

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ



ΑΘΑΝΑΣΙΑ Κ. ΠΡΟΚΛΟΥ

Πνευμονολόγος

Ηράκλειο Κρήτης

2015

Επιβλέπων: Καθ. Ν. Μ. Σιαφάκας

Επιβλέπων

Ν.Μ. Σιαφάκας, Καθηγητής Πνευμονολογίας MD, PhD, FCCP

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Ν. Μ. Σιαφάκας, Καθηγητής

Σ. Σχίζα, Επικ. Καθηγήτρια

Γ. Σουρβίνος, Επικ. Καθηγητής

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Ν. Μ. Σιαφάκας

Σ. Σχίζα

Γ. Σουρβίνος

Γ. Σαμώνης

Δ. Σπαντίδος

Χ. Τσατσάνης

Α. Μ. Αντωνίου

....Ευχαριστίες

Κατά αντιστοιχία με τον φωτισμένο όρκο που μας κληρονόμησε ο Ιπποκράτης, θα ήταν μεγάλη παράλειψη να μην αναφερθώ στους ανθρώπους που εγγυήθηκαν με τη σοβαρότητα, την αφοσίωση και την συνέπεια τους την εκπόνηση αυτής της διδακτορικής διατριβής.

Πρώτα απ' όλα, ευχαριστώ θερμά και ειλικρινά την κυρία Τζωρτζάκη Ελένη που με στήριξε, παρακολούθησε και καθοδήγησε βήμα προς βήμα τόσο το πειραματικό όσο και το συγγραφικό κομμάτι που απαιτήθηκε για τη διδακτορική διατριβή αυτή. Είναι αμέτρητη η βοήθεια και η στήριξη της και δύσκολο να καταμετρηθεί λεπτομερώς. Θα περιοριστώ στο να εκφράσω πως την ευχαριστώ που ήταν πάντα εκεί γενναιόδωρα και με ανιδιοτέλεια όποτε χρειάστηκα-πολλές φορές και προτού το ζητήσω- να καταφύγω στη συμβουλή της.

Ευχαριστώ επίσης τον καθηγητή μου, κύριο Σιαφάκα Νίκο που συνέβαλε στην οργάνωση του κλινικού σκέλους της διατριβής αυτής και χωρίς την καθοδήγηση του οποίου δε θα ήταν εφικτή η ολοκλήρωσή της.

Στη συνέχεια ευχαριστώ την κυρία Σχίζα Σοφία και τον κύριο Σουρβίνο Γιώργο οι οποίοι με καθοδήγησαν με συνέπεια στην συγγραφή της διατριβής αυτής.

Θα ήταν επίσης παράλειψη να μην ευχαριστήσω τον κύριο Ζέρβα Ελευθέριο, την κυρία Ροβίνα Νικολέτα και την κυρία Γκάγκα Μίνα που μας βοήθησαν καταληκτικά στην συλλογή του απαραίτητου αριθμού ασθενών με άσθμα.

Ευχαριστώ ακόμα τους συνεργάτες Νεοφύτου Ειρήνη, Σουλιτζή Νίκο, που πρόσφεραν τη βοήθειά τους και το χρόνο τους για την επεξεργασία των δειγμάτων των προκλητών πτυέλων των ατόμων που συμμετείχαν στη μελέτη αυτή.

Επίσης ευχαριστώ την κυρία Δέσποινα Μωραιτάκη για την βοήθειά της από το εργαστήριο σπιρομετρήσεων.

Ευχαριστώ τις κυρίες Ειρήνη Ρογδάκη και Ρένα Μιχαλάκη που είναι πάντα πρόθυμες να βοηθήσουν.

Στο τέλος, αλλά με εξίσου μεγάλη σπουδαιότητα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου που υποστηρίζει με τη σταθερότητά της και την ηθική εμπύχωση που μου προσφέρει κάθε μικρό ή μεγάλο προσωπικό βήμα.

Βιογραφικό Σημείωμα

ΠΡΟΚΛΟΥ ΑΘΑΝΑΣΙΑ

ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΟΣ-ΦΥΜΑΤΙΟΛΟΓΟΣ

1.ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Όνοματεπώνυμο	Αθανασία Πρόκλου
Όνομα πατρός	Κώστας
Όνομα μητρός	Στεργιανή
Ημερομηνία γεννήσεως	10/08/1976
Τόπος γεννήσεως	Δράμα, Δράμας
Οικογενειακή κατάσταση	Συνεζευγμένη, δύο παιδιά
Υπηκοότητα	Ελληνική
Διεύθυνση κατοικίας:	Κλεομένη 4, Αγ. Ιωάννης, Ηράκλειο 71409, Κρήτη
Τηλέφωνα επικοινωνίας:	6974801355
Ηλεκτρονική διεύθυνση (e-mail)	281021439 proklath@yahoo.gr

Γλώσσες

- Ελληνική(Μητρική)
- Αγγλική(First Certificate University of Cambridge)
- Βουλγαρική (άπταιστη γνώση)

2. ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

α. Βασική εκπαίδευση

1982-1991

Πρωτοβάθμια, Ροδολίβος Σερρών

1991-1994

Δευτεροβάθμια, Ροδολίβος Σερρών

β. Πανεπιστημιακή εκπαίδευση

1996-2002

Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Plovdiv, Bulgaria

γ. Μετεκπαίδευση

2006- 2007

12^ο Ετήσιο Μετεκπαιδευτικό Πρόγραμμα
Επείγουσας Προνοσοκομειακής Ιατρικής του
ΕΚΑΒ , Ηράκλειο.

2009 PreHospital trauma Life Support-Advanced Course,
NAEMT, Hellenic National Centre, Heraklio, Crete.

2008 – 2015 Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής στο
Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Ιατρικής Σχολής.

3. ΔΙΠΛΩΜΑΤΑ

2002 Πτυχίο Ιατρικής (άριστα 5.6/6), Ιατρική
Σχολή Πανεπιστημίου Plovdiv, Bulgaria.

2004 Πράξη Αναγνώρισης Τίτλου Σπουδών-
ΔΙΚΑΤΣΑ (Λίαν Καλώς 6.84/10).

4. ΑΔΕΙΕΣ ΑΣΚΗΣΗΣ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΟΣ

Μάρτιος 2004 Άδεια άσκησης ιατρικού επαγγέλματος

Ιούνιος 2014 Τίτλος ειδικότητας Πνευμονολογίας,
Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ηρακλείου,

5. ΚΛΙΝΙΚΟ ΕΡΓΟ- ΠΡΟΥΠΗΡΕΣΙΑ

α. Κλινική

Προπτυχιακή

2001-2002 Συμμετοχή στις δραστηριότητες και τις εφημερίες της Γενικής Χειρουργικής, Θωρακοχειρουργικής, Παθολογικής, Ορθοπαιδικής, Καρδιολογικής, Γαστρεντερολογικής, Νευρολογικής, ΩΡΛ, Ψυχιατρικής, κλινικής του Πανεπιστημιακού νοσοκομείου Ρνονdιν, Bulgaria.

Μάρτιος 2007-
Μάρτιος 2008 Συμμετοχή στο Ιατρείο Διαμέσων Νοσημάτων, Πνευμονολογική Κλινική ΠαΓΝΗ.

Μεταπτυχιακή

Ιούνιος 2004- Σεπτέμβριος 2004 Εκπλήρωση τρίμηνης υποχρεωτικής εκπαίδευσης (Παθολογική, Καρδιολογική, ΕΚΑΒ και Χειρουργική Κλινική) στο «Βενιζέλειο-Πανάκειο» Νοσοκομείο Ηρακλείου Κρήτης

Σεπτέμβριος 2004- Οκτώβριος 2005 Εκπλήρωση υποχρεωτικής υπηρεσίας υπαίθρου, ως αγροτική ιατρός στο Π.Ι. Πύργου, Κ.Υ.Χάρακα, Ηρακλείου Κρήτης.

Μάρτιος 2008- Ειδικευόμενη Ιατρός, Πνευμονολογικής Κλινικής

Ιούνιος 2014

Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου
(ΠαΓΝΗ)

β. Εργαστηριακή

Προπτυχιακή

Μάρτιος 2007-

Εργαστήριο Μοριακής και Κυτταρικής Πνευμονολογίας,

Μάρτιος 2008

Πανεπιστήμιο Κρήτης

Μεταπτυχιακή

2008 – 2015

Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής στο Πανεπιστήμιο
Κρήτης, Τμήμα Ιατρικής Σχολής

6. ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΕΡΓΟ

ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ

- 2008 **Ερευνητική υποτροφία με θέμα:** Οξειδωτική βλάβη του DNA στο Άσθμα, Ερευνητικό Βραβείο Πνευμονολογίας Glaxo-Smith-Kline
- 2009 **ERS Lung Science Congress Bursary** to F. Economidou, K. Antoniou, G. Soufla, **A. Proklou**, R. Lymbouridou, H. Papadaki, N.Siafakas. Oral presentation: Increased CXCR4 expression and short telomeres in bone marrow mesenchymal stem cells of patients with idiopathic pulmonary fibrosis . Lung Science Conference, Estoril, Portugal.
- 2009 **Βραβείο Ερευνητικής Υποτροφίας ‘Πέπη Λάτση’ ΕΠΕ-Clinical Research Award for 2009.** Phenotypical and molecular characteristics of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Rheumatoid Arthritis associated Interstitial Lung Disease (RA-ILD).
- 2010 **ERS Lung Science Congress Bursary** to K. Karagiannis, K. Antoniou, R. Lymbouridou, C. Kalpadaki, E. Vassalou, I.Lasithiotaki, **A. Proklou**, N. Siafakas, N. Tzanakis. Does cigarette smoking influence bone marrow microenvironment? Downregulation of CXCR4 expression in bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMMSCs) in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD): preliminary results, Lung Science Conference, Estoril, Portugal

ΒΡΑΒΕΥΣΕΙΣ

2009

ERS Travel Award to A. Proklou, A. Proklou, K. Antoniou, G. Gvazava, G. Soufla, K. Christina, R. Lymbouridou, K. Karagiannis, I. Lasithiotaki, N. Siafakas. Phenotypical and molecular characteristics of bone marrow mesenchymal stem cells in rheumatoid lung. ERS Annual Congress, Viena, September 12-16, 2009. ERJ 2009;34(sup 53): 18s ‘

Δεκέμβριος 2007

Πρώτο Βραβείο για ολοκληρωμένη εργασία στο 16^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, με τίτλο: Ανάλυση της έκφρασης του βιολογικού άξονα SDF-1/CXCL12 και του υποδοχέα CXCR4 σε μεσεγχυματικά κύτταρα μυελού των οστών – ινοκύτταρα (fibrocytes) και πνευμονικό ιστό ασθενών με Ιδιοπαθή Πνευμονική Ίνωση. Αθήνα 2007

2009 18ο Πανελλήνιο
Συνέδριο Νοσημάτων
Θώρακα-

2ο βραβείο ολοκληρωμένης εργασίας: Κ.Μ. Αντωνίου, **A. Πρόκλου**, Κ. Καραγιαννης, Ρ. Λυμπουρίδου, Ε. Βασσάλου, Ι. Λασηθιωτάκη, Μ.Χ. Καστινάκη, Ν. Τζανάκης, Δ. Σπαντίδος, Ε.Α. Παπαδάκη, Ν.Μ. Σιαφάκας. Διερεύνηση του βιολογικού άξονα CXCR4/SDF1a στα μεσεγχυματικά κύτταρα μυελού των οστών σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα και διάμεση πνευμονική συμμετοχή. 18ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακα, Θεσσαλονίκη 2009.

18ο Πανελλήνιο
Συνέδριο Νοσημάτων

1ο βραβείο αναρτημένης εργασίας: Κ. Καραγιαννης, Κ.Μ. Αντωνίου, Γ. Μαργαριτόπουλος, Φ. Οικονομίδου, Ε.

- Θώρακα- 2009 Κουταλά, Ι. Λασηθιωτάκη, **Α. Πρόκλου**, Ρ. Λυμπουρίδου, Δ. Μωραιτάκη, Ν.Μ. Σιαφάκας. Έκφραση των toll-like receptors στις ινωτικές ιδιοπαθείς διάμεσες πνευμονοπάθειες-προκαταρτικά αποτελέσματα. 18ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακα, Θεσσαλονίκη, 2009.
- 19^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακα -2010 **1^ο βραβείο ολοκληρωμένης εργασίας:** **Α.Πρόκλου**, Κ.Καραγιαννης Γ.Μαργαριτόπουλος, Κ.Σαμαρά, Ε.Βασσάλου, Ι.Λασηθιωτάκη, Γ.Σούφλα, Ρ. Λυμπουρίδου, Μ.Χ.Καστρινάκη, Δ.Σπαντίδος, Ε.Παπαδάκη, Ν.Μ.Σιαφάκας, Κ.Μ. Αντωνίου. Διερεύνηση της έκφρασης της τελομεράσης και του μήκους τελομεριδίου στην αυτοάνοση και ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση στα πρόδρομα μεσεγγυματικά κύτταρα μυελού των οστών. 19ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακα, Ρόδος, 2010.
- 15ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο- Ιατρική Εταιρεία Χανίων,2010 **Βραβείο καλύτερης εργασίας:** **Α.Πρόκλου**, Κ.Καραγιαννης, Γ.Μαργαριτόπουλος, Κ.Σαμαρά, Ε.Βασσάλου, Ι.Λασηθιωτάκη, Γ.Σούφλα, Ρ. Λυμπουρίδου, Μ.Χ.Καστρινάκη, Δ.Σπαντίδος, Ε.Παπαδάκη, Ν.Μ.Σιαφάκας, Κ.Μ. Αντωνίου. Διερεύνηση της έκφρασης της τελομεράσης και του μήκους τελομεριδίου στην αυτοάνοση και ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση στα πρόδρομα μεσεγγυματικά κύτταρα μυελού των οστών.

Νοέμβριος 2011

Βραβείο Παναγιώτη Χόρτη σε προφορική ανακοίνωση με τίτλο: Διερεύνηση του άξονα Τελομεράσης /Τελομερών σε μεσεγγυματικά κύτταρα μυελού των οστών ασθενών με ρευματοειδή πνεύμονα. Γιώργος Α. Μαργαριτόπουλος, **Αθανασία Πρόκλου**, Κώστας Καραγιάννης, Ισμήνη Λασηθιωτάκη^{1,2}, Γιαννούλα Σουφλά, Μαρία Χριστίνα Καστρινάκη, Δημήτριος Α. Σπαντιδός, Ελένη Α. Παπαδάκη, Νικόλαος Μ. Σιαφάκας, Κατερίνα Μ. Αντωνίου. 20ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος. Αθήνα 24-27 Νοεμβρίου 2011.

22ο Πανελλήνιο
Πνευμονολογικό
Συνέδριο, Αθήνα, 2013

2^ο Βραβείο Καλύτερης δημοσιευμένης εργασίας σε διεθνή περιοδικά στους **Athanasia Proklou**, N. Soulitzis, E.Neofytou, N. Rovina, E.Zervas, M.Gaga, N.M.Siafakas, E.G.Tzortzaki. Granule Cytotoxic Activity and Oxidative DNA Damage in Smoking and Nonsmoking Patients With Asthma. 22ο Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο, Αθήνα, 2013.

**ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ
ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΑ
ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ**

1. Antoniou KM, Soufla G, **Proklou A**, Margaritopoulos G, Choulaki C, Lymbouridou R, Samara KD, Spandidos DA, Siafakas NM. Different activity of the biological axis VEGF-Flt-1 (fms-like tyrosine kinase 1) and CXC chemokines between pulmonary sarcoidosis and idiopathic pulmonary fibrosis: a bronchoalveolar lavage study. Clin Dev Immunol. 2009; 537929.

2. Protopapadakis C, Antoniou KM, Voloudaki A, Samara K, **Proklou A**, Margaritopoulos G, Siafakas NM. Rituximab-induced non-specific interstitial pneumonia like reaction in a patient with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Respiratory Medicine CME* 2009; 2(4): 176-178

3. Margaritopoulos GA, Antoniou KM, Soufla G, Karagiannis K, **Proklou A**, Lasithiotaki I, Tzanakis N, Spandidos DA, Siafakas NM. Upregulation of stromal cell derived factor-1alpha in collagen vascular diseases-associated interstitial pneumonias (CVDs-IPs). *Pulm Pharmacol Ther.* 2010 ;23(2):115-20.

4. Economidou F, Antoniou KM, Soufla G, Lasithiotaki I, Karagiannis K, Lymbouridou R, **Proklou A**, Spandidos DA, Siafakas NM. Role of VEGF-stromal cell-derived factor-1alpha/CXCL12 axis in pleural effusion of lung cancer. *J Recept Signal Transduct Res.* 2010;30(3):154-60.

5. Tzortzaki EG, **Proklou A**, Siafakas NM. Asthma in the Elderly: Can We Distinguish It from COPD? *J Allergy (Cairo).* 2011;2011:843543.

6. Margaritopoulos GA, **Proklou A**, Lagoudaki E, Voloudaki A, Siafakas NM, Antoniou KM. Sarcoidosis in a 65-year-old woman presenting with a lung mass and pericardial effusion: a case report. *J Med Case Rep*. 2012; 6(1):259.

7. Antoniou KM, Margaritopoulos GA, **Proklou A**, Karagiannis K, Lasithiotaki I, Soufla G, Kastrinaki MC, Spandidos DA, Papadaki HA, Siafakas NM. Investigation of Telomerase/Telomeres system in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells derived from IPF and RA-UIP. *J Inflamm (Lond)*. 2012 ;9(1):27.

8. **Athanasia Proklou** , Nikolaos Soultzis , Eirini Neofytou , Nikoletta Rovina , Eleftherios Zervas , Mina Gaga ; Nikolaos M. Siafakas, Eleni G. Tzortzaki. Granule Cytotoxic Activity and Oxidative DNA Damage in Smoking and Nonsmoking Patients With Asthma. *CHEST* 2013; 144(4):1230–1237.

9. Margaritopoulos GA, Antoniou KM, Lasithiotaki I, **Proklou A**, Soufla G, Siafakas NM. Expression of SDF-1/CXCR4 axis in Bone Marrow Mesenchymal cells derived from Rheumatoid Arthritis-Usual

Interstitial Pneumonia. Clin Exp Rheumatol. 2013 Jul-Aug;31(4):610-1.

**ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ
ΕΛΛΗΝΙΚΑ
ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ**

1. Γ. Παπαδόπουλος, Δ. Μπρίμης, **Α. Πρόκλου**, Μ. Μαυρογιαννάκη : Περιστατικό κακοήθους μελανώματος. Αντιμετώπιση και διαχείριση του ασθενούς από το Γενικό γιατρό. Πρωτοβάθμια Φροντίδα Υγείας Τόμος 17, τεύχος 2, 80-82, 2005
2. Γ. Παπαδόπουλος, Δ. Μπρίμης, Α. Πετρουλάκη, **Α. Πρόκλου**, Σ. Τοκατλίδου, Ν. Δρακωνάκης : Περίπτωση ακανθοκυτταρικού καρκίνου πνεύμονα. Αντιμετώπιση και διαχείριση του ασθενούς στην πρωτοβάθμια φροντίδα υγείας. Πρωτοβάθμια Φροντίδα Υγείας Τόμος 18, Τεύχος 4, 192-197, 2006.
3. Γ. Παπαδόπουλος, Δ. Μπρίμης, **Α. Πρόκλου**, Α. Πετρουλάκη, Α. Χουλάκη, Η. Σαλούστρος. Αναφυλαξία στην πρωτοβάθμια φροντίδα υγείας-

μια επείγουσα κατάσταση που καλείται να αντιμετωπίσει άμεσα ο γενικός γιατρός. Πρωτοβάθμια Φροντίδα Υγείας Τόμος 18, τεύχος 2, 91-94, 2006.

4. **A Proklou**, F Economidou, KM Antoniou, EG Tzortzaki, A Voloudaki, K Malagari, NM Siafakas. Clinical, radiological and molecular effects in three patients with idiopathic pulmonary fibrosis after long-term treatment with interferon gamma-1b. *Pneumon* Vol 22, No 2, 2009.

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΣΥΓΓΡΑΜΜΑΤΑ

1. **A. Πρόκλου**, I. Μητρούσκα. Συχνές ερωτήσεις στην Πνευμονολογία: Πνευμονική Αρτηριακή Υπέρταση- ερωτήσεις-απαντήσεις. Εκδ. Ελλ. Πνευμ. Ετ. 2010
2. Ε.Τζωρτζάκη, I. Μητρούσκα, **A. Πρόκλου**, Ε. Σταματάκη. Η Ελληνική εμπειρία από την Anti-IgE θεραπεία στην αντιμετώπιση του σοβαρού αλλεργικού άσθματος. 2010.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ

ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Φ. Οικονομίδου, Κ. Αντωνίου, I. Σουφλά, Ε. Τζωρτζάκη, **A. Πρόκλου**, Ε. Λαμπίρη, Ν. Σιαφάκας : Μελέτη έκφρασης σε επίπεδο mRNA των αγγειογενετικών αυξητικών παραγόντων VEGF, TGF-B1, FGF2, IGF-1, σε πνευμονικό ιστό ασθενών με Πνευμονική Ίνωση. 16ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος. Αθήνα 2007.
2. Φ. Οικονομίδου, Κ. Αντωνίου, Ε. Τζωρτζάκη, Ν. Τζανάκης, **A. Πρόκλου**, Δ. Μωραϊτάκη, Γ. Μαλτεζάκης, Ν. Σιαφάκας : Κλινικά χαρακτηριστικά και μοριακά ευρήματα μετά από μακροχρόνια χορήγηση Ιντερφερόνης $-\gamma$ -1b σε

ασθενείς με Ιδιοπαθή Πνευμονική Ύψωση. 16ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος. Αθήνα 11/2007.

3. Antoniou KM, Soufla G, **Proklou A**, Samara K, Lymbouridou R, Economidou F, Choulaki C, Spandidos D.A, Siafakas NM : Differential activity of the biological axis VEGF-Flt-1 between granulomatous and fibrotic disorders:a bronchoalveolar lavage fluid. 13th World congress on advances in oncology, and 11th International symposium on molecular medicine. Hersonissos, Crete, Greece, 2008. S86.
4. Antoniou KM, Soufla G, Kastrinaki MC, Economidou F, Damianaki A, **Proklou A**, Spandidos D, Papadaki HA, Siafakas NM : Investigation of Telomerase expression in bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCS) and lung tissue from patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. 9th WASOG Meeting and 11th BAL International Conference. Athens, 2008. PP66.
5. Maragaritopoulos G, Antoniou KM, Soufla G, Economidou F, Choulaki C, **Proklou A**, Lymbouridou R, Lambiri I, Tzanakis N, Siafakas NM : Increased expression of stromal cell derived factor-1/CXC chemokine receptor 4(SDF-

1/CXCL12-CXCR4) biological axis in Interstitial Pneumonias associated with Collagen Vascular Disease: a bronchoalveolar lavage fluid study. 9th WASOG Meeting and 11th BAL International Conference. Athens, 2008. PP82

6. Economidou F, Antoniou KM, Sougla G, **Proklou A**, Samara K, Choulaki C, Lymbouridou R, Siafakas NM : Impaired VEGF Receptor-1, FLT-1 expression in bronchoalveolar lavage fluid in patients with Pulmonary Sarcoidosis. 9th WASOG Meeting and 11th BAL International Conference. Athens, 2008. PP01

7. G. Margaritopoulos, K.M. Antoniou, R. Lymbouridou, G. Soufla, F. Economidou, **A. Proklou**, I. Lambiri, N. Tzanakis, N.M. Siafakas : VEGF Expression in Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF) in Patients with Fibrotic Interstitial Pneumonias: Idiopathic Versus Collagen Vascular Disease Related Subtypes: Preliminary Results. ATS-2008 Toronto, USA . A742.

8. G. Margaritopoulos, K. Antoniou, G. Soufla, F. Economidou, C. Choulaki, **A. Proklou**, R. Lymbouridou, I. Lambiri, N. Tzanakis, N. Siafakas. Differential expression of stromal cell derived factor-1/CXC chemokine receptor 4 (SDF-1/CXCL12 -

CXCR4) biological axis between idiopathic pulmonary fibrosis and interstitial pneumonia associated with collagen vascular disease: a bronchoalveolar lavage study;. ERS 2008 Berlin, Annual Congress, Germany.

9. **Proklou, K.** Antoniou, G. Soufla, F. Economidou, K. Samara, M. Manousakis, I. Drositis, D. Spandidos, N. Siafakas. Expression of angiogenic growth factors and stromal cell derived factor-1/CXC chemokine receptor 4 (SDF-1/CXCL12 - CXCR4) biological axis in idiopathic pulmonary fibrosis: a lung tissue study; ERS 2008 Berlin, Annual Congress, Germany. p 8s

10.F. Economidou, K. Antoniou, G. Soufla, **A. Proklou,** R. Lymbouridou, G. Maltezakis, N. Tzanakis, N. Siafakas. Increased expression of angiogenic growth factor stromal cell derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) in pleural fluid of patients with lung cancer: preliminary results. ERS 2008 Berlin, Annual Congress, Germany. p 459s.

11.F. Economidou, K. Antoniou, K. Samara, G. Soufla, C. Choulaki, **A. Proklou,** I. Politis, D. Moraitaki, N. Tzanakis, N. Siafakas. Angiogenetic profiles (VEGF and VEGF receptor-1, Flt-1) in bronchoalveolar

lavage fluid in patients with interstitial lung diseases; ERS 2008 Berlin, Annual Congress, Germany. p 318s.

12. KM Antoniou, G Soufla , F Ekonomidou, **A Proklou**, R Lymbouridou, H Papadaki, NM Siafakas: Increased CXCR4 expression and short telomeres in bone marrow mesenchymal stem cells of patients with IPF. ERS 2009 VIENNA Annual Congress, Austria.

13. **A Proklou**, KM Antoniou, G Gvazava , G Soufla, C Kastrinaki, R Lymbouridou, K Karagiannis, I Lasithiotaki, NM Siafakas. Phenotypical and molecular characteristics of bone marrow mesenchymal stem cells in RA. ERS 2009 VIENNA Annual Congress, Austria.

14. K Karagiannis, KM Antoniou, G Margaritopoulos, **A Proklou**, I Lasithiotaki, R Lymbouridou, H Koutala, D Moraitaki, NM Siafakas. Toll-like receptor 4 is overexpressed in bronchoalveolar lavage fluid of patients with fibrotic idiopathic interstitial pneumonias: preliminary results. ERS 2009 VIENNA Annual Congress, Austria.

15. F Ekonomidou, KM Antoniou, **A Proklou**, I Lasithiotaki, K Karagiannis, R Lymbouridou, G

Soufla, NM Siafakas: Investigation of angiogenetic mechanisms in pleural fluid of patients with lung cancer: preliminary results. ATS 2009-SAN DIEGO, California. A2876.

16.G Margaritopoulos, KM Antoniou, **A Proklou**, G Soufla, R Lymbouridou, F Economidou, NM Siafakas. Angiogenetic Balance in Fibrotic Interstitial Pneumonias Versus Collagen Vascular Diseases – Associated Pneumonias. ATS 2009, San Diego, California, USA. A2869.

17.A **Proklou**, KM Antoniou, R Lymbouridou, G Soufla, K Karagiannis, I Lasithiotaki, NM Siafakas. Angiopoietins' (Ang-1 and Ang-2) mRNA Expression Levels in Lung Tissue of IPF Patients. ATS 2009- San Diego, California, USA. A2868.

18.Antoniou KM, **Proklou A**, Lymbouridou R, Soufla G, I.Lasithiotaki, K.Karagiannis, Spandidos D.A, Siafakas NM : Differential expression of SDF-CXCR4 biological axis in bone marrow mesenchymal stem cells in rheumatoid arthritis associated lung fibrosis. 14th World congress on advances in oncology, and 11th International symposium on molecular medicine. Loutraki, Greece 2009.

- 19.**A.Πρόκλου**, Ε.Τζωρτζάκη. Άσθμα μετά από άσκηση. 25ο μεταπτυχιακό σεμινάριο ελληνικής βρογχολογικής εταιρείας, Αθήνα.12/2009
- 20.**A.Πρόκλου**, Ε. Νεοφύτου, Δ. Μωραϊτάκη, Ι. Μητρούσκα, Κ. Αντωνίου, Ν. Σιαφάκας, Ε.Τζωρτζάκη. Έκφραση της περφορίνης ως δείκτη κυτταροτοξικότητας σε ασθενείς με βρογχικό άσθμα. 18^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακα, Θεσσαλονίκη, 2009.
- 21.Κ. Καραγιάννης, ΚΜ Αντωνίου, Γ. Μαργαριτόπουλος, Φ. Οικονομίδου, Ε. Κουταλά, Ι. Λασηθιωτάκη, **A. Πρόκλου**, Ρ. Λυμπουρίδου, Δ. Μωραϊτάκη, ΝΜ Σιαφάκας. Έκφραση των toll-like receptors στις ινωτικές ιδιοπαθείς διάμεσες πνευμονοπάθειες:προκαταρτικά αποτελέσματα. 18^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακα, Θεσσαλονίκη, 2009.
- 22.Neofytou E., **Proklou A.**, Soulitzis N., Siafakas N.M, Tzortzaki E.: Oxidative DNA damage in Asthma: preliminary results. XX World congress of asthma, Αθήνα 2010.
- 23.**Proklou A.**, Neofytou E., Soulitzis N., Siafakas

N.M, Tzortzaki E.: Perforin and granzymes A and B expression in persistent Asthma. XX World congress of asthma, Αθήνα 2010.

24.**Proklou A.**, Samara K., Neofytou E., Stamataki E., Tzortzaki E, Siafakas N.M.: Comparison of sputum perforin expression between COPD and Asthma. XX World congress of asthma, Αθήνα 2010.

25.Antoniou KM, **Proklou A**, M.C.Kastrinaki, K.samara, H.Papadaki, Siafakas NM: Increased TERT mRNA expression of BM-MSCs in IPF. ERS 2010 BARCELONA Annual Congress, Spain.

26.**A.Proklou**, E.Neofytou, S.Schiza, I.Mitrouska, N.Siafakas, E.Tzortzaki: Serum and sputum perforin and granzymes A and B expression in persistent asthma. ERS 2010 BARCELONA Annual Congress, Spain.

27.**A.Proklou**, E.Neofytou, M.Psarrou, S.Schiza, N.Siafakas, E.Tzortzaki: Increase in serum and sputum perforin expression in persistent asthma: preliminary results. ERS 2010 BARCELONA Annual Congress, Spain.

28.K.Karagiannis Antoniou KM, , Lymbouridou R, Kalpadaki C, Vassalou E, I.Lasithiotaki, **Proklou A**,

Siafakas NM, N.Tzanakis : Does cigarette smoking influence bone marrow microenvironment? Down-regulation of CXCR4 expression in bone marrow-derived mesenchymal stem cells in patients with COPD: preliminary results. ERS 2010 BARCELONA

29.**Athanasia Proklou**, Eirini Neofytou, Sophia Schiza, Vasilios Tzilas, Charis Armeftis, Nikolaos Siafakas, Eleni G. Tzortzaki. Serum And Sputum Perforin Expression In Persistent Asthma: Preliminary Results. ATS 2010, New Orleans, USA.

30.Konstantinos Karagiannis, Katerina M. Antoniou, Rena Lymbouridou, **Athanasia Proklou**, Christina Kalpadaki, Evi Vassalou, Ismini Lasithiotaki, Nikolaos Siafakas, Nikolaos Tzanakis. Down-regulation Of CXCR4 Expression In Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells (BM-MSCs) In Patients With Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD): Preliminary Results ATS 2010, New Orleans, USA.

31.**Proklou**, E. Neofytou, M. Psarrou, S. Schiza, N. Siafakas, E. Tzortzaki. Increase in serum and sputum perforin expression in persistent asthma: preliminary results. Lung Science Conference, Estoril, Portugal

2010.

32.K. Karagiannis, K. Antoniou, R. Lymbouridou, C. Kalpadaki, E. Vassalou, I. Lasithiotaki, **A. Proklou**, N. Siafakas, N. Tzanakis Does cigarette smoking influence bone marrow microenvironment? Down-regulation of CXCR4 expression in bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-MSCs) in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD): preliminary results. Lung Science Conference, Estoril, Portugal 2010.

33.**A.Πρόκλου**, Ε. Νεοφύτου, Σ. Σχίζα, Δ. Μωραϊτάκη, Ν. Σιαφάκας, Ε.Τζωρτζάκη. Έκφραση περφορίνης και Granzymes A και B σε ασθενείς με μέτριο επίμονο βρογχικό άσθμα. 19^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακα, Ρόδος, 2010.

34.**Athanasia Proklou**, Konstantinos Karagiannis, Ioannis Giannarakis, Cristina Kalpadaki, Rena Lymbouridou, Nikolaos Siafakas, Katerina M. Antoniou. Toll-Like Receptors Expression In Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells (BM-MSCs) Of Patients With Pulmonary Fibrosis. ATS 2011, Denver, USA.

35.Katerina D. Samara, **Athanasia Proklou**, Eirini

Neofytou, Evangelia Stamataki, Eleni Tzortzaki, Nikolaos Siafakas. Sputum Perforin Expression In Obstructive Airways Diseases: COPD And Asthma. ATS 2011, Denver, USA.

36. Konstantinos Karagiannis, Katerina M. Antoniou, **Athanasia Proklou**, Ioannis Giannarakis, Evagelia Vassalou, Nikolaos Tzanakis, Nikolaos Siafakas. Down-Regulation Of Toll-Like Receptors Expression In Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells (BM-MSCs) Of COPD Patients. ATS 2011, Denver, USA.

37. Katerina Antoniou, **Athanasia Proklou**, Konstantinos Karagiannis, Ismini Lastithiotaki, Ioannis Giannarakis, Giannoula Soufla, Despina Moraitaki, Nikos Siafakas. Investigation of the viral-induced Toll-like receptors axis in bone-marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) of patients with chronic lung disorders. 9th ERS Lung Science Conference, Estoril, Portugal, 2011.

38. Κ.Δ.Σαμαρά, **Α.Πρόκλου**, Ε.Νεοφύτου, Ε.Σταματάκη, Ε.Τζωρτζάκη, Ν. Μ. Σιαφάκας. Έκφραση της περφορίνης στα αποφρακτικά νοσήματα του πνεύμονα: ΧΑΠ και Βρογχικό Άσθμα. 20ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακα,

Αθήνα, 2011.

39. George A. Margaritopoulos, Ismini Lasithiotaki, **Athanasia Proklou**, George Papadogiannis, Iro Chatziantoniou, Nikos M. Siafakas, Katerina M. Antoniou. The Stomal Derived-1/CXCR4 Axis Regulates The Migration Of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells In The Rheumatoid Lung. ATS 2013.

40. **Proklou**, E. Neofytou, N. Rovina, E. Zervas, M. Gaga, E. Kallitsi, N. Siafakas, E. Tzortzaki. Granule cytotoxic activity and oxidative DNA damage in smoking and non-smoking asthmatics N. Soultzis,. ERS BARCELONA, 2013.

ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ- ΠΡΟΣΚΕΚΛΗΜΕΝΟΣ ΟΜΙΛΗΤΗΣ

- Δηλητηριάσεις στην Πρωτοβάθμια Υγεία- Κ.Υ. Χάρακα 2005.
- Επιπολασμός Οστεοπόρωσης στο

Μετεμμηνοπαυσιακό Γυναικείο Πληθυσμό της Περιοχής Ευθύνης του ΠΙ Ασημιού. 17ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γενικής Ιατρικής. Χαλκιδική 2005.

- Σημασία της Μικροεπεμβατικής Χειρουργικής στην Πρωτοβάθμια Φροντίδα Υγείας. 17ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γενικής Ιατρικής. Χαλκιδική 2005.
- Ανάπτυξη και Διατροφικές Συνήθειες παιδιών σχολικής και εφηβικής ηλικίας στην περιοχή του ΚΥ Χάρακα. 17ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γενικής Ιατρικής. Χαλκιδική 2005.
- Διερεύνηση του βιολογικού άξονα CXCR4/Stromal Cell Derived Factor-1A (SDF-1A) στα μεσεγχυματικά κύτταρα μυελού των οστών σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα και διάμεση πνευμονική συμμετοχή (RA-ILD).18ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακα, Θεσσαλονίκη, 2009.
- Άσθμα μετά από άσκηση. 25ο μεταπτυχιακό σεμινάριο ελληνικής βρογχολογικής εταιρείας, Αθήνα.12/2009
- Differential expression of SDF-CXCR4 biological axis in bone marrow mesenchymal stem cells in rheumatoid arthritis associated lung fibrosis. 14th

World congress on advances in oncology, and 11th International symposium on molecular medicine. Loutraki, Greece 2009.

- Έκφραση περφορίνης και GRANZYMES A και B σε ασθενείς με μέτριο επίμονο βρογχικό άσθμα. 19^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακα, Ρόδος, 2010.
- Κυτταροτοξικοί μηχανισμοί στο άσθμα- 3^ο Σεμινάριο Συνεχιζόμενης Ιατρικής Εκπαίδευσης- Ημέρες Άσθματος-Ναύπλιο, 2012.

Ὀρκος του Ιπποκράτη

Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἄσκληπιὸν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἴστορας ποιεύμενος, ἐπιτελέα ποιήσιν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν ὄρκον τόνδε καὶ ξυγγραφὴν τήνδε. Ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χριζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ ωυτέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καὶ διδάξειν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χριζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ ξυγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσί τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοισί τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἰητρικῶ, ἄλλῳ δὲ οὐδενί. Διαιτήμασί τε χρήσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἴρξειν. Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑφηγήσομαι ξυμβουλίην τοιήνδε. Ὅμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω. Ἀγνῶς δὲ καὶ ὀσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμήν. Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε. Ἐς οἰκίας δὲ ὀκόσας ἂν ἐσίω,

έσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης
έκουσίης καὶ φθορίης, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε
γυναικείων σωμάτων καὶ ἀνδρῶν, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων. Ἄ δ'
ἂν ἐν θεραπείῃ ἢ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπήης κατὰ βίον
ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρρητα
ἠγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα. Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα
ποιέοντι, καὶ μὴ ξυγγέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης
δοξαζομένω παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον.
παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιποροῦντι, τάναντία τουτέων.

Ἀπόδοση στα νέα ελληνικά

Ορκίζομαι στο θεό Απόλλωνα τον ιατρό και στο θεό Ασκληπιό και
στην Υγεία και στην Πανάκεια και επικαλούμενος τη μαρτυρία όλων των

θεών ότι θα εκτελέσω κατά τη δύναμη και την κρίση μου τον όρκο αυτόν και τη συμφωνία αυτή. Να θεωρώ τον διδάσκαλό μου της ιατρικής τέχνης ίσο με τους γονείς μου και την κοινωνό του βίου μου. Και όταν χρειάζεται χρήματα να μοιράζομαι μαζί του τα δικά μου. Να θεωρώ την οικογένειά του αδέρφια μου και να τους διδάσκω αυτήν την τέχνη αν θέλουν να την μάθουν χωρίς δίδακτρα ή άλλη συμφωνία. Να μεταδίδω τους κανόνες ηθικής, την προφορική διδασκαλία και όλες τις άλλες ιατρικές γνώσεις στους γιους μου, στους γιους του δασκάλου μου και στους εγγεγραμμένους μαθητές που πήραν τον ιατρικό όρκο, αλλά σε κανέναν άλλο. Θα χρησιμοποιώ τη θεραπεία για να βοηθήσω τους ασθενείς κατά τη δύναμη και την κρίση μου, αλλά ποτέ για να βλάψω ή να αδικήσω. Ούτε θα δίνω θανατηφόρο φάρμακο σε κάποιον που θα μου το ζητήσει, ούτε θα του κάνω μια τέτοια υπόδειξη. Παρομοίως, δεν θα εμπιστευτώ σε έγκυο μέσο που προκαλεί έκτρωση. Θα διατηρώ αγνή και άσπιλη και τη ζωή και την τέχνη μου. Δεν θα χρησιμοποιώ νυστέρι ούτε σε αυτούς που πάσχουν από λιθίαση, αλλά θα παραχωρώ την εργασία αυτή στους ειδικούς της τέχνης. Σε όσα σπίτια πηγαίνω, θα μπαίνω για να βοηθήσω τους ασθενείς και θα απέχω από οποιαδήποτε εσκεμμένη βλάβη και φθορά, και ιδίως από γενετήσιες πράξεις με άνδρες και γυναίκες, ελεύθερους και δούλους. Και όσα τυχόν βλέπω ή ακούω κατά τη διάρκεια της θεραπείας ή και πέρα από τις επαγγελματικές μου ασχολίες στην καθημερινή μου ζωή, αυτά που δεν πρέπει να μαθευτούν παραέξω δεν θα τα κοινοποιώ, θεωρώντας τα θέματα αυτά μυστικά. Αν τηρώ τον όρκο αυτό και δεν τον παραβώ, ας χαίρω πάντοτε υπολήψεως ανάμεσα στους ανθρώπους για τη ζωή και για την τέχνη μου. Αν όμως τον παραβώ και επιορκήσω, ας πάθω τα αντίθετα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ελληνική περίληψη ειδικού μέρους	37
Abstract	40

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Άσθμα- ορισμός	41
Άσθμα και κάπνισμα	42
Παθογενετικοί μηχανισμοί	43
Κυτταροτοξικοί μηχανισμοί	46
1) Περφορίνη	
2) Γκρανζύμες	
3) 8-OHdG	
4) Οξειδωτικό stress	
Βιβλιογραφία γενικού μέρους	56

II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εισαγωγή.....	65
Προκλητά πτύελα.....	66
Κυτταροτοξικότητα και οξειδωτική βλάβη του DNA στους ασθματικούς- Μεθοδολογία.....	68
Άτομα μελέτης.....	
Προκλητή απόχρεμψη.....	
Πνευμονική λειτουργία	
Ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία ανίχνευσης.....	
Στατιστική ανάλυση	
Αποτελέσματα μελέτης.....	72
Δημογραφικά χαρακτηριστικά	

Κυτταροτοξικότητα και οξειδωτική βλάβη του DNA.....	
Στρωματοποιημένη ανάλυση.....	
Συσχέτιση με κλινικές παραμέτρους.....	
Συζήτηση.....	82
Βιβλιογραφία ειδικού μέρους.....	87
Παράρτημα.....	91

Ελληνική περίληψη ειδικού μέρους

Εισαγωγή: Η οξειδωτική βλάβη του DNA και ο αποπτωτικός μηχανισμός μέσω της απελευθέρωσης περφορίνης και γκρανζυμών από τα κυτταροτοξικά κύτταρα, αποτελούν μηχανισμούς που ήδη έχουν αποδειχθεί σε ασθενείς με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ).

Παρόμοιοι μηχανισμοί ωστόσο δεν έχουν διερευνηθεί σε ασθενείς με άσθμα και ειδικότερα σε καπνιστές ασθματικούς.

Σκοπός: Ο προσδιορισμός επιπέδων της περφορίνης, των γκρανζυμών A, και B και της 8-OHdG στο υπερκείμενο πτυέλων ασθενών με ήπιο και μέτριο επιμένον άσθμα (καπνιστών και μη καπνιστών) σε σύγκριση με υγιείς (καπνιστές και μη καπνιστές).

Μέθοδοι: Τις κύριες ομάδες μελέτης αποτέλεσαν 50 ασθενείς με διάγνωση Χρόνιου Βρογχικού Άσθματος με βάση τα κριτήρια και την ταξινόμηση των Παγκόσμιων Οδηγιών για το Άσθμα, (GINA), καθώς και μια κύρια ομάδα ελέγχου, 20 υγιών μαρτύρων.

Η ομάδα των ασθματικών αποτελούνταν από μια υποομάδα 20 καπνιστών ασθματικών, ηλικίας 41.3 ± 11.6 έτη και μια υποομάδα 30 μη καπνιστών με άσθμα, ηλικίας 47.4 ± 21 έτη.

Την ομάδα ελέγχου αποτέλεσαν δέκα ενεργείς καπνιστές και δέκα μη καπνιστές υγιείς εθελοντές χωρίς γνωστή νόσο αεραγωγών και με φυσιολογικές λειτουργικές δοκιμασίες πνευμόνων.

Σε όλους τους μετέχοντες στη μελέτη πραγματοποιήθηκαν λειτουργικές δοκιμασίες πνευμόνων. Επιπλέον έγινε λήψη επαγόμενων πτυέλων στο υπερκείμενο των οποίων μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης περφορίνης, γκρανζύμης A, B και 8-OHdG με δοκιμασία ELISA.

Αποτελέσματα: Στατιστικά σημαντικά αυξημένη βρέθηκε η έκφραση της περφορίνης στην ομάδα των καπνιστών ασθματικών συγκριτικά με όλες τις υπόλοιπες τρεις ομάδες ($p=0,015$).

Στατιστικά σημαντικά αυξημένη βρέθηκε η έκφραση της γκρανζύμης A ($p=0.049$) και της γκρανζύμης B ($p =0.028$) στους ασθματικούς σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες. Επιπλέον, στατιστικά σημαντική διαφορά βρέθηκε όσον αφορά στα επίπεδα έκφρασης της γκρανζύμης B ($p = 0016$), της περφορίνης ($p =0,026$) και της 8-OHdG ($p = 0,021$) μεταξύ των ασθματικών καπνιστών και των μη καπνιστών. Τέλος, στατιστικά σημαντική διαφορά βρέθηκε μόνο στα επίπεδα έκφρασης της γκρανζύμης B ($p=0,014$) μεταξύ των καπνιστών σε σύγκριση με τους μη καπνιστές της ομάδας ελέγχου.

Στην ανάλυση κατά στρώματα, αυξημένα βρέθηκαν τα ποσοστά έκφρασης της περφορίνης στο 40-45% των δειγμάτων στις 2 ομάδες του καπνίσματος, και μόνο στο 7% στους ασθενείς με άσθμα ($p 0,004$). Σε αντίθεση, τα επίπεδα των γκρανζυμών A και B ήταν αυξημένα σε όλες τις τρεις ομάδες, αν και το ποσοστό των καπνιστών ασθματικών με αυξημένες τιμές ήταν ελαφρώς υψηλότερο από ότι στους ασθενείς με άσθμα.

Τέλος, τα επίπεδα της 8-OHdG ήταν αυξημένα στο 35% των καπνιστών ασθματικών και σε χαμηλότερα ποσοστά στους μη καπνιστές ασθματικούς και στους καπνιστές (10% και 20% αντίστοιχα).

Συμπεράσματα: Σύμφωνα με την αρχική μας υπόθεση, δείξαμε ότι το άσθμα στους καπνιστές εμφανίζει διαφορετική κυτταροτοξική δραστηριότητα από το άσθμα στους μη καπνιστές. Προηγούμενες μελέτες αναφέρουν αυξημένη δραστικότητα των CD8 + T-λεμφοκυττάρων και της περφορίνης σε δείγματα πτυέλων καπνιστών με

ή χωρίς ΧΑΠ σε σύγκριση με υγιείς μη καπνιστές. Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες ανέδειξαν αυξημένη οξειδωτική βλάβη του DNA σε ασθενείς με ΧΑΠ.

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η κυτταροτοξική δραστηριότητα στους πνεύμονες των καπνιστών ασθματικών αυξάνεται μαζί με την οξειδωτική βλάβη του DNA, κάτι που παρατηρείται και στην ΧΑΠ.

Εν κατακλείδι, δείξαμε ότι, οι καπνιστές ασθματικοί φαίνεται να παρουσιάζουν μια διαφορετική απάντηση, με τη συμμετοχή όχι μόνο των γκρανζυμών αλλά και της περφορίνης και της 8-OHdG προσομοιάζοντας τους μηχανισμούς της ΧΑΠ.

Abstract

Background: Lung cytotoxic mechanisms trigger the release of perforin and granzymes, causing oxidative DNA damage that ultimately leads to apoptosis. These effects, although demonstrated in COPD, have not been investigated in patients with asthma and in particular in patients with asthma who smoke. Our aim was to measure perforin, granzyme A, granzyme B, and 8-OHdG expression in sputum from smoking and nonsmoking patients with asthma, compared with smoking and nonsmoking control subjects.

Methods: Perforin, granzyme A, granzyme B, and 8-OHdG expression levels were detected by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) in induced sputum specimens.

Results: Perforin expression was increased in 40% of smokers and 45% of smoking patients with asthma and in only 7% of nonsmoking patients with asthma ($p=0,004$), compared with control subjects' values. In contrast, granzymes A and B levels were increased in 40% of patients in all three groups vs control subjects. Finally, 8-OHdG levels were elevated in 35% of smoking patients with asthma, in 20% of smokers, and in only 10% of nonsmoking patients with asthma. Statistical analysis revealed a positive correlation between granzyme A ($p=0,001$) and granzyme B ($p=0,006$) expression levels and the number of pack-years in smoking patients with asthma.

Conclusions: Asthma cytotoxic immune response is mainly represented by granzymes A and B, whereas in smoking patients with asthma perforin and 8-OHdG are additionally involved, resembling the immune response in COPD.

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Βρογχικό Άσθμα

Εισαγωγή-Ορισμός Το άσθμα αποτελεί σύμφωνα με τις τροποποιημένες νέες οδηγίες κατά GINA όπως αυτές δημοσιεύθηκαν το 2014, «μια χρόνια φλεγμονώδη νόσο των αεραγωγών. Χαρακτηρίζεται από ιστορικό συρίττουσας αναπνοής, δύσπνοιας, σφιξίματος στο στήθος και βήχα που κυμαίνονται σε ένταση και συχνότητα εμφάνισης, και συνοδεύονται από ποικίλους έντασης απόφραξης των αεραγωγών».(1) Θα πρέπει να διευκρινιστεί στο σημείο αυτό ότι η πραγματοποίηση της μελέτης μας έγινε και ολοκληρώθηκε πριν από την έκδοση των αναθεωρημένων ορισμών και οδηγιών του 2014, σύμφωνα με τις οδηγίες του 2009, όπου ως Άσθμα ορίζονταν «μια χρόνια φλεγμονώδης νόσος των αεραγωγών στην οποία συμμετέχουν πολλά κύτταρα και μεσολαβητές. Η φλεγμονή αυτή συνοδεύεται από υπεραντιδραστικότητα των αεραγωγών και οδηγεί σε επαναλαμβανόμενα επεισόδια συρίττουσας αναπνοής, δύσπνοιας, σφιξίματος στο στήθος και βήχα ιδιαίτερα τις νυχτερινές ώρες ή νωρίς το πρωί. Αυτά τα επεισόδια συνδυάζονται με απόφραξη των αεραγωγών που συχνά αναστρέφεται με, ή ακόμα και χωρίς, θεραπεία».(2) Το άσθμα αποτελεί μια πολύ συχνή αναπνευστική νόσο που αφορά στο 1-8% του γενικού πληθυσμού σε διάφορες χώρες. Από άσθμα πάσχουν τουλάχιστον 300 εκατομμύρια άνθρωποι όλων των ηλικιών και ο αριθμός αυτός αναμένεται να αυξηθεί. Ο επιπολασμός του άσθματος έχει διπλασιασθεί την τελευταία 10ετία, ιδιαίτερα στα παιδιά, στις περισσότερες χώρες του κόσμου.(1)

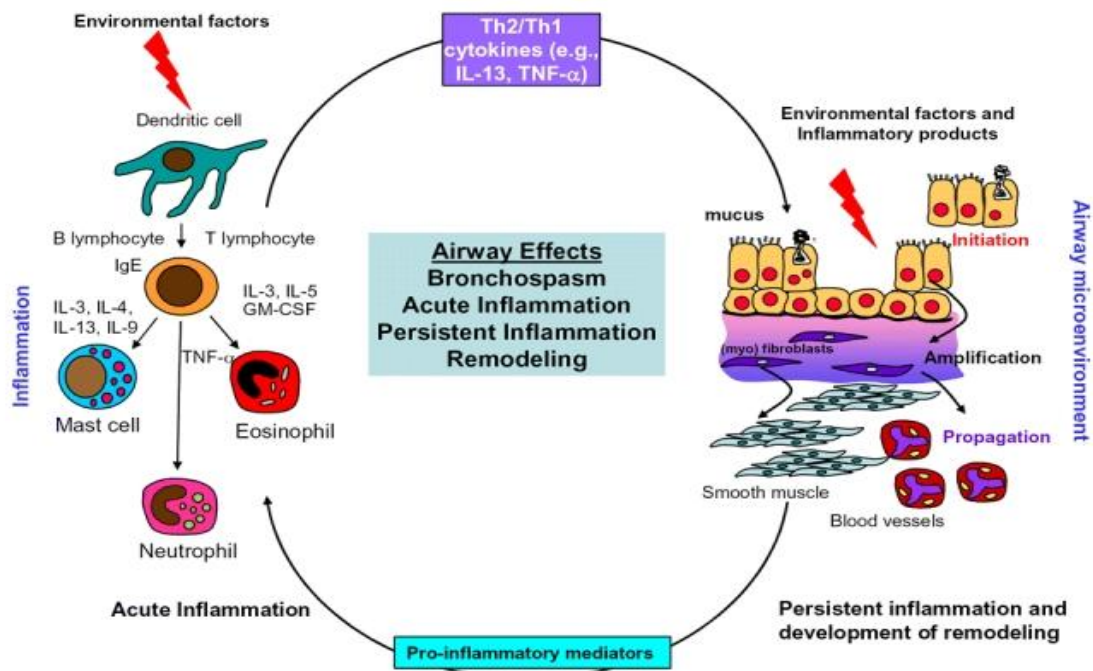
Άσθμα και κάπνισμα

Ο επιπολασμός του καπνίσματος στην Ευρώπη ανέρχεται σε 31% του πληθυσμού, ενώ με στοιχεία της Eurostat για το 2003, δύο στους τρεις Έλληνες (58,1%) και μία στις τρεις Ελληνίδες (32,2%) καπνίζουν. Συνολικά, το 44,9% του πληθυσμού της Ελλάδας είναι καπνιστές και στην Ε.Ε. κατέχουν την πρώτη θέση στο κάπνισμα. Η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (ΠΟΥ) εκτιμά ότι το ένα τρίτο του παγκόσμιου πληθυσμού, δηλ. περίπου 1,25 δισεκατομμύρια άνθρωποι, είναι καπνιστές, με τα δύο τρίτα περίπου να ζουν σε αναπτυσσόμενες χώρες. Στις ανεπτυγμένες χώρες, τουλάχιστον ένας στους τέσσερις ενήλικες καπνίζει, με το συνολικό ποσοστό των καπνιστών να ποικίλλει μεταξύ των Ευρωπαϊκών χωρών και των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής (π.χ. 26% στην Αγγλία, 38% στη Γερμανία, 30% στη Γαλλία, 29% στην Ιταλία, 18% στη Σουηδία, 25% στις ΗΠΑ). Στις αναπτυσσόμενες χώρες και γενικότερα στις χώρες με χαμηλό κατά κεφαλή εισόδημα, ο επιπολασμός του καπνίσματος είναι μεγαλύτερος. Τα στοιχεία που υπάρχουν για τους ενήλικες με άσθμα που καπνίζουν είναι πολύ λίγα. Γενικά όμως, το κάπνισμα σε αυτήν την ομάδα ασθενών είναι συχνό και πλησιάζει σε συχνότητα αυτήν του γενικού πληθυσμού. Στοιχεία που υπάρχουν από το Ηνωμένο Βασίλειο και τις ΗΠΑ σχετικά με τα ποσοστά καπνίσματος στους ασθενείς με άσθμα δίνουν ποσοστά καπνίσματος που κυμαίνονται από 17-35%. Υψηλός είναι και ο αριθμός των ασθενών με άσθμα που ήταν πρώην καπνιστές, με ποσοστό που κυμαίνεται από 22 έως 43%. Έτσι, στις περισσότερες ανεπτυγμένες χώρες, τουλάχιστον οι μισοί από τους ενήλικες ασθενείς με άσθμα είναι πιθανό να είναι καπνιστές ή πρώην καπνιστές.(3-7)

Παθογενετικοί μηχανισμοί

Η φλεγμονή των αεραγωγών στο άσθμα είναι επίμονη παρά το γεγονός ότι τα συμπτώματα έχουν συχνά επεισοδιακό και διαλείποντα χαρακτήρα. Η συσχέτιση ανάμεσα στη βαρύτητα του άσθματος και την βαρύτητα της φλεγμονής δεν έχει πλήρως ξεκαθαριστεί. Η φλεγμονώδης διεργασία των αεραγωγών έχει κοινά χαρακτηριστικά τα οποία είναι ανεξάρτητα παθογένειας και ηλικίας. Τα μαστοκύτταρα, τα ηωσινόφιλα, τα T-λεμφοκύτταρα, τα iNKT κύτταρα, τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα απελευθερώνουν φλεγμονώδεις μεσολαβητές, όπως κυτταροκίνες, χημειοκίνες, λευκοτριένια και αυξητικούς παράγοντες και συμβάλλουν στην διατήρηση της φλεγμονής. Η παραγωγή κυτταροκινών και άλλων μεσολαβητών από δομικά κύτταρα των αεραγωγών όπως οι ινοβλάστες, οι μυοινοβλάστες, τα λεία μυϊκά κύτταρα, τα ενδοθηλιακά και τα επιθηλιακά κύτταρα θεωρείται σημαντική για τη διατήρηση της φλεγμονής(8). Εκτός από τη φλεγμονώδη απάντηση στους ασθματικούς ασθενείς συνυπάρχουν και χαρακτηριστικές δομικές αλλαγές που συνολικά περιγράφονται ως αναδιαμόρφωση των αεραγωγών (airway remodeling). Η απόπτωση του επιθηλίου, η υπερπλασία των λείων μυϊκών ινών, η πάχυνση της βασικής μεμβράνης και ο αυξημένος αριθμός των καλυκοειδών κυττάρων και των υποβλεννογονίων αδένων με υπερέκκριση βλέννης είναι οι κυριότερες δομικές αλλαγές(9,10). Οι αλλαγές αυτές ενδέχεται να παριστούν διορθωτική απάντηση στη χρόνια φλεγμονή. Ορισμένες από αυτές σχετίζονται με τη βαρύτητα της νόσου και μπορεί να οδηγήσουν σε σχετικά μη αναστρέψιμη απόφραξη των αεραγωγών. Η βρογχική υπεραντιδραστικότητα και η στένωση των αεραγωγών είναι οι δυο κύριες αιτίες της διαταραχής της πνευμονικής λειτουργίας στο βρογχικό άσθμα. Η βρογχική υπεραντιδραστικότητα

είναι η εκσεσημασμένη βρογχοσυσπαστική απάντηση σε ποικιλία ερεθισμάτων που δεν προκαλούν καμία αντίδραση σε ένα φυσιολογικό άτομο. Το φαινόμενο της βρογχικής υπεραντιδραστικότητας αν και χαρακτηρίζει το βρογχικό άσθμα, έχει περιγραφεί και σε άτομα με αλλεργική ρινίτιδα, χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, κυστική ίνωση. Τα ερεθίσματα που μπορεί να προκαλέσουν βρογχική υπεραντιδραστικότητα είναι μεσολαβητές όπως η ισταμίνη, φαρμακευτικές ουσίες όπως η μεταχολίνη, φυσικά ερεθίσματα όπως η άσκηση, ο ξηρός αέρας, ο υπεραερισμός και μη ισότονα διαλύματα. Οι μηχανισμοί της βρογχικής υπεραντιδραστικότητας δεν είναι πλήρως κατανοητοί, αν και φαίνεται να σχετίζεται τόσο με τη φλεγμονή όσο και με την αναδιαμόρφωση των αεραγωγών και είναι μερικώς αναστρέψιμη με τη θεραπεία. Τα κορτικοειδή, που βελτιώνουν τα συμπτώματα του άσθματος και μειώνουν την φλεγμονή των αεραγωγών, έχουν σημαντική επίδραση στη βρογχική υπεραντιδραστικότητα, χωρίς όμως να την επαναφέρουν σε φυσιολογικά επίπεδα. Η ακριβής συσχέτιση ανάμεσα στη βρογχική υπεραντιδραστικότητα, τη βαρύτητα του άσθματος και τη φλεγμονή είναι περίπλοκη και όχι επακριβώς διευκρινισμένη(11,12).



Key: GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; IgE, immunoglobulin E; IL-3, interleukin 3 (and similar); TNF- α , tumor necrosis factor-alpha

St.Holgate. A look at the pathogenesis of asthma: the need of a change in direction. Disc. Medicine. 2010

Σε απόκριση σε διάφορες περιβαλλοντικές προσβολές, όπως είναι ο καπνός και τα αλλεργιογόνα, οι πνεύμονες απαντούν μέσω της ενεργοποίησης κυτταροτοξικών μηχανισμών ως μία από τις ανοσολογικές αποκρίσεις στο στρες, συμπεριλαμβανομένων των CD8 T+ λεμφοκυττάρων, των NK κυττάρων (φυσικά κύτταρα δολοφόνοι), και των φυσικών φονικών T-κυττάρων(13,14). Μία βασική λειτουργία των κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων είναι να ανιχνεύει κατεστραμμένα κύτταρα παρακινώντας τους να υποβληθούν σε απόπτωση. Στο πλαίσιο του μηχανισμού επιτήρησης, τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα (CTLs) απελευθερώνουν περφορίνη και γκρανζύμες (GRZ)(15-21).

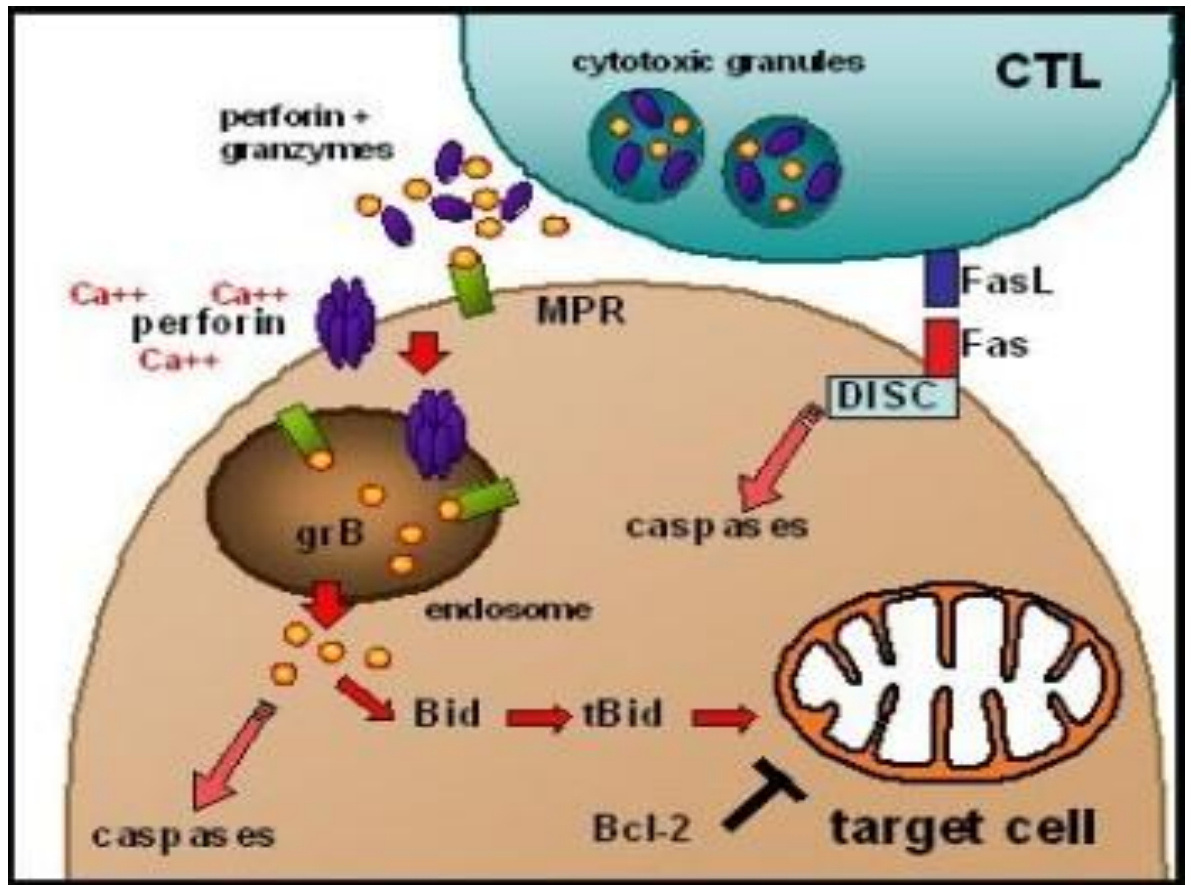
Κυτταροτοξικοί μηχανισμοί

1. Περφορίνη

Η περφορίνη είναι μέλος της MACPF οικογένειας πρωτεϊνών, η οποία έχει πάνω από 500 μέλη(22). Πρόσφατα, οι κρυσταλλικές δομές των τριών πρωτεϊνών MACPF επιλύθηκαν, και παρά την έλλειψη σημαντικών ομοιοτήτων ακολουθίας, επέδειξαν αξιοσημείωτη δομική ομοιότητα με τις βακτηριακές χοληστερόλοεξαρτώμενες κυτταρολυσίνες.(23-26) Η περφορίνη είναι μία πρωτεΐνη, μεγέθους 60-kD, η οποία παράγεται από τα NK κύτταρα, τα γάμμα / δέλτα (g / d) κύτταρα, τα κυτταροτοξικά CD8 T-λεμφοκύτταρα, και από τα CD4 T λεμφοκύτταρα. Έχει δομικές και λειτουργικές ομοιότητες με το συστατικό 9 του συμπληρώματος (C9). Όπως και το C9, δημιουργεί διαμεμβρανικά κανάλια, οδηγώντας σε μη – ειδική ωσμωτική λύση μίας σειράς κυττάρων-στόχων. Αποτελεί μια από τις κύριες κυτταρολυτικές πρωτεΐνες των κυτταρολυτικών κόκκων, δρώντας ως ένα βασικό μόριο για την κυτταρόλυση μέσω των T και NK κυττάρων.(27)

Όπως έχει ήδη φανεί από προηγούμενες μελέτες ο σχηματισμός πόρου έχει διάμετρο περί τα 20 nm. (28) Είναι μία διαδικασία εξαρτώμενη από το ασβέστιο που βασίζεται σε μια σειρά από ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μονομερών της περφορίνης.(26,29) Αυτό το μέγεθος είναι περισσότερο από αρκετά μεγάλο για την άνετη διέλευση των GRZ μονομερή ή διμερή. Αυτή η παρατήρηση είναι σύμφωνη με κάθε μια από τις δυο υποθέσεις του πώς η περφορίνη παραδίδει τις GRZ στο κυτοσόλιο κυττάρου-στόχου. Σύμφωνα με μία υπόθεση, η απελευθέρωση της πρωτεογλυκάνης σεργλυκίνης (SG) εντός της ανοσοποιητικής σύναψης ακολουθείται από το σχηματισμό

πόρων για την περφορίνη στην κυτταρική μεμβράνη-στόχο που διευκολύνει την άμεση προαποπτωτική είσοδο των GRZ στο κυτοσόλιο. Εκεί, οι GRZ διασπών τα ενδογενή ενδοκυττάρια ή ιογενή υποστρώματα, οδηγώντας σε μη προγραμματισμένο αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο ή / και στη διακοπή της αναπαραγωγής του ιού.(30) Μία εναλλακτική υπόθεση προτείνει ότι η περφορίνη και οι GRZ βρίσκονται στα ενδοκυτταρικά κυστίδια εντός του κυττάρου-στόχου, και στη συνέχεια η περφορίνη λύει "από το εσωτερικό", μετακινώντας τις GRZ στο κυτοσόλιο. (31,32) Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία, οι GRZ μπορεί να παραμένουν σε ένα ενδοκυτταρικό διαμέρισμα λειτουργώντας με ένα υποδοχέα-ανεξάρτητο τρόπο, και το κύτταρο-στόχος να παραμένει υγιές χωρίς την ύπαρξη περφορίνης.(31,33,34) Σε αντίθεση, έχει προταθεί πρόσφατα ότι οι πόροι της περφορίνης είναι πολύ μικροί για να εισέρχονται οι γκρανζύμες, και αντ' αυτού, ο σχηματισμός τους ενεργοποιεί στο κύτταρο-στόχο το μηχανισμό επισκευής της μεμβράνης υπό τη μορφή της ενδοκυττάρωσης, διευκολύνοντας έτσι την πρόσληψη των γκρανζυμών.(32) Ωστόσο, δεν είναι σαφές πώς οι γκρανζύμες απελευθερώνονται στο κυτοσόλιο από τον αυλό αυτών των υποθετικών κυστιδίων.



Adapted from: <https://www.fmhs.auckland.ac.nz/en/sms/about/our-departments/auckland-cancer-society-research-centre/research-groups/medicinal-chemistry/inhibition-of-perforin.html>

2.Γκρανζύμες (GRZ)

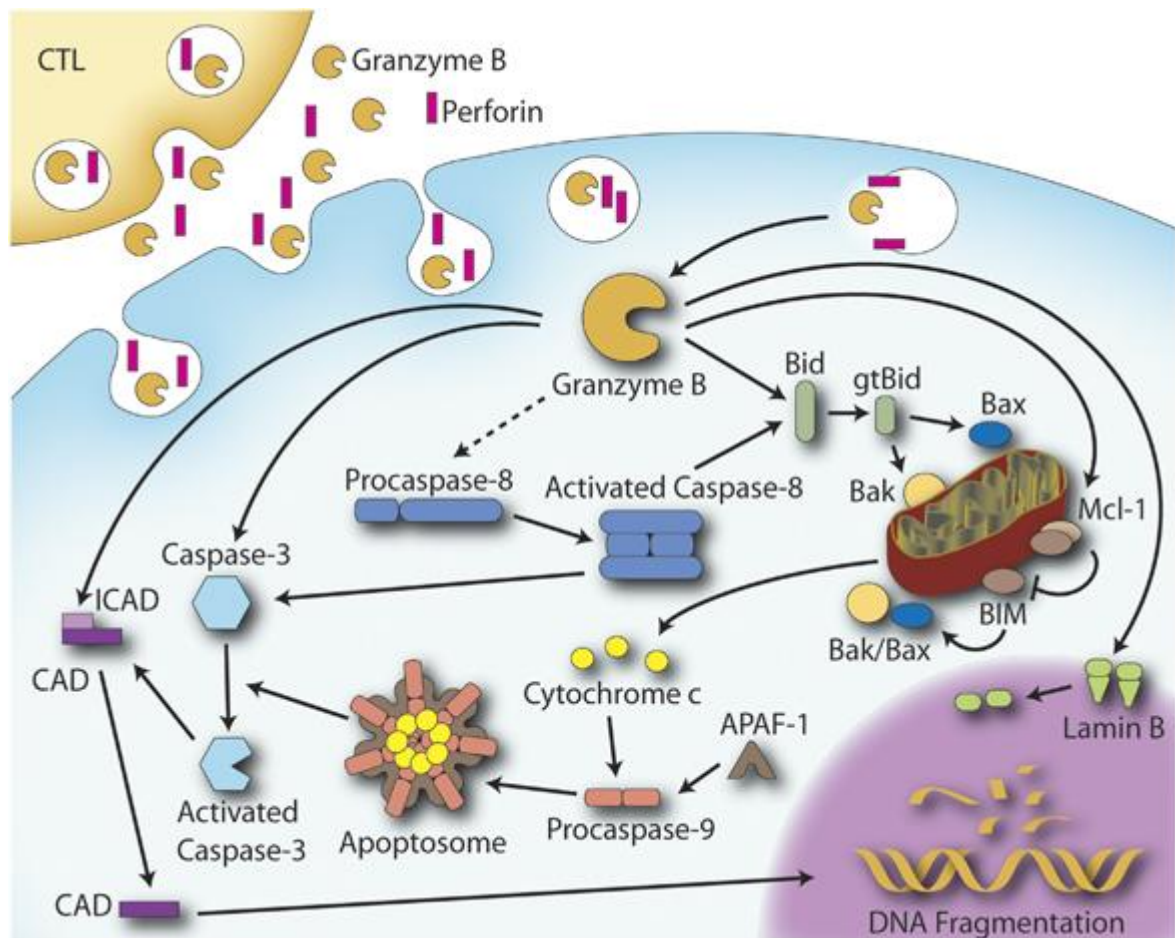
Οι γκρανζύμες είναι μια οικογένεια σερινοπρωτεασών που αποθηκεύονται εντός των κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων (CLS). Υπάρχουν 5 είδη γκρανζυμών που εκφράζονται στους ανθρώπους: A, B, H, K και M, και 11 σε ποντικούς (A, B, C, D, E, F, G, K, L, M και N). (35)

I. Γκρανζύμη B

Η γκρανζύμη B (GrB), έχει εκτενώς μελετηθεί κατά τη διάρκεια των τελευταίων δύο δεκαετιών. Ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά στα μέσα της δεκαετίας του 1980, όπου πολλές ομάδες ανέφεραν την παρουσία της πρωτεάσης σε κόκκους μέσα στα CLs. (36-39) Η GrB είναι μια 32-kDa πρωτεάση σερίνης που μοιάζει με χυμοθρυψίνη, και είναι γνωστή ως γκρανζύμη 2 ή σερίνη εστεράσης του κυτταροτοξικού T-λεμφοκύτταρου-1. Το γονίδιο που την κωδικοποιεί έχει μήκος 3500bp , περιέχει πέντε εξόνια και τέσσερα ιντρόνια και χάρτες στο χρωμόσωμα 14. (40) Όπως συμβαίνει και με τις κασπάσες, η GrB είναι υπεύθυνη για τη διάσπαση των πεπτιδίων που άμεσα γειτνιάζουν με το κατάλοιπο του ασπαρτικού (Asp) . (41,42) Αυτή η επιλεκτικότητα οφείλεται στη δομή της δραστηρικής θέσης της GrB, η οποία περιέχει μια αργινίνη (Arg). Το φαινόμενο της αλληλεπίδρασης μεταξύ Asp στη θέση P1 του υποστρώματος και της Arg εντός της δραστηρικής θέσης είναι το κλειδί για αλληλοεπίδραση του ενζύμου και του υποστρώματος. (43)

Η έκφραση της γκρανζύμης επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες που διεγείρουν την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού κυττάρου. Η μεταγραφική ενεργοποίηση της GrB εντός των T-λεμφοκυττάρων

εμπλέκει την ενεργοποίηση του υποδοχέα των κυττάρων T και τη διέγερση των κυτοκινών. (44) Όλοι οι παράγοντες μεταγραφής δρουν μαζί για τη ρύθμιση της έκφρασης της GrB. Είναι σαφές ότι κάθε μεταλλάξη σε οποιοδήποτε παράγοντα θα καταργήσει την έκφραση της GrB.(45,46) Στα T- λεμφοκύτταρα και τα NK κύτταρα, πολλοί από τους εξωκυττάριους παράγοντες που διεγείρουν την ενεργοποίηση των T κυττάρων, αυξάνουν επίσης την έκφραση της GrB, συμπεριλαμβανομένης της σύνθεσης της κυτοκίνης, τη δέσμευση του υποδοχέα, και την παρουσία των βοηθητικών ή των ρυθμιστικών CD4+ T κυττάρων. (44)



Intracellular versus extracellular granzyme B in immunity and disease: challenging the dogma. Wendy Anne Boivin, et.al Lab Invest. 2009.

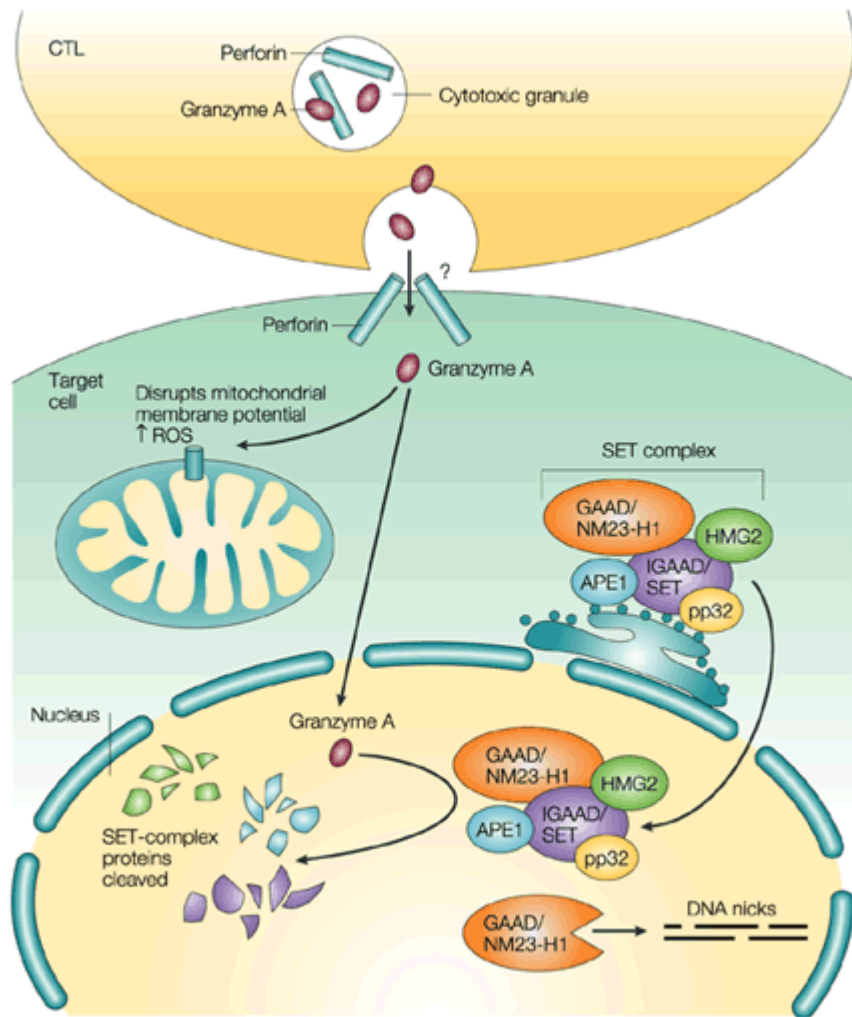
II. Γκρανζύμη A

Η γκρανζύμη A ενεργοποιεί τον κυτταρικό θάνατο μέσω ενός μηχανισμού ανεξάρτητο των κασπασών. Η γκρανζύμη A (GrA) συμμετέχει στο φαινόμενο της απόπτωσης, συμπεριλαμβανομένης της διόγκωσης της κυτταρικής μεμβράνης, της απώλειας του μιτοχονδριακού δυναμικού, τον κατακερματισμό του πυρήνα και τη συρρίκνωση της χρωματίνης. Η GrA προκαλεί μία χαρακτηριστική μορφή της βλάβης του DNA που είναι μονοκλωνική και όχι το συνήθη αποπτωτικό κατακερματισμό του DNA διπλής έλικας. (47)

Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι κατά την επαγωγή του κυτταρικού θανάτου, η GrA στοχεύει ένα σύμπλοκο του ενδπλασματικού δικτύου (ΕΔ) , γνωστό ως SET σύνθετο, το οποίο περιέχει δύο πρωτεΐνες καταστολής όγκου, την p32 και την GAAD (Granzyme-A-Activated DNase) / NM23H1 και τρία υποστρώματα της GrA, την πρωτεΐνη του συμπλόκου SET, την DNA-δεσμευτική πρωτεΐνη HMG2(High-Mobility Group Protein-2) και το ένζυμο επισκευής APE1__(απουρινική / απυριμιδική ενδονουκλεάση-1). Η GrA καταστρέφει τις γνωστές λειτουργίες αυτών των υποστρωμάτων. Αν και η φυσιολογική λειτουργία του συμπλόκου SET παραμένει άγνωστη, έχει προταθεί ότι διευκολύνει την ενεργοποίηση της μεταγραφής και της μεταγραφής που σχετίζονται με την επιδιόρθωση του DNA σε απόκριση στο οξειδωτικό στρες. Πράγματι, οι πρωτεΐνες σε αυτό το συγκρότημα μετατοπίζονται ταχέως στον πυρήνα ως απάντηση σε μια αύξηση του επιπέδου των ROS (Reactive Oxygen Species) και μετά από ενεργοποίηση της GrA και της περφορίνης. Η GrA καταστρέφει τρία μέλη του συμπλόκου SET,

συμπεριλαμβανομένης της πρωτεΐνης SET , το ένζυμο επισκευής APE1 και την HMG2. Όταν αυτές οι πρωτεΐνες καταστρέφονται, η πρωτεΐνη NM23H1 είναι ελεύθερη να κατακερματίσει το DNA χωρίς να ακολουθήσει επισκευή. Η NM23H1 είναι η GAAD και το SET είναι ο αναστολέας της, IGAAD (αναστολέας της GAAD). (48)

Επιπρόσθετα, η GrA στοχεύει και σε άλλες σημαντικές πυρηνικές πρωτεΐνες. Έτσι, η ανασταλτική δράση της έναντι της Ιστόνης-1 ενισχύει τον κατακερματισμό του DNA, και επάγει την καταστροφή των πυρηνικών λαμινών, το βασικό συστατικό του ενδιάμεσου νηματίου του πυρήνα, οι οποίες εξασφαλίζουν την πυρηνική ακεραιότητα. Μετά την ενεργοποίηση της GrA με την περφορίνη, οι κασπάσες δεν διασπώνται ή ενεργοποιούνται. Το κυτόχρωμα -C δεν απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια, αν και η μιτοχονδριακή μεμβράνη και τα μιτοχόνδρια γίνονται δυσλειτουργικά, όπως φαίνεται από το αυξημένο επίπεδο των ROS. Επιπλέον, ο επαγόμενος κυτταρικός θάνατος από τη GrA δεν αναστέλλεται από την υπερέκφραση του BCL2. (49)



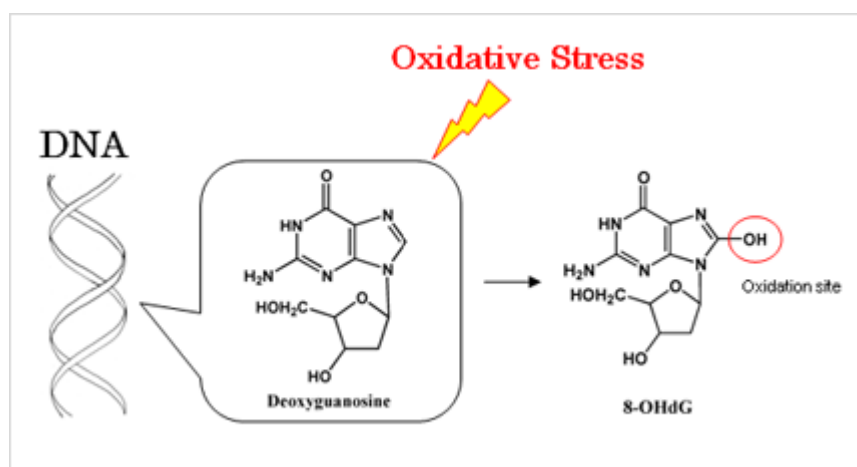
Nature Reviews | Immunology

The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal Judy Lieberman. *Nature Reviews Immunology*, 2003

3. 8-υδροξυ-δεοξυγουανοσίνη (8-OHdG)

Δεδομένα από προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η οξειδωτική βλάβη συμβαίνει μόνιμα στα λιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών, των πρωτεϊνών και του DNA. Μία από τις κυρίαρχες μορφές ελευθέρων ριζών που ελευθερώνεται από οξειδωτικές βλάβες στο πυρηνικό και μιτοχονδριακό DNA είναι η 8-υδροξυ-δεοξυγουανοσίνη (8-OHdG) ή 8-οξοδουγουανοσίνη (8-oxodG) και γι αυτό έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως βιοδείκτης οξειδωτικού στρες και στην καρκινογένεση. Μελέτες έδειξαν ότι η μέτρηση της 8-OHdG στα ούρα αποτελεί ένα καλό βιοδείκτη για την αξιολόγηση του κινδύνου των διαφόρων μορφών καρκίνου και εκφυλιστικών ασθενειών.(50,51)

Ως βιοδείκτης, η 8-OHdG έχει χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για τη μέτρηση της επίδρασης της ενδογενούς οξειδωτικής βλάβης στο DNA και ως παράγοντας για την έναρξη και την προώθηση της καρκινογένεσης. Επιπλέον έχει χρησιμοποιηθεί για να εκτιμηθεί η βλάβη του DNA σε ανθρώπους μετά από έκθεση σε καρκινογόνες ουσίες, όπως ο καπνός, οι ίνες αμιάντου, τα βαρέα μέταλλα και οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες. (52)



Adapted from Dr Marrota

4.Οξειδωτικό stress

Το οξειδωτικό stress φαίνεται να αποτελεί ένα σημαντικό μηχανισμό ενίσχυσης της φλεγμονής. Προηγούμενες μελέτες σε ασθενείς με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια έχουν ήδη βρει αυξημένους τους δείκτες του οξειδωτικού stress (υπεροξειδίου του υδρογόνου, 8-ισοπροστάνιο) στα πτύελα, το εκπνεόμενο συμπύκνωμα της αναπνοής αλλά και στην συστηματική κυκλοφορία.(53) Ο καπνός του τσιγάρου ο οποίος είναι ο κυριότερος περιβαλλοντικός βλαπτικός παράγοντας, περιέχει άφθονες ποσότητες ελεύθερων ριζών οξυγόνου, υπεροξειδία και περοξυνιτρίτη, τα οποία έχουν ως αποτέλεσμα την πρόκληση σοβαρού οξειδωτικού stress στους πνεύμονες.(53-56)

Οι συνέπειες του οξειδωτικού stress όπως η χημειοταξία και η ισχυρή προσκόλληση των λευκοκυττάρων έχουν σαν αποτέλεσμα την έναρξη της διαδικασίας της φλεγμονής. Η στρατολόγηση φλεγμονωδών κυττάρων όπως τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα επίσης συνεισφέρει στην διαδικασία της οξείδωσης μέσω απελευθέρωσης ειδικών ενζύμων.(57) Έτσι ο καπνός του τσιγάρου και η τοπική απελευθέρωση οξειδωτικών παραγόντων θέτει σε λειτουργία έναν φαύλο κύκλο ο οποίος προάγει μια παθολογική φλεγμονώδη απάντηση.

Βιβλιογραφία Γενικού Μέρους

1. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Global Initiative for Asthma (GINA) 2014. Available from <http://www.ginasthma.org>
2. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Global Initiative for Asthma (GINA) 2009. GINA website. <http://www.ginasthma.org/>
3. Althuis M, Sexton M, Prybylski D. Cigarette smoking and asthma symptom severity among adult asthmatics. *J Asthma* 1999; 36:257-264.
4. Siroux V, Pin I, Oryszcyn MP, Le Moual N, Kauffmann F. Relationships of active smoking to asthma and asthma severity in the EGEA study. *Eur Respir J* 2000; 15:470-477.
5. Sippel JM, Pedula KL, Vollmer WM, Buist AS, Osborne ML. Associations of smoking with hospital-based care and quality of life in patients with obstructive airway disease. *Chest* 1999; 115:691-696.
6. Silverman RA, Boudreaux ED, Woodruff PG, Clark S, Camargo CA Jr. Cigarette smoking among asthmatic adults presenting to 64 emergency departments. *Chest* 2003; 123:1472-1479.
7. Gallefoss F, Bakke P. Does smoking affect the outcome of patient education and self management in asthmatics? *Patient Educ Couns* 2003; 49:91-97.

8. Barnes PJ, Chung KF, Page CP. Inflammatory mediators of asthma:an update. *Pharmacol Rev* 1998;50:515-596.
9. James A. Airway remodeling in asthma. *Curr Opin Pulm Med* 2005;11:1-6.
10. Vignola AM, Mirabella F, Costanzo G et al. Airway remodeling in asthma. *Chest* 2003; 123:417-422.
11. Wang L,McParland BE, Pare PD. The functional consequences of structural changes in the airways: implications for airway hyperresponsiveness in asthma. *Chest* 2003; 123:356-362.
12. McParland BE, Macklem PT, Pare PD. Airway wall remodeling: friend or foe? *J Appl Physiol* 2003; 95:426-434.
13. Auerbach A, Hernandez ML. The effect of environmental oxidative stress on airway inflammation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2012; 12 (2): 133 - 139.
14. Faux SP, Tai T , Thorne D, Xu Y, Breheny D, Gaca M. The role of oxidative stress in the biological responses of lung epithelial cells to cigarette smoke. *Biomarkers.* 2009; 14 (suppl 1): 90 - 96.
15. Chrysofakis G, Tzanakis N, Kyriakoy D, et al. Perforin expression and cytotoxic activity of sputum CD8 1 lymphocytes in patients with COPD. *Chest.* 2004; 125 (1): 71 - 76.
16. James KM, Peebles RS Jr, Hartert TV. Response to infections in patients with asthma and atopic disease: an epiphenomenon or reflection of host susceptibility? *J Allergy Clin Immunol.* 2012; 130 (2): 343 - 351.

17. Hams E, Fallon PG. Innate type 2 cells and asthma. *Curr Opin Pharmacol.* 2012; 12 (4): 503 - 509.
18. Langier S, Sade K, Kivity S. Regulatory T cells in allergic asthma. *Isr Med Assoc J.* 2012; 14 (3): 180 - 183.
19. Nakagome K, Matsushita S, Nagata M. Neutrophilic inflammation in severe asthma. *Int Arch Allergy Immunol.* 2012; 158 (suppl 1): 96 - 102.
20. Anthony DA, Andrews DM, Watt SV, Trapani JA, Smyth MJ. Functional dissection of the granzyme family: cell death and inflammation. *Immunol Rev.* 2010; 235 (1): 73 - 92.
21. Pardo J, Aguilo JJ, Anel A, et al. The biology of cytotoxic cell granule exocytosis pathway: granzymes have evolved to induce cell death and inflammation. *Microbes Infect.* 2009; 11(4): 452 - 459.
22. Rosado CJ, Kondos S, Bull TE, Kuiper MJ, Law RH, Buckle AM, Voskoboinik I, Bird PI, Trapani JA, Whisstock JC, Dunstone MA. The MACPF/CDC family of pore-forming toxins. *Cell. Microbiol.* 2008; 10, 1765–1774
23. Hadders MA, Beringer DX, Gros P. Structure of C8 - MACPF reveals mechanism of membrane attack in complement immune defense. *Science.* 2007; 317, 1552–1554.
24. Rosado CJ, Buckle AM, Law RH, Butcher RE, Kan WT, Bird CH, Ung K, Browne KA, Baran K, Bashtannyk-Puhlovich TA, Faux NG, Wong W, Porter CJ, Pike RN, Ellisdon AM, Pearce MC, Bottomley SP, Emsley, J., Smith, A. I., Rossjohn, J., Hartland, E.

- L., Voskoboinik, I., Trapani, J. A., Bird, P. I., Dunstone, M. A., Whisstock, J. C. A common fold mediates vertebrate defense and bacterial attack. *Science* 2007,317, 1548–1551.
25. Slade, DJ., Lovelace, L. L., Chruszcz, M., Minor, W., Lebioda, L., Sodetz, J. M. Crystal structure of the MACPF domain of human complement protein C8 in complex with the C8 subunit. *J. Mol. Biol* 2008. 379, 331–342.
26. Baran, K., Dunstone, M., Chia, J., Ciccone, A., Browne, K. A., Clarke, C. J. P., Lukoyanova, N., Saibil, H., Whisstock, J. C., Voskoboinik, I., Trapani, J. A. (2009) The molecular basis for perforin oligomerization and transmembrane pore assembly. *Immunity* 30, 684–695.
27. Shinkai Y, Yoshida MC, Maeda K, Kobata T, Maruyama K, Yodoi J, Yagita H, Okumura K. “Molecular cloning and chromosomal assignment of a human perforin (PFP) gene”. *Immunogenetics* 1990. 30 (6): 452–7. doi:10.1007/BF02421177. PMID2592021
28. Young, J. D., Hengartner, H., Podack, E. R., Cohn, Z. A. (1986) Purification and characterization of a cytolytic pore-forming protein from granules of cloned lymphocytes with natural killer activity. *Cell* 44, 849–859.
29. Voskoboinik, I., Thia, M. C., Fletcher, J., Ciccone, A., Browne, K., Smyth, M. J., Trapani, J. A. (2005) Calcium-dependent plasma membrane binding and cell lysis by perforin are mediated through its C2 domain: a critical role for aspartate residues 429, 435, 483, and 485 but not 491. *J. Biol. Chem.* 280, 8426–8434

30. Kurschus, F. C., Fellows, E., Stegmann, E., Jenne, D. E. (2008) Granzyme B delivery via perforin is restricted by size, but not by heparan sulfate- dependent endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 13799–13804.
31. Browne, K. A., Blink, E., Sutton, V. R., Froelich, C. J., Jans, D. A., Trapani, J. A. (1999) Cytosolic delivery of granzyme B by bacterial toxins: evidence that endosomal disruption, in addition to transmembrane pore formation, is an important function of perforin. *Mol. Cell. Biol.* 19, 8604– 8615.
32. Keefe, D., Shi, L., Feske, S., Massol, R., Navarro, F., Kirchhausen, T., Lieberman, J. (2005) Perforin triggers a plasma membrane-repair response that facilitates CTL induction of apoptosis. *Immunity* 23, 249–262.
33. Trapani, J. A., Sutton, V. R., Thia, K. Y., Li, Y. Q., Froelich, C. J., Jans, D. A., Sandrin, M. S., Browne, K. A. (2003) A clathrin/dynamin- and mannose-6-phosphate receptor-independent pathway for granzyme B-induced cell death. *J. Cell Biol.* 160, 223–233.
34. Shi, L., Mai, S., Israels, S., Browne, K., Trapani, J. A., Greenberg, A. H. (1997) Granzyme B (GraB) autonomously crosses the cell membrane and perforin initiates apoptosis and GraB nuclear localization. *J. Exp. Med.* 185, 855–866.
35. Bots M, Medema JP. Granzymes at a glance. *J Cell Sci* 2006;119(Part 24):5011–5014.

36. Bleackley RC, Duggan B, Ehrman N, et al. Isolation of two cDNA sequences which encode cytotoxic cell proteases. *FEBS Lett* 1988;234:153–159.
37. Brunet JF, Dosseto M, Denizot F, et al. The inducible cytotoxic T-lymphocyte-associated gene transcript CTLA-1 sequence and gene localization to mouse chromosome 14. *Nature* 1986;322:268–271.
38. Masson D, Nabholz M, Estrade C, et al. Granules of cytolytic T-lymphocytes contain two serine esterases. *EMBO J* 1986;5:1595–1600.
39. Pasternack MS, Eisen HN. A novel serine esterase expressed by cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 1985;314:743–745.
40. Klein JL, Shows TB, Dupont B, et al. Genomic organization and chromosomal assignment for a serine protease gene (CSPB) expressed by human cytotoxic lymphocytes. *Genomics* 1989;5:110–117.
41. Poe M, Blake JT, Boulton DA, et al. Human cytotoxic lymphocyte granzyme B. Its purification from granules and the characterization of substrate and inhibitor specificity. *J Biol Chem* 1991;266:98–103.
42. Murphy ME, Moulton J, Bleackley RC, et al. Comparative molecular model building of two serine proteinases from cytotoxic T lymphocytes. *Proteins* 1988;4:190–204.
43. Waugh SM, Harris JL, Fletterick R, et al. The structure of the proapoptotic protease granzyme B reveals the molecular determinants of its specificity. *Nat Struct Biol* 2000;7:762–765.

44. Chowdhury D, Lieberman J. Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. *Annu Rev Immunol* 2008;26: 389–420.
45. Wargnier A, Lafaurie C, Legros-Maida S, et al. Down-regulation of human granzyme B expression by glucocorticoids. Dexamethasone inhibits binding to the Ikaros and AP-1 regulatory elements of the granzyme B promoter. *J Biol Chem* 1998;273:35326–35331.
46. Babichuk CK, Bleackley RC. Mutational analysis of the murine granzyme B gene promoter in primary T cells and a T cell clone. *J Biol Chem* 1997;272:18564–18571.
47. Fan Z, Beresford PJ, Oh DY, Zhang D, Lieberman J. Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell*. 2003 Mar 7;112(5):659-72.
48. Fan Z, Beresford PJ, Zhang D, Xu Z, Novina CD, Yoshida A, Pommier Y, Lieberman J. Cleaving the oxidative repair protein Ape1 enhances cell death mediated by granzyme A. *Nat Immunol*. 2003 Feb;4(2):145-53. Epub 2003 Jan 13.
49. Lieberman J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol*. 2003 May;3(5):361-70.
50. Kasai H. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2 deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutation Research* 1997;387:147–163.

51. Shigenaga MK, Gimeno CJ, Ames BN. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage. *Proceedings National Academy of Sciences, USA* 1989;86:9697-9701
52. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A Critical Biomarker of Oxidative Stress and Carcinogenesis. *Journal of Environmental Science and Health, Part C: Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews* Volume 27, Issue 2, 2009
53. Rahman I. Oxidative stress in pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: cellular and molecular mechanisms. *Cell Biochem Biophys* 2005; 43(1):167-88.
54. Pryor WA. Biological effects of cigarette smoke, wood smoke, and the smoke from plastics: the use of electron spin resonance. *Free Radic Biol Med.* 1992 Dec; 13(6):659-76.
55. Ludwig PW, Hoidal JR. Alterations in leukocyte oxidative metabolism in cigarette smokers. *Am Rev Respir Dis.* 1982 Dec; 126(6):977-80.
56. Repine JE, Bast A, Lankhorst I. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. Oxidative Stress Study Group. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997 Aug; 156(2 Pt 1):341-57.
57. Hoidal JR, Jeffery PK. Cellular and biochemical mechanisms in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir Mon,* 1998, 7, 84-91.

Πανεπιστήμιο Κρήτης

Ιατρική Σχολή

**ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ ΤΗΣ
ΥΠΟΨΗΦΙΟΥ ΔΙΔΑΚΤΟΡΑ**

ΠΡΟΚΛΟΥ ΑΘΑΝΑΣΙΑ

<<Οξειδωτική βλάβη του DNA στο Άσθμα>>

Εισαγωγή

Στο γενικό εισαγωγικό μέρος της εκπόνησης αυτής της διατριβής αναφέρθηκε ότι η συχνότητα του καπνίσματος στους ενήλικες με άσθμα είναι υψηλή (17-35%) και πλησιάζει αυτή του γενικού πληθυσμού.(1) Προηγούμενες μελέτες αποδεικνύουν ότι συγκριτικά με τους ασθενείς που δεν καπνίζουν, τόσο η θνητότητα, όσο και η νοσηρότητα αυξάνονται στους ασθενείς με άσθμα που καπνίζουν. Οι ασθματικοί καπνιστές έχουν βαρύτερα συμπτώματα άσθματος, μεγαλύτερη ανάγκη για φάρμακο ανακούφισης και χειρότερους δείκτες βαρύτητας της νόσου συγκριτικά με τους μη καπνιστές ασθματικούς. Έχουν ταχύτερο ρυθμό ετήσιας έκπτωσης του FEV1 και επιπλέον οι επισκέψεις στα επείγοντα ιατρεία των νοσοκομείων και οι εισαγωγές στο νοσοκομείο ή στις μονάδες εντατικής θεραπείας αφορούν συχνότερα στους βαρύτερους καπνιστές με άσθμα.(2,3) Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι οι ασθενείς με άσθμα που καπνίζουν αναπτύσσουν κάποιο είδος αντίστασης στη θεραπεία με κορτικοστεροειδή παράλο που δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως οι υποκείμενοι μηχανισμοί αντίστασης σε αυτά.(4,5) Η παθοφυσιολογία των αεραγωγών στους ασθενείς με άσθμα που καπνίζουν φαίνεται να διαφοροποιείται από την πορεία της φλεγμονής και αναδιαμόρφωσης που παρατηρείται στους υπόλοιπους ασθενείς με άσθμα και η διερεύνηση των ιδιομορφιών αυτών πιθανώς να βοηθήσει στην κατανόηση των μηχανισμών αντίστασης στα κορτικοστεροειδή αλλά και στην αναζήτηση νέων θεραπευτικών επιλογών, πιο στοχευόμενων και άρα πιο αποτελεσματικών.(4,6,7)

Σε κάθε περίπτωση η ταυτοποίηση των ασθματικών φαινοτύπων είναι πολύ σημαντική στη σύγχρονη αντιμετώπιση του άσθματος. Ο

φαινότυπος αυτός μπορεί να διερευνηθεί με μη επεμβατικές μεθόδους, επιτρέποντας έτσι τη στοχευόμενη – εξατομικευμένη θεραπεία, η οποία είναι πολύ πιο αποτελεσματική στο σοβαρό άσθμα. Σήμερα μεγάλη ποικιλία μεθόδων και βιολογικών δεικτών μη επεμβατικής αξιολόγησης της φλεγμονής των αεραγωγών είναι διαθέσιμες. Οι βιολογικοί αυτοί δείκτες που χρησιμοποιούνται για τη μη επεμβατική αξιολόγηση της φλεγμονής μπορούν να συλλεχθούν με ποικίλες μεθόδους από διάφορα βιολογικά υλικά, συμπεριλαμβανομένων των προκλητών πτυέλων, του συμπυκνώματος του εκπνεόμενου αέρα, του περιφερικού αίματος και των ούρων.

Οι επεμβατικές μέθοδοι όπως το βρογχοκυψελιδικό έκλυμα και η διαβρογχική βιοψία έχουν περιορισμένη χρησιμότητα στην παρακολούθηση του άσθματος, δεδομένου ότι δε μπορούν να χρησιμοποιηθούν κατ' επανάληψη. Συνεπώς, οι μη επεμβατικές μέθοδοι αναπτύχθηκαν για να καλύψουν και αυτή την ανάγκη. Οι μετρήσεις των τεχνικών αυτών περιλαμβάνουν προσδιορισμούς κυτταρικών πληθυσμών και μεσολαβητών σε βιολογικά υγρά.

Προκλητά πτύελα

Τα προκλητά πτύελα θεωρούνται μια ελάχιστα επεμβατική μέθοδος συλλογής βιολογικού δείγματος, ασφαλώς λιγότερο επεμβατική από τη βρογχοσκόπηση με λήψη βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (BAL) και βιοψιών.(8) Κατά γενική αποδοχή τα προκλητά πτύελα κατηγοριοποιούνται στις μη επεμβατικές μεθόδους και χρησιμοποιούνται για τη μελέτη των χαρακτηριστικών και της έντασης της φλεγμονής των κατώτερων αεραγωγών στο άσθμα. Τα κυριότερα μειονεκτήματα των προκλητών πτυέλων είναι ότι τα αποτελέσματα δεν είναι άμεσα

διαθέσιμα και ότι η ανάλυσή τους απαιτεί ειδικό εργαστήριο. Από την επεξεργασία των πτυέλων μπορούμε να λάβουμε πληροφορίες για τους κυτταρικούς υποπληθυσμούς και να υπολογίσουμε τις ποσοστιαίες αναλογίες των ηωσινόφιλων και ουδετερόφιλων κυττάρων.(8) Δεδομένου ότι η πρόκληση πτυέλων πραγματοποιείται με την επαναλαμβανόμενη εισπνοή υπέρτονου διαλύματος NaCl, πρέπει να ληφθούν αυστηρές προφυλάξεις όταν πραγματοποιείται η δοκιμασία εξαιτίας του πιθανού έντονου βρογχόσπασμου σε ασθενείς με βαρύ άσθμα και χαμηλό FEV1. Η χαμηλή τιμή του FEV1 αποτελεί σχετική αντένδειξη για την πραγματοποίηση της πρόκλησης πτυέλων σε ασθματικούς ασθενείς. Η μέθοδος δε μπορεί να είναι απόλυτα ασφαλής, δεδομένου ότι επεισόδιο αιφνίδιου και σοβαρού βρογχόσπασμου μπορεί να συμβεί ακόμα και σε ασθενείς με φυσιολογική αναπνευστική λειτουργία που έχουν λάβει προφυλακτικά εισπνεόμενους β2-αγωνιστές πριν τη δοκιμασία. Η ομάδα εργασίας του ERS συνιστά την έναρξη με στείρο διάλυμα NaCl 0,9% και διάρκεια της δοκιμασίας επαγωγής 30 δευτερόλεπτα, 1 λεπτό και 5 λεπτά (μετρώντας τον FEV1 μετά από κάθε περίοδο χορήγησης). Εάν δεν επιτύχει η πρόκληση με αύξηση της συγκέντρωσης στο 3%, ακολουθεί αύξηση του χρόνου πρόκλησης για 30 δευτερόλεπτα, 1 λεπτό και 2 λεπτά. Εάν εξακολουθεί να μην υπάρχει αποτέλεσμα αυξάνουμε περαιτέρω τη συγκέντρωση στο 4,5% για 30 δευτερόλεπτα, 1 λεπτό, 2 λεπτά, 4 λεπτά και 8 λεπτά. Εάν ο ασθενής δε μπορεί να υποβληθεί στη διαδικασία της πρόκλησης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα αποτελέσματα των αυτόματων δειγμάτων, παρόλο που δε συνιστάται η χρήση δειγμάτων αυτόματης απόχρεμψης, εξαιτίας του μικρότερου αριθμού ζωντανών κυττάρων και της χαμηλότερης ποιότητας του δείγματος σε σύγκριση με τα προκλητά πτύελα (9).

Κυτταροτοξικότητα και οξειδωτική βλάβη του DNA στους ασθματικούς

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

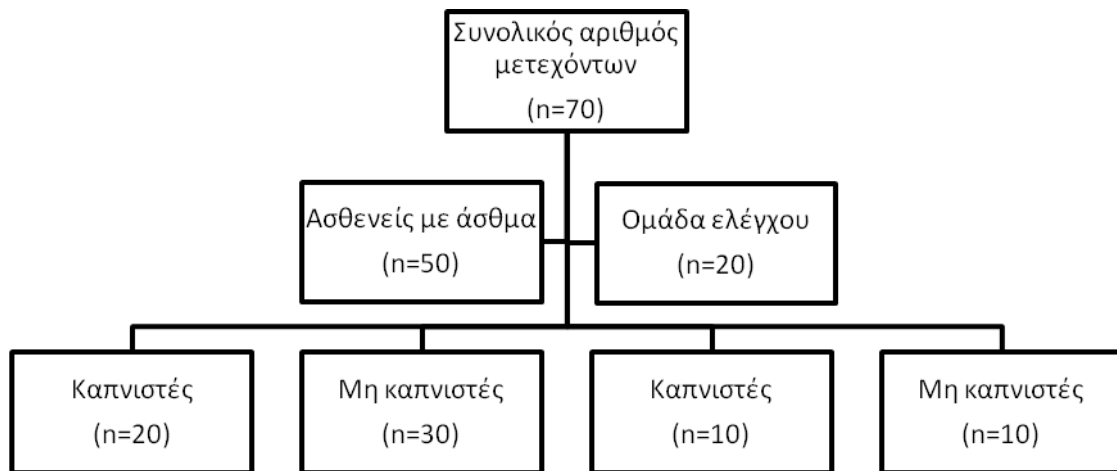
Άτομα μελέτης

Τα άτομα που εισήχθησαν στη μελέτη προέρχονται από μια μεγάλη ομάδα ασθενών και υγιών ατόμων που παρακολουθούνται από τα εξωτερικά ιατρεία άσθματος της Πανεπιστημιακής Πνευμονολογικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής Κρήτης, το 1ο Πανεπιστημιακό Τμήμα της Πνευμονολογικής Κλινικής, και την 7η Πνευμονολογική Κλινική του Τμήματος & Κέντρου άσθματος και Νοσημάτων Θώρακος, Νοσοκομείο «Σωτηρία», Αθήνα, μετά από διάστημα παρακολούθησης τουλάχιστον δύο ετών. Η διάγνωση του άσθματος επιβεβαιώθηκε σύμφωνα με τα κριτήρια της Παγκόσμιας Πρωτοβουλίας για το Άσθμα (GINA).(10) Τις ομάδες αποτέλεσαν ασθενείς με επίμονο, ήπιο έως μέτριο άσθμα, σύμφωνα με τα κριτήρια της Παγκόσμιας Πρωτοβουλίας για το Άσθμα (GINA).

Συμμετείχαν στη μελέτη 20 ασθματικοί καπνιστές, ηλικίας 41.3 ± 11.6 ετών και 30 μη καπνιστές ασθματικοί ασθενείς, ηλικίας $47,4 \pm 21$ ετών.

Επιπλέον, περιλήφθηκαν στη μελέτη 10 ενεργείς καπνιστές και 10 μη καπνιστές υγιείς εθελοντές, χωρίς γνωστή νόσο αεραγωγών και με

φυσιολογικές λειτουργικές δοκιμασίες των πνευμόνων.



Όλοι οι ασθενείς με άσθμα λάμβαναν σταθερή θεραπεία με εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή.

Τα κριτήρια εισαγωγής στη μελέτη περιελάμβαναν:

- ηλικία >18 έτη,
- διάγνωση ήπιου έως μέτριου άσθματος σύμφωνα με την ταξινόμηση κατά GINA,
- ενώ ως καπνιστές ορίστηκαν οι ασθενείς που είχαν καπνιστικό ιστορικό τουλάχιστον 10 πακέτα/έτος.

Τα κύρια κριτήρια αποκλεισμού ήταν:

- FEV1 <1,2 λίτρα,
- χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια,
- βρογχεκτασίες,
- άλλη σοβαρή συνοσηρότητα όπως κακοήθεια, καρδιακή/ηπατική/νεφρική ανεπάρκεια

- λοίμωξη του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος ή/και χρήση αντιβιοτικών ή κορτικοστεροειδών από το στόμα 2 μήνες πριν από την ένταξη στην μελέτη.

Όλοι οι συμμετέχοντες δέχτηκαν εγγράφως τη συμμετοχή τους στη μελέτη μετά από κατάλληλη ενημέρωση. Οι επιστημονικές επιτροπές και των δύο νοσοκομείων στα οποία υπάγονται οι Πανεπιστημιακές Πνευμονολογικές Κλινικές ενέκριναν τη διεξαγωγή της παρούσας μελέτης.

Προκλητή απόχρεμψη

Η προκλητή απόχρεμψη έγινε με βάση ήδη δημοσιευμένα πρωτόκολλα μεθοδολογίας.(11) Η διαδικασία πρόκλησης πτυέλων πραγματοποιήθηκε μέσω εισπνοής ενός αερολύματος υπέρτονου αλατούχου (3% έως 5%), από ένα υπερηχητικό εκνεφωτή (Ultraneb 2000, DeVilbiss Healthcare LLC) σύμφωνα με τα πρωτόκολλα προτύπου. (12)

Το δείγμα των προκλητών πτυέλων θεωρήθηκε κατάλληλο όταν είχε όγκο τουλάχιστον 2ml και όταν τα επιστρωμένα με κυτταρικό πληθυσμό πλακίδια περιείχαν επιθηλιακά κύτταρα σε ποσοστιαία αναλογία <10% του συνολικού αριθμού των κυττάρων. Τα επιλεγμένα βύσματα πτυέλων επώαστηκαν για 15 min με ένα όγκο 0,1% διθειοθρεϊτόλη (DTT) (αραιωμένη σε αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών) ίσο με τέσσερις φορές το βάρος του δείγματος. Ένας ίσος όγκος αλατούχου φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (PBS) προστέθηκε στο μίγμα, ακολουθούμενο από μία περαιτέρω περίοδο επώσεως 5 λεπτών. Στα επόμενα βήματα περιλαμβάνονταν φιλτράρισμα προς απομάκρυνση

συντριμμίων και υπολειμμάτων βλέννης, και φυγοκέντρωση για το διαχωρισμό των κυττάρων από την υγρή φάση. Τα δείγματα πτυέλων με βιωσιμότητα των κυττάρων > 80% θεωρήθηκαν κατάλληλα για περαιτέρω ανάλυση. Στο τέλος της επεξεργασίας του δείγματος το υπερκείμενο των προκλητών πτυέλων αποθηκεύτηκε σε πλαστικά φιαλίδια στους -80 ° C για μεταγενέστερη έρευνα.

Από την τελική επεξεργασία των πτυέλων προσδιορίσαμε την % αναλογία των φλεγμονωδών κυττάρων και από το υπερκείμενο αυτό των πτυέλων υπολογίσαμε τα επίπεδα τους. Μετά από κατάλληλη επεξεργασία του δείγματος, σε κάθε πλακίδιο μετρήθηκαν τουλάχιστον 500 κύτταρα. Ο συνολικός αριθμός κυττάρων εκφράσθηκε ως αριθμός κυττάρων $\times 10^6$. Τα φλεγμονώδη κύτταρα των πτυέλων που αναγνωρίστηκαν και μετρήθηκαν εκφράσθηκαν ως % αναλογία στο συνολικό αριθμό κυττάρων και ως απόλυτος αριθμός κυττάρων ($\times 10^6/\text{ml}$).

Πνευμονική λειτουργία

Σε όλα τα άτομα που συμμετείχαν στη μελέτη εκτιμήθηκε ο βίαια εκπνεόμενος όγκος το 1^ο δευτερόλεπτο (FEV1), η ζωτική χωρητικότητα (FVC), ο μεταξύ τους λόγος (FEV1/FVC), προ και μετά τη χορήγηση μιας δόσης βρογχοδιασταλτικού φαρμάκου. Οι μετρήσεις έγιναν σύμφωνα με τις οδηγίες της Αμερικάνικης Εταιρείας Θώρακος (ATS) χρησιμοποιώντας τη συσκευή Jaeger, Master Laboratory 2.12.

Ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία ανίχνευσης (ELISA)

Για την μέτρηση της 8-OHdG χρησιμοποιήθηκε το OxiSelect Oxidative DNA Damage ELISA Kit (Cell Biolabs Inc). Η περφορίνη μετρήθηκε με το Perforin Human ELISA Kit (Abcam plc). Τα επίπεδα Granzyme A

και Β προσδιορίσθηκαν με το Human Granzyme A Platinum ELISA kit και Human Granzyme B Platinum ELISA kit, αντίστοιχα (eBioscience, Inc). Η συσκευή ELx808 Absorbance Microplate Reader (BioTek Instruments Inc) χρησιμοποιήθηκε ακολουθώντας τα προτεινόμενα πρωτόκολλα .

Στατιστική Ανάλυση

Οι διαφορές έκφρασης της περφορίνης, granzyme A και B, και 8-OHdG μεταξύ των τεσσάρων ομάδων μελέτης προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία t-test, και με τη βοήθεια του Mann-Whitney U-test για τις μεταβλητές οι οποίες δεν εμφάνιζαν κανονική κατανομή καθώς και με τη δοκιμή Kruskal-Wallis H. Για τη συσχέτιση με τις συνεχείς μεταβλητές (ηλικία, ΔΜΣ, πακέτα/έτη, σπυρομετρικές τιμές) χρησιμοποιήθηκε η Pearson ή η μη παραμετρική Spearman κατανομή. Τέλος, η δοκιμή χ^2 χρησιμοποιήθηκε για την σύνδεσή τους με τις διάφορες κλινικές παραμέτρους. Τιμές $p < 0.05$ θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές στο επίπεδο του 95%. Η στατιστική ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα SPSS 11.5 (IBM) και ήταν δύο όψεων.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ

Δημογραφικά χαρακτηριστικά

Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ατόμων που συμμετείχαν στη μελέτη συνοψίζονται στον Πίνακα 1. Όλες οι εξεταζόμενες ομάδες είχαν την ίδια περίπου ηλικία ($p=0,85$). Ο βαθμός έκθεσης στο κάπνισμα

μεταξύ των καπνιστών ασθενών με άσθμα και των “υγιών” καπνιστών ήταν παρόμοιος ($p= 0,37$). Επιπλέον, και οι δύο ομάδες άσθματος υποβλήθηκαν σε αγωγή με μέση δόση των εισπνεόμενων κορτικοστεροειδών. Ωστόσο, οι δύο ομάδες άσθματος ήταν περισσότερο παχύσαρκοι από ό, τι οι δύο «υγιείς» ομάδες ($p =0,035$) και είχαν χαμηλότερο FEV₁ / FVC ($p =0,003$).

Πίνακας 1. Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά και σπυρομετρικά δεδομένα των τεσσάρων ομάδων μελέτης.

Characteristic	Smoking Patients With Asthma (n = 20)	Nonsmoking Patients With Asthma (n = 30)	Smokers (n = 10)	Nonsmokers (n = 10)	P Value ^a
Demographic data					
Sex, male (female)	9 (11)	8 (22)	2 (8)	6 (4)	.14 ^b
Age, y	41.3 ± 11.6	47.4 ± 21.0	41.0 ± 8.7	40.3 ± 2.8	.85
Smoking, pack-y	16.1 ± 12.5	...	19.0 ± 9.637
BMI	27.6 ± 6.3	30.3 ± 5.7	24.1 ± 2.1	24.1 ± 1.0	.035
Spirometric measurements					
FEV ₁ , % predicted	88.1 ± 18.9	88.0 ± 25.0	104.1 ± 8.5	101.5 ± 4.3	.12
FVC, % predicted	101.5 ± 17.0	100.7 ± 22.5	106.5 ± 10.2	100.6 ± 3.0	.87
FEV ₁ /FVC, %	72.6 ± 6.9	72.1 ± 10.8	83.9 ± 5.0	85.1 ± 2.9	.003
Reversibility, %	12 ± 3	16 ± 4	8 ± 1	5 ± 1	.024

All values are presented as mean ± SD. P values refer to the simultaneous comparison of the four study groups.

^aKruskal-Wallis H test.

^b χ^2 Test.

Κυτταροτοξικότητα και οξειδωτική βλάβη του DNA

Οι καπνιστές ασθματικοί εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα όλων των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν σε σύγκριση με τους μη καπνιστές ασθματικούς, τους καπνιστές και την ομάδα ελέγχου. (Πίνακας 2) Ωστόσο, μόνον η έκφραση της περφορίνης ήταν στατιστικά σημαντικά διαφορετική μεταξύ των τεσσάρων ομάδων μελέτης ($p= 0,015$).

Πίνακας 2: Τιμές Περφορίνης, Γκρανζύμης Α και Β, και 8-OHdG στις τέσσερις ομάδες μελέτης.

Protein	Smoking Patients With		Nonsmoking Patients With		P Value ^a
	Asthma (n=20)	Asthma (n=30)	Smokers (n=10)	Nonsmokers (n=10)	
Perforin	133.5 ± 45.1	53.1 ± 36.7	52.9 ± 30.1	19.2 ± 11.1	.015
Granzyme A	596.8 ± 315.0	222.0 ± 74.2	80.7 ± 34.4	31.7 ± 20.5	.13
Granzyme B	727.5 ± 287.8	253.6 ± 53.9	188.1 ± 21.2	25.8 ± 18.7	.079
8-OHdG	93.6 ± 9.9	69.3 ± 7.6	82.7 ± 19.4	41.5 ± 14.8	.080

All values are presented as mean ± SEM. P values refer to the simultaneous comparison of the four study groups.

^aKruskal-Wallis H test.

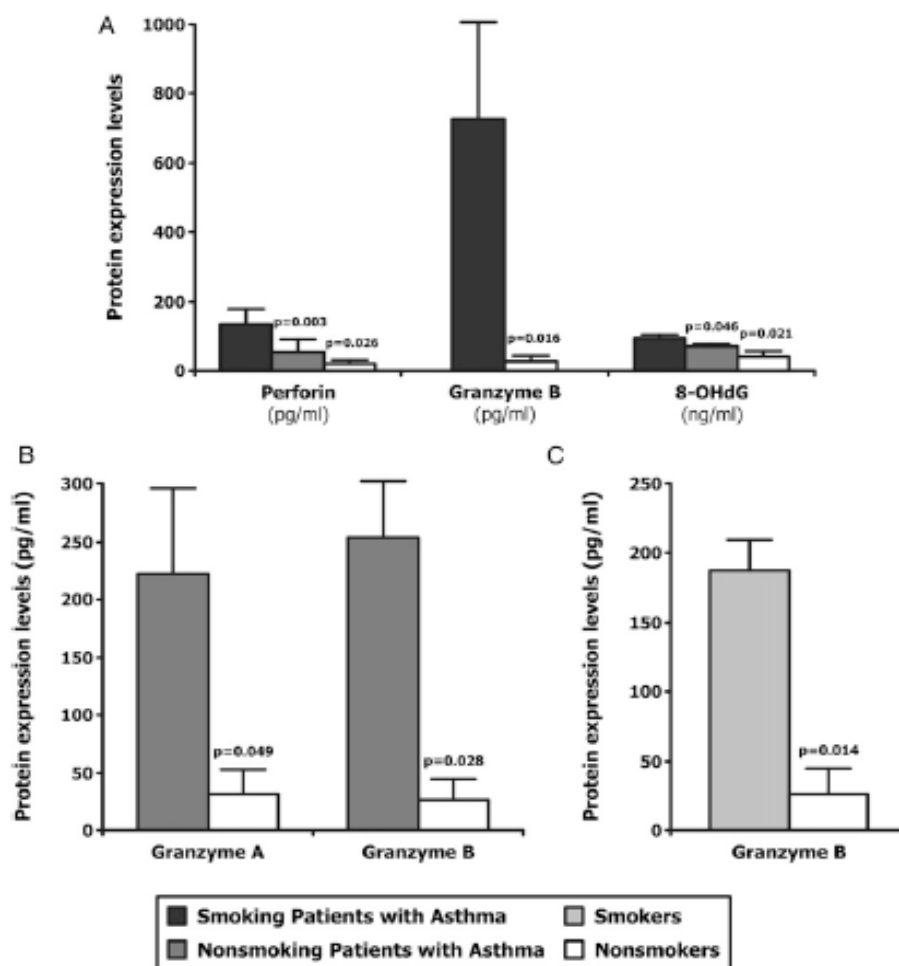
Η κατά ζεύγη ανάλυση αποκάλυψε ότι οι καπνιστές ασθματικοί παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική αυξημένη έκφραση για την περφορίνη ($p=0,003$) και την 8-OHdG ($p= 0,046$) σε σύγκριση με τα επίπεδα έκφρασης στους μη καπνιστές ασθματικούς (Σχήμα 1). Παρόμοιες στατιστικές συσχετίσεις δεν παρατηρήθηκαν στα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν μεταξύ καπνιστών ασθματικών και των καπνιστών της ομάδας ελέγχου.

Επιπλέον, στατιστικά σημαντική διαφορά βρέθηκε όσον αφορά στα επίπεδα έκφρασης της γκρανζύμης B ($p = 0,016$), της περφορίνης ($p =0,026$) και της 8-OHdG ($p = 0,021$) μεταξύ των ασθματικών καπνιστών και των μη καπνιστών.

Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν μεταξύ των ασθματικών και των καπνιστών. Στατιστικά σημαντική αυξημένη έκφραση της γκρανζύμης A ($p = 0,049$) και της γκρανζύμης B ($p=0,028$) παρατηρήθηκε στους ασθματικούς σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες.

Τέλος, στατιστικά σημαντική διαφορά βρέθηκε μόνο στα επίπεδα έκφρασης της γκρανζύμης B ($p=0,014$) μεταξύ των καπνιστών σε σύγκριση με τους μη καπνιστές της ομάδας ελέγχου.

Σχήμα 1: Επίπεδα έκφρασης περφορίνης, granzymes A και B, και 8-OHdG μεταξύ των τεσσάρων ομάδων μελέτης. **A:** καπνιστών ασθενών με άσθμα έναντι μη καπνιστών ασθενών με άσθμα και έναντι της ομάδας ελέγχου. **B:** μη καπνιστών ασθενών με άσθμα vs ομάδας ελέγχου. **C:** καπνιστές vs ομάδα ελέγχου.



Στρωματοποιημένη ανάλυση

Μετά την εφαρμογή στρωματοποιημένης ανάλυσης παρατηρήσαμε, την ύπαρξη αυξητικής τάσης στα επίπεδα έκφρασης των υπό μελέτη μορίων μεταξύ των ασθενών με άσθμα και των καπνιστών ασθενών με άσθμα, αλλά οι τιμές τυπικής απόκλισης (SD) ήταν αρκετά μεγάλες. Για να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα, θέσαμε τα επίπεδα έκφρασης της ομάδας ελέγχου ως το ανώτερο όριο της κανονικής έκφρασης (περφορίνη < 50 pg / mL, γκρανζύμη A < 100 pg / mL, γκρανζύμη B < 100 pg / mL, και 8-OHdG < 100 ng / mL). Στη συνέχεια προσδιορίσαμε το ποσοστό του δείγματος που ήταν πάνω από τα όρια αυτά στις άλλες τρεις ομάδες της μελέτης. Στη συνέχεια προσδιορίσαμε το ποσοστό του δείγματος που ήταν πάνω από τα ανώτερα φυσιολογικά επίπεδα έκφρασης στις υπόλοιπες τρεις ομάδες μελέτης.

Αυξημένα βρέθηκαν τα ποσοστά έκφρασης της περφορίνης στο 40-45% των δειγμάτων στις 2 ομάδες του καπνίσματος, και μόνο στο 7% στους ασθενείς με άσθμα ($p = 0.004$) (Πίνακας 3).

Πίνακας 3: Ανάλυση σχετικής έκφρασης περφορίνης, γκρανζύμης Α και Β, 8-OHdG σε καπνιστές με άσθμα, μη καπνιστές με άσθμα, και καπνιστές.

Protein	Smoking Patients With Asthma (n = 20)	Nonsmoking Patients With Asthma (n = 30)	Smokers (n = 10)	P Value ^a
Perforin				.004
Normal	11 (55.0)	28 (93.3)	6 (60.0)	
Elevated	9 (45.0)	2 (6.7)	4 (40.0)	
Granzyme A				.65
Normal	9 (45.0)	17 (56.7)	6 (60.0)	
Elevated	11 (55.0)	13 (43.3)	4 (40.0)	
Granzyme B				.21
Normal	7 (35.0)	12 (40.0)	1 (10.0)	
Elevated	13 (65.0)	18 (60.0)	9 (90.0)	
8-OHdG				.10
Normal	13 (65.0)	27 (90.0)	8 (80.0)	
Elevated	7 (35.0)	3 (10.0)	2 (20.0)	

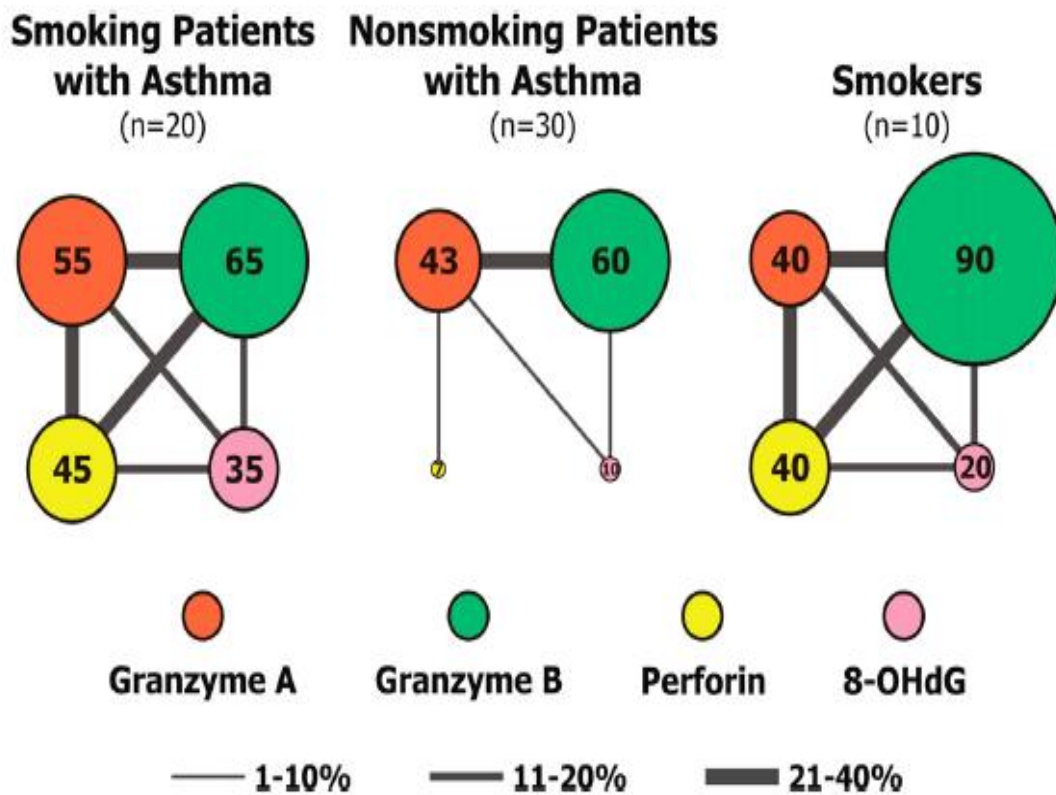
Data are presented as No. (%). Upper limits of normal values: perforin < 50 pg/mL; granzyme A < 100 pg/mL; granzyme B < 100 pg/mL; 8-OHdG < 100 ng/mL. P values refer to the simultaneous comparison of the three groups.

^aχ² Test.

Σε αντίθεση, η έκφραση των γκρανζυμών Α και Β ήταν αυξημένη σε ένα μεγάλο ποσοστό του δείγματος σε όλες τις τρεις ομάδες, αν και το ποσοστό των καπνιστών ασθενών με άσθμα με αυξημένες τιμές ήταν ελαφρώς υψηλότερο από τους μη καπνιστές ασθενείς με άσθμα. Τέλος, τα επίπεδα έκφρασης της 8-OHdG ήταν αυξημένα στο 35% των καπνιστών ασθενών με άσθμα και σε χαμηλότερα ποσοστά στους μη

καπνιστές ασθενείς με άσθμα και στους καπνιστές (10% και 20%, αντίστοιχα) (Σχήμα 2). Επιπλέον, παρατηρήσαμε ότι στους μη καπνιστές ασθενείς με άσθμα ουσιαστικά υπερεκφράζονται μόνο οι γκρανζύμες Α και Β, ενώ στους καπνιστές και τους καπνιστές ασθματικούς ασθενείς υπερεκφράζονται το σύνολο των εξεταζόμενων μορίων με ένα παρόμοιο μοτίβο συν-έκφρασης.

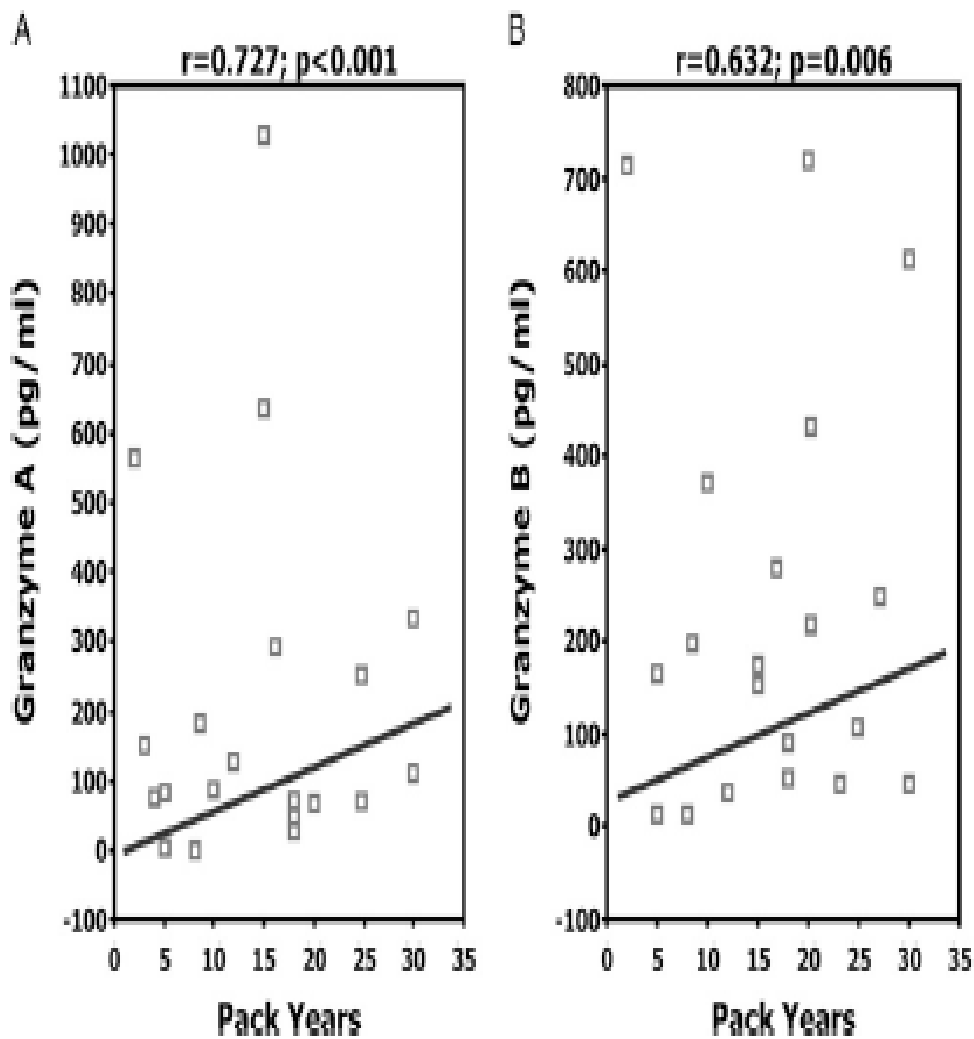
Σχήμα 2: Σχετική ανάλυση της έκφρασης της περφορίνης (κίτρινο), γκρανζύμης Α (κόκκινο), γκρανζύμης Β (πράσινο), και 8-OHdG (ροζ) σε καπνιστές ασθενείς με άσθμα, μη καπνιστές ασθενείς με άσθμα, και καπνιστές. Το μέγεθος του κάθε κύκλου είναι ανάλογο με το ποσοστό των δειγμάτων με τιμές έκφρασης υψηλότερες από το κανονικό (επίσης φαίνεται από την τιμή στο εσωτερικό κάθε κύκλου). Οι κύκλοι συνδέονται όταν δύο από τα μόρια που μελετήθηκαν υπερεκφράζονται ταυτόχρονα σε τουλάχιστον 1% των ασθενών σε κάθε ομάδα. Το πάχος των γραμμών συνδέσεως είναι ανάλογη προς το ποσοστό των δειγμάτων που συν-υπερεκφράζουν τα εξεταζόμενα μόρια.



Συσχέτιση με κλινικές παραμέτρους.

Η στατιστική συσχέτιση των αποτελεσμάτων με τα κλινικά και σπυρομετρικά χαρακτηριστικά των ασθενών αποκάλυψε θετική συσχέτιση μόνο μεταξύ των επίπεδων έκφρασης της γκρανζύμης Α ($p < 0,001$) και της γκρανζύμης Β ($p = 0.006$) και τον αριθμό των πακέτων/έτος στους καπνιστές ασθματικούς (Σχήμα 3).

Σχήμα 3: Α: Στατιστικά σημαντική συσχέτιση επιπέδων έκφρασης μεταξύ της γκρανζύμης Α με το καπνιστικό ιστορικό (pack years) σε καπνιστές ασθενείς με άσθμα. Β: Στατιστικά σημαντική συσχέτιση επιπέδων έκφρασης μεταξύ της γκρανζύμης Β με το καπνιστικό ιστορικό (pack years) σε καπνιστές ασθενείς με άσθμα.



Συζήτηση

Σύμφωνα με την αρχική μας υπόθεση, φάνηκε ότι οι μηχανισμοί κυτταροτοξικότητας στους καπνιστές ασθματικούς διαφέρουν από εκείνους στους μη καπνιστές ασθενείς με χρόνια βρογχικό άσθμα. Οι καπνιστές ασθενείς με άσθμα παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης των δεικτών κυτταροτοξικότητας σε σύγκριση με τους μη καπνιστές ασθενείς με άσθμα, τους <<υγιείς>> καπνιστές, και την ομάδα ελέγχου.

Επιπρόσθετα, αξιολογήσαμε την έκφραση της 8-OHdG, που αποτελεί δείκτη της οξειδωτικής βλάβης του DNA, δείχνοντας σημαντική διαφορά έκφρασης στους καπνιστές ασθενείς με άσθμα. Ο καπνός του τσιγάρου έχει την ικανότητα να βλάψει το βρογχικό επιθήλιο με διάφορους τρόπους, συμπεριλαμβανομένης της άμεσης τοξικής δράσης στα βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα, την οξειδωτική βλάβη, τον κυτταρικό θάνατο, και την προαγωγή της φλεγμονής στους αεραγωγούς. (13-15)

Το άσθμα συνδέεται κυρίως με την κλασική Th2 τύπου φλεγμονώδους απάντησης.(16) Μια σειρά κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των λευκοκυττάρων, ουδετερόφιλων, ηωσινόφιλων, βασεόφιλων, μονοκύτταρα, μακροφάγα, μαστοκύτταρα, δενδριτικά κύτταρα, T κύτταρα, B κύτταρα, και τα φυσικά κύτταρα φονείς ενεργοποιούν ενδοκυττάρους μεσολαβητές και ενεργοποιούν την ανοσολογική απάντηση.(17,18)

Τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα αποτελούν σημαντικές συνιστώσες του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή που στοχεύουν τροποποιημένα, μολυσμένα, ή νεοπλασματικά κύτταρα με την απελευθέρωση κυτταροτοξικών μορίων όπως περφορίνης και γκρανζυμών (A και B). Ωστόσο, η επίπτωση αυτών των μορίων στους μη

καπνιστές ασθενείς με άσθμα ή σε ασθενείς με άσθμα με έκθεση στον καπνό δεν έχει διερευνηθεί.

Προηγούμενες μελέτες έχουν βρει αυξημένα T-λεμφοκυτταρα (κυρίως CD8+) και περφορίνη, σε δείγματα πτυέλων καπνιστών με ή χωρίς Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) σε σύγκριση με υγιή άτομα. (19,20) Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες επέδειξαν αυξημένη οξειδωτική βλάβη του DNA σε ασθενείς με ΧΑΠ.(21)

Τα αποτελέσματα της δικής μας μελέτης έδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές έκφρασης της περφορίνης και της 8-OHdG μεταξύ καπνιζόντων ασθενών με άσθμα και μη καπνιστών ασθενών με άσθμα, το οποίο μπορεί να σημαίνει ότι η κυτταροτοξική δραστηριότητας στους πνεύμονες των καπνιστών ασθενών με άσθμα αυξάνεται μαζί με την οξειδωτική βλάβη του DNA, με ένα μηχανισμό παρόμοιο εκείνου της ΧΑΠ (Σχήμα 1).

Ενδιαφέρον αποτελεί η παρατήρηση ότι, οι καπνιστές ασθενείς με άσθμα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου έδειξαν επίσης στατιστικά σημαντική αυξημένη έκφραση των γκρανζυμών, της περφορίνης, και της 8-OHdG, ενώ δεν διέφεραν από τους καπνιστές.

Τα στοιχεία αυτά έρχονται σε συμφωνία με προηγούμενες αναφορές, γεγονός που υποδηλώνει ότι το κάπνισμα μπορεί να ενεργοποιήσει τον καταρράκτη κυτταροτοξικότητας των κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων. Από την άλλη πλευρά, τα αποτελέσματά μας έδειξαν για πρώτη φορά, ότι οι μη καπνιστές ασθενείς με άσθμα παρουσίασαν αυξημένη έκφραση των γκρανζυμών A και B, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Μια πιθανή εξήγηση μπορεί να είναι ότι στο άσθμα, οι γκρανζύμες μπορεί να απελευθερωθούν από άλλες κυτταρικές πηγές, όπως τα πλασματοκυτταροειδή δενδριτικά κύτταρα.(22) Είναι πιθανό ότι

η γκρανζύμη Β που απελευθερώνεται από τα πλασματοκυτταροειδή δενδριτικά κύτταρα να εμπλέκεται στην αναδιαμόρφωση των ιστών επηρεάζοντας το επιθήλιο της αναπνευστικής οδού. Επιπλέον, η στατιστική ανάλυση μεταξύ των καπνιστών και της ομάδας ελέγχου έδειξε σημαντική διαφορά μόνο στα επίπεδα έκφρασης της γκρανζύμης Β, υποδηλώνοντας ότι το κάπνισμα από μόνο του θα μπορούσε εν μέρει να ενεργοποιήσει την προαναφερθείσα κυτταροτοξική οδό σε «υγιείς» καπνιστές, χωρίς κλινικά έκδηλη ΧΑΠ.

Παρά το γεγονός ότι η γκρανζύμη Β απαιτείται για τον αποτελεσματικό αποπτωτικό θάνατο των κυττάρων, η γκρανζύμη Α είναι σε θέση να επιτύχει το ίδιο αποτέλεσμα, αλλά όχι με την ίδια αποτελεσματικότητα ή ταχύτερα της γκρανζύμης Β. Η γκρανζύμη Β που φαίνεται να εμπλέκεται στην υδρόλυση των συστατικών του εξωκυττάρου matrix κατά τη διάρκεια της μεταφοράς λευκοκυττάρων, μπορεί επίσης να εισέλθει στο κύτταρο-στόχο, χωρίς την ανάγκη ύπαρξης καναλιού από την περφορίνη. Αυτό συμβαίνει πιθανώς μέσω της σύνδεσης της με τον υποδοχέα 6-φωσφορική μαννόζη / ινσουλίνη αυξητικού παράγοντα ΙΙ, που ακολουθείται από ενδοκυττάρωση.

Από την ανάλυση της σχετικής έκφρασης της περφορίνης επιβεβαιώθηκε η αύξηση στο 40% έως 45% των καπνιστών και των καπνιστών ασθενών με άσθμα, υποδεικνύοντας τη συσχέτιση της περφορίνης με το κάπνισμα (Σχήμα 2). Από την άλλη πλευρά η γκρανζύμη Α σε σχέση με την ομάδα ελέγχου αυξήθηκε στο 40%, 43%, και 55% των καπνιστών, μη καπνιστών ασθενών με άσθμα, και καπνιστών ασθενών με άσθμα αντίστοιχα (Πίνακας 3). Ομοίως, η γκρανζύμη Β ήταν επίσης αυξημένη στο 60% και 65% των μη καπνιζόντων ασθενών με άσθμα και καπνιστών ασθενών με άσθμα, αντίστοιχα, και σε όλους σχεδόν τους καπνιστές (90%). Βασιζόμενοι στα παραπάνω θα μπορούσαμε να υποστηρίξουμε

τη συσχέτιση της ανοσοαπόκρισης μέσω της οδού της γκρανζύμης ως απάντηση στο κάπνισμα και το άσθμα σε καπνιστές ή μη.

Επιπλέον, δείξαμε ότι το 35% των καπνιστών ασθενών με άσθμα παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης στην 8-OHdG σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το 20% των καπνιστών με παρόμοια έκθεση στον καπνό με εκείνη των καπνιστών ασθενών με άσθμα και μόνο το 10% των μη καπνιζόντων ασθενών με άσθμα εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα 8-OHdG, γεγονός που υποδηλώνει ότι παρόλο που τόσο το κάπνισμα και το άσθμα προάγουν οξειδωτική βλάβη στο DNA, ο συνδυασμός τους δρα συνεργικά και αθροιστικά οδηγώντας στον κατακερματισμό του DNA (Σχήμα 2, Πίνακας 3). Επιπρόσθετα, η γκρανζύμη A, με την αλληλεπίδραση της περφορίνης, οδηγεί σε τμηματικές αποσχίσεις του μονοκλωνικού DNA παρά σε κατακερματισμό του. Ο επαγόμενος κυτταρικός θάνατος συμβαίνει με μια οδό ανεξάρτητη από την ενεργοποίηση των κασπασών. Σημείο κλειδί αποτελεί η μιτοχονδριακή βλάβη, καταστρέφοντας την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και οδηγώντας στην παραγωγή ROS. (23-25)

Από την άλλη πλευρά, η γκρανζύμη B προκαλεί τον θάνατο κυττάρου-στόχου, μέσω διαφόρων μηχανισμών, όπως η παραγωγή ROS μέσω της ενεργοποίησης των κασπασών 3/7 και η απελευθέρωση κυτοχρώματος C, εξαιτίας της διάσπασης και ενεργοποίησης των Bid, Bak και Bax, και με τις δύο οδούς να οδηγούν στην απώλεια της δραστηριότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Η γκρανζύμη B με τη συνεργεια της περφορίνης, συσσωρεύεται στον κυτταρικό πυρήνα, προκαλώντας τον κατακερματισμό του DNA. (26,27) Υπό διερεύνηση παραμένει ακόμη το ερώτημα κατά πόσο η επαγόμενη κατάτμηση του DNA είναι προστατευτική ή αντανακλά το θάνατο των κυττάρων του επιθηλίου των πνευμόνων.

Με την πραγματοποίηση ανάλυσης συνέκφρασης δείξαμε ότι οι ασθενείς με άσθμα συν-υπερεκφράζουν γκρανζύμες A και B. Οι καπνιστές και οι ασθενείς με άσθμα με καπνιστική συνήθεια συν-υπερεκφράζουν το σύνολο των μορίων που εξετάστηκαν με ένα παρόμοιο μοτίβο συνέκφραση, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι καπνιστές ασθενείς με άσθμα έχουν περισσότερες ομοιότητες με τους καπνιστές και πιθανώς με τους ασθενείς με ΧΑΠ παρά με τους μη καπνιστές με άσθμα. Επιπλέον, η στατιστική συσχέτιση με τα κλινικά στοιχεία των ασθενών αποκάλυψαν μια θετική συσχέτιση μεταξύ της έντασης έκφρασης της γκρανζύμης A και B και του καπνίσματος στους καπνιστές ασθενείς με άσθμα, το οποίο ενισχύει την υπόθεση μας ότι η κυτταροτοξική δράση επιδεινώνεται στους καπνιστές ασθενείς με άσθμα (Σχήμα 3).

Εν κατακλείδι, δείξαμε ότι οι μη καπνιστές ασθενείς με άσθμα εμφανίζουν κυτταροτοξική ανοσολογική απάντηση που αντιπροσωπεύεται κυρίως από τις γκρανζύμες A και B, ενώ οι καπνιστές ασθενείς με άσθμα παρουσιάζουν μια διαφορετική απάντηση, με τη συμμετοχή όχι μόνο των γκρανζυμών αλλά και της περφορίνης και της 8-OHdG, μιμούμενη σε μεγάλο βαθμό τους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς της ΧΑΠ. Ωστόσο, χρειάζονται περαιτέρω μεγαλύτερες μελέτες για να διευκρινιστεί η υπόθεση αυτή.

Βιβλιογραφία ειδικού μέρους

1. Ulrik CS, Lange P. Cigarette smoking and asthma. *Monaldi Arch Chest Dis* 2001; 56:349–353.
2. Mannino DM. COPD: epidemiology, prevalence, morbidity and mortality, and disease heterogeneity. *Chest* 2002; 121:121S–126S.
3. Siroux V, Pin I, Oryszczyn M, et al. Relationships of active smoking to asthma and asthma severity in the EGEA study. *Eur Respir J* 2000; 15:470–477.
4. Chalmers GW, MacLeod KJ, Thomson L, et al. Smoking and airway inflammation in patients with mild asthma. *Chest* 2001; 120:1917–1922.
5. Pedersen B, Dahl R, Karlstrom R, et al. Eosinophil and neutrophil activity in asthma in a one-year trial with inhaled budesonide: the impact of smoking. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153:1519–1529.
6. McKay A, Komai-Koma M, MacLeod KJ et al. Interleukin-18 levels in induced sputum are reduced in asthmatic and normal smokers. *Clin Exp Allergy* 2004;34:904-10.
7. Van Hove CL, Moerloose K, Maes T, Joos GF, Tournoy KG. Cigarette smoke enhances Th-2 driven airway inflammation and delays inhalational tolerance. *Respir Res* 2008;9:42.

8. Brightling, C.E. Clinical applications of induced sputum. *Chest* 2006; 129: 1344- 1348
9. Vignola, AM.; Rennard, S.I.; Hargreave, F.E et al. European Respiratory Society Task Force. Standardised methodology of sputum induction and processing: future directions. Report of Working Group 8. *Eur. Respir. J.*, 2002; 20: 51-55.
10. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Global Initiative for Asthma (GINA) 2009. GINA website. <http://www.ginasthma.org/> .
11. Kips JC, Fahy JV, Hargreave FE, Ind PW, in't Veen JC. Methods for sputum induction and analysis of induced sputum: a method for assessing airway inflammation in asthma. *Eur Respir J Suppl* 1998; 26:9S-12S.
12. Proceedings of the ATS workshop on refractory asthma: current understanding, recommendations and unanswered questions. American Thoracic Society. *Am J Crit Care Med* 2000; 162:2341-2351.
13. Kabesch M. Gene by environment interactions and the development of asthma and allergy. *Toxicol Lett.* 2006; 1 62(1) : 43 - 48 .
14. James AL, Palmer LJ, Kicic E, et al. Decline in lung function in the Busselton Health Study: the effects of asthma and cigarette smoking. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005; 171 (2): 109 - 114.
15. Thomson NC, Chaudhuri R, Livingston E. Asthma and cigarette smoking. *Eur Respir J.* 2004; 24 (5): 822 - 833 .

16. Kim HY, DeKruyff RH, Umetsu DT. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. *Nat Immunol.* 2010; 11 (7): 577 - 584 .
17. Hamzaoui A, Chaouch N, Graïri H, Ammar J, Hamzaoui K. Inflammatory process of CD8+ CD28- T cells in induced sputum from asthmatic patients . *Mediators Inflamm.* 2005; 2005 (3): 160 – 166
18. Van Rensen EL, Sont JK, Evertse CE, et al; AMPUL Study Group. Bronchial CD8 cell infiltrate and lung function decline in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005; 172 (7): 837 - 841 .
19. Chrysofakis G, Tzanakis N, Kyriakoy D, et al. Perforin expression and cytotoxic activity of sputum CD8 + lymphocytes in patients with COPD. *Chest.* 2004; 125 (1): 71 - 76 .
20. Vernooij JH, Möller GM, van Suylen RJ, et al. Increased granzyme A expression in type II pneumocytes of patients with severe chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007 ; 175 (5): 464 – 472
21. Tzortzaki EG, Dimakou K, Neofytou E, et al. Oxidative DNA damage and somatic mutations: a link to the molecular pathogenesis of chronic inflammatory airway diseases. *Chest.* 2012 ; 141 (5): 1243 – 1250.
22. Bratke K, Nielsen J, Manig F, et al. Functional expression of granzyme B in human plasmacytoid dendritic cells: a role in allergic inflammation. *Clin Exp Allergy.* 2010; 40 (7): 1015 - 1024.

23. Beresford PJ, Xia Z, Greenberg AH, Lieberman J. Granzyme A loading induces rapid cytolysis and a novel form of DNA damage independently of caspase activation. *Immunity*. 1999; 10 (5): 585 - 594.
24. Fan Z, Beresford PJ, Oh DY, Zhang D, Lieberman J. Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell*. 2003; 112 (5): 659 – 672.
25. Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J. Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity*. 2005; 22 (3): 355 - 370.
26. Jans DA, Jans P, Briggs LJ, Sutton V, Trapani JA. Nuclear transport of granzyme B (fragmentin-2). Dependence of perforin in vivo and cytosolic factors in vitro. *J Biol Chem*. 1996; 271 (48): 30781 - 30789.
27. Trapani JA, Browne KA, Smyth MJ, Jans DA. Localization of granzyme B in the nucleus. A putative role in the mechanism of cytotoxic lymphocyte-mediated apoptosis. *J Biol Chem*. 1996 ; 271 (8): 4127 – 4133.



Granule Cytotoxic Activity and Oxidative DNA Damage in Smoking and Nonsmoking Patients With Asthma

Athanasia Proklou, MD; Nikolaos Soultzizis, PhD; Eirini Neofytou, PhD; Nikoletta Rovina, MD, PhD; Eleftherios Zervas, MD, PhD; Mina Gaga, MD, PhD; Nikolaos M. Siafakas, MD, PhD, FCCP; and Eleni G. Tzortzaki, MD, PhD, FCCP

Background: Lung cytotoxic mechanisms trigger the release of perforin and granzymes, causing oxidative DNA damage that ultimately leads to apoptosis. These effects, although demonstrated in COPD, have not been investigated in patients with asthma and in particular in patients with asthma who smoke. Our aim was to measure perforin, granzyme A, granzyme B, and 8-OHdG expression in sputum from smoking and nonsmoking patients with asthma, compared with smoking and nonsmoking control subjects.

Methods: Perforin, granzyme A, granzyme B, and 8-OHdG expression levels were detected by enzyme-linked immunosorbent assays in induced sputum specimens.

Results: Perforin expression was increased in 40% of smokers and 45% of smoking patients with asthma and in only 7% of nonsmoking patients with asthma ($P = .004$), compared with control subjects' values. In contrast, granzymes A and B levels were increased in >40% of patients in all three groups vs control subjects. Finally, 8-OHdG levels were elevated in 35% of smoking patients with asthma, in 20% of smokers, and in only 10% of nonsmoking patients with asthma. Statistical analysis revealed a positive correlation between granzyme A ($P < .001$) and granzyme B ($P = .006$) expression levels and the number of pack-years in smoking patients with asthma.

Conclusions: Asthma cytotoxic immune response is mainly represented by granzymes A and B, whereas in smoking patients with asthma perforin and 8-OHdG are additionally involved, resembling the immune response in COPD.

CHEST 2013; 144(4):1230-1237

Abbreviations: CTL = cytotoxic T lymphocyte; ROS = reactive oxygen species

Asthma is a complex disorder characterized by reversible airflow obstruction, airway inflammation, and bronchial hyperresponsiveness to various environmental stimuli.¹ The presence of airway inflammation has been demonstrated even in patients with newly diagnosed, mild, or intermittent disease. Genetic and

environmental interactions play a major role in the expression of the disease, influencing its clinical manifestations, leading to various asthma phenotypes.¹⁻⁴

In response to environmental insults, such as cigarette smoke, reactive oxygen species (ROS), and allergens, the lungs evolved cytotoxic mechanisms as one of the immune responses to stress,^{2,5} comprising three main classes of human killer cells (CD8⁺ T lymphocytes, natural killer cells, and natural killer T cells). A key function of cytotoxic lymphocytes is to detect

Manuscript received February 13, 2013; revision accepted April 22, 2013.

Affiliations: From the Department of Thoracic Medicine, University Hospital of Heraklion (Drs Proklou, Siafakas, and Tzortzaki), and the Laboratory of Molecular and Cellular Pulmonology (Drs Soultzizis, Neofytou, Siafakas, and Tzortzaki), Medical School, University of Crete, Heraklion, Crete; and the First University Department of Respiratory Medicine (Dr Rovina), and the Seventh Respiratory Medicine Department and Asthma Center (Drs Zervas and Gaga), Chest Diseases Hospital "Sotiria," Athens, Greece.

Drs Proklou and Soultzizis contributed equally to this research.

Funding/Support: This study was supported by a competitive research grant from the Hellenic Thoracic Society [Grant 2009/05].

Correspondence to: Eleni G. Tzortzaki, MD, PhD, FCCP, Department of Thoracic Medicine, Medical School, University of Crete, 71003 Heraklion, Crete, Greece; e-mail: tzortzaki@med.uoc.gr

© 2013 American College of Chest Physicians. Reproduction of this article is prohibited without written permission from the American College of Chest Physicians. See online for more details. DOI: 10.1378/chest.13-0367

damaged cells by inducing them to undergo apoptosis. As part of the surveillance mechanism, cytotoxic T lymphocytes (CTLs) release granzymes and a pore-forming protein, perforin.⁶⁻¹² Perforin permeates the target cell membrane, allowing granzymes to enter and induce apoptosis through various downstream effector pathways, such as DNA fragmentation.¹¹⁻¹⁵

The previously mentioned intracellular pathways are activated in COPD due to smoking. Previous studies have shown that cigarette smoke exposure in COPD can lead to an enhanced inflammatory response, inducing CTL proliferation and release of perforin and granzymes, leading to increased oxidative DNA damage.¹⁶⁻¹⁹ A marker of oxidant-induced DNA damage is 8-OHdG, which is excreted *in vivo* during the repair of damaged DNA and has been detected in the sputum of patients with COPD.²⁰⁻²²

Exposure to tobacco smoke in patients with asthma adversely affects an already accelerated decline in lung function, increases asthma severity, and decreases the response to treatment.^{1,22-24} Moreover, in asthma inflammatory cells are recruited, which on activation release more oxidants, causing direct toxicity of the bronchial epithelium, apoptosis, oxidative DNA damage, and somatic mutations.^{5,22,25-27}

Our working hypothesis was that smoking asthma and COPD are similar in certain cytotoxic and DNA damage biomarkers. To investigate this hypothesis, we measured the expression levels of perforin, granzyme A, granzyme B, and 8-OHdG in induced sputum from smoking patients with asthma, nonsmoking patients with asthma, smokers, and a control group of nonsmokers.

MATERIALS AND METHODS

Study Subjects

Twenty smoking patients with asthma, aged 41.3 ± 11.6 years, and 30 nonsmoking patients with asthma, aged 47.4 ± 21.0 years, were recruited from the Outpatient Clinic of the Department of Thoracic Medicine, University of Crete, the first University Department of Respiratory Medicine, and the seventh Respiratory Medicine Department and Asthma Centre, Chest Diseases Hospital "Sotiria" Athens. The asthma groups consisted of patients with persistent, mild to moderate asthma that was diagnosed and classified according to GINA (Global Initiative for Asthma).¹ In addition, 10 current smokers and 10 control subjects (nonsmoking healthy subjects, without known airway diseases and with normal lung function) were included in the study. Anthropometric characteristics and spirometric values of all study groups are reported in Table 1.

Smokers were defined as subjects who had a history of at least 10 pack-years of cigarette smoking. The main exclusion criteria were $FEV_1 < 1.2$ L, COPD, bronchiectasis, upper respiratory tract infection, and/or use of antibiotics or oral corticosteroids within 2 months prior to inclusion in the study. The Research Ethics Committee of the Medical School, University of Crete approved the study (approval number: 2011318/Feb-12-2008), and informed consent was obtained from all participants.

Pulmonary Function and Sputum Induction

Spirometry, including a bronchodilation test, was performed in all subjects using a computerized system (Master Laboratory 2.12; Jaeger).¹ Sputum was induced via inhalation of a hypertonic saline aerosol (3% to 5%), generated by an ultrasonic nebulizer (Ultraneb 2000; DeVilbiss Healthcare LLC) according to standard protocols.^{28,29}

Sputum Processing

After sputum samples were weighed, sputum plugs were selected and incubated for 15 min with a volume of 0.1% (diluted in phosphate buffer saline) dithiothreitol equal to four times the sample weight. An equal volume of phosphate-buffered saline was added to the mixture, followed by a further 5-min incubation period. Subsequent steps included filtration to remove debris and remaining mucus followed by centrifugation to separate the cells from the fluid phase. Sputum samples with cell viability $> 80\%$ were considered adequate for further analysis. The supernatant was stored at -80°C for later investigation of soluble markers.^{28,27}

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Detection

Quantification of 8-OHdG was carried out using the OxiSelect Oxidative DNA Damage ELISA Kit (Cell Biolabs Inc). Perforin was measured with the Perforin Human ELISA Kit (Abcam plc). Granzyme A and B levels were determined with the Human Granzyme A Platinum ELISA kit and Human Granzyme B Platinum ELISA kit, respectively (eBioscience, Inc). Plates were read on ELx808 Absorbance Microplate Reader (BioTek Instruments Inc) at the wavelengths each protocol suggested.

Statistical Analysis

Differences in perforin, granzyme A and B, and 8-OHdG expression among the four study groups were determined using Student *t* test or its nonparametric equivalents, Mann-Whitney *U* and Kruskal-Wallis *H* tests. Pearson or the nonparametric Spearman rank correlation was used to examine their association with continuous variables (age, BMI, pack-years, spirometric values). Finally, the χ^2 test was used to examine their association with the various clinical parameters after stratification. Statistical analyses were two-sided and performed with SPSS 11.5 (IBM). Statistical significance was set at the 95% level ($P < .05$).

RESULTS

Clinical Characteristics of the Study Groups

As shown in Table 1, subject groups were of approximately the same age ($P = .85$). Smoking exposure among smoking patients with asthma and smokers was also similar ($P = .37$). In addition, both asthma groups were treated with medium dose of inhaled corticosteroids. However, both asthma groups were more obese than the other two "healthy" groups ($P = .035$) and had lower FEV_1/FVC ratio ($P = .003$).

Granule Cytotoxic and Oxidative DNA Damage Molecules

Table 2 demonstrates the raw detected values of the examined molecules in the study groups. Although smoking patients with asthma had increased levels of all studied proteins compared with nonsmoking

Table 1—Anthropometric Characteristics and Spirometric Values of the Four Study Groups: Smoking Patients With Asthma, Nonsmoking Patients With Asthma, Smokers, and Nonsmokers

Characteristic	Smoking Patients With Asthma (n = 20)	Nonsmoking Patients With Asthma (n = 30)	Smokers (n = 10)	Nonsmokers (n = 10)	P Value ^a
Demographic data					
Sex, male (female)	9 (11)	8 (22)	2 (8)	6 (4)	.14 ^b
Age, y	41.3 ± 11.6	47.4 ± 21.0	41.0 ± 8.7	40.3 ± 2.8	.85
Smoking, pack-y	16.1 ± 12.5	...	19.0 ± 9.637
BMI	27.6 ± 6.3	30.3 ± 5.7	24.1 ± 2.1	24.1 ± 1.0	.035
Spirometric measurements					
FEV ₁ , % predicted	88.1 ± 18.9	88.0 ± 25.0	104.1 ± 8.5	101.5 ± 4.3	.12
FVC, % predicted	101.5 ± 17.0	100.7 ± 22.5	106.5 ± 10.2	100.6 ± 3.0	.87
FEV ₁ /FVC, %	72.6 ± 6.9	72.1 ± 10.8	83.9 ± 5.0	85.1 ± 2.9	.003
Reversibility, %	12 ± 3	16 ± 4	8 ± 1	5 ± 1	.024

All values are presented as mean ± SD. P values refer to the simultaneous comparison of the four study groups.

^aKruskal-Wallis H test.

^bχ² Test.

patients with asthma, smokers, and control subjects, only perforin expression was statistically different among the four study groups ($P = .015$).

Pairwise analysis revealed that smoking patients with asthma had statistically significant increased perforin ($P = .003$) and 8-OHdG ($P = .046$) expression levels compared with nonsmoking patients with asthma. Interestingly, no statistical associations were observed in the expression levels of the studied molecules between smoking patients with asthma and the smoking control group, whereas granzyme B ($P = .016$), perforin ($P = .026$), and 8-OHdG ($P = .021$) levels differed statistically between smoking patients with asthma and nonsmokers (Fig 1A). Nonsmoking patients with asthma also did not exhibit statistically significant differences in the expression levels of the studied proteins compared with smokers, whereas they had statistically significant increased expression of granzyme A ($P = .049$) and granzyme B ($P = .028$) compared with control subjects (Fig 1B). Finally, statistical analysis between smokers vs nonsmoker control groups revealed statistically significant differences only in granzyme B levels ($P = .014$) (Fig 1C).

Stratification Analysis

As observed, there was an upward trend in the expression levels of the studied molecules among

patients with asthma and smoking patients with asthma, but the SD values were quite large. To overcome this problem, we set the expression levels of the control group as the upper limit of normal expression (perforin < 50 pg/mL, granzyme A < 100 pg/mL, granzyme B < 100 pg/mL, and 8-OHdG < 100 ng/mL). We then determined the sample percentage that was above these thresholds in the other three study groups (Table 3). Perforin expression was increased in 40% to 45% of samples in the two smoking groups and only in 7% of samples in nonsmoking patients with asthma ($P = .004$). In contrast, granzyme A and B levels were elevated in a large sample portion in all three groups, although the percentage of smoking patients with asthma with increased values was slightly higher than nonsmoking patients with asthma. Finally, 8-OHdG levels were elevated in 35% of smoking patients with asthma and at lower percentages in nonsmoking patients with asthma and smokers (10% and 20%, respectively) (Fig 2).

Figure 2 also exhibits the percentage of patients who simultaneously overexpressed two of the studied molecules (represented by the connecting lines between each two molecules, with its thickness being proportional to that percentage). We observed that nonsmoking patients with asthma essentially co-overexpressed only granzymes A and B, whereas both smokers and smoking patients with asthma co-overexpressed all of the

Table 2—Values of Perforin, Granzymes A and B, and 8-OHdG Expression Levels in the Four Study Groups

Protein	Smoking Patients With Asthma (n = 20)	Nonsmoking Patients With Asthma (n = 30)	Smokers (n = 10)	Nonsmokers (n = 10)	P Value ^a
Perforin	133.5 ± 45.1	53.1 ± 36.7	52.9 ± 30.1	19.2 ± 11.1	.015
Granzyme A	596.8 ± 315.0	222.0 ± 74.2	80.7 ± 34.4	31.7 ± 20.5	.13
Granzyme B	727.5 ± 287.8	253.6 ± 53.9	188.1 ± 21.2	25.8 ± 18.7	.079
8-OHdG	93.6 ± 9.9	69.3 ± 7.6	82.7 ± 19.4	41.5 ± 14.8	.080

All values are presented as mean ± SEM. P values refer to the simultaneous comparison of the four study groups.

^aKruskal-Wallis H test.

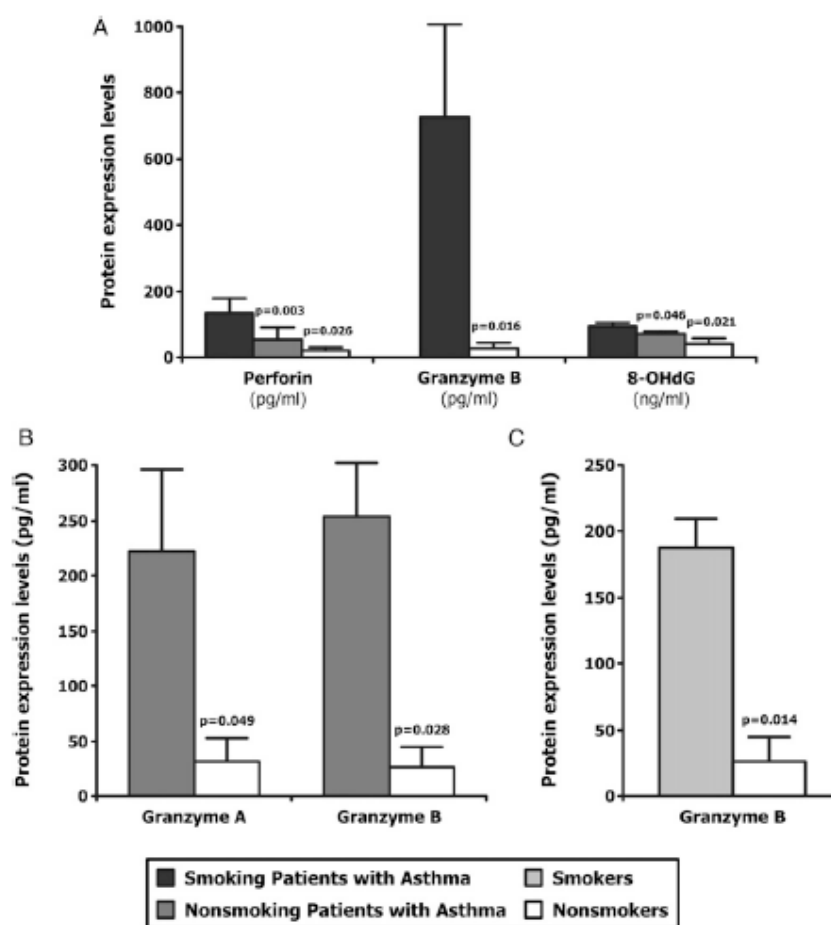


FIGURE 1. Column bars depicting statistically significant differences in the expression levels of perforin, granzymes A and B, and 8-OHdG among the four study groups. A, Smoking patients with asthma vs nonsmoking patients with asthma and vs control subjects. B, Nonsmoking patients with asthma vs control subjects. C, Smokers vs control subjects. Error bars represent SEM.

examined molecules and with a similar co-expression pattern.

Correlation With Clinical Parameters

Statistical analysis of the results with patients' clinical and spirometric values revealed a positive correlation only between granzyme A ($P < .001$) and granzyme B ($P = .006$) expression levels and the number of pack-years in smoking patients with asthma (Fig 3). No other statistically significant associations were observed.

DISCUSSION

In accordance with our initial hypothesis, we demonstrated that smoking asthma is different from nonsmoking asthma regarding the granule cytotoxic activity.

Smoking patients with asthma exhibited increased expression levels of the granule cytotoxic molecules in comparison with nonsmoking patients with asthma, smokers, and control subjects. We additionally evaluated the expression levels of 8-OHdG, a marker of oxidative DNA damage, showing significant difference in smoking patients with asthma. Cigarette smoke has the capacity to damage the bronchi in a number of ways, including direct toxicity to the bronchial barrier epithelial cells, oxidative damage, cell death, and inflammation in airway inflammatory diseases.^{4,24,30}

Asthma is mainly associated with the classic T helper cell type 2 cytokine-mediated inflammation.³¹ In asthma, a variety of cells, including leukocytes, neutrophils, eosinophils, basophils, monocytes, macrophages, mast cells, dendritic cells, T cells, B cells, and natural killer cells trigger intracellular mediators and activate immune responses.^{32,33} The CTLs are important components

Table 3—Relative Expression Analysis of Perforin, Granzymes A and B, and 8-OHdG in Smoking Patients With Asthma, Nonsmoking Patients With Asthma, and Smokers When Compared With the Normal Values Derived From the Nonsmokers Control Group

Protein	Smoking Patients With Asthma (n = 20)	Nonsmoking Patients With Asthma (n = 30)	Smokers (n = 10)	P Value*
Perforin				.004
Normal	11 (55.0)	28 (93.3)	6 (60.0)	
Elevated	9 (45.0)	2 (6.7)	4 (40.0)	
Granzyme A				.65
Normal	9 (45.0)	17 (56.7)	6 (60.0)	
Elevated	11 (55.0)	13 (43.3)	4 (40.0)	
Granzyme B				.21
Normal	7 (35.0)	12 (40.0)	1 (10.0)	
Elevated	13 (65.0)	18 (60.0)	9 (90.0)	
8-OHdG				.10
Normal	13 (65.0)	27 (90.0)	8 (80.0)	
Elevated	7 (35.0)	3 (10.0)	2 (20.0)	

Data are presented as No. (%). Upper limits of normal values: perforin < 50 pg/mL; granzyme A < 100 pg/mL; granzyme B < 100 pg/mL; 8-OHdG < 100 ng/mL. P values refer to the simultaneous comparison of the three groups. * χ^2 Test.

of the host immune system that target altered, infected, or neoplastic cells by releasing cytotoxic molecules such as perforin and granzymes (A and B). However, the implication of these molecules in nonsmoking patients with asthma or in patients with asthma under cigarette smoke exposure has not been investigated.

Previous studies have reported increased T lymphocytes, mainly CD8+ cells and perforin, in sputum samples of smokers with or without COPD compared with healthy individuals.^{9,24} Moreover, recent studies exhibited increased oxidative DNA damage in patients with COPD.²⁰

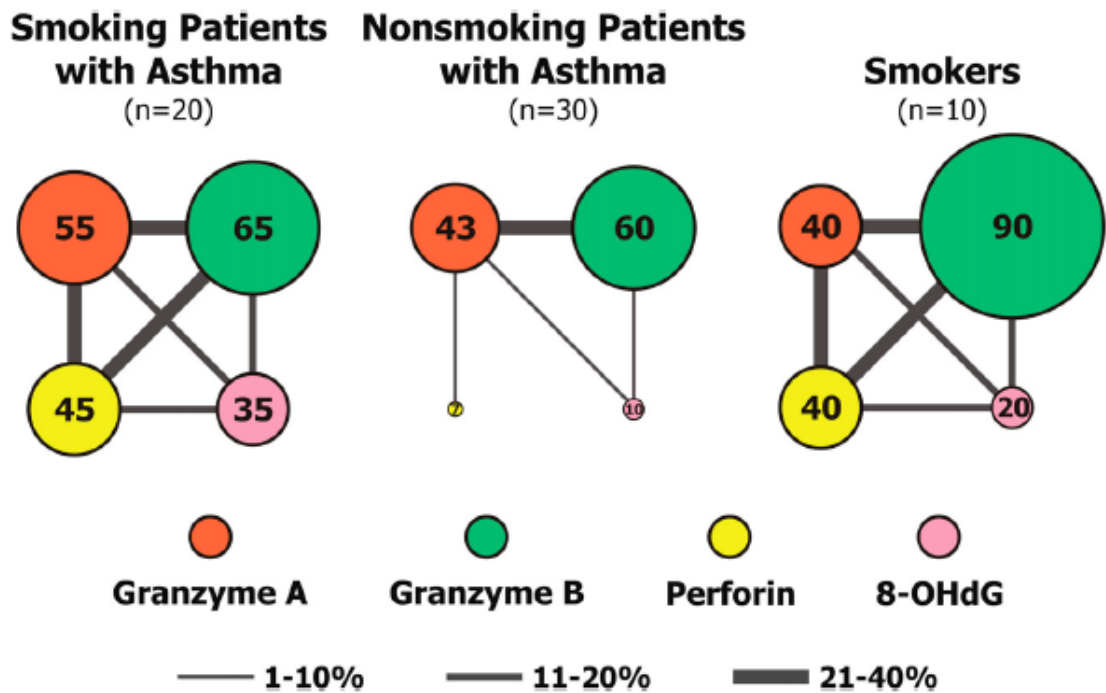


FIGURE 2. Relative expression analysis of perforin (yellow), granzyme A (red), granzyme B (green), and 8-OHdG (pink) in smoking patients with asthma, nonsmoking patients with asthma, and smokers. The size of each circle is proportional to the percentage of samples with expression values higher than normal (also shown by the value inside each circle). Circles are connected when two of the studied molecules are simultaneously overexpressed in at least 1% of patients at each group. The thickness of the connecting lines is proportional to the percentage of samples that co-overexpress the linked molecules.

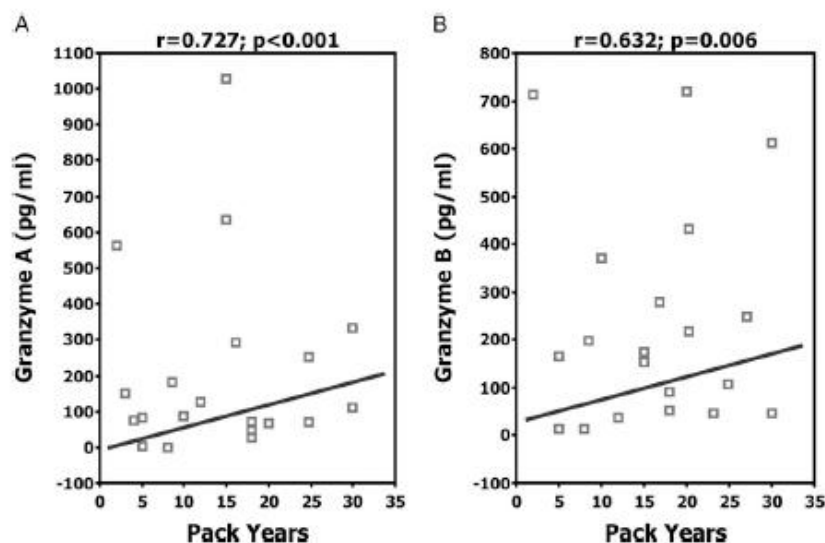


FIGURE 3. A, Statistically significant correlation between granzyme A expression levels with pack-y of smoking in smoking patients with asthma. B, Statistically significant correlation between granzyme B expression levels with pack-y of smoking in smoking patients with asthma.

Our results showed statistically significant differences in perforin and 8-OHdG expression levels between nonsmoking patients with asthma and smoking patients with asthma, which may imply that the cytotoxic activity in the lungs of smoking patients with asthma is increased along with oxidative DNA damage, resembling that in COPD (Fig 1A). Interestingly, smoking patients with asthma compared with control subjects also showed statistically significant increased expression of granzymes, perforin, and 8-OHdG, whereas they did not differ from smokers (Fig 1A). The previous data are in agreement with the current scientific knowledge, suggesting that smoking may activate the granule exocytosis of CTLs.

On the other hand, our results showed for the first time, to our knowledge, that nonsmoking patients with asthma exhibited increased expression of granzymes A and B when compared with control subjects (Fig 1B). A possible explanation could be that in asthma, granzymes can be released by cellular sources other than CTLs, such as plasmacytoid dendritic cells.³⁵ It is possible that plasmacytoid dendritic cell-derived granzyme B is involved in asthma tissue remodeling by affecting the airway epithelium. Furthermore, statistical analysis between smokers and control subjects showed significant difference only in granzyme B levels (Fig 1C), implying that smoking by itself could partially activate the previously mentioned cytotoxic pathway in "healthy" smokers without clinically relevant COPD.

Although granzyme B is required for efficient apoptotic killing of cells, granzyme A is able to achieve

the same effect, but not with the same efficiency or as rapidly as granzyme B. Granzyme B, which seems to be involved in the hydrolysis of extracellular matrix components during leukocyte diapedesis, can also enter the target cell without the need for a perforin channel. This possibly occurs through its binding to the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor, followed by endocytosis.¹¹⁻¹⁵

The previously mentioned results were also confirmed by relative expression analysis (Fig 2). Perforin expression was increased in 40% to 45% of smokers and smoking patients with asthma, indicating mainly an association of perforin with smoking. Granzyme A expression relative to the control group was increased in 40%, 43%, and 55% of smokers, nonsmoking patients with asthma, and smoking patients with asthma, respectively (Table 3). Similarly, granzyme B relative expression was also increased in 60% and 65% of nonsmoking patients with asthma and smoking patients with asthma, respectively, and in nearly all smokers (90%), indicating that in all three conditions (smoking, asthma, smoking asthma) the immune response involves the granzyme pathway. Moreover, we have shown that 35% of smoking patients with asthma exhibited increased 8-OHdG levels compared with the control group. Interestingly, 20% of smokers (with similar smoking exposure to smoking patients with asthma) and only 10% of nonsmoking patients with asthma exhibited increased 8-OHdG levels (Fig 2, Table 3), suggesting that although both smoking and asthma cause oxidative DNA damage, their combination has a synergistic and aggregating effect on DNA fragmentation.

Granzyme A, in synergy with perforin, stimulates single-stranded DNA nicks rather than DNA fragmentation. The granzyme A-induced cell death occurs independently of caspase activation, with mitochondrial damage being its key feature. Although granzyme A fails to disrupt the mitochondrial outer membrane, it damages the inner mitochondrial membrane and leads to the production of ROS.³⁶⁻³⁸

On the other hand, granzyme B induces target cell death via various mechanisms such as ROS production through direct activation of caspases 3/7 and cytochrome c release, due to cleavage and activation of Bid, Bak, and Bax, with both pathways leading to the loss of mitochondrial membrane potential. Granzyme B, in the presence of perforin, can efficiently target and accumulate in the nucleus, inducing DNA fragmentation.^{39,40} The question remains whether the induced DNA fragmentation is actually protective or reflects the cell death of lung epithelium.

Coexpression analysis (as exhibited in Fig 2) showed that asthma patients co-overexpress granzymes A and B, whereas both smokers and smoking patients with asthma co-overexpress all of the examined molecules, and with a similar coexpression pattern, suggesting that smoking patients with asthma are more similar to smokers and possibly to patients with COPD than to non-smoking patients with asthma. Additionally, statistical analysis with patients' clinical data revealed a positive correlation between granzyme A and B expression levels and the intensity of smoking in smoking patients with asthma, which strengthens our assumption that the cytotoxic activity is aggravated in smoking patients with asthma (Fig 3).

In conclusion, we showed that nonsmoking patients with asthma exhibited a cytotoxic immune response mainly represented by granzymes A and B, whereas smoking patients with asthma exhibited a different response, involving not only granzymes but also perforin and 8-OHdC, imitating at large COPD. However, further larger studies are needed to clarify this hypothesis.

ACKNOWLEDGMENTS

Author contributions: Dr Tzortzaki serves as guarantor of the manuscript.

Dr Proklou: contributed to data acquisition and drafting of the manuscript.

Dr Soultzis: contributed to design, data analysis, and drafting and revision of the manuscript.

Dr Neofytou: contributed to design, data acquisition, and drafting and revision of the manuscript.

Dr Rovina: contributed to conception, design, and revision of the manuscript.

Dr Zervas: contributed to data acquisition and revision of the manuscript.

Dr Gaga: contributed to data acquisition and revision of the manuscript.

Dr Siafakas: contributed to conception, data interpretation, revision of the manuscript, and approval of the final version.

Dr Tzortzaki: contributed to conception and design, data analysis and interpretation, drafting and revision of the manuscript, and approval of the final version.

Financial/nonfinancial disclosures: The authors have reported to CHEST that no potential conflicts of interest exist with any companies/organizations whose products or services may be discussed in this article.

Role of sponsors: The sponsor had no role in the design of the study, the collection and analysis of the data, or the preparation of the manuscript.

REFERENCES

1. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Global Initiative for Asthma (GINA) 2012. GINA website. <http://www.ginasthma.org/>. Accessed February 12, 2013.
2. Auerbach A, Hernandez ML. The effect of environmental oxidative stress on airway inflammation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2012;12(2):133-139.
3. Bonfield TL, Ross KR. Asthma heterogeneity and therapeutic options from the clinic to the bench. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2012;12(1):60-67.
4. Kabesch M. Gene by environment interactions and the development of asthma and allergy. *Toxicol Lett.* 2006;162(1):43-48.
5. Faux SP, Tai T, Thorne D, Xu Y, Breheny D, Gaca M. The role of oxidative stress in the biological responses of lung epithelial cells to cigarette smoke. *Biomarkers.* 2009;14(suppl 1):90-96.
6. Chrysafakis G, Tzanakis N, Kyriakoy D, et al. Perforin expression and cytotoxic activity of sputum CD8+ lymphocytes in patients with COPD. *Chest.* 2004;125(1):71-76.
7. James KM, Peebles RS Jr, Hartert TV. Response to infections in patients with asthma and atopic disease: an epiphenomenon or reflection of host susceptibility? *J Allergy Clin Immunol.* 2012;130(2):343-351.
8. Hams E, Fallon PG. Innate type 2 cells and asthma. *Curr Opin Pharmacol.* 2012;12(4):503-509.
9. Langier S, Sade K, Kivity S. Regulatory T cells in allergic asthma. *Isr Med Assoc J.* 2012;14(3):180-183.
10. Nakagome K, Matsushita S, Nagata M. Neutrophilic inflammation in severe asthma. *Int Arch Allergy Immunol.* 2012;158(suppl 1):96-102.
11. Anthony DA, Andrews DM, Watt SV, Trapani JA, Smyth MJ. Functional dissection of the granzyme family: cell death and inflammation. *Immunol Rev.* 2010;235(1):73-92.
12. Pardo J, Aguilo JI, Anel A, et al. The biology of cytotoxic cell granule exocytosis pathway: granzymes have evolved to induce cell death and inflammation. *Microbes Infect.* 2009;11(4):452-459.
13. Erten G, Aktas E, Deniz G. Natural killer cells in allergic inflammation. *Chem Immunol Allergy.* 2008;94:48-57.
14. Vujanovic NL. Role of TNF superfamily ligands in innate immunity. *Immunol Res.* 2011;50(2-3):159-174.
15. Bovenschen N, Kummer JA. Orphan granzymes find a home. *Immunol Rev.* 2010;235(1):117-127.
16. Celli BR, MacNee W; ATS/ERS Task Force. Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. *Eur Respir J.* 2004;23(6):932-946.
17. Decramer M, Janssens W, Miravittles M. Chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet.* 2012;379(9823):1341-1351.
18. Tsoumakidou M, Koutsopoulos AV, Tzanakis N, et al. Decreased small airway and alveolar CD83+ dendritic cells in COPD. *Chest.* 2009;136(3):726-733.
19. Hodge S, Hodge G, Nairn J, Holmes M, Reynolds PN. Increased airway granzyme b and perforin in current and ex-smoking COPD subjects. *COPD.* 2006;3(4):179-187.

20. Tzortzaki EG, Dimakou K, Neofytou E, et al. Oxidative DNA damage and somatic mutations: a link to the molecular pathogenesis of chronic inflammatory airway diseases. *Chest*. 2012;141(5):1243-1250.
21. Caramori G, Adcock IM, Casolari P, et al. Unbalanced oxidant-induced DNA damage and repair in COPD: a link towards lung cancer. *Thorax*. 2011;66(6):521-527.
22. Chung KF, Marwick JA. Molecular mechanisms of oxidative stress in airways and lungs with reference to asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1203:85-91.
23. Vignola AM, Chané P, Campbell AM, et al. Airway inflammation in mild intermittent and in persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157(2):403-409.
24. James AL, Palmer LJ, Kicic E, et al. Decline in lung function in the Busselton Health Study: the effects of asthma and cigarette smoking. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171(2):109-114.
25. Avery SV. Molecular targets of oxidative stress. *Biochem J*. 2011;434(2):201-210.
26. Zervou MI, Tzortzaki EG, Makris D, et al. Differences in microsatellite DNA level between asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2006;28(3):472-478.
27. Paraskakis E, Sourvinos G, Passam F, et al. Microsatellite DNA instability and loss of heterozygosity in bronchial asthma. *Eur Respir J*. 2003;22(6):951-955.
28. Makris D, Tzanakis N, Damianaki A, et al. Microsatellite DNA instability and COPD exacerbations. *Eur Respir J*. 2008;32(3):612-618.
29. Thomou C, Paraskakis E, Neofytou E, Kalmanti M, Siafakas NM, Tzortzaki EG. Acquired somatic mutations in the microsatellite DNA, in children with bronchial asthma. *Pediatr Pulmonol*. 2009;44(10):1017-1024.
30. Thomson NC, Chaudhuri R, Livingston E. Asthma and cigarette smoking. *Eur Respir J*. 2004;24(5):822-833.
31. Kim HY, DeKruyff RH, Umetsu DT. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. *Nat Immunol*. 2010;11(7):577-584.
32. Hamzaoui A, Chaouch N, Graïri H, Ammar J, Hamzaoui K. Inflammatory process of CD8+ CD28- T cells in induced sputum from asthmatic patients. *Mediators Inflamm*. 2005;2005(3):160-166.
33. van Rensen EL, Sont JK, Evertse CE, et al; AMPUL Study Group. Bronchial CD8 cell infiltrate and lung function decline in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172(7):837-841.
34. Vermooy JH, Möller GM, van Suylen RJ, et al. Increased granzyme A expression in type II pneumocytes of patients with severe chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175(5):464-472.
35. Bratke K, Nielsen J, Manig F, et al. Functional expression of granzyme B in human plasmacytoid dendritic cells: a role in allergic inflammation. *Clin Exp Allergy*. 2010;40(7):1015-1024.
36. Beresford PJ, Xia Z, Greenberg AH, Lieberman J. Granzyme A loading induces rapid cytolysis and a novel form of DNA damage independently of caspase activation. *Immunity*. 1999;10(5):585-594.
37. Fan Z, Beresford PJ, Oh DY, Zhang D, Lieberman J. Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell*. 2003;112(5):659-672.
38. Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J. Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity*. 2005;22(3):355-370.
39. Jans DA, Jans P, Briggs LJ, Sutton V, Trapani JA. Nuclear transport of granzyme B (fragmentin-2). Dependence of perforin in vivo and cytosolic factors in vitro. *J Biol Chem*. 1996;271(48):30781-30789.
40. Trapani JA, Browne KA, Smyth MJ, Jans DA. Localization of granzyme B in the nucleus. A putative role in the mechanism of cytotoxic lymphocyte-mediated apoptosis. *J Biol Chem*. 1996;271(8):4127-4133.