

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ

Καθ. Ν. Σιαφάκας

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΣΤΑΘΕΙΑΣ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΟΥ DNA
(MICROSATELLITE INSTABILITY) ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΚΑ
ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗ
ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑ**

ΕΛΕΝΗ Γ. ΤΖΩΡΤΖΑΚΗ

Ιατρός-Πνευμονολόγος

Δεκέμβριος 1999

Ηράκλειο Κρήτης

Στους γονείς μου

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΕΛΕΝΗ Γ. ΤΖΩΡΤΖΑΚΗ

Ιατρός-Πνευμονολόγος

Τόπος και ημερομηνία γέννησης: 9 Αυγούστου 1967, Ηράκλειο Κρήτης

Σπουδές:

1985-1986

Ρουμανική Γλώσσα

Πανεπιστήμιο Κραιόβας, Ρουμανίας.

1986-1992

Ιατρική Σχολή

Σχολή Ιατρικής και Φαρμακευτικής

Πανεπιστήμιο Τιμισοάρας, Ρουμανία.

1991-1992

Διπλωματική Εργασία

Εργαστήριο Γενετικής, Πανεπιστημιακή Οφθαλμιατρική Κλινική,

Σχολή Ιατρικής και Φαρμακευτικής

Πανεπιστήμιο Τιμισοάρας, Ρουμανία.

Κληρονομικές παθήσεις των οφθαλμών.

1994-1998

Ειδίκευση στην Πνευμονολογία/Φυματιολογία

Πνευμονολογική Κλινική, Ιατρικής Σχολής

Πανεπιστήμιο Κρήτης.

1996-1999

Διδακτορική Διατριβή

Μελέτη της Αστάθειας του Μικροδορυφορικού DNA (Microsatellite Instability) σε κυτταρολογικά δείγματα ασθενών με Χρόνια

Αποφρακτική πνευμονοπάθεια

Πνευμονολογική Κλινική, Εργαστήριο Κλινικής Ιολογίας

Ιατρικής Σχολής

Πανεπιστήμιο Κρήτης.

1999-

Μεταδιδακτορικές Σπουδές/Εξειδίκευση στην Μοριακή Βιολογία και Γενετική (Postdoctoral studies)

Rutgers, The State University of New Jersey, USA

Department of Genetics.

Κλινική Εμπειρία:

1992-1993

Τρίμηνη εκπαίδευση στην Γενική Χειρουργική και Παθολογία, Απολλώνειο Γενικό Νοσοκομείο, Ηρακλείου Κρήτης.

1993-1994

Υπηρεσία Υπαίθρου, Υγειονομικός Σταθμός Ζαρού, Ηρακλείου Κρήτης

1996

Εθελοντική συμμετοχή σε επιχείρηση παροχής ιατρικής φροντίδας σε ακριτικά ελληνικά νησιά (Καστελλόριζο, Δωδεκανήσων)

1994-1998

Ειδίκευση στην **Πνευμονολογία /Φυματολογία**, όπως ακολουθεί:

- 1994-1995 Πνευμονολογική Κλινική, Βενιζέλειο Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου, Κρήτης.
- 1995-1997 Πνευμονολογική Κλινική, Περιφεριακό Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου, Κρήτης
- 1996 Μονάδα Εντατικής Θεραπείας, Περιφεριακό Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου, Κρήτης
- 1996-1997 Εργαστήριο Μελέτης Διαταραχών Ύπνου, Πνευμονολογική Κλινική, Περιφεριακό Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου, Κρήτης
- 1997-1998 Β' Παθολογική Κλινική, Βενιζέλειο Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου, Κρήτης.

Ερευνητική Εμπειρία:

- 1991-1992 **Διπλωματική Εργασία**
Εργαστήριο Γενετικής, Πανεπιστημιακή Οφθαλμιατρική Κλινική,
Σχολή Ιατρικής και Φαρμακευτικής
Πανεπιστήμιο Τιμισοάρας, Ρουμανία
- 1996-1999 **Διδακτορική Διατριβή**
Πνευμονολογική Κλινική, Εργαστήριο Κλινικής Ιολογίας, Ιατρικής Σχολής,
Πανεπιστήμιο Κρήτης,
- 1999- **Μεταδιδακτορικές Σπουδές (Postdoctoral studies)**
Department of Genetics
Rutgers, The State University of New Jersey, USA

Βραβεία-Διακρίσεις:

Πρώτο Βραβείο καλύτερης εργασίας.

9ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Θεσσαλονίκη 1997.

Ε. Γ. Τζωρτζάκη, Δ. Μπούρος, Γ. Σουρβίνος, Δ.Σπαντίδος, Ο. Βουλγαράκη και Ν.Μ.

Σιαφάκας. Ανίχνευση της Αστάθειας του Μικροδορυφορικού DNA σε κυτταρολογικά δείγματα ασθενών με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (Χ.Α.Π.), σε σύγκριση με καπνιστές χωρίς σπιρομετρικά ή κλινικά ευρήματα Χ.Α.Π.

Χρηματικό έπαθλο απο την **Boehringer Ingelheim, Hellas**.

Συμμετοχή σε Διεθνή Συνέδρια:

1999 65th Annual International Scientific Assembly, CHEST 1999. Chicago, **USA**

1997 European Thoracic Society (ERS) Annual Conference. Berlin, **Germany**.

1997 5th International Congress on Sarcoidosis, Granulomatous and Vasculitic Disorders. Essen, **Germany**.

1997 1st International Conference on Snoring and Sleep Apnea. Athens, **Greece**.

1997 American Thoracic Society (ATS) Annual Conference. San Francisco, **USA**.

1996 European Thoracic Society (ERS) Annual Conference. Stocholm, **Sweden**.

1996 American Thoracic Society (ATS) Annual Conference. New Orleans, **USA**.

1995 1st World Congress on Advances in Oncology. Athens, **Greece**.

1995 VIII European Congress of Intensive Care Medicine. Athens, **Greece**.

Δημοσιευμένες εργασίες:

- Siafakas N.M., **Tzortzaki E.G.**, Sourvinos G., Bouros D., Tzanakis N., Kafatos A., Spandidos D. Microsatellite DNA Instability in COPD. *Chest* 1999;116(1):47-51.
- **Tzortzaki E.G.**, Sourvinos G., Bouros D., Spandidos D., Siafakas N.M. Microsatellite DNA Instability is common in COPD and not in non-COPD smokers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997;155(4):A587.
- **Tzortzaki E.G.**, Sourvinos G., Bouros D., Spandidos D., Siafakas N.M. Microsatellite DNA Instability in COPD patients and not in non-COPD smokers. *Eur. Respir. J.* 1997;10(25):486s.
- D.A.Vasilakis, **E.G.Tzortzaki**, G.Sourvinos, M.Markatos, K.Psathakis, D.Spandidos, N.M.Siafakas, D.Bouros. Microsatellite Instability in patients with Sarcoidosis. *Sarcoidosis, Vasculitis and Diffuse Lung Diseases.* 1997;14(supp.1):18.
- **Tzortzaki E.G.**, Hatzistamou J., Bouros D., Prinianakis G., Ergazaki M., Kiaris H., Spandidos D., Siafakas N.M. Microsatellite DNA Instability (MI) in cytological specimens from patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Eur. Respir. J.* 1996;9(23):283s.
- **Tzortzaki E.G.**, Hatzistamou J., Bouros D., Markatos M., Ergazaki M., Kiaris H., Spandidos D., Siafakas N.M. Microsatellite DNA Instability in Cytological specimens from patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). *Pneumon* 1996;1:9.
- Spandidos D.A., Ergazaki M., Hatzistamou J., Kiaris H., Bouros D., **Tzortzaki E.G.**, Siafakas N.M. Microsatellite instability in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Oncology Reports* 1996;3:489-491.

- Siafakas N.M., **Tzortzaki E.G.**, Hatzistamou J., Bouros D., Markatos M., Ergazaki M., Kiaris H., Spandidos D. Microsatellite DNA Instability (MI) in cytological specimens from patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Am. J., Respir. Crit. Care Med.* 1996;153(4):A50.
- **Tzortzaki E.G.**, Prinianakis G., Bouros D., Ergazaki M., Spandidos D., Siafakas N.M. (1996). Microsatellite DNA Instability in cytological specimens from patients with COPD. *Proceedings of the 8th Cretan Medical Conference*, 1996;8:234.
- Siafakas N.M., **Tzortzaki E.G.**, Bouros D. Acute exacerbation of COPD. *Proceedings of the 8th European Congress of Intensive Care Medicine.* 1995;8:141-146.
- N.Bahlitzanakis, E.Kondili, N.Rovina, **E.Tzortzaki**, G.Alegakis, Y.Bibakis, Y.Vavuranakis (1995). Study of Mantoux dermo-reaction in 3846 new students of Heraklion Technological Institute during eight successive years, between 1987 and 1994. *European Journal of Internal Medicine* 1995;651:83.

Επιπλέον παρουσιάσεις σε επιστημονικά συνέδρια:

1. N.Bahlitzanakis, **E.Tzortzaki**, M.Moshonas, N.Rovina, E.Kondili, K.Hahliutis, I.Drositis (1996). Endoscopical study of the Lung Right-Upper Lobe Branching, in the Cretan population.VIII Hellenic Congress on Thoracic Disease, Athens, **Greece**.
2. J.Hatzistamou, M.Ergazaki, H.Kiaris, **E.G.Tzortzaki**, N.M.Siafakas and D.A.Spandidos (1995). Microsatellite DNA Instability in patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease.1st World Congress on Advances in Oncology, Athens, **Greece**.
3. N.Bahlitzanakis, M.Arvanitakis, M.Xidaki, G.Prinianakis, **E.Tzortzaki**, I.Bibakis, M.Moshonas, V.Aggelaki, F.Tsekoura (1994). Asthma and Asthmatic Bronhitis incidence among school pupils of Iraklion, Crete. VII Cretan Medical Conference, Crete, **Greece**.

4. N.Bahlitzanakis, I.Bibakis, G.Prinianakis, **E.Tzortzaki**, M.Moshonas, M.Arvanitakis (1994).
Mantoux dermo-reaction incidence due to familial contact with tuberculosis patients the last decade in the Iraklion area. VII Cretan Medical Conference, Crete, **Greece**.

Μέλος:

1. American College of Chest Physicians (ACCP).
2. Ελληνική Πνευμονολογική Εταιρεία
3. Ελληνική Αντικαπνιστική Εταιρεία
4. Ένωση Ελλήνων Καταναλωτών

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΝ ΑΡΧΗ.....

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	20
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	21
SUMMARY.....	25

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΠΡΩΤΗ ΕΝΟΤΗΤΑ: ΧΡΟΝΙΑ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑ(Χ.Α.Π.)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ Χ.Α.Π.....	29
--------------------------	----

Κεφάλαιο 1:

ΟΡΙΣΜΟΣ, ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ & ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΧΡΟΝΙΑΣ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑΣ

1.1	Ορισμός.....	36
1.2	Διαφορική Διάγνωση.....	39
1.3	Επιδημιολογία.....	41

Κεφάλαιο 2:

ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΧΡΟΝΙΑΣ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑΣ

2.1	Η Βρετανική Υπόθεση.....	48
2.2	Η Ολλανδική Υπόθεση.....	52
2.3	Η Αμερικανική Υπόθεση.....	54

Κεφάλαιο 3:

ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΗΣ ΧΡΟΝΙΑΣ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑΣ

3.1	Ηλικία, Κάπνισμα και Αναπνευστική Λειτουργία.....	60
3.2	Ατμοσφαιρική Ρύπανση.....	65
3.3	Επαγγελματική Έκθεση.....	66
3.4	Κοινωνικοοικονομικό Επίπεδο.....	66

Κεφάλαιο 4:

ΦΥΣΙΚΗ ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΧΡΟΝΙΑΣ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑΣ

4.1	Εικόνα Χρόνιας Βρογχίτιδας.....	68
4.2	Εικόνα Εμφυσήματος.....	70

Κεφάλαιο 5:

ΧΡΟΝΙΑ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑ & ΚΙΝΔΥΝΟΣ ΑΛΛΗΣ ΝΟΣΟΥ

5.1	Χ.Α.Π. και Καρκίνος του Πνεύμονα.....	72
5.2	Χ.Α.Π. και Στεφανιαία Νόσος.....	73

Κεφάλαιο 6:

ΓΕΝΕΤΙΚΗ & ΧΡΟΝΙΑ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑ

6.1	α1-αντιθρυψίνη.....	76
6.2	α1-αντιχυμοθρυψίνη.....	78
6.3	ο ρυθμιστής της αγωγιμότητας της μεμβράνης (CFRT).....	79
6.4	Vitamin D-binding protein (VDBP).....	80
6.5	α2-μακροσφαιρίνη.....	80
6.6	Κυτόχρωμα P4501A1.....	81
6.7	Αντιγόνα ομάδων αίματος.....	83
6.8	Human Leucocyte Antigen Locus (HLA).....	83
6.9	Ανεπάρκεια Ανοσοσφαιρινών.....	83
6.10	Εξωκυτταρική Υπεροξειδική Δισμουτάση (EC-SOD).....	84
6.11	Secretory Leucocyte Proteinase Inhibitor (SLPI).....	84
	<u>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</u>	86

ΔΕΥΤΕΡΗ ΕΝΟΤΗΤΑ: ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΟ DNA(Microsatellite DNA)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟ ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΟ DNA.....88

Κεφάλαιο 1:

ΔΙΑΔΟΧΙΚΑ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΟ DNA ΧΩΡΙΣ

ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΤΙΚΗ_ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ (non-coding DNA).....91

Κεφάλαιο 2:

ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ

ΤΩΝ ΕΙΔΩΝ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΙ ΤΩΝ ΟΥΔΕΤΕΡΩΝ

ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ: Η ΧΡΗΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΠΛΕΟΝΑΖΟΝΤΟΣ

DNA (useful “junk” DNA).....98

Κεφάλαιο 3:

ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΟ DNA: ΜΕΛΕΤΗ & ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

3.1 Ανάλυση του Γονιδιώματος.....104

3.2 Ανάλυση της Δυσαναλογίας Αλληλομόρφων.....105

3.3 Μελέτη του Μικροδορυφορικού DNA σε νοσήματα του ανθρώπου.....107

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....113

ΤΡΙΤΗ ΕΝΟΤΗΤΑ:
Η ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΜΕ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ (PCR) ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ
ΣΤΗΝ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ.

Κεφάλαιο 1:

Η ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ

ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΜΕ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ.....116

Κεφάλαιο 2:

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΜΕ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ

- 2.1 Εφαρμογή της PCR, στην ανάλυση του φαινομένου του πολυμορφισμού και στον έλεγχο των παθογενετικών μεταλλάξεων.....122
- 2.2 Εφαρμογή της PCR στην μη επιλεκτική ενίσχυση DNA αλληλουχιών, όταν το DNA, είναι διαθέσιμο σε ελάχιστη μόνο ποσότητα.....123
- 2.3 Εφαρμογή της PCR στην κλωνοποίηση μη χαρακτηρισμένων αλληλουχιών DNA, οι οποίες βρίσκονται εκατέρωθεν ήδη γνωστών αλληλουχιών.....124

2.4	Εφαρμογή των «προϊόντων» της PCR στον προσδιορισμό της αλληλουχίας των νουκλεοτιδικών βάσεων του DNA (Sequencing of DNA), χρησιμοποιώντας την μέθοδο της «μη συμμετρικής» PCR.....	125
2.5	Εφαρμογή της PCR στην πρόκληση προκαθορισμένων μεταλλάξεων στις αλληλουχίες του DNA (PCR mediated mutagenesis).....	126
	<u>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</u>	127

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

<u>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u>	130
------------------------------	-----

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΠΡΩΤΟ

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΑΣΤΑΘΕΙΑΣ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΟΥ DNA ΣΤΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑ.

1.1	Εισαγωγή-Στόχος.....	134
1.2	Κριτήρια Επιλογής Ασθενών.....	135

1.3	Δείγματα και εκχύλιση DNA.....	137
1.4	Επιλογή των Δεικτών του Μικροδορυφορικού DNA.....	138
1.5	Εφαρμογή της Αλυσιδωτής αντίδρασης με Πολυμεράση για την ενίσχυση των Μικροδορυφορικών αλληλουχιών του DNA.....	141
1.6	Ανίχνευση της Αστάθειας του Μικροδορυφορικού DNA.....	142
1.7	Στατιστική ανάλυση.....	143
1.8	Αποτελέσματα.....	145
1.9	Συζήτηση Πρώτου Πρωτόκολλου.....	150

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΣΤΑΘΕΙΑΣ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΟΥ DNA ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑ ΣΕ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΚΑΠΝΙΣΤΕΣ ΧΩΡΙΣ ΚΛΙΝΙΚΑ Η ΣΠΙΡΟΜΕΤΡΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ Χ.Α.Π.

2.1	Εισαγωγή-Στόχος.....	154
2.2	Κριτήρια Επιλογής Ατόμων.....	155
2.3	Εκχύλιση του DNA.....	160
2.4	Ανάλυση του Μικροδορυφορικού DNA.....	160
2.5	Επιλογή των δεικτών του Μικροδορυφορικού DNA.....	162
2.6	Εφαρμογή της Αλυσιδωτής αντίδρασης με Πολυμεράση.....	162
2.7	Στατιστική Ανάλυση.....	163
2.8	Αποτελέσματα.....	164
2.9	Συζήτηση Δεύτερου Πρωτόκολλου.....	177

ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΕΙΔΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ

Η ΑΣΤΑΘΕΙΑ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΟΥ DNA ΣΤΗΝ	
ΧΡΟΝΙΑ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑ: ΔΕΙΚΤΗΣ	
ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΕΥΠΑΘΕΙΑΣ?.....	181

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Αναφορές.....	191
Κατάλογος Δημοσιευμένων Εργασιών.....	221
Ανάπτυξη Δημοσιευμένων Εργασιών.....	223

EN APXH.....

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ολοκληρώνοντας τη συγγραφή της διατριβής μου, αισθάνομαι την επιθυμία να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον καθηγητή μου, Νικόλαο Σιαφάκα, που πρώτος με εισήγαγε στην ιδέα να μελετήσω τμήμα της μοριακής βιολογίας της Χρόνιας Αποφρακτικής Πνευμονοπάθειας. Τον ευχαριστώ για την ενθάρρυνση του να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα, για τις χρήσιμες συζητήσεις που είχαμε μαζί και τις εύστοχες πάντα υποδείξεις του, κατά την συγγραφή της διατριβής αυτής.

Ευχαριστώ τον αναπληρωτή καθηγητή Δημοσθένη Μπούρο για την αμεσότητα το χιούμορ και τις κριτικές υποδείξεις του, σαν μέλος της τριμελούς επιτροπής αυτής της διατριβής. Οφείλω επίσης να ευχαριστήσω τον καθηγητή Δημήτριο Σπαντίδο που πρόθυμα έθεσε στην διάθεση μου το εργαστήριο του. Παράλειψη θα ήταν να μην αναφερθώ στην βοήθεια και το ενδιαφέρον που έδειξαν για την ερευνητική μου μελέτη, η γραμματεία της Πνευμονολογικής κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου καθώς επίσης το νοσηλευτικό προσωπικό της Πνευμονολογικής κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου.

Ειδικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον σύζυγο μου Νεκτάριο Ταβερναράκη για την συμπαράσταση και την ουσιαστική βοήθεια που με μεγάλη προθυμία και αγάπη μου πρόσφερε όλους αυτούς τους μήνες. Χωρίς την πολύτιμη καθοδήγηση και τις υποδείξεις του δεν θα κατάφερνα να εξοικειωθώ με τις μεθόδους και τις τεχνικές της μοριακής βιολογίας που ήταν απαραίτητες για την ολοκλήρωση της έρευνας μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η **Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (Χ.Α.Π.)** αποτελεί μια από τις σημαντικότερες αιτίες νοσηρότητας και θνησιμότητας παγκοσμίως.

Όπως έχει διαπιστωθεί μέχρι τώρα από πολλές μελέτες, το κάπνισμα του τσιγάρου αντιπροσωπεύει τον κυριότερο παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη της Χ.Α.Π. Φαίνεται όμως ότι υπάρχει αξιοσημείωτη ατομική διαφοροποίηση όσον αφορά την απάντηση στην έκθεση του καπνού του τσιγάρου, αφού τελικά λιγότερο από 20% των καπνιστών αναπτύσσουν Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια. Αυτό υποδεικνύει ότι επιπλέον **γενετικοί** και **περιβαλλοντολογικοί** παράγοντες φαίνεται να ευθύνονται για την ανάπτυξη της νόσου. Αν και μέχρι τώρα πολλές κλινικές μελέτες σχετίζονται με την παθοφυσιολογία της Χ.Α.Π., εντούτοις ελάχιστα γνωρίζουμε για την μοριακή βάση της ασθένειας.

Το **Μικροδορυφορικό DNA** αποτελείται από βραχείες διαδοχικά επαναλαμβανόμενες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες και βρίσκεται διασκορπισμένο σε όλο το γονιδίωμα των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών, ενώ υπάρχει σε περισσότερες από 100.000 διαφορετικές θέσεις σε όλα τα χρωμοσώματα του ανθρώπου.

Το φαινόμενο της **Αστάθειας του Μικροδορυφορικού DNA (MICROSATELLITE INSTABILITY, MI)** έχει συνδεθεί με υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων και αποτελεί κοινό εύρημα στους περισσότερους καρκίνους.

Στην περίπτωση της Χρόνιας Αποφρακτικής Πνευμονοπάθειας, από τις μέχρι σήμερα γνωστές βιβλιογραφικές αναφορές, δεν έχει επιχειρηθεί η ανίχνευση του φαινομένου της Αστάθειας του Μικροδορυφορικού DNA.

Το **Πρώτο Πρωτόκολλο** της μελέτης μας, **σκοπό** είχε να διερευνήσει την πιθανότητα ανίχνευσης του φαινομένου της Αστάθειας του Μικροδορυφορικού DNA σε κυτταρολογικά δείγματα (πτύελα) ασθενών με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια και να εκτιμηθεί η περαιτέρω πιθανότητα διερεύνησης γενετικών διαταραχών στους ασθενείς με Χ.Α.Π., χρησιμοποιώντας σαν δείκτη Αστάθειας.

Δείγματα (πτύελα και περιφερικό αίμα) από τριάντα-ένα (**31**) **ασθενείς με Χ.Α.Π.** αναλύθηκαν. Έξι δείκτες του Μικροδορυφορικού DNA (Microsatellite markers)

χρησιμοποιήθηκαν, για τέσσερα διαφορετικά χρωμοσώματα Η Αστάθεια των την συχνότητα εμφάνισης του φαινομένου της μικροδορυφορικών αλληλουχιών, ανιχνεύθηκε συγκρίνοντας το ηλεκτροφορητικό μοντέλο των δεικτών του Μικροδορυφορικού DNA που ενισχύθηκαν με την μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης με Πολυμεράση (PCR), στα δυο διαφορετικά δείγματα DNA που χρησιμοποιήθηκαν από τον κάθε ασθενή, και τα οποία αντιστοιχούσαν στο DNA από το περιφερικό αίμα και στο DNA από το κυτταρολογικό δείγμα (πτύελα).

Αστάθεια του Μικροδορυφορικού DNA χαρακτηρίστηκε κάθε διαφορά στην κινητικότητα των μικροδορυφορικών αλληλομόρφων, πάνω στην πηκτή του πολυακρυλαμιδίου κατά την ηλεκτροφόρηση, όπως ακόμα και η δημιουργία νέων αλληλομόρφων (novel alleles). Το DNA που εκχειρίστηκε από το περιφερικό αίμα θεωρήθηκε το φυσιολογικό πρότυπο για το γονιδιακό DNA, ενώ το DNA που προήλθε από τα πτύελα, ελέγχθηκε για την έκφραση του φαινομένου της αστάθειας των μικροδορυφορικών αλληλουχιών.

Από τις τριάντα-ένα (31) περιπτώσεις που μελετήθηκαν επτά (7), δηλαδή ποσοστό **23%** εμφάνισαν **Αστάθεια του Μικροδορυφορικού DNA**. Στις πέντε (5), από τις επτά (7) θετικές περιπτώσεις, Αστάθεια ανιχνεύθηκε μόνο σε ένα μικροδορυφορικό δείκτη, ενώ στις υπόλοιπες δύο (2) θετικές περιπτώσεις η αστάθεια αφορούσε δύο μικροδορυφορικούς δείκτες. Για να διαπιστωθεί αν η εμφάνιση του φαινομένου της Αστάθειας του Μικροδορυφορικού DNA, αποτελεί και δείκτη βαρύτητας της νόσου, συγκρίθηκαν κλινικοί και εργαστηριακοί παράμετροι των ασθενών που εμφάνισαν το φαινόμενο με αυτούς που ήταν αρνητικοί, χωρίς όμως να παρατηρηθούν στατιστικά σημαντικές διαφορές όσον αφορά την ηλικία, την καπνιστική συνήθεια, τα σπυρομετρικά ευρήματα ανάμεσα στις δύο υποομάδες.

Έτσι θεωρήθηκε ότι το φαινόμενο της Αστάθειας αποτελεί ανιχνεύσιμη γενετική αλλοίωση σε κυτταρολογικά δείγματα ασθενών με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια και μπορεί να αντιπροσωπεύει δείκτη πιθανής κακοήθειας, ή δείκτη γενετικής διαταραχής που σχετίζεται με την εκδήλωση της νόσου.

Όμως ο σχεδιασμός της προηγούμενης μελέτης δεν μας επέτρεψε να απαντήσουμε και να καταλήξουμε σε συμπεράσματα, αφού η παρακολούθηση των

ασθενών δεν έγινε για μακρό χρονικό διάστημα και επιπλέον δεν έγινε σύγκριση με καπνιστές, χωρίς κλινικά ή σπιρομετρικά ευρήματα Χ.Α.Π.

Έτσι, το **Δεύτερο Πρωτόκολλο** σχεδιάστηκε για να μελετηθεί η πιθανότητα ανίχνευσης του φαινομένου της Αστάθειας των Μικροδορυφορικών Αλληλουχιών του DNA, σε καπνιστές με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (**Καπνιστές με Χ.Α.Π.**), και σε καπνιστές που δεν εμφάνιζαν κλινικά ή σπιρομετρικά ευρήματα της νόσου (**Καπνιστές χωρίς Χ.Α.Π.**).

Η **Υπόθεση** που τέθηκε, ήταν ότι αν το φαινόμενο της Αστάθειας, αποτελεί δείκτη δυνητικής κακοήθειας, τότε θα πρέπει να ανιχνεύεται και στους καπνιστές με Χ.Α.Π., αλλά και στους καπνιστές χωρίς εκδήλωση της νόσου.

Από την άλλη πλευρά, αν το φαινόμενο της Αστάθειας αποτελεί γενετική ανωμαλία που οδηγεί στην ανάπτυξη της Χ.Α.Π., τότε θα πρέπει να ανιχνεύεται, κατά κύριο λόγο στους ασθενείς με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια, εξηγώντας κατά ένα μέρος την πολύπλοκη γενετική βάση της νόσου.

Επτά υψηλά πολυμορφικοί μικροδορυφορικοί δείκτες χρησιμοποιήθηκαν για τα ίδια χρωμοσώματα που ερευνήθηκαν και στο πρώτο πρωτόκολλο ακολουθώντας την ίδια μέθοδο.

Δείγματα (πτύελα και περιφερικό αίμα), από εξήντα (**60**) **καπνιστές χωρίς Χ.Α.Π.** και πενήντα εννέα (**59**) **καπνιστές με σοβαρού βαθμού Χ.Α.Π.** και παρόμοιο ιστορικό καπνίσματος 48 ± 25 και 54 ± 33 ($x \pm SD$) pack years (πακέτα επί έτη) αντίστοιχα, αναλύθηκαν.

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε μία φορά για τους «μη-Χ.Α.Π. καπνιστές» και δύο φορές για τους «Χ.Α.Π.-καπνιστές», στην αρχή, και 24 μήνες αργότερα.

Αστάθεια του Μικροδορυφορικού DNA ανιχνεύθηκε σε **14 καπνιστές με Χ.Α.Π.**, δηλαδή σε ποσοστό **24%**, ενώ αντίθετα **κανένας από τους καπνιστές χωρίς Χ.Α.Π.** δεν εμφάνισε το φαινόμενο. Στις 10 από τις 14 θετικές περιπτώσεις ένας μόνο μικροδορυφορικός DNA δείκτης εμφάνισε το φαινόμενο, ενώ στις υπόλοιπες 4 θετικές περιπτώσεις Αστάθεια εκδηλώθηκε, σε δύο διαφορετικούς μικροδορυφορικούς δείκτες.

Προκειμένου να διερευνηθεί η σχέση του φαινομένου της Αστάθειας με την βαρύτητα της νόσου, συγκρίθηκαν κλινικοί και εργαστηριακοί παράμετροι των ασθενών που εμφάνισαν το φαινόμενο με αυτούς που ήταν αρνητικοί, χωρίς όμως να

παρατηρηθούν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ηλικία, στην επιβίωση, στα σπυρομετρικά ευρήματα, στην θεραπευτική αγωγή, στην καπνιστική συνήθεια και στη συχνότητα ανάπτυξης καρκίνου του πνεύμονα, ανάμεσα στις δύο ομάδες.

Συμπερασματικά, από την παρούσα μελέτη, αποδεικνύεται ότι το φαινόμενο της Αστάθειας του Μικροδορυφορικού DNA αποτελεί κοινό εύρημα αποκλειστικά στους καπνιστές με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια αφού ανεβρέθηκε σε ποσοστό 24% στα κυτταρολογικά τους δείγματα, ενώ αντίθετα κανένας καπνιστής χωρίς Χ.Α.Π. δεν εμφάνισε το φαινόμενο.

Τα αποτελέσματα αυτά στηρίζουν την υπόθεση ότι η Αστάθεια των Μικροδορυφορικών αλληλουχιών του DNA μπορεί να σχετίζεται με την πολύπλοκη γενετική βάση της Χρόνιας Αποφρακτικής Πνευμονοπάθειας. Επιπλέον, η αστάθεια αυτή θα μπορούσε να αποτελέσει δείκτη γενετικής διαταραχής που σχετίζεται με το κάπνισμα του τσιγάρου και μπορεί να οδηγήσει περαιτέρω στην ανάπτυξη της Χ.Α.Π.

SUMMARY

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is a leading cause of morbidity and mortality among the adult population worldwide. The major risk factor of COPD is undoubtedly cigarette smoking. However, only **less than 20% of smokers develop clinically significant COPD**. Thus, in addition to exposure, host factors are important in determining whether smokers develop lung disease. It has not been established if these “**susceptible**” smokers who develop COPD are genetically predetermined, or environmental (type of tobacco), dietary or other factors affect the development of the disease. Although several clinical studies exist on the pathophysiology of COPD, little is known as regards the molecular basis of the disease.

Microsatellite DNA, is very short tandem nucleotide repeats and are found scattered throughout the human genome. Instability of tandem repeat DNA sequences or **Microsatellite Instability** (MI) has been correlated with high mutational rates and has been reported in various malignancies.

In the **first protocol** of this study, we tried to investigate if Microsatellite DNA Instability (MI) is a detectable phenomenon in sputum cells of COPD patients and to perform an assessment of the mutational rate in those patients, as reflected by the incidence of Microsatellite Instability.

Thirty-one cytological specimens from **patients with COPD** were analysed for Microsatellite Instability (MI). Polymerase Chain Reaction (PCR) coupled with assessment of electrophoretic mobility of the amplified DNA fragments was employed to detect any irregularities in the generated pattern for each of the subjects. Six polymorphic microsatellite markers were targeted by utilizing specific oligonucleotide primer pairs for each of them. Genomic DNA isolated from sputum and blood samples from the subjects was used as template. The electrophoretic pattern of each specimen was compared with the corresponding pattern of the peripheral blood and any difference in the mobility of the microsatellite alleles was interpreted as MI.

Among 31 cases tested, **7 (23%)** were interpreted as **MI positive**. In the 5 of these cases instability affected only one marker while in the remaining 2 cases, 2 markers were affected.

It was postulated that MI is either a marker of potential malignancy or a genetic defect requirement for development of COPD. However, the design of the first protocol did not allow us to come to conclusions since we did not follow up the patients long enough or we did not compare them with non-COPD smokers.

The **second protocol** was designed to study MI in smokers who develop COPD and those who do not. The hypothesis was that, if MI is a potential marker of malignancy, this marker should be rather evenly distributed among non-COPD smokers and COPD patients whereas, if this is a genetic alteration leading to COPD it would be more common in COPD patients.

In order to investigate this hypothesis we compared smokers who develop COPD with smokers who did not (non-COPD).

Seven highly polymorphic microsatellite markers were targeted on the DNA of sputum cells and of white blood cells.

Sixty non-COPD smokers and **59 severe COPD patients** with similar smoking history (mean \pm SD) of 48 ± 25 vs. 54 ± 33 pack-years, respectively ($p = 0.77$) were studied. Non-COPD smokers were tested once and COPD-smokers were tested twice, with an interval of 24 months between tests.

MI was detected in **14 COPD patients (24%)** but in **none of the non-COPD smokers**. In 10 COPD patients MI positive instability was exhibited by one MI marker and in the remaining 4 by two different alleles. The most commonly affected marker was THRA1 on chromosome 17 (43%). No significant differences were found in the clinical or laboratory parameters, survival and in the development of lung cancer between MI positive and negative COPD patients, the revealed instability cannot be linked to the severity of the disease or previous smoking history. No change in the microsatellite alleles was found between the two tests made at interval of 24 months.

Conclusions: This study demonstrated that **MI** was found **exclusively in sputum cells of smokers with COPD**. The results support the hypothesis that MI could be part of the complex genetic basis of COPD, and could be **a marker of genetic**

susceptibility to cigarette smoking in order to develop COPD. To the best of our knowledge this is the **first report** of such a genetic alteration in smokers with COPD.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΠΡΩΤΗ ΕΝΟΤΗΤΑ

ΧΡΟΝΙΑ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗ
ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑ (Χ.Α.Π.)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ Χ.Α.Π.

There are two distinct chapters in the story of respiration:

In the first, the environment, air or aerated water, meets and conflicts with the blood, gives up Oxygen and receives Carbon Dioxide. This is what is commonly called respiration, and it is carried out in special body structures.

But there follow more essential phenomena, for the first is but a means to an end: Oxygen is in the Blood, and it is taken up by the tissues. This fundamentally is respiration (Paul Bert, 1870).

Στο τέλος μιας βαθιάς εισπνοής περίπου 80% του πνευμονικού όγκου είναι αέρας, 10% είναι αίμα και μόνο το υπόλοιπο 10% είναι ο πνευμονικός ιστός (Weibel and Taylor, 1998). Παρά την μικρή μάζα του ο πνευμονικός ιστός, καταλαμβάνει τεράστια επιφάνεια (περίπου το μέγεθος ενός γηπέδου tennis), είναι πολύ λεπτός και ευπαθής, ενώ συγχρόνως διατηρεί την ακεραιότητα του παρά την συνεχή έκθεση του στο εχθρικό πολλές φορές περιβάλλον (**Σχήμα 1**).

Η ξεχωριστή αυτή δομή των πνευμόνων, εξασφαλίζει τη μηχανική σταθερότητα όπως και τις κατάλληλες συνθήκες για την τέλεση της πρωταρχικής πνευμονικής λειτουργίας, που είναι η παροχή Οξυγόνου στο αίμα ακόμα και όταν οι απαιτήσεις για Οξυγόνο είναι υψηλές, όπως για παράδειγμα κατά την διάρκεια σκληρής άσκησης (**Σχήμα 2**).

Υπάρχουν όμως παθήσεις, όπως οι αποφρακτικές, που περιορίζουν την ανταλλαγή των αερίων, στους πνεύμονες, επηρεάζοντας κατ'εξοχήν την σχέση αερισμού αιμάτωσης (Weibel and Taylor, 1998). Οι αποφρακτικές παθήσεις των πνευμόνων είναι πάρα πολύ συχνές και τα ποσοστά θνησιμότητας και ο επιπολασμός συνεχώς αυξάνουν.

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση η Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια και το βρογχικό άσθμα μαζί με την πνευμονία αποτελούν την τρίτη πιο συχνή αιτία θανάτου, στη Β. Αμερική η Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια είναι η τέταρτη κατά σειρά αιτία θανάτου (Siafakas et al., 1995), ενώ παγκοσμίως αντιπροσωπεύει την έκτη. Υπολογίζεται ότι 4-6% των ανθρώπων πάνω από την ηλικία των 45 ετών πάσχει από Χ.Α.Π. (O'Byrne and Postma, 1999).

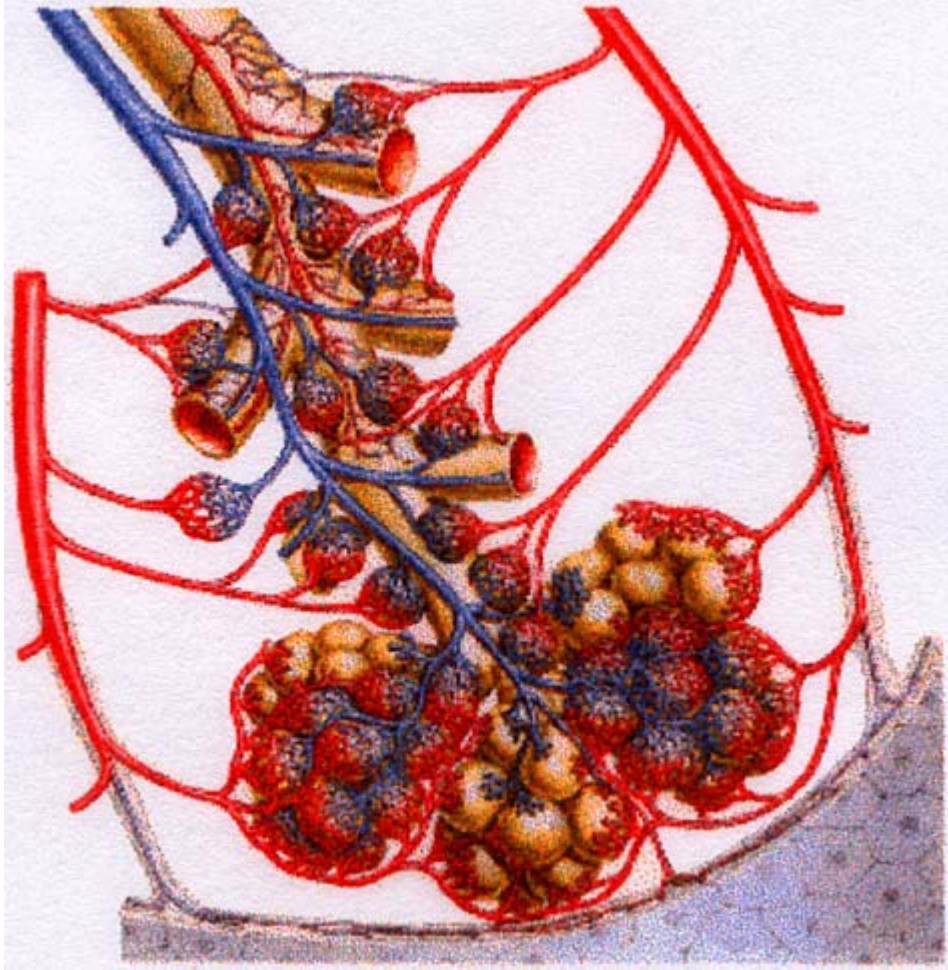
Ο όρος, Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (Χ.Α.Π.) περιλαμβάνει ασθενείς με εμφύσημα, ή χρόνια βρογχίτιδα, ή συνδυασμό και των δύο.

Οι περισσότεροι ασθενείς εμφανίζουν επιδεινούμενη δύσπνοια, χρόνια βήχα, περιορισμένη αντοχή στην άσκηση, απόφραξη των αεραγωγών, πνευμονική υπερδιατάση και διαταραχή της ανταλλαγής των αερίων. Ο περιορισμός της ροής του αέρα δεν παρουσιάζει σημαντική ανταπόκριση σε φάρμακα και είναι συχνή η υπεραντιδραστικότητα των αεραγωγών σε ποικίλα ερεθίσματα.



ΣΧΗΜΑ 1:

Ενδοπνευμονικοί Αεραγωγοί. Netter F. 1995, (Interactive Atlas Of Anatomy).



ΣΧΗΜΑ 2:

Ενδοπνευμονική Κυκλοφορία. Netter F. 1995, (Interactive Atlas Of Anatomy).

Όπως προκύπτει από την μέχρι τώρα γνώση μας, πολλοί φαίνεται να είναι οι παράγοντες που αλληλεπιδρούν για την ανάπτυξη της Χρόνιας Αποφρακτικής Πνευμονοπάθειας. Το κάπνισμα του τσιγάρου, είναι ο κυριότερος μέχρι τώρα εξακριβωμένος παράγοντας κινδύνου, αν και μόνο μια μειονότητα καπνιστών (10-20%) αναπτύσσει τελικά Χ.Α.Π., ενώ αντίθετα, ένας μη καπνιστής μπορεί να εκδηλώσει ακόμα και σοβαρής μορφής Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια.

Κεφάλαιο 1

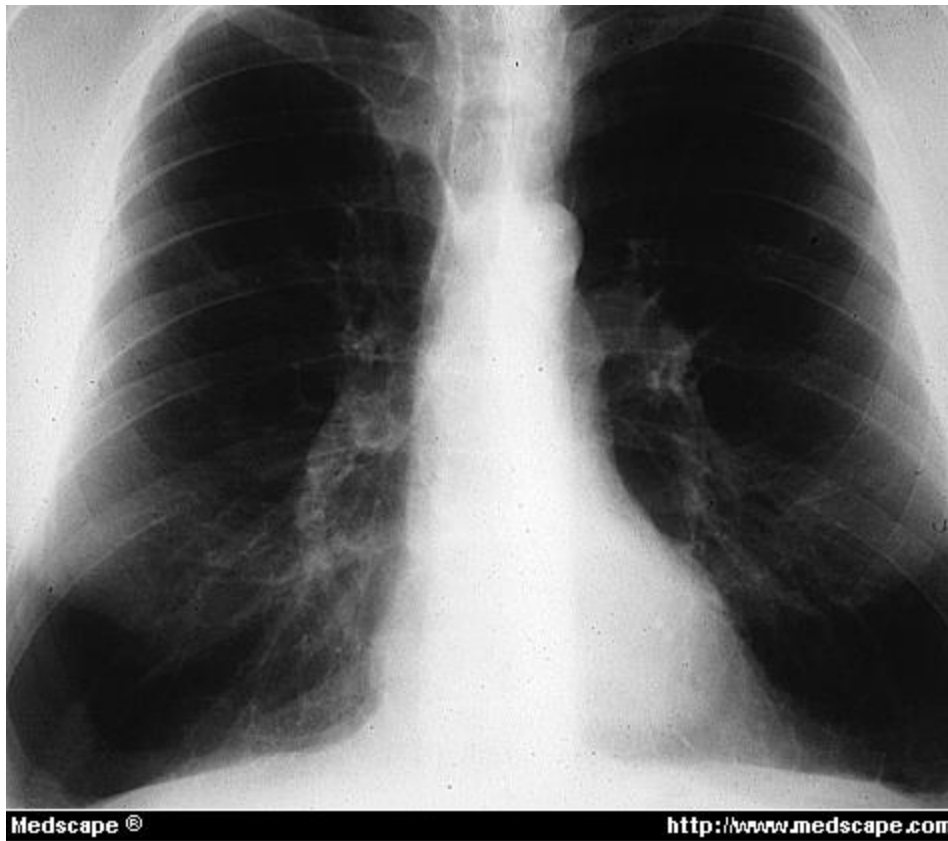
ΟΡΙΣΜΟΣ, ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ & ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΧΡΟΝΙΑΣ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑΣ.

1.1 ΟΡΙΣΜΟΣ

Η Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (Χ.Α.Π.) χαρακτηρίζεται από **μειωμένη μέγιστη εκπνευστική ροή** και επιβράδυνση της δυναμικής εκπνοής των πνευμόνων, γνωρίσματα τα οποία δεν παρουσιάζουν σημαντική μεταβολή για χρονική περίοδο αρκετών μηνών. **Ο περιορισμός της ροής του αέρα**, είναι στο μεγαλύτερο μέρος του, προοδευτικά **επιδεινούμενος και μη ανατρέψιμος**, και οφείλεται σε ποικίλους συνδυασμούς νόσου των αεραγωγών και εμφυσήματος, που όμως είναι δύσκολο να προσδιορισθούν in vivo (Siafakas et al., 1995).

-Το **Εμφύσημα** ορίζεται ανατομικά, από τη μόνιμη εκ' καταστροφής διάταξη των περιφερικών των τελικών βρογχιολίων αεροχώρων, χωρίς εμφανή ίνωση (**Εικόνα 1, Εικόνα 2**) Η απώλεια κυψελιδικών προσφύσεων στην περίμετρο των αεραγωγών συμβάλλει στην στένωση των αεραγωγών.

-Η **Χρόνια Βρογχίτιδα** ορίζεται κλινικά, από την παρουσία χρόνιων ή επαναλαμβανομένων αυξημένων βρογχικών εκκρίσεων ικανών να προκαλέσουν απόχρεμψη. Οι εκκρίσεις είναι παρούσες τις περισσότερες μέρες, για ελάχιστο χρονικό διάστημα τριών μηνών το χρόνο, τουλάχιστον δύο διαδοχικά έτη και δεν μπορούν να αποδοθούν σε άλλα πνευμονικά ή καρδιακά αίτια. (Medical Research Council, 1965; Fletcher and Pride, 1984).

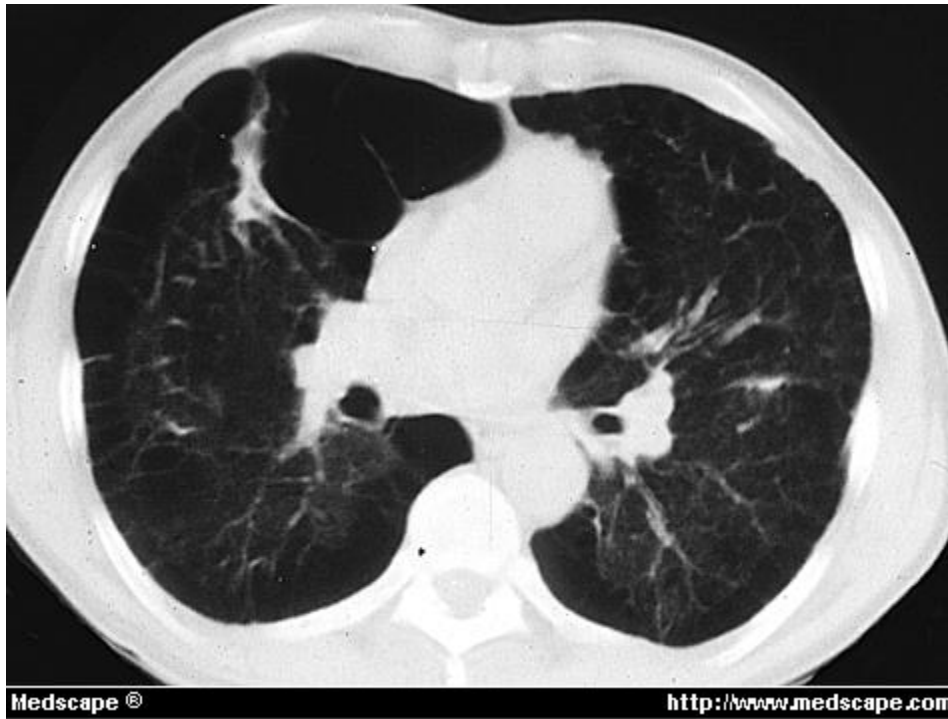


ΕΙΚΟΝΑ 1:

Οπισθοπρόσθια ακτινογραφία θώρακος, ασθενούς με Πνευμονικό Εμφύσημα.

Διακρίνονται:

- εικόνα πνευμονικής υπερδιάτασης (φανερά αυξημένο θωρακικό εύρος)
- έλλειψη αγγείωσης (υπερδιαφάνεια),
- επιπέδωση του διαφράγματος
- διάχυτη φυσσαλιδώδης νόσος του πνευμονικού παρεγχύματος (Hafner J.P. and Ferro T.J. 1999).



ΕΙΚΟΝΑ 2:

Υπολογιστική Τομογραφία θώρακος, ασθενούς με Πνευμονικό Εμφύσημα, η οποία αναδεικνύει μονήρη ευμεγέθη φουσσαλίδα (bullae), όπως και άλλες φουσσαλίδες μικρότερου μεγέθους (Hafner J.P. and Ferro T.J. 1999).

1.2 ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Δύσκολο διαφοροδιαγνωστικό πρόβλημα αποτελεί η διάκριση της Χ.Α.Π. από το χρόνιο άσθμα σε ηλικιωμένα άτομα όπου υπάρχει μόνιμος περιορισμός της ροής του αέρα, χωρίς σημαντική βελτίωση της σπιρομέτρησης μετά τη χορήγηση βρογχοδιασταλτικών ή γλυκοκορτικοειδών. Το Άσθμα αρχικά συμπεριλαμβάνονταν στην διάγνωση της Χ.Α.Π. Η κύρια ομοιότητα μεταξύ των δύο νόσων είναι η παρουσία του περιορισμού της ροής του αέρα, όμως υπάρχουν πολλές κλινικές και φυσιολογικές διαφορές ανάμεσα τους που τις ξεχωρίζουν (**Πίνακας 1**).

Άλλες αποφρακτικές παθήσεις, με χρόνιο περιορισμό της ροής του αέρα, λόγω ειδικών αιτίων, όπως :

- η κυστική ίνωση,
- οι βρογχιεκτασίες,
- η αποφρακτική βρογχολίτιδα,

μπορούν να διαφοροδιαγνωστούν εξ' ορισμού από την Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (Siafakas et al., 1995).

ΠΙΝΑΚΑΣ 1:

Χαρακτηριστικά διαφοροδιάγνωσης του Άσθματος από την Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια. Τροποποίηση από: *Owens G. Physiologic comparisons of obstructive pulmonary diseases. J. Respir. Dis. 1990;11(suppl 6A):S23-29.*

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	ΑΣΘΜΑ	Χ.Α.Π.
Απόφραξη της ροής του αέρα	ποικίλει	Μόνιμη
Πορεία νόσου	ποικίλει	Προοδευτικά επιδεινούμενη
Απάντηση σε βρογχοδιασταλτικά	συνήθως μεγάλη	Ποικίλει
Βρογχική Υπεραντιδραστικότητα	πάντοτε	Ποικίλει
Διαχυτική ικανότητα	φυσιολογική ή αυξημένη	Μειωμένη
Απάντηση στην άσκηση	βρογχοσύσπαση	Διαταραχή αερίων αρτηριακού αίματος (αποκορεσμός)

1.3 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Η συχνότητα και η νοσηρότητα της Χρόνιας Αποφρακτικής Πνευμονοπάθειας, διαφέρουν σημαντικά στις διάφορες χώρες. Εξαιτίας της φύσης της ασθένειας, συνήθως υπάρχει υποεκτίμηση της διάγνωσης. Η νόσος παρουσιάζει μεγάλη περίοδο επώασης, διάρκειας περίπου 20 ετών, τα πρώτα συμπτώματα είναι ήπια (πρωινός παραγωγικός βήχας, βαθμιαία έκπτωση της φυσικής αντοχής στην κόπωση) και συνήθως δεν αξιολογούνται. Έτσι δεν υπάρχουν πολλές αξιόπιστες στατιστικές μελέτες συχνότητας της Χρόνιας Αποφρακτικής Πνευμονοπάθειας στην Ευρώπη αλλά και στην Ελλάδα. (Siafakas et al., 1995; Sherril et al., 1990; Burrows, 1991; Γεωργάτου και συν., 1997; Αναγνωστοπούλου, 1997).

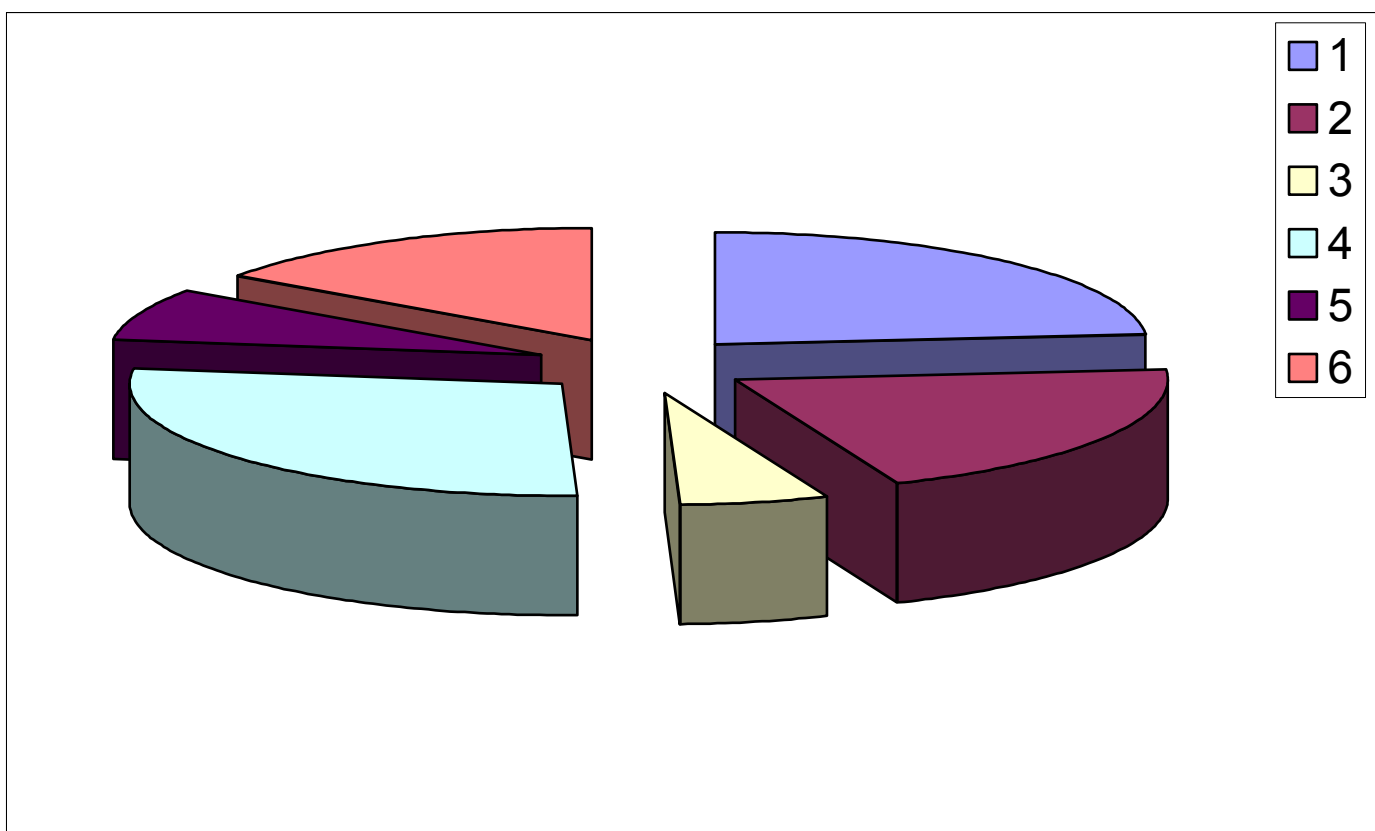
Η πρώτη μελέτη που σχετίζει το κάπνισμα του τσιγάρου με την ανάπτυξη της Χ.Α.Π., και με την θνησιμότητα, ήταν αυτή από τους Doll και Hill (Doll and Hill, 1964). Σε μια περίοδο δέκα ετών, από το 1951 έως και το 1961, κατέγραψαν τα αίτια θανάτου Βρετανών γιατρών, για κάθε έτος ξεχωριστά. Τα αποτελέσματα τους έδειξαν ότι 34 στους 100.000 θανάτους το χρόνο οφείλονταν σε Χρόνια Βρογχίτιδα (δηλαδή από Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια κυρίως). Όσον αφορά τους καπνιστές η αναλογία ήταν ακόμα μεγαλύτερη, δηλαδή 51 στους 100.000. Μετά από αυτά τα αποτελέσματα, πολλοί ήταν οι γιατροί που σταμάτησαν το κάπνισμα και το ποσοστό της θνησιμότητας μειώθηκε αντίστοιχα (Fletcher and Horn, 1970).

Ακολούθησαν πολλές άλλες μελέτες για τον επιπολασμό της Χ.Α.Π., με βάση κλινικά και σπιρομετρικά δεδομένα. Οι Ferris και Anderson (Ferris and Anderson, 1962) έδειξαν ότι ποσοστό 8.5%, των ενήλικων ανδρών και ποσοστό 8.1% των γυναικών, στο Βερολίνο (New Hampshire), έπασχαν από Χ.Α.Π., ενώ το ποσοστό ανέβαινε ακόμα περισσότερο για την ηλικία των 55-64 ετών (13.4%). Σε άλλη μελέτη στην Αριζόνα (Tucson) οι Knudson και συνεργάτες (Knudson et al., 1976), από σπιρομετρικά ευρήματα συμπέραναν ότι το 20-25% του γενικού πληθυσμού παρουσιάζει ευρήματα συμβατά με Χ.Α.Π. Στην Σουηδία, επίσης (Oxhoj et al., 1977), σε παρόμοια μελέτη παρατήρησαν λειτουργικές διαταραχές κατά τον έλεγχο της πνευμονικής λειτουργίας σε μεσήλικες καπνιστές σε ποσοστό που ανέρχονταν περίπου στο 50%. Στο Michigan (Tecumseh), οι Higgins και συνεργάτες (Higgins et al., 1982) παρατήρησαν ότι ο

επιπολασμός της Χ.Α.Π. σε άνδρες ηλικίας 45-54 ετών ήταν 16.3%, ενώ για τις γυναίκες ήταν μόλις 5%. Κριτήριο διάγνωσης για την Χ.Α.Π. είχε ορισθεί, ο δυναμικός εκπνεόμενος όγκος στο πρώτο δευτερόλεπτο να είναι μικρότερος από 65% της προβλεπόμενης τιμής του.

Σύμφωνα με στοιχεία που προέρχονται από την Βρετανία, για τα έτη 1982-1983, οι αναπνευστικές νόσοι κατατάσσονταν ως η τρίτη συχνότερη αιτία απουσιών από την εργασία. Στη Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια οφείλονταν το 56% των ημερών απουσίας για τους άνδρες και το 24% για τις γυναίκες. (LAIA 92/4).

Από Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια υπολογίζεται ότι πάσχει περίπου το 5% του γενικού πληθυσμού και το 20% των υπερηλίκων. Αποτελεί την τέταρτη αιτία θανάτου στη Β. Αμερική (**Σχήμα 3**; Fiore et al 1997), ενώ στην Ευρωπαϊκή Ένωση, η Χ.Α.Π. και το Άσθμα μαζί με την Πνευμονία, αποτελούν την τρίτη πιο συχνή αιτία θανάτου (Siafakas et al., 1995). Υπολογίζεται ότι από το 1980 μέχρι σήμερα, οι νέοι ασθενείς με Χ.Α.Π. αυξήθηκαν περίπου κατά 40% και οι θάνατοι από τη νόσο αυξήθηκαν κατά 32%.



1. Καρδιολογικά νοσήματα	(99.000)
2. Άλλα νοσήματα	(85.000)
3. Αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια	(23.300)
4. Καρκίνος του πνεύμονα	(117.000)
5. Άλλοι καρκίνοι	(31.000)
6. Πνευμονικές παθήσεις	(64.000)

ΣΧΗΜΑ 3:

Αριθμός θανάτων κατα νόσημα ανά έτος που αποδόθηκαν στο κάπνισμα, United States, 1990. (From Centers of Disease Control: MMWR 1993;43:645-649).

Κατά μέσο όρο, οι ασθενείς με Χ.Α.Π. παρουσιάζουν 1-4 επεισόδια οξέων παροξυσμών το χρόνο . Το οικονομικό κόστος είναι εξαιρετικά υψηλό, διότι, κατά την διάρκεια των παροξυσμών γίνεται αναπροσαρμογή της θεραπείας και συχνά υπάρχει ανάγκη νοσηλείας των ασθενών ή ακόμα και μεταφορά τους σε Μονάδα Εντατικής Θεραπείας.(Connors et al, 1996; Kong et al., 1997).

Επιπρόσθετα, η θνησιμότητα κατά την νοσηλεία των ασθενών με οξύ παροξυσμό Χ.Α.Π. είναι περίπου 10%, με συνολική 40% θνητότητα, σε ένα χρόνο.(Connors et al., 1996; Kong et al., 1997; Fuso et al., 1995; Seneff et al., 1995).

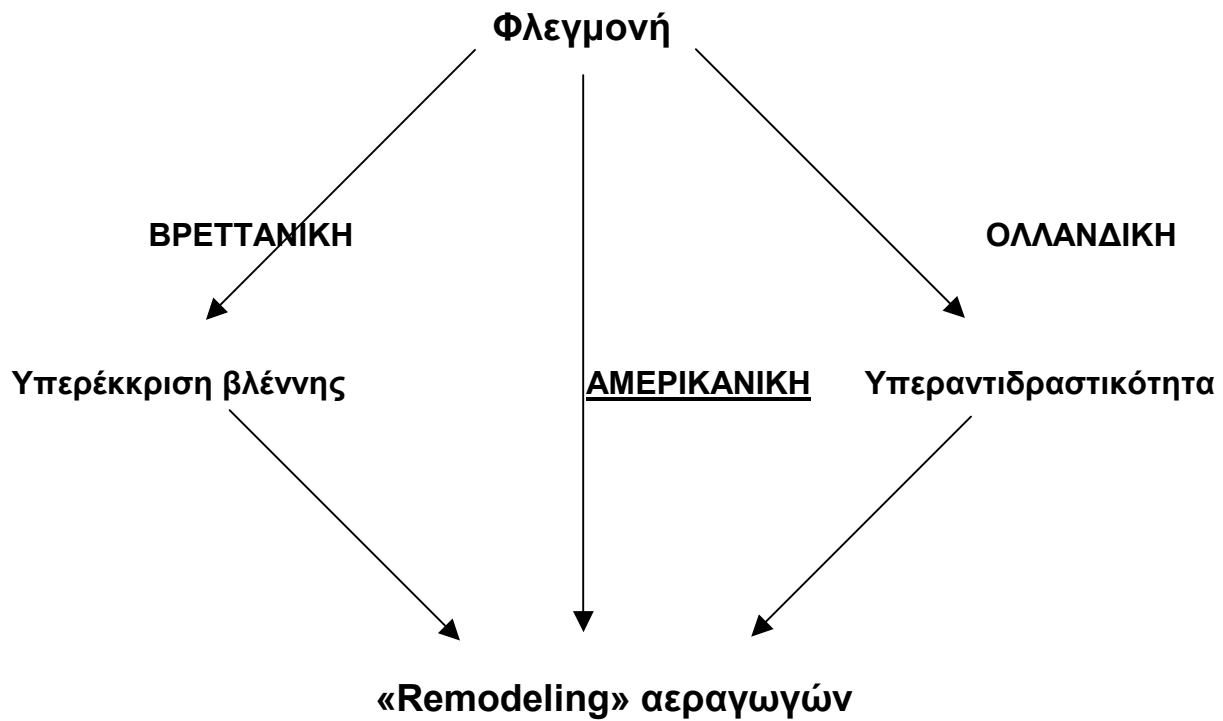
Οι άνδρες περισσότερο από τις γυναίκες φαίνονται επιρρεπείς στην ανάπτυξη Χρόνιας Αποφρακτικής Πνευμονοπάθειας.(Higgins and Keller, 1989, Viegi et al., 1988) Η διαφορά αυτή είναι πιθανόν να οφείλεται στην υψηλότερη συχνότητα της καπνιστικής συνήθειας στους άνδρες όπως και στην συχνότερη επαγγελματική έκθεση σε επιβλαβείς παράγοντες.Όμως πρόσφατα στοιχεία δείχνουν αύξηση της συχνότητας του καπνίσματος και στις γυναίκες και όπως είναι επόμενο, αναμένεται αύξηση της νοσηρότητας της Χ.Α.Π. και στον γυναικείο πληθυσμό.

Κεφάλαιο 2

ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΧΡΟΝΙΑΣ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑΣ

Ανάμεσα σε ποικίλους παράγοντες που σχετίστηκαν με την ταχεία έκπτωση της πνευμονικής λειτουργίας, η Βρογχική Υπεραντιδραστικότητα (ΟΛΛΑΝΔΙΚΗ ΥΠΟΘΕΣΗ), όπως και η Υπερπαραγωγή Βλέννης (ΒΡΕΤΤΑΝΙΚΗ ΥΠΟΘΕΣΗ), αποτελούν δύο από τους πιο πολυσυζητημένους μέχρι τώρα παράγοντες, με πιθανό ρόλο στην παθογένεια της Χ.Α.Π.

Φαίνεται όμως, ότι και η Βρογχική Υπεραντιδραστικότητα όπως και η Υπερπαραγωγή της βλέννης οδηγούν με τον ένα ή τον άλλο τρόπο, στον παθολογικό ανασχηματισμό του αναπνευστικού επιθηλίου (Airway Remodeling), που συμπίπτει με την ΑΜΕΡΙΚΑΝΙΚΗ ΥΠΟΘΕΣΗ για την παθογένεια της μόνιμης και μη ανατρέψιμης απόφραξης των αεραγωγών, που χαρακτηρίζει την Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (**Σχήμα 4**).



ΣΧΗΜΑ 4:

Σύγκριση της Βρετανικής, της Ολλανδικής και της Αμερικανικής Υπόθεσης για τη σχέση της φλεγμονής με την παθολογική αναδιοργάνωση του αναπνευστικού επιθηλίου (airway remodelling) και την εξέλιξη της περαιτέρω σε μόνιμη απόφραξη των αεραγωγών (Rennard 1998)

2.1 Η ΒΡΕΤΤΑΝΙΚΗ ΥΠΟΘΕΣΗ

Η Υπερπαραγωγή Βλέννης σχετίζεται με την «Βρετανική Υπόθεση», η οποία υποστήριζε ότι η αυξημένη παραγωγή της βλέννης συνοδεύεται από χρόνια φλεγμονή των αεραγωγών (Fletcher and Pride, 1984; Reid, 1954).

Η παρουσία αυξημένης ποσότητας βλέννης προδιαθέτει τους αεραγωγούς σε λοιμώξεις, οι οποίες με την σειρά τους οδηγούν εκ νέου σε μεγαλύτερη παραγωγή βλέννης, γεγονός που τελικά οδηγεί σε βλάβη των αεραγωγών και περιορισμό της ροής του αέρα. Θεωρήθηκε ότι ερεθιστικοί παράγοντες όπως το κάπνισμα του τσιγάρου, οι ατμοσφαιρικοί ρύποι και άλλοι άγνωστοι παράγοντες προκαλούσαν υπερπαραγωγή βλέννης, στον βρογχικό αυλό, η οποία και δημιουργούσε ευνοϊκές συνθήκες για υποτροπιάζουσες λοιμώξεις. Ο κύριος υπεύθυνος μηχανισμός για την απόφραξη των αεραγωγών θεωρήθηκε ότι ήταν η εκτεταμένη φλεγμονή και η ίνωση των αεραγωγών εξαιτίας των επανειλημμένων λοιμώξεων και ο αποκλεισμός του βρογχικού αυλού από τα βύσματα της βλέννης (Baun and Wolinski, 1994). Η υπερέκκριση της βλέννης θεωρήθηκε κεντρικής σημασίας έτσι που ο ορισμός για την Χρόνια Βρογχίτιδα να είναι κλινικός και να ορίζεται ως νόσος με χρόνιο παραγωγικό βήχα και αυξημένη απόχρεμψη. (Ciba Simposium Report 1959; Siafakas et al., 1995)

Η «Βρετανική Υπόθεση» επηρέασε για πολλά χρόνια την έρευνα για την παθογένεια της Χ.Α.Π. Σήμερα όμως, είναι γνωστό ότι δεν υπάρχει άμεση σχέση της Χ.Α.Π. με την έκκριση της βλέννης και τις βρογχικές λοιμώξεις, όπως πιστεύονταν παλιότερα. Επανειλημμένες μελέτες πληθυσμών δείχνουν χαμηλή συσχέτιση μεταξύ της υπερέκκρισης της βλέννης και της απόφραξης των αεραγωγών, ενώ αιτιολογική συσχέτιση μεταξύ τους δεν έχει παρατηρηθεί.

Στον βρογχικό αυλό, η βλέννη εκκρίνεται από τους υποβλεννογόνιους αδένες και από τα επιθηλιακά «goblet» κύτταρα. Οι υποβλεννογόνιοι αδένες φαίνεται να είναι και η κύρια πηγή της απόχρεμψης ενώ υπάρχουν μελέτες που συνδέουν το μέγεθος αυτών των αδένων με την ποσότητα της απόχρεμψης (Jamal et al., 1984).

Η διόγκωση των βλεννογονίων αδένων θεωρήθηκε από τα κύρια κριτήρια διάγνωσης της Χρόνιας Βρογχίτιδας (Reid, 1960) Αν όμως η υπερπαραγωγή της βλέννης ήταν η κύρια αιτία για την ανάπτυξη της Χ.Α.Π., τότε θα έπρεπε να υπάρχει

άμεσση σχέση ανάμεσα στην απόφραξη των αεραγωγών και στο μέγεθος των βλεννογοννίων αδένων. Όμως πάρα πολλές σχετικές μελέτες απέτυχαν να αποδείξουν αυτή την συσχέτιση (Mitchell et al., 1976; Thurlbeck et al., 1970), όπως και να αποδείξουν άμεσση σχέση μεταξύ αναπνευστικών λοιμώξεων ή υπερπαραγωγή βλέννης, και ανάπτυξη Χ.Α.Π. Άλλωστε δεν είναι σπάνιο ασθενείς με βαριά Χ.Α.Π. να μην έχουν ιστορικό απόχρεμψης, ούτε και να αναφέρουν επεισόδια με πυώδη απόχρεμψη, κατά την διάρκεια λοιμώξεων του αναπνευστικού, ενώ άλλοι ασθενείς με αυτά τα συμπτώματα, να μην παρουσιάζουν αντικειμενικά ευρήματα έκπτωσης της πνευμονικής λειτουργίας (Mitchell and Filley, 1964)

Αντιπροσωπευτικές μελέτες που δείχνουν την εναλλασσόμενη σχέση της απόφραξης των αεραγωγών με την υπερπαραγωγή της βλέννης και με τις αναπνευστικές λοιμώξεις είναι αυτές που έγιναν από τους Fletcher και συνεργάτες, στο Λονδίνο, σε εργάτες μεταφορών (Fletcher et al., 1976). Σε αυτές τις μελέτες βρέθηκε ότι το κάπνισμα, η παραγωγή βλέννης και η ταχεία έκπτωση του Δυναμικού Εκπνεόμενου Όγκου στο πρώτο δευτερόλεπτο (FEV1) ήταν στενά συνδεδεμένα μεταξύ τους. Όμως το κάπνισμα του τσιγάρου, συνδέονταν πολύ πιο στενά με την απώλεια της πνευμονικής λειτουργίας από ότι η υπερπαραγωγή της βλέννης. Επιπλέον στατιστικές μελέτες έδειξαν ότι για δεδομένη ποσότητα κατανάλωσης τσιγάρων, η υπερέκκριση της βλέννης δεν συνοδεύεται από μεγαλύτερη ταχύτητα πτώσης του FEV1. Οι Fletcher και συνεργάτες επίσης έδειξαν ότι για ένα συγκεκριμένο άτομο, οι εναλλαγές του όγκου της απόχρεμψης με το χρόνο, δεν είχαν σχέση με αλλαγές του FEV1.

Οι Sharp και συνεργάτες (Sharp et al., 1973) επίσης παρατήρησαν ασταθή σχέση ανάμεσα στην ανάπτυξη της Χ.Α.Π. και την παραγωγή της βλέννης, σε μελέτη που έγινε σε εργάτες βιομηχανίας. Σε άλλη βρετανική επιδημιολογική μελέτη η οποία είχε διάρκεια πάνω από 20-25 χρόνια, η θνητότητα από την Χ.Α.Π. ήταν στενά συνδεδεμένη με το αρχικό επίπεδο της αναπνευστικής λειτουργίας, αλλά ήταν εντελώς ανεξάρτητη από την παραγωγή της βλέννης (Peto et al., 1983)

Σύμφωνα με τις παραπάνω μελέτες, θεωρήθηκε ότι η υπερπαραγωγή της βλέννης και η απόφραξη των αεραγωγών είναι δύο εντελώς ξεχωριστές οντότητες, που όμως έχουν κοινή αιτιολογία, η οποία είναι το κάπνισμα του τσιγάρου. Η υπερέκκριση

της βλέννης αυξάνει την νοσηρότητα, συνοδεύεται από χρόνια βήχα και μπορεί να προδιαθέτει σε υποτροπιάζουσες βρογχικές λοιμώξεις.

Όμως η σημαντικότερη συνέπεια του καπνίσματος των τσιγάρων είναι η απόφραξη των αεραγωγών επειδή αυτή μπορεί να οδηγήσει κατευθείαν σε ανικανότητα και αργότερα στον θάνατο. Οι Fletcher και συνεργάτες, έδειξαν ότι άτομα με αυξημένη ποσότητα βλέννης υπέφεραν συχνότερα από επεισόδια πυώδους βρογχίτιδας. Όμως οι υποτροπιάζουσες λοιμώξεις από μόνες τους δεν συνδέονται με την πτώση του FEV1, όταν μάλιστα υπάρχει ιστορικό καπνίσματος.

Μεμονωμένα επεισόδια οξείας βρογχίτιδας μπορούν περιστασιακά να συνοδεύονται από μείωση του FEV1, όταν όμως η λοίμωξη υποχωρήσει, ο FEV1 συνήθως επιστρέφει στο προηγούμενο επίπεδο ηρεμίας. Άλλες μελέτες έδειξαν ότι μεμονωμένα επεισόδια βρογχικών λοιμώξεων σπάνια προκαλούν μείωση της πνευμονικής λειτουργίας και ακόμα η συχνότητα των λοιμώξεων δεν έχει σχέση με μόνιμες παθολογικές αλλαγές των σπιρομετρικών ευρημάτων (Howard, 1967).

Οι ασθενείς με σοβαρή Χ.Α.Π. συχνά εμφανίζουν βακτηριακές λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού, με συνήθη παθογόνα τον *Streptococcus pneumoniae* όπως και τον *Haemophilus influenzae*. Περαιτέρω έρευνα για τον ρόλο των βακτηριακών λοιμώξεων στην ανάπτυξη της Χ.Α.Π., με κλινικές μελέτες, έδειξε ότι η παρατεταμένη αντιβιοθεραπεία σε ασθενείς με ήπια απόφραξη των αεραγωγών δεν φαίνεται να επηρεάζει τον ρυθμό έκπτωσης του δυναμικού εκπνεόμενου όγκου στο πρώτο δευτερόλεπτο (FEV1). (British Medical Research Council 1966; Emirgil et al., 1969)

Αν και οι μέχρι τώρα μελέτες υποστηρίζουν, ότι οι λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού δεν αποτελούν σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη της Χ.Α.Π., ίσως είναι πιθανόν κάποιες λοιμώξεις από ειδικά παθογόνα να έχουν ρόλο τελικά στην ανάπτυξη της Χ.Α.Π., προκαλώντας αλλοιώσεις στην αναπνευστική λειτουργία, που συντελούνται όμως σε μακρό χρονικό διάστημα και έτσι δεν μπορούν να ανιχνευθούν νωρίς. Για παράδειγμα, μη επιπλεγμένες ιογενείς λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού έχει παρατηρηθεί ότι επηρεάζουν την λειτουργία του κατώτερου αναπνευστικού για παρατεταμένα διαστήματα σε νέους υγιείς ενήλικες (Picken et al., 1972).

Υπάρχουν επίσης ενδείξεις ότι λοιμώξεις του αναπνευστικού κατά την διάρκεια της ανάπτυξης των πνευμόνων στην παιδική ηλικία, μπορεί να προδιαθέτουν σε Χ.Α.Π. κατά την ενήλικη ζωή, ενώ παιδιά με ιστορικό υποτροπιάζουσων λοιμώξεων του αναπνευστικού, αναδεικνύουν κατά τον έλεγχο της πνευμονικής λειτουργίας τιμές στα κατώτερα φυσιολογικά όρια (Burrows et al., 1977).

Ακόμα από άλλες μελέτες, ενήλικες με πνευμονική λειτουργία στα κατώτερα φυσιολογικά όρια αναφέρουν ιστορικό επανειλημμένων λοιμώξεων του αναπνευστικού στην παιδική ηλικία. Παρόλα αυτά ο ακριβής ρόλος των λοιμώξεων στην παθογένεια της Χ.Α.Π. χρήζει περαιτέρω κλινικής και επιδημιολογικής διερεύνησης.

2.2 Η ΟΛΛΑΝΔΙΚΗ ΥΠΟΘΕΣΗ

Η Βρογχική Υπεραντιδραστικότητα, σχετίζεται με την «Ολλανδική Υπόθεση» η οποία υποστήριζε ότι η υπεραντιδραστικότητα των αεραγωγών, υποκρύπτεται πίσω από την ανάπτυξη του περιορισμού της ροής του αέρα. Σύμφωνα με αυτήν την υπόθεση, προοδευτικά επιδεινούμενη απόφραξη των αεραγωγών αναπτύσσεται στα ευπαθή, «hyperreactive», άτομα που καπνίζουν.

Επειδή η Χ.Α.Π. και το Άσθμα φαίνεται να συνυπάρχουν σε μερικούς ασθενείς και επειδή οι περισσότεροι ασθενείς με Χ.Α.Π. εκδηλώνουν κάποιου βαθμού αναστρεψιμότητα στην σπιρομέτρηση μετά από χρήση βρογχοδιασταλτικών, θεωρήθηκε ότι αλλεργικοί παράγοντες ή και βρογχική υπεραντιδραστικότητα πιθανά να έχουν ρόλο στην ανάπτυξη της Χ.Α.Π (Baun and Wolinski, 1994).

Στην μελέτη του Λονδίνου των Fletcher και συνεργατών, στους εργάτες μεταφορών, δεν συνδέθηκε ο ρυθμός πτώσης του FEV1 (εξαιτίας της ηλικίας ή εξαιτίας άλλων παραγόντων) με ατομικό ή οικογενειακό ιστορικό αλλεργίας. Όμως υπήρχε κάποια σχέση, της πνευμονικής λειτουργίας με τον αριθμό των ηωσινόφιλων στα πτύελα (Fletcher et al., 1976).

Σε άλλη μελέτη βρέθηκε ότι η επηρεασμένη πνευμονική λειτουργία συνδέονταν με αυξημένα ηωσινόφιλα ορού, αυξημένα επίπεδα IgE ορού, όπως και με θετικά δερματικά tests (Burrows et al., 1976). Όταν όμως αυτά τα δεδομένα αναλύθηκαν ξανά για να αποκλειστούν από την μελέτη ασθενείς με γνωστό ιστορικό άσθματος, η σχέση μεταξύ αλλεργίας και πνευμονικής λειτουργίας για τους ασθενείς με Χ.Α.Π. δεν επιβεβαιώθηκε (Burrows et al., 1988).

Επίσης μελέτες που έγιναν σε βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL) ασθενών με Άσθμα, έδειξαν ότι τα ηωσινόφιλα είναι τα κατ' εξοχήν κύτταρα της φλεγμονώδους διαδικασίας στο Άσθμα (Rennard et al., 1995), ενώ στο Βρογχοκυψελιδικό υγρό των ασθενών με Χ.Α.Π., κυριαρχούσαν τα ουδετερόφιλα (Lacoste et al., 1993; Vrugt and Aalberts, 1993).

Η Βρογχική Υπεραντιδραστικότητα χαρακτηρίζεται από μη φυσιολογικού βαθμού βρογχική σύσπασση σε συγκεκριμένα ερεθίσματα. Η μη ειδική βρογχική υπεραντιδραστικότητα φαίνεται να κατέχει κεντρικό ρόλο στην παθογένεια του

άσθματος, και έτσι θεωρήθηκε ότι παρόμοιος μηχανισμός μπορεί να εμπλέκεται και στην παθογένεια της Χ.Α.Π.

Πολλοί ασθενείς με Χ.Α.Π. εκδηλώνουν βρογχική υπεραντιδραστικότητα, που βέβαια είναι πολύ μικρότερου βαθμού συγκριτικά με εκείνη που εμφανίζουν οι ασθενείς με βρογχικό Άσθμα (O'Connor et al., 1989). Όμως, επίσης έχει παρατηρηθεί ότι τα σπυρομετρικά ευρήματα μετά από τεστ πρόκλησης με μεταχολίνη, είναι ανάλογα με το προηγούμενο επίπεδο ηρεμίας της πνευμονικής λειτουργίας, πριν από την πρόκληση. Έτσι, ασθενείς με πολύ χαμηλές τιμές ηρεμίας στην σπυρομέτρηση εμφανίζουν και την εντονότερη αντίδραση στο τεστ πρόκλησης (Sparrow et al., 1991).

Συμπερασματικά λοιπόν, στους ασθενείς με Χ.Α.Π., φαίνεται ότι η βρογχική υπεραντιδραστικότητα αποτελεί συνέπεια της νόσου, εξαιτίας της ήδη διαταραγμένης αρχιτεκτονικής των αεραγωγών και της περαιτέρω αλλοίωσης του φυσιολογικού τρόπου αντίδρασης των αεραγωγών σε εισπνεόμενους ερεθιστικούς παράγοντες.

2.3 Η ΑΜΕΡΙΚΑΝΙΚΗ ΥΠΟΘΕΣΗ

Από τα παραπάνω, φαίνεται ότι οι δύο υποθέσεις μάλλον συμπληρώνουν η μία την άλλη παρά ανταγωνίζονται. Σύμφωνα με αυτές κάποιος αιτιολογικός παράγοντας, όπως το κάπνισμα του τσιγάρου, ή μια λοίμωξη μπορούν να οδηγήσουν σε φλεγμονή των αεραγωγών.

Κατά την «Ολλανδική Υπόθεση» η φλεγμονή των αεραγωγών οδηγεί σε Βρογχική Υπεραντιδραστικότητα ενώ κατά την «Βρετανική Υπόθεση» η φλεγμονή οδηγεί σε Υπερέκκριση βλέννης. Και στις δύο περιπτώσεις το αποτέλεσμα είναι το ίδιο, δηλαδή απόφραξη των αεραγωγών και μόνιμος περιορισμός της ροής του αέρα.

Η τρίτη θεωρία για την παθογένεια της Χ.Α.Π., είναι η «Αμερικανική Υπόθεση» (Siafakas et al., 1995; Rennard, 1998) που υποστηρίζει ότι την διαδικασία της φλεγμονής ακολουθεί παθολογική αναδιοργάνωση της φυσιολογικής δομής των αεραγωγών (airway remodeling), που οδηγεί κατά συνέπεια στον μόνιμο και μη ανατρέψιμο περιορισμό της ροής του αέρα, στους αεραγωγούς.

Όπως έχει τεκμηριωθεί μέχρι τώρα, το κάπνισμα του τσιγάρου προκαλεί έντονο οξειδωτικό stress στο αναπνευστικό επιθήλιο το οποίο με την σειρά του οδηγεί σε φλεγμονή και οξεία πνευμονική βλάβη (acute lung injury). Αν και το οξειδωτικό stress είναι ανάλογο της ποσότητας του καπνίσματος, λιγότερο από το 20%, των καπνιστών αναπτύσσει Χ.Α.Π. Οι αεραγωγοί χαρακτηρίζονται από «φλεγμονώδη» καταστροφή και παθολογική «αναδιοργάνωση» (Remodeling) του επιθηλίου, ενώ το παρέγχυμα αναπτύσσει πρωτεολυτικού τύπου βλάβη. Πιθανή εξήγηση φαίνεται να είναι η βλάβη του φυσιολογικού μηχανισμού επούλωσης-αποκατάστασης του πνεύμονα.

Η διαδικασία «επιδιόρθωσης» (repair), είναι εξαιρετικά πολύπλοκη και συμπεριλαμβάνει την μετανάστευση των κυττάρων στο σημείο της βλάβης, την προμιτωτική διαφοροποίηση, την μίτωση όπως και την μεταμιτωτική αναδιαφοροποίηση των κυττάρων. Η επιτυχία της σωστής αποκατάστασης του πνεύμονα, είναι αυτή που θα εξασφαλίζει την περαιτέρω διατήρηση της πνευμονικής λειτουργίας στα φυσιολογικά επίπεδα, μετά από οξύ πνευμονικό τραυματισμό, ή στην διάρκεια πνευμονικών νόσων. Όμως πάρα πολλοί είναι οι παράγοντες που μπορούν δυνητικά να επηρεάσουν την πρόγνωση της πνευμονικής αποκατάστασης (Ingbar and Matthay, 1986).

Κλινικοί παράγοντες, όπως:

- η ηλικία,
- το ιστορικό προηγούμενης πνευμονικής νόσου,
- το κάπνισμα,
- η πιθανή γενετική προδιάθεση,
- η συμπληρωματική οξυγονοθεραπεία,
- η βακτηριαιμία κ.ά,

μπορούν να επηρεάσουν το μηχανισμό αποκατάστασης.

Παθοφυσιολογικοί παράγοντες που σχετίζονται με τον έκταση της βλάβης, αλλά και τον βαθμό αποκατάστασης όπως:

- η ένταση της πρωτεολυτικής δραστηριότητας των πνευμόνων,
- η ποσότητα των ελεύθερων ριζών οξυγόνου,
- η έκταση της βλάβης της βασικής μεμβράνης του επιθηλίου,
- ο αριθμός των ουδετεροφίλων και η δράση τους,
- το surfactant,
- το κολλαγόνο,
- ο πολλαπλασιασμός των πνευμονοκυττάρων τύπου II,
- η βρογχική κυτταρική επαναεπιθηλιοποίηση,
- ποικίλοι χημειοτακτικοί παράγοντες,
- κυτταροκίνες,
- παράγοντες που διεγείρουν ή καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών,
- αντιπρωτεάσες, και γλυκοζαμινογλυκάνες,

εμπλέκονται επίσης σε αυτήν την τόσο πολύπλοκη διαδικασία.

Στον πνεύμονα παρατηρούνται περισσότερα από 40 διαφορετικά είδη κυττάρων, γεγονός που κάνει τον μηχανισμό επιδιόρθωσης του, ακόμα πιο πολύπλοκο. Μερικές φορές ο ίδιος μηχανισμός που οδηγεί στην αλλοίωση της φυσιολογικής δομής του

πνεύμονα, κατά την διάρκεια φλεγμονής ή ίνωσης, εμπλέκεται και στην διαδικασία «επιδιόρθωσης» του.

Η επιτυχία, ή η αποτυχία του μηχανισμού αποκατάστασης εξαρτάται από την φύση και την έκταση της βλάβης, αλλά και από την αποτελεσματικότητα της επανορθωτικής διαδικασίας (Bitterman et al., 1994; Roman and MacDonald, 1991; Snyder et al., 1990).

Τρεις βασικές αρχές όπως φαίνεται, διέπουν την διαδικασία επιδιόρθωσης που έπεται μετά από κάθε οξεία πνευμονική βλάβη.

Σύμφωνα με την πρώτη, στον πνεύμονα ακολουθείται η ίδια γενική αλληλουχία των γεγονότων, που συμβαίνει για κάθε άλλο όργανο ή για το δέρμα, στην περίπτωση βλάβης (Clark, 1991).

Δεύτερον, πιθανολογείται ότι, η διαδικασία επανόρθωσης (rebuilding), μετά από βλάβη, παρουσιάζει πολλά κοινά σημεία με την διαδικασία που ακολουθείται κατά την φυσιολογική οργανογένεση του πνεύμονα. Αυτό μπορεί να συνεπάγεται την έκφραση γονιδίων, την αντιγραφή και την μετάφραση πρωτεϊνών και άλλων προϊόντων, που όμως φυσιολογικά δεν έχουν θέση στα κύτταρα του ώριμου πνεύμονα. Επιπλέον κατά την εξέλιξη αυτής της αναδημιουργίας, φαίνεται να πραγματοποιείται και διάλυση των υπολειμάτων της βλάβης, που συνεπάγεται την μετακίνηση νεκρωτικού υλικού, ινωτικού ιστού και βλαστικών κυττάρων.

Τρίτον, κάποιες τουλάχιστον ουλές θα συνοδεύσουν την διαδικασία της φυσιολογικής επιδιόρθωσης. Μόνιμες ουλές ή διαταραχή της αρχιτεκτονικής του πνεύμονα θα προκύψει μόνο όταν η φυσιολογική δομή του έχει διαταραχθεί ή η διαδικασία της φυσιολογικής αποκατάστασης είναι αλλοιωμένη.

Ανατομικές, κυτταρικές και μηχανικές αλλοιώσεις έχουν παρατηρηθεί τόσο στο αναπνευστικό επιθήλιο, όσο και στο παρέγχυμα των ασθενών με μόνιμο περιορισμό της ροής του αέρα.

Οι Saetta και συνεργάτες (1994) σε μορφομετρικές μελέτες που έγιναν *in vivo* σε καπνιστές, παρατήρησαν σε αυξημένο βαθμό ανωμαλίες του αναπνευστικού επιθηλίου, διήθηση του τοιχώματος των αεραγωγών με φλεγμονώδη κύτταρα, όπως και μυϊκή υπερτροφία και ίνωση, ευρήματα τα οποία δεν υπήρχαν σε μη καπνιστές. Υπήρχε αυξημένο ποσοστό αεραγωγών με διάμετρο μικρότερη από 400 μm ενώ

παρατηρήθηκαν δυναμικές διαταραχές που δεν μπορούσαν να μετρηθούν ποσοτικά, όπως:

- Βλάβη του αναπνευστικού επιθηλίου και αυξημένη διαπερατότητα της μεμβράνης με παρεμπόδιση της περαιτέρω φυσιολογικής λειτουργίας του επιθηλίου.
- Εικόνα χρόνιας φλεγμονής των αεραγωγών.
- Δομικές αλλαγές του τοιχώματος των αεραγωγών.
- Απώλεια των κυψελιδικών προσφύσεων.

Ο καπνός του τσιγάρου προκαλεί την προσέλευση των μακροφάγων στα αναπνευστικά βρογχιόλια και των ουδετεροφίλων στα κυψελιδικά τοιχώματα. Σε βρογχοκυψελιδική έκπλυση (BAL), καπνιστών όπως και ασθενών με Χ.Α.Π. έχουν βρεθεί αυξημένα ποσά ουδετεροφίλων και μακροφάγων (MacNee, 1997; Hunninghake and Crystal, 1983).

Τα ουδετερόφιλα απελευθερώνουν πρωτεάσες, όπως ελαστάση, από τα αζουρόφιλα κοκκία τους, διαταρράσσοντας έτσι το σύστημα πρωτεασών-αντιπρωτεασών του πνεύμονα και προκαλούν πρωτεολυτικού τύπου βλάβη κατευθείαν στο πνευμονικό παρέγχυμα (Dent et al., 1995). Επιπλέον απελευθερώνουν ενεργές οξειδωτικές ουσίες που οδηγούν σε οξειδωτικό stress και οξεία πνευμονική βλάβη (acute lung injury).

Τα κυψελιδικά μακροφάγα εμπλέκονται στην παθογένεια του εμφυσήματος (κεντρολοβιώδες), που σχετίζεται με το κάπνισμα (Hoidal et al., 1981). Απελευθερώνουν ελεύθερες ρίζες οξυγόνου ή παράγωγά τους όπως το υπεροξειδίο του οξυγόνου, ή ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου, τα οποία αν δεν διασπαστούν από αντιοξειδωτικούς παράγοντες (π.χ. υπεροξειδική δισμουτάση, καταλάση) μπορούν να βλάψουν τον πνευμονικό ιστό, αλλά και τα ίδια τα φαγοκύτταρα (Fridovich 1978; Sacks et al., 1978; Nathan et al., 1979). Έτσι όταν συσσωρευθούν στα βρογχιόλια των καπνιστών, τα κυψελιδικά μακροφάγα, μπορούν:

- Αμμεσα, να προκαλέσουν πνευμονική βλάβη εκκρίνοντας τοξικές ρίζες οξυγόνου.
- Εμμεσα από τις πρωτεολυτικές ουσίες που απελευθερώνονται εξαιτίας της αυτοκαταστροφής τους,
- ή να καταστείλουν ένζυμα που αναστέλουν την διαδικασία της πρωτεόλυσης.

Μελέτες έχουν δείξει, ότι οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου από τα κυψελιδικά μακροφάγα μπορούν να εμποδίσουν την αντιπρωτεασική δράση της α1-αντιθρυψίνης (Carr and Janoff, 1979; Janoff et al., 1979), ενώ έχει βρεθεί εξασθενημένη δράση της α1-αντιθρυψίνης σε βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα καπνιστών (Gadek, 1979).

Σε άλλη μελέτη, οι Nakamura και συνεργάτες (Nakamura et al., 1995), παρατήρησαν ότι, το εκχύλισμα του καπνού του τσιγάρου καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό και την μετανάστευση των ινοβλαστών στον πνεύμονα του ανθρώπου. Η Ακρολείνη και η Ακεταλδεύδη, πτητικά συστατικά του καπνού του τσιγάρου φαίνεται να ευθύνονται. Έτσι εμποδίζεται η σωστή επούλωση (Repair) του πνεύμονα, οδηγώντας έτσι σε **«Remodeling»**, δηλαδή σε παθολογική επαναδιόρθωση και μη αντιστρεπτή αλλοίωση της φυσιολογικής δομής του αναπνευστικού επιθηλίου. Η βλάβη των κυψελιδικών δομών φαίνεται να συμβαίνει ακόμα και σε φυσιολογικά άτομα. Πνευμονικό Εμφύσημα όμως, φαίνεται ότι αναπτύσσεται μόνο όταν, η έκταση της βλάβης υπερβαίνει την ικανότητα των μηχανισμών για φυσιολογική αποκατάσταση.

Όμως και άλλοι παράγοντες φαίνεται να επηρεάζουν την διαδικασία της πνευμονικής αποκατάστασης-επούλωσης, μετά από βλάβη (Rennard 1998). Οι Sahebjami και Domino (1989) παρατήρησαν ότι ακόμα και η ασιτία μπορεί να επιταχύνει την ανάπτυξη του εκ'ελαστάσης-εμφυσήματος, σε πειραματόζωα. Ακόμα παρατήρησαν ότι το εμφύσημα είναι πιο σοβαρό σε ελλειποβαρή άτομα, σε σύγκριση με υπέρβαρα ή φυσιολογικού σωματικού βάρους άτομα, για τον ίδιο βαθμό περιορισμού της ροής του αέρα (Sahebjami et al., 1993).

Έτσι, και η κατάσταση της θρέψης, φαίνεται να επηρεάζει την διαδικασία αποκατάστασης του πνεύμονα, προδιαθέτοντας σε ανάπτυξη εμφυσήματος με ταχύτερο ρυθμό σε ελλειποβαρή ή εξασθενημένα άτομα, σε σύγκριση με άτομα με φυσιολογικό σωματικό βάρος.

Κεφάλαιο 3

ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΧΡΟΝΙΑΣ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑΣ

3.1 ΗΛΙΚΙΑ ΚΑΠΝΙΣΜΑ ΚΑΙ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ

Βαρεία Χ.Α.Π. είναι ασυνήθιστη σε άτομα κάτω των 40 ετών, ενώ είναι πολύ συχνή σε ασθενείς μεγαλύτερης ηλικίας.

Αυτή η παρατήρηση προκύπτει από πολλές μελέτες στο γενικό πληθυσμό όπως και από την ιατρική κλινική πράξη. (Knudson and Lebowitz, 1977; Oxhøj et al., 1977).

Θεωρείται ότι η απώλεια της πνευμονικής λειτουργίας που χαρακτηρίζει την Χ.Α.Π., γίνεται σταδιακά, έτσι ώστε η κλινική έκφραση της νόσου να εμφανίζεται συνήθως σε μεγαλύτερης ηλικίας άτομα. Όμως η σχέση αυτή, της Χρόνιας Αποφρακτικής Πνευμονοπάθειας με την ηλικία, θα μπορούσε κατά ένα μέρος, να εξηγηθεί και από την φυσιολογική απώλεια της αναπνευστικής λειτουργίας που συμβαίνει με την γήρανση (Baun and Wolinski, 1994).

Στον φυσιολογικό ενήλικο, όσο προχωράει η ηλικία, παρατηρείται μείωση της μέγιστης εκπνευστικής ροής (Knudson et al., 1976; Kory et al., 1961; Morris et al, 1971), αύξηση των πνευμονικών αντιστάσεων (Frank et al, 1957), και μείωση της δύναμης ελαστικής επαναφοράς του πνεύμονα (Turner et al, 1968).

Ο όγκος σύγκλεισης και η εξάρτηση της δυναμικής ενδοτικότητας από την συχνότητα επίσης επηρεάζονται από την ηλικία (Begin et al, 1975; Buist et al, 1973).

Οι στατικοί πνευμονικοί όγκοι και συγκεκριμένα η Λειτουργική Υπολειπόμενη Χωρητικότητα (FRC), όπως και ο Υπολειπόμενος Όγκος (RV), αυξάνονται, ενώ η Δυναμική Ζωτική Χωρητικότητα (FVC) μειώνεται (Boren et al., 1966).

Οι παραπάνω αλλαγές που παρατηρούνται στην πνευμονική λειτουργία με το πέρασμα της ηλικίας, είναι παρόμοιες με τις αλλαγές που παρατηρούνται και στην Χ.Α.Π.

Φυσιολογικά, ο δυναμικός εκπνευστικός όγκος στο πρώτο δευτερόλεπτο (FEV1), φτάνει την μέγιστη τιμή του στην νεαρή ενήλικη ζωή, μεταξύ 25-30 ετών, ακολουθώντας όμως από εκεί και έπειτα προοδευτικά φθίνουσα πορεία. Σε υγιείς μη καπνιστές ο ετήσιος ρυθμός έκπτωσης του FEV1 είναι κατά μέσο όρο 30ml κατ'έτος (Knudson et al, 1976), αν και παρατηρούνται ευρείες ατομικές παραλλαγές. Έτσι σε φυσιολογικά άτομα μπορεί να παρατηρηθεί ταχύτερος ρυθμός έκπτωσης της πνευμονικής λειτουργίας με την ηλικία, συγκριτικά με τον μέσο όρο. Αυτές οι ατομικές παραλλαγές ίσως μπορούν να

αποτελέσουν προγνωστικό δείκτη για άτομα με ενδεχόμενη αυξημένη «ευπάθεια» για ανάπτυξη Χρόνιας Αποφρακτικής Πνευμονοπάθειας.

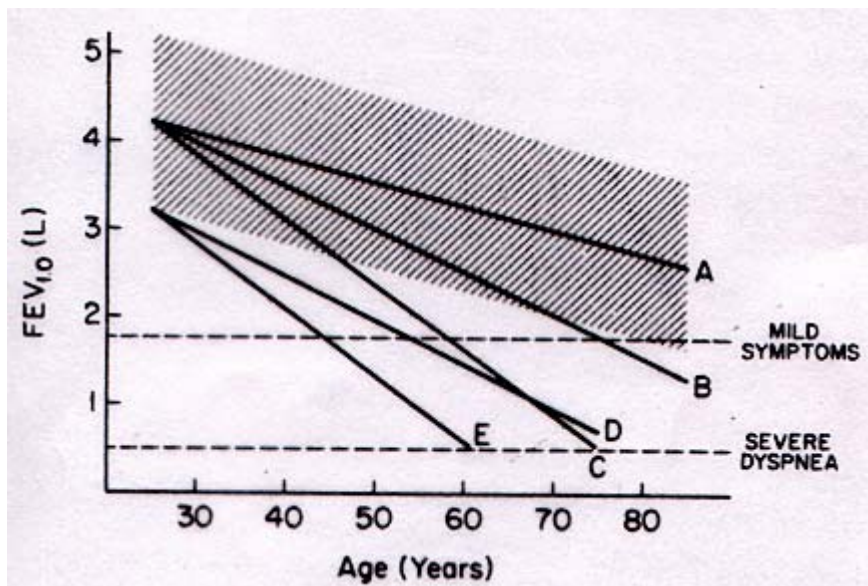
Κατά την διάρκεια της ζωής ενός ανθρώπου, όμως, οι συγκεντρωτικές επιρροές από διάφορους άλλους παράγοντες κινδύνου, φαίνεται να επηρεάζουν πολύ σοβαρότερα την αναπνευστική λειτουργία από ότι η ηλικία από μόνη της

(Σχήμα 5).

Σύμφωνα με τα νορμογράμματα από τους Knudson και συνεργάτες (Knudson et al, 1976), για έναν νεαρό άνδρα ηλικίας 25 ετών και ύψους 175cm, η προβλεπόμενη τιμή για τον FEV1 είναι 4,22lt/s. Με ετήσια πτώση 27ml, το ίδιο άτομο στην ηλικία των 65 ετών θα έχει δυναμικό εκπνευστικό όγκο στο πρώτο δευτερόλεπτο (FEV1) ίσο με 3,14lt.

Συμπτωματολογία Χ.Α.Π., μπορεί να εκδηλωθεί όταν ο δυναμικός εκπνευστικός όγκος στο πρώτο δευτερόλεπτο (FEV1) πέσει κάτω από την τιμή των 2lt. Όπως φαίνεται λοιπόν η επίδραση της ηλικίας στην αναπνευστική λειτουργία, από μόνη της δεν είναι αρκετή για να προκαλέσει εκδήλωση συμπτωματολογίας Χ.Α.Π., στον μέσο φυσιολογικό άνθρωπο. Όμως με την γήρανση προκαλείται σημαντική απώλεια των λειτουργικών αποθεμάτων των πνευμόνων και όταν αυτό συνδυάζεται με επιπρόσθετες επιδράσεις άλλων παραγόντων κινδύνου, όπως το κάπνισμα, οδηγεί σε πνευμονική βλάβη και εκδήλωση Χ.Α.Π.

Πολλές, ανεξάρτητες μεταξύ τους, μελέτες και κλινικές παρατηρήσεις έχουν συνδέσει το κάπνισμα με την Χ.Α.Π. Όλοι συνήθως οι ασθενείς με Χ.Α.Π., αναφέρουν μακρό ιστορικό καπνίσματος και όπως προκύπτει από μελέτες η θνητότητα από την Χ.Α.Π., στα δυτικά κράτη αυξάνει ανάλογα με την κατανάλωση του καπνού.



ΣΧΗΜΑ 5:

Μεταβολές του FEV1 που σχετίζονται με την ηλικία και μεταβολές που σχετίζονται με την καπνιστική συνήθεια.

Με (A) αναπαρίσταται ο μέσος όρος του ετήσιου ρυθμού έκπτωσης του FEV1 (27ml/s/year), σε μη καπνιστή, ύψους 175cm (η σκιαγραφημένη περιοχή αναφέρεται στο φάσμα των φυσιολογικών τιμών). Αν το ίδιο άτομο είναι καπνιστής, τότε η προβλεπόμενη ετήσια έκπτωση του FEV1 θα είναι περίπου 50ml/s (B), ή ακόμα και 100ml/s (C). Με (D) και (E), αναπαρίσταται ο μέσος όρος και η επιτάχυνση του ρυθμού έκπτωσης της πνευμονικής λειτουργίας εξαιτίας του καπνίσματος, σε άτομο που ο FEV1 του, από την ηλικία των 25 ετών είναι ήδη στα κατώτερα φυσιολογικά όρια (Baun 1994).

Πνευμονικές λειτουργικές διαταραχές έχουν καταγραφεί σε καπνιστές, άνδρες ή γυναίκες σε όλες τις ηλικίες (Woolf and Suero 1971; Tockman et al., 1976; Burrows et al., 1977). Η έκταση αυτών των διαταραχών μεγαλώνει όσο προχωράει η ηλικία και όσο αυξάνεται η κατανάλωση του καπνού.

Όμως διαταραχές της πνευμονικής λειτουργίας έχουν παρατηρηθεί και σε νεαρούς καπνιστές, στον όγκο σύγκλεισης, στην σχέση της ενδοτικότητας από την συχνότητα, και στις καμπύλες ροής-όγκου Ηλίου-Οξυγόνου (Buist et al., 1973; Dosman et al., 1975). Οι διαταραχές αυτές υποδεικνύουν ότι ήπια πνευμονική βλάβη αναπτύσσεται μέσα σε μικρό χρονικό διάστημα από την έναρξη του καπνίσματος, και μάλιστα αυτό επιβεβαιώθηκε από τις παθολογικές αλλαγές που παρατηρήθηκαν στους περιφερικούς μικρούς αεραγωγούς των καπνιστών (Niewoehner et al., 1974).

Οι Fletcher και συνεργάτες (Fletcher et al., 1976), στην μελέτη του Λονδίνου, παρατήρησαν ότι οι μη καπνιστές είχαν ετήσια πτώση του FEV1 κατά 36ml/s το χρόνο, ενώ οι καπνιστές ανάλογα με την ποσότητα των τσιγάρων είχαν κατά μέσο όρο ετήσια πτώση του FEV1 κατά 10-20ml/s το χρόνο παραπάνω από τους μη καπνιστές, δηλαδή 46-56ml/s συνολική ετήσια απώλεια. Βέβαια, άτομα με πιο επιβαρυσμένο ιστορικό καπνίσματος παρουσίαζαν και ταχύτερο ρυθμό έκπτωσης του FEV1. Παρόλαυτα η προβλεπόμενη επιπρόσθετη επίδραση του καπνίσματος στην συνολική ετήσια έκπτωση του FEV1 (δηλαδή επιπλέον 10-25ml/s ετησίως για τους καπνιστές), είναι σχετικά ήπια και μικρότερης έντασης από την ετήσια έκπτωση του FEV1, λόγω ηλικίας (δηλαδή 27-36ml/s ετησίως).

Έτσι φαίνεται τελικά ότι η συνολική επίδραση της ηλικίας και του καπνίσματος στην πνευμονική λειτουργία είναι αρκετά μικρή. Αυτό εξηγεί γιατί οι περισσότεροι καπνιστές δεν αναπτύσσουν Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια.

Σύμφωνα με το παράδειγμα του νεαρού ενήλικα με FEV1 περίπου 4lt, στην ηλικία των 25 ετών και φυσιολογική ετήσια απώλεια λόγω ηλικίας 27ml/s το χρόνο περίπου, στην ηλικία των 65 ετών ο FEV1 θα έχει μειωθεί στην τιμή των 3lt (**Σχήμα 5**). Ακόμα και αν η ετήσια έκπτωση της πνευμονικής λειτουργίας, διπλασιασθεί, λόγω καπνίσματος, ο FEV1 στην ηλικία των 65 ετών δεν θα είναι μικρότερος από 2lt. Σ' αυτό το στάδιο ο ασθενής μπορεί να παρουσιάσει ήπια δύσπνοια στην κόπωση, αλλά όχι όμως σοβαρή Χ.Α.Π.

Το κάπνισμα φαίνεται να προκαλεί Χ.Α.Π. σε κάποιους καπνιστές, επειδή εκείνοι υφίστανται έκπτωση της πνευμονικής τους λειτουργίας η οποία ξεπερνά κατά πολύ την αναμενόμενη.

Οι Fletcher και συνεργάτες (Fletcher et al., 1976) παρατήρησαν ότι κάποιοι βαρείς καπνιστές υφίστανται μείωση της πνευμονικής λειτουργίας που δεν διαφέρει από αυτήν που υφίστανται λόγω της ηλικίας οι μη καπνιστές, ενώ άλλοι “ευπαθείς” καπνιστές είχαν πολύ σημαντικές απώλειες της πνευμονικής λειτουργίας. Έτσι όπως φαίνεται και στο παράδειγμα (**Σχήμα 5**), μείωση του FEV1 κατά 100ml/s το χρόνο περίπου, αρχίζοντας από την ηλικία των 25 ετών θα οδηγήσει στην ηλικία των 55 ετών σε κλινική εκδήλωση Χ.Α.Π., ενώ στην ηλικία των 70 ετών θα καταλήξει σε σοβαρή αναπηρία.

Όμως μέχρι τώρα λίγα γνωρίζουμε όσον αφορά την διάκριση των «ευπαθών» καπνιστών από τους μη ευπαθείς και την αναγνώριση αυτών των ατόμων με μεγαλύτερο κίνδυνο για ανάπτυξη Χ.Α.Π.

Αξιόπιστο προγνωστικό δείκτη κινδύνου για ανάπτυξη Χ.Α.Π., φαίνεται να αποτελούν οι ατομικές μετρηθείσες τιμές της πνευμονικής λειτουργίας (Higgins et al., 1982; Peto et al., 1983). Στο παράδειγμα του 25χρονου νεαρού ενήλικα (**Σχήμα 5**), η προβλεπόμενη τιμή του FEV1 σύμφωνα με την ηλικία και το ύψος πρέπει να είναι περίπου 4,22lt. Όμως λόγω φυσιολογικών βιολογικών ατομικών διαφορών ένα μικρό ποσοστό ατόμων με την ίδια ηλικία και το ίδιο ύψος θα έχουν FEV1 ίσο με 3,50lt ή και λιγότερο. Έτσι είναι φανερό ότι αυτά τα άτομα διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο εκδήλωσης Χ.Α.Π. και μάλιστα πρόωρα. Για έναν άνδρα 25 ετών με FEV1 ίση με 3,25ml/s και ετήσια απώλεια περίπου 50ml/s αναμένεται να εκδηλωθεί Χ.Α.Π. στην ηλικία των 55 ετών. Αν υπάρξουν και επιπρόσθετοι παράγοντες κινδύνου που να οδηγήσουν σε ακόμα ταχύτερη απώλεια της αναπνευστικής λειτουργίας τότε η εκδήλωση της νόσου θα πραγματοποιηθεί σε νεαρότερη ηλικία.

3.2 ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΙΚΗ ΡΥΠΑΝΣΗ

Η χημική σύσταση των ατμοσφαιρικών ρύπων διαφέρει πολύ από περιοχή σε περιοχή και είναι εξαιρετικά πολύπλοκη. Ιδιαίτερη προσοχή μέχρι τώρα έχει δοθεί στις βλαπτικές επιδράσεις του οξειδίου του θείου του οξειδίου του αζώτου, του όζοντος και του μονοξειδίου του άνθρακα.

Αυξημένα επίπεδα ατμοσφαιρικής ρύπανσης μπορούν να προκαλέσουν μικρής διάρκειας αναπνευστικές διαταραχές. Σε αστικές περιοχές, με αυξημένες συγκεντρώσεις όζοντος ή διοξειδίου του άνθρακα, έχουν παρατηρηθεί μέτριας βαρύτητας διαταραχές στην πνευμονική λειτουργία κατά την άσκηση, στα παιδιά αλλά και στους ενήλικες (Spector et al., 1988). Οι λειτουργικές διαταραχές συνοδεύονται από βήχα, αναπνευστική δυσχέρεια και πιθανά οξεία φλεγμονώδη αντίδραση των αεραγωγών (Koren et al., 1989).

Σε μελέτη που έγινε στο Λονδίνο, σε ταχυδρόμους (Holland and Reid, 1965), φάνηκε ότι οι περισσότερες αναπνευστικές διαταραχές και συμπτώματα παρατηρήθηκαν στα άτομα που ζούσαν στις αστικές περιοχές.

Στην Ιαπωνία επίσης, παιδιά που ζουν σε περιοχές με μεγάλη ατμοσφαιρική ρύπανση παρατηρήθηκε να έχουν κατά τον λειτουργικό έλεγχο της αναπνοής, τιμές στα κατώτερα φυσιολογικά όρια συγκριτικά με παιδιά από άλλες μη μολυσμένες περιοχές.

Σε άλλη μελέτη ανάμεσα σε δύο πόλεις με διαφορετικό επίπεδο ατμοσφαιρικής μόλυνσης (San Francisco και Los Angeles), οι εργάτες της πιο μολυσμένης περιοχής παρουσίαζαν περισσότερο βήχα και απόχρεμψη αλλά όχι όμως ανιχνεύσιμη διαταραχή της πνευμονικής λειτουργίας (Linn et al., 1976).

Αν και υπάρχουν σαφείς ενδείξεις ότι η ατμοσφαιρική ρύπανση των αστικών περιοχών μπορεί να αποτελέσει επιπρόσθετο παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη Χ.Α.Π., φαίνεται να είναι μικρότερης σημασίας τελικά από ότι το κάπνισμα του τσιγάρου.

3.3 ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΚΘΕΣΗ

Πολλές μελέτες έγιναν σε διάφορα επαγγέλματα για να καθοριστεί η ύπαρξη και το μέγεθος του κινδύνου για ανάπτυξη Χ.Α.Π., από επαγγελματική έκθεση σε σκόνη ή τοξικές εισπνεόμενες ουσίες.

Η επαγγελματική έκθεση, έχει ενοχοποιηθεί για ταχεία πτώση του FEV1. Αξιόπιστα στοιχεία υπάρχουν για το Κάδμιο και το Πυρίτιο ενώ υψηλού κινδύνου για ανάπτυξη Χ.Α.Π. θεωρούνται:

- οι εργάτες οικοδομών (έκθεση σε τσιμέντο),
- οι εργάτες μεταλλουργείας (έκθεση στη θερμότητα κλιβάνων),
- οι εργάτες σε μύλους χαρτιού, όπως και
- οι εργάτες που χειρίζονται δημητριακά και βαμβάκι. (Siafakas et al., 1995; Burge, 1994; Becklake, 1989).

Όμως για τις περισσότερες περιπτώσεις ο κίνδυνος φαίνεται να είναι μεγαλύτερος όταν συνοδεύεται από ιστορικό καπνίσματος. Έτσι η επαγγελματική έκθεση από μόνη της είναι μικρότερης σημασίας από ότι το κάπνισμα από μόνο του για εκδήλωση Χ.Α.Π.

3.4 ΚΟΙΝΩΝΙΚΟΟΙΚΟΝΟΜΙΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ

Αυξημένη θνητότητα από Χ.Α.Π., έχει παρατηρηθεί σε άτομα χαμηλού κοινωνικοοικονομικού επιπέδου. Αυτό φαίνεται να σχετίζεται με το κάπνισμα, την επαγγελματική έκθεση αλλά και την διαμονή σε περισσότερο μολυσμένες περιοχές (Higgins et al., 1977).

Κεφάλαιο 4

ΦΥΣΙΚΗ ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΧΡΟΝΙΑΣ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑΣ

Η Φυσική Ιστορία της Χρόνιας Αποφρακτικής Πνευμονοπάθειας εξαρτάται από το είδος της οργανικής βλάβης που κυριαρχεί (Fishman 1988):

4.1 ΕΙΚΟΝΑ ΧΡΟΝΙΑΣ. ΒΡΟΓΧΙΤΙΔΑΣ

Ο κατ' εξοχήν βρογχιτιδικός ασθενής είναι συνήθως χρόνιος καπνιστής τσιγάρων με επηρεασμένους τους φυσιολογικούς μηχανισμούς άμυνας εξαιτίας παρατεταμένης έκθεσης στις τοξικές ουσίες του εισπνεόμενου καπνού. Οι βλάβες που πιθανά προκαλούνται και από άλλες τοξικές εισπνεόμενες ουσίες του περιβάλλοντος, απλά επιπροστίθενται στις ήδη υπάρχουσες από τον καπνό του τσιγάρου. Αυτές οι βλάβες προδιαθέτουν σε λοιμώξεις.

Στο **αρχικό στάδιο** της Χρόνιας Βρογχίτιδας ο όγκος σύγκλεισης όπως και ο υπολειπόμενος όγκος είναι ήπια αυξημένοι, υπάρχει εξάρτηση της συχνότητας από την ενδοτικότητα, αλλά η αντίσταση των αεραγωγών και ο συμβατικός έλεγχος της πνευμονικής λειτουργίας (π.χ. FEV1) είναι φυσιολογικά. Η μερική πίεση Οξυγόνου στο αρτηριακό αίμα συνήθως βρίσκεται στα κατώτερα φυσιολογικά όρια ή είναι ελάχιστα μειωμένη εξαιτίας της ήπιας ανομοιογένειας της σχέσης αερισμού-αιμάτωσης. Αυτό το στάδιο μπορεί να είναι ανατρέψιμο αν επιτευχθεί:

- διακοπή του καπνίσματος,
- απομάκρυνση από άλλες εισπνεόμενες τοξικές ουσίες, και
- πρόληψη των αναπνευστικών λοιμώξεων.

Η συνέχιση όμως του καπνίσματος και οι υποτροπιάζουσες λοιμώξεις του αναπνευστικού οδηγούν **στο δεύτερο στάδιο**, κατά το οποίο οι περιφερικοί αεραγωγοί προοδευτικά αποφράσσονται, ενώ κάποιοι από αυτούς ατελεκτατούν. Εξαιτίας του χρόνιου ερεθισμού και των επανειλημμένων λοιμώξεων, αρχίζουν να προσβάλλονται και οι μεγαλύτεροι αεραγωγοί.

Οι αεραγωγοί εμφανίζονται με μειωμένη διάμετρο του αυλού τους εξαιτίας πάχυνσης των τοιχωμάτων τους. Οι υποβλεννογόνιοι αδένες διογκώνονται (αύξηση του Δείκτη της Reid) και αυξάνεται η ποσότητα της ενδοαυλικής βλέννης. Ο έλεγχος της πνευμονικής λειτουργίας αποκαλύπτει αποφρακτικού τύπου διαταραχή. Ο δυναμικά

εκπνεόμενος όγκος στο πρώτο δευτερόλεπτο (FEV1) είναι χαμηλός ενώ ο υπολλειπόμενος όγκος είναι αυξημένος. Όμως η ελαστική δύναμη επαναφοράς των πνευμόνων, ακόμα διατηρείται φυσιολογική όπως και η διαχυτική ικανότητα για το CO. Ελάχιστοι μόνο από αυτούς τους ασθενείς παρουσιάζουν σοβαρές διαταραχές των μερικών πιέσεων των αερίων του αρτηριακού αίματος όπως κατά το στάδιο, που εμφανίζουν Αναπνευστική Ανεπάρκεια και Χρόνια Πνευμονική Καρδιά.

Το **τρίτο στάδιο** χαρακτηρίζεται από προοδευτικά επιδεινούμενη διαταραχή της σχέσης αερισμού-αιμάτωσης των πνευμόνων, η οποία προκαλείται εξαιτίας της απόφραξης των αεραγωγών και της δημιουργίας εμφυσήματος. Αν και ο συνηθέστερος τύπος, είναι το κεντρολοβιώδες εμφύσημα κάποιοι ασθενείς αναπτύσσουν και πανλοβιώδες. Η μείωση της δύναμης ελαστικής επαναφοράς των πνευμόνων οδηγεί σε αύξηση της αντίστασης των αεραγωγών.

Όσο προχωράει η ηλικία του ασθενούς, τόσο και επιδεινώνεται η απώλεια της δύναμης ελαστικής επαναφοράς, αυξάνεται η πιθανότητα αναπνευστικών λοιμώξεων και αυξάνεται η απόφραξη στα βρογχιόλια και στους βρόγχους.

Όσο λογική όμως και αν φαίνεται η αλληλουχία των σταδίων της Χρ. Βρογχίτιδας, υπάρχουν πολλά κενά στην μέχρι τώρα γνώση μας. Για παράδειγμα, λίγα πράγματα ξέρουμε για την μετάβαση από το πρώτο στάδιο στο δεύτερο.

Επίσης είναι άγνωστο πως οι περισσότεροι καπνιστές (80-85%) δεν φτάνουν από την ασυμπτωματική νόσο των μικρών αεραγωγών στην Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια.

Γιατί, μόνο λίγοι ασθενείς αναπτύσσουν κυψελιδικό υποαερισμό και τις συνέπειες του, ενώ οι περισσότεροι με παρόμοιες διαταραχές στον συμβατικό έλεγχο της πνευμονικής λειτουργίας, διατηρούν σχεδόν φυσιολογικά επίπεδα αερίων αρτηριακού αίματος εκτός από τις περιόδους παροξύνσεων λόγω λοιμώξεων του αναπνευστικού, παραμένει επίσης αδιευκρίνιστο.

4.2 ΕΙΚΟΝΑ ΕΜΦΥΣΗΜΑΤΟΣ

Το Εμφύσημα ακόμα και σε σοβαρή μορφή, όταν δεν υπάρχει απόφραξη των αεραγωγών μπορεί να παραμείνει ασυμπτωματικό σχεδόν σε όλη τη διάρκεια της ζωής, εκτός από την παρουσία δύσπνοιας, στην κόπωση.

Όμως οι περισσότεροι ασθενείς με εμφύσημα, συνήθως, εμφανίζουν και κάποιου βαθμού Χρ. Βρογχίτιδας, λόγω καπνιστικής συνήθειας. Σε σύγκριση με τους χρόνιους βρογχιτιδικούς ασθενείς, οι κατ'εξοχήν εμφυσηματικοί ασθενείς σπάνια αναπτύσσουν Χρόνια Πνευμονική Καρδιά εκτός αν παρουσιάζουν υποξυγοναιμία τόσο σοβαρή ώστε να προκαλέσει Χρόνια Πνευμονική Υπέρταση. Η απόφραξη των αεραγωγών στον μη καπνιστή εμφυσηματικό ασθενή, είναι γενικά ήπια.

Ο τύπος του εμφυσηματος – κεντρολοβιώδες ή πανλοβιώδες – ελάχιστα φαίνεται να επηρεάζει το βαθμό απόφραξης των αεραγωγών. Μέτρια έως σοβαρή απόφραξη αεραγωγών συνήθως οφείλεται σε συνύπαρξη Χρ. Βρογχίτιδας.

Έτσι λοιπόν, η φυσική ιστορία του Εμφυσηματος ποικίλει από δύσπνοια στην κόπωση έως προοδευτικά επιδεινούμενη σοβαρή δύσπνοια στην ηρεμία, όταν το εμφύσημα εξακολουθεί να εξελίσσεται και οι πνεύμονες προοδευτικά καταστρέφονται. Αύξηση του μεταφορτίου της δεξιάς καρδιακής κοιλίας όπως και Πνευμονική Καρδιά αναπτύσσονται συνήθως όταν υπάρχει χρόνια υποξυγοναιμία.

Κεφάλαιο 5

ΧΡΟΝΙΑ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑ & ΚΙΝΔΥΝΟΣ ΑΛΛΗΣ ΝΟΣΟΥ

5.1 Χ.Α.Π. ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Η χρόνια έκπτωση της πνευμονικής λειτουργίας, όπως αναδεικνύεται από τα σπυρομετρικά ευρήματα, στην Χ.Α.Π., αντανakλά άμεσα τις λειτουργικές βλάβες των πνευμόνων. Επίσης αποτελεί αξιόπιστο δείκτη πρόβλεψης της θνητότητας εξαιτίας της Χ.Α.Π. όπως και εξαιτίας άλλων συνυπαρχόντων νοσημάτων (Petty et al., 1997).

Η υπόθεση ότι ο χρόνιος περιορισμός της ροής του αέρα μπορεί να είναι παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη βρογχογενούς καρκίνου, τέθηκε από το 1953 όταν ο Korol, παρατήρησε σε ασθενείς με συγγενές φυσσαλιδώδες εμφύσημα, 10 περιπτώσεις ανάπτυξης καρκίνου του πνεύμονα.

Το 1968 οι Coldstein και συνεργάτες, παρατήρησαν ότι οι ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα σε σύγκριση με τα άτομα ελέγχου, παρουσίαζαν στην ακτινογραφία θώρακος υπερμεγέθεις φυσαλλίδες στο πνευμονικό τους παρέγχυμα.

Οι Coldstein και συνεργάτες ήταν οι πρώτοι που υπέθεσαν ότι ο περιορισμός της ροής του αέρα παρεμποδίζοντας τον φυσιολογικό αερισμό των πνευμόνων μπορεί να οδηγήσει στην εναπόθεση τοξικών σωματιδίων, όπως αυτά από τον καπνό του τσιγάρου, στους αεραγωγούς, προάγοντας έτσι την βλάβη του αναπνευστικού επιθηλίου η οποία περαιτέρω μπορεί να οδηγήσει σε παθολογική αναδιοργάνωση του επιθηλίου, ατυπία και περαιτέρω νεοπλασία.

Σήμερα, πολλές μελέτες έχουν επιβεβαιώσει ότι, ο μειωμένος δυναμικός εκπνευστικός όγκος στο πρώτο δευτερόλεπτο (FEV1), συνοδεύεται με αυξημένο κίνδυνο κατά επτά περίπου φορές περισσότερο του φυσιολογικού, για ανάπτυξη καρκίνου του πνεύμονα και θάνατο, σε σύγκριση με άτομα που παρουσιάζουν φυσιολογική αναπνευστική λειτουργία, στον λειτουργικό έλεγχο της αναπνοής.

5.2 Χ.Α.Π. ΚΑΙ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΝΟΣΟΣ

Οι ερευνητές της μελέτης Framingham Heart Study (Kannel et al., 1983), ήταν οι πρώτοι που παρατήρησαν ότι η Ζωτική Χωρητικότητα (VC) μπορεί να αποτελέσει δείκτη πρόγνωσης της συχνότητας ανάπτυξης επακόλουθης Στεφανιαίας νόσου (Petty et al., 1997).

Αυτή η σχέση παρατηρήθηκε ακόμα και σε μη καπνιστές, δείχνοντας έτσι ότι η μείωση της Ζωτικής Χωρητικότητας μπορεί να αποτελέσει σημαντικό παράγοντα κινδύνου για ανάπτυξη Στεφανιαίας Νόσου. Αυτή η παρατήρηση επιβεβαιώθηκε και σε άλλες μελέτες (Marcus et al., 1989). Σε πρόσφατη αναφορά από τους Tockman και συνεργάτες (Tockman et al., 1995) υπάρχει σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ του ρυθμού έκπτωσης του FEV1 και της επακόλουθης θνητότητας από Στεφανιαία Νόσο ανάμεσα σε 883 άνδρες, μέσης ηλικίας 61 ετών, που μελετήθηκαν (Baltimore Longitudinal., Study of Aging, 1995).

Πολλοί μηχανισμοί θα μπορούσαν να εξηγήσουν την σχέση της πνευμονικής λειτουργίας με την Στεφανιαία νόσο και με τον καρκίνο του πνεύμονα.

Είναι πιθανόν ότι κοινοί μηχανισμοί, όπως:

-η κατάργηση της ικανότητας για σωστή επούλωση του επιθηλίου μετά από οξεία πνευμονική βλάβη (Acute Lung injury) εξαιτίας της έκθεσης σε εισπνεόμενες ερεθιστικές ουσίες, όπως ο καπνός του τσιγάρου, ή και

-η εξασθένηση των φυσιολογικών αμυντικών μηχανισμών εναντίον οξειδωτικών ουσιών και ελευθέρων ριζών O₂,

να υποκρύπτονται πίσω από την ανάπτυξη Χ.Α.Π., της Στεφανιαίας νόσου ή και του Καρκίνου του Πνεύμονα.

Όσον αφορά τον καρκίνο, η μειωμένη βλεννοκροσσωτή κάθαρση που παρατηρείται στους ασθενείς με Χ.Α.Π., μπορεί να επιδεινώνει την κατακράτηση καρκινογόνων ουσιών στο αναπνευστικό επιθήλιο, ή μπορεί απλώς, να υπάρχει κοινή γενετική προδιάθεση, ανάμεσα στην Χ.Α.Π. και στον καρκίνο του πνεύμονα.

Στην Στεφανιαία νόσο μειωμένη πνευμονική λειτουργία ,είτε σαν αιτία είτε σαν αποτέλεσμα, μπορεί να συνοδεύεται με παχυσαρκία και μειωμένη φυσική δραστηριότητα.

Η υποξυγοναιμία που σχετίζεται με την συνυπάρχουσα πνευμονική νόσο μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο εκδήλωσης λανθάνουσας Στεφανιαίας νόσου ή να οδηγήσει μια υποκλινική καρδιακή δυσλειτουργία να εκδηλωθεί ως πνευμονική αγγειακή συμφόρηση, οδηγώντας σε επιπλέον μείωση της Ζωτικής Χωρητικότητας.

Κεφάλαιο 6

ΓΕΝΕΤΙΚΗ & ΧΡΟΝΙΑ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑ

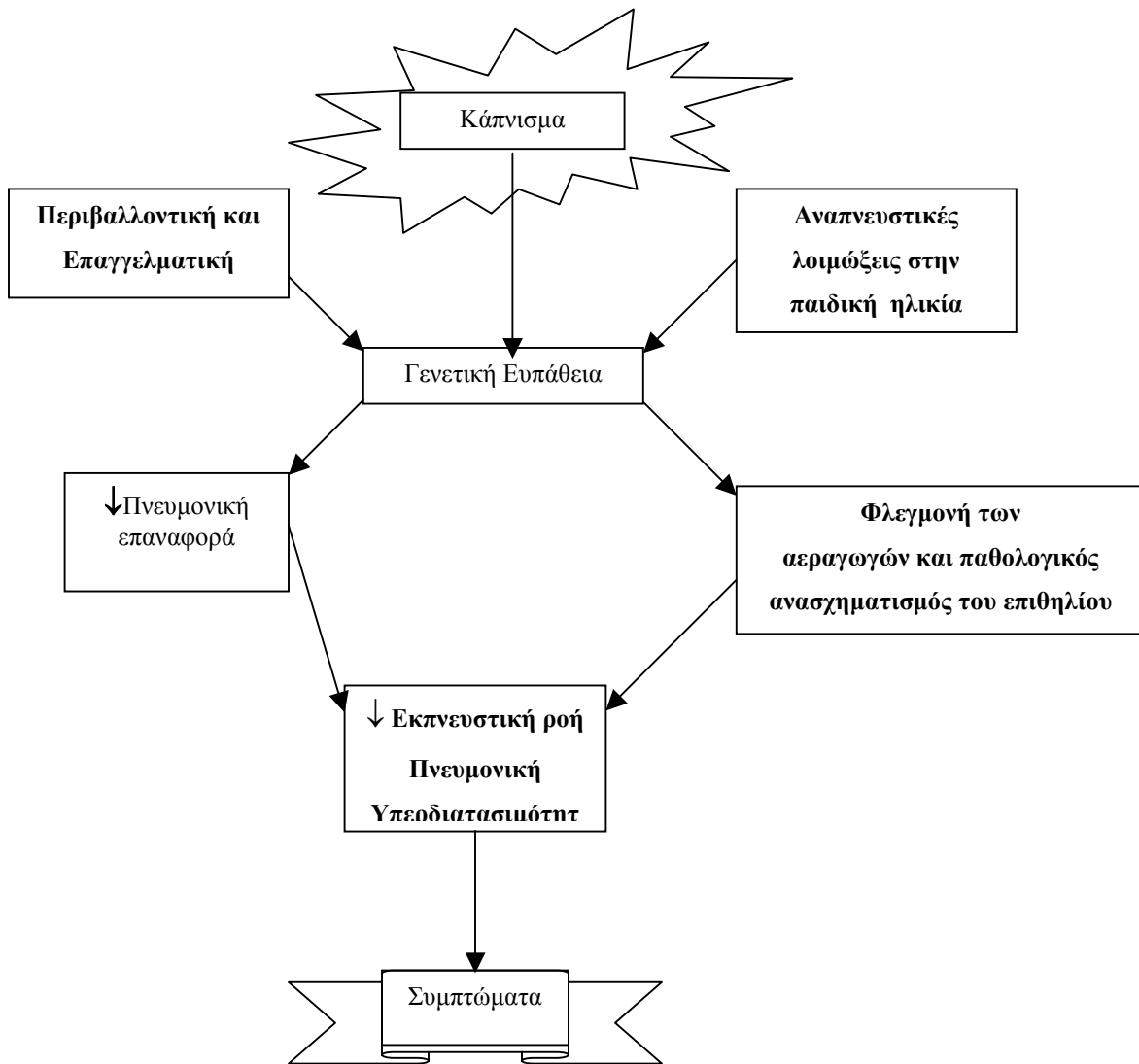
Παρά την φανερή σχέση του καπνίσματος με την απόφραξη των αεραγωγών, υπάρχει αξιοσημείωτη παραλλαγή στο είδος της απάντησης κάθε ατόμου στην έκθεση του τσιγάρου. Έτσι μόνο μια μειονότητα από τους καπνιστές (15-20%) εκδηλώνουν Χ.Α.Π. Επιδημιολογικές και κλινικές μελέτες όπως και μελέτες σε οικογένειες και διδύμους αποδεικνύουν ότι γενετικοί παράγοντες επίσης έχουν ρόλο στην παθογένεια της Χ.Α.Π (Σχήμα 6). Αντίθετα από άλλες νόσους όπως για παράδειγμα την Κυστική Ίνωση, για την οποία ευθύνεται η μετάλλαξη ενός μόνο γονιδίου, η Χ.Α.Π. φαίνεται να είναι γενετικά πολύπλοκη και να ελέγχεται από συνδυασμό γονιδίων (Sanford et al., 1997).

6.1 Α1-ΑΝΤΙΘΡΥΨΙΝΗ

Πρώτοι οι Laurell και Eriksson (Laurell and Eriksson, 1963), παρατήρησαν ότι ασθενείς με πολύ χαμηλά επίπεδα ορού της α1-σφαιρίνης εκδήλωναν συχνότερα εμφύσημα.

Η α1-αντιθρυψίνη είναι μια πανίσχυρη αντιπρωτεάση και είναι από τα λίγα ένζυμα που μπορούν να καταστείλουν την δράση της ελαστάσης των λευκοκυττάρων. Παράγεται στο συκώτι, αλλά και στα κυψελιδικά μακροφάγα, όπως και στα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος. Είναι πρωτεΐνη υψηλού πολυμορφισμού και έχουν βρεθεί μέχρι τώρα πάνω από 70 διαφορετικοί τύποι έκφρασης της (Mornex et al., 1986). Ο γονότυπος MM θεωρείται φυσιολογικός και εκφράζει τα υψηλότερα επίπεδα ορού της α1-αντιθρυψίνης.

Ο τύπος Z του γονιδίου της α1-αντιθρυψίνης, συνοδεύεται από διαταραχή της αντιπρωτεολυτικής δράσης της και διαταραχή της επεξεργασίας της στο ενδοπλασματικό δίκτυο, γεγονός που οδηγεί στην συσσώρευση της μέσα στο κύτταρο. Αυξημένες ποσότητες του τύπου Z της α1-αντιθρυψίνης στα ηπατοκύτταρα φαίνεται να οδηγούν σε ηπατική νόσο (Birrer et al., 1991).



ΣΧΗΜΑ 6:

Σύνοψη των παθογενετικών μηχανισμών στην Χ.Α.Π. Η έκθεση στον καπνό του τσιγάρου αποτελεί τον κυρίαρχο παράγοντα κινδύνου, που όμως αλληλεπιδρώντας με άλλους παράγοντες όπως την γενετική ατομική ευπάθεια, καταλήγει στην εκδήλωση της νόσου (Τροποποίηση από Sandford et al 1997).

Ομόζυγα άτομα ZZ έχουν εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα κυκλοφορούσης α1-αντιθρυψίνης (χαμηλότερα από το 15% του φυσιολογικού) και παρουσιάζουν φανερά ταχύτερο ρυθμό έκπτωσης της πνευμονικής λειτουργίας ακόμα και αν δεν έχουν ιστορικό καπνίσματος (Janus et al., 1985). Στους καπνιστές ομόζυγους ZZ η συμπτωματολογία και η απόφραξη των αεραγωγών συμβαίνει σε μικρότερη ακόμα ηλικία.

Όμως ο τύπος ZZ στον γενικό πληθυσμό, εκφράζεται πολύ σπάνια, και έτσι μπορεί να εξηγηθεί μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό (λιγότερο από 1%) της ατομικής γενετικής ευπάθειας για ανάπτυξη εμφυσήματος ανάμεσα στους καπνιστές (Petty and Weinmann, 1997).

Έτσι μελετήθηκαν και ετερόζυγοι γονότυποι.

Ασθενείς με ετερόζυγο τύπο MS παρουσιάζουν ήπια μείωση της α1-αντιθρυψίνης με επίπεδα ορού περίπου 80% του φυσιολογικού, οι ετερόζυγοι MZ 60% του φυσιολογικού ενώ οι ετερόζυγοι SZ ακόμα χαμηλότερα επίπεδα, περίπου 40% του φυσιολογικού, αλλά αυτός ο γονότυπος εμφανίζεται εξαιρετικά σπάνια.

Εκτός από αυτές τις μεταλλάξεις που επηρεάζουν τα επίπεδα της α1-αντιθρυψίνης, πολλές άλλες έχουν περιγραφεί που επηρεάζουν την λειτουργία της ακόμα και όταν τα επίπεδα της στον ορό είναι φυσιολογικά (Owen et al., 1983), αλλά αυτές παρατηρούνται ακόμα πιο σπάνιες.

6.2 A1-ANTΙΧΥΜΟΘΡΥΨΙΝΗ

Πρόκειται επίσης για αντιπρωτέαση του ορού. Καταστέλει:

- την χυμοθρυψίνη του παγκρέατος,
- την καθεψίνη G των ουδετεροφίλλων,
- την χυμάση των μαστοκυττάρων, και
- την παραγωγή της ουδετεροφιλικής υπεροξειδάσης (Kilpatrick et al., 1991).

Παράγεται από τα ηπατοκύτταρα και τα κυψελιδικά μακροφάγα (Burnetti et al., 1984). Η έλλειψη της α1-αντιχυμοθρυψίνης είναι σπάνια και σε μελέτες που παρατηρήθηκε κληρονομική έλλειψη της, ελέγχονταν κατά τον αυτοσωμικό

κυριαρχούντα χαρακτήρα (Eriksson et al., 1986; Lindmark et al., 1990). Δεν έχει παρατηρηθεί ιδιαίτερος κλινικός φαινότυπος που να σχετίζεται με την έλλειψη της, όμως υπάρχουν μελέτες που έχει παρατηρηθεί κατά τον λειτουργικό έλεγχο της αναπνοής αυξημένος υπολειπόμενος όγκος (RV), και αύξηση του ποιλίκου RV/TLC (υπολειπόμενος όγκος/ζωτική χωρητικότητα) σε αυτούς τους ασθενείς.

Αυξημένη συχνότητα έλλειψης της α 1-αντιχυμοθρυψίνης έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς με παιδικό άσθμα και Χ.Α.Π. (Lindmark et al., 1990; Poller et al., 1992; Poller et al., 1993).

6.3 Ο ΡΥΘΜΙΣΤΗΣ ΤΗΣ ΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ

Το γονίδιο του ρυθμιστή της αγωγιμότητας της μεμβράνης είναι εκείνο που ελέγχει τα κανάλια του Χλωρίου στην επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων των αεραγωγών κι έτσι, έχει ρόλο στον έλεγχο των εκκρίσεων.

Ομόζυγη έλλειψη του γονιδίου (CFTR), ή διαταραχή της λειτουργίας αυτής της πρωτεΐνης οδηγεί σε Κυστική Ίνωση (CF), η οποία χαρακτηρίζεται από αυξημένα επίπεδα χλωρίου στον ιδρώτα και πρώιμη έναρξη αποφρακτικής πνευμονικής νόσου. Οι βρογχικές εκκρίσεις είναι παχύρρευστες και κολλώδεις προδιαθέτοντας σε υποτροπιάζουσες βακτηριακές λοιμώξεις και βρογχεκτασίες. Ο επιπολασμός της Κυστικής Ίνωσης είναι 1 σε 2000, ή 1 σε 3000 περιπτώσεις (Welch et al., 1995).

Οι ετεροζυγώτες παρουσιάζουν διαταραχή της ρύθμισης του ύδατος και των ιόντων, διαταραχή της βλεννοκροσσωτής κάθαρσης και αυξημένη ευπάθεια σε παράγοντες κινδύνου που υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν θα είχαν καμιά επίδραση.

Στην δεκατία του 1960 τέθηκε η υπόθεση ότι οι ετεροζυγώτες μπορεί να είχαν αυξημένη προδιάθεση για αναπνευστικά νοσήματα. Σύγκριση των γονέων των ασθενών με κυστική ίνωση με φυσιολογικά άτομα μέσης ηλικίας 34-36 ετών δεν ανέδειξε σημαντικές διαφορές στην αναπνευστική λειτουργία ούτε διαφορά στον επιπολασμό του άσθματος ή της χρόνιας βρογχίτιδας στους ετεροζυγώτες (Batten et al., 1963; Hallet et al., 1965). Όμως παρατηρήθηκε αυξημένη βρογχική υπεραντιδραστικότητα στην πρόκληση με μεταχολίνη (Davies, 1984), και αυξημένη συχνότητα εκδήλωσης συρριγμού, ο οποίος συνοδεύονταν και από πτώση

του FEV1 και της δυναμικής μεσοεκπνευστικής ροής FEF25-75 (Davis and Vargo, 1987).

Πάνω από 580 διαφορετικοί τύποι γονιδίων για τον ρυθμιστή της αγωγιμότητας της μεμβράνης στην Κυστική ίνωση έχουν περιγραφεί. Ο πιο συχνός είναι ο ΔF508 και έχει βρεθεί στο 70% περίπου των χρωμοσωμάτων των ασθενών αυτών (Kerem et al., 1989). Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η ετεροζυγωτία του ΔF508, φαίνεται να προδιαθέτει σε βρογχιεκτασίες, αλλά η συμβολή του σε άλλες αποφρακτικές παθήσεις δεν έχει αποδεικτεί (Pignatti et al., 1996; Gasparini et al., 1990).

6.4 VITAMIN D-BINDING PROTEIN (VDBP)

Είναι πρωτεΐνη που εκκρίνεται από το ήπαρ και η οποία έχει την ικανότητα να ενώνει εξωκυτταρική ακτίνη και ενδοτοξίνη μαζί με την βιταμίνη D. Αυξάνει την χημειοτακτική δράση του παράγοντα του συμπληρώματος C5a για τα ουδετερόφιλλα (Ken and Webster, 1988), μπορεί να δράσει σαν ενεργοποιητής της δράσης των μακροφάγων (Yamamoto and Homma, 1991), και επιπλέον μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την ένταση της φλεγμονώδους αντίδρασης.

Οι Kueppers et al., 1977, και Horne et al., 1990, παρατήρησαν μεταλλάξεις του γονιδίου αυτής της πρωτεΐνης σε ασθενείς με Χ.Α.Π. Όμως σε άλλες μελέτες αυτό δεν επιβεβαιώθηκε (Kauffmann et al., 1983).

6.5 Α2-ΜΑΚΡΟΣΦΑΙΡΙΝΗ (alpha2-macroglobuline)

Είναι ευρέως φάσματος αναστολέας της πρωτεάσης. Φυσιολογικά τα επίπεδα της στον ορό του αίματος είναι υψηλότερα στις γυναίκες και μειώνονται με την ηλικία. Συντίθεται στα ηπατοκύτταρα, στα κυψελιδικά μακροφάγα (White et al., 1980) και στους ινοβλάστες των πνευμόνων του ανθρώπου (Mosher and Wing 1976).

Πιστεύεται ότι τελεί προστατευτικό ρόλο στους πνεύμονες. Λόγω του μεγάλου μοριακού βάρους της δύσκολα περνάει από το αίμα στον Διάμεσο και Κυψελιδικό Χώρο

του πνεύμονα, έτσι που τα επίπεδα της στο αίμα δεν αντικατοπτρίζουν και την συγκέντρωση της στον πνεύμονα.

Όμως υπό συνθήκες φλεγμονής, η αύξηση της διαπερατότητας του αγγειακού τοιχώματος επιτρέπει την διάβαση της α2-μακροσφαιρίνης και την είσοδο της στον διάμεσο χώρο (Bohm et al., 1980). Αυξημένα επίπεδα της έχουν ανιχνευθεί σε πτύελα ασθενών με οξείες λοιμώξεις του αναπνευστικού (Burnett and Stockley, 1981).

Αυξημένα επίπεδα α2-μακροσφαιρίνης, διπλάσια του φυσιολογικού παρατηρήθηκαν σε ορό ασθενών με έλλειψη α1-αντιθρυψίνης, χωρίς να σχετίζονται με παρουσία ή απουσία Χ.Α.Π. (Brissenden and Cox, 1983; Ganrot et al., 1967). Τέτοια αύξηση όμως δεν παρατηρήθηκε σε ασθενείς με εμφύσημα που δεν σχετίζονταν με την έλλειψη της α1-αντιθρυψίνης.

Η ανεπάρκεια της α2-μακροσφαιρίνης είναι πολύ σπάνια. Σε δύο μελέτες μέχρι τώρα, έχει περιγραφεί κληρονομική έλλειψη της κατά τον αυτοσωμικό κυρίαρχο χαρακτήρα (Bergqvist and Nilsson 1979; Stenbjerg 1981). Σε αυτά τα άτομα όμως δεν παρατηρήθηκε συμπτωματολογία αναπνευστικής νόσου, ίσως επειδή ήταν σε πολύ νεαρή ηλικία για να εκδηλώσουν Χ.Α.Π. Παντελής έλλειψη α2-μακροσφαιρίνης δεν έχει περιγραφεί ακόμα και ίσως είναι ασύμβατη με την ζωή.

6.6 ΚΥΤΟΧΡΩΜΑ P4501A1

Είναι ένζυμο που μεταβολίζει εξωγενή στοιχεία έτσι ώστε αυτά να μπορέσουν να αποβληθούν με την χολή ή τα ούρα. Έχει ανιχνευθεί και στους πνεύμονες και φαίνεται να παίζει ρόλο στην ενεργοποίηση των προκαρκινογόνων και στην μετατροπή τους σε καρκινογόνα.

Το γονίδιο CYP1A1 ελέγχει την παραγωγή του ενζύμου και οι μεταλλάξεις του συνοδεύονται από καρκίνο του πνεύμονα (Drakoulis et al., 1994).

Σε πρόσφατη μελέτη παρατηρήθηκε ότι μετάλλαξη αυτού του γονιδίου βρέθηκε να σχετίζεται εκτός από τον καρκίνο του πνεύμονα και με αυξημένη ευπάθεια για κεντρολοβιακό εμφύσημα (Cantlay et al., 1995).

6.7 ANTIΓΟΝΑ ΟΜΑΔΩΝ ΑΙΜΑΤΟΣ (Blood group antigens)

Το γονίδιο για τις ομάδες αίματος βρίσκεται στο χρωμόσωμα 9, και καθορίζει την δράση μιας γλυκοτρανφεράσης η οποία μετατρέπει την γλυκοπρωτεΐνη (H) στα αντιγόνα A ή B.

Σχέση μεταξύ του ABO γονιδίου και της Χ.Α.Π. βρέθηκε από τους Cohen et al., 1977. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν ότι διαταραχή της πνευμονικής λειτουργίας ήταν συνδεδεμένη με την ομάδα αίματος (A). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν από τους ίδιους συγγραφείς με μελέτη διάρκειας πέντε ετών, όπου φάνηκε ταχύτερη έκπτωση της πνευμονικής λειτουργίας στους ασθενείς με (A) ομάδα αίματος σε σύγκριση με τους άλλους (Beatty et al., 1984). Όμως σε αντίθεση με αυτά τα δεδομένα, πολλές άλλες μελέτες απέτυχαν να επιβεβαιώσουν αυτήν την συσχέτιση (Vestbo et al., 1993; Higgins et al., 1982).

Τα αντιγόνα ABO θεωρητικά είναι παρόντα σε όλα τα κύτταρα του ανθρώπινου σώματος. Περίπου 80% του γενικού πληθυσμού εκκρίνουν ABO αντιγόνα στην σίελο, στο πλάσμα και στις αναπνευστικές εκκρίσεις. Η ικανότητα αυτή καθορίζεται από ειδική θέση-γονίδιο (secretor locus), στο χρωμόσωμα 19q και κληρονομείται κατά τον κυρίαρχο χαρακτήρα.

Έχει παρατηρηθεί ότι «non-secretor» άτομα παρουσιάζουν διαταραχή της αναπνευστικής λειτουργίας, που δεν παρατηρήθηκε αντίστοιχα σε «secretor» άτομα (Cohen et al., 1980; Haines et al., 1982).

Αυτό μπορεί να υποδηλώνει τον πιθανό προστατευτικό ρόλο αυτών των αντιγόνων στο αναπνευστικό δέντρο. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν από τους Kauffmann et al., 1983, που βρήκαν σημαντικό ποσοστό «non-secretors» της ομάδας O, σε άτομα με χαμηλό FEV1, αν και αυτά τα άτομα είχαν ηλικία πάνω από 40 έτη. Όμως, άλλες μελέτες δεν επιβεβαίωσαν αυτά τα αποτελέσματα (Higgins et al., 1982; Vestbo et al., 1993).

Έτσι ο ρόλος των ABO στην Χ.Α.Π. φαίνεται να παραμένει ακόμα αδιευκρίνιστος, αλλά μπορεί να υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των αντιγονικών συστημάτων και της προσκόλλησης λοιμωδών παραγόντων (Raza et al., 1991), αυξάνοντας έτσι την ατομική

ευαισθησία στις λοιμώξεις. Εξάλλου οι υποτροπιάζουσες λοιμώξεις ιδιαίτερα της παιδικής ηλικίας αποτελούν έναν από τους παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη της Χ.Α.Π.

6.8 HUMAN LEUCOCYTE ANTIGEN LOCUS (HLA)

Μελετήθηκαν βαρείς καπνιστές με υψηλή τιμή FEV1 και μη καπνιστές με χαμηλή τιμή FEV1 με σκοπό να ερευνηθεί η σχέση μεταξύ του HLA τύπου I γονιδίου και Χ.Α.Π. (Kauffmann et al., 1983). Οι συγγραφείς παρατήρησαν σημαντικά μειωμένη συχνότητα του HLA-Bw16 αλληλίου στους ασθενείς με χαμηλή FEV1 ενώ οι ίδιοι παρουσίαζαν αυξημένη συχνότητα για το HLA-B7.

Στην Ιαπωνία σε ασθενείς με διάχυτη πανβρογχιολίτιδα παρατηρήθηκε αυξημένη συχνότητα του HLA-B54, συγκριτικά με φυσιολογικά άτομα (Sugiyama et al., 1990). Αυτός ο τύπος του HLA αντιγόνου υπάρχει μόνο σε Ιάπωνες, Κορεάτες και Κινέζους και αυτό μπορεί να είναι και η εξήγηση γιατί η διάχυτη πανβρογχιολίτιδα δεν έχει παρατηρηθεί σε Καυκάσιους και Αφρικανούς.

Δεν έχει όμως αποδεικτεί ακόμα αν αυτές οι συσχετίσεις είναι εξαιτίας των διαφορετικών τύπων των HLA γονιδίων, ή εξαιτίας ευπάθειας των γονιδίων.

6.9 ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ

Ασθενείς με κληρονομική ανεπάρκεια IgA είτε μόνη της, είτε σε συνδυασμό με ανεπάρκεια IgG είναι γνωστό ότι εκδηλώνουν υποτροπιάζουσες αναπνευστικές λοιμώξεις (Oxelius et al., 1981).

Σε μελέτες ασθενών με ανεπάρκεια IgA και IgG, παρατηρήθηκε διαταραγμένη αναπνευστική λειτουργία (Bjorkander et al., 1985). Επίσης βρέθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων IgG2 και τιμών του FEV1 σε ασθενείς με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (O'Keefe et al., 1991).

6.10 ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΚΗ ΔΙΣΜΟΥΤΑΣΗ (EC-SOD)

Είναι γλυκοπρωτεΐνη που βρίσκεται κυρίως στο Διάμεσο Χώρο αν και περίπου το 1% από την συνολική της ποσότητα βρίσκεται στο πλάσμα, στην λέμφο και στο αρθρικό υγρό.

Είναι το κύριο εξωκυτταρικό αντιοξειδωτικό ένζυμο του πνεύμονα, προστατεύοντας από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου που εισπνέονται κατά το κάπνισμα ή που παράγονται τοπικά από τα ενεργοποιημένα κύτταρα της φλεγμονής.

Μετάλλαξη του γονιδίου της EC-SOD οδηγεί στην αντικατάσταση της αργινίνης από την γλυκίνη στην θέση R213G (Folz et al., 1994; Sandstrom et al., 1994). Περίπου το 2% του γενικού πληθυσμού έχει βρεθεί να είναι ετεροζυγώτες για αυτήν την αντικατάσταση (Sandstrom et al., 1994). Η μετάλλαξη, οδηγεί στην αύξηση της συγκέντρωσης του ενζύμου στον ορό, επειδή αποτυγχάνει να συνδεθεί και να παραμείνει συνδεδεμένο με τις γλυκοσαμινογλυκάνες του διάμεσου χώρου.

Σε ασθενή με μεταμόσχευση πνεύμονα λόγω εμφυσήματος τελικού σταδίου, βρέθηκαν πολύ αυξημένα επίπεδα ορού EC-SOD (10 φορές πάνω από τα φυσιολογικά), όμως η μετάλλαξη σε αυτόν τον ασθενή δεν επιβεβαιώθηκε. Έτσι επειδή το γονίδιο είναι πολυμορφικό θα πρέπει να μελετήθουν και άλλες πιθανές μεταλλάξεις.

6.11 SECRETORY LEUCOCYTE PROTEINASE INHIBITOR (SLPI)

Πρόκειται για αντιπρωτεάση που έχει βρεθεί σε διάφορες εκκρίσεις συμπεριλαμβανομένων και των αναπνευστικών.

Παράγεται τοπικά στους πνεύμονες από τα επιθηλιακά κύτταρα και μπορεί να καταστείλει την ελασάση των ουδετεροφίλλων, ασκώντας έτσι σημαντικό ρόλο στην πρόληψη της ιστικής βλάβης από τα ουδετερόφιλλα κατά την διάρκεια της φλεγμονής (Sallenave et al., 1994).

Όμως σε μελέτες, σε ασθενείς με πρώιμη Χ.Α.Π., χωρίς ανεπάρκεια α1-αντιθρυψίνης, ή σε άτομα με ποικίλους α1-αντιθρυψίνη γονότυπους δεν βρέθηκαν μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτής της πρωτεΐνης (Abe et al., 1991).

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η **Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια** (Χ.Α.Π.) αποτελεί μια από τις συχνότερες αιτίες νοσηρότητας και θνητότητας σήμερα.

Από Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια υπολογίζεται ότι πάσχει περίπου το 5% του γενικού πληθυσμού και το 20% των υπερηλίκων. Αποτελεί την τέταρτη αιτία θανάτου στη Β. Αμερική (Fiore et al 1997), ενώ στην Ευρωπαϊκή Ένωση, η Χ.Α.Π. και το Άσθμα μαζί με την Πνευμονία, αποτελούν την τρίτη πιο συχνή αιτία θανάτου(Siafakas et al., 1995).

Αν και έχει αποδεικτεί ότι **ο καπνός του τσιγάρου** κατέχει σημαντικό ρόλο στην δημιουργία της μόνιμης απόφραξης των αεραγωγών που χαρακτηρίζει την Χ.Α.Π, εντούτοις φαίνεται να υπάρχει αξιοσημείωτη ατομική διαφοροποίηση όσον αφορά την απάντηση στην έκθεση του καπνού του τσιγάρου, αφού τελικά λιγότερο από 20% των καπνιστών αναπτύσσουν Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια.

Αυτό υποδεικνύει την ύπαρξη αυξημένης γενετικής ευπάθειας σε συγκεκριμένα μόνο άτομα, τα οποία κάτω από συνθήκες παρατεταμένης έκθεσης σε ερεθιστικές εισπνεόμενες ουσίες (κάπνισμα, περιβαλλοντική, ή επαγγελματική έκθεση) θα αναπτύξουν Χ.Α.Π.

Επειδή η **νόσος** είναι ίσως **πολυγονιακή** δεν αρκεί ο πολυμορφισμός ενός μόνο γονιδίου για την κλινική έκφραση της, αλλά φαίνεται ότι απαιτείται συνδυασμός πολυμορφισμού, διαφόρων γονιδίων και μάλιστα ταυτόχρονα, για να **μετατραπεί ένα άτομο με αυξημένη γενετική ευπάθεια**, σε βλαπτικά αναπνευστικά ερεθίσματα, **σε ασθενή, με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια**.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΕΙΔΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η **Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια** (Χ.Α.Π.) αποτελεί μια από τις συχνότερες αιτίες νοσηρότητας και θνησιμότητας σήμερα.

Αν και έχει αποδεικτεί ότι ο **καπνός του τσιγάρου** κατέχει σημαντικό ρόλο στην δημιουργία της μόνιμης απόφραξης των αεραγωγών που χαρακτηρίζει την Χ.Α.Π, εντούτοις φαίνεται να υπάρχει αξιοσημείωτη ατομική διαφοροποίηση όσον αφορά την απάντηση στην έκθεση του καπνού του τσιγάρου, αφού τελικά λιγότερο από 20% των καπνιστών αναπτύσσουν Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια.

Αυτό υποδεικνύει ότι επιπλέον **γενετικοί** και **περιβαλλοντολογικοί** παράγοντες φαίνεται να ευθύνονται για την ανάπτυξη της Χ.Α.Π.

Ο **σκοπός** της μελέτης μας, ήταν η διερεύνηση της πιθανότητας γενετικών διαταραχών στους ασθενείς με Χ.Α.Π., χρησιμοποιώντας σαν δείκτη την συχνότητα εμφάνισης του φαινομένου της Αστάθειας των αλληλουχιών του Μικροδορυφορικού DNA (Loeb, 1994).

Εξαιτίας της ευρείας διάδοσης του στο ανθρώπινο γονιδίωμα, αφού υπάρχει σε περισσότερες από 100.000 διαφορετικές θέσεις σε όλα τα χρωμοσώματα του ανθρώπου (Weber and May 1989), του εξαιρετικού πολυμορφισμού του, του τρόπου που κληρονομείται (κατά το Μεντελικό πρότυπο), και την δυνατότητα εφαρμογής της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (PCR) για την ενίσχυση των αλληλουχιών του, το Μικροδορυφορικό DNA αποτελεί σημαντικό δείκτη μελέτης για το γονιδίωμα του ανθρώπου.

Ο σχεδιασμός γενετικών δεικτών, όπως είναι οι δείκτες για το μικροδορυφορικό DNA, παρέχει την δυνατότητα έρευνας σε όλο το γονιδίωμα, για ανεύρεση αστάθειας, καθώς και συσχετίσεων της αστάθειας με την εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων σε πληθυσμούς ατόμων υπό έλεγχο.

Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατόν, να αποκαλυφθούν **χρωμοσωμικές περιοχές** στις οποίες ανιχνεύεται **Αστάθεια Μικροδορυφορικού DNA**, οι οποίες πιθανόν να **γειτονεύουν με γονίδια** τα οποία εμπλέκονται στην εμφάνιση νοσημάτων.

Στο Ατοπικό Άσθμα, για παράδειγμα, έξι τέτοιες χρωμοσωμικές περιοχές βρέθηκαν σε Βρετανική μελέτη (Daniels et al., 1996), ενώ σε άλλη μελέτη, παρατηρήθηκαν πολλές και διαφορετικές χρωμοσωμικές περιοχές με πιθανή σύνδεση στην γενετική ευπάθεια για το Ατοπικό Άσθμα, σε ομάδες ατόμων διαφορετικών εθνοτήτων, υποδεικνύοντας ότι υπάρχουν γενετικές διαφορές ανάμεσα σε διαφορετικούς πληθυσμούς (CSGA: The Collaborative Study on the Genetics of Asthma 1997).

Η Αστάθεια του Μικροδορυφορικού DNA, αρχικά παρατηρήθηκε στον Καρκίνο του παχέως εντέρου, όπου θεωρήθηκε ότι λάθη κατά την αντιγραφή του DNA, τα οποία δεν «επιδιορθώθηκαν», οδήγησαν στον κακοήγη μετασχηματισμό των κυττάρων.

Συγχρόνως πολλές άλλες μελέτες επιβεβαίωσαν ότι η Αστάθεια του Μικροδορυφορικού DNA αποτελεί κοινό εύρημα στους περισσότερους καρκίνους, όπως στον καρκίνο του Πνεύμονος, του Ενδομητρίου, των Ωοθηκών του Προστάτη, της Κεφαλής και Τραχήλου, της Ουροδόχου Κύστης (Aaltonen et al., 1993; Field et al., 1995; Froudarakis et al., 1998; Mao et al., 1996; Mao et al., 1996; Thiboteau et al., 1994).

Στην περίπτωση της Χρόνιας Αποφρακτικής Πνευμονοπάθειας, από τις μέχρι σήμερα γνωστές βιβλιογραφικές αναφορές, δεν έχει επιχειρηθεί η ανίχνευση του φαινομένου της Αστάθειας του Μικροδορυφορικού DNA.

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΠΡΩΤΟ

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΑΣΤΑΘΕΙΑΣ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΟΥ DNA
ΣΤΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑ.

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΣΤΟΧΟΣ

Από την μέχρι τώρα γνώση μας για την παθοφυσιολογία της Χρόνιας Αποφρακτικής Πνευμονοπάθειας, πολύ λίγα γνωρίζουμε για την μοριακή βάση της νόσου.

Ο σκοπός της μελέτης μας, ήταν η διερεύνηση της πιθανότητας γενετικών διαταραχών στους ασθενείς με Χ.Α.Π., χρησιμοποιώντας σαν δείκτη την συχνότητα εμφάνισης του φαινομένου της Αστάθειας των αλληλουχιών του Μικροδορυφορικού DNA (Loeb, 1994).

Η Αστάθεια των διαδοχικά επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών του DNA ή με άλλα λόγια η **Αστάθεια του Μικροδορυφορικού DNA (Microsatellite Instability)**, αποτελεί φαινόμενο γενετικής ανωμαλίας, το οποίο χαρακτηρίζει πολλούς κληρονομικούς και σποραδικούς καρκίνους και έχει συνδεθεί με υψηλό δείκτη μεταλλαξογένεσης (Aaltonen et al., 1993; Ionov et al., 1993; Thiboteau et al., 1993; Yee et al, 1994; Kiaris et al., 1994; Parson et al., 1993).

Το φαινόμενο της αστάθειας των μικροδορυφορικών αλληλουχιών του DNA έχει συνδεθεί με μεταλλάξεις σε γονίδια που εμπλέκονται στον μηχανισμό της αποκατάστασης του DNA (Paradopoulos et al., 1994; Parson et al., 1993). Με την παρούσα μελέτη, θελήσαμε να ερευνήσουμε:

- 1.Την δυνατότητα ανίχνευσης του φαινομένου σε κυτταρολογικά δείγματα ασθενών με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια
- 2.Την συχνότητα της εμφάνισης του φαινομένου της Αστάθειας του Μικροδορυφορικού DNA σε αυτούς τους ασθενείς

1.2 ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΑΣΘΕΝΩΝ

Τα δείγματα (πτύελα και περιφερικό αίμα), λήφθηκαν από ασθενείς με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια, από την Πνευμονολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου, Ηρακλείου Κρήτης, αφού πρώτα δόθηκε έγκριση από την Επιτροπή Ιατρικής Έρευνας και Ηθικής, του Νοσοκομείου.

Μελετήθηκαν δείγματα, από 31 ασθενείς, με μέσο όρο ηλικίας 68 ± 11 έτη, και οι οποίοι πληρούσαν τα κριτήρια συμμετοχής για την συγκεκριμένη μελέτη.

Αναλυτικότερα, τα κριτήρια συμμετοχής ήταν:

- μακρό ιστορικό καπνίσματος,
- ιστορικό βήχα και απόχρεμψης, για μεγάλα διαστήματα
- δύσπνοια κατά την άσκηση, ή κατά την ηρεμία
- σπιρομετρικά ευρήματα μη-αναστρέψιμης απόφραξης των αεραγωγών μετά την χορήγηση β2-διεγέρτη
- αρνητικό ιστορικό για Ατοπία και Βρογχικό Άσθμα (IgE σε φυσιολογικά επίπεδα)

Επίσης θεωρήθηκε απαραίτητο, για τουλάχιστον τέσσερις εβδομάδες πριν από την λήψη των δειγμάτων, οι ασθενείς να βρίσκονταν σε περίοδο ηρεμίας.

Οι δημογραφικές παράμετροι, το ιστορικό καπνίσματος, τα σπιρομετρικά ευρήματα και οι τιμές των αερίων του αρτηριακού αίματος των ασθενών της μελέτης, απεικονίζονται στον **ΠΙΝΑΚΑ 1.1**.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.1.

Μέσες τιμές κλινικών και εργαστηριακών παραμέτρων, των ασθενών με Χ.Α.Π.

Αριθμός ασθενών	31
Ηλικία (έτη)	68.74 ± 10.91
Διάρκεια νόσου (έτη)	7,42 ± 4.3
Κάπνισμα (pack years)	53.83 ± 33.56
PaO ₂ (mmHg)	60.7 ± 8.81
PaCO ₂ (mm Hg)	49.14 ± 11.26
pH	7.37 ± 0.04
HCO ₃ ⁻	28.37 ± 3.41
FEV ₁ (% προβλεπόμενης)	36.91 ± 14.38
FVC (% προβλεπόμενης)	47.26 ± 12.15
FEV ₁ /FVC (%)	54.72 ± 10.32

PaO₂=Arterial partial pressure of Oxygen (Μερική πίεση του Οξυγόνου στο αρτηριακό αίμα)

PaCO₂=Arterial partial pressure of Carbon Dioxide (Μερική πίεση του Διοξειδίου του Άνθρακα στο αρτηριακό αίμα)

FEV₁=Forced Expiration Volume in one second (Δυναμικός Εκπνευστικός Όγκος στο πρώτο δευτερόλεπτο)

FVC=Forced Vital Capacity (Δυναμική Ζωτική Χωρητικότητα)

1.3 ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΑΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΤΟΥ DNA

Το υλικό που χρησιμοποιήθηκε, ήταν κύτταρα από πτύελα και από περιφερικό αίμα, ασθενών με Χ.Α.Π.

1.3Α. Εκχύλιση του DNA από κυτταρολογικά δείγματα (πτύελα):

Από τον κάθε ασθενή συλλέχθηκαν, με αυτόματη απόχρεμψη, πτύελα ενός 24ώρου. Τα πτύελα αραιώθηκαν με ίσο όγκο φυσιολογικού ορού (N/S 0,9%) και μετά από ανάδευση συλλέχθηκε μόνο ή υπερκείμενη φάση σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα. Προστέθηκε φυσιολογικός ορός μέχρι να συμπληρωθεί όγκος ίσος με 50 ml. Ακολούθησε φυγοκέντρηση και απομάκρυνση της υδατικής φάσης. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 400mM TRIS-HCL (pH:7.0), 150mM NaCl, 60 mM EDTA, 1% SDS και 100μg/ml proteinase K και επώασθηκε στους 42 βαθμούς Κελσίου για 12-15 ώρες. Στη συνέχεια προστέθηκαν 150 μl υπερχλωρικού νατρίου και 500μl χλωροφόρμιου και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά σε 13.000 rpm, σε θερμοκρασία δωματίου. Η υδατική φάση μεταφέρθηκε σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα και το DNA κατακρίμνησθηκε με την προσθήκη 100% αιθυλικής αλκοόλης και NaCl 5N. Τα δείγματα τέθηκαν στους -20 βαθμούς Κελσίου για 12-14 ώρες και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 13.000 rpm και σε θερμοκρασία 4 βαθμών Κελσίου. Τέλος απομακρύνθηκε η υπερκείμενη φάση, το ίζημα ξεπλύθηκε με 70% παγωμένη αιθυλική αλκοόλη και επαναδιαλύθηκε σε 50μl απεσταγμένου νερού.

1.3Β. Εκχύλιση του DNA από περιφερικό αίμα:

Με φλεβοκέντηση από περιφερική φλέβα, συλλέχθηκαν 3ml αίματος από κάθε ασθενή σε δοκιμαστικούς αποστειρωμένους σωλήνες που περιείχαν EDTA. Για την απομάκρυνση των ερυθροκυττάρων χρησιμοποιήθηκε 10 mM TRIS-HCL (pH:8.0), 320 mM σουκρόζης, 1% TRITON X-100 και 5mM MgCl₂. Για την εκχύλιση του DNA από τα λευκά αιμοσφαίρια εφαρμόστηκε η ίδια μέθοδος με εκείνη που εφαρμόστηκε στα κυτταρολογικά δείγματα (πτύελα). Η απομάκρυνση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε

με προσθήκη 500μl φαινόλης/χλωροφορμίου. Η κατακρίμνηση του DNA έγινε επίσης με την προσθήκη 100% αιθυλικής αλκοόλης, όπως περιγράφηκε παραπάνω.
Τα δείγματα του DNA διατηρήθηκαν στους 4 βαθμούς Κελσίου.

1.4 ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΟΥ DNA

Έξι δείκτες του Μικροδορυφορικό DNA (Microsatellite markers; Research Genetics;Huntsville, ALBANY, USA) χρησιμοποιήθηκαν, για τέσσερα διαφορετικά χρωμοσώματα (**ΠΙΝΑΚΑΣ 1.2**).

Αναλυτικότερα:

-για το χρωμόσωμα (**3**) χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικοί δείκτες, ο **D3S1234** και ο **D3S1210**

-για το χρωμόσωμα (**6**) χρησιμοποιήθηκε ο **D6S344**

-για το χρωμόσωμα (**11**) χρησιμοποιήθηκε ο **HRM**

-για το χρωμόσωμα (**17**) χρησιμοποιήθηκαν επίσης δύο διαφορετικοί δείκτες, ο **THRA1** και ο **D17S250**.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.2:

Οι Δείκτες του Μικροδορυφορικού DNA που χρησιμοποιήθηκαν και η αντιστοιχία τους κατά χρωμόσωμα.

Δείκτης (Microsatellite marker)	Χρωμόσωμα
D3S1234	3
D3S1210	3
D6S344	6
HRM	11
THRA1	17
D17S250	17

Η επιλογή των χρωμοσωμάτων και των αντίστοιχων δεικτών, για την ανίχνευση της αστάθειας του Μικροδορυφορικού DNA, έγινε με βάση ήδη γνωστές βιβλιογραφικές αναφορές οι οποίες συσχετίζουν τα συγκεκριμένα χρωμοσώματα με γονίδια τα οποία έχουν ενοχοποιηθεί για την συμμετοχή τους σε κακοήθεις εξεργασίες του πνεύμονα, όπως ο μικροκυτταρικός και ο μη-μικροκυτταρικός καρκίνος.

Συγκεκριμένα **στο χρωμόσωμα (3)** του ανθρώπου, οι Wilkie και Weber (1994) χαρτογράφησαν 18 διαφορετικές θέσεις πολυμορφισμού των διαδοχικά επαναλαμβανόμενων μικροδορυφορικών αλληλουχιών.

Πολλές μελέτες, αναδεικνύουν αστάθεια των μικροδορυφορικών αλληλουχιών του DNA, σε ασθενείς με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονος, η οποία ανιχνεύεται στα χρωμοσώματα (3p), (3q), (11p), (11q), (13q) (Xq), χρησιμοποιώντας διαφορετικούς, κάθε φορά μικροδορυφορικούς δείκτες (Shridar V., et al 1994).

Για **το χρωμόσωμα (11)**, μελέτες σε ασθενείς με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, ανέδειξαν ειδική περιοχή μήκους 5-cM στην θέση 11q23, η οποία απουσιάζει σε αυτούς τους ασθενείς (Iizuka et al., 1995). Επίσης στο ίδιο χρωμόσωμα (11q), αναγνωρίστηκε η ύπαρξη ογκοκατασταλτικού γονιδίου, του οποίου η δράση καταργείται μέσω του φαινομένου της απώλειας της ετεροζυγωτίας στους ασθενείς με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (Murakami et al., 1995).

Στο **χρωμόσωμα (6)**, μελέτες σε πειραματόζωα (ποντίκια), ανέδειξαν και χαρτογράφησαν, κοντά στο γονίδιο Kras, ειδική περιοχή που σχετίζεται με κληρονομική προδιάθεση για καρκίνο του πνεύμονα, και ονομάστηκε Pas 1 (pulmonary adenoma susceptibility 1). Παρόμοιες περιοχές επίσης έχουν χαρτογραφηθεί, όπως και περιοχές που σχετίζονται με «ανθεκτικότητα» για καρκίνο του πνεύμονα (Dragani et al., 1996).

Τέλος, **στο χρωμόσωμα (17)**, πολλές μελέτες αναδεικνύουν αστάθεια των αλληλουχιών του μικροδορυφορικού DNA, όπως και απώλεια της ετεροζυγωτίας στους ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (Froudarakis et al., 1998).

Επιπλέον αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι σε άλλες μελέτες παρατηρήθηκε αστάθεια του μικροδορυφορικού DNA, και απώλεια της ετεροζυγωτίας στα χρωμοσώματα 3q14, 9p21, 17p13, σε **υγιείς, νυν και τέως καπνιστές**, σε δείγματα από βιοψίες βρογχικού επιθηλίου με φυσιολογική, ή, με την παρουσία ελάχιστων αλλοιώσεων στο βρογχικό επιθήλιο, ιστολογική εικόνα (Mao et al., 1997).

1.5 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΜΕ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΔΟΥΦΟΡΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ

Η τεχνική της PCR (Polymerase Chain Reaction: Αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση), εφαρμόστηκε σε 12,5μl αντιδρώντος όγκου, ο οποίος περιείχε:

- 100ng γονιδιακού DNA,
- 500μM dNTPs,
- 10 pmol από κάθε ολιγονουκλεοτίδιο-εκκινητή. Χρησιμοποιήθηκαν, ένας εκκινητής για ευθεία και ένας για ανάστροφη υβριδοποίηση, για κάθε Μικροδορυφορικό Δείκτη (forward and reverse primer).
- 1,25μl από 10Xbuffer:
- 670mM Tris-HCL με pH:(8,5),
- 166mM Θειικό Αμμώνιο,
- 67mM Χλωριούχο Μαγνήσιο,
- 1,7mg/ml λευκωματίνη βοείου ορού,
- 100mM β-Μερκαπτοαιθανόλη και
- 1% (w/v) Triton-X-100}
- 0,3 μονάδες Taq-DNA Πολυμεράση.

Η **θερμική αποδιάταξη** της δίκλωνης έλικας του DNA πραγματοποιήθηκε στους 95 βαθμούς Κελσίου και για 5 λεπτά.

Ο **υβριδισμός** των εκκινητών πραγματοποιήθηκε στους 58-60 βαθμούς Κελσίου και η **σύνθεση** της θυγατρικής αλυσίδας στους 72 βαθμούς.

Τα τρία αυτά στάδια (θερμική αποδιάταξη, υβριδισμός, σύνθεση DNA) επαναλήφθηκαν για 28 κύκλους.

Η ανάλυση των προϊόντων της αντίδρασης έγινε με ηλεκτροφόρηση σε 10% πηκτή πολυακρυλαμιδίου, και χρώση αργύρου (Sambrook et al., 1989).

1.6 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΑΣΤΑΘΕΙΑΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ

Η Αστάθεια των μικροδορυφορικών αλληλουχιών, ανιχνεύθηκε συγκρίνοντας το ηλεκτροφορητικό μοντέλο των δεικτών του Μικροδορυφορικού DNA που ενισχύθηκε, στα δυο διαφορετικά δείγματα DNA που χρησιμοποιήθηκαν από τον κάθε ασθενή, και τα οποία αντιστοιχούσαν στο DNA από το περιφερικό αίμα και στο DNA από το κυτταρολογικό δείγμα (πτύελα).

Αστάθεια του Μικροδορυφορικού DNA χαρακτηρίστηκε κάθε διαφορά στην κινητικότητα των μικροδορυφορικών αλληλομόρφων, πάνω στην πηκτή του πολυακρυλαμιδίου κατά την ηλεκτροφόρηση, όπως ακόμα και η δημιουργία νέων αλληλομόρφων (novel alleles).

Το DNA που εκχυλίσθηκε από το περιφερικό αίμα θεωρήθηκε το φυσιολογικό πρότυπο για το γονιδιακό DNA, ενώ το DNA που προήλθε από τα πτύελα, ελέγχθηκε για την έκφραση του φαινομένου της αστάθειας των μικροδορυφορικών αλληλουχιών.

Η διαφορά στην κινητικότητα, των αλληλομόρφων του DNA, που προήλθε από τα κυτταρολογικά δείγματα (πτύελα), συγκριτικά με τα αλληλόμορφα από το περιφερικό αίμα, αποδόθηκε, είτε στην προσθήκη (addition), είτε στην παράλειψη κατά την αντιγραφή του DNA (replication slippage), μιας ή περισσοτέρων επαναλαμβανόμενων μικροδορυφορικών αλληλουχιών (**ΕΙΚΟΝΑ 1.1**).

Η ανάλυση των θετικών περιπτώσεων της αστάθειας του μικροδορυφορικού DNA, επαναλήφθηκε τουλάχιστον δύο φορές για τον έλεγχο της αναπαραγωγικότητας των αποτελεσμάτων.

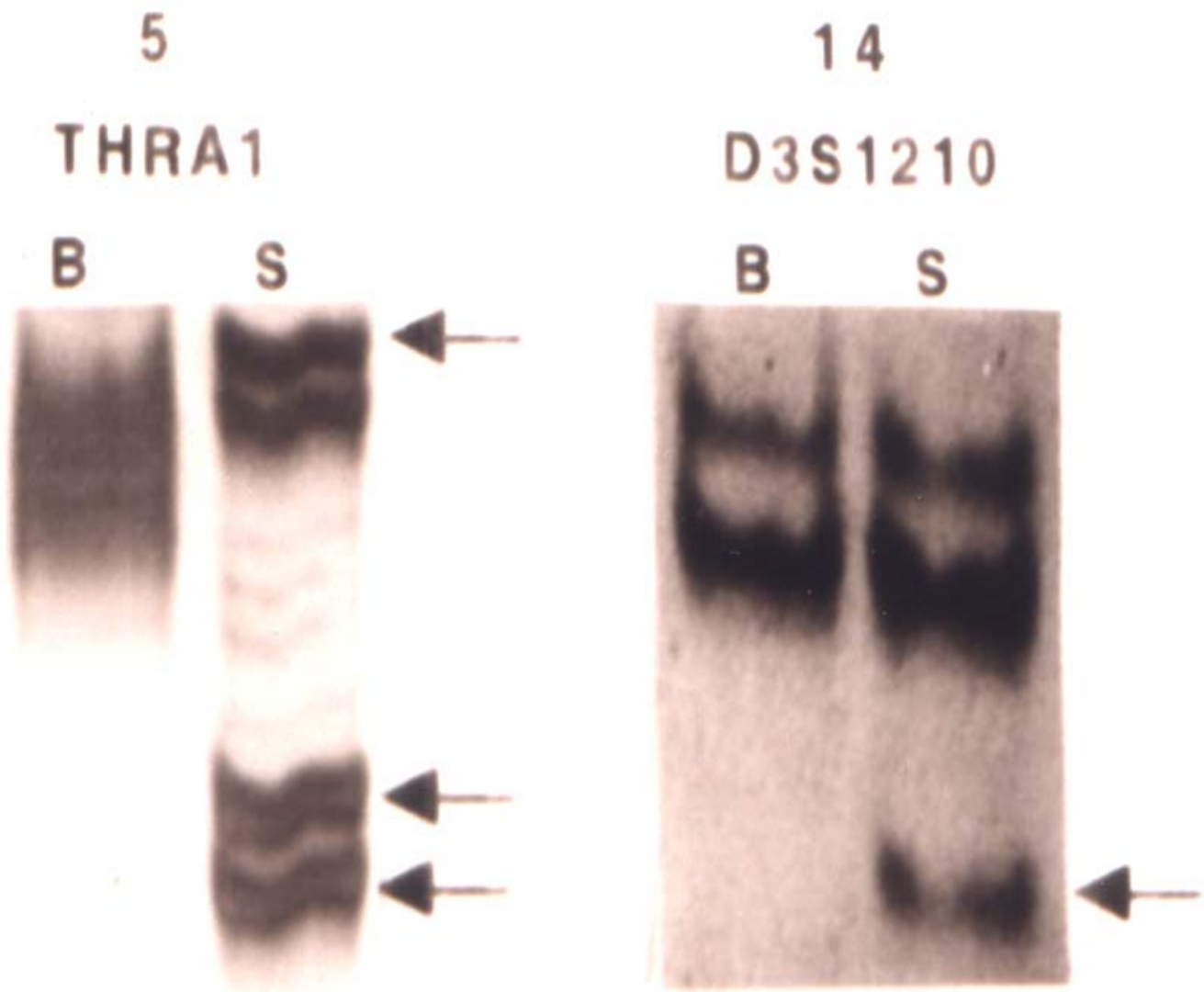
1.7 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Οι αριθμητικές τιμές των παραμέτρων της αναπνευστικής λειτουργίας αναλύθηκαν με την δοκιμασία κατά STUDENT (T-Test) καθώς και κατά MANN-WHITNEY.

Οι συσχετίσεις με την διάρκεια και την βαρύτητα της νόσου έγιναν με μοντέλα πολλαπλής γραμμικής, ή λογαριθμικής αλληλοσυσχέτισης. Τέλος οι πίνακες των ποιοτικών παρατηρήσεων, αναλύθηκαν με τον αλγόριθμο Excel (Microsoft). Οι τιμές με συντελεστή P (p value) μικρότερο του 0.05 θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

ΕΙΚΟΝΑ 1.1:

Χαρακτηριστικά παραδείγματα δειγμάτων που εμφάνισαν Αστάθεια στο Μικροδορυφορικού DNA. Το **(B)** αντιστοιχεί στο δείγμα, από το περιφερικό αίμα, ενώ το **(S)** αντιστοιχεί στο δείγμα που προήλθε από το κυτταρολογικό υλικό (πτύελα). Το βέλος υποδεικνύει την θέση που εκδηλώθηκε το φαινόμενο της Αστάθειας. Επίσης σημειώνεται ο Μικροδορυφορικός δείκτης που χρησιμοποιήθηκε, όπως και ο αύξων αριθμός του ασθενούς.



1.8 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Από τα τριάντα ένα (31) κυτταρολογικά δείγματα των ασθενών με Χ.Α.Π., που μελετήθηκαν, σε επτά (7) περιπτώσεις (23%), ανιχνεύθηκε **Αστάθεια του Μικροδορυφορικού DNA (ΕΙΚΟΝΑ 1.1)**.

Στις πέντε (5), από τις επτά (7) θετικές περιπτώσεις, Αστάθεια ανιχνεύθηκε μόνο σε ένα μικροδορυφορικό δείκτη, ενώ στις υπόλοιπες δύο (2) θετικές περιπτώσεις η αστάθεια αφορούσε δύο μικροδορυφορικούς δείκτες (**ΠΙΝΑΚΑΣ 1.3**).

Για να διαπιστωθεί αν η εμφάνιση του φαινομένου της Αστάθειας του Μικροδορυφορικού DNA, αποτελεί και δείκτη βαρύτητας της νόσου, συγκρίθηκαν οι δύο υποομάδες των ασθενών με Χ.Α.Π., δηλαδή συγκρίθηκε η υποομάδα των ασθενών με Χ.Α.Π., που εμφάνισε Αστάθεια στα κυτταρολογικά δείγματα, με την υποομάδα των ασθενών που δεν εμφάνισαν το φαινόμενο στα δείγματα τους.

Συγκρίθηκαν οι μέσες τιμές:

- της ηλικίας
- της διάρκειας της νόσου
- της καπνιστικής συνήθειας
- της επιβίωσης
- των μερικών πιέσεων των αερίων του αρτηριακού αίματος
- τα σπυρομετρικά ευρήματα (**ΠΙΝΑΚΑΣ 1.4**).

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.3

Αριθμός ασθενούς	D3S1234	THRA1	D6S344	D17S250	HRM	D3S1210
1	-	-	-	-	+	-
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	+
4	-	-	-	-	-	-
5	-	+	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-
8	-	+	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	+	-	+
16	-	-	-	-	+	-
17	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-
28	-	+	+	-	-	-
29	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-
31	-	-	-	-	-	-

Με (+) σημειώνονται οι ασθενείς που εκδήλωσαν Αστάθεια στο Μικροδορυφορικό DNA, στον αντίστοιχο δείκτη.

Με (-) σημειώνονται οι ασθενείς που δεν εκδήλωσαν το φαινόμενο.

ΑΣΤΑΘΕΙΑ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΟΥ DNA ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑ.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.4:

Σύγκριση κλινικών και εργαστηριακών παραμέτρων ανάμεσα στους ασθενείς με Χ.Α.Π. που εμφάνισαν Αστάθεια του Μικροδορυφορικού DNA, στα κυτταρολογικά τους δείγματα (**ΜΙ ΘΕΤΙΚΟΙ**), και σε αυτούς που δεν εμφάνισαν το φαινόμενο (**ΜΙ ΑΡΝΗΤΙΚΟΙ**).

	ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ Χ.Α.Π.		
	ΜΙ ΘΕΤΙΚΟΙ	ΜΙ ΑΡΝΗΤΙΚΟΙ	p value*
Αριθμός ασθενών	7	24	-
Ηλικία (έτη)	68.5 ± 9.1	69.8 ± 9.3	0.90
Διάρκεια νόσου (έτη)	8.5 ± 5.1	7.4 ± 4.2	0.92
Κάπνισμα (πακέτα επί έτη)	64 ± 26	54 ± 34	0.81
FEV ₁ (% προβλεπόμενης)	32.7 ± 6.8	36.7 ± 15.4	0.87
FVC (% προβλεπόμενης)	46.5 ± 10.8	48.7 ± 13.6	0.90
FEV ₁ /FVC (%)	52 ± 12.5	55.4 ± 10.3	0.90
PaO ₂ (mm Hg)	59.4 ± 7.3	68.7 ± 8.2	0.93
PaCO ₂ (mm Hg)	48.6 ± 14.1	49.2 ± 10.4	0.95
pH	7.38 ± 0.03	7.37 ± 0.04	0.93
HCO ₃ ⁻ (mEq/L)	28.7 ± 3.4	28.56 ± 3.7	0.95

*=Τιμές μη στατιστικά σημαντικές

MI=Microsatellite Instability (Αστάθεια του Μικροδορυφορικού DNA).

FEV₁=Forced Expiration Volume in one second (Δυναμικός Εκπνευστικός Όγκος στο πρώτο δευτερόλεπτο),

FVC=Forced Vital Capacity (Δυναμική Ζωτική Χωρητικότητα),

PaO₂=Arterial partial pressure of Oxygen (Μερική πίεση του Οξυγόνου στο αρτηριακό αίμα),

PaCO₂=Arterial partial pressure of Carbon Dioxide (Μερική πίεση του Διοξειδίου του Άνθρακα στο αρτηριακό αίμα)

Όμως, από την σύγκριση των παραπάνω παραμέτρων, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο υποομάδες των ασθενών με Χ.Α.Π., δηλαδή ανάμεσα στην υποομάδα που εμφάνισε Αστάθεια του Μικροδορυφορικού DNA στα δείγματα της και στην υποομάδα που δεν εμφάνισε το φαινόμενο.

Έτσι, από τα παραπάνω προκύπτει ότι το φαινόμενο της Αστάθειας των Μικροδορυφορικών Αλληλουχιών του DNA δεν φαίνεται να σχετίζεται με την βαρύτητα της νόσου.

1.9 ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΠΡΩΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

Από την παρούσα μελέτη (**ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΠΡΩΤΟ**) αποδείχτηκε ότι, το φαινόμενο της Αστάθειας του Μικροδορυφορικού DNA, αποτελεί ανιχνεύσιμη γενετική αλλοίωση σε κυτταρολογικά δείγματα ασθενών με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια αφού ανιχνεύθηκε σε ποσοστό **23%** χρησιμοποιώντας μόνο έξι δείκτες για το μικροδορυφορικό DNA, για τέσσερα μόνο διαφορετικά χρωμοσώματα.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα, φαίνεται ότι η συχνότητα του φαινομένου της Αστάθειας των Μικροδορυφορικών αλληλουχιών του DNA στους ασθενείς με Χ.Α.Π, πιθανότατα να έχει υποεκτιμηθεί, αφού στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν μόνο έξι δείκτες για το μικροδορυφορικό DNA ενώ στην βιβλιογραφία υπάρχουν πλήθος αναφορών, για πάρα πολλούς ακόμα δείκτες που συσχετίζουν το φαινόμενο της αστάθειας των μικροδορυφορικών αλληλουχιών με κακοήθειες του πνεύμονα. Έτσι δεν μπορεί να αποκλεισθεί η πιθανότητα ότι οι ασθενείς με Χ.Α.Π. που δεν εμφάνισαν το φαινόμενο της Αστάθειας στους συγκεκριμένους δείκτες, που χρησιμοποιήθηκαν, δεν θα μπορούσαν και να μην αναδείξουν Αστάθεια σε άλλους δείκτες, εκτός από τους έξι της παρούσας μελέτης.

Όμως παρά τους παραπάνω περιορισμούς, η παρούσα μελέτη έδειξε ότι **το φαινόμενο της Αστάθειας** ανιχνεύθηκε σε ποσοστό **23% των κυτταρολογικών δειγμάτων των ασθενών με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια** που μελετήθηκαν, υποδεικνύοντας ότι η συγκεκριμένη «αλλοίωση» των μικροδορυφορικών αλληλουχιών μπορεί εύκολα να ανιχνευθεί κατά την διάρκεια της εξέλιξης της νόσου.

Για να διαπιστωθεί αν η εμφάνιση του φαινομένου της Αστάθειας του Μικροδορυφορικού DNA στους ασθενείς με Χ.Α.Π, σχετίζεται με την βαρύτητα της νόσου, συγκρίθηκαν κλινικοί και εργαστηριακοί παράμετροι των δύο υποομάδων, δηλαδή των ασθενών που εμφάνισαν αστάθεια στα κυτταρολογικά τους δείγματα και των ασθενών που εμφανίσθηκαν αρνητικοί για το φαινόμενο.

Όμως, από την παραπάνω σύγκριση δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις μέσες τιμές της ηλικίας, της διάρκειας της νόσου, της καπνιστικής συνήθειας, των μερικών πιέσεων των αερίων του αρτηριακού αίματος και των

σπιρομετρικών ευρημάτων στις δύο υποομάδες των ασθενών με Χ.Α.Π. Έτσι, από τα παραπάνω προκύπτει ότι το φαινόμενο της Αστάθειας των Μικροδορυφορικών Αλληλουχιών του DNA στην Χ.Α.Π. **δεν φαίνεται να σχετίζεται με την βαρύτητα της νόσου.**

Η Αστάθεια του Μικροδορυφορικού DNA, αρχικά παρατηρηρήθηκε στον Καρκίνο του παχέως εντέρου, όπου θεωρήθηκε ότι λάθη κατά την αντιγραφή του DNA, τα οποία δεν «επιδιορθώθηκαν», οδήγησαν στον κακοήθη μετασχηματισμό των κυττάρων. Συγχρόνως πολλές άλλες μελέτες επιβεβαίωσαν ότι η Αστάθεια του Μικροδορυφορικού DNA αποτελεί κοινό εύρημα στους περισσότερους καρκίνους, όπως στον καρκίνο του Πνεύμονος, του Ενδομητρίου, των Ωοθηκών, του Προστάτη, της Κεφαλής και Τραχήλου, της Ουροδόχου Κύστης (Aaltonen et al., 1993; Field et al., 1995; Froudarakis et al., 1998; Mao et al., 1996; Mao et al., 1996; Thiboteau et al., 1994).

Το φαινόμενο της Αστάθειας του Μικροδορυφορικού DNA αντικατοπτρίζει άμεσα τις διαταραχές του μηχανισμού αποκατάστασης των λαθών κατά την αντιγραφή του DNA και έχει συνδεθεί με υψηλό δείκτη μεταλλάξεων. Η ανίχνευση του φαινομένου στους ασθενείς με Χ.Α.Π. υποδεικνύει ότι πιθανά η νόσος εκδηλώνεται διαμέσου κάποιων μεταλλάξεων οι οποίες κατά συνέπεια μπορεί να ευθύνονται για ενεργοποίηση ή καταστολή άλλων γονιδίων που σχετίζονται με την παθογένεση της νόσου. Όμως οι πιθανοί στόχοι αυτών των μεταλλάξεων μας είναι ακόμα άγνωστοι, αφού ελάχιστα πράγματα γνωρίζουμε για την μοριακή βιολογία της Χ.Α.Π.

Σημαντικό επίσης είναι, ότι η ανίχνευση της Αστάθειας των μικροδορυφορικών αλληλουχιών του DNA, πραγματοποιήθηκε **σε κυτταρολογικά δείγματα**, γεγονός που υποδηλώνει την δυνατότητα εφαρμογής της μεθόδου, με ευκολία στην κλινική πράξη.

Επιπλέον κλινική εφαρμογή θα μπορούσε να αποτελέσει στη περίπτωση των ασθενών **με καρκίνο του Πνεύμονα**, αφού η συγκεκριμένη νόσος χαρακτηρίζεται από υψηλή συχνότητα εμφάνισης του φαινομένου της Αστάθειας του Μικροδορυφορικού DNA (Mao et al., 1994) και διαταραχών στα ογκογονίδια και στα ογκοκατασταλτικά γονίδια (Anderson and Spandidos, 1993).

Θεωρήθηκε λοιπόν ότι, το φαινόμενο της Αστάθειας του Μικροδορυφορικού DNA στην Χ.Α.Π.θα μπορούσε να μεταφραστεί:

-είτε σαν δείκτης δυνητικής κακοήθειας,

-είτε σαν δείκτης γενετικής αλλοίωσης που μπορεί να εμπλέκεται στην παθογένεια της Χρόνιας Αποφρακτικής Πνευμονοπάθειας.

Όμως νέες μελέτες απαιτούνται για να αποσαφηνισθεί η ακριβής σημασία των παραπάνω αποτελεσμάτων και ο ρόλος τους στην κλινική πράξη.

Επιπλέον επειδή το διάστημα παρακολούθησης των ασθενών ήταν ελάχιστο, δεν ήταν δυνατόν με την παρούσα μελέτη να εκτιμηθεί η εξέλιξη της πορείας των ασθενών των δύο ομάδων και επιπλέον δεν έγινε σύγκριση με καπνιστές, χωρίς κλινικά ή σπυρομετρικά ευρήματα Χ.Α.Π.

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΣΤΑΘΕΙΑΣ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΟΥ DNA ΣΕ
ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑ
ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΑ ΜΕ ΚΑΠΝΙΣΤΕΣ, ΧΩΡΙΣ ΚΛΙΝΙΚΑ Η ΣΠΙΡΟΜΕΤΡΙΚΑ
ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΧΑΠ.

2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΣΤΟΧΟΣ

Στην προηγούμενη μας μελέτη (**ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΠΡΩΤΟ**) αποδείχτηκε ότι, το φαινόμενο της Αστάθειας του Μικροδορυφορικού DNA, αποτελεί ανιχνεύσιμη γενετική αλλοίωση σε κυτταρολογικά δείγματα ασθενών με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (Siafakas et al., 1996; Spandidos et al., 1996; Tzortzaki et al., 1996).

Θεωρήθηκε ότι, το φαινόμενο της Αστάθειας μπορεί να μεταφραστεί:

-είτε σαν δείκτης δυνητικής κακοήθειας,
-είτε σαν δείκτης γενετικής αλλοίωσης που εμπλέκεται στην παθογένεια της Χρόνιας Αποφρακτικής Πνευμονοπάθειας.

Όμως ο σχεδιασμός της προηγούμενης μελέτης δεν μας επέτρεψε να απαντήσουμε και να καταλήξουμε σε συμπεράσματα, αφού η παρακολούθηση των ασθενών δεν έγινε για μακρό χρονικό διάστημα και επιπλέον δεν έγινε σύγκριση με καπνιστές, χωρίς κλινικά ή σπιρομετρικά ευρήματα Χ.Α.Π.

Έτσι, το παρόν πρωτόκολλο (**ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΔΕΥΤΕΡΟ**) σχεδιάστηκε για να μελετηθεί η πιθανότητα ανίχνευσης του φαινομένου της Αστάθειας των Μικροδορυφορικών Αλληλουχιών του DNA, σε:

-σε καπνιστές με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (COPD-smokers: **Καπνιστές με Χ.Α.Π.**), και
-σε καπνιστές που δεν εμφανίζουν κλινικά ή σπιρομετρικά ευρήματα της νόσου (non-COPD smokers: **Καπνιστές χωρίς Χ.Α.Π.**).

Η **Υπόθεση** που τέθηκε, ήταν ότι αν το φαινόμενο της Αστάθειας, αποτελεί **δείκτη δυνητικής κακοήθειας**, τότε θα πρέπει να ανιχνεύεται και στους καπνιστές με Χ.Α.Π., αλλά και στους καπνιστές χωρίς εκδήλωση της νόσου.

Από την άλλη πλευρά, αν το φαινόμενο της Αστάθειας αποτελεί **γενετική ανωμαλία που οδηγεί στην ανάπτυξη της Χ.Α.Π.**, τότε θα πρέπει να ανιχνεύεται, κατά κύριο λόγο στους ασθενείς με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια, εξηγώντας κατά ένα μέρος την πολύπλοκη γενετική βάση της νόσου.

2.2 ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΑΤΟΜΩΝ

Μελετήθηκαν δύο ομάδες καπνιστών.

Η πρώτη ομάδα, αποτελούνταν από **59** ασθενείς με σοβαρού βαθμού **Χ.Α.Π.** και ιστορικό καπνίσματος 54 ± 33 ($x \pm SD$) pack years (πακέτα επί έτη), κατά μέσο όρο.

Κατά την περίοδο της μελέτης οι ασθενείς έπρεπε να βρίσκονταν σε φάση ηρεμίας. Η διάγνωση της Χ.Α.Π. όπως και το στάδιο βαρύτητας της νόσου καθορίστηκαν σύμφωνα με τις διεθνείς θέσεις ομοφωνίας της European Respiratory Society (Siafakas et al., 1995).

Συνοπτικά εκτός από το ιστορικό καπνίσματος, οι ασθενείς είχαν:

- κλινικό ιστορικό βήχα και απόχρεμψης,
- δύσπνοια στην κόπωση, ή και στην ηρεμία
- μη αναστρέψιμη απόφραξη των αεραγωγών στον σπιρομετρικό έλεγχο, ακόμα και μετά την χορήγηση βρογχοδιαστολής (β2 διεγέρτη)
- αρνητικό ιστορικό άσθματος και ατοπίας.

Επίσης έπρεπε να είναι κλινικά σταθεροί για τουλάχιστον ένα μήνα πριν την λήψη των δειγμάτων (περιφερικό αίμα και πτύελα).

Τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά, το ιστορικό καπνίσματος, οι μέσες σπιρομετρικές τιμές και οι μερικές πιέσεις των αρτηριακών αερίων αίματος των ασθενών με Χ.Α.Π., απεικονίζονται στον **(ΠΙΝΑΚΑ 2.1)**.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.1.

Μέσες τιμές, κλινικών και εργαστηριακών παραμέτρων των ασθενών με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (**COPD-smokers**)

	ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ Χ.Α.Π. (COPD-smokers)
<i>Αριθμός ασθενών</i>	59
<i>Ανδρες/Γυναίκες</i>	54/5
<i>Ηλικία (έτη)</i>	63.1 ± 15.7
<i>Κάπνισμα (πακέτα επί έτη)</i>	54 ± 33
<i>Διάρκεια νόσου (έτη)</i>	7.5 ± 4.2
FEV ₁ (% προβλ.)	33.9 ± 10.4
FVC (% προβλ.)	48.5 ± 10.7
FEV ₁ /FVC (%)	54.6 ± 10.3
PaO ₂ (mmHg)	60.5 ± 7.9
PaCO ₂ (mmHg)	49.4 ± 10.4
pH	7.37 ± 0.05
HCO ₃ ⁻ (mEq/L)	28.4 ± 3.4

PaO₂=Arterial partial pressure of Oxygen (Μερική πίεση του Οξυγόνου στο αρτηριακό αίμα),

PaCO₂=Arterial partial pressure of Carbon Dioxide (Μερική πίεση του Διοξειδίου του Άνθρακα στο αρτηριακό αίμα)

FEV₁ =Forced Expiration Volume in one second (Δυναμικός Εκπνευστικός Όγκος στο πρώτο δευτερόλεπτο),

FVC=Forced Vital Capacity (Δυναμική Ζωτική Χωρητικότητα),

Η δεύτερη ομάδα, αποτελούνταν από **60 καπνιστές** χωρίς ευρήματα Χ.Α.Π., κατά τον κλινικό και εργαστηριακό έλεγχο (non-COPD smokers).

Ο μέσος όρος της ηλικίας, του φύλλου και του ιστορικού καπνίσματος της δεύτερης ομάδας απεικονίζονται στον **ΠΙΝΑΚΑΣ 2.2**.

Αναλυτικότερα, για τα άτομα της δεύτερης ομάδας, θεωρήθηκαν απαραίτητες οι παρακάτω προϋποθέσεις:

- φυσική εξέταση φυσιολογική
- ακτινογραφία θώρακος φυσιολογική
- λειτουργικός έλεγχος της αναπνοής εντός των φυσιολογικών ορίων.

Ο μέσος όρος του ιστορικού καπνίσματος ήταν 48 ± 25 πακέτα επί έτη (pack/years). Τα άτομα αυτής της ομάδας προήλθαν από ένα μεγαλύτερο σύνολο εργαζομένων που συμμετείχαν σε ετήσιο check-up.

Επίσης κρίθηκε απαραίτητο για την αξιοπιστία της σύγκρισης των δεδομένων ανάμεσα στις δύο ομάδες, οι μέσες τιμές της ηλικίας των ατόμων, όπως και ο μέσος όρος του καπνίσματος (πακέτα επί έτη) να μην παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (**ΠΙΝΑΚΑΣ 2.3**).

Όλα τα άτομα και από τις δύο ομάδες ήταν υπό παρακολούθηση για τουλάχιστον 24 μήνες, όσον αφορά:

- την επιβίωση, και
- την ανάπτυξη κλινικά ανιχνεύσιμου καρκίνου του πνεύμονος.

Η παρακολούθηση πραγματοποιήθηκε με ετήσια κλινική και φυσική εξέταση, ακτινογραφία θώρακος (F/P), όπως και επανειλημμένες κυτταρολογικές εξετάσεις πτυέλων.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.2.

Μέσες τιμές, κλινικών και εργαστηριακών παραμέτρων των καπνιστών, χωρίς κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα Χρόνιας Αποφρακτικής Πνευμονοπάθειας (**non-COPD smokers**).

	ΚΑΠΝΙΣΤΕΣ ΧΩΡΙΣ Χ.Α.Π. (non-COPD smokers)
<i>Αριθμός ατόμων</i>	60
<i>Ανδρες/Γυναίκες</i>	51/9
<i>Ηλικία (έτη)</i>	58.6± 15.6
Κάπνισμα (πακέτα επί έτη)	48 ± 25
FEV ₁ (% προβλ.)	84.8 ± 2.5
FVC (% προβλ.)	88.2 ± 9.5
FEV ₁ /FVC (%)	82.3 ± 7.5

FEV₁=Forced Expiration Volume in one second (Δυναμικός Εκπνευστικός Όγκος στο πρώτο δευτερόλεπτο),

FVC=Forced Vital Capacity (Δυναμική Ζωτική Χωρητικότητα),

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.3.

Συγκριτικός πίνακας των μέσων τιμών των κλινικών και εργαστηριακών παραμέτρων των ασθενών με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (**COPD-smokers**) και των καπνιστών, χωρίς σπιρομετρικά ή κλινικά ευρήματα Χ.Α.Π. (**non-COPD smokers**).

	ΚΑΠΝΙΣΤΕΣ ΧΩΡΙΣ Χ.Α.Π. (Non-COPD smokers)	ΚΑΠΝΙΣΤΕΣ ΜΕ Χ.Α.Π. (COPD-smokers)	p value
Αριθμός ασθενών	60	59	
Άνδρες/Γυναίκες	51/9	54/5	
Ηλικία (έτη)	58.6 ± 15.6	63.1 ± 15.7	NS
Κάπνισμα (πακέτα επί έτη)	48 ± 25	54 ± 33	NS
Διάρκεια νόσου (έτη)	—	7.5 ± 4.2	
Επιβίωση (%) (24 μήνες)	100	77.9 ± 1.5	0.08
FEV1 (% προβλ.)	84.8 ± 2.5	33.9 ± 10.4	<0.001
FVC (% προβλ.)	88.2 ± 9.5	48.5 ± 10.7	<0.001
FEV1/FVC (%)	82.3 ± 7.5	54.6 ± 10.32	<0.001
PaO ₂ (mmHg)	—	60.5 ± 7.9	
PaCO ₂ (mmHg)	—	49.4 ± 10.4	
pH	—	7.37 ± 0.05	
HCO ₃ ⁻ (mEq/L)	—	28.4 ± 3.4	

NS=Not significant (στατιστικά μη σημαντικό).

FEV₁=Forced Expiration Volume in one second (Δυναμικός Εκπνευστικός Όγκος στο πρώτο δευτερόλεπτο),

FVC=Forced Vital Capacity (Δυναμική Ζωτική Χωρητικότητα),

PaO₂=Arterial partial pressure of Oxygen (Μερική πίεση του Οξυγόνου στο αρτηριακό αίμα),

PaCO₂=Arterial partial pressure of Carbon Dioxide (Μερική πίεση του Διοξειδίου του Άνθρακα στο αρτηριακό αίμα)

2.3 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΤΟΥ DNA

Η εκχύλιση του DNA από τα λευκά αιμοσφαίρια του περιφερικού αίματος, όπως και από τα κυτταρολογικά δείγματα (κύτταρα από πτύελα), πραγματοποιήθηκε με το IsoQuick Nucleic Acid Extraction kit (ORCA Research Inc;Bothell, WA, 98021 USA) ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΔΟΡΥΦΟΡΙΚΟΥ DNA

Ανιχνεύθηκε η ύπαρξη του φαινομένου της Αστάθειας των Μικροδορυφορικών αλληλουχιών, σε γενομικό DNA, που εκχυλίστηκε από δύο διαφορετικά δείγματα κάθε ατόμου:

- περιφερικό αίμα (λευκά αιμοσφαίρια)
- πτύελα (κυτταρολογικό υλικό)

Τα αποτελέσματα προέκυψαν συγκρίνοντας το ηλεκτροφορητικό μοντέλο των δεικτών του Μικροδορυφορικού DNA, που ενισχύθηκαν, στα δύο δείγματα DNA κάθε ατόμου και τα οποία αντιστοιχούσαν στο κυτταρολογικό δείγμα (πτύελα) και στο περιφερικό αίμα (λευκά αιμοσφαίρια).

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε μία φορά για τους «μη-Χ.Α.Π. καπνιστές» και δύο φορές για τους «Χ.Α.Π.-καπνιστές», στην αρχή, και 24 μήνες αργότερα.

Επτά Δείκτες για το Μικροδορυφορικό DNA χρησιμοποιήθηκαν, για έξι διαφορετικά χρωμοσώματα, συγκεκριμένα οι: THRA1, ANK1, HRM, D6S344, D3S1210, D17S250 και D13S71 (**ΠΙΝΑΚΑΣ 2.4**).

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.4:

Οι Δείκτες του Μικροδορυφορικού DNA που χρησιμοποιήθηκαν και η αντιστοιχία τους κατά χρωμόσωμα.

Δείκτης (Microsatellite marker)	Χρωμόσωμα
ANK1	8
D3S1210	3
D6S344	6
D13S71	13
D17S250	17
HRM	11
THRA1	17

2.5 ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΟΥ DNA

Στην προηγούμενη μας μελέτη (**ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΠΡΩΤΟ**), ανιχνεύθηκε το φαινόμενο της Αστάθειας στο Μικροδορυφορικό DNA σε ποσοστό 23%, σε ασθενείς με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια.

Έξι (6) Μικροδορυφορικοί δείκτες, για τέσσερα (4) διαφορετικά χρωμοσώματα, χρησιμοποιήθηκαν. Συγκεκριμένα:

-για το χρωμόσωμα (3) χρησιμοποιήθηκαν οι D3S1234 και D3S1210

-για το χρωμόσωμα (6) χρησιμοποιήθηκε ο D6S344

-για το χρωμόσωμα (11) χρησιμοποιήθηκε ο HRM, και

-για το χρωμόσωμα (17) χρησιμοποιήθηκαν οι THRA1 και D17S250 (**ΠΙΝΑΚΑΣ 1.2, ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΠΡΩΤΟ**).

Σε αυτήν την μελέτη χρησιμοποιήθηκαν εκτός από τους παραπάνω μικροδορυφορικούς δείκτες, επιπλέον και:

-ο **ANK1** για το χρωμόσωμα (**8**), και

-ο **D13S71** για το χρωμόσωμα (**13**).

Όπως και για τους παραπάνω δείκτες, η επιλογή έγινε σύμφωνα, με ήδη γνωστές βιβλιογραφικές αναφορές που συνδέουν, τα συγκεκριμένα χρωμοσώματα με το φαινόμενο της γενετικής Αστάθειας των μικροδορυφορικών αλληλουχιών και τον καρκίνο του πνεύμονος (Polymeropoulos et al., 1991; Shridhar et al., 1994; Tamura et al., 1997; Wistuba et al., 1999).

2.6 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΜΕ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ

Η τεχνική της PCR (Polymerase Chain Reaction: Αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση), εφαρμόστηκε σε 50μl αντιδρώντος όγκου, ο οποίος περιείχε:

- 200ng γονιδιακού DNA
- 1μM από κάθε ολιγονουκλεοτίδιο-εκκινητή, (ένας εκκινητής για ευθεία και ένας, για ανάστροφη υβριδοποίηση, στις αλληλουχίες κάθε μικροδορυφορικού δείκτη, forward and reverse primers)
- 250μM dNTPs
- 5μl 10Xbuffer:
- 670mM Tris-HCL (pH:8.5),
- 166mM Θειικό Αμμώνιο,
- 67mM Χλωριούχο Μαγνήσιο,
- 1,7mg/ml λευκωματίνη βοείου ορού,
- 100mM β-Μερκαπτοαιθανόλη και
- 1% (w/v) Triton-X-100}
- 1 (U) μονάδα Taq-DNA Πολυμεράση.

Η **θερμική αποδιάταξη** (denaturation) της δίκλωνης έλικας του DNA πραγματοποιήθηκε στους 95 βαθμούς Κελσίου και για 5 λεπτά. Ο **υβριδισμός** (annealing) των εκκινητών πραγματοποιήθηκε στους 57 βαθμούς Κελσίου και η **σύνθεση** (DNA synthesis) της θυγατρικής αλυσίδας στους 72 βαθμούς Κελσίου.

Τα τρία στάδια (θερμική αποδιάταξη, υβριδισμός, σύνθεση DNA) επαναλήφθηκαν για 35 διαδοχικούς κύκλους, για την ενίσχυση των προϊόντων της αντίδρασης.

Η ανάλυση των προϊόντων της αντίδρασης (7μl από κάθε δείγμα) έγινε με ηλεκτροφόρηση σε 2% πηκτή αγαρόζης, χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (Sambrook et al., 1989).

2.7 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Οι αριθμητικές τιμές των παραμέτρων της αναπνευστικής λειτουργίας αναλύθηκαν με την δοκιμασία κατά STUDENT (T-Test) καθώς και κατά MANN-WHITNEY.

Οι συσχετίσεις με την διάρκεια και την βαρύτητα της νόσου έγιναν με μοντέλα πολλαπλής γραμμικής, ή λογαριθμικής αλληλοσυσχέτισης.

Τέλος οι πίνακες των ποιοτικών παρατηρήσεων, αναλύθηκαν με τον αλγόριθμο Excel (Microsoft). Οι τιμές με συντελεστή P (p value) μικρότερο του 0.05 θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

2.8 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ομάδα Α: Καπνιστές με Χ.Α.Π.

Το ηλεκτροφορητικό μοντέλο του DNA, από τα κύτταρα των πτυέλων των ασθενών με Χ.Α.Π., συγκρίθηκε με το ηλεκτροφορητικό μοντέλο του DNA των κυττάρων του περιφερικού αίματος (λευκά αιμοσφαίρια), χρησιμοποιώντας επτά διαφορετικούς πολυμορφικούς δείκτες του Μικροδορυφορικού DNA.

Κάθε διαφορά στην κινητικότητα των μικροδορυφορικών αλληλομόρφων αποδόθηκε στο φαινόμενο της Αστάθειας του Μικροδορυφορικού DNA (MI).

Τα αποτελέσματα της μελέτης, έδειξαν ότι **14** ασθενείς με Χ.Α.Π., από τους 59 συνολικά που συμμετείχαν, δηλαδή σε ποσοστό **24%**, εμφάνισαν **Αστάθεια των Μικροδορυφορικών αλληλουχιών του DNA** στα κυτταρολογικά τους δείγματα (πτύελα).

Οι **ΕΙΚΟΝΕΣ 2.1, 2.2, 2.3**, απεικονίζουν χαρακτηριστικά παραδείγματα δειγμάτων που εμφάνισαν Αστάθεια στο Μικροδορυφορικό DNA, σε διαφορετικά χρωμοσώματα, χρησιμοποιώντας διαφορετικό μικροδορυφορικό δείκτη.

ΕΙΚΟΝΑ 2.1:

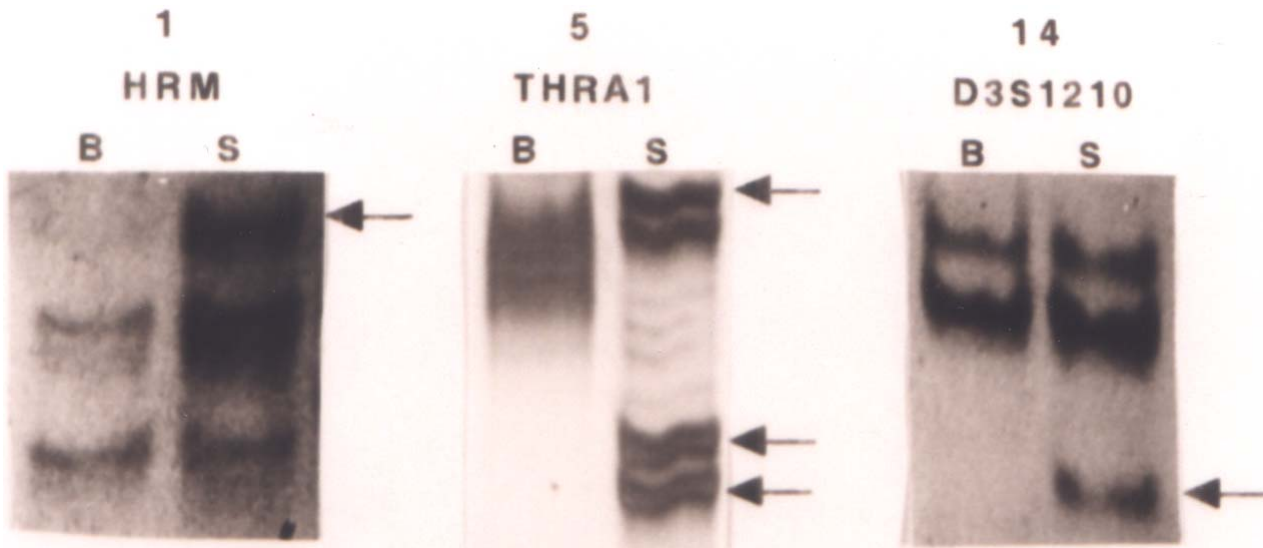
Χαρακτηριστικές εικόνες από δείγματα **καπνιστών με Χ.Α.Π**, που εμφάνισαν Αστάθεια του Μικροδορυφορικού DNA στους Δείκτες:

-HRM

-THRA1

-D3S1210

Το **(B)** αντιστοιχεί στο δείγμα, από το περιφερικό αίμα, ενώ το **(S)** αντιστοιχεί στο δείγμα που προήλθε από το κυτταρολογικό υλικό (πτύελα). Το βέλος υποδεικνύει την θέση που εκδηλώθηκε το φαινόμενο της Αστάθειας. Επίσης σημειώνεται ο αύξων αριθμός του ασθενούς.



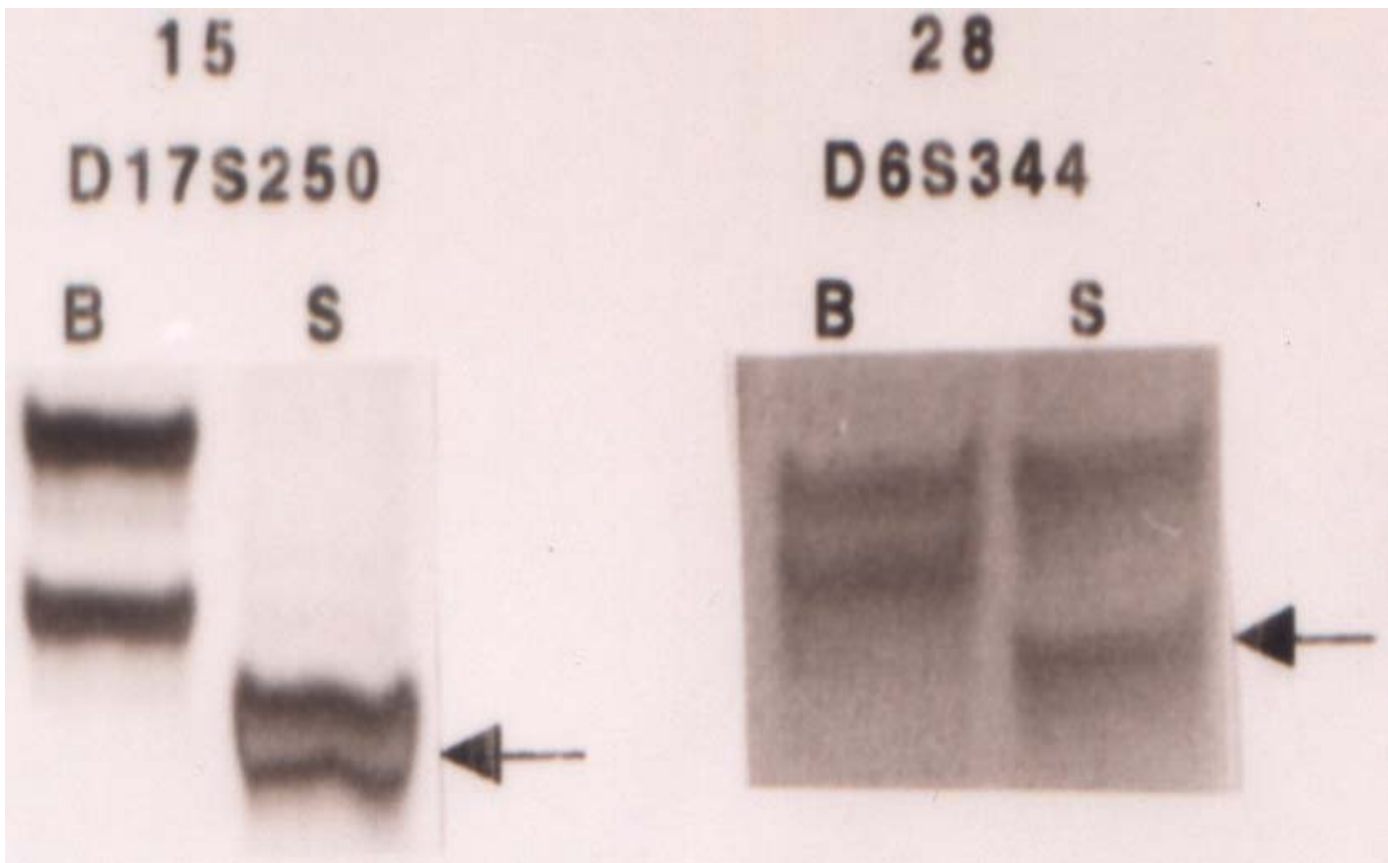
ΕΙΚΟΝΑ 2.2:

Χαρακτηριστικές εικόνες από δείγματα **καπνιστών με Χ.Α.Π.** που εμφάνισαν Αστάθεια του Μικροδορυφορικού DNA στους Δείκτες:

-D17S250

-D6S344

Το **(B)** αντιστοιχεί στο δείγμα, από το περιφερικό αίμα, ενώ το **(S)** αντιστοιχεί στο δείγμα που προήλθε από το κυτταρολογικό υλικό (πτύελα). Το βέλος υποδεικνύει την θέση που εκδηλώθηκε το φαινόμενο της Αστάθειας. Επίσης σημειώνεται ο αύξων αριθμός του ασθενούς.



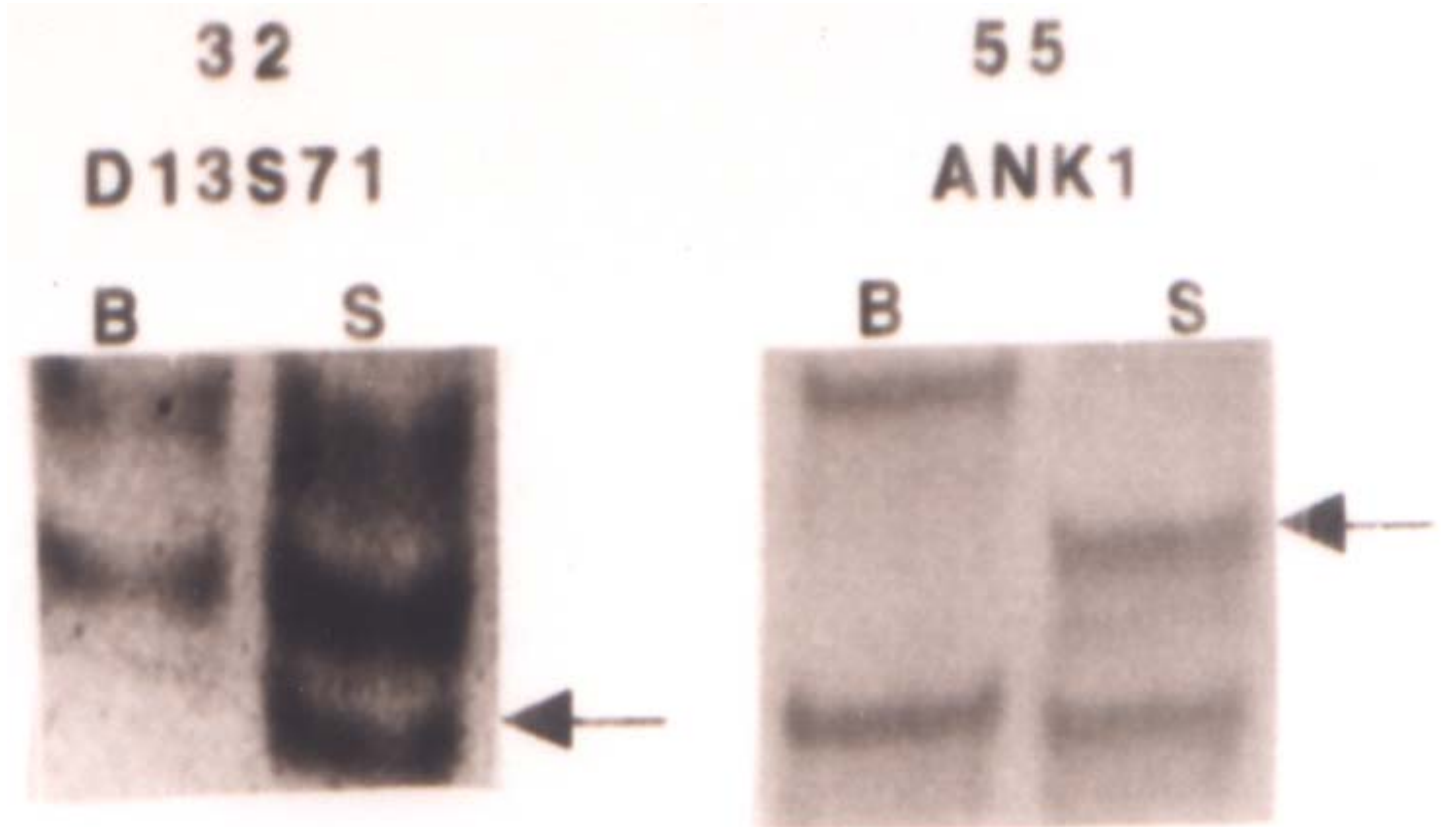
ΕΙΚΟΝΑ 2.3:

Χαρακτηριστικές εικόνες από δείγματα **καπνιστών με Χ.Α.Π.** που εμφάνισαν Αστάθεια του Μικροδορυφορικού DNA, στους Δείκτες:

-D13S71

-ANK1

Το **(B)** αντιστοιχεί στο δείγμα, από το περιφερικό αίμα, ενώ το **(S)** αντιστοιχεί στο δείγμα που προήλθε από το κυτταρολογικό υλικό (πτύελα). Το βέλος υποδεικνύει την θέση που εκδηλώθηκε το φαινόμενο της Αστάθειας. Επίσης σημειώνεται ο αύξων αριθμός του ασθενούς



Στις **10** από τις **14 θετικές** περιπτώσεις **ένας** μόνο μικροδορυφορικός DNA **δείκτης** εμφάνισε το φαινόμενο, ενώ στις υπόλοιπες **4** θετικές περιπτώσεις Αστάθεια εκδηλώθηκε, σε **δύο** διαφορετικούς μικροδορυφορικούς **δείκτες**.

Από τους επτά μικροδορυφορικούς δείκτες, που χρησιμοποιήθηκαν, για διαφορετικά χρωμοσώματα, ο δείκτης **THRA1** για το χρωμόσωμα **17**, έκφρασε συχνότερα από όλους τους άλλους το φαινόμενο της Αστάθειας και συγκεκριμένα σε ποσοστό **43%** (**ΠΙΝΑΚΑΣ 2.5**).

Από τα 4 θετικά δείγματα που εμφάνισαν Αστάθεια σε δύο διαφορετικούς δείκτες, ο **D17S250**, στο χρωμόσωμα **17** ήταν θετικός στις 3 από τις 4 περιπτώσεις.

Για να διαπιστωθεί αν η εμφάνιση του φαινομένου της Αστάθειας του Μικροδορυφορικού DNA, αποτελεί και δείκτη βαρύτητας της νόσου, συγκρίθηκαν οι δύο υποομάδες των ασθενών με Χ.Α.Π., δηλαδή συγκρίθηκε:

-η υποομάδα των **ασθενών με Χ.Α.Π**, που εμφάνισε Αστάθεια στα κυτταρολογικά δείγματα (**ΜΙ ΘΕΤΙΚΟΙ**)

-με την υποομάδα των **ασθενών με Χ.Α.Π**, που δεν εμφάνισαν το φαινόμενο στα δείγματα τους (**ΜΙ ΑΡΝΗΤΙΚΟΙ**)

Συγκρίθηκαν κλινικοί και εργαστηριακοί παράμετροι, όπως:

- η ηλικία
- η διάρκεια της νόσου
- η καπνιστική συνήθεια
- η επιβίωση
- οι μερικές πιέσεις των αερίων του αρτηριακού αίματος
- τα σπιρομετρικά ευρημάτα
- η χρήση και το είδος της θεραπευτικής αγωγής
- το ποσοστό εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονος (**ΠΙΝΑΚΑΣ 2.6**)

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.5:

Αριθμός και ποσοστό ασθενών με Χ.Α.Π.(**COPD-smokers**), και καπνιστών (**non-COPD smokers**), που εμφάνισαν Αστάθεια στο Μικροδορυφορικό DNA, σε σχέση με τον μικροδορυφορικό δείκτη που χρησιμοποιήθηκε και το αντίστοιχο χρωμόσωμα.

	Δείκτης (Microsatellite marker)	ΑΣΤΑΘΕΙΑ ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΟΥ DNA	
		Non-COPD	COPD
8	ANK1	0	1 (7%) ⁺
3	D3S1210	0	2* (14 %)
6	D6S344	0	1 (7 %)
13	D13S71	0	2* (14%)
17	D17S250	0	3* (21.4 %)
11	HRM	0	3 (21. 4%)
17	THRA1	0	6* (42.8 %)

(*) Ο συγκεκριμένος μικροδορυφορικός δείκτης, βρέθηκε θετικός για Αστάθεια σε συνδυασμό και με άλλους δείκτες, στο ίδιο δείγμα (Για περισσότερες λεπτομέρειες βλέπε κείμενο).

[†]Οι αριθμοί στις παρενθέσεις απεικονίζουν το ποσοστό επί του συνόλου, που ο συγκεκριμένος δείκτης εκδήλωσε Αστάθεια.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.6:

Σύγκριση κλινικών και εργαστηριακών παραμέτρων των ασθενών με Χ.Α.Π. που εμφάνισαν Αστάθεια του Μικροδορυφορικού DNA, στα κυτταρολογικά τους δείγματα, με τους Χ.Α.Π. ασθενείς που δεν εμφάνισαν το φαινόμενο.

	ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ Χ.Α.Π.		
	ΜΙ ΘΕΤΙΚΟΙ	ΜΙ ΑΡΝΗΤΙΚΟΙ	p value*
Αριθμός ασθενών	14	45	-
Ηλικία (έτη)	65 ± 25	62 ± 9	0.21
Διάρκεια νόσου (έτη)	7.7 ± 5.1	7.4 ± 4.0	0.92
Κάπνισμα (πακέτα επί έτη)	60 ± 25	54 ± 34	0.14
FEV ₁ (% προβλεπόμενης)	35.4 ± 7.8	33.4 ± 11	0.53
FVC (% προβλεπόμενης)	52.8 ± 5.7	47.2 ± 11.6	0.09
FEV ₁ /FVC (%)	52 ± 8.8	55.4 ± 10.6	0.23
PaO ₂ (mm Hg)	60.3 ± 6.9	60.6 ± 8.2	0.89
PaCO ₂ (mm Hg)	48 ± 12.1	49.8 ± 9.9	0.46
pH	7.38 ± 0.06	7.37 ± 0.04	0.35
HCO ₃ ⁻ (mEq/L)	28.7 ± 3.4	28.6 ± 3.7	0.95
Χρήση θεραπευτικής αγωγής (% των ασθενών)			
-ΕΙΣΠΝΕΟΜΕΝΟΙ β2-ΔΙΕΓΕΡΤΕΣ	100	95.5	0.42
-ΕΙΣΠΝΕΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΧΟΛΙΝΕΡΓΙΚΑ	86	88.9	0.75
-ΕΙΣΠΝΕΟΜΕΝΑ ΚΟΡΤΙΚΟΣΤΕΡΟΕΙΔΗ	93.3	93.3	0.95
-ΚΟΡΤΙΚΟΣΤΕΡΟΕΙΔΗ <i>per os</i>	14.3	15.5	0.91
Διάγνωση περιπτώσεων με Καρκίνο του Πνεύμονος σε περίοδο 24 μηνών παρακολούθησης	1	1	

*=Τιμές μη στατιστικά σημαντικές

MI=Microsatellite Instability (Αστάθεια του Μικροδορυφορικού DNA).

FEV₁=Forced Expiration Volume in one second (Δυναμικός Εκπνευστικός Όγκος στο πρώτο δευτερόλεπτο),

FVC=Forced Vital Capacity (Δυναμική Ζωτική Χωρητικότητα),

PaO₂=Arterial partial pressure of Oxygen (Μερική πίεση του Οξυγόνου στο αρτηριακό αίμα),

PaCO₂=Arterial partial pressure of Carbon Dioxide (Μερική πίεση του Διοξειδίου του Άνθρακα στο αρτηριακό αίμα)

Σύμφωνα με τον **ΠΙΝΑΚΑ 2.6** ,συγκρίνοντας τις παραπάνω παραμέτρους, δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο υποομάδες των ασθενών με Χ.Α.Π., δηλαδή ανάμεσα σε αυτούς που ήταν θετικοί στο φαινόμενο της Αστάθειας (**ΜΙ ΘΕΤΙΚΟΙ**) και στους αρνητικούς (**ΜΙ ΑΡΝΗΤΙΚΟΙ**), γεγονός που υποδεικνύει ότι πιθανότατα η Αστάθεια του Μικροδορυφορικού DNA δεν σχετίζεται με την βαρύτητα της νόσου.

Επιπλέον, κατά την διάρκεια των 24 μηνών παρακολούθησης των ατόμων που συμμετείχαν στην μελέτη, δύο (**2**) άτομα, από την ομάδα των ασθενών με Χ.Α.Π, εμφάνισαν **Καρκίνο του Πνεύμονα**.

Αξιοσημείωτο είναι, ότι ο ένας από τους δύο είχε εμφανίσει Αστάθεια του Μικροδορυφορικού DNA, ενώ ο άλλος δεν είχε εμφανίσει. Και οι δύο ασθενείς διαγνώστηκαν με Μη-Μικροκυτταρικό Καρκίνο Πνεύμονος (πλακώδους τύπου).

Επίσης δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή στην έκφραση του φαινομένου της Αστάθειας των μικροδορυφορικών αλληλουχιών, σε δεύτερο επανέλεγχο, που πραγματοποιήθηκε 24 μήνες μετά, σε όλους τους ασθενείς με Χ.Α.Π. που συμμετείχαν στην μελέτη.

Συγκεκριμένα οι 14 από τους 59 ασθενείς με Χ.Α.Π., που εμφάνισαν το φαινόμενο της Αστάθειας στην αρχική ανάλυση, παρέμειναν επίσης θετικοί στον ίδιο μικροδορυφορικό δείκτη και στον επανέλεγχο των νέων δειγμάτων που λήφθηκαν 24 μήνες μετά την πρώτη ανάλυση.

Ενώ οι ασθενείς που δεν εμφάνισαν από την αρχή Αστάθεια παρέμειναν αρνητικοί και στον επανέλεγχο για τους ίδιους μικροδορυφορικούς δείκτες, συμπεριλαμβανομένου και του ενός από τους δύο ασθενείς που διαγνώστηκαν με καρκίνο πνεύμονος.

Ομάδα Β: Καπνιστές χωρίς Χ.Α.Π.

Ακολουθώντας την ίδια μέθοδο, αναλύθηκαν και τα δείγματα από τους καπνιστές, χωρίς κλινικά και σπιρομετρικά ευρήματα Χ.Α.Π. (**Καπνιστές χωρίς Χ.Α.Π:** non-COPD smokers), για την ανίχνευση του φαινομένου της Αστάθειας στις μικροδορυφορικές αλληλουχίες του DNA (**ΕΙΚΟΝΕΣ 2.4, 2.5, 2.6**).

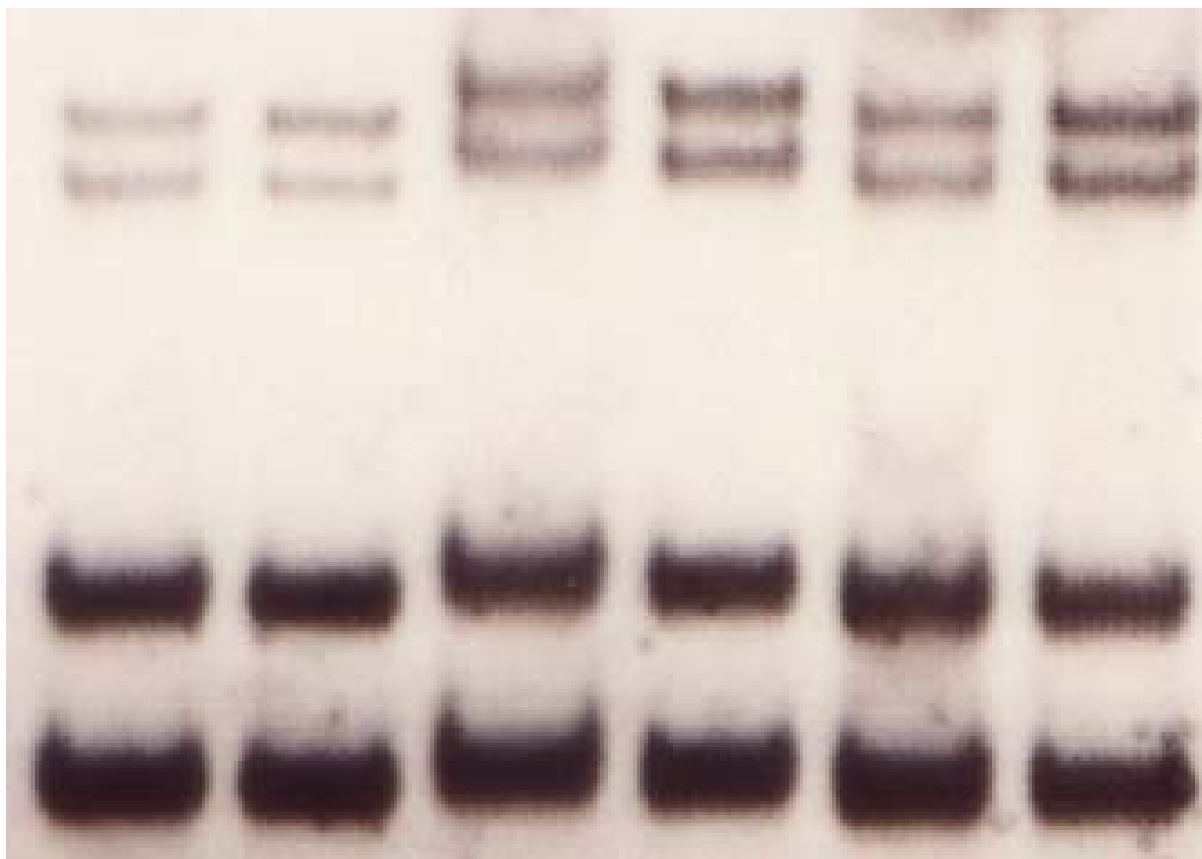
Κανένας από τους **60 καπνιστές** αυτής της ομάδας, δεν εμφάνισε Αστάθεια στο Μικροδορυφορικό DNA σε **κανέναν** από τους επτά μικροδορυφορικούς **δείκτες** που χρησιμοποιήθηκαν (**ΠΙΝΑΚΑΣ 2.5**).

Έτσι λοιπόν, όπως φαίνεται από τα παραπάνω αποτελέσματα, **η Αστάθεια του Μικροδορυφορικού DNA**, τουλάχιστον όσον αφορά τους μικροδορυφορικούς δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν, φαίνεται να συνοδεύει αποκλειστικά τους **καπνιστές με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια**, χωρίς όμως, όπως φαίνεται, **να σχετίζεται:**

- με την βαρύτητα της νόσου,
- την επιβίωση, ή
- την εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονος.

ΕΙΚΟΝΑ 2.4:

Χαρακτηριστικές εικόνες από δείγματα **καπνιστών χωρίς Χ.Α.Π**, όπου δεν παρατηρείται το φαινόμενο της Αστάθειας του Μικροδορυφορικού DNA, στον δείκτη **THRA1**.



ΕΙΚΟΝΑ 2.5:

Χαρακτηριστικές εικόνες από δείγματα **καπνιστών χωρίς Χ.Α.Π**, όπου δεν παρατηρήται το φαινόμενο της Αστάθειας του Μικροδορυφορικού DNA, στον δείκτη **D13S71 (A)** και στον **ANK1 (B)**.

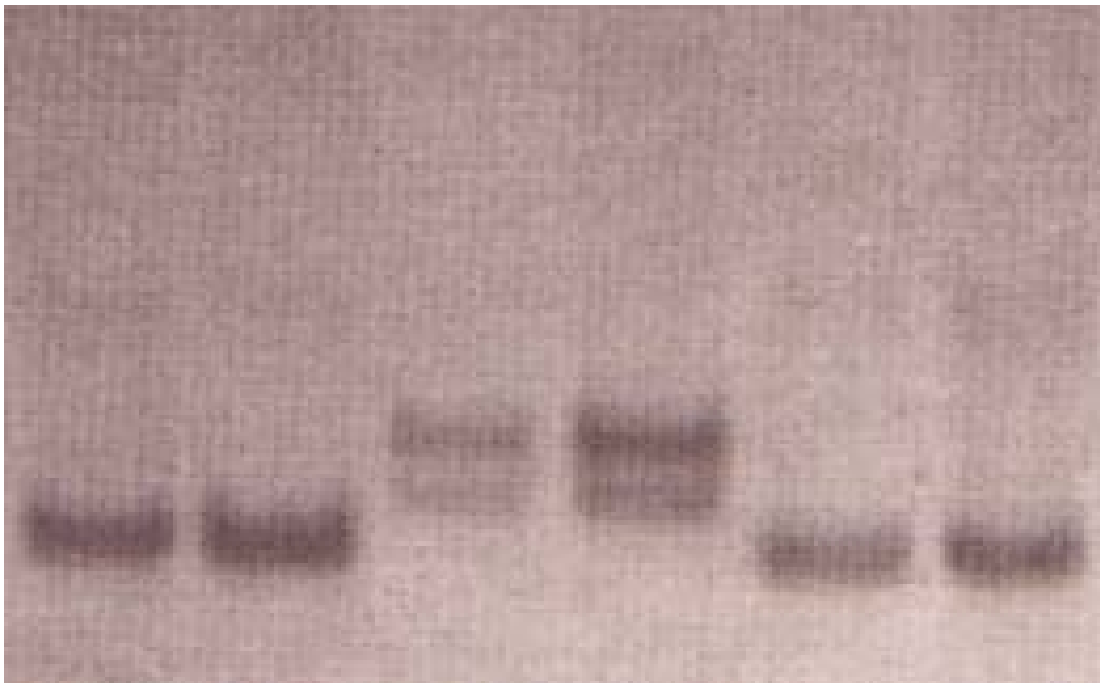


A

B

ΕΙΚΟΝΑ 2.6:

Χαρακτηριστικές εικόνες από δείγματα **καπνιστών χωρίς Χ.Α.Π**, όπου δεν παρατηρήται, το φαινόμενο της Αστάθειας του Μικροδορυφορικού DNA, στον δείκτη **HRM**.



2.9 ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΔΕΥΤΕΡΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

Η παρούσα μελέτη (**ΔΕΥΤΕΡΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ**) σχεδιάστηκε έτσι ώστε να μελετηθούν και να συγκριθούν δύο ομάδες καπνιστών, δηλαδή:

-η ομάδα των καπνιστών με **Χ.Α.Π.** (59 άτομα)

-η ομάδα των καπνιστών χωρίς **Χ.Α.Π.** (60 άτομα)

Στο **ΔΕΥΤΕΡΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ**, μόνο η ομάδα των καπνιστών με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια εμφάνισε το φαινόμενο της Αστάθειας του Μικροδορυφορικού DNA. Στους δεκατέσσερις (**14**), από τους πενήντα εννέα (**59**) ασθενείς με **Χ.Α.Π.**, που μελετήθηκαν δηλαδή σε ποσοστό **24%**, ανιχνεύθηκε **Αστάθεια στο Μικροδορυφορικό DNA**, σε ένα τουλάχιστον από τους επτά μικροδορυφορικούς δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν.

Αντίθετα η άλλη ομάδα που μελετήθηκε, που αποτελούνταν από τους εξήντα (**60**) καπνιστές χωρίς κλινικά ή σπιρομετρικά ευρήματα **Χ.Α.Π.** (**non-COPD smokers**) δεν εκδήλωσε σε κανένα δείκτη Αστάθεια των μικροδορυφορικών αλληλουχιών του DNA. Κατά την διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης όλων των ατόμων της μελέτης (24 μήνες) **κανένας από τους καπνιστές χωρίς Χ.Α.Π.**, δεν ανέπτυξε κλινικά τουλάχιστον ανιχνεύσιμο Καρκίνο του Πνεύμονος.

Αντίθετα στην ομάδα των καπνιστών με **Χ.Α.Π.** (**COPD-smokers**), **δύο** άτομα διαγνώσθηκαν με **Μη-Μικροκυτταρικό Καρκίνο Πνεύμονος**, πλακώδους τύπου, μέσα στο διάστημα των 24 μηνών παρακολούθησης. Επιπλέον, ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι **μόνο το ένα** από τα δύο αυτά άτομα είχε εκδηλώσει Αστάθεια του Μικροδορυφορικού DNA, ενώ το άλλο άτομο ήταν αρνητικό.

Το φαινόμενο της Αστάθειας που ανιχνεύθηκε στα κυτταρολογικά δείγματα των ασθενών με **Χ.Α.Π.**, επαληθεύτηκε σε δεύτερο επανέλεγχο που πραγματοποιήθηκε μετά από εικοσιτέσσερις (24) μήνες, σε όλα τα άτομα της ομάδας των καπνιστών με **Χ.Α.Π.** (**COPD-smokers**), χρησιμοποιώντας την ίδια μέθοδο και τους ίδιους μικροδορυφορικούς δείκτες.

Καμία αλλαγή στην έκφραση του φαινομένου δεν παρατηρήθηκε σε κανέναν από τους ασθενείς και στον δεύτερο κύκλο επανελέγχου. Τα ίδια αποτελέσματα επίσης επιβεβαιώθηκαν και για τις δύο περιπτώσεις ασθενών που διαγνώστηκαν με καρκίνο του πνεύμονα. Αυτό φαίνεται να υποδεικνύει, ότι η συγκεκριμένη γενετική αλλοίωση, δηλαδή η Αστάθεια των μικροδορυφορικών αλληλουχιών, συμβαίνει σε πρώιμα στάδια της ανάπτυξης της νόσου και δεν αποτελεί επιφαινόμενο, που έπεται της νόσου.

Αν και μόνο **24%**, από τους καπνιστές με Χ.Α.Π. (COPD-smokers), εμφάνισαν το φαινόμενο, αυτό δεν έρχεται σε αντίθεση με την παραπάνω εξήγηση, αφού **μόνο επτά δείκτες για το Μικροδορυφορικό DNA** ερευνήθηκαν. Είναι πολύ πιθανόν, αν αναλυθούν περισσότεροι μικροδορυφορικοί δείκτες, τα ποσοστά των θετικών περιπτώσεων να αυξηθούν.

Η εμφάνιση του φαινομένου **συνδέεται άμεσα με το κάπνισμα που οδηγεί σε Χ.Α.Π**, αφού ανιχνεύθηκε μόνο στους καπνιστές με Χ.Α.Π, και **όχι στους καπνιστές χωρίς Χ.Α.Π**.

Δεν φαίνεται να σχετίζεται με την βαρύτητα της νόσου, αφού συγκρίθηκαν κλινικοί και εργαστηριακοί παράμετροι των ασθενών με Χ.Α.Π. που εμφάνισαν το φαινόμενο με αυτούς που ήταν αρνητικοί, χωρίς όμως να παρατηρηθούν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ηλικία, στην επιβίωση, στα σπιρομετρικά ευρήματα, στην θεραπευτική αγωγή, στην καπνιστική συνήθεια και στη συχνότητα ανάπτυξης καρκίνου του πνεύμονα, ανάμεσα στις δύο ομάδες.

Αποδεικνύεται λοιπόν ότι το φαινόμενο της Αστάθειας του Μικροδορυφορικού DNA αποτελεί κοινό εύρημα αποκλειστικά στους καπνιστές με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια αφού ανευρέθηκε σε ποσοστό 24% στα κυτταρολογικά τους δείγματα, ενώ αντίθετα κανένας καπνιστής χωρίς Χ.Α.Π. δεν εμφάνισε το φαινόμενο.

Τα αποτελέσματα αυτά στηρίζουν την υπόθεση ότι η Αστάθεια των Μικροδορυφορικών αλληλουχιών του DNA μπορεί να σχετίζεται με την πολύπλοκη γενετική βάση της Χρόνιας Αποφρακτικής Πνευμονοπάθειας. Επιπλέον, η αστάθεια, θα μπορούσε να αποτελέσει δείκτη γενετικής διαταραχής που σχετίζεται με το κάπνισμα του τσιγάρου και που μπορεί να οδηγήσει περαιτέρω στην ανάπτυξη της Χ.Α.Π.

Από τα μέχρι τώρα στοιχεία της βιβλιογραφίας αυτή είναι **η πρώτη μελέτη** που επιχειρήθηκε η ανίχνευση του φαινομένου της Αστάθειας του Μικροδορυφορικού DNA στην Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια.

Περαιτέρω και για μακρό χρονικό διάστημα, παρακολούθηση των ασθενών με Χ.Α.Π. θα μπορούσε να αποσαφηνίσει με περισσότερη ακρίβεια την χρονική έναρξη εμφάνισης του φαινομένου της αστάθειας των μικροδορυφορικών αλληλουχιών του DNA κατά την πορεία της νόσου, υποδεικνύοντας έτσι την σύνδεση του φαινομένου με την παθογένεια της Χ.Α.Π.

Από την άλλη θα μπορούσε να αποτελέσει πρώιμο δείκτη ανίχνευσης νόσων όπως ο καρκίνος του Πνεύμονα και συγκεκριμένα να χρησιμοποιηθεί για τους ασθενείς με Χ.Α.Π. οι οποίοι και θεωρούνται υψηλού κινδύνου για την ανάπτυξη καρκίνου πνεύμονα.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΕΙΔΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ

Η ΑΣΤΑΘΕΙΑ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΟΥ DNA ΣΤΗΝ ΧΡΟΝΙΑ **ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑ: ΔΕΙΚΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΕΥΠΑΘΕΙΑΣ?**

Στην μελέτη μας (**ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΠΡΩΤΟ, ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΔΕΥΤΕΡΟ**), αποδείχτηκε ότι η Αστάθεια στο Μικροδορυφορικό DNA αποτελεί κοινό εύρημα στα κυτταρολογικά δείγματα των ασθενών με Χ.Α.Π, αφού ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 23% και 24% αντίστοιχα (Siafakas et al., 1996; Spandidos et al., 1996; Tzortzaki et al., 1996; Tzortzaki et al., 1997; Siafakas et al., 1999).

Το Μικροδορυφορικό DNA ανήκει στις υψηλά επαναλαμβανόμενες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες του DNA, χωρίς κωδικοποιητική λειτουργία και βρίσκεται διαδεδομένο στο γονιδίωμα των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών. Η έλλειψη ειδικής λειτουργίας των μικροδορυφορικών αλληλουχιών, σε συνδυασμό με την υψηλά επαναλαμβανόμενη δομή τους, επιτρέπει να διατηρούν την ακεραιότητά τους με ευκολία, χωρίς να υπόκεινται στην διαδικασία της εξελικτικής επιλογής.

Στο ανθρώπινο γονιδίωμα υπολογίζεται ότι υπάρχει σε περισσότερες από 100.000 διαφορετικές θέσεις διασκορπισμένο σε όλα τα χρωμοσώματα. Η σημασία και η λειτουργία αυτών των αλληλουχιών δεν έχει αποσαφηνισθεί εντελώς. Ωστόσο, δεν φαίνεται να έχουν ρόλο στην ρύθμιση της λειτουργίας των γονιδίων και ούτε φαίνεται να επιδρούν στις περιοχές των υποκινητών των γονιδίων (gene promoters) καταστέλλοντας ή διεγείροντας την έκφραση τους.

Αντίθετα, οι μικροδορυφορικές αλληλουχίες, οριοθετούν τις περιοχές που συντελείται η ανταλλαγή ανάμεσα στις αδερφές χρωματίδες κατά την διάρκεια του γενετικού ανασυνδυασμού, διασφαλίζοντας την ακρίβεια του και προλαμβάνοντας τον έκτοπο και τον μιτωτικό ανασυνδυασμό ανάμεσα στα ομόλογα χρωμοσώματα. Έτσι, μπορούν να αναγνωρισθούν κατά την διάρκεια του ζευγαρώματος των ομόλογων χρωμοσωμάτων, να απενεργοποιηθούν ανεπανόρθωτα (με την διαδικασία της μεθυλίωσης, ή με την διαδικασία της μετάλλαξης της κυτοσίνης σε θυμίνη) και έτσι να μην μπορούν να αντιγραφούν.

Επιπλέον, επειδή το πρότυπο της μεθυλίωσης, όπως και των μεταλλάξεων μπορεί να διαφέρει για την κάθε επαναλαμβανόμενη αλληλουχία, δημιουργείται

απόκλειση των αλληλουχιών τέτοια ώστε να αποτρέψει τον ανασυνδυασμό ανάμεσα στις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (Radman, 1991).

Όλες οι μεταλλάξεις που συμβαίνουν μέσα στο Μικροδορυφορικό DNA είναι ουδέτερες μεταλλάξεις και μπορούν να αθροιστούν ταχέως. Όμως επειδή, οι μικροδορυφορικές αλληλουχίες, είναι αλληλουχίες χωρίς κωδικοποιητική λειτουργία (non-coding DNA) μπορούν να αποτελέσουν το βασικό φορέα πολυμορφισμού των αλληλουχιών.

Ο πολυμορφισμός των αλληλουχιών, όπως είναι γνωστό, αποτελεί πολύ ισχυρό φραγμό (εμπόδιο) στον ομόλογο ανασυνδυασμό, εξαιτίας της απόκλισης των αλληλουχιών, λόγω των ουδετέρων μεταλλάξεων (Rayssiguier et al., 1989).

Ο σχεδιασμός γενετικών δεικτών, όπως είναι οι δείκτες για το μικροδορυφορικό DNA, παρέχει την δυνατότητα έρευνας σε όλο το γονιδίωμα, για ανεύρεση αστάθειας, καθώς και συσχετίσεων της αστάθειας με την εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων σε πληθυσμούς ατόμων υπό έλεγχο.

Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να αποκαλυφθούν **χρωμοσωμικές περιοχές** στις οποίες ανιχνεύεται **Αστάθεια Μικροδορυφορικού DNA**, οι οποίες πιθανόν να **γειτονεύουν με γονίδια** τα οποία **εμπλέκονται στην εμφάνιση νοσημάτων**.

Στο Ατοπικό Άσθμα, για παράδειγμα, έξι τέτοιες χρωμοσωμικές περιοχές βρέθηκαν σε Βρετανική μελέτη (Daniels et al., 1996), ενώ σε άλλη μελέτη, στην Αμερική, παρατηρήθηκαν πολλές και διαφορετικές χρωμοσωμικές περιοχές με πιθανή σύνδεση στην γενετική ευπάθεια για το Ατοπικό Άσθμα, σε ομάδες ατόμων διαφορετικών εθνικοτήτων, υποδεικνύοντας ότι υπάρχουν γενετικές διαφορές ανάμεσα σε διαφορετικούς πληθυσμούς (CSGA: The Collaborative Study on the Genetics of Asthma 1997).

Η Αστάθεια του Μικροδορυφορικού DNA, αρχικά παρατηρήθηκε στον Καρκίνο του παχέως εντέρου, όπου θεωρήθηκε ότι λάθη κατά την αντιγραφή του DNA, τα οποία δεν «επιδιορθώθηκαν», οδήγησαν στον κακοήγη μετασχηματισμό των κυττάρων. Συγχρόνως πολλές άλλες μελέτες επιβεβαίωσαν ότι η Αστάθεια του Μικροδορυφορικού DNA αποτελεί κοινό εύρημα στους περισσότερους καρκίνους, όπως στον καρκίνο:

- του Πνεύμονος,
- του Ενδομητρίου,

-των Ωοθηκών,
-του Προστάτη,
-της Κεφαλής και Τραχήλου,
-της Ουροδόχου Κύστης (Aaltonen et al., 1993; Field et al., 1995; Froudarakis et al., 1998; Mao et al., 1996; Mao et al., 1996; Thiboteau et al., 1994).

Από τις μέχρι τώρα γνωστές βιβλιογραφικές αναφορές (Barnes, 1999) η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που επιχείρησε ανίχνευση της Αστάθειας του Μικροδορυφορικού DNA στην Χ.Α.Π.

Τα αποτελέσματα της μελέτης μας (ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΠΡΩΤΟ & ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΔΕΥΤΕΡΟ), δηλαδή η ανεύρεση Αστάθειας στο Μικροδορυφορικού DNA, σε κυτταρολογικά δείγματα ασθενών με Χ.Α.Π. εξηγήθηκαν είτε σαν:

-Δείκτης πιθανής κακοήθειας, ή
-Γενετική ανωμαλία που σχετίζεται με το κάπνισμα του τσιγάρου και την παθογένεια της Χ.Α.Π. (Siafakas et al., 1996; Spandidos et al., 1996; Tzortzaki et al., 1996; Tzortzaki et al., 1997; Siafakas et al 1999).

Όπως είναι γνωστό, το κάπνισμα του τσιγάρου προκαλεί σημαντικό

οξειδωτικό stress το οποίο οδηγεί σε βλάβη του επιθηλίου των αεραγωγών. Ο μηχανισμός αποκατάστασης είναι εξαιρετικά πολύπλοκος και απαιτεί μετανάστευση κυττάρων στο σημείο της βλάβης, προμιτωτική διαφοροποίηση, μίτωση και μεταμιτωτική αναδιαφοροποίηση.

Η Αστάθεια του Μικροδορυφορικού DNA θα μπορούσε να είναι συνδεδεμένη με γονίδια που ευθύνονται για την αποκατάσταση του επιθηλίου των αεραγωγών μετά από βλάβη (lung injury) και να αντανakλά ακριβώς, την αλλοίωση της φυσιολογικής επανορθωτικής διαδικασίας που έπεται μετά από κάθε βλάβη. Το αποτέλεσμα αυτής της μη-φυσιολογικής επανόρθωσης του επιθηλίου (**REMODELING; THE AMERICAN HYPOTHESIS**) οδηγεί και στην μη ανατρέψιμη απόφραξη των αεραγωγών που χαρακτηρίζει την Χ.Α.Π.

Αρχικά στην μελέτη μας (**ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΠΡΩΤΟ**), η Αστάθεια του Μικροδορυφορικού DNA ανιχνεύθηκε σε επτά (7) από τους τριάντα ένα (31), ασθενείς με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια, που μελετήθηκαν, δηλαδή σε ποσοστό **23%**. Η μελέτη συμπληρώθηκε με το **ΔΕΥΤΕΡΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ**, το οποίο σχεδιάστηκε έτσι ώστε να μελετηθούν και να συγκριθούν δύο ομάδες καπνιστών, δηλαδή:

-η ομάδα των καπνιστών με Χ.Α.Π. (59 άτομα)

-η ομάδα των καπνιστών χωρίς Χ.Α.Π. (60 άτομα)

Στο ΔΕΥΤΕΡΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ, μόνο η ομάδα των καπνιστών με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια εμφάνισε το φαινόμενο. Στους δεκατέσσερις (14), από τους πενήντα εννέα (59) ασθενείς με Χ.Α.Π., που μελετήθηκαν δηλαδή σε ποσοστό **24%**, ανιχνεύθηκε Αστάθεια στο Μικροδορυφορικό DNA, σε ένα τουλάχιστον από τους επτά μικροδορυφορικούς δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν.

Αντίθετα η άλλη ομάδα που μελετήθηκε, που αποτελούνταν από τους εξήντα (60) καπνιστές χωρίς κλινικά ή σπιρομετρικά ευρήματα Χ.Α.Π. (**non-COPD smokers**) δεν εκδήλωσε **σε κανένα** δείκτη Αστάθεια των μικροδορυφορικών αλληλουχιών του DNA.

Κατά την διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης όλων των ατόμων της μελέτης (24 μήνες) κανένας από τους καπνιστές χωρίς Χ.Α.Π., δεν ανέπτυξε κλινικά τουλάχιστον ανιχνεύσιμο Καρκίνο του Πνεύμονος.

Αντίθετα στην ομάδα των καπνιστών με Χ.Α.Π. (**COPD-smokers**), **δύο** άτομα διαγνώσθηκαν με **Μη-Μικροκυτταρικό Καρκίνο Πνεύμονος**, πλακώδους τύπου, μέσα στο διάστημα των 24 μηνών παρακολούθησης. Επιπλέον, το ένα μόνο από τα δύο αυτά άτομα είχε εκδηλώσει Αστάθεια του Μικροδορυφορικού DNA, ενώ το άλλο άτομο ήταν αρνητικό.

Η **κριτική** που θα μπορούσε να ασκηθεί στην συγκεκριμένη μελέτη, αφορά κατ' αρχήν το γεγονός ότι αν και λήφθηκε κάθε προσοχή στην ακριβή λήψη του ιστορικού όσον αφορά την καπνιστική συνήθεια, έτσι ώστε να υπάρχει αντιστοιχία στις δύο ομάδες της μελέτης, ως προς τον βαθμό έκθεσης στον καπνό του τσιγάρου (**ΠΙΝΑΚΑΣ 2.3**), εντούτοις ήταν δύσκολο να καθοριστεί κατά πόσο ακριβές, ήταν το ιστορικό καπνίσματος που δόθηκε από τα ίδια τα άτομα που συμμετείχαν. Επιπλέον, ήταν

δύσκολο να καθοριστούν άλλοι παράγοντες που δυνητικά θα μπορούσαν να επηρεάσουν τα αποτελέσματα, όπως:

- οι διαιτητικές συνήθειες των ατόμων
- οι περιβαλλοντολογικές συνθήκες (ατμοσφαιρική ρύπανση)
- γενετικές διαφορές (ομάδα αίματος, κ.ά.)

Παρόλαυτα, όλα τα άτομα της μελέτης κατοικούσαν στο ίδιο γεωγραφικό διαμέρισμα (Κρήτη) και επιπλέον η επιλογή τους έγινε τυχαία χωρίς να τηρηθεί ιδιαίτερη διαδικασία επιλογής εκτός από τα απαραίτητα κριτήρια συμμετοχής στην μελέτη.

Το δεύτερο σημείο που θα μπορούσε να ασκηθεί κριτική, σχετίζεται με την περίοδο παρακολούθησης, αφού εικοσιτέσσερις (24) μήνες θα μπορούσαν να θεωρηθούν βραχύ διάστημα για την ανίχνευση αξιοσημείωτων διαφορών, ιδιαίτερα όσον αφορά την εκδήλωση καρκίνου του πνεύμονος. Παρόλαυτα στην προαναφερθήσα περίοδο, δύο (2) ασθενείς με Χ.Α.Π. διαγνώστηκαν με **Μη-Μικροκυτταρικό Καρκίνο του Πνεύμονος**, ενώ σε αντίθεση κανένας από την ομάδα των καπνιστών χωρίς Χ.Α.Π., δεν εμφάνισε την νόσο.

Είναι φανερό, ότι τα αποτελέσματα της μελέτης μας, δεν αποκλείουν εντελώς την πιθανότητα ότι **η Αστάθεια του Μικροδορυφορικού DNA** θα μπορούσε να εμπλέκεται και στις δύο ασθένειες, δηλαδή:

- στην παθογένεια της Χρόνιας Αποφρακτικής Πνευμονοπάθειας, και
- στην ανάπτυξη καρκίνου του πνεύμονος.

Ακόμα, από άλλες μελέτες φαίνεται, να υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στον καρκίνο του πνεύμονα και την Χ.Α.Π., χωρίς όμως αυτή η συσχέτιση να συνδέεται με την ηλικία ή το ιστορικό καπνίσματος, υποδεικνύοντας έτσι ότι, μπορεί να υπάρχει κοινή γενετική προδιάθεση ανάμεσα στα δύο νοσήματα (Cohen et al., 1977; Tockman et al., 1987).

Δεύτερος επανέλεγχος πραγματοποιήθηκε μετά από εικοσιτέσσερις (24) μήνες, σε όλα τα άτομα της ομάδας των καπνιστών με Χ.Α.Π. (COPD-smokers), χρησιμοποιώντας την ίδια μέθοδο και τους ίδιους μικροδορυφορικούς δείκτες.

Καμία αλλαγή στην έκφραση του φαινομένου δεν παρατηρήθηκε σε κανέναν από τους ασθενείς και στον δεύτερο κύκλο επανελέγχου. Αυτό φαίνεται να υποδεικνύει, ότι η συγκεκριμένη γενετική αλλοίωση, συμβαίνει σε πρώιμα στάδια της ανάπτυξης της νόσου.

Μολονότι, εξαιτίας των περιορισμών της μεθόδου, δεν ήταν δυνατόν να εξακριβωθεί το κύτταρο, ή τα κύτταρα των πτυέλων που εμφάνισαν το φαινόμενο της Αστάθειας στο DNA, τα αποτελέσματα μας, θα μπορούσαν να υποδείξουν ότι αυτή η γενετική αλλοίωση συμβαίνει κατά την διάρκεια της περιόδου αποκατάστασης της βλάβης του αναπνευστικού επιθηλίου, μετά από πνευμονικό τραυματισμό, οδηγώντας σε μη-φυσιολογική επούλωση και παθολογικό ανασχηματισμό (remodeling), του αναπνευστικού επιθηλίου.

Το γεγονός ότι κανένας από τους μη-Χ.Α.Π. καπνιστές (non-COPD smokers), δεν εκδήλωσε Αστάθεια στο Μικροδορυφορικό DNA, υποστηρίζει την παραπάνω υπόθεση.

Οι επαναλαμβανόμενες μικροδορυφορικές αλληλουχίες, φαίνεται να αποτελούν σημεία συχνών μεταλλάξεων (hot spots), και έτσι το φαινόμενο της Αστάθειας απλά, να σχετίζεται με αυξημένα «λάθη» κατά την αντιγραφή (replicative errors) του DNA του γονιδιώματος των κυττάρων που προήλθαν από τα πτύελα, που δεν είναι άλλα από τα επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών (Risinger, 1993).

Αν και μόνο 24%, από τους καπνιστές με Χ.Α.Π. (COPD-smokers), εμφάνισαν το φαινόμενο, αυτό δεν έρχεται σε αντίθεση με την παραπάνω εξήγηση, αφού μόνο επτά δείκτες για το Μικροδορυφορικό DNA ερευνήθηκαν. Είναι πολύ πιθανόν, αν αναλυθούν περισσότεροι μικροδορυφορικοί δείκτες, τα ποσοστά των θετικών περιπτώσεων να αυξηθούν.

Συμπερασματικά, λοιπόν τα αποτελέσματα της μελέτης μας (**ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΠΡΩΤΟ ΚΑΙ ΔΕΥΤΕΡΟ**), έδειξαν ότι:

1. Η ανίχνευση της Αστάθειας του Μικροδορυφορικού DNA, στα κυτταρολογικά δείγματα των ασθενών με Χ.Α.Π, είναι εφικτή αφού ανιχνεύθηκε σε ποσοστό **24%**, χρησιμοποιώντας μόνο επτά διαφορετικούς δείκτες για το Μικροδορυφορικό DNA.

2. Συνδέεται άμεσα με το κάπνισμα που οδηγεί σε Χ.Α.Π, αφού ανιχνεύθηκε μόνο στους καπνιστές με Χ.Α.Π, και όχι στους καπνιστές χωρίς Χ.Α.Π.
3. Δεν σχετίζεται με την βαρύτητα της Χ.Α.Π.
4. Θα μπορούσε να αποτελέσει χρήσιμο δείκτη γενετικής αλλοίωσης του μηχανισμού αποκατάστασης του αναπνευστικού επιθηλίου, μετά από βλάβη (π.χ. κάπνισμα τσιγάρων), που οδηγεί στον μη ανατρέψιμο και παθολογικό ανασχηματισμό των φυσιολογικών δομών των αεραγωγών και του παρεγχύματος.
5. Η παρούσα μελέτη ανέδειξε **πρωτότυπα ευρήματα** αφού από τις μέχρι σήμερα γνωστές βιβλιογραφικές αναφορές, είναι η πρώτη που συσχέτισε το φαινόμενο της Αστάθειας του Μικροδορυφορικού DNA με την Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια.

Όμως περισσότερες μελέτες απαιτούνται, για να επιβεβαιώσουν τα παραπάνω ευρήματα και την **Υπόθεση της σύνδεσης της Αστάθειας του Μικροδορυφορικού DNA με γονίδια που σχετίζονται με την πολύπλοκη γενετική βάση της Χ.Α.Π.**

Μελλοντικά, πολλές μελέτες για περαιτέρω διερεύνηση του φαινομένου θα μπορούσαν να σχεδιαστούν.

Πρώτα από όλα η **χρήση περισσότερων δεικτών** για το Μικροδορυφορικό DNA και για άλλα χρωμοσώματα θα μπορούσαν να αναδείξουν ακόμα μεγαλύτερα ποσοστά συχνότητας του φαινομένου.

Ακόμα, **μακρόχρονη παρακολούθηση** των ασθενών με Χ.Α.Π. που εμφάνισαν το φαινόμενο θα μπορούσε να διευκρινήσει κατά πόσο η Αστάθεια συνδέεται μόνο με την παθογένεια της Χ.Α.Π., ή μπορεί να αποτελέσει και πρώιμο δείκτη ανίχνευσης καρκίνου του Πνεύμονα. Από την δική μας μελέτη δεν ήταν δυνατόν να διευκρινισθεί το παραπάνω ερώτημα αφού 24 μήνες παρακολούθησης των ασθενών θεωρείται βραχύ διάστημα για ανιχνεύσιμες αξιοσημείωτες αλλαγές όσον αφορά τον καρκίνο του Πνεύμονα.

Σύμφωνα με την παρούσα μελέτη το φαινόμενο της αστάθειας συνδέεται με το κάπνισμα που οδηγεί σε Χ.Α.Π. αφού εμφανίστηκε αποκλειστικά σε αυτήν την ομάδα υποδεικνύοντας καινούργια σημεία έρευνας. Έτσι, θα μπορούσε να συνδυασθεί με την ταυτόχρονη μελέτη δεικτών

-φλεγμονής,

-απόπτωσης, ή

-δεικτών που σχετίζονται με τον παθολογικό ανασχηματισμό του αναπνευστικού επιθηλίου (**Remodeling**).

σε κυτταρολογικά δείγματα, ή και σε ιστούς ασθενών με Χ.Α.Π.

Αν και μέχρι τώρα το φαινόμενο της απόπτωσης δεν έχει συνδεθεί άμεσα με την Χ.Α.Π.(Yasuda et al., 1998) ωστόσο φαίνεται να κατέχει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο των κοκκιοκυττάρων που κατακλύζουν τις περιοχές της φλεγμονής. Με την διαδικασία της απόπτωσης φαίνεται να περιορίζεται η εξάπλωση της φλεγμονής και να προάγεται η λύση της (White 1996). Έτσι η ενεργοποίηση του μηχανισμού της απόπτωσης μπορεί να οδηγήσει στον τερματισμό της φλεγμονώδους διεργασίας περιορίζοντας την μετανάστευση των φλεγμονωδών κυττάρων. Από την άλλη η καθυστερημένη ενεργοποίηση της αποπτωτικής διεργασίας μπορεί να ευθύνεται για χρονίζουσα φλεγμονώδη κυτταρική διήθηση στους ιστούς (Simon et al., 1997; Wooley et al., 1996; Anderson 1996). Έτσι σε συνδυασμό με την αστάθεια του Μικροδορυφορικού DNA ίσως θα μπορούσε να εξηγηθεί μέρος της γενετικής και της παθογένειας της Χ.Α.Π.

Επιπλέον η διερεύνηση του φαινομένου θα μπορούσε να αποτελέσει μέθοδο ελέγχου σε ομάδες υψηλού κινδύνου, όπως:

-βαρείς καπνιστές

-άτομα με επαγγελματική και ατμοσφαιρική έκθεση σε εισπνεόμενους ερεθιστικούς παράγοντες

-άτομα με οικογενειακό ιστορικό αναπνευστικής νόσου, ή καρκίνου του πνεύμονα

με σκοπό την πρόληψη ανίχνευση των «**ευπαθών καπνιστών**» για περαιτέρω πρόληψη της ανάπτυξης της Χρόνιας Αποφρακτικής Πνευμονοπάθειας, αλλά και την πρόληψη, ή έστω την έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- Aaltonen L.A, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993;260:812-816.
- Abe T., et al. Expression of the secretory leucoprotease inhibitor gene in epithelial cells. *J. Clin. Invest.* 1991;87:2207-2215.
- American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructiv pulmonary disease (COPD). *Amer. J. Respir. Crit. Care Med.* 1995;152:S77-S120.
- Αναγνωστοπούλου Ο. Οικονομική και κοινωνική διάσταση της Χρόνιας Αποφρακτικής Πνευμονοπάθειας. *Πνεύμων* 1997;10:53-60.
- Anderson G.P. Resolution of chronic inflammation by therapeutic induction of apoptosis. *Trends Pharmacol. Sci.* 1996;17:438-442.
- Anderson M.L.M. and Spandidos D.A. Oncogenes and oncosuppressor genes in lung cancer. *Resp. Med.* 1993;87:413-420.
- Armour J.A.L, Jeffreys A. Biology and applications of human minisatellite loc. *J. Curr. Op. Genet. Dev.* 1992;2:850-856.
- Barnes P.J. Molecular genetics of chronic obstructive pulmonary disease. In: Genetics and pulmonary Medicine 9. *Thorax* 1999;54(3):245-252.
- Barnes P.J. and Karin M. Nuclear factor kB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N. Engl. J. Med.* 1997;336:1066-1071.

- Batten J., et al. The prevalence of respiratory disease in heterozygotes for the gene for fibrocystic disease of the pancreas. *Lancet* 1963;*1*:1348-1350.
- Baun G.L., Wolinski E. Clinical Aspects of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. In: *Little, Brown and Company eds. (fifth ed.) Textbook of Pulmonary diseases. (vol 2)* 1994;995-1027.
- Beatty T.H., et al. Risk factors associated with longitudinal changes in pulmonary function. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1984;*129*:660-667.
- Becklake M.R. Occupational exposures: evidence of a causal association with chronic obstructiv pulmonary disease. *Am. Rev. Respir Dis.* 1989;*140*:S85-S91.
- Begin R., et al. Flow and age dependence of airway closure and dynamic compliance. *J. Appl. Physiol.* 1975;*38*:199.
- Bergqvist D., Nilsson I.M. Hereditary a2-macroglobulin deficiency. *Scand. J. Haematol.* 1979;*23*:433-436.
- Bjorkander J., et al. Impaired lung function in patients with IgA deficiency and low levels of IgG2 or IgG3. *N. Engl. J. Med.* 1985;*313*:720-724.
- Birrer P., et al. Alpha1-antitrypsin deficiency and liver disease. *J. Inher. Metab. Dis.* 1991;*14*:512-525.
- Bitterman P.B., Polunovsky V.A., Ingbar D.H. Repair after acut lung injury. *Chest* 1994;*105*(suppl)118-121.

- Bohm N., et al. Combined α 1-antitrypsin and α 2-macroglobulin deficiency syndrome: light microscopic evidence of collagenolytic, elastolytic and myolytic tissue lesions. *Path. Res. Prac.* 1980;168:17-35.
- Boren H.G., Kory R.C., Syner G.K. The Veterans Administration-Army Cooperative Study of Pulmonary Function: II. The lung volume and its subdivisions in normal men. *Am. J. Med.* 1966;41:96.
- Brissenden J.E., Cox D.W. Alpha2-macroglobuline in patients with obstructive lung disease, with and without α 1-antitrypsin deficiency. *Clin. Chim. Acta.* 1983;128:241-248.
- British Medical Research Council. Value of chemoprophylaxis and chemotherapy in early chronic bronchitis: A report to the Medical Research Council by their working party on trials on chemotherapy in early chronic bronchitis. *Br. Med. J.* 1966;1:1317.
- Brook J.D., et al. Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* 1992;68:799-808.
- Bruford M.W. & Wayne R.K. Microsatellites and their application to population genetic studies. *Curr. Op. Genet. Dev.* 1993;3:939-943.
- Buist A.S., Vollmer W.M. Smoking and other risk factors. In: Murray J.F., Nadel J.A. eds. *Textbook of respiratory medicine.* Philadelphia: WB Saunders, 1994;1259-1287.
- Buist A.S., Van Fleet D.L., Ross B. A comparison of conventional spirometric tests and the test of closing volume in an emphysema screening center. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1973;107:735.

- Buist A.S., Ross B.B. Predicted values of closing volumes using a modified single breath nitrogen test. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1973;107:744.
- Burge P.S. Occupation and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Eur. Respir.J.* 1994;7:1032-1034.
- Burnetti D., Stockley R.A. Serum and sputum a₂-macroglobulin in patients with chronic obstructive airways disease. *Thorax* 1981;36:512-516.
- Burnetti D., McGillivray D.H., Stockley R.A. Evidence that alveolar macrophages can synthesize and secrete alpha-antichymotrypsin. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1984;129:473-476.
- Burrows B., Lebowitz M.D., Barbee R.A. respiratory disorders and allergy skin-test reactions. *Ann. Intern. Med.* 1976;84:134.
- Burrows B., Knudson R.J., Lebowitz M.D. The relationship of childhood respiratory illness to adult obstructive airway disease. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1977;115:751.
- Burrows B., et al. Quantitative relationships between cigarette smoking and ventilatory function. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1977;115:195.
- Burrows B., et al. A reexamination of risk factors for ventilatory impairment. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1988;138:829.
- Burrows B. Epidemiological evidence for different types of chronic airflow obstruction. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1991;140:225-252.
- Cambien F., et al. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 1992;359:641-644.

- Cantlay A.M., et al. Association between the CYPIA1 gene polymorphism and susceptibility to emphysema and lung cancer. *J. Clin.Path: Mol. Path.* 1995;48:M210-214.
- Carp H., Janoff A. *In vitro* suppression of serum elastase-inhibitory capacity by reactive oxygen species generated by phagocytosing polymorphonuclear leukocytes. *J. Clin. Invest.* 1979;63:793-797.
- Cawkell L., et al. Rapid detection of allele loss in colorectal tumours using microsatellites and fluorescent DNA technology. *Br. J. Cancer* 1993;67:1262-1267.
- Γεωργάτου-Παπαγεωργίου Ν., Γκάγκα Μ., Μαρώσης Κ., Ρέππας Χ., Αβαρλής Π., Δημάδη Μ., Κυριακού Μ., Τσίπρα Σ., Ζειμπέκογλου Κ., Τρακόπουλος Γ. Μελέτη της Ευρωπαϊκής Κοινότητας για την αναπνευστική υγεία. Αποτελέσματα στην Αθήνα. *Πνεύμων* 1997;10:61-68.
- Charlesworth B., Sniegowski P., Stephan W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 1994;371:215-220.
- Ciba Guest Symposium Report. Terminology, definitions, and classification of chronic pulmonary emphysema and related conditions. *Thorax* 1959;14:286.
- Clark R.A. The commonality of cutaneous wound repair and lung injury. *Chest* 1991;99(suppl):57-60.
- Connors A.F., et al. Outcomes following acute exacerbation of severe chronic obstructiv lung disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996;154:959-967.
- Cohen B. H., et al. Risk factors in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Am. J. Epidemiol.* 1977;105:223-232.

- Cohen B.H., et al. Is ABH non-secretor status a risk factor for obstructive lung disease? *Am. J. Epidemiol.* 1980;111:285-291.
- Corder E.H., et al. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer's disease. *Nature Genet.* 1994;7:180-184.
- Cox G. IL-10 enhances resolution of pulmonary inflammation in vivo by promoting apoptosis of neutrophils. *Am. J. Physiol.* 1996;271:L566-571.
- CSGA: The Collaborative Study on the Genetics of Asthma. Genome-wide search for asthma susceptibility loci in ethnically diverse populations. *Nat. Genet.* 1997;15:389-392.
- Davies J.L., et al. A genome wide search for human type I diabetes susceptibility genes. *Nature* 1994;371:130-136.
- Davies P.B. Autonomic and airway reactivity in obligate heterozygotes for cystic fibrosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1984;129:911-914.
- Davies P.B., Vargo K. Pulmonary abnormalities in obligate heterozygotes for cystic fibrosis. *Thorax* 1987;42:120-125.
- Dent G., Rabe K.F., Magnussen H. Relationship between bronchoalveolar lavage neutrophil numbers and lavage fluid elastase and antielastase activities. *Lung* 1995;173:165-175.
- Doll R., Hill A.B. Mortality in relations to smoking: Ten years observation of British doctors. *Br. Med. J.* 1964;1:1399.

- Dosman J., et al. The use of helium-oxygen mixture during maximum expiratory flow to demonstrate obstruction in small airways in smokers. *J. Clin. Invest.* 1975;55:1090.
- Dragani T.A., Manenti G., Pierotti M.A. Polygenic inheritance of predisposition to lung cancer. *Ann. 1st Super Sanita* 1996;32(1):145-150.
- Drakoulis N., et al. I. Polymorphisms in the human CYP1A1 gene as susceptibility factors for lung cancer; exon-7 mutation (4889A to G), and a T to C mutation in the 3'-flanking region. *Clin. Invest.* 1994;72:240-248.
- Emirgil C., et al. A study of the long-term effect of therapy in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Med.* 1969;47:367.
- Eriksson S., Lindmark B., Lilja H. Familial α 1-antichymotrypsin deficiency. *Acta Med. Scand.* 1986;220:447-453.
- Ferris B.G.Jr., Anderson D.O. The prevalence of chronic respiratory disease in a New Hampshire town. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1962;86:165.
- Field J.K. et al. Microsatellite instability in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br. J. Cancer* 1995;75:1065-1069.
- Finlay G.A., et al. Elevated levels of matrix metalloproteinases in bronchoalveolar lavage fluid of emphysematous patients. *Thorax* 1997;52:502-506.
- Fiore M.C., Piasecki T.M., Baker L.J., Deeren S.M. G1. Cigarette Smoking: The Leading Preventable Cause of Pulmonary Diseases. In: *'The Bone's Pulmonary and Critical Care Medicine Looseleaf* 1997, edited by Bone R.C.

- Fishman A.P., The spectrum of Chronic Obstructiv Pulmonary Disease of the Airways. *In: Mc Graw-Hill eds(sec. ed.). Pulmonary disease and Disorders (vol 2), 1988;1159-1171.*
- Fletcher C.M., Pride N.B. Definitions of emphysema, chronic bronchitis, asthma and airflow obstruction: 25 years on from the Ciba symposium. *Thorax 1984;39:81-85.*
- Fletcher C, et al. The natural history of chronic bronchitis and emphysema:An Eight-Year Study of Early Chronic Obstructiv Lung Disease in Working Men in London. *Oxford, England: Oxford University Press 1976;1-272.*
- Fletcher C.M., Horn D. Smoking and health. *WHO Chron. 1970;24:3445.*
- Folz R.J., Peno-Green L., Crapo J.D. Identification of a homozygous mis-sense mutation (Arg to Gly) in the critical binding region of the human EC-SOD gene (SOD3) and its association with dramatically increased serum enzyme levels. *Hum. Mol. Genet. 1994;3:2251-2254.*
- Frank N.R., Mead J., Ferris B.G.Jr. The mechanical behavior of the lungs in healthy elderly persons. *J. Clin. Invest. 1957;36:1680.*
- Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science 1978;201:875-880.*
- Froudarakis M., Sourvinos G., Fournel P., Bouros D., Vergnon J.M., Spandidos D.A., Siafakas N.M. Microsatellite Instability and loss of heterozygosity at chromosomes 9 and 17 in non-small cell lung cancer. *Chest 1998;113:1091-1094.*
- Fuso L., et al. Predicting mortality of patients hospitalized for acutely exacerbated chronic obstructiv pulmonary disease. *Am. J. Med 1995;98:272-277.*

- Fu Y.H., et al. An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science (Washington DC)*, 1992;255:1256-1258.
- Gadek J.E., Fells G.A., Crystal R.G. Cigarette smoke induces functional antiprotease deficiency in the lower respiratory tract of humans. *Science* 1979;206:1313-1314.
- Gasparini P., et al. The cystic fibrosis gene is not likely to be involved in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1990;2:297-299.
- Goate A., et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 1991;349:704-706.
- Haber J.E., et al. The frequency meiotic recombination in yeast is independent of the number and position of homologous donor sequences: implications for chromosome pairing. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1991;88:1120-1124.
- Hafner J.P. and Ferro T.J. Recent developments in the management of COPD. *Hospital Medicine* 1999;35:3.
- Haines A.P., Imerson J.D., Meade T.W. ABH secretor status and pulmonary function. *Am. J. Epidemiol.* 1982;115:367-370.
- Hajeer A.H., Lazarus M., Turner D., et al. IL-10 gene promoter polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Scand.J. Rheumatol.* 1998;27:142-145.
- Hallet W.Y., Knudson A.G., Massey F.J. Absence of detrimental effect of the carrier state for the cystic fibrosis gene. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1965;90:714-724.
- Hall J.M., et al. Linkage of early onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 1990;250:1684-1689.

- Hames B.D., Hooper N.M., Houghton J.D. Recombinant DNA technology: Polymerase chain reaction (PCR). *In: Bios Scientific Publishers. Instant notes in Biochemistry 1997;16:213-217.*
- Hassett C., et al. Human microsomal epoxide hydrolase: genetic polymorphism and functional expression in vitro of amino acid variants. *Hum. Mol. Genet. 1994;3:421-428.*
- Higgins M.W., et al. Smoking, socioeconomic status and chronic respiratory disease. *Am. Rev. Respir. Dis. 1977;116:403.*
- Higgins M.W., et al. An index of risk for obstructive airways disease. *Am. Rev. Respir. Dis. 1982;125:144-151.*
- Higgins M.W., Keller J.B. Trends in COPD morbidity and mortality in Tecumseh, Michigan. *Am. Rev. Respir. Dis. 1989;140:S42-S48.*
- Hoidal J.R., Fox B.R., LeMarbe P.A., Perri R., Repine J.E. Altered Oxidative Metabolic Responses *in vitro* of Alveolar macrophages from Asymptomatic Cigarette Smokers. *Am. Rev. Respir. Dis. 1981;123:85-89.*
- Holland W.W., Reid D.D. The urban factor in chronic bronchitis. *Lancet 1965;1:445.*
- Holmes S.E., et al. A new retrotransposable human L1 element from the LRE2 locus on chromosome 1q produces a chimaeric insertion. *Nature Genet. 1994;7(2):143-148.*
- Holmes D.S. and Quigley. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem. 1981;114:193.*

- Horne S.L., Cockcroft D.W., Dosman J.A. Possible protective effect against chronic obstructive airways disease by the GC 2 allele. *Hum. Hered.* 1990;40:173-176.
- Howard P. Evolution of the ventilatory capacity in chronic bronchitis. *Br. Med. J.* 1967;3:392.
- Hubbard R.C., et al. Neutrophilic accumulation in the lung in alpha 1-antitrypsin deficiency. Spontaneous release of leucotriene B4 by alveolar macrophages. *J. Clin. Invest.* 1991;88:891-897.
- Hunninghake G.W., Crystal R.G. Cigarette smoking and lung obstruction: accumulation of neutrophils in the lungs of cigarette smokers. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1983;128:833-838.
- Iizuka M., et al. Allelic losses in human chromosome 11 in lung cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 1995;13:40-46.
- Ingbar D.H., Matthay R.A. Possible Prognostic factors for Lung Repair. *Crit. Care Clin* 1986;2:629-665.
- In K.H., et al. Naturally occurring mutations in the human 5-lipoxygenase gene promoter that modify transcription factor binding and reporter gene transcription. *J. Clin. Invest.* 1997;99:1130-1137.
- Ionov Y., et al. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993;363:558-561.
- Jabs E.W., Goble C.A., Cutting G.R. Macromolecular organization of human centromeric regions reveals high frequency, polymorphic macroDNA repeats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989;86:202-206.

- Jamal K., et al. Chronic Bronchitis: Corellation of morphologic findings to sputum production and flow rates. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1984;129:719.
- Janoff A., Carp H., Lee D.K., Drew R.T. Cigarette smoke inhalation decreases alpha1-antitrypsin activity in rat lung. *Science* 1979;206:1313-1314.
- Janus E.D., Phillips N.T., Carell R.W. Smoking, lung function and alpha1-antitrypsin deficiency. *Lancet* 1985;1:152-154.
- Jeffrey P.K. Structural and inflammatory changes in COPD: a comparison with asthma. *Thorax* 1998;158:815-819.
- Jeffreys A.J., et al. *Nature Genet.* 1994;6:136-145.
- John B. and Miklos G.L.G. The Eukaryote Genome in Development and Evolution (Allen and Uwin, London 1988).
- Kannel W.B., Hubert H., Lew E.A. Vital capacity as a predictor of cardiovascular disease: the Framingham Study. *Am. Heart J.* 1983;105:311-315.
- Kauffmann F., Drouet D., Lelouch J. Occupational exposure and 12-year spirometric changes among Paris area workers. *Br. J Int Med* 1982;39:221-232.
- Kauffmann F., et al. Genetics markers in chronic airflow limitation: a genetic epidemiologic study. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1983;127:263-269.
- Keatings V.M., et al. Differences in interleucine-8 and tumor necrosis factor-a in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996;153:530-534.

- Kerem B.S., et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis *Science* 1989;245:1073-1080.
- Kew R.R., Webster R.O. Gc-globulin (vitamin D-binding protein) enhances the neutrophil chemotactic activity of C5a and C5a des Arg. *J.Clin.Invest.* 1988;82:364-369.
- Kiaris H., Spandidos D.A., Jones A.S., Field J.K. Loss of heterozygosity and microsatellite instability of the H-ras gene in cancer of the head and neck. *Int. J. Oncol.* 1994;5:579-582.
- Kilpatrick L., et al. Inhibition of human neutrophil superoxide generation by a1-antichymotrypsin. *J.Immunol.* 1991;146:2388-2393.
- Know O.J., et al. Tumor necrosis factor-induced interleucin 8 expression in cultured human epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 1994;11:L398-405.
- Knudson R.J., et al. The maximal expiratory flow-volume curve: Normal standards, variability, and effects of age. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1976;113:587.
- Knudson R.J., Burrows B., Lebowitz M.D. The maximal expiratory flow-volume curve: Its use in the detection of ventilatory abnormalities in a population study. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1976;14:871.
- Knudson R.J., Lebowitz M.D. Comparison of flow-volume curve and closing volume variables in a random population. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1977;116:1039.
- Kricker M.C., Drake J.W., Radman M. Duplication-targeted DNA methylation and mutagenesis in the evolution of eucaryotic chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992;89:1075-1079.

- Krontiris T.G., et al. An association between the risk of cancer and mutations in the hras1 minisatellite locus. *N. Engl. J. Med.* 1993;329:517-523.
- Krzyanowski M., Jedrychowski W. Occupational exposure and incidence of chronic respiratory symptoms among residents of Cracow followed for 13 years. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 1990;62:311-317.
- Kong G.K., Melman M.J. and Weingarten S. Reducing length of stay for patients hospitalized with exacerbation of COPD by using a practice guideline. *Chest* 1997;111:89-94.
- Koren H.S., et al. Ozone-induced inflammation in the lower airways of human subjects. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1989;139:407.
- Koreth J., et al. Microsatellites and PCR genomic analysis. *J. Pathology* 1996;178:239-248.
- Kory R.C., et al. The Veterans Administration-Army Cooperative Study of Pulmonary Function: I. Clinical spirometry in normal men. *Am. J. Med.* 1961;30:243.
- Kroeger K.M., Carville K.S., Abraham L.J. The -308 tumor necrosis factor- α promoter polymorphism effects transcription. *Mol. Immunol.* 1997;34:391-399.
- Kueppers F., et al. Familial prevalence of chronic obstructive pulmonary disease in a matched pair study. *Am. J. Med.* 1977;63:336-342.
- Lacraz S., et al. IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. *J. Clin. Invest.* 1995;96:2304-2310.

- Lacoste J.Y., et al. Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma, chronic bronchitis, and chronic obstructive pulmonary disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1993;92:537-548.
- LAIA: Lung & Asthma Information Agency. Sickness absence from respiratory disease. London St. George Hospital Medical School. Factsheet 92/4.
- Lakich D., Kazarian H.H., Antonarakis S.E., Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nature Genet.* 1993;3:236-341.
- Laurell C.B., Eriksson S. The electrophoretic alpha1-globulin pattern of serum in alpha1-antitrypsin deficiency. *Scand. J. Clin. Invest.* 1963;15:132-140.
- Lee W.H., et al. Human retinoblastoma susceptibility gene:cloning, identification and sequence. *Science* 1987;235:1394-1399.
- Lim S., et al. Haplotype associated with low interleukin-10 production in patients with severe asthma. *Lancet* 1998;352:113.
- Lindmark B.E., Arborelius M., Eriksson S.G. Pulmonary function in middle-aged women with heterozygous deficiency of the serine protease inhibitor alpha1-antichymotrypsin. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1990;141:884-888.
- Lindmark B., Svenonius E., Eriksson S. Heterozygous alpha1-antichymotrypsin and PiZ alpha1-antitrypsin deficiency:prevalence and clinical spectrum in asthmatic children. *Allergy* 1990;45:197-203.
- Linn W.S., et al. Respiratory function and symptoms in urban office workers in relation to oxidant air pollution exposure. *Am. Rev. Respir. Dis* 1976;114:477.

- Liu B., et al. Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. *Nature Genet.* 1994;9:48-55.
- Loeb L.A. Microsatellite instability: Marker of a Mutator Phenotype in Cancer. *Cancer Res.* 1994;54:5059-5063.
- Louis E., et al. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF- α production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. *Clin. Exp. Immunol.* 1998;113:401-406.
- Lucey E.C., Stone P.J., Snider G.L. Consequences of proteolytic injury. In: Crystal R.G., Barnes P.J., West J.B., et al, eds. *The Lung: scientific foundations (vol 20)* . Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997;2237-2250.
- Luster A.D. Chemokines: chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N. Engl. J. Med.* 1998;338:436-445.
- Lynch H.T., et al. Hereditary non-polyposis colorectal cancer (Lynch syndromes I & II). Genetics, pathology, natural history, and cancer control, Part I. *Cancer Genet. Cytogenet* 1991;53:143-160.
- MacNee W. Neutrophil traffic and COPD. *Eur. Respir. Rev.* 1997;7(43):124-127.
- Mao L., et al. Clonal genetic alterations in the lungs of current and former smokers. *J. Natl. Cancer Inst.* 1997;89(12):857-862.
- Mao L., et al. Molecular detection of primary bladder cancer by microsatellite analysis. *Science* 1996;271:659-662.
- Mao L., et al. Microsatellite alteration as clonal markers for the detection of human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1994;91:9871-9875.

- Marcus E.B., et al. Pulmonary function as a predictor of coronary heart disease. *Am. J. Epidemiol.* 1989;129:97-104.
- Markowitz S., et al. Inactivation of the type II TGF- β receptor in colon cancer cell with microsatellite instability. *Science* 1995;268:1336-1338.
- Medical Research Council. Definition and classification of chronic bronchitis clinical and epidemiological purposes: a report to the Medical Research Council by their committee on the etiology of chronic bronchitis. *Lancet* 1965;1:775-780.
- Merlo A., et al. Frequent microsatellite instability in primary small cell lung cancer. *Cancer Res.* 1994;54:2098-2101.
- Mitchell R.S., et al. The morphologic features of the bronchi, bronchioles, and alveoli in chronic airway obstruction: A clinicopathologic study. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1976;114:137.
- Mitchell R.S., Filley G.F. Chronic obstructiv bronchopulmonary disease:I. Clinical features. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1964;89:360.
- Mornex J.F., et al. Expression of the alpha1-antitrypsin gene in mononuclear phagocytes of normal and alpha1-antitrypsin deficient individuals. *J. Clin. Invest* 1986;77:1952-1961.
- Morris J.F., Koski A., Johnson L.C. Spirometric standards for healthy nonsmoking adults. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1971;103:57.
- Mosher D.F., Wing W.A. Synthesis and secretion of a2-macroglobulin by cultured human fibroblasts. *J. Exp. Med.* 1976;143:462-467.

- Murakami Y., et al. Localization of tumor suppressor activity important in non-cell lung carcinoma on chromosome 11q. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1998;95:8153-8158.
- Nakamura Y., et al. Cigarette smoke inhibits lung fibroblast proliferation and chemotaxis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1995;151:1497-1503.
- Nathan C.F., Bruckner L.H., Silverstein S.C., Cohn Z.A. Extracellular cytotoxicity by activated macrophages and granulocytes. II. Hydrogen peroxide as a mediator of cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 1979;149:100-113.
- Niewoehner D.E. Clinical aspects of chronic obstructiv pulmonary disease. *In: Baum G.L., Wolinsky E., eds. Textbook of pulmonary disease (vol. 2). Boston:Little Brown, 1993;995-1027.*
- Niewoehner D.E., Kleinerman J., Rice D.B. Pathologic changes in the peripheral airways of young cigarette smokers. *N. Engl. J. Med.* 1974;291:755.
- Ochman H., Wilson A.C. Evolution in bacteria: evidence for a universal rate in cellular genomes. *J. Mol. Evol.* 1987;26:74-86.
- O'Byrne P.M., Postma D.S. The Many Faces of Airway Inflammation: Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1999;159:S41-S66.
- O'Connor G.T., Sparrow D., Weiss S.T. The role of allergy and nonspecific airway hyperresponsiveness in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1989;140:225.
- O'Keefe S., et al. Immunoglobulin G subclasses and spirometry in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur. Respir. J.* 1991;4:932-938.

- Orgel L.E., Crick F.H., Sapienza C. Selfish DNA. *Nature* 1980;288 (5792):645-646.
- Owen M.C., et al. Mutation of antitrypsin to antithrombin: a1-antitrypsin Pittsburgh (358met arg), a fatal bleeding disorder. *N. Engl. J. Med.* 1983;309:694-698.
- Oxelius V.A., et al. IgG subclasses in selective IgA deficiency. *N. Engl. J. Med.* 1981;304:1476-1477.
- Oxhoj H., Bake B., Wilhelmsen L. Ability of spirometry, flow-volume curves and the nitrogen closing volume test to detect smokers: A population study. *Scand. J. Respir. Dis.* 1977;58:80.
- Papadopoulos N., et al. Mutation of a *mutL* homolog in hereditary colon cancer. *Science* 1993;263:1625-1629.
- Parsons R., et al. Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER+ tumour cells. *Cell* 1993;75:1227-1236.
- Peltomaki P., et al. Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science* 1993;260:810-812.
- Petit M.A., et al. Control of chromosomal rearrangements in E.Coli by the mismatch repair system. *Genetics* 1991;129:327-332.
- Peto R., et al. The relevance in adults of air-flow obstruction, but not mucus hypersecretion, to mortality from chronic lung disease. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1983;128:491.
- Petty T.L., Weinmann G.G. Building a national strategy for the prevention and management of and research in chronic obstructive pulmonary disease. *JAMA* 1997;277:246-253.

- Picken J.J., Niewoehner D.E., Chester E.H. Prolonged effects of viral infections of the upper respiratory tract upon small airways. *Am. J. Med.* 1972;52:738.
- Pignatti P.F., et al. CFTR gene variant IVS8-5T in disseminated bronchiectasis. *Am. J. Hum. Genet.* 1996;58:889-892.
- Poller W., et al. Mis-sense mutation of a1-antichymotrypsin gene associated with chronic lung disease. *Lancet* 1992;339:1538.
- Poller W., et al. A leucine-toproline substitution causes a defective a1-antichymotrypsin allele associated with familial obstructive lung disease. *Genomics* 1993;17:740-743.
- Polymeropoulos M.H., et al. Dinucleotide repeat polymorphism at the human ankyrin gene (ANK1). *Nucleic Acids Res.* 1991;19(4):969.
- Radman M. Avoidance of inter-repeat recombination by sequence divergence and a mechanism of neutral evolution. *Biochimie* 1991;73:357-361.
- Radman M., Wagner R. Mismatch recognition in chromosomal interactions and speciation. *Chromosoma* 1993;102:369-373.
- Raza M.W., et al. Association between secretor status and respiratory viral illness. *Br. Med. J.* 1991;303:815-818.
- Rayssiguier C., Thaler D.S., Radman M. The barrier to recombination between *Escherichia coli* and *Salmonella typhirium* is disrupted in mismatch-repair mutants. *Nature* 1989;342:396-401.
- Reid L.M. Pathology of chronic bronchitis. *Lancet* 1954;1:275.

- Reid L. Measurement of the bronchial mucous gland layer: A diagnostic yardstick in chronic bronchitis. *Thorax* 1960;15:132.
- Rennard S., et al. Is asthma an epithelial disease? *Chest* 1995;107(suppl):127-131.
- Rennard I. Stephen. COPD: Overview of Definitions, Epidemiology, and Factors Influencing Its Development. *Chest* 1998;113:S235-S241.
- Repine J.E., Bast A., Lankhorst I. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997;156:341-357.
- Rhounim L., Rossignol J.L., Faugeron G. Epimutation of repeated genes in *Ascolobus immersus*. *EMBO J.* 1992;11:4451-4457.
- Richards R.I., Sutherland G.R. Simply repeat DNA is not replicated simply. *Nature Genet.* 1994;6:114-116.
- Risinger J.I., et al. Genetic instability of microsatellites in endometrial carcinoma. *Cancer* 1993;53:5100-5103.
- Roman J.R., MacDonald J.A. Cellular processes in lung repair. *Chest* 1991;100:245-248.
- Sacks T., Moldow F., Craddock P.R., Bowes T.K., Jacob H.S. Oxygen radicals mediate endothelial cell damage by complement-stimulated granulocytes: An *in vitro* model of immune vascular damage. *J. Clin. Invest.* 1978;61:1161-1167.
- Saetta M., et al. CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998;157:822-826.

- Saetta M., Finkenlstein R., Cosio M.G. Morphological and cellular basis for airflow limitation in smokers. *Eur. Respir. J.* 1994;7:1505-1515.
- Sahebajami H., Domino M. Effects of starvation and refeeding on elastase-induced emphysema. *J. Appl. Physiol.* 1989;66:2611-2616.
- Sahebajami H., et al. Anthropometric and pulmonary function test profiles of outpatients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Med.* 1993;94:469-474.
- Sallenave J.M., et al. Regulation of secretory leucocyte proteinase inhibitor (SLPI) and elastase specific inhibitor (ESI/Elafin) in human airway epithelial airway cells by cytokines and neutrophilic enzymes *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1994;11:733-741.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Gel Electrophoresis of DNA: Polyacrylamide Gel Electrophoresis. In: Cold Spring Harbor Laboratory Press (2nd ed.). *Molecular Cloning: A laboratory Manual* 1989;1:6.36-6.44.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Gel Electrophoresis of DNA: Agarose Gel Electrophoresis. In: Cold Spring Harbor Laboratory Press (2nd ed.). *Molecular Cloning: A laboratory Manual* 1989;1:6.3-6.13.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Commonly Used Techniques in Molecular Cloning: Purification of Nucleic Acids. In: Cold Spring Harbor Laboratory Press (2nd ed.). *Molecular Cloning: A laboratory Manual* 1989;3:E3-E11.
- Sandstrom J., et al. Tenfold increase in human plasma extracellular superoxide dismutase content caused by a mutation in heparin-binding domain. *J. Biol. Chem.* 1994;269:19163-19166.

- Sanford A.J., Weir T.D., Pare P.D. Genetic risk factors for chronic obstructive pulmonary disease. *Eur. Respir. J.* 1997;10:1380-1391.
- Schachter F., et al. Genetic associations with human longevity at the apolipoprotein E and angiotensin converting enzyme loci. *Nature Genet.* 1994;6:29-32.
- Schlotterer C., Tautz D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res.* 1992;20:211-215.
- Schunkert H., et al. Association between a deletion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene and left ventricular hypertrophy. *N. Engl. J. Med.* 1994;330:1634-1638.
- Selker EU. Premeiotic instability of repeated sequences in *Neurospora crassa*. *Annu. Rev. Genet.* 1990;24:579-613.
- Seneff M.G., Wagner D.P., Wagner R.P., Zimmerman J.E., Knaus W.A. Hospital and 1-year survival of patients admitted to intensive care units with acute exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *JAMA* 1995;274(23):1852-1857.
- Shapiro S.D. Elastolytic metalloproteinases produced by human mononuclear phagocytes. Potential roles in destructive lung disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1994;150:S160-164.
- Sharp J.T., et al. A longitudinal study of bronchitic symptoms and spirometry in a middle-aged, male industrial population. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1973;108:1066.
- Sherril D.L., Lebiwitz M.D., Burrows B. Epidemiology of COPD. *Clin. Chest Med.* 1990;11:375-388.

- Shrider V., et al. Genetic instability of microsatellite sequences in many non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res.* 1994;15:54(8):2084-2087.
- Siafakas N.M., Tzortzaki E.G., Sourvinos G., Bouros D., Tzanakis N., Kafatos A., Spandidos D. Microsatellite DNA Instability in COPD. *Chest* 1999;116(1):47-51.
- Siafakas N.M., Tzortzaki E.G., Hatzistamou J., Bouros D., Markatos M., Ergazaki M., Kiaris H., Spandidos D. Microsatellite DNA Instability (MI) in cytological specimens from patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Am. J., Respir. Crit. Care Med.* 1996;153(4):A50.
- Siafakas N.M., Vermeire P., Pride N.B., Paoletti P., Gibson J., Howard P., Yernault J.C., Decramer M., Higenbottam T., Postma D. S., Rees J. Optimal assesment and management of Chronic Obstructiv Pulmonary Disease (COPD). Consensus statement. *Eur. Respir. J.* 1995;8:1398-1420.
- Simon H.U., et al. Direct demonstation of delayed eosinophil apoptosis as a mecanism causing tissue eosinophilia. *J.Immunol.* 1997;158:3902-3908.
- Smith C.A.D., Harrison D.J. Association between polymorphism in gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema. *Lancet* 1997;350:630-633.
- Snell R.G., et al. Relationship between trinucleotide repeat expansion and phenotyping variation in Huntigton's disease. *Nat. Genet.* 1993;4:393-397.
- Snider G.L., Faling L.J., Rennard S.I. Chronic bronhitis and emphysema. In: Murray J.F., Nadel J.A. *Textbook of respiratory medicine (vol 2)*. Philadelphia: WB Saunders, 1994;1331-1397.

- Snyder L.S., et al. Failure of lung repair following acute lung injury. Regulation of fibroproliferative response. *Chest* 1990;98:733-738,989-993.
- Spandidos D.A., Ergazaki M., Hatzistamou J., Kiaris H., Bouros D., Tzortzaki E.G., Siafakas N.M. Microsatellite instability in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Oncology Reports* 1996;3:489-491.
- Σπαντίδος Δ.Α., Λιλόγλου Τ., Εργαζάκη Μ. Εφαρμογή της τεχνικής της αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράση (PCR) για την ανίχνευση ιών. *Εφαρμοσμένη Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διαγνωστική* 1994;9(2):98-103).
- Sparrow D., et al. The influence of age and level of pulmonary function on nonspecific airway responsiveness. The Normative Aging Study. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1991;143:978.
- Spector D.M., et al. Effects of ambient ozone on respiratory function in active normal children. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1988;137:313.
- Spector D.M., et al. Effects of ambient ozone on respiratory function in healthy adults exercising outdoors. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1988;138:821.
- Stenbjerg S. Inherited α₂-macroglobulin deficiency. *Thrombosis Res.* 1981;22:491-495.
- Stephan W. Tandem-repetitive noncoding DNA: formes and forces. *Molec. Biol. Evol.* 1989;6(2):198-212.
- Stockley R.A. The role of proteinases in the pathogenesis of chronic bronchitis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1994;150:S109-113.

- Stordeur P., Goldman M. Interleukin-10 as a regulatory cytokine induced by cellular stress: molecular aspects. *Int. Rev. Immunol.* 1998;16:501-522.
- Strachan T. and Read A.P. Mutation and Instability of human DNA. *In BIOS Scientific Publ.* 1996 (reprinted 1998): *Human Molecular Genetics* (10)241-273.
- Strand M., et al. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature* 1993;365:274-276.
- Sugiyama Y., et al. Analysis of HLA antigens in patients with diffuse panbronchiolitis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1990;141:1459-1462.
- Sutherland G.R., et al. Simple tandem DNA repeats and human genetic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995;92:3636-3641.
- Tamura K., Zhang X., et al. Deletion of three distinct regions on chromosome 13q in human non-small cell lung cancer. *Int. J. Cancer* 1997;74(1):45-49.
- Thiboteau S.N., et al. Microsatellite instability in cancer of proximal colon. *Science* 1993;260:816-819.
- Thomas D.C., Umar A., Kunkel T. Microsatellite instability and mismatch repair defects in cancer cells. *Mutation Research* 1996;350:201-205.
- Thurlbeck W.M., et al. Chronic obstructive lung disease: A comparison between clinical roentgenologic, functional, and morphologic criteria in chronic bronchitis, emphysema, asthma, and bronchiectasis. *Medicine* 1970;49:81.
- Tockman M., et al. A comparison of pulmonary function in male smokers and nonsmokers. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1976;114:711.

- Tockman M.S., et al. Airways obstruction and the risk for lung cancer. *Ann. Intern. Med.* 1987;106:512-518.
- Tockman M.S., et al. Rapid decline in FEV1: a new risk factor for coronary heart disease mortality. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1995;151:390-398.
- Tomfohrde J., et al. Gene for familial psoriasis susceptibility mapped to distal end of human chromosome 17q. *Science* 1994;264:1141-1145.
- Turato G., et al. Effect of smoking cessation on airway inflammation in chronic bronchitis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1995;152:1262-7.
- Turner J., Mead J., Wohl M.E. Elasticity of human lungs in relation to age. *J. Appl. Physiol* 1968;25:664.
- Tzortzaki E.G., Sourvinos G., Bouros D., Spandidos D., Siafakas N.M. Microsatellite DNA Instability is common in COPD and not in non-COPD smokers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997;155(4):A587.
- Tzortzaki E.G., Sourvinos G., Bouros D., Spandidos D., Siafakas N.M. Microsatellite DNA Instability in COPD patients and not in non-COPD smokers. *Eur. Respir. J.* 1997;10(25):486s.
- Tzortzaki E.G., Hatzistamou J., Bouros D., Prinianakis G., Ergazaki M., Kiaris H., Spandidos D., Siafakas N.M. Microsatellite DNA Instability (MI) in cytological specimens from patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Eur. Respir. J.* 1996;9(23):283s.
- Tzortzaki E.G., Hatzistamou J., Bouros D., Markatos M., Ergazaki M., Kiaris H., Spandidos D., Siafakas N.M. Microsatellite DNA Instability in Cytological specimens

from patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). *Pneumon* 1996;1:9.

- Vestbo J., et al. Genetic markers for chronic bronchitis and peak expiratory flow in the Copenhagen Male Study. *Dan. Med. Bull.* 1993;40:378-380.
- Viegi G., et al. Prevalence of respiratory symptoms in an unpolluted area of Northern Italy. *Eur. Respir. J.* 1988;1:311-318.
- Vrugt B., Aalbers R. Inflammation and bronchial hyperresponsiveness in allergic asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Respir. Med.* 1993;87:3-7.
- Wada C., et al. Genomic instability of microsatellite repeats and its association with the evolution of chronic myelogenous leucemia. *Blood* 1994;83:3449-3456.
- Welch M.J., et al. The Metabolic Basis of Inherited Disease. In: Scriver C.L., Beaudel A.L., Sly W.S., Valle D., eds. New York, McGraw-Hill Inc. 1995;3799-3876.
- Weibel E.R., Taylor C.R. Functional design of the human lung for gas exchange. In : Mc Graw-Hill eds(3rd. ed.) *Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders* 1998 1;2:21-61.
- Weissenbach J. Microsatellite polymorphisms and the genetic linkage map of the human genome. *Curr. Op. Genet. Dev.* 1993;3(3):414-417.
- Wilkie P.J., Weber J.L. Mapping of short tandem repeat polymorphisms on human chromosome 3. *Genomics* 1994;19(1):167-169.

- Wilson A.G., et al. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor a promoter on transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997;94:3195-3199.
- Wistuba I., et al. Allelic losses at chromosome 8p21-23 are early and frequent events in the pathogenesis of lung cancer. *Cancer Res.* 1999;59(8):1973-1979.
- White E. Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Gene Dev.* 1996;10:1-15.
- White R., Janoff A., Godfrey H.P. Secretion of a2-macroglobulin by alveolar macrophages. *Lung* 1980;158:9-14.
- Woolf C.R., Suero J.T. The respiratory effects of regular cigarette smoking in women. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1971;103:26.
- Wooley K.L., et al. Eosinophil apoptosis and the resolution of airway inflammation in asthma. *Am. J. Crit. Care Med.* 1996;154:237-243.
- Wooster R., et al. Instability of short tandem repeats (microsatellites) in human cancer. *Nature Genet.* 1994;6:152-156.
- Yamamoto C., et al. Airway inflammation in COPD assessed by sputum levels of interleucine-8. *Chest* 1997;112:502-510.
- Yamamoto N., Homma S. Vitamin D-binding protein (group specific component) is a precursor for the macrophage-activating signal factor from lysophosphatidyl-choline-treated lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991;88:8539-8543.
- Yasuda N., et al. An increase of soluble Fas, an inhibitor of apoptosis, associated with progression of COPD. *Resp. Med.* 1998;92:993-999.

- Yee C.J., et al. Microsatellite instability and loss of heterozygosity in breast cancer. *Cancer Res.* 1994;54:1641-1644.
- Yu S., et al. Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA. *Science (Washington DC)*, 1991;252:1179-1181.

Κατάλογος Δημοσιευμένων Εργασιών

- Siafakas N.M., **Tzortzaki E.G.**, Sourvinos G., Bouros D., Tzanakis N., Kafatos A., Spandidos D. Microsatellite DNA Instability in COPD. *Chest* 1999;116(1):47-51.
- **Tzortzaki E.G.**, Sourvinos G., Bouros D., Spandidos D., Siafakas N.M. Microsatellite DNA Instability is common in COPD and not in non-COPD smokers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997;155(4):A587.
- **Tzortzaki E.G.**, Sourvinos G., Bouros D., Spandidos D., Siafakas N.M. Microsatellite DNA Instability in COPD patients and not in non-COPD smokers. *Eur. Respir. J.* 1997;10(25):486s.
- **Tzortzaki E.G.**, Hatzistamou J., Bouros D., Prinianakis G., Ergazaki M., Kiaris H., Spandidos D., Siafakas N.M. Microsatellite DNA Instability (MI) in cytological specimens from patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Eur. Respir. J.* 1996;9(23):283s.
- **Tzortzaki E.G.**, Hatzistamou J., Bouros D., Markatos M., Ergazaki M., Kiaris H., Spandidos D., Siafakas N.M. Microsatellite DNA Instability in Cytological specimens from patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). *Pneumon* 1996;1:9.
- Spandidos D.A., Ergazaki M., Hatzistamou J., Kiaris H., Bouros D., **Tzortzaki E.G.**, Siafakas N.M. Microsatellite instability in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Oncology Reports* 1996;3:489-491.
- Siafakas N.M., **Tzortzaki E.G.**, Hatzistamou J., Bouros D., Markatos M., Ergazaki M., Kiaris H., Spandidos D. Microsatellite DNA Instability (MI) in cytological

specimens from patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Am. J., Respir. Crit. Care Med.* 1996;153(4):A50.

- Siafakas N.M., **Tzortzaki E.G.**, Bouros D. Acute exacerbation of COPD. Proceedings of the 8th European Congress of Intensive Care Medicine. 1995;8:141-146.
- **Tzortzaki E.G.**, Hatzistamou J., Bouros D., Markatos M., Ergazaki M., Kiaris H., Spandidos D., Siafakas N.M. (1996). Microsatellite DNA Instability in cytological specimens from patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). VIII Hellenic Congress on Thoracic Disease Athens, Greece.
- **Tzortzaki E.G.**, Prinianakis G., Bouros D., Ergazaki M., Spandidos D., Siafakas N.M. (1996). Microsatellite DNA Instability in cytological specimens from patients with COPD. VIII Cretan Medical Conference, Crete, Greece.
- Hatzistamou J., Ergazaki M., Kiaris H., **Tzortzaki E.G.**, Siafakas N.M. and Spandidos D. (1995). Microsatellite DNA Instability in patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. 1st World Congress on Advances in Oncology, Athens, Greece.