

**Αναστολή της απόπτωσης
των βρογχοκυψελιδικών κυττάρων
Μια σημαντική αιτία θανάτου των σηπτικών ασθενών**

ΣΚΟΠΟΣ Στους σηπτικούς ασθενείς, η φυσιολογική λειτουργία του πνεύμονα συχνά επηρεάζεται λόγω των τοξικών ουσιών που απελευθερώνονται στη συστηματική κυκλοφορία, καθώς και λόγω των διαταραχών ιστικής οξυγόνωσης. Μέχρι σήμερα, ο ρόλος της απόπτωσης, η οποία αντιπροσωπεύει ένα φυσιολογικό μηχανισμό ανανέωσης των ιστών του ανθρώπινου οργανισμού, δεν έχει διερευνηθεί σε κυτταρικούς πληθυσμούς από πνεύμονα σηπτικών ασθενών. Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε με σκοπό να εξετάσει την επίδραση της σήψης στο ρυθμό απόπτωσης τόσο των βρογχοκυψελιδικών κυττάρων όσο και των μακροφάγων. **ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ** Βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL) ελήφθη από 20 διαδοχικούς ασθενείς που εισήχθησαν σε δύο Μονάδες Εντατικής Θεραπείας και οι οποίοι πληρούσαν τα κριτήρια σήψης. Την ομάδα ελέγχου αποτελούσαν 9 εθελοντές, οι οποίοι χειρουργήθηκαν για καθαρή πάθηση των χορηφών. Η μέτρηση της απόπτωσης έγινε με τις τεχνικές ανεξίνης V (annexin V binding) σε κυτταρομετρητή ροής, TUNEL και κατάτμησης του DNA (DNA ladder). Επίσης, έγινε έλεγχος των μορφολογικών χαρακτηριστικών των κυττάρων με τη βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου και μελετήθηκε η έκφραση του αντιαποπτωτικού γονιδίου *bcl-2*. **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ** Η απόπτωση των κυττάρων του BAL και ειδικά των κυψελιδικών μακροφάγων βρέθηκε σημαντικά χαμηλότερη στους σηπτικούς ασθενείς σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($P < 0,01$). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν τόσο με την τεχνική TUNEL, όσο και με τη μελέτη των μορφολογικών χαρακτηριστικών. Η ηλεκτροφόρηση του DNA σε πήκτωμα αгарόζης και η μελέτη της έκφρασης του γονιδίου *bcl-2* έδειξε ότι η κατάτμηση του DNA και η έκφραση του γονιδίου *bcl-2* δεν είναι απαραίτητα συνδεδεμένες με τον αποπτωτικό θάνατο των κυττάρων. **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ** Το φαινόμενο της απόπτωσης μπορεί να εξηγήσει τη δυσλειτουργία των πνευμόνων στους σηπτικούς ασθενείς, λόγω της τροποποιημένης κυτταρικής αρχιτεκτονικής του πνεύμονα, η οποία είναι δυνατό να καταλήξει στην εμφάνιση του συνδρόμου της οξείας αναπνευστικής ανεπάρκειας και σε θάνατο. Στην παρούσα μελέτη διαπιστώθηκε αυξημένη επιβίωση των πνευμονοκυττάρων και των κυψελιδικών μακροφάγων σε σηπτικούς ασθενείς, η οποία οφείλεται στην αναστολή της απόπτωσης. Ο μηχανισμός αυτός φαίνεται ότι αποτελεί μια πρώτη αντίδραση του οργανισμού, με σκοπό την καλύτερη αντιμετώπιση των παθογόνων μικροοργανισμών, η διατήρηση όμως του οποίου έχει τελικά βλαπτική επίδραση.

Χ. Λιάκου,¹
Μ.Μ. Κωνσταντουλάκης,^{1,2}
Στ. Κατσαραγάκης,²
Ε. Μεσσάρης,¹
Μ. Παπανικολάου,³
Γ. Γεωργιάδης,³
Ε. Μενεκάκος,²
Α. Μαριόλης,²
Γ. Ανδρουλιάκης^{1,2}

¹Εργαστήριο Χειρουργικής Έρευνας, Α' Προπαιδευτική Χειρουργική Κλινική, Πανεπιστήμιο Αθηνών
²Χειρουργική Μονάδα Εντατικής Θεραπείας-Τραύματος, Α' Προπαιδευτική Χειρουργική Κλινική, Πανεπιστήμιο Αθηνών
³Μονάδα Εντατικής Θεραπείας, ΠΓΝΑ «Ιπποκράτειο»

Apoptosis in bronchoalveolar cells represents a major pathophysiologic pathway of death in septic patients

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρητηρίου

Ανεξίνη V
Απόπτωση
bcl-2
Βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL)
DNA ladder
Σήψη
TUNEL

Η απόπτωση αποτελεί ένα φυσιολογικό μηχανισμό κυτταρικού θανάτου και το βασικό μηχανισμό ελέγχου ισορροπίας μεταξύ της προ- και της φλεγμονώδους διαδικασίας.^{1,2} Προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες έχουν ενοχοποιηθεί για την αναστολή της λειτουργίας της απόπτωσης. Η αναστολή της απόπτωσης στα ουδετερόφιλα, στα μακροφάγα, καθώς και σε άλλα κύτταρα, αυξάνει το μέσο χρόνο επιβίωσης και επιμηκύνει το χρόνο λειτουργίας τους. Αυτή η παρατεταμένη κυτταρική επιβίωση μπορεί να έχει ως συνέπεια τη διαταραχή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων σε επίπεδο ιστών, με τελικό αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού τους και την παραγωγή τοξικών μεταβολικών προϊόντων. Επιπλέον, όπως έχει αποδειχθεί σε πειραματικά σηπτικά μοντέλα, η απόπτωση παίζει σημαντικό ρόλο στην αναδιάρθρωση και ανακατασκευή της ιστικής αρχιτεκτονικής των οργάνων-στόχων.^{3,4}

Ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου στα πνευμονοκύτταρα, τόσο φυσιολογικών ατόμων όσο και σηπτικών ασθενών, δεν έχει αποσαφηνιστεί μέχρι σήμερα. Οι αλλαγές που υφίστανται οι πνεύμονες στους σηπτικούς ασθενείς, σε κυτταρικό επίπεδο, περιλαμβάνουν όλα τα στάδια από την επιθηλιακή και ενδοθηλιακή ισχαιμία μέχρι και τον κυτταρικό θάνατο. Η απόπτωση σε σηπτικά πειραματόζωα θεωρείται ότι αποτελεί τον κύριο μηχανισμό αναστολής κυτταρικού θανάτου των πνευμονοκυττάρων τύπου I και II, των ουδετεροφίλων, των μακροφάγων και των λοιπών κυτταρικών πληθυσμών των πνευμόνων.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να απαντήσει στα εξής ερωτήματα: (α) εάν τα βρογχοκυψελιδικά κύτταρα υφίστανται απόπτωση στα φυσιολογικά άτομα και στους σηπτικούς ασθενείς, (β) εάν το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος είναι διαφορετικό στους σηπτικούς ασθενείς απ' ό,τι στην ομάδα ελέγχου, (γ) εάν το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος σηπτικών ασθενών επηρεάζει την πρόγνυσή τους και (δ) πώς ενεργοποιείται ή αναστέλλεται ο μηχανισμός της απόπτωσης στους σηπτικούς ασθενείς.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Ασθενείς

Ομάδα μελέτης. Η ομάδα μελέτης αποτελείτο από 20 βαρέως πάσχοντες σηπτικούς ασθενείς, οι οποίοι πληρούσαν τα κριτήρια της σήψης⁵ (πίν. 1), ενώ κριτήρια αποκλεισμού ασθενών από τη μελέτη αποτελούσαν τα ακόλουθα: οι ακραίες ηλικίες (≤ 18 ετών ή ≥ 85 ετών), η λήψη ανοσοκατασταλτικών

Πίνακας 1. Κριτήρια σήψης (SIRS). Η σήψη επιβεβαιώνεται κλινικά με την ανεύρεση θετικών καλλιέργειών σε βιολογικά υλικά, όπως αίμα, ούρα, πτύελα κ.λπ., ή την παρουσία πρωτοπαθούς σηπτικής εστίας σε συνδυασμό με δύο από τα παρακάτω κριτήρια.

Θερμοκρασία	>39 °C ή <36 °C
Καρδιακός ρυθμός	>90 παλμοί/min
Αναπνευστικός ρυθμός	>20 αναπνοές/min ή PaCO ₂ <32 torr
Λευκοκύτταρα	>12.000 κύτταρα/mm ³ ή <4.000 κύτταρα/mm ³ ή >10% πρόδρομα κύτταρα

φαρμάκων, η μετάγγιση αίματος 24 ώρες πριν από τη λήψη του BAL και η ύπαρξη κακοήθειας. Οι ασθενείς αντιπροσώπευαν διαδοχικές εισαγωγές σε δύο εντατικές μονάδες σε μεγάλο νοσοκομείο των Αθηνών. Όλοι υποβλήθηκαν σε βρογχοσκόπηση και έγινε λήψη βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (BAL). Τα δημογραφικά δεδομένα της ομάδας μελέτης περιγράφονται στον πίνακα 2.

Η μέση ηλικία της ομάδας μελέτης ήταν 66,2 έτη (σταθερό σφάλμα, SE \pm 2,75) και η διάμεση 68,5 έτη. Έντεκα ασθενείς ήταν άνδρες (55%) και 9 γυναίκες (45%) (Α/Γ: 1/2). Για κάθε ασθενή καταγράφηκαν τα κλινικά και εργαστηριακά στοιχεία και οι μετρήσεις APACHE II και MOF.⁶⁻⁸

Ομάδα ελέγχου. Την ομάδα ελέγχου αποτέλεσαν 9 εθελοντές χωρίς πάθηση του αναπνευστικού, μετά από συγκατάθεσή τους. Οι ασθενείς έπασχαν από χολολιθίαση, για την οποία υποβλήθηκαν σε λαπαροσκοπική χολοκυστεκτομή. Κανένας από τους εθελοντές δεν εμφάνισε επιπλοκές μετά το χειρουργείο. Η μέση ηλικία τους ήταν 54,5 έτη (SE \pm 3,4, διάμεση 58,8). Δύο ήταν άνδρες (22,2%) και 7 γυναίκες (77,8%) (Α/Γ: 0,28).

Μέθοδος

α. Πρωτόκολλο BAL. Όλες οι βρογχοσκοπίσεις διενεργήθηκαν από τον ίδιο ιατρό. Χρησιμοποιήθηκε βρογχοσκόπιο με οπτικές ίνες (Pentax 15p, Japan), το οποίο εισήχθη στην τραχεία διαμέσου ενδοτραχειακού σωλήνα (>8 mm id) μέσω

Πίνακας 2. Δημογραφικά δεδομένα της ομάδας μελέτης.

Σηπτικοί ασθενείς (n=20)		
Ηλικία (έτη)	Μέση: 66,2 (SE \pm 2,75)	Διάμεση: 68,5
Φύλο	Άνδρες 11 (55%)	Γυναίκες 9 (45%)
ΜΕΘ (ημέρες διαμονής)	Μέση: 35,1 (SE \pm 5)	Διάμεση: 29,5
Μικρόβιο	Ασθενείς	Θνητότητα
<i>Acinetobacter baumannii</i>	3 (15%)	3 (100%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11 (55%)	9 (81,8%)
<i>Candida albicans</i>	1 (5%)	1 (100%)
<i>Enterococcus</i>	2 (10%)	2 (100%)
<i>Klebsiella</i>	2 (10%)	2 (100%)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1 (5%)	1 (100%)

Σε όλους τους ασθενείς, η αιτία θανάτου ήταν πολυοργανική ανεπάρκεια (MOF)

ειδικού προσαρμογέα. Κατά τη διάρκεια της βρογχοσκόπησης, το ποσοστό εισπνεόμενου οξυγόνου (FiO₂) ήταν 100%. Η άκρη του βρογχοσκοπίου έφθανε αρχικά στο άκρο του δεξιού μέσου πνευμονικού λοβού, όπου και γινόταν έγχυση 20 mL ισοτονικού διαλύματος (0,9% NaCl, 37 °C). Το αναρροφώμενο υγρό εθεωρείτο δείγμα έκπλυσης των βρόγχων και δεν χρησιμοποιείτο. Ακολουθούσε έγχυση 3 φορές με 60 mL διαλύματος (0,9% NaCl, 37 °C), το οποίο και αναρροφάτο. Από το συνολικό όγκο υγρού (180 mL), που χρησιμοποιείτο για έγχυση, κατά μέσο όρο το 55% (95 mL) επέστρεφε με την αναρρόφηση. Αμέσως μετά γινόταν μεταφορά των δειγμάτων στο εργαστήριο, όπου με τη βοήθεια γάζας-φίλτρου απομακρυνόταν η βλέννη πριν από οποιαδήποτε περαιτέρω επεξεργασία.

β. *Μέτρηση ζώντων κυττάρων.* Το ποσοστό των ζώντων κυττάρων προσδιορίστηκε μετά από χρώση τους με τη χρωστική κυανού του τρυπανίου (trypan blue). Μετά την καταμέτρηση των κυττάρων, αυτά αραιώνονταν σε τελική συγκέντρωση 1×10⁶ κύτταρα/mL σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS), pH 7,4.

γ. *Μορφολογικά κριτήρια για την εκτίμηση της απόπτωσης.* Η μορφολογική αναγνώριση αποπτωτικών πυρήνων βαθμολογήθηκε από δύο ανεξάρτητους παθολογοανατόμους. Τα κύτταρα θεωρήθηκαν αποπτωτικά, αν εμφάνιζαν πυκνωτικές περιοχές χρωματίνης είτε με τη μορφή ενός πυρήνα, είτε με τη μορφή κατακερματισμένων τμημάτων που δεν συνδέονταν μεταξύ τους.^{9,10}

δ. *Κυτταρομετρία ροής.* Η κυτταρομετρία πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του κυτταρομετρητή ροής (Coulter Corporation, USA):

ι. *Σήμανση ανεξίτης V και ιωδιούχου προπίδιου (PI).* Προκειμένου να μελετηθούν οι αλλαγές στην κυτταρική μεμβράνη, που συνδυάζονται με την έναρξη της διαδικασίας της απόπτωσης, τα κύτταρα από το BAL επισημάνθηκαν με ανεξίτην V-FITC^{11,12} (TACS Annexin V Apoptosis Detection Kit; Genzyme Diagnostics, Cambridge, MA, USA). Μετά από φυγοκέντρηση των κυττάρων σε συγκέντρωση 10⁶ κύτταρα/mL σε διάλυμα PBS, το ίζημα επανατίθετο σε αιώρηση σε 100 mL διαλύματος επώασης ανεξίτης V (10 μL 10X binding buffer, 10 μL ιωδιούχου προπίδιου, 1 μL συμπλόκου ανεξίτης V-FITC και 79 mL αποσταγμένου νερού) και ακολουθούσε επώαση για 15 min στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου, πριν γίνει η ανάλυση των κυττάρων σε κυτταρομετρητή ροής. Ο συνδυασμός σήμανσης με ανεξίτην V και ιωδιούχου προπίδιου επιτρέπει τη διάκριση μεταξύ κυττάρων σε πρώιμα στάδια απόπτωσης (ανεξίτην V-θετικά), κυττάρων σε τελικά στάδια απόπτωσης, νεκρών κυττάρων (ανεξίτην V και ιωδιούχο προπίδιο-θετικά) και υγιών κυττάρων (ανεξίτην V και ιωδιούχο προπίδιο-αρνητικά).

Η μελέτη με ανεξίτην V και ιωδιούχο προπίδιο πραγματοποιήθηκε σε 19 ασθενείς (95%) και σε όλους τους μάρτυρες, ενώ σε έναν ασθενή (5%) δεν επαρκούσε το δείγμα BAL.

ii. *Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των κυττάρων με CD66b, CD71 και EMA.* Τα κύτταρα από το BAL διαχωρίστηκαν σε πνευμονοκύτταρα μετά από επώασή τους με το αντίσωμα EMA (μεμβρανικό επιθηλιακό αντιγόνο), ενώ τα πολυμορφοπύρνα διαχωρίστηκαν από τα κυψελιδικά μακροφάγα με τη χρησιμοποίηση των αντισωμάτων CD66b και CD71.¹³ Ο φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του κυτταρομετρητή ροής. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα επανατέθηκαν σε αιώρηση με το διάλυμα της ανεξίτης V, όπως προαναφέρθηκε, χωρίς το ιωδιούχο προπίδιο και ακολούθησε ανάλυση με κυτταρομετρία ροής.

ε. *Τεχνική TUNEL (TdT-mediated dUTP biotin nick end-labelling).* Χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της έκφρασης του δείκτη της απόπτωσης.

Σύμφωνα με την τεχνική αυτή, το ένζυμο TdT (τελική δεοξυνουκλεοτιδική τρανσφεράση) προσθέτει το επισημασμένο με διγοξιγενίνη dUTP στο 3'-OH-τελικό άκρο κάθε τμήματος αποπτωτικού DNA.¹⁴ Στη συνέχεια, η επισήμανση ανιχνεύεται με ένα αντίσωμα έναντι της διγοξιγενίνης, το οποίο είναι συνδεδεμένο με υπεροξειδάση. Η υπεροξειδάση, με τη σειρά της, αντιδρά με το υπόστρωμα του TACS Blue Label (TBL) και χρωματίζεται μπλε.¹⁵

Η μέθοδος TUNEL εφαρμόστηκε σε μη μονιμοποιημένα κύτταρα που προέρχονταν από το δείγμα BAL, μετά από διήθηση, καταμέτρηση των κυττάρων και τελική αραιώσή τους σε 1×10⁶ ανά 100 μL σε 2% BSA/PBS. Τα κύτταρα, στη συνέχεια, μονιμοποιήθηκαν με τη χρησιμοποίηση διαλύματος 3,7% φορμαλδεΰδης. Ως TUNEL-θετικά κύτταρα (αποπτωτικά κύτταρα που έχουν εισέλθει στη διαδικασία της απόπτωσης) χαρακτηρίστηκαν τα κύτταρα στα οποία είχε επισημανθεί ο πυρήνας. Η διάκριση των αποπτωτικών από τα νεκρά κύτταρα έγινε με δεύτερη χρώση για τη μορφολογική επιβεβαίωση της απόπτωσης. Τα δείγματα στα οποία έγινε χρώση με TBL, μελετήθηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο. Η τεχνική πραγματοποιήθηκε σε 13 ασθενείς (65%) και σε όλους τους μάρτυρες. Ένα πλακίδιο, στο οποίο έγινε επεξεργασία με ενδονουκλεάση, χρησιμοποιήθηκε ως θετικό δείγμα. Αντίθετα, ως αρνητικό δείγμα χρησιμοποιήθηκε πλακίδιο στο οποίο δεν προστέθηκε το ένζυμο TdT.

στ. *Ηλεκτροφόρηση του DNA σε πίκτωμα αгарόζης στα πλαίσια της τεχνικής DNA ladder.* Κατά τη διάρκεια της απόπτωσης, τα κύτταρα συχνά έχουν το DNA τους κατακερματισμένο εξαιτίας της δράσης κυτταρικών ενδονουκλεασών. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία τμημάτων DNA μεγέθους 200–480 βάσεων, τα οποία μπορούν να ανιχνευθούν σε πίκτωμα αгарόζης μετά την απομόνωση του DNA.

Με βάση την τεχνική αυτή, τα κύτταρα από το BAL τοποθετήθηκαν σε λυτικό διάλυμα (20 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 7,5, 0,2% Triton X-100 και 0,1 mg/mL proteinase K) και επώαστηκαν στους 37 °C για 18 ώρες. Στη συνέχεια, προστέθηκε στο διάλυμα RNase A (50 μg/mL) στους 37 °C επί 30 min. Το DNA απομονώθηκε με διάλυμα φαινόλης, χλωροφορμο-ισοαμυλ-αλκοόλης (24:1) και εκκυλίστηκε με διάλυμα 50% ισοπροπρανόλης και γλυκογόνου (20 μg/mL). Το εκκύλισμα εκπλύθηκε με 80% αιθανόλη, αφυδατώθηκε και

διαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα 10 μL (Tris-HCl)-EDTA. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 1%. Μετά την ηλεκτροφόρηση, στο πήκτωμα έγινε χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) και ακολούθησε φωτογράφησή του υπό υπεριώδη (UV) ακτινοβολία. Η συγκεκριμένη τεχνική ολοκληρώθηκε επιτυχώς σε 15 ασθενείς (75%) και σε όλους τους μάρτυρες.

z. *Ανοσοϊστοχημική μέθοδος ανίχνευσης της έκφρασης του γονιδίου bcl-2.* Τα κύτταρα του BAL μονιμοποιήθηκαν με τη χρησιμοποίηση διαλύματος 3,7% φορμαλδεΰδης σε ειδική φυγόκεντρο (Cytospin, USA). Στη συνέχεια, προστέθηκε διάλυμα 3% υπεροξειδίου του υδρογόνου επί 5 min, για τη δέσμευση της ενδογενούς υπεροξειδάσης. Μετά από διαδοχικές πλύσεις 6 min με ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών (pH=6,0), χρησιμοποιήθηκε το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης του γονιδίου *bcl-2*. Μετά από 18 ώρες έγινε έκπλυση των πλακιδίων με PBS για 6 min και ακολούθησε επώαση με αντιγόνο κοκίχου έναντι ανοσοσφαιρινών αρουραίου (αντι-IgG) επισημασμένο με υπεροξειδάση, για 30 min. Στη συνέχεια, προστέθηκε αιματοξυλίνη επί 2 min, έγινε έκπλυση και, τελικά, ανάγνωση των αποτελεσμάτων στο μικροσκόπιο.

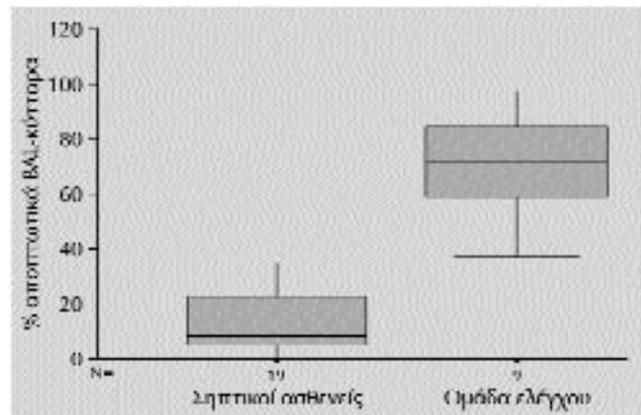
Στατιστική ανάλυση

Όλες οι ποσοτικές μετρήσεις παρουσιάζονται ως μέσες τιμές και επιπλέον παρατίθεται το σταθερό σφάλμα (SE). Οι συγκρίσεις μεταξύ ποσοτικών μεταβλητών έγιναν με το Student's t-test. Διαφορές στο APACHE II score μεταξύ της ομάδας μελέτης και της ομάδας ελέγχου αξιολογήθηκαν με το Mann Whitney U test. Οι ποιοτικές μεταβλητές αναλύθηκαν με τη βοήθεια του chi-square test και όπου το δείγμα ήταν μικρό, χρησιμοποιήθηκε το Fisher's exact test. Στατιστικά σημαντικές διαφορές θεωρήθηκαν αυτές όπου η τιμή του $P < 0,05$.

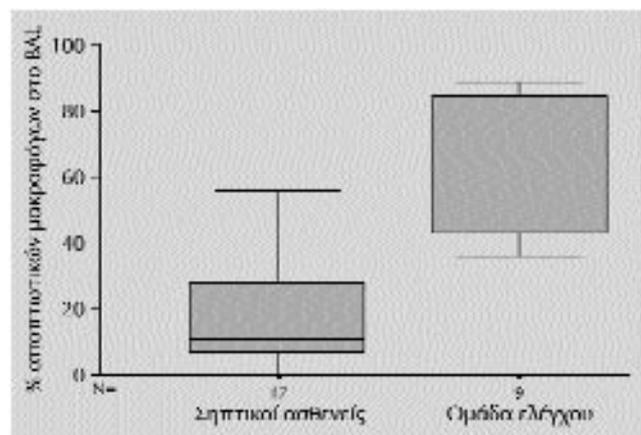
Η έρευνα έγινε μετά από ενημέρωση και συγκατάθεση των ατόμων που έλαβαν μέρος στη μελέτη ή του πλησιέστερου συγγενή τους.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η μέση τιμή του ποσοστού των αποπτωτικών κυττάρων στο σύνολο BAL των σηπτικών ασθενών ήταν 21,6% ($\pm 6,8$), ενώ των μακροφάγων ήταν 22,8% ($\pm 6,1$). Στην ομάδα ελέγχου, οι αντίστοιχες τιμές, όπως υπολογίστηκαν με τη μέθοδο της ανεξίτης V, ήταν 65,1% (± 9) ($P=0,001$) και 65,6% ($\pm 7,1$), αντίστοιχα ($P=0,0001$) (εικόνες 1–3). Η μείωση του ποσοστού των αποπτωτικών κυττάρων στο BAL σηπτικών ασθενών επιβεβαιώθηκε από τη μελέτη των μορφολογικών κριτηρίων και από τα αποτελέσματα της τεχνικής TUNEL (εικ. 4). Φυσιολογικά, τα κύτταρα BAL κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας μπορούν να υποστούν απόπτωση ή νέκρωση. Για το λόγο αυτό, δείγματα με σήμανση κυττάρων $< 2\%$ του συνόλου του κυτταρικού πληθυσμού θεωρήθηκαν TUNEL-αρνητικά. Με την τεχνική TUNEL, 8 δείγματα σηπτικών



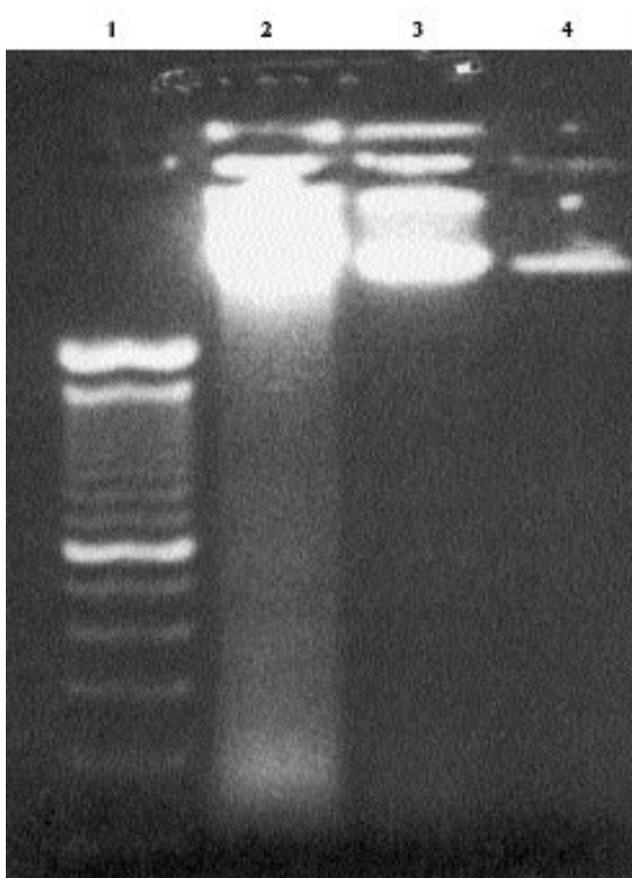
Εικόνα 1. Σύγκριση ποσοστού (%) BAL-κυττάρων σημασμένων με FITC-ανεξίνη V. Παρατηρήθηκε σημαντική ($P=0,001$) μείωση των αποπτωτικών κυττάρων στους σηπτικούς ασθενείς σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.



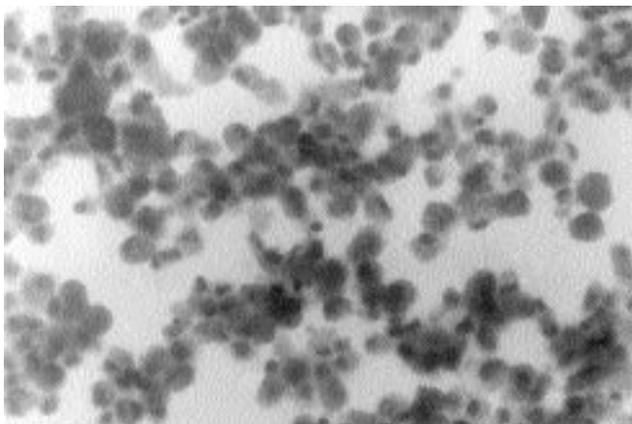
Εικόνα 2. Σύγκριση ποσοστού (%) κυψελιδικών μακροφάγων σημασμένων με FITC-ανεξίνη V και cd71-PE. Παρατηρήθηκε σημαντική ($P=0,001$) μείωση των αποπτωτικών μακροφάγων στους σηπτικούς ασθενείς σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.

ασθενών (61,5%) βρέθηκαν θετικά, ενώ όλα τα δείγματα ($n=9$, 100%) της ομάδας ελέγχου ήταν αρνητικά. Η διαφορά αυτή βρέθηκε στατιστικά σημαντική ($P=0,006$) (εικ. 5). Όσον αφορά την κυτταρική νέκρωση με τη χρήση της ανεξίτης V, δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων.

Ο ενδοπυρηνικός κατακερματισμός του DNA συχνά χρησιμοποιείται ως κριτήριο για την ανίχνευση της απόπτωσης με την τεχνική DNA ladder.¹⁶⁻¹⁹ Στη δική μας μελέτη, η ηλεκτροφόρηση του DNA κυττάρων BAL αποκάλυψε κατακερματισμό του DNA μόνο σε 4 σηπτι-



Εικόνα 6. Πίκτωμα αгарόζης DNA ladder. Στήλη 1: 100 kb DNA ladder. Στήλη 2: σηπτικοί ασθενείς (χαρακτηριστική απεικόνιση DNA ladder). Στήλες 3, 4: μάρτυρες.

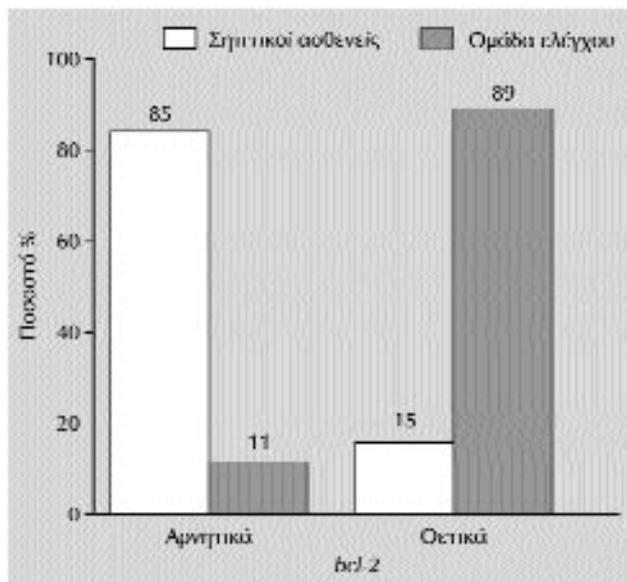


Εικόνα 7. Έκφραση του γονιδίου *bcl-2* σε κύτταρα από BAL σηπτικού ασθενούς. Μεγέθυνση εικόνας $\times 400$.

της ομάδας μελέτης βρέθηκε στατιστικά σημαντική ($P=0,002$) (εικ. 8).

Επιβίωση

Η ομάδα των σηπτικών ασθενών βαθμολογήθηκε, με το APACHE II, κατά την εισαγωγή, με $15,9 \pm 1,26$, ενώ



Εικόνα 8. Η έκφραση του γονιδίου *bcl-2* ήταν 89% και 15% για τους μάρτυρες και τους σηπτικούς ασθενείς, αντίστοιχα.

η κλίμακα MOF ήταν $6 \pm 10,95$. Η θνητότητα της ομάδας μελέτης ήταν 85%, με μέση επιβίωση 36,8 ημερών και διάμεση 32 ημερών. Από τους 20 σηπτικούς ασθενείς, επιβίωσαν οι 3 (15%). Η αιτία θανάτου, κοινή για όλους τους ασθενείς, ήταν η ανεπάρκεια πολλαπλών ζωτικών οργάνων. Οι 3 ασθενείς που επιβίωσαν ήταν όλοι άρρενες, μέσης ηλικίας 59,3 ετών και με μέση παραμονή στη μονάδα 62 ημερών. Η μέση τιμή του ποσοστού των αποπτωτικών κυττάρων του BAL και ιδιαίτερα των μακροφάγων στους επιβιώσαντες ήταν 31,9% και 60%, αντίστοιχα. Κανείς από τους εθελοντές της ομάδας ελέγχου δεν απεβίωσε. Η μέση τιμή του APACHE II ήταν $7,88 \pm 1,7$ και ήταν σημαντικά μικρότερη από την αντίστοιχη της ομάδας μελέτης ($P=0,003$).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η απελευθέρωση τοξικών παραγόντων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και εξέλιξης του σηπτικού συνδρόμου οδηγεί σε σοβαρή βλάβη των ιστών συγκεκριμένων οργάνων-στόχων. Ένα όργανο-στόχος, το οποίο συχνά υφίσταται βλάβη στους σηπτικούς ασθενείς, είναι οι πνεύμονες. Σε μελέτες πειραματικών μοντέλων σήψης έχει βρεθεί συσχέτιση της απόπτωσης με την ανάπτυξη και εξέλιξη της σήψης.²⁰⁻²³ Οι Lee et al αναφέρουν μειωμένο αριθμό αποπτωτικών πολυμορφοκυττάρων σε τομές πνευμονικού ιστού από κουνέλια που έπασχαν από πνευμονίτιδα.⁹ Οι Tsuchida et al αναφέρουν επίσης παράταση της επιβίωσης πολυμορφοκυττάρων, τα οποία απομώθηκαν από την περιτοναϊκή κοιλότητα πειραματοζώων

μετά από ενδοπεριτοναϊκή έγχυση μιας πεπτόνης που αυξάνει την απόπτωση, σε σχέση με τα πολυμορφοπύρνα τα οποία κυκλοφορούν στο αίμα.²⁴ Παρόλα αυτά, ο ρόλος της απόπτωσης σε σπηκικούς ασθενείς δεν είναι σαφής.²⁵⁻²⁷ Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη στη βιβλιογραφία, που εξετάζει τη λειτουργία της απόπτωσης σε BAL σπηκικών ασθενών.

Στη μελέτη μας χρησιμοποιήθηκαν 4 διαφορετικές τεχνικές, προκειμένου να ανιχνευθεί η απόπτωση: η ανεξίτη V, το DNA ladder, το TUNEL και η μικροσκοπηση. Με τη μέθοδο της ανεξίτη V προσπαθήσαμε να ποσοτικοποιήσουμε τα αποτελέσματά μας και βρέθηκε ότι η απόπτωση των κυτάρων του BAL και ιδιαίτερα των μακροφάγων, ήταν σημαντικά μικρότερη στους σπηκικούς ασθενείς σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (εικόνες 1, 2). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν περαιτέρω με τη βοήθεια του TUNEL και της μικροσκοπησης των δειγμάτων. Αντίθετα, με την ηλεκτροφόρηση του DNA κυτάρων BAL, η οποία εντοπίζει τον κατακερματισμό του DNA, γεγονός που αποτελεί ένδειξη αποπτωτικού θανάτου, δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της ομάδας μελέτης και της ομάδας ελέγχου. Ενώ ο ενδοπυρηνικός κατακερματισμός του DNA θεωρείται δείκτης ανίχνευσης της απόπτωσης, δεν υπάρχουν αξιόπιστα στοιχεία που να υποστηρίζουν ότι η τμηματική διάσπαση του DNA αντιστοιχεί και σε αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο. Υπάρχουν αρκετές μελέτες που περιγράφουν όλα τα στάδια του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου, δεν ανιχνεύουν όμως τον κατακερματισμό του DNA.²⁸⁻³²

Ένας ακόμη στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της πιθανής επίδρασης της απόπτωσης στην επιβίωση των σπηκικών ασθενών. Δυστυχώς, στη μελέτη μας, μόνο 3 ασθενείς επιβίωσαν, έτσι ώστε η εξαγωγή συμπερασμάτων, λόγω του μικρού δείγματος, να είναι αμφίβολης αξιοπιστίας.

Ο μηχανισμός με τον οποίο παρατηρείται η αναστολή της απόπτωσης στα κύτταρα από BAL σπηκικών ασθενών παραμένει άγνωστος. Η διαδικασία της απόπτωσης ελέγχεται από μια ποικιλία ερεθισμάτων, γενετικών, κυτταρικών και βιοχημικών, είτε ενδογενούς είτε εξωγενούς προέλευσης. *In vitro* μελέτες έδειξαν ότι διάφορες κυταροκίνες, όπως οι G-CSF, GM-CSF, INF- γ , TNF α , IL-2, IL-6, καθώς και τα γλυκοκορτικοειδή, μπορούν να ενεργοποιήσουν ή να αναστείλουν την κυτταρική απόπτωση, με αποτέλεσμα η φλεγμονώδης αντίδραση, από μόνη της, να μπορεί να επηρεάσει τον πολλαπλασιασμό και το θάνατο των κυτάρων ενός ιστού. Παρόλα αυτά, ο μηχανισμός που ελέγχει την απόπτωση στους σπηκικούς ασθενείς παραμένει άγνωστος. Στη μελέτη μας, εξετάσαμε το ρόλο του αντι-αποπτωτικού

γονιδίου *bcl-2*. Το γονίδιο *bcl-2* αποτελεί βασικό ρυθμιστή της λειτουργίας της απόπτωσης, αφού παρατείνει την κυτταρική επιβίωση αναστέλλοντας τη δράση υποδοχέων που χρειάζονται για την ενεργοποίηση πρωτεασών (κασπάσες), οι οποίες αποικοδομούν το κύτταρο. Παλαιότερες μελέτες απέδειξαν ότι η υπερέκφραση του *bcl-2* σε διαγονιδιακά σπηκικά πειραματόζωα βελτιώνει σημαντικά την επιβίωση των πειραματόζωων και προστατεύει τα κύτταρα από τον αποπτωτικό θάνατο. Φαίνεται λοιπόν ότι η επίδραση του *bcl-2* στο ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή, καθώς και στην τελική έκβαση του ξενιστή, είναι ιδιαίτερα σημαντική.³³ Στη μελέτη μας, η έκφραση του γονιδίου *bcl-2* ήταν σημαντικά χαμηλότερη στους σπηκικούς ασθενείς σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Αυτό το εύρημα μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι ο ρόλος του *bcl-2* δεν είναι ρυθμιστικός, όσον αφορά την αναστολή της απόπτωσης στα πνευμονοκύτταρα σπηκικών ασθενών. Έτσι, το πολύ χαμηλό ποσοστό επιβίωσης των ασθενών μας ενδέχεται να σχετίζεται με την απώλεια έκφρασης του *bcl-2*.

Η μέτρηση της απόπτωσης των κυτάρων BAL αποτελεί μια στατική μέτρηση μιας δυναμικής διαδικασίας, η οποία αντιπροσωπεύει την ισορροπία μιας συγκεκριμένης χρονικής στιγμής μεταξύ της εξέλιξης της αποπτωτικής διαδικασίας και της φαγοκυττάρωσης των αποπτωτικών σωματιδίων. Χρειάζονται λοιπόν συνεχείς, διαδοχικές μετρήσεις της απόπτωσης των BAL-κυτάρων, προκειμένου να καθοριστεί ο προγνωστικός ρόλος της απόπτωσης σε σπηκικούς ασθενείς. Όμως, η διαδοχική λήψη BAL από ήδη βαρέως πάσχοντες ασθενείς εγείρει ηθικά προβλήματα και καθίσταται ανέφικτη. Έχουμε ήδη αρχίσει να ερευνούμε εναλλακτικές μεθόδους για τον καθορισμό της αποπτωτικής κατάστασης του πνεύμονα, πραγματοποιώντας δειγματοληψίες στοματικού και ρινικού βλεννογόνου –οι οποίες φαίνεται να αντιπροσωπεύουν το υπόλοιπο αναπνευστικό επιθήλιο– με τη μέθοδο της «βούρτσας». Ο ορισμός της σήψης περιλαμβάνει τον όρο της χαμηλής ιστικής οξυγόνωσης. Προκειμένου να συσχετιστεί η σήψη και η απόπτωση και τα συμπεράσματα να εφαρμοστούν στην καθημερινή κλινική πράξη, χρειάζεται επίσης να ερευνηθεί αν αυτή η μείωση της απόπτωσης στους σπηκικούς ασθενείς επηρεάζει την προσφορά και την κατανάλωση οξυγόνου στους περιφερικούς ιστούς.

Η έναρξη και η λύση της φλεγμονώδους αντίδρασης είναι πολύπλοκες διαδικασίες, οι οποίες αποτελούν κέντρο επισταμένων ερευνών τα τελευταία χρόνια. Η απόπτωση αποτελεί την κυρίαρχη διαδικασία για τη λύση της φλεγμονώδους αντίδρασης, με κυρίαρχο τον κυτταρικό πληθυσμό των πολυμορφοπυρηνών. Αρχικά, ο ρόλος της απόπτωσης μπορεί να είναι ευεργετικός για

την επιβίωση του ξενιστή, αφού μειώνει δραστικά τη φλεγμονώδη αντίδραση. Όμως, φαίνεται ότι στην ευεργετική δράση της απόπτωσης υπάρχει ένα κριτικό όριο, πέρα από το οποίο η απόπτωση των παρεγχυματικών κυττάρων οδηγεί σε ιστική καταστροφή, στην οργανική ανεπάρκεια και τελικά στο θάνατο.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστούμε το Τμήμα Ανοσολογίας του Νοσοκομείου «Έλενα Βενιζέλου» και ιδιαίτερα τις κυρίες Μ. Βάρλα-Λευθεριώτου και Α. Χιώτη. Επίσης, ευχαριστούμε την κα Βασιλική Κοζώνη.

ABSTRACT

Apoptosis in bronchoalveolar cells represents a major pathophysiologic pathway of death in septic patients

C. LIACOS,¹ M.M. KONSTADOUAKIS,^{1,2} S. KATSARAGAKIS,² E. MESSARIS,¹

M. PAPANICOLAOU,³ G. GEORGIADIS,³ E. MENEKAKOS,² A. MARGIOLIS,² G. ANDROULAKIS^{1,2}

¹Laboratory of Surgical Research, First Department of Propedeutic Surgery, University of Athens, Medical School,

²Surgical Intensive Care and Trauma Unit, First Department of Propedeutic Surgery, University of Athens, Medical School,

³Intensive Care Unit, Hippokration General Hospital, Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2000, 17(2):180-188

OBJECTIVE Apoptosis represents a physiological clearance mechanism in human tissues. The role of apoptosis has not been examined in lung cell populations of septic patients, although the lung is frequently affected in these patients. This study was designed to examine the effect of sepsis on the apoptosis of bronchoalveolar cells and macrophages. **METHOD** Bronchoalveolar lavage (BAL) was obtained from 20 consecutive patients, admitted to two intensive care units, who met the criteria for sepsis. BAL from 9 volunteers without lung disease served as controls. The specimens were analyzed using annexin V binding, terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling (TUNEL), DNA laddering, light microscopy and the expression of the *bcl-2* gene. **RESULTS** Spontaneous apoptosis of BAL cells and particularly of alveolar macrophages was significantly decreased in septic patients compared to the non-septic volunteers ($P < 0.01$). This finding was confirmed using morphologic criteria and the TUNEL method. Gel electrophoresis of DNA obtained from bronchoalveolar cells revealed that DNA fragmentation was not necessarily associated with apoptotic cell death. The *bcl-2* gene was significantly ($P < 0.01$) overexpressed in the control group. **CONCLUSIONS** The prolonged survival of lung cells in septic patients and especially of alveolar macrophages is due to the inhibition of apoptosis. This represents an initial attempt of the host to increase the defensive capacity for killing invading microorganisms resulting in an imbalanced tissue load inhibition of cells and an uncontrolled release of toxic metabolites. Apoptosis inhibition may in this way explain the destruction of the lung architecture and function which leads to sepsis-induced acute respiratory distress syndrome and death.

Key words: Annexin V, Apoptosis, *bcl-2*, Bronchoalveolar lavage (BAL), DNA ladder, Light microscopy, Sepsis, TUNEL

Βιβλιογραφία

- CARSON WE, YU H, DIERKSHEIDE J. A fatal cytokine-induced systemic inflammatory response reveals a critical role for NK cells. *J Immunol* 1999, 162:4943-4951
- GLYNNE PA, EVANS TJ. Inflammatory cytokines induce apoptotic and necrotic cells shedding from human proximal tubular epithelial cell monolayers. *Kidney Int* 1999, 55:2573-2597
- HAMADA E, NISHIDA T, UCHIYAMA Y. Activation of Kupffer cells and caspase-3 involved in rat hepatocyte apoptosis induced by endotoxin. *J Hepatol* 1999, 30:807-818
- HOTCHKISS RS, SWANSON PE, COBB JP, JACOBSON A, BUCHMAN TG, KARL IE. Apoptosis in lymphoid and parenchymal cells during sepsis: Findings in normal and T- and B-cell-deficient mice. *Crit Care Med* 1997, 25:1298-1307

5. AMERICAN COLLEGE OF CHEST PHYSICIANS/SOCIETY OF CRITICAL CARE MEDICINE CONSENSUS CONFERENCE. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992, 20:864–874
6. KNAUS WA, ZIMMERMAN JE, WAGNER DP. APACHE–acute physiology and chronic health evaluation: A physiologically based classification system. *Crit Care Med* 1981, 9:591–597
7. KATSARAGAKIS S, PAPANIMITROPOULOS K, ANTONAKIS P, STERGIOPOULOS S, KONSTANTOULAKIS MM, ANDROULAKIS G. Comparison of Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II (APACHE-II) and Simplified Acute Physiology Score II (SAPS-11) scoring systems in a single Greek intensive care unit. *Crit Care Med* 2000, 28:426–432
8. MARSHALL JC, COOK DJ, CHRISTOU NV, BERNARD GR, SPRUNG CC, SIBBAD WJ. Multiple organ dysfunction score: a reliable descriptor of a complex clinical outcome. *Crit Care Med* 1995, 23:1638–1652
9. LEE A, WHYTE MK, HASLETT C. Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. *J Leuk Biol* 1993, 54:283–288
10. MCGAHON AJ, MARTIN SJ, BISSONNETTE RP, MAHBOUBI A, SHI Y, MOGIL RJ ET AL. The end of the (cell) line methods for the study of apoptosis *in vitro*. *Methods Cell Biol* 1995, 46:153–185
11. HOMBURG CH, DE HASS M, VON DEM BORNE AE, VERHOEVEN AJ, REUTELLINGSPERGER CP, ROOS D. Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire annexin V binding sites during apoptosis *in vitro*. *Blood* 1995, 85:532–540
12. LITES WC, KIENER JA, LEDBETTER A, ARUFFO A, KLEBANOFF SJ. Differential expression of Fas (CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes: implications for the regulation of apoptosis in neutrophils. *J Exp Med* 1996, 184:429–440
13. VIKSMAN MY, LIU MC, SCHLEIMER RP, BOCHNER B. Application on flow cytometric method using autofluorescence and a tandem fluorescent dye to analyze human alveolar macrophage surface markers. *J Immunol Methods* 1994, 172:17–24
14. GAVRIELI Y, SHERMAN Y, BENSASSON S. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992, 119:493–501
15. GORCYZA W, GONG J, DARZYNKIEWICZ Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the *in situ* terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res* 1993, 53:1945–1951
16. AREND MJ, WYLLIE A. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol* 1991, 32:223–254
17. COHEN JJ. Programmed cell death in the immune system. *Adv Immunol* 1991, 50:55–85
18. GOLSTEIN P, OJCIUS DM, YOUNG JDE. Cell death mechanisms of the immune system. *Immunol Rev* 1991, 121:29–65
19. RAFF MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature (London)* 1992, 356:397–400
20. BOHLINGER I, LEIST M, GATNER F, ARGEMULLER S, TIEGS G, WENDEL A. DNA fragmentation in mouse organs during endotoxic shock. *Am J Pathol* 1996, 149:1381–1393
21. FRIEDMAN AH, CARDO CC, BAYOUMY S, GARZOTTO M, McLOUGHLIN M, GALLILY R ET AL. Lipopolysaccharide induces disseminated endothelial apoptosis requiring ceramide generation. *J Exp Med* 1997, 186:1831–1841
22. CHUNG CS, XU YX, WANG W, CHAUDRY IH, AYALA A. Is fas ligand or endotoxin responsible for mucosal lymphocyte apoptosis in sepsis? *Arch Surg* 1998, 133:1213–1220
23. AYALA A, URBANICH MA, HERDON CD, CHAUDRY IH. Is sepsis induced apoptosis associated with macrophage dysfunction? *J Trauma* 1996, 40:568–574
24. TSUCHIDA H, TAKEDA Y, TAKEI H, SHINZAWA H, TAKAHASHI T, SENDO F. *In vivo* regulation of rat neutrophil apoptosis occurring spontaneously or induced with TNF-alpha or cyclohexamide. *J Immunol* 1995, 154:2403–2412
25. BARDALES RH, XIE SS, SCHAEFER RF, HSU SM. Apoptosis is a major pathway responsible for the resolution of type II pneumocytes in acute lung injury. *Am J Pathol* 1996, 149:845–852
26. COUTINHO HB, ROBALINHO TI, COUTINHO VB, AMORIN AMS, FURTANDO AF, FERRAZ A ET AL. Intraabdominal sepsis: an immunohistochemical study of the small intestine mucosa. *J Clin Pathol* 1997, 50:294–298
27. JIMENEZ MF, WATSON RWG, PARODO J, EVANS D. Dysregulated expression of neutrophil apoptosis in the systemic inflammatory response syndrome. *Arch Surg* 1997, 132:1263–1270
28. SCHULZE-OSTHOFF K, WALCZAK H, DRÖGE W, KRAMMER PH. Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis. *J Cell Biol* 1994, 127:15–20
29. COHEN GM, SUN XM, SNOWDEN RT, DINSDALE D, SKILITER DN. Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. *Biochem J* 1992, 286:331–334
30. FALCIERI E, MARTELLI AM, BAREGGI R, CATALDI A, COCCO L. The protein kinase inhibitor staurosporine induces morphological fragmentation. *Biochem Biophys Res Commun* 1993, 193:19–25
31. OBERHAMMER F, FRITSCH G, SCHMIED M, PAVELKA M, PRINTZ D, PURCHIO T ET AL. Condensation of the chromatin at the membrane of an apoptotic nucleus is not associated with activation of an endonuclease. *J Cell Sci* 1993, 104:317–326
32. SCHWARTZ RS, SALIE SW, JONES MEE, OSBORNE BA. Do all programmed cell deaths occur via apoptosis? *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90:980–984
33. HOTCHKISS RS, TINSLEY KW, SWANSON PE, CHANG KC, COBB JP, BUCHMAN TG ET AL. Prevention of lymphocyte cell death in sepsis improves survival in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96:14541–14546

Corresponding author:

M.M. Konstadoulakis, 24 Kalvou street, GR-154 52 P. Psychico, Athens, Greece