφάνιζαν μία κυτταρολυτική δραστηριότητα η οποία ήταν ανεξάρτητη από ιόντα Ca2+ και δεν μπορούσε να

αποδοθεί στην περφορίνη και τις granzymes. Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι η κυτταρολυτική αυτή δραστηριότητα οφείλεται στο Fasl, αφ' ής στιγμής τα ενεργοποιημένα CD4+ Τ κύτταρα σκότωναν μόνο κύτταρα στόχους που εξέφραζαν Fas αλλά όχι Fas αρνητικά κύτταρα (Rouvier E, et al, 1993). Αργότερα άλλοι ερευνητές κλωνοποίησαν το γονίδιο για το Fasl για τον άνθρωπο, τον επίμυ και τον ποντικό. Ο συνδέτης αυτός επάγει την απόπτωση μέσω αλληλεπίδρασης με τον υποδοχέα του Fas (Suda T, et al, 1993, Takahashi T, et al, 1994, Takahashi T, T et al, 1994). Το Fasl ανήκει στη μεγάλη οικογένεια των TNF-like μορίων η οποία περιέχει και άλλους συνδέτες που επάγουν την απόπτωση όπως οι TNFα και TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), όπως και μόρια που δεν επάγουν την απόπτωση, όπως οι συνδέτες για τα CD27, CD30, CD40, κ.λ.π. (Locksley RM, et al, 2001).

Αν και η έκφραση του Fasl αρχικά πιστευόταν ότι περιορίζεται στα ενεργοποιημένα Τ κύτταρα και τα κύτταρα NK (Suda T, et al, 1993, Suda T, et al, 1995), μία πληθώρα δημοσιεύσεων έχει δείξει ότι το Fasl εκφράζεται σε πολλούς διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους περιλαμβανομένων και μη αιμοποιητικών τύπων κυττάρων (Nagata S, 1999, Walker PR, et al, 1998). Η αρχική παρατήρηση της δραστηριότητας του Fasl σε ενεργοποιημένα Τ κύτταρα υποδηλώνει ότι το Fasl μπορεί να αντιπροσωπεύει ένα εκτελεστικό μηχανισμό των κυτταροτοξικών Τ κυττάρων. Όμως η απανταχού έκφρασή του σε πολλές φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις, υποδηλώνει έναν πολυπαραγοντικό ρόλο για αυτό το μόριο. Το Fasl έχει ενοχοποιηθεί σε καταστάσεις φλεγμονής (Chen JJ, et al, 1998, Hohlbaum AM, et al, 2000), επαγωγής ανοχής, (Van Parijs L, Abbas AK, 1998, Griffith TS, et al, 1996), αιμοποίησης (De Maria R, et al, 1999), και σε πολλά άλλα γεγονότα.

Ο συνδέτης Fasl είναι ένα ομοτριμερές μόριο το οποίο ενώνεται με τρία μόρια Fas και αντίστοιχα με τις περιοχές θανάτου (DD) οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους

(Ashkenazi A, Dixit VM 1998). Ακολουθεί προσέλκυση του πρωτεϊνικού προσαρμογέα FADD (Fas-associated death domain ή Mort1) και σύζευξη της δική του περιοχής θανάτου (DD) με την περιοχή θανάτου του υποδοχέα (DD). Ο προσαρμογέας FADD εκτός από την περιοχή θανάτου, περιλαμβάνει και μία αμινοτελική δραστική περιοχή θανάτου (OEO- death effector domain), η οποία συνδέεται με μια ανάλογη περιοχή (OEO) της προκασπάσης-8 (ή FLICE ή MACH) (Chinnaiyan AM, et al, 1995, Boldin MP, et al, 1996). Η ενεργοποίηση της κασπάσης-8 που ακολουθεί, οδηγεί μέσω αλυσιδωτών αντιδράσεων στην πρωτεολυτική μετατροπή της προκασπάσης-3 σε κασπάση-3, στην κατάτμηση των διαφόρων υποστρωμάτων από την κασπάση-3 και στην ολοκλήρωση του αποπτωτικού προγράμματος (Rossi D, Gaidano G, 2003).

p53

Το γονίδιο p53 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17p13.1 και είναι ο πιο συχνός στόχος για γενετικές μεταβολές στους όγκους στον άνθρωπο (Liu MC, Gelmann EP, 2002). Οι όγκοι στον άνθρωπο περιέχουν μεταλλάξεις αυτού του γονιδίου σε ποσοστό λίγο μεγαλύτερο από 50%. Στις περισσότερες περιπτώσεις οι μεταλλάξεις προσβάλλουν και τα δύο αλληλόμορφα του p53 και μεταβιβάζονται σε σωματικά κύτταρα. Λιγότερο συχνά, ορισμένα άτομα κληρονομούν ένα μεταλλαγμένο αλληλόμορφο του p53. Η κληρονομικότητα ενός μεταλλαγμένου αλληλόμορφου, προδιαθέτει τα άτομα να εμφανίσουν κακοήθεις όγκους, επειδή μόνο ένα κτύπημα χρειάζεται για να απενεργοποιήσει το δεύτερο, φυσιολογικό αλληλόμορφο. Τέτοια άτομα, που έχουν το σύνδρομο Li-Fraumeni, έχουν 25 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να εμφανίσουν κακοήθη όγκο έως την ηλικία των 50 ετών, σε σχέση με το γενικό πληθυσμό (Frebourg T, et al: 1995). Σε σύγκριση με τους σποραδικούς όγκους, αυτοί που προσβάλλουν τα άτομα με το σύνδρομο Li-Fraumeni συμβαίνουν σε μικρότερη

ηλικία και ένα άτομο μπορεί να εμφανίσει πολλαπλούς πρωτοπαθείς όγκους (Nichols KE, et al, 2001).

Το γεγονός ότι οι μεταλλάξεις του p53 είναι συχνές σε μία ποικιλία όγκων στον άνθρωπο, υποδηλώνει ότι η πρωτεΐνη του p53 λειτουργεί ως ένας κριτικός φύλακας της πύλης του γονιδιώματος εναντίον της εμφάνισης καρκίνου. Πράγματι είναι γεγονός ότι το p53 δρα ως ένας «μοριακός αστυνόμος» που εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των γενετικά κατεστραμμένων κυττάρων. Η πρωτεΐνη του p53 είναι μία DNA-συνδεδεμένη πρωτεΐνη η οποία εντοπίζεται στον πυρήνα. Όταν χρειάζεται να δράσει, λειτουργεί ελέγχοντας τη μεταγραφή (transcription) διαφόρων άλλων γονιδίων. Περίπου το 80% των σημειακών μεταλλάξεων του p53 που υπάρχουν στους καρκίνους στον άνθρωπο, εντοπίζονται στο τμήμα εκείνο της πρωτεΐνης που συνδέεται στο DNA. Το μεταλλαγμένο p53, το οποίο δεν συνδέεται στο DNA, παράγει μία ελαττωματική πρωτεΐνη (άστοχη μετάλλαξη-missense mutation,) η οποία μπλοκάρει τη δραστηριότητα της φυσιολογικής πρωτεΐνης. Επιπρόσθετα σε σωματικές και κληρονομικές μεταλλάξεις, οι λειτουργίες του p53 μπορεί να απενεργοποιούνται από άλλους μηχανισμούς. Οι μεταμορφωτικές πρωτεΐνες διαφόρων DNA ιών, περιλαμβανομένης της E6 πρωτεΐνης του HPV, μπορούν να δεσμεύσουν ή/και να επάγουν την αποδόμηση του p53. Ένα άλλος μηχανισμός ουδετεροποίησης του p53 είναι μέσω της MDM2, μίας πρωτεΐνης η οποία φυσιολογικά αναστέλλει τη λειτουργία του p53 διότι προκαλεί αποδόμηση αυτού (Onel K, Corden-Cardoc C, 2004, Shmueli A, Oren M, 2004.)

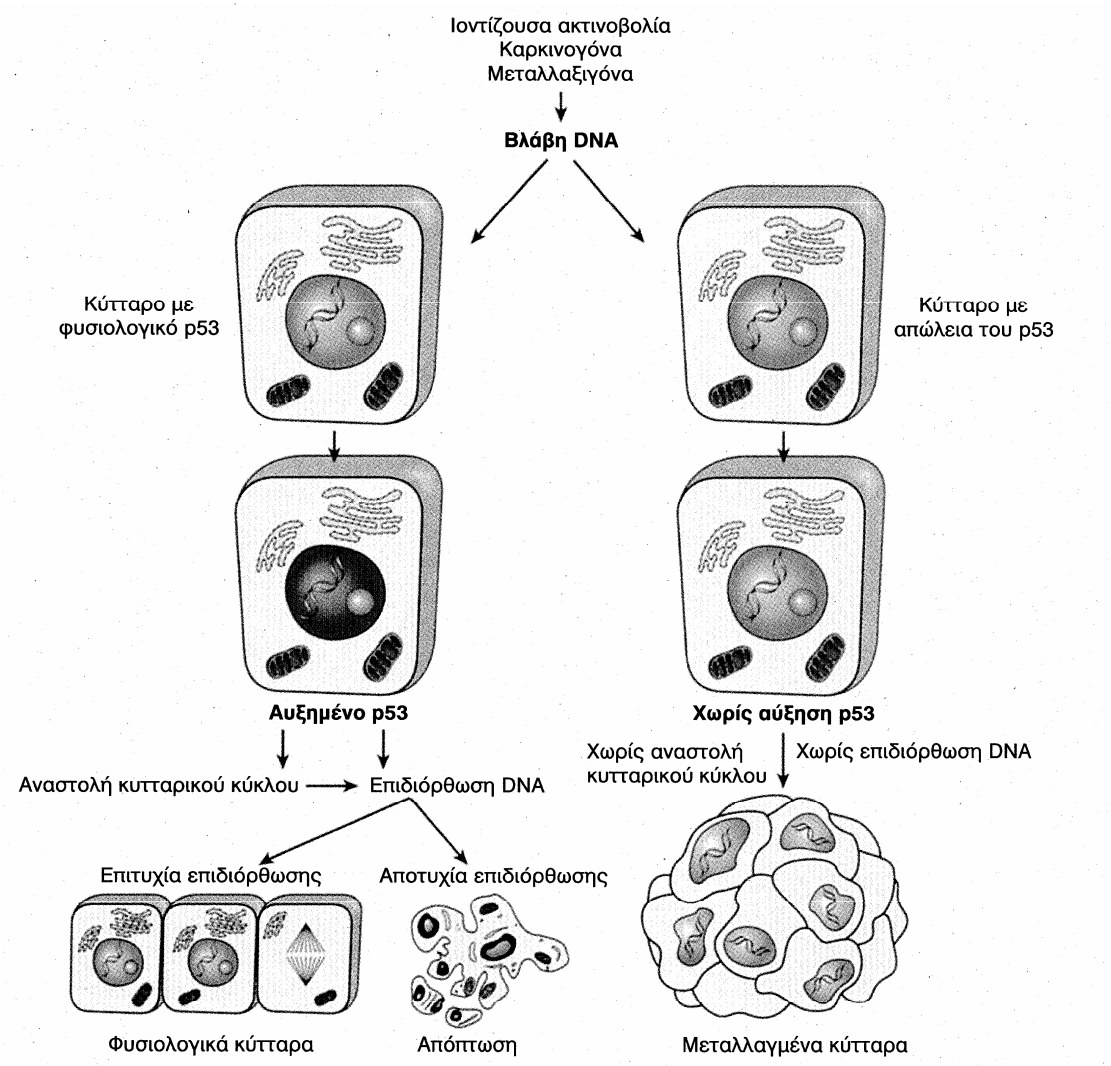
Οι μείζονες λειτουργικές δραστηριότητες της πρωτεΐνης του p53 είναι η διακοπή του κυτταρικού κύκλου και η έναρξη της απόπτωσης ως απάντηση στη βλάβη του DNA. Το p53 καλείται επειγόντως όταν υπάρχει βλάβη του DNA από ακτινοβολία, υπεριώδες φως, ή μεταλλαξιογόνα χημικά και επίσης σε απάντηση σε μεταβολές σε

κυτταρικές καταστάσεις όπως υποξία, γήρανση και άλλες καταστάσεις stress οι οποίες δεν βλάπτουν άμεσα το DNA (Liu MC, Gelmann EP, 2002). Μετά τη βλάβη του DNA παρατηρείται γρήγορη αύξηση των επιπέδων του p53. Την ίδια χρονική στιγμή κινάσες, όπως η DNA-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση και η ATM (μεταλλαγμένη κινάση στην αταξία τηλαγγειεκτασία), ενεργοποιούνται, ως απάντηση στη βλάβη του DNA. Αυτά τα ένζυμα φωσφορυλιώνουν το p53 και η πρωτεΐνη στη συνέχεια ξεδιπλώνεται και είναι ικανή να συνδέσει το DNA και να καταστεί ένας ενεργός μεταγραφικός παράγων (εικόνα 13). Το p53 διεγείρει τη μεταγραφή διαφόρων γονιδίων τα οποία διαμεσολαβούν τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση. Η επαγόμενη από το p53 διακοπή του κυτταρικού κύκλου συμβαίνει όψιμα στη φάση G1 και προκαλείται από p53-εξαρτώμενη μεταγραφή του CDK αναστολέα p21. Μία τέτοια διακοπή στον κυτταρικό κύκλο είναι καλοδεχούμενη, διότι παρέχει στο κύτταρο αρκετό χρόνο να επιδιορθώσει τη βλάβη του DNA η οποία προκλήθηκε από τον μεταλλαξιογόνο παράγοντα. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το p53 έχει βραχύ χρόνο ημιζωής (περίπου 20 λεπτά) διότι υφίσταται πρωτεόλυση η οποία διαμεσολαβείται από την ουμπικουϊτίνη. Έτσι σε αντίθεση με το RB, δεν «αστυνομεύει» τον φυσιολογικό κυτταρικό κύκλο. Το p53 επίσης βοηθά στην διαδικασία επιδιόρθωσης άμεσα, λόγω επαγωγής της μεταγραφής του GADD45, το οποίο κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη η οποία εμπλέκεται στην επιδιόρθωση του DNA. Εάν η βλάβη του DNA επιδιορθωθεί επιτυχώς, το p53 ενεργοποιεί την MDM2, το προϊόν της οποίας δεσμεύεται στο p53 και το αποδομεί, και έτσι σταματά το μπλοκ του κυτταρικού κύκλου. Εάν κατά τη διάρκεια παύσης της κυτταρικής διαίρεσης, η βλάβη του DNA δεν μπορεί να επιδιορθωθεί επιτυχώς, το φυσιολογικό p53, σε μία τελική προσπάθεια, στέλνει το κύτταρο στο «νεκροταφείο», προκαλώντας ενεργοποίηση των γονιδίων που επάγουν την απόπτωση, όπως το bax. Όπως είπαμε

και πριν το bax δεσμεύεται και ανταγωνίζεται τον αναστολέα της απόπτωσης bcl-2 και επομένως το bax επάγει τον κυτταρικό θάνατο.

Συμπερασματικά, το p53 συνδέει την κυτταρική βλάβη με την επιδιόρθωση του DNA, τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση. Σε απάντηση της βλάβης του DNA, το p53 φωσφορυλιώνεται από γονίδια τα οποία εμπλέκονται στην επιδιόρθωση του DNA. Το p53 βοηθά στην επιδιόρθωση του DNA προκαλώντας διακοπή στη φάση G1 και επάγει τα επιδιορθωτικά του DNA γονίδια. Ένα κύτταρο με κατεστραμμένο DNA το οποίο δεν μπορεί να επιδιορθωθεί, κατευθύνεται από το p53 έτσι ώστε να υποστεί απόπτωση. Λόγω αυτών των δραστηριοτήτων το p53 αποκαλείται επιτυχημένα ο «φύλακας του γονιδιώματος». Σε καταστάσεις με ομοζυγωτική απώλεια του p53, η βλάβη του DNA δεν επιδιορθώνεται, οι μεταλλάξεις σταθεροποιούνται στα κύτταρα που διαιρούνται και το κύτταρο γυρίζει σε μία κατεύθυνση που οδηγεί σε κακοήθη εξαλλαγή.

Η ικανότητα του p53 να ελέγχει την απόπτωση, σε απόκριση στη βλάβη του DNA, έχει σημαντικές πρακτικές θεραπευτικές αξίες. Η ακτινοβολία και η χημειοθεραπεία, οι δύο συνήθεις θεραπευτικές επιλογές στη θεραπεία του καρκίνου, διαμεσολαβούν το αποτέλεσμά τους μέσω επαγωγής βλάβης στο DNA και της επακόλουθης απόπτωσης. Οι όγκοι που διατηρούν φυσιολογικό p53 είναι πιθανότερο να ανταποκρίνονται σε τέτοια θεραπεία σε σύγκριση με τους όγκους οι οποίοι μεταφέρουν τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα αυτού του γονιδίου.



Εικόνα 13: Ο ρόλος του p53 στη διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος. (Από Cumar, Cotran, Robbins, Βασική Παθολογοανατομία, εκδ. Παρισιάνου, Αθήνα 2000).

ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΚΑΙ ΘΥΜΟΣ

Κατά τη διάρκεια της εμφάνισης και ωρίμανσης των θυμοκυττάρων, τα δυνητικά αυτοαντιδραστικά θυμοκύτταρα εξαλείφονται μέσω απόπτωσης (Fesus L,1991, Feldmann G, 1999) η οποία είναι υπεύθυνη για την αρνητική επιλογή που συμβαίνει μέσα στο θύμο. Ο κυτταρικός θάνατος διαμεσολαβείται από εξωτερικά ερεθίσματα τα οποία ενεργοποιούν το μεταβολικό μηχανισμό του κυττάρου ώστε αυτός να επάγει τη διαδικασία «αυτοκτονίας» (Fadeel B, et al, 1999). Αυτή η διεργασία είναι σε πλήρη αντίθεση με τον άλλο τύπο κυτταρικού θανάτου, τη νέκρωση, όπου ζωντανά

κύτταρα πεθαίνουν με μη ρυθμιζόμενο σχέδιο και αυτό είναι αποτέλεσμα μη αναστρέψιμης βλάβης. Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος ή απόπτωση, είναι μία διαδικασία που οφείλεται σε μεταγωγή σήματος και απαιτεί την έκφραση διαφόρων γονιδίων (Fiers W, et al, 1999, Golstein P, et al, 1991).

Πιο συγκεκριμένα έχουν πρόσφατα παρατηρηθεί τρεις διαφορετικοί τύποι κυτταρικού θανάτου στο θύμο του επίμυος [νέκρωση, απόπτωση και αθροιστικός κυτταρικός θάνατος (Quaglino D Jr, 1998)].

Όσον αφορά τα αποπτωτικά θυμοκύτταρα, αυτά αναγνωρίζονται από την εξαιρετικά συμπυκνωμένη και κατακερματισμένη χρωματίνη και υπάρχουν τόσο στο φλοιό όσο και το μυελό. Και στις δύο αυτές περιοχές, ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος φθάνει το μέγιστο βαθμό στον 1 μήνα από τη γέννηση και αυτό είναι συμβατό με το ρόλο της απόπτωσης στην αρνητική επιλογή και την καθιέρωση του ρεπερτορίου των Τ κυττάρων (Cairns JS, et al, 1994). Πάντως σε προηγούμενη μελέτη (Quaglino D, Ronchetti IP, 2001) δεν υπήρχε αλληλοεπικάλυψη μεταξύ του βαθμού κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης. Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός ήταν πολύ υψηλός κατά την γέννηση και ελαττωνόταν βαθμιαία με την πάροδο του χρόνου, ενώ η απόπτωση εμφανιζόταν μετά τις 2-4 εβδομάδες ζωής. Αυτό το γεγονός μπορεί να οφείλεται σε ορμονικά ερεθίσματα, καθορισμό του ρεπερτορίου των Τ κυττάρων ή να αποτελεί επακόλουθο μαζικής επαφής με εξωγενή αντιγόνα στην περιφέρεια, τα οποία εμμέσως (ίσως μέσω κυτοκινών), επηρεάζουν το μικροπεριβάλλον του θύμου (Feldmann G, 1999, Inomata T, et al, 1993).

Όπως προαναφέρθηκε η απόπτωση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη εμφάνιση των Τ κυττάρων μέσα στο θύμο και πιθανόν διαμεσολαβεί το μηχανισμό με τον οποίο γίνεται η εξάλειψη των πρόδρομων μορφών των αυτοαντιδραστικών Τ-κυττάρων (Von Boehmer H, 1990). Επιπλέον πιστεύεται ότι ένα υψηλό ποσοστό θυμοκυττάρων

υφίσταται απόπτωση και απομακρύνονται με φαγοκυττάρωση από τα θυμικά μακροφάγα (Surh CD, Sprent J, 1994).

Υπάρχει μία τάση στη βιβλιογραφία που αναφέρει ότι η νουκλεοσωμική κλιμακωτή διάταξη του DNA είναι ισοδύναμη της απόπτωσης (Cohen JJ, 1991). Έτσι αυτή η μορφή αποδόμησης DNA εμφανίζεται να είναι βιοχημικός δείκτης του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου και ενδεικτικό απόπτωσης σε μεγάλη ποικιλία βιολογικών διεργασιών που περιλαμβάνουν της εξάλειψη κυττάρων η οποία επάγεται από μεταγωγή σήματος (Kerr JF, et al, 1972). Η αναστολή της ενδονουκλεάσης από το οριντρικαρβοξυλικό οξύ παρεμποδίζει την απόπτωση των θυμοκυττάρων και έτσι δείχνει το ρόλο κλειδί της αποδόμησης του DNA στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (McConkey DJ, et al, 1989). Από την άλλη πλευρά όμως, έχει δειχθεί ότι τα θυμοκύτταρα πεθαίνουν επίσης σε απουσία αποδόμησης του DNA και έτσι είναι TUNEL αρνητικά (Nakamura M, et al, 1995) και η ενδοπυρηνική σχάση του DNA αντιπροσωπεύει ένα όψιμο γεγονός στην αποπτωτική διαδικασία (Cohen GM, et al, 1992). Σε πρωτογενείς καλλιέργειες θυμοκυττάρων η προσθήκη γλυκοκορτικοειδών και η απόσυρση αυξητικών παραγόντων επάγουν την απόπτωση.

Πάντως η εξαρτώμενη από τα γλυκοκορτικοειδή αλλά όχι αυτόματη απώλεια των ζωντανών κυττάρων, εξαρτάται από γονιδιακή ρύθμιση και τη δραστηριότητα της κασπάσης, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα θυμοκύτταρα μπορεί να πεθάνουν και με μηχανισμό ανεξάρτητο από κασπάση (Mann CL, 2000). Επίσης τα λεμφοκύτταρα του θύμου είναι ευαίσθητα in vivo στην απόπτωση που επάγεται από τα γλυκοκορτικοειδή (Quaglino D, Ronchetti IP, 2001).

Παρά τον αυξανόμενο αριθμό των ερευνών, οι διεργασίες που οδηγούν στις μορφολογικές μεταβολές της χρωματίνης στα κύτταρα του θύμου που υφίστανται

απόπτωση, δεν είναι ξεκάθαρες. Πρόσφατα έχει δειχθεί ότι ο κατακερματισμός της χρωματίνης και οι πυρηνικές μορφολογικές αλλοιώσεις που φαίνονται τυπικά στην απόπτωση, μπορούν να παραχθούν in vitro σε απομονωμένα θυμοκύτταρα, τα οποία επωάζονται με κύτταρα Jurkat που έχουν διεγερθεί από το Fas/APO (Chow SC, 1995). Χρησιμοποιώντας αυτό το in vitro σύστημα, έχει αναφερθεί ότι το ATP είναι απαραίτητο για την συμπύκνωση της χρωματίνης, τη μετακίνηση στην περιφέρεια του πυρήνα και το σχηματισμό του αποπτωτικού σωματίου αλλά όχι για τον κατακερματισμό του DNA(Kass GE, et al, 1996).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η απόπτωση χαρακτηρίζεται από πύκνωση της χρωματίνης και διαταραχή των πυρηνικών στοιβάδων, διεργασίες οι οποίες είναι τυπικές και για τη μίτωση και έτσι μπορεί κάποιος να υποθέσει ότι η απόπτωση είναι μια ελαττωματική μορφή της μίτωσης. Η ιδέα αυτή υποστηρίζεται περισσότερο και από το γεγονός ότι έχει παρατηρηθεί ενεργοποίηση της Cdc2-εξαρτώμενης πρωτεϊνικής κινάσης (Cdk2) κατά τη διάρκεια του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Hakem A, et al, 1999, Gil Gomez G, et al, 1998). Οι Norbury και συν κατέδειξαν ότι η πύκνωση της χρωματίνης και η αναδιάταξη των στοιβάδων του πυρήνα οφείλονται σε διεργασίες διαφορετικές από αυτές που διαμεσολαβούν τη μίτωση και υποδηλώνουν ότι η ενεργοποίηση της p34cdc2 πρωτεϊνικής κινάσης (Cdc2) δεν εμπλέκεται στην επαγωγή της απόπτωσης στα θυμοκύτταρα, τα οποία πεθαίνουν σε μία ήσυχη (G0) κατάσταση (Norbury C, et al, 1994). Όμως, καινούργιες μελέτες έχουν εστιάσει στην ενδιαφέρουσα σχέση μεταξύ κυτταρικού πολλαπλασιασμού και κυτταρικού θανάτου (Brady HJ, Gil Gomez G, 1999). Π.χ. η κυκλινοεξαρτώμενη κινάση (Cdk2) ενεργοποιείται κατά τη διάρκεια της απόπτωσης των θυμοκυττάρων και μπορεί να ρυθμισθεί από το p53, το bax και το bcl-2. Πιο συγκεκριμένα η υψηλή δραστηριότητα της Cdk2 κινάσης στα θυμοκύτταρα που

υφίστανται απόπτωση δεν σχετίζεται με τις κανονικές κυκλίνες, κυκλίνη Ε και κυκλίνη Α, και απαιτεί denovo σύνθεση των πρωτεϊνών ώστε η ενεργοποίηση να λάβει χώρα. Αυτή η παρατήρηση υποδηλώνει ότι η ενεργοποίηση της Cdk2 είναι κριτικό γεγονός στα διακριτά μονοπάτια της απόπτωσης, στο σημείο εκείνο όπου ο κυτταρικός κύκλος και ο κυτταρικός θάνατος αλληλεπιδρούν (Gil Gomez G, et al, 1998). Πιο πρόσφατα μελέτες έδειξαν ότι, στα αναπτυσσόμενα θυμοκύτταρα η Cdk2 προκαλεί επαγωγή του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53, ενεργοποίηση του επαγωγέα θανάτου bax, μεταβολές στη διαπερατότητα των μιτοχονδρίων, στα επίπεδα bcl-2 και στην ενεργοποίηση των κασπασών. Αφού δε η αναστολή της Cdk2 προστατεύει τα θυμοκύτταρα από απόπτωση, μιτοχονδριακές μεταβολές και ενεργοποίηση της κασπάσης, είναι προφανές ότι η δραστηριότητα της Cdk2 είναι κριτική για την επαγωγή της απόπτωσης των θυμοκυττάρων (Hakem A, et al, 1999).

Στον ανώριμο θύμο η απόπτωση μπορεί να επάγεται από δύο μονοπάτια: ένα εξαρτώμενο από το p53 και ένα ανεξάρτητο από το p53. Το πρώτο μονοπάτι ενεργοποιείται από παράγοντες που καταστρέφουν το DNA (όπως η ακτινοβολία και το χημειοθεραπευτικό ετοποσίδη) και το δεύτερο μονοπάτι επάγεται από τα γλυκοκορτικοειδή (Quaglino D, Ronchetti IP, 2001). Επιπλέον η επαγόμενη από τη βλάβη του DNA απόπτωση σε ήρεμα ώριμα περιφερικά Τ κύτταρα σχετίζεται με συσσώρευση του p53, γεγονός που υποδηλώνει ότι η σταθεροποίηση του p53 στα θυμοκύτταρα σε απάντηση της βλάβης του DNA μπορεί να ρυθμίζεται από τους παράγοντες ανάπτυξης (MacFarlane M, et al, 1996).

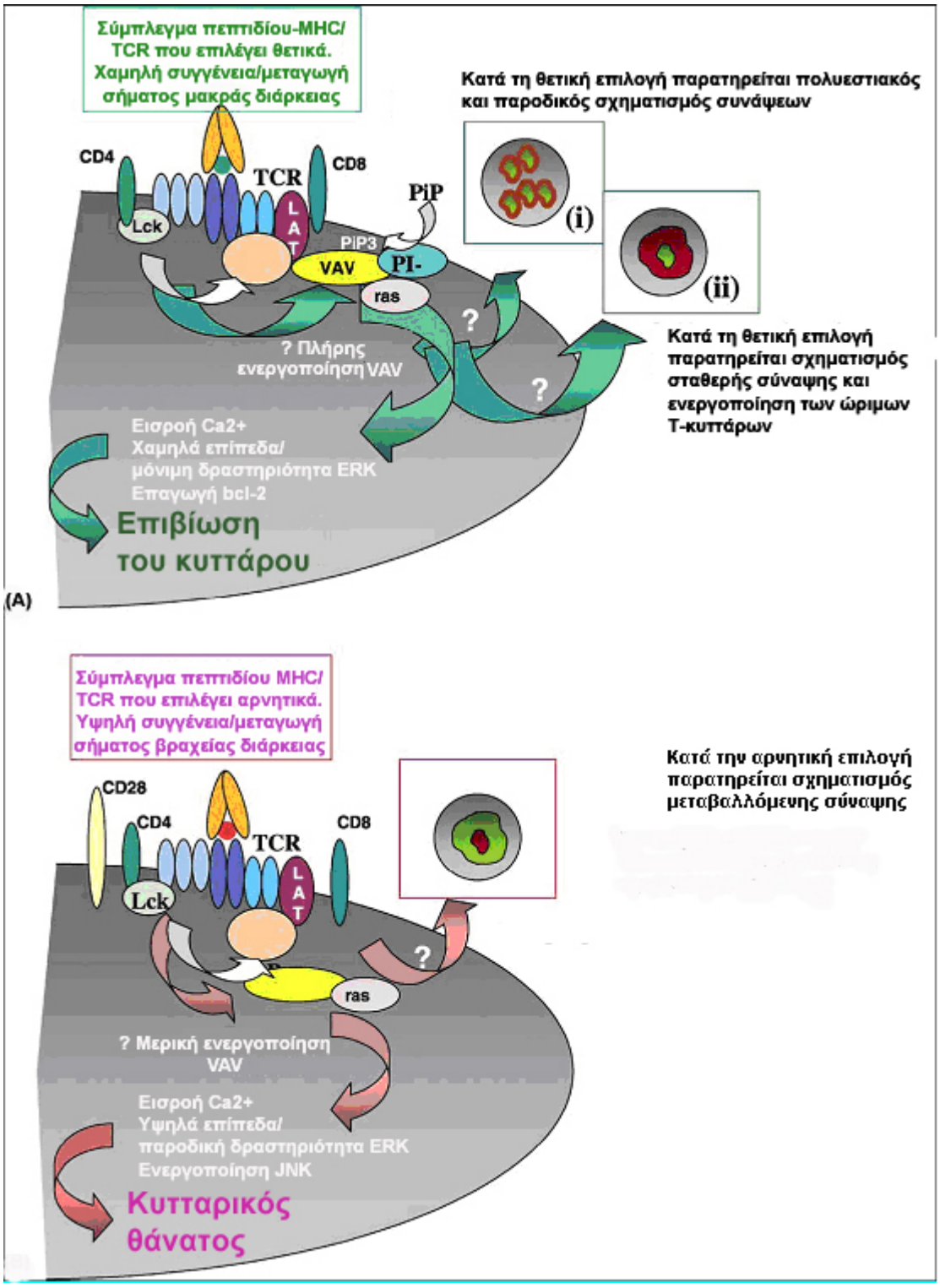
Συνοπτικά αν και η έρευνα και η απόκτηση νέας γνώσης γύρω από τους μηχανισμούς που οδηγούν τις σύνθετες διεργασίες της εμφάνισης του θυμοκυττάρου, είναι ξεκάθαρο ότι ο κυτταρικός θάνατος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μορφοποίηση του ρεπερτορίου του Τ κυττάρου. Υπάρχουν σημαντικά αποπτωτικά σημεία ελέγχου

τα οποία επιτρέπουν την ωρίμανση και τον πολλαπλασιασμό εκείνων μόνο των κυττάρων τα οποία έχουν έναν αναδιαταγμένο αβTCR και είναι ικανά να δεσμεύουν συμπλέγματα που δημιουργούνται από μόρια MHC και πεπτίδια του ιδίου.

Το δίλημμα που παραμένει, όμως, πώς η μεταγωγή του σήματος διαμέσου των ίδιων υποδοχέων και μονοπατιών οδηγεί σε εκσεσημασμένα διαφορετικά βιολογικά αποτελέσματα, από τον θάνατο στη θετική ή αρνητική επιλογή. Πιστεύεται ότι σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν τόσο η ανοσολογική σύναψη όσο και ο κυτταροσκελετός και ειδικότερα μία πρωτεΐνη αυτού η Vav. Η εικόνα 14 δείχνει την πολυπλοκότητα των γεγονότων που πιστεύεται ότι συμβαίνουν στη διάρκεια των διεργασιών που θα οδηγήσουν τα θυμοκύτταρα προς την επιβίωση ή τον κυτταρικό θάνατο.

ΘΥΜΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ

Στο φυσιολογικό θύμο το γονίδιο bcl-2 εντοπίζεται κυρίως στα θυμοκύτταρα του μυελού και λιγότερο στα θυμοκύτταρα του φλοιού (Onodera J, et al, 1996). Πιο συγκεκριμένα σε διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία επανακατεύθυναν την έκφραση του bcl-2 στα θυμοκύτταρα του φλοιού, το bcl-2 φαίνεται να προστατεύει τα ανώριμα CD4+CD8+ θυμοκύτταρα από την απόπτωση που επάγεται από γλυκοκορτικοειδή και ακτινοβολία. Επιπλέον το bcl-2 μεταβάλλει την ωρίμανση των Τ κυττάρων, επάγοντας τη δημιουργία αυξημένων ποσοστών $CD3^{hi}$ και $CD4^{-}CD8^{+}$ θυμοκυττάρων. Όμως η κλωνική εξάλειψη των Τ κυττάρων που αναγνωρίζουν ενδογενή υπεραντιγόνα συμβαίνει ακόμη, γεγονός που υποδηλώνει ότι δεκάδες μονοπάτια ενεργοποιούνται μέσα στο θύμο και ότι αυτά τα μονοπάτια μπορούν να διακριθούν με βάση την εξάρτησή τους από το bcl-2 (Sentman CL, et al, 1991). Στον πάσχοντα θύμο και ειδικότερα σε ασθενείς με θύμωμα, με ή χωρίς συνοδό μυασθένεια το bcl-2 εκφράζεται στα θυμοκύτταρα αλλά όχι στα νεοπλασματικά



<u>Εικόνα 14</u>: Γεγονότα και μηχανισμοί που οδηγούν τα θυμοκύτταρα στην επιβίωση ή τον κυτταρικό θάνατο. TCR: υποδοχέας Τ-κυττάρων, VAV: πρωτεΐνη κυτταροσκελετού (Από: Minter LM, Osborne BA, Seminars in Immunology 15: 135–144, 2003).

κύτταρα (Gilhus NE, et al, 1995). Επιπλέον το bcl-2 έχει ανιχνευθεί σε θυμώματα μυελοειδούς τύπου και θυμικά καρκινώματα υψηλής βαθμίδος κακοήθειας και περιπτώσεις υπερπλασίας του θύμου (Tateyama H, et al, 1997, Onodera J, et al, 1996).

Οι Williams και συν έχουν δείξει ότι ενώ το bcl-2 αναστέλλει την αρνητική επιλογή μέσα στον θύμο, το bax δεν την επηρεάζει καθόλου (Williams O, et al, 1998). Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι τα μέλη της οικογένειας bcl-2 έχουν συγκεκριμένους ρόλους στην επιλογή των Τ κυττάρων και επίσης υποστηρίζουν την υπόθεση ότι τα bax και bcl-2 ανταγωνίζονται τη δράση το ένα του άλλου σε συγκεκριμένα αποπτωτικά μονοπάτια, ενώ σε άλλα μπορεί να είναι ανεξάρτητα (Williams O, et al, 1998). Στο θύμο η πρωτεΐνη bax εντοπίζεται στο μυελό και το μεγαλύτερο μέρος της έκφρασής του σχετίζεται με τα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα και λιγότερο συχνά με τα θυμοκύτταρα του μυελού ή του φλοιού (Krajewski S, Krajewski et al, 1994, Penault-Llorca F, et al, 1998).

Όσον αφορά το bcl-x, πρόσφατη μελέτη σε 8 μυασθενικούς ασθενείς έδειξε ότι η έκφραση του bcl-x mRNA δεν διέφερε από αυτή των μαρτύρων, εύρημα το οποίο υποδηλώνει ότι το bcl-x δεν φαίνεται να διαδραματίζει ρόλο στην εμφάνιση και εξέλιξη της μυασθένειας. Εδώ πρέπει να υπενθυμίσουμε ότι το bcl-x αναστέλλει την απόπτωση από διαφορετικό μονοπάτι από αυτό του bcl-2 (Nagata T, et al, 2001).

Όσον αφορά το Fas, οι περισσότερες μελέτες έχουν αποτύχει να καταδείξουν έναν ρόλο για τον Fas-επαγόμενο θάνατο στην αρνητική επιλογή στο θύμο (Kishimoto H, et al, 1998). Σε συμφωνία με αυτά τα ευρήματα, η απόπτωση των $CD4^+8^+$ θυμοκυττάρων, μετά από έκθεση στην σύνδεση TCR/CD28 (όπου TCR ο υποδοχέας των Τ κυττάρων), είναι το ίδιο εκτεταμένη με τα Fas^- lpr/lpr κύτταρα όπως και με τα φυσιολογικά Fas^+ κύτταρα (Kishimoto H, Sprent J, 1997).

Όπως αναφέρουν προηγούμενες μελέτες, φαίνεται ότι τόσο in vivo, όσο και in vitro φαίνεται ότι το Fas εμπλέκεται στην αρνητική επιλογή μόνον όταν η συγκέντρωση για το συγκεκριμένο αντιγόνο (anti-TCR μονοκλωνικό αντίσωμα (+ anti-CD28 μονοκλωνικό αντίσωμα) είναι σχετικά υψηλή. Η υπόθεση επομένως είναι ότι το Fas-ανεξάρτητο μονοπάτι της απόπτωσης αποτυγχάνει όταν τα HSA^{hi} $CD4^{+}8^{-}$ θυμοκύτταρα υπόκεινται σε ισχυρή σύνδεση με τον υποδοχέα των Τ-κυττάρων (TCR). Αλλά γιατί η ισχυρή σηματοδότηση εμποδίζει την απόπτωση; Η εξήγηση που φαίνεται να επικρατεί είναι ότι η ισχυρή TCR σηματοδότηση των HSA^{hi} $CD4^{+}8^{-}$ κυττάρων επάγει την παραγωγή αντιαποπτωτικών μορίων και έτσι προστατεύει τα κύτταρα από το θάνατο (Kishimoto H, Sprent J, 1999). Αυτό το προστατευτικό αποτέλεσμα εμφανίζεται μόνο στην απόπτωση που είναι ανεξάρτητη από το Fas και έτσι επιτρέπει στα κύτταρα να διατηρούν την ευαισθησία στον Fas-επαγόμενο θάνατο. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο το Fas παρέχει έναν υποστηρικτικό μηχανισμό για την αρνητική επιλογή όταν το Fas-ανεξάρτητο μονοπάτι αποτυγχάνει. Παρά το ότι το αντιγόνο Fas έχει ανιχνευθεί σε θυμώματα και καλώς διαφοροποιημένα θυμικά καρκινώματα (Tateyama H, et al, 1997) και σε μικρό αριθμό περιπτώσεων υπερπλασίας του θύμου (Onodera J, et al, 1996), εν τούτοις δεν έχει συσχετισθεί η τυχόν παρουσία του με τους κλασικούς προγνωστικούς παράγοντες της βαρείας μυασθένειας και με τη μετεγχειρητική πορεία των ασθενών.

Όσον αφορά το p53 η έκφρασή του έχει μελετηθεί σε θυμικά καρκινώματα και θυμώματα ασχέτως της ύπαρξης ή όχι μυασθένειας (Tomita et al, 2002). Η συγκεκριμένη μελέτη έδειξε ότι η έκφραση του p53 ήταν υψηλότερη στα θυμικά καρκινώματα παρά στα θυμώματα (Tomita et al, 2002). Άλλη μελέτη έδειξε ότι η έκφραση του p53 σε επιθηλιακούς όγκους του θύμου δεν σχετιζόταν με την πρόγνωση αυτών των όγκων, αν και οι όγκοι με υψηλότερη έκφραση του p53 είχαν

ελαφρώς χειρότερη πρόγνωση (Comin CE, et al. 2004). Επιπλέον κατεδείχθη σημαντική συσχέτιση p53 και ιστολογικών υποτύπων, αλλά δεν βρέθηκε καμία σχέση μεταξύ αυτού του παράγοντα και της μυασθένειας.

Στην παρούσα διατριβή και σε χειρουργικά παρασκευάσματα των θυμεκτομών από ασθενείς με βαρεία μυασθένεια διερευνήθηκε ο ρόλος της απόπτωσης καθώς και η ανοσοϊστοχημική έκφραση των γονιδίων bcl-2, bcl-x, bax, Fas, και Fasl και των δεικτών κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki67 και PCNA και του ογκογονιδίου p53 σε σχέση με τη μετεγχειρητική επιβίωση των ασθενών καθώς και τους άλλους γνωστούς προγνωστικούς παράγοντες. Το υλικό προέρχεται από ασθενείς που νοσηλεύθηκαν στην Πανεπιστημιακή Νευρολογική Κλινική για βαρεία μυασθένεια και υπεβλήθησαν σε θυμεκτομή στην Καρδιοθωρακοχειρουργική Κλινική στα πλαίσια της θεραπείας τους.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Η μελέτη περιέλαβε 46 συνεχόμενες περιπτώσεις ασθενών με διαγνωσμένη βαρεία μυασθένεια που υπέστησαν θυμεκτομή για θεραπευτικούς λόγους από τον Ιούνιο 1990 έως Μάρτιο 2001 στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Πατρών. Επρόκειτο για 17 άνδρες και 29 γυναίκες ηλικίας από 16-75 ετών (μέση τιμή 36.60±16.09 - διάμεσος τιμή 30.5). Όλα τα δημογραφικά και κλινικοεργαστηριακά στοιχεία των ασθενών ελήφθησαν από τους ιατρικούς φακέλους της Νευρολογικής και Καρδιοθωρακοχειρουργικής κλινικής του Πανεπιστημίου Πατρών. Για όλους τους ασθενείς που περιελήφθησαν στη μελέτη, η κλινική ταξινόμηση της μυασθένειας πριν τη θυμεκτομή έγινε με βάση τα κριτήρια κατά Osserman (Osserman KE, 1958). Τα ιστοπαθολογικά ευρήματα του θύμου κατά τη στιγμή της θυμεκτομής αντλήθηκαν από τις ιστοπαθολογικές εκθέσεις από το αρχείο του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημίου Πατρών. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήσαμε ιστούς θύμου που ελήφθησαν από πέντε (5) έμβρυα μετά από αποβολή, όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως (Gilhaus NE, et al, 1995)

ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕΤΑ ΤΗ ΘΥΜΕΚΤΟΜΗ

Η κλινική κατάσταση των ασθενών μετά τη θυμεκτομή εκτιμήθηκε κατόπιν κλινικής εξέτασης των ασθενών. Για όσους αυτό δεν ήταν εφικτό, η αξιολόγηση βασίστηκε σε στοιχεία που έδωσαν οι ίδιοι οι ασθενείς για την κατάστασή τους σε τηλεφωνική επικοινωνία μαζί τους και σε στοιχεία από το αρχείο της Νευρολογικής κλινικής. Η κατάσταση των ασθενών αξιολογήθηκε 39-166 (μέση τιμή±SD: 91.87±38.38, διάμεσος τιμή 86) μήνες μετά από τη θυμεκτομή σύμφωνα με διεθνώς αποδεκτά κριτήρια τα οποία έχουν αναφερθεί προηγουμένως στον πίνακα 6 (Jaretzki A, et al, 2000).

ΜΕΘΟΔΟΙ

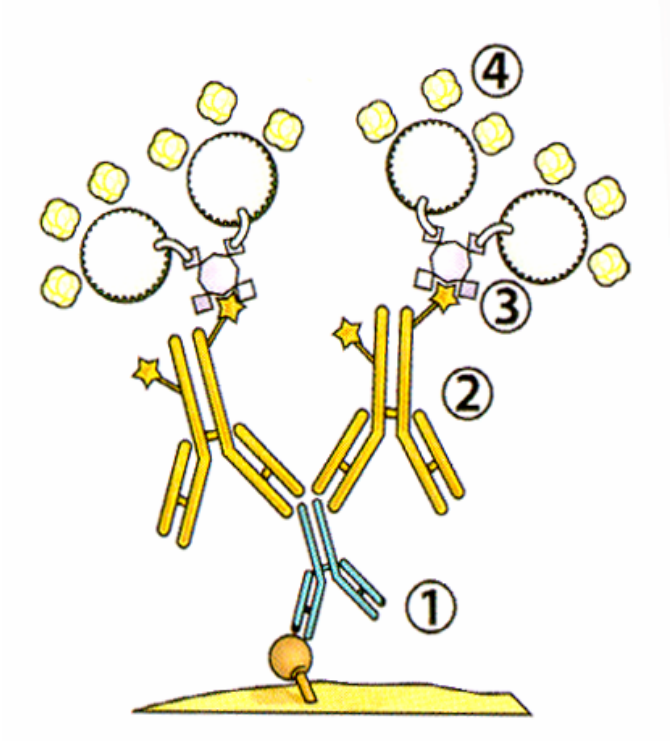
ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΡΟΥΤΙΝΑΣ

Η μακροσκοπική επεξεργασία των παρασκευασμάτων έγινε με βάση συγκεκριμένα πρωτόκολλα επεξεργασίας των παρασκευασμάτων θυμεκτομών (Rosai J, 2004). Σε κάθε περιστατικό ελήφθη επαρκής αριθμός τομών ώστε να τεκμηριώνεται κάθε φορά η ιστοπαθολογική διάγνωση. Με τον όρο υπερπλασία εννοείται η θυμική λεμφοζιδιακή υπερπλασία (Rosai, J, 2004). Η διάγνωση «θύμωμα» περιέλαβε τα θυμώματα τύπου Β1 και Β2 και η διάγνωση «θυμικό καρκίνωμα» τα θυμώματα τύπου Β3 (υψηλής διαφοροποίησης καρκίνωμα) (Dadmanesh F, et al, 2001). **Στη συνέχεια του κειμένου θα χρησιμοποιούμε τους όρους «θύμωμα» και «καρκίνωμα» με βάση τους προηγούμενους ορισμούς**

ΜΕΛΕΤΕΣ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ IN-SITU ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ

Σε κάθε περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν δύο αντιπροσωπευτικοί κύβοι παραφίνης από τους οποίους ελήφθησαν πολλαπλές (10) συνεχόμενες τομές πάχους 4μm. Οι τομές τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες οι οποίες είχαν προηγουμένως επιστρωθεί με λεπτό στρώμα πολυ-L-λυσίνης (MB>150000, SIGMA), ώστε να αποφευχθεί η αποκόλληση των τομών. Το διάλυμα της πολύ-L-λυσίνης και η επίστρωσή της έγιναν σύμφωνα με τη μεθοδολογία και τον τρόπο που έχει περιγραφεί σε λεπτομέρειες αλλού (Polak JM, Van Norden S, 1984).

Ανοσοϊστοχημική τεχνική για την ανίχνευση των πρωτεϊνών bcl-2, bax, bcl-x,Fas, Fasl, PCNA, Ki67 και p53



Εικόνα 15: Μέθοδος στρεπταβιδίνης-βιοτίνης περοξειδάσης. 1: πρωτογενές αντίσωμα, 2: δευτερογενές βιοτυνιλιωμένο αντίσωμα, 3: σύμπλεγμα στρεπταβιδίνης, 4: υπόστρωμα

Υλικά

1. Μονιμοποιητικό υλικό: 10% ουδέτερη φορμόλη.
2. Μικροσκοπικά πλακίδια (Polylysine, microscopic slides, US Pat. 4481246, 4624882, Menzel-Glaser, Germany).
3. Απεσταγμένο νερό, καλυπτρίδες (Knittel Glaser, Germany), ξυλόλη, αιθανόλη.
4. Ρυθμιστικό διάλυμα Tris.
5. Υπεροξείδιο του υδρογόνου 30%, κιτρικό νάτριο.
6. Βόειος αλβουμίνη, κλάσμα V, σε λυοφιλοποιημένη μορφή και ελεύθερη από λιπαρά οξέα (13257, Serva, Germany).
7. Μονοκλωνικό αντίσωμα anti-bcl2 εναντίον του ποντικού, (DAKO, USA).

8. Πολυκλωνικό αντίσωμα anti-bax εναντίον του κουνελιού, (SantaCruz, USA)
9. Μονοκλωνικό αντίσωμα anti-bcl-x εναντίον του ποντικού, (Novocastra, UK).
10. Πολυκλωνικό αντίσωμα anti- Fas εναντίον του κουνελιού, (SantaCruz, USA).
11. Πολυκλωνικό αντίσωμα anti- Fasl εναντίον του κουνελιού, (SantaCruz, USA).
12. Μονοκλωνικό αντίσωμα anti-PCNA εναντίον του ποντικού, (Signet, USA).
13. Μονοκλωνικό αντίσωμα anti-Ki67 εναντίον του ποντικού (DAKO, USA).
14. Μονοκλωνικό αντίσωμα anti-p53 εναντίον του ποντικού, (Biogenex, USA).
15. Super sensitive Ready-to-Use Detection kit, (Catalog No QP900-CL, Biogenex, USA).
16. Χρωμογόνο: Ταμπλέτες DAB (Sigma Fast DAB, St Louis, MO, USA).
17. Αιματοξυλίνη Harris, διάλυμα Papanikolaou 1a, (1.09253.2500, Merck).
18. Υλικό επικάλυψης των τομών: Entellan®, neu, rapid mounting media for microscopy, (1.07961.0500, Merck).

Προετοιμασία των διαλυμάτων

1. Διάλυμα κιτρικού νατρίου (pH6): 500 ml απεσταγμένο νερό και 1.05 γρ κιτρικό νάτριο.
2. Ρυθμιστικό διάλυμα Tris (pH: 7.6): 6.1g Tris σε 1000 ml απεσταγμένο νερό και 37 ml 1N HCl.
3. Ρυθμιστικό διάλυμα TBS: 1800 ml NaCl και 200 ml Tris.
4. Διάλυμα για την κατανάλωση της ενδογενούς περοξειδάσης: 98 ml μεθανόλη και 2 ml H2O2.
5. Διαλύματα αραίωσης (για τα πρωτογενή αντισώματα και τους άλλους παράγοντες) και blocking serum: 30 ml TBS και 0.3 γρ αλβουμίνη.
6. Αντίσωμα εναντίον bcl-2, αραίωση 1:60, σε διάλυμα TBS/BSA.
7. Αντίσωμα εναντίον bax αραίωση 1:1000, σε διάλυμα TBS/BSA.

8. Αντίσωμα εναντίον bcl-x αραίωση 1:50, σε διάλυμα TBS/BSA.
9. Αντίσωμα εναντίον Fas αραίωση 1:100, σε διάλυμα TBS/BSA.
10. Αντίσωμα εναντίον Fasl αραίωση 1:100, σε διάλυμα TBS/BSA.
11. Αντίσωμα εναντίον PCNA αραίωση 1:80, σε διάλυμα TBS/BSA.
12. Αντίσωμα εναντίον p53 αραίωση 1:150, σε διάλυμα TBS/BSA.
13. Αντίσωμα εναντίον Ki67 αραίωση 1:50, σε διάλυμα TBS/BSA.
14. Διάλυμα χρωμογόνου: 100 ml Tris, 2 ml DAB, 100 μl H_2O_2

Πρωτόκολλο (Μέθοδοι)

Προετοιμασία των ιστών και ανοσοϊστοχημική μέθοδος για τα ανωτέρω αντιγόνα

1. Μονιμοποίηση του ιστού σε διάλυμα 10% ουδέτερης φορμαλίνης για 16 ώρες.
2. Εμπέδωση του ιστού σε παραφίνη.
3. Λήψη τομών από το μικροτόμο, πάχους 4 μm και τοποθέτηση αυτών σε υδατόλουτρο το οποίο δεν περιέχει πρωτεΐνη.
4. Τοποθέτηση των τομών στα πλακίδια που είναι επιστρωμένα με πολυλυσίνη.
5. Αποπαραφίνωση των τομών σε κλίβανο (16 ώρες στους 37°C).
6. Αποπαραφίνωση των τομών με εμβάπτιση σε ξυλόλη για 20 λεπτά.
7. Ενυδάτωση των τομών σε κατιούσα αλκοολών: 100% 2 λεπτά, 100% 2 λεπτά, 96% 1 λεπτό, 80% 1 λεπτό, 70% 1 λεπτό.
8. Έκπλυση των τομών με απεσταγμένο νερό για 5 λεπτά.
9. Αποκάλυψη αντιγόνων: Οι τομές τοποθετούνται σε διάλυμα 10mM κιτρικό, pH 6.0 (τα anti-bcl-x, anti-Fas, anti-Fasl, anti-PCNA) ή σε διάλυμα 1mM EDTA-NaOH, pH 8.0 (τα anti-bcl-2, anti-Ki67 και anti-p53) και στη συνέχεια επωάζονται σε φούρνο μικροκυμάτων στα 750 W, τρεις φορές, 5 λεπτά τη φορά. Κάθε 5 λεπτά ελέγχουμε το επίπεδο του διαλύματος και προσθέτουμε διάλυμα αν αυτό είναι αναγκαίο.

10. Έκπλυση των τομών με απεσταγμένο νερό για 5 λεπτά.
11. Επώαση των τομών με το διάλυμα H_2O_2 για την κατανάλωση της ενδογενούς περοξειδάσης, για 20 λεπτά.
12. Έκπλυση των τομών με απεσταγμένο νερό για 5 λεπτά.
13. Σκουπίζουμε το διάλυμα με προσοχή γύρω από τον ιστό.
14. Προσθέτουμε το blocking serum επάνω σε κάθε τομή και επωάζουμε τις τομές σε υγρό περιβάλλον για 20 λεπτά.
15. Στη συνέχεια αφαιρούμε με μεγάλη προσοχή το blocking serum γύρω από κάθε τομή και χωρίς να ξεπλύνουμε τις τομές, τοποθετούμε το διάλυμα του πρωτογενούς αντισώματος. Επωάζουμε τις τομές στους 37^{o}C για 1 ώρα.
16. Έκπλυση των τομών επί 5 λεπτά με διάλυμα TBS επί 3 φορές.
17. Στη συνέχεια σκουπίζουμε με προσοχή το διάλυμα γύρω από κάθε τομή, προσέχοντας να μην καταστρέψουμε την τομή και τοποθετούμε το διάλυμα του βιοτυνιλιωμένου αντισώματος (biotynilated anti-immunoglobulins- Super sensitive Ready-to-Use Detection kit). Επωάζουμε τις τομές για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
18. Έκπλυση των τομών επί 5 λεπτά με διάλυμα TBS επί 3 φορές.
19. Στη συνέχεια σκουπίζουμε με προσοχή το διάλυμα γύρω από κάθε τομή, προσέχοντας να μην καταστρέψουμε την τομή και τοποθετούμε το διάλυμα στρεπταβιδίνης (enzyme-conjugated streptavidin- Super sensitive Ready-to-Use Detection kit,). Επωάζουμε τις τομές για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
20. Έκπλυση των τομών επί 5 λεπτά με διάλυμα TBS επί 3 φορές.
21. Τοποθέτηση των τομών στο διάλυμα χρωμογόνου.
22. Παρατηρούμε την εμφάνιση του χρώματος με φωτονικό μικροσκόπιο. Σε κάθε περίπτωση δεν επωάζουμε τι τομές περισσότερο από 7 λεπτά.

23. Έκπλυση με νερό βρύσης για 1 λεπτό.

24. Έκπλυση με απεσταγμένο νερό για 5 λεπτά.

25. Χρώση με αιματοξυλίνη Harris για 2 λεπτά.

26. Έκπλυση με νερό βρύσης.

27. Αφυδάτωση των τομών σε ανιούσα αλκοολών: 70% 1 λεπτό, 80% 1 λεπτό, 96% 1 λεπτό, 100% 1 λεπτό, 100% 1 λεπτό.

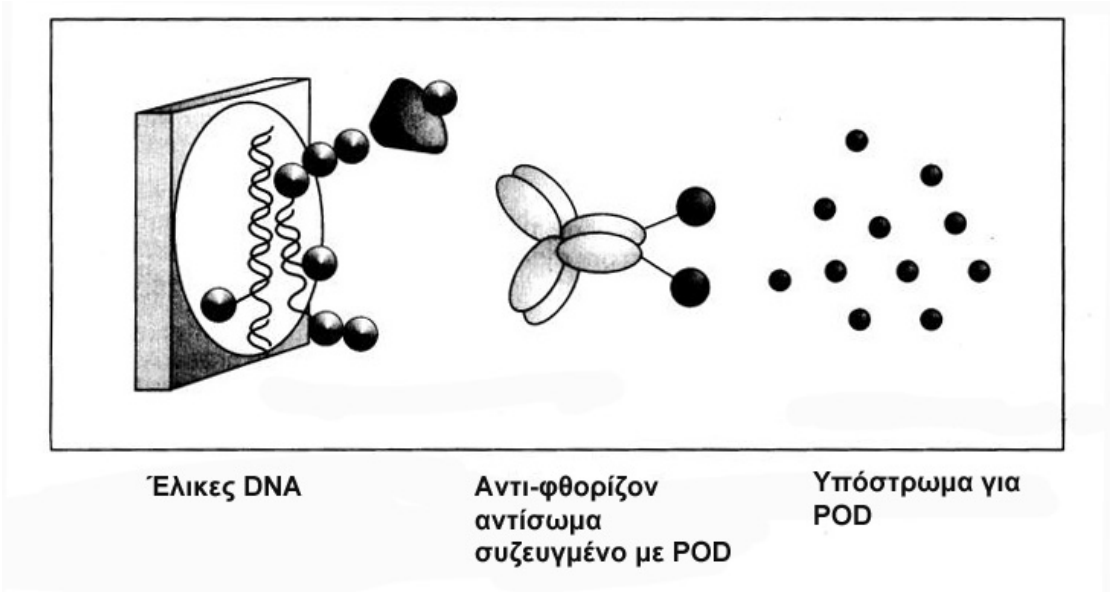
28. Εμβάπτιση των τομών σε ξυλόλη 2 φορές από 1 λεπτό.

29. Επικόλληση των καλυπτρίδων με Entellan.

Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τομές παραφίνης από φυσιολογικό αμυγδαλικό ιστό και φυσιολογικούς λεμφαδένες. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τομές από τους θύμους, με την ίδια μέθοδο στρεπταβιδίνης-βιοτίνης περοξειδάσης αλλά το πρωτογενές αντίσωμα αντικαταστάθηκε από διάλυμα 1% BSA σε PBS. Η κυτταροπλασματική χρώση για τα bcl-2 και bcl-x, η κυτταροπλασματική και μεμβρανική χρώση για το bax, η κυτταροπλασματική χρώση για τα αντιγόνα Fas και Fasl και η πυρηνική για τα p53, και Ki67 θεωρήθηκαν ως θετικές.

Μέθοδος in situ υβριδισμού TUNEL (κατακερματισμένου DNA) για την ανίχνευση των αποπτωτικών κυττάρων.

Για την ανίχνευση του κατακερματισμένου DNA και κατ' επέκταση των αποπτωτικών κυττάρων, εφαρμόστηκε η μέθοδος in situ υβριδισμού TUNEL σε τομές παραφίνης. Η τεχνική απεικονίζεται στην εικόνα 16.



Εικόνα 16: Απεικόνιση της μεθόδου in situ υβριδισμού TUNEL

Χρησιμοποιήθηκε το In Situ Cell Death Detection Kit, POD (Boeringer Mannheim USA) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστού ως ακολούθως:

1. Αποπαραφίνωση τομών: Η αποπαραφίνωση των τομών έγινε σε κλίβανο σε θερμοκρασία 60^{o}C για 16 ώρες.
2. Ενυδάτωση τομών: Οι τομές εμβαπτίσθηκαν σε διαφορετικά διαλύματα ως ακολούθως:

   α. Ξυλόλη για 20 λεπτά.

   β. Ενυδάτωση των τομών σε κατιούσα αλκοολών: 100% 2 λεπτά, 100% 2 λεπτά, 96% 1 λεπτό, 80% 1 λεπτό, 70% αιθανόλη 1 λεπτό.

   γ. Έκπλυση των τομών με απεσταγμένο νερό για 5 λεπτά.
3. Επώαση των τομών σε διάλυμα πρωτεϊνάσης Κ (Roche) για 30 λεπτά στους 37^{0}C.
4. Έκπλυση τομών επί 5 λεπτά με απεσταγμένο νερό 2 φορές.
5. Επώαση των τομών σε διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου 2% για 20 λεπτά για την κατανάλωση της ενδογενούς περοξειδάσης.

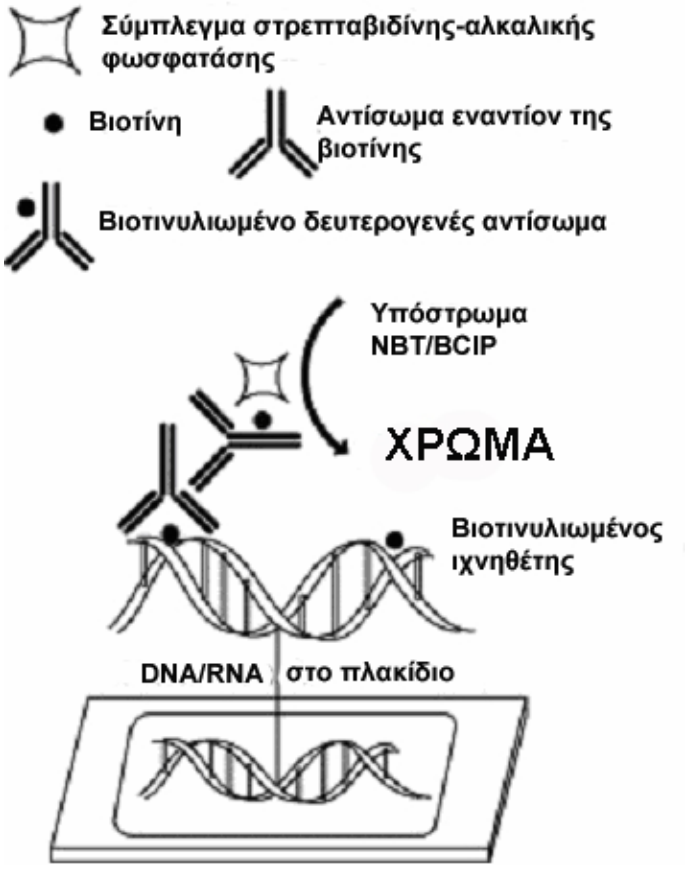
6. Έκπλυση των τομών με απεσταγμένο νερό επί 5 λεπτά, 2 φορές.
7. Επώαση των τομών με το μείγμα TUNEL (TdT-terminal deoxynucleotidyl transferase και digoxigenin-dUTP) στους 37^0C για 60 λεπτά
8. Έκπλυση των τομών επί 5 λεπτά σε διάλυμα PBS, 3 φορές.
9. Επώαση των τομών για 30 λεπτά στους 37^0 C με το peroxidase converter anti-fluorescein antibody.
10. Έκπλυση των τομών επί 5 λεπτά με διάλυμα TBS 3 φορές.
11. Επώαση των τομών για 3 λεπτά περίπου σε διάλυμα που περιέχει διαμινοβενζιδίνη (Sigma Fast DAB tablets, D-4293) (2ml Dab σε 100 ml διάλυμα Tris).
12. Έκπλυση των τομών επί 1 λεπτό σε νερό βρύσης 2 φορές.
13. Χρώση των τομών με αιματοξυλίνη Harris (2 λεπτά).
14. Έκπλυση με νερό βρύσης.
15. Αφυδάτωση των τομών σε ανιούσα αλκοολών: 70% 1 λεπτό, 80% 1 λεπτό, 96% 1 λεπτό, 100% 1 λεπτό, 100% 1 λεπτό.
16. Εμβάπτιση των τομών επί 1 λεπτό σε ξυλόλη 2 φορές.
17. Επικόλληση των καλυπτρίδων με Entellan.

Ως βιοχημικοί θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν (σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστού) ορισμένες τομές οι οποίες επωάσθηκαν με διάλυμα 10μg/ml of DNAse I (Sigma, UK). Ως φυσιολογικοί θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν (σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστού) τομές από λεπτό έντερο επίμυος. Και σε αυτές τις τομές εφαρμόσθηκε η διαδικασία που περιγράφηκε προηγουμένως. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ορισμένες τομές από τα παρασκευάσματα των θυμεκτομών και σε αυτές εφαρμόσθηκε η ίδια διαδικασία όπου το διάλυμα TUNEL είχε αντικατασταθεί από άλλο διάλυμα που δεν περιείχε

TdT.

Μέθοδος in situ υβριδισμού για την ανίχνευση του mRNA των ογκογονίδίων bcl-2, bax, bcl-x, Fas, Fasl σε τομές παραφίνης

Χρησιμοποιήσαμε μία μη-ραδιενεργό μέθοδο in-situ υβριδισμού με το kit: Hybridization/Detection Complete System (IH-60002 (IHD-0052): Ultra Sensitivity, MBI, CA, USA). Η τεχνική απεικονίζεται στην εικόνα 17.



Εικόνα 17: Η μέθοδος in-situ υβριδισμού για την ανίχνευση του mRNA των διαφόρων παραγόντων.

Υλικά

1. Μονιμοποιητικό υλικό: 10% ουδέτερη φορμόλη.
2. Υλικά που περιλαμβάνονται στο Hybridization/Detection Complete System (IH-60002): ***α)*** Βιοτυνιλιωμένος ιχνηθέτης για το Housekeeping γονίδιο (GAPDH): μπλε φιαλίδιο 1 ml, ***β)*** Πρωτεϊνάση Κ: καφέ φιαλίδιο 4 mg, ***γ)*** Διάλυμα αραίωσης

ελεύθερο σε DNase και RNase: 1 φιαλίδιο 2 ml, ***δ)*** Διάλυμα υβριδισμού: λευκό φιαλίδιο 6 ml, ***ε)*** Protein Block (20X): 1 φιαλίδιο 50 ml, ***στ)*** Διάλυμα Rnase A (15 μg/ml): Μωβ φιαλίδιο 6 ml, ***ζ)*** Mouse Anti-Biotin Linker 1: πράσινο φιαλίδιο 6 ml, ***η)*** Biotin-Goat Anti-Mouse Ig Linker 2: κίτρινο φιαλίδιο 6 ml, ***θ)*** Streptavidin-AP Conjugate: κόκκινο φιαλίδιο 6 ml, ***ι)*** Καφέ υπόστρωμα: φιαλίδιο1 vial 6 ml, ***ια)*** Διάλυμα εκπλύσεων (20 X:) 1 φιαλίδιο 100 ml

3. Μικροσκοπικά πλακίδια (Polylysine, microscopic slides, US Pat. 4481246, 4624882, Menzel-Glaser, Germany).
4. Ιστός που χρησιμοποιείται για θετικός μάρτυρας SP-10043 (bcl-1001/bcl-1002), Maxim Biotech, Inc., CA, USA].
5. Απεσταγμένο ύδωρ, καλυπτρίδες (Knittel Glaser, Germany), ξυλόλη, αιθανόλη.
6. Διάλυμα Tris (pH: 7.6): Διάλυση 6.1g Tris σε 1000 ml απεσταγμένο ύδωρ και 37 ml 1 N HCl.
7. Διάλυμα TBS: 1800ml NaCl και 200ml TRIS (TR 0423, Scharlau, Germany)
8. Χρώση: Nuclear Fast Red (S1963, DAKO, Carpinteria, CA, USA).
9. Biotinylated Long DNA Probe for Human Bcl-2 Gene. Cat. No.: IH-60041 (BCL-6001-B) Maxim Biotech, Inc., CA, USA.) (Alignment on database: Genbank, M14745)
10. Biotinylated Long DNA Probe for Human Bax Gene. Cat. No.: IH-60040 (BAX-6001-B) Maxim Biotech, Inc., CA, USA.) (Alignment on database: Genbank, L22473).
11. Biotinylated Long DNA Probe for Human FasL Gene IH-60047 (FAS-6001-B) Maxim Biotech, Inc., CA, USA.) (Alignment on database: Genbank, M67454).
12. Biotinylated Long DNA Probe for Human Fasl Gene IH-60048 (FAS-6010-B) Maxim Biotech, Inc., CA, USA.) (Alignment on database: Genbank, D38122,

U08137).

13. Biotinylated Long DNA Probe for Human Bcl-x Gene IH-60042 (BCL-6010-B) Maxim Biotech, Inc., CA, USA.) (Alignment on database: Genbank, Z23115).
14. Mounting medium: Entellan®, neu, rapid mounting media for microscopy, (1.07961.0500, Merck, Germany).

Προετοιμασία των διαλυμάτων (σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστού- "Hybridization/Detection Complete System (IH-60002 (IHD-0052): Ultra Sensitivity, MBI, CA, USA)"

Πρωτεϊνάση Κ

Διάλυμα πρωτεϊνάσης Κ 10 Χ

1. Θερμαίνουμε το διάλυμα αραίωσης ελεύθερο από Dnase και Rnase) πριν τη χρήση για να αποφύγουμε τυχόν καθιζήσεις.
2. Αδειάζουμε το περιεχόμενο του ανωτέρω διαλύματος στο φιαλίδιο που περιέχει τη λυοφιλοποιημένη πρωτεϊνάση Κ (4 mg).
3. Αναμιγνύουμε ελαφρά.
4. Μοιράζουμε το περιεχόμενο του φιαλιδίου (πρωτεϊνάση Κ 10Χ) σε μικρά φιαλίδια τύπου eppendorfs και τοποθετούμε αμέσως στην κατάψυξη (-20°C) τα eppendorfs που δεν θα χρησιμοποιήσουμε.

Διάλυμα πρωτεϊνάσης 1Χ

1. Το διάλυμα πρωτεϊνάσης 10Χ ξεπαγώνει σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Προσθέτουμε στα διαλύματα απεσταγμένο νερό ως ακολούθως: 1 μέρος διαλύματος με συγκέντρωση 10Χ και 9 μέρη νερό.

Διάλυμα Protein Block

1. Αναμιγνύουμε 50 ml του συμπυκνωμένου (20Χ) Protein Block διαλύματος σε

1000 ml απεσταγμένο νερό και αποθηκεύουμε το 1X Protein Block διάλυμα που δεν χρησιμοποιούμε στους 4°C.

Διάλυμα έκπλυσης

1. Αναμιγνύουμε 50 ml του συμπυκνωμένου 20X διαλύματος έκπλυσης σε 1000 ml απεσταγμένο νερό.
2. Αποθηκεύουμε το διάλυμα έκπλυσης 1X, το οποίο δεν χρησιμοποιούμε, σε θερμοκρασία δωματίου.

Πρωτόκολλα (Μέθοδοι)

Προετοιμασία των ιστών

1. Μονιμοποιούμε τον ιστό σε 10% ουδέτερη φορμόλη για 16 ώρες.
2. Εμβαπτίζουμε τον ιστό σε παραφίνη.
3. Κόβουμε με προσοχή για να αποφύγουμε τη μόλυνση και τοποθετούμε τις τομές σε υδατόλουτρο που δεν περιέχει πρωτεΐνη.
4. Στη συνέχεια τοποθετούμε με προσοχή, για να αποφύγουμε τη μόλυνση, τις τομές στα πλακίδια πολυλυσίνης.
5. Αποπαραφίνωση των τομών στους 37°C για 16 ώρες.
6. Αποπαραφίνωση των τομών σε ξυλόλη για 20 λεπτά.
7. Ενυδάτωση των τομών σε ανιούσα αλκοολών ως ακολούθως: 100% 2 λεπτά, 100% 2 λεπτά, 96% 1 λεπτό, 80% 1 λεπτό, 70% 1 λεπτό.
8. Έκπλυση των τομών επί 5 λεπτά με απεσταγμένο νερό.
9. Στεγνώνουμε τις τομές επί 5 λεπτά στους 37°C.
10. Εμβαπτίζουμε τις τομές επί 15 λεπτά σε διάλυμα πρωτεϊνάσης K στους 37°C.
11. Έκπλυση των τομών επί 5 λεπτά
12. Έκπλυση με απεσταγμένο νερό επί 1 λεπτό
13. Αφυδάτωση των τομών ως ακολούθως: 70% 1 λεπτό, 80% 1 λεπτό, 96% 1 λεπτό,

100% 1 λεπτό

14. Στέγνωμα των τομών στους 37°C επί 5 λεπτά.

Πρωτόκολλο υβριδισμού

1. Τοποθετούμε 1 σταγόνα από το διάλυμα που έχουμε αναμιγνύοντας τον ιχνηθέτη στο διάλυμα υβριδισμού (αραίωση 1/10) στην τομή. Στη συνέχεια τοποθετούμε μία καλυπτρίδα επάνω από την τομή, με προσοχή ώστε να μην «παγιδευθούν» φυσαλίδες αέρα μεταξύ της καλυπτρίδας και της τομής.
2. Τοποθετούμε τα πλακίδια με τις καλυπτρίδες σε κλίβανο και σε θερμοκρασία 95°C για 10 λεπτά ώστε να υπάρξει αποδόμηση της δευτερογενούς δομής του RNA.
3. Στη συνέχεια τοποθετούμε τα πλακίδια σε θάλαμο επώασης και επωάζουμε στους 37°C για 8 ώρες ώστε να συμπληρωθεί ο σχηματισμός υβριδίου (υβριδισμός) μεταξύ του ιχνηθέτη και του νουκλεϊνικού οξέως στόχου.
4. Στη συνέχεια ξεπλένουμε τα πλακίδια με το διάλυμα έκπλυσης 1X έως ότου αποπέσει η καλυπτρίδα προσέχοντας να μην καταστραφεί ο ιστός.
5. Στη συνέχεια τοποθετούμε πάνω στην τομή 1-2 σταγόνες RNase A (15 μg/ml).
6. Ακολούθως τοποθετούμε τα πλακίδια σε θάλαμο επώασης και τα επωάζουμε στους 37°C για 30 λεπτά.
7. Ξεπλένουμε τα πλακίδια με Protein Block 3X στους 37°C για 3 λεπτά.
8. Επωάζουμε τα πλακίδια με Protein Block (2X) για 3-5 λεπτά στους 37°C.
9. Με προσοχή σκουπίζουμε το διάλυμα που περισσεύει γύρω από την τομή.
10. Τοποθετούμε 1-2 σταγόνες Linker 1 (πράσινο φιαλίδιο) στην τομή.
11. Τοποθετούμε τα πλακίδια σε θάλαμο επώασης και επωάζουμε στους 37°C για 40 λεπτά.
12. Σκουπίζουμε προσεκτικά το πλακίδιο γύρω από την τομή και ξεπλένουμε τα

πλακίδια με διάλυμα έκπλυσης για 5 λεπτά.

13. Σκουπίζουμε πάλι προσεκτικά τα πλακίδια γύρω από τον ιστό.
14. Τοποθετούμε 1-2 σταγόνες από Linker 2 (κίτρινο φιαλίδιο) στην τομή.
15. Τοποθετούμε τα πλακίδια σε θάλαμο επώασης και επωάζουμε στους 37°C για 20 λεπτά.
16. Σκουπίζουμε προσεκτικά το πλακίδιο γύρω από την τομή.
17. Ξεπλένουμε τα πλακίδια με διάλυμα έκπλυσης για 5 λεπτά.
18. Σκουπίζουμε πάλι προσεκτικά τα πλακίδια γύρω από τον ιστό.
19. Τοποθετούμε 1-2 σταγόνες του Conjugate (κόκκινο φιαλίδιο) στην τομή.
20. Τοποθετούμε τα πλακίδια σε θάλαμο επώασης και επωάζουμε στους 37°C για 20 λεπτά.
21. Σκουπίζουμε προσεκτικά τα πλακίδια γύρω από τον ιστό.
22. Ξεπλένουμε τα πλακίδια με διάλυμα έκπλυσης για 5 λεπτά.
23. Σκουπίζουμε πάλι προσεκτικά τα πλακίδια γύρω από τον ιστό.
24. Τοποθετούμε 1-2 σταγόνες από το υπόστρωμα (καφέ φιαλίδιο) στην τομή.
25. Τοποθετούμε τα πλακίδια σε θάλαμο επώασης και τα επωάζουμε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ή έως ότου εμφανισθεί το χρώμα. Για αυτό το λόγο ελέγχουμε τις τομές στο φωτονικό μικροσκόπιο μέχρι η χρώση να είναι πλήρης (το χρώμα είναι έντονα κυανό).
26. Σκουπίζουμε προσεκτικά τα πλακίδια γύρω από τον ιστό.
27. Ξεπλένουμε τα πλακίδια με απεσταγμένο νερό (2-3 φορές).
28. Εναντιοχρωμασία και επικόλληση των καλυπτρίδων: *α)* Εναντιοχρωμασία Nuclear Fast Red για 10 λεπτά. ***β)*** Έκπλυση με απεσταγμένο νερό για 5 λεπτά. ***γ)*** Αφυδάτωση των τομών σε ανιούσα αλκοολών: 70%, 80%, 96%, 100% (δύο φορές) για 1 λεπτό την κάθε φορά. ***δ)*** Εμβάπτιση επί 1 λεπτό σε ξυλόλη δύο

φορές. ***ε)*** Επικόλληση καλυπτρίδων χρησιμοποιώντας Entellan.

Ως θετική χρώση θεωρείται η κοκκώδης κυτταροπλασματική χρώση για το κάθε ογκογονίδιο (bcl-2, bax, bcl-x, Fas, Fasl). Ως θετικούς μάρτυρες χρησιμοποιήσαμε τομές παραφίνης από αμυγδαλικό ιστό ανθρώπου. Για να πιστοποιήσουμε ότι η θετική χρώση ήταν ειδική επωάσαμε τα ίδια πλακίδια με ιχνηθέτες οι οποίοι είχαν συμπληρωματικές αλληλουχίες με αυτές στα πλακίδια των θετικών μαρτύρων (DNA ιχνηθέτες ανθρώπινου γονιδιώματος-θετικοί μάρτυρες ιχνηθέτες). Αυτοί οι μάρτυρες ιχνηθέτες είχαν ταυτόσημο μήκος και περιεχόμενο GC με τον ιχνηθέτη που χρησιμοποιήθηκε. Για την περίπτωση των αρνητικών μαρτύρων τα πλακίδια επωάσθηκαν με τον ίδιο τρόπο αλλά χρησιμοποιήσαμε ετερόλογους ιχνηθέτες. Οι τελευταίοι δεν εμφάνισαν καμία συμπληρωματικότητα για καμία αλληλουχία με τους ιχνηθέτες που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση έκφρασης του mRNA (DNA ιχνηθέτες φυτικού γονιδιώματος). Αυτοί οι αρνητικοί μάρτυρες ιχνηθέτες είχαν ταυτόσημο μήκος και περιεχόμενο GC με τον ιχνηθέτη που χρησιμοποιήθηκε.

ΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η ποσοτικοποίηση των χρώσεων, η εκτίμηση του ποσοστού των διαφορετικών ειδών κυττάρων που παρουσίασαν i) θετική ανοσοϊστοχημική χρώση στα αντιγόνα bcl-2, bax, bcl-x, Fas, Fasl, PCNA, Ki67 και p53, ii) θετική χρώση στη μέθοδο in-situ υβριδισμού (TUNEL) για την ανίχνευση του κατακερματισμένου DNA και iii) θετική χρώση στη μέθοδο in-situ υβριδισμού για την ανίχνευση έκφρασης του mRNA των ογκογονιδίων bcl-2, bax, bcl-x, Fas, Fasl (ενεργός παραγωγή των ογκογονιδίων) βασίσθηκε σε καλώς εφαρμοσμένη μέθοδο (Scopa CD, et al, 2001).

Όλες οι τομές εκτιμήθηκαν σε φωτονικό μικροσκόπιο σε μικρή μεγέθυνση και επιλέχθηκαν οι περιοχές σε κάθε τομή που εμφάνισαν θετική χρώση. Στη

συνέχεια επάνω σε κάθε τομή εφαρμόσθηκε ένα μικροσκοπικό πλέγμα 10Χ10 (121 σημεία). Ακολούθως και σε μεγέθυνση Χ400 μετρήθηκαν τα κύτταρα που έδωσαν θετική ανοσοχρώση (για κάθε αντίσωμα ή ανιχνευτή που χρησιμοποιήθηκε) αλλά και ο συνολικός αριθμός των συγκεκριμένων κυττάρων που περιέχονται στο πλέγμα (τουλάχιστον 500 κύτταρα). Για κάθε δείκτη κατεγράφη μία τιμή για το μυελό και μία για το φλοιό. Στη συνέχεια ο αριθμός των θετικών κυττάρων διαιρέθηκε με το συνολικό αριθμό των κυττάρων και κατεγράφη ένα ποσοστό (πάντα ξεχωριστά για το μυελό και το φλοιό). Η εκτίμηση αυτή εφαρμόσθηκε σε έξι (6) διαφορετικά ΜΟΠ για κάθε τομή. Οι τιμές δεν διέφεραν μεταξύ τους περισσότερο από 10%. Στη συνέχεια υπολογίσθηκε η μέση τιμή που αντιστοιχεί σε κάθε περίπτωση. Επιπλέον, σε κάθε περίπτωση η αναλογία bax/bcl-2 υπολογίσθηκε διαιρώντας το %ποσοστό των bax (+) κύτταρα με το %ποσοστό των bcl-2 (+) κυττάρων (και πάλι ξεχωριστά για το μυελό και το φλοιό). Στην περίπτωση του αριθμού των αποπτωτικών σωματίων το ποσοστό ονομάσθηκε δείκτης αποπτωτικών σωματίων (ΔΑΣ).

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Τα αποτελέσματα της μελέτης παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± SD, διάμεση τιμή και εύρος τιμών. Η σύγκριση μεταξύ των τιμών των διαφόρων ομάδων-δηλ. συσχέτιση της ιστοπαθολογίας του θύμου και του σταδίου της μυασθένειας με τα αποτελέσματα των χρώσεων- έγινε με τη χρήση της δοκιμασίας ANOVA (ανάλυση απλής μεταβλητής) ενώ, όπου ήταν απαραίτητο χρησιμοποιήθηκε η μη-παραμετρική δοκιμασία Kruskall-Wallis. Για να διευθετηθούν τα όποια προβλήματα θα προέκυπταν από τις πολλαπλές συγκρίσεις, αυτές οι δοκιμασίες (ANOVA, Kruskall–Wallis) ακολουθήθηκαν από την posthoc Bonferroni δοκιμασία. Η μέθοδος συσχέτισης κατά Spearman rank χρησιμοποιήθηκε με σκοπό να εξετάσει τις πιθανές

σχέσεις μεταξύ των αποτελεσμάτων των ανοσοϊστοχημικών και in-situ υβριδισμών τεχνικών από τη μία πλευρά, και μεταξύ τους μεγέθους και του βάρους του θύμου από την άλλη. Επίσης η μέθοδος συσχέτισης κατά Spearman rank χρησιμοποιήθηκε για να εξετάσει τις πιθανές σχέσεις μεταξύ των αποτελεσμάτων των διαφόρων χρώσεων. Οι καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier χρησιμοποιήθηκαν για να καθορίσουν εάν υπήρχε σχέση μεταξύ της αναλογίας bax/bcl-2 και της κατάστασης των ασθενών μετά τη θυμεκτομή (όπως αυτή έχει περιγραφεί αναλυτικά πιο πάνω). Τελικώς εφαρμόσθηκε η δοκιμασία Cox για να διακρίνουμε ποιοι από όλους τους παράγοντες που μελετήσαμε αποτελούν ανεξάρτητους προγνωστικούς παράγοντες για την έκβαση των ασθενών. Για τους σκοπούς της στατιστικής ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SPSS (έκδοση για Windows 10.0, SPSS®, USA) και κάθε τιμή $p<0.05$ θεωρήθηκε ως στατιστικώς σημαντική.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΚΛΙΝΙΚΟΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΒΑΡΕΙΑ ΜΥΑΣΘΕΝΕΙΑ

Ο πίνακας 8 δείχνει το φύλο των ασθενών, την ηλικία τους όταν έγινε η θυμεκτομή, τη χρονική διάρκεια από την έναρξη των συμπτωμάτων της νόσου έως τη θυμεκτομή (διάρκεια μεγαλύτερη ή μικρότερη του 1 χρόνου), το στάδιο της μυασθένειας κατά Osserman πριν τη θυμεκτομή και τα ιστοπαθολογικά ευρήματα των παρασκευασμάτων της θυμεκτομής. Οκτώ ασθενείς είχαν ατροφία θύμου, 26 υπερπλασία, εννέα θύμωμα [τύπου Β1 και Β2 κατά την ταξινόμηση WHO (Dadmanesh F, et al, 2001)] και τρεις θύμωμα τύπου Β3 (υψηλής διαφοροποίησης καρκίνωμα κατά την ταξινόμηση WHO). Πέντε ασθενείς είχαν μυασθένεια σταδίου Ι πριν τη θυμεκτομή, 21 ΙΙΑ, 17 ΙΙΒ και 3 μυασθένεια σταδίου ΙΙΙ. Διαθέσιμες πληροφορίες για το χρόνο που μεσολάβησε από την έναρξη της νόσου έως τη θυμεκτομή υπήρξαν για 43 ασθενείς: 22 ασθενείς υπέστησαν θυμεκτομή σε χρονικό διάστημα μικρότερο και 21 σε διάστημα μεγαλύτερο του ενός έτους από την έναρξη των συμπτωμάτων της μυασθένειας.

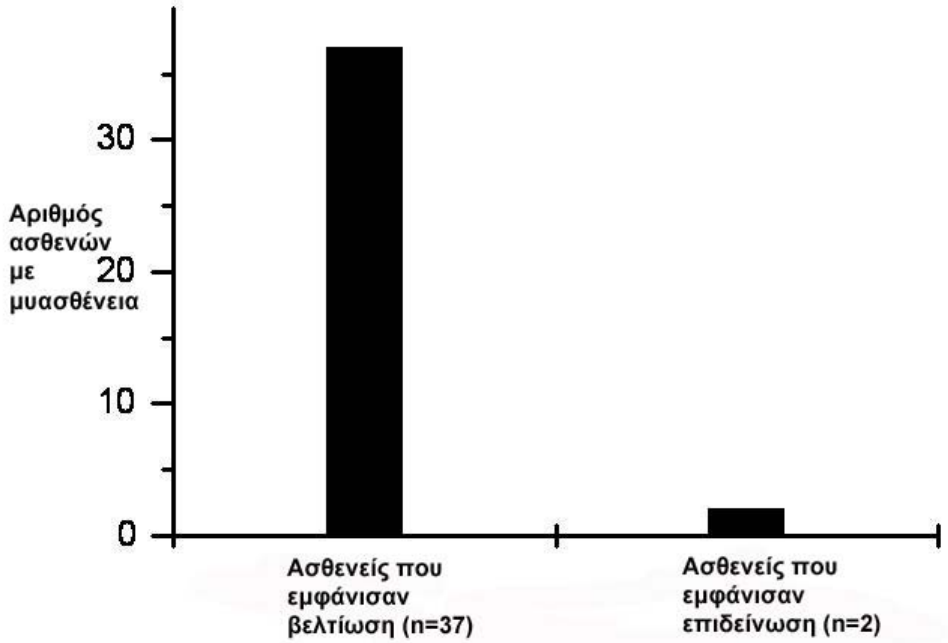
Πίνακας 8: Κλινικοεπιδημιολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με μυασθένεια

# Ασθ.	Φύλο	Ηλικία	Στάδιο	Χρόνος	Ιστολογία	Κατάσταση	Μήνες$^{\$}$	Μήνες*	Μήνες^{+}
1	Θ	18	ΙΙΒ	<1	θύμωμα	Επιδείνωση	166		
2	Θ	64	ΙΙΑ	>1	θύμωμα	ΝΑ			
3	Θ	54	ΙΙΑ	>1	ατροφία	ΕΕ-3	132		
4	Α	38	ΙΙΑ	<1	θύμωμα	ΠΣΥ	160	0	160
5	Θ	23	ΙΙΒ	<1	υπερπλασία	ΕΕ-3	151		
6	Θ	21	ΙΙΒ	>1	υπερπλασία	Επιδείνωση	143		
7	Θ	75	ΙΙΙ	<1	θύμωμα	ΕΕ-3	86		
8	Θ	34	ΙΙΒ	<1	ατροφία	Βελτίωση	135		
9	Θ	18	ΙΙΑ	<1	υπερπλασία	ΕΕ-2	135		
10	Α	28	Ι	>1	ατροφία	ΦΥ	129		

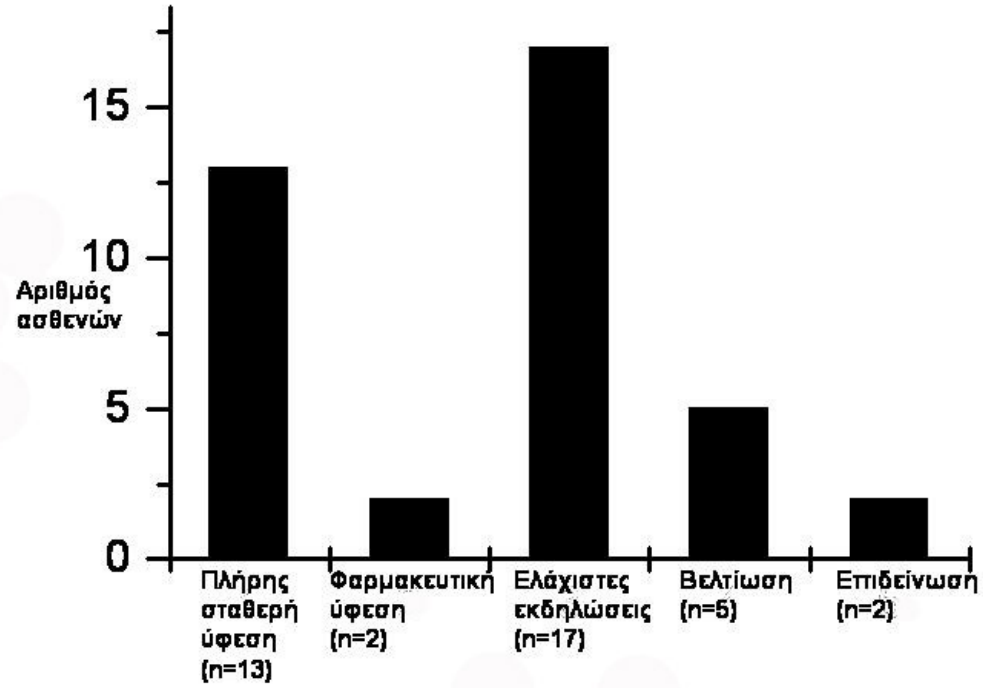
11	Θ	30	IIA	<1	υπερπλασία	ΠΣΥ	136	18	118
12	Θ	52	IIA	>1	θύμωμα	ΕΕ-0	130		
13	Α	35	III	NA	θύμωμα	NA			
14	Α	60	IIA	>1	ατροφία	ΦΥ	126		
15	Θ	29	IIA	<1	ατροφία	ΠΣΥ	127	24	103
16	Α	30	IIA	<1	υπερπλασία	ΕΕ-3	124		
17	Α	66	IIA	>1	ατροφία	ΕΕ-2	119		
18	Θ	26	IIA	<1	υπερπλασία	NA			
19	Θ	31	IIA	<1	θύμωμα	ΕΕ-2	103		
20	Θ	64	III	>1	ατροφία	ΕΕ-3	108		
21	Α	30	I	<1	ατροφία	ΠΣΥ	91	0	91
22	Α	24	IIB	<1	υπερπλασία	ΕΕ-3	87		
23	Θ	21	IIA	<1	υπερπλασία	ΠΣΥ	82	48	34
24	Θ	20	IIA	<1	υπερπλασία	ΠΣΥ	80	3	77
25	Θ	57	IIA	<1	καρκίνωμα	NA			
26	Α	44	IIB	>1	υπερπλασία	Βελτίωση	87		
27	Α	34	I	<1	υπερπλασία	ΠΣΥ	76	1	75
28	Α	16	I	<1	υπερπλασία	ΠΣΥ	82	0	82
29	Α	27	IIB	<1	υπερπλασία	ΠΣΥ	70	12	58
30	Θ	37	IIA	>1	υπερπλασία	ΕΕ-3	68		
31	Α	25	IIB	>1	υπερπλασία	NA			
32	Θ	28	IIA	<1	υπερπλασία	ΠΣΥ	60	18	42
33	Θ	34	IIB	>1	καρκίνωμα	ΕΕ-2	58		
34	Α	38	IIA	NA	υπερπλασία	NA			
35	Α	72	IIB	>1	υπερπλασία	ΕΕ-3	61		
36	Θ	30	IIB	>1	θύμωμα	ΠΣΥ	51	12	39
37	Θ	43	IIB	>1	καρκίνωμα	ΕΕ-3	49		
38	Θ	24	IIA	>1	υπερπλασία	ΕΕ-2	54		
39	Θ	33	IIA	NA	υπερπλασία	NA			
40	Θ	22	IIB	<1	υπερπλασία	ΠΣΥ	45	12	33
41	Θ	27	IIA	>1	υπερπλασία	ΠΣΥ	50	36	14
42	Θ	67	IIB	>1	θύμωμα	Βελτίωση	48		
43	Α	25	IIB	>1	υπερπλασία	Βελτίωση	48		
44	Θ	48	IIB	>1	υπερπλασία	Βελτίωση	40		
45	Α	42	I	<1	υπερπλασία	ΕΕ-3	47		
46	Θ	20	IIB	>1	υπερπλασία	ΕΕ-1	39		

Α: άρρεν, Θ: θήλυ, Στάδιο: κατά Osserman, Χρόνος: αν η θυμεκτομή σε λιγότερο ή περισσότερο από 1 έτος μετά την έναρξη των συμπτωμάτων της νόσου, Υπερπλασία: λεμφοζιδιακή υπερπλασία, Θύμωμα: θύμωμα τύπου Β1 ή Β2 κατά τη WHO, Καρκίνωμα: θύμωμα τύπου Β3 (υψηλής διαφοροποίησης καρκίνωμα) κατά τη WHO (Dadmanesh F, et al, 2001). Κατάσταση: η κλινική κατάσταση των ασθενών μετά τη θυμεκτομή, ΠΣΥ: πλήρης σταθερή ύφεση, ΦΥ: φαρμακευτική ύφεση, ΕΕ: ελάχιστες εκδηλώσεις, ΕΕ-0: όχι φάρμακα, ΕΕ-1: μόνο ανοσοκατασταλτικά, ΕΕ-2: μόνο αναστολείς χολινεστεράσης (μικρή δόση), ΕΕ-3: αναστολείς χολινεστεράσης και ανοσοκατασταλτικά. NA: όχι διαθέσιμες πληροφορίες, $^{\$}$: χρόνος από τη θυμεκτομή έως την αξιολόγηση**,** *: μήνες που εμφανίσθηκε η ΠΣΥ μετά τη θυμεκτομή, $^{+}$**:** μήνες που διαρκούσε η ΠΣΥ.

Επίσης στον παραπάνω πίνακα (πίνακα 8) φαίνεται η κλινική κατάσταση των ασθενών μετά τη θυμεκτομή σύμφωνα με τα κριτήρια του Αμερικανικού Ιδρύματος για τη Μυασθένεια (MGFA). Ο χρόνος που είχε μεσολαβήσει από τη θυμεκτομή μέχρι την εκτίμηση της κλινικής κατάστασης των ασθενών φαίνεται και αυτός στον πίνακα 8. Η αξιολόγηση έγινε σε 39 από τους 46 ασθενείς. Μία ασθενής απεβίωσε 1.5 μήνα μετά τη θυμεκτομή από πνευμονική εμβολή και δεν γνωρίζουμε την κατάστασή της από πλευράς μυασθενικών συμπτωμάτων έως τότε. Επιπλέον η επικοινωνία δεν ήταν δυνατή με έξι (6) ασθενείς. Να αναφέρουμε επίσης ότι τρεις (3) από τους 39 ασθενείς είχαν αποβιώσει όταν έγινε η αξιολόγηση, λάβαμε όμως επαρκείς πληροφορίες από τους οικείους τους και από το αρχείο της Νευρολογικής Κλινικής κατά την παρακολούθησή τους, ώστε να αξιολογήσουμε με αξιοπιστία την κατάστασή τους μετά τη θυμεκτομή έως και το θάνατό τους. Σημειωτέον ότι ο θάνατος και τους τρεις ασθενείς οφειλόταν σε άλλα αίτια εκτός της μυασθένειας. Έτσι λοιπόν από τους 39 αυτούς ασθενείς που υπέστησαν μεγίστη τροποποιημένη θυμεκτομή και για τους οποίους έχουμε πληροφορίες, 37 (94.87%) εμφάνισαν βελτίωση και δύο επιδείνωση (εικόνα 18). Πιο συγκεκριμένα, 13 ασθενείς εμφάνισαν πλήρη σταθερή ύφεση, δύο (2) ασθενείς ύφεση υπό φαρμακευτική αγωγή και 17 είχαν ελάχιστες εκδηλώσεις της νόσου. Οι υπόλοιποι επτά ασθενείς συνέχιζαν να έχουν συμπτώματα μυασθένειας, κατά τη χρονική στιγμή της αξιολόγησης, σε σχέση όμως με τα συμπτώματα που είχαν προ του χειρουργείου οι πέντε εμφάνιζαν βελτίωση και οι δύο επιδείνωση (εικόνα 19).



Εικόνα 18: Μετά την τροποποιημένη μεγίστη θυμεκτομή 37/39 (94.87%) ασθενείς με μυασθένεια εμφάνισαν βελτίωση και 2/39 επιδείνωση.



Εικόνα 19: Η κλινική κατάσταση των 39 ασθενών μετά τη θυμεκτομή

Οι 13 ασθενείς με την πλήρη σταθερή ύφεση αξιολογήθηκαν 45-160 (μέση τιμή±SD 85.46±35.25, διάμεσος τιμή 80) μήνες μετά τη θυμεκτομή. Οι υπόλοιποι 26 ασθενείς (με ύφεση υπό φαρμακευτική αγωγή, ελάχιστες εκδηλώσεις, βελτίωση και επιδείνωση) αξιολογήθηκαν 39-166 (μέση τιμή±SD 92.84±39.4, διάμεσος τιμή 87) μήνες μετά τη θυμεκτομή. Η διαφορά στη χρονική αξιολόγηση δεν είναι στατιστικώς σημαντική (p=0.572).

Σχετικά με τη φαρμακευτική αγωγή προ του χειρουργείου, για δύο ασθενείς δεν έχουμε πληροφορίες ενώ όλοι οι υπόλοιποι, πλην τριών ασθενών, ελάμβαναν φάρμακα. Δεκαπέντε (15) ασθενείς ελάμβαναν μόνο πυριδοστιγμίνη (αναστολέας χολινεστεράσης), 24 πυριδοστιγμίνη και κορτιζόνη και 2 ασθενείς πυριδοστιγμίνη, κορτιζόνη και αζαθειοπρίνη. Οι τρεις ασθενείς που δεν ελάμβαναν αγωγή (No 4, 19 και 28 στον πίνακα 8) είχαν ήπια συμπτώματα προ του χειρουργείου, οι δύο γενικευμένης και ο ένας οφθαλμικής μυασθένειας. Αυτοί οι τρεις ασθενείς χειρουργήθηκαν διότι στην αξονική τομογραφία μεσοθωρακίου εμφάνιζαν εικόνα θυμώματος. Τελικά οι δύο ασθενείς με γενικευμένη μυασθένεια είχαν θύμωμα ενώ ο ασθενής με την οφθαλμική μυασθένεια είχε υπερπλασία θύμου. Μετά το χειρουργείο, ο ένας από τους ασθενείς με γενικευμένη νόσο χρειάστηκε να λάβει αγωγή (πυριδοστιγμίνη) ενώ οι άλλοι δύο όχι. Τελικά, κατά την αξιολόγηση της κατάστασής τους, αυτοί οι δύο τελευταίοι ασθενείς ήταν σε πλήρη σταθερή ύφεση ενώ ο τρίτος ασθενής που έλαβε τελικά φάρμακα εμφάνιζε ελάχιστες εκδηλώσεις νόσου. Συνολικά και οι τρεις αυτοί ασθενείς βελτιώθηκαν.

Μετά τη θυμεκτομή η κατάσταση των περισσοτέρων ασθενών (από τους 39 για τους οποίους έχουμε πληροφορίες) είχε διακυμάνσεις, με υφέσεις και εξάρσεις. Έστω και για κάποιο χρονικό διάστημα μετά το χειρουργείο χρειάστηκε να λάβουν φαρμακευτική αγωγή όλοι, πλην τριών ασθενών. Πρόκειται για τους δύο ασθενείς

που προαναφέρθηκαν, οι οποίοι δεν είχαν πάρει αγωγή ούτε προεγχειρητικά (No 4, 28 στον πίνακα 8) και έναν επιπλέον ασθενή (No 21 στον πίνακα 8)με οφθαλμική μυασθένεια και ατροφία θύμου που είχε λάβει πυριδοστιγμίνη και κορτιζόνη προεγχειρητικά, αλλά δεν χρειάστηκε φαρμακευτική αγωγή μετά.

Υπήρξαν επιπλέον και επτά ασθενείς (No 1, 6, 8, 20, 38, 43, 46 στον πίνακα 8), οι οποίοι σε κάποια στιγμή, κατά τη διάρκεια της μετεγχειρητικής τους πορείας, χρειάστηκε, λόγω της βαρύτητας των συμπτωμάτων τους να κάνουν πλασμαφαίρεση ή να λάβουν γ-σφαιρίνη.

Ωστόσο, παρά τις διακυμάνσεις της κλινικής τους πορείας, φαίνεται από τα στοιχεία που συλλέξαμε, ότι τελικά, οι περισσότεροι μυασθενικοί ασθενείς μετά τη θυμεκτομή βελτιώθηκαν. Συνολικά από τους 39 ασθενείς βελτιώθηκαν οι 37 ενώ δύο (2) ασθενείς παρουσίασαν επιδείνωση.

Σχετικά με τους δύο ασθενείς που τελικά επιδεινώθηκαν (No 1 και 6 στον πίνακα) να αναφέρουμε ότι η κατάστασή τους εκτιμήθηκε σε 166 και 143 μήνες αντίστοιχα μετά τη θυμεκτομή, όπου διαπιστώθηκε ότι παρουσίαζαν μέτρια έως σοβαρά συμπτώματα γενικευμένης μυασθένειας, βαρύτερα από αυτά που είχαν προ του χειρουργείου, ενώ ελάμβαναν και ικανοποιητική φαρμακευτική αγωγή. Όταν εκτιμήθηκαν, ο ένας ασθενής από αυτούς ελάμβανε πυριδοστιγμίνη (300mg/μέρα) πρεδνιζολόνη (20 mg ανά $2^{η}$ μέρα) και κυκλοσπορίνη (150 mg/μέρα) και ο άλλος πυριδοστιγμίνη (240mg/μέρα) και πρεδνιζολόνη (60 mg ανά $2^{η}$ μέρα). Και οι δύο ασθενείς χρειάσθηκε να νοσηλευθούν στη ΜΕΘ μία και δύο φορές αντίστοιχα, ενώ στη διάρκεια της μετεγχειρητικής τους πορείας δεν έχουν εμφανίσει ποτέ σημαντική ύφεση της νόσου και πάντα χρειάζονται αυξημένες δόσεις φαρμάκων. Σημειώνουμε ότι και οι δύο ασθενείς είναι γυναίκες με θύμωμα και υπερπλασία θύμου αντίστοιχα.

Από τους 37 ασθενείς οι οποίοι βελτιώθηκαν, οι 15 όταν εκτιμήθηκαν ήταν σε

ύφεση. Από αυτούς, 13 σε πλήρη σταθερή ύφεση και 2 σε φαρμακολογική ύφεση (σύμφωνα με τα MGFA κριτήρια). Θα πρέπει να προσθέσουμε ότι οι 13 ασθενείς εμφάνισαν την πλήρη σταθερή ύφεση (δηλ. απουσία συμπτωμάτων χωρίς φαρμακευτική αγωγή για τουλάχιστον έναν χρόνο) σε χρόνους οι οποίοι κυμάνθηκαν από 0-48 (μέση τιμή±SD 14.15±14.89, διάμεσος τιμή 12) μήνες μετά τη θυμεκτομή (πίνακας 8). Επιπλέον σε αυτούς τους ασθενείς η πλήρης σταθερή ύφεση διαρκούσε 14-160 (μέση τιμή±SD 71.2±40.6, διάμεσος τιμή 75) μήνες (πίνακας 8)

Να αναφέρουμε εδώ ότι κανένας άλλος ασθενής, πέραν των 13 που προαναφέρθηκαν, δεν εμφάνισε κατά τη μετεγχειρητική του πορεία ύφεση συμπτωμάτων χωρίς να χρειάζεται φαρμακευτική αγωγή διάρκειας τουλάχιστον ενός έτους (δηλ. πλήρη σταθερή ύφεση).

Οι δύο ασθενείς με φαρμακολογική ύφεση ελάμβαναν μόνο αζαθειοπρίνη. Ο πρώτος εμφάνισε την ύφεση αυτή 8,5 χρόνια μετά το χειρουργείο και η ύφεση διαρκούσε 2 χρόνια. Ο δεύτερος πέθανε από έμφραγμα μυοκαρδίου 10,5 χρόνια μετά το χειρουργείο και τα τελευταία 3,5 χρόνια ήταν σε ύφεση υπό αζαθειοπρίνη. Η ύφεση αυτή ξεκίνησε 7 χρόνια μετά τη θυμεκτομή.

Οι ασθενείς που τη χρονική στιγμή που εκτιμήθηκαν, είχαν ελάχιστες εκδηλώσεις μυασθένειας, ήταν 15. Από αυτούς ο ένας δεν ελάμβανε καθόλου αγωγή, πέντε ελάμβαναν μόνο πυριδοστιγμίνη, ένας μόνο αζαθειοπρίνη και οι υπόλοιποι οκτώ πυριδοστιγμίνη και ανοσοκατασταλτικά (έξι πυριδοστιγμίνη και κορτιζόνη, δύο πυριδοστιγμίνη και αζαθειοπρίνη και δύο πυριδοστιγμίνη, κορτιζόνη και αζαθειοπρίνη). Στην ομάδα ασθενών με ελάχιστες εκδηλώσεις νόσου ανήκουν και δύο ασθενείς (No 3, 7 στον πίνακα 8) που έχουν πεθάνει από άλλο αίτιο εκτός της μυασθένειας, αλλά σύμφωνα με πληροφορίες από τους οικείους τους και το αρχείο της Νευρολογικής Κλινικής από την παρακολούθησή τους, μέχρι το θάνατό τους

είχαν ελάχιστα συμπτώματα και από πλευράς αγωγής ελάμβαναν πυριδοστιγμίνη και κορτιζόνη.

Οι ασθενείς που απλώς βελτιώθηκαν μετά τη θυμεκτομή ήταν πέντε, όλοι με συμπτώματα γενικευμένης μυασθένειας. Τέσσερις (4) εξ αυτών ελάμβαναν πυριδοστιγμίνη, κορτιζόνη και αζαθειοπρίνη και 1 πυριδοστιγμίνη και κορτιζόνη.

Η στατιστική ανάλυση των στοιχείων του πίνακα 8 έδωσε τα ακόλουθα αποτελέσματα: Οι ασθενείς που εμφάνισαν πλήρη σταθερή ύφεση είχαν κατά τη θυμεκτομή ηλικία από 16-38 (μέση τιμή±SD 27.07±6.006, διάμεσος τιμή 28) έτη. Οι υπόλοιποι ασθενείς είχαν ηλικία από 18-75 (μέση τιμή±SD 40.53±18.12, διάμεσος τιμή 35.5) έτη. Η διαφορά αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική (p=0.036) γεγονός που δείχνει ότι η μικρότερη ηλικία (κατά τη θυμεκτομή) ευνοεί την εμφάνιση πλήρους σταθερής ύφεσης. Από τους 43 ασθενείς για τους οποίους γνωρίζουμε πότε υπέστησαν θυμεκτομή σε σχέση με την έναρξη της νόσου, διαθέσιμες πληροφορίες για την μετεγχειρητική κατάσταση υπήρξαν για 20 ασθενείς που χειρουργήθηκαν σε περίοδο μικρότερη του έτους και για 19 που χειρουργήθηκαν σε περίοδο μεγαλύτερη του έτους (από την έναρξη της νόσου). Πλήρη σταθερή ύφεση εμφάνισαν 11/20 που υπέστησαν θυμεκτομή σε χρόνο μικρότερο του 1 έτους και 2/19 που υπέστησαν θυμεκτομή σε χρόνο μεγαλύτερο του 1 έτους (p=0.009). Όσον αφορά την κλινική κατάσταση των ασθενών σε σχέση με το στάδιο της νόσου (κατά Osserman), πριν τη θυμεκτομή, πρέπει να αναφέρουμε τα εξής: α) όταν η σύγκριση έγινε μεταξύ των τεσσάρων σταδίων (I, IIA, IIB, III) δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά όσον αφορά τη συχνότητα εμφάνισης πλήρους σταθερής ύφεσης (p=0.178), β) όταν η σύγκριση έγινε μεταξύ της οφθαλμικής μορφής της νόσου (στάδιο I) και της γενικευμένης μορφής (στάδια IIA, IIB και III) της νόσου, τότε δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των αυτών κατηγοριών στη συχνότητα

εμφάνισης πλήρους σταθερής ύφεσης (p=0.337), γ) όταν η σύγκριση περιέλαβε μόνο τα στάδια της γενικευμένης μυασθένειας που χωρίσθηκαν σε δύο ομάδες (ΙΙΑ και ΙΙΒ+ΙΙΙ), τότε το στάδιο ΙΙΑ εμφάνισε συχνότερα πλήρη σταθερή ύφεση - η διαφορά πλησίασε τη στατιστική σημαντικότητα (p=0.052), δ) όταν η σύγκριση περιέλαβε δύο ομάδες (στάδια Ι+ΙΙΑ και στάδια ΙΙΒ+ΙΙΙ) τότε υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά: η ομάδα που περιέλαβε τα στάδια Ι+ΙΙΑ εμφάνισε συχνότερα πλήρη σταθερή φαρμακευτική ύφεση σε σχέση μ την ομάδα που περιέλαβε τα στάδια ΙΙΒ+ΙΙΙ (p=0.013). Τέλος δεν κατεγράφη καμία συσχέτιση μεταξύ της ιστολογικής εικόνας του θύμου στα παρασκευάσματα των θυμεκτομών και της κλινικής κατάστασης των ασθενών μετά τη θυμεκτομή.

ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ

Bcl-2

Όλα τα αποτελέσματα για το bcl-2 φαίνονται στον πίνακα 9. Τόσο η ανοσοϊστοχημική μέθοδος για την πρωτεΐνη του bcl-2, όσο και η μέθοδος in-situ υβριδισμού για την ανίχνευση του bcl-2mRNA (ενεργός παραγωγή του bcl-2) έδειξαν παρόμοια αποτελέσματα όσον αφορά την κατανομή της χρώσης. Στους μάρτυρες (φυσιολογικός θύμος) το bcl-2 ανιχνεύθηκε κυρίως στο μυελό και λιγότερο στο φλοιό (εικόνα 20Α). Τα επιθηλιακά κύτταρα και τα βλαστικά κέντρα περιείχαν λίγα bcl-2(+) κύτταρα. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με προηγούμενη μελέτη (Onodera J, et al, 1996). Στις περιπτώσεις με μυασθένεια η οποία συνόδευε ατροφία ή υπερπλασία του θύμου, το bcl-2 (πρωτεΐνη και mRNA) εκφράσθηκε κυρίως στο μυελό του θύμου. Η χρώση ήταν κυτταροπλασματική και περιπυρηνική για την πρωτεΐνη (εικόνα 20Β) και κυτταροπλασματική για το mRNA (εικόνα 20Δ). Λιγότερα bcl-2 (+) κύτταρα ανιχνεύθηκαν στο φλοιό. Τα βλαστικά κέντρα περιείχαν

αραιά bcl-2(+) κύτταρα, ενώ τα επιθηλιακά κύτταρα έδειξαν αραιή ενεργό παραγωγή του bcl-2 (λίγα κύτταρα έδωσαν θετική χρώση για bcl-2mRNA). Στους ασθενείς με μυασθένεια η οποία συνοδευόταν από θύμωμα η πρωτεΐνη και το mRNA του bcl-2 εκφράσθηκαν περισσότερο στα θυμοκύτταρα και λιγότερο συχνά στα επιθηλιακά κύτταρα. Στον περιβάλλοντα τον όγκο θυμικό μη νεοπλασματικό ιστό το bcl-2 έδειξε παρόμοια κατανομή όπως στους υπερπλαστικούς και ατροφικούς θύμους που περιελήφθησαν στη μελέτη. Οι τρεις περιπτώσεις καρκινώματος έδειξαν λίγα κύτταρα θετικά για την πρωτεΐνη του bcl-2 (εικόνα 20Γ) ή το bcl-2 mRNA. Και σε αυτές τις τρεις περιπτώσεις οι περιβάλλοντες τους όγκους μη νεοπλασματικοί θυμικοί ιστοί εμφάνισαν παρόμοια έκφραση του bcl-2 με τους υπερπλαστικούς ή ατροφικούς θύμους που περιελήφθησαν στη μελέτη. Η έκφραση του bcl-2 στον μυελό ήταν χαμηλότερη στις περιπτώσεις καρκινώματος σε σύγκριση με την υπερπλασία και το θύμωμα ($p<0.001$). Επιπρόσθετα, η έκφραση του bcl-2 στον μυελό ήταν υψηλότερη στους ασθενείς με μυασθένεια σε σύγκριση με τους μάρτυρες ($p<0.001$). Η έκφραση του bcl-2 κυρίως στον μυελό (και λιγότερο στον φλοιό), σχετίζεται αντιστρόφως με το στάδιο της νόσου κατά Osserman ($p<0.001$) (πίνακας 9). Η ανάλυση κατά Spearman δεν απεκάλυψε σχέση μεταξύ της έκφρασης bcl-2 και μεγέθους και βάρους του θύμου.

Bax

Ο πίνακας 10 δείχνει τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημείας και in-situ υβριδισμού για την πρωτεΐνη και το mRNA του bax αντιστοίχως. Στους μάρτυρες (φυσιολογικός θύμος) (εικόνα 21Α) η πρωτεΐνη και το mRNA του bax ανιχνεύθηκαν κυρίως στον μυελό και λιγότερο συχνά στο φλοιό. Τα ευρήματα αυτά είναι συμβατά με προηγούμενες μελέτες (Krajewski, S, Krajewska M, et al, 1994 Penault-Llorca F, et al, 1998). Στις περιπτώσεις με μυασθένεια οι οποίες σχετίζονταν με υπερπλασία και

ατροφία, τόσο η πρωτεΐνη bax όσο και το baxmRNA ανιχνεύθηκαν κυρίως στα κύτταρα του μυελού και λιγότερο συχνά στον φλοιό. Η χρώση ήταν κυτταροπλασματική και μεμβρανική για την πρωτεΐνη bax και κυτταροπλασματική για το baxmRNA. Τα βλαστικά κέντρα έδειξαν α) πολυάριθμα κύτταρα που εξέφρασαν την πρωτεΐνη bax (εικόνα 21Β) και β) υψηλή ενεργό παραγωγή bax (πολυάριθμα baxmRNA(+) κύτταρα). Στους ασθενείς με μυασθένεια και θύμωμα τόσο η πρωτεΐνη του bax όσο και το baxmRNA ανιχνεύθηκαν κυρίως στα επιθηλιακά κύτταρα και λιγότερο συχνά στα θυμοκύτταρα. Στους περιβάλλοντες τα θυμώματα μη νεοπλασματικούς θυμικούς ιστούς, η κατανομή της πρωτεΐνης και του mRNA του bax ήταν παρόμοια με αυτή στους υπερπλαστικούς και ατροφικούς θύμους. Οι τρεις περιπτώσεις καρκινώματος έδειξαν πολυάριθμα κύτταρα θετικά για την πρωτεΐνη του bax (εικόνα 21Γ) αλλά και το baxmRNA (εικόνα 21Δ). Και πάλι στους περιβάλλοντες τα θυμώματα μη νεοπλασματικούς θυμικούς ιστούς, η κατανομή της πρωτεΐνης και του mRNA του bax ήταν παρόμοια με αυτή στους υπερπλαστικούς και ατροφικούς θύμους. Τα αποτελέσματα αυτά για την έκφραση του baxmRNA σε συνδυασμό με αυτά για την έκφραση του bcl-2mRNA, πιστοποιούν ότι το bcl-2 ή/και το bax παράγονται ενεργά στα θυμοκύτταρα ή τα επιθηλιακά κύτταρα του θύμου, αλλά έχουν διαφορετικό τόπο παραγωγής. Η έκφραση του bax ήταν υψηλότερη στις περιπτώσεις των καρκινωμάτων σε σύγκριση με τα θυμώματα και τις περιπτώσεις υπερπλασίας του θύμου ($p<0.001$). Η έκφραση του bax ήταν υψηλότερη στους ασθενείς με μυασθένεια σε σύγκριση με τους μάρτυρες ($p<0.001$). Επιπροσθέτως υπήρχε τάση για υψηλότερη έκφραση του bax προς τα βαρύτερα στάδια της νόσου ($p<0.001$) (πίνακας 10). Δεν κατεγράφη καμία συσχέτιση μεταξύ έκφραση του bax και του μεγέθους και βάρους του θύμου.

Πίνακας 9: Έκφραση της πρωτεΐνης και του mRNA του bcl-2 σε σχέση με τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά του θύμου κατά τη θυμεκτομή και το στάδιο της νόσου

Ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά	# περ	Bcl-2 πρωτεΐνη (M±SD)		Bcl-2 mRNA (M±SD)	
Ιστοπαθολογία θύμου		Μυελός*	Φλοιός§	Μυελός^{+}	Φλοιός¶
Υπερπλασία +Ατροφία	34	66.2±2.8^{a,b}	5.2±1.6^{g}	67.4±3.2^{a,b}	2.9±1.3^{g}
Θύμωμα (τύπου Β1/Β2)	9	63.4±3.2^{c,d}	4.5±1.6^{h}	62.5±2.1^{c,d}	5.4±2.7^{g,f}
ΥΔΚ (θύμωμα τύπου Β3)	3	44.2±5.2^{a,c,e}	3.7±1.3^{g}	47.8±2.4^{a,c,e}	2.5±0.8
Μάρτυρες	5	30.2±1.3^{b,d,e}	2.2±0.8^{g,h}	34.2±1.4^{b,d,e}	1.2±0.2^{f}
Στάδιο (Osserman)		Μυελός**	Φλοιός$^{¥}$	Μυελός$^{\pm}$	Φλοιός$^{\$}$
I	5	62.1±3.4^{a,b,f}	5.5±1.9^{a}	61.7±3.4^{a,b,c}	5.3±1.8^{a,f}
IIA	21	55.8±3.1^{c,d,f}	4.7±2.1	55.8±2.2^{a,d,e}	4.4±1.2^{g,j}
IIB	17	43.2±4.7^{a,c,e}	3.1±1.6	43.7±3.8^{b,d,j}	2.5±1.1^{f,g}
III	3	29.1±1.5^{b,d,e}	1.8±0.5^{a}	31.2±1.3^{c,e,j}	1.2±0.3^{a,j}
Σύνολο	46				

ΥΔΚ: υψηλής διαφοροποίησης καρκίνωμα

*,$^{+}$: Οι διαφορές είναι σημαντικές στο επίπεδο $p<0.001$ στις τιμές με τα γράμματα a,b,c,d,e

§: Οι διαφορές είναι σημαντικές στο επίπεδο $p<0.05$ στις τιμές με τα γράμματα g, h

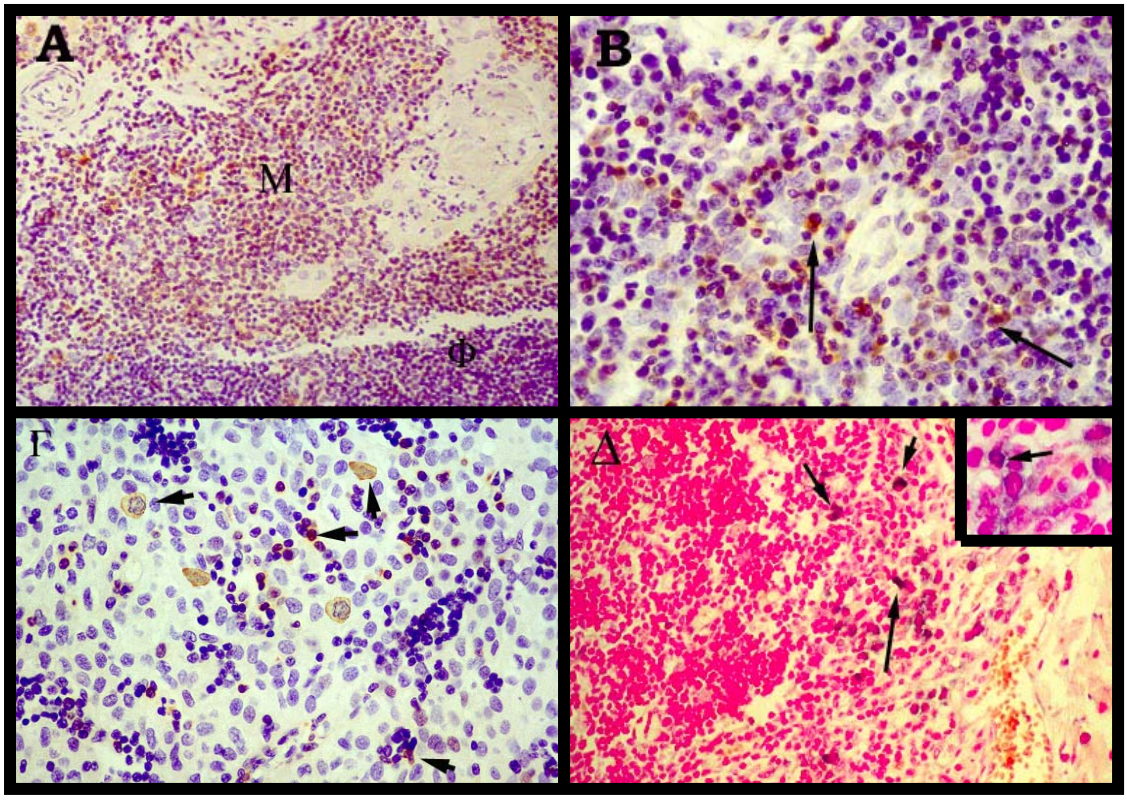
¶: Οι διαφορές είναι σημαντικές στο επίπεδο $p<0.01$ στις τιμές με τα γράμματα f και $p<0.05$ στο g

**: Οι διαφορές είναι σημαντικές στο επίπεδο $p<0.001$ στις τιμές με τα γράμματα a,b,c,d,e και $p<0.01$ στο f

$^{¥}$: Οι διαφορές είναι σημαντικές στο επίπεδο $p<0.001$ στις τιμές με το γράμμα a

$^{\pm}$: Οι διαφορές είναι σημαντικές στο επίπεδο $p<0.001$ στις τιμές με τα γράμματα a,b,c,d,e,i

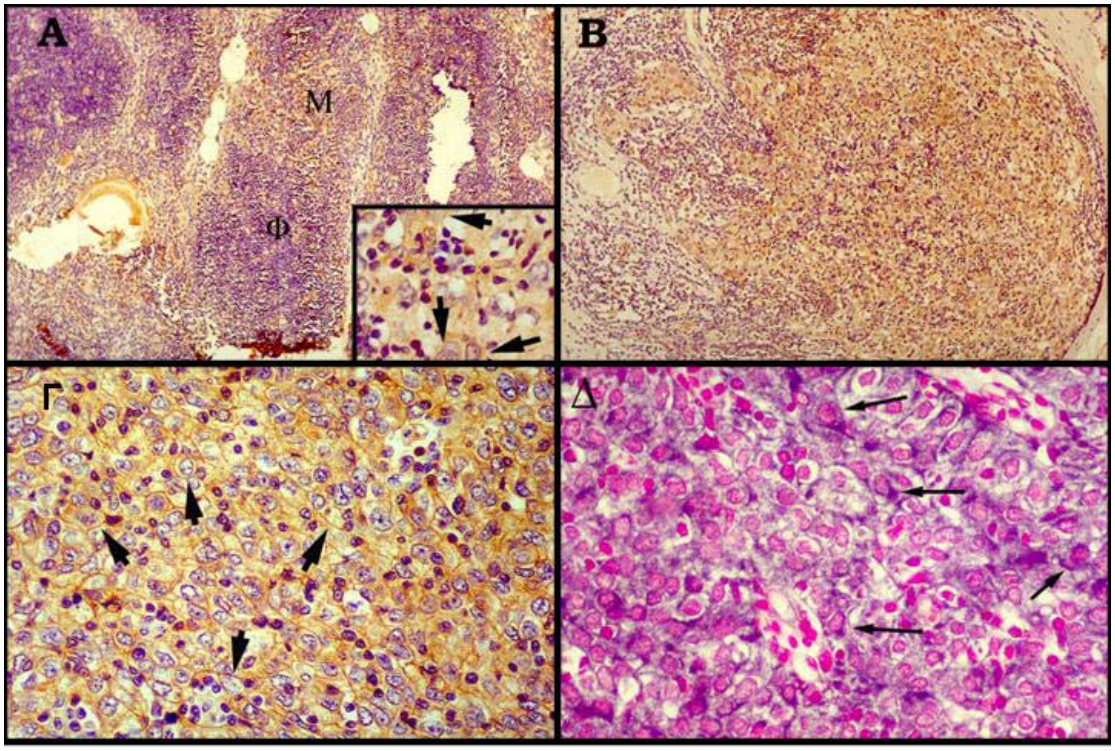
$^{\$}$: Οι διαφορές είναι σημαντικές στο επίπεδο $p<0.001$ στις τιμές με το γράμμα a, στο επίπεδο $p<0.01$ στα f, j και $p<0.05$ στο g



<u>Εικόνα 20</u>: ***Α.*** Έκφραση του bcl-2 σε φυσιολογικό θύμο. Υπάρχει υψηλότερη έκφραση στο μυελό. Μ: μυελός, Φ: φλοιός (Στρεπταβιδίνη-βιοτίνη περοξειδάση x40). ***Β.*** Πολυάριθμα bcl-2 θετικά κύτταρα σε έναν υπερπλαστικό θύμο (βέλη-Στρεπταβιδίνη-βιοτίνη περοξειδάση x250). ***Γ.*** Λίγα bcl-2 θετικά κύτταρα σε καρκίνωμα (βέλη-Στρεπταβιδίνη-βιοτίνη περοξειδάση x400). ***Δ.*** Έκφραση του bcl-2mRNA σε υπερπλαστικό θύμο (βέλη-in-situ hybridization x 400).

<u>Αναλογία bax/bcl-2</u>

Όλα τα αποτελέσματα σχετικά με την αναλογία bax/bcl-2 στο επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης φαίνονται στον πίνακα 11 και στις εικόνες 22 και 23. Οι αναλογίες παρουσίασαν αύξηση στα βαρύτερα στάδια της νόσου, ενώ ήταν υψηλότερες στις περιπτώσεις καρκινωμάτων, σε σύγκριση με τις περιπτώσεις θυμωμάτων/ υπερπλασίας θύμου. Όπως δείχνει η εικόνα 24 υπήρξε μία τάση για αύξηση της αναλογίας από το στάδιο I προς το στάδιο III κατά Osserman (370 φορές για το mRNA και 391 φορές για την πρωτεΐνη). Ειδικότερα η αναστροφή του λόγου κατεγράφη στο στάδιο IIB.



Εικόνα 21: ***Α.*** Έκφραση της πρωτεΐνης bax σε φυσιολογικό θύμο. Υπάρχει υψηλότερη έκφραση του bax στα επιθηλιακά κύτταρα του μυελού (βέλη) Μ: μυελός, Φ: φλοιός (Στρεπταβιδίνη-βιοτίνη περοξειδάση x40). ***Β.*** Βλαστικό κέντρο με πολυάριθμα bax (+) κύτταρα (Στρεπταβιδίνη-βιοτίνη περοξειδάση x250). ***Γ.*** Πολυάριθμα bax (+) επιθηλιακά κύτταρα σε καρκίνωμα (βέλη-Στρεπταβιδίνη-βιοτίνη περοξειδάση x400). ***Δ.*** Έκφραση του baxmRNA σε καρκίνωμα (βέλη-in-situ hybridization x 400).

Συσχετίσεις μεταξύ της αναλογίας bax/bcl-2 με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους και την κλινική κατάσταση των ασθενών με μυασθένεια

Η αναλογία bax/bcl-2 (στα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης) σχετίσθηκε ευθέως με το βαθμό απόπτωσης ($r=0.591$ και 0.358 $p<0.01$ και $p<0.05$). Επιπλέον όλες οι περιπτώσεις ασθενών με μυασθένεια που χαρακτηρίσθηκαν από πλήρη σταθερή ύφεση (ομάδα Α) είχαν αναλογία bax/bcl-2 μικρότερη του 1 (είτε στο επίπεδο πρωτεΐνης ή στο επίπεδο mRNA). Οι υπόλοιποι ασθενείς (ύφεση με φάρμακα, ελάχιστες εκδηλώσεις, βελτίωση, επιδείνωση-ομάδα Β) είχαν αναλογία bax/bcl-2 μεγαλύτερη του 1 (είτε στο επίπεδο πρωτεΐνης ή στο επίπεδο mRNA). Η εικόνα 25

Πίνακας 10: Έκφραση της πρωτεΐνης και του mRNA του bax σε σχέση με τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά του θύμου κατά τη θυμεκτομή και το στάδιο της νόσου

Ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά	# περ	Bax πρωτεΐνη (M±SD)		Bax mRNA (M±SD)	
Ιστοπαθολογία θύμου		Μυελός*	Φλοιός[§]	Μυελός[+]	Φλοιός[¶]
Υπερπλασία+Ατροφία	34	$41.9\pm4.5^{a,b}$	4.3 ± 1.4	$43.9\pm2.8^{a,g}$	4.1 ± 1.2^{g}
Θύμωμα (τύπου Β1/Β2)	9	$42.1\pm2.2^{c,d}$	4.4 ± 0.9^{g}	$42.6\pm2.1^{b,c}$	$4.1\pm1.1^{h,k}$
ΥΔΚ (θύμωμα τύπου Β3)	3	$69.7\pm3.2^{a,c,e}$	$6.1\pm0.8^{a,g}$	$71.3\pm4.2^{b,d,g}$	$7.3\pm2.1^{f,h}$
Μάρτυρες	5	$28.2\pm1.3^{b,d,e}$	2.4 ± 1.2^{a}	$30.2\pm1.1^{a,c,d}$	$2.3\pm0.8^{f,g,k}$
Στάδιο κατά Osserman		Μυελός**	Φλοιός[¥]	Μυελός[±]	Φλοιός[$]
I	5	$36.3\pm3.7^{a,b,c}$	2.3 ± 1.2^{f}	$36.5\pm4.3^{a,b,f}$	$2.2\pm1.1^{a,f,g}$
IIA	21	$43.6\pm1.8^{a,d,e}$	$3.5\pm1.3^{a,g}$	$45.1\pm1.8^{c,f,j}$	$3.3\pm0.6^{b,g,j}$
IIB	17	$55.5\pm2.3^{b,d,i}$	5.4 ± 0.9^{g}	$56.5\pm3.4^{a,c,d}$	$5.1\pm1.4^{b,f,l}$
III	3	$65.1\pm1.6^{c,e,i}$	$7.2\pm1.3^{a,f}$	$67.3\pm2.4^{b,d,j}$	$7.3\pm1.4^{a,j,l}$
Σύνολο	46				

ΥΔΚ: Υψηλής διαφοροποίησης καρκίνωμα

*,**: Οι διαφορές είναι σημαντικές στο επίπεδο $p<0.001$ στις τιμές με τα γράμματα a,b,c,d,e και a,b,c,d,e,I αντιστοίχως

[§]: Οι διαφορές είναι σημαντικές στο επίπεδο $p<0.01$ στις τιμές με το γράμμα a και $p<0.05$ στο g

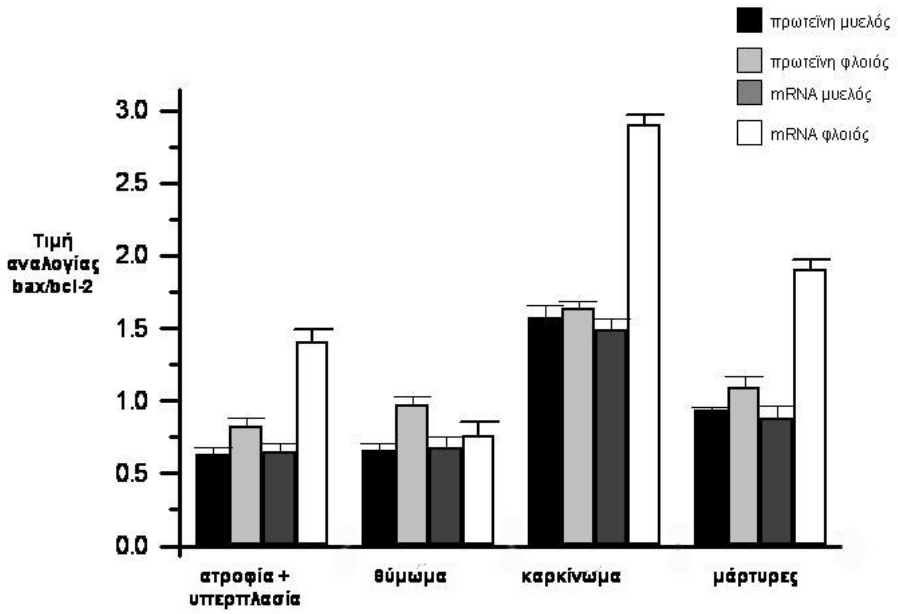
[+]: Οι διαφορές είναι σημαντικές στο επίπεδο $p<0.001$ στις τιμές με τα γράμματα b,g,d και $p<0.05$ στο a,c

[¶]: Οι διαφορές είναι σημαντικές στο επίπεδο $p<0.01$ στις τιμές με τα γράμματα f και $p<0.05$ στο g,h,k

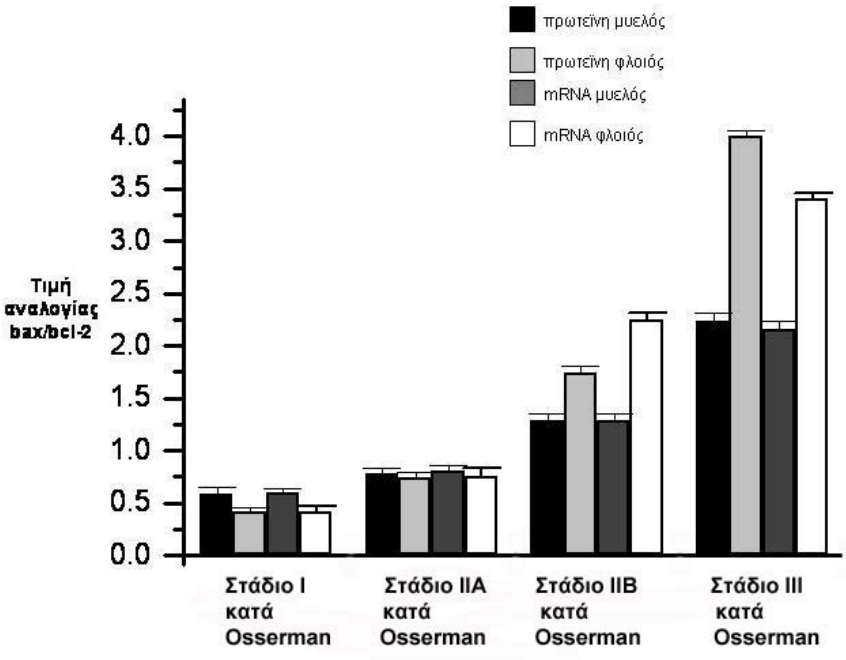
[¥]: Οι διαφορές είναι σημαντικές στο επίπεδο $p<0.001$ στις τιμές με το γράμμα a, $p<0.01$ στο f και $p<0.05$ στο g

[±]: Οι διαφορές είναι σημαντικές στο επίπεδο $p<0.001$ στις τιμές με τα γράμματα a,b,c,d και $p<0.01$ στο f,j

[$]: Οι διαφορές είναι σημαντικές στο επίπεδο $p<0.001$ στις τιμές με το γράμμα a,b στο επίπεδο $p<0.01$ στα f, j,l και $p<0.05$ στο g.



Εικόνα 22: Έκφραση της αναλογίας bax/bcl-2 σε σχέση με την ιστολογία του θύμου



Εικόνα 23: Έκφραση της αναλογίας bax/bcl-2 σε σχέση με το στάδιο κατά Osserman

Πίνακας 11: Αναλογία bax/bcl-2 για τα επίπεδα πρωτεΐνης και mRNA σε σχέση με την ιστοπαθολογία του θύμους και τα στάδια της νόσου (κατά Osserman)

Ιστολογικοί Παράγοντες	# περ.	Αναλογία Bax/Bcl-2 πρωτεΐνη (M±SD)		Αναλογία Bax/Bcl-2 mRNA (M±SD)	
Ιστοπαθολογία θύμου		Μυελός*	Φλοιός$^{\&}$	Μυελός^{+}	Φλοιός¶
Υπερπλασία+Ατροφία	34	$0.63\pm0.01^{a,b}$	0.82 ± 0.02	$0.65\pm0.06^{a,g}$	1.41 ± 0.01^{g}
Θύμωμα (τύπου Β1/Β2)	9	$0.66\pm0.04^{c,d}$	0.97 ± 0.03^{g}	$0.68\pm0.02^{b,c}$	$0.76\pm0.03^{h,k}$
ΥΔΚ (θύμωμα τύπου Β3)	3	$1.57\pm0.02^{a,c,e}$	$1.64\pm0.05^{a,g}$	$1.49\pm0.07^{b,d,g}$	$2.9\pm0.02^{f,h}$
Μάρτυρες	5	$0.93\pm0.03^{b,d,e}$	1.09 ± 0.03^{a}	$0.88\pm0.03^{a,c,d}$	$1.90\pm0.04^{f,g,k}$
Στάδιο κατά Osserman		Μυελός **	Φλοιός$^{¥}$	Μυελός$^{\$}$	Φλοιός$^{£}$
Στάδιο I	5	$0.58\pm0.04^{a,b,c}$	0.41 ± 0.01^{f}	$0.59\pm0.03^{a,b,f}$	$0.41\pm0.01^{a,f,g}$
Στάδιο IIA	21	$0.78\pm0.03^{a,d,e}$	$0.74\pm0.01^{a,g}$	$0.80\pm0.07^{c,f,j}$	$0.75\pm0.07^{b,g,j}$
Στάδιο IIB	17	$1.28\pm0.06^{b,d,i}$	1.74 ± 0.01^{g}	$1.29\pm0.01^{a,c,d}$	$2.24\pm0.03^{b,f,l}$
Στάδιο III	3	$2.23\pm0.07^{c,e,i}$	$4.00\pm0.01^{a,f}$	$2.15\pm0.06^{b,d,j}$	$3.40\pm0.05^{a,j,l}$
Σύνολο	46				

ΥΔΚ: Υψηλής διαφοροποίησης καρκίνωμα

*,**: Οι διαφορές είναι σημαντικές στο επίπεδο $p<0.001$ στις τιμές με τα γράμματα a,b,c,d,e και τα γράμματα a,b,c,d,e,I, αντίστοιχα

$^{\&}$: Οι διαφορές είναι σημαντικές στο επίπεδο $p<0.01$ στις τιμές με το γράμμα a και $p<0.05$ στο g

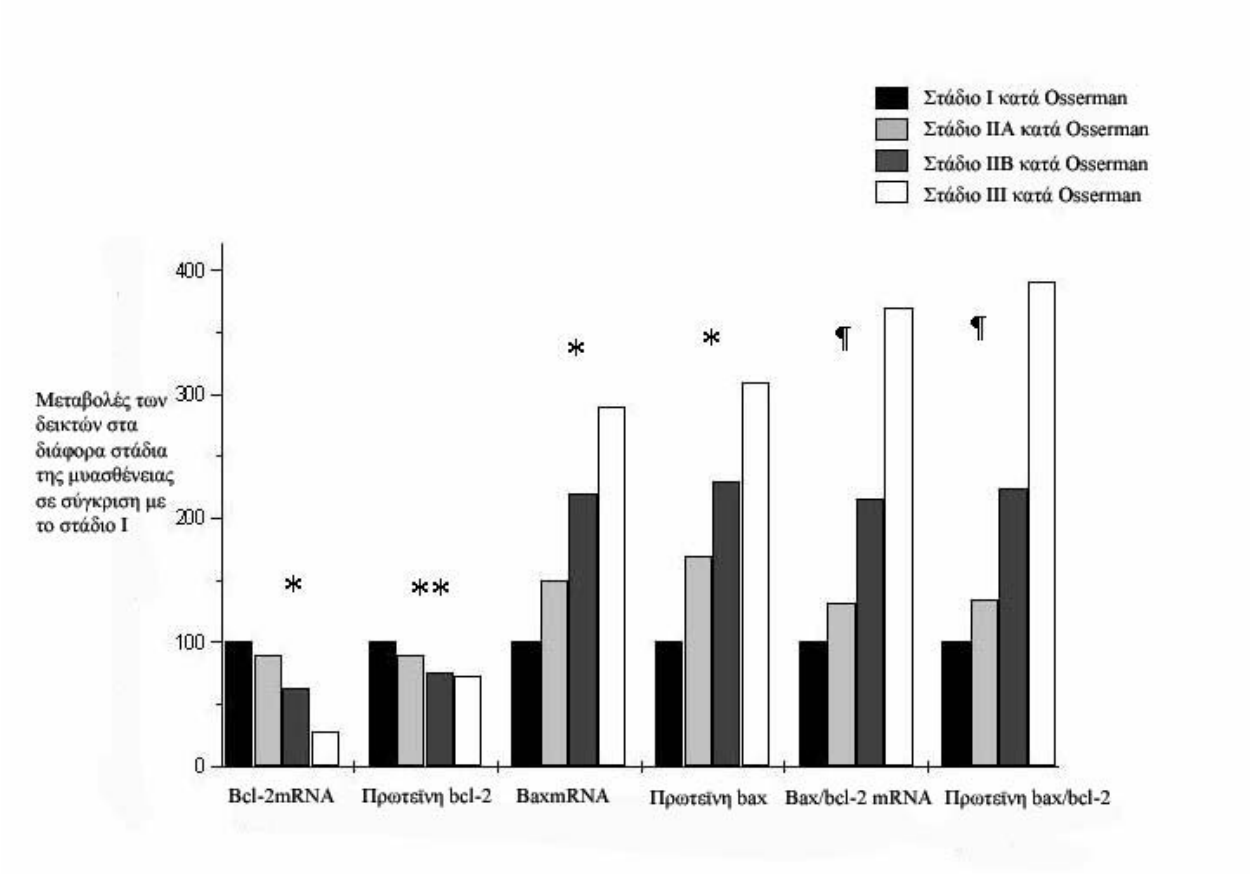
$^{+}$: Οι διαφορές είναι σημαντικές στο επίπεδο $p<0.001$ στις τιμές με τα γράμματα b,g,d και $p<0.05$ στο g

¶: Οι διαφορές είναι σημαντικές στο επίπεδο $p<0.01$ στις τιμές με το γράμμα f και $p<0.05$ στο g,h,k

$^{¥}$: Οι διαφορές είναι σημαντικές στο επίπεδο $p<0.001$ στις τιμές με το γράμμα a, $p<0.01$ στο f και $p<0.05$ στο g

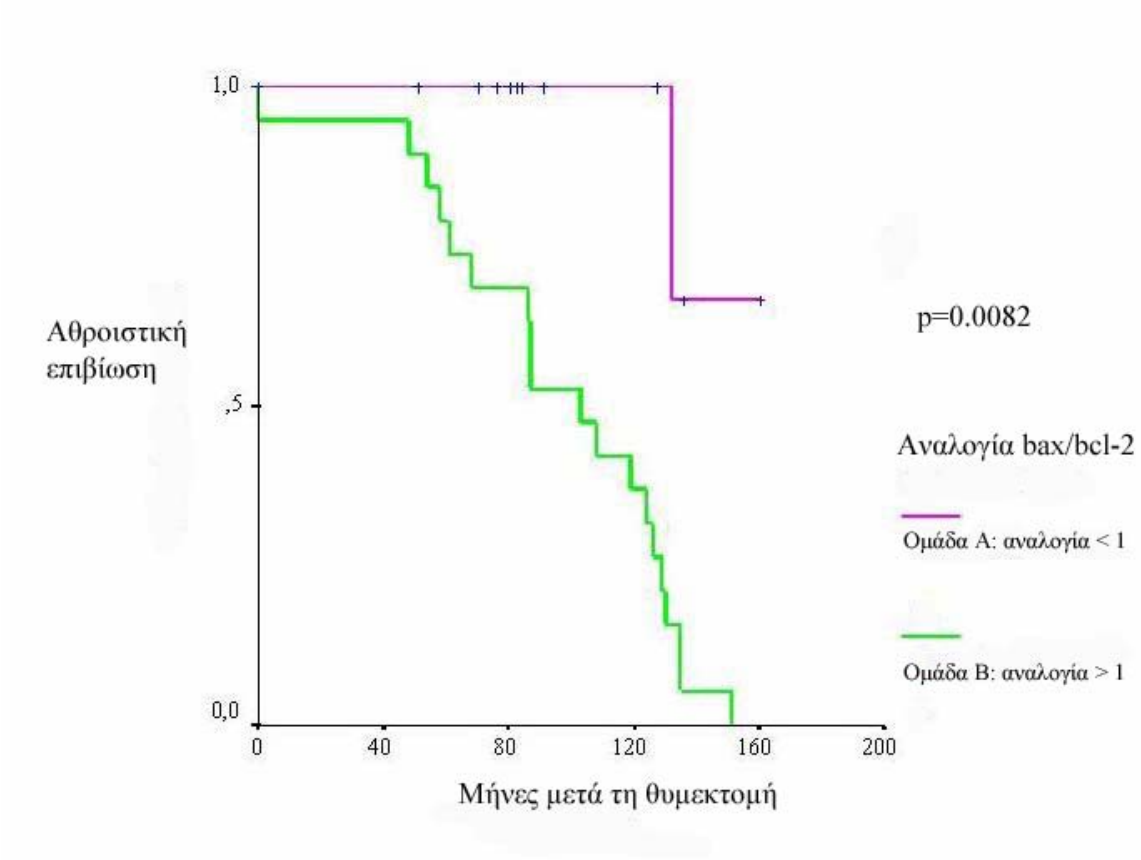
$^{\$}$: Οι διαφορές είναι σημαντικές στο επίπεδο $p<0.001$ στις τιμές με τα γράμματα a,b,c,d και $p<0.01$ στο f,j

$^{£}$: Οι διαφορές είναι σημαντικές στο επίπεδο $p<0.001$ στις τιμές με το γράμμα a,b στο επίπεδο $p<0.01$ στα f, j,l και $p<0.05$ στο g.



Εικόνα 24: Μεταβολές στα επίπεδα bcl-2, bax και αναλογίας bax/bcl-2 ratio (στα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης) στις 46 περιπτώσεις, από το στάδιο I προς το στάδιο III (κατά Osserman) **: $p<0.05$, *:$p<0.01$, ¶:$p<0.001$.

απεικονίζει τη διαφορά στις καμπύλες επιβίωσης (Kaplan Meier) ανάμεσα στις δύο ομάδες (ομάδα A vs. ομάδας B-$p<0.01$). Και στις δύο ομάδες οι τιμές των χρόνων στους οποίους υπήρξε επικοινωνία με τους ασθενείς προκειμένου να αξιολογηθεί και να καταγραφεί η κατάστασή τους ήταν συγκρίσιμοι και δεν υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά: ομάδα A: 45-160 (μέση τιμή±SD 85.46±35.25, διάμεσος τιμή 80) μήνες μετά τη θυμεκτομή, ομάδα B: 39-166 (μέση τιμή±SD 92.84±39.4, διάμεσος τιμή 87) ($p=0.572$).



Εικόνα 25: Kaplan Meier καμπύλες επιβίωσης οι οποίες απεικονίζουν τη σχέση μεταξύ της αναλογίας bax/bcl-2 και της αθροιστικής – ελεύθερης ή μη συμπτωμάτων – επιβίωσης μετά από τη θυμεκτομή στους 46 ασθενείς. Ομάδα Α και Β: βλέπε κείμενο για λεπτομέρειες.

Bcl-x

Ο πίνακας 12 δείχνει τα αποτελέσματα για την έκφραση του bcl-x τόσο στις περιπτώσεις των 46 ασθενών με μυασθένεια όσο και τους μάρτυρες. Όπως παρατηρεί κανείς δεν υπάρχει καμία αξιολογήσιμη διαφορά στην έκφραση του γονιδίου τόσο ανάμεσα στους ασθενείς με μυασθένεια και τους μάρτυρες αλλά και μεταξύ των ασθενών με μυασθένεια όσον αφορά τις διάφορες παραμέτρους της νόσου. Πιθανότατα τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι το bcl-x δεν φαίνεται να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην εμφάνιση και εξέλιξη της μυασθένειας (Nagata T, et al, 2001).

Fas, Fasl

Οι πίνακες 13 και 14 δείχνουν τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημείας και in-situ υβριδισμού για την πρωτεΐνη και το mRNA των Fas και Fasl αντιστοίχως. Στο θύμο (εικόνα 26Α) η πρωτεΐνη και το mRNA των Fas και Fasl ανιχνεύθηκαν κυρίως στον μυελό και λιγότερο συχνά στο φλοιό. Στις περιπτώσεις με μυασθένεια οι οποίες σχετίζονταν με υπερπλασία και ατροφία, τόσο η πρωτεΐνη Fas όσο και το Fas mRNA ανιχνεύθηκαν κυρίως στα κύτταρα του μυελού και λιγότερο συχνά στον φλοιό. Η χρώση ήταν κυτταροπλασματική τόσο για την πρωτεΐνη όσο και για το mRNA των Fas/Fasl. Τα βλαστικά κέντρα έδειξαν α) πολυάριθμα κύτταρα που εξέφρασαν τις πρωτεΐνες Fas/Fasl (εικόνα 26Β) και β) υψηλή ενεργό παραγωγή Fas/Fasl (πολυάριθμα mRNA(+) κύτταρα). Στους ασθενείς με μυασθένεια και θύμωμα η πρωτεΐνη και το mRNA των Fas/ Fasl ανιχνεύθηκαν κυρίως στα επιθηλιακά κύτταρα και λιγότερο συχνά στα θυμοκύτταρα. Οι τρεις περιπτώσεις καρκινώματος έδειξαν πολυάριθμα κύτταρα θετικά για την πρωτεΐνη των Fas/Fasl (εικόνα 26Γ) αλλά και το Fas/Fasl mRNA (εικόνα 26Δ). Στους περιβάλλοντες τα θυμώματα και καρκινώματα μη νεοπλασματικούς θυμικούς ιστούς, η κατανομή της πρωτεΐνης και του mRNA των Fas/Fasl ήταν παρόμοια με αυτή στους υπερπλαστικούς και ατροφικούς θύμους. Η έκφραση των Fas/Fasl ήταν υψηλότερη στις περιπτώσεις των καρκινωμάτων, σε σύγκριση με τα θυμώματα τύπου Β1/Β2 και τις περιπτώσεις υπερπλασίας του θύμου ($p<0.001$). Η έκφραση των Fas/Fasl ήταν υψηλότερη στους ασθενείς με μυασθένεια σε σύγκριση με τους μάρτυρες ($p<0.001$). Επιπροσθέτως υπήρχε τάση για υψηλότερη έκφραση των Fas/Fasl προς τα βαρύτερα στάδια της νόσου ($p<0.001$) (πίνακες 13 και 14). Δεν κατεγράφη καμία συσχέτιση μεταξύ έκφρασης των Fas/Fasl και του μεγέθους και βάρους του θύμου.

Πίνακας 12: Έκφραση της πρωτεΐνης και του mRNA του bcl-x σε σχέση με τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά του θύμου κατά τη θυμεκτομή και το στάδιο της νόσου

Ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά	# περ	Bcl-x πρωτεΐνη (M±SD)		Bcl-x mRNA (M±SD)	
Ιστοπαθολογία θύμου		Μυελός	Φλοιός	Μυελός	Φλοιός
Υπερπλασία+Ατροφία	34	31.5±2.1	3.2±0.8	35.6±3.2	4.2±0.8
Θύμωμα (τύπου Β1/Β2)	9	38.2±3.2	2.8±0.8	28.3±2.8	3.7±0.6
ΥΔΚ (θύμωμα τύπου Β3)	3	29.4±2.8	4.1±0.8	31.7±2.7	2.9±0.4
Μάρτυρες	5	30.5±1.7	2.7±0.9	36.8±1.64	1.8±0.5
Στάδιο (Osserman)		Μυελός	Φλοιός	Μυελός	Φλοιός
I	5	35.1±2.5	4.2±0.7	33.7±1.4	3.6±0.5
IIA	21	28.7±4.1	3.1±0.6	30.7±1.4	2.9±0.3
IIB	17	34.6±3.6	2.8±0.9	28.8±1.4	2.1±0.4
III	3	31.8±2.8	3.3±0.5	29.5±1.4	1.8±0.8
Σύνολο	46				

ΥΔΚ: Υψηλής διαφοροποίησης καρκίνωμα

PCNA και Ki67

Ο πίνακας 15 δείχνει τα αποτελέσματα της έκφρασης των δεικτών κυτταρικού πολλαπλασιασμού PCNA και Ki67 σε σχέση με τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά του θύμου κατά τη στιγμή της θυμεκτομής αλλά και το στάδιο των ασθενών με μυασθένεια. Και οι δύο δείκτες παρουσίασαν παρόμοια κατανομή. Τα δύο αντιγόνα ανιχνεύθηκαν και στις 46 περιπτώσεις με μυασθένεια και στις 5 περιπτώσεις των μαρτύρων. Στις τομές από τους μάρτυρες, τα PCNA και Ki67 εκφράσθηκαν κυρίως στον φλοιό και λιγότερο συχνά στον μυελό (εικόνα 27Α). Σε ασθενείς με μυασθένεια η οποία συνοδευόταν από υπερπλασία ή ατροφία του θύμου τα PCNA και Ki67 ανιχνεύθηκαν κυρίως στον φλοιό και λιγότερο συχνά στον μυελό (εικόνα 27Β). Σε όλες τις περιπτώσεις [μάρτυρας-υπερπλασία-θύμωμα-καρκίνωμα (εικόνα 27Γ)] η χρώση ήταν πυρηνική. Η παρουσία των PCNA και Ki67 ήταν υψηλότερη στις τρεις περιπτώσεις καρκινωμάτων σε σύγκριση με τις περιπτώσεις θυμωμάτων και υπερπλασίας/ατροφίας τόσο στο μυελό όσο και στον φλοιό ($p<0.001$ αντιστοίχως). Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες (Tomita M et al, 2002, Comin CE, et al, 2004). Επιπροσθέτως η έκφραση και των δύο αντιγόνων ήταν υψηλότερη στους ασθενείς με μυασθένεια σε σύγκριση με τους μάρτυρες ($p<0.001$). Κατεγράφη επίσης η τάση για αυξημένη έκφραση και των δύο αντιγόνων τόσο στο φλοιό όσο και το μυελό στα βαρύτερα στάδια της νόσου ($p<0.001$ για το μυελό ή το φλοιό). Στην παρούσα μελέτη επιπλέον, και για τα δύο αντιγόνα παρατηρήθηκαν θετικές συσχετίσεις των $\%PCNA^+$ και $\%Ki67^+$ κυττάρων με το βάρος και το μέγεθος του θύμου (PCNA: $r=0.62$, $p<0.01$, και $r=0.66$, $p<0.01$, Ki67: $r=0.56$, $p<0.01$ και $r=0.61$, $p<0.01$). Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με προηγούμενη

Πίνακας 13: Έκφραση της πρωτεΐνης και του mRNA του Fas σε σχέση με τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά του θύμου κατά τη θυμεκτομή και το στάδιο της νόσου

Ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά	# περ	Fas πρωτεΐνη (M±SD)		Fas mRNA (M±SD)	
Ιστοπαθολογία θύμου		Μυελός*	Φλοιός[§]	Μυελός[+]	Φλοιός[¶]
Υπερπλασία+Ατροφία	34	$41.2\pm3.2^{a,b}$	3.2 ± 1.2	$43.7\pm3.0^{a,g}$	4.4 ± 1.8^{g}
Θύμωμα (τύπου Β1/Β2)	9	$43.3\pm1.8^{c,d}$	5.1 ± 1.6^{g}	$44.0\pm2.8^{b,c}$	$5.2\pm1.12^{h,k}$
ΥΔΚ (θύμωμα τύπου Β3)	3	$66.2\pm2.1^{a,c,e}$	$6.6\pm0.8^{a,g}$	$71.3\pm1.1^{b,d,g}$	$7.2\pm1.3^{f,h}$
Μάρτυρες	5	$25.3\pm1.2^{b,d,e}$	3.5 ± 0.6^{a}	$29.1\pm1.1^{a,c,d}$	$3.6\pm0.9^{f,g,k}$
Στάδιο κατά Osserman		Μυελός**	Φλοιός[¥]	Μυελός[±]	Φλοιός[$]
I	5	$37.2\pm4.2^{a,b,c}$	2.4 ± 1.1^{f}	$34.7\pm4.2^{a,b,f}$	$2.3\pm1.2^{a,f,g}$
IIA	21	$42.5\pm1.9^{a,d,e}$	$4.5\pm1.6^{a,g}$	$46.2\pm1.9^{c,f,j}$	$4.1\pm0.8^{b,g,j}$
IIB	17	$56.2\pm3.5^{b,d,i}$	5.7 ± 1.2^{g}	$57.6\pm3.5^{a,c,d}$	$5.6\pm1.2^{b,f,l}$
III	3	$66.1\pm1.8^{c,e,i}$	$7.3\pm1.6^{a,f}$	$68.1\pm2.4^{b,d,j}$	$7.2\pm1.3^{a,j,l}$
Σύνολο	46				

ΥΔΚ: υψηλής διαφοροποίησης καρκίνωμα

*: Οι διαφορές είναι σημαντικές στο επίπεδο $p<0.001$ στις τιμές με τα γράμματα a,b,c,d,e

[§]: Οι διαφορές είναι σημαντικές στο επίπεδο $p<0.01$ στις τιμές με το γράμμα a και $p<0.05$ στο g

[+]: Οι διαφορές είναι σημαντικές στο επίπεδο $p<0.001$ στις τιμές με τα γράμματα b,g,d και $p<0.05$ στο a,c

[¶]: Οι διαφορές είναι σημαντικές στο επίπεδο $p<0.01$ στις τιμές με τα γράμματα f και $p<0.05$ στο g,h,k

**: Οι διαφορές είναι σημαντικές στο επίπεδο $p<0.001$ στις τιμές με τα γράμματα a,b,c,d,e,i

[¥]: Οι διαφορές είναι σημαντικές στο επίπεδο $p<0.001$ στις τιμές με το γράμμα a, $p<0.01$ στο f και $p<0.05$ στο g

[±]: Οι διαφορές είναι σημαντικές στο επίπεδο $p<0.001$ στις τιμές με τα γράμματα a,b,c,d και $p<0.01$ στο f,j

[$]: Οι διαφορές είναι σημαντικές στο επίπεδο $p<0.001$ στις τιμές με το γράμμα a,b στο επίπεδο $p<0.01$ στα f, j,l και $p<0.05$ στο g.

Πίνακας 14: Έκφραση της πρωτεΐνης και του mRNA του Fasl σε σχέση με τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά του θύμου κατά τη θυμεκτομή και το στάδιο της νόσου

Ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά	# περ	Fasl πρωτεΐνη (M±SD)		Fasl mRNA (M±SD)	
Ιστοπαθολογία θύμου		Μυελός*	Φλοιός§	Μυελός^{+}	Φλοιός¶
Υπερπλασία+Ατροφία	34	40.5±2.8^{a,b}	2.8±0.5	41.6±2.6^{a,g}	4.1±1.1^{g}
Θύμωμα (τύπου Β1/Β2)	9	42.4±1.6^{c,d}	5.3±1.1^{g}	43.2±1.8^{b,c}	4.8±1.2^{h,k}
ΥΔΚ (θύμωμα τύπου Β3)	3	65.1±1.7^{a,c,e}	6.1±0.9^{a,}	69.4±1.7^{b,d,g}	7.2±1.3^{f,h}
Μάρτυρες	5	24.2±2.1^{b,d,e}	4.3±0.9^{a}	27.2±2.3^{a,c,d}	2.9±0.6^{f,g,k}
Στάδιο κατά Osserman		Μυελός**	Φλοιός$^{¥}$	Μυελός$^{\pm}$	Φλοιός$^{\$}$
I	5	38.1±4.4^{a,b,c}	2.8±1.3^{f}	33.6±3.8^{a,b,f}	2.1±0.9^{a,f,g}
IIA	21	43.2±1.6^{a,d,e}	4.6±1.4^{a,g}	44.3±1.6^{c,f,j}	3.8±0.58^{b,g,j}
IIB	17	58.3±2.1 ^{b,d,i}	4.9±1.3^{g}	56.5±2.8^{a,cd}	5.1±1.1^{b,f,l}
III	3	67.2±1.9 ^{c,e,i}	6.9±1.4^{a,f}	67.6±2.1^{b,d,j}	6.9±1.1^{a,j,l}
Σύνολο	46				

ΥΔΚ: υψηλής διαφοροποίησης καρκίνωμα

*,**: Οι διαφορές είναι σημαντικές στο επίπεδο $p<0.001$ στις τιμές με τα γράμματα a,b,c,d,e και a,b,c,d,e,I, αντιστοίχως

§: Οι διαφορές είναι σημαντικές στο επίπεδο $p<0.01$ στις τιμές με το γράμμα a και $p<0.05$ στο g

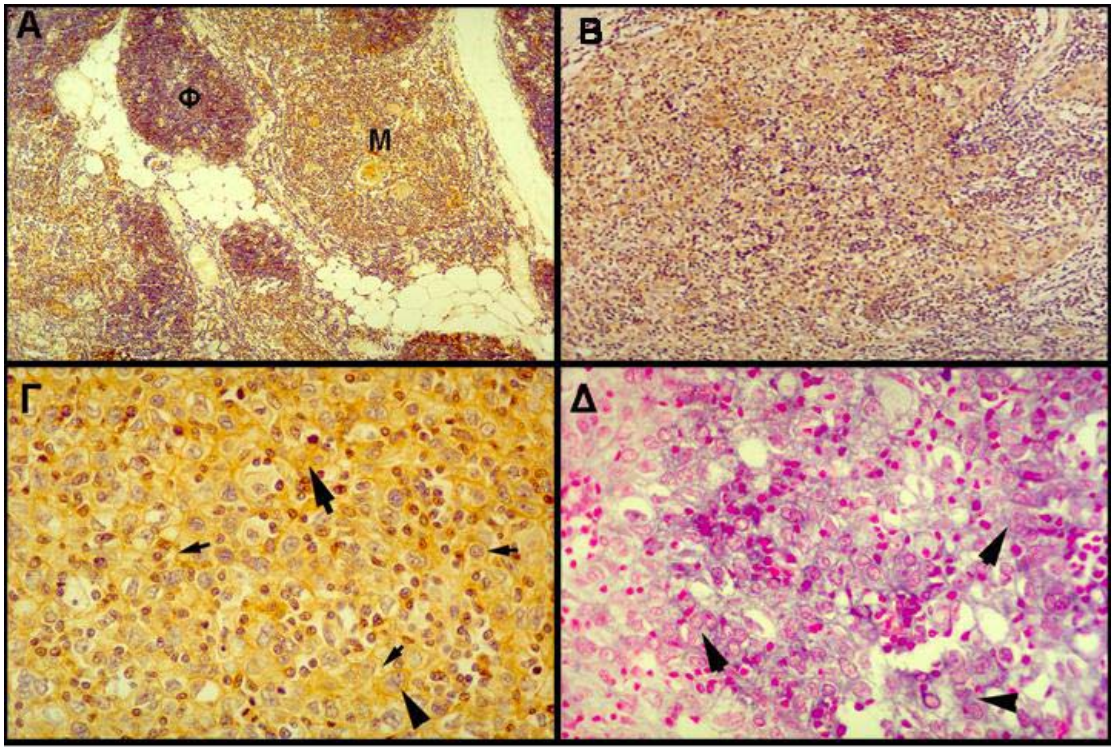
$^{+}$: Οι διαφορές είναι σημαντικές στο επίπεδο $p<0.001$ στις τιμές με τα γράμματα b,g,d και $p<0.05$ στο a,c

¶: Οι διαφορές είναι σημαντικές στο επίπεδο $p<0.01$ στις τιμές με τα γράμματα f και $p<0.05$ στο g,h,k

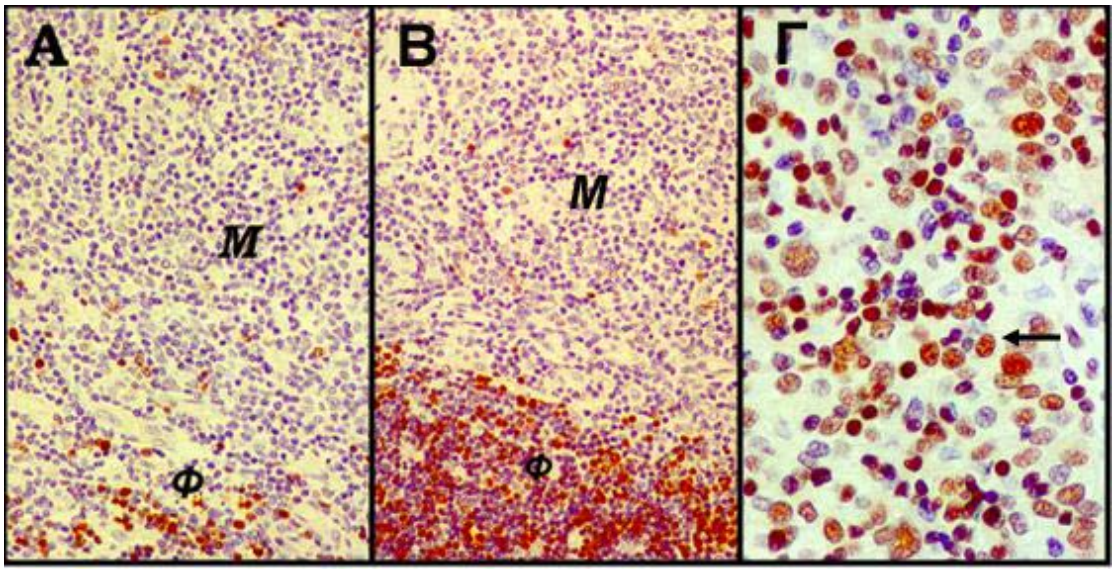
$^{¥}$: Οι διαφορές είναι σημαντικές στο επίπεδο $p<0.001$ στις τιμές με το γράμμα a, $p<0.01$ στο f και $p<0.05$ στο g

$^{\pm}$: Οι διαφορές είναι σημαντικές στο επίπεδο $p<0.001$ στις τιμές με τα γράμματα a,b,c,d και $p<0.01$ στο f,j

$^{\$}$: Οι διαφορές είναι σημαντικές στο επίπεδο $p<0.001$ στις τιμές με το γράμμα a,b στο επίπεδο $p<0.01$ στα f, j,l και $p<0.05$ στο g.



Εικόνα 26: Α. Έκφραση του Fas σε φυσιολογικό θύμο. Μ: μυελός, Φ: φλοιός (Στρεπταβιδίνη-βιοτίνη περοξειδάση x40). ***Β.*** Fas θετικά κύτταρα σε βλαστικό κέντρο (Στρεπταβιδίνη-βιοτίνη περοξειδάση x250). ***Γ.*** Πολυάριθμα Fas επιθηλιακά κύτταρα σε καρκίνωμα. Κυτταροπλασματική (ευρέα βέλη) και μεμβρανική (λεπτά βέλη) χρώση (Στρεπταβιδίνη-βιοτίνη περοξειδάση x400). ***Δ.*** Έκφραση του FAS mRNA σε καρκίνωμα (βέλη-in-situ υβριδισμός x400).



Εικόνα 27: ***Α.*** Έκφραση του αντιγόνου Ki67 στο φυσιολογικό θύμο. Μ: μυελός, Φ: φλοιός, (στρεπταβιδίνη-βιοτίνη περοξειδάση Χ 40). ***Β.*** Έκφραση του αντιγόνου Ki67 σε θύμο με υπερπλασία. Μ: μυελός, Φ: φλοιός (στρεπταβιδίνη-βιοτίνη περοξειδάση Χ 40). ***Γ.*** Έκφραση του αντιγόνου Ki67 σε μία περίπτωση καρκινώματος. Πυρηνική χρώση (βέλος-στρεπταβιδίνη βιοτίνη περοξειδάση Χ400).

μελέτη (Gilhaus NE, et al, 1995). Επίσης δεν κατεγράφη καμία σχέση μεταξύ της έκφρασης των PCNA και Ki67 με την κλινική κατάσταση των ασθενών μετά τη θυμεκτομή όπως αυτή περιγράφηκε νωρίτερα. Προηγούμενη μελέτη σε επιθηλιακούς όγκους του θύμου έχει δείξει ότι η υψηλότερη έκφραση του Ki-67 σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση (Comin CE, et al, 2004, Pitch A, et al, 1996). Στη δική μας μελέτη τέσσερις ασθενείς απεβίωσαν 1.5, 86, 126 και 132 μήνες μετά τη θυμεκτομή και οι υπόλοιποι επέζησαν. Δεν κατεγράφη καμία διαφορά όσον αφορά την έκφραση των δεικτών PCNA και Ki67 στους ασθενείς που απεβίωσαν και σε αυτούς που επέζησαν.

p53

Ο πίνακας 16 δείχνει τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημείας για την πρωτεΐνη p53. Στους μάρτυρες (φυσιολογικός θύμος) η πρωτεΐνη p53 δεν ανιχνεύθηκε ούτε στον μυελό ούτε στον φλοιό. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με προηγούμενη μελέτη (Gilhaus NE, et al, 1995). Στους ασθενείς με μυασθένεια και συνοδό υπερπλασία ή ατροφία του θύμου το p53 ανιχνεύθηκε τόσο στο μυελό όσο και στον φλοιό. Στις περιπτώσεις θυμώματος το p53 ανιχνεύθηκε κατά τον ίδιο τρόπο. Τα θετικά κύτταρα ήταν τόσο λεμφοκύτταρα (θυμοκύτταρα) όσο και επιθηλιακά κύτταρα. Η έκφραση του p53 ήταν υψηλότερη στις τρεις περιπτώσεις καρκινώματος (εικόνα 28) σε σύγκριση με τις περιπτώσεις θυμώματος και υπερπλασίας/ατροφίας ($p<0.001$). Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε μερική συμφωνία με προηγούμενες μελέτες (Comin CE, et al, 2004, Tomita M et al, 2002, Kuo TT, Chan JK l, 1998, Pitch A, et al, 1996).

Πίνακας 15: Έκφραση των δεικτών κυτταρικού πολλαπλασιασμού PCNA και Ki67 σε σχέση με τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά του θύμου κατά τη θυμεκτομή και το στάδιο της νόσου

Ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά	# περ	PCNA (mean±SD) Μυελός*	PCNA (mean±SD) Φλοιός§	Ki67 (mean±SD) Μυελός+	Ki67 (mean±SD) Φλοιός¶
Ιστοπαθολογία θύμου					
Υπερπλασία + Ατροφία	34	35.4±3.6 [a]	37.3±2.6 [a,f]	30.8±4.3[a]	30.3±1.4[a,f]
Θύμωμα (τύπου Β1/Β2)	9	39.7±4.3 [b,g]	40.5±2.7 [b,c]	36.4±3.2[b,g]	35.3±1.7[b,c]
ΥΔΚ (θύμωμα τύπου Β3)	3	79.1±4.2 [a,b,c]	74.8±4.9 [a,b,d]	72.1±2.3[a,b,c]	69.5±1.8[a,b,d]
Μάρτυρες		33.4±2.5 [c,g]	29.4±3.5 [c,d,f]	30.2±1.3[c,g]	25.2±0.8[c,d,f]
Στάδιο κατά Osserman		Μυελός**	Φλοιός¥	Μυελός±	Φλοιός$
I	3	36.3±5.2 [a,b,f]	35.3±2.7 [a,b]	33.4±4.3[a,b,f]	31.2±1.1[a,b]
IIA	19	45.7±2.5 [c,f,g]	41.3±4.2 [c,d]	42.6±2.6[c,f,g]	35.4±3.3[c,d]
IIB	13	60.3±3.7 [a,c,d]	56.4±3.2 [a,c,e]	56.2±3.1[a,c,d]	52.3±1.3[a,c,e]
III	3	72.3±4.3 [b,g,d]	76.5±4.5 [b,d,e]	69.6±3.1[b,g,d]	71.74±1.4[b,d,e]
Σύνολο	46				

ΥΔΚ: υψηλής διαφοροποίησης καρκίνωμα

*,+: Οι διαφορές είναι σημαντικές στο επίπεδο $p<0.001$ στις τιμές με τα γράμματα a,b,c, και $p<0.05$ στο g

§,¶: Οι διαφορές είναι σημαντικές στο επίπεδο $p<0.001$ στις τιμές με το γράμμα d και $p<0.01$ στο a,b,c,f

**,±: Οι διαφορές είναι σημαντικές στο επίπεδο $p<0.001$ στις τιμές με τα γράμματα a,b,c,d, $p<0.01$ στοf και $p<0.05$ στο g

¥,$: Οι διαφορές είναι σημαντικές στο επίπεδο $p<0.001$ στις τιμές με τα γράμματα a,b,c,d,e

Από την άλλη πλευρά όμως τα αποτελέσματα της μελέτης ήταν σε αντίθεση με άλλη προηγούμενη μελέτη η οποία αναφέρει ότι η έκφραση του p53 σε θυμώματα δεν σχετίζεται με τους ιστολογικούς υπότυπους (Chen FF, et al, 1996). Επιπροσθέτως υπήρχε τάση για υψηλότερη έκφραση του p53 προς τα βαρύτερα στάδια της νόσου ($p<0.001$) (πίνακας 16). Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με προηγούμενη μελέτη (Comin CE, et al, 2004) η οποία αναφέρει ότι δεν ανιχνεύθηκε συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του p53 με τα χαρακτηριστικά της μυασθένειας. Στην παρούσα μελέτη δεν κατεγράφη καμία συσχέτιση μεταξύ έκφραση του p53 και του μεγέθους και βάρους του θύμου. Επίσης δεν παρατηρήθηκε καμία σχέση μεταξύ έκφρασης του p53 και της κλινικής κατάσταση των ασθενών με μυασθένεια μετά τη θυμεκτομή όπως αυτή περιγράφηκε νωρίτερα. Επίσης δεν υπήρξε καμία σχέση μεταξύ της έκφρασης του p53 είτε με την πρόγνωση των ασθενών (Jaretzki A, 2000) ή με την επιβίωση αυτών. Το εύρημα αυτό είναι σε μερική συμφωνία με ορισμένες προηγούμενες (Comin CE, et al, 2004, Chen FF, et al, 1996) και σε αντίθεση με άλλες (Pitch A, et al, 1996). Τέλος κατεγράφη ευθεία συσχέτιση μεταξύ του % ποσοστού των p53(+) και bax (+) κυττάρων (εικόνα 29). Αυτό εξηγείται πιθανόν από το γεγονός ότι το γονίδιο, το οποίο κωδικοποιεί την πρωτείνη bax εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 19q13.3-q13.4 και αποτελεί στόχο του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 (Packham G, 1998). Η επαγωγή της έκφρασης του bax αποδίδεται στην μη μεταλλαγμένη μορφή (wild-type) του γονιδίου p53 το οποίο συνδέεται με συγκεκριμένα στοιχεία αναγνωρίσεως στον επαγωγέα του bax (Raisova M, et al, 2001). Από την άλλη πλευρά δεν υπήρξε συσχέτιση μεταξύ του % ποσοστού των p53(+) και bcl-2(+) κυττάρων, όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενη μελέτη (Chen FF, et al, 1996). Επίσης δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του γονιδίου p53 και των δεικτών PCNA ή Ki67 ή μεταξύ της έκφρασης του γονιδίου p53 και ΔΑΣ.

Αποπτωτικός δείκτης

Κύτταρα τα οποία υφίστανται απόπτωση ανιχνεύθηκαν και στις 46 περιπτώσεις των ασθενών με μυασθένεια και στους πέντε μάρτυρες. Όλα τα αποτελέσματα για τον αποπτωτικό δείκτη φαίνονται στον πίνακα 16. Στους ασθενείς με μυασθένεια και συνοδό υπερπλασία ή ατροφία του θύμου, $TUNEL^+$ κύτταρα ανιχνεύθηκαν τόσο στο μυελό όσο και στον φλοιό (εικόνα 30Α). Στις περιπτώσεις θυμώματος, $TUNEL^+$ κύτταρα ανιχνεύθηκαν κατά τον ίδιο τρόπο (εικόνα 30Β). Τα θετικά κύτταρα ήταν τόσο λεμφοκύτταρα (θυμοκύτταρα) όσο και επιθηλιακά κύτταρα. Ο ΔΑΣ ήταν υψηλότερος στις τρεις περιπτώσεις θυμώματος καρκινώματος σε σύγκριση με τις περιπτώσεις θυμώματος και υπερπλασίας/ατροφίας ($p<0.001$). Επιπλέον κατεγράφη μία τάση για αυξημένες τιμές του ΔΑΣ προς τα βαρύτερα στάδια της νόσου ($p<0.001$). Η ανάλυση κατά Spearman απεκάλυψε: α) ευθεία συσχέτιση μεταξύ του ΔΑΣ και του βάρους και του μεγέθους του θύμου ($r=0.58$, $p<0.01$ and $r=0.63$, $p<0.01$), β) ευθεία συσχέτιση μεταξύ ΔΑΣ και έκφρασης της πρωτεΐνης bax ή του bax mRNA στο μυελό ($r=0.46$, $P<0.05$ and $r=0.47$, $P<0.05$, αντίστοιχα), γ) ευθεία συσχέτιση του ΔΑΣ και της έκφρασης των PCNA και Ki67 (PCNA: $r=0.53$, $P<0.05$, Ki67: $r=0.49$, $P<0.05$), και δ) ανάστροφη συσχέτιση μεταξύ του ΔΑΣ και της έκφρασης του bcl-2 στο μυελό ($r=-0.36$, $p<0.05$). Δεν ανιχνεύθηκε καμία σχέση μεταξύ ΔΑΣ και έκφρασης p53, Fas, Fasl, bcl-x.

ΠΟΛΥΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΤΑ COX

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως η ανάλυση απλής μεταβλητής έδειξε ότι οι παράγοντες που σχετίσθηκαν με την εμφάνιση της πλήρους σταθερής ύφεσης ήταν η μικρότερη ηλικία κατά τη θυμεκτομή ($p=0.036$), η πραγματοποίηση της θυμεκτομής σε χρόνο μικρότερο του έτους από τη διάγνωση της μυασθένειας ($p=0.009$), τα

στάδια Ι και ΙΙΑ κατά Osserman (σε σύγκριση με τα στάδια ΙΙΒ και ΙΙΙ-p=0.013) και η αναλογία bax/bcl-2<1 (p=0.0082). Όσον αφορά τη διαφορά μεταξύ του σταδίου ΙΙΑ σε σύγκριση με τα στάδια ΙΙΑ+ΙΙΙ πρέπει να σημειώσουμε ότι στο στάδιο ΙΙΒ αντιστρέφεται η τιμή της αναλογίας bax/bcl-2 από <1 σε >1 (πίνακας 11). Για να δούμε ποιοι από όλους αυτούς τους παράγοντες (κλινικούς και μοριακούς) είναι ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες, εφαρμόσαμε την πολυπαραγοντική κατά Cox ανάλυση. Αυτή (πίνακας 17) απεκάλυψε ότι οι μόνοι ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες για την κλινική κατάσταση των ασθενών με μυασθένεια μετά τη θυμεκτομή, είναι: **α)** ο χρόνος που παρήλθε μετά την έναρξη των συμπτωμάτων της μυασθένειας μέχρι τη θυμεκτομή (οι ασθενείς που χειρουργήθηκαν σε περίοδο μικρότερη του 1 έτους από τη διάγνωση εμφάνισαν πλήρη και σταθερή ύφεση σε μεγαλύτερο ποσοστό). Όπως φαίνεται στον πίνακα 17 η τιμή του p είναι 0.01. **β)** το στάδιο της νόσου, όταν τα στάδια χωρίζονται σε δύο κατηγορίες (Ι+ΙΙΑ vs. ΙΙΒ+ΙΙΙ). Όπως φαίνεται στον πίνακα 17 η τιμή του p είναι 0.043. **γ)** η αναλογία bax/bcl-2 (οι ασθενείς με αναλογία μικρότερη του 1 εμφάνισαν σε υψηλότερο ποσοστό πλήρη σταθερή ύφεση. Όπως φαίνεται στον πίνακα 17 η τιμή του p είναι 0.041. Πάντως αν και η αναλογία bax/bcl-2 αποτέλεσε ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα και η αναστροφή της αναλογίας κατεγράφη στο στάδιο ΙΙΒ (βλέπε πίνακα 11) εντούτοις το στάδιο κατά Osserman (όταν συγκρίθηκε το στάδιο ΙΙΑ vs. ΙΙΒ+ΙΙΙ) δεν απετέλεσε ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα (p=0.086).

Πίνακας 16: Έκφραση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 και αποπτωτικός δείκτης

Ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά	# περ	p53 (mean±SD) Μυελός *	Φλοιός §	ΔΑΣ (mean±SD) Μυελός+	Φλοιός¶
Ιστοπαθολογία θύμου					
Υπερπλασία + Ατροφία	34	31.3 ± 3.7^{a}	31.2 ± 1.7^{a}	$29.3\pm4.1^{a,b}$	$25.3\pm2.6^{a,b,f}$
Θύμωμα (τύπου Β1/Β2)	9	36.8 ± 3.1^{b}	35.4 ± 1.2^{b}	$36.3\pm2.5^{a,c,d}$	$32.4\pm2.3^{a,c,d}$
ΥΔΚ (θύμωμα τύπου Β3)	3	71.3 ± 1.2^{ab}	69.3 ± 1.2^{ab}	$66.7\pm4.8^{b,c,e}$	$58.3\pm2.5^{b,c,e}$
Μάρτυρες		0	0	$25.2\pm1.3^{d,e,f}$	$19.2\pm0.8^{d,e,f}$
Στάδιο κατά Osserman		Μυελός**	Φλοιός ¥	Μυελός±	Φλοιός $
I	3	$31.6\pm4.1^{a,b,c}$	$31.2\pm1.1^{a,b,c}$	$32.6\pm5.2^{a,b,c}$	$32.9\pm1.1^{a,b,c}$
IIA	19	$44.2\pm1.9^{a,d,e}$	$36.4\pm0.3^{a,d,e}$	$43.9\pm1.8^{a,d,e}$	$46.2\pm2.3^{a,d,e}$
IIB	13	$53.4\pm3.2^{b,d,i}$	$51.1\pm1.1^{b,d,i}$	$56.7\pm2.3^{b,d,i}$	$53.3\pm3.2^{b,d,i}$
III	3	$72.3\pm3.6^{c,e,i}$	$71.4\pm1.3^{c,e,i}$	$69.1\pm3.4^{c,e,i}$	$68.5\pm2.4^{c,e,i}$
Σύνολο	46				

ΥΔΚ: υψηλής διαφοροποίησης καρκίνωμα

*: Οι διαφορές είναι σημαντικές στο επίπεδο $p<0.001$ στις τιμές με τα γράμματα a,b.

§: Οι διαφορές είναι σημαντικές στο επίπεδο $p<0.001$ στις τιμές με τα γράμματα a,b.

**: Οι διαφορές είναι σημαντικές στο επίπεδο $p<0.001$ στις τιμές με τα γράμματα a,b,c,d,e,i

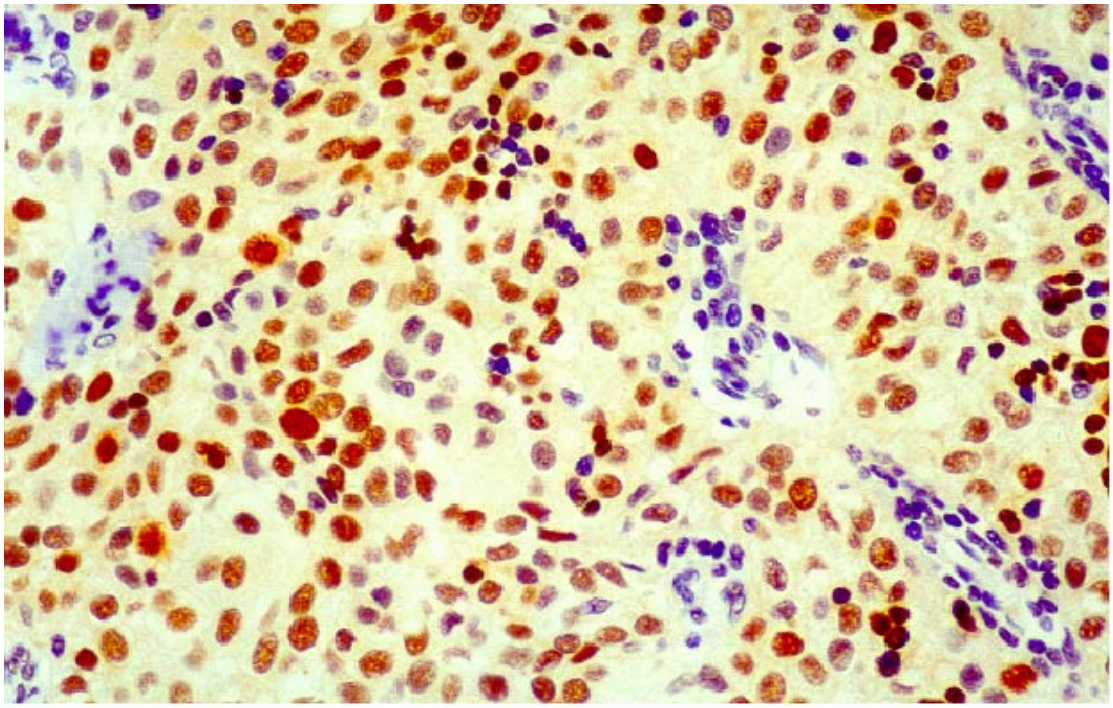
¥: Οι διαφορές είναι σημαντικές στο επίπεδο $p<0.001$ στις τιμές με τα γράμματα a,b,c,d,e,i

+:Οι διαφορές είναι σημαντικές στο επίπεδο $p<0.001$ στις τιμές με τα γράμματα a,b,c,d,e

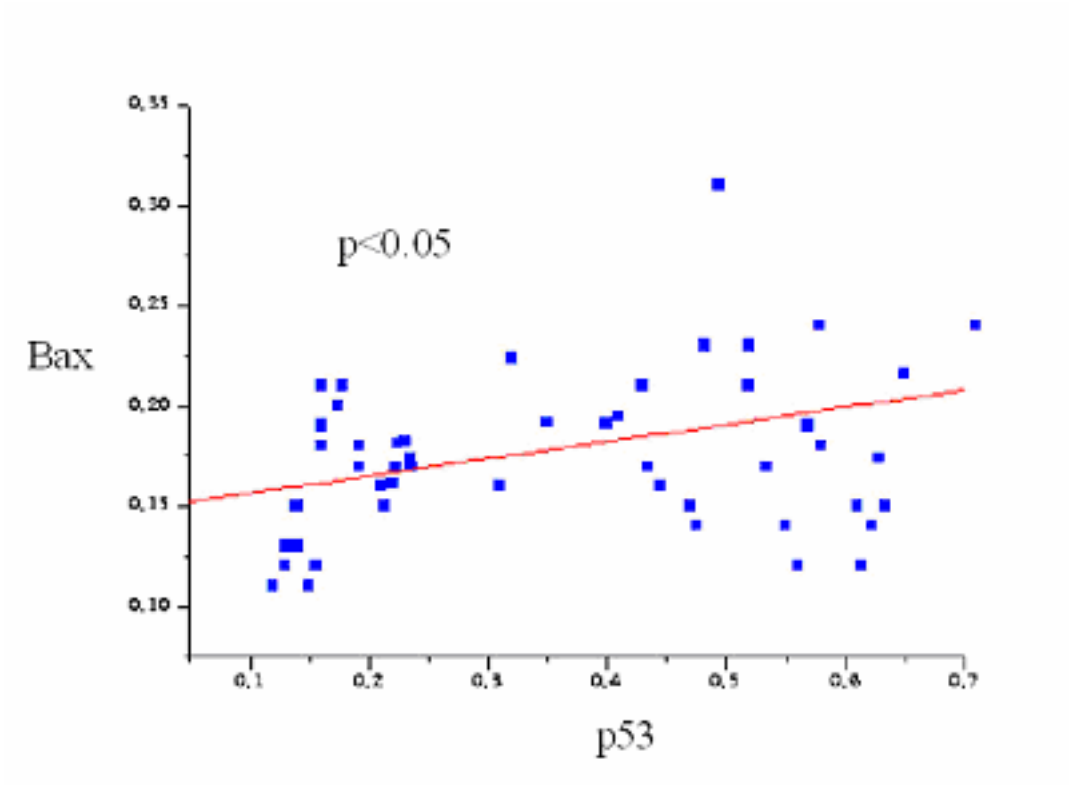
¶: Οι διαφορές είναι σημαντικές στο επίπεδο $p<0.01$ στις τιμές με τα γράμματα a,b,c,d,e και στο επίπεδο $p<0.05$ στις τιμές με το γράμμα f

±: Οι διαφορές είναι σημαντικές στο επίπεδο $p<0.001$ στις τιμές με τα γράμματα a,b,c,d,e,i

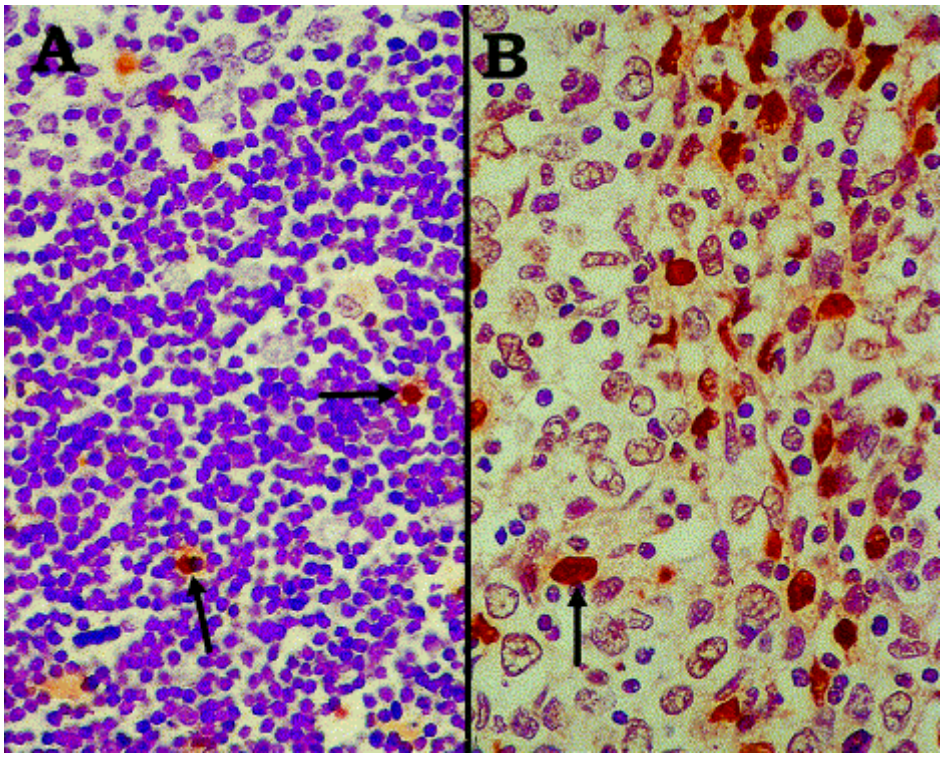
$: Οι διαφορές είναι σημαντικές στο επίπεδο $p<0.001$ στις τιμές με τα γράμματα a,b,c,d,e,i



Εικόνα 28: Έκφραση του αντιγόνου p53 σε μία περίπτωση καρκινώματος (στρεπταβιδίνη βιοτίνη περοξειδάση Χ250).



Εικόνα 29: Συσχέτιση μεταξύ % ποσοστού των p53(+) και bax (+) κυττάρων.



<u>Εικόνα 30</u>: Α. Αποπτωτικά σωμάτια σε έναν θύμο με υπερπλασία (TUNEL-περοξειδάση Χ100). Β.Αποπτωικά σωμάτια σε μία περίπτωση καρκινώματος (TUNEL-περοξειδάση Χ400).

Πίνακας 17. Σχέση μεταξύ των δυνητικών προγνωστικών παραγόντων με την κλινική κατάσταση των ασθενών (για λεπτομέρειες σχετικά με την κλινική κατάσταση των ασθενών βλέπε το κείμενο) (Cox's proportional hazards regression analysis model)

Παράγοντες	B	SE	Wald	df	Odds	95% CI for Odds		Sig. (p)
						Lower	Upper	
ΓΕΝΟΣ	.088	.365	.058	1	1.092	.534	2.232	.810
ΗΛΙΚΙΑ	.012	.014	.724	1	1.012	.985	1.039	.395
ΒΑΡΟΣ	-2.251	1.329	2.867	1	.105	.008	1.426	.090
ΜΕΓΕΘΟΣ	-.303	.459	.435	1	.739	.301	1.817	.510
ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ	1.089	.902	1.457	1	2.970	.507	17.397	.227
ΣΤΑΔΙΟ$^{\#}$	-4.513	2.628	2.949	1	.011	.000	1.892	.086
ΣΤΑΔΙΟ^{+}	.766	.380	4.076	1	2.152	1.023	4.529	.043*
Fas	.253	.444	.323	1	1.287	.539	3.076	.570
p53	-.163	.602	.074	1	.849	.261	2.763	.786
ΔΑΣ	.294	.686	.184	1	1.341	.350	5.142	.668
Ki67	.336	.347	.949	1	1.402	.711	2.765	.330
ΑΝΑΛΟΓΙΑ bax/bcl-2	1.930	.947	4.157	1	6.892	1.078	44.073	.041*
ΧΡΟΝΟΣ	-1.792	.694	6.659	1	.167	.043	.650	.01*

ΔΑΣ: δείκτης αποπτωτικών σωματίων, ΧΡΟΝΟΣ: ο χρόνος που μεσολάβησε από την έναρξη των συμπτωμάτων της μυασθένειας έως τη θυμεκτομή, $^{\#}$: συγκρίθηκε η έκβαση των ασθενών με στάδιο ΙΙΑ με αυτούς με στάδια ΙΙΒ+ΙΙΙ, $^{+}$: συγκρίθηκε η έκβαση των ασθενών με στάδια Ι+ΙΙΑ με αυτούς με στάδια ΙΙΒ+ΙΙΙ *: $p<0.05$

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μελέτη αυτή δείχνει ότι **α)** ασθενείς με βαρεία μυασθένεια που υπέστησαν τροποποιημένη μεγίστη θυμεκτομή εμφάνισαν σε υψηλό ποσοστό (95%) βελτίωση των συμπτωμάτων της νόσου μετά την επέμβαση, και **β)** η κλινική έκβαση των μυασθενικών ασθενών μετά την μεγίστη τροποποιημένη θυμεκτομή καθορίζεται από **κλινικούς** και **μοριακούς** παράγοντες.

Όσον αφορά τους κλινικούς παράγοντες, στην παρούσα μελέτη η ανάλυση απλής μεταβλητής έδειξε ότι οι παράγοντες που συσχετίσθηκαν με την συχνότητα εμφάνισης πλήρους σταθερής ύφεσης ήταν η μικρότερη ηλικία κατά τη θυμεκτομή, η πραγματοποίηση της θυμεκτομής σε χρόνο μικρότερο του έτους από την έναρξη των συμπτωμάτων της νόσου, και το ηπιότερο στάδιο (I και IIA vs. IIB+III) της νόσου. Σχετικά με την ηλικία οι απόψεις που υπάρχουν σε προηγούμενες μελέτες είναι αντικρουόμενες. Υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι σε νεαρότερες ηλικίες (κάτω των 40-45 ετών) επιτυγχάνονται μεγαλύτερα ποσοστά ύφεσης της μυασθένειας μετά τη θυμεκτομή (Beghi E, et a1, 1991, Huang CS, et al, 2005, Frist WH, et al, 1994, Beekman R, et al, 1997). Στη δική μας μελέτη οι ασθενείς που υπέστησαν τροποποιημένη μεγίστη θυμεκτομή και εμφάνισαν πλήρη σταθερή ύφεση είχαν μέση ηλικία τα 27 (16-38) έτη (δηλ. όλοι ήσαν κάτω των 40 ετών), ενώ οι ασθενείς που δεν εμφάνισαν πλήρη σταθερή ύφεση είχαν μέση ηλικία τα 40 (18-85) έτη. Άλλοι όμως συγγραφείς δεν θεωρούν ότι από τις υπάρχουσες μελέτες επιβεβαιώνεται η επίδραση της ηλικίας στην έκβαση της νόσου μετά τη θυμεκτομή (Gronseth GS, Barohn RJ , 2000).

Στην παρούσα μελέτη η ανάλυση κατά Cox απεκάλυψε ότι **ανεξάρτητοι κλινικοί**

προγνωστικοί παράγοντες για τη συχνότητα εμφάνισης πλήρους σταθερής ύφεσης μετά από θυμεκτομή σε μυασθενικούς ασθενείς είναι:

Α) Η χρονική περίοδος που μεσολαβεί από την έναρξη των συμπτωμάτων της μυασθένειας έως τη θυμεκτομή. Πιο συγκεκριμένα φάνηκε ότι η θυμεκτομή που γίνεται σε χρόνο λιγότερο του 1 έτους από την έναρξη των συμπτωμάτων της μυασθένειας, υπερτερεί αυτής που γίνεται σε χρόνο μεγαλύτερο του 1 έτους. Τα ευρήματα αυτά είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες στις οποίες φαίνεται ότι η θυμεκτομή είναι πιο αποτελεσματική όταν πραγματοποιείται νωρίς μετά από την έναρξη των συμπτωμάτων της νόσου, καλύτερα δε μέσα στον πρώτο χρόνο (Rubin JW, et al, 1981, Monden Y, et al, 1984, DeFilippi VJ, et al, 1994, Kaminski HJ, 2003).

Β) Το ηπιότερο στάδιο (κατά Osserman) της νόσου, πριν τη θυμεκτομή. Φάνηκε ότι οι περιπτώσεις με νόσο σταδίων I+IIA υπερτερούν έναντι των περιπτώσεων με νόσο σταδίων IIB+III, πριν τη θυμεκτομή. Τα ευρήματα αυτά είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες. Αυτές δείχνουν ότι ασθενείς με λιγότερο σοβαρά συμπτώματα μυασθένειας ανταποκρίνονται καλύτερα στη θυμεκτομή (Jaretzki A, et al, 2004). Υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι το μετεγχειρητικά αναμενόμενο ποσοστό ύφεσης της νόσου, χωρίς την ανάγκη φαρμακευτικής αγωγής (δηλ. πλήρης σταθερή ύφεση) είναι μεγαλύτερο στα στάδια I ή II κατά Osserman (Nussbaum MS, et al, 1992, Huang MH, et al, 1988). Αντιθέτως, γενικευμένα και σοβαρά συμπτώματα μυασθένειας πριν τη θυμεκτομή σχετίζονται με χειρότερη πρόγνωση (Beghi E, et al, 1991).

Στην παρούσα μελέτη δεν κατεδείχθη καμία σχέση μεταξύ της ιστολογικής εικόνας του θύμου και της κλινικής κατάστασης των ασθενών. Υπάρχουν μελέτες

που δείχνουν ότι ασθενείς με θύμωμα εμφανίζουν μικρότερο ποσοστό ύφεσης ή βελτίωσης των συμπτωμάτων της μυασθένειας μετά τη θυμεκτομή, συγκριτικά με μυασθενικούς ασθενείς χωρίς θύμωμα (Jaretzki A, et al, 1988, Maggi G, et al, 1989). Ωστόσο η μακροχρόνια κλινική έκβαση σε πολλούς ασθενείς με μυασθένεια και θύμωμα μπορεί να είναι το ίδιο ευνοϊκή, όπως και σε μυασθενικούς ασθενείς χωρίς θύμωμα (Keesey JC , 2004, Bril V, et al, 1998, Romi F, et al, 2000). Αναφορικά με την απάντηση στη θυμεκτομή σε σχέση με μη νεοπλασματικές ιστολογικές αλλοιώσεις του θύμου (υπερπλασία ή ατροφία), υπάρχουν αντικρουόμενες αναφορές (Huang MH, et al, 1988, Mulder DG, et al, 1989). Αυτό μπορεί να οφείλεται σε διαφορετικές τεχνικές επεξεργασίας των παρασκευασμάτων του θύμου ή στη χρήση διαφορετικών διαγνωστικών κριτηρίων για την αξιολόγησή τους (Jaretzki A, et al, 2000).

Αναφορικά με τους μοριακούς προγνωστικούς παράγοντες, η μελέτη έδειξε ότι η έκφραση των αποπτωτικών γονιδίων bcl-2, bax, bcl-x, Fas, Fasl, των δεικτών κυτταρικού πολλαπλασιασμού PCNA Ki67 και του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53, όπως αυτή ανιχνεύθηκε με τις μεθόδους ανοσοϊστοχημείας και in-situ υβριδισμού, ήταν ποικίλη και μεταβαλλόταν ανάλογα με τα ιστοπαθολογικά ευρήματα του θύμου κατά την ώρα της θυμεκτομής. Επιπρόσθετα τα γονίδια bcl-2, bax, bcl-x, Fas και Fasl παράγονται ενεργώς στο θύμο αλλά εμφανίζουν διαφορετική κατανομή όσον αφορά τη θέση παραγωγής.

Σήμερα είναι γνωστό ότι το ογκογονίδιο bcl-2 αναστέλλει την αποπτωτική διαδικασία στους ιστούς μέσω της δράσης του σε διάφορα «μονοπάτια». Η υπερέκφραση του bcl-2 μπορεί παρεμποδίσει ή να μειώσει τον κυτταρικό θάνατο, ο οποίος επάγεται από σειρά ερεθισμάτων (Sentman SL, et al, 1991). Έτσι αυτό το

ογκογονίδιο μπορεί να διαμεσολαβεί ένα μηχανισμό ο οποίος απευαισθητοποιεί τα θυμοκύτταρα ως προς την αντίδρασή τους στα αποπτωτικά ερεθίσματα. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι κατά τη διάρκεια της δημιουργίας του θύμου, η ογκοπρωτεΐνη bcl-2 εκφράζεται κυρίως από τα πρόδρομα κύτταρα και τα ώριμα θυμοκύτταρα, παρά από τα διάμεσα θυμοκύτταρα (Gratiot-Deans J, et al, 1993, Moore NC, et al, 1994). Τα αποτελέσματα της δικής μας μελέτης έδειξαν ότι η έκφραση του bcl-2 ήταν υψηλότερη στους ασθενείς με βαρεία μυασθένεια σε σχέση με τους μάρτυρες. Επιπλέον η παρουσία της πρωτεΐνης bcl-2 ήταν περισσότερο εμφανής στον μυελό παρά στον φλοιό του θύμου. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με προηγούμενη μελέτη (Onodera J, et al, 1996). Έτσι μπορούμε να υποθέσουμε ότι αυτά τα ευρήματα ενοχοποιούν την πρωτεΐνη bcl-2 για την ελάττωση στο βαθμό απόπτωσης στα αυτοαντιδραστικά θυμοκύτταρα στους ασθενείς με βαρεία μυασθένεια. Εναλλακτικά, η έκφραση της πρωτεΐνης bcl-2 κυρίως στο μυελό του θύμου μπορεί να σχετίζεται με την παρουσία των φλεγμονωδών κυττάρων και έτσι ο μυελός του θύμου, στις περιπτώσεις βαρείας μυασθένειας, μπορεί να μιμείται τους λεμφαδένες όταν προσβάλλονται από φλεγμονή (Kornstein, MJ et al, 1984). Η ετερογένεια που παρατηρήθηκε στη έκφραση του bcl-2 πιστοποιεί την ύπαρξη ενός μεγάλου εύρους ωρίμανσης η οποία συμβαίνει στα λεμφοκύτταρα του θυμώματος όπως και στα φυσιολογικά θυμοκύτταρα. Επιπροσθέτως η παρούσα μελέτη έδειξε ότι ο αριθμός των bcl-2 θετικών θυμοκυττάρων ήταν σημαντικά υψηλότερος στον θυμικό ιστό που ελήφθη από ασθενείς με βαρεία μυασθένεια (και οι οποίοι εμφάνισαν υπερπλασία θύμου) σε σχέση με τον θυμικό ιστό που ελήφθη από τους μάρτυρες. Προηγούμενες μελέτες έχουν αναφέρει σημαντική αύξηση του ποσοστού των CD4(+)/CD8(−) κυττάρων στο θύμο ασθενών με βαρεία μυασθένεια (Fuji N, et al, 1990). Έτσι, η παραγωγή και έκφραση του στο θύμο ασθενών με βαρεία μυασθένεια

πιθανόν αντανακλά μία αύξηση στον αριθμό των ώριμων θυμοκυττάρων που εκφράζουν bcl-2.

Παρά το μικρό αριθμό των καρκινωμάτων που περιελήφθησαν σε αυτή τη μελέτη, η έκφραση της πρωτεΐνης και του mRNA του γονιδίου bcl-2 ήταν χαμηλότερη σε αυτά σε σύγκριση με τις περιπτώσεις θυμικής υπερπλασίας και θυμώματος. Αν και ο ρόλος του ογκογονιδίου bcl-2 στην εμφάνιση και ανάπτυξη των θυμωμάτων που συνοδεύουν ή χαρακτηρίζονται από την παρουσία βαρείας μυασθένειας δεν έχει επαρκώς αποσαφηνισθεί, η σημαντική απώλεια της έκφρασης του bcl-2 στις περιπτώσεις των καρκινωμάτων, σε σύγκριση με τις περιπτώσεις υπερπλασίας και θυμώματος, εισηγείται ότι η έκφραση του bcl-2 αποτελεί πρώιμο και όχι όψιμο γεγονός στην ογκογένεση του θύμου. Αυτό υποδηλώνει ότι η αποδόμηση του συγκεκριμένου γονιδίου διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση και τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου των θυμικών κυττάρων, αφού τα καθιστά ευάλωτα στην επίδραση της αποπτωτικής διαδικασίας. Από την άλλη πλευρά η ανώμαλη έκφραση του bcl-2 μπορεί να οδηγήσει σε συσσώρευση κυττάρων με επιμηκυσμένο κυτταρικό κύκλο με τελικό αποτέλεσμα την εμφάνιση νεοπλάσματος. Η απορυθμισμένη έκφραση του γονιδίου bcl-2 στα νεοπλασματικά κύτταρα υποδηλώνει ότι τα κύτταρα αυτά υφίστανται μετάλλαξη και αυξάνει η ανθεκτικότητά τους στα αποπτωτικά ερεθίσματα, γεγονός που στα πρώιμα στάδια οδηγεί στην ανάπτυξη και εξέλιξη του όγκου.

Στην παρούσα μελέτη καταδείχθηκε η απώλεια έκφρασης του γονιδίου bcl-2 στα βαρύτερα στάδια της νόσου (βαρείας μυασθένειας). Μία πιθανή εξήγηση είναι ότι το bcl-2 επιμηκύνει τη ζωή (την επιβίωση) των αυτοαντιδραστικών θυμοκυττάρων μέσω αναστολής της αποπτωτικής διαδικασίας. Έτσι επιδρά στην κυτταρική ανάπτυξη σε

μικρότερο βαθμό απ' ότι άλλα ογκογονίδια τα οποία δρουν μέσω αύξησης του βαθμού του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Όλες αυτές οι παρατηρήσεις (σχετικά με την απώλεια έκφρασης του bcl-2 στα θυμικά καρκινώματα και την βαθμιαία ελάττωση καθώς αυξάνει η βαρύτητα της νόσου) εισηγούνται ανώμαλη (διαταραγμένη) έκφραση του bcl-2 μόνο στα πρώιμα στάδια της βαρείας μυασθένειας. Μία άλλη εναλλακτική εξήγηση είναι ότι η έκφραση του bcl-2 μπορεί να αποτελεί επιφαινόμενο χωρίς βιολογική σημασία. Αυτές οι αντιθέσεις μπορεί να ερμηνευθούν μέσα από τη συνεργασία διαφορετικών ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων τα οποία εμφανίζουν συγκεκριμένο-για κάθε ιστό-ρόλο στην μετάλλαξη των κυττάρων και την εξέλιξη του θυμώματος. Τέλος η παρούσα μελέτη δεν κατέδειξε συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του bcl-2 και του βαθμού κυτταρικού πολλαπλασιασμού, όπως αυτός εκφράζεται από το ποσοστό των Ki67+ κυττάρων. Αυτό το εύρημα στηρίζει την υπόθεση ότι η έκφραση του bcl-2 δεν διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη ή στα βαρύτερα στάδια της βαρείας μυασθένειας, όπου καταγράφονται και οι μεγαλύτερες τιμές του δείκτη Ki67.

Στην παρούσα μελέτη η έκφραση του bax στο θυμικό ιστό που ελήφθη από τους μάρτυρες ήταν παρόμοια με αυτή που έχει περιγραφεί πρωτύτερα (Krajewski S, Krajewska M, et al, 1994, Penault-Llorca et al, 1998). Επιπλέον η έκφραση του bax ήταν αντίθετη από αυτή του bcl-2. Το bax εκφράσθηκε κυρίως στο μυελό αλλά περισσότερο στα βλαστικά κέντρα τα οποία όπως είναι γνωστό εμφανίζουν υψηλούς αποπτωτικούς δείκτες. Η διαφορά αυτή μπορεί να εξηγηθεί ως εξής: **α)** το bax μπορεί να δρα ως επαγωγέας θανάτου του κυττάρου, αφού αποτελεί κυρίαρχο αναστολέα του bcl-2, και έτσι το τελευταίο μπορεί να ρυθμίζει το bax, όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενη μελέτη (Krajewski S, Krajewska M, et al, 1994). **β)** άλλα ογκογονίδια, μέλη της οικογένειας του bcl-2 (π.χ. bcl-x) μπορεί να παράγονται

ταυτόχρονα με το bax και να αναστέλλουν την αποπτωτική διαδικασία στις περιοχές εκείνες που εκφράζεται bax αλλά όχι bcl-2.

Η παρούσα μελέτη δείχνει, ότι το bax παράγεται ενεργώς (ανίχνευση bax mRNA) και επίσης εκφράζεται (παρουσία της πρωτεΐνης bax) από τα επιθηλιακά κύτταρα και τα θυμοκύτταρα στα παρασκευάσματα του θύμου που ελήφθησαν από ασθενείς με βαρεία μυασθένεια κατά τη διάρκεια τροποποιημένης μεγίστης θυμεκτομής η οποία έγινε για θεραπευτικούς λόγους. Επιπροσθέτως, η μελέτη έδειξε ότι η έκφραση του bax ήταν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη στις περιπτώσεις καρκινώματος σε σύγκριση με τις περιπτώσεις θυμώματος και θυμικής υπερπλασίας. Και αυτό παρά το μικρό αριθμό καρκινωμάτων που περιέλαβε η μελέτη. Τα αποτελέσματα αυτά εισηγούνται ότι το συγκεκριμένο γονίδιο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στα όψιμα (προχωρημένα) στάδια της ογκογένεσης του θύμου. Δηλ. η έκφραση του γονιδίου bax καθιστά τα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα ευάλωτα στην απόπτωση γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την εξέλιξη της νόσου.

Επιπλέον στην παρούσα μελέτη κατεδείχθη η σημαντική τάση για αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης bax αλλά και του baxmRNA κατά την εξέλιξη της νόσου (προς βαρύτερα στάδια). Το εύρημα αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι το bax αυξάνει το βαθμό απόπτωσης των αυτοαντιδραστικών θυμοκυττάρων με επακόλουθο την αύξηση του βαθμού κυτταρικού πολλαπλασιασμού και ανάπτυξης με τελικό αποτέλεσμα την εξέλιξη της νόσου προς βαρύτερα στάδια. Όλες αυτές οι παρατηρήσεις ευνοούν την όψιμη διαταραγμένη έκφραση του bax στα προχωρημένα στάδια της νόσου.

Λόγω της μεγάλης αλληλεπίδρασης που υπάρχει ανάμεσα στα μέλη της οικογένειας bcl-2 φαίνεται ότι η αναλογία bax/bcl-2 έχει τη μεγαλύτερη σημασία στη

ρύθμιση της απόπτωσης. Στην παρούσα μελέτη υπήρξε αυξημένη έκφραση της αναλογίας bax/bcl-2 στους ασθενείς με μυασθένεια σε σχέση με τους μάρτυρες. Επιπλέον όσον αφορά τους ασθενείς με μυασθένεια κατεγράφη αύξηση της αναλογίας στα καρκινώματα σε σχέση με τα θυμώματα και την υπερπλασία και επίσης αύξηση της αναλογίας προς τα βαρύτερα στάδια της νόσου. Πιο συγκεκριμένα οι τιμές της αναλογίας αντιστράφηκαν (από μικρότερες του 1 σε μεγαλύτερες του 1 στο στάδιο IIB κατά Osserman). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν τη σημασία που έχουν οι μεταβολές στην αναλογία bax/bcl-2 (τόσο στο επίπεδο το mRNA όσο και στο επίπεδο της πρωτεΐνης) στην εξέλιξη της μυασθένειας προς τα βαρύτερα στάδια. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί σε περιπτώσεις πειραματικής νεφρικής και ηπατικής ίνωσης (Yang B, et al, 2002, Kalogeropoulou C, et al, 2004) όσο και σε περιπτώσεις χρόνιας ηπατίτιδας B και C (Tsamandas AC, Gogos C, et al, 2004, Tsamandas AC, Thomopoulos K, et al, 2005). Σε αυτές τις μελέτες έχει αναφερθεί αύξηση στην τιμή της αναλογίας bax/bcl-2 προς τα προχωρημένα στάδια της ίνωσης και της επακόλουθης εμφάνισης νεφρικής ή ηπατικής νόσου τελικού σταδίου. Επομένως φαίνεται ότι η αύξηση της αναλογίας και επομένως η αύξηση του βαθμού απόπτωσης είτε άμεσα με αύξηση της επαγωγής λόγω αύξησης του bax, ή έμμεσα με μείωση της καταστολής λόγω μείωσης του bcl-2, οδηγεί την εξέλιξη της μυασθένειας προς βαρύτερα στάδια, και έτσι μειώνει τις πιθανότητες ύφεσης. Στην παρούσα μελέτη όλοι οι ασθενείς που εμφάνισαν πλήρη σταθερή ύφεση (Jaretzki A, et al, 2000) είχαν αναλογία μικρότερη του 1 ενώ οι υπόλοιποι αναλογία μεγαλύτερη του 1. Τέλος, η ανάλυση κατά Cox έδειξε ότι η αναλογία bax/bcl-2 απετέλεσε ανεξάρτητο μοριακό προγνωστικό παράγοντα για την κλινική έκβαση των ασθενών, μετά από τη θυμεκτομή, όπως αυτή ορίζεται με βάση διεθνώς αποδεκτά κριτήρια (Jaretzki A, et al, 2000).

Η έκφραση του γονιδίου bcl-x ήταν ποικίλη και δεν εμφάνισε σημαντική διαφορά τόσο ανάμεσα στους μάρτυρες και τους ασθενείς με μυασθένεια όσο και ανάμεσα στους ίδιους τους ασθενείς, όσον αφορά τα διαφορετικά κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά της μυασθένειας. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι το bcl-x δεν φαίνεται να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην εμφάνιση και εξέλιξη της μυασθένειας (Nagata T, et al, 2001).

Όσον αφορά τα γονίδια Fas και Fasl η έκφρασή τους στα παρασκευάσματα θυμεκτομών από τους ασθενείς με μυασθένεια ήταν υψηλότερη από αυτά των μαρτύρων. Επιπλέον στους ασθενείς με μυασθένεια και τα δύο γονίδια ανιχνεύθηκαν κυρίως στα επιθηλιακά κύτταρα και λιγότερο συχνά στα θυμοκύτταρα. Τα ευρήματα αυτά είναι σε μερική συμφωνία με προηγούμενες μελέτες (Tateyama H, et al, 1996, Leithauser F, et al, 1993, Onodera J, et al, 1996, Koji T, et al, 1994). Επιπλέον κατεγράφη αυξημένη έκφραση και των δύο γονιδίων στα βαρύτερα στάδια της νόσου. Όπως έχει προαναφερθεί η αποπτωτική διαδικασία μέσω Fas αρχίζει όταν ο Fas-συνδέτης αντιδρά με τον Fas μετατρέποντας τον υποδοχέα σε τριμερές, με αποτέλεσμα τη σύνδεση της κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης-προσαρμοστή FADD μέσω μιας περιοχής αναγνώρισης σημάτων θανάτου. Στη συνέχεια, η πρωτεΐνη-προσαρμοστής ενεργοποιεί την ευοδωτική κασπάση 8 πυροδοτώντας τη φάση εκτέλεσης του κυτταρικού θανάτου. Επιπλέον πιστεύεται ότι το Fas συμμετέχει στην αρνητική επιλογή των θυμοκυττάρων (Τ λεμφοκυττάρων) στο θύμο μόνον όταν υπάρχουν αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις του υποδοχέα των Τ κυττάρων. Στην παρούσα μελέτη οι δύο δείκτες Fas και Fasl εκφράσθηκαν κυρίως στα επιθηλιακά κύτταρα στις περιπτώσεις θυμώματος και καρκινώματος και σχετίσθηκαν με βαρύτερο στάδιο της νόσου. Πιθανόν λοιπόν η έκφραση αυτών των γονιδίων να σχετίζεται με τη εξέλιξη της νόσου προς βαρύτερες μορφές. Πάντως στην παρούσα

εργασία δεν κατεδείχθη καμία σχέση μεταξύ τους βαθμού απόπτωσης ή του βαθμού κυτταρικού πολλαπλασιασμού με την έκφραση των Fas ή Fasl. Επομένως η διερεύνηση του ρόλου των συγκεκριμένων δεικτών στην εμφάνιση και εξέλιξη της μυασθένειας χρήζει περαιτέρω έρευνας. Επίσης η παρούσα μελέτη έδειξε υψηλότερη έκφραση των Fas και Fasl στα καρκινώματα σε σχέση με τα θυμώματα. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι η έκφραση των συγκεκριμένων αντιγόνων σχετίζεται με πιο επιθετική βιολογική συμπεριφορά των επιθηλιακών όγκων του θύμου και βρίσκονται σε συμφωνία με αυτά προηγούμενης μελέτης η οποία έδειξε ότι η έκφραση του Fas σχετίζεται με προχωρημένο στάδιο αλλά και βιολογική επιθετικότητα σε περιπτώσεις επιθηλιακών όγκων του θύμου (Tateyama H, et al, 1996). Η τελευταία μελέτη έδειξε ότι η έκφραση του Fas είναι αυξημένη και σε προχωρημένο στάδιο αυτών των όγκων, εύρημα το οποίο δεν κατεδείχθη στη δική μας μελέτη. Ίσως αυτό να οφείλεται α) στο γεγονός ότι η παρούσα μελέτη περιέλαβε μικρό αριθμό θυμωμάτων και καρκινωμάτων τα οποία όμως συνόδευαν μυασθένεια και β) στο ότι η προηγούμενη μελέτη (Tateyama H, et al, 1996) περιέλαβε μόνον επιθηλιακούς όγκους του θύμου με ή χωρίς συνοδό μυασθένεια δηλ. είχε διαφορετικό σχεδιασμό. Φαίνεται τελικά ότι η έκφραση των Fas και Fasl στις περιπτώσεις μυασθένειας που συνοδεύεται από επιθηλιακούς όγκους του θύμου (θύμωμα-καρκίνωμα) σχετίζεται εμμέσως και με χειρότερη πρόγνωση (όσον αφορά την επιβίωση) αφού είναι γνωστό ότι το καρκίνωμα του θύμου (θύμωμα τύπου Β3-όπως οι όγκοι που περιελήφθησαν στη δική μας μελέτη) έχει χειρότερη πρόγνωση από το θύμωμα (θύμωμα τύπου Β1/Β2) (Rosai J, 2004). Πάντως αυτό δεν κατεδείχθη στη δική μας μελέτη. Για να αποδειχθούν αυτά τα ευρήματα χρειάζεται περαιτέρω έρευνα η οποία να περιλάβει μεγαλύτερο αριθμό επιθηλιακών όγκων του θύμου οι οποίοι να συνοδεύουν μυασθένεια.

Επίσης η παρούσα μελέτη κατέδειξε την ύπαρξη υψηλότερου βαθμού κυτταρικού

πολλαπλασιασμού στις περιπτώσεις των καρκινωμάτων σε σύγκριση με αυτές των θυμωμάτων και της θυμικής υπερπλασίας. Επιπλέον και σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη (Gilhus NE, et al, 1995), η παρούσα έδειξε ότι η έκφραση του Ki67 σχετίσθηκε ευθέως με το βάρος και το μέγεθος του θύμου κατά τη διάρκεια της τροποποιημένης μεγίστης θυμεκτομής η οποία έγινε για θεραπευτικούς λόγους σε ασθενείς με βαρεία μυασθένεια. Η παρουσία των PCNA και Ki67 ήταν υψηλότερη στις τρεις περιπτώσεις των καρκινωμάτων σε σύγκριση με τις περιπτώσεις θυμωμάτων και υπερπλασίας/ατροφίας τόσο στο μυελό όσο και στον φλοιό. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες (Tomita M et al, 2002, Comin CE, et al, 2004). Επιπροσθέτως η έκφραση και των δύο αντιγόνων ήταν υψηλότερη στους ασθενείς με μυασθένεια σε σύγκριση με τους μάρτυρες ενώ κατεγράφη επίσης η τάση για αυξημένη έκφραση και των δύο αντιγόνων τόσο στο φλοιό όσο και το μυελό στα βαρύτερα στάδια της νόσου. Επομένως μπορεί κανείς να υποθέσει ότι ο αυξημένος βαθμός κυτταρικού πολλαπλασιασμού σχετίζεται με την εξέλιξη της νόσου προς βαρύτερα στάδια και πιθανόν με χειρότερη πρόγνωση αφού τα βαρύτερα στάδια της νόσου (IIB+III) σχετίζονται με χειρότερη πρόγνωση και μάλιστα αποτελούν και ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα. Εδώ πρέπει να επισημάνουμε ότι μιλώντας για χειρότερη πρόγνωση εννοούμε τη μειωμένη συχνότητα εμφάνισης πλήρους σταθερής ύφεσης (Jaretzki A, et al, 2000). Μία προηγούμενη μελέτη (Comin CE, et al, 2004) αναφέρει ότι δεν ανιχνεύθηκε συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του Ki67 με τα χαρακτηριστικά της μυασθένειας. Όμως οι συγγραφείς αυτοί μελέτησαν την έκφραση του αντιγόνου Ki67 σε αριθμό επιθηλιακών όγκων του θύμου ορισμένοι από τους οποίους συνοδεύονταν από μυασθένεια και δεν περιέλαβαν στη μελέτη περιπτώσεις μυασθένειας που σχετίζονταν με υπερπλασία ή ατροφία του θύμου. Επίσης δεν κατεγράφη καμία

σχέση μεταξύ της έκφρασης των PCNA και Ki67 με την κλινική κατάσταση των ασθενών μετά τη θυμεκτομή όπως αυτή περιγράφηκε νωρίτερα. Προηγούμενη μελέτη σε επιθηλιακούς όγκους του θύμου έχει δείξει ότι η υψηλότερη έκφραση του Ki-67 σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση (Comin CE, et al, 2004, Pitch A, et al, 1996). Στη δική μας μελέτη τέσσερις ασθενείς απεβίωσαν 1.5, 86, 126 και 132 μήνες μετά τη θυμεκτομή και οι υπόλοιποι επέζησαν. Δεν κατεγράφη καμία διαφορά όσον αφορά την έκφραση των δεικτών PCNA και Ki67 στους ασθενείς που απεβίωσαν και σε αυτούς που επέζησαν.

Επιπλέον τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής έδειξαν αύξηση του αποπτωτικού δείκτη α) στα προχωρημένα στάδια της νόσου και β) στις περιπτώσεις βαρείας μυασθένειας που συνοδεύουν το καρκίνωμα σε σύγκριση με τα θυμώματα και τη θυμική υπερπλασία. Τέλος, κατεγράφη θετική συσχέτιση μεταξύ του βαθμού απόπτωσης (αποπτωτικός δείκτης) και του βαθμού κυτταρικού πολλαπλασιασμού (δείκτης Ki67). Ο ρόλος και η σημασία των αποπτωτικών μηχανισμών στην εξέλιξη, πρόγνωση και θεραπεία της βαρείας μυασθένειας δεν έχει ακόμη πλήρως αποσαφηνισθεί. Η αναστολή της αποπτωτικής διαδικασίας οδηγεί στην επιμήκυνση του κύκλου ζωής των κυττάρων και έτσι πιθανόν αποτελεί ένα από τους μηχανισμούς μέσω των οποίων οι αυτοαντιδραστικοί κυτταρικοί επαγωγείς μεγεθύνουν το αποτέλεσμα της δράσης τους στα κύτταρα. Η εξέλιξη της βαρείας μυασθένειας προς τα βαρύτερα στάδια μπορεί να αποδοθεί σε πιθανή υψηλότερη ενεργοποίηση ή μικρότερη αναστολή της αποπτωτικής διαδικασίας.

Τέλος, στην παρούσα μελέτη, στους μάρτυρες η πρωτεΐνη p53 δεν ανιχνεύθηκε ούτε στον μυελό ούτε στον φλοιό. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με προηγούμενη μελέτη (Gilhus NE, et al, 1995) και πιθανόν οφείλεται στο γεγονός ότι τα επίπεδα του p53 στο φυσιολογικό θύμο να είναι τόσο χαμηλά ώστε να μην είναι

ανιχνεύσιμα (Gilhus NE, et al, 1995). Στους ασθενείς με μυασθένεια και συνοδό υπερπλασία ή ατροφία του θύμου ή θύμωμα το p53 ανιχνεύθηκε τόσο στο μυελό όσο και στον φλοιό. Η έκφραση του p53 ήταν υψηλότερη στις τρεις περιπτώσεις καρκινώματος σε σύγκριση με τις περιπτώσεις θυμώματος και υπερπλασίας/ατροφίας. Η αυξημένη έκφραση του p53 σε μη νεοπλασματικές και νεοπλασματικές καταστάσεις μπορεί να αποδοθεί σε μεταλλάξεις του γονιδίου (Marshall CJ, 1991, Iggo R, et al, 1990). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης (δηλ. η μεγαλύτερη έκφραση του p53 στα καρκινώματα σε σχέση με τα θυμώματα) είναι σε μερική συμφωνία με προηγούμενες μελέτες (Comin CE, et al., Tomita M, et al, 2002, Kuo TT, et al, 1998, Pitch A, et al, 1996). Αυτές έδειξαν ότι σε επιθηλιακούς όγκους του θύμου η υψηλότερη έκφραση του p53 συσχετίσθηκε με χειρότερο ιστολογικό τύπο. Από την άλλη πλευρά όμως τα αποτελέσματα της μελέτης ήταν σε αντίθεση με άλλη προηγούμενη μελέτη η οποία αναφέρει ότι η έκφραση του p53 σε θυμώματα δεν σχετίζεται με τους ιστολογικούς υπότυπους (Chen FF, et al, 1996). Φαίνεται τελικά ότι η έκφραση του p53 στις περιπτώσεις μυασθένειας που συνοδεύεται από επιθηλιακούς όγκους του θύμου (θύμωμα-καρκίνωμα) σχετίζεται εμμέσως και με χειρότερη πρόγνωση (όσον αφορά την επιβίωση) αφού είναι γνωστό ότι το καρκίνωμα του θύμου (θύμωμα τύπου Β3-όπως οι όγκοι που περιελήφθησαν στη δική μας μελέτη) έχει χειρότερη πρόγνωση από το θύμωμα (θύμωμα τύπου Β1/Β2) (Rosai J, 2004). Στη δική μας μελέτη τέσσερις ασθενείς απεβίωσαν 1.5, 86, 126 και 132 μήνες μετά τη θυμεκτομή και οι υπόλοιποι επέζησαν-ενώ δεν κατεγράφη καμία διαφορά στη έκφραση του p53 στους ασθενείς που απεβίωσαν σε σχέση με αυτούς που επέζησαν. Επομένως δεν υπήρξε καμία σχέση μεταξύ της έκφρασης του p53 με την πρόγνωση των ασθενών όσον αφορά την επιβίωση. Το εύρημα αυτό είναι σε μερική συμφωνία με ορισμένες προηγούμενες

μελέτες (Comin CE, et al, 2004, Chen FF, et al, 1996) και σε αντίθεση με άλλες (Pitch A, et al, 1996). Αναφέρουμε «μερική» συμφωνία ή διαφωνία διότι οι προηγούμενες μελέτες περιλαμβάνουν μόνο επιθηλιακούς όγκους του θύμου ορισμένοι εκ των οποίων συνοδεύονται από μυασθένεια και δεν περιλαμβάνουν καθόλου περιπτώσεις υπερπλασίας ή ατροφίας του θύμου που συνοδεύουν μυασθένεια και εκεί έγκειται ο διαφορετικός σχεδιασμός της παρούσας μελέτης.

Επιπροσθέτως στην παρούσα μελέτη υπήρχε τάση για υψηλότερη έκφραση του p53 προς τα βαρύτερα στάδια της μυασθένειας. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με προηγούμενη μελέτη (Comine CE, et al, 2004) η οποία αναφέρει ότι δεν ανιχνεύθηκε συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του p53 και των χαρακτηριστικών της μυασθένειας. Όμως οι συγγραφείς αυτοί μελέτησαν την έκφραση του αντιγόνου p53 σε αριθμό επιθηλιακών όγκων του θύμου ορισμένοι μόνο από τους οποίους συνοδεύονταν από μυασθένεια και δεν περιέλαβαν στη μελέτη περιπτώσεις μυασθένειας που σχετίζονταν με υπερπλασία ή ατροφία του θύμου. Στην παρούσα μελέτη δεν κατεγράφη καμία συσχέτιση μεταξύ έκφραση του p53 και του μεγέθους και βάρους του θύμου. Επίσης δεν παρατηρήθηκε καμία σχέση μεταξύ έκφρασης του p53 και της κλινικής κατάσταση των ασθενών με μυασθένεια μετά τη θυμεκτομή όπως αυτή περιγράφηκε νωρίτερα. Από την άλλη πλευρά όμως κατεγράφη ευθεία συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του p53 και του bax, χωρίς όμως να υπάρξει ανάλογη συσχέτιση με την αναλογία bax/bcl-2 (η οποία και απετέλεσε ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη της κλινικής κατάστασης των ασθενών), ή τον αποπτωτικό δείκτη. Φαίνεται λοιπόν από την παρούσα μελέτη ότι το p53 δεν συμμετέχει στην εξέλιξη της μυασθένειας προς βαρύτερα στάδια μέσω ρύθμισης της απόπτωσης. Βέβαια αυτό χρειάζεται περαιτέρω μελέτη με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών που πάσχουν από μυασθένεια.

Συμπερασματικά η μελέτη αυτή εισηγείται ότι σε ασθενείς με βαρεία μυασθένεια οι οποίοι υπέστησαν τροποποιημένη μεγίστη θυμεκτομή, εμφάνισαν σε υψηλό ποσοστό (95%) βελτίωση των συμπτωμάτων της νόσου μετά την επέμβαση, και ότι η κλινική έκβαση των μυασθενικών ασθενών μετά την μεγίστη τροποποιημένη θυμεκτομή εξαρτάται από κλινικούς και μοριακούς παράγοντες. Πιο συγκεκριμένα, η κλινική κατάσταση των ασθενών μετά τη θυμεκτομή εξαρτάται: α) από το χρόνο ο οποίος μεσολάβησε από την έναρξη των συμπτωμάτων της μυασθένειας έως τη θυμεκτομή (οι ασθενείς οι οποίοι υπέστησαν θυμεκτομή σε χρόνο μικρότερο του ενός έτους από την εμφάνιση της νόσου εμφανίζουν πιο συχνά πλήρη σταθερή ύφεση β) από το στάδιο της νόσου (οι ασθενείς με στάδια I+IIA εμφανίζουν πιο συχνά πλήρη σταθερή ύφεση σε σχέση με αυτούς με στάδια IIB+III) και γ) από την τιμή της αναλογίας bax/bcl-2 (αυτοί που έχουν τιμή μικρότερη του 1 εμφανίζουν πιο συχνά πλήρη σταθερή ύφεση σε σχέση με τιμή άνω του 1). Βάσει του αυξημένου ενδιαφέροντος για την πρόγνωση της μυασθένειας (Jaretzki A, et al, 2000), οι μοριακοί δείκτες που παρουσιάζονται εδώ πιθανόν να βοηθήσουν στην περαιτέρω κατανόηση της αιτιοπαθογένειας της νόσου και να παρέχουν πρόσθετες σημαντικές πληροφορίες που αφορούν την πρόγνωση δηλ. την κλινική κατάσταση των μυασθενικών ασθενών μετά την τροποποιημένη μεγίστη θυμεκτομή. Πάντως, χρειάζεται επιπλέον έρευνα η οποία θα έχει ως στόχο να καταδείξει εκείνους τους συγκεκριμένους δείκτες οι οποίοι θα παρέχουν με ασφάλεια πληροφορίες για τα μακρόχρονα αποτελέσματα της χειρουργικής θεραπείας στη μυασθένεια.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός: Σήμερα η θυμεκτομή αποτελεί ευρέως αποδεκτή θεραπευτική μέθοδο για τη βαρεία μυασθένεια (ΒΜ). Επιπλέον η απόπτωση πιστεύεται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της ΒΜ. Ο σκοπός αυτής της εργασίας ήταν η μελέτη της έκφρασης των δεικτών bcl-2, bcl-x, bax, Fas, Fasl (αποπτωτικές ογκοπρωτεΐνες), PCNA και Ki67 (δείκτες κυτταρικού πολλαπλασιασμού) και p53 (ογκοκατασταλτικό γονίδιο) σε παρασκευάσματα θυμεκτομών από ασθενείς με ΒΜ, και η συσχέτιση αυτής της έκφρασης με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους και την κλινική κατάσταση των ασθενών μετά τη θυμεκτομή. **Ασθενείς και Μέθοδοι:** Η μελέτη περιέλαβε 46 ασθενείς (17 άνδρες και 29 γυναίκες με μέση ηλικία 36.60±16.09 έτη) με ΒΜ, οι οποίοι υπεβλήθησαν σε τροποποιημένη ριζική θυμεκτομή. Η κλινική σταδιοποίηση (ταξινόμηση κατά Osserman) πριν τη θυμεκτομή έδειξε ότι 5 ασθενείς ήταν σταδίου Ι, 21 ΙΙΑ, 17 ΙΙΒ και 3 σταδίου ΙΙΙ. Η ιστοπαθολογική εξέταση του θύμου έδειξε την παρουσία υπερπλασίας σε 26 περιπτώσεις, ατροφίας σε 8, θυμώματος σε 9 και θυμικού καρκινώματος σε 3 περιπτώσεις. Σε τομές παραφίνης, εφαρμόσθηκαν α) η ανοσοϊστοχημική μέθοδος στρεπταβιδίνης-βιοτίνης περοξειδάσης για τα αντισώματα εναντίον των bcl-2, bax, bcl-x, Fas, Fasl, PCNA, Ki67 και p53, β) η μέθοδος in situ υβριδισμού με ιχνηθέτες σημασμένους με διγοξιγενίνη για τους δείκτες bcl-2, bax, bcl-x, Fas και Fasl και γ) η μέθοδος in situ υβριδισμού TUNEL για την εκτίμηση του αποπτωτικού δείκτη (ΔΑΣ). Τα αποτελέσματα εκφράσθηκαν μετά από μορφομετρική ανάλυση και συσχετίσθηκαν με τις κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους. Η αναλογία bax/bcl-2 (στα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης) καθορίσθηκε για κάθε δείγμα, διαιρώντας τα %bax (+) κύτταρα με τα % bcl-2 (+) κύτταρα. Η κλινική κατάσταση των ασθενών

αξιολογήθηκε σε χρονικό διάστημα 39-166 (διάμεσος 86) μηνών μετά τη θυμεκτομή. Κατά τη στιγμή της αξιολόγησης και σύμφωνα με διεθνή κριτήρια (Jaretzki A, et al, Neurology 55:16, 2000) οι ασθενείς διαχωρίστηκαν ως εξής: ομάδα Α: πλήρης σταθερή ύφεση, ομάδα Β: φαρμακολογική ύφεση+ελάχιστες εκδλώσεις+βελτίωση+επιδείνωση. **Αποτελέσματα**: Η αξιολόγηση της κλινικής κατάστασης ήταν δυνατή σε 39/46 ασθενείς. Σύμφωνα με τα προαναφερθέντα κριτήρια 13/39 ασθενείς ανήκαν στην ομάδα Α και 26/39 στην ομάδα Β. Η ανάλυση απλής μεταβλητής απεκάλυψε ότι οι κλινικοί παράγοντες που σχετίζονται με πιο συχνή εμφάνιση πλήρους σταθερής ύφεσης είναι: η νεαρότερη ηλικία των ασθενών κατά τη θυμεκτομή, ο μικρότερος χρόνος που μεσολαβεί μεταξύ της έναρξης των συμπτωμάτων της νόσου και της θυμεκτομής (μικρότερος του έτους) και το ηπιότερο στάδιο της νόσου (I και IIA vs. IIB+III). Όμως η ανάλυση κατά Cox απεκάλυψε ότι μόνο ο μικρότερος χρόνος που μεσολαβεί μεταξύ της έναρξης των συμπτωμάτων της νόσου και της θυμεκτομής (μικρότερος του έτους) και το ηπιότερο στάδιο της νόσου (I και IIA vs. IIB+III) αποτελούν ανεξάρτητους προγνωστικούς παράγοντες (95% CI:0.043-6.50, p=0.01 **και** 95% CI:1.023-4.529, p=0.043, αντιστοίχως). Η έκφραση του bcl-2 ήταν υψηλότερη στις περιπτώσεις υπερπλασίας και θυμώματος σε σχέση με τα θυμικά καρκινώματα ($p<0.001$). Υψηλότερη έκφραση στα καρκινώματα σε σύγκριση με τα θυμώματα και τις περιπτώσεις υπερπλασίας κατεγράφη για τους δείκτες bax ($p<0.001$), PCNA, Ki67 ($p<0.001$), Fas, Fasl, p53 και ΔΑΣ ($p<0.001$). Επιπροσθέτως, αυτοί οι δείκτες εμφάνισαν υψηλότερη έκφραση προς τα βαρύτερα στάδια της νόσου. Η έκφραση του bcl-x δεν έδειξε καμία συσχέτιση με τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά του θύμου ή τα χαρακτηριστικά της ΒΜ. Η αναλογία bax/bcl-2 (στο επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης) ήταν αυξημένη προς τα βαρύτερα στάδια της νόσου (+370% για το mRNA και +391% για την πρωτεΐνη, από

το στάδιο Ι προς το στάδιο ΙΙΙ). Όλες οι 13 περιπτώσεις της ομάδας Α είχαν αναλογία bax/bcl-2 <1, ενώ όλες οι 26 περιπτώσεις της ομάδας Β είχαν αναλογία >1. Η στατιστική ανάλυση απεκάλυψε: Α) θετική συσχέτιση των bax(+) κυττάρων με το στάδιο της ΒΜ ($p<0.001$), του ΔΑΣ και των %Ki67(+) κυττάρων με το στάδιο της ΒΜ ($p<0.001$, αντίστοιχα), %Ki67(+) και %bax(+) κυττάρων με τον ΔΑΣ($p<0.05$), %p53(+) και %bax(+) κυττάρων ($p<0.05$), και Β) ανάστροφη συσχέτιση μεταξύ των %bcl-2(+) κυττάρων και του σταδίου της ΒΜ ($p<0.05$). Οι καμπύλες επιβίωσης Kaplan Meier έδειξαν υψηλότερο διάστημα ελεύθερο νόσου, στην ομάδα Α ($p<0.01$). Η ανάλυση κατά Cox απεκάλυψε ότι η τιμή της αναλογίας bax/bcl-2 αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα (95% CI:1.078-44.073, $p=0.041$). **Συμπεράσματα**: Η παρούσα μελέτη δείχνει ότι **α)** ασθενείς με βαρεία μυασθένεια που υπέστησαν τροποποιημένη μεγίστη θυμεκτομή εμφάνισαν σε υψηλό ποσοστό (95%) βελτίωση των συμπτωμάτων της νόσου μετά την επέμβαση, και **β)** η κλινική έκβαση των μυασθενικών ασθενών μετά την μεγίστη τροποποιημένη θυμεκτομή εξαρτάται από κλινικούς και μοριακούς παράγοντες. Σε αυτή τη μελέτη, η έκφραση των διαφόρων μοριακών δεικτών (bcl-2, bax, bcl-x, PCNA, Ki67, p53) και του αποπτωτικού δείκτη συσχετίσθηκε θετικά ή αρνητικά με τα μικροσκοπικά ευρήματα του θύμου. Αυξημένος βαθμός απόπτωσης και κυτταρικού πολλαπλασιασμού συνοδεύει τα βαρύτερα στάδια της νόσου. Η ανάλυση κατά Cox απεκάλυψε ότι ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες για την κλινική κατάσταση των ασθενών μετά τη θυμεκτομή, είναι το μικρότερο χρονικό διάστημα μεταξύ έναρξης της νόσου και θυμεκτομής, το ηπιότερο στάδιο και η τιμή της αναλογίας bax/bcl-2 <1. Επιπλέον έρευνα χρειάζεται, η οποία θα έχει ως στόχο να καταδείξει εκείνους τους συγκεκριμένους δείκτες οι οποίοι θα παρέχουν με ασφάλεια πληροφορίες για τα μακρόχρονα αποτελέσματα της χειρουργικής θεραπείας στη μυασθένεια.

ABSTRACT

Objective: Today thymectomy is a widely accepted therapeutic option for myasthenia gravis (MG). On the other hand apoptosis seems to play a significant role in progress of MG. The aim of this study was to evaluate bcl-2, bcl-x, bax, Fas, Fasl (apoptotic oncoproteins), PCNA and Ki67 (cell proliferation markers) and p53 (tumor suppressor gene) expression in thymus from patients with myasthenia gravis (MG) and to determine the potential correlation with clinicopathologic parameters and the clinical response after thymectomy. **Patients and Methods**: The study included 46 patients (17 males, 29 females; mean age 36.60±16.09 years) with MG who underwent modified maximal thymectomy. Clinical staging (Osserman classification) included stage I in five, IIA in 21, IIB in 17 and III in three. Microscopic examination of thymus showed thymic hyperplasia in 26, atrophy in eight, thymoma in nine and thymic carcinoma in three cases. On paraffin sections, the streptavidin–biotin technique, using antibodies to bcl-2, bax, bcl-x, Fas, Fasl, PCNA, Ki67 and p53, was employed, and in situ hybridization with digoxigenin-labeled probes to bcl-2, bax, bcl-x, Fas and Fasl was performed. In addition, the apoptotic body index (ABI) was assessed via the TUNEL method. Staining results were expressed following morphometric analysis and were correlated with clinicopathologic parameters. Bax to bcl-2 mRNA and protein ratio was determined for each sample by dividing %bax (+) cells by % bcl-2 (+) cells. Patients were followed up for 39-166 (median 86) months. At the end of the follow-up period, according to standard criteria (Jaretzki A, et al, Neurology 55:16, 2000) patients were classified as follows: group A: complete stable remission, group B: pharmacological remission+minimal manifestations+ improvement, deterioration. **Results**: Follow-up data were available on 39/46 patients.

According to the aforementioned criteria 13/39 patients belonged to group A and 26/39 to group B. ANOVA test revealed that the clinical factors correlated with more frequent development of complete stable remission were: the younger age of the patients, the shorter interval time between disease onset and thymectomy (less than a year) and the earlier stage (I και IIA vs. IIB+III) of the disease. However Cox regression analysis revealed that only the shorter interval time between disease onset and thymectomy (less than a year) and the earlier stage (I και IIA vs. IIB+III) of the disease constitute independent prognostic factors (95% CI:0.043-6.50, p=0.01 **and** 95% CI:1.023-4.529, p=0.043, respectively). Bcl-2 expression was higher in hyperplasia and thymoma cases, compared to thymic carcinomas ($p<0.001$). Higher expression in carcinomas, compared to hyperplasia and thymomas, was observed for bax ($p<0.001$), PCNA, Ki67 ($p<0.001$), Fas, Fasl, p53 and ABI ($p<0.001$). In addition these markers exhibited higher expression towards advanced stages of the disease. Bcl-x expression did not show any correlation with thymus pathology or MG features. The bax/bcl-2 mRNA and protein ratios were increased towards advanced disease stages (+370% for mRNA and +391% for protein, from MG stage I to stage III). All the 13 cases of group A had a bax/bcl-2 ratio<1, whereas all the 26 cases of group B had a ratio>1.Statistical analysis demonstrated: A) positive correlation of bax(+) cells with MG stage ($p<0.001$), ABI and %Ki67(+) cells with MG stage ($p<0.001$, respectively), %Ki67(+) and %bax(+) cells with ABI ($p<0.05$), %p53(+) and %bax(+) cells ($p<0.05$), and B) reverse correlation between %bcl-2(+) cells and MG stage ($p<0.05$). The Kaplan Meier survival curve showed higher percentage of complete stable remission in group A ($p<0.01$). Cox regression analysis revealed that the bax/bcl-2 ratio constituted independent prognostic factor (95% CI:1.078-44.073, p=0.041). **Conclusions**: This study shows a) that patients with MG who underwent

modified maximal thymectomy for treatment developed improvement in 95% of the cases and b) that the prognosis of these patients depends on clinical and molecular factors. The expression of the several molecular markers included in this study (bcl-2, bax, bcl-x, PCNA, Ki67, p53) and the apoptotic index correlates positively or reversibly with the microscopic findings of thymus. Increased apoptosis and proliferation accompany advanced disease stage. Cox regression revealed that independent prognostic factors for therapeutic response after thymectomy are the shorter time interval between disease onset and thymectomy, the earlier stage and the bax/bcl-2 ratio<1. More extensive studies are needed in order to use these markers in the design and selection of the proper therapeutic modality in such cases.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Aarli JA. Late onset myasthenia gravis, a changing scene. Arch Neurol 1999;56:25-27.
2. Aarli JA, Stefanson K, Marton LSG, Wollman RL. Patients with myasthenia gravis and thymoma have in their sera IgG antibodies against titin. Clin Exp Immunol 1990;82:284–288.
3. Abbas L. Synapse formation: let's stick together. Curr Biol 2003; 13:R25-R27.
4. Akao Y, Otsuki Y, Kataoka S, Ito Y, Tsujimoto Y. Multiple subcellular localization of bcl 2: Detection in nuclear outer membrane, endoplasmic reticulum membrane, and mitochondrial membranes. Cancer Res 1994;54:2468–2471.
5. Allison AC, Eugui EM. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. Immunopharmacology 2000;47:85-118.
6. Antozzi C. Myasthenia gravis and myasthenic syndrome. Neurol Sci 2003;24:S260-S263.
7. Αποστολάκης Σ, Δουγένης Δ. Θυμεκτομή: Η χειρουργική θεραπεία της βαρείας μυασθένειας. Στο: Αγγειακά Εγκεφαλικά Επεισόδια-Βαρεία Μυασθένεια, Πρακτικά 12ης Μετεκπαιδευτικής Ημερίδας Νευρολογικής Κλινικής, Πάτρα 14 Φεβρουαρίου 2004, σελ.95-112.
8. Aragones JM, Bolibar I, Bonfill X, Bufill E, Mummany A, Alonso F, Illa I. Myasthenia gravis: a higher than expected incidence in the elderly. Neurology 2003; 60:1024-1026.
9. Arber S, Burden SJ, Harris AJ. Patterning of skeletal muscle. Curr Opin Neurobiol 2002;12:100–103.
10. Arsura EL, Bick A, Brunner NG, Namba T, Grob D. High-dose intravenous immunoglobulin in the management of myasthenia gravis. Arch Intern Med 1986;146:1365-1368.
11. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. Science 1998;281:1305-1308.
12. Barnes PJ. Molecular mechanisms of corticosteroids in allergic diseases. Allergy 2001;56:928-936.
13. Bayry J, Thirion M, Misra N, Thorenoor N, Delignat S, Lacroix-Desmazes S, Bellon B, Kaveri S, Kazatchkine MD. Mechanisms of action of intravenous immunoglobulin in autoimmune and inflammatory diseases. Neurol Sci 2003; 24:S217-S221.
14. Beekman R, Kuks JBM, Oosterhuis HJGH. Myathenia gravis: diagnosis and follow-up of 100 consecutive patients. J Neurol 1997;244:112-118.
15. Beghi E, Antozzi C, Batocchi AP, Cornelio F, Cosi V, Evoli A, Lombardi M, Mantegazza R, Monticelli ML, Piccolo G, et al. Prognosis of myasthenia gravis: a multicenter follow-up study of 844 patients. J Neurol Sci 1991;106:213-220.
16. Beroukhim R, Unwinn N. Three dimenshional location of the main immunogenic region of the acetylcholine receptor. Neuron 1995;15:323-331.
17. Bever CT Jr., Aquino AV, Penn AS, Lovelace RE, Rowland LP. Prognosis of ocular myasthenia. Ann Neurol 1983;14:516-519.
18. Bissonnette RP, Echeverri F, Mahboubi A, Green DR. Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. Nature 1992;359:552-554.
19. Boise LH, Gonzalez Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nunez G, Thompson CB. Bcl x, a bcl 2 related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. Cell 1993;74:597–608.

20. Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. Cell 1996;85:803-815.
21. Boonyapisit K, Kaminski HJ, Ruff RL. The molecular basis of neuromuscular transmission disorders. Am J Med 1999;106:97–113
22. Brady HJ, Gil Gomez G. The cell cycle and apoptosis. ResultsProbl Cell Differ 1999;23:127–144.
23. Brannagan TH. Intravenous gammaglobulin (IVIg) for the treatment of CIDP and related immune-mediated neuropathies. Neurology 2002;59:S33-S40.
24. Brejc K, van Dijk WJ, Klaassen RV, Schuurmans M, van Der Oost J, Smit AB, Sixma TK. Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. Nature 2001;411:269–276.
25. Bril V, Kojic J, Ilse WK, Cooper JD. Long-term clinical outcome after transcervical thymectomy for myasthenia gravis. Ann Thorac Surg. 1998;65:1520-1522.
26. Brown DC, Gatter KC. Ki67 protein: the immaculate deception? Histopathology 2002;40:2-11.
27. Cairns JS, Mainwaring MS, Cacchione RN, Walker JA, McCarthy SA. Regulation of apoptosis in thymocytes. Thymus 1993;21:177–193.
28. Case JP. Old and new drugs used in rheumatoid arthritis: a historical perspective. Part 1: the older drugs. Am J Ther 2001;8:123-143.
29. Chaudhry V, Cornblath DR, Ghriffin JW, O' Brien R, Drachman DB. Mycophenolate mofetil: a safe and promising immunosuppressant in neuromuscular diseases. Neurology 2001;56:94-96.
30. Chen FF, Yan JJ, Jin YT, Su IJ. Detection of bcl-2 and p53 in thymoma: expression of bcl-2 as a reliable marker of tumor aggressiveness. Hum Pathol 1996;27:1089-1092.
31. Chen JJ, Sun Y, Nabel GJ. Regulation of the pro-inflammatory effects of Fas ligand (CD95L). Science 1998;282:1714–1717.
32. Chen WH, Chiu HC, Hseih RP. Association of HLA-Bw46DR9 combination with juvenile myasthenia gravis in Chinese. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1993;56(4):382-385.
33. Cheng EH, Levine B, Boise LH, Thompson CB, Hardwick JM. Bax-independent inhibition of apoptosis by Bcl-XL. Nature 1996;379:554-556.
34. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. Cell 1995;81:505-512.
35. Chow SC, Weis M, Kass GE, Holmstrom TH, Eriksson JE, Orrenius S. Involvement of multiple proteases during Fas mediated apoptosis in T lymphocytes. FEBS Lett. 1995;364:134–138.
36. Ciafaloni E, Massey JM, Tucker-Lipscomb B, Sanders DB. Mycophenolate mofetil for myasthenia gravis: an open-label pilot study. Neurology 2001;56:97-99.
37. Ciafaloni E, Nikhar NK, Massey JM, Sanders DB. Retrospective analysis of the use of cyclosporine in myasthenia gravis. Neurology 2000;55:448-450.
38. Cleary ML, Sklar J. Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. Proc Natl Acad Sci USA 1985;82:7439-7443.

39. Cohen JJ. Programmed cell death in the immune system. Adv Immunol 1991; 50:55–85.
40. Cohen JJ. Apoptosis. Immunol Today 1993;14:126-130.
41. Cohen GM, Sun XM, Snowden RT, Dinsdale D, Skilleter DN. Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. BiochemJ 1992;286:331–334.
42. Comin CE, Messerini L, Novelli L, Boddi V, Dini S. Ki67 antigen expression predicts survival and correlates with histologic subtype in the WHO classification of thymic epithelial tumors. Int J Surg Pathol 2004;12:395-400.
43. Compston DAS, Vincent A, Newsom-Davis J, Batchelor JR. Clinical, pathological, HLA antigen, and immunological evidence for disease heterogeneity in myasthenia gravis. Brain1980;103:579-601.
44. Conti-Fine B, Bellone M, Howard JJ, Protti M. Myasthenia Gravis: The Immunobiology of an Autoimmune Disease. Georgetown, TX: Neuroscience Intelligence Unit, R.G. Landes; 1997
45. Conti-Fine BM, Kaminski HJ. Autoimmune neuromuscular transmission disorders: myasthenia gravis and Lambert-Eaton myasthenic syndrome. Continuum 2001;7:56–93.
46. Corey AL, Richman DP, Agius MA, Wollmann RL. Refractoriness to a second episode of experimental myasthenia gravis. Correlation with AChR concentration and morphologic appearance of the postsynaptic membrane. J Immunol 1987;138:3269–3275.
47. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. Nature Rev Cancer 2002;2:647-656.
48. Cummings MC, Winterford CM, Walker NI. Apoptosis. Am J Surg Pathol 1997;21:88-101.
49. Dadmanesh F, Sekihara T, Rosai J. Histologic typing of thymoma according to the New World Health Organization classification. Chest Surgery Clinics of North America 2001;11:407-420.
50. Dalakas M. Mechanisms of action of IVIg and therapeutic considerations in the treatment of acute and chronic demyelinating neuropathies. Neurology 2002; 59:S13-S21.
51. DeFilippi VJ, Richman DP, Ferguson MK. Transcervical thymectomy for myasthenia gravis. Ann Thorac Surg 1994;57:194–197.
52. De Feo LG, Schottlender J, Martelli N, Molfino NA. Use of Intravenous Pulsed Cyclophosphamide in Severe, Generalized Myasthenia Gravis. Muscle Nerve 2002;26:31-36.
53. De Maria R, Testa U, Luchetti L, Zeuner A, Stassi G, Pelosi E, Riccioni R, Felli N, Samoggia P, Peschle C. Apoptotic role of Fas/Fas ligand system in the regulation of erythropoiesis. Blood 1999;93:796–803.
54. Dietrich JB. Apoptosis and anti apoptosis genes in the Bcl 2 family. Arch Physiol Biochem 1997;105:125–135.
55. Doglioni C, Dei Tos AP, Laurino L, Chiarelli C, Barbareschi M, Viale G. The prevalence of bcl-2 immunoreactivity in breast carcinomas and its clinicopathological correlates, with particular reference to estrogen receptor status. Virchows Archiv 1994;424:47–51.
56. Donaldson DH, Ansher M, Horan S, Rutherford RB, Ringel SP. The relationship of age to outcome in myasthenia gravis. Neurology 1990;40:786-790.

57. Drachman DB, McIntosh KR, Reim J, Balcer L. Strategies for treatment of myasthenia gravis. Myasthenia gravis and related disorders. Ann N Y Acad Sci 1993;681:515-528.
58. Eibl MM. Intravenous immunoglobulins in neurological disorders: safety issues. Neurol Sci 2003;24:S222-S226.
59. Elion GB. Significance of azathioprine metabolites. Proc R Soc Med 1972;65:257-260.
60. Engel AG. Anatomy and molecular architecture of the neuromuscular junction. In: Engel AG, ed. Myasthenia Gravis and Myasthenic Disorders. Oxford: Oxford University Press; 1999, pp:3–39.
61. Engel AG, Lambert EH, Howard FM. Immune complexes (IgG and C3) at the motor end-plate in myasthenia gravis. Ultrastructure and light microscopic localization and electrophysiological correlations. Mayo Clin Proc 1977;52:267–280.
62. Evoli A, Batocchi AP, Minisci C, DiShino C, Tonali P. Therapeutic options in ocular myasthenia gravis. Neuromuscul Disord 2001;11:208–216
63. Evoli A, Tonali PA, Padua L, Monaco ML, Scuderi F, Batocchi AP, Marino M, Bartoccioni E. Clinical correlates with anti-MuSK antibodies in generalized seronegative myasthenia gravis. Brain 2003;126:2304–2311.
64. Fadeel B, Zhivotovsky B, Orrenius S. All along the watchtower: On the regulation of apoptosis regulators. FASEB J 1999;13:1647–1657.
65. Feldmann G. Apoptosis. Ann Pharm Fr 1999; 57: 291–308.
66. Fesus L, Davies PJ, Piacentini M. Apoptosis: Molecular mechanisms in programmed cell death. Eur J Cell Biol 1991;56:170–177.
67. Fiers W, Beyaert R, Declercq W, Vandenabeele P. More than one way to die: Apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. Oncogene 1999;18:7719–7730.
68. Frebourg T, Barbier N, Yan YX, Garber JE, Dreyfus M, Fraumeni J Jr, Li FP, Friend SH. Germ-line *p53* mutations in 15 families with Li-Fraumeni syndrome. Am J Hum Genet 1995;56:608-615.
69. Fridman JS, Benedict MA, Maybaum J. bcl-X(S)-induced cell death in 3T3 cells does not require or induce caspase activation. Cancer Res 1999;59:5999-6004.
70. Fridman JS, Parsels J, Rehemtulla A, Maybaum J. Cytochrome c depletion upon expression of Bcl-XS. J Biol Chem 2001;276:4205-4210.
71. Frist WH, Thirumalai S, Doehring CB, Merrill WH, Stewant JR, Fenichel GM, et al. Thymectomy for the myasthenia gravis patient: factors influencing outcole. Ann Thorac Surg 1994;57:334-338.
72. Fujii N, Itoyama Y, Goto I. Increase in differentiated type of T lineage cells in the myasthenic thymus: two-color fluorocytometric analysis. Ann Neurol 1990;27:642–646.
73. Gajdos P, Chevret S, Clair B, Tranchant C, Chastang C. Clinical trial of plasma exchange and high-dose intravenous immunoglobulin in myasthenia gravis. Myasthenia Gravis Clinical Study. Ann Neurol 1997;41:789-796.
74. Gajdos P, Chevret S, Toyka K. Plasma exchange for myasthenia gravis. Cochrane Database Syst Rev 2002;4:CD002275.
75. Gajdos P, Chevret S, Toyka K. Intravenous immunoglobulin for myasthenia gravis. Cochrane Database Syst Rev 2003;2:CD002277.

76. Gautam M, Noakes PG, Moscoso L, Rupp F, Scheller RH, Merlie JP, Sanes JR. Defective neuromuscular synaptogenesis in agrin-deficient mutant mice. Cell 1996;85:525–535.
77. Gil Gomez G, Berns A, Brady HJ. A link between cell cycle and cell death: Bax and Bcl 2 modulate Cdk2 activation during thymocyte apoptosis. EMBO J 1998; 17:7209–7218.
78. Gilhaus NE, Jones M, Turley H, Gatter KC, Nagvekar N, Newsom-Davis J, Willcox N. Oncogene proteins and proliferation antigens in thymomas: increased expression of epidermal growth factor receptor and Ki67 antigen. J Clin Pathol 1995;48: 447–455.
79. Glass DJ, Bowen DC, Stitt TN, Radziejewski C, Bruno J, Ryan TE, Gies DR, Shah S, Mattsson K, Burden SJ, DiStefano PS, Valenzuela DM, DeChiara TM, Yancopoulos GD.Agrin acts via a MuSK receptor complex. Cell 1996;85:513–523.
80. Golstein P, Ojcius DM, Young JD. Cell death mechanisms and the immune system. Immunol Rev 1991;121:29–65.
81. Gomez CM, Richman DP. Monoclonal anti-acetylcholine receptor antibodies with differing capacities to induce experimental autoimmune myasthenia gravis. J Immunol 1985;135: 234–241.
82. Gonzalez-Garcia M, Perez-Ballestero R, Ding L, Duan L, Boise LH, Thompson CB, Nunez G. bcl-XL is the major bcl-x mRNA form expressed during murine development and its product localizes to mitochondria. Development 1994;120:3033-3042.
83. Gottschalk AR, Boise LH, Thompson CB, Quintans J. Identification of immunosuppressant-induced apoptosis in a murine B-cell line and its prevention by bcl-x but not bcl-2. Proc Natl Acad Sci U S A 1994;91:7350-7354.
84. Gratiot-Deans J, Ding L, Turka LA, Nunez G. bcl-2 proto-oncogene expression during human T cell development: evidence for biphasic regulation. J Immunol 1993;151:83–91.
85. Griffith TS, Yu X, Herndon JM, Green DR, Ferguson TA. CD95-induced apoptosis of lymphocytes in an immune privileged site induces immunological tolerance. Immunity 1996;5:7–16.
86. Gronseth GS, Barohn RJ. Practice parameter: thymectomy for autoimmune myasthenia gravis (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. Neurology 2000;55:7–15.
87. Haberal M, Karakayali H, Emiroglu R, Basaran O, Moray G, Bilgin N. Malignant tumors after organ transplantation. Artif Organs 2002;26:778-781.
88. Hakem A, Sasaki T, Kozieradzki I, Penninger JM. The cyclin dependent kinase Cdk2 regulates thymocyte apoptosis. J ExpMed 1999;189:957–968.
89. Hanayama R, Hanayama R, Tanaka M, Miwa K, Shinohara A, Iwamatsu A, Nagata S. Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. Nature 2002;417:182-187.
90. Hannun YA. Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy. Blood 1997;89:1845–1853.
91. Hawkins BR, Chan-Lui WY, Choi EK, Ho AY. Strong association of HLA BW46 with juvenile onset myasthenia gravis in Hong Kong Chinese. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1984;47:555-557.

92. Herrlinger U, Weller M, Dichgans J, Melms A. Association of primary central nervous system lymphoma with long-term azathioprine therapy for myasthenia gravis. Ann Neurol 2000;47:682-683.
93. Hoch W, McConville J, Helms S, Newson-Davis J, Melms A, Vincent A. Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylocholine receptor antibodies. Nat Med 2001;7:365-368
94. Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. Nature 1990;348:334-336.
95. Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W, Nahm M, Korsmeyer SJ. Bcl-2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. Proc Natl Acad Sci USA 1991;88:6961-6965.
96. Hohlbaum AM, Moe S, Marshak-Rothstein A. Opposing effects of transmembrane and soluble Fas ligand expression on inflammation and tumor cell survival. J Exp Med 2000;191:1209–1220.
97. Hohlfeld R, Wekerle H. The thymus in myasthenia gravis. Neurol Clin 1994;12:331–342.
98. Hsu YT, Wolter KG, Youle RJ. Cytosol to membrane redistribution of Bax and Bcl X(L) during apoptosis. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94:3668–3672.
99. Huang CS, Hsu HS, Huang BS, Lee HC, Kao KP, Hsu WH, Huang MH. Factors influencing the outcome of transsternal thymectomh for myasthenia gravis. Acta Neurol Scand 2005;112:108-114.
100. Huang MH, King KL, Hsu WH, Huang BS, Hsu HK, Wang LS, Chien KY. The outcome of thymectomy in nonthymomatous myasthenia gravis. Surg Gynecol Obstet 1988;166:436-440.
101. Hughes BW, Moro De Casillas ML, Kaminski HJ. Pathophysiology of myasthenia gravis. Semin Neurol 2004;24:21-30.
102. Iggo R, Gatter K, Bartek J, Lane D, Harris AL. Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. Lancet 1990;i:675-9.
103. Inomata T, Hyodo T, Sakita K, Ninomiya H, Showji Y, Hashimoto Y, Murakata S. Influence of adrenalectomy on the developing rat thymus during peri-weaning period. Anat Histol Embryol 1993; 22: 296–299.
104. Jaretzki A, Barohn RB, Ernstoff R, Kaminski HR, Keesey JC, Penn AS, Sanders DB. Myasthenia gravis: recommendation for clinical research standards. Task Force of the Medical Scientific Advisory Board of the Myasthenia Gravis Foundation of America. Neurology 2000;55:16-23.
105. Jaretzki A 3rd, Penn AS, Younger DS, Wolff M, Olarte MR, Lovelace RE, Rowland LP. "Maximal" thymectomy for myasthenia gravis. Results. J Thorac Cardiovasc Surg 1988;95:747-757.
106. Jaretzki III A, Steinglass KM, Sonett JR. Thymectomy in the Management of Myasthenia Gravis. Seminars in Neurology 2004;24:49-62.
107. Joza N, Kroemer G, Penninger JM. Genetic analysis of the mammalian cell death machinery. Trends Genet 2002;18:142-149.
108. Kahle W, Leonhardt H, Platzer W. Θύμος, στο: Εγχειρίδιο ανατομικής του ανθρώπου, Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, Αθήνα 1985, σελ: 92-95.
109. Kalogeropoulou C, Tsota I, Zabakis P, Kourelis T, Ravazoula P, Bonikos DS, Kardamakis D, Petsas T, Tepetes K, Tsamandas AC. Alterations of Bax/Bcl-2 ratio upergulates caspase-3 and modifies apoptosis in experimental liver fibrosis. Mod Pathol. 2004;17(S1):303A.

110. Kaminski HJ. Myasthenia Gravis and Related Disorders. Totowa, NJ: Humana Press; 2003, pp:1–396.
111. Kaminski HJ. Treatment of myasthenia gravis. In: Kaminski HJ, ed. Myasthenia Gravis and Related Disorders. Totowa, NJ: Humana Press; 2003, pp:197–221
112. Kaminski HJ, Fenstermaker RA, Abdul-Karim FW, Clayman J, Ruff RL. Acetylcholine receptor subunit gene expression in thymic tissue. Muscle Nerve 1993;16:1332–1337.
113. Kaminski HJ, Ruff RL. Insights into possible skeletal muscle nicotinic acetylcholine receptor (AChR) changes in some congenital myasthenias from physiological studies, point mutations, subunit substitutions of the AChR. Ann N Y Acad Sci 1993;681:435–450.
114. Kass GE, Eriksson JE, Weis M, Orrenius S, Chow SC. Chromatin condensation during apoptosis requires ATP. Biochem J 1996; 318:749–752.
115. Keesey JC. Clinical evaluation and management of myasthenia gravis. Muscle & Nerve 2004;29:484-505.
116. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 1972;26:239-257.
117. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. Cancer 1994;73:2013-2026.
118. Kesler KA, Wright CD, Loehrer PJ. Thymoma: Current Medical and Surgical Management. Seminars in Neurology 2004;24:63-73.
119. King KL, Cidlowski JA. Cell cycle and apoptosis: Common pathways to life and death. J Cell Biochem 1995; 58:175–180.
120. Kino T, Hatanaka H, Hashimoto M, Nishiyama M, Goto T, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H, Imanaka H. FK506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. I. Fermentation, isolation and physico-chemical and biological characteristics. J Antibiot (Tokyo) 1987;40:1249-1255.
121. Kishimoto H, Sprent J. Negative selection in the thymus includes semimature T cells. J Exp Med 1997;185:263–271.
122. Kishimoto H, Sprent J. Several different cell surface molecules control negative selection of medullary thymocytes. JExp Med 1999:190:1–9.
123. Kishimoto H, Surh CD, Sprent J. A role for Fas in negative selection of thymocytes in vivo. J Exp Med 1998;187:1427–1438.
124. Koji T, Kobayashi N, Nakanishi Y, Yoshii A, Hashimoto S, Shibata Y, et al. Immunohistochemical localization of Fas antigen in paraffin sections with rabbit antibodies against human specific Fas peptides. Acta Histochem Cytochem 1994;27:459-463.
125. Konishi T, Yoshiyama Y, Takamori M, Yagi K, Mukai E, Saida T and The Japanese FK506 MG Study Group. Clinical Study of FK506 in Patients with Myasthenia Gravis. Muscle Nerve 2003;28:570-574.
126. Kornstein MJ, Brooks JJ, Anderson AO, Levinson AI, Lisak RP, Zweiman B. The immunohistology of the thymus in myasthenia gravis. Am J Pathol 1984; 117:184–194.
127. Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. Blood 1992;80:879-886.
128. Korsmeyer SJ: Bcl-2 gene family and the regulation of programmed cell death. Cancer Res 1999;59(Suppl):S1693–S1700.
129. Krajewski S, Bodrug S, Gascoyne R, Berean K, Krajewska M, Reed JC. Immunohistochemical analysis of Mcl 1 and Bcl 2 proteins in normal and neoplastic lymph nodes. Am J Pathol 1994; 145: 515–525.

130. Krajewski S, Krajewska M, Ehrmann J, Sikorska M, Lach B, Chatten J, Reed JC. Immunohistochemical analysis of bcl-2, bcl-x, mcl-1, and bax in tumors of central and peripheral nervous system origin. Am J Pathol 1997;150:805–14.
131. Krajewski S, Krajewska M, Shabaik A, Miyashita T, Wang HG, Reed JC. Immunohistochemical determination of in vivo distribution of bax, a dominant inhibitor of bcl-2. Am J Pathol 1994;145:1323–1336.
132. Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, Schibler MJ, Fenton W, Reed JC. Investigations of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum and outer mitochondrial membranes. Cancer Res 1993;53:4701-4714.
133. Kuks JB, Djojoatmodjo S, Oosterhuis HJ. Azathioprine in myasthenia gravis: observations in 41 patients and a review of literature. Neuromuscul Disord 1991; 1:423-431.
134. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Cellular Adaptations, Cell Injury, and Cell Death. In Robbins S and Cotran R. Pathologic Basis of Disease, 7th edition, Kumar V, Abbas AK, Fausto N (eds), Saunders New York, 2004, pp:3-46.
135. Kuo TT, Chan JK. Thymic carcinoma arising in thymoma is associated with alterations in immunohistochemical profile. Am J Surg Patholo 1998;22:1474-1481.
136. Kupersmith MJ, Latkany R, Homel P. Development of Generalized Disease at 2 Years in Patients with Ocular Myasthenia Gravis. Arch Neurol 2003;60:243-248.
137. Leithauser F, Dhein J, Mechtersheimer G, Koretz K, Bruderlein S, Henne C, Schmidt A, Debatin KM, Krammer PH, Moller P. Constritutive and induced expression of APO-1, a new member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor superfamily, in normal and neoplastic cells. Lab Invest 1993; 69:415-429.
138. Lennon VA. Serological diagnosis of myasthenia gravis and Lambert-Eaton myasthenic syndrome. In: Lisak RP, ed. Handbook of Myasthenia Gravis and Myasthenic Syndromes. New York: Marcel Dekker, 1994, pp:149–164.
139. Lennon VA, Seybold ME, Lindstrom JM, Cochrane C, Ulevitch R. Role of complement in the pathogenesis of experimental autoimmune myasthenia gravis. J Exp Med 1978;147:973–983.
140. Li T-J, Browne RM, Matthews JB. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 in unicystic ameloblastoma. Histopathology 1995;26:219-228.
141. Lin F, Kaminski H, Conti-Fine B, Wang W, Richmonds C, Medof M. Enhanced susceptibility to experimental autoimmune myasthenia gravis in the absence of decay-accelerating factor protection. J Clin Invest 2002;110:1269–1274.
142. Lindenboim L, Borner C, Stein R. Bcl-x(S) can form homodimers and heterodimers and its apoptotic activity requires localization of Bcl-x(S) to the mitochondria and its BH3 and loop domains. Cell Death Differ 2001;8:933-942.
143. Lindstrom J. Acetylcholine receptors and myasthenia. Muscle Nerve 2000;23:453–477
144. Lindstrom J. Acetylcholine receptor structure. In: Kaminski HJ, ed. Myasthenia Gravis and Related Disorders. Totowa, NJ: Humana Press, 2003, pp15–25.
145. Lindstrom JM, Seybold MD, Lennon VA, Whittingham S, Duane DD. Antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis: prevalence, clinical correlates, and diagnostic value. Neurology 1976;26:1054–1059.

146. Liu MC, Gelmann EP. *P53* gene mutations: case study of a clinical marker for solid tumors. Semin Oncol 2002;29:246-257.
147. Liyanage Y, Hoch W, Beeson D, Vinceny A. The agrin/muscle-specific kinase pathway: new targets for autoimmune and genetic disorders at the neuromuscular junction. Muscle Nerve 2002;25:4-16.
148. Lohmann CM, League AA, Clark WS, Lawson D, DeRose PB, Cohen C. Bcl-2: Bax and Bcl-2:Bcl-x ratios by image cytometric quantitation of immunohistochemical expression in ovarian carcinoma: correlation with prognosis. Cytometry 2000;42:61–66.
149. Loutrari H, Kokla A, Tzartos S. Passive transfer of experimental myasthenia gravis via antigenic modulation of acetylcholine receptor. Eur J Immunol 1992;22:2449-2452.
150. Lu QL, Poulsom R, Wong L, Hanby AM. Bcl-2 expression in adult and embryonic non-haematopoietic tissues. J Pathol 1993;169:431-437.
151. MacFarlane M, Jones NA, Dive C, Cohen GM. DNA damaging agents induce both p53 dependent and p53 independent apoptosis in immature thymocytes. Mol Pharmacol 1996;50:900–911.
152. Maggi G, Casadio C, Cavallo A, Cianci R, Molinatti M, Ruffini E. Thymectomy in myasthenia gravis. Results of 662 cases operated upon in 15 years. Eur J Cardiothorac Surg 1989;:504-511.
153. Mann CL, Hughes FM Jr, Cidlowski JA. Delineation of the signaling pathways involved in glucocorticoid induced and spontaneous apoptosis of rat thymocytes. Endocrinology 2000;141:528–538.
154. Mantegazza R, Baggi F, Antozzi C, Confalonieri P, Morandi L, Bernasconi P, Andreetta F, Simoncini O, Campanella A, Beghi E, Cornelio F. Myasthenia gravis (MG): epidemiological data and prognostic factors. Ann N Y Acad Sci 2003;998:413–423
155. Marshall CJ. Tumor suppressor genes. Cell 1991;64:313-326.
156. Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Jurgensmeier JM, Susin SA, Vieira HL, Prevost MC, Xie Z, Matsuyama S, Reed JC, Kroemer G. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. Science 1998;281:2027-2031.
157. Massey JM. Treatment of acquired myasthenia gravis. Neurology 1997;48:46S-51S.
158. Matell G. Immunosuppressive drugs: azathioprine in the treatment of myasthenia gravis. Ann N Y Acad Sci 1987;505:588-594.
159. Matsuda S, Koyasu S. Mechanisms of action of cyclosporine. Immunopharmacology 2000;47:119-125.
160. McCarthy NJ, Evan GI. Methods for detecting and quantifying apoptosis. Curr Top Dev Biol 1998;36:259-278.
161. McConkey DJ, Hartzell P, Nicotera P, Orrenius S. Calcium activated DNA fragmentation kills immature thymocytes. FASEB J 1989;3:1843–1849.
162. Meriggioli MN, Ciafaloni E, Al-Hayk KA, Rowin J, Tucker-Lipscomb B, Massey JM, Sanders DB. Mycophenolate mofetil for myasthenia gravis. An analysis of efficacy, safety, and tolerability. Neurology 2003;61:1438-1440.
163. Meriggioli MN, Rowin J, Richman JG, Leurgans S. Mycophenolate Mofetil for Myasthenia Gravis. A Double-Blind, Placebo-Controlled Pilot Study. Ann N Y Acad Sci 2003;998:494-499.
164. Meriggioli MN, Sanders DB. Myasthenia Gravis: Diagnosis. Seminars In Neurology 2004;24:31-39.

165. Merlie JP, Sanes JR. Concentration of acetylcholine receptor mRNA in synaptic regions of adult muscle fibers. Nature 1985;317:66–68.
166. Metzstein MM, Stanfield GM, Horvitz HR. Genetics of programmed cell death in *C. elegans:* past, present and future. Trends Genet 1998;14:410-416.
167. Miwa T, Song WC. Membrane complement regulatory proteins: insight from animal studies and relevance to human diseases. Int Immunopharmacol 2001;1:445–459.
168. Monden Y, Nakahara K, Kagotani K, Fujii Y, Nanjo S, Masaoka A, Kawashima Y. Effects of preoperative duration of symptoms on patients with myasthenia gravis. Ann Thorac Surg 1984;38:287-291.
169. Monsul NT, Patwa HS, Knorr AM, Lesser RL, Goldstein JM. The effect of prednisone on the progression from ocular to generalized myasthenia gravis. Journal of the Neurological Sciences 2004;217:131-133.
170. Moore NC, Anderson G, Williams GT, Qwen JJ, Jenkinson EJ. Developmental regulation of bcl-2 expression in the thymus. Immunology 1994;81:115–119.
171. Motyl T. Regulation of apoptosis: Involvement of Bcl 2 related proteins. Reprod Nutr Dev 1999; 39: 49–59.
172. Mulder DG, Graves M, Herrmann C. Thymectomy for myasthenia gravis: recent observations and comparisons with past experience. Ann Thorac Surg 1989;48:551-555.
173. Myasthenia Gravis Clinical Study Group. A randomized clinical trial comparing prednisone and azathioprine in myasthenia gravis. Results of the second interim analysis. J Neurol Neurosurg Psychiatry 199356:1157-1163.
174. Mygland Å , Vincent A, Newsom-Davis J, Kaminski H, Zorzato F, Agius M, Gilhus NE, Aarli JA. Autoantibodies in thymoma-associated myasthenia gravis with myositis or neuromyotonia. Arch Neurol 2000;57:527–531.
175. Nagata S. Fas ligand-induced apoptosis. Annu Rev Genet 1999;33:29–55.
176. Nagata T, Onodera H, Ohuchi M, Suzuki Y, Tago H, Fujihara K, Ishii N, Sugamura K, Shoji Y, Handa M, Tabayashi K, Itoyama Y. Decreased expression of c-myc family genes in thymuses from myasthenia gravis patients. J Neuroimmunol 2001;115:199-202.
177. Nakamura M, Yagi H, Kayaba S, Ishii T, Ohtsu S, Gotoh T, Itoh T. Most thymocytes die in the absence of DNA fragmentation. Arch Histol Cytol 1995; 58: 249–256.
178. Nakano S, Engel AG. Myasthenia gravis: quantitative immunocytochemical analysis of inflammatory cells and detection of complement membrane attack complex at the endplate in 30 patients. Neurology 1993;43:1167–1172.
179. Navaneetham D, Penn AS, Howard JFJ, Conti-Fine BM. Human thymuses express incomplete sets of muscle acetylcholine receptor subunit transcripts that seldom include the delta subunit. Muscle Nerve 2001;24:203–210.
180. Niakan E, Harati Y, Rolak LA. Immunosuppressive drug therapy in myasthenia gravis. Arch Neurol 1988;43:155-156.
181. Nichols KE, Malkin D, Garber JE, Fraumeni JF Jr, Li FP. Germ-line *p53* mutations predispose to a wide spectrum of early-onset cancers. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2001;10:83-87.
182. Nicolle MW. Myasthenia Gravis. The Neurologist 2002;8:2-21.
183. Norbury C, MacFarlane M, Fearnhead H, Cohen GM. Cdc2 activation is not required for thymocyte apoptosis. Biochem Biophys Res Commun 1994; 202: 1400–1406.

184. Nussbaum MS, Rosenthal GJ, Samaha FJ, Grinvalsky HT, Quinlan JG, Schmerler M, Fischer JE. Management of myasthenia gravis by extended thymectomy with anterior mediastinal dissection. Surgery 1992;112:681-688.
185. Nutt LK, Chandra J, Pataer A, Fang B, Roth JA, Swisher SG, O'Neil RG, McConkey DJ. Bax-mediated Ca2+ mobilization promotes cytochrome c release during apoptosis. J Biol Chem 2002;277:20301-20308.
186. Ogura E, Senzaki H, Yamamoto D, Yoshida R, Takada H, Hioki K, Tsubura A. Prognostic significance of Bcl-2, Bcl-xL/S, Bax and Bak expressions in colorectal carcinomas. Oncol Rep 1999;6:365-369.
187. Oltvai Z, Milliman C, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conversed homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. Cell 1993;74:609-619.
188. Onel K, Corden-Cardoc C: MDM2 and prognosis. Mol Cancer Res 2004;2:1-8.
189. Onodera J, Nakamura S, Nagano I, Tobita M, Yoshioka M, Takeda A, Oouschi M, Itoyama Y. Upregulation of bcl-2 protein in the myasthenic thymus. Ann Neurol 1996 39:521-528.
190. Osserman KE. Myasthenia gravis. New York: Grune & Stratton; 1958, pp 78-80.
191. Owen-Schaub LB, Radinsky R, Kruzel E, Berra K, Yonehara S. Anti-fas on non-hematopoietic tumors: levels of Fas/APO-1 and bcl-2 are not predictive of biological responsiveness. Cancer Res 1994; 54:1580-1586.
192. Packham G. Mutation of bcl-2 family proteins in cancer. Apoptosis 1998;3:75-82.
193. Palace J, Newsom-Davis J, Lecky B. A randomized double-blinded trial of prednisolone alone or with azathioprine in myasthenia gravis. Myasthenia Gravis Study Group. Neurology 1998;50:1778-1783.
194. Pan Z, Bhat MB, Nieminen AL, Ma J. Synergistic movements of Ca(2+) and Bax in cells undergoing apoptosis. J Biol Chem 2001;276:32257-32263.
195. Παπαπετρόπουλος Θ. Μυϊκές παθήσεις από διαταραχή του νευρομυϊκού οργάνου αγωγής. Στο: Μυοπάθειες, εκδ Παπαπετρόπουλος Θ, 2η έκδοση Παρισιάνος, Αθήνα 1990, σελ. 153-196.
196. Παπαπετρόπουλος Θ. Συντηρητική θεραπεία της βαρείας μυασθένειας. Μυοπάθειες: αιτιοπαθογένεια και θεραπεία. Πρακτικά 3ης Μετεκπαιδευτικής Ημερίδος Πανεπιστημιακής Νευρολογικής Κλινικής Πατρών Επιμέλεια έκδοσης:Θ. Παπαπετρόπουλος, Φεβρουάριος 1994, σελ. 45-52
197. Patrick J, Lindstrom J. Autoimmune response to acetylcholine receptor. Science 1973;180:871–872.
198. Pena JC, Rudin CM, Thompson CB. A Bcl-xL transgene promotes malignant conversion of chemically initiated skin papillomas.Cancer Res 1998;58:2111-2116.
199. Penault-Llorca F, Bouabdallah R, Devilard E, Charton-Bain MC, Hassoun J, Birg F, Xerri L. Analysis of bax expression in human tissues using the anti-bax, 4F11 monoclonal antibody on paraffin sections. Path Res Pract 1998;194:457-464.
200. Perez MC, Buot WL, Mercado-Danguilan C, Bagabaldo ZG, Renales LD. Stable remissions in myasthenia gravis. Neurology 1981;31:32-37.
201. Perlo VP, Arnason B, Poskanzer D, Castleman B, Schwab RS, Osserman KE, Papatestas A, Alpert L, Kark A. The role of thymectomy in the treatment of myasthenia gravis. Ann N Y Acad Sci 1971;183:308–315

202. Perlo VP, Poskanzer DC, Schwab RS, Viets HR, Osserman KE, Genkins G. Mysthenia gravis: evaluation of treatment in 1355 patients. Neurology 1966;16:431-439.
203. Pezzella F, Turley H, Kuzu I, Kuzu I, Tungekar MF, Dunnill MS, Pierce CB, Harris A, Gatter KC, Mason DY. Bcl-2 protein in non-small cell lung carcinoma. N Engl J Med 1993; 329:690-694.
204. Phillips LH. The epidemiology of myasthenia gravis. Ann NY Acad Sci 2003;998:407-412.
205. Phillips LH, Juel VC. Myasthenia gravis in the tenth decade. Muscle Nerve 1999;22:1297-1298.
206. Phillips LH, Torner JC. Epidemiologic evidence for a changing natural history of myasthenia gravis. Neurology 1996;47:1233-1238.
207. Pinching AJ, Peters DK, Newsom-Davis J. Remission of myasthenia gravis following plasma exchange. Lancet 1976;2:1373–1376.
208. Pitch A, Chiarle R, Chiusa L, Ponti R, Geuna M, Palestro G. p53 expression and proliferative activity predict survival in non-invasive thymomas. Int J Cancer 1996;69:180-183.
209. Polak JM, Van Norden S. An introduction to immunohistochemistry: Current techniques and problems. Oxford University Press-Royal Microscopic Society, New York, 1984, pp: 44-49.
210. Poulas K, Kokla A, Tsibri E, Papanastasiou D, Tsouloufis T, Marinou M, Tsantili P, Papapetropoulos T, Tzartos SJ. Epidemiology of seropositive myasthenia gravis in Greece. Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry 2001;71:352-356.
211. Poulas K, Tsibri E, Papanastasiou D, Tsouloufis T, Marinou M, Tsantili P, Papapetropoulos T, Tzartos SJ. Equal male and female incidence of myasthenia gravis. Neurology 2000;54:1202-1203.
212. Qu ZC, Moritz E, Huganir RL. Regulation of tyrosine phosphorylation of the nicotinic acetylcholine receptor at the rat neuromuscular junction. Neuron 1990;4:367-378.
213. Quaglino D, Capri M, Bergamini G, Euclidi E, Zecca L, Franceschi C, Pasquali-Ronchetti I. Age dependent remodelling of rat thymus. Morphological and cytofluorimetric analysis from birth up to one year of age. Eur J Cell Biol 1998, 76:156–166.
214. Quaglino D, Ronchetti IP. Cell death in the rat thymus: A minireview. Apoptosis 2001; 6: 389–401.
215. Radis CD, Kahl LE, Baker GL, Wasko MC, Cash JM, Gallatin A, Stolzer BL, Agarwal AK, Medsger TA Jr, Kwoh CK. Effects of cyclophosphamide on the development of malignancy and on long term survival of patients with rheumatoid arthritis. A 20-year follow-up study. Arthritis Rheum. 1995;38:1120-1127.
216. Raisova M, Hossini AM, Eberle J, Riebeling C, Wieder T, Sturm I, Daniel PT, Orfanos CE, Geilen CC. The Bax/Bcl-2 ratio determines the susceptibility of human melanoma cells to CD95/Fas-mediated apoptosis. J Invest Dermatol 2001;117:333-340.
217. Rathmell JC, Thompson CB. The central effectors of cell death in the immune system. Annu Rev Immunol 1999; 17: 781–828.
218. Ravagnan L, Roumier T, Kroemer G. Mitochondria, the killer organelles and their weapons. J Cell Physiol 2002;192:131-137.

219. Ravichandran KS. "Recruitment signals" from apoptotic cells: invitation to a quiet meal. Cell 2003;113:817-820.
220. Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. J Cell Biol 1994;124:1-6.
221. Reed JC: Cytochrome *c:* can't live with it - can't live without it. Cell 1997;91:559-562.
222. Richman DP, Agius MA. Treatment of autoimmune myasthenia gravis. Neurology 2003;61:1652-1661.
223. Richman DP, Agius MA. Treatment Principles in the Management of Autoimmune Myasthenia Gravis. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2003;998:457-472.
224. Robbins SL, Cotran R, Kumar V, Collins T. Παθολογοανατομική Βάση της Νόσου, 6η έκδοση, επιμ. Έκδοσης Μπονίκος Δ, Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου ΑΕ, Αθήνα 2003, σελ.15-25.
225. Rodriguez M, Gomez MR, Howard FM Jr, Taylor WF. Myasthenia gravis in children: long-term follow-up. Ann Neurol 1983;13:504–510.
226. Romi F, Aarli JA, Gilhaus NE. Seronegative myasthenia gravis: disease severity and prognosis. European Journal of Neurology 2005;12:413-418.
227. Romi F, Skeie GO, Aarli JA, Gilhus NE. The severity of myasthenia gravis correlates with the serum concentration of titin and ryanodine receptor antibodies. Arch Neurol 2000;57:1596-1600.
228. Rosai J. Thymus. In Rosai and Ackerman's Surgical Pathology, ed Rosai J, Mosby, New York, 2004, pp:462-483.
229. Rosai J. Guidelines for handling of most common and important surgical specimens. In Rosai and Ackerman's Surgical Pathology, ed Rosai J, Mosby, New York, 2004, pp:2911.
230. Rossi D, Gaidano G. Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease. Haematologica 2003;88:212-218.
231. Rouvier E, Luciani M-F, Golstein P. Fas involvement in Ca2+-independent T cell-mediated cytotoxicity. J Exp Med 1993;177:195–200.
232. Rubin JW, Ellison RG, Moore HV, Pai GP. Factors affecting response to thymectomy for myasthenia gravis. J Thorac Cardiovasc Surg 1981;82:720–728.
233. Rudolph P, Peters J, Lorenz D, Schmidt D, Parwaresch R. Correlation between mitotic and Ki-67 labeling indices in paraffin-embedded carcinoma specimens. Hum Pathol 1998;29:1216-1222.
234. Ruegg MA, Bixby JL. Agrin orchestrates synaptic differentiation at the vertebrate neuromuscular junction. Trends Neurosci 1998;21:22–27
235. Ruff RL. Neurophysiology of the neuromuscular junction:overview. Ann N Y Acad Sci 2003;998:1–10.
236. Sahashi K, Engel AG, Lambert EH, Howard FM Jr. Ultrastructural localization of the terminal and lytic ninth complement component (C9) at the motor end-plate in myasthenia gravis. J Neuropathol Exp Neurol 1980;39:160–172.
237. Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. Cell 1997; 91:443-446.
238. Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. Nature Rev Mol Cell Biol 2002;3:401-410.
239. Sanders DB, Andrews I, Howard JF, Massey JM. Seronegative myasthenia gravis. Neurology 1997;48(suppl 5):S40-S45.
240. Sanders DB, El-Salem K, Massey JM,McConville J, Vincent A. Clinical aspects of MuSK antibody positive seronegative MG. Neurology 2003;60:1978–1980.

241. Sanes JR, Lichtman JW. Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. Nat Rev Neurosci 2001;2:791–805.
242. Saperstein DS, Barohn RJ. Management of myasthenia gravis. Seminars in Neurology 2004;24:41-48.
243. Savill J, Fadok V. Corpse clearing defines the meaning of cell death. Nature 2000;407:784-788.
244. Schonbeck S, Padberg F, Hohlfeld R, Wekerle H. Transplantation of thymic autoimmune microenvironment to severe combined immunodeficiency mice. J Clin Invest 1992;90:245–250.
245. Schulte-Herman R, Bursch W, Crasl-Kraupp B. Active cell death (apoptosis) in liver biology and disease. In Boyer JL, Ockner RK (eds). Progress in Liver Diseases, vol 13, Philadelphia, Saunders 1995, pp:1-35.
246. Schumm F, Wietholter H, Fateh-Mogbadan A, Dichgans J. Thymectomy in myasthenia with pure ocular symptoms. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1985;48:332–337.
247. Scopa CD, Vagianos C, Kardamakis D, Kourelis TG, Kalofonos HP, Tsamandas AC. bcl-2/bax ratio as a predictive marker for therapeutic response to radiotherapy in patients with rectal cancer. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2001;9:329-334.
248. Scorrano L, Korsmeyer SJ. Mechanisms of cytochrome release by proapoptotic BCL-2 family members. Biochem Biophys Res Commun 2003;304:437-444.
249. Scuderi F, Marino M, Colonna L, Mannella F, Evoli A, Provenzano C, Bartoccioni E. Anti-P110 autoantibodies identify a subtype of ‘‘seronegative’’ myasthenia gravis with prominent oculobulbar involvement. Lab Invest 2002;82:1139–1146
250. Sentman CL, Shutter JR, Hockenbery D, Kanagawa O, Korsmeyer SJ. Bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes. Cell 1991;67:879–888.
251. Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. Nature. 1999;399:483-487.
252. Shmueli A, Oren M: Regulation of p53 by MDM2: fate is in the numbers. Mol Cell 2004;13:4-5.
253. Skeie GO, Lunde PK, Sejersted OM, Mygland A, Aarli JA, Gilhus NE. Myasthenia gravis sera containing antiryanodine receptor antibodies inhibit binding of [3H]-ryanodine to sarcoplasmic reticulum. Muscle Nerve 1998; 21:329–335.
254. Skeie GO, Mygland Å, Aarli JA, Gilhus NE. Titin antibodies in patients with late onset myasthenia gravis: clinical correlations. Autoimmunity 1995;20:99–104.
255. Smit AB, Syed NI, Schaap D, van Minnen J, Klumperman J, Kits KS, Lodder H, van der Schors RC, van Elk R, Sorgedrager B, Brejc K, Sixma TK, Geraerts WP. A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission. Nature 2001;411:261–268.
256. Sommer N, Willcox N, Harcourt GC, Newsom-Davis J. Myasthenic thymus and thymoma are selectively enriched in acetylcholine receptor-reactive T cells. Ann Neurol 1990;28:312–319.
257. Somnier FE, Keiding N, Paulson OB. Epidemiology of myasthenia gravis in Denmark. A longitudinal and comprehensive population survey. Arch Neurol. 1991;48:733-739.

258. St. Clair EG, Anderson SJ, Oltvai ZN. Bcl 2 counters apoptosis by Bax heterodimerization dependent and independent mechanisms in the T cell lineage. J Biol Chem 1997; 272: 29347–29355.
259. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. Science 1995; 267:1445-1449.
260. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. Annu Rev Biochem 2000;69:217-245.
261. Suda T, Okazaki T, Naito Y, Yokota T, Arai N, Ozaki S, Nakao K, Nagat S. Expression of the Fas ligand in cells of T cell lineage. J Immunol 1995;154:3806–3813.
262. Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. Cell 1993;75:1169–1178.
263. Surh CD, Sprent J. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. Nature 1994;372:100–103.
264. Takahashi T, Tanaka M, Brannan CI, Jenkins NA, Copeland NG, Suda T, Nagata S. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the fas ligand. Cell 1994;76:969–976.
265. Takahashi T, Tanaka M, Inazawa J, Abe T, Suda T, Nagata S. Human fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity. Int Immunol 1994;6:1567–1574.
266. Tateyama H, Eimoto T, Tada T, Inagaki H, Hattori H, Takino H. Apoptosis, bcl-2 protein and fas antigen in thymic epithelial tumors. Mod Pathol 1997; 10:983-991.
267. Τερζής Σ. Ηλεκτροφυσιολογική διερεύνηση των παθήσεων της νευρομυϊκής σύναψης. Στο Κλινική Ηλεκτρομυογραφία, Νευρομυϊκές Παθήσεις, εκδ. Τερζής Σ, Πάτρα 1996, σελ 243-246
268. Tindall RS, Phillips JT, Rollins JA, Wells L, Hall K. A clinical therapeutic trial of cyclosporine in myasthenia gravis. Ann NY Acad Sci 1993;681:539-551.
269. Tindall RS, Rollins JA, Phillips JT, Greenlee RG, Wells L, Belendiuk G. Preliminary Results of a double-blind, randomized, placebo-controlled trial of cyclosporine in myasthenia gravis. N Engl J Med 1987;316:719-724.
270. Tomita M, Matsuzaki Y, Edagawa M, Maeda M, Shimizu T, Hara M, Onitsuka T. Clinical and immunohistochemical study of eight cases with thymic carcinoma. BMC Surg 2002; 23:3-8.
271. Toyka KV, Drachman DB, Griffin DE, Pestronk D. Myasthenia gravis study of humoral immune mechanisms by transfer to mice. N Engl J Med 1977;296:125–131.
272. Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Moller P, Falk W, Debatin KM,Krammer PH. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. Science 1989;245:301-305.
273. Tsamandas AC, Gogos C, Thomopoulos K, Kourelis T, Tepetes K, Petsas T, Karatza C, Bonikos DS. Increased Bax/Bcl-2 ratio upregulates caspase-3 and increases apoptosis in cases of chronic hepatitis type B and C. Mod Pathol. 2004;17(S1): 313A.
274. Tsamandas AC, Thomopoulos K, Theocharis G, Syrrokosta I, Dimitropoulou D, Petsas T, Karatza C, Gogos C. The potential effect of liver cell steatosis and apoptosis on the progression of the disease in cases of chronic hepatitis type B and C. Modern Pathology 2005;18(S1): 288A.

275. Tsuji T, Mimura Y, Wen S, Li X, Kanekawa A, Sasaki K, Shinozaki F. The significance of PCNA and p53 protein in some oral tumors. Int J Oral Maxillofac Surg 1995;24:221-5.
276. Τζάρτος Σ. Αντισώματα κατά του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης στη βαρεία μυασθένεια. Στο: Μυοπάθειες: αιτιοπαθογένεια και θεραπεία, Πρακτικά 3ης μετεκπαιδευτικής ημερίδος, Πανεπιστημιακής Νευρολογικής Κλινικής Πανεπιστημίου Πατρών , Πάτρα 5 Φεβρουαρίου, 1994,σελ 11-17.
277. Tzartos SJ, Barkas T, Cung MT, Mamalaki A, Marraud M, Orlewski P, Papanastasiou D, Sakarellos C, Sakarellos-Daitsiotis M, Tsantili P, Tsikaris V. Anatomy of the antigenic structure of the large membrane autoantigen, the muscle type nicotinic acetylcholine receptor. Immunol Rev 1998;163:89-120.
278. Tzartos SJ, Lindstrom JM. Monoclonal antibodies used to probe acetylcholine receptor structure: localization of the main immunogenic region and detection of similarities between subunits. Proc Natl Acad Sci USA 1980;77:755-759.
279. Τζάρτος Σ, Πουλάς Κ. Παθογένεια της μυασθένειας: Αυτοαντισώματα κατά του υποδοχέα της ακετυλχολίνης και της πρωτεϊνης MuSK. Στο: Αγγειακά Εγκεφαλικά Επεισόδια-Βαρεία Μυασθένεια, Πρακτικά 12ης Μετεκπαιδευτικής Ημερίδας Νευρολογικής Κλινικής, Πάτρα 14 Φεβρουαρίου 2004, σελ 67-78.
280. Tzartos S, Seybold M, Lindstrom J. Specificities of antibodies to acetylcholine receptors in sera from myasthenia gravis patients measured by monoclonal antibodies. Proc Natl Acad Sci USA 1982;79:188-192.
281. Tzartos SJ, Sophianos D, Efthimiadis A. Role of the main immunogenic region of acetylcholine receptor in myasthenia gravis. An Fab monoclonal antibody protects against antigenic modulation by human sera. J Immunol 1985;134:2343-2349.
282. Unwin N. Projection structure of the nicotinic acetylcholine receptor: distinct conformations of the a subunits. J Mol Biol 1996;257:586–596
283. Unwin N, Toyoshima C, Kubalek E. Arrangement of the acetylcholine receptor subunits in the resting and desensitised states, determined by cryoelectron microscopy of crystallized torpedo postsynaptic membranes. J Cell Biol 1988;107:1123–1138.
284. van Blitterswijk WJ, van der Luit AH, Veldman RJ, Verheij M, Borst J. Ceramide: second messenger or modulator of membrane structure and dynamics? Biochem J 2003;369:199-211.
285. van Oijen MGCT, Medema RH, Slootweg PJ, Rijksen G. Positivity of the proliferation marker Ki-67 in noncycling cells. Am J Clin Pathol 1998;110:24-31.
286. van Parijs L, Abbas AK. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. Science 1998;280: 243–248.
287. Vaux D, Silke J: Mammalian mitochondrial IAP binding proteins.Biochem Biophys Res Commun 2003;203:449-504.
288. Vaux DL, Strasser A. The molecular biology of apoptosis. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:2239-2244.
289. Victor M, Ropper AH. Μυασθένεια gravis και άλλες διαταραχές της νευρομυϊκής σύναψης, στο Adam's and Victor's ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΑ ΙΙΙ, Επιμέλεια, Βασιλόπουλος Δ, εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, Αθήνα 2004, σελ. 1782-1800.
290. Vincent A. The neuromuscular junction and neuromuscular transmission. In: Karpati G, Hilton-Jones D, Griggs RC, eds. Disorders of Voluntary Muscle. Cambridge: Cambridge University Press; 2001, pp.142–167

291. Vincent A, Bowen J, Newsom-Davis J, McConville J. Seronegative generalised myasthenia gravis: clinical features, antibodies, and their targets. Lancet Neurol 2003;2:99– 106
292. Vincent A, McConville J, Farrugia ME, Newsom-Davis J. Seronegative Myasthenia Gravis. Seminars in Neurology 2004;24:125-133.
293. Vincent A, Palace J, Hilton-Jones D. Myasthenia gravis. Lancet 2001;357:2122–2128.
294. von Boehmer H. Developmental biology of T cells in T cell-receptor transgenic mice. Annu Rev Immunol 1990;8: 531–556.
295. Wakata N, Saito T, Tanaka S, Hirano T, Oka K. Tacrolimus hydrate (FK506): therapeutic effects and selection of responders in the treatment of myasthenia gravis. Clinical Neurology and Neurosurgery 2003;106:5-8.
296. Walker PR, Saas P, Dietrich PY. Tumor expression of Fas ligand (CD95L) and the consequences. Curr Opin Immunol 1998;10:564-572.
297. Wallace B. scFvs get down to basics: how MuSK makes synapses. Nat Biotechnol 1997;15:721–722.
298. Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. Annu Rev Immunol 1999;17:331-67.
299. Walport MJ. Complement. N Engl J Med 2001;344:1058–1066.
300. Wickelgren I. Synapse-making molecules revealed. Science 1996;272:1100.
301. Willcox N. Myatshenia Gravis. Curr Opin Immunol 1993;5:910-917.
302. Williams O, Norton T, Halligey M, Kioussis D, Brady HJM. The action of Bax and bcl 2 on T cell selection. J Exp Med 1998; 188: 1125–1133.
303. Witte AS, Cornblath DR, Parry GJ, Lisak RP, Schatz NJ. Azathioprione in the treatment of myasthenia gravis. Ann Neurol 1984;15:602-605.
304. Wood SJ, Slater CR. Safety factor at the neuromuscular junction. Prog Neurobiol 2001;64:393–429.
305. Wyllie AH. Apoptosis: an overview. Br Med Bull 1997;53:451-465.
306. Yang B, Johnson TS, Thomas GL, Watson PF, Wagner B, Furness PN, El Nahas AM. A shift in the Bax/Bcl-2 balance may activate caspase-3 and modulate apoptosis in experimental glomerulonephritis. Kidney Int 2002; 62:1301-1313.
307. Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. Blood 1996;88:386-401
308. Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Bad, a heterodimeric partner for Bcl XL and Bcl 2, displaces Bax and promotes cell death. Cell 1995; 80: 285–291.
309. Zhang Y, Tzartos SJ, Wekerle H. B-T lymphocyte interactions in experimental autoimmune myasthenia gravis: antigen presentation by rat/mouse hybridoma lines secreting antibodies against the acetylcholine receptor. Eur J Immunol 1988;18:211-218.
310. Zheng Y, Wheatley LM, Liu T, Levinson AI. Acetylcholine receptor alpha subunit mRNA expression in human thymus: augmented expression in myasthenia gravis and upregulation by interferon-gamma. Clin Immunol 1999;91:170–177.
311. Zhu LP, Cupps TR, Whalen G, Fauci AS. Selective effects of cyclophosphamide therapy on activation, proliferation, and differentiation of human B cells. J Clin Invest 198779:1082-1090.
312. Zutter M, Hockenbery D, Silverman GA, Korsmeyer SJ. Immunolocalization of the Bcl-2 protein within hematopoietic neoplasms. Blood 1991;78:1062-1068.