

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΟΛΟΓΙΑΣ
(Καθ.Δ.Α.Σπαντίδος)**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗΣ
ΤΟΥ DNA ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ ΚΑΙ ΙΔΙΟΠΑΘΗ
ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΙΝΩΣΗ.**

**ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΥ ΚΩΣΤΟΥΛΑ
ΙΑΤΡΟΣ**

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2003

Στους γονείς μου.

Στον αξιότιμο Καθηγητή μου
Δ.Α.Σπαντίδο.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	
ABSTRACT	
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ:

ΔΙΑΧΥΤΕΣ ΔΙΑΜΕΣΕΣ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΕΣ

1.1. ΓΕΝΙΚΑ.....	14
1.2. ΟΡΙΣΜΟΣ.....	14
1.3. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ.....	15
1.4. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ.....	15
1.4.1 ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΚΗ.....	15
1.4.2 ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ.....	18
1.5 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ.....	18
1.5.1. ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΔΙΑΜΕΣΟΥ ΙΣΤΟΥ.....	18
1.5.2 ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑ ΔΙΑΜΕΣΟΥ ΙΣΤΟΥ.....	20
1.5.3 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ.....	21
1.6 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΗ.....	23
1.7 ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ.....	23
1.8 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ-ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΤΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ.....	24
1.9 ΠΡΟΓΝΩΣΗ.....	25
1.10 ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ.....	25

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ:

ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ

2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΟΡΙΣΜΟΣ.....	26
2.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ.....	27
2.3 ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ.....	27
2.4 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ-ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ.....	29
2.5 ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ.....	32
2.6 ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ.....	33
2.7 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ-ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΤΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ.....	35
2.8 ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΝΕΥΜΟΝΑ.....	35
2.9 ΓΕΝΕΤΙΚΗ.....	36
2.10 ΔΙΑΓΝΩΣΗ-ΠΡΟΓΝΩΣΗ.....	38

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ:**ΙΔΙΟΠΑΘΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΙΝΩΣΗ**

3.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ- ΟΡΙΣΜΟΣ.....	39
3.2. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ.....	41
3.3. ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ.....	42
3.4. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ-ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ.....	43
3.5. ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ.....	46
3.6. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ	48
3.7. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ-ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΤΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ.....	49
3.8. ΠΡΟΓΝΩΣΗ.....	50
3.9. ΙΔΙΟΠΑΘΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΙΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΝΕΥΜΟΝΑ.....	50
3.10.ΓΕΝΕΤΙΚΗ.....	52

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ:**ΓΕΝΕΤΙΚΗ**

4.1. ΓΕΝΙΚΑ.....	54
4.2. ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΑ.....	55
4.3. ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΣΤΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ.....	57
4.4. ΓΟΝΙΔΙΑ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗΣ ΤΟΥ DNA.....	59
4.5. ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΟ DNA.....	60
4.6. ΑΠΩΛΕΙΑ ΕΤΕΡΟΖΥΓΩΤΙΑΣ.....	61
4.7. ΑΣΤΑΘΕΙΑ ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΟΥ DNA.....	62
4.8. ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ ΣΕ ΑΛΛΕΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ.....	64

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**I.ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΠΡΩΤΟ****ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΕΜΠΤΟ:****ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ**

5.1 ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ-ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΑΣΘΕΝΩΝ.....	66
5.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ.....	67
5.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΠΤΥΕΛΑ.....	68
5.4 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ(PCR).....	68
5.4.1. Αρχές μεθόδου	
5.4.2. Ρυθμιστικοί παράγοντες της PCR	
5.4.3. Ρυθμιστικά διαλύματα της PCR	
5.4.4. Σχεδιασμός εκκινητών	
5.4.5. Συνθήκες των αντιδράσεων της PCR	
5.5 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΟΥ DNA.....	81
5.6 ΧΡΩΣΗ ΤΟΥ DNA ΜΕ ΝΙΤΡΙΚΟ ΑΡΓΥΡΟ.....	81
5.7 ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΛΟΥΤΥΠΟΥ ΜΕ ΔΕΙΚΤΕΣ ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΟΥ DNA.....	82
5.8 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	83

5.9 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ-ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΕΙΚΟΝΑΣ.....	83
5.10 ΕΤΑΙΡΕΙΕΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΥΛΙΚΩΝ.....	84

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΤΟ:

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1. ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΑΛΛΟΙΩΣΕΩΝ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΟΥ DNA ΣΤΗΝ ΙΔΙΟΠΑΘΗ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΙΝΩΣΗ.....	86
---	-----------

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΒΔΟΜΟ:

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

7.1 ΙΔΙΟΠΑΘΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΙΝΩΣΗ.....	90
--	-----------

II. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΟΓΔΟΟ:

ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

8.1.ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ-ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΑΣΘΕΝΩΝ.....	95
8.2.ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ....	96
8.3.ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΠΤΥΕΛΑ.....	97
8.4.ΑΛΥΣΙΑΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ(PCR).....	97
8.4.1. Αρχές μεθόδου	
8.4.2. Ρυθμιστικοί παράγοντες της PCR	
8.4.3. Ρυθμιστικά διαλύματα της PCR	
8.4.4. Σχεδιασμός εκκινητών	
8.4.5. Συνθήκες των αντιδράσεων της PCR	
8.5 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΟΥ DNA.....	110
8.6. ΧΡΩΣΗ ΤΟΥ DNA ΜΕ ΝΙΤΡΙΚΟ ΑΡΓΥΡΟ.....	111
8.7. ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΛΟΥΤΥΠΟΥ ΜΕ ΔΕΙΚΤΕΣ ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΟΥ DNA.....	112
8.8. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	112
8.9. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ-ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΕΙΚΟΝΑΣ.....	113
8.10. ΕΤΑΙΡΕΙΕΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΥΛΙΚΩΝ.....	114

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΝΑΤΟ:

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

9.1. ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΑΛΛΟΙΩΣΕΩΝ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΟΥ DNA ΣΤΗ ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ.....	116
--	------------

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΚΑΤΟ:**ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ****10.1.ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ.....124****ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....127****ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ160**

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΑΤΟΜΙΚΑ ΚΑΙ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

ΟΝΟΜΑ	ΚΩΣΤΟΥΛΑ
ΕΠΩΝΥΜΟ	ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΥ
ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ	30/11/1974
ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ	ΣΠΑΡΤΗ ΛΑΚΩΝΙΑΣ
ΕΠΑΓΓΕΛΜΑ	ΙΑΤΡΟΣ, ΕΙΔΙΚΕΥΟΜΕΝΗ ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΟΝ «ΕΥΑΓΓΕΛΙΣΜΟ»
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ	ΕΓΓΑΜΗ ΜΕ ΤΟ ΓΙΑΤΡΟ ΠΑΝΤΑΖΗ ΣΤΑΘΗ
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΚΑΤΟΙΚΙΑΣ	ΔΑΒΑΡΗ 61,Ν.ΚΟΣΜΟΣ,ΑΘΗΝΑ
ΤΗΛΕΦΩΝΑ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΣ	2109012263,6977489102
E-MAIL	koustoula@med.uoc.gr

ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΗ ΜΟΡΦΩΣΗ

1993-1999 ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΤΟΥ ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ(Α.Π.Θ) με βαθμό πτυχίου «Λίαν Καλώς»(8).

2000 ΑΝΑΛΗΨΗ ΕΚΠΟΝΗΣΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ ΣΤΟ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΙΑΤΡΙΚΟΥ
ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ ΜΕ ΘΕΜΑ
:ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΣΤΑΘΕΙΑΣ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΟΥ DNA
ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ ΚΑΙ ΙΔΙΟΠΑΘΗ
ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΙΝΩΣΗ υπό την επίβλεψη του καθηγητή
Δ.Α.Σπαντίδου.

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

Αγγλικά Πτυχίο First Certificate in English
Γαλλικά Πτυχίο Certificat

ΆΛΛΑ ΠΡΟΣΟΝΤΑ

Χρήση Η/Υ(Πτυχίο European Computer Driving Licence)

ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

1998-1999 : Τρίμηνη εκπαίδευση στην Πανεπιστημιακή Χειρουργική Κλινική του
Νομαρχιακού Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης “Γ.Γεννηματάς”

1999 : Τρίμηνη εκπαίδευση στην Γ΄ Παθολογική Κλινική και
Β΄ Παιδιατρική Κλινική του Ιπποκρατείου Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης

1999-2000 : Άσκηση υπηρεσίας υπαίθρου με απόσπαση στην Παθολογική Κλινική του Γ.Ν.Ν.Σπάρτης ,εφημερίες στο Μικροβιολογικό Εργαστήριο

2001-2002 : Ειδικευόμενη Βιοπαθολογίας στο Γ.Ν.Ν.Σπάρτης.

2002- : Ειδικευόμενη Βιοπαθολογίας στο Νοσοκομείο «Ευαγγελισμός»

ΕΡΓΑΣΙΕΣ ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΕΣ

1. Ηπατική ανεπάρκεια
2. Λοιμώδης μονοπυρήνωση
3. Φαρμακευτική αντιμετώπιση υπερλιπιδαιμιών και της αθηρωμάτωσης
4. Πρόωρος τοκετός και τοκολυτικά φάρμακα
5. Παρουσία αυτοαντισωμάτων σε τυχαίο δείγμα φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος

ΕΡΓΑΣΙΕΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΕΣ

1. Καταγραφή αιωνόβιων της Λακωνίας σε συνεργασία με το Ινστιτούτο βιολογίας του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος «Οι αιωνόβιοι του Ελλαδικού χώρου. Δεδομένα υγείας και διαβίωσης».

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Genetic instability in pulmonary sarcoidosis (παρουσιάστηκε στο 4th International Symposium on Molecular Medicine)
2. A study of Salmonella spp. isolates from 1990 to 2000, Laconia, Greece.(παρουσιάστηκε στο 12th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases-Milan-Italy-2002)

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

3. Η κλινική μας εμπειρία με την Εγκρατή Ορθότοπη Νεοκύστη κατά Hautmann.
4. Μελέτη μικροβιακών στελεχών απομονωθέντων από δείγματα ούρων εξωτερικών ασθενών σε Νομαρχιακό Νοσοκομείο.
5. Ο επιπολασμός της ηπατίτιδας C σε εθελοντές αιμοδότες του νομού Λακωνίας: Καταγραφή των τελευταίων πέντε (5) ετών.
6. Ο επιπολασμός της ηπατίτιδας B σε εθελοντές αιμοδότες του νομού Λακωνίας: Καταγραφή των τελευταίων πέντε (5) ετών.
7. Σύγχρονη διάγνωση 3 πρωτοπαθών Καρκίνων Διαφορετικού Ιστολογικού τύπου σε άνδρες ασθενείς.

8. Οξεία εστιακή βακτηριακή νεφρίτιδα ή νεφρικό απόστημα: μια υπερηχοτομογραφική διάγνωση(παρουσιάστηκε στο 16^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο).

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. **Kostoula Demopoulos**, Demetrios A. Arvanitis, Dimitrios A. Vassilakis, Nikolaos M. Siafakas, Demetrios A. Spandidos. MYCL1 ,FHIT ,SPARC, p16^{INK4} and TP53 genes associated to lung cancer in idiopathic pulmonary fibrosis. J.Cell.Mol.Med.Vol 6,No 2,2002 pp.215-222.
2. **Kostoula Demopoulos**, Demetrios A. Arvanitis, Dimitris A. Vassilakis , Nikolaos M. Siafakas and Demetrios A. Spandidos .Genomic instability on hMSH2, hMLH1, CD48 and IRF4 loci in pulmonary sarcoidosis.International Journal of Biological Markers,Vol.17, No.4,pp.224-230.

ΔΙΔΑΚΤΙΚΟ ΕΡΓΟ

1999-2000 Διδασκαλία στα ΙΕΚ Σπάρτης στα μαθήματα «Βασικές Βιολογικές Έννοιες-Φυσιολογία» και «Αποστειρώσεις και Σκεύη Εργαστηρίου» .

ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΕΙΣ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ

- 6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γεροντολογίας-Γηριατρικής
- 5ο και 6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογίας
- 2^ο, 3^ο 4^ο και 5^ο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος
- 11^ο Πανελλήνιο Ακτινολογικό Συνέδριο
- 1^η Ελληνοβουλγαρική Ιατρική Συνάντηση
- 16^ο και 17^ο Ιατρικό Συνέδριο Ενόπλων Δυνάμεων
- 3^ο Συνέδριο Χειρουργικής Εταιρίας Βορείου Ελλάδος
- 9^ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος
- 2^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής Θώρακος – Καρδιάς – Αγγείων
- 1^η Διεθνής Συνάντηση της Ελληνικής Εταιρίας Αεροδιαστημικής
- 3^ο Ετήσιο Αθλητιατρικό Επιμορφωτικό Σεμινάριο
- 11^ο Βορειοελλαδικό Ιατρικό Συνέδριο
- 1^ο Εθνικό Συνέδριο AIDS και Σεξουαλικά Μεταδιδόμενων Νοσημάτων
- 17^ο Εθνικό Συνέδριο Χειρουργικών Λοιμώξεων
- 15^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας
- 3^ο Διεθνές Συνέδριο Αθλητιατρικής Εταιρίας Βορείου Ελλάδος
- 7^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο
- 2^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μελέτης Εξαρτησιογόνων Ουσιών
- 5th World Congress on Advances in Oncology
- 3rd International Symposium on Molecular Medicine
- 12^ο Ουρολογικό Συμπόσιο (συμμετοχή και στην οργανωτική επιτροπή)
- 6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσοκομειακών Λοιμώξεων και υγιεινής στο χώρο του Νοσοκομείου

27^ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο
 6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιολογίας
 8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μαιευτικής και Γυναικολογίας
 Μετεκπαιδευτικό σεμινάριο στην Κλινική Βιοχημεία στην Παιδιατρική
 13^ο Πανελλήνιο Συνέδριο AIDS
 5^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ανοσολογίας
 12^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αιματολογίας
 6th World Congress on Advances in Oncology
 4th International Symposium on Molecular Medicine
 16^ο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας
 3^ο Διανοσοκομειακό Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας Δυτικής Ελλάδος
 20^ο Εθνικό Συνέδριο Μικροβιολογίας και 2^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας
 28^ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο.
 16^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο
 8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογίας.
 7th World Congress on Advances in Oncology
 5th International Symposium on Molecular Medicine
 23^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής
 19^ο Ιατρικό Συνέδριο Ενόπλων Δυνάμεων
 Διήμερο Επιστημονικό Συμπόσιο με θέμα «AIDS»
 Ημερίδα “Ουρολοιμώξεις”(Ερρίκος Ντυνάν)
 Μηχανισμοί αντοχής και έλεγχος ευαισθησίας των μικροβίων στα αντιβιοτικά
 29^ο Πανελλήνιο Ιατρικό συνέδριο

ΣΥΜΜΕΤΟΧΕΣ ΣΕ ΕΠΙΜΟΡΦΩΤΙΚΑ ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ

1. Σύγχρονη διαγνωστική μεθοδολογία σε λοιμώδη και αυτοάνοσα νοσήματα (Ινστιτούτο Pasteur-2000)
2. 1^ο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Αντιμικροβιακής Χημειοθεραπείας(Χειμώνας 2002)
3. 11^ο Μετεκπαιδευτικό σεμινάριο:Διάχυτες διάμεσες πνευμονοπάθειες(2002)

ΜΕΛΟΣ

- 1.Ιατρικού Συλλόγου Αθηνών.
- 2.Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η διδακτορική αυτή διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης το χρονικό διάστημα 2000-2003.

Ολοκληρώνοντας τη συγγραφή αισθάνομαι την επιθυμία και το χρέος να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν σε αυτό το εκπόνημα. Πρώτα από όλους ευχαριστώ τον καθηγητή μου και δάσκαλο στην Ιατρική Τέχνη Δ.Α.Σπαντίδο που με παρότρυνε να ασχοληθώ με αυτό εδώ το θέμα. Τον ευχαριστώ για την ενθάρρυνση και το κουράγιο που πάντα μου έδινε, τις πολύτιμες συμβουλές του, τις εύστοχες υποδείξεις και χρήσιμες συζητήσεις που κάναμε σε όλο αυτό το διάστημα αλλά κυρίως για την γνώση και εμπειρία που μου μετέδωσε. Θα ήταν παράλειψη να μην εκφράσω τις ολόθερμες ευχαριστίες μου και στα άλλα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον καθηγητή Ν.Σιαφάκα και το λέκτορα Μ.Φρουδαράκη καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής για τη συμμετοχή τους στη διαδικασία αξιολόγησης της διατριβής μου.

Ευχαριστώ επίσης όλα τα μέλη του εργαστηρίου Ιολογίας για την άψογη συνεργασία και ιδιαίτερα τους: Δ.Α.Αρβανίτη, Ι.Διαλυνά, Σ.Μυγιάκη Α.Ζαφειρόπουλο και Γ.Σουφλά.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον άνδρα μου Στάθη Πανταζή για τη συμπαράσταση του, την κατανόηση και τις συμβουλές που μου παρείχε καθόλη τη διάρκεια αυτού του εκπονήματος.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση (IPF) είναι μια ειδική μορφή χρόνιας διάμεσης πνευμονίας που περιορίζεται στον πνεύμονα και χαρακτηρίζεται από ινοβλαστική απάντηση με ήπια μόνο σημεία φλεγμονής. Σχεδόν πάντα οδηγεί σε ινωτική αποδόμηση του πνεύμονα. Πρόσφατα βρέθηκαν μερικές γενετικές αλλοιώσεις σε μικροδορυφορικό επίπεδο που είναι πιο συχνές στη νόσο. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήσαμε 40 εκκινητές μικροδορυφορικού DNA, οι μισοί από τους οποίους βρίσκονταν σε περιοχές που απαλείφονται συχνά στον καρκίνο του πνεύμονα. Με τη βοήθεια της πολλαπλής PCR μελετήσαμε 26 δείγματα πτυέλων από ασθενείς με IPF και 26 από υγιείς και τα συγκρίναμε με τα αντίστοιχα από το φλεβικό αίμα. Απώλεια ετεροζυγωτίας βρέθηκε σε 10 (38,5%) ασθενείς σε ένα τουλάχιστον τόπο ενώ κανείς από τους υγιείς δεν εμφάνιζε αλλαγές στους υπό μελέτη δείκτες. Η πλειοψηφία των αλλαγών (81,8%) βρέθηκε σε δείκτες που είχαν προηγούμενα συνδεθεί με καρκίνο πνεύμονα στις περιοχές 1p34.3, 3p21.32-p21.1, 5q32-q33.1, 9p21 και 17p13.1 όπου έχουν χαρτογραφηθεί τα γονίδια MYCL1, hMLH1, SPARC, p16Ink4 και TP53. Τα δεδομένα αυτά φωτίζουν μια άλλη πτυχή στη παθογένεση της IPF και στη σύνδεσή της με τον καρκίνο του πνεύμονα.

Από την άλλη πλευρά, η πνευμονική σαρκοείδωση μοιράζεται χαρακτηριστικά τόσο της άνοσης νόσου όσο και της νεοπλασίας και παρουσιάζει αλλαγές σε μικροδορυφορικό επίπεδο σε δείγματα πτυέλων σαρκοειδικών ασθενών. Απώλεια ετεροζυγωτίας (LOH) βρέθηκε σε 13 από τους 38 (34,2%) ασθενείς σε ένα τουλάχιστον γενετικό τόπο. Οι αλλαγές αφορούσαν δείκτες που εδράζονταν σε γονίδια του επιδιορθωτικού συστήματος κακώς ζευγαρωμένων βάσεων του DNA (MMR) hMSH2 (2p22.3-p16.1) και hMLH1 (3p21.32-p21.1), καθώς και στα γονίδια CD48 (1q21-q23) και IRF4 (6p23-p25) που συνδέονται με την ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων. Μικροδορυφορική αστάθεια (MIN) παρατηρήθηκε σε πέντε περιπτώσεις (13,2%) σε ένα τουλάχιστον τόπο. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι η γενετική αστάθεια στην πνευμονική σαρκοείδωση μπορεί να οφείλεται σε ελαττώματα του MMR ενώ οι αλλαγές στους λεμφοειδικούς παράγοντες μπορεί να οδηγούν στο σχηματισμό κοκκιώματος.

ABSTRACT

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a specific form of chronic interstitial pneumonia limited to the lung and characterized by a fibroproliferative response with only minor signs of inflammation, which almost always causes rapid fibrotic destruction of the lung. Recently, we reported that genetic alterations at the microsatellite level are frequent in this disease. In this study, we used 40 microsatellite DNA primers, approximately half of them located on regions frequently deleted in lung cancer. We analyzed, using multiplex PCR-based microsatellite assays, 26 sputum specimens from IPF patients and 26 from healthy matched subjects, versus correspondent venous blood. Loss of heterozygosity (LOH) was found in ten (38.5%) patients in at least one locus, while none of the healthy subjects exhibited any genetic alteration in the studied markers. The majority of these alterations (81.8%) were found on markers previously associated with lung cancer located on 1p34.3, 3p21.32-p21.1, 5q32-q33.1, 9p21 and 17p13.1 where MYCL1, hMLH1, SPARC, p16^{Ink4} and TP53 genes have been mapped. These data provide new insights on IPF pathogenesis as well as a new perspective for its correlation with lung cancer.

On the other hand, pulmonary sarcoidosis shares certain features with immune disease and neoplasia, and microsatellite DNA alterations are detectable in sputum specimens of pulmonary sarcoidosis patients. The biological basis and significance of these findings remain obscure, while information regarding the genetic basis of the disease is limited. Using multiplex PCR-based microsatellite analysis, we investigated 40 markers located on 1p, 1q, 2p, 2q, 3p, 5q, 6p, 7p, 9p, 11q, 14q and 17p in 38 sputum specimens of pulmonary sarcoidosis patients. Loss of heterozygosity (LOH) was found in 13 of 38 (34.2%) patients in at least one locus. These alterations occurred in the subset of markers located in or close to DNA mismatch repair (MMR) genes, hMSH2 (2p22.3-p16.1) and hMLH1 (3p21.32-p21.1), as well as in CD48 (1q21-q23) and IRF4 (6p23-p25) genes associated with lymphocyte activation. Microsatellite instability (MIN) was observed in five cases (13.2%) in at least one locus. Our data suggest that genomic instability in pulmonary sarcoidosis could be due to MMR defects, while alterations of lymphocyte-specific agents could account for granuloma formation.

ΔΙΑΧΥΤΕΣ ΔΙΑΜΕΣΕΣ

ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΕΣ(DIFFUSE INTERSTITIAL LUNG DISEASES-DILD)

1.1 ΓΕΝΙΚΑ

Πρόκειται για χρόνια νοσήματα του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος που χαρακτηρίζονται από φλεγμονή, αποδιοργάνωση της φυσιολογικής δομής των κυψελιδικών τοιχωμάτων και έκπτωση της λειτουργίας τους. Πρωτοπεριγράφηκαν πριν 65 περίπου χρόνια όταν οι Hamman και Rich είχαν τέσσερις ασθενείς που κατέληξαν από άγνωστης αιτιολογίας διάχυτη διάμεση ίνωση των πνευμόνων μέσα σε λίγες εβδομάδες(1).

1.2 ΟΡΙΣΜΟΣ

Είναι ομάδα ετερογενών παθολογικών καταστάσεων που χαρακτηρίζονται από αλλοιώσεις της δομής των κυψελίδων, της υφής του διάμεσου ιστού, των αγγείων και των βρογχιολίων. Είναι δυνατό να προσβληθούν οι αεραγωγοί ως και ο υπεζωκότας. Δηλαδή οι παθήσεις δεν περιορίζονται στα μεσοκυψελιδικά διαφράγματα όπως αναφέρει ο όρος «διάμεσες».

Σε αυτές ανήκει μεγάλος αριθμός παθήσεων διαφορετικής αιτιολογίας που εμφανίζουν κοινά κλινικά, απεικονιστικά, παθολογοανατομικά, παθοφυσιολογικά και λειτουργικά ευρήματα(2,3).

1.3 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Δεν είναι καλά μελετημένη και ποικίλει ανάλογα με τον τύπο της πάθησης. Σύμφωνα με μια έρευνα η συνολική συχνότητα είναι 80,9 ανά 100.000 στους άνδρες και 67,2 ανά 100.000 στις γυναίκες(4), δηλαδή λίγο μεγαλύτερη στους άνδρες.

Είναι σχετικά συχνά νοσήματα μεταξύ των πνευμονικών παθήσεων και ιδιαίτερα η ιδιοπαθής και δευτεροπαθής πνευμονική ίνωση.

1.4 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Υπάρχει διαφωνία σχετικά με την ταξινόμηση. Μερικοί περιορίζουν τον όρο «ιδιοπαθείς διάμεσες πνευμονοπάθειες» στις διαταραχές που αφορούν στο επιθηλιακό και συνδετικό ιστό των κυψελιδικών διαφραγμάτων. Ωστόσο οι κλινικοί διευρύνουν τον όρο περιλαμβάνοντας διαταραχές και στον περιβρογχικό/ περιβρογχιλιακό συνδετικό ιστό, τα ενδολοβιακά διαφράγματα, τους λεμφαδένες και τα αγγεία.

Σήμερα περισσότερες από 180 διαφορετικές παθήσεις περιλαμβάνονται στη κατηγορία των διάχυτων διάμεσων πνευμονοπαθειών από τις οποίες τα 2/3 είναι άγνωστης αιτιολογίας. Κάθε ομάδα μπορεί να διαιρεθεί σε υποομάδες σύμφωνα με αιτιολογικά ή παθολογοανατομικά κριτήρια(5).

1.4.1 ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΚΗ

Πίνακας 1: Νόσοι διάμεσου πνευμονικού ιστού γνωστής αιτιολογίας.

1. Ανόργανες σκόρες (συχνότερες)
Πυρίτιο, αμίαντος, τάλκ, καολίνη, αλουμίνιο, αντιμόνιο, άνθρακας, βηρύλλιο, τιτάνιο, κάδμιο.
2. Οργανικές σκόρες
σπόροι μυκήτων, πρωτεΐνες βακτηριδίων, συνθετικές οργανικές ενώσεις
(Πνεύμονας των γεωργών, βαγάκωση).
3. Τοξικά αέρια και οσμές
Οξυγόνο, χλωρίνη, SO₂, οξείδια Mn, Mg, Ni, Cu, Zn.
4. Φάρμακα
 - α. κυτταροστατικά
 - β. αντιβιοτικά
 - γ. άλλα (χρυσός, διφαινυλδαντοΐνη, προπανολόλη κτλ.)
 - δ. δηλητήρια (Paraquat)
 - ε. αναλγητικά και υπνωτικά
 - στ. αντιαρρυθμικά
5. Ακτινοβολία
6. Λοιμώδη αίτια (θερμόφιλοι ακτινομύκητες, *Aspergillus sp.*, μύκητες, μυκοβακτήρια *Pneumocystis carinii*)
7. Παθήσεις άλλων οργάνων
 - Χρόνιο πνευμονικό οίδημα
 - Χρόνια ουραιμία.
8. Αλλεργία
9. Τραύμα
10. Μεταβολικές παθήσεις.

Πίνακας 2: Νόσοι διάμεσου πνευμονικού ιστού άγνωστης αιτιολογίας.

1. Ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση (45% των διάμεσων πνευμονοπαθειών).
2. Αυτοάνοσα ρευματικά νοσήματα (π.χ. λύκος, σκληρόδερμα, ρευματοειδής αρθρίτιδα, μυκτή κολλαγόνωση.)
3. Σαρκοείδωση.
4. Ιστιοκυττάρωση X.
5. Σύνδρομο Goodpasture.
6. Ιδιοπαθής πνευμονική αιμοσιδήρωση.
7. Νόσος Wegener.
8. Λεμφοκυτταρικές διηθητικές διαταραχές.
9. Αγγειίτιδες.
10. Αμυλοείδωση.
11. Χρόνια ηωσινοφιλική πνευμονία.
12. Νόσος Whipple.
13. Αγκυλοποιητική σπονδυλοαρθρίτιδα
14. Οξέα αιμορραγικά σύνδρομα πνευμονα (P.H.S)
15. ARDS
16. Φλεγμονώδης νόσος εντέρου.
17. Κοκκιωμάτωση Langerhans'.
18. Πνευμονική κυψελιδική πρωτεΐνωση.
19. Κυψελιδική μικρολιθίαση.
20. Λεμφαγγειομάτωση.
21. Κληρονομικές παθήσεις (π.χ. οζώδης σκλήρυνση, νευροϊνωμάτωση).
22. Φλεβοαποφρακτική νόσος του πνεύμονα.
23. Μικρολιθίαση.

1.4.2 ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ

Σύμφωνα με την ταξινόμηση του Liebow(6) οι κατηγορίες είναι οι ακόλουθες:

- i) συνήθης διάμεση πνευμονία (Usual interstitial pneumonia)
- ii) λεμφοκυτταρική διάμεση πνευμονία (Lymphoid interstitial pneumonia)
- iii) αποφολιδωτική διάμεση πνευμονία (Desquamative interstitial pneumonia).
- iv) Γιγαντοκυτταρική διάμεση πνευμονία(Giant cell interstitial pneumonia)
- v) Βρογχιολίτιδα με διάμεση πνευμονία (bronchiolitis with interstitial pneumonia)

Οι Katzenstein και Myers(7) πρόσθεσαν άλλες δύο κατηγορίες, τις :οξεία διάμεση πνευμονία (Acute interstitial pneumonia) και μη ειδική διάμεση πνευμονία (nonspecific interstitial pneumonia).

1.5 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

1.5.1. ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΔΙΑΜΕΣΟΥ ΙΣΤΟΥ

Οι κυψελίδες αποτελούνται από ένα μονό στρώμα επιθηλιακών κυττάρων πάνω σε μία βασική στιβάδα. Περισσότερα από το 90% αυτών των κυττάρων είναι τύπου I διαφοροποιημένα και ευάλωτα στον τραυματισμό. Τα υπόλοιπα είναι τύπο II μεταβολικώς ενεργά κύτταρα που παράγουν μια σειρά από πρωτεΐνες όπως η φμπρονεκτίνη, κολλαγόνο τύπου IV ,λαμινίνη ,συστατικά του συμπληρώματος, παράγοντες συγκόλλησης, κυτοκίνες και πρωτεογλυκάνες.

Τα κύτταρα αυτά συμβάλλουν στη διατήρηση της δομής των κυψελίδων και στην αποκατάσταση ενδεχομένων βλαβών.

Τα κυψελιδικά μακροφάγα παράγονται στο μυελό των οστών από αρχέγονα κύτταρα του διάμεσου χώρου. Όταν υπάρχει αυξημένη ανάγκη σε αυτά, πολλαπλασιάζονται όσα βρίσκονται ήδη στον κυψελιδικό αυλό ή μεταναστεύουν από το διάμεσο ιστό. Στη συνέχεια μεταφέρονται στο φάρυγγα μέσω των τελικών βρογχιολίων και με τη βοήθεια των αναπνευστικών κινήσεων αποβάλλονται με την απόχρεμψη. Ο ρόλος τους στις διάμεσες πνευμονοπάθειες είναι σημαντικός και κυρίως στις ανοσολογικές αντιδράσεις που συμβαίνουν.

Ο διάμεσος κυψελιδικός ιστός αποτελεί το υπόστρωμα του πνεύμονα και εντοπίζεται γύρω από τις αεροφόρες οδούς, περιαγγειακά και κεντρολοβιδιακά. Διακλαδίζεται, εισχωρεί μεταξύ των κυψελιδωτών πόρων και σχηματίζει το διάμεσο χώρο των κυψελιδικών διαφραγμάτων που αποτελείται από ιστιοκύτταρα, σιτευτικά κύτταρα, ελαστικές, δικτυωτές ίνες, ίνες κολλαγόνου και σπάνιους ινοβλάστες. Είναι σχετικά χαλαρός σε αντίθεση με τα κυψελιδικά κύτταρα που συνδέονται στενά έτσι ώστε οι αεραγωγοί να είναι στεγανοί. Ανάμεσα στον κυψελιδικό διάμεσο ιστό υπάρχουν τα πνευμονικά τριχοειδή που αποτελούνται από ένα στρώμα ενδοθηλιακών κυττάρων πάνω σε μια βασική στιβάδα. Αυτή διαχωρίζεται από τη βασική επιθηλιακή στιβάδα με τα κυψελιδικά διαφράγματα. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι και αυτά ευάλωτα στον τραυματισμό και έχουν την ικανότητα να μεταναστεύουν, διασπείρονται, πολλαπλασιάζονται και να παράγουν συστατικά της τριχοειδικής βασικής στιβάδας και αναστολείς πρωτεασών (8).

Τα λεμφαγγεία του πνεύμονα αναπτύσσονται σε ένα επιπολής δίκτυο κάτω από τον υπεζωκότα και σε ένα εν τω βάθει που συνοδεύει το βρογχικό δέντρο. Ξεκινούν από τα μεσολόβια διαφραγμάτια και τις κορυφές των κυψελιδικών πόρων και παροχετεύουν το υγρό του διάμεσου χώρου. Στη διαδικασία αυτή συμβάλλει και ο συνδετικός ιστός που περιβάλλει τα βρογχικά αγγεία.

1.5.2 ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑ ΔΙΑΜΕΣΟΥ ΙΣΤΟΥ

Ο κυψελιδικός διάμεσος ιστός περιέχει μεσεγγυματικά κύτταρα (ινοβλάστες) ,μονοκύτταρα/μακροφάγα και σπάνια λεμφοκύτταρα μέσα σε μεσοκυττάρια ουσία(3,8).Οι ινοβλάστες είναι η κύρια πηγή μεσοκυττάρων μακρομορίων, φιμπρονεκτίνης, λαμινίνης, ελαστίνης, γλυκοπρωτεϊνών και σε κυτταροκαλλιέργειες συνθέτουν κολλαγόνο τύπου I, II, IV,V και VI. Μερικοί ινοβλάστες παράγουν κυτοκίνες (π.χ. τον platelet-derived growth factor και άλλους αυξητικούς παράγοντες) , ένζυμα και βιοενεργά λιπίδια όπως η προσταγλανδίνη E₂. Μονοκύτταρα, μακροφάγα και λεμφοκύτταρα είναι τα κύρια μεταναστευτικά κύτταρα που βρίσκονται στον κυψελιδικό διάμεσο ιστό. Τα μακροφάγα μπορούν να παράγουν μια σειρά από κυτοκίνες, βιοενεργά λιπίδια και πρωτεΐνες.

Ινοβλάστες, κύτταρα τύπου II και ενδοθηλιακά επιτελούν εξειδικευμένες λειτουργίες με σκοπό την αποκατάσταση της βλάβης. Άλλα συνθέτουν συνδετικό ιστό και μεσοκυττάρια πρωτεΐνες και άλλα αντικαθιστούν τα κατεστραμμένα κύτταρα.

Οι διάφοροι τύποι του κολλαγόνου αποτελούν το 60% του βάρους του διαμέσου συνδετικού ιστού και κυρίως οι τύποι I και III σε αναλογία 2:1 ενώ αυξημένα είναι και τα επίπεδα του κολλαγόνου τύπου V. Η ελαστίνη αποτελεί το 30% ενώ οι γλυκοζαμινογλυκάνες και οι πρωτεογλυκάνες λιγότερο από το 1%.

Συμπερασματικά, ο διάμεσος ιστός ενισχύει την άμυνα του αναπνευστικού μέσω ανοσολογικών μηχανισμών και παραγωγής κυττάρων φλεγμονής. Παράλληλα μέσω της τριχοκυψελιδικής μεμβράνης ρυθμίζει την ανταλλαγή ουσιών και βοηθά στη διατήρηση της αρχιτεκτονικής δομής των κυψελίδων.

1.5.3 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Όλα ξεκινούν με τη φλεγμονή των κυψελίδων ως απάντηση στην επίδραση διαφόρων βλαπτικών αιτιών που εισπνέονται ή φθάνουν μέσω της κυκλοφορίας. Μέσα στις κυψελίδες, στον περιαγγειακό χώρο και στο διάμεσο πνευμονικό ιστό συγκεντρώνονται φλεγμονώδη κύτταρα, όπως λεμφοκύτταρα στη σαρκοείδωση και πολυμορφοπύρρηνα στην ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση αλλά και κυψελιδικά μακροφάγα, ηωσινόφιλα. Το γεγονός αυτό οδηγεί στην ανάπτυξη αγγειίτιδας ή κυψελιδίτιδας που ο βαθμός της καθορίζει την περαιτέρω πορεία. Αν ολοκληρωθεί η διαδικασία θα συμβεί διαταραχή στο ρυθμό ανανέωσης /καταστροφής των στοιχείων του διαμέσου ιστού με αποτέλεσμα τη συνεχή αύξηση του συνδετικού ιστού των μεσοκυψελιδικών διαφραγμάτων και την ίνωση των πνευμόνων. Στα παραπάνω συμβάλλουν και δύο άλλοι μηχανισμοί: η άμεση τοξική επίδραση και η πρόκληση άνοσης αντίδρασης.(Εικ.1).

Η βασική στιβάδα αποδομείται και έτσι χάνεται ο σκελετός για την αποκατάσταση των κυψελίδων. Σε απάντηση στα παραπάνω γεγονότα, τα κύτταρα των κυψελίδων απελευθερώνουν ενεργές ρίζες οξυγόνου, πρωτεϊνάσες, παράγωγα του αραχιδονικού οξέος, συστατικά του συμπληρώματος και κυτοκίνες όπως τον TNF.Υπάρχει η γενική άποψη ότι όταν καταστραφεί η βασική στιβάδα οι κυψελίδες δε μπορούν να αποκατασταθούν.

Η εικόνα της «μελισσοκηρύθρας» προκύπτει από το συνδυασμό κυψελιδίτιδας και ινώδους απάντησης. Εδώ παίζουν ρόλο οι κολλαγενάσες και άλλες πρωτεϊνάσες, που παράγονται από τα μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα και άλλα κυψελιδικά κύτταρα.

Η ίνωση δεν επηρεάζει τις παρακείμενες στα βρογχιόλια αεροφόρες οδούς. Πρέπει βέβαια να αναφέρουμε ότι υπάρχουν και περιπτώσεις στις οποίες η κυψελιδίτιδα, όπως η λεμφοκυτταρική, όχι μόνο δεν καταλήγει σε ίνωση αλλά μπορεί να αποτελεί την «ορθή» απάντηση του πνεύμονα σε τοξικές π.χ. ουσίες ή μηχανισμό άμυνας έναντι της νεοπλασίας(9-15).

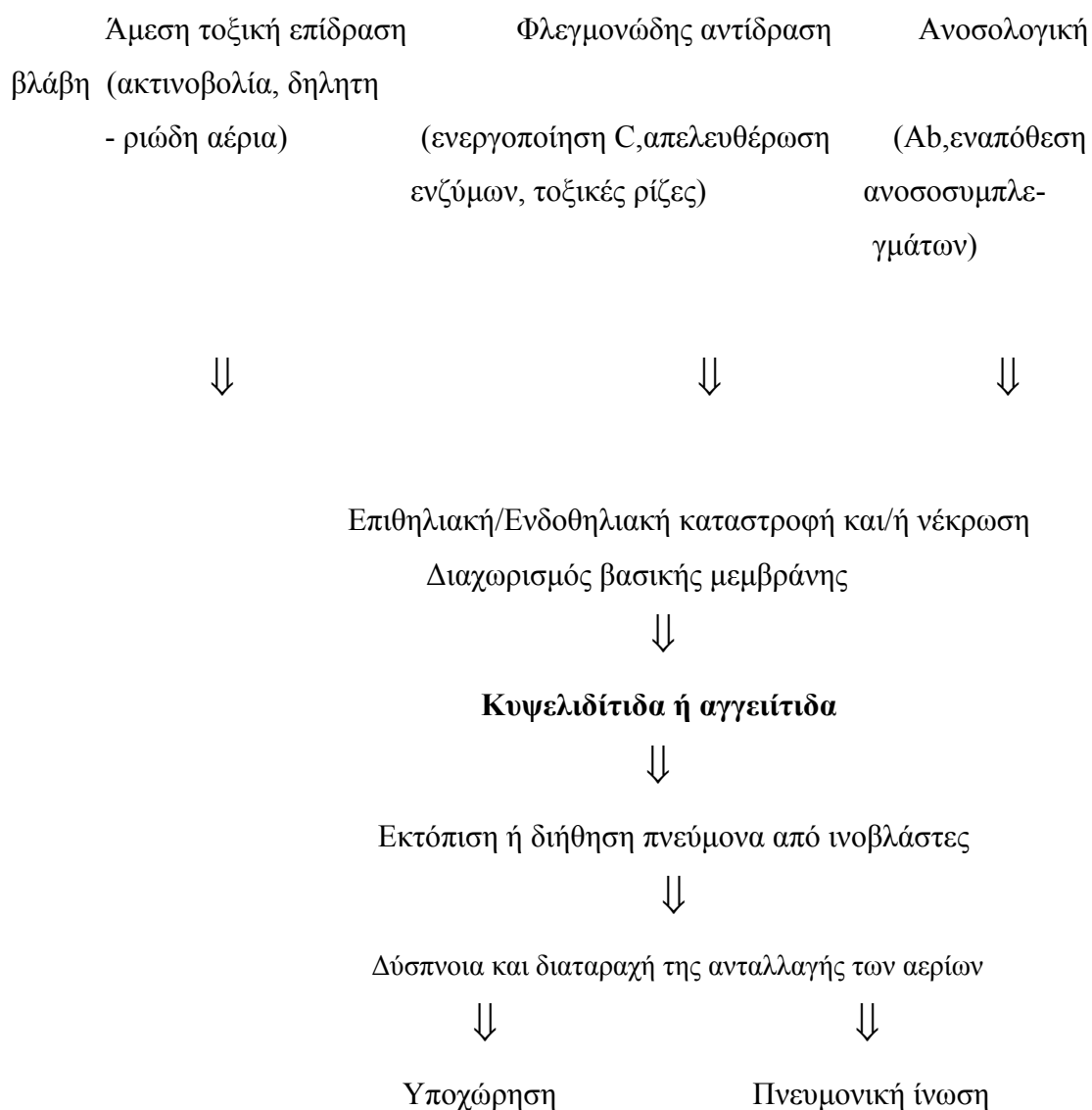
Ο περιορισμός στις διηθητικές πνευμονοπάθειες οφείλεται κυρίως σε μηχανικούς λόγους. Οι διηθημένοι και ινωτικοί πνεύμονες απαιτούν μεγάλες πιέσεις από τους αναπνευστικούς μύες για να εκπτυχθούν.

Στις διηθητικές πνευμονοπάθειες προσβάλλονται και οι μικροί αεραγωγοί και τα μικρά πνευμονικά αγγεία χωρίς όμως σοβαρές διαταραχές της δομής τους.

Αξιοσημείωτο είναι ότι διάφοροι τύποι διάχυτων διάμεσων πνευμονοπαθειών διαφορετικής αιτιολογίας μπορεί να έχουν παρόμοια ιστολογικά ευρήματα όπως οι ιογενείς πνευμονίες με την οξεία διάμεση πνευμονία, τις πνευμονοπάθειες λόγω ασβέστωσης, φαρμάκων ή ρευματοειδούς αρθρίτιδας.

Στο σύνδρομο Hamman-Rich υπάρχει εξοίδηση και πάχυνση του τοιχώματος των κυψελίδων λόγω της συγκέντρωσης λεμφοκυττάρων, ινοβλαστών και μυοϊνοβλαστών. Οι κυψελίδες είναι γεμάτες με μακροφάγα.

Εικ.1. Παθοφυσιολογία διάχυτων διηθητικών πνευμονοπαθειών.



1.6 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΗ

Παρόλο που η αιτιοπαθογένεια αυτών των νοσημάτων παραμένει άγνωστη, έχουν αυξηθεί οι γνώσεις μας σχετικά με τη γενετική τους βάση(16). Φαίνεται πως έχει μεγάλη σημασία αφού όλοι όσοι εκτίθενται σε ινοποιούς παράγοντες δεν εμφανίζουν νόσο. Έχουν αναφερθεί περιπτώσεις οικογενειών όπου η νόσος εμφανίζεται σε μονοζυγώτες διδύμους και σε συγγενείς 1^{ου} βαθμού. Επίσης οι διάμεσες πνευμονοπάθειες συνοδεύουν κληρονομικά σύνδρομα. Οι γενετικοί μαζί με τους περιβαλλοντικούς παράγοντες καθορίζουν την κλινική έκφραση.

Σχετικά με τους γενετικούς παράγοντες φαίνεται πως είναι πολύπλοκοι και πολλαπλοί. Περιλαμβάνουν γονίδια που σχετίζονται με κυτοκίνες, παράγοντες αύξησης, οξειδωτικά συστήματα και συστήματα επιδιόρθωσης του DNA , HLA αντιγόνα. Η άλλοτε άλλη συμμετοχή αυτών των γονιδίων, η γενετική ποικιλομορφία και η πληθώρα των εξωγενών παραγόντων επίδρασης εξηγούν το ευρύ κλινικό φάσμα αυτών των παθήσεων.

Ορισμένοι HLA φαινότυποι συνδέονται με τη σοβαρότητα των νόσων. Έρευνες έχουν δείξει μεταβολές στην έκφραση του γονιδίου του κολλαγόνου και στη μεταγραφική ρύθμιση της σύνθεσης του. Έχει βρεθεί αύξηση στη μεταγραφή του γονιδίου και στον αγγελιαφόρο mRNA.

Είναι φανερό πως η ανεύρεση αλληλόμορφων γονιδίων που προδιαθέτουν στην εμφάνιση διάμεσων πνευμονοπαθειών θα βοηθήσει στην έγκαιρη πρόβλεψη και άμεση αντιμετώπιση αυτών με στόχο τη μείωση της θνησιμότητας και νοσηρότητας.

1.7 ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

Το φάσμα των κλινικών εκδηλώσεων είναι τόσο μεγάλο όσο και ο αριθμός των παθήσεων που υπάγονται σε αυτή την κατηγορία. Οι περισσότεροι ασθενείς προσέρχονται με δύσπνοια που έχει εγκατασταθεί απότομα και είναι προοδευτικά

επιδεινούμενη στην άσκηση, με μειωμένη ικανότητα για σωματική προσπάθεια και με ξηρό μη παραγωγικό βήχα. Είναι δυνατό να παρατηρηθεί επίσης πυρετός, πλευριτικός πόνος, αιμόπτυση αλλά και εξωπνευμονικές εκδηλώσεις.

Η πνευμονική υπέρταση, η πνευμονική καρδιά και η κυάνωση αποτελούν όψιμα ευρήματα αυτών των νόσων.

Ωστόσο είναι δυνατό διάχυτες διάμεσες πνευμονοπάθειες που έχουν επιβεβαιωθεί παθολογοανατομικά να είναι ασυμπτωματικές.

1.8 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ-ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΤΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ

Η εκτόπιση των φυσιολογικών ανατομικών στοιχείων του πνεύμονα από ινώδη ιστό οδηγεί σε περιοριστικού τύπου διαταραχή αερισμού με σταδιακή ελάττωση όλων των πνευμονικών όγκων, της ενδοτικότητας και της ικανότητας διάχυσης. Η σχέση FEV_1/FVC και οι πνευμονικές αντιστάσεις είναι φυσιολογικές. Η ροή είναι συνήθως φυσιολογική ή αυξημένη, αν ληφθεί υπόψη ο όγκος του πνεύμονα. Οι πνευμονικοί όγκοι και οι χωρητικότητες εξαρτώνται από το στάδιο της νόσου καθώς και από τον τύπο της. Στη σαρκοείδωση σταδίου III, στην πνευμονία από υπερευαισθησία, στην οζώδη σκλήρυνση, στην νευροϊνωμάτωση και στο ηωσινόφιλο κοκκίωμα η ολική πνευμονική χωρητικότητα είναι αυξημένη.

Η απώλεια των κυψελίδων προκαλεί διαταραχή της ισορροπίας αερισμού-αιμάτωσης. Από την εξέταση των αερίων αίματος υπάρχει υποξαιμία λόγω μείωσης της ικανότητας διάχυσης. Η υποξαιμία επιτείνεται με την άσκηση επειδή η διήθηση των πνευμονικών αγγείων οδηγεί σε απώλεια των εφεδρειών που φυσιολογικά έχει η πνευμονική κυκλοφορία. Υπάρχει και υποκαπνία από υπεραερισμό λόγω ερεθισμού των παρατριχοειδών υποδοχέων από τη διήθηση και αργότερα την υποξαιμία (17,18).

Ορολογικές εξετάσεις για αντιπυρηνικά αντισώματα και ρευματοειδή παράγοντα είναι θετικά στο 20-40% των ασθενών, χωρίς όμως να είναι διαγνωστικά. Σε μερικές περιπτώσεις τα ANCA μπορεί να είναι διαγνωστικά όπως στην περίπτωση της κοκκιωμάτωσης Wegener's.

Η ακτινογραφία θώρακος δε θέτει τη διάγνωση αλλά μπορεί να επιβεβαιώσει την ύπαρξη διάχυτης διάμεσης πνευμονοπάθειας με τις χαρακτηριστικές διάχυτες ακτινοσκοιές βλάβες και στα δύο πνευμονικά πεδία. Είναι δυνατό η ακτινογραφία θώρακος να είναι φυσιολογική και να υπάρχει μόνο μείωση της ικανότητας διάχυσης του CO και υποξυγοναιμία.

1.9 ΠΡΟΓΝΩΣΗ

Μπορεί να είναι οξείες, υποξείες ή χρόνιες. Μερικές είναι αυτοπεριοριζόμενες, χωρίς θεραπεία. Άλλες απαντούν καλά στη θεραπεία και το υπόλειμμα βλάβης στον πνεύμονα είναι μικρό. Υπάρχουν άλλες που δεν απαντούν στη θεραπεία και εξελίσσονται σε διάχυτη ίνωση με αποδόμηση των κυψελίδων και διαταραχή στην ανταλλαγή των αερίων(19,3).

Η ηλικία θεωρείται καλός προγνωστικός παράγοντας αφού οι νεότεροι αποκαθιστούν ευκολότερα τις βλάβες των κυψελίδων και απαντούν καλύτερα στη θεραπεία. Η συνύπαρξη άλλων παρεγχυματικών νόσων επιδεινώνει την πρόγνωση.

1.10 ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

Οι περισσότερες από τις διηθητικές παθήσεις απαιτούν ανοιχτή βιοψία πνεύμονα για τη διάγνωση εκτός από τη σαρκοείδωση που μπορεί να διαγνωστεί και με διαβρογχική βιοψία. Το σπινθηρογράφημα γαλλίου που προσλαμβάνεται μόνο από τα φλεγμονώδη κύτταρα και η βρογχοκυψελιδική έκπλυση δε δίνουν ειδική διάγνωση αλλά βοηθούν στο να εκτιμηθεί ο χαρακτήρας και η έκταση της φλεγμονής. Ιδιαίτερα χρήσιμη είναι η βρογχοκυψελιδική έκπλυση σε περίπτωση λοίμωξης από πνευμονοκύστη Carinii ή μυκοβακτήρια καθώς και όταν η κυτταρολογική εξέταση αποκαλύπτει την παρουσία καρκινικών κυττάρων.

ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ

2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΟΡΙΣΜΟΣ

Πρωτοπεριγράφηκε το 1869 ως «δερματοπάθεια των Hutchinson και Boek» ενώ η πολυσυστηματική της εντόπιση έγινε γνωστή το 1917. Από την πρώτη διεθνή συνάντηση για τη σαρκοείδωση στην Ουάσιγκτον το 1960, ο ορισμός της σαρκοείδωσης έχει αναθεωρηθεί πολλές φορές(20). Παράλληλα, η τεχνική του BAL και οι ανοσοϊστοχημικές μέθοδοι που επιτρέπουν πρόσβαση στα κυτταρικά και μη συστατικά των πασχουσών περιοχών απέτυχαν να θέσουν μια νέα υπόθεση σχετικά με την εξέλιξη της νόσου.

Για περισσότερο από εκατό χρόνια παραμένει άγνωστης αιτιολογίας χρόνια συστηματική κοκκιωματώδης πάθηση(21). Πρόκειται για απάντηση υπερευαισθησίας στις σαρκοειδικές περιοχές. Χαρακτηρίζεται από συγκεντρώσεις επιθηλιοειδών κυττάρων χωρίς τυροειδοποίηση σε όλα τα προσβεβλημένα όργανα ή ιστούς, χωρίς αυτό να είναι ειδικό εύρημα. Είναι δυνατό να υπάρξει ινωδοειδής νέκρωση στο κέντρο μερικών κοκκιωμάτων(22,23). Οι βλάβες εντοπίζονται κυρίως ενδοθωρακικά με διόγκωση των πυλαίων και παρεγχυματικών λεμφαδένων και διήθηση του πνευμονικού παρεγχύματος. Οι κυριότερες θέσεις εξωθωρακικής εντόπισης είναι το δέρμα και τα μάτια.

Μαζί με την ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση αποτελούν τις πιο συχνές διάμεσες πνευμονοπάθειες(24).

2.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Η επίπτωση της νόσου είναι 1-64 περιπτώσεις ανά 100.000 πληθυσμού ανάλογα με τη χώρα και τη φυλή(25-27). Το τόσο ευρύ φάσμα της επίπτωσης οφείλεται αφενός στις μεγάλες γεωγραφικές και εθνικές διακυμάνσεις και αφετέρου στην έλλειψη ενός κοινά αποδεκτού ορισμού της πάθησης. Εντοπίζεται παγκοσμίως αλλά απαντά κυρίως στις αναπτυγμένες χώρες. Η συχνότητά της είναι δεκαπλάσια στο μαύρο πληθυσμό των Η.Π.Α όπου είναι πιο επιθετική και με εξωθωρακικές εντοπίσεις. Το ίδιο συμβαίνει και με τους Ινδούς που ζουν στην Αγγλία(28,29). Παρόλα αυτά το 79% των ασθενών ανά τον κόσμο είναι λευκοί. Επίσης τα όργανα που προσβάλλονται διαφέρουν μεταξύ των χωρών, των φυλών και των ατόμων(20). Στη Σουηδία, το σύνδρομο Lofgren(οξεία μορφή της νόσου) είναι συχνότερο σε σχέση με άλλες χώρες.

Έχει βρεθεί εποχιακή κατανομή της νόσου στην Ελλάδα (70% των περιπτώσεων εμφανίζονται μεταξύ Μάρτη και Μάη κάθε χρόνο), στην Ισπανία(περίπου 50% των διαγνώσεων μεταξύ Απρίλη και Ιούνιο) και στην Ιαπωνία (μεταξύ Ιουνίου και Ιουλίου)(30,31). Στην Αμερική και στην Αγγλία η επίπτωση είναι μεγαλύτερη στους υγιείς εργάτες από ότι στο γενικό πληθυσμό ενώ άλλη μελέτη αναφέρει μεγαλύτερη συχνότητα μεταξύ του πληρώματος πλοίων, αεροπλάνων και πυροσβεστών(32-38).

Παρατηρείται κυρίως στην τρίτη και τέταρτη δεκαετία της ζωής παρόλο που μπορεί να εμφανιστεί και στα 70 χρόνια. Τα δύο τρίτα των ασθενών είναι κάτω από 40 χρ. τη στιγμή της διάγνωσης. Μάλλον προσβάλλει συχνότερα τις γυναίκες τουλάχιστον στο μαύρο πληθυσμό(39).

2.3 ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ

Από το 1869 που ο Jonathan Hutchinson πρώτος περιέγραψε τη νόσο ως σήμερα έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για να καθοριστούν τα αίτια της νόσου.

Παράγοντες φλεγμονής , χημικά, φάρμακα, αλλεργία(πχ. γύρη του πεύκου, ζιρκόνιο, άλλα μέταλλα), αυτοανοσία και γενετικοί παράγοντες έχουν ενοχοποιηθεί. Παρόλο που πολλές μελέτες θεωρούν τη σαρκοείδωση ένα είδος φυματίωσης, αυτό δεν έχει αποδειχθεί(40). Ωστόσο τα άτυπα μυκοβακτήρια ,οι νοκάρδιες, τα μυκοπλάσματα και τα προπιονοβακτήρια(*Propionibacterium acnes* και *P.granulosum*) ίσως παίζουν ρόλο σε μια μικρή ομάδα ασθενών(41-46). Ορισμένοι ερευνητές αναφέρουν μεγαλύτερη ανίχνευση μυκοβακτηριακού DNA από σπληνικούς ιστούς και BAL ασθενών σε σχέση με το υγιές δείγμα ελέγχου(41,42,47,48). Ωστόσο δεν έχει απομονωθεί ως τώρα μυκοβακτηρίδιο από καλλιέργειες προσβεβλημένου ιστού ούτε έχει επιτευχθεί πειραματικά φυματίωση μετά από ένεση σαρκοειδικού ιστού.

Ιοί, όπως της ερυθράς ,της ιλαράς, της γρίπης , της παραγρίπης έχουν ενοχοποιηθεί. Επιπλέον αυξημένοι τίτλοι αντισωμάτων έναντι του Epstein Barr για παράδειγμα έχουν βρεθεί. Πιστεύεται ότι οι μικροοργανισμοί κατορθώνουν να επιβιώνουν στο σαρκοειδικό ιστό λόγω διαταραχής της ανοσίας σε αυτούς. Πάντως ως τώρα ούτε το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ούτε οι ιστοκαλλιέργειες έχουν κατορθώσει να αποκαλύψουν κάποιο λοιμογόνο παράγοντα. Μελετώντας τα ανοσολογικά χαρακτηριστικά της νόσου, έχει διατυπωθεί η άποψη ότι πρόκειται για μια αντίδραση υπερευαισθησίας σε επίμονα περιβαλλοντικά οργανικά αντιγόνα. Η εισπνοή γύρης πεύκου, σκόνης ροδάκινου, ταλκ και η δευτερογενής οξάλωση έχουν ενοχοποιηθεί, χωρίς όμως αυτό να έχει αποδειχθεί(49-51). Ουσίες που μοιάζουν με το βηρύλλιο μπορεί να είναι αιτίες(52-54). Όλοι αυτοί οι αντιγονικοί παράγοντες ελάχιστα αποδομούνται στα μακροφάγα.

Έχει βρεθεί σχέση της σαρκοείδωσης με άλλες νόσους του κολλαγόνου ,όπως το σύνδρομο Sjogren , η ρευματοειδής αρθρίτιδα και η μυασθένεια Gravis(55-57).

Οι νεότερες μελέτες αναφέρουν ότι η σαρκοείδωση δεν οφείλεται σε ένα παράγοντα αλλά είναι το αποτέλεσμα πολλών παθογενετικών παραγόντων που οδηγούν στην ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων.

2.4 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ-ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Τα κοκκιώματα στη σαρκοείδωση έχουν παρόμοια ιστολογική εικόνα με αυτά της φυματίωσης. Στην τελευταία γνωρίζουμε ότι έχουμε αντίδραση υπερευαισθησίας τύπου IV , κάτι που πιστεύουμε ότι συμβαίνει και στη σαρκοείδωση. Μελέτες κυττάρων στο BAL έχουν βοηθήσει στην κατανόηση των μηχανισμών που οδηγούν στο σχηματισμό των σαρκοειδικών περιοχών(54).

Υπάρχει παθολογική λειτουργία των θυμοεξαρτώμενων T λεμφοκυττάρων με αποτέλεσμα τη συγκέντρωση κυψελιδικών μακροφάγων και το σχηματισμό κοκκιώματος(Εικ.2). Το αρχικό ερέθισμα για τη διέγερση των λεμφοκυττάρων παραμένει άγνωστο. Ίσως ο διεγερμένος υποδοχέας των CD3 λεμφοκυττάρων από ένα αντιγόνο ή αυτοαντιγόνο του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας (HLA) τάξης II στα μονοκυτταρικά φαγοκύτταρα ενεργοποιεί τα λεμφοκύτταρα.

Στο σημείο αυτό ενδιαφέρον παρουσιάζει η εκλεκτική χρήση των αντιγονικών θέσεων του υποδοχέα των T κυττάρων(TCR) από τα διάφορα αντιγόνα. Η πλειοψηφία των T κυττάρων χρησιμοποιούν την TCR-α/β αλυσίδα ενώ η TCR γ/δ ίσως παίζει ρόλο στην κοκκιωμάτωση απάντηση(58). Έρευνα έδειξε ότι οι ασθενείς με σαρκοείδωση έχουν μεγαλύτερους αριθμούς Vγ9 και Vδ2 αντιγράφων σε σχέση με τους υγιείς και η περιορισμένη ποικιλία των TCR συνδετικών θέσεων συνδέεται με απάντηση σε συγκεκριμένα ερεθίσματα, πιθανώς αντιγονικά. Στους ίδιους ασθενείς βρέθηκε και αυξημένο ποσοστό των γ/δ T κυττάρων που εκφράζουν τις Vδ1(59,60).

Τα ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα εκκρίνουν ουσίες όπως η ιντερλευκίνη 2 (IL-2) που προάγει τον πολλαπλασιασμό τους ,ο χημειοτακτικός παράγοντας των μονοκυττάρων και ο παράγοντας αναστολής της μετανάστευσής τους που προάγει τη μετανάστευση των μονοκυττάρων και τη διαφοροποίησή τους σε μακροφάγα και επιθηλιοειδή κύτταρα . Επίσης παράγουν και λεμφοκίνες με αποτέλεσμα την πολυκλωνική διέγερση των B λεμφοκυττάρων και την υπεργαμμασφαιριναιμία(61). Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα παράγουν ιντερλευκίνη -1, - 6 και συντελούν στην πνευμονική ίνωση μέσω της ιντερφερόνης γ και της φιμπρονεκτίνης. Είναι κύτταρα-κλειδιά για την ενεργό ιστική ανάπλαση μέσω της απελευθέρωσης κυτοκινών, χυμοκινών με προφλεγμονώδη και ινωγενετική δραστηριότητα ,ενεργών ριζών οξυγόνου και πρωτεολυτικών ενζύμων. Οι κυτοκίνες μαζί με τα μονοπύρρηνα

φαγοκύτταρα ενεργοποιούνται και πολλαπλασιάζονται στο σημείο της φλεγμονής με αποτέλεσμα το σχηματισμό κοκκιώματος.

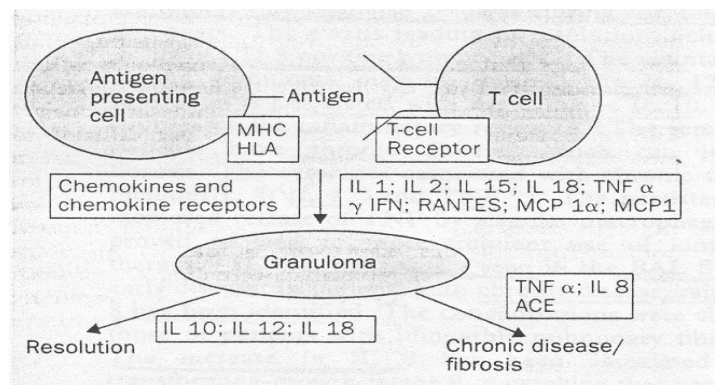
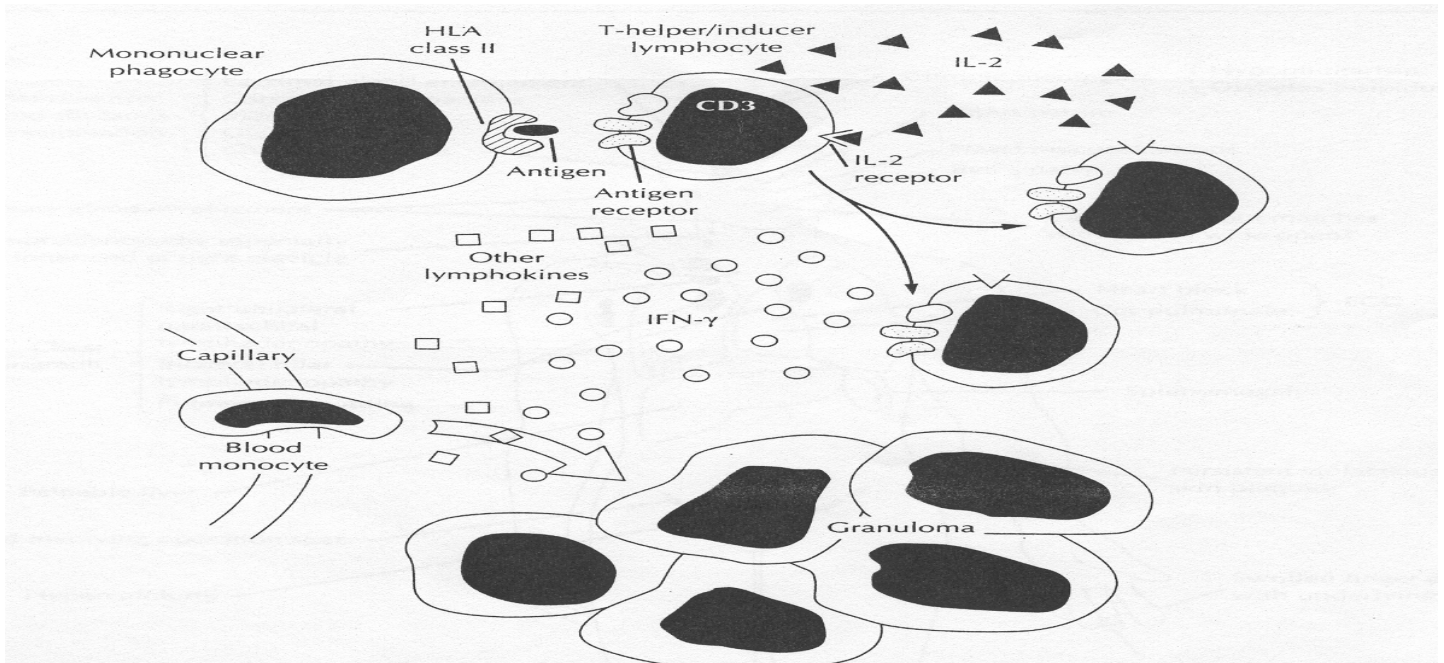
Τα αυξημένα επίπεδα mRNA και πρωτεϊνών για την IL-12, IL-18 και την ιντερφερόνη γ στους σαρκοειδικούς ασθενείς επιβεβαιώνουν την ανοσολογική-φλεγμονώδη απάντηση τύπου T_H1 (62-64). Προς την κατεύθυνση αυτή συμβάλλουν και η ιστική συγκέντρωση $CD4+$ λεμφοκυττάρων που ανευρίσκονται αυξημένα στο BAL. Αυξημένος είναι και ο λόγος $CD4/CD8$. Η ιστική αναδόμηση στην σαρκοείδωση προέρχεται από την ισορροπία μεταξύ της διάσπασης των υπαρχόντων πρωτεϊνών της μεσοκυττάριας ουσίας και της παραγωγής νέων. Πράγματι, αυξημένες συγκεντρώσεις φιμπροεκτίνης και προκολλαγόνου τύπου III έχουν βρεθεί στο BAL ασθενών με σαρκοείδωση (65).

Τα αυξημένα επίπεδα του TGF β στις σαρκοειδικές περιοχές δείχνουν το ρόλο του ως πιθανό ινωτικό παράγοντα αλλά και τον αρνητικό ρυθμιστικό του ρόλο στην ανοσολογική απάντηση (66). Νεότερες μελέτες δείχνουν πως υπάρχει μια πολύπλοκη σχέση μεταξύ των ανοσοκυττάρων, των φλεγμονωδών διαμεσολαβητών των πρωτεϊνών του συνδετικού ιστού και του καταρράκτη της συγκόλλησης-ινωδύλωσης που προάγει το σχηματισμό κοκκιώματος (67).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον αποκτούν τελευταία οι μεταλοπρωτεϊνάσες (MMPs) και οι αναστολείς τους (TIMPs). Η οικογένεια των μεταλοπρωτεϊνών περιέχει περισσότερες από 20 ενδοπεπτιδάσες που έχουν την ικανότητα να διασπούν τις σημαντικότερες ουσίες του διάμεσου ιστού, κάτι που τις καθιστά απαραίτητες στην ανάπτυξη και αναδόμηση των ιστών (68). Ο ρόλος τους είναι ακόμη πιο περίπλοκος αφού έχει βρεθεί ότι συμβάλλουν και στην παραγωγή και οργάνωση μορίων της μεσοκυττάριας ουσίας, κάτι που ίσως εξηγεί το παράδοξο εύρημα της αυξημένης δραστηριότητας τους σε ινωτικούς ιστούς (69). Στη σαρκοείδωση έχει βρεθεί αυξημένη παραγωγή MMP-2 από τα κυψελιδικά μακροφάγα, αυξημένα επίπεδα MMP-9 στα πτύελα και αυξημένη δραστηριότητα κολλαγόνου στο BAL (70-72). Επιπλέον έχει βρεθεί ότι τα κύτταρα του πυρήνα των κοκκιωμάτων δείχνουν ειδικές αντιδράσεις για τις MMPs, κάτι που επισημαίνει τον ξεχωριστό ρόλο αυτών των κυττάρων στη διατήρηση της φλεγμονώδους απάντησης και στο σχηματισμό κοκκιώματος. Ένας ενεργοποιητής των MMP-2, ο MT1-MMP φαίνεται πως διαχέεται μαζί με το στόχο του σε αυτά τα κύτταρα. Ωστόσο παραμένει αδιευκρίνιστο αν η ανίχνευση των MMPs στους σαρκοειδικούς ιστούς μπορεί να είναι χρήσιμο για την πρόγνωση της νόσου.

Το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης και η ενεργός βιταμίνη D ίσως παίζουν ρόλο ως μεσολαβητές που αυξάνουν τη φλεγμονώδη απάντηση.

Εικ.2. Παθογένεση της σαρκοειδωσης.



Τα περισσότερα από τα σαρκοειδικά κοκκιώματα (>60%) υποχωρούν τα επόμενα 2-5 χρόνια. Το γεγονός αυτό συνδέεται με εισροή CD8+ λεμφοκυττάρων και την IL-10 που καταστέλλει τη φλεγμονώδη απάντηση(73). Οι υπόλοιποι ασθενείς θα αναπτύξουν χρόνια νόσο με φλεγμονή και απόφραξη των ζωτικών δομών και θα οδηγηθούν στην ίνωση. Οι IL-8, IL-12 και ο TNF συνδέονται με χρόνια νόσο. Η αύξηση της IL-8 έχει συνδεθεί με τον TGFβ, μια κυτοκίνη που προάγει την ίνωση(74-76).

Η ανενεργία στην αντίδραση φυματίνης(έκπτωση της αντίδρασης υπερευαισθησίας επιβραδυνόμενου τύπου) εξηγείται από την απουσία τοπικά λεμφοκυττάρων και άρα λεμφοκινών λόγω της συγκέντρωσής τους στα κοκκιώματα.

2.5 ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ

Χαρακτηρίζεται από οζώδεις, πυκνές, καλά περιγεγραμμένες αθροίσεις επιθηλιοειδών κυττάρων και γιγαντοκυττάρων του Langerhans που προκύπτουν από σύντηξη μακροφάγων(77-79) σε ένα ή περισσότερα όργανα. Τα επιθηλιοειδή κύτταρα προέρχονται από μακροφάγα και αποτελούν τον κεντρικό πυρήνα που περιβάλλεται από ινοβλάστες και κύτταρα χρόνιας φλεγμονής στις κυτταρικά ευαίσθητες θέσεις προσβολής. Συνήθως αυτά τα κοκκιώματα δεν εμφανίζουν κεντρική τυροειδική νέκρωση. Ωριμάζουν με συσσώρευση υαλίνης και ινοβλαστών και αντικαθίστανται από ινώδη συνδετικό ιστό (εικόνα δίκην «μελισσοκηρύθρας»). Επίσης είναι δυνατό να υπάρχουν σωματίδια Schaumann και αστεροειδή, χωρίς να είναι ευρήματα ειδικά της νόσου. Στα κοκκιώματα οφείλονται οι τελικές υδροξυλιώσεις, οι ενεργοποιήσεις της προβιταμίνης D και άρα η υπερασβεστιαμία της σαρκοείδωσης.

Η οδός μετανάστευσής τους είναι η λεμφική και έτσι εξηγείται γιατί εμφανίζονται κατά μήκος του βρογχοαγγειακού δέντρου, των ενδολοβιδιακών και κυψελιδικών διαφραγμάτων. Στους βρογχικούς βλεννογόνους είναι καλά σχηματισμένα και εύκολα προσβάσιμα στις βρογχικές βιοψίες.

Η κοκκιωματώδης αγγειίτιδα συνήθως ακολουθεί τα παρεγχυματικά κοκκιώματα λόγω της συνάφειας των κοκκιωμάτων με τα αγγεία. Η διήθηση του πνευμονικού παρεγχύματος από μακροφάγα και T λεμφοκύτταρα διαχωρίζει τη σαρκοείδωση από άλλες διάμεσες πνευμονοπάθειες όπως την ινοποιό κυψελιδίτιδα όπου επικρατούν τα πολυμορφοπύρρηνα. Τα λεμφοκύτταρα που ανευρίσκονται στα κοκκιώματα είναι μεγαλύτερα από τα φυσιολογικά και εκφράζουν στην επιφάνειά τους το CD4 αντιγόνο. Καθώς η νόσος γίνεται λιγότερο ενεργός τα CD4 μειώνονται και επικρατούν τα CD8 στις παρυφές των κοκκιωμάτων(80,81).

Κοκκιώματα μπορούν να εμφανιστούν και αλλού όπως στο δέρμα, στους λεμφαδένες, στο ήπαρ, στο σπλήνα, στα μάτια, στις αρθρώσεις, στο κεντρικό νευρικό σύστημα, στους μύες.

Η εμφάνιση κοκκιωμάτων δεν είναι ειδική της νόσου καθώς και σε άλλες καταστάσεις είναι πιθανό να βρίσκονται όπως στην φυματίωση, στις εν τω βάθει μυκητιασικές λοιμώξεις και σε κακοήθειες (λέμφωμα, καρκίνος πνεύμονα και μαστού)(82-84).

2.6 ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

Θεωρητικά τα συμπτώματα της σαρκοείδωσης προέρχονται από α) τη συμπίεση από τη μάζα του κοκκιώματος των επιθηλιοειδών κυττάρων β) τη δυσλειτουργία λόγω των ενεργώς μεταβολικά κοκκιωμάτων γ) τη μη κοκκιωματώδη άνοση αγγειίτιδα δ) τις ινώδεις αλλαγές μετά την υποχώρηση των κοκκιωδών βλαβών.

Τα συμπτώματα παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία ανάλογα με τη διάρκεια, την έκταση της νόσου αλλά και το προσβεβλημένο όργανο. Μπορεί να είναι μη ειδικά. 50% των ασθενών θα εμφανίσουν συμπτώματα από τον πνεύμονα, το 25% συστηματικά συμπτώματα και το 7% εξωπνευμονική προσβολή. Στους υπολοίπους η νόσος διαδράμει ασυμπτωματικά και η διάγνωσή της είναι τυχαία(85). Αυτό συμβαίνει κυρίως με τους Λευκούς και τους Ασιάτες σε αντίθεση με τους Μαύρους όπου τα συμπτώματα είναι έντονα.

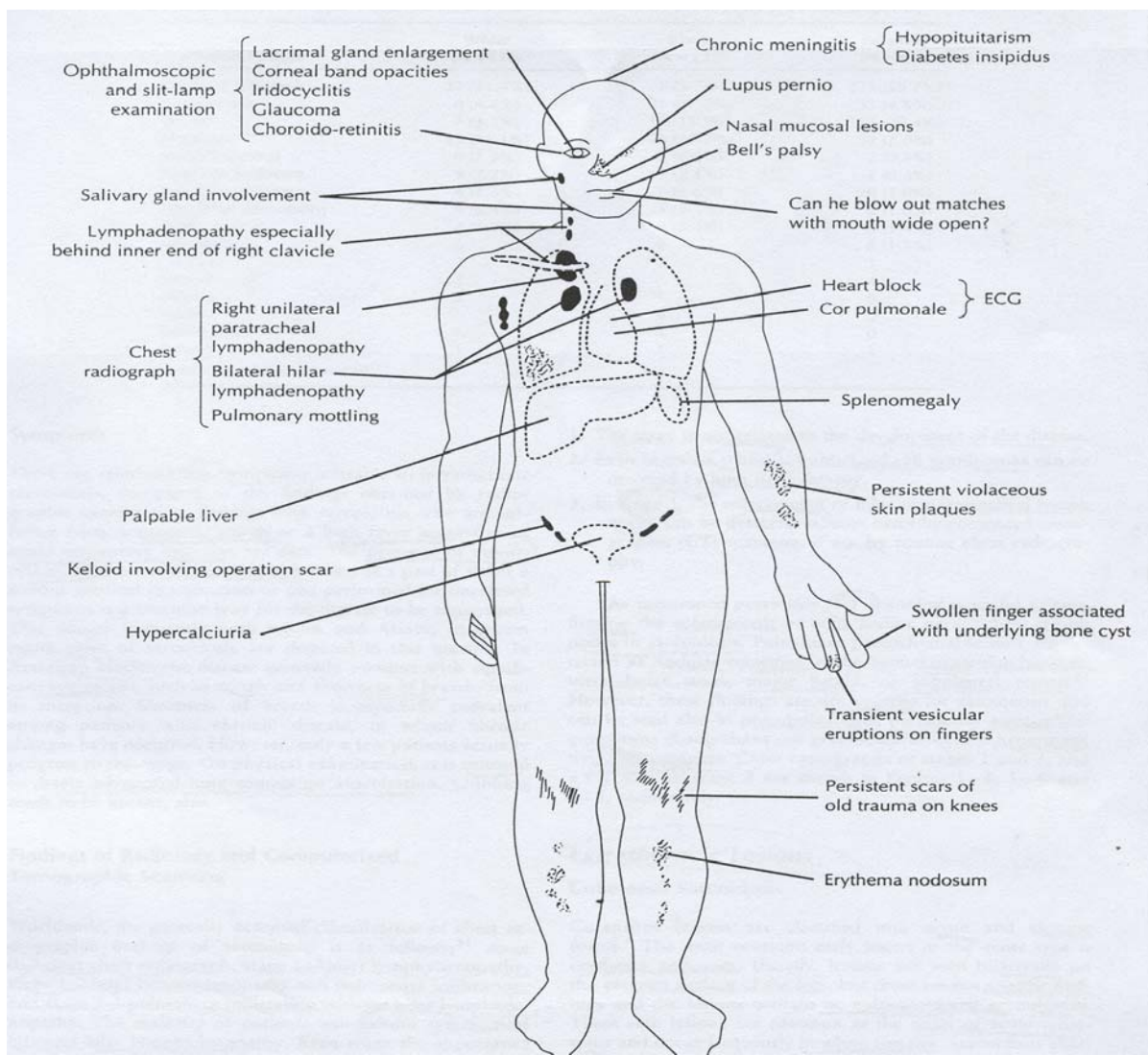
Η σαρκοείδωση μπορεί να είναι οξεία, υποξεία ή χρόνια. Στην πρώτη περίπτωση η νόσος ξεκινά αιφνίδια και συνήθως αυτοϊάται. Αντίθετα στη δεύτερη περίπτωση η έναρξη είναι ασαφής και η πορεία αυτής ποικίλη.

Από το αναπνευστικό σύστημα μπορεί να έχουμε βήχα, δύσπνοια, θωρακικό πόνο, αιμόπτυση ή να μην υπάρχουν συμπτώματα παρά τη σοβαρότητα των ακτινολογικών ευρημάτων. Η δύσπνοια συνήθως εμφανίζεται σε μεταγενέστερη ινωτική φάση και συνδέεται με απόφραξη των αεραγωγών. Η προσβολή των οφθαλμών παρατηρείται ως και το 25% των περιπτώσεων με ποικίλες κλινικές

εκδηλώσεις. Υπάρχουν συστηματικά συμπτώματα όπως χαμηλός πυρετός, απώλεια βάρους, καταβολή. Παράλληλα μπορεί να προσβληθούν το δέρμα (οζώδες ερύθημα με πολυαρθραλγία), το λεμφικό σύστημα, το πεπτικό (ηπατοσπληνομεγαλία), το νευρικό, το μυοσκελετικό, το καρδιαγγειακό, οι σιελογόνοι αδένες (Εικ.2),(86). Οι εξωπνευμονικές εκδηλώσεις μπορεί να ποικίλουν ανάλογα με τη φυλή και το φύλο(87,29).

Συνήθως η νόσος υποχωρεί μόνη της με πλήρη εξάλειψη σε 1-2 χρόνια όμως σε μικρό ποσοστό παρατηρούνται μόνιμες διαταραχές και ινώδεις αλλοιώσεις. Σε ένα ποσοστό 10% είναι δυνατό να έχουμε προοδευτική πνευμονική ίνωση, βρογχιεκτασίες και εξωπνευμονικές αλλοιώσεις. Ο πνευμοθώρακας, η αιμόπτυση και η αναπνευστική ανεπάρκεια είναι δυνατό να επιπλέξουν αυτό το προχωρημένο στάδιο της σαρκοείδωσης. Καλύτερη είναι η πρόγνωση για τους ασθενείς με πυλαία λεμφαδενοπάθεια ενώ η συμμετοχή του παρεγχύματος επιδεινώνει τη διάγνωση. Η εμφάνιση οζώδους ερυθήματος σχετίζεται με καλή έκβαση. 5% περίπου των ασθενών καταλήγουν λόγω αναπνευστικής ανεπάρκειας.

Εικ.3. Κλινικά ευρήματα σαρκοείδωσης.



2.7. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ-ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΤΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ

Υπάρχουν μη ειδικά ευρήματα όπως αύξηση της ταχύτητας καθίζησης, υπερασβεστιαμία, υπερασβεστιουρία, αναιμία, λεμφοπενία με χαμηλή σχέση T4/T8, υπεργαμμασφαιριναιμία(στο 30% των ασθενών), αύξηση της συγκέντρωσης του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης(στο 60-70%) . Στο βρογχοκυψελιδικό έκκριμα ο αριθμός των T λεμφοκυττάρων είναι αυξημένος με υπεροχή των T4-βοηθητικών. Όλα αυτά δείχνουν την έκπτωση της υπερευαισθησίας επιβραδυνόμενου τύπου.

Με βάση τα ευρήματα της ακτινογραφίας θώρακος η πνευμονική σαρκοείδωση σταδιοποιείται ως εξής: Στάδιο 0: φυσιολογική ακτινογραφία(5-10%). Στάδιο 1: αμφοτερόπλευρη συμμετρική πυλαία λεμφαδενοπάθεια(50%), Στάδιο 2: αδενοπάθεια με πνευμονικές διηθήσεις(25%), Στάδιο 3: μόνο πνευμονικές διηθήσεις(15%). Ακόμη κι αν οι βλάβες είναι ετερόπλευρες γίνονται αμφοτερόπλευρες στην πορεία της νόσου. Η σταδιοποίηση δε συμβαδίζει με τη φυσική πορεία της νόσου(88-90).

Ο έλεγχος της αναπνευστικής λειτουργίας αποκαλύπτει διαταραχές περιοριστικού τύπου με ελάττωση του δείκτη διάχυσης και της ενδοτικότητας.

2.8. ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Η σχέση μεταξύ σαρκοείδωσης και καρκίνου ,ιδίως του πνεύμονα και λέμφωμα(3 ως 11 φορές συχνότερο) έχει τεθεί εδώ και δύο δεκαετίες όταν παρουσιάστηκε η πρώτη δημοσίευση από τον Brincker το 1974(91). Δεδομένου ότι στη χρόνια φλεγμονή υπάρχει αυξημένη πιθανότητα για λέμφωμα και άλλες κακοήθειες ,το ίδιο θα έπρεπε να συμβαίνει και στη σαρκοείδωση(92-98).

Προτάθηκε πως υπάρχει ένα σύνδρομο σαρκοείδωσης-λεμφώματος(92) στο οποίο ο χρόνιος ενεργός τύπος της σαρκοείδωσης ευθύνεται για τον αυξημένο κίνδυνο για κακοήγη μεταλλαγή των λεμφοειδών κυττάρων. Ο προβληματισμός στις περιπτώσεις καρκίνου πνεύμονα και λεμφώματος ήταν αν αυτές οφείλονταν σε κακή ταξινόμηση ως σαρκοείδωση περιπτώσεων που μιμούνται καρκίνο και αντίστροφα λόγω των κοινών ακτινολογικών ευρημάτων και της έλλειψης ιστολογικής επιβεβαίωσης (99-103). Μια πιο πρόσφατη δημοσίευση αναφέρει 16 κακοήθειες σε 243 ασθενείς με σαρκοείδωση αλλά πέντε συμπεριλαμβανόμενου καρκίνου πνεύμονα και λεμφώματος ήταν κακώς ταξινομημένες σαρκοειδικές βλάβες(104). Πολλές άλλες αναφορές περιπτώσεων για συνύπαρξη καρκίνου και σαρκοείδωσης υπάρχουν αλλά όλες αυτές είναι χρήσιμες μόνο για γενίκευση υποθέσεων και όχι για έλεγχο αυτών(105-108). Επίσης δε γνωρίζουμε αν οι αναφερόμενες περιπτώσεις αυξημένης πιθανότητας για καρκίνο ήταν λόγω καπνίσματος και άλλων περιβαλλοντικών συνθηκών ή αποτελούν χαρακτηριστικό της σαρκοείδωσης.

Σαρκοειδικά κοκκιώματα μπορούν να παρατηρηθούν σε όγκους και στους περιοχικούς λεμφαδένες, ιδιαίτερα σε νέους ασθενείς. Αυτό δεν αποτελεί απαραίτητα μετάσταση αλλά τοπική αντίδραση ή αντίσταση των καρκινικών κυττάρων.

Ο Yamagushi αναφέρει πως πολλοί από τους θανάτους των σαρκοειδικών ήταν λόγω καρκίνου του πνεύμονα και πνευμονικών λοιμώξεων αλλά είναι αδιευκρίνιστο πως έγινε η διάγνωση της σαρκοείδωσης(109).

Το κυριότερο πρόβλημα είναι η δυσκολία στην ταξινόμηση και άρα στην ερμηνεία για τον πιθανό κίνδυνο για κακοήθεια.

2.9. ΓΕΝΕΤΙΚΗ

Ορισμένα άτομα έχουν την τάση να αναπτύξουν σαρκοείδωση και είναι πιο ευαίσθητα στους αιτιολογικούς παράγοντες. Αναφέρονται περίπου 400 περιπτώσεις οικογενούς σαρκοείδωσης(110-115) σε μέλη οικογενειών πρώτου και δευτέρου βαθμού. Οικογενής χαρακτηρίζεται η νόσος όταν τουλάχιστον ένας συγγενής έχει την

ίδια διάγνωση με τον πάσχοντα. Είναι πιο συχνή στους μονοωογενείς διδύμους από ότι στους ετερογενείς.

Συγκεκριμένοι γενετικοί πολυμορφισμοί έχουν συνδεθεί με αυξημένη επίπτωση της νόσου, όπως ποικιλομορφία στο MHC στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 6(116-126). Τα αντιγόνα HLA DR11,12,14,15,17, DRw6 προδιαθέτουν στην εμφάνιση της νόσου ενώ τα HLA DR 1,3,4 και ίσως HLA DQ*0202 λειτουργούν μάλλον προστατευτικά. Άλλη μελέτη έδειξε ότι η συχνότητα του DR5 αλληλίου ήταν αυξημένη στους άνδρες σαρκοειδικούς των οποίων η πρόγνωση ήταν φτωχή ενώ το BF F αλληλίο ήταν αυξημένο στις γυναίκες που νοσούσαν(127). Επίσης φαίνεται ότι τα αντιγόνα HLA-B8 και HLA-DR3 σχετίζονται με καλύτερη πρόγνωση και εκδηλώσεις πυλαίας λεμφαδενίτιδας και οζώδους ερυθήματος μόνο όμως στους λευκούς. Το HLA-B8 συνδέεται με το οζώδες ερύθημα και την αρθρίτιδα ενώ το HLA-B27 με ραγοειδίτιδα(128). Μελέτη σε περιπτώσεις μη οικογενούς σαρκοειδωσης έδειξε τη σχέση δύο αλληλίων στις θέσεις D6S105 και FTPH στο χρωμόσωμα 6p(129).

Το σύμπλεγμα του TNF που εδράζεται κοντά στο MHC τάξης II στο χρωμόσωμα 6 ίσως παίζει σημαντικό ρόλο στη σοβαρότητα της νόσου μαζί με τα αλληλόμορφα του MHC τάξης II. Ο πολυμορφισμός -308 στον προαγωγέα του TNF έχει συνδεθεί με το σύνδρομο Lofgren που είναι μια μορφή σαρκοειδωσης με καλή πρόγνωση. Άλλος καλά μελετημένος πολυμορφισμός είναι ο 267 στο ιντρόνιο 16 του γονιδίου που κωδικοποιεί το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης. Προς το παρόν δεν έχει βρεθεί σχέση αυτού με την νόσο παρά την πληθώρα των μελετών που έχουν γίνει(133-135). Και άλλοι πολυμορφισμοί φαίνεται πως παίζουν ρόλο(130-132).

Συμπερασματικά ακόμη κι αν δεχθούμε ότι υπάρχει γενετική προδιάθεση στη σαρκοειδωση, το πρότυπο της κληρονομικότητας καθορίζεται από περισσότερα από ένα γονίδια. Η ανεύρεση νέων χρωμοσωμικών δεικτών μεγαλύτερης ευκρίνειας και οι μελέτες οικογενών και σποραδικών περιπτώσεων ίσως βοηθήσουν να ξεκαθαριστούν οι γενετικοί παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση και έκβαση της νόσου.

2.10.ΔΙΑΓΝΩΣΗ-ΠΡΟΓΝΩΣΗ

Η διάγνωση βασίζεται στην ιστολογική ανεύρεση των χωρίς τυροειδοποίηση κοκκιωμάτων και στον αποκλεισμό των άλλων ειδικών αιτιών κοκκιωμάτωσης. Τις περισσότερες φορές η διάγνωση επιβεβαιώνεται με ιστολογική εξέταση του υλικού της διαβρογχικής βιοψίας στη διάρκεια βρογχοσκόπησης. Βέβαια η ανοιχτή βιοψία πνεύμονα και προσβεβλημένων πυλαίων λεμφαδένων είναι παθογνωμική της νόσου.

Τα ευρήματα στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (αύξηση των T4 έναντι των T8) δεν είναι παθογνωμικά και βοηθούν μόνο στην παρακολούθηση της νόσου. Τα δείγματα από τη βιοψία πρέπει να καλλιεργούνται και για μυκοβακτήρια και μύκητες. Το σπινθηρογράφημα με Ga^{67} έχει χαμηλή ειδικότητα. Το Ga^{67} συγκεντρώνεται στα μακροφάγα των προσβεβλημένων οργάνων.

Η πρόγνωση είναι συνήθως καλή και οι περισσότεροι θα αποκατασταθούν πλήρως σε μήνες ή χρόνια(136). Το ποσοστό θνησιμότητας είναι 5-8%. Σε 10-15% των ασθενών η νόσος θα εξελιχθεί και θα εμφανιστούν εξωθωρακικές εντοπίσεις. Για τους ασθενείς με αμφοτερόπλευρη πυλαία λεμφαδενοπάθεια ειδικά για τους ασυμπτωματικούς κάτω των 30 χρ. κατά την έναρξη της νόσου η πρόγνωση είναι πολύ καλή(137). Τα απεικονιστικά ευρήματα συνήθως υποχωρούν σε 2 χρόνια. Η πρόγνωση για ασθενείς με εξωθωρακικές εντοπίσεις είναι συγκριτικά πιο φτωγή(138). Η μεγάλη ηλικία αποτελεί κακό προγνωστικό παράγοντα. Σημαντικός προγνωστικός παράγοντας είναι ο τρόπος έναρξης της νόσου. Μια οξεία έναρξη με οζώδες ερύθημα ή ασυμπτωματική αμφοτερόπλευρη πυλαία λεμφαδενοπάθεια είναι συνήθως αυτοπεριοριζόμενη σε σχέση με μια βραδεία έναρξη με εξωθωρακικές εντοπίσεις που μπορεί να οδηγήσει στην ίνωση και σε οργανική δυσλειτουργία.

ΙΔΙΟΠΑΘΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΙΝΩΣΗ

3.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΟΡΙΣΜΟΣ

Περισσότερες από 3.015 βιβλιογραφικές αναφορές τα τελευταία δέκα χρόνια υπάρχουν για την πάθηση που ονομάζεται και κρυπτογενής ινοποιητική κυψελιδίτιδα (cryptogenic fibrosing alveolitis) στη Μεγάλη Βρετανία από το 1964 (Scadding). Βέβαια ο όρος αυτός αναφέρεται και στις διάχυτες διάμεσες πνευμονοπάθειες από κολλαγονόσους. Αντίθετα στις Η.Π.Α. διαχωρίζονται σαφώς οι δυο αυτές καταστάσεις αφού έχουν διαφορετικά παθολογοανατομικά ευρήματα και πρόγνωση. Για παράδειγμα, η εντοπισμένη ινοποιητική κυψελιδίτιδα έχει καλύτερη πορεία από αυτή που συνυπάρχει με το σκληρόδερμα, τη ρευματοειδή αρθρίτιδα και τη δερματομυοσίτιδα.

Η ιδιοπαθής διάμεση ίνωση χαρακτηρίζεται από φλεγμονή και ίνωση του διάμεσου πνευμονικού ιστού, των περιφερικών αεραγωγών και η αιτιολογία της παραμένει ασαφής. Η φλεγμονή συμβαίνει ενδοκυψελιδικά όπου το κυψελιδικό εξίδρωμα ενσωματώνεται στι διάμεσο χώρο.

Όταν η νόσος πρωτοπεριγράφηκε (1907) η διάγνωση βασιζόταν σε κλινικά και απεικονιστικά κριτήρια και λίγοι ασθενείς έκαναν ανοικτή βιοψία πνεύμονα. Όταν όμως η βιοψία γενικεύτηκε, πολλοί διαφορετικοί ιστολογικοί τύποι εντάχθηκαν κάτω από τον όρο ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση λόγω του κοινού στοιχείου της ίνωσης. Έχουν γίνει πολλές προσπάθειες ταξινόμησης των διαφόρων τύπων, όπως αυτή των Liebow και Carrington με μορφολογικά κριτήρια (επικρατών φλεγμονώδες κύτταρο) η οποία όμως είχε πολλούς επικηρυκτές και δεν καθιερώθηκε (139). Σήμερα γνωρίζουμε ότι πολλές από αυτές τις ιστοπαθολογικές οντότητες έχουν διαφορετική κλινική πορεία, πρόγνωση και απάντηση στη θεραπεία. (Πίνακας 3). Για παράδειγμα, η διαφορική διάγνωση μεταξύ της NSIP και της UIP έχει μεγάλη σημασία γιατί η πρώτη έχει θεραπεία και καλή πρόγνωση σε αντίθεση με τη δεύτερη που δεν έχει (80% και 20% αντίστοιχα επιβίωση) (140).

Πίνακας 3. Ταξινόμηση κατά Katzenstein και Myers(1998) της ιδιοπαθούς διάμεσης πνευμονίας με βάση παθολογοανατομικά στοιχεία.

1. Συνήθης διάμεση πνευμονία (Usual interstitial pneumonitis-UIP)
2. Αποφολιδωτική διάμεση πνευμονία (Desquamative interstitial pneumonitis-DIP)
3. Οξεία διάμεση πνευμονία ή σύνδρομο των Hamman-Rich (Acute interstitial pneumonitis-AIP)
4. Μη ειδική διάμεση πνευμονία (Nonspecific interstitial pneumonitis-NSIP)
5. Οργανοποιός αποφρακτική βρογχιολίτιδα -πνευμονία (Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia-BOOP)

Η λεμφοειδής διάμεση πνευμονία που παλιότερα κατατασσόταν στις παραπάνω ταυτίζεται σήμερα με τη λεμφοϋπερπλαστική νόσο. Όμοια, η γιγαντοκυτταρική διάμεση πνευμονία ανήκει πλέον στις πνευμονοκονιώσεις.

Σήμερα είναι κοινά αποδεκτό ότι η UIP είναι το παθολογοανατομικό ισοδύναμο της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης που αποτελεί το 25-30% των περιπτώσεων και όλοι οι άλλοι τύποι είναι διαφορετικές οντότητες(142). Περιπτώσεις IPF σε έδαφος νοσήματος του κολλαγόνου περιγράφονται χωριστά γιατί έχουν διαφορετική κλινική πορεία, πρόγνωση και απάντηση στη θεραπεία..

Είναι σαφές ότι πρέπει να γίνεται προσπάθεια ακριβούς διάγνωσης με τη βοήθεια της ανοιχτής βιοψίας όλων των ιστοπαθολογικών οντοτήτων που παλιά εντάσσονταν κάτω από το γενικό όρο «ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση»(143). Η Αμερικανική Εταιρεία θώρακος (ATS) και η Ευρωπαϊκή Πνευμονολογική Εταιρεία (ERS) έχουν καθορίσει με ομοφωνία τα κριτήρια διάγνωσης και το χειρισμό των ασθενών με IPF έτσι ώστε να υπάρχει μια ενιαία θεώρηση της νόσου παγκοσμίως.

3.2. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση αποτελεί το 25-30% των διάμεσων πνευμονοπαθειών.

Η επίπτωση και ο επιπολασμός της νόσου δεν είναι σαφώς καθορισμένα. Μερικές μελέτες αναφέρουν ότι η συχνότητα της νόσου είναι 3 με 5 περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα και 0,3 νέα περιστατικά ανά 100.000 εμφανίζονται ανά έτος(144,145). Μια πιο πρόσφατη όμως μελέτη από το Νέο Μεξικό ανεβάζει την επίπτωση σε 29 περιπτώσεις ανά 100.000 ανδρών και 27 για τις γυναίκες(4). Οι Scott και συν.(1990) αναφέρουν επίπτωση 6 ανά 100.000 στην Αγγλία και στην Ουαλία. Αυτές οι διαφορές οφείλονται στο ότι λείπει ένας κοινός ορισμός, σε διαφορετικά κριτήρια διάγνωσης στις πληθυσμιακές μελέτες και σε πιθανή αύξηση της επίπτωσης.

Οι ασθενείς είναι συνήθως μέσης ηλικίας(μεταξύ 40 και 70χρ.) αλλά η νόσος μπορεί να εμφανιστεί από τη νηπιακή ως την προχωρημένη ηλικία Αναφέρονται περιπτώσεις ηλικιωμένων 80 χρ. αλλά και βρεφών λίγων μηνών που πρωτοδιαγνώστηκε η πάθηση σε αυτή την ηλικία. Τα δύο τρίτα των ασθενών είναι πάνω από 60χρ. όταν διαγιγνώσκεται η πάθηση με μέση ηλικία διάγνωσης τα 66χρ(146-152). Η επίπτωση της νόσου αυξάνει με την ηλικία(153). Ο επιπολασμός για τους ενήλικες 35-44χρ. είναι 2,7 ανά 100.000 ενώ για αυτούς πάνω από 75χρ. 175 ανά 100.000. Δεν είναι σαφές αν ένα παρόμοιο σύνδρομο υφίσταται στα παιδιά. Αν ναι ,τότε είναι πολύ σπάνιο(154,155).Οι τύποι DIP, AIP, NSIP φαίνεται να εμφανίζονται σε νεότερες ηλικίες από ότι η UIP, δηλαδή οι μεν πρώτες μεταξύ 42-49 χρ. και η δεύτερη 57-65 χρ.

Είναι πιο συχνή στους άνδρες από ότι στις γυναίκες σε αναλογία 1:1 ως 2:1(156) ενώ όταν συνυπάρχουν παθήσεις του κολλαγόνου η αναλογία είναι περίπου η ίδια.

Η UIP και η NSIP είναι συχνότερες (60%και 30% αντίστοιχα) σε σχέση με τη DIP και AIP που είναι πιο σπάνιες(157,158).

Η νόσος δεν εμφανίζει γεωγραφική κατανομή. Απαντά με την ίδια συχνότητα σε αστικούς και αγροτικούς πληθυσμούς και δε δείχνει προτίμηση σε φύλο ή έθνος. Η θνησιμότητα ανά ηλικία διαφέρει γεωγραφικά λόγω διαφορετικής έκθεσης σε επαγγελματικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής τα ποσοστά θνησιμότητας είναι μεγαλύτερα στο Νότο από ότι στο Βορρά

ενώ στην Αγγλία μεγαλύτερα ποσοστά παρατηρούνται στις βιομηχανικές περιοχές(159).

3.3. ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ

Έχει προταθεί ότι περιβαλλοντικοί παράγοντες είναι σημαντικοί στην παθογένεια της νόσου όπως μέταλλα και οργανικές σκόρες(160,161). Ο κίνδυνος ανάπτυξης ίνωσης αυξάνει καθώς αυξάνουν τα χρόνια έκθεσης σε αυτές. Σκόρες που περιέχουν μόλυβδο, χαλκό, πεύκο, διαλυτικά και η ατοπία ενοχοποιούνται κυρίως(160,168,169).

Περισσότεροι από το 75% των ασθενών είναι ή ήταν καπνιστές . Σε μεγάλες επιδημιολογικές μελέτες φάνηκε ότι το κάπνισμα συνδέεται ισχυρά με την IPF ως ανεξάρτητος προδιαθεσικός παράγοντας(162-164,170).

Ιογενείς φλεγμονές ,κυρίως της ομάδας των ερπητοϊών, έχουν επίσης αναφερθεί ότι συνδέονται με τη νόσο. Το καψιδικό αντιγόνο του ιού έχει βρεθεί σε πνευμονικό ιστό μετά από ανοσοφθορισμό. Και άλλοι ιοί ,όπως της γρίπης, ο CMV, της ηπατίτιδας C ,ο HIV-1 ,της ερυθράς αλλά και μυκοπλάσματα και λεγιωνέλλες έχουν ενοχοποιηθεί. Ως τώρα δεν υπάρχει καμία σαφής ένδειξη αυτών(165,166,173-191).

Έχει προταθεί ότι τα ανοσοσυμπλέγματα που είναι παρόντα στο πνευμονικό παρέγχυμα παίζουν ρόλο στην έναρξη και διατήρηση της ανοσιακής και φλεγμονώδους διεργασίας που οδηγεί σε ίνωση(167).Έχουν βρεθεί στον ορό ασθενών με IPF αντισώματα έναντι της τοποϊσομεράσης II, ενός μέλους μιας οικογένειας ενζύμων που σχετίζονται με την αντιγραφή του DNA, τη μετάφραση, τον ανασυνδυασμό. Επίσης έχουν βρεθεί αυξημένα τα Β λεμφοκύτταρα που εκκρίνουν IgG και τα ενεργοποιημένα μακροφάγα, χωρίς όμως να γνωρίζουμε τη σημασία αυτών των ευρημάτων στην παθογένεση της IPF.

Όλοι οι παραπάνω παράγοντες φαίνεται πως επιδρούν σε άλλοτε άλλη συχνότητα σε γενετικώς προδιατεθειμένα άτομα με αποτέλεσμα την εμφάνιση της ιδιοπαθούς διάμεσης ίνωσης.

Και διάφοροι άλλοι παράγοντες έχουν ενοχοποιηθεί χωρίς όμως να έχει αποδειχθεί και ο σαφής ρόλος τους στην αιτιολογία της νόσου. Τέτοιοι είναι η γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση και τα αντικαταθλιπτικά(171,172).

3.4. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ-ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Οι δυσκολίες στην προσέγγιση της παθογένειας της νόσου οφείλονται στα ακόλουθα: α) η πνευμονική ίνωση είναι το αποτέλεσμα της βιολογικής απάντησης σε μια σειρά παραγόντων. β) οι περισσότερες μελέτες αφορούν σε ετερογενή ομάδα ασθενών με ή χωρίς θεραπεία, με ή χωρίς άλλες παθήσεις ή επαγγελματική έκθεση και η παρακολούθησή τους είναι χρονικά περιορισμένη γ)οι περισσότερες δοκιμασίες είναι μη ειδικές και με χαμηλή ευαισθησία δ) τα ευρήματα είναι συχνά αντικρουόμενα αφού για παράδειγμα οι εξετάσεις αίματος δείχνουν ανοσολογική νόσο ενώ η εξέταση του BAL υπογραμμίζει τη φλεγμονώδη φύση της πάθησης.

Η αρχική υπόθεση επικεντρωνόταν σε ένα άγνωστο παράγοντα που μεσολαβούσε σε ένα κύκλο χρόνιας φλεγμονώδους βλάβης των κυψελίδων σε γενετικώς προδιατεθειμένα άτομα και κατέληγε σε ίνωση βαθμιαία ή απότομα. Αν ο κύκλος αυτός διακοπτόταν πριν συμβούν ιστικές βλάβες ,η ίνωση μπορούσε να αποφευχθεί. Η νεότερη υπόθεση έχει κάπως τροποποιηθεί (Εικ.4).

Σήμερα γνωρίζουμε ότι η νόσος οφείλεται στη διαταραχή της ισορροπίας καταστροφής-αποκατάστασης των στοιχείων του διαμέσου ιστού. Η πιο πάνω διαδικασία έχει προφανώς ανοσιακή βάση χωρίς να γνωρίζουμε το εκλυτικό της αίτιο. Ολόκληρη η επιφάνεια του αναπνευστικού βλεννογόνου διαθέτει ανοσοδραστικά κύτταρα που ανάλογα με τα ερεθίσματα που θα δεχθούν διεγείρονται, μετακινούνται και διαφοροποιούνται σε άλλα κύτταρα.

Η συγκέντρωση των μακροφάγων εξαρτάται εν μέρει από την παραγωγή τμημάτων της φιμπρονεκτίνης. Ανοσοσυμπλέγματα διεγείρουν τα κυψελιδικά μακροφάγα να εκκρίνουν χημειοτακτικούς παράγοντες(συστατικά του συμπληρώματος, μικροοργανισμοί κτλ.) που προσελκύουν ουδετερόφιλα στα κυψελιδικά τριχοειδή. Τα κύτταρα αυτά παράγουν οξειδωτικές ουσίες , μυελοϋπεροξειδάση, ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και υδροξυλίου και πρωτεάσες που

καταστρέφουν το κυψελιδικό τοίχωμα. Οι ελεύθερες ρίζες είναι υπεύθυνες για την καταστροφή του κυψελιδικού επιθηλίου και ενδοθηλίου. Τα διεγερμένα ουδετερόφιλα του αίματος είναι κυτταροτοξικά για τους ινοβλάστες, δράση που αναστέλλεται από την ανεπάρκεια της γλουταθειόνης. Η φλεγμονώδης απάντηση μοιάζει περισσότερο με την Th-2 ανοσιακή απάντηση. Υπάρχουν ηωσινόφιλα, μαστοκύτταρα (αύξηση επιπέδων ισταμίνης) και αυξημένα ποσά Th-2 κυτοκινών, ιντερλευκίνης 4 και 13 (192-196). Παράλληλα τα μακροφάγα εκλύουν πολυπεπτιδικούς αυξητικούς παράγοντες που διεγείρουν τα μεσεγχυματικά κύτταρα να πολλαπλασιαστούν. Μεταξύ του πληθυσμού των τελευταίων υπάρχει διαφορετική ικανότητα πολλαπλασιασμού. Τα μεσεγχυματικά κύτταρα με τη σειρά τους παράγουν κολλαγόνο και φμπρονεκτίνη και έτσι αυξάνεται ο συνδετικός ιστός και έχουμε ίνωση. Επιπλέον επηρεάζουν τη σύνθεση της διάμεσης ουσίας, εκκρίνοντας κολλαγενάση και λυσοσωμικά ένζυμα. Έχει βρεθεί αυξημένη έκφραση των γονιδίων του κολλαγόνου και η μεταγραφή τους είναι καθοριστικός παράγοντας για την ίνωση.

Τα διαμεσολαβητικά φλεγμονώδη μόρια πυροδοτούν ή διατηρούν τις φλεγμονώδεις και ανοσολογικές διεργασίες που οδηγούν στην ίνωση. Το mRNA της IL-8 έχει βρεθεί πως υπερεκφράζεται στα κυψελιδικά μακροφάγα ασθενών με IPF. Η IL-8 είναι ένα νέο πολυπεπτίδιο που έχει πιθανή εκλεκτική χημειοτακτική δράση στα ουδετερόφιλα. Επιπλέον τα επίπεδα έκφρασης του mRNA της IL-8 και η IL-8 συνδέονται με τον αριθμό των ουδετεροφίλων στο BAL ασθενών με IPF.

Ο TGF- β στο ανγεννόμενο κυψελιδικό επιθήλιο είναι μια κυτοκίνη- κλειδί για την ίνωση. Εκφράζεται σε μεγάλο ποσοστό και επιδρά στο σχηματισμό συνδετικού ιστού. Προάγει την έκφραση των γονιδίων του κολλαγόνου και την παραγωγή κολλαγόνου τύπου I από τους ινοβλάστες. Αυξημένη έκφραση του mRNA του TGF- β έχει βρεθεί σε ασθενείς με IPF. Και άλλες κυτοκίνες όπως ο TNF α , ο platelet-derived growth factor, και πρωτεάσες (κολλαγενάση, ελαστάση) εμπλέκονται.

Τα λεμφοκύτταρα και ιδίως τα OKT8+Τα διασπείρονται στο διάμεσο χώρο και συχνά οργανώνονται σε ομάδες με βλαστικό κέντρο. Η λεμφοκυττάρωση είναι παρούσα σε υποκλινικά και πρώιμα στάδια της νόσου και είναι προάγγελος της εξέλιξης της.

Στα αρχικά στάδια της ίνωσης είναι αυξημένο το κολλαγόνο τύπου III ενώ αργότερα το τύπου I. Επίσης ασθενείς με μεγαλύτερο ποσοστό κολλαγόνου τύπου III έχουν καλύτερη κλινική εικόνα. Ωστόσο ο ρυθμός σύνθεσης του κολλαγόνου δε

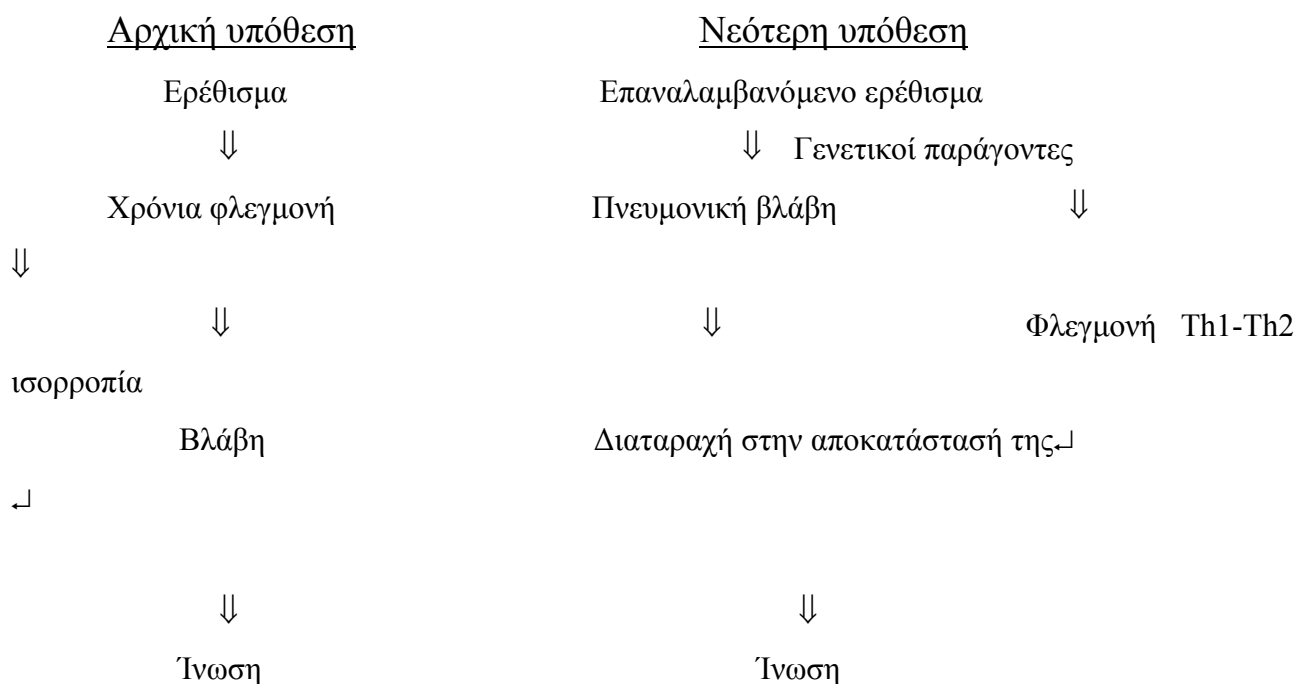
διαφέρει από αυτό των υγιών αλλά τα επίπεδα του τύπου III προκολλαγόνου αμινοτελικού πεπτιδίου είναι αυξημένα.

Το σήμα κατατεθέν της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης είναι οι ινοβλαστικές εστίες. Χαρακτηρίζονται από αντιγραφή των μεσεγχυματικών κυττάρων και άφθονη εναπόθεση εξωκυττάριας ουσίας. Είναι τυπικές της κυψελιδικής επιθηλιακής βλάβης με ενδολοβιακή εναπόθεση και αποδιοργάνωση των παρακείμενων αεραγωγών(197). Διαμεσολαβητές που υπεισέρχονται στην αποκατάσταση της βλάβης ,όπως ο transforming growth factor β₁ και ο connective tissue growth factor εκφράζονται σε αυτές τις θέσεις(198,199).Αλλά και άλλα ρυθμιστικά πεπτίδια όπως ο platelet-derived growth factor, fibroblast growth factors, fibroblast activating factors, insuline-like growth factor, IL-1, TNF φαίνεται πως παίζουν ρόλο(200).

Μυοϊνοβλάστες, λείες μυικές ίνες και άλλα συστατά διάμεσα κύτταρα εμφανίζονται στην IPF.

Αρχικά είχε δοθεί έμφαση στο διάμεσο ιστό ως η κύρια θέση φλεγμονής και παθογένειας . Ο πρωταρχικός ρόλος του ενδοκυψελιδικού ιστού στο σχηματισμό κοκκιωμάτων δείχνει τη μεγάλη σημασία του επιθηλίου στη φλεγμονή πιθανώς κάτω από την επίδραση ρυθμιστικών παραγόντων(201).

Εικόνα 4: Η αρχική και η νεότερη υπόθεση σχετικά με την παθογένεια της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης.



3.5. ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ

Η υπερτροφία και η υπερπλασία των μορφολογικά και λειτουργικά επηρεασμένων κυψελιδικών κυττάρων τύπου II είναι κοινό εύρημα σε όλες σχεδόν τις διάμεσες πνευμονοπάθειες. Παράλληλα έχουν βρεθεί ανωμαλίες των φωσφολιπιδικών συστατικών του πνευμονικού επιφανειακού παράγοντα που συνδέονται με την κλινική εικόνα της IPF.

Χαρακτηριστικό εύρημα στη UIP είναι η ποικιλία των βλαβών ανά περιοχή αφού συμβαίνουν σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Έτσι εμφανίζονται ινωτικές περιοχές, κυρίως στην περιφέρεια, με εικόνα «μελισσοκηρύθρας» ανάμεσα σε υγιές πνευμονικό παρέγχυμα. Επίσης διακρίνονται περιοχές ενεργού και ανενεργού ίνωσης, δηλ. άλλες με εικόνα «μελισσοκηρύθρας» και άλλες με οξεία φλεγμονή, πολλαπλασιαζόμενους ινοβλάστες και μυοϊνοβλάστες(14,202). Υπάρχουν ώριμοι ινοβλάστες και άλλοι με ελάχιστο σχηματισμό κολλαγόνου. Οι τελευταίες αυτές περιοχές αποτελούν πρώιμα παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά της UIP(203). Η ετερογένεια των βλαβών πιθανώς οφείλεται στη διαφορετική διεισδυτικότητα των εισπνεόμενων σωματιδίων, στη διαφορετική διαλυτότητα των εισπνεόμενων αερίων και στη διαφορετική κατανομή του αερισμού-αιμάτωσης. Οι διαφορές αυτές εξηγούν γιατί η συγκέντρωση του κολλαγόνου είναι αυξημένη ενώ η σύνθεση του παραμένει φυσιολογική. Υπερπλασία των κυττάρων τύπου II και αυξημένος αριθμός μακροφάγων χαρακτηρίζουν τα κυψελιδικά διαφράγματα. Στα πρώιμα στάδια της νόσου υπάρχει ενεργός κυψελιδίτιδα με ελάχιστη ίνωση ενώ σε προχωρημένα στάδια παρατηρείται περιορισμένη κυψελιδίτιδα με μέγιστη ίνωση.

Οι αεροφόρες οδοί διατείνονται και περιέχουν όχι μόνο μακροφάγα και άλλα κύτταρα φλεγμονής αλλά και κρυστάλλους χοληστερίνης, βλέννη και νεκρωμένους ιστούς. Το τοίχωμά τους αποτελείται από υπερπλαστικό επιθήλιο όπως και των αιμοφόρων αγγείων. Υπερπλασία υφίστανται και οι λείες μυϊκές ίνες.

Αντίθετα στην NSIP υπάρχει ομοιογένεια με διήθηση των κυψελίδων με λεμφοκύτταρα, πλασματοκύτταρα με αποτέλεσμα την πάχυνση των διαφραγμάτων τους. Οι βλάβες είναι χρονικά ομοιόμορφες αλλά υπάρχουν και περιοχές υγιούς

πνευμονικού παρεγχύματος. Η φλεγμονή φαίνεται πως είναι πιο χαρακτηριστικό εύρημα σε σχέση με την UIP.

Η οξεία διάμεση πνευμονία (AIP) ή σύνδρομο των Hamman-Rich χαρακτηρίζεται από διήθηση από μονοκύτταρα και εμφανίζει ομοιότητες με το ARDS. Τα κυψελιδικά διαφράγματα παχύνονται λόγω οιδήματος, φλεγμονώδους κυτταρικής διήθησης, πολλαπλασιασμού των ινοβλαστών και επιθηλιακής υπερπλασίας(204,205).Ο πολλαπλασιασμός των ινοβλαστών είναι διάχυτος σε σχέση με την UIP όπου είναι εστιακός παρόλο που υπάρχουν μεταβολές στη σοβαρότητα των βλαβών ανά περιοχή. Τα πνευμονοκύτταρα τύπου II υπερπλάσσονται και εμφανίζουν ατυπία. Οι βλάβες εντοπίζονται κυρίως στα κυψελιδικά διαφράγματα αλλά και στους αεραγωγούς.

Στην DIP οι κυψελίδες βρίθουν μακροφάγων και γι' αυτό η νόσος ονομάζεται και πνευμονία από κυψελιδικά μακροφάγα.(Alveolar macrophage pneumonia-AMP). Τα μακροφάγα συγκεντρώνονται γύρω από τα βρογχιόλια αλλά και διάχυτα στο πνευμονικό παρέγχυμα. Η συσσώρευση τους υπερκαλύπτει τη διάμεση πνευμονία. Τα βρογχιόλια των κυψελιδικών διαφραγμάτων παχύνονται και τα πνευμονοκύτταρα υπερπλάσσονται. Η εικόνα δεν είναι ομοιόμορφη αλλά γενικά απουσιάζουν οι περιοχές «μελισσοκηρύθρας» και οι ινοβλαστικές και η ίνωση είναι ήπια(206).

Στην BOOP η φλεγμονή επικεντρώνεται στους περιβρογχικούς διάμεσους και κυψελιδικούς πόρους(207).Αφρώδη μακροφάγα συναντώνται συχνά. Ενδοαυλικές μάζες συνδετικού ιστού υπάρχουν στις κυψελίδες, τα βρογχιόλια και τους αεραγωγούς.

Συμπερασματικά, η κοινή παθολογοανατομική βλάβη είναι η γεωγραφικά και χρονικά ετερογενής παρεγχυματική ίνωση σε έδαφος ήπιας φλεγμονής. Σε προχωρημένα στάδια οι πνεύμονες υφίστανται ρίκνωση και μοιάζουν μακροσκοπικά με το κίρρωτικό ήπαρ ,γι' αυτό η πάθηση παλιά λεγόταν «κυστική κίρρωση του πνεύμονα». Ο υπεζωκότας σπάνια γίνεται ινωτικός αλλά μπορεί να συμβεί ασβέστωση του.

3.6. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

Πρώτες εκδηλώσεις είναι η προοδευτικά αυξανόμενη δύσπνοια , η μη αντοχή στην προσπάθεια, ο θωρακικός πόνος και ο ξηρός ερεθιστικός βήχας. Η δύσπνοια και ο βήχας συχνά συνοδεύονται και από συστηματικά συμπτώματα όπως η κόπωση, η ανορεξία ,η μυαλγία , η αρθραλγία, οι νυχτερινοί ιδρώτες και η απώλεια βάρους(157).Τα πιο πάνω συμπτώματα μπορεί να υποδύονται γρίπη. Όμοια και στην αρχή η πάθηση μπορεί να μοιάζει με ιογενή λοίμωξη ή λοίμωξη από μυκόπλασμα. 5% των ασθενών είναι ασυμπτωματικοί τη στιγμή της διάγνωσης.

Συχνά προηγείται μια λοίμωξη του ανωτέρου αναπνευστικού συστήματος.

Σημεία πνευμονικής υπέρτασης με κύανωση και πληκτροδακτυλία με συνοδό υπερτροφική οστεαρθροπάθεια εμφανίζονται αργά στην πορεία της νόσου. Αριστερή καρδιακή ανεπάρκεια παρατηρείται σε ένα 10% των ασθενών με σοβαρή IPF(208). Μπορεί να συνυπάρχουν παθήσεις όπως ο ερυθματώδης λύκος, η ρευματοειδής αρθρίτιδα και το σκληρόδερμα.

3.7. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ-ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΤΙΚΑ

ΕΥΡΗΜΑΤΑ

Συνήθως είναι μη ειδικά. Η ΤΚΕ μπορεί να είναι αυξημένη το ίδιο και η LDH, χωρίς όμως να είναι ειδικά ευρήματα. Η υποξαιμία είναι συχνή αλλά σπάνια υπάρχει πολυκυτταραιμία. Τα επίπεδα των κυκλοφορούντων ανοσοσυμπλεγμάτων και τα επίπεδα των ανοσοσφαιρινών (ιδίως των IgG) είναι αυξημένα σε ποσοστό 30% και συνδέονται ιστοπαθολογικά με μεγαλύτερη φλεγμονή. Anti-DNA αντισώματα ανευρίσκονται στο 7-25% των ασθενών, ρευματοειδής παράγοντας στο 14% και κρυσφαιρίνες στο 41%.

Δείχνει πρότυπο περιοριστικής πνευμονοπάθειας με ελαττωμένη την ολική πνευμονική χωρητικότητα και τη DL_{CO} (ικανότητα διάχυσης του πνεύμονα) ενώ ο λόγος FEV₁/FVC είναι αυξημένος. Η υποοξυγοναιμία επιδεινώνεται στην κόπωση. Η

ΡαCO₂ είναι φυσιολογική ή ελαττωμένη και το pH φυσιολογικό. Η κυψελιδο-αρτηριακή διαφορά οξυγόνου είναι αυξημένη στην ηρεμία ακόμη και όταν η ΡαO₂ είναι φυσιολογική(209). Ωστόσο σε αρχικά στάδια μπορεί τα ευρήματα αυτά να απουσιάζουν.

Τα κύτταρα που λαμβάνονται με τη βρογχοκυψελιδική έκπλυση μπορεί να είναι ενδεικτικά του τύπου της φλεγμονής των κυψελίδων. Συνήθως βρίσκονται αυξημένα τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα, μπορεί όμως και τα ηωσινόφιλα και τα λεμφοκύτταρα(210).

Η ακτινογραφία θώρακος δείχνει συνήθως διάσπαρτες οζώδεις ή δικτυοζώδεις σκιάσεις κυρίως στα κάτω πνευμονικά πεδία και στην περιφέρεια των πνευμόνων. Περίπου το 14% των ιστολογικά επιβεβαιωμένων έχει φυσιολογική ακτινογραφία. Εικόνα «μελισσοκηρύθρας» παρατηρείται σε προχωρημένη ίνωση(211).

Η αξονική τομογραφία επιτρέπει τη μελέτη του παρεγχύματος ως το επίπεδο των πνευμονικών λοβιδίων(212).

Είναι κοινά αποδεκτό ότι η ανοικτή βιοψία βοηθά στη σωστή διάγνωση και άρα στην κατάλληλη θεραπευτική αντιμετώπιση(213,214) ιδιαίτερα στους ασθενείς που έχουν άτυπα κλινικά και απεικονιστικά ευρήματα. Τα αποτελέσματα της βιοψίας πρέπει να συνεκτιμηθούν με τα κλινικά στοιχεία γιατί παρόμοια παθολογοανατομικά ευρήματα μπορεί να έχουμε και μετά από ιογενείς λομώξεις, επίδραση τοξικών ουσιών ή ακτινοβολίας.

3.8. ΠΡΟΓΝΩΣΗ

Συνήθως η νόσος είναι προοδευτική αλλά η πρόγνωση της πορείας της είναι δύσκολο να προδιαγραφεί. Ο μέσος χρόνος επιβίωσης είναι 4-5 χρόνια(216) ή κατά άλλους 28,2 μήνες από την έναρξη των αναπνευστικών συμπτωμάτων(220). Το ποσοστό θνησιμότητας είναι 50% τα 5 πρώτα χρόνια μετά τη διάγνωση, παρόλο που το στάδιο της νόσου και οι υποκείμενες παθήσεις μπορεί να επηρεάσουν την έκβαση. Καμία ως τώρα θεραπεία δεν έχει καταφέρει να αυξήσει το χρόνο επιβίωσης(215).40% των ασθενών καταλήγουν λόγω αναπνευστικής ανεπάρκειας

αλλά και επιπλοκών της νόσου(216).Στην Ιαπωνία τα ποσοστά θνησιμότητας είναι 3,3 για τους άνδρες και 2,5 για τις γυναίκες ανά 100.000 πληθυσμού.

Η πρόγνωση είναι καλύτερη σε γυναίκες κάτω των 50 χρ. με βραχεία περίοδο συμπτωμάτων, καλή πνευμονική λειτουργία , περιορισμένη ίνωση, υψηλότερη PaO₂ ,υπεροχή λεμφοκυττάρων στο κυψελιδικό έκπλυμα και καλή απάντηση στα κορτικοειδή.(158,148,217-221,151).Η λεμφοκυττάρωση στο BAL εμφανίζεται εκλεκτικά σε όσους έχουν καλή απάντηση στη θεραπεία. Αντίθετα η ηωσινοφιλία στο BAL συνδέεται με προοδευτική επιδείνωση. Πάντως ο καλύτερος προγνωστικός παράγοντας είναι τα ιστολογικά ευρήματα. Οι φλεγμονώδεις βλάβες είναι αναστρέψιμες σε αντίθεση με την εικόνα δίκην «μελισσοκηρύθρας» και την υαλοειδή εκφύλιση που δεν υποστρέφονται.

Σε σπάνιες άλλοτε περιπτώσεις είναι δυνατό η πάθηση να οδηγήσει σε θάνατο από αναπνευστική ανεπάρκεια μέσα σε 6 μήνες από την εγκατάσταση των συμπτωμάτων(σύνδρομο των Hamman-Rich). Είναι εκπληκτικό πως σε όσους καταφέρουν να επιβιώσουν η πνευμονική λειτουργία αποκαθίσταται πλήρως(222,223).

3.9. ΙΔΙΟΠΑΘΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΙΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Η επίπτωση του βρογχογενούς καρκινώματος είναι αυξημένη(9,8-31%) σε ασθενείς με IPF(151,224-230) σε σχέση με τους υγιείς(2-6,4%). Συγκεκριμένα ο κίνδυνος για καρκίνο του πνεύμονα στους ασθενείς με IPF σε σχέση με το γενικό πληθυσμό είναι 14:1 και είναι αιτία θανάτου για περισσότερους από το 10% αυτών (151). Αυτή η παρατήρηση είναι σημαντική για την πρόγνωση και θεραπεία της ίνωσης αλλά και για την κατανόηση των αιτιών του καρκίνου του πνεύμονα. Παραμένει αντιφατικό αν το γεγονός αυτό της συνύπαρξης οφείλεται στην ίνωση και χρόνια φλεγμονή ή αν έχει σχέση με το κάπνισμα και την επαγγελματική έκθεση(232,233).

Άλλες μελέτες αναφέρουν ότι το κάπνισμα είναι ανεξάρτητος και επιπρόσθετος παράγοντας κινδύνου και η πιθανότητα συνύπαρξης Ca και IPF συνδέεται με το κάπνισμα(144,146,170). Σε αντίθεση με αυτές τις απόψεις, ο Hubbard και συν.(231) αναφέρουν ότι ο κίνδυνος για καρκίνο πνεύμονα συνδεδεμένου με IPF είναι διπλάσιος στους μη καπνιστές σε σχέση με τους καπνιστές.

Το αντίστοιχο μοντέλο της εύρεσης καρκίνου του εντέρου σε ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα κάνει λιγότερο εκπληκτική την εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα στους ασθενείς με ίνωση(234). Άλλα παρόμοια μοντέλα είναι αυτά του καρκίνου του στομάχου μετά από επιμένουσα φλεγμονή με το H.pylori και το ηπατοκυτταρικό Ca σε ηπατίτιδα Β ή C. Ίσως η χρόνια φλεγμονή προκαλεί εκτεταμένη καταστροφή στο DNA, αναστολή της G1 φάσης -απόπτωση με αποτέλεσμα την υπερέκφραση και μετάλλαξη του γονιδίου p53 και άρα την καρκινογένεση(235).

Στην IPF η επούλωση οδηγεί πιθανώς στη συγκέντρωση καρκινογόνων παραγόντων. Πράγματι υψηλές συγκεντρώσεις καρκινοεμβρυικού αντιγόνου έχουν βρεθεί στο BAL ασθενών με ίνωση και αποτελεί δείκτη της προκακοήθους μεταπλασίας και υπερπλασίας. Αυτές οι αλλαγές στον πνευμονικό ιστό με αποτέλεσμα την επιθηλιακή ατυπία περιφερικά προδιαθέτουν στην εμφάνιση διεισδυτικής κακοήθειας. Μια άλλη πιθανή εξήγηση είναι των κοινών αιτιών των δύο αυτών νόσων.

Την άποψη της συνύπαρξης καρκίνου και IPF ενισχύει και το γεγονός ότι κυτοκίνες παράγονται τόσο στην IPF όσο και στον καρκίνο του πνεύμονα. Ίσως παίζει ρόλο κατά τη διάρκεια των φλεγμονωδών και επιδιορθωτικών διαδικασιών η μετάλλαξη στο K-ras που αποτελεί ένα πρώιμο γεγονός στην πνευμονική καρκινογένεση.

Οι επιδημιολογικές μελέτες σχετικά με τη σχέση IPF και καρκίνου είναι λίγες(236-238). Αν θεωρήσουμε πως υπάρχει σχέση μεταξύ IPF και καρκίνου, αυτή μπορεί να οφείλεται σε έκθεση σε περιβαλλοντικούς και επαγγελματικούς παράγοντες. Ο Lee και συν. αναφέρουν ότι σε σχέση με τα περισσότερα καρκινώματα που εντοπίζονται στους άνω λοβούς, τα καρκινώματα που συνδέονται με την IPF βρίσκονται κυρίως στον κατώτερο λοβό και κυρίως (65,6%) περιφερικά όπου η ίνωση είναι προχωρημένη(233). Οι ιστολογικοί τους τύποι δε διαφέρουν σε σχέση με αυτούς των ασθενών χωρίς ίνωση. Ιδιαίτερα συχνά απαντούν τα αδενοκαρκινώματα και κυρίως το βρογχοκυψελιδικό και το μικροκυτταρικό.

Μικροσκοπικά το αδενοκαρκίνωμα πολλαπλασιάζεται στην επιφάνεια των πεπαχυσμένων κυψελιδικών τοιχωμάτων και στα διευρυσμένα βρογχιόλια.

Μένει να απαντηθούν πολλά ερωτήματα ακόμη όπως για παράδειγμα αν η εντόπιση και οι ιστολογικοί τύποι του καρκίνου είναι διαφορετικοί σε αυτούς με IPF και χωρίς.

3.10.ΓΕΝΕΤΙΚΗ

Περισσότερο από το 3% των περιπτώσεων ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης εμφανίζονται σε μέλη οικογενειών(239-247,16). Η υπόθεση ότι η IPF συμβαίνει σε γενετικώς προδιατεθειμένα άτομα που δεν μπορούν να ελέγξουν τις φλεγμονώδεις, ανοσολογικές και ινωτικές διαδικασίες στον πνεύμονα μετά από έκθεση σε διάφορους παράγοντες στηρίζεται σε αξιόλογες μελέτες αλλά κανένας γενετικός παράγοντας δεν έχει πλήρως ταυτοποιηθεί. Υποστηρίζεται επίσης ότι ο γενετικός παράγοντας καθορίζει την κλινική έκφραση της νόσου.

Έχει βρεθεί αυξημένη συχνότητα των HLA-B12, HLA-B15, HLA-Dw6, HLA-DR2 και HLA-B8(σε γυναίκες με έναρξη των συμπτωμάτων πριν τα 50χρ.) και μειωμένη συχνότητα του HLA-Dw3(248-250). Μελέτες στην περιοχή της α1-αντιθρυψίνης στο χρωμόσωμα 14 έδειξαν σημαντική αύξηση του non-MM φαινοτύπου και ειδικά του MZ(251-253). Μια άλλη περιοχή του χρωμοσώματος 14, η ανοσοσφαιρίνη γ συνδέεται με την οικογενή πνευμονική ίνωση. Λέγοντας οικογενή πνευμονική ίνωση εννοούμε την εμφάνιση νόσου ιστολογικά επιβεβαιωμένης σε τουλάχιστον δύο μέλη αυτής(254). Ο απλότυπος GM1 συνδέεται με την IPF. Η σχέση της νόσου με άλλες κληρονομικές όπως το σύνδρομο Hermansky-Pudlak, η νευροϊνωμάτωση, η νόσος Gaucher's, η νόσος Niemann-Pick ,η οικογενής υπερασβεστιουρική υπερασβεστιαϊμία ενισχύουν την άποψη της γενετικής βάσης της νόσου.

Η κλινική εικόνα ,τα ευρήματα στη φυσική εξέταση , οι ραδιογραφικές και ιστοπαθολογικές ανωμαλίες στην οικογενή πάθηση είναι διαφορετικές από τα ευρήματα στις σποραδικές περιπτώσεις. Η νόσος μπορεί να ξεκινά από την παιδική

ηλικία. Μονοωγενείς δίδυμοι έχουν συνήθως παρόμοια ηλικία έναρξης της νόσου και κλινική εικόνα, ακόμη και αν ζουν σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές. Ασυμπτωματικά μέλη οικογενειών με οικογενή νόσο έχουν αυξημένη επίπτωση κυψελιδικής φλεγμονής με αυξημένες τιμές ουδετεροφίλων και ενεργοποιημένων μακροφάγων.

Ο τύπος της κληρονομικότητας μάλλον είναι ο επικρατών αυτοσωμικός με ποικίλη διεισδυτικότητα(243).

Παρόλο που έχουν παρατηρηθεί πολυμορφισμοί στον ανταγωνιστή του υποδοχέα της ιντερλευκίνης 1, του TNF α και περιοχών του HLA, δεν υπάρχει σαφής κλινική ένδειξη της γενετικής βάσης της νόσου(255,256).

Φαίνεται πως όλοι αυτοί οι παράγοντες σε διαφορετικό βαθμό καθορίζουν τη φαινοτυπική έκφραση της ίνωσης στην πάθηση.

ΓΕΝΕΤΙΚΗ

4.1 ΓΕΝΙΚΑ

Γνωρίζουμε ότι ο καρκίνος είναι μια πολύπλοκη και πολυσταδιακή διαδικασία που περιλαμβάνει ενεργοποίηση, συνεχή πολλαπλασιασμό, απώλεια αναστολής, είσοδο και μετάσταση των καρκινικών κυττάρων στους γειτονικούς ιστούς. Γενετικοί αλλά και επιγενετικοί παράγοντες προκαλούν απώλεια του φυσιολογικού ελέγχου της κυτταρικής δραστηριότητας. Σε όλα αυτά εμπλέκονται γονίδια που ρυθμίζουν την κυτταρική αύξηση και θάνατο, τη γενετική αστάθεια και την αποκατάσταση των βλαβών του DNA. Τα πιο πάνω γονίδια μπορεί να υποστούν μονοσημειακές μεταλλάξεις, απώλεια χρωμοσωμικών βραχιόνων, χρωμοσωμικές μεταθέσεις ή πολλαπλασιασμό.

Όλες οι διαδικασίες που οδηγούν σε κακοήθεια περιλαμβάνουν γενετικές και επιγενετικές επιρροές με αποτέλεσμα την επικράτηση κλώνων με επιθετικές αυξητικές ιδιότητες. Μόνο ένα μικρό μέρος των μεταλλαγών που προδιαθέτουν σε καρκίνο αφορούν τους γαμέτες ενώ η πλειοψηφία αυτών είναι σωματικές και παρούσες στα νεοπλαστικά κύτταρα των προσβεβλημένων ατόμων. Υπάρχουν τρεις τύποι γονιδίων που είναι στόχοι των καρκινικών μεταλλαγών: τα ογκογονίδια, τα ογκοκατασταλτικά και τα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA. Είναι ενδιαφέρουσα η μελέτη του βιοχημικού τους ρόλου και η συμμετοχή τους στα διάφορα στάδια της κακοήθους εξέλιξης.

Σήμερα οι προσπάθειές μας επικεντρώνονται στο ρόλο τους στην πρόιμη διάγνωση και πρόγνωση των όγκων. Για παράδειγμα στον καρκίνο του πνεύμονα, το p53 έχει θέση στην πρόιμη διάγνωση της νόσου και στην πρόγνωση μαζί με τα K-ras, HER-2/neu και myc. Επίσης τα p53, HER-2/neu εμπλέκονται στην αντίσταση στα φάρμακα και άρα μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως χημειοευαίσθητοι δείκτες.

4.2 ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΑ

Τα ογκογονίδια είναι αποτέλεσμα ενεργοποίησης των πρωτο-ογκογονιδίων μετά από μεταλλαγή(π.χ. ras) , πολλαπλασιασμό ή υπερέκφραση(π.χ.myc). Τα πρωτο-ογκογονίδια συμμετέχουν στη φυσιολογικά ανάπτυξη ,διαφοροποίηση και πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Κωδικοποιούν πρωτεΐνες που παίζουν ρόλο στην επαγωγή σήματος ή στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Όταν υπερεκφράζονται ή αλλοιώνονται δομικά, οι πρωτεΐνες τους επιλεκτικά προκαλούν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που τις εκφράζουν.

Ο μετασχηματισμός ενός δεδομένου κυττάρου επηρεάζεται τόσο από τον τύπο του ογκογονιδίου που είναι ενεργό στο κύτταρο όσο και από την ποσότητα του προϊόντος του. Η ικανότητα ενός ογκογονιδίου να αθανατοποιεί τα κύτταρα συνδέεται με την ικανότητά του να μπλοκάρει τη διαφοροποίηση. Ένα ογκογονίδιο δεν είναι αρκετό για να προκαλέσει κακοήγη μετασχηματισμό αλλά χρειάζεται συνεργική δράση με άλλα για την επαγωγή του καρκίνου.

Τα περισσότερα ογκογονίδια είναι όμοια με αυτά που ελέγχουν την κυτταρική διαίρεση και αύξηση. Παρόλο που η ρύθμιση της κυτταρικής διαίρεσης δεν είναι πλήρως κατανοητή ,τέσσερις τύποι πρωτεϊνών συμμετέχουν σε αυτή: οι αυξητικοί παράγοντες, οι υποδοχείς των αυξητικών παραγόντων, οι ενδοκυτταρικοί διαβιβαστές μηνυμάτων και οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες της μεταγραφής. Η ταξινόμηση έγινε σύμφωνα με το λειτουργικό τους ρόλο σε οδούς επαγωγής σήματος.

A) **Αυξητικοί παράγοντες (Ογκογονίδια τάξης I).** Τα ογκογονίδια σπάνια προέρχονται από γονίδια που κωδικοποιούν αυξητικούς παράγοντες. Μόνο ένα τέτοιο γονίδιο, το sis έχει ταυτοποιηθεί. Κωδικοποιεί μια μορφή αυξητικού παράγοντα που παράγεται από τα αιμοπετάλια(PDGF) και μετασχηματίζει κύτταρα που έχουν τον PDGF υποδοχέα. Έχουν σχηματιστεί τεχνητά ογκογονίδια τάξης I, π.χ. όταν το γονίδιο που κωδικοποιεί τον παράγοντα που διεγείρει τα κοκκιοκύτταρα-μακροφάγα(GM-CSF) εισαχθεί σε ένα κύτταρο που έχει GM-CSF υποδοχέα ,τότε

διεγείρει την κυτταρική διαίρεση και αύξηση. Αυτή η αυτοδιέγερση ονομάζεται αυτοκρινής επαγωγή.

B) Υποδοχείς ορμονών και αυξητικών παραγόντων (Ογκογονίδια τάξης

II)

Η τάξη αυτή διαιρείται σε δύο κατηγορίες: τους υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης και τους ενδοκυττάριους υποδοχείς. Οι πρώτοι στέλνουν ένα αυξητικό μήνυμα στο κύτταρο μετά την πρόσδεση του αυξητικού παράγοντα. Μερικοί υποδοχείς έχουν δράση κινασών στην κυτταροπλασματική τους περιοχή και φωσφορυλιώνουν τυροσίνες πρωτεϊνών. Τα γονίδια αυτών των υποδοχέων γίνονται ογκογονίδια όταν μεταλλαχθούν με τέτοιο τρόπο ώστε οι υποδοχείς που κωδικοποιούν να παραμείνουν ενεργοί ακόμη και απουσία του προσδεδεμένου παράγοντα. Σε περίπτωση που λείπει η περιοχή πρόσδεσης του σήματος ο τροποποιημένος υποδοχέας παραμένει διαρκώς ενεργός. Έτσι ένα κύτταρο που έχει αυτό τον υποδοχέα διαιρείται και αυξάνεται ανεξάρτητα από τους παράγοντες που ρυθμίζουν την ανάπτυξή του.

Παράδειγμα ενδοκυττάριου υποδοχέα είναι αυτού της θυρεοειδούς ορμόνης. Φυσιολογικά ο ρόλος της ορμόνης είναι να ενεργοποιεί τον υποδοχέα προς ρυθμιστική πρωτεΐνη της μεταγραφής. Το ογκογονίδιο *erbA* παράγει έναν τροποποιημένο υποδοχέα *erbA* που πιθανόν συναγωνίζεται τον ενδογενή υποδοχέα της θυρεοειδούς ορμόνης ,προκαλώντας ανάπτυξη χωρίς έλεγχο. Το ογκογονίδιο *erbA* δε μετασχηματίζει πλήρως τα κύτταρα, αλλά λειτουργεί συνεργατικά με την *erbB* διαμεμβρανική φωσφοπρωτεΐνη που είναι παράγωγο του υποδοχέα επιδερμικής ανάπτυξης(EGF). Απαντά στον καρκίνο του μαστού και των ωθηκών όπου το 20-30% αυτών εμφανίζουν πολλαπλασιασμό και υπερέκφραση, κάτι που συνδέεται με φτωχή πρόγνωση.

Γ) Ενδοκυτταρικοί διαβιβαστές μηνυμάτων (Ογκογονίδια τάξης III)

Κωδικοποιούν προϊόντα που ανήκουν στις εξής κατηγορίες: κινάσες πρωτεϊνικών τυροσινών ,κινάσες σερίνης/θρεονίνης, Ras πρωτεΐνες και συγγενείς πρωτεΐνες της φωσφωλιπάσης C.

Δ) Ρυθμιστικές πρωτεΐνες της μεταγραφής(Ογκογονίδια τάξης IV)

Παράδειγμα τέτοιων ογκογονιδίων είναι το *jun* και το *myc*.

Σχετικά με τη διαδικασία ογκογένεσης παρουσία των ογκογονιδίων ,πιστεύουμε ότι τα κύτταρα που περιέχουν μια εναρκτήρια μετάλλαξη σε ένα

ογκογονίδιο παραμένουν εφησυχασμένα και ρυθμίζονται από γειτονικά μέχρι να ελευθερωθούν με την αθανατοποίηση, κλωνική διαλογή και θάνατο των κυττάρων που τα περιβάλλουν.

Περίπου το 20% των δειγμάτων του DNA από πολυάριθμες κυτταρικές σειρές ανθρωπίνων κυττάρων και κυτταρικών όγκων έχουν ικανότητα μετασχηματισμού. Έτσι τα ογκογονίδια είναι συνήθη στους ανθρώπινους καρκίνους. Τα περισσότερα από αυτά είναι συγγενή προς τη c-ras οικογένεια. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί τρία c-ras-συγγενή γονίδια, το γονίδιο neu και αρκετά άλλα. Κυτταρικά ογκογονίδια έχουν βρεθεί στις λευχαιμίες, καρκίνους της ουροδόχου κύστης, πνευμόνων, παχέος εντέρου και νευρικού ιστού. Τα κυτταρικά ογκογονίδια δεν είναι αναγκαία ιστοειδικά στη δράση τους, δηλαδή το ίδιο γονίδιο μπορεί να είναι λειτουργικό σε όγκους διαφόρων ιστών.

Σχετικά με το ρόλο των ογκογονιδίων ως προγνωστικοί παράγοντες, έχει βρεθεί ότι τα myc είναι αρνητικοί προγνωστικοί παράγοντες για το μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα ενώ μεταλλάξεις στο K-ras και υπερέκφραση του HER-2/neu είναι αρνητικοί προγνωστικοί παράγοντες για τα αδenoκαρκινώματα. Αντίθετα η έκφραση του bcl-2 έχει θετική προγνωστική αξία για τα μη μικροκυτταρικά καρκινώματα.

4.3 ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ

Η ανάπτυξη σχεδόν όλων των κοινών καρκίνων του ανθρώπου συνοδεύεται με απώλεια ή μεταλλαγή ενός ή περισσότερων ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Αυτά κωδικοποιούν πρωτεΐνες που ρυθμίζουν αρνητικά την ανάπτυξη των κυττάρων και επηρεάζουν την επαγωγή σήματος και τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Για να εμφανίσουν ογκογόνο δράση πρέπει και τα δύο αλληλόμορφα να αδρανοποιηθούν.

Τελευταία περισσότερα από δώδεκα ογκοκατασταλτικά ή υπονήφια ογκοκατασταλτικά με σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση έχουν ταυτοποιηθεί και αναμένεται η ταχεία ανακάλυψη πολλών άλλων τα επόμενα χρόνια.

Το πρώτο ογκοκατασταλτικό γονίδιο που μελετήθηκε ήταν του ρετινοβλαστώματος(Rb) στο 13q14 χρωμόσωμα που κωδικοποιεί μια πυρηνική πρωτεΐνη ,την p105 . Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η ύπαρξη μεταλλαγών του Rb και στα δύο αλληλόμορφα έχει διαπιστωθεί σε κύτταρα πολλών διαφορετικών όγκων εκτός του ρετινοβλαστώματος , όπως του πνεύμονα και του προστάτη. Ο πρωταρχικός ρόλος του Rb είναι η ρύθμιση της μετάβασης από τη φάση G1 στη φάση S,συνδεδεμένο με ρυθμιστικές πρωτεΐνες, όπως c-myc και μεταγραφικός παράγοντας E2F .

Το p53 στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 17 είναι ίσως το πιο συχνά επηρεαζόμενο στις κακοήθειες και αποτελεί για πολλούς το "φύλακα του γονιδιώματος". Ελέγχει τη συσσώρευση βλαβών του DNA.Κωδικοποιεί μια πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη που λειτουργεί ως παράγοντας μεταγραφής ,συνδεδεμένη με ειδικές DNA αλληλουχίες και ρυθμίζοντας την έκφραση άλλων γονιδίων, όπως το MDM-2, p21 κλπ. Πιο συγκεκριμένα υπερρυθμίζει το bcl-2 και υπορυθμίζει την έκφραση του Bax και p21. Το Bax προάγει την απόπτωση και το p21 αναστέλλει την κυκλίνη-εξαρτώμενες κινάσες. Η πρωτεΐνη p53 μεσολαβεί στην κυτταρική απάντηση σε βλάβες του DNA με δύο μηχανισμούς: πρώτον αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 και δεύτερον μεσολάβηση στην απόπτωση. Επομένως η απενεργοποίηση του p53 οδηγεί σε απώλεια του ελέγχου δύο σημαντικών λειτουργιών: του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και θανάτου(257). Απώλεια του p53 οδηγεί στο σύνδρομο Li-Fraumeni που χαρακτηρίζεται από προδιάθεση για ορισμένους τύπους καρκίνου. Όταν λείπουν και τα δύο αντίγραφα του p53 οι όγκοι είναι μεταστατικοί και το ποσοστό επιβίωσης χαμηλό(258).Επιπλέον, οι μεταλλάξεις p53 στη γαμετική σειρά προκειμένου να επιταχύνουν την ογκογένεση στους ιστούς μπορεί να συνεργάζονται με τις μεταλλάξεις στο Rb .

Ένα άλλο ογκοκατασταλτικό γονίδιο, το p16 στο 9p χρωμόσωμα απενεργοποιείται με ομόζυγη απαλειφή, ενδογονιδιακή μετάλλαξη ή υπερμεθυλίωση της περιοχής CpG του προαγωγέα του p16. Η πρωτεΐνη του γονιδίου ρυθμίζει τους αναστολείς των κινασών που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο. Εμποδίζει την ενεργοποίηση της CDK4 με σύνδεση των CDK4 υποομάδων και προλαμβάνει την επίδραση με την κυκλίνη D.

Το DPC4 στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 18 απενεργοποιείται με ομόζυγη απαλοιφή αλλά και με απώλεια ετεροζυγωτίας και ενδογονιδιακή

μετάλλαξη. Το προϊόν του έχει μεγάλη σημασία στη μετάδοση μηνυμάτων μέσω του μεταφραφικού αυξητικού παράγοντα TGF- β (259).

Το PTEN γονίδιο κωδικοποιεί μια φωσφολιπιδική φωσφατάση που το κύριο υπόστρωμά της είναι η PIP3. Άρα απώλεια της λειτουργίας του PTEN οδηγεί σε ενεργοποίηση της δραστηριότητας της κινάσης PKB/AKT με αποτέλεσμα τη μειωμένη ευαισθησία στον κυτταρικό θάνατο. Μεταλλάξεις στο PTEN έχουν βρεθεί στον καρκίνο του προστάτη, στο γλοιοβλάστωμα, στον καρκίνο του μαστού και του ενδομητρίου(260).

Το WT1 γονίδιο εδράζεται στο χρωμόσωμα 11 και είναι απαραίτητο για τη φυσιολογική ανάπτυξη του νεφρού. Μεταλλάξεις σε αυτό σχετίζονται με τον οικογενή τύπο της νόσου του Wilms και σπάνια παρατηρούνται σε σποραδικούς όγκους.

4.4 ΓΟΝΙΔΙΑ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗΣ ΤΟΥ DNA

Το σύστημα επιδιόρθωσης του DNA(DNA mismatch repair (MMR) system) είναι σημαντικό για τη διατήρηση της γενετικής σταθερότητας . Όλες οι κύριες λειτουργίες του MMR, όπως η διόρθωση των βιοσυνθετικών λαθών και λαθών αντιγραφής, η επιβίωση των βλαβών του DNA και η πρόληψη του ανασυνδυασμού μεταξύ μη ιδίων αλληλουχιών εξυπηρετούν αυτό το σκοπό(262-264). Η αρχική απενεργοποίηση του MMR που ελέγχει τη σταθερότητα της αντιγραφής του DNA οδηγεί σε γενετική αστάθεια και αύξηση του ρυθμού μεταλλαξιογένεσης σε γονίδια που εμπλέκονται στον καρκίνο(π.χ. τον κληρονομικό μη πολυποσικό καρκίνο του εντέρου). Κύτταρα με ελαττώματα στο MMR σύστημα έχουν 100-1000 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα για μεταλλαγές και άρα για σποραδικούς ή οικογενείς καρκίνους. Βέβαια πιστεύουμε ότι μια απενεργοποίηση ενός γονιδίου επιδιόρθωσης του DNA δεν αποτελεί ένα μεταλλακτικό γεγονός από μόνο του αλλά απαιτούνται και επιπρόσθετες γενετικές αλλαγές ώστε τα κύτταρα να γίνουν κακοήθη. Διάφορες

θετικές ή αρνητικές επιλεκτικές πιέσεις μπορεί να οδηγήσουν σε διαφορετικά ποσοστά μεταλλάξεων. Επίσης ρόλο παίζουν ο τύπος της μετάλλαξης και η φυσιολογία του κυττάρου.

Τουλάχιστον 6 διαφορετικές πρωτεΐνες του MMR έχουν αναγνωρισθεί. Η MSH2 σχηματίζει ετεροδιμερή με την MSH6 ή MSH3 ανάλογα με τον τύπο της περιοχής που επιδιορθώνεται. Ένα ετεροδιμερές των MLH1 και PMS2 συντονίζει την αλληλεπίδραση μεταξύ του MMR και πρωτεϊνών απαραίτητων για το MMR. Οι τελευταίες περιλαμβάνουν τουλάχιστον εξωνουκλεάση 1, τις DNA πολυμεράσες δ και ίσως ελικάσες. Επιπλέον ομόλογα των πρωτεϊνών του MMR χρειάζονται για λειτουργίες άλλες από αυτές του MMR. Σε αυτές περιλαμβάνονται οι MSH4 και MSH5 που είναι απαραίτητες για το μειωτικό ανασυνδυασμό .

4.5 ΜΙΚΡΟΔΟΡΥΦΟΡΙΚΟ DNA

Οι διαδοχικά επαναλαμβανόμενες περιοχές του DNA είναι διάσπαρτες στο ανθρώπινο γονιδίωμα των ευκαρυωτικών οργανισμών και δεν έχουν κωδικοποιητική λειτουργία. Διακρίνονται σε δορυφορικό DNA με πολύ υψηλά διαδοχικά επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, σε μεταθετά στοιχεία που είναι μέτρια επαναλαμβανόμενες κινητές διάσπαρτες αλληλουχίες και τέλος σε μικροδορυφορικό DNA. Αυτό χαρακτηρίζεται από μέτρια διαδοχικά επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες. Είναι βραχείες συστοιχίες (2-5bp) νουκλεοτιδικών επαναλήψεων στο γονιδίωμα. Κυρίως επαναλαμβάνονται οι διπλέτες CA/GT. Στον άνθρωπο υπάρχουν τουλάχιστον 30.000 θέσεις μικροδορυφορικών αλληλουχιών DNA. Ο αριθμός των αντιγράφων ποικίλλει χαρακτηριστικά μέσα σε ένα πληθυσμό. Ο μέσος όρος του μεγέθους των συστοιχιών των μικροδορυφορικών αλληλουχιών του DNA είναι της τάξεως του 100 αλλά συχνά παρατηρούνται αποκλίσεις από το μέσο όρο. Πολλοί παράγοντες μπορεί να επηρεάσουν το μήκος των επαναλαμβανόμενων νουκλεοτιδικών μονάδων στις διαδοχικές συστοιχίες των αλληλουχιών του DNA. Τέτοιοι είναι η ενίσχυση κάποιου γονιδίου (μέσω παράλειψης, κυκλικής αντιγραφής ή άνισης ανταλλαγής) και η μετάλλαξη με αντικατάσταση βάσης. Από αυτούς τους

μηχανισμούς η παράλειψη κατά την αντιγραφή του DNA είναι η κύρια αιτία του πολυμορφισμού μήκους που οδηγεί σε αλλαγές μήκους λίγων βάσεων κάθε φορά.

Οι αλληλουχίες αυτές οριοθετούν τις περιοχές που συντελείται η ανταλλαγή ανάμεσα στις αδερφές χρωματίδες κατά το γενετικό ανασυνδυασμό, διασφαλίζοντας την ακρίβεια του και προλαμβάνοντας τον μιτωτικό ανασυνδυασμό ανάμεσα στα χρωμοσώματα. Βέβαια δεν απαιτείται απόλυτη ομολογία, γι' αυτό μικρά λάθη δεν επηρεάζουν το πλαίσιο ανάγνωσης σε παρακείμενα γονίδια.

Οι ανασυνδυασμοί των διαδοχικά επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών του DNA μπορεί να οδηγήσουν σε χρωμοσωμικές ανακατατάξεις και μεταλλάξεις μέσω ενίσχυσης των μικροδορυφορικών αλληλουχιών. Οι μεταλλάξεις των γονιδίων που ελέγχουν το μηχανισμό αποκατάστασης των λαθών κατά την αντιγραφή του DNA μπορεί να οδηγήσουν σε αστάθεια των μικροδορυφορικών αλληλουχιών του DNA, αφού τα λάθη που έγιναν κατά την αντιγραφή δε μπορούν να διορθωθούν. Η συχνότητα με την οποία συμβαίνουν αυτές οι αλλοιώσεις στο μήκος των διαδοχικά επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών του μικροδορυφορικού DNA είναι πολύ υψηλότερη από την κανονική συχνότητα μετάλλαξης.

Το μικροδορυφορικό DNA λόγω της ευρείας διάδοσης του στο γονιδίωμα, του πολυμορφισμού του και της δυνατότητας εφαρμογής της PCR αποτελεί σημαντικό δείκτη μελέτης του ανθρώπινου γονιδιώματος. Έχοντας το ως ιδανικό πειραματικό μοντέλο, μελετάται η πιστότητα στην αντιγραφή του DNA στα καρκινικά κύτταρα.

4.6 ΑΠΩΛΕΙΑ ΕΤΕΡΟΖΥΓΩΤΙΑΣ(LOH)

Ως απώλεια ετεροζυγωτίας χαρακτηρίζεται η απώλεια ενός αλληλομόρφου που παρατηρείται στους όγκους και όχι στο φυσιολογικό DNA λόγω άνισου επιχιασμού κατά το ζευγάρωμα των αδερφών χρωματίδων ή την αντιγραφή του DNA. Αν η απουσία ενός αντιγράφου(ετεροζυγωτία) είναι σιωπηλή, η ογκογένεση μπορεί να συμβεί με την απώλεια ενός δεύτερου αντιγράφου (απώλεια ετεροζυγωτίας). Ωστόσο και η ετεροζυγωτία από μόνη της μπορεί να οδηγήσει στην

καρκινογένεση, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις της συνεργικής επιρροής με άλλα γονίδια. Η απώλεια της ετεροζυγωτίας είναι χαρακτηριστικό των ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Όσον αφορά τον αριθμό της επανάληψης των αλληλουχιών, υπερβαίνει το 90% στο φυσιολογικό πληθυσμό.

LOH βρέθηκε σε μικρότερη συχνότητα στους MIN+ μη πολυποσικούς καρκίνους του εντέρου (HNPCC) σε σχέση με τους MIN-, ενώ στο μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα οι MIN+ και οι MIN- καρκίνοι είχαν την ίδια συχνότητα LOH.

Στον καρκίνο του πνεύμονα LOH έχει βρεθεί στις περιοχές 3p,5q,17p,13q, 10q και 4q.

Η απώλεια ετεροζυγωτίας βοηθά στην εύρεση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων σε μια πάθηση αλλά και στον καθορισμό της θέσης νέων τέτοιων γονιδίων.

4.7 ΑΣΤΑΘΕΙΑ ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΟΥ DNA(MIN)

Μεταλλαγές στο σύστημα κακώς επιδιορθωμένων βάσεων του DNA (MMR) οδηγεί σε μοριακές αλλαγές που είναι υπεύθυνες για την MIN. Το ποσοστό των μεταλλάξεων έχει σχέση με το μήκος της επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας και τη φύση της, καθώς υπάρχουν επιρροές από παρακείμενες αλληλουχίες. Η MIN είναι αποτέλεσμα της παράλειψης κατά την αντιγραφή μικροδορυφορικών αλληλουχιών, κάτι που συμβαίνει συχνότερα σε αυτές. Χρωμοσωμικές περιοχές με μικροδορυφορικούς δείκτες υψηλής συχνότητας MIN συνδέονται με ορισμένους τύπους καρκίνου και αναφέρονται ως MIN hot spots. Η αστάθεια μπορεί να αφορά όχι μόνο μια μονή επαναλαμβανόμενη αλληλουχία αλλά διάφορες περιοχές του χρωμοσώματος που διαφέρουν στους διάφορους όγκους.

Παρόλο που δεν αναφέρεται βιβλιογραφικά σχέση της MIN με την ιστοπαθολογία, έχει βρεθεί στατιστικά μεγαλύτερη συχνότητα MIN σε ορισμένους

υποτύπους καρκίνου. Η MIN μπορεί να εμφανίζεται σε πρώιμο ή αργότερο στάδιο της ογκογένεσης και έχει βρεθεί και σε μη νεοπλαστικούς ιστούς.

Η MIN που συνδέεται με επίκτητες μεταλλάξεις στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA(κυρίως hMSH2/hMLH1) φαίνεται να χαρακτηρίζει τον κληρονομικό μη πολυπώσικό καρκίνο του εντέρου(HNPCC) και μερικούς νεανικούς καρκίνους εντέρου και όχι τους μη-HNPCC όγκους(265-267). hMSH1/hMLH1 μεταλλάξεις σπάνια αναφέρονται σε άλλους MIN+ τύπους καρκίνου όπως του ενδομητρίου και των ωοθηκών. Στους MIN+ καρκίνους χωρίς μεταλλάξεις hMSH2/hMLH1 φαίνεται πως άλλοι παράγοντες του συστήματος κακώς επιδιορθωμένων βάσεων του DNA είναι υπεύθυνοι για την παρατηρούμενη αστάθεια, όπως ο hMSH6. Στους σποραδικούς καρκίνους του εντέρου η συχνότητα των MIN+ περιπτώσεων είναι 15-20% ενώ σε ασθενείς κάτω των 35χρ. μπορεί να φτάσει το 58%(268). Η αμέσως επόμενη υψηλή συχνότητα MIN παρατηρείται στον παγκρεατικό καρκίνο.

Η MIN αντανακλά μια υποκείμενη γενετική αστάθεια, αποτέλεσμα απενεργοποίησης και των δύο αλληλομόρφων σε μια περιοχή του συστήματος επιδιόρθωσης του DNA. hMSH2/hMLH1 μεταλλάξεις σπάνια αναφέρονται σε άλλους εκτός από τους MIN+ καρκίνους του εντέρου.

Το ποσοστό των αυθόρμητων αλλαγών σε μικρές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες 6 βάσεων είναι τρεις φορές υψηλότερο από ότι σε αυτές των δύο βάσεων. Επιπλέον οι αυθόρμητες μεταλλάξεις σε μικροδορυφορικούς δείκτες τρι- και τετρανουκλεοτιδίων είναι 50 φορές συχνότερες από ότι στους δινουκλεοτιδικούς με αποτέλεσμα τα δύο συστήματα να μην είναι συγκρίσιμα και οι δινουκλεοτιδικοί να προτιμώνται στην εκτίμηση της γενετικής αστάθειας. Ο σχεδιασμός γενετικών δεικτών όπως οι δείκτες του μικροδορυφορικού DNA δίνει τη δυνατότητα έρευνας σε όλο το γονιδίωμα χρωμοσωμικών περιοχών για ανεύρεση αστάθειας και συσχέτιση αυτής με παθολογικές καταστάσεις.

Δεν έχει καθοριστεί βιβλιογραφικά ο αριθμός των δεικτών που πρέπει να χρησιμοποιηθούν προκειμένου ένας όγκος να χαρακτηριστεί ως MIN+/- . Πάντως δημοσιευμένες μελέτες που χαρακτηρίζουν όγκους ως MIN- χρησιμοποιώντας τρεις μικροδορυφορικούς δείκτες δε θεωρούνται λιγότερο ακριβείς από αυτές που χρησιμοποιούν τέσσερις ή περισσότερους.

Τα πρώτα γονίδια στα οποία περιγράφηκε μικροδορυφορική αστάθεια είναι τα TGFβRII, BAX, IGFIIR, MSH3, MSH6. Σήμερα η ομάδα τους έχει κατά πολύ διευρυνθεί.

Ανάλυση για MIN του DNA των όγκων μπορεί να ανιχνεύσει σωματικές μεταλλαγές που συμβαίνουν στα διάφορα στάδια της ογκογένεσης και να προκαθορίσει την αντίσταση στους αλκυλιωτικούς παράγοντες. Έχει βρεθεί ότι οι MIN+ φαινότυποι συνδέονται με αντίσταση στους αλκυλιωτικούς παράγοντες.

4.8 ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ ΣΕ ΑΛΛΕΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ

Στο σημείο αυτό θα αναφερθούμε σε γενετικές αλλοιώσεις που αφορούν σε παθήσεις εκτός από τη σαρκοείδωση και την ιδιοπαθή ίνωση, αφού οι δύο τελευταίες θα αναλυθούν εκτενώς παρακάτω.

MIN έχει βρεθεί στις αθηρωματικές πλάκες και σχετίζεται με την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου(269-275). Γενετικές αλλοιώσεις έχουν παρατηρηθεί και σε παθήσεις οφθαλμικές (πτερύγιο), νευρολογικές(χορεία του Huntington, σύνδρομο εύθραυστου χρωμοσώματος X)(276-280). Βέβαια στις παραπάνω περιπτώσεις οι περιοχές που υφίστανται αύξηση είναι περιορισμένες και η αστάθειά τους δεν αντανακλά γενικότερη αύξηση του αριθμού των μεταλλάξεων. Η γενετική αστάθεια έχει συσχετιστεί και με αύξηση του ποσοστού των αποβαλλόμενων εμβρύων(281-284). Μικροδορυφορικές αλλοιώσεις εμφανίζονται και σε καλοήθεις παθήσεις του μαστού και του ήπατος(285,286).

MIN και LOH έχει βρεθεί και σε καλοήθεις πνευμονικές παθήσεις όπως η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια(287-292).

Πέρα από τον καρκίνο του πνεύμονα, MIN και LOH παρατηρείται και σε άλλες κακοήθειες, όπως του γαστρεντερικού(έντερο, ήπαρ, στόμαχος, οισοφάγος), του θυρεοειδούς, του ουροποιητικού, του νευρικού(γλοιοβλάστωμα) και του γεννητικού(μαστός, τράχηλος)(293-305). Οι χρωμοσωμικές περιοχές που κυρίως εντοπίζονται οι αλλοιώσεις φαίνονται στον παρακάτω πίνακα 4.

Πίνακας 4. Οι σποραδικοί καρκίνοι και οι απώλειες χρωμοσωμικών περιοχών.

ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ	ΟΡΓΑΝΑ
1q,1p,3p,6q,11p,13q,16q,17q,17p	ΜΑΣΤΟΣ
3p,5q,8p,11p,13q,17p	ΠΝΕΥΜΟΝΑΣ
3p,5q,17p	ΝΕΦΡΟΙ
6q,9p,11p	ΔΕΡΜΑ
3p,11q,17p	ΤΡΑΧΗΛΟΣ
3p,6q,11p,13q,17p	ΩΟΘΗΚΕΣ
3p,11p,17p	ΟΡΧΕΙΣ
8p,10q,16q	ΠΡΟΣΤΑΤΗΣ
1p,2p,5q,8p,11q,13q,14q,17p	ΠΑΧΥ ΕΝΤΕΡΟ
13q,18q	ΣΤΟΜΑΧΟΣ
3p,6q,8p,11,17p	ΠΑΓΚΡΕΑΣ

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΠΡΩΤΟ

ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

5.1 ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ-ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΑΣΘΕΝΩΝ

Πτύελα και φλεβικό αίμα συλλέχθηκαν από 52 ασθενείς που διαγνώστηκαν και παρακολουθούνταν στην Πνευμονολογική Κλινική του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου και εμφάνιζαν κλινικά , ακτινολογικά(HRCT) και ιστολογικά χαρακτηριστικά συμβατά με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση(IPF). Η διάγνωση της IPF έγινε με βιοψία πνεύμονα (ανοιχτή θωρακική βιοψία ή θωρακοσκοπική επέμβαση με τη βοήθεια video) και έδειξε διάμεση πνευμονία (UIP) ,την παρουσία χαρακτηριστικού κριγμού στην ακρόαση, μεταβολές στις πνευμονικές δοκιμασίες και την απουσία διηθήσεων στην HRCT. Ασθενείς με περιβαλλοντική έκθεση σε ινωτικούς παράγοντες αποκλείστηκαν. Άλλα κριτήρια αποκλεισμού ήταν η συνύπαρξη χρόνιας νόσου ,πνευμονικής λοίμωξης ή κακοήθειας. Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν τα 72 χρόνια(από 57 ως 82 χρόνια).Σαράντα από τους ασθενείς ήταν άντρες και 12 γυναίκες. Τριάντα έξι από τους ασθενείς ήταν καπνιστές . Η διάρκεια της νόσου ήταν $3,3\pm 1,4$ χρόνια. Για να επιβεβαιώσουμε ότι τα δείγματα των πτυέλων ήταν από την κατώτερη αναπνευστική οδό εξετάστηκαν μικροσκοπικά και κατάλληλα θεωρήθηκαν αυτά που είχαν λιγότερα από 10 επιθηλιακά κύτταρα κατά οπτικό πεδίο(305).Οι μετρήσεις των πνευμονικών λειτουργιών έγιναν όπως προηγούμενα(306). Γραπτή συγκατάθεση πάρθηκε από όλους τους ασθενείς που μετείχαν στη μελέτη και έγινε σύμφωνα με τους κανόνες της ιατρικής δεοντολογίας. Τα κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα των ασθενών με IPF φαίνονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5. Χαρακτηριστικά ασθενών με IPF.

Συνολικός αριθμός	52
Άνδρες	40
Γυναίκες	12
Μέση ηλικία \pm SD(έτη)	72(\pm 15)
Διάρκεια νόσου(έτη)	3.3 \pm 1.4
<u>Σπυρομέτρηση</u>	
FEV ₁ (% προβλ.)	70 \pm 6
FVC (% προβλ.)	68 \pm 7
FEV ₁ /FVC	91 \pm 4
PaO ₂ (mmHg) σε ηρεμία	68 \pm 7
PaCO ₂ (mmHg) σε ηρεμία	40 \pm 3
PH	7.37 \pm 0.2

5.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ

Συλλέχθησαν περίπου 5ml περιφερικού αίματος και διατηρήθηκαν με αντιπηκτικό (K-Na EDTA) σε θερμοκρασία 4oC. Έγινε λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων (απύρηνα) μετά από επώαση του αίματος σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε 10mM Tris HCL pH 8.0, 320mM σουκρόζη, 5mM MgCl₂ και 1% Τριτον-X-100. Μετά από ήπια ανάδευση του διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου έγινε φυγοκέντρηση σε 2.500 rpm. Το κυτταρικό ίζημα που συλλέχθηκε επαναιωρήθηκε σε διάλυμα που περιείχε Tris pH 8.0 400mM, EDTA 60mM, NaCl 150mM και SDS 1%. Ακολούθησε η προσθήκη υπερχλωρικού νατρίου, προσθήκη χλωροφορμίου και κατακρήμνιση του DNA με αιθανόλη.

5.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΠΤΥΕΛΑ

Για την εκχύλιση χρωμοσωμικού DNA από τα πτύελα χρησιμοποιήθηκε διάλυμα λύσης (10mM EDTA, 10mM TrispH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5% SDS) προκειμένου να ομογενοποιηθούν. Ακολούθησε προσθήκη πρωτεϊνάσης K σε τελική συγκέντρωση 100μg/mL και επώαση του ομογενοποιημένου ιστού σε θερμοκρασία 60oC. Στη συνέχεια έγινε εκχύλιση του DNA με ίσες ποσότητες φαινόλης/χλωροφορμίου για 1h σε θερμοκρασία 37oC. Το DNA κατακρημνίστηκε με προσθήκη μισού όγκου οξείκου αμμωνίου και 2,5 όγκων απόλυτης αιθανόλης και φυγοκεντρήθηκε σε θερμοκρασία 4oC σε 13000 rpm. Το κατακρημνισμένο DNA εκπλύθηκε με 70% αιθανόλη, η οποία αφού απομακρύνθηκε επαναραιώθηκε το DNA σε ddH₂O και διατηρήθηκε σε θερμοκρασία 4oC. Το DNA φωτομετρήθηκε στα 260nm και στα 280nm προκειμένου να καθοριστεί η ποσότητα και η καθαρότητά του(308).

5.4 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ(PCR)

5.4.1. Αρχές μεθόδου

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ή PCR πρωτοεμφανίστηκε από την ομάδα των ερευνητών Mullis, Fallona και Saiki της εταιρείας Cetus και αποτελεί αναμφίβολα επανάσταση στη βιοϊατρική έρευνα με ευρύτατο φάσμα εφαρμογών. Αντικατέστησε καθολικά τους μέχρι τότε υπάρχοντες τρόπους ανάλυσης του DNA σε ερευνητικά και διαγνωστικά εργαστήρια. Το βραβείο Νόμπελ Χημείας απενεμήθη

στον Mullis τον Οκτώβριο του 1993 για την καθοριστικά συμβολή του στην ανακάλυψη και ανάπτυξη της τεχνικής PCR.

Με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται ταχέως(2-3h) η σύνθεση “in vitro” ενός τμήματος DNA, γνωστής αλλά και άγνωστης αλληλουχίας. Σε χρονικό διάστημα λίγων ωρών η συγκεκριμένη περιοχή του DNA(DNA-στόχος)πολλαπλασιάζεται σε ένα μεγάλο αριθμό αντιγράφων που εξαρτάται από τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην κινητική επανασύνδεσης των αποδιαταγμένων συμπληρωματικών αλύσεων δίκλωνου νουκλεϊνικού οξέος που ανέπτυξαν οι Britten και Kohne στα τέλη της δεκαετίας του 1960. Εκεί που άλλες τεχνικές υψηλής ευαισθησίας όπως οι τεχνικές μοριακού υβριδισμού (Southern, Northern) αποδεικνύονται ανεπαρκείς, η PCR επιτυγχάνει την επέκταση του DNA-στόχου σε σημείο που να γίνεται ευχερώς ανιχνεύσιμο.

Το DNA-στόχος αποτελεί το πρότυπο DNA στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης. Ως αφετηρίες χρησιμοποιούνται 2 συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (15-25 βάσεων) με δομή συμπληρωματική προς τις πλευρικές αλληλουχίες του DNA-στόχου, καθένα αντίστοιχα προς τον ένα κλώνο του στόχου και με αντίθετη κατεύθυνση. Το πρώτο στάδιο της PCR είναι η μετουσίωση του DNA-στόχου κατά την οποία το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο. Στη συνέχεια συνδέονται τα δύο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια που λέγονται εκκινητές (primers) στις δύο πλευρές του DNA-στόχου, στους αντίστοιχους κλώνους(δεύτερο στάδιο).Με τη δράση της θερμοανθεκτικής Taq DNA πολυμεράσης, ενός ενζύμου προερχόμενου από θερμόφιλα βακτήρια, προστίθενται συμπληρωματικές βάσεις δεοξυριβονουκλεοτιδίων στο 3' άκρο κάθε εκκινητή και η αλυσος επεκτείνεται(τρίτο στάδιο). Έτσι σχηματίζονται δύο νέες αλυσος ή κλώνοι του DNA συμπληρωματικές ως προς αυτές των δύο κλώνων του προτύπου DNA και το DNA-στόχος έχει με αυτό τον τρόπο διπλασιαστεί. Τα τρία αυτά στάδια, δηλαδή η μετουσίωση(denaturation), ο υβριδισμός των εκκινητών (annealing) και η επέκταση των εκκινητών με τη σύνθεση νέου κλώνου(extention) αποτελεί ένα κύκλο της αντίδρασης.

Στο τέλος του πρώτου κύκλου της αντίδρασης οι κλώνοι του DNA-στόχου είναι 4 και αποτελούν πρότυπα για τη σύνθεση νέων κλώνων DNA στο δεύτερο κύκλο. Στο τέλος του δεύτερου κύκλου οι κλώνοι θα είναι 8 και αυξάνοντας τον αριθμό των κύκλων αυξάνει εκθετικά και ο αριθμός των ανατύπων του DNA-στόχου, επειδή οι κλώνοι που σχηματίζονται

χρησιμοποιούνται ως πρότυπα στον επόμενο κύκλο. Γι' αυτό και ονομάστηκε η αντίδραση “αλυσιδωτή”, επειδή η νεοσυντιθέμενη αλυσίδα του DNA λειτουργεί ως πρότυπο αντιγραφής για περαιτέρω σύνθεση DNA σε διαδοχικούς κύκλους. Έτσι επιτυγχάνεται μεγέθυνση του DNA-στόχου 2^n όπου η ο αριθμός των κύκλων (βλ. Σχήμα 1 και 2). Συνήθως η PCR πραγματοποιείται επί 25-40 κύκλους. Ο αριθμός των αντιγράφων του DNA υπολογίζεται με βάση την εξίσωση $N = \eta(1+e)^c$, όπου N η τελική ποσότητα του προϊόντος, η η αρχική ποσότητα του DNA, e η απόδοση της αντίδρασης και c ο αριθμός των κύκλων της PCR (Mullis and Faloona, 1987). Ωστόσο ο εκθετικός πολλαπλασιασμός των αντιγράφων αλλοιώνεται στους τελευταίους κύκλους εμφανίζοντας plateau, λόγω εξάντλησης των αποθεμάτων των δεοξυριβονουκλεοτιδίων, των εκκινητών και της σταδιακής απενεργοποίησης της πολυμεράσης εξαιτίας των επαναλαμβανόμενων υψηλών θερμοκρασιών στο στάδιο της αποδιάταξης (309).

Το κύριο προϊόν της PCR είναι δίκλωνο DNA που περιβάλλεται από εκκινητές των οποίων τα 5' άκρα είναι και τα άκρα του προϊόντος της PCR. Το μέγεθος του σε ζεύγη βάσεων (bp) είναι ίσο με το άθροισμα των βάσεων των εκκινητών και της παρεμβαλλόμενης αλληλουχίας του DNA-στόχου. Είναι δυνατό κατά τους πρώτους κύκλους της PCR να σχηματιστούν μακρύτερα μονόκλινα μόρια DNA που αποτελούν ένα ελάχιστο ποσοστό στο συνολικό προϊόν της PCR και άρα δεν είναι ανιχνεύσιμα.

Όλη η αντίδραση PCR ολοκληρώνεται στο ίδιο μίγμα αντιδραστηρίων για το οποίο απαιτείται: DNA-στόχος, εκκινητές, τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια, Taq DNA πολυμεράση, ιόντα Mg απαραίτητα για την ενζυμική δράση και κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα pH 8.2 για τη δράση του ενζύμου. Η Taq πολυμεράση απομονώθηκε από το βακτήριο *Thermus aquaticus* (Taq) και έχει την ιδιότητα να είναι ενεργή ακόμη και στους 95°C, θερμοκρασία που απαιτείται για τη μετουσίωση του DNA-στόχου επί 40min.

Κάθε κύκλος PCR περιλαμβάνει 3 διαφορετικές θερμοκρασίες για τα στάδια της μετουσίωσης, του υβριδισμού και της επέκτασης. Η μετουσίωση του DNA γίνεται σε θερμοκρασία 92-95°C για 30 περίπου sec, ο υβριδισμός ανάλογα με τη σύνθεση των βάσεων A/T, G/C σε θερμοκρασία 50-65°C επί 1-2 min και η επέκταση σε θερμοκρασία 70-78°C επί 1-2 min. Οι εναλλαγές της θερμοκρασίας ανάμεσα σε κάθε κύκλο επιτυγχάνονται με αυτοματοποιημένες συσκευές, τους θερμοκυκλοποιητές που έχουν τη δυνατότητα να ανεβοκατεβάζουν τη

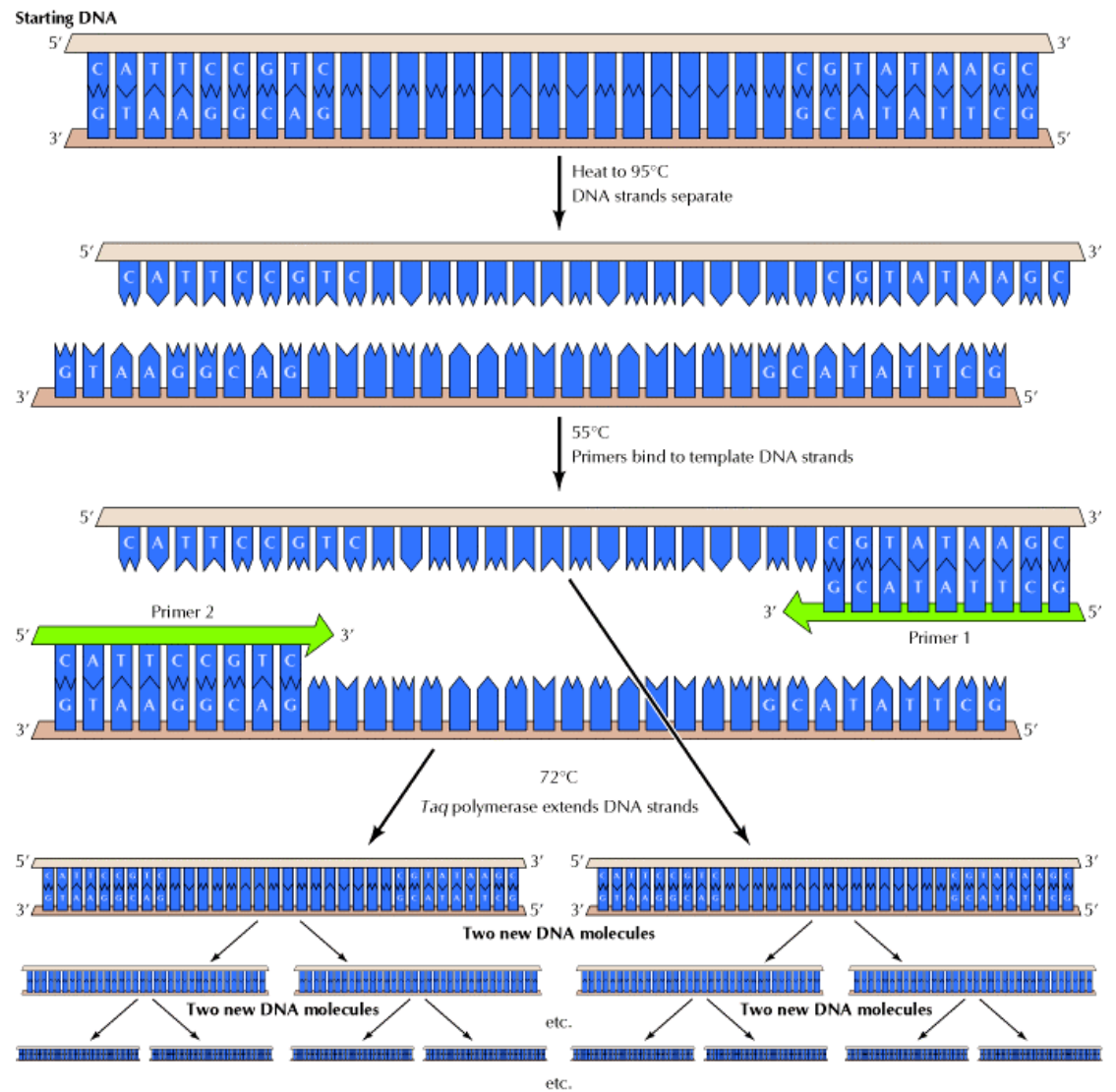
θερμοκρασία μεταξύ των τριών προαναφερόμενων θερμοκρασιών σε λιγότερο από 1 min για αυξομείωση θερμοκρασίας 40oC.

Προκειμένου να ποσοτικοποιηθούν τα αποτελέσματα της PCR πρέπει να τερματιστεί η αντίδραση στην εκθετική της φάση. Έτσι γίνεται γραμμική αντιστοίχιση της τελικής ποσότητας του προϊόντος με την αρχική ποσότητα του DNA. Συνήθως σχεδιάζεται μια πρότυπη καμπύλη με διαδοχικές αραιώσεις του DNA-στόχου ώστε να βρεθούν οι συθήκες στις οποίες η σχέση είναι γραμμική.

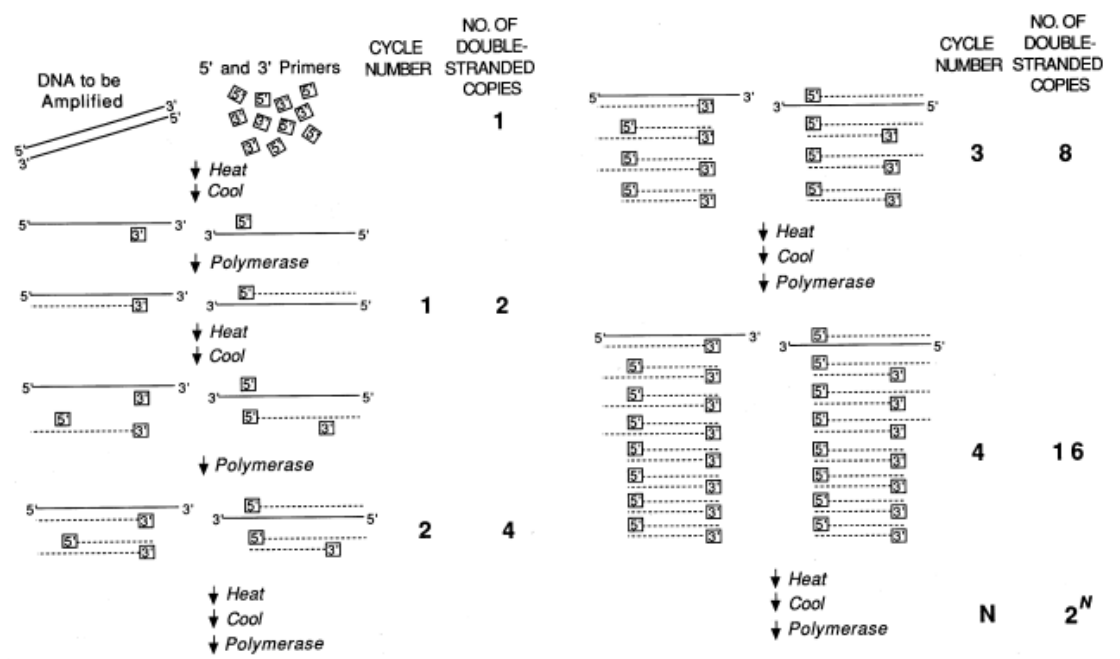
Συνήθως 100ng ολικού DNA αρκούν για να επιτευχθεί η γονιδιακή επέκταση του DNA-στόχου. Απαραίτητη προϋπόθεση για να γίνει αυτό είναι η ακεραιότητά του. Ακόμα και θραύσματα γενετικού υλικού είναι δυνατό να ανιχνευθούν με την PCR. Η αλληλουχία των βάσεων του DNA-στόχου μπορεί να είναι άγνωστη αλλά η αλληλουχία βάσεων των πλευρικών περιοχών του DNA-στόχου θα πρέπει να είναι γνωστή ώστε να κατασκευαστούν οι εκκινητές . Ο αριθμός των κύκλων της PCR προκειμένου να έχουμε μια επαρκή μεγέθυνση εξαρτάται από τη συγκέντρωση του DNA-στόχου και την απόδοση της PCR σε κάθε κύκλο μεγέθυνσης. Υπερβολικός αριθμός κύκλων οδηγεί σε αύξηση των μη ειδικών προϊόντων της γονιδιακής επέκτασης ενώ μικρότερος από τον απαιτούμενο στη μη ανίχνευση του DNA-στόχου.

Η ευαισθησία της μεθόδου αυξάνεται ακόμη περισσότερο με την επανένισχυση των προϊόντων της πρώτης αντίδρασης. Αυτό γίνεται με τη βοήθεια εκκινητών που υβριδίζουν εσωτερικότερα των πρώτων στη συγκεκριμένη αλληλουχία-στόχο.

Σχήμα 1



Σχήμα 2



5.4.2. Ρυθμιστικοί παράγοντες της PCR

i) Εκκινητές

Θα πρέπει να επιλεγθούν πάνω σε μη μεταβλητές περιοχές του DNA-στόχου που θα μεγεθυνθεί μεταξύ των δύο εκκινητών. Αυτοί θα πρέπει να έχουν παραπλήσιο αριθμό βάσεων G/C ,να μη παρουσιάζουν συμπληρωματικότητα στο 3΄ ή στο 5΄ άκρο τους ώστε να αποφεύγεται ο σχηματισμός διμερών και η απόστασή τους να είναι μεγαλύτερη των 100 βάσεων για να επιτρέπεται ο σχηματισμός νέου κλώνου DNA. Δεδομένου ότι μια αλληλουχία DNA μήκους 20bp είναι μοναδική στο γονιδίωμα ,οι εκκινητές θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 20μερή ώστε να επιτευχθεί ειδική ενίσχυση των αλληλουχιών. Η συνηθισμένη συγκέντρωση ενός 20μερούς εκκινητή σε μια PCR αντίδραση είναι 0,5μM.

Οι εκκινητές θα πρέπει να έχουν παραπλήσια θερμοκρασία αποδιάταξης ή τήξεως (T_m , melting temperature). Σύμφωνα με τον τύπο των Thein και Wallace $T_m = (4 \times \text{αριθμός βάσεων G+C}) + (2 \times \text{αριθμός βάσεων A+T})$. Ένα επιθυμητό T_m θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 55-57°C. Όσο μεγαλύτερη είναι η T_m τόσο μεγαλύτερο υβριδισμό πετυχαίνουμε αλλά χαμηλής απόδοσης. Όσο μικρότερη είναι η T_m τόσο καλύτερη απόδοση έχουμε σε βάρος της ειδικότητας, με αποτέλεσμα πολλά παραπροϊόντα. Η ειδικότητα της αντίδρασης οφείλεται και στη θερμοκρασία υβριδισμού (T_a , annealing temperature) των εκκινητών. Συνήθως η T_a επιλέγεται να είναι 5-10°C μικτότερη της T_m . Όσο πιο κοντά είναι η T_a στην T_m τόσο πιο πολύ αυξάνει η ειδικότητα.

ii) Ιόντα Mg

Μεγάλες συγκεντρώσεις αυξάνουν την ενεργότητα της Taq πολυμεράσης αλλά μειώνουν την πιστότητά της. Η ιδανικότερη συγκέντρωση ιόντων Mg είναι 25mM/αντίδραση .

Η ειδικότητα καθώς και η απόδοση της αντίδρασης εξαρτάται επίσης από τον αριθμό των κύκλων, τη συγκέντρωση της Taq καθώς και τη συγκέντρωση των εκκινητών και του DNA-στόχου. Προκειμένου να βελτιστοποιηθούν οι συνθήκες της αντίδρασης με δεδομένο ζεύγος εκκινητών γίνονται πειράματα στα οποία μεταβάλλονται ανεξάρτητα μεταξύ τους η θερμοκρασία αναδιάταξης και η

συγκέντρωση ιόντων Mg. Η ειδικότητα του προϊόντος της PCR σε βέλτιστες συνθήκες επιβεβαιώνεται ως ένα ομοιογενές προϊόν σε ηλεκτροφόρηση ηλεκτροφόρησης, το μέγεθος του οποίου ταυτίζεται με το μέγεθος του DNA-στόχου.

5.4.3. Ρυθμιστικά διαλύματα της PCR

Αυτά ρυθμίζουν το pH και παρέχουν συμπαράγοντες και σταθεροποιητές για τη μέγιστη απόδοση της αντίδρασης. Χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα :

Ρυθμιστικό διάλυμα A: 670mM Tris.HCl, pH 8.5, 166 mM θειϊκό αμμώνιο, 67 mM χλωριούχο μαγνήσιο, 1,7 mg/ml BSA, 100μM β-μερκαπτοαιθανόλη και 1% (w/v) Triton X-100.

Ρυθμιστικό διάλυμα B: 75mM Tris.HCl, pH 9.0, 20 mM θειϊκό αμμώνιο, 0.01%(w/v) Tween 20, 2.5 mM θειϊκό μαγνήσιο.

Ρυθμιστικό διάλυμα C: 50mM Tris HCl, pH 8.3, 50mM χλωριούχο κάλιο, 10 mM χλωριούχο μαγνήσιο, 10μM διθειοθρεϊτόλη ,0.5 μM σπερμιδίνη.

5.4.4. Σχεδιασμός εκκινητών

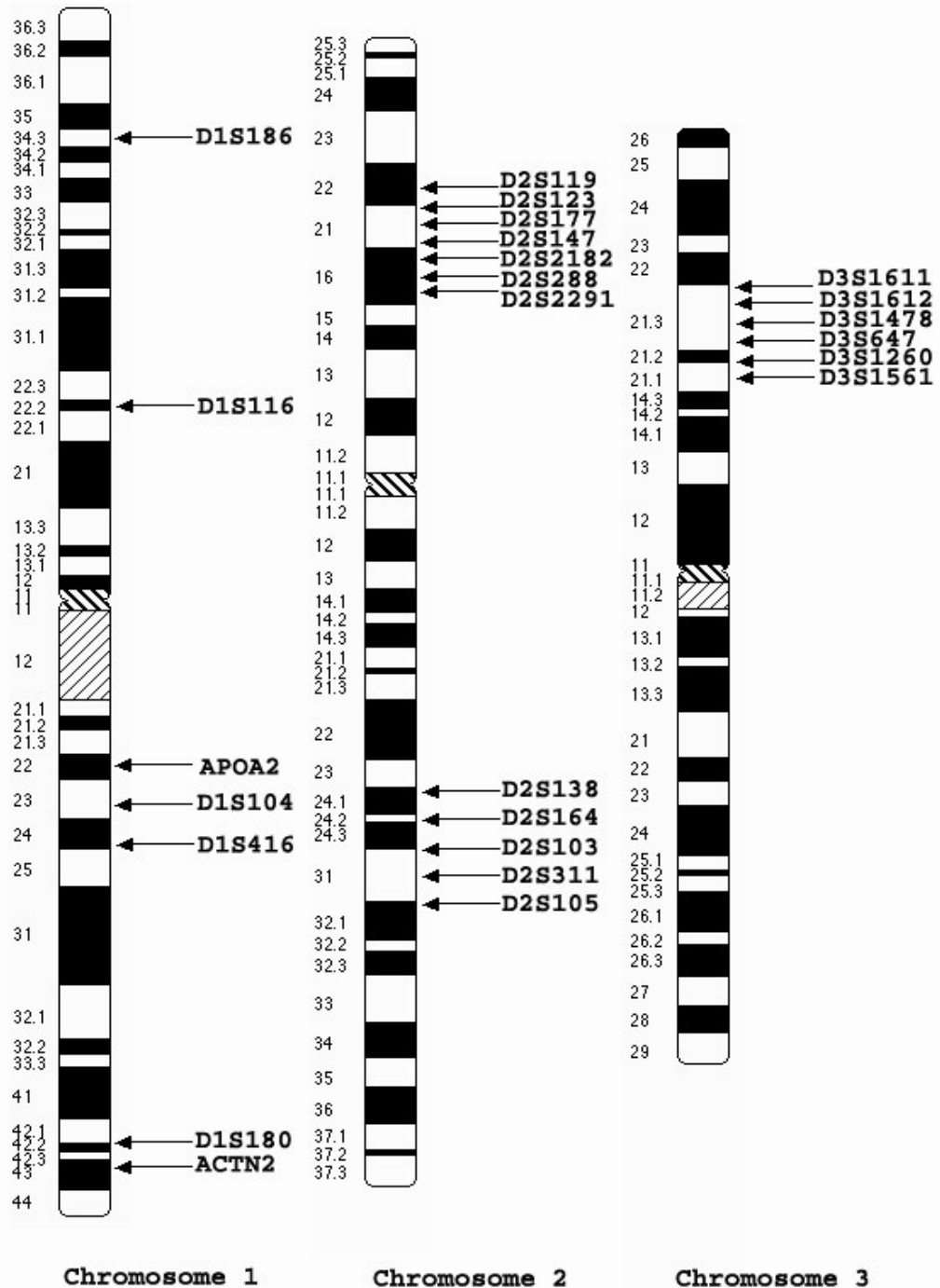
Σαράντα πολυμορφικοί δείκτες που βρίσκονται στις περιοχές 1p, 1q 2p, 2q, 3p, 5q, 6p, 7p,9p, 11q, 14q και 17p (Πιν.6 και Εικ.5) μελετήθηκαν με σκοπό να καθοριστούν οι χρωμοσωμικές περιοχές που μεταβάλλονται στην IPF και άρα αποτελούν μέρος της γενετικής βάσης της νόσου και εμπλέκονται στην αιτιοπαθογένειά της.

Πίνακας 6. Οι εκκινητές του μικροδορυφορικού DNA που μελετήθηκαν.

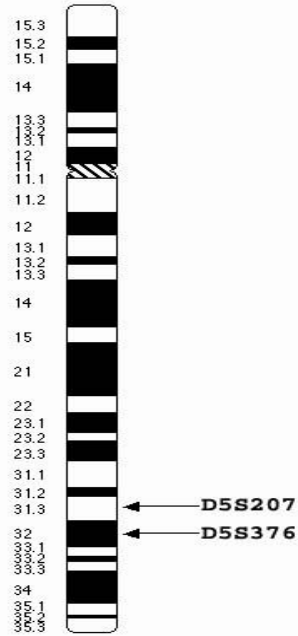
Εκκινητές	Κυττογενετική περιοχή	Ετεροζυγωτία	Εύρος μεγέθους αλληλομόρφου	Αναγκαία συγκέντρωση εκκινητή στην πολλαπλή PCR (nM)	Ομάδα εκκινητών I*
			146-		
D1S416	1q24	0.82	162	130	I
			82-		
D1S186	1p34.3	0.84	106	100	G
			89-		
D1S116	1p31-p21	0.65	101	100	F
			131-		
APOA2	1q21-q23	0.70	145	150	E
			152-		
D1S104	1q2-q23	0.76	168	150	G
			163-		
D1S180	1q42	0.90	189	150	H
ACTN2	1q42-q43	0.50	105	120	H
D2S119	2p22.3-p16.1	0.80	221	175	A
D2S123	2p22.3-p16.1	0.76	196	140	A
D2S177	2p22.3-p16.1	0.85	276	225	A
D2S147	2p22.3-p16.1	0.73	111	80	A
D2S2182	2p22.3-p16.1	0.78	234	180	C
			276-		
D2S288	2p22.3-p16.1	0.62	284	250	C
D2S2291	2p22.3-p16.1	0.76	245	320	D
D2S138	2q24.1-q32.1	0.67	115	100	B
D2S164	2q24.1-q32.1	0.83	195	175	B
			109-		
D2S103	2q24.1-q32.1	0.82	125	120	D
			185-		
D2S311	2q24.1-q32.1	0.81	207	150	D
			107-		
D2S105	2q24.1-q32.1	0.69	125	130	E
			3p21.32-		
D3S1611	p21.1	0.66	258	260	B
D3S1612	3p21.32-	0.69	100	80	C

	p21.1					
		3p21.32-			109-	
D3S1478	p21.1		0.98	152		130 C
		3p21.32-				
D3S647	p21.1		0.73		100	90 D
		3p21.32-				
D3S1260	p21.1		0.66		268	230 E
		3p21.32-				
D3S1561	p21.1		0.65		226	180 E
					135-	
D5S207		5q31.3-q33.3	0.68	143		130 K
					117-	
D5S376		5q32-q33.1	0.72	129		100 I
D6S2225		6p21.3	0.38		152	140 J
					240-	
D6S1002		6p21.3-p22.1	0.32	244		200 K
					222-	
D6S429		6p23-p25	0.74	238		200 I
					267-	
D6S259		6p23-p25	0.73	285		260 K
		6pter, 6p23-			90-	
D6S263	p25		0.82	114		80 J
					256-	
D7S519		7p15-q22	0.81	268		230 F
					119-	
D9S161		9p21	0.78	135		120 F
					87-	
D9S270		9p21	0.71	101		100 H
					123-	
D11S1876		11q21-q22.3	1.00	135		100 J
		14pter,			257-	
D14S72	14q11.1-q11.2		0.83	271		200 J
					170-	
D14S258		14q23-q24.3	0.80	182		160 I
		14qter,			110-	
D14S292	14q32.1-q32.3		0.74	118		100 G
					103-	
TP53		17p13.1	0.90	135		130 K

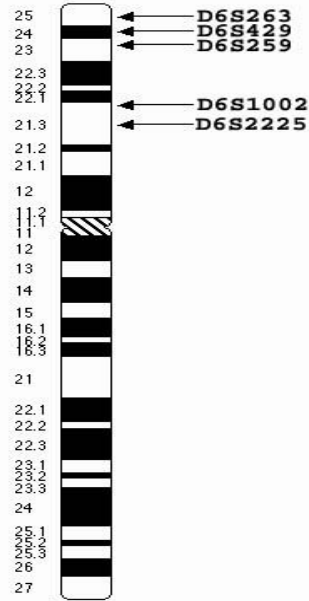
* Ομάδα εκκινητών της πολλαπλής αντίδρασης.



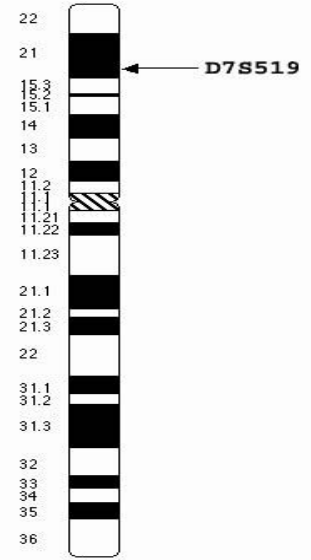
Εικ.5 Οι χρωμοσωμικές περιοχές στις οποίες εδράζονται οι εκκινήτες.



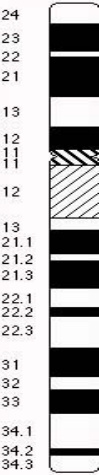
Chromosome 5



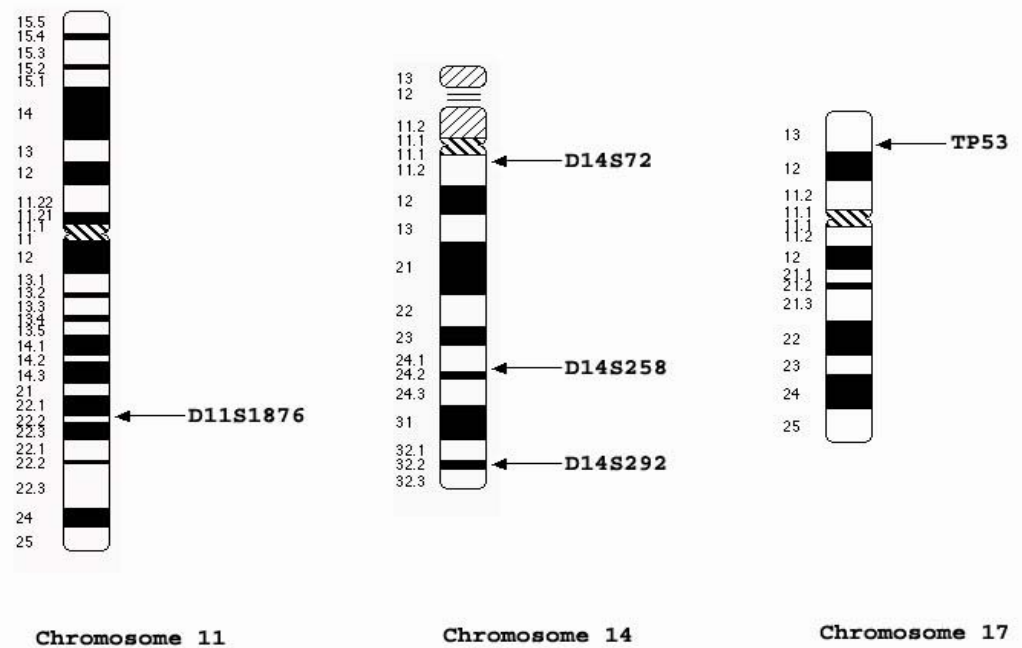
Chromosome 6



Chromosome 7



Chromosome 22



5.4.5. Συνθήκες των αντιδράσεων της PCR

Σαράντα(40) δείκτες μικροδορυφορικού DNA (Research Genet-ics,US) πολλαπλασιάστηκαν σε 11 ομάδες τριπλών και τετραπλών αντιδράσεων(Πίνακας 7).Εισαγάγαμε 100 ng γενομικού DNA σε μίγμα PCR αντίδρασης που περιείχε 1X PCR buffer, 400 μ M dNTPs, 2.66 mM MgCl₂ και 0.35U Taq DNA polymerase (Life Technologies Ltd.,Gaithersburg,Scotland,United Kingdom).Για να διαχωρίσουμε τις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις από κάθε εκκινητή(Πίνακας 7).Οι παράμετροι πολλαπλασιασμού είναι οι ακόλουθοι: αρχική αποδιάταξη για 3 λεπτά, 30 κύκλοι στους 94°C για 30 δευτερόλεπτα, 55°C για 30 δευτερόλεπτα και 72°C για 30 δευτερόλεπτα. Το τελικό στάδιο της επέκτασης γίνεται στους 72°C για 10 λεπτά. Οι PCR αντιδράσεις έγιναν στη συσκευή PTC-100(MJ Research, Inc, Watertown, MA, USA).

5.5 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΟΥ DNA

Το DNA ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης ή ακρυλαμιδίου. Η επιλογή του πηκτώματος έγινε με βάση το μέγεθος του DNA που επρόκειτο να ηλεκτροφορηθεί και από τη διακριτική ικανότητα που αναμέναμε να επιτευχθεί. Το πήκτωμα αγαρόζης (μέση συγκέντρωση 1 ως 2%) είναι πιο κατάλληλο για ηλεκτροφόρηση μεγάλων τμημάτων DNA και για μεγάλες διαφορές μεγέθους τμημάτων που πρόκειται να διαχωριστούν. Αντίθετα το πήκτωμα ακρυλαμιδίου(19:1 μίγμα ακρυλαμιδίου/bis ακρυλαμιδίου) επιλέγεται σε περιπτώσεις μικρότερων τμημάτων DNA και για μικρές διαφορές μεγέθους ανάμεσά τους.

Και τα δύο είδη πηκτωμάτων σχηματίζονται σε υδατικό μέσο που περιέχει 1X TBE ρυθμιστικό διάλυμα (0.09 TrisHCl, 0.09M βορικό οξύ, 2.5mM EDTA, pH 8.3). Η πήξη επιτυγχάνεται για την αγαρόζη με στερεοποίησή της μετά από πτώση της θερμοκρασίας(προηγείται τήξη της με βρασμό) και για το ακρυλαμίδιο με προσθήκη 50μl τετραμεθυλ-αιθυλενο-διαμίνης(TEMED) και 160μl υπερθειικού αμμωνίου 25% για κάθε 65 ml διαλύματος ακρυλαμιδίου.

Το υπό ηλεκτροφόρηση δείγμα του DNA επαναιωρείται σε διάλυμα φόρτωσης που περιέχει 0.25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0.25% κυανό του ξυλενίου και 25% φυκόλη.

5.6 ΧΡΩΣΗ ΤΟΥ DNA ΜΕ ΝΙΤΡΙΚΟ ΑΡΓΥΡΟ

Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται όταν το DNA έχει ηλεκτροφορηθεί σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου. Έχει μεγάλη ευαισθησία και γι' αυτό χρησιμοποιείται αντί της ραδιενέργειας. Μειονεκτεί στη μη ειδική χρώση του DNA δεδομένου ότι χρωματίζεται και το μονόκλωνο DNA, το RNA καθώς και οι πρωτεΐνες. Έτσι

απαραίτητη προϋπόθεση για την εφαρμογή της είναι η ύπαρξη καθαρού και ειδικού DNA. Συχνά χρησιμοποιείται για την ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR.

Το πήκτωμα ακρυλαμιδίου τοποθετείται υπό ανάδευση σε μονιμοποιητικό διάλυμα που περιέχει 10% αιθανόλη και 0.5% οξικό οξύ για 10 min. Ακολουθεί η προσθήκη διαλύματος νιτρικού αργύρου 0.1%(w/v) για 20 min σε ημίφως, πλύσιμο με νερό και προσθήκη του διαλύματος εμφάνισης που περιέχει 0.4 N NaOH και 0.15%(v/v) φορμαλδεύδη. Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη διαλύματος ανθρακικού νατρίου 0.75%(w/v).

Η χρώση με βρωμιούχο εθίδιο εφαρμόζεται όταν το DNA πρόκειται να ηλεκτροφορηθεί σε πήκτωμα αγαρόζης. Κατά την παρασκευή του τελευταίου προστίθεται βρωμιούχο εθίδιο σε συγκέντρωση 10mg/ml. Το βρωμιούχο εθίδιο παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων των νουκλεοτιδίων και φθορίζει παρουσία υπεριώδους ακτινοβολίας και έτσι αποκαλύπτονται οι ζώνες του DNA του PCR προϊόντος.

5.7 ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΛΟΤΥΠΟΥ ΜΕ ΔΕΙΚΤΕΣ ΜΙΚΡΟΔΟΡΥΦΟΡΙΚΟΥ DNA

Οι πολυμορφικές αυτές περιοχές ενισχύονται με τη βοήθεια της αντίδρασης αλυσιδωτής πολυμεράσης (PCR) και τα προϊόντα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου 10% και χρωματίζονται με νιτρικό άργυρο. Επειδή οι αλληλουχίες του DNA είναι επαναλαμβανόμενες και υπάρχει πολυμορφισμός δηλαδή ετεροζυγωτία θα πρέπει η αντίδραση να διατηρείται στην εκθετική της φάση αφού είναι ημιποσοτική μέθοδος προσδιορισμού της σχετικής έντασης των δύο αλληλομόρφων. Επίσης θα πρέπει να επιδιώκεται η καλύτερη δυνατή διακριτική ικανότητα δεδομένου ότι είναι δυνατό τα αλληλόμορφα να διαφέρουν σε δύο μόνο ζεύγη βάσεων.

5.8 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Ως απώλεια ετεροζυγωτίας (LOH) θεωρήθηκε εκείνη η περίπτωση στην οποία η ένταση ενός αλληλομόρφου ήταν τουλάχιστον 50% μικρότερη σε σχέση με το άλλο. Αυτό προέκυπτε μετά από σύγκριση του DNA από τα πτύελα των ασθενών και το φλεβικό αίμα. Ως μικροδορυφορική αστάθεια (MIN) θεωρήθηκε η αλλαγή στην κινητικότητα του ενός ή και των δύο αλληλομόρφων ή ακόμη και η εμφάνιση νέου. Αυτό προέκυπτε και πάλι μετά από σύγκριση του DNA από τα πτύελα των ασθενών και το φλεβικό αίμα.

5.9 ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΕΙΚΟΝΑΣ -ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η σάρωση των πηκτωμάτων έγινε από την Agfa SnapScan 1212u (Ag-fa-Gevaert N.V., Belgium). Η φωτεινότητα [Integrated density (ID= (Mean OD-Background OD)* pixels; OD, optical density)] των ζωνών χρησιμοποιήθηκε ως ποσοτική παράμετρος και υπολογίστηκε με ψηφιακή απεικόνιση με το σύστημα Adobe Photoshop 6.0 software (Adobe Systems Inc., US). Η απώλεια της ετεροζυγωτίας υπολογίστηκε σε ετερόζυγη περίπτωση όταν η αναλογία

$$\frac{\text{ID allele1 (sputum DNA)} / \text{ID allele2 (sputum DNA)}}{\text{ID allele1 (blood DNA)} / \text{ID allele2 (blood DNA)}}$$

$$\text{ID allele1 (blood DNA)} / \text{ID allele2 (blood DNA)}$$

ήταν >1.49 ή <0.58 με ευαισθησία 99.5%. Η μικροδορυφορική αστάθεια (MIN) υπολογίστηκε όταν ένα νέο εμφανιζόμενο αλληλόμορφο παρατηρήθηκε στα πτύελα σε σχέση με το αίμα του ίδιου ασθενούς. Ανάλυση των LOH ή MIN θετικών περιπτώσεων έγινε τρεις φορές και τα αποτελέσματα ήταν επιτυχώς αναπαραγώγιμα.

Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με το SPSS στατιστικό λογισμικό (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέση \pm SD διακύμανση.

Το χ^2 χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση των επί τοις εκατό ποσοστών. Διαφορές στις μέσες τιμές των ποσοτικών μετρήσεων ελέγχθηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία Student t-test και Mann-Whitney U . Στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν οι συσχετίσεις με μονοδύναμο επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$. Μοντέλα πολλαπλής γραμμικής ή λογαριθμικής αλληλοσυσχέτισης χρησιμοποιήθηκαν για τη συσχέτιση με τη βαρύτητα και τη διάρκεια της νόσου. Όλοι οι πίνακες επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα Excel Microsoft Office 2000.

5.10 ΕΤΑΙΡΙΕΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΥΛΙΚΩΝ

1,2-διδροξυ-αιθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιο-BDH

Άγαρ-Difco

Αγαρόζη-Gibco BRL

Αιθανόλη-BDH

Αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ-BDH

Ακρυλαμίδιο-BDH

Ανθρακικό νάτριο-Sigma

Βορικό οξύ-BDH

Βρωμιούχο αιθίδιο-Sigma

Γλυκερόλη-Gibco BRL

Διαιθυλ-πυροκαρβονικό οξύ-BDH

ΔιθειοθριτόληSigma

Διμεθυλσουλφοξείδιο-BDH

Δεσοξυριβονουκλεοτίδια-Boehringer Mannheim

Ένζυμα περιορισμού-New England Biolabs

Θειϊκό αμμώνιο-BDH

Ισοπροπανόλη-BDH

Κιτρικό νάτριο-BDH

Κυανό της βρωμοφαινόλης-Sigma

Λυσοζύμη-Sigma

Μεθανόλη-Fluka
Μεμβράνες διαπίδυσης πόρων διαμέτρου 10mm-Sigma
MOPS-Sigma
Νιτρικός άργυρος-Sigma
Οξεικό αμμώνιο- Sigma
Οξεικό κάλιο -Sigma
Οξεικό νάτριο- Sigma
Οξεικό οξύ-BDH
Πρωτεΐνάση K-Sigma
Ριβονουκλεάση A-Sigma
RNAzol B-China Biotex
SDS-Sigma
SuperScript II RT, Life Technologies
Ταq πολυμεράση-Gibco BRL
TEMED-Sigma
Tris base-BDH
Triton-X-100-Sigma
Trizol-Gibco BRL
Tween-20-Sigma
Υδροξείδιο του νατρίου-Sigma
Υδροχλωρικό οξύ-BDH
Υπερθεϊκό αμμώνιο-Gibco BRL
Υπεροξείδιο του υδρογόνου-BDH
Φαινόλη-BDH
Φορμαλδεύδη-BDH
Φορμαμίδιο-BDH
Χλωριούχο καΐσιο-Sigma
Χλωριούχο κάλιο-Sigma
Χλωριούχο λίθιο-Sigma
Χλωριούχο μαγγάνιο-Sigma
Χλωριούχο μαγνήσιο-Sigma
Χλωριούχο νάτριο-Sigma
Χλωροφόρμιο-Fluka

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1. ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΑΛΛΟΙΩΣΕΩΝ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΟΥ DNA ΣΤΗΝ ΙΔΙΟΠΑΘΗ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΙΝΩΣΗ

Μελετήσαμε 52 ζεύγη πτυέλων/φλεβικού αίματος από ασθενείς με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση με 40 μικροδορυφορικούς δείκτες συνολικά. Η συχνότητα της αστάθειας για κάθε δείκτη κυμαινόταν μεταξύ 0% και 10%, ενώ το ποσοστό της ετεροζυγωτίας μεταξύ 0,32 και 1 (Πίνακας 8). Είκοσι δείγματα από ασθενείς με IPF εμφάνισαν LOH (38,5%) σε ένα τουλάχιστον γενετικό τόπο. Παρόλο που MIN παρατηρήθηκε σε 10 περιπτώσεις (19,2%), κανείς δεν πληρούσε τα κριτήρια της συνύπαρξης σε πέντε τουλάχιστον δείκτες ώστε να χαρακτηριστεί ως ψευδώς θετικός φαινότυπος αντιγραφής [replication error-positive phe-notype (RER+)] (310). Αναλυτική παρουσίαση των γονοτύπων των θετικών για μικροδορυφορικές αλλαγές φαίνεται στον Πίνακα 8.

LOH παρατηρήθηκε συχνότερα στον D3S1260 (10,5%), D3S1612 (10%) και TP53 (8%). Ο ομόζυγος γονότυπος του δείγματος σε ένα μικροδορυφορικό δείκτη DNA θεωρήθηκε ως μη πληροφοριακός στην LOH ανάλυση. Οι χρωμοσωμικές περιοχές που εμφάνισαν LOH ήταν 1p34.3 (4,3%), 3p21.32-p21.1 (15,4%), 5q32-q33.1 (5,3%), 9p21 (4,8%) και 17p13.1 (8%) όπου τα γονίδια MYCL1, FHIT, SPARC, p16ink4 και TP53 εδράζονται (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/>).

Υποομάδες ασθενών με IPF, θετικών και αρνητικών για LOH συγκρίθηκαν. Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δε βρέθηκε μεταξύ των υποομάδων σχετικά με την ηλικία, φύλο, στάδιο, διάρκεια νόσου και κάπνισμα.

Πίνακας 7. Οι εκκινητές του μικροδορυφορικού DNA που μελετήθηκαν

Εκκινητές	Κυττογενετική περιοχή	Ετεροζυγωτία	Εύρος μεγέθους αλληλομόρφου	Αναγκαία συγκέντρωση εκκινητή στην πολλαπλή PCR (nM)	Ομάδα εκκινητών I*
D1S416	1q24	0.82	146-162	130	I
D1S186	1p34.3	0.84	82-106	100	G
D1S116	1p31-p21	0.65	89-101	100	F
APOA2	1q21-q23	0.70	131-145	150	E
D1S104	1q2-q23	0.76	152-168	150	G
D1S180	1q42	0.90	163-189	150	H
ACTN2	1q42-q43	0.50	105	120	H
D2S119	2p22.3-p16.1	0.80	221	175	A
D2S123	2p22.3-p16.1	0.76	196	140	A
D2S177	2p22.3-p16.1	0.85	276	225	A
D2S147	2p22.3-p16.1	0.73	111	80	A
D2S2182	2p22.3-p16.1	0.78	234	180	C
D2S288	2p22.3-p16.1	0.62	276-284	250	C
D2S2291	2p22.3-p16.1	0.76	245	320	D
D2S138	2q24.1-q32.1	0.67	115	100	B
D2S164	2q24.1-q32.1	0.83	195	175	B
D2S103	2q24.1-q32.1	0.82	109-125	120	D
D2S311	2q24.1-q32.1	0.81	185-207	150	D
D2S105	2q24.1-q32.1	0.69	107-125	130	E
D3S1611	3p21.32-p21.1	0.66	258	260	B

D3S1612	p21.1	3p21.32-	0.69	100	80	C
D3S1478	p21.1	3p21.32-	0.98	152	130	C
D3S647	p21.1	3p21.32-	0.73	100	90	D
D3S1260	p21.1	3p21.32-	0.66	268	230	E
D3S1561	p21.1	3p21.32-	0.65	226	180	E
D5S207		5q31.3-q33.3	0.68	143	130	K
D5S376		5q32-q33.1	0.72	129	100	I
D6S2225		6p21.3	0.38	152	140	J
D6S1002		6p21.3-p22.1	0.32	244	200	K
D6S429		6p23-p25	0.74	238	200	I
D6S259		6p23-p25	0.73	285	260	K
D6S263	p25	6pter, 6p23-	0.82	114	80	J
D7S519		7p15-q22	0.81	268	230	F
D9S161		9p21	0.78	135	120	F
D9S270		9p21	0.71	101	100	H
D11S1876		11q21-q22.3	1.00	135	100	J
D14S72	14q11.1-q11.2	14pter,	0.83	271	200	J
D14S258		14q23-q24.3	0.80	182	160	I
D14S292	14q32.1-q32.3	14qter,	0.74	118	100	G
TP53	17p13.1		0.90	135	130	K

* Ομάδα εκκινητών της πολλαπλής αντίδρασης.

Πίνακας 8. Οι γονότυποι των περιπτώσεων ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης με απώλεια ετεροζυγωτίας(LOH) και αστάθεια του μικροδορυφορικού DNA(MIN)

Marker	1	5	8	10	11	12	13	16	18	20	23	24	25	27	29	30	31	33	35	38	40	41	43	47	49	51	LOH (%)	MIN (%)	
D1S416	H	H	H	H	H	H	NI	H	H	NI	H	NI	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	0.0	0.0	
D1S186	H	H	H	LOH	H	H	H	H	H	H	H	H	H	NI	LOH	H	NI	H	H	H	H	NI	H	H	H	H	H	4.3	0.0
D1S116	NI	NI	H	H	H	H	H	H	NI	H	H	NI	H	H	H	NI	H	H	NI	H	H	NI	NI	H	H	H	0.0	0.0	
APOA2	H	H	NI	H	NI	H	NI	H	H	H	H	H	NI	NI	H	H	H	H	NI	H	H	H	H	H	H	MIN	0.0	1.9	
D1S104	H	H	MIN	H	H	H	H	NI	H	NI	H	NI	H	H	H	NI	NI	H	H	H	NI	H	H	H	H	H	0.0	1.9	
D1S180	H	H	H	H	H	H	H	LOH	H	H	H	H	H	H	H	LOH	H	H	H	H	H	H	H	NI	H	H	H	4.0	0.0
ACTN2	H	NI	NI	H	NI	H	H	NI	NI	H	H	NI	NI	NI	H	H	NI	H	H	H	H	H	H	H	NI	H	NI	0.0	0.0
D2S119	NI	H	H	NI	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	NI	H	H	H	H	H	NI	H	H	H	H	H	0.0	0.0
D2S123	H	NI	H	H	H	NI	H	NI	H	H	H	NI	H	MIN	H	H	H	NI	H	H	H	H	H	H	H	H	NI	0.0	1.9
D2S177	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	NI	H	H	H	H	NI	H	H	NI	H	H	H	H	H	0.0	0.0
D2S147	H	H	H	H	H	H	H	H	NI	NI	H	H	H	H	H	NI	H	H	H	H	H	H	H	NI	NI	H	H	0.0	0.0
D2S2182	NI	MIN	H	H	H	H	NI	H	H	H	H	H	H	H	H	H	NI	H	H	H	H	H	H	H	H	NI	H	0.0	1.9
D2S288	H	H	NI	NI	H	H	NI	H	NI	H	H	H	NI	H	NI	NI	H	H	H	NI	H	NI	NI	H	H	H	H	0.0	0.0
D2S2291	H	H	H	H	NI	H	H	H	NI	H	H	NI	H	NI	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	0.0	0.0
D2S138	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	NI	H	H	NI	H	NI	NI	NI	NI	H	H	H	H	H	H	NI	0.0	0.0
D2S164	H	H	H	NI	H	H	H	H	H	H	H	NI	MIN	NI	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	0.0	1.9
D2S103	H	H	H	H	H	H	H	NI	H	H	NI	H	NI	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	0.0	0.0
D2S311	H	NI	NI	H	H	H	NI	H	H	H	H	H	H	H	NI	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	0.0	0.0
D2S105	H	H	H	H	NI	NI	H	NI	H	H	H	NI	H	H	H	NI	NI	H	H	H	H	H	H	H	NI	H	H	0.0	0.0
D3S1611	NI	NI	H	H	NI	H	H	H	MIN	H	H	H	NI	H	H	H	H	H	NI	NI	H	NI	H	H	H	H	H	0.0	1.9
D3S1612	LOH	LOH	NI	H	H	H	NI	H	H	H	H	NI	H	H	H	H	H	LOH	NI	H	H	LOH	H	NI	NI	H	10.0	0.0	
D3S1478	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	0.0	0.0
D3S647	H	H	NI	H	H	NI	H	H	H	LOH	H	H	H	H	NI	H	H	H	H	H	H	H	H	H	NI	H	NI	4.8	0.0
D3S1260	H	NI	H	H	H	H	LOH	NI	H	H	H	LOH	H	H	H	NI	H	H	LOH	NI	NI	NI	NI	LOH	H	H	10.5	0.0	
D3S1561	H	H	H	H	H	H	H	H	H	NI	H	NI	NI	H	NI	NI	H	NI	H	H	H	H	H	H	NI	H	0.0	0.0	
D5S207	H	H	NI	H	H	NI	H	H	NI	H	H	H	NI	H	NI	H	H	H	H	MIN	NI	H	H	H	H	NI	0.0	1.9	
D5S376	NI	NI	H	H	H	LOH	NI	H	H	H	NI	NI	H	H	H	H	H	H	H	LOH	H	H	NI	NI	H	H	H	5.3	0.0
D6S2225	H	NI	NI	H	H	NI	NI	H	NI	NI	NI	NI	NI	NI	H	NI	H	H	NI	H	NI	H	H	NI	H	NI	0.0	0.0	
D6S1002	H	H	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	H	NI	NI	H	NI	NI	NI	H	NI	H	H	H	H	NI	H	0.0	0.0
D6S429	NI	H	H	NI	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	NI	H	H	H	NI	NI	NI	H	H	H	H	H	0.0	0.0
D6S259	H	NI	NI	H	H	H	H	H	H	NI	H	NI	H	H	H	H	H	H	NI	H	H	H	H	NI	H	H	0.0	0.0	
D6S263	H	H	H	H	H	H	H	H	H	NI	H	H	H	H	NI	H	H	NI	H	H	H	H	NI	H	H	H	H	0.0	0.0
D7S19	H	H	H	H	MIN	H	NI	H	NI	H	H	H	H	H	NI	H	H	NI	H	H	NI	H	H	H	H	H	H	0.0	1.9
D9S161	H	H	H	NI	LOH	H	H	NI	H	H	MIN	NI	H	H	H	H	H	NI	H	H	NI	H	LOH	H	H	H	H	4.8	1.9
D9S270	H	H	NI	H	H	NI	H	H	NI	H	H	H	H	H	NI	H	H	H	H	H	H	H	NI	H	H	H	NI	0.0	0.0
D11S1876	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	0.0	0.0
D14S72	H	H	H	H	H	H	H	H	H	NI	H	H	H	NI	H	H	H	H	NI	H	H	H	H	H	H	H	H	0.0	0.0
D14S258	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	NI	H	NI	H	H	H	H	H	H	H	H	NI	NI	H	H	0.0	0.0
D14S292	NI	H	H	H	H	H	H	H	H	H	NI	H	H	H	H	NI	MIN	H	H	NI	H	H	NI	H	H	NI	H	0.0	1.9
TP53	H	NI	H	H	LOH	H	H	H	H	H	H	H	LOH	H	H	H	H	H	H	H	H	LOH	H	H	H	LOH	H	8.0	0.0

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

7.1 ΙΔΙΟΠΑΘΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΙΝΩΣΗ

Στην παρούσα διατριβή επιχειρήσαμε ανάλυση του μικροδορυφορικού DNA με ισχυρά πολυμορφικούς δείκτες με σκοπό να καθορίσουμε τις ύποπτες γενετικές περιοχές για την ανάπτυξη IPF. Η επιλογή των ύποπτων περιοχών για τη μελέτη της LOH και MIN βασίστηκε σε προηγούμενες σχετικές μελέτες που αφορούσαν την IPF ή τον καρκίνο του πνεύμονα (320-323,312,313,315). Τα πειράματα έγιναν σε δείγματα πτυέλων. Αυτά δε φαίνεται να υστερούν σε ευαισθησία και ειδικότητα ως προς την ανίχνευση MIN και LOH σε σχέση με δείγματα από διαφορετικές θέσεις του τραχειοβρογχικού δέντρου. Και αυτό γιατί οι επιθηλιακές επιφάνειες κατά μήκος του τραχειοβρογχικού δέντρου αποτελούνται από ταχέως πολλαπλασιαζόμενους πληθυσμούς κυττάρων που αποβάλλονται απευθείας στα πτύελα. Οι πληθυσμοί αυτοί εμφανίζουν παρόμοιες γενετικές αλλοιώσεις.

Η επίπτωση της LOH(ένδειξη πιθανών ογκοκατασταλτικών γονιδίων) ήταν 38,5% στους IPF ασθενείς με μεταβολές τουλάχιστον σε ένα γενετικό τόπο. Οι θετικές για LOH περιοχές παρατηρήθηκαν στους μικροδορυφορικούς δείκτες που βρίσκονταν στα γονίδια MYCL1, FHIT, SPARC, p16^{ink4} και TP53 σε ποσοστό 4,3%, 15,4%, 5,3%, 4,8% και 8% αντίστοιχα. Σύμφωνα με τη θεωρία των «δύο χτυπημάτων» του Knudson, η LOH είναι το σημείο-κλειδί για την ύπαρξη ογκοκατασταλτικών γονιδίων.

Προηγούμενες μελέτες σχετικά με την LOH στην IPF έδειξαν επίπτωση μεταξύ 39% και 52%(314,315). Τέτοιες διαφορές μπορεί να οφείλονται στο διαφορετικό είδος δειγμάτων, πτύελα(314) όπου η επιμόλυνση με υγιή κύτταρα είναι μεγαλύτερη(ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα) από ότι σε τομές πνευμονικού ιστού(315) καθώς και στον αποκλεισμό ή όχι αυτών με κακοήθειες. Η μονιμοποίηση με παραφίνη μπορεί και αυτή να δημιουργήσει προβλήματα στην εκτίμηση της PCR ανάλυσης.

Καμία ως τώρα μελέτη δεν υπάρχει σχετικά με τον αριθμό των γενετικών τόπων που πρέπει να αναλυθούν και το πόσοι από αυτούς πρέπει να εμφανίζουν αλλαγές έτσι ώστε να θεωρηθούν ως υψηλού βαθμού για MIN ή LOH. Παρόλα αυτά δεχόμαστε ότι ένα δείγμα είναι χαμηλού βαθμού για MIN ή LOH όταν εμφανίζει αστάθεια σε ένα γενετικό τόπο ενώ όταν η αστάθεια είναι σε περισσότερους τόπους τότε το δείγμα θεωρείται υψηλού βαθμού για MIN ή LOH .

Το MYCL1 είναι μέλος μιας οικογένειας γονιδίων που κωδικοποιούν πυρηνικές πρωτεΐνες βραχέως χρόνου ημιζωής που δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες και ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση(316). Μεταβολές σε αυτή την περιοχή έχουν περιγραφεί στον καρκίνο του πνεύμονα(317) καθώς και LOH στο τμήμα αυτό του χρωμοσώματος(318).

Ανωμαλίες στην έκφραση σε μια εύθραυστη ομάδα ιστιδίνης, το γονίδιο FHIT, έχουν αναφερθεί ότι συμβαίνουν συχνά σε πολλές μορφές καρκίνου όπως στο μικροκυτταρικό Ca πνεύμονα(NSCLC)(319) αλλά και στην IPF(315). Το ογκοκατασταλτικό αυτό γονίδιο βρίσκεται στην 3p14.2 περιοχή και περιλαμβάνει το εύθραυστο FRA3B τμήμα. Το ποσοστό απώλειας του αλληλομόρφου είναι μεγάλο στις περιοχές της μεταπλασίας στην IPF και ακόμη μεγαλύτερο στην IPF μαζί με καρκίνο του πνεύμονα. Ο Uematsu και συν. βρήκαν συχνότητα LOH 17% στο γονίδιο FHIT, κάτι που επιβεβαιώνεται από τη FISH ανάλυση σε ασθενείς με IPF χωρίς καρκίνο(315) όπου βρέθηκε LOH σε ποσοστό 15,4% στην ίδια περιοχή. Οι μεταλλαγές αυτές συμβαίνουν όχι μόνο de novo αλλά και μετά από έκθεση σε μιτογόνα (περιβαλλοντικοί και επαγγελματικοί παράγοντες) . Για παράδειγμα η άσβестος και το κάπνισμα συνδέονται με μεταλλάξεις στο γονίδιο FHIT και ανωμαλίες στην έκφρασή του. Η έκφραση του FHIT είναι ελαττωμένη σε περιοχές μεταπλασίας γύρω από σχηματισμούς δίκην μελισσοκηρύθρας.

Το γονίδιο SPARC εκφράζει τη μεσοκυττάρια πρωτεΐνη SPARC(secreted protein acidic and rich in cystein) που εμφανίζεται σε διάφορα στάδια της ανάπτυξης και απαντά πρωτογενώς σε ιστούς ενηλίκων που είναι ύποπτοι για μεταλλαγή καθώς και σε τραύμα και νόσο(320). Το SPARC ανήκει σε μια οικογένεια γονιδίων που επηρεάζουν την κυτταρική συμπεριφορά και έχουν ομοιότητες στη δομή τους. Συμβάλλει στην οργάνωση της μεσοκυττάριας ουσίας στο συνδετικό ιστό και τις βασικές μεμβράνες. Επηρεάζει την ινωδογένεση χάρη στην ικανότητά του να συνδέεται με το κολλαγόνο ή μέσω άλλων άγνωστων μηχανισμών. Η ικανότητα της

πρωτεΐνης SPARC να συνδέεται με πρωτεΐνες του ενδοπλασματικού δικτύου, να ρυθμίζει την αποτελεσματικότητα αυξητικών παραγόντων, να επηρεάζει την έκφραση μεταλλοπρωτεϊνών και να αλλάζει το κυτταρικό σχήμα ενισχύει την άποψη ότι η SPARC λειτουργεί ως ρυθμιστής την σύνδεσης του κυττάρου με την εξωκυττάρια ουσία κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και ως απάντηση στο τραύμα(320).

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η IPF συνδέεται περισσότερο με την ανώμαλη επούλωση του τραύματος παρά με τη φλεγμονή. Άρα η σχέση μεταξύ SPARC και IPF αντανακλά αυτό το χαρακτηριστικό.

Η σχέση μεταξύ IPF και καρκίνου (226,311,216,232) οδήγησε στην υπόθεση ότι η LOH στα γονίδια p16^{ink4} και TP53(όπως φάνηκε στη μελέτη μας) μπορεί να εμπλέκεται στην παθογένεια της νόσου λόγω απώλειας λειτουργικού αλληλομόρφου. Το γονίδιο p53 αναστέλλει την κυτταρική αύξηση με ρύθμιση της G1/S φάσης στον κυτταρικό κύκλο και μεσολαβεί στην απόπτωση ως απάντηση σε βλάβες του DNA. Ο αρχέγονος τύπος του γονιδίου ενισχύει την κυτταρική αύξηση ενώ το κύτταρο προσπαθεί να επιδιορθώσει τις βλάβες του DNA. Επίσης προάγει την απόπτωση σε εκείνα τα κύτταρα που έχουν κατεστραμμένο DNA ή πολλαπλασιάζονται αδιάκοπα.

Αλλαγές στην έκφραση του p53 έχουν βρεθεί σε επίπεδο πρωτεϊνών(312) καθώς και μεταλλάξεις στο γονίδιο(313). Οι σημειακές μεταλλάξεις στο p53 γονίδιο συνήθως οδηγούν σε αλλαγές στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης και αυξημένη σταθερότητα, με αποτέλεσμα τη συσσώρευσή της στον πυρήνα. Οι μεταλλάξεις αυτές συμβαίνουν κυρίως στην περιφέρεια του πνεύμονα όπου και η επίπτωση του καρκίνου είναι μεγαλύτερη και αποτελούν πρώιμα γεγονότα στη διαδικασία της ογκογένεσης.

Το p21 προέρχεται από κύτταρα που περιέχουν τον αρχέγονο τύπο του p53 μετά από έκθεση σε καταστρεπτικούς για το DNA παράγοντες και όχι το μεταλλαγμένο p53. Όπως και το p53 υπερεκφράζονται στα υπερπλαστικά τύπου II πνευμονοκύτταρα και στα βρογχικά επιθήλια. p53 και p21 παίζουν εξίσου σημαντικούς ρόλους στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και προάγουν την αποκατάσταση της βλάβης των ιστών στην IPF. Απώλεια της λειτουργίας του p53 οδηγεί σε ελάττωση της έκφρασης του p21. Η παραγωγή του p53 και p21 είναι αυξημένη σε αυξημένη καταστροφή του DNA σε ασθενείς με IPF.

Αξιοσημείωτο είναι ότι αλλαγές στο p53 δεν εμφανίζονται μόνο στην καρκινογένεση αλλά και στην οξεία φλεγμονή. Ο Αντωνιάδης και συν. υποστηρίζουν μια αντίστροφη σχέση μεταξύ αυξητικών παραγόντων και επιπέδων p53. Κατά την

επούλωση η έκφραση των αυξητικών παραγόντων καταστέλλεται και η p53 αυξάνει , φτάνοντας στο μέγιστο τη στιγμή της πλήρους επιθηλιοποίησης και της επούλωσης . Μελέτες αναφέρουν ότι ο πολλαπλασιασμός των ινοβλαστών είναι αποτέλεσμα της επιθηλιακής βλάβης. Τα επιθηλιακά κύτταρα απελευθερώνουν κυτοκίνες που υπορρυθμίζουν τη δραστηριότητα των ινοβλαστών.

Ο TGF- β βρίσκεται κυρίως στα επιθηλιακά κύτταρα των κυψελίδων και υπερπαράγεται στους πνεύμονες ασθενών με προχωρημένη IPF. Έχει βρεθεί αυξημένη έκφρασή του σε περιοχές πλούσιες σε μακροφάγα που πυροδοτούν την ίνωση. Ο TGF- β αναστέλλει την κυτταρική αύξηση και συνδέεται με αλλαγές στη φωσφορυλίωση της p53 πρωτεΐνης . Επίσης υπορρυθμίζει τη p21.

MIN βρέθηκε σε ποσοστό 19,2% στα δικά μας δείγματα. Πάντως κανένα από αυτά δεν είχε ψευδώς θετικό φαινότυπο αντιγραφής[replication error-positive phenotype (RER+)], λόγω ίσως ασήμαντων μεταβολών στη δραστηριότητα του επιδιορθωτικού συστήματος κακώς ζευγαρωμένων βάσεων DNA(mismatch repair genes-MMR)(310).

Ωστόσο πρέπει να τονιστεί ότι γενετικές αλλοιώσεις του τύπου της LOH και MIN δεν απαντούν μόνο στην IPF αλλά και σε άλλες παθήσεις. Για παράδειγμα γενετική αστάθεια έχει βρεθεί σε νευρολογικές, οφθαλμικές, καρδιακές παθήσεις αλλά και παθήσεις του ήπατος και του μαστού,στη χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια. Εκτός από τις παραπάνω καλοήθεις παθήσεις, LOH και MIN εμφανίζουν και οι όγκοι των περισσότερων οργάνων(269-291).

Σχετικά με το ρόλο του καπνίσματος, η μελέτη μας δεν έδειξε μεγαλύτερη συχνότητα LOH ή MIN στους καπνιστές από ότι στους μη και άρα το κάπνισμα δε σχετίζεται με τη γενετική αστάθεια στην IPF. Ωστόσο τα δεδομένα στη διεθνή βιβλιογραφία πάνω σε αυτό το θέμα είναι αντικρουόμενα(163,314,290).

Όσον αφορά στην κλινική εικόνα των ασθενών και τη βαρύτητα της νόσου υποομάδες ασθενών με IPF ,θετικών και αρνητικών για LOH συγκρίθηκαν. Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δε βρέθηκε μεταξύ των υποομάδων σχετικά με την ηλικία ,φύλο, στάδιο, διάρκεια νόσου και κάπνισμα, γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η γενετική αστάθεια είναι ανεξάρτητη της σοβαρότητας της πάθησης.

Η υπόθεση ότι η IPF συμβαίνει σε γενετικώς προδιατεθειμένα άτομα που δεν μπορούν να ελέγξουν τις φλεγμονώδεις, ανοσολογικές και ινωτικές διαδικασίες στον πνεύμονα μετά από έκθεση σε διάφορους παράγοντες στηρίζεται σε αξιόλογες

μελέτες αλλά κανένας γενετικός παράγοντας δεν έχει πλήρως ταυτοποιηθεί(239-245,162). Φαίνεται πως η διαδικασία είναι πολυσύνθετη ,πολυεστιακή και η κληρονομικότητα μαζί με τους εξωγενείς παράγοντες καθορίζουν τη φαινοτυπική έκφραση της νόσου.

Συμπερασματικά, τα δεδομένα μας δείχνουν η IPF εμφανίζει αλλαγές σε μοριακό επίπεδο και η LOH και η MIN είναι χρήσιμοι δείκτες για την ανίχνευση αυτών. Οι αλλαγές που συμβαίνουν είναι παρόμοιες με αυτές του καρκίνου και της επούλωσης τραύματος. Η χρόνια φλεγμονή στην IPF οδηγεί σε επαναλαμβανόμενους κύκλους βλαβών και αποκατάστασης των επιθηλιακών κυττάρων στους βρόγχους και στις κυψελίδες. Οι περιοχές της μεταπλασίας αποτελούν πρόκληση στην έρευνα της ανθρώπινης καρκινογένεσης στην περιφέρεια του πνεύμονα. Γονίδια που εμπλέκονται σε διαφορετικά κυτταρικά μονοπάτια όπως αυτά του κυτταρικού κύκλου, της απόπτωσης και της απάντησης στη φλεγμονή πρέπει να συνυπολογίζονται στην παθογένεια της νόσου. Απομένει η λεπτομερής χαρτογράφηση των χρωμοσωμικών περιοχών που πιθανώς εδράζονται τέτοια γονίδια.

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

8.1 ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ-ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΑΣΘΕΝΩΝ

Τριανταοκτώ(38) ζεύγη από πρωινά πτύελα και φλεβικό αίμα ασθενών με σαρκοείδωση μελετήθηκαν. Όλα τα δείγματα προέρχονταν από ασθενείς που παρακολουθούνταν στην Πνευμονολογική Κλινική του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου(ΠΕ.ΠΑ.ΓΝΗ).Δεκαεννέα(19) ασθενείς λάμβαναν θεραπεία με κορτικοειδή. Τα χαρακτηριστικά των ασθενών φαίνονται στον Πίνακα 9.Ασθενείς που είχαν χρόνια νόσο, πνευμονική λοίμωξη ή κακοήθεια αποκλείστηκαν από τη μελέτη. Για να επιβεβαιώσουμε ότι τα δείγματα των πτυέλων προέρχονται από την κατώτερη αναπνευστική οδό, εξετάστηκαν μικροσκοπικά και θεωρήθηκαν κατάλληλα όσα είχαν περισσότερα από 10 πυοσφαίρια κατά οπτικό πεδίο(306). Οι αναπνευστικές δοκιμασίες εκτελέστηκαν όπως περιγράφεται προηγούμενα(307).Η μέση ζωτική χωρητικότητα υπολογίστηκε σε 48%.Υπήρχε η γραπτή συγκατάθεση όλων όσων μετείχαν και η έρευνα έγινε σύμφωνα με τους κανόνες της ιατρικής δεοντολογίας

Πίνακας 9 .Χαρακτηριστικά ασθενών με σαρκοείδωση

Συνολικός αριθμός	38
Στάδιο I	10
Στάδιο II	21
Στάδιο III	5
Στάδιο IV	2
Άνδρες	25
Γυναίκες	13
Μέση ηλικία±SD(έτη)	55.2±11.5
Διάρκεια νόσου(έτη)	3.7± 1.6
Σπιρομέτρηση	
FEV1(% προβλ.)	76.3 ± 3.8
FVC (% προβλ.)	88.6 ± 2.3
FEV1/FVC	82.7 ± 2.5

8.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ

Συλλέχθηκαν περίπου 5ml περιφερικού αίματος και διατηρήθηκαν με αντιπηκτικό (K-Na EDTA) σε θερμοκρασία 4oC. Έγινε λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων (απύρηνα) μετά από επώαση του αίματος σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε 10mM Tris HCL pH 8.0, 320mM σουκρόζη, 5mM MgCl₂ και 1% Τριτον-X-100. Μετά από ήπια ανάδευση του διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου έγινε φυγοκέντρηση σε 2.500 rpm. Το κυτταρικό ίζημα που συλλέχθηκε επαναιωρήθηκε σε διάλυμα που περιείχε Tris pH 8.0 400mM, EDTA 60mM, NaCl 150mM και SDS 1%.

Ακολούθησε η προσθήκη υπερχλωρικού νατρίου, προσθήκη χλωροφορμίου και κατακρήμνιση του DNA με αιθανόλη.

8.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΠΤΥΕΛΑ

Για την εκχύλιση χρωμοσωμικού DNA από τα πτύελα χρησιμοποιήθηκε διάλυμα λύσης (10mM EDTA, 10mM TrispH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5% SDS) προκειμένου να ομογενοποιηθούν. Ακολούθησε προσθήκη πρωτεΐνάσης K σε τελική συγκέντρωση 100μg/mL και επώαση του ομογενοποιημένου ιστού σε θερμοκρασία 60oC. Στη συνέχεια έγινε εκχύλιση του DNA με ίσες ποσότητες φαινόλης/χλωροφορμίου για 1h σε θερμοκρασία 37oC. Το DNA κατακρημνίστηκε με προσθήκη μισού όγκου οξεϊκού αμμωνίου και 2,5 όγκων απόλυτης αιθανόλης και φυγοκεντρήθηκε σε θερμοκρασία 4oC σε 13000 rpm. Το κατακρημνισμένο DNA εκπλύθηκε με 70% αιθανόλη, η οποία αφού απομακρύνθηκε επαναραιώθηκε το DNA σε ddH₂O και διατηρήθηκε σε θερμοκρασία 4oC. Το DNA φωτομετρήθηκε στα 260nm και στα 280nm προκειμένου να καθοριστεί η ποσότητα και η καθαρότητα του(308).

8.4. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ(PCR)

8.4.1. Αρχές μεθόδου

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ή PCR πρωτοεμφανίστηκε από την ομάδα των ερευνητών Mullis, Fallona και Saiki της εταιρείας Cetus και αποτελεί αναμφίβολα επανάσταση στη βιοϊατρική έρευνα με ευρύτατο φάσμα εφαρμογών. Αντικατέστησε καθολικά τους μέχρι τότε υπάρχοντες τρόπους ανάλυσης του DNA σε

ερευνητικά και διαγνωστικά εργαστήρια. Το βραβείο Νόμπελ Χημείας απενεμήθη στον Mullis τον Οκτώβριο του 1993 για την καθοριστικά συμβολή του στην ανακάλυψη και ανάπτυξη της τεχνικής PCR.

Με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται ταχέως(2-3h) η σύνθεση “in vitro” ενός τμήματος DNA, γνωστής αλλά και άγνωστης αλληλουχίας. Σε χρονικό διάστημα λίγων ωρών η συγκεκριμένη περιοχή του DNA(DNA-στόχος)πολλαπλασιάζεται σε ένα μεγάλο αριθμό αντιγράφων που εξαρτάται από τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην κινητική επανασύνδεσης των αποδιαταγμένων συμπληρωματικών αλύσεων δίκλωνου νουκλεϊνικού οξέος που ανέπτυξαν οι Britten και Kohne στα τέλη της δεκαετίας του 1960. Εκεί που άλλες τεχνικές υψηλής ευαισθησίας όπως οι τεχνικές μοριακού υβριδισμού (Southern, Northern) αποδεικνύονται ανεπαρκείς, η PCR επιτυγχάνει την επέκταση του DNA-στόχου σε σημείο που να γίνεται ευχερώς ανιχνεύσιμο.

Το DNA-στόχος αποτελεί το πρότυπο DNA στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης. Ως αφετηρίες χρησιμοποιούνται 2 συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (15-25 βάσεων) με δομή συμπληρωματική προς τις πλευρικές αλληλουχίες του DNA-στόχου, καθένα αντίστοιχα προς τον ένα κλώνο του στόχου και με αντίθετη κατεύθυνση. Το πρώτο στάδιο της PCR είναι η μετουσίωση του DNA-στόχου κατά την οποία το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο. Στη συνέχεια συνδέονται τα δύο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια που λέγονται εκκινητές (primers) στις δύο πλευρές του DNA-στόχου, στους αντίστοιχους κλώνους(δεύτερο στάδιο).Με τη δράση της θερμοανθεκτικής Taq DNA πολυμεράσης, ενός ενζύμου προερχόμενου από θερμοφιλά βακτήρια, προστίθενται συμπληρωματικές βάσεις δεοξυριβονουκλεοτιδίων στο 3' άκρο κάθε εκκινητή και η αλυσος επεκτείνεται(τρίτο στάδιο). Έτσι σχηματίζονται δύο νέες αλυσος ή κλώνοι του DNA συμπληρωματικές ως προς αυτές των δύο κλώνων του προτύπου DNA και το DNA-στόχος έχει με αυτό τον τρόπο διπλασιαστεί. Τα τρία αυτά στάδια, δηλαδή η μετουσίωση(denaturation), ο υβριδισμός των εκκινητών (annealing) και η επέκταση των εκκινητών με τη σύνθεση νέου κλώνου(extention) αποτελεί ένα κύκλο της αντίδρασης.

Στο τέλος του πρώτου κύκλου της αντίδρασης οι κλώνοι του DNA-στόχου είναι 4 και αποτελούν πρότυπα για τη σύνθεση νέων κλώνων DNA στο δεύτερο κύκλο. Στο τέλος του δεύτερου κύκλου οι κλώνοι θα είναι 8 και αυξάνοντας τον αριθμό των κύκλων αυξάνει εκθετικά και ο αριθμός των ανατύπων του DNA-στόχου, επειδή οι κλώνοι που σχηματίζονται χρησιμοποιούνται ως πρότυπα στον επόμενο

κύκλο. Γι' αυτό και ονομάστηκε η αντίδραση “αλυσιδωτή”, επειδή η νεοσυντιθέμενη αλυσίδα του DNA λειτουργεί ως πρότυπο αντιγραφής για περαιτέρω σύνθεση DNA σε διαδοχικούς κύκλους. Έτσι επιτυγχάνεται μεγέθυνση του DNA-στόχου 2^n όπου η ο αριθμός των κύκλων (βλ. Σχήμα 3 και 4). Συνήθως η PCR πραγματοποιείται επί 25-40 κύκλους. Ο αριθμός των αντιγράφων του DNA υπολογίζεται με βάση την εξίσωση $N = n(1+e)^c$, όπου N η τελική ποσότητα του προϊόντος, n η αρχική ποσότητα του DNA, e η απόδοση της αντίδρασης και c ο αριθμός των κύκλων της PCR (Mullis and Faloona, 1987). Ωστόσο ο εκθετικός πολλαπλασιασμός των αντιγράφων αλλοιώνεται στους τελευταίους κύκλους εμφανίζοντας plateau, λόγω εξάντλησης των αποθεμάτων των δεοξυριβονουκλεοτιδίων, των εκκινητών και της σταδιακής απενεργοποίησης της πολυμεράσης εξαιτίας των επαναλαμβανόμενων υψηλών θερμοκρασιών στο στάδιο της αποδιάταξης (309).

Το κύριο προϊόν της PCR είναι δίκλωνο DNA που περιβάλλεται από εκκινητές των οποίων τα 5' άκρα είναι και τα άκρα του προϊόντος της PCR. Το μέγεθος του σε ζεύγη βάσεων (bp) είναι ίσο με το άθροισμα των βάσεων των εκκινητών και της παρεμβαλλόμενης αλληλουχίας του DNA-στόχου. Είναι δυνατό κατά τους πρώτους κύκλους της PCR να σχηματιστούν μακρύτερα μονόκλιωνα μόρια DNA που αποτελούν ένα ελάχιστο ποσοστό στο συνολικό προϊόν της PCR και άρα δεν είναι ανιχνεύσιμα.

Όλη η αντίδραση PCR ολοκληρώνεται στο ίδιο μίγμα αντιδραστηρίων για το οποίο απαιτείται: DNA-στόχος, εκκινητές, τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια, Taq DNA πολυμεράση, ιόντα Mg απαραίτητα για την ενζυμική δράση και κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα pH 8.2 για τη δράση του ενζύμου. Η Taq πολυμεράση απομονώθηκε από το βακτήριο *Thermus aquaticus* (Taq) και έχει την ιδιότητα να είναι ενεργή ακόμη και στους 95°C, θερμοκρασία που απαιτείται για τη μετουσίωση του DNA-στόχου επί 40 min.

Κάθε κύκλος PCR περιλαμβάνει 3 διαφορετικές θερμοκρασίες για τα στάδια της μετουσίωσης, του υβριδισμού και της επέκτασης. Η μετουσίωση του DNA γίνεται σε θερμοκρασία 92-95°C για 30 περίπου sec, ο υβριδισμός ανάλογα με τη σύνθεση των βάσεων A/T, G/C σε θερμοκρασία 50-65°C επί 1-2 min και η επέκταση σε θερμοκρασία 70-78°C επί 1-2 min. Οι εναλλαγές της θερμοκρασίας ανάμεσα σε κάθε κύκλο επιτυγχάνονται με αυτοματοποιημένες συσκευές, τους θερμοκυκλοποιητές που έχουν τη δυνατότητα να ανεβοκατεβάζουν τη θερμοκρασία

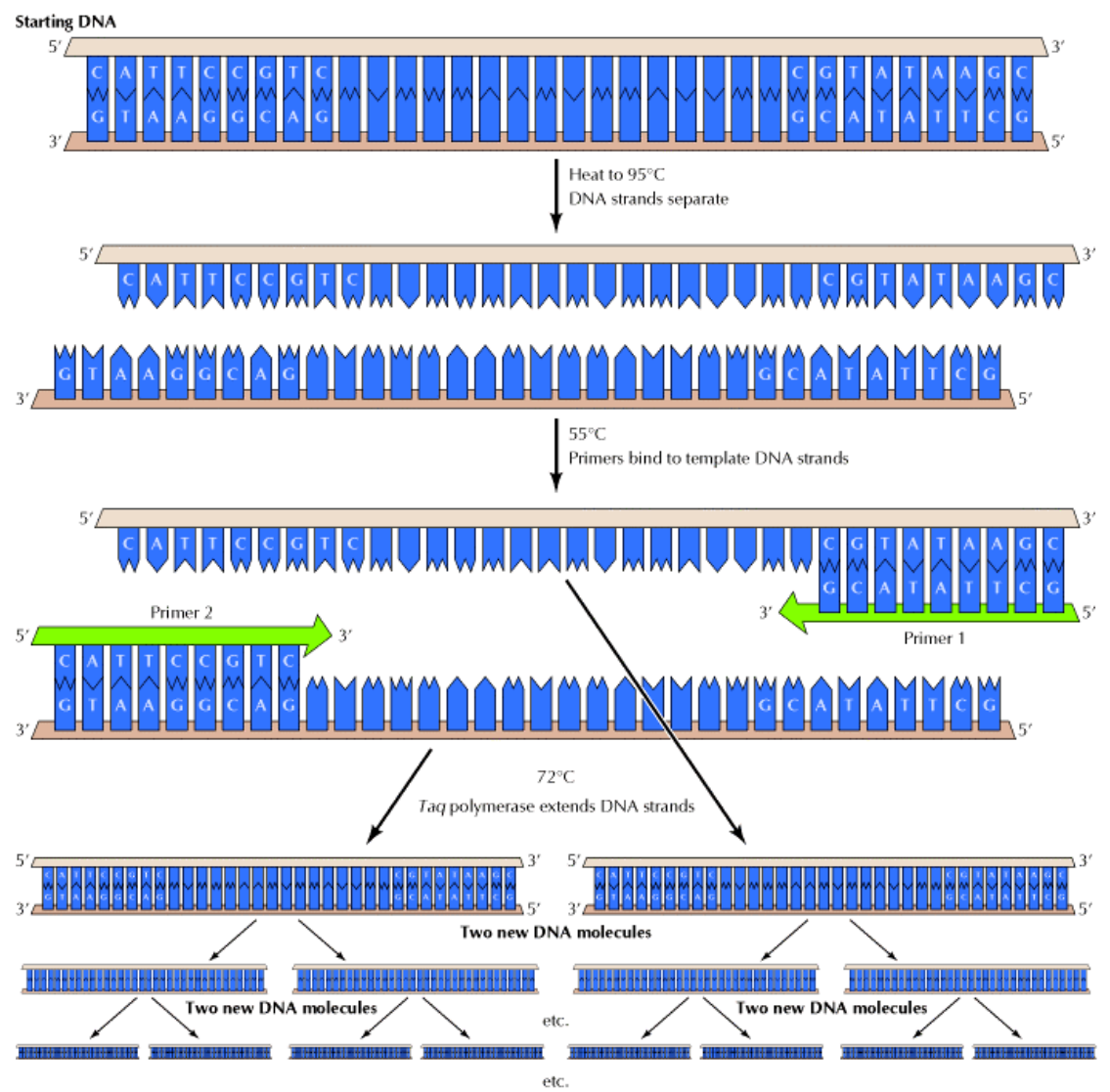
μεταξύ των τριών προαναφερόμενων θερμοκρασιών σε λιγότερο από 1 min για αυξομείωση θερμοκρασίας 40°C.

Προκειμένου να ποσοτικοποιηθούν τα αποτελέσματα της PCR πρέπει να τερματιστεί η αντίδραση στην εκθετική της φάση. Έτσι γίνεται γραμμική αντιστοίχιση της τελικής ποσότητας του προϊόντος με την αρχική ποσότητα του DNA. Συνήθως σχεδιάζεται μια πρότυπη καμπύλη με διαδοχικές αραιώσεις του DNA-στόχου ώστε να βρεθούν οι συθήκες στις οποίες η σχέση είναι γραμμική.

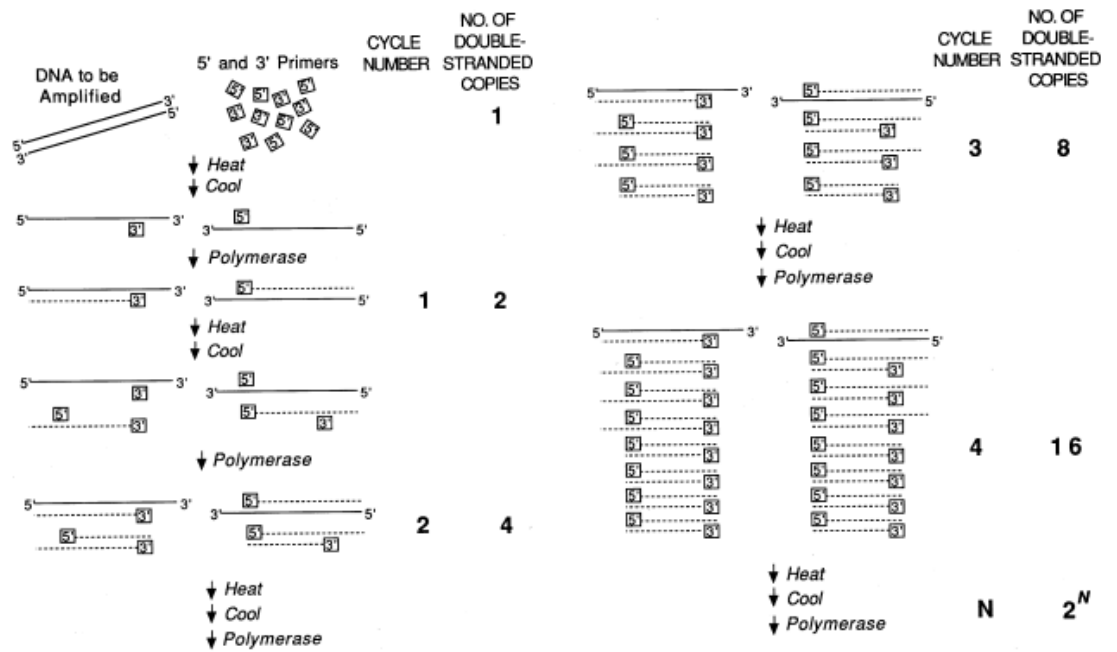
Συνήθως 100ng ολικού DNA αρκούν για να επιτευχθεί η γονιδιακή επέκταση του DNA-στόχου. Απαραίτητη προϋπόθεση για να γίνει αυτό είναι η ακεραιότητά του. Ακόμα και θραύσματα γενετικού υλικού είναι δυνατό να ανιχνευθούν με την PCR. Η αλληλουχία των βάσεων του DNA-στόχου μπορεί να είναι άγνωστη αλλά η αλληλουχία βάσεων των πλευρικών περιοχών του DNA-στόχου θα πρέπει να είναι γνωστή ώστε να κατασκευαστούν οι εκκινητές . Ο αριθμός των κύκλων της PCR προκειμένου να έχουμε μια επαρκή μεγέθυνση εξαρτάται από τη συγκέντρωση του DNA-στόχου και την απόδοση της PCR σε κάθε κύκλο μεγέθυνσης. Υπερβολικός αριθμός κύκλων οδηγεί σε αύξηση των μη ειδικών προϊόντων της γονιδιακής επέκτασης ενώ μικρότερος από τον απαιτούμενο στη μη ανίχνευση του DNA στόχου.

Η ευαισθησία της μεθόδου αυξάνεται ακόμη περισσότερο με την επανενίσχυση των προϊόντων της πρώτης αντίδρασης. Αυτό γίνεται με τη βοήθεια εκκινητών που υβριδίζουν εσωτερικότερα των πρώτων στη συγκεκριμένη αλληλουχία-στόχο.

Σχήμα 3



Σχήμα 4



8.4.2. Ρυθμιστικοί παράγοντες της PCR

i) Εκκινητές

Θα πρέπει να επιλεγθούν πάνω σε μη μεταβλητές περιοχές του DNA-στόχου που θα μεγεθυνθεί μεταξύ των δύο εκκινητών. Αυτοί θα πρέπει να έχουν παραπλήσιο αριθμό βάσεων G/C ,να μη παρουσιάζουν συμπληρωματικότητα στο 3' ή στο 5' άκρο τους ώστε να αποφεύγεται ο σχηματισμός διμερών και η απόστασή τους να είναι μεγαλύτερη των 100 βάσεων για να επιτρέπεται ο σχηματισμός νέου κλώνου DNA. Δεδομένου ότι μια αλληλουχία DNA μήκους 20bp είναι μοναδική στο γονιδίωμα ,οι εκκινητές θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 20μερή ώστε να επιτευχθεί ειδική ενίσχυση των αλληλουχιών. Η συνηθισμένη συγκέντρωση ενός 20μερούς εκκινητή σε μια PCR αντίδραση είναι 0,5μM.

Οι εκκινητές θα πρέπει να έχουν παραπλήσια θερμοκρασία αποδιάταξης ή τήξεως (T_m , melting temperature). Σύμφωνα με τον τύπο των Thein και Wallace $T_m = (4 \times \text{αριθμός βάσεων G+C}) + (2 \times \text{αριθμός βάσεων A+T})$. Ένα επιθυμητό T_m θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 55-57°C. Όσο μεγαλύτερη είναι η T_m τόσο μεγαλύτερο υβριδισμό πετυχαίνουμε αλλά χαμηλής απόδοσης. Όσο μικρότερη είναι η T_m τόσο καλύτερη απόδοση έχουμε σε βάρος της ειδικότητας, με αποτέλεσμα πολλά παραπροϊόντα. Η ειδικότητα της αντίδρασης οφείλεται και στη θερμοκρασία υβριδισμού (T_a , annealing temperature) των εκκινητών. Συνήθως η T_a επιλέγεται να είναι 5-10°C μικτότερη της T_m . Όσο πιο κοντά είναι η T_a στην T_m τόσο πιο πολύ αυξάνει η ειδικότητα.

ii) Ιόντα Mg

Μεγάλες συγκεντρώσεις αυξάνουν την ενεργότητα της Taq πολυμεράσης αλλά μειώνουν την πιστότητά της. Η ιδανικότερη συγκέντρωση ιόντων Mg είναι 25mM/αντίδραση .

Η ειδικότητα καθώς και η απόδοση της αντίδρασης εξαρτάται επίσης από τον αριθμό των κύκλων, τη συγκέντρωση της Taq καθώς και τη συγκέντρωση

των εκκινητών και του DNA-στόχου. Προκειμένου να βελτιστοποιηθούν οι συνθήκες της αντίδρασης με δεδομένο ζεύγος εκκινητών γίνονται πειράματα στα οποία μεταβάλλονται ανεξάρτητα μεταξύ τους η θερμοκρασία αναδιάταξης και η συγκέντρωση ιόντων Mg. Η ειδικότητα του προϊόντος της PCR σε βέλτιστες συνθήκες επιβεβαιώνεται ως ένα ομοιογενές προϊόν σε ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αγαρόζης, το μέγεθος του οποίου ταυτίζεται με το μέγεθος του DNA-στόχου.

8.4.3. Ρυθμιστικά διαλύματα της PCR

Αυτά ρυθμίζουν το pH και παρέχουν συμπαραγοντες και σταθεροποιητές για τη μέγιστη απόδοση της αντίδρασης. Χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα :

Ρυθμιστικό διάλυμα A: 670mM Tris.HCl, pH 8.5, 166 mM θεϊκό αμμώνιο, 67 mM χλωριούχο μαγνήσιο, 1,7 mg/ml BSA, 100μM β-μερκαπτοαιθανόλη και 1% (w/v) Triton X-100.

Ρυθμιστικό διάλυμα B: 75mM Tris.HCl, pH 9.0, 20 mM θεϊκό αμμώνιο, 0.01%(w/v) Tween 20, 2.5 mM θεϊκό μαγνήσιο.

Ρυθμιστικό διάλυμα C: 50mM Tris HCl, pH 8.3, 50mM χλωριούχο κάλιο, 10 mM χλωριούχο μαγνήσιο, 10μM διθειοθρεϊτόλη ,ο.5 μM σπερμιδίνη.

8.4.4. Σχεδιασμός εκκινητών

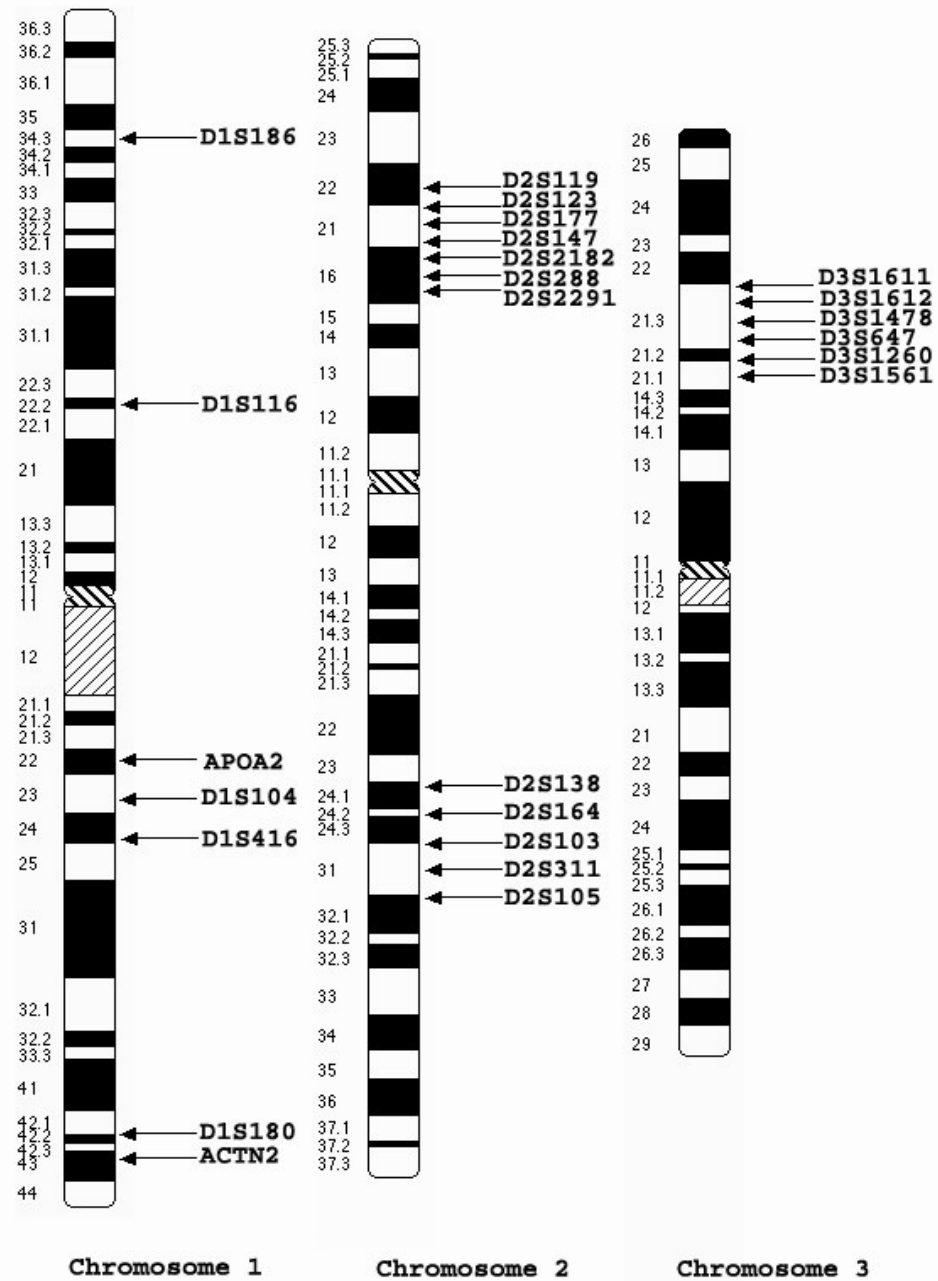
Σαράντα(40) δείκτες μικροδορυφορικού DNA (Research Genet-ics,US) πολλαπλασιάστηκαν σε 11 ομάδες τριπλών και τετραπλών αντιδράσεων(Πίνακας 10,Εικ.6).

Πίνακας 10. Οι εκκινητές του μικροδορυφορικού DNA που μελετήθηκαν

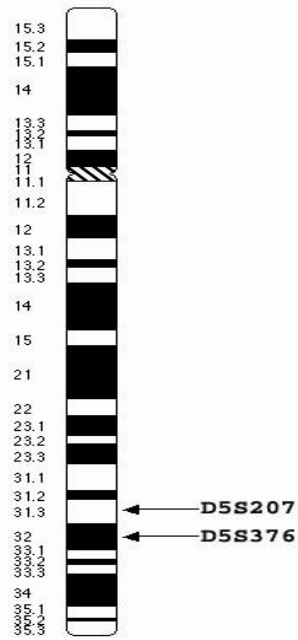
Εκκινητής	Κυτογενετική περιοχή	Ετεροζυγωτία	Εύρος μεγέθους αλληλομόρφου	Αναγκαία συγκέντρωση εκκινητή στην πολλαπλή PCR (nM)	Ομάδα εκκινητών*
D1S416	1q24	0.82	146-162	130	H
D1S186	1p34.3	0.84	82-106	100	G
D1S116	1p31-p21	0.65	89-101	100	F
APOA2	1q21-q23	0.70	131-145	150	F
D1S104	1q2-q23	0.76	152-168	150	G
D1S180	1q42	0.90	163-189	150	H
ACTN2	1q42-q43	0.50	105	120	H
D2S119	p16.1 2p22.3-	0.80	221	175	A
D2S123	p16.1 2p22.3-	0.76	196	140	A
D2S177	p16.1 2p22.3-	0.85	276	225	A
D2S147	p16.1 2p22.3-	0.73	111	80	A
D2S2182	p16.1 2p22.3-	0.78	234	180	C
D2S288	p16.1 2p22.3-	0.62	276-284	250	C
D2S2291	p16.1 2q24.1-	0.76	245	320	D
D2S138	q32.1 2q24.1-	0.67	115	100	B
D2S164	q32.1 2q24.1-	0.83	195	175	B
D2S103	q32.1 2q24.1-	0.82	109-125	120	D
D2S311	q32.1 2q24.1-	0.81	185-207	150	D
D2S105	q32.1 3p21.32-	0.69	107-125	130	E
D3S1611	p21.1	0.66	258	260	B

D3S1612	p21.1	3p21.32-	0.69	100	80	C
D3S1478	p21.1	3p21.32-	0.98	109-152	130	C
D3S647	p21.1	3p21.32-	0.73	100	90	D
D3S1260	p21.1	3p21.32-	0.66	268	230	E
D3S1561	p21.1	3p21.32-	0.65	226	180	E
D5S207	q33.3	5q31.3-	0.68	135-143	130	K
D5S376		5q32-q33.1	0.72	117-129	100	I
D6S2225		6p21.3	0.38	152	140	J
D6S1002	p22.1	6p21.3-	0.32	240-244	200	K
D6S429		6p23-p25	0.74	222-238	200	I
D6S259		6p23-p25	0.73	267-285	260	K
D6S263	p25	6pter, 6p23-	0.82	90-114	80	J
D7S519		7p15-q22	0.81	256-268	230	F
D9S161		9p21	0.78	119-135	120	F
D9S270		9p21	0.71	87-101	100	H
D11S187						
6		11q21-q22.3	1.00	123-135	100	J
D14S72	14q11.1-q11.2	14pter,	0.83	257-271	200	J
D14S258		14q23-q24.3	0.80	170-182	160	I
D14S292	14q32.1-q32.3	14qter,	0.74	110-118	100	K
TP53	17p13.1		0.90	103-135	130	G

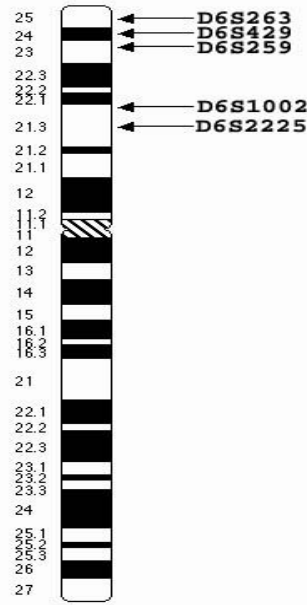
*Ομάδα εκκινητών της πολλαπλής αντίδρασης.



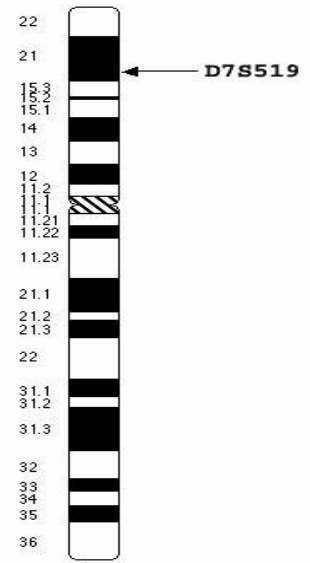
Εικ.6 Οι χρωμοσωμικές περιοχές στις οποίες εδράζονται οι εκκινητές.



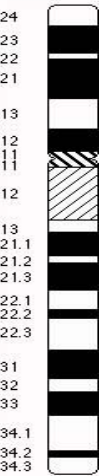
Chromosome 5



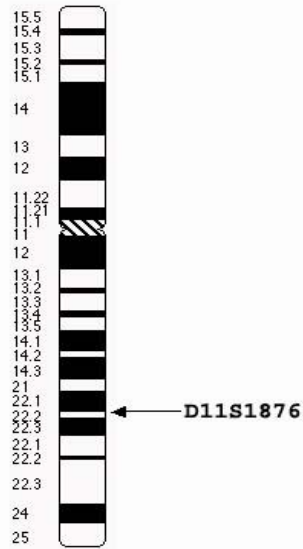
Chromosome 6



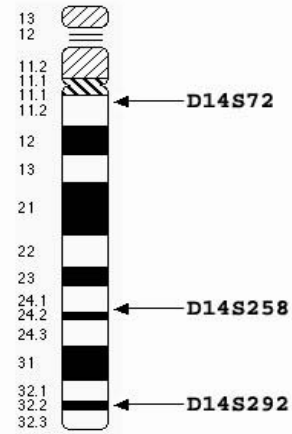
Chromosome 7



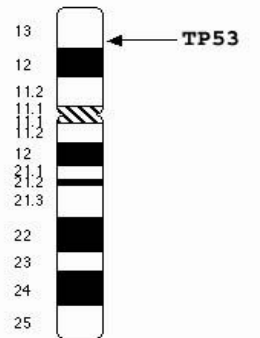
Chromosome 24



Chromosome 11



Chromosome 14



Chromosome 17

8.4.5. Συνθήκες των αντιδράσεων της PCR

Εισαγάγαμε 100 ng γενομικού DNA σε μίγμα PCR αντίδρασης που περιείχε 1X

PCR buffer, 400 μM dNTPs, 2.66 mM MgCl₂ και 0.35U Taq DNA πολυμεράση (GIBCO BRL, Life Technologies). Για να διαχωρίσουμε τις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις από κάθε εκκινητή (Πίνακας 11). Οι παράμετροι πολλαπλασιασμού ήταν οι ακόλουθοι: αρχική αποδιάταξη για 3 λεπτά, 30 κύκλοι στους 94°C για 30 δευτερόλεπτα, 55°C για 30 δευτερόλεπτα και 72°C για 30 δευτερόλεπτα. Το τελικό στάδιο της επέκτασης έγινε στους 72°C για 10 λεπτά. Τα προϊόντα της PCR αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε 10% πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και χρωματίστηκαν με νιτρικό άργυρο.

8.5 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΟΥ DNA

Το DNA ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης ή ακρυλαμιδίου. Η επιλογή του πηκτώματος έγινε με βάση το μέγεθος του DNA που επρόκειτο να ηλεκτροφορηθεί και από τη διακριτική ικανότητα που αναμέναμε να επιτευχθεί. Το πήκτωμα αγαρόζης (μέση συγκέντρωση 1 ως 2%) είναι πιο κατάλληλο για ηλεκτροφόρηση μεγάλων τμημάτων DNA και για μεγάλες διαφορές μεγέθους τμημάτων που πρόκειται να διαχωριστούν. Αντίθετα το πήκτωμα ακρυλαμιδίου (19:1 μίγμα ακρυλαμιδίου/bis ακρυλαμιδίου) επιλέγεται σε περιπτώσεις μικρότερων τμημάτων DNA και για μικρές διαφορές μεγέθους ανάμεσά τους.

Και τα δύο είδη πηκτωμάτων σχηματίζονται σε υδατικό μέσο που περιέχει 1X TBE ρυθμιστικό διάλυμα (0.09 TrisHCl, 0.09M βορικό οξύ, 2.5mM EDTA, pH 8.3). Η πήξη επιτυγχάνεται για την αγαρόζη με στερεοποίησή της μετά από πτώση της θερμοκρασίας (προηγείται τήξη της με βρασμό) και για το ακρυλαμίδιο με προσθήκη

50ml τετραμεθυλ-αιθυλενο-διαμίνης(TEMED) και 160ml υπερθειϊκού αμμωνίου 25% για κάθε 65 ml διαλύματος ακρυλαμιδίου.

Το υπό ηλεκτροφόρηση δείγμα του DNA επαναιωρείται σε διάλυμα φόρτωσης που περιέχει 0.25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0.25% κυανό του ξυλενίου και 25% φυκόλη.

8.6 ΧΡΩΣΗ ΤΟΥ DNA ΜΕ ΝΙΤΡΙΚΟ ΑΡΓΥΡΟ

Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται όταν το DNA έχει ηλεκτροφορηθεί σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου. Έχει μεγάλη ευαισθησία και γι' αυτό χρησιμοποιείται αντί της ραδιενέργειας. Μειονεκτεί στη μη ειδική χρώση του DNA δεδομένου ότι χρωματίζεται και το μονόκλωνο DNA, το RNA καθώς και οι πρωτεΐνες. Έτσι απαραίτητη προϋπόθεση για την εφαρμογή της είναι η ύπαρξη καθαρού και ειδικού DNA. Συχνά χρησιμοποιείται για την ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR.

Το πήκτωμα ακρυλαμιδίου τοποθετείται υπό ανάδευση σε μονιμοποιητικό διάλυμα που περιέχει 10% αιθανόλη και 0.5% οξικό οξύ για 10 min. Ακολουθεί η προσθήκη διαλύματος νιτρικού αργύρου 0.1%(w/v) για 20 min σε ημίφως, πλύσιμο με νερό και προσθήκη του διαλύματος εμφάνισης που περιέχει 0.4 N NaOH και 0.15%(v/v) φορμαλδεΐδη. Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη διαλύματος ανθρακικού νατρίου 0.75%(w/v).

Η χρώση με βρωμιούχο εθίδιο εφαρμόζεται όταν το DNA πρόκειται να ηλεκτροφορηθεί σε πήκτωμα αγαρόζης. Κατά την παρασκευή του τελευταίου προστίθεται βρωμιούχο εθίδιο σε συγκέντρωση 10mg/ml. Αφού ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση οι ζώνες του DNA είναι ορατές μετά από έκθεση του πηκτώματος σε υπεριώδη ακτινοβολία UV.

8.7 ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΛΟΤΥΠΟΥ ΜΕ ΔΕΙΚΤΕΣ ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΟΥ DNA

Οι πολυμορφικές αυτές περιοχές ενισχύονται με τη βοήθεια της αντίδρασης αλυσιδωτής πολυμεράσης (PCR) και τα προϊόντα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου 10% και χρωματίζονται με νιτρικό άργυρο. Επειδή οι αλληλουχίες του DNA είναι επαναλαμβανόμενες και υπάρχει πολυμορφισμός δηλαδή ετεροζυγωτία θα πρέπει η αντίδραση να διατηρείται στην εκθετική της φάση αφού είναι ημιποσοτική μέθοδος προσδιορισμού της σχετικής έντασης των δύο αλληλομόρφων. Επίσης θα πρέπει να επιδιώκεται η καλύτερη δυνατή διακριτική ικανότητα δεδομένου ότι είναι δυνατό τα αλληλόμορφα να διαφέρουν σε δύο μόνο ζεύγη βάσεων.

8.8 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Ως απώλεια ετεροζυγωτίας (LOH) θεωρήθηκε εκείνη η περίπτωση στην οποία η ένταση ενός αλληλομόρφου ήταν τουλάχιστον 50% μικρότερη σε σχέση με το άλλο. Αυτό προέκυπτε μετά από σύγκριση του DNA από τα πτύελα των ασθενών και το φλεβικό αίμα. Ως μικροδορυφορική αστάθεια (MIN) θεωρήθηκε η αλλαγή στην κινητικότητα του ενός ή και των δύο αλληλομόρφων ή ακόμη και η εμφάνιση νέου. Αυτό προέκυπτε και πάλι μετά από σύγκριση του DNA από τα πτύελα των ασθενών και το φλεβικό αίμα.

8.9 ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΕΙΚΟΝΑΣ- ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η σάρωση των πηκτωμάτων έγινε από την Agfa SnapScan 1212u (Agfa-Gevaert N.V., Belgium). Η φωτεινότητα [Integrated density (ID= (Mean OD-Background OD)* pixels; OD, optical density)] των ζωνών χρησιμοποιήθηκε ως ποσοτική παράμετρος και υπολογίστηκε με ψηφιακή απεικόνιση με το σύστημα Adobe Photoshop 6.0 software (Adobe Systems Inc., US). Η απώλεια της ετεροζυγωτίας υπολογίστηκε σε ετερόζυγη περίπτωση όταν η αναλογία

$$\frac{\text{ID allele1 (sputum DNA)} / \text{ID allele2 (sputum DNA)}}{\text{ID allele1 (blood DNA)} / \text{ID allele2 (blood DNA)}}$$

$$\text{ID allele1 (blood DNA)} / \text{ID allele2 (blood DNA)}$$

ήταν >1.49 ή <0.58 με ευαισθησία 99.5%. Η μικροδορυφορική αστάθεια (MIN) υπολογίστηκε όταν ένα νέο εμφανιζόμενο αλληλόμορφο παρατηρήθηκε στα πτύελα σε σχέση με το αίμα του ίδιου ασθενούς. Ανάλυση των LOH ή MIN θετικών περιπτώσεων έγινε τρεις φορές και τα αποτελέσματα ήταν επιτυχώς αναπαραγώγιμα.

Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με το SPSS στατιστικό λογισμικό (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέση \pm SD διακύμανση. Το χ^2 χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση των επί τοις εκατό ποσοστών. Διαφορές στις μέσες τιμές των ποσοτικών μετρήσεων ελέγχθηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία Student t-test και Mann-Whitney U. Στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν οι συσχετίσεις με μονοδύναμο επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$. Μοντέλα πολλαπλής γραμμικής ή λογαριθμικής αλληλοσυσχέτισης χρησιμοποιήθηκαν για τη συσχέτιση με τη βαρύτητα και τη διάρκεια της νόσου. Όλοι οι πίνακες επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα Excel Microsoft Office 2000.

8.10 ΕΤΑΙΡΙΕΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΥΛΙΚΩΝ

1,2-διδροξυ-αιθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιο-BDH
 Άγαρ-Difco
 Αγαρόζη-Gibco BRL
 Αιθανόλη-BDH
 Αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ-BDH
 Ακρυλαμίδιο-BDH
 Ανθρακικό νάτριο-Sigma
 Βορικό οξύ-BDH
 Βρωμιούχο αιθίδιο-Sigma
 Γλυκερόλη-Gibco BRL
 Διαιθυλ-πυροκαρβονικό οξύ-BDH
 ΔιθειοθριτόληSigma
 Διμεθυλσουλφοξείδιο-BDH
 Δεσοξυριβονουκλεοτίδια-Boehringer Mannheim
 Ένζυμα περιορισμού-New England Biolabs
 Θεικό αμμώνιο-BDH
 Ισοπροπανόλη-BDH
 Κιτρικό νάτριο-BDH
 Κυανό της βρωμοφαινόλης-Sigma
 Λυσοζύμη-Sigma
 Μεθανόλη-Fluka
 Μεμβράνες διαπίδυσης πόρων διαμέτρου 10mm-Sigma
 MOPS-Sigma
 Νιτρικός άργυρος-Sigma
 Οξεικό αμμώνιο- Sigma
 Οξεικό κάλιο -Sigma
 Οξεικό νάτριο- Sigma
 Οξεικό οξύ-BDH
 Πρωτεΐνάση K-Sigma
 Ριβονουκλεάση A-Sigma
 RNAzol B-China Biotex

SDS-Sigma
SuperScript II RT, Life Technologies
Ταq πολυμεράση-Gibco BRL
TEMED-Sigma
Tris base-BDH
Triton-X-100-Sigma
Trizol-Gibco BRL
Tween-20-Sigma
Υδροξείδιο του νατρίου-Sigma
Υδροχλωρικό οξύ-BDH
Υπερθεϊκό αμμώνιο-Gibco BRL
Υπεροξείδιο του υδρογόνου-BDH
Φαινόλη-BDH
Φορμαλδεύδη-BDH
Φορμαμίδιο-BDH
Χλωριούχο καίσιο-Sigma
Χλωριούχο κάλιο-Sigma
Χλωριούχο λίθιο-Sigma
Χλωριούχο μαγγάνιο-Sigma
Χλωριούχο μαγνήσιο-Sigma
Χλωριούχο νάτριο-Sigma
Χλωροφόρμιο-Fluka

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

9.1. ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΑΛΛΟΙΩΣΕΩΝ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΟΥ DNA ΣΤΗ ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ

Μελετήσαμε 38 ζεύγη πτύελα/φλεβικό αίμα από ασθενείς με πνευμονική σαρκοείδωση με συνολικά 40 μικροδορυφορικούς δείκτες. Η επίπτωση της αστάθειας για καθένα δείκτη κυμαινόταν μεταξύ 0% και 10%. (Πίνακας 12) και το ποσοστό της ετεροζυγωτίας μεταξύ 0.32 και 1.00 (Πίνακας 11). Δεκατρία (13) δείγματα ασθενών με πνευμονική σαρκοείδωση εμφάνισαν LOH (34.2%) σε ένα τουλάχιστον από τους εξεταζόμενους γενετικούς τόπους. Παρόλο που MIN παρατηρήθηκε σε πέντε περιπτώσεις (13.2%), κανείς από αυτούς δεν πληρούσε τα κριτήρια της συνύπαρξης MIN σε τουλάχιστον πέντε δείκτες ώστε να χαρακτηριστεί ως ψευδώς θετικός φαινότυπος αντιγραφής [replication error-positive phe-notype (RER+)] (310). Χαρακτηριστικά παραδείγματα φαίνονται στην εικόνα 7. Αναλυτική παρουσίαση των γονοτύπων δίνεται στον Πίνακα 11. LOH παρατηρείται συχνότερα στο D2S147 (10.0%), ακολουθούμενο από το D6S429 (9.4%), D6S263 (8.8%) και APOA2 (6.9%). Ομόζυγος γονότυπος δείκτη μικροδορυφορικού DNA θεωρείται μη πληροφοριακός για την LOH ανάλυση. Η κλασματική απώλεια αλληλομόρφου (FAL) υπολογίστηκε για κάθε δείγμα ως (θέση με LOH)/συνολική πληροφοριακή θέση (325). Το υψηλότερο ποσοστό FAL βρέθηκε σε μια γυναίκα 52 χρονών με σαρκοείδωση σταδίου II. Το μέσο ποσοστό FAL για τις LOH-θετικές περιπτώσεις ήταν 0.006. Τέσσερις από τις δώδεκα χρωμοσωμικές περιοχές που εμφάνιζαν LOH 1q21-q23, 2p22.3-p16.1, 3p21.3-p21.1 and 6p23-p25 βρίσκονταν στις περιοχές CD48, hMSH2, hMLH1 και IRF4 αντίστοιχα (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/>). Οι υποομάδες των ασθενών με σαρκοείδωση που ήταν είτε θετικές είτε αρνητικές για LOH συγκρίθηκαν. Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δε βρέθηκε μεταξύ των δύο υποομάδων σε σχέση με την ηλικία, το φύλο, το στάδιο, τη διάρκεια της νόσου, το κάπνισμα, τη θεραπεία με κορτικοειδή, τα αέρια αίματος και τις σπιρομετρικές μετρήσεις.

Πίνακας 11. Οι εκκινητές του μικροδορυφορικού DNA που μελετήθηκαν

Εκκινητής	Κυτογενετική περιοχή	Ετεροζυγωτία	Εύρος μεγέθους αλληλομόρφου	Αναγκαία συγκέντρωση εκκινητή στην πολλαπλή PCR (nM)	Ομάδα εκκινητών*
D1S416	1q24	0.82	146-162	130	H
D1S186	1p34.3	0.84	82-106	100	G
D1S116	1p31- p21 1q21-	0.65	89-101	100	F
APOA2	q23	0.70	131-145	150	F
D1S104	1q2-q23	0.76	152-168	150	G
D1S180	1q42 1q42-	0.90	163-189	150	H
ACTN2	q43 2p22.3-	0.50	105	120	H
D2S119	p16.1 2p22.3-	0.80	221	175	A
D2S123	p16.1 2p22.3-	0.76	196	140	A
D2S177	p16.1 2p22.3-	0.85	276	225	A
D2S147	p16.1 2p22.3-	0.73	111	80	A
D2S2182	p16.1 2p22.3-	0.78	234	180	C
D2S288	p16.1 2p22.3-	0.62	276-284	250	C
D2S2291	p16.1 2q24.1-	0.76	245	320	D
D2S138	q32.1 2q24.1-	0.67	115	100	B
D2S164	q32.1 2q24.1-	0.83	195	175	B
D2S103	q32.1	0.82	109-125	120	D

		2q24.1-				
D2S311	q32.1		0.81	185-207	150	D
		2q24.1-				
D2S105	q32.1		0.69	107-125	130	E
		3p21.32-				
D3S1611	p21.1		0.66	258	260	B
		3p21.32-				
D3S1612	p21.1		0.69	100	80	C
		3p21.32-				
D3S1478	p21.1		0.98	109-152	130	C
		3p21.32-				
D3S647	p21.1		0.73	100	90	D
		3p21.32-				
D3S1260	p21.1		0.66	268	230	E
		3p21.32-				
D3S1561	p21.1		0.65	226	180	E
		5q31.3-				
D5S207	q33.3		0.68	135-143	130	K
		5q32-				
D5S376	q33.1		0.72	117-129	100	I
D6S2225	6p21.3		0.38	152	140	J
		6p21.3-				
D6S1002	p22.1		0.32	240-244	200	K
		6p23-				
D6S429	p25		0.74	222-238	200	I
		6p23-				
D6S259	p25		0.73	267-285	260	K
		6pter,				
D6S263	6p23-p25		0.82	90-114	80	J
		7p15-				
D7S519	q22		0.81	256-268	230	F
D9S161	9p21		0.78	119-135	120	F
D9S270	9p21		0.71	87-101	100	H

D11S1876	11q21- q22.3	1.00	123-135	100	J
D14S72	14pter, 14q11.1-q11.2	0.83	257-271	200	J
D14S258	14q23- q24.3	0.80	170-182	160	I
D14S292	14qter, 14q32.1-q32.3	0.74	110-118	100	K
TP53	17p13.1	0.90	103-135	130	G

*Ομάδα εκκινητών της πολλαπλής αντίδρασης.

Πίνακας 12.Οι γονότυποι των περιπτώσεων που μελετήθηκαν

Αρτέριο ξ ασθενούς	Ηλικία	Οι Εκκνητές του Μικροδορυφορικού DNA																			FAL*	
		D1	D1	D1	AP	D1	D1	A	D2	D2	D2	D2	D2	D2	D2	D2	D2	D2	D2	D3		
		S416	S186	S116	OA2	S104	S180	CTN2	S119	S123	S177	S147	S2182	S288	S2291	S138	S164	S103	S311	S105	S1611	
	3	I	N	I		I							I	I								.00
	1		H	I		I		I							I	I	I					.00
	8		H		I	I		I	I		I								I			.00
	7		H			I								I		I						.03
	0		H	I				I		OH					I	I						.03
	5		H			I					I		I						I			.00
	4		H		I				I			OH				I					I	.03
	2		H			I		I		I			I							I		.00
	7		H					I			I	OH			I							.03
	2	I	N													I	I					.00
	0		H			I						I							I	I		.00
	5		H			I			I				I							I		.00
	3		H							I			I		I							.00
	1		H	I		I										I					I	.03
	3		H				I		I			I									I	.00
	2	I	N											I							I	.00
	2		H			I																.00
	4		H				I		I			I										.00
	7		H			I					I	I									I	.00
	7		H							I			I	I		I						.00
	7		H			I					I						I		I			.03
	2		H																			.00
	1		H			I							I			I					I	.00

5	H				I																I	.00	
0	H									I											I	.00	
3	H				I			I						I								I	.00
8	I				OH																I	.03	
9	H									I												I	.00
3	H				I			I														I	.00
4	H							I														I	.00
	0/26	/27	/21	/23	/23	/29	/19	/26	/25	/28	/23	/25	/22	/25	/22	/27	/28	/27	/22	/22			
				4.3)					4.0)	8.7)													

Σημείωση:FAL: Κλάσμα απώλειας αλληλομόρφου, NI:Μη πληροφοριακό,Η:ετεροζυγώτης,LOH:απώλεια ετεροζυγωτίας.

Πίνακας 12. (συνέχεια) Οι γονότυποι των περιπτώσεων που μελετήθηκαν

Αριθμός ασθενούς	Ηλικία	Οι Εκκνητές του Μικροδορυφορικού DNA																				FAL*
		D3	D3	D3	D3	D3	D5	D5	D6	D6	D6	D6	D6	D7	D9	D9	D1	D1	D1	D1	TP	
3		S1612									I											.00
1		S1478				I					I		I	I							I	.00
8		S647			I			I	I					I				I			I	.00
7	I			OH		I		I	I				I									.03
0					I		I				I					I			I			.03
5	I							I		I	I											.00
4				I				I	I												I	.03
2						I		I					I		I					I		.00
7	I					I		I	I							I						.03
0	2	I							I				I			I						.00

1	0			I				I	I	I											.00
2	5			I				I	I						I						.00
3	3								I								I				.00
4	1					I				OH	I										.03
5	3		I		I			I	I												.00
6	2			I				I	I	I			I								.00
7	2							I	I								I				.00
8	4					I			I				I								.00
9	7	I							I										I		.00
0	7		I	I				I	I	I					I						.00
1	7								I			OH	I								.03
2	2							I	I												.00
3	1	I			I		I				I			I					I		.00
4	5	I							I										I		.00
5	0		I		I				I	I					I						.00
6	3			I				I											I		.00
7	8					I			I		I										.03
8	9		I					I					I			I					.00
9	3				I				I												.00
0	4								I										I		.00

0/23

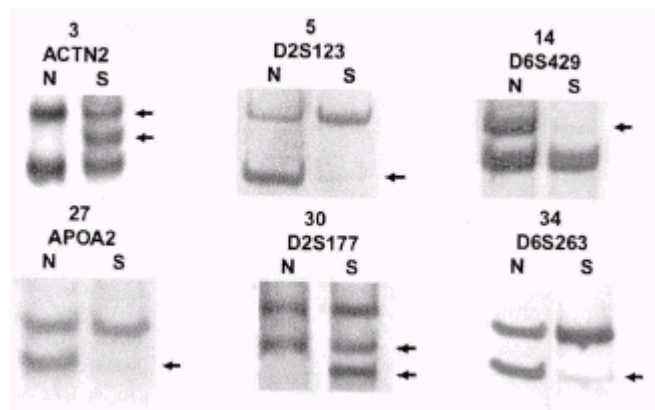
/30 /25 /23 /23 /25 /26 /14 /9 /25 /25 /27 /26 /26 /24 /30 /27 /25 /24 /30

4.0)

4.0)

3.7)

Εικόνα 7: Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα LOH και MIN. Τα βέλη δείχνουν το αλληλόμορφο με την ελαττωμένη φωτεινότητα. Οι αριθμοί δείχνουν το νούμερο του δείγματος. N φυσιολογικό DNA και S σαρκοειδικό DNA.



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

9.1 ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ

Η σαρκοείδωση χαρακτηρίζεται από κοκκιοματώδεις, καλά σχηματισμένες οζιδιακές φλεγμονώδεις περιοχές άγνωστης αιτιολογίας με συγκεντρωμένα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα(326). Κατά τη διάρκεια της συγκέντρωσης των μονοπύρηννων φλεγμονωδών κυττάρων στο όργανο-στόχος, μακροφάγα συσσωρεύονται και διαφοροποιούνται σε επιθηλιοειδή και πολυπύρηννα γιγάντια κύτταρα(MGC) ,ενώ άφθονα CD4 κύτταρα διασπείρονται μεταξύ των φλεγμονωδών κυττάρων(81). Η γενετική αστάθεια ,χαρακτηριστικό της ανθρώπινης νεοπλασίας έχει βρεθεί στην πνευμονική σαρκοείδωση(330), ενώ η σχέση της με τον καρκίνο του πνεύμονα παραμένει ασαφής(326-329). Ίσως υπάρχει αυξημένη πιθανότητα για λεμφώματα αλλά η συχνότητα δεν πρέπει να διαφέρει από αυτή που παρατηρείται σε άλλες χρόνιες παθήσεις , όπως τη ρευματοειδή αρθρίτιδα ή τη φλεγμονώδη νόσο του εντέρου.

Στην παρούσα διατριβή, χρησιμοποιήσαμε τη μικροδορυφορική ανάλυση του DNA με ισχυρά πολυμορφικούς παράγοντες για να καθορίσουμε τους υποψήφιους γενετικούς τόπους για την ανάπτυξη πνευμονικής σαρκοείδωσης. Η επιλογή των ύποπτων περιοχών για τη μελέτη της LOH και MIN βασίστηκε σε προηγούμενες σχετικές μελέτες που αφορούσαν τη σαρκοείδωση. Τα πειράματα έγιναν σε δείγματα πτυέλων. Αυτά δε φαίνεται να υστερούν σε ευαισθησία και ειδικότητα ως προς την ανίχνευση MIN και LOH σε σχέση με δείγματα από διαφορετικές θέσεις του τραχειοβρογχικού δέντρου. Και αυτό γιατί οι επιθηλιακές επιφάνειες κατά μήκος του τραχειοβρογχικού δέντρου αποτελούνται από ταχέως πολλαπλασιαζόμενους πληθυσμούς κυττάρων που αποβάλλονται απευθείας στα πτύελα. Οι πληθυσμοί αυτοί εμφανίζουν παρόμοιες γενετικές αλλοιώσεις.

Καμία ως τώρα μελέτη δεν υπάρχει σχετικά με τον αριθμό των γενετικών τόπων που πρέπει να αναλυθούν και το πόσοι από αυτούς πρέπει να εμφανίζουν αλλαγές έτσι ώστε να θεωρηθούν ως υψηλού βαθμού για MIN ή LOH. Παρόλα αυτά δεχόμαστε ότι ένα δείγμα είναι χαμηλού βαθμού για MIN ή LOH όταν εμφανίζει αστάθεια σε ένα γενετικό τόπο ενώ όταν η αστάθεια είναι σε περισσότερους τόπους τότε το δείγμα θεωρείται υψηλού βαθμού για MIN ή LOH (324). Πάντως MIN και

LOH είναι χρήσιμοι δείκτες για την ανίχνευση εκείνων των γενετικών αλλαγών που οδηγούν σε σαρκοείδωση.

Η συχνότητα της LOH ήταν 34.2% στους ασθενείς με σαρκοείδωση ,με ένα τουλάχιστον γενετικό τόπο επηρεασμένο. LOH θετικές περιπτώσεις παρατηρήθηκαν σε μικροδορυφορικούς DNA δείκτες που βρίσκονται κοντά στα γονίδια του επιδιορθωτικού συστήματος κακώς ζευγαρωμένων βάσεων DNA(mismatch repair genes-MMR)(hMSH2 και hMLH1) και σε λεμφο-δραστικούς ειδικούς παράγοντες(CD48 and IRF4). Η σταθερή εμφάνιση της γενετικής αστάθειας σε μικροδορυφορικούς δείκτες κοντά στα γονίδια του MMR σε ασθενείς με σαρκοείδωση υποδηλώνει πως το φαινόμενο μπορεί να συνδέεται άμεσα με την παθογένεια της νόσου.

Τα γονίδια hMSH2(human mutS homologue 2) και hMLH1(human mutS homologue 1) είναι μέρος του MMR συστήματος και σχετίζονται με την αύξηση της πιστότητας στην αντιγραφή του DNA.Το MMR σύστημα ανακαλύφθηκε στους προκαρυωτικούς οργανισμούς και πρόσφατα σχετίστηκε με τον καρκίνο(6). Στον άνθρωπο δύο διαφορετικά ετεροδιμερή συμπλέγματα των MutS-σχετικών πρωτεϊνών (hMSH2-hMSH3 και hMSH2-hMSH6) και άλλα δύο των MutL-σχετικών πρωτεϊνών (hMLH1-hPMS2 και hMLH1-hPMS1) θεωρούνται θεμελιώδη στο MMR(332,262). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι απαιτείται απενεργοποίηση και των δύο αντιγράφων του hMSH2 γονιδίου προκειμένου να εκφραστεί ο μεταλλαγμένος φαινότυπος αφού και ένα λειτουργικό γονίδιο έχει τέτοια ενζυμική δραστηριότητα ώστε να αποφευχθεί η αστάθεια της μικροδορυφορικής περιοχής.

Μεταλλάξεις στα hMSH2 και hMLH1 που εμπλέκονται στον κληρονομικό μη πολυποματώδη καρκίνο του εντέρου(HNPCC) παράγουν το φαινότυπο RER+ επειδή εμφανίζουν δομική βλάβη(310). Ογκοι RER+ δεν εμφανίζουν MMR δραστηριότητα σε βιοχημικές δοκιμασίες(325,331).MIN βρέθηκε στη γένεση νέων αλληλομόρφων σε 13.2% των περιπτώσεων μας. Κανένα από τα δείγματα μας δεν παρουσίασε ψευδώς θετικό φαινότυπο αντιγραφής(RER+) όπως φαίνεται από την συνύπαρξη MIN σε τουλάχιστον πέντε δείκτες, πιθανώς λόγω ασήμαντων αλλαγών στην MMR δραστηριότητα.

Το CD48 γονίδιο είναι μέρος της δραστηριοποίησης μιας γλυκοπρωτεΐνης της κυτταρικής επιφάνειας που εκφράζεται πρωτογενώς σε διεγερμένα λεμφοκύτταρα(274).Επιπλέον ο IRF4 είναι ένας ανθρώπινος παράγοντας ρυθμιστικός της ιντερφερόνης που εκφράζεται στον σπλήνα, στα λεμφοκύτταρα και στα

μελανοκύτταρα.(275).LOH σε αυτές τις δύο περιοχές μπορεί να παριστά σημαντικό βήμα στο σχηματισμό κοκκιώματος σε σχέση με τη μερικώς φλεγμονώδη φύση της σαρκοείδωσης.

Ωστόσο πρέπει να τονιστεί ότι γενετικές αλλοιώσεις του τύπου της LOH και MIN δεν απαντούν μόνο στη σαρκοείδωση αλλά και σε άλλες παθήσεις. Για παράδειγμα, γενετική αστάθεια έχει βρεθεί σε νευρολογικές, οφθαλμικές, καρδιακές παθήσεις αλλά και παθήσεις του ήπατος και του μαστού,στη χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια. Εκτός από τις παραπάνω καλοήθειες παθήσεις, LOH και MIN εμφανίζουν και οι όγκοι των περισσότερων οργάνων(269-291).

Σχετικά με το ρόλο του καπνίσματος, η μελέτη μας δεν έδειξε μεγαλύτερη συχνότητα LOH ή MIN στους καπνιστές από ότι στους μη και άρα το κάπνισμα δε σχετίζεται με τη γενετική αστάθεια στη σαρκοείδωση. Ωστόσο τα δεδομένα στη διεθνή βιβλιογραφία πάνω σε αυτό το θέμα είναι αντικρουόμενα(162-164,299).

Όσον αφορά στην κλινική εικόνα των ασθενών και τη βαρύτητα της νόσου ,υποομάδες ασθενών με σαρκοείδωση ,θετικών και αρνητικών για LOH συγκρίθηκαν. Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δε βρέθηκε μεταξύ των υποομάδων σχετικά με την ηλικία ,φύλο, στάδιο, διάρκεια νόσου και κάπνισμα, γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η γενετική αστάθεια είναι ανεξάρτητη της σοβαρότητας της πάθησης.

Η υπόθεση ότι η σαρκοείδωση συμβαίνει σε γενετικώς προδιατεθειμένα άτομα που δεν μπορούν να ελέγξουν τις φλεγμονώδεις, ανοσολογικές και ινωτικές διαδικασίες στον πνεύμονα μετά από έκθεση σε διάφορους παράγοντες στηρίζεται σε αξιόλογες μελέτες αλλά κανένας γενετικός παράγοντας δεν έχει πλήρως ταυτοποιηθεί(239-246). Φαίνεται πως η διαδικασία είναι πολυσύνθετη ,πολυεστιακή και η κληρονομικότητα μαζί με τους εξωγενείς παράγοντες καθορίζουν τη φαινοτυπική έκφραση της νόσου.

Συμπερασματικά ,τα δεδομένα μας συνηγορούν υπέρ της πολυπαραγοντικής φύσης της πνευμονικής σαρκοείδωσης ,στην οποία γενετικές ή επιγενετικές αλλαγές αλληλεπιδρούν με περιβαλλοντικούς παράγοντες για την εμφάνιση του φαινοτύπου της νόσου. Αποτυχία επιδιόρθωσης του DNA καθώς και αλλαγές σε λεμφο-ειδικούς παράγοντες μπορεί να συμβάλλουν στην παθογένεια της νόσου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1.Hamman L, Rich AR. Fulminant diffuse interstitial fibrosis of the lungs. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 1935; 51:154-63.
- 2.Fulmer JD: An introduction to the interstitial lung diseases. *Clin Chest Med* 1982; 3:457-473.
- 3.Fulmer JD: Interstitial lung diseases, in Stein JH(ed): *Internal Medicine* ed.3 Boston, Little Brown & Co,1990, pp675-683.
- 4.Coultas DB, Zumwald RI, Black WC, Sobonya RA. The epidemiology of interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150:967-972.
- 5.Poletti V, Kitaichi M. Facts and controversies in the classification of idiopathic interstitial pneumonias. *Sarcoidosis and Vasculitis and Diffuse Lung Diseases* 2000; 17:229-238.
- 6.Liebow AA. Definition and classification of interstitial pneumonias in human pathology. In : Basset F, Georges R, editors. *Progress in Respiration Research*. New York : karger, 1975: pp.1-33
- 7.Katzenstein AA, Myers J. Idiopathic pulmonary fibrosis. Clinical relevance of pathologic classification. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:1301-1315.
- 8.Crouch E. Pathobiology of pulmonary fibrosis. *Am J Physiol* 1990; 259: L159-L184
- 9.Dalavanga YA, Constantopoulos SH, Galanopoulou V ,Moutsopoulos HM. Alveolitis correlates with clinical pulmonary involvement in primary Sjogren's syndrome. *Chest* 1991;99:1394-7.
- 10.Dalavanga YA, Constantopoulos SH, Zerva LB, Trekli MM, Kotoulas OB and Moutsopoulos HM. Liquid phase characteristics of bronchoalveolar lavage in primary Sjogren's syndrome. *Chest* 1992; 102:1805-07.
11. Constantopoulos SH, Dalavanga YA, Sakellariou K, Goudevenos J and OB Kotoulas. Lymphocytic alveolitis and pleural calcifications in non-occupational asbestos exposure. Protection against neoplasia? *Am Rev Respir Dis* 1992; 146:1565-1570.
12. Galani V, Constantopoulos S, Manda-Stachouli C, Frangou-Lazaridis M, Mavridis A, Vassiliou M, Dalavanga Y. Additional proteins in BAL fluid of Metsovites environmentally exposed to asbestos: more evidence of "protection" against neoplasia? *Chest*. 2002 Jan;121(1):273-8.

13. Burkhardt A. Alveolitis and collapse in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 1989;140:513-524.
14. Kuhn III C, Boldt J, King TE, et al. An immunohistochemical study of architectural remodeling and connective tissue synthesis in pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 1989;140:1693-1703.
15. Myers JL, Veal CF Jr, Shin MS, et al. Respiratory bronchiolitis causing interstitial lung disease. A clinico-pathologic study of six cases. *Am Rev Respir Dis* 1987; 880-884
16. Raghu G, Mageto YN. Genetic predisposition of interstitial lung disease In: Schwartz M, King T, editors. *Interstitial lung disease*. Ontario, CA: Decker BC, 1998:pp.119-134.
17. Denison P, Al-Hillawi H, Turton C. Lung function in interstitial lung disease. *Sem Respir Med* 1984; 6:40-54.
18. Jackson LK, Fulmer JD. Structural functional features of the interstitial diseases, in Fishman AP(ed): *Pulmonary diseases and disorders*, New York, McGraw-Hill Book Co, 1988, Vol 1, pp 739-754.
19. Katzenstein A, Askin F. Surgical pathology of non neoplastic lung disease. *Major Prob Pathol* 1990;13:9-96.
20. Izumi T. Sarcoidosis in the 1990s: avenue for the future. *Respiration* 1990; 57:176-179.
21. Yamamoto M, Sharma OP, Hosoda Y. The 1991 descriptive definition of sarcoidosis. *Sarcoidosis* 1993; 9:33-34.
22. Scadding JG, Mitchell DN. *Sarcoidosis*, ed 2. London, Chapman & Hall, 1985, p 41.
23. Popper HH. Epithelioid cell granulomatosis of the lung: new insights and concepts. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 1999 ;16:32-46.
24. DeRemee RA. *Clinical Profiles of Diffuse Interstitial Pulmonary Disease*. Mount Kisco (NY): Futura, 1990
25. DeRemee RA. Sarcoidosis: current perspectives on diagnosis and treatment. *Postgrad Med* 1984; 76: 167-172
26. Newman LS, Rose CS, Maier LA. Sarcoidosis. *N.Engl J Med* 1997; 336 :1224-34.
27. Chesnutt AN. Enigmas in sarcoidosis. *West J med* 1995; 162:519-26.
28. Saboor SA, Johnson NmcI. Sarcoidosis. *Br J Hosp Med* 1992; 48 :293-302.
29. Honeybourne D. Ethnic differences in the clinical features of sarcoidosis in southeast London. *Br J Dis Chest* 1980 ;74:63-9.

30. Panageas S, Theodorakopoulos P, Bouras A, Constatopoulos S. Seasonal occurrence of sarcoidosis in Greece. *Lancet* 1991; 338:510-11.
31. Bardinas F, Morera J, Fite E, Plasencia A. Seasonal clustering of sarcoidosis. *Lancet* 1989; 2:455-56.
30. Hosoda Y, Hiraga Y, Odaka M, et al. A cooperative study of sarcoidosis in Asia and Africa: analytic epidemiology. *Ann N Y Acad Sci* 1976; 278:355-67.
33. Edmonstone WM. Sarcoidosis in nurses: is there an association? *Thorax* 1998; 43:342-43.
34. Hennessy TW, Ballard DJ, Deremee RA, Chu CP, Melton LJ. The influence of diagnostic access bias on the epidemiology of sarcoidosis: a population-based study in Rochester, Minnesota, 1935-1984. *J Clin Epidemiol* 1988 ; 41 : 567-70.
35. Sartwell PE, Edwards LB. Epidemiology of sarcoidosis in the U.S. Navy. *Am J Epidemiol*. 1974. Apr;99(4):250-7.
36. Sarcoidosis among US Navy enlisted men, 1965-1993. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1997; 46:539-43.
38. Kern DG, Neill MA, Wrenn DS, Varone JC. Investigation of a unique time-space cluster of sarcoidosis in firefighters. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148:974-80.
38. Prezant DJ, Dhala A, Goldstein A, et al. The incidence, prevalence, and severity of sarcoidosis in New York City firefighters. *Chest* 1999; 116:1183-93.
39. Neville E, Walker AN, James DG. Prognostic factors predicting the outcome of sarcoidosis. An analysis of 818 patients. *Q J Med* 1983 ;208: 525-33.
40. Vokurka M, Lecossier D, duBois RM, et al. Absence of DNA from mycobacteria of the *M.tuberculosis* complex in sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997 ;156 :100-23.
41. Saboor SA, Johnson NmCI, McFadden J. Detection of mycobacterial DNA in sarcoidosis and tuberculosis with polymerase chain reaction. *Lancet* 1992; 339:1012-5.
42. Mitchell IC, Turke JL, Mitchell DN. Detection of mycobacterial RNA in sarcoidosis with liquid-phase hybridization. *Lancet* 1992 ;339:1015-7.
43. Bocart D, Lecossier D, De Lassence A, et al. A search for mycobacterial DNA in granulomatous tissues from patients with sarcoidosis using polymerase chain reaction. *Am Rev Respir Dis* 1993; 145:1142-8.
44. Hance AJ. The role of mycobacteria in the pathogenesis of sarcoidosis. *Semin Respir Infect* 1998; 13:197-205.

45. McGrath DS, Goh N, Foley PJ, duBois RM. Sarcoidosis genes and microbes: soil or seed. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2001;18:149-64.
46. Eishi Y, Miyamae C, Ando N, et al: Seeking a causative agent of sarcoidosis: a monoclonal antibody prepared by the immunization with a crude tissue suspension of sarcoidosis lymph nodes. *Sarcoidosis* 1994; 11:265-268.
47. Grunewald J, Olerup O, Persson U, et al. T-cell receptor variable region gene usage by CD4+ and CD8+ T cells in bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood of sarcoidosis patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:4965-69.
48. Joyce-Brady M: Tastes great, less filling, the debate about mycobacteria and sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis* 1993; 145:986-987.
49. Konig G, Baur X, Fruhmann G. Sarcoidosis or extrinsic allergic alveolitis? *Respiration* 1981; 42:150-4
50. Farber HW, Fairman RP, Glauser FL. Talc granulomatosis: laboratory findings similar to sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis* 1982; 125: 258-61.
52. Fayemi AO, Ali M. Sarcoid-like granulomas in secondary oxalosis-a case report. *Mt Sinai J Med* 1980; 47:255-7.
52. Kriebel D, Brain JD, Sprince NL, et al. The pulmonary toxicity of beryllium. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137:464-473.
53. ATS Statement on sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160: 736-755.
54. Thomas PD, Hunninghake GW: Current concepts of the pathogenesis of sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135:747-60.
55. Deheinzeln D, Carvalho CRRd, Tomazini ME, et al: Association of Sjogren's syndrome, report of a case. *Sarcoidosis* 1998; 5:68-70.
56. Kucera RF. A possible association of rheumatoid arthritis and sarcoidosis. *Chest* 1989; 95:604-606.
57. Andonopoulos AP, Papathanasopoulos PG, karatza C, et al. Sarcoidosis in a patient with myasthenia gravis. Case report and review of the literature. *Clin Rheumatol* 1991; 10:323-325.
58. Augustin A, Kubo RT, Sim GK. Resident pulmonary lymphocytes expressing the gamma/delta T cell receptor. *Nature* 1989; 340:239-241.
59. Tamura N, Holroyd KJ, Banks T, et al. Diversity in junctional sequences associated with the common human V gamma 9 and V delta 2 gene segments in

normal blood and lung compared with the limited diversity in a granulomatous disease. *J Exp Med* 1990; 172:169-181.

60. Forrester JM, Newman LS, Wang Y, et al. Clonal expansion of lung V delta 1+ T cells in pulmonary sarcoidosis. *J Clin Invest* 1993; 91:292-300.

61. Chase MW. Delayed-type hypersensitivity and the immunology of Hodgkin 's disease, with a parallel examination of sarcoidosis. *Cancer Res* 1966; 26:1097-1120.

62. Shigehara K, Shijubo N, Ohmichi M, et al. IL12 and IL18 are increased and stimulate IFN-gamma production in sarcoid lungs. *J Immunol* 2001; 166:642-49.

63. Baumer I, Zissel G, Schlaak M, Muller-Quernheim J. Th1/Th2 cell distribution in pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 16:171-77.

64. Moller DR. Cells and cytokines involved in the pathogenesis of sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 1999 ;16:24-31.

65. Roman J. Extracellular matrices in the pathogenesis of injury and repair, in Scharz M, King T (eds): *Interstitial Lung Disease*. London ,U.K, B.C., Decker, 1998; pp. 207-227.

66. Roman J, Yeon YJ, Gal A, et al. Distribution of extracellular matrices, matrix receptors, and transforming growth factor beta 1 in human and experimental lung granulomatous inflammation. *Am J Med Sci* 1995; 309:124-133.

67. Perez RL, Roman J. Fibrin enhances the expression of interleukin-1a by human peripheral blood mononuclear cells. Implications in pulmonary inflammation .*J Immunol* 1995;154:1879-1887.

68. Nagase H, Woessner J: Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274:21491-21494

69. Galis ZS, Johnson C, Godin D, et al. Targeted disruption of the matrix metalloproteinase-9 gene impairs smooth muscle cell migration and geometrical arterial remodeling. *Circ Res* 2002; 91 :852-859.

70. John M, Oltmanns U, Fietze I, et al. Increased production of matrix metalloproteinase-2 in alveolar macrophages and regulation by interleukin-10 in patients with acute pulmonary sarcoidosis. *Exp Lung Disease Res* 2000; 28:55-68.

71. Fireman E, Kraiem Z, Sade O, et al. Induced sputum-retrieved matrix metalloproteinase 9 and tissue metalloproteinase inhibitor 1 in granulomatous diseases. *Clin Exp Immunol* 2002; 130:331-337.

72. Ward K, O' Connor CM, Odlum C, et al: Pulmonary disease progress in sarcoid patients with and without bronchoalveolar lavage collagenase. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142:636-641.

73. Moller DR, Forman JD, Liu MC, et al. Enhanced expression of IL 12 associated with Th1 cytokine profiles in active pulmonary sarcoidosis. *J Immunol* 1996; 156:4952-60.

74. Ziegenhagen MW, Benner UK, Zissel G, Schlaak M., Muller-Quernheim J. Sarcoidosis: TNF-alpha release from alveolar macrophages and serum level of sIL 2R are prognostic markers. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:1586-92.

75. Baughman RP, Keeton D, Lower EE. Relationship between interleukin-8 and neutrophils in the BAL fluid of sarcoidosis. *Sarcoidosis* 1994;11 :S217-20.

76. Baughman RP, Strohofer SA, Bushbaum J, Lower EE. Release of tumour necrosis factor by alveolar macrophages of patients with sarcoidosis. *J Lab Clin Med* 1990; 115:36-42.

77. Hunninghake GW, Kawanami O, Ferrans VJ, et al. Characterization of the inflammatory and immune effector cells in the lung parenchyma of patients with interstitial lung disease. *Am Rev Respir Dis* 1981; 123:407-12.

78. Spiteri MA, Clarke SW, Poulter LW. Phenotypic and functional changes in alveolar macrophages contribute to the pathogenesis of pulmonary sarcoidosis. *Eur Respir J* 1989 ;74:359-64.

79. Spiteri MA, Clarke SW, Poulter LW. Alveolar macrophages that suppress T-cell responsiveness may be crucial to the pathogenic outcome of pulmonary sarcoidosis. *Eur Respir J* 1992; 5:394-403

80. Paradis IL, Dauber JH, Ravin BS. Lymphocyte phenotypes in bronchoalveolar lavage and lung tissue in sarcoidosis and idiopathic pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133 :858-60.

81. Hunninghake GW, Crystal RG. Pulmonary sarcoidosis-a disorder mediated by excess helper T-lymphocyte activity at sites of disease activity. *N Engl J med* 1981;305: 429-34.

82. Daly PA, O'Brain DS, Robinson I, Guckian M, Prichard JS. Hodgkin's disease with a granulomatous pulmonary presentation mimicking sarcoidosis. *Thorax* 1988; 43:407-09.

83. Lower EE, Hawkins HH, Baughman RP. Breast disease in sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2001;18 :301-05.

84. Hunninghake GW, Costabel U, Ando M, et al. ATS/ERS/WASOG statement on sarcoidosis. American Thoracic Society/ European Respiratory Society/World Association of Sarcoidosis and other Granulomatous Disorders. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 1999 ;16:149-73.
85. Consensus conference: activity of sarcoidosis. *Eur Respir J* 1994; 7:624-7
86. Schonfeld SA, Johns CJ. Sarcoidosis In: Recent advances in respiratory medicine. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1986; 109-30.
87. Baughman RP, Teirstein AS, Judson MA, et al. Clinical characteristics of patients in a case control study of sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:1885-89.
88. Dereme RA. The roentorographic staging of sarcoidosis: historic and contemporary perspective. *Chest* 1983; 83:128-32.
89. Panel of the world association of sarcoidosis and other granulomatous diseases, Consensus conference: activity of sarcoidosis. *Eur Respir J* 1994;7: 624-7.
90. Tazi A, Desfemmes-Baleyte T, Soler P, et al. Pulmonary sarcoidosis with diffuse ground pattern on the chest radiograph. *Thorax* 1994; 49:793-7.
91. Brincker H, Wilbek E. The incidence of malignant tumours in patients with respiratory sarcoidosis. *Br J Cancer* 1974; 29:247-51.
92. Mellekjaer, L., V. Andersen, M. S. Linet, G. Gridley, R. Hoover, and J. H. Olsen. Non-Hodgkin's lymphoma and other cancers among a cohort of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997; 40:761-768.
93. Holmes, G. K., P. L. Stokes, T. M. Sorahan, P. Prior, J. A. Waterhouse, and W. T. Cooke. Coeliac disease, gluten-free diet, and malignancy. *Gut.* 1976; 17:612-619.
94. Baecklund, E., A. Ekbom, P. Sparen, N. Feltelius, and L. Klareskog. Disease activity and risk of lymphoma in patients with rheumatoid arthritis: nested case-control study. *B.M.J.* 1998; 317:180-181.
95. La Vecchia, C., E. Negri, and S. Franceschi. Medical history and the risk of non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1992; 1:533-536.
96. Ekbom, A., C. Helmick, M. Zack, and H. O. Adami. Ulcerative colitis and colorectal cancer: a population-based study. *N. Engl. J. Med.* 1990; 323:1228-1233.
97. Ekbom, A., C. Helmick, M. Zack, and H. O. Adami. Increased risk of large-bowel cancer in Crohn's disease with colonic involvement. *Lancet* 1990; 336:357-359.

98. Brincker H. The sarcoidosis-lymphoma syndrome. *Br J Cancer* .1986; 54:467–73.
99. Brincker H. Interpretation of granulomatous lesions in malignancy. *Acta Oncol* .1992; 31:85–9.
100. Badr AI, Sharma OP. Ki-1 anaplastic large cell lymphoma: another masquerader of sarcoidosis. A case report. *Sarcoidosis* 1993; 10:62–5.
101. Boulier I, Cohen J, Kerdel FA. Cutaneous large-cell lymphoma histologically resembling sarcoidosis. *J Am Acad Dermatol*. 1993 ; 28:327–30.
102. Soyer P, Gottlieb L, Bluemke DA, Fishman E. Sarcoidosis of the pancreas mimicking pancreatic cancer: CT features. Is an excess risk of lung cancer in these patients *Eur J Radiol* .1994 ; 19:32–3.
103. Fazzi P, Solfanelli S, Morelli G, Orsitto E, Pieri L, Petrini M, et al. Sarcoidosis: single bulky mesenteric lymph node mimicking a lymphoma. *Sarcoidosis* 1995; 12:75–7.
104. Reich JM, Mullooly JP, Johnson RE. Linkage analysis of malignancy-associated sarcoidosis. *Chest* .1995;107:605.
105. Reich JM. Sarcoidosis and agnogenic myeloid metaplasia. *J Intern Med*.1994;235:175–8.
106. Harada H, Shijubo N, Katoh S, Satoh M, Abe S. Malignant T cell lymphoma associated with sarcoidosis. *Sarcoidosis* .1994; 11:132–4.
107. Sugio K, Inoue T, Yokoyama H, Ishida T, Nakano S, Sugimachi K. Sarcoid reactions in regional lymph nodes of primary lung cancer. *Respiration* .1993; 60:133–6.
108. Hulshof MM. Ulcerating cutaneous sarcoidosis and non Hodgkin's lymphoma. *Br J Dermatol* .1993; 129:343–4.
109. Masuda R, Toyoshima H, Bandou T, Isoyama T, Matsui Y, Takemura T. Malignant lymphoma of the stomach possible to use rates for Copenhagen only in associated with systemic sarcoidosis. *Cancer* .1992; 70:2592–6.
110. Prendiville J, Robinson A, Young M. Familial sarcoidosis. *Indian J Med Sci* 1982; 151:258-60.
111. Priestly S, Delaney JC. Familial sarcoidosis presenting with stridor. *Thorax* 1981; 36:636-7.
112. Rybicki BA, Kirkey KL, Major M, et al. Familial risk ratio of sarcoidosis in African-American sibs and parents. *Am J Epidemiol* .2001;153:188-93.

113. McGrath DS, Daniil Z, Foley P, et al. Epidemiology of familial sarcoidosis in the UK. *Thorax* 2000; 55:751-54.
114. Rybicki BA, Ianuzzi MC, Frederick MM, et al. Familial aggregation of sarcoidosis: a case-control etiologic study of sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:2085-91.
115. Schurmann M, Lympany PA, Reichel P, et al. Familial sarcoidosis is linked to the major histocompatibility complex region. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162:861-64.
116. Ina Y, Takada K, Yamamoto M, et al. HLA and sarcoidosis in the Japanese. *Chest* 1989; 95:1257-61.
117. Lenhart K, Kolek V, Bartova A. HLA antigens associated with sarcoidosis. *Dis Markers*. 1990; 8:23-9.
118. Kunikane H, Abe S, Yamaguchi E, et al. Analysis of restriction fragment length polymorphism for the HLA-DR gene in Japanese patients with sarcoidosis. *Thorax* 1994; 49:573-76.
119. Swider C, Schnittger L, Bogunia KK, et al. TNF-alpha and HLA-DR genotyping as potential prognostic markers in pulmonary sarcoidosis. *Eur Cytokine Netw*. 1999;10:143-46.
120. Berlin M, Fogdell HA, Olerup O, Eklund A, Grunewald J. HLA-DR predicts the prognosis in Scandinavian patients with pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997; 156:1601-05.
121. Martinetti M, Tinelli C, Kolek V, et al. The sarcoidosis map. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995; 152:557-64.
122. Foley PJ, McGrath DS, Petrek M, et al. HLA-DRB1 position 11 residues are a common protective marker for sarcoidosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001;25:272-77.
123. Maliarik MJ, Chen KM, Major ML, et al. Analysis of HLA-DPB1 polymorphisms in African-Americans with sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998; 158:111-14.
124. Odum N, Milman N, Jakobsen BK, et al. HLA class II (DR, DQ, DP) in patients with sarcoidosis: evidence of an increased frequency of DRW6. *Exp Clin Immunogenet*. 1991;8:227-232.

125. Finco O, Martinetti M, Dondi E, et al. Sarcoidosis and major histocompatibility complex genes with special emphasis on BF F subtypes. *Complement Inflamm.* 1991; 8:80-85.
126. Guyatt GH, Bensen WG, Stolman LP, et al. HLA-B8 and erythema nodosum. *Can Med Assoc J.* 1982; 127:1005-6.
127. Maliarik M, Kost J, Harrington D, et al. Linkage analysis of major histocompatibility genes in familial sarcoidosis. *Sarcoidosis* 1994 ;11:236-239.
128. Grutters JC, Sato H, Pantelidis P, et al. Increased frequency of the uncommon tumor necrosis factor 857T allele in British and Dutch patients with sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002 ; 165:1119-24.
129. Ishihara M, Ohno S, Ishida T, et al. Genetic polymorphisms of the TNFB and HSP70 genes located in the human major histocompatibility complex in sarcoidosis. *Tissue Antigens.* 1995; 46:59-62.
130. Somoskovi A, Zissel G, Seitzer U, et al. Polymorphisms at position-308 in the promoter region of the TNF-alpha and in the first intron of the TNF-beta genes and spontaneous and lipopolysaccharide-induced TNF-alpha release in sarcoidosis. *Cytokine.* 1999;11:882-87.
131. Takashige N, Naruse TK, Matsumori A, et al. Genetic polymorphisms at the tumor necrosis factor loci (TNFA and TNFB) in cardiac sarcoidosis. *Tissue Antigens* 1999;54:191-93.
132. Yamagushi E, Itoh A, Hizawa N, kawakami Y. The gene polymorphism of tumour necrosis factor-beta, but not of tumour necrosis factor-alpha, is associated with the prognosis of sarcoidosis. *Chest* 2001;119:753-61.
133. McGrath DS, Foley PJ, Petrek M, et al. ACE gene I/D polymorphism and sarcoidosis pulmonary disease severity. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:197-201.
134. Schurmann M, Reichel P, Muller-Myhsok B, et al. Angiotensin-converting enzyme (ACE) gene polymorphism and familial occurrence of sarcoidosis. *J Intern Med.* 2001;249:77-83.
135. Tomita H, Ina Y, Sugiura Y, et al. Polymorphism in the angiotensin-converting enzyme (ACE) gene and sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;156:255-259.
136. Huang CT, Heurich AE, Sutton AL, Lyons HA. Mortality in sarcoidosis: a changing pattern of the cause of death. *Eur J Respir Dis.* 1981;62:231-8.

137. Bascom R., Johns CJ: Natural history and management of sarcoidosis. *Adv Intern Med.* 1986; 31: 213-241.
138. Izumi T: Sarcoidosis in Kyoto (1963-1986). *Sarcoidosis* .1988;5:142-146.
139. Katzenstein AL and Myers JL. Idiopathic pulmonary fibrosis. Clinical relevance of pathologic classification. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:1301-1315.
140. Schwartz DA. Epidemiology, morbidity, mortality, and familial distribution of idiopathic pulmonary fibrosis. In: TE. King (Ed): *New approaches to managing idiopathic pulmonary fibrosis*, Published by ATS, September 2000; pp.1-7
142. Ryu JH, Colby TV, Hartman TE. Idiopathic pulmonary fibrosis: current concepts. *Mayo Clin Proc.* 1998;73:1085-101.
143. Nagai S, Kitaichi M, Izumi T. Classification and recent advances in idiopathic interstitial pneumonia. *Curr opin Pulm Med.* 1998; 4:256-60.
144. Iwai K., T.Mori, Yamada N, Yamaguchi M, and Hosoda Y. Idiopathic pulmonary fibrosis: epidemiologic approaches to occupational exposure. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994 ; 150:670-75.
145. Scott J., Johnston I., Britton J., What causes cryptogenic fibrosing alveolitis? A case-control study of environmental exposure to dust, *BMJ.* 1990 ;301: 1015-1017
146. Hubbard, R., S. Lewis, K. Richards, I. Johnston, and J. Britton. Occupational exposure to metal or wood dust and aetiology of cryptogenic fibrosing alveolitis. *Lancet* 1996; 347:284–289.
147. Johnston, I. D. A., R. J. Prescott, J. C. Chalmers, R. M. Rudd, and for the Fibrosing Alveolitis Subcommittee of the Research Committee of the British Thoracic Society. British Thoracic Society study of cryptogenic fibrosing alveolitis: current presentation and initial management. *Thorax.* 1997;52:38–44.
148. Rudd, R. M., P. L. Haslam, and M. Turner-Warwick. Cryptogenic fibrosing alveolitis relationships of pulmonary physiology and bronchoalveolar lavage to treatment and prognosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1981;124:1–8.
149. Winterbauer, R. H., S. P. Hammar, K. O. Hallman, J. E. Hays, N. E. Pardee, E. H. Morgan, J. D. Allen, K. D. Moores, W. Bush, and J. H. Walker. Diffuse interstitial pneumonitis Clinicopathologic correlations in 20 patients treated with prednizone/azathioprine. *Am. J. Med.* 1978;65:661–672.

150. Watters, L. C., M. I. Schwarz, R. M. Cherniack, J. A. Waldron, T. L. Dunn, R. E. Stanford, and T. E. King, Jr. Idiopathic pulmonary fibrosis: pretreatment bronchoalveolar lavage cellular constituents and their relationships with lung histopathology and clinical response to therapy. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1987;135:696–704.
151. Turner-Warwick, M., B. Burrows, and A. Johnson. Cryptogenic fibrosing alveolitis: clinical features and their influence on survival. *Thorax* .1980;35:171–180.
152. Carrington, C. B., E. A. Gaensler, R. E. Coutu, M. X. Fitzgerald, and R. G. Gupta. Natural history and treated course of usual and desquamative interstitial pneumonia. *N. Engl. J. Med.* 1978;298:801–809.
153. Mannino, D. M., R. A. Etzel, and R. G. Parrish. Pulmonary fibrosis deaths in the United States, 1979–1991: an analysis of multiple cause mortality data. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996;153:1548–1552.
154. B. J. Fan, L. L., C. A. Kozinetz, H. A. Wojtczak, B. A. Chatfield, A. H. Cohen, and S. S. Rothenberg. Diagnostic value of transbronchial, thoracoscopic, and open lung biopsy in immunocompetent children with chronic interstitial lung disease. *J. Pediatr.* 1997;131:565–569.
155. Fan, L. L., and C. A. Kozinetz. Factors influencing survival in children with chronic interstitial lung disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997;156:939–942.
156. Coultas, D. B. Epidemiology of idiopathic pulmonary fibrosis. *Semin. Respir. Med.* 1993; 14:181–196.
157. Michaelson JE, Aguayo SM and Boman J. Idiopathic pulmonary fibrosis. A practical approach for diagnosis and management. *Chest* .2000;118:788-794.
158. Bjoraker JA, Ryu JH, Edwin MK, Myers JL, Tazelaar HD, Schroeder DR, Offord KP. Prognostic significance of histopathologic subsets in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998 Jan;157(1):199-203.
159. Johnston, I., J. Britton, W. Kinnear, and R. Logan. Rising mortality from cryptogenic fibrosing alveolitis. *Br. Med. J.* 1990; 301:1017–1021.
160. Baumgartner KB, Samer JM, Coultas DB, et al. Occupational and environmental risk factors for idiopathic pulmonary fibrosis: a multicenter case-control study. *Am J Epidemiol.* 2000;152:307-15.

161. Mullen J, Hodgson MJ, DeGraff CA, Godar T. Case-control study of idiopathic pulmonary fibrosis and environmental exposures. *J Occup Environ Med.* 1998; 40:363-7.
162. Hanley ME, King TE Jr, Schwartz MI, Watters LC, Shen AS, Cherniak RM. The impact of smoking on mechanical properties of the lungs in idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis.* 1991 ;144:1102-6.
163. Schwartz DA, Merchant RK, Helmers RA , Gilbert SR, Dayton CS, Hunninghake GW. The influence of cigarette smoking on lung function in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis.* 1991;144:504-6.
164. Schwartz DA, Helmers RA, Dayton CS, Merchant RK, Hunninghake GW. Determinants of bronchoalveolar lavage cellularity in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Appl Physiol.* 1991;71: 1688-93.
165. Turner-Warwick M. In search of a cause of cryptogenic fibrosing alveolitis(CFA):one initiating factor or many? *Thorax* 1998;53:Suppl 2:3-9.
166. Ferri C, La Civita L, Fazzi P, et al. Interstitial lung fibrosis and rheumatic disorders in patients with hepatitis C virus infection. *Br J Rheumatol.* 1997; 36:360-5.
167. Panos RJ, King TE Jr: Idiopathic pulmonary fibrosis, in Lynch JP III, DeRemee RA (eds): *Immunologically Mediated Pulmonary Diseases.* Boston, JP Lippincott, 1991, pp 1-39.
168. Billings, C. G., and P. Howard. Hypothesis: exposure to solvents may cause fibrosing alveolitis. *Eur. Respir.J.* 1994 ;7:1172–1176.
169. Marsh. P., I. Johnston, and J. Britton. Atopy as a risk factor for cryptogenic fibrosing alveolitis. *Respir. Med.* 1994; 88:369–371.
170. Baumgartner, K. B., J. Samet, C. A. Stidley, T. V. Colby, J. A. Waldron, and the Collaborating Centers. Cigarette smoking: a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997; 155:242–248.
171. Hubbard, R., A. Venn, C. Smith, M. Cooper, I. Johnston, and J. Britton. Exposure to commonly prescribed drugs and the etiology of cryptogenic fibrosing alveolitis: a case-control study. *Am. J. Respir.Crit. Care Med.* 1998;157:743–747.

172. Tobin RW, Pope CE 2nd, Pellegrini CA, Emond MJ, Sillery J, Raghu G. Increased prevalence of gastroesophageal reflux in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Dec;158(6):1804-8.
173. Jakab, G. J. Sequential virus infections, bacterial superinfections, and fibrogenesis. *Am. Rev. Respir. Dis*. 1990;142:374–379.
174. Vergnon, J. M., M. Vincent, G. DeThe, J. F. Mornex, P. Weynants, and J. Brune. Cryptogenic fibrosing alveolitis and Epstein–Barr virus: an association? *Lancet* .1984;2:768–771.
175. Egan, J. J., J. P. Stewart, P. S. Hasleton, J. R. Arrand, K. B. Carroll, and A. A. Woodcock. Epstein–Barr virus replication within pulmonary epithelial cells in cryptogenic fibrosing alveolitis. *Thorax* .1995;50:1234–34.
176. Egan, J. J., A. A. Woodcock, and J. P. Stewart. Viruses and idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. J*. 1997 ;10:1433–1437.
177. Watanabe, A., K. Nishi, T. Ohka, H. Sugiura, and M. Kitagawa. A case of Epstein–Barr virus infection with interstitial pneumonitis. *Jpn. J. Thorac. Dis*.1987; 25:794–798.
178. Pinsker, K. L., B. Schneyer, N. Becker, and S. L. Kamholz. Usual interstitial pneumonia following Texas A2 influenza infection. *Chest*. 1981;80:123–126.
179. Luria, D. B., J. L. Blumenfeld, and J. T. Ellis. Studies on influenza in the pandemic of 1957–1958: II. Pulmonary complications of influenza. *J. Clin. Invest*.1959; 38:213–265.
180. Winterbauer, R. H., W. R. Ludwig, and S. P. Hammar. Clinical course, management, and long-term sequelae of respiratory failure due to influenza viral pneumonia. *Johns Hopkins Med. J*.1977; 141:148–155.
181. Jakab, G. J., and D. J. Bassett. Influenza virus infection, ozone exposure, and fibrogenesis. *Am. Rev. Respir. Dis*.1990; 141:1307–1315.
182. Jiwa, M., R. D. Steenbergen, F. E. Zwaan, P. M. Kluin, A. K. Raap, and M. van der Ploeg. Three sensitive methods for the detection of cytomegalovirus in lung tissue of patients with interstitial pneumonitis. *Am. J. Clin. Pathol*. 1990;93:491–494.
183. Irving, W. L., S. Day, and I. D. A. Johnston. Idiopathic pulmonary fibrosis and hepatitis C virus infection. *Am. Rev. Respir. Dis*. 1993;148:1683–1684.

184. Ueda, T., K. Ohta, N. Suzuki, M. Yamaguchi, K. Hirai, T. Horiuchi, J. Watanabe, T. Miyamoto, and K. Ito. Idiopathic pulmonary fibrosis and high prevalence of serum antibodies to hepatitis C virus. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1992;146:266–268.
185. Meliconi, R., P. Andreone, L. Fasano, S. Galli, A. Pacilli, R. Miniero, M. Fabbri, L. Solforosi, and M. Bernardi. Incidence of hepatitis C virus infection in Italian patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* 1996; 51:315–317.
186. Hartelius, H., J. Gaub, L. Ingemann Jensen, J. Jensen, and V. Faber. Computed tomography of the lungs in acquired immunodeficiency syndrome: an early indicator of interstitial pneumonia. *Acta Radiol.* 1988; 29:641–644.
187. Siegel, C., S. Johnston, and S. Adair. Isolation of measles virus in primary rhesus monkey cells from a child with acute interstitial pneumonia who cytologically had giant-cell pneumonia without a rash. *Am. J. Clin. Pathol.* 1990; 94:464–469.
188. Weintrub, P. S., W. M. Sullender, C. Lombard, M. P. Link, and A. Arvin. Giant cell pneumonia caused by parainfluenza type 3 in a patient with acute myelomonocytic leukemia. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1987; 111:569–570.
189. Carrigan, D. R., W. R. Drobyski, S. K. Russler, M. A. Tapper, K. K. Knox, and R. C. Ash. Interstitial pneumonitis associated with human herpesvirus-6 infection after marrow transplantation. *Lancet.* 1991; 338:147–149.
190. Kaufman, J. M., C. A. Cuvelier, and M. van der Straeten. Mycoplasma pneumonia with fulminant evolution into diffuse interstitial fibrosis. *Thorax* 1980; 35:140–144.
191. Chastre, J., G. Raghu, P. Soler, P. Brun, F. Basset, and C. Gibert. Pulmonary fibrosis following pneumonia due to acute legionnaires' disease: clinical, ultrastructural, and immunofluorescent study. *Chest* 1987;91:57–62.
192. Furuie H, Yamasaki H, Suga M, Ando M. Altered accessory cell function of alveolar macrophages :a possible mechanism for induction of Th2 secretory profile in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* .1997;10:787-94.
193. Hancock A, Armstrong L, Gama R, Millar A. Production of interleukin 13 by alveolar macrophages from normal and fibrotic lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998;18:60-5.

194. Kunkel SL, Lukacs NW, Strieter RM, Chensue SW. Th1 and Th2 responses regulate experimental lung granuloma development. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 1996; 13:120-8.
195. Martinez JA, King TE Jr, Brown K, et al. Increased expression of the interleukin-10 gene by alveolar macrophages in interstitial lung disease. *Am J Physiol.* 1997; 273 :676-683.
196. Romagnani S. Th1/Th2 cells. *Inflamm Bowel Dis.* 1999; 5: 285-94.
197. Kasper M, Haroske G. Alterations in the alveolar epithelium after injury leading to pulmonary fibrosis. *Histol Histopathol.* 1996; 11:463-83.
198. Broekelmann TJ, Limper AH, Colby TV, McDonald JA. Transforming growth factor beta 1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis. *Proc natl Acad Sci USA.* 1991; 88:6642-6.
199. Allen JT, Knight RA, Bloor CA, Spiteri MA. Enhanced insulin-like growth factor binding protein-related protein 2 (connective tissue growth factor) expression in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999; 21:693-700.
200. Harmon KR, Witkop CJ, White JG, et al. Pathogenesis of pulmonary fibrosis: platelet-derived growth factor precedes structural alterations in the Hermansky-Pudlak syndrome. *J Lab Clin Med.* 1994; 123:617-27.
201. McDonald JA, Kuhn C III. Fibroblasts and collagen deposition in interstitial lung disease. In Schwartz MI, King TE, eds. *Interstitial lung disease.* St. Louis: Mosby-Year Book, 1993; 45-57.
202. Fukada Y, Basset F, Ferrans VJ, yamanaka N. Significance of early intralveolar fibrotic lesions and integrin expression in lung biopsy specimens from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Hum Pathol.* 1995; 26:53-61.
203. Myers JL, Katzenstein AL: Epithelial necrosis and alveolar collapse in the pathogenesis of usual interstitial pneumonia. *Chest* 1988; 94:1309-1311.
204. Katzenstein AL: Pathogenesis of fibrosis in interstitial pneumonia: An electron microscopic study. *Hum Pathol* 1985; 16:1015-1024.
205. Katzenstein AL, Myers JL, Mazur MT. Acute interstitial pneumonia: a clinicopathologic, ultrastructural, and cell kinetic study. *Am J Surg Pathol* 1986; 10:256-67.

206. Yousem SA, Colby TV, Gaensler EA. Respiratory bronchiolitis-associated interstitial lung disease and its relationship to desquamative interstitial pneumonia. *Mayo Clin Proc* 1989;64:1373-80.
207. Epler GR. Heterogeneity of bronchiolitis obliterans organizing pneumonia. *Curr Opin Pulm Med* 1998; 4:93-7.
208. Vizza CD, Lynch JP, Ochoa LL, Richardson G, Trulock EP. Right and left ventricular dysfunction in patients with severe pulmonary disease. *Chest* 1998;113:576-83.
209. Nava S, Rubini F. Lung and chest wall mechanics in ventilated patients with end stage idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* 1999; 54:390-5.
210. The BAL Cooperative Group Steering Committee. Bronchoalveolar lavage constituents in healthy individuals, idiopathic pulmonary fibrosis, and selected comparison groups. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141:169-202.
211. Mathieson JR, Mayo JR, Staples CA, Muller NL. Chronic diffuse infiltrate lung disease: a comparison of diagnostic accuracy of CT and chest radiography. *Radiology* 1989; 171:111-6.
212. Xaubert A, Agusti C, Luburich P et al. Pulmonary function tests and CT scan in the management of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998 ; 158:431-6.
213. Hunninghake G, Schwartz D, King T, et al. Open lung biopsy in IPF. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:Suppl A277.
214. Raghu G, Mageto YN, Lockhart D, Schmidt RA, Wood DE, Godwin JD. The accuracy of the clinical diagnosis of a new onset idiopathic pulmonary fibrosis and other interstitial lung disease: a prospective study. *Chest* 1999;116:1168-74.
215. Mason RJ, Schwartz MI, Hunninghake GW, Musson RA. Pharmacological therapy for idiopathic fibrosis: past, present, and future. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 177:1-7.
216. Panos RJ, Mortenson RL, Niccoli SA, King TE Jr. Clinical deterioration in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: causes and assessment. *Am J Med* 1990; 88:396-404.
217. Gay SE, Kazerooni EA, Toews GB, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis : predicting response to therapy and survival. *Am J Respir Crit Care Med* 1998 ;157 :1063-72.

218. Mapel DW, Hunt WC, Utton R, Baumgartner KB, Samet JM, Coultas DB. Idiopathic pulmonary fibrosis: survival in population based and hospital based cohorts. *Thorax* 1998; 53:469-76.
219. Schwartz DA, Van Fossen DS, Davis CS, et al. Determinants of progression in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149:444-9.
220. Schwartz DA, Helmers RA, Galvin JR, et al. Determinants of survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149:450-4.
221. Tukiainen P, Taskinen E, Holsti P, et al. Prognosis of cryptogenic fibrosing alveolitis. *Thorax* 1983; 38:349-55.
222. Katzenstein AL, Myers JL, Mazur MT: Acute interstitial pneumonia. A clinicopathologic, ultrastructural and cell kinetic study. *Am J Surg Pathol* 1986; 10:256-267.
223. Olson J, Colby T, Elliott C: Hamman-Rich syndrome revisited. *Mayo Clin Proc* 1990;65:1538-1548.
224. Tockman, M. S. Other host factors and lung cancer susceptibility. In J. M. Samet, editor. *Epidemiology of Lung Cancer*. Marcel Dekker, New York. 1994; 397–412.
225. Spain D. M. The association of terminal bronchiolar carcinoma with chronic interstitial inflammation and fibrosis of the lungs. 1957; 559–567.
226. Haddad, R., and D. Massaro. Idiopathic diffuse interstitial pulmonary fibrosis (fibrosing alveolitis), atypical epithelial proliferation and lung cancer. *Am. J. Med.* 1968;45:211–219.
227. Fox B, Risdon RA. Carcinoma of the lung and diffuse interstitial pulmonary fibrosis. *J Clin Pathol* 1968; 21:486–91.
228. Fraire AE, Greenberg SD. Carcinoma and diffuse interstitial fibrosis of lung. *Cancer* 1973; 31:1078–86.
229. Kawai T, Yakumaru K, Suzuki M, Kageyama K. Diffuse interstitial pulmonary fibrosis and lung cancer. *Acta Pathol Jpn* 1987; 37:11–9.
230. Nagai A, Chiyotani A, Nakadate T, Konno K. Lung cancer in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Tohoku J Exp Med* 1992;167:231–7.
231. Hubbard, R., A. Venn, S. Lewis, and J. Britton. Lung cancer and cryptogenic fibrosing alveolitis: a population based cohort study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1999;161:5–8.

232. Samet JM. Does idiopathic pulmonary fibrosis increase lung cancer risk? *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1-2.
233. Lee HJ, Im JG, Ahn JM, Yeon KM. Lung cancer in patients with idiopathic pulmonary fibrosis:CT findings. *J Comput Assist Tomogr* 1996 ;20:979-982.
234. Hughes J. M., and H. Weill. Asbestos and man-made fibres. In *Epidemiology of Lung Cancer*. Marcel Dekker, New York. 1994; 185–206.
235. Kuwano, K., R. Kunitake, M. Kawasaki, Y. Nomoto, N. Hagimoto, Y. Nakanishi, and N. Hara. p21/waf1/cip1/sdi1 and p53 and p53 expression in association with DNA strand breaks in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997;154:477–483.
236. Wells, C., and D. M. Mannino. Pulmonary fibrosis and lung cancer in the United States: analysis of the multiple cause of death mortality data, 1979 through 1991. *South Med. J.* 1996; 89:505–510.
237. Stack, B. H. R., Y. F. J. Choo-Kang, B. E. Heard, and W. B. Bias. The prognosis of cryptogenic fibrosing alveolitis. *Thorax* 1972;27:535–542.
238. Hubbard, R., I. Johnston, D. B. Coultas, and J. Britton. Mortality rates from cryptogenic fibrosing alveolitis in seven countries. *Thorax* 1996; 51:711–716.
239. Baecher-Allan CM, Barth RK .PCR analysis of cytokine induction profiles associated with mouse strain variation in susceptibility to pulmonary fibrosis. *Reg Immunol* 1993;5:207-17.
240. Mageto YN, Raghu G. Genetic predisposition of idiopathic pulmonary fibrosis .*Curr Opin Pulm Med* 1997;3:336-40.
241. Marshall RP, McAnulty RJ, Laurent GJ. The pathogenesis of pulmonary fibrosis: is there a fibrosis gene? *Int J Biochem Cell Biol* 1997;29:107-20.
242. Marshall RP, Puddicombe A, Cookson WO, Laurent GJ .Adult familial cryptogenic fibrosing alveolitis in the United Kingdom. *Thorax* 2000;55:143-6.
243. Bitterman PB, Rennard SI, Keogh BA, et al. Familial idiopathic pulmonary fibrosis evidence of lung inflammation in unaffected family members. *N. Engl J Med* 1986;314:1343-47.
244. Ellis, R. H. Familial incidence of diffuse interstitial fibrosis. *Postgrad. Med. J.* 1965;41:150–152.
245. Murphy A., and B. J. O’Sullivan. Familial fibrosing alveolitis. *Isr. J. Med. Sci.* 1981; 150:204–209.

246. Hughes E. W. Familial incidence of diffuse interstitial fibrosis. *Postgrad. Med. J.* 1965; 41:150–152.
247. Watters L. C. Genetic aspects of idiopathic pulmonary fibrosis and hypersensitivity pneumonitis. *Semin. Respir. Med.* 1986; 7:317–325.
248. Turton, C. W. G., L. M. Morris, S. D. Lawler, and M. Turner-Warwick. HLA in cryptogenic fibrosing alveolitis. *Lancet* 1978;507–508.
249. Fulmer, J. D., M. S. Sposovska, E. R. von Gal, R. G. Crystal, and K. K. Mittal. Distribution of HLA antigens in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1978; 118:141–147.
250. Libby, D. M., A. Gibofsky, M. Fotino, S. J. Waters, and J. P. Smith. Immunogenetic and clinical findings in IPF association with the B-cell alloantigen HLA-DR2. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1983; 127:618–622.
251. Geddes D. M., D. A. Brewerton, M. Webley, C. W. Turton, M. Turner-Warwick, A. H. Murphy, and A. M. Ward. Alpha-1-antitrypsin phenotypes in fibrosing alveolitis and rheumatoid arthritis. *Lancet* 1997:1049–1051.
252. Musk A. W., P. J. Zilko, P. Manners, P. H. Kay, and M. I. Kamboh. Genetic studies in familial fibrosing alveolitis possible linkage with immunoglobulin allotypes (Gm). *Chest* 1986; 89:206–210.
253. Hubbard R., Y. Baoku, N. Kalsheker, J. Britton, and I. Johnston. Alpha 1-antitrypsin phenotypes in patients with cryptogenic fibrosing alveolitis: a case-control study. *Eur. Respir. J.* 1997 ;10:2881–2883.
254. Rosenberg D. M. Inherited forms of interstitial lung disease. *Clin. Chest Med.* 1982; 3:635–641.
255. Whyte M, Hubbard R, Meliconi R ,et al. Increased risk of fibrosing alveolitis associated with inteleukin-1 receptor antagonist and tumour necrosis factor-alpha gene polymorphisms. *Am J Respir Ctit Care Med* 2000;162:755-8.
256. Briggs DC, Vaughan RW, Welsh KI, Myers A, du Bois RM, Black CM. Immunogenetic prediction of pulmonary fibrosis in systemic sclerosis. *Lancet* 1991;338:661-2.
257. Fearon ER. Tumor suppressor genes. In Vogelstein B, kinzler KW, editors. *The genetic basis of human cancer*. New York McGraw-Hill; 1998. pp 229-36.
258. Lowe SW, Bodis S, McClatchey A, et al. p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science* 1994; 226:807-10.

259. Hahn SA, Schutte M, Shamsul Hoque ATM, et al. Dpc4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 1996; 271:350-3.
260. Di Cristofano A, Pandolfi PP. The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell* 2000;100:387-90.
261. Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet* 2000;16:168-74.
262. Kolodner RD, Marsischky GT: Eukaryotic mismatch repair. *Curr Opin Genet Devel* 1999; 9: 89-96.
263. Buermeier AB, Deschenes SM, Baker SM, et al: Mammalian DNA mismatch repair. *Annu Rev Genet* 1999; 33: 533-564.
264. Jiricny J, Nystrom-Lahti M: Mismatch repair defects in cancer. *Curr Opin Genet Devel* 2000;10:735-40.
265. Ionov Y, Peinado AM, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993 ;363:558-61.
266. Aoltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkanen L, Mecklin JP. Clues to pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993;260:812-6.
267. Thibodeau S, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993;260:816-19.
268. Liu B, Farrington SM, Petersen GM, Hamilton SR, Parsons R, Papadopoulos N, et al. Genetic instability occurs in the majority of young patients with colorectal cancer. *Nat Med* 1995;1:348-52.
269. Spandidos DA, Ergazaki M, Arvanitis D, Kiaris H. Microsatellite instability in human atherosclerotic plaques. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 220(1):137-40.
270. Hatzistamou J, Kiaris H, Ergazaki M, Spandidos DA. Loss of heterozygosity and microsatellite instability in human atherosclerotic plaques. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;225(1):186.
271. McCaffrey TA, Du B, Consigli S, Szabo P, Bray PJ, Hartner L, Weksler BB, Sanborn TA, Bergman G, Bush HL Jr. Genomic instability in the type II TGF-beta1 receptor gene in atherosclerotic and restenotic vascular cells. *J Clin Invest*. 1997; 100(9):2182-8.

272. Flouris GA, Arvanitis DA, Parissis JT, Arvanitis DL, Spandidos DA. Loss of heterozygosity in DNA mismatch repair genes in human atherosclerotic plaques. *Mol Cell Biol Res Commun.* 2000;4(1):62-5.

273. Clark KJ, Cary NR, Grace AA, Metcalfe JC. Microsatellite mutation of type II transforming growth factor-beta receptor is rare in atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21(4):555-557.

274. Chen YH, Lin SJ, Lin MW, Tsai HL, Kuo SS, Chen JW, Charng MJ, Wu TC, Chen LC, Ding YA, Pan WH, Jou YS, Chau LY. Microsatellite polymorphism in promoter of heme oxygenase-1 gene is associated with susceptibility to coronary artery disease in type 2 diabetic patients. *Hum Genet.* 2002 ;111(1):1-8.

275. Miniati P, Sourvinos G, Michalodimitrakis M, Spandidos DA. Loss of heterozygosity on chromosomes 1, 2, 8, 9 and 17 in cerebral atherosclerotic plaques. *Int J Biol Markers.* 2001;16(3):167-71.

276. Spandidos DA, Sourvinos G, Kiaris H, Tsamprlakakis J. Microsatellite instability and loss of heterozygosity in human pterygia. *Br J Ophthalmol.* 1997 Jun;81(6):493

277. Detorakis ET, Sourvinos G, Tsamprlakakis J, Spandidos DA. Evaluation of loss of heterozygosity and microsatellite instability in human pterygium: clinical correlations. *Br J Ophthalmol.* 1998;82(11):1324-8.

278. Detorakis ET, Drakonaki EE, Spandidos DA. Molecular genetic alterations and viral presence in ophthalmic pterygium. *Int J Mol Med.* 2000;6(1):35-41.

279. Snell RG, Pritchard M, Kremer E, Lynch M, Nancarrow J, Baker E, Holman K, Mulley JC, Warren ST, Schlessinger D, et al Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA. *Science.* 1991;252(5010):1179-81.

280. Snell RG, MacMillan JC, Cheadle JP, Fenton I, Lazarou LP, Davies P, MacDonald ME, Gusella JF, Harper PS, Shaw DJ. Relationship between trinucleotide repeat expansion and phenotypic variation in Huntington's disease. *Nat Genet.* 1993;4(4):393-7.

281. Kiaris H, Ergazaki M, Spandidos DA. Instability at the H-ras minisatellite is associated with the spontaneous abortion of the embryo. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 Sep 25;214(3):788-92.

282. Kiaris H, Koumantakis E, Ergazaki M, Spandidos DA. Microsatellite instability in aborted embryos. *Mol Hum Reprod.* 1996 ;2(1):72-4.

283. Spandidos DA, Koumantakis E, Sifakis S, Sourvinos G. Microsatellite mutations in spontaneously aborted embryos. *Fertil Steril.* 1998 ;70(5):892-5.

284. Nikitina TV, Nazarenko SA. Mutation in microsatellite repeats of DNA and embryonal death in humans]Genetika. 2000;36(7):965-71.
285. Siafakas NM, Tzortzaki EG. Few smokers develop COPD. Why? Respir Med. 2002 ;96(8):615-24.
286. Guo X, Lin HM, Lin Z, Montano M, Sansores R, Wang G, DiAngelo S, Pardo A, Selman M, Floros J. Surfactant protein gene A, B, and D marker alleles in chronic obstructive pulmonary disease of a Mexican population. Eur Respir J. 2001 ;18(3):482-90.
287. Guo X, Lin HM, Lin Z, Montano M, Sansores R, Wang G, DiAngelo S, Pardo A, Selman M, Floros J. Polymorphisms of surfactant protein gene A, B, D, and of SP-B-linked microsatellite markers in COPD of a Mexican population. Chest. 2000;117(5 Suppl 1):249S-5.
288. Ji R, He Q, Zhang R, Gao Z, Ding D. A genetic study of the depressive respiratory responses to hypoxia in chronic obstructive pulmonary disease patients with type II respiratory failure. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi. 2000;17(3):173-7.
289. Yamada N, Yamaya M, Okinaga S, Nakayama K, Sekizawa K, Shibahara S, Sasaki H. Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to emphysema. Am J Hum Genet. 2000 ;66(1):187-95. Erratum in: Am J Hum Genet 2001 ;68(6):1542.
290. Siafakas NM, Tzortzaki EG, Sourvinos G, Bouros D, Tzanakis N, Kafatos A, Spandidos D. Microsatellite DNA instability in COPD. Chest. 1999 ;116(1):47-51.
291. Kasami M, Vnencak-Jones CL, Manning S, Dupont WD, Page DL. Loss of heterozygosity and microsatellite instability in breast hyperplasia. No obligate correlation of these genetic alterations with subsequent malignancy. Am J Pathol. 1997;150(6):1925-32.
292. Tsopanomichalou M, Kouroumalis E, Ergazaki M, Spandidos DA. Loss of heterozygosity and microsatellite instability in human non-neoplastic hepatic lesions. Liver. 1999;19(4):305-11.
293. Lu N, Hu N, Li WJ, Roth MJ, Wang C, Su H, Wang QH, Taylor PR, Dawsey SM. Microsatellite alterations in esophageal dysplasia and squamous cell carcinoma from laser capture microdissected endoscopic biopsies. Cancer Lett. 2003;189(2):137-45.

294. Toncheval DI, Atanassova SY, Gergov TD, Todorovska EG, Roeva IG, Georgiev TH, Fink-Gremmels J, Zaharieva BM. Genetic changes in uroepithelial tumors of patients with Balkan endemic nephropathy. *J Nephrol.* 2002 ;15(4):387-93.
295. El-Rifai W, Powell SM. Molecular biology of gastric cancer. *Semin Radiat Oncol.* 2002;12(2):128-40.
296. Stoler DL, Datta RV, Charles MA, Block AW, Brenner BM, Sieczka EM, Hicks WL Jr, Loree TR, Anderson GR. Genomic instability measurement in the diagnosis of thyroid neoplasms. *Head Neck.* 2002;24(3):290-5.
297. Takebayashi Y, Nakayama K, Kanzaki A, Miyashita H, Ogura O, Mori S, Mutoh M, Miyazaki K, Fukumoto M, Pommier Y. Loss of heterozygosity of nucleotide excision repair factors in sporadic ovarian, colon and lung carcinomas: implication for their roles of carcinogenesis in human solid tumors. *Cancer Lett.* 2001;174(2):115-25.
298. Ponz de Leon M, Percesepe A. Pathogenesis of colorectal cancer. *Dig Liver Dis.* 2000;32(9):807-21.
299. Maggioni M, Coggi G, Cassani B, Bianchi P, Romagnoli S, Mandelli A, Borzio M, Colombo P, Roncalli M. Molecular changes in hepatocellular dysplastic nodules on microdissected liver biopsies. *Hepatology.* 2000;32(5):942-6.
300. Leung SY, Yuen ST, Chan TL, Chan AS, Ho JW, Kwan K, Fan YW, Hung KN, Chung LP, Wyllie AH. Chromosomal instability and p53 inactivation are required for genesis of glioblastoma but not for colorectal cancer in patients with germline mismatch repair gene mutation. *Oncogene.* 2000;19(35):4079-83.
301. Kawai H, Suda T, Aoyagi Y, Isokawa O, Mita Y, Waguri N, Kuroiwa T, Igarashi M, Tsukada K, Mori S, Shimizu T, Suzuki Y, Abe Y, Takahashi T, Nomoto M, Asakura H. Quantitative evaluation of genomic instability as a possible predictor for development of hepatocellular carcinoma: comparison of loss of heterozygosity and replication error. *Hepatology.* 2000;31(6):1246-50.
302. Kagawa Y, Yoshida K, Hirai T, Toge T, Yokozaki H, Yasui W, Tahara E. Microsatellite instability in squamous cell carcinomas and dysplasias of the esophagus. *Anticancer Res.* 2000;20(1A):213-7.
303. Luft F, Gebert J, Schneider A, Melsheimer P, von Knebel Doeberitz M. Frequent allelic imbalance of tumor suppressor gene loci in cervical dysplasia. *Int J Gynecol Pathol.* 1999;18(4):374-80.

304. Euhus DM, Maitra A, Wistuba II, Alberts A, Albores-Saavedra J, Gazdar AF. Loss of heterozygosity at 3p in benign lesions preceding invasive breast cancer. *J Surg Res.* 1999;83(1):13-8.
305. Shousha S, Costello C, Luqmani YA, Sinnett HD. CD5 positive breast carcinoma in a patient with untreated chronic lymphocytic leukaemia: molecular studies of chromosome 13q. *J Clin Pathol.* 1998;51(11):862-4.
306. Froudarakis M.E., 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.
307. Bhowmik A., Seemungal T.A., Sapsford R.J., Devalia J.L., Wedzicha J.A., Comparison of spontaneous and induced sputum for investigation of airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease, *Thorax.*1998; 53: 953-956.
308. Maniatis T., Fritsch E., Somebrook J. *Molecular cloning, a laboratory manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982
309. Kwok S., Du M., Mullis K.B. Identification Of Human Immunodeficiency Virus Sequences By Using In Vitro Enzymatic Amplification And Oligomer Cleavage Detection. *J.Virol.*1987;61:1680-1685.
310. Peltomaki P., Lothe R.A., Aaltonen L.A., Pylkkanen L., Nystrom-Lahti M., Seruca R., David L., Holm R., Ryberg D., Haugen A., et al., Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome, *Cancer Res.*1993 ;53: 5853-5855.
311. Jones A.W. Alveolar cell carcinoma occurring in idiopathic interstitial pulmonary fibrosis, *Br J Dis Chest.*1970; 64: 78-84.
312. Kuwano K., Kunitake R., Kawasaki M., Nomoto Y., Hagimoto N., Nakanishi Y., Hara N., P21Waf1/Cip1/Sdi1 and p53 expression in association with DNA strand breaks in idiopathic pulmonary fibrosis, *Am J Respir Crit Care Med.*1996; 154: 477-483.
313. Kawasaki H., Ogura T., Yokose T., Nagai K., Nishiwaki Y., Esumi H., p53 gene alteration in atypical epithelial lesions and carcinoma in patients with idiopathic pulmonary fibrosis, *Hum Pathol.*2001; 32: 1043-1049.
314. Vassilakis D.A., Sourvinos G., Spandidos D.A., Siafakas N.M., Bouros D., Frequent genetic alterations at the microsatellite level in cytologic sputum samples of patients with idiopathic pulmonary fibrosis, *Am J Respir Crit Care Med.*2000; 162: 1115-1119.

315. Uematsu K., Yoshimura A., Gemma A., Mochimaru H., Hosoya Y., Kunugi S., Matsuda K., Seike M., Kurimoto F., Takenaka K., Koizumi K., Fukuda Y., Tanaka S., Chin K., Jablons D.M., Kudoh S.. Aberrations in the fragile histidine triad (FHIT) gene in idiopathic pulmonary fibrosis. *Cancer Res.*2001; 61: 8527-8533.
316. DePinho R.A., Hatton K.S., Tesfaye A., Yancopoulos G.D., Alt F.W.. The human myc gene family: structure and activity of L-myc and an L-myc pseudogene. *Genes Dev.*1987; 1: 1311-1326.
317. Makela T.P., Saksela K., Alitalo K.. Amplification and rearrangement of L-myc in human small-cell lung cancer. *Mutat Res.*1992; 276: 307-315.
318. Gasparian A.V., Laktionov K.K., Belialova M.S., Pirogova N.A., Tatosyan A.G., Zborovskaya I.B.. Allelic imbalance and instability of microsatellite loci on chromosome 1p in human non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer.*1998; 77: 1604-1611.
319. Sozzi G., Veronese M.L., Negrini M., Baffa R., Cotticelli M.G., Inoue H., Torielli S., Pilotti S., De Gregorio L., Pastorino U., Pierotti M.A., Ohta M., Huebner K., Croce C.M.. The FHIT gene 3p14.2 is abnormal in lung cancer. *Cell.*1996; 85: 17-26.
320. Bradshaw A.D., Sage E.H., SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury. *J Clin Invest.*2001; 107: 1049-1054.
321. Van den Blink B., Jansen H.M., Peppelenbosch M.P., Idiopathic pulmonary fibrosis: molecular mechanisms and possible therapeutic strategies, *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).*2000; 48: 539-545.
322. Maeyama T., Kuwano K., Kawasaki M., Kunitake R., Hagimoto N., Matsuba T., Yoshimi M., Inoshima I., Yoshida K., Hara N., Upregulation of Fas-signalling molecules in lung epithelial cells from patients with idiopathic pulmonary fibrosis, *Eur Respir J.*2001; 17: 180-189.
323. Mori M., Kida H., Morishita H., Goya S., Matsuoka H., Arai T., Osaki T., Tachibana I., Yamamoto S., Sakatani M., Ito M., Ogura T., Hayashi S., Microsatellite instability in transforming growth factor-beta 1 type II receptor gene in alveolar lining epithelial cells of idiopathic pulmonary fibrosis, *Am J Respir Cell Mol Biol.*2001; 24: 398-404.
324. Bocker, T., J. Diermann, W. Friedl, J. Gebert, E. Holinski-Feder, J.Karner-Hanusch, M. von Knebel-Doerberitz, K. Koelble, G. Moeslein,H. K. Schackert, H. C.

- Wirtz, R. Fishel, and J. Ruschhoff. Microsatellite instability analysis: a multicenter study for reliability and quality control. *Cancer Res.* 1997; 57:4739–4743.
325. Liloglou T, Maloney P, Xinarianos G, Fear S, Field JK. Sensitivity and limitations of high throughput fluorescent microsatellite analysis for the detection of allelic imbalance: application in lung tumors. *Int J Oncol* 2000; 16: 5-14.
326. Brinker H, Wilbek E. The incidence of malignant tumors in patients with respiratory sarcoidosis. *Br J Cancer* 1974; 29: 247–251.
327. Yamaguchi M, Odaka M, Hosoda Y, Iwai K, Tachibana T. Excess death of lung cancer among sarcoidosis patients. *Sarcoidosis* 1991; 8: 51–55.
328. Romer FK, Hommelgaard P, Schou G. Sarcoidosis and cancer revisited: a long-term follow-up study of 555 Danish sarcoidosis patients. *Eur Respir J* 1998; 12: 906–912.
329. Askling J, Grunewald J, Eklund A, Hillerdal G, Ekbohm A. Increased risk for cancer following sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 1668-1672.
330. Vassilakis DA, Sourvinos G, Markatos M, Psathakis K, Spandidos DA, Siafakas NM, Bouros D. Microsatellite DNA instability and loss of heterozygosity in pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 1729-1733.
331. Sheffield EA, Williams WH. Pathology. *In: James DG, Ed. Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders.* New York, Dekker, 1995; pp. 45-67.
332. Kolodner R. Biochemistry and genetics of eukaryotic mismatch repair. *Genes Dev* 1996; 10: 1433-1442.

Επίσης έγιναν αναφορές στις παρακάτω πηγές:

1. Εσωτερική παθολογία . Harrison, Isselbacher, Braunwald, Wilson, Martin, Fauci, Kasper. 13^η Έκδοση. Ιατρικές εκδόσεις Παρισιάνος.
2. Βασικές αρχές παθοφυσιολογίας . Μουτσόπουλος Χ.Μ., Εμμανουήλ Δ.Σ. Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας.
3. Παθολογία Cecil. Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας.
4. Εσωτερική Παθολογία .Τομέας Παθολογίας Τμήματος Ιατρικής Α.Π.Θ. University Studio Press.
5. Μοριακή Ογκολογία. Δ.Α.Σπαντίδος .Ιατρικές εκδόσεις Λυχνία.
6. Internal Medicine. Stein JH. ed.3 Boston, Little Brown & Co,1990
7. Progress in Respiration Research. Basset F, Georges R, editors. New York, 1975
8. Pulmonary diseases and disorders. Fishman AP. New York, McGraw-Hill Book Co, 1988
9. Sarcoidosis. Scadding JG. Mitchell DN. ed 2. London, Chapman & Hall, 1985.
10. Interstitial Lung Disease. Schartz M, King T. London ,U.K, B.C., Decker,1998
11. New approaches to managing idiopathic pulmonary fibrosis. TE. King. Published by ATS, September 2000.
12. Immunologically Mediated Pulmonary Diseases. Lynch JP III, DeRemee RA. Boston, JP Lippincott, 1991
13. Epidemiology of Lung Cancer.J.M.Samet. Marcel Dekker,New York.1994.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ