

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**

**ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

Διευθυντής: Καθηγητής Νικόλαος Σιαφάκας

**«Βιολογικοί και γενετικοί δείκτες στη διαφοροδιάγνωση των  
υπεζωκοτικών συλλογών»**

**ΦΩΤΕΙΝΗ Ν. ΟΙΚΟΝΟΜΙΔΟΥ**

**Ιατρός- Πνευμονολόγος**

**Ηράκλειο 2009**

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περιεχόμενα.....	2
Ευχαριστίες.....	4
Βιογραφικό.....	5
Περίληψη.....	34

## Γενικό Μέρος

### Κεφάλαιο 1:

Υπεζωκότας-Πλευριτικό υγρό.....	43
Παθογένεια των πλευριτικών συλλογών.....	45
Ανοσολογία και Πλευριτικό Υγρό.....	48
Διαφοροδιάγνωση των πλευριτικών συλλογών.....	49

### Κεφάλαιο 2:

Η κακοήθης πλευριτική συλλογή.....	54
Διάγνωση της κακοήθους πλευριτικής συλλογής.....	57

### Κεφάλαιο 3:

Αστάθεια του Μικροδορυφορικού DNA και απώλεια ετεροζυγωτίας.....	62
--	----

## Ειδικό Μέρος

### Κεφάλαιο 1:

A. Το αγγειογενετικό μόριο Tie-2 και ο αγγειακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) στην παθογένεια των πλευριτικών συλλογών.....	73
B. Η λειτουργική αλληλεπίδραση του βιολογικού άξονα VEGF-Stromal cell derived factor-1 <sup>α</sup> (SDF-1 <sup>α</sup> /CXCL12) σε κακοήθεις πλευριτικές συλλογές από καρκίνο του πνεύμονα.....	94

### Κεφάλαιο 2:

Ο ρόλος του Μικροδορυφορικού DNA στη διαφορική διάγνωση των υπεζωκοτικών συλλογών.....	112
--	-----

Τελικά συμπεράσματα και μελλοντικές κατευθύνσεις.....	129
---	-----

Περίληψη στα αγγλικά.....	131
---------------------------	-----

Δημοσιευμένες εργασίες.....	137
Κατάλογος ελεύθερων ανακοινώσεων.....	138
Ανάτυπα δημοσιεύσεων.....	140

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Με την ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου Νικόλαο Σιαφάκα, για τη συμβολή του στην εκπόνηση αυτής της διατριβής. Υπήρξε ο άνθρωπος που από τα φοιτητικά μου ακόμη χρόνια με ενέπνευσε να ασχοληθώ με την ειδικότητα της Πνευμονολογίας, αλλά και με την ιατρική έρευνα. Θα είμαι πάντοτε ευγνώμων για την υποστήριξη και τις πολύτιμες συμβουλές του.

Οφείλω επίσης να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου τις Λέκτορες Πνευμονολογίας, Ελένη Τζωρτζάκη και Σοφία Σχίζα, χωρίς την έμπνευση και την καθοδήγηση των οποίων θα ήταν αδύνατη η ολοκλήρωση της διατριβής μου.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την Λέκτορα Πνευμονολογίας και φίλη μου Κατερίνα Αντωνίου, για την έμπρακτη βοήθεια, την αμέριστη συμπαράσταση και την υποστήριξη της στην επιστημονική μου πορεία.

## ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΟΝΟΜΑ	<b>ΦΩΤΕΙΝΗ</b>
ΕΠΩΝΥΜΟ	<b>ΟΙΚΟΝΟΜΙΔΟΥ</b>
ΗΜΕΡ. ΓΕΝΝΗΣΕΩΣ	18.05.1971
ΚΑΤΑΓΩΓΗ	ΛΗΜΝΟΣ
ΟΙΚΟΓΕΝ. ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ	ΑΓΑΜΟΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ	ΥΨΗΛΑΝΤΟΥ 30, 11521 ΑΘΗΝΑ
ΤΗΛΕΦΩΝΟ	2107212103, 6947203558
E-MAIL	foikon@yahoo.gr

### ΣΠΟΥΔΕΣ

ΙΟΥΝΙΟΣ 1989	Απολυτήριο 3ου Γενικού Λυκείου Ζωγράφου, Αθήνα
ΙΟΥΝΙΟΣ 1995	Αποφοίτηση από τα Τ.Ε.Ι. ΑΘΗΝΩΝ Σχολή Σ.Ε.Υ.Π Τμήμα Ραδιολογίας Ακτινολογίας
ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2001	Αποφοίτηση από την ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ Πανεπιστημίου Κρήτης
ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2005	Έγκριση εκπόνησης διδακτορικής διατριβής με θέμα «Βιολογικοί και γενετικοί δείκτες στην διαφοροδιάγνωση των υπεζωκοτικών συλλογών» από το τμήμα Πνευμονολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ηρακλείου Κρήτης

ΜΑΡΤΙΟΣ 2008

Απόκτηση τίτλου ειδικότητας « Πνευμονολογία-  
Φυματολογία»

### ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

ΜΑΡΤ. '01-ΝΟΕΜΒ. '02

Αγροτικός ιατρός αποσπασμένη από το  
περιφερειακό ιατρείο των Αγίων Δέκα- Κέντρου  
Υγείας Μοιρών στο Ογκολογικό Τμήμα του  
Βενιζελείου, Γενικού Περιφερειακού Νοσοκομείου  
Ηρακλείου Κρήτης

ΔΕΚΕΜ. '02-ΜΑΡΤ. '03

Εργαστήριο Ύπνου της Ιατρικής Σχολής του  
Πανεπιστημίου Κρήτης

ΑΠΡΙΛ. '03-ΝΟΕΜ '05

Ειδικευόμενη ιατρός στην Πνευμονολογική  
Κλινική του Βενιζελείου, Γενικού Περιφερειακού  
Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης

ΝΟΕΜ '05 –ΙΑΝΟΥΑΡ '08

Ειδικευόμενη ιατρός στην Πνευμονολογική  
Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου  
Ηρακλείου Κρήτης

ΙΟΥΛΙΟΣ '08-ΣΗΜΕΡΑ

Εξειδικευόμενη ιατρός στην Μονάδα Εντατικής  
Θεραπείας του Νοσοκομείου "ΕΥΑΓΓΕΛΙΣΜΟΣ"

### ΕΡΓΑΣΙΕΣ

1. Νεώτερες Τεχνολογικές Μέθοδοι για την αντιμετώπιση του Καρκίνου του Δέρματος  
(Πτυχιακή Διατριβή) Μάιος 1995

2. Οργανωτική επιτροπή του 3<sup>ου</sup> Σεμιναρίου Κλινικής Ιατρικής με τίτλο «Διλήμματα στην Κλινική Ιατρική» που οργανώθηκε από την Πανεπιστημιακή Γαστρεντερολογική Κλινική στο Ηράκλειο της Κρήτης στις 15 Απριλίου 2000
3. Οργανωτική επιτροπή του 4<sup>ου</sup> Σεμιναρίου Κλινικής Ιατρικής με τίτλο «Ιατρική βασιζόμενη στις ενδείξεις (Evidence based Medicine)» που οργανώθηκε από την Πανεπιστημιακή Γαστρεντερολογική Κλινική στο Ηράκλειο της Κρήτης στις 17 Μαρτίου 2001
4. Αιτιολογική θεραπεία μεταστατικών γαστρεντερικών όγκων (GIST) με imatinib (glivec). Παρουσίαση δύο περιστατικών  
Φ.Οικονομίδου, Ε.Βούλγαρη, Λ.Βαμβακάς, Γ.Πασπατής, Σ.Τσούσης  
Ελεύθερη ανακοίνωση στο 11<sup>ο</sup> Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Χανιά 1-3 Νοεμβρίου 2002
5. Επιτυχής θεραπεία «Ιδιοπαθούς θρομβοπενικής πορφύρας» (ITP-like syndrome ) επί Μικροκυτταρικού Καρκίνου πνεύμονα με μικρή δόση ιντερφερόνης.  
Φ. Οικονομίδου, Ε. Βουρλιωτάκη, Ι.Καράλης, Α. Δερμιτζάκης, Σ.Τσούσης  
Αναρτημένη ανακοίνωση στο 1<sup>ο</sup> Διαιτηρικό Αντικαρκινικό Συνέδριο, Αθήνα 20-23 Μαρτίου 2003
6. Παράμετροι της τελικής φάσης και χαρακτηριστικά του θανάτου 125 ασθενών του Παθολογικού Ογκολογικού τμήματος γενικού νοσοκομείου  
Φ.Οικονομίδου, Ε.Βουρλιωτάκη, Σ.Τσούσης  
Ελεύθερη ανακοίνωση στο 1<sup>ο</sup> Διαιτηρικό Αντικαρκινικό Συνέδριο, Αθήνα 20-23 Μαρτίου 2003
7. Η καπεσιταμίνη δυνατόν να αποτελέσει υποκατάστατο της φλουοροουρακίλης (5FU), σε ασθενείς με Περιοριστική φωτοευαισθησία στη 5FU  
Ε.Βουρλιωτάκη, Φ.Οικονομίδου, Σ.Τσούσης  
Αναρτημένη ανακοίνωση στο 1<sup>ο</sup> Διαιτηρικό Αντικαρκινικό Συνέδριο, Αθήνα 20-23 Μαρτίου 2003
8. Τόπος νοσηλείας τελικής φάσης και θανάτου 125 ασθενών ογκολογικού τμήματος γενικού νοσοκομείου. Στοιχεία Διαχείρισης «οξείας νοσοκομειακής κλινικής».  
Φ.Οικονομίδου, Ε.Βουρλιωτάκη, Ε.Παπαδάκη, Σ.Τσούσης  
Ελεύθερη ανακοίνωση στο 5<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Επιστημονικό Συνέδριο Management Υπηρεσιών Υγείας

Ρόδος 23-25 Οκτωβρίου 2003

**9.** Κατανομή πνευμονικού εμφυσήματος στην αξονική τομογραφία υψηλής ευκρίνειας σε νεαρούς, μη καπνιστές, χωρίς έλλειψη α<sub>1</sub> αντιθρυψίνης

Φ. Οικονομίδου, Μ.Κοκκινάκη, Γ.Μελέτης, Μ.Φερδούτσης, Ε.Θάνου, Κ. Αντωνίου, Ε.Ψαράκης, Γ.Πατσουράκης, Ν.Μπαχλιτζανάκης, Λ.Τριανταφύλλου

Τμήμα Αξονικού Τομογράφου και Πνευμονολογική Κλινική Βενιζελείου Γενικού Περιφερειακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης

Ελεύθερη ανακοίνωση στο 12<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος

**10.** Η bolus χορήγηση του κυτταροπροστατευτικού παράγοντα Amofostine (Ethyol, WR2721) μειώνει τη συμπτωματική υπόταση σε ασθενείς που θεραπεύονται με συνδυασμένη χημειοθεραπεία για καρκίνο του πνεύμονα

Μ. Φερδούτσης, Γ.Μελέτης, Κ.Αντωνίου, Μ.Πλατάκη, Ε.Θάνου, Φ.Οικονομίδου, Γ.Πατσουράκης, Ν.Μπαχλιτζανάκης

Πνευμονολογική Κλινική Βενιζελείου Γενικού Περιφερειακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης

Ελεύθερη ανακοίνωση στο 12<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος

**11.** Η ευαισθησία στα αντιβιοτικά του *Acinetobacter Baumannii* και της *Pseudomonas Aeruginosa* μετά από μικροβιολογική ανάλυση των πτυέλων σε ασθενείς με μηχανικό αερισμό στη ΜΕΘ

Βακούτη Ε., Ασρινάκη Ε., Μελέτης Γ., Φερδούτσης Μ., Οικονομίδου Φ., Ζωγραφιστός Ν., Θάνου Ε., Κουργεράκη Ο., Βρούχος Γ., Μπαχλιτζανάκης Ν.

Πνευμονολογική Κλινική και ΜΕΘ Βενιζελείου Γενικού Περιφερειακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης

Αναρτημένη ανακοίνωση στο 12<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος

**12.** B-Thalassemia: pulmonary function in transfusion-dependent patients and correlation with ferritin levels

Nikolaos C. Bachlitzanakis, Elizavet N. Thanou, Emmanouil L. Ferdoutsis, Georgios, D. Meletis, Konstantinos I., Anyfantakis, Fotini N. Economidou, Georgios M. Patsourakis, Alexandros H. Papadakis

Pulmonary Medicine, B-Thalassemia and others hemoglobin disorders

Venizelion General Hospital, Crete, Greece



Posteur, 14<sup>th</sup> ERS Annual Congress, Glasgow, UK

**13.** High resolution computed tomography findings in respiratory asymptomatic patient with b-thalassemia major

Maria M. Kokkinaki, Fotini N. Economidou, Konstantinos I. Anofantakis, Emmanouil L. Ferdoutsis, Georgios D. Meletis, Elizavet N. Thanou, Nikolaos C. Bachlitzanakis, Alexandros H. Papadakis, Lambros Triantafilou

Computed Tomography Department, Pulmonary Medicine, B-Thalassemia and others hemoglobin

Disorders Venizelion General Hospital, Crete, Greece

Posteur- Presentation, 14<sup>th</sup> ERS Annual Congress, Glasgow, UK

**14.** Ait-trapping semiquantitative analysis performed by high resolution computed tomography in patients with b-thalassemia major and correlation with spirometric findings and serum ferritin levels

Maria M. Kokkinaki, Georgios D. Meletis, Fotini N. Economidou, Konstantinos I. Anofantakis, Emmanouil L. Ferdoutsis, Elizavet N. Thanou, Lambros V. Triantafilou, Alexandros H. Papadakis, Nikolaos C. Bachlitzanakis

Computed Tomography Department, Pulmonary Medicine, B-Thalassemia and others hemoglobin

Disorders Venizelion General Hospital, Crete, Greece

Posteur- Presentation, 14<sup>th</sup> ERS Annual Congress, Glasgow, UK

**15.** Ευρήματα από την αξονική τομογραφία υψηλής ευκρίνειας θώρακος (HRCT) σε Ασυμπτωματικούς αναπνευστικά ασθενείς με β-θαλασσαιμία

Οικονομίδου Φ, Καλιτσουνάκη ΑΜ, Φερδούτσης Μ, Ανυφαντάκης Κ, Κοκκινάκη Μ, Μελέτης Γ, Πατσουράκης Γ, Παπαδάκης Α, Τριανταφύλλου Λ, Μπαχλιτζανάκης Ν Πνευμονολογικό Τμήμα, Μονάδα Μεσογειακής Αναιμίας και Τμήμα Αξονικού Τομογράφου Βενιζελείου Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης

Ελεύθερη ανακοίνωση στο 12<sup>ο</sup> Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο

**16.** Ημιοσοτική ανάλυση παγίδευσης αέρα (air-trapping) σε αξονική τομογραφία υψηλής ευκρίνειας θώρακα (HRCT) ασθενών με Β-Θαλασσαιμία. Συσχέτιση με τα σπυρομετρικά ευρήματα και τα επίπεδα φερριτίνης στο αίμα

Ε. Θάνου, Α. Παπαδάκης, Φ. Οικονομίδου, Κ. Ανυφαντάκης, Μ. Κοκκινάκη, Ε.

Φερδούτσας, Γ. Μελέτης, Α.Μ. Καλιτσουνάκη, Λ. Τριανταφύλλου, Ν. Μπαχλιτζανάκης  
Πνευμονολογικό Τμήμα, Μονάδα Μεσογειακής Αναιμίας και Τμήμα Αξονικού  
Τομογράφου Βενιζελείου Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης

Ελεύθερη ανακοίνωση στο 12<sup>ο</sup> Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο

**17. Σπάνια περίπτωση πνευμονίας από *Penicillium Marneffei* σε ανοσοκατασταλαμένο ασθενή**

Φ. Οικονομίδου, Γ. Μελέτης, Ε. Φερδούτσας, Γ. Πατσουράκης, Μ. Κοκκινάκη, Ν.

Λυδατάκη, Σ. Μαράκη, Ε. Θάνου, Α.Μ. Καλιτσουνάκη, Ν.Μπαχλιτζανάκης

Πνευμονολογική Κλινική Βενιζελείου Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης

Ελεύθερη ανακοίνωση στο 12<sup>ο</sup> Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο

**18. Αποφρακτική Βρογχολίτιδα με οργανοειδή πνευμονία (BOOP-OP) σε ασθενή με οξεία μυελογενή λευχαιμία**

Ε. Θάνου, Φ. Οικονομίδου, Α.Μ. Καλιτσουνάκη, Κ. Σαμαρά, Γ. Μελέτης, Κ.Θυμάκη, Μ.

Φερδούτσας, Ε. Χρονάκη, Γ.Πατσουράκης, Ν.Μπαχλιτζανάκης

Πνευμονολογική Κλινική Βενιζελείου Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης

Ελεύθερη ανακοίνωση στο 12<sup>ο</sup> Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο

**19. Β-Θαλασσαιμία, πνευμονική λειτουργία σε μεταγγιζόμενους ασθενείς και συσχέτιση με τα επίπεδα φερριτίνης στο αίμα**

Φ.Οικονομίδου, Α.Παπαδάκης, Γ.Μελέτης, Μ. Φερδούτσας, Ε.Θάνου, Γ.Πατσουράκης,

Κ.Θυμάκη, Κ. Ανυφαντάκης, Κ.Σαμαρά, Ν. Μπαχλιτζανάκης

Πνευμονολογικό Τμήμα και Μονάδα Μεσογειακής Αναιμίας

Βενιζελείου Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης

Ελεύθερη ανακοίνωση στο 12<sup>ο</sup> Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο

**20. Ασυνήθης περίπτωση παρουσίας ενδοβρογχικού ξένου σώματος σαν τυχαίο εύρημα στην HRCT θώρακα σε ασυμπτωματικό νέο άνδρα**

Μουρκογιάννης Ν., Οικονομίδου Φ., Μελέτης Γ., Φερδούτσας Μ., Κοκκινάκη Μ.,

Ψυλλάκης Κ., Ματθαϊάκης Μ., Ψαράκης Ε., Τριανταφύλλου Λ.

Τμήμα Υπολογιστικής Τομογραφίας και Πνευμονολογικό Τμήμα

Βενιζελείου Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης

Αναρτημένη ανακοίνωση στο 14<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Ακτινολογικό Συνέδριο

**21. Ευρήματα υπολογιστικής τομογραφίας υψηλής ευκρίνειας (HRCT) σε φορείς**

- μείζονος β-θαλασσαιμίας, ασυμπτωματικούς από το αναπνευστικό σύστημα  
Μουρκογιάννης Ν., Κοκκινάκη Μ., Οικονομίδου Φ., Φερδούτσης Ε., Μελέτης Γ.,  
Ψυλλάκης Κ., Παπαδάκης Α., Ψαράκης Ε., Τριανταφύλλου Λ.  
Τμήμα Υπολογιστικής Τομογραφίας, Πνευμονολογικό Τμήμα και Μονάδα Μεσογειακής  
Αναιμίας Βενιζελείου Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης  
Αναρτημένη ανακοίνωση στο 14<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Ακτινολογικό Συνέδριο
- 22.** Απεικονιστικά ευρήματα στη HRCT Συνδρόμου Swyer-James-Macleod, σε  
ασυμπτωματικό ασθενή  
Μουρκογιάννης Ν., Μπιμπάκης Ι., Οικονομίδου Φ., Μελέτης Γ., Κοκκινάκη Μ.,  
Γαργουλάκη Μ., Δασκαλάκη Μ., Ψαράκης Ε., Τριανταφύλλου Λ.  
Τμήμα Υπολογιστικής Τομογραφίας, Αντιφυματική Μονάδα και Πνευμονολογικό  
Τμήμα Βενιζελείου Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης  
Αναρτημένη ανακοίνωση στο 14<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Ακτινολογικό Συνέδριο
- 23.** Υποθυρεοειδισμός σε ασθενείς με υπερκαπνική αναπνευστική ανεπάρκεια  
Μ. Φερδούτσης, Φ. Οικονομίδου, Γ. Μελέτης, Ε. Θάνου, Μ. Χριστοδούλου, Α.Μ.  
Καλτσουνάκη, Ε. Αστρινάκη, Γ. Πατσουράκης, Ν.Μπαχλιτζανάκης  
Πνευμονολογικό Τμήμα Βενιζελείου Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης  
Ελεύθερη ανακοίνωση στο 31<sup>ο</sup> ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο
- 24.** Προσδιορισμός με rast της ευαισθητοποίησης σε αλλεργιογόνα σε ασθενείς με χρόνια  
βήχα οφειλόμενο σε άσθμα (CVA- cough variant asthma)  
Γ. Μελέτης, Ε. Θάνου, Μ. Φερδούτσης, Φ. Οικονομίδου, Α.Μ. Καλτσουνάκη, Κ.  
Σαμαρά, Κ. Θυμάκη, Γ. Πατσουράκης, Β. Λιάκου, Ν. Μπαχλιτζανάκης  
Πνευμονολογικό Τμήμα Βενιζελείου Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης  
Ελεύθερη ανακοίνωση στο 31<sup>ο</sup> ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο
- 25.** Role of Tumor Necrosis Factor- Alpha (TNF-a) in the diagnostic assessment of  
pleural effusion: Preliminary results  
F. Economidou, K.M. Antoniou, M.G. Alexandrakis, K. Sfiridaki, N. Tzanakis, E.G.  
Tzortzaki, N.Bachlitzanakis, N.M. Sifakas, S.E. Schiza  
Dept of Pulmonology, Venizeleion Hospital, Heraklion, Greece, Dept of Thoracic  
Medicine, University Hospital, Medical School of Crete, Heraklion, Greece, Dept of  
Haematology, University Hospital, Medical School of Crete, Heraklion, Greece.

Posteur, ATS 2005, International Conference, May 20-25, San Diego, California

**26.** Can high resolution tomography findings predict the recurrence of spontaneous pneumothorax?

F. Economidou, E. Ferdoutsis, G. Meletis, M. Kokkinaki, E. Thanou, K. Samara, G. Patsourakis, L. Triantafyllou, N. Bachlitzanakis

Thoracic Medicine and Computed Tomography Department

Venizelion General Hospital, Crete, Greece

Posteur- Presentation, ERS Annual Congress 2005, in Copenhagen, Denmark

**27.** The importance of intrapleurally- $\gamma$  interferon in ambulatory management of malignant pleural effusion in elderly patients with and-stage NSCCL

E. Ferdoutsis, G. Meletis, E. Thanou, F. Economidou, K. Samara, K. Thymaki, G. Patsourakis, A.M. Kaltsounaki, N. Bachlitzanakis

Pulmonaty Medicine, Venizelion General Hospital, Crete, Greece

Posteur- Presentation, ERS Annual Congress 2005, in Copenhagen, Denmark

**28.** Allergic sensitization in patients with cough variant asthma (CVA)

G. Meletis, E. Thanou, E. Ferdoutsis, F. Economidou, K. Thymaki, A.M. Kaltsounaki, G. Patsourakis, V. Liakou. N. Bachlitzanakis

Department of Pulmonaty Medicine, Venizelion General Hospital, Crete, Greece

Posteur- Presentation, ERS Annual Congress 2005, in Copenhagen, Denmar

**29.** Utility of an algorithm predicting nasal continious airway pressure

S. Shiza, I. Bouloukaki, N. Tzanakis, F. Economidou, N. Siafakas

Sleep Disorders Unit, Department of Thoracic Medicine, University of Crete, Heraklion, Crete

Posteur, ERS Annual Congress 2005, in Copenhagen, Denmar

**30.** Ο ρόλος του tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) στη διάγνωση των πλευριτικών συλλογών: Προκαταρτικά αποτελέσματα

Οικονομίδου Φ., Αντωνίου Κ., Τζανάκης Ν., Τζωρτζάκη Ε., Φερδούτσης Μ., Μελέτης Γ., Μπαχλιτζανάκης Ν., Σιαφάκας Ν., Σχίζα Σ.

Πνευμονολογική Κλινική Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης και

Πνευμονολογική Κλινική Βενιζελείου Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης

Αναρτημένη ανακοίνωση στο 14<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο Νοσημάτων

Θώρακος

**31.** Σπάνια περίπτωση πνευμονίας από *Penicillium Marneffeii* σε ανοσοκατασταλαμένο ασθενή

Φ. Οικονομίδου, Ε. Φερδούτσης, Γ. Μελέτης, Γ. Πατσουράκης, Μ. Κοκκινάκη, Θάνου, Ν.Μπαχλιτζανάκης

Πνευμονολογική Κλινική Βενιζελείου Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης  
Αναρτημένη ανακοίνωση στο 14<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο Νοσημάτων  
Θώρακος

**32.** Μακροχρόνιες κλινικές επιδράσεις της ιντερφερόνης- $\gamma$  -1 $\beta$  και της κολχικίνης στην Ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση.

Κ. Αντωνίου, Μ. Δημάδη, Ν. Τζανάκη, Κ. Μαλαγάρη, Π. Λάτση, Α. Ράπτη, Ρ. Τριγίδου, Χ. Λαμπράκη, Γ. Μπίρμπα, Φ. Οικονομίδου, Β. Πολυχρονόπουλο, Ν. Μπαχλιτζανάκη, Ν.Σιαφάκα, Δ. Μπούρο

Πανεπιστημιακή Πνευμονολογική Κλινική Ηρακλείου Κρήτης και Αλεξανδρούπολης εκ Μέρους της Ομάδας Διάμεσων Πνευμονοπαθειών της Ελληνικής Πνευμονολογικής Εταιρείας

Προφορική Ανακοίνωση στο 14<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος  
1-4 Δεκεμβρίου 2005 Θεσσαλονίκη, Ξενοδοχείο Macedonia Palace

**33.** Investigation of genetic alteration in malignant and infectious pleural fluid: preliminary results

F. Economidou, M. Zervou, K. Samara, E.Tzortzaki, S.Shiza, M,Pougounias, N.Siafakas  
Department of Thoracic Medicine, Medical School, University of Crete, Heraklion Crete  
E-posteur, ERS Annual Congress 2006, in Munich, Germany, September 2-6,2006

**34.** Ευρήματα από την αξονική τομογραφία υψηλής ευκρίνειας (HRCT), σε ασυμπτωματικούς αναπνευστικά ασθενείς με  $\beta$ -θαλασσαιμία

Οικονομίδου Φ., Θάνου Ε., Πηγάκης Κ., Πενθερουδάκη Α., Μπελιάς Χ., Φερδούτσης Ε., Μελέτης Γ., Κοκκινάκη Μ., Πατσουράκης Γ., Μπαχλιτζανάκης Ν.

Πνευμονολογικό Τμήμα, Μονάδα Μεσογειακής Αναιμίας και Τμήμα Αξονικού Τομογράφου Βενιζελείου Γενικού Περιφερειακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης  
Αναρτημένη ανακοίνωση στο 15<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, 2-5 Νοεμβρίου 2006 Κρήτη

**35.** Συγκριτική μελέτη της ημερήσιας vs εβδομαδιαίας χορήγησης epoerlin-beta για τον έλεγχο της σχετιζόμενης με τον καρκίνο του πνεύμονα αναιμίας μετά από συνδυασμένη χημειοθεραπεία σε ασθενείς με NSCCL (σταδίου III A, III B, IV)

Πενθερουδάκη Α., Μπελιάς Χ., Πηγάκης Κ., Οικονομίδου Φ., Θάνου Ε., Σαμαρά Κ., Φερδούτσης Μ., Μελέτης Γ., Πατσουράκης Γ., Μπαχλιτζανάκης Ν.

Πνευμονολογικό Τμήμα Βενιζέλειο Πανάνειο Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου Κρήτης  
Αναρτημένη ανακοίνωση στο 15<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, 2-5 Νοεμβρίου 2006 Κρήτη

**36.** Β θαλασσαιμία:πνευμονική λειτουργία σε μεταγγιζόμενους ασθενείς και συσχέτιση με τα επίπεδα φερριτίνης στο αίμα

Οικονομίδου Φ., Μελέτης Γ., Πενθερουδάκη Α., Πηγάκης Κ., Καράλης Γ., Φερδούτσης Μ., Πατσουράκης Γ., Παπαδάκης Α., Καλιτσουνάκη Α-Μ., Μπαχλιτζανάκης Ν.

Πνευμονολογικό Τμήμα και Μονάδα Μεσογειακής Αναιμίας  
Βενιζελείου Γενικού Περιφερειακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης  
Αναρτημένη ανακοίνωση στο 15<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, 2-5 Νοεμβρίου 2006 Κρήτη

**37.** Ο ρόλος της αγγειογένεσης στην διαφοροδιάγνωση των πλευριτικών συλλογών: προκαταρκτικά αποτελέσματα

Οικονομίδου Φ., Αντωνίου Κ., Σφυριδάκη Κ., Τζανάκης Ν., Σιαφάκας Ν., Σχίζα Σ  
Πνευμονολογική Κλινική Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης  
Αναρτημένη ανακοίνωση στο 15<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, 2-5 Νοεμβρίου 2006 Κρήτη

**38.** Διερεύνηση των γενετικών αλλοιώσεων σε κακοήθεις και φλεγμονώδεις πλευριτικές συλλογές: προκαταρκτικά αποτελέσματα

Οικονομίδου Φ., Ζερβού Μ., Σαμαρά Κ., Σχίζα Σ., Τζωρτζάκη Ε., Σιαφάκας Ν.  
Πνευμονολογική Κλινική Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης  
Αναρτημένη ανακοίνωση στο 15<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, 2-5 Νοεμβρίου 2006 Κρήτη

**39.** Ημιοσοτική ανάλυση παγίδευσης αέρα (air trapping) στην αξονική τομογραφία υψηλής ευκρίνειας (HRCT) σε ασθενείς με β- θαλασσαιμία. Συσχέτιση με τα σπυρομετρικά ευρήματα και τα επίπεδα φερριτίνης στο αίμα

Θάνου Ε., Οικονομίδου Φ., Μπελιάς Χ., Καράλης Γ., Καλιτσουνάκη Α-Μ., Μελέτης Γ., Κοκκινάκη Μ., Φερδούτσης Μ., Πατσουράκης Γ., Μπαχλιτζανάκης Ν  
Πνευμονολογικό Τμήμα, Μονάδα Μεσογειακής Αναιμίας και Τμήμα Αξονικού Τομογράφου Βενιζέλειο Γενικό Περιφερειακό Νοσοκομείο Ηρακλείου Κρήτης  
Προφορική ανακοίνωση στο 15<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, 2-5 Νοεμβρίου 2006 Κρήτη

**40.** Μείωση των αγγειογενετικών CXC χυμοκινών στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ασθενών με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση μετά από θεραπεία με ιντερφερόνη γ-1β

Αντωνίου Κ., Τζωρτζάκη Ε., Οικονομίδου Φ., Αλεξανδράκης Μ., Λαμπίρη Ε., Κοθτσόπουλος Α., Μαλτεζάκης Γ., Τζανάκης Ν., Σιαφάκας Ν.

Πνευμονολογική Κλινική Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης  
Αιματολογική Κλινική Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης

Παθολογοανατομικό Εργαστήριο Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης  
Προφορική ανακοίνωση στο 15<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, 2-5 Νοεμβρίου 2006 Κρήτη

**41.** Οι παροξύνσεις της ΧΑΠ σχετίζονται με την βαρύτητα της νόσου;

Μακρής Δ., Τζανάκης Ν., Μοσχανδρέα Ι., Νταουκάκης Ε., Μαλτεζάκης Γ., Οικονομίδου Φ., Δαμιανάκη Α., Σιαφάκας Ν.

Πνευμονολογικό Τμήμα Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης και Πνευμονολογικό Τμήμα Νομαρχιακού Γενικού Νοσοκομείου Χανίων

Προφορική ανακοίνωση στο 15<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, 2-5 Νοεμβρίου 2006 Κρήτη

**42.** Οι παροξύνσεις της Χρόνιας Αποφρακτικής Πνευμονοπάθειας επιταχύνουν την μείωση της FEV1

Δαμιανάκη Α., Μακρής Δ., Τζανάκης Ν., Κοκκώση Μ., Νταουκάκης Ε., Οικονομίδου Φ., Σιαφάκας Ν.

Πνευμονολογικό Τμήμα Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης και Πνευμονολογικό Τμήμα Νομαρχιακού Γενικού Νοσοκομείου Χανίων

Προφορική ανακοίνωση στο 15<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, 2-5 Νοεμβρίου 2006 Κρήτη

**43.** Μείωση των αγγειογενετικών CXC χυμοκινών στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ασθενών με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση μετά από θεραπεία με ιντερφερόνη γ-1β

Αντωνίου Κ., Τζωρτζάκη Ε., Οικονομίδου Φ., Αλεξανδράκης Μ., Λαμπίρη Ε., Κοθτσόπουλος Α., Μαλτεζάκης Γ., Τζανάκης Ν., Σιαφάκας Ν.

Πνευμονολογική Κλινική Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης

Αιματολογική Κλινική Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης

Παθολογοανατομικό Εργαστήριο Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης

Προφορική ανακοίνωση στο 13<sup>ο</sup> Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, 9-12 Νοεμβρίου 2006  
Ηράκλειο Κρήτης

**44.** Erdheim-Chester disease: an atypical and severe case with multisystemic involvement.

<sup>1</sup>Protopapadakis C, <sup>1</sup>Economidou F, <sup>1</sup>Margaritopoulos G, <sup>1</sup>Antoniou KM, <sup>1</sup>Tzanakis N, <sup>2</sup>Voloudaki A, <sup>1</sup>Lambiri I, <sup>3</sup>Nicholson A, <sup>2</sup>Katantanas A, <sup>1</sup>Siafakas NM

<sup>1</sup>Department of Thoracic Medicine, University School of Crete, <sup>2</sup>Department of Radiology, University School of Crete, <sup>3</sup>Department of Pathology, Brompton Hospital

Oral presentation, joint meeting of the European Society of Thoracic Imaging (ESTI) and Fleischner Society, Athens, 8-10 June 2007

**45.** Long term clinical and radiological effects of interferon gamma-1b in idiopathic pulmonary fibrosis<sup>1</sup>Economidou F, <sup>1</sup>Margaritopoulos G, <sup>1</sup>Protopapadakis C, <sup>2</sup>Voloudaki A, <sup>1</sup>Lambiri I, <sup>3</sup>Malagari K, <sup>1</sup>Antoniou KM, <sup>1</sup>Siafakas NM

<sup>1</sup>Department of Thoracic Medicine, Medical School, University of Crete and <sup>2</sup>Department of Radiology, Medical School, University of Crete

<sup>3</sup>Department of Radiology, Medical School, University of Athens

Oral presentation, joint meeting of the European Society of Thoracic Imaging (ESTI) and Fleischner Society, Athens, 8-10 June 2007

**46.** The role of angiogenesis in the differential diagnosis of pleural effusions F. Economidou, MD1, K.M. Antoniou, MD1, K. Sfiridaki, MD2, N.M. Siafakas, Prof1, S.E. Schiza MD1

Department of Thoracic Medicine, University General Hospital, Heraklion, Greece

Department of Hematology, Venizeleion General Hospital Heraklion, Greece

Poster Presentation at annual congress of American Thoracic Society, San Francisco, May 2007



**47. Differential role of Tyrosine Kinase Receptor Tie-2 in Pulmonary Sarcoidosis**

K.M. Antoniou, MD, I. Lambiri, MD, E.G. Tzortzaki, MD, M. Plataki, MD, F. Economidou, MD, E. Stamataki, RN, N. Tzanakis, MD, G. Maltezas, MD, N.M. Siafakas, Prof

Department of Thoracic Medicine, University General Hospital, Heraklion, Greece

Poster Presentation at annual congress of American Thoracic Society, San Francisco, May 2007

**48. Sleep disorders related symptomatology in professional drivers: Preliminary results**

C.Papadaki, N. Tzanakis, I.Bouloukaki, F. Economidou, N.M.Siafakas, S.E.Schiza

Dept of Clinical Epidemiology, Public Health, Medical School, University of Heraklion, Crete and Dept of Thoracic Medicine, Sleep Disorders Unit, Medicine School, University of Crete, Heraklion, Greece

Poster Presentation at annual congress of American Thoracic Society, San Francisco, May 2007

**49. Effects of 6 and 12 months smoking cessation of airway inflammation**

I.E.Bouloukaki, M.Tsoumakidou, I.Mitrouska, F.Economidou, N.M.Siafakas, N.Tzanakis.

Dept of Thoracic Medicine, Medical School, Heraklion, Crete, Greece

Poster Presentation at annual congress of American Thoracic Society, San Francisco, May 2007

**50. Could Microsatellite Analysis of pleural fluid increase sensitivity of pleural fluid cytology?**

Economidou F., Tzortzaki EG., Neofytou E., Antoniou KM., Tzanakis N., Siafakas NM., Schiza S.

Department of Thoracic Medicine of University Hospital, Heraklion, Crete, Greece

Electronic Poster Discussion, Annual Congress of European Respiratory Society, Stockholm, Sweden, 15-19 September 2007

**51. VEGF expression does not differentiate between idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidosis.** Antoniou K, Economidou F, Soufla G, Tzortzaki E, Lambiri I, Tzanakis N, Spandidos D, Siafakas N. Dept of Thoracic Medicine, Medical School, University of Crete, Heraklion Greece, Dept of Virology, Medical School, University of Crete, Heraklion, Greece

Poster presentation, Annual Congress of European Respiratory Society, Stockholm, Sweden, 15-19 September 2007

**52.** Hemoptysis: A retrospective study of 127 cases comparing imaging and laboratory findings in relation to etiology in previously asymptomatic patients

N.Mourkoyiannis, F.Oikonomidou, M.Kokkinaki, M.Michalaku, N.Segkos, G.Meletis, E.Ferdoutsis, K.Psilakis, L.Triantafyllou

Radiological and Thoracic Departments of Venizelleion General Hospital, Heraklion Crete, Greece

Electronic poster, European Congress of Radiology, Vienna, Austria 2004

**53.** Μελέτη έκφρασης σε επίπεδο mRNA των αγγειογενετικών αυξητικών παραγόντων VEGF, TGF- $\beta$ 1, FGF-2, IGF-1 σε πνευμονικό ιστό ασθενών με Ιδιοπαθή Πνευμονική Ίνωση

Φ.Οικονομίδου, Κ.Αντωνίου, Ι.Σούφλα, Ε.Τζωτζάκη, Α.Πρόκλου, Ε.Λαμπίρη, Ν.Σιαφάκας

Πνευμονολογική Κλινική Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης

Εργαστήριο Ιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης

Προφορική ανακοίνωση στο 16<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος

6-9 Δεκεμβρίου 2007, Αθήνα Ξενοδοχείο Hilton

**54.** 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

Κ.Μ.Αντωνίου, Γ.Σούφλα, Α.Δαμιανάκη, Φ.Οικονομίδου, Ε.Κουταλά, Μ.Χ.Καστρινάκη, Δ.Σπαντίδος, Ε.Α.Παπαδάκη, Ν.Μ.Σιαφάκας

Πνευμονολογική Κλινική Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης,

Εργαστήριο Ιολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης, Εργαστήριο Αιματολογίας,

Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης, Αιματολογική Κλινική Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης

Προφορική ανακοίνωση στο 16<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος

6-9 Δεκεμβρίου 2007, Αθήνα Ξενοδοχείο Hilton

**55.** Η ανάλυση του μικροδορυφορικού DNA δεν διαχωρίζει τις κακοήθειες από τις καλοήθειες πνευμονικές συλλογές

Φ.Οικονομίδου, Ε.Τζωρτζάκη, Σ.Σχίζα, Κ.Αντωνίου, Ε.Νεοφύτου, Μ.Ζερβού, Κ.Σαμαρά, Γ.Σκουλά, Ν.Σιαφάκας

Πνευμονολογική Κλινική Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης, Ερευνητικό Εργαστήριο Πνευμονολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης  
Προφορική ανακοίνωση στο 16<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος  
6-9 Δεκεμβρίου 2007, Αθήνα Ξενοδοχείο Hilton

**56.** Erdheim Chester Disease: Μια σπάνια νόσος με πολυσυστηματική συμμετοχή  
Χ.Πρωτοπαπαδάκης, Κ.Αντωνίου, Φ.Οικονομίδου, Γ.Μαργαριτόπουλος, Γ.Μαλτεζάκης, Ν.Τζανάκης, Ν.Σιαφάκας

Πνευμονολογική Κλινική Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης  
Αναρτημένη ανακοίνωση στο 16<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος  
6-9 Δεκεμβρίου 2007, Αθήνα Ξενοδοχείο Hilton

**57.** Μειωμένη διακριτική ικανότητα του Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) μεταξύ Ιδιοπαθούς Πνευμονικής Ύψωσης και Σαρκοείδωσης

Γ.Μαργαριτόπουλος, Κ.Αντωνίου, Ι.Σούφλα, Φ.Οικονομίδου, Ι.Πολίτης, Ε.Τζωρτζάκη, Ν.Σιαφάκας

Πνευμονολογική Κλινική Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης, Εργαστήριο Ιολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης  
Αναρτημένη ανακοίνωση στο 16<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος  
6-9 Δεκεμβρίου 2007, Αθήνα Ξενοδοχείο Hilton

**58.** Κλινικά, ακτινολογικά και εργαστηριακά ευρήματα μετά από μακροχρόνια χορήγηση ιντερφερόνης-γ-1β σε ασθενείς με Ιδιοπαθή Πνευμονική Ύψωση

Φ.Οικονομίδου, Κ.Αντωνίου, Ε.Τζωρτζάκη, Ν.Τζανάκης, Α.Πρόκλου, Δ.Μωραϊτάκη, Γ.Μαλτεζάκης, Ν.Σιαφάκας

Πνευμονολογική Κλινική Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης  
Αναρτημένη ανακοίνωση στο 16<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος  
6-9 Δεκεμβρίου 2007, Αθήνα Ξενοδοχείο Hilton

**59.** Expression analysis of the biological axis CXCL 12/CXCR4 in the bone marrow mesenchymal stem cells in patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis.

Κ.Αντωνίου, Η.Παπαδάκη, Γ.Σούφλα, Α.Δαριβιανάκη, Η.Κουτάλα, Μ.Κ.Καστρινάκη, Ε.Οικονομίδου, Δ.Σπανδίδος, Ν.Σιαφάκας

Medical School University of Crete, Thoracic Medicine, Heraklion Crete, Greece  
Poster Presentation, 6<sup>TH</sup> ERS Lung Science Conference, 14-16 March 2008, Estoril,  
Portugal

**60.** Functional and molecular characteristic of bone marrow mesenchymal stem cells in  
Idiopathic Pulmonary Fibrosis

K.M.Antoniou, H.Papadaki, G.Soufla, A.Dariviaki, H.Koutala, C.Kastrinaki,  
F.Economidou, D.Spandidos, N.M.Siafakas

Dept of Thoracic Medicine, Medical School, University of Crete, Heraklion, Greece

Dept of Hematology, Medical School of Crete, Heraklion, Greece

Dept of Virology, Medical School of Crete, Heraklion, Greece

Poster Presentasion, Annual Congress of American Thoracic Society, 16-21 May 2008,  
Toronto, Canada

**61.** Transcriptional inactivation of p53 gene in the apoptotic pathway of Idiopathic  
Pulmonary Fibrosis: Preliminary results

K.M.Antoniou, C.Choulaki, G.Soufla, F.Economidou, I.Drositis, M.Manousakis,  
N.M.Siafakas, D.Spandidos

Dept of Thoracic Medicine, Medical School, University of Crete, Heraklion, Greece

Dept of Rheumatology, Clinical Immunology and Allergy, University of Crete,  
University Hospital, Heraklion, Greece

Dept of Virology, Medical School, University of Crete, Heraklion, Greece

Dept of Thoracic Surgery, Medical School, University of Crete, Heraklion, Greece

Poster Presentasion, Annual Congress of American Thoracic Society, 16-21 May 2008,  
Toronto, Canada

**62.** Investigation of the biological axis Strimal Cell Derived Factor 1 and receptor (SDF-  
1/CXCL12) in patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis

K.M.Antoniou, G.Soufla, F.Economidou, R.Lymbouridou, G.Margaritopoulos,  
D.Spandidos, N.M.Siafakas

Dept of Thoracic Medicine, Medical School, University of Crete, Heraklion, Greece

Dept of Virology, Medical School, University of Crete, Heraklion Greece

Poster Presentasion, Annual Congress of American Thoracic Society, 16-21 May 2008,  
Toronto, Canada

**63.** Angiogenetic profiles (VEGF and VEGF receptor-1, Flt-1) in Bronchoalveolar Lavage Fluid in patients with Interstitial Lung Diseases

F.Economidou, K.M.Antoniou, G.Soufla, E.G.Tzortzaki, R.Lymbouridou, G.Margaritopoulos, I.Politis, N.Tzanakis, N.M.Siafakas

Dept of Thoracic Medicine, Medical School, University of Crete, Heraklion Greece

Dept of Virology, Medical School, University of Crete, Heraklion, Greece

Poster Presentasion, Annual Congress of American Thoracic Society, 16-21 May 2008, Toronto, Canada

**64.** VEGF expression in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) in patients with Fobrotic Interstitial Pneumonias: Idiopathic versus Collagen Vascular Disease related subtype: Preliminary results

G.Margaritopoulos, K.M.Antoniou, R.Lynbouridou, G.Soufla, F.Economidou, A.Proklou, I.Lambiri, N.Tzanakis, N.M.Siafakas

Dept of Thoracic Medicine, Medical School, University of Crete, Heraklion Greece

Dept of Virology, Medical School, University of Crete, Heraklion, Greece

Poster Presentasion, Annual Congress of American Thoracic Society, 16-21 May 2008, Toronto, Canada

**65.** Impaired VEGF receptor-1, Flt-1 expression in bronchoalveolar lavage fluid in patients with Pulmonary Sarcoidosis

Economidou F., Antoniou K.M., Soufla G., Proklou A., Samara K., Choulaki C., Lymbouridou R., Siafakas NM.

Dept of Thoracic Medicine, Medical School, University of Crete, Heraklion Greece

Dept of Virology, Medical School, University of Crete, Heraklion, Greece

Poster Presentasion, 9<sup>th</sup> WASONG Meeting and 11<sup>th</sup> BAL International Conference, June 19-22, 2008, Athens, Greece

**66.** Increased expression of the biological axis CXCL12/CXCR4 in bone marrow mwswnchymal srem cells (BM MSCS) in patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis

K.M.Antoniou, H.Papadaki, G.Soufla, A.Dariviaki, H.Koutala, C.Kastrinaki, F.Economidou, D.Spandidos, N.M.Siafakas

Dept of Thoracic Medicine, Medical School, University of Crete, Heraklion, Greece

Dept of Hematology, Medical School of Crete, Heraklion, Greece

Dept of Virology, Medical School of Crete, Heraklion, Greece

Poster Presentasion, 9<sup>th</sup> WASONG Meeting and 11<sup>th</sup> BAL International Conference, June 19-22, 2008, Athens, Greece

**67.** Investigation of telomerase expression in bone marrow mesenchymal stem cells and lung tissue from patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis

K.M.Antoniou, G.Soufla, C.Kastrinaki, F.Economidou, A.Damianaki, A.Proklou, D.Spandidos, H.Papadaki, N.M.Siafakas

Dept of Thoracic Medicine, Medical School, University of Crete, Heraklion, Greece

Dept of Hematology, Medical School of Crete, Heraklion, Greece

Dept of Virology, Medical School of Crete, Heraklion, Greece

Poster Presentasion, 9<sup>th</sup> WASONG Meeting and 11<sup>th</sup> BAL International Conference, June 19-22, 2008, Athens, Greece

**68.** Increased expression of stromal cell derived factor-1/CXC chemokine receptor 4 (SDF-1/CXCL12-CXCR4) biological axis in inrestitial pneumonias associated with collagen vascular disease: Abronchoalveolar lavage fluid study

G.Margaritopoulos, K.M.Antoniou, G.Soufla, F.Economidou, C.Choulaki, A.Proklou, R. Lymbouridou, I.Lambiri, N.Tzanakis, N.M.Siafakas

Dept of Thoracic Medicine, Medical School, University of Crete, Heraklion Greece

Dept of Virology, Medical School, University of Crete, Heraklion, Greece

Poster Presentasion, 9<sup>th</sup> WASONG Meeting and 11<sup>th</sup> BAL International Conference, June 19-22, 2008, Athens, Greece

**69.** Expression of angiogenic growth factors and stromal cell derived factor-1/CXC chemokine receptor 4 (SDF-1/CXCL12–CXCR4) biological axis inidiopathic pulmonary fibrosis: a lung tissue study.

Athanasia Proklou, Katerina Antoniou, Giannoula Soufla, Foteini Economidou, Katerina Samara, Manolis Manousakis, Ioannis Drositis, Demetrios Spandidos, Nikolaos Siafakas.

Thoracic Medicine, University of Crete, Heraklion,Greece, Virology, University of Crete, Heraklion, Greece, Thoracic Surgery, University of Crete, Heraklion, Greece

Poster Presentasion, Annual Congress of European Respiratory Society, Berlin, Germany, 4-8 October 2008

**70.** Angiogenetic profiles (VEGF and VEGF receptor-1, Flt-1) in bronchoalveolar lavage fluid in patients with interstitial lung diseases.

Foteini Economidou , Katerina Antoniou , Katerina Samara, Giannoula Soufla, Christiana Choulaki, Athanasia Proklou , Ioannis Politis , Despoina Moraitaki, Nikos Tzanakis, Nikos Siafakas

Dept. of Thoracic Medicine, Medical School, University of Crete, Heraklion, Greece, Dept. of Virology, Medical School, University of Crete, Heraklion, Greece, Laboratory of Internal Medicine, University of Crete, Heraklion, Greece

Poster Presentasion, Annual Congress of European Respiratory Society, Berlin, Germany, 4-8 October 2008

**71.** Increased expression of angiogenic growth factor stromal cell derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) in pleural fluid of patients with lung cancer: preliminary results

Foteini Economidou, Katerina Antoniou, Giannoula Soufla, Athanasia Proklou, Rena Lymbouridou, George Maltezas, Nikolaos Tzanakis, Nikolaos Siafakas

Dept. of Thoracic Medicine, Dept. of Virology, Medical School, University of Crete, Heraklion, Greece

Poster Presentasion, Annual Congress of European Respiratory Society, Berlin, Germany, 4-8 October 2008

**72.** 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 fluid study

George Margaritopoulos, Katerina Antoniou, Giannoula Soufla, Foteini Economidou, Christiana Choulaki, Athanasia Proklou, Rena Lymbouridou, Irini Lambiri, Nikos Tzanakis, Nikos Siafakas

Dept. of Thoracic Medicine, Medical School, University of Crete, Heraklion, Greece, Dept. of Virology, Medical School, University of Crete, Heraklion, Greece, Laboratory of Internal Medicine, School of Health Sciences, University of Crete, Heraklion, Greece

Poster Presentasion, Annual Congress of European Respiratory Society, Berlin, Germany, 4-8 October 2008

**73.** Functional molecular and proteomic characterization of bone marrow mesenchymal stem cells in Idiopathic Pulmonary Fibrosis

Katerina Antoniou, Giannoula Soufla, H. Papadaki, A. Darivianaki, H. Koutala, C.Kastrinaki, Foteini Economidou, Dimitris Spandidos, Nikos Siafakas

Oral Presentation, 11<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Medicine, Hersonissos, Crete, Greece, 9-11 October 2008

**74.** Αυξημένη έκφραση του αγγειογενετικού παράγοντα stromal cell derived factor-1 σε κακοήθεις πνευμονικές συλλογές: προκαταρκτικά αποτελέσματα

Φωτεινή Οικονομίδου, Κατερίνα Αντωνίου, Γιαννούλα Σούφλα, Ρένα Λυμπουρίδου, Αθανασία Πρόκλου, Δέσποινα Μωραϊτάκη, Νικόλαος Τζανάκης, Νικόλαος Σιαφάκας

Εργαστήριο Πνευμονολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης και Εργαστήριο Ιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης

Αναρτημένη ανακοίνωση στο 17<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, 20-23 Νοεμβρίου 2008, Αλεξανδρούπολη

**75.** Αυξημένη έκφραση του βιολογικού άξονα stromal cell derived factor-1 και του υποδοχέα (SDF-1/CXCL12-CXCR4) στα κολλαγονικά νοσήματα με διάμεση συμμετοχή

Γιώργος Μαργαριτόπουλος, Κατερίνα Αντωνίου, Γιαννούλα Σούφλα, Φωτεινή Οικονομίδου, Αθανασία Πρόκλου, Ρένα Λυμπουρίδου, Ειρήνη Λαμπίρη, Δέσποινα Μωραϊτάκη, Νικόλαος Σιαφάκας

Πνευμονολογική Κλινική Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης και Εργαστήριο Ιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης

Αναρτημένη ανακοίνωση στο 17<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, 20-23 Νοεμβρίου 2008, Αλεξανδρούπολη

**76.** Διαφορετική δραστηριότητα του βιολογικού άξονα VEGF/FLT-1 μεταξύ σαρκοείδωσης και ίνωσης

Γιώργος Μαργαριτόπουλος, Ιωάννης Πολίτης, Κατερίνα Αντωνίου, Γιαννούλα Σούφλα, Φωτεινή Οικονομίδου, Ρένα Λυμπουρίδου, Ειρήνη Λαμπίρη, Μωραϊτάκη Δέσποινα, Νικόλαος Σιαφάκας

Πνευμονολογική Κλινική Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης και Εργαστήριο Ιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης



Αναρτημένη ανακοίνωση στο 17<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, 20-23 Νοεμβρίου 2008, Αλεξανδρούπολη

## ΒΡΑΒΕΙΑ

1. 1<sup>ο</sup> Βραβείο Καλύτερης Εργασίας του Συνεδρίου για την εργασία με θέμα: Μακροχρόνιες κλινικές επιδράσεις της ιντερφερόνης-γ-1β και της κολχικίνης στην Ιδιοπαθή Πνευμονική Ίνωση  
Κ.Αντωνίου, Μ.Δημάδη, Ν.Τζανάκης, Κ.Μαλαγάρη, Π.Λάτση, Α.Ράπτη, Ρ.Τριγίδου, Χ.Λαμπράκη, Γ.Μπίρμπα, Φ.Οικονομίδου, Β.Πολυχρονόπουλος, Ν.Μπαχλιτζανάκης, Ν.Σιαφάκας, Δ.Μπούρος  
14<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Θεσσαλονίκη 2005
2. Έπαινος για την καλύτερη ανακοίνωση του Συνεδρίου για την εργασία με θέμα: Οι παροξύνσεις της ΧΑΠ σχετίζονται με την βαρύτητα της νόσου;  
Μακρής Δ., Τζανάκης Ν., Μοσχανδρέα Ι., Νταουκάκης Ε., Μαλτεζάκης Γ., Οικονομίδου Φ., Δαμιανάκη Α., Σιαφάκας Ν.  
15<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Κρήτη 2006
3. Έπαθλο Ιατρικής Εταιρείας Ηρακλείου για την εργασία με θέμα: Μείωση των αγγειογενετικών CXC χυμοκινών στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ασθενών με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση μετά από θεραπεία με ιντερφερόνη γ-1β  
Αντωνίου Κ., Τζωρτζάκη Ε., Οικονομίδου Φ., Αλεξανδράκης Μ., Λαμπίρη Ε., Κοθτσόπουλος Α., Μαλτεζάκης Γ., Τζανάκης Ν., Σιαφάκας Ν.  
13<sup>ο</sup> Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Ηράκλειο Κρήτης 2006
4. Βραβείο για την καλύτερη πλήρη εργασία του συνεδρίου με θέμα: Ανάλυση της έκφρασης του βιολογικού άξονα SDF-1/CXCL12 και του υποδοχέα CXCR4 σε μεσεγχυματικά κύτταρα μυελού των οστών-ινοκύτταρα (stem cells) και πνευμονικού ιστού ασθενών με Ιδιοπαθή Πνευμονική Ίνωση  
Κ.Μ.Αντωνίου, Γ.Σούφλα, Α.Δαμιανάκη, Φ.Οικονομίδου, Ε.Κουταλά, Μ.Χ.Καστρινάκη, Δ.Σπαντίδος, Ε.Α.Παπαδάκη, Ν.Μ.Σιαφάκας  
16<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Αθήνα 2007

5. 2<sup>ο</sup> Βραβείο καλύτερης ολοκληρωμένης εργασίας του συνεδρίου με τίτλο: Λειτουργικός, φαινοτυπικός και μοριακός προσδιορισμός προδρόμων μεσεγγυματικών κυττάρων μυελού των οστών (stem cells) σε ασθενείς με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση
- Κατερίνα Αντωνίου, Γιαννούλα Σούφλα, Φωτεινή Οικονομίδου, Μαρία Χριστίνα Καστρινάκη, Αθηνά Διαμανάκη, Ελένη Κουταλά, Δημήτριος Σπαντίδος, Ελένη Παπαδάκη, Νικόλαος Σιαφάκας
- Πνευμονολογική Κλινική Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης, Εργαστήριο Ιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης, Εργαστήριο Αιματολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης
- 17<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο, Αλεξανδρούπολη, 20-23 Νοεμβρίου 2008

#### ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. Παρουσίαση περιστατικών (case report) Στοχευτική θεραπεία με imatinib (Glivec): Αναντιστοιχία κλινικού οφέλους και αντικειμενικής ανταπόκρισης δύο ασθενών με μεταστατικό γαστρεντερικό στρωματικό όγκο (GIST)
- Σ. Τσούσης, Φ. Οικονομίδου, Ε. Βουρλιωτάκη
- Βήμα Κλινικής Ογκολογίας, Τόμος 1(B), Τεύχος 4:242-247, Οκτώβριος-Δεκέμβριος 2002
2. Ενδιαφέρουσα περίπτωση (case report) Η βαριά κατάσταση ασθενούς από μεταστατικό γαστρεντερικό στρωματικό όγκο δεν απολείει τη θεραπεία με imatinib
- Σ. Τσούσης, Φ. Οικονομίδου, Ε. Βούλγαρη, Λ. Βαμβακάς
- Ιατρική 2002, 82(3-40):280-286
3. Ενδιαφέρουσα Περίπτωση: Σπάνια περίπτωση πνευμονίας από *Penicillium Marneffei* σε ανοσοκατασταλαμένο ασθενή
- Φ. Οικονομίδου, Μ. Φερδούτσης, Γ. Μελέτης, Μ. Κοκκινάκη, Ν. Λυδατάκη, Ε. Θάνου, Γ. Πατσουράκης, Ν. Μπαχλιτζανάκης
- Περιοδικό Πνεύμων 2006, Τόμος 19, Τεύχος 1, Ιανουάριος-Μάρτιος 2006

## ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

**1.** Successful treatment of idiopathic thrombocytopenic purpura-like syndrome in a cancer patient with low dose interferon: Case report and review of the literature.

S.Tsoussis, F. Ekonomidou, E.Vourliotaki, I. Karalis, A. Dermitzakis

American Journal of Hematology, 2004;76:353-9

**2.** Pharmacotherapy in complicated parapneumonic pleural effusions and thoracic empyema

Schiza SE, Antoniou KM, Economidou FN, Siafakas NM

Pulmonary Pharmacologic Therapy 2005; 18:381-389

**3.** Capecitabine as an alternative in a case of fluorouracil-induced photodermatitis.

Tsoussis S, Vourliotaki I, Ekonomidou F, Apostolakis S.

Clin Oncol (R Coll Radiol). 2006;18:158-9.

**4.** Clinical burden of terminal phase in cancer patients

S.Tsoussis, F.Ikonomidou, I.Vourliotaki, A.Papadaki, S. Apostolakis

Journal of BUON 2007;12:383-388

**5.** Microsatellite DNA analysis does not distinguish malignant from benign pleural effusions.

Economidou F, Tzortzaki EG, Schiza S, Antoniou KM, Neofytou E, Zervou M, Lambiri I, Siafakas NM

Oncol Rep. 2007;18:1507-12

**6.** Angiogenic molecule Tie-2 and VEGF in the pathogenesis of pleural effusions.

Economidou F, Antoniou KM, Tzanakis N, Sfiridaki K, Siafakas NM, Schiza SE.

Respir Med. 2008;102:774-779

**7.** Pulmonary consolidation with fever is not always pneumonia: a case report of microscopic polyangiitis and review of the literature

K. Antoniou, F. Economidou, A. Voloudaki, C. Protopapadakis, I. Mitrouska, N. Siafakas

Respiratory Medicine CME 2008;1:169-175

**8.** Pivotal clinical dilemmas in Collagen Vascular Diseases associated with Interstitial Lung Involvement. Review

K. Antoniou, G. Margaritopoulos, F. Economidou, N. Siafakas

European Respiratory Journal ( Epub ahead of print)

**9.** Induced sputum in Interstitial Lung Diseases: novel insights in the diagnosis, evaluation and research

F. Economidou, K. Samara. K. Antoniou, N. Siafakas

Respiration 2008 (Epub ahead of print)

**10.** mRNA levels of angiogenic growth factors and biological axis CXCL12/CXCR4 axis in IPF.

Antoniou KM, Soufla G, Economidou F, Lymbouridou R, Manousakis M, Drositis I, Spandidos D, Siafakas NM.

European Respiratory Journal (Submitted)

**11.** Differences in mRNA of the biological axis SDF-1-CXCR4 between idiopathic pulmonary fibrosis and interstitial pneumonias of collagen vascular disease

Margaritopoulos G, Antoniou KM, Soufla G, Economidou F, Siafakas N.

(Under submission)

**12.** Functional interaction of the biological axis of VEGF-Stromal cell derived factor-1 $\alpha$  (SDF-1 $\alpha$ /CXCL12) in malignant pleural effusion of patients with lung cancer

Economidou F, Antoniou KM, Soufla G, Lasithiotaki I, Lymbouridou R, Proklou A, Karagiannis K, Spandidos D, Siafakas NM.

(Under Submission)

## ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΤΗ ΣΥΓΓΡΑΦΗ ΒΙΒΛΙΩΝ

1. Ατμοσφαιρική ρύπανση και πνεύμονας  
Φ. Οικονομίδου, Ν. Τζανάκης  
Βιβλίο μαθημάτων Ελληνικής Πνευμονολογικής Εταιρείας 2007
2. Μη Επεμβατικός Μηχανικός Αερισμός στην Οξεία Αναπνευστική Ανεπάρκεια.  
Αρχές εφαρμογής  
και παρακολούθησης  
Ι. Μητρούσκα, Φ. Οικονομίδου, Θ. Σολάκης  
Βιβλίο μαθημάτων Ελληνικής Πνευμονολογικής Εταιρείας 2008

3. Ο ρόλος των προκλητών πτυέλων στην Ιδιοπαθή Πνευμονική Ίνωση  
Κ. Αντωνίου, Φ. Οικονομίδου, Ν. Τζανάκης  
Βιβλίο Διαμέσων Νοσημάτων Πνεύμονος Ελληνικής Πνευμονολογικής Εταιρείας  
(Νέα έκδοση)
4. Ο ρόλος του σπινθηρογραφήματος  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA στην Ιδιοπαθή Πνευμονική Ίνωση  
Κ. Αντωνίου, Α. Πρόκλου, Φ. Οικονομίδου  
Βιβλίο Διαμέσων Νοσημάτων Πνεύμονος Ελληνικής Πνευμονολογικής Εταιρείας  
( Νέα έκδοση)

#### ΣΥΝΕΔΡΙΑ-ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ

1. 2<sup>ο</sup> Διαπανεπιστημιακό Ακτινολογικό και Ογκολογικό Συνέδριο 1ο Πανελλήνιο Συμπόσιο Ακτινολογίας Νεωτέρων Απεικονιστικών Μεθόδων  
Αθήνα, 13-15 Νοεμβρίου 1992
2. 9<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ακτινολογίας και Διεθνές Συμπόσιο Επεμβατικής Ακτινολογίας  
Αθήνα, 6-10 Απριλίου 1993
3. 3<sup>ο</sup> Σεμινάριο Κλινικής Ιατρικής με Θέμα «Διλήμματα στην Κλινική Ιατρική»  
Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης
4. Παρακολούθηση μαθημάτων καρδιοαναπνευστικής-εγκεφαλικής αναζωογόνησης, χρήσης AED και Προχωρημένης υποστήριξης της ζωής, που πραγματοποιήθηκε στο Βενιζέλειο-Πανάγειο Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου Κρήτης διάρκειας 15 ωρών,  
Μάϊος 2000
5. 10<sup>ο</sup> Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Ρέθυμνο Κρήτης, 9-12 Νοεμβρίου 2001
6. 4<sup>ο</sup> Σεμινάριο Κλινικής Ιατρικής με θέμα «Ιατρική βασισόμενη στις ενδείξεις, evidence based medicine»  
Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης, 17 Μαρτίου 2001
7. Εκπαιδευτικό Σεμινάριο με θέμα « Ορμόνες και Καρκίνος του Μαστού»

- Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης, 6 Οκτωβρίου 2001
- 8.** 9<sup>ο</sup> Μετεκπαιδευτικό Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας  
Ηράκλειο Κρήτης, 14-17 Νοεμβρίου 2001
  - 9.** 1<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Forum Ογκολογίας «Ογκολογία πεδίο αντιθέσεων»  
Χανιά Κρήτης, 31 Μαΐου-2 Ιουνίου 2002
  - 10.** 11<sup>ο</sup> Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Χανιά Κρήτης, 1-3 Νοεμβρίου 2002
  - 11.** 10<sup>ο</sup> Μετεκπαιδευτικό Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας  
Ηράκλειο Κρήτης, 13-17 Νοεμβρίου 2002
  - 12.** 1<sup>ο</sup> Διαιτητικό Αντικαρκινικό Συνέδριο, Αθήνα, 20-23 Μαρτίου 2003
  - 13.** 99th International Conference of the American Thoracic Society  
Seattle Washington USA, 16-21 May 2003
  - 14.** 12<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος  
Ξενοδοχείο Hilton Αθήνα, 3-7 Δεκεμβρίου 2003
  - 15.** 8th State of the Art, Interdisciplinary Review Course on Thoracic, Critical Care and  
Emergency Medicine, Μέγαρο Μουσικής Αθηνών, 7-9 Μαΐου 3004
  - 16.** 42<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο  
Ξενοδοχείο Creta Maris Κρήτης, 28-30 Μαΐου 2004
  - 17.** 14<sup>th</sup> European Respiratory Society Annual Congress  
Glasgow, UK, 4-8 September 2004
  - 18.** 12<sup>ο</sup> Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο  
Ξενοδοχείο Elounda Bay Palace Κρήτη, 28-31 Οκτωβρίου 2004
  - 19.** 12<sup>ο</sup> Μετεκπαιδευτικό Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, Ξενοδοχείο Candia Maris,  
Ηράκλειο Κρήτης, 10-13 Νοεμβρίου 2004
  - 20.** 13<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο  
Συνεδριακό και Πολιτιστικό Κέντρο Πανεπιστημίου Πατρών, 2-5 Δεκεμβρίου 2004
  - 21.** 9th State of the Art, Interdisciplinary Review Course on Pulmonary Diseases, Critical  
Care, Emergency Medicine and Nursing Care  
Μέγαρο Μουσικής Αθηνών, 22-24 Απριλίου 2005
  - 22.** 31<sup>ο</sup> Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο  
Ξενοδοχείο Hilton Αθηνών, 17-21 Μαΐου 2005
  - 23.** 4<sup>ο</sup> Διεθνές Σεμινάριο Πνεύμονας και Περιβάλλον

Αγία Πελαγία, Κρήτη, 3-5 Ιουνίου 2005

**24.** Διαταραχές της Αναπνοής στον ύπνο

Alexander Hotel, Αλεξανδρούπολη, 23-25 Ιουνίου 2005

**25.** European Respiratory Society Annual Congress 2005

Copenhagen, Denmark, 17-21 September 2005

**26.** 17<sup>ο</sup> Παγκρήτιο Παιδιατρικό Συνέδριο

Ξενοδοχείο ATLANTIS Ηράκλειο Κρήτη, 22-13 Οκτωβρίου 2005

**27.** 2<sup>ο</sup> Συνέδριο Παθολογίας «Συγχρονες τάσεις στην Παθολογία»

Ηράκλειο, Κρήτη, 3-5 Νοεμβρίου 2005

**28.** 10<sup>ο</sup> Διατομεακό Μεταπτυχιακό Σεμινάριο « Αναπνευστική Ανεπάρκεια: Απεικόνιση και Θεραπεία»

Συνεδριακό Κέντρο Μεγάλου Μουσικής Αθηνών, 11-13 Νοεμβρίου 2005

**29.** Επιστημονική Ημερίδα με θέμα «Λοιμώξεις» που διοργανώθηκε από την Ελληνική

Εταιρεία Λοιμώξεων και τον Ιατρικό Σύλλογο Ηρακλείου, στο Ηράκλειο της Κρήτης, 18 Μαρτίου 2006

**30.** 10<sup>th</sup> State of the Art, Interdisciplinary Review Course on Pulmonary Diseases, Critical Care, Emergency Medicine and Nursing Care,

Συνεδριακό Κέντρο Μεγάλου Μουσικής Αθηνών, 6-9 Απριλίου 2006

**31.** Σεμινάριο για τις βασικές αρχές μηχανικού αερισμού, ΜΕΘ Πανεπιστημιακού

Νοσοκομείου, Ηρακλείου Κρήτης, 2-4 Ιουνίου 2006

**32.** European Respiratory Society Annual Congress 2006

Munich, Germany, 2-6 September 2006

**33.** 15<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος,

Ξενοδοχείο Creta Maris Κρήτη, 2-5 Νοεμβρίου 2006

**34.** 13<sup>ο</sup> Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο

Ξενοδοχείο Candia Maris Ηράκλειο Κρήτη, 9-12 Νοεμβρίου 2006

**35.** 11<sup>ο</sup> Διατομεακό Μεταπτυχιακό Σεμινάριο, Αναπνευστική Ανεπάρκεια: Διαγνωστική προσέγγιση και Θεραπευτική Αντιμετώπιση

Μακεδονία Palace Θεσσαλονίκη, 8-9 Δεκεμβρίου 2006

**36.** 3<sup>η</sup> Επιστημονική Συνάντηση με θέμα Σήψη- Πολυοργανική Ανεπάρκεια Νεότερα

Δεδομένα, Αθήνα, 19-20 Ιανουαρίου 2007

- 37.** 11<sup>th</sup> State of the Art, Interdisciplinary Review Course on Pulmonary Diseases, Critical Care, Emergency Medicine and Nursing Care, Athens, Greece, 20-22 April 2007
- 38.** Ημερίδα με θέμα: Πνευμονική Υπέρταση, Κλινική Εντατικής Θεραπείας και Πνευμονολογική Κλινική  
Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης, 25 Απριλίου 2007
- 39.** Annual Congress of American Thoracic Society  
San Francisco, California, U.S.A, 18-13 May 2007
- 40.** Joint Meeting of the European Society of Thoracic Imaging (ESTI) and Fleischner Society, Athens, Greece, 8-10 June 2007
- 41.** Annual Congress of European Respiratory Society  
Stockholm, Sweden, 15-19 September 2007
- 42.** Εκπαιδευτικό Σεμινάριο για τη διάγνωση και θεραπευτική αντιμετώπιση της Πνευμονικής Υπέρτασης με τίτλο «Αντιμετωπίζοντας το δίλημμα της Πνευμονικής Υπέρτασης», Αθήνα, 24 Νοεμβρίου 2007
- 43.** 16<sup>o</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος  
Ξενοδοχείο Hilton, Αθήνα, 6-9 Δεκεμβρίου 2007
- 44.** 12<sup>th</sup> State of the Art, Interdisciplinary review course on Pulmonary Diseases, Critical Care, Emergency Medicine and Nursing Care  
Μέγαρο Μουσικής Αθηνών, 11-13 Απριλίου 2008
- 45.** ERS Research Seminar on Pulmonary Circulation: Scleroderma-related pulmonary arterial hypertension, Paris, France, 14-15 April 2008
- 46.** Annual Congress of American Thoracic Society  
Toronto, Ontario, Canada, 16-21 May 2008
- 47.** 9<sup>th</sup> Wasong Meeting and 11<sup>th</sup> BAL International Conference  
Athens, Greece, 19-22 June 2008
- 48.** Annual Congress of European Respiratory Society  
Berlin, Germany, 4-8 October 2008
- 49.** 11<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Medicine  
Hersonissos, Crete, Greece, 9-11 October 2008
- 50.** 13<sup>o</sup> Διατομεακό Μεταπτυχιακό Σεμινάριο « Αναπνευστική ανεπάρκεια: Διαγνωστική προσέγγιση και Θεραπευτική αντιμετώπιση», Αθήνα, 24-25 Οκτωβρίου 2008



51. Δημερίδα με τίτλο : Διεθνείς]ς οδηγίες για την αύξηση της επιβίωσης στη σήψη  
Αθήνα, 23-24 Ιανουαρίου 2009

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

ΑΓΓΛΙΚΑ Cambridge First Certificate in English  
TOEFL, με βαθμό 580

ΙΤΑΛΛΙΚΑ Certificate, Diploma di Dante Alighieri  
Medio, Superiore Palso

ΓΑΛΛΙΚΑ DEULF 1

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι πλευριτικές συλλογές είναι μια συνηθισμένη εκδήλωση διαφόρων νοσημάτων. Περίπου το 20% των πλευριτικών συλλογών οφείλονται σε κακοήθειες και το 50% αυτών οφείλονται σε καρκίνο του πνεύμονα. Η κακοήθης πλευριτική συλλογή είναι η πρώτη εκδήλωση της νόσου σε ποσοστό που κυμαίνεται από 10 έως 50%. Η κυτταρολογική εξέταση του πλευριτικού υγρού είναι η βασική μέθοδος για την διάγνωση της κακοήθειας και η ευαισθησία της είναι 50-70%. Η τυφλή βιοψία του υπεζωκότα μπορεί να χρησιμοποιηθεί συμπληρωματικά για τη διάγνωση της κακοήθειας. Όμως μεταξύ των κυτταρολογικά αρνητικών περιπτώσεων μόνο στο 7% αποδείχθηκε κακοήθεια διαμέσου της βιοψίας του υπεζωκότα ενώ ένα 20% των πλευριτικών συλλογών παραμένουν αδιάγνωστες. Τέλος οι μετρήσεις διαφόρων καρκινικών δεικτών στο πλευριτικό υγρό όπως το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο (CEA) μπορεί να φανούν χρήσιμες στην διαφοροδιάγνωση των πλευριτικών συλλογών και οι ευαισθησίες τους είναι σχετικά υψηλές, όμως τέτοιες μέθοδοι δεν είναι επιβεβαιωμένες.

Είναι γνωστό ότι η κυτταρολογική εξέταση δίνει αρνητικό αποτέλεσμα στις περιπτώσεις που το πλευριτικό υγρό περιέχει λιγότερα από 1-10% κακοήθη κύτταρα, ενώ οι μοριακές μέθοδοι που χρησιμοποιούν την PCR μπορεί να ξεχωρίσουν ανωμαλίες σε ένα από τα  $10^5$ - $10^6$  κύτταρα.

Το μικροδορυφορικό DNA αποτελείται από επαναλαμβανόμενα μοτίβα των 1-6 ζευγών νουκλεοτιδίων τα οποία ανευρίσκονται σε όλα τα προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά κύτταρα. Στις περισσότερες περιπτώσεις αποτελούν τμήματα “non-coding DNA” και σπανιότερα περιοχών που κωδικοποιούν κάποιες πρωτείνες. Το μικροδορυφορικό DNA παρουσιάζει μεγάλη ποικιλία πολυμορφισμού.

Με τη χρήση της PCR (polymerase chain reaction) το μικροδορυφορικό DNA έχει μετατραπεί σε ένα χρήσιμο γενετικό δείκτη. Το μικροδορυφορικό DNA έχει αποδειχθεί ένα εξαιρετικό εργαλείο της γονιδιακής χαρτογράφησης πολλών οργάνων με διάφορες εφαρμογές από ιατροδικαστικές μελέτες, μελέτες αποδόμησης του DNA έως διατήρηση

και διαχείριση βιολογικών πηγών. Τέλος μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένα εργαλείο γονιδιακού διαχωρισμού σε διάφορες μελέτες μοριακής επιδημιολογίας.

Η Αστάθεια του Μικροδορυφορικού DNA σχετίζεται με υψηλούς ρυθμούς μετάλλαξης και η διαδικασία της μετάλλαξης διαφέρει ανάμεσα στους διάφορους γονιδιακούς τόπους, τα είδη, την ηλικία, το φύλο. Ο υψηλός ρυθμός μεταλλαξογένεσης στις μικροδορυφορικές αλληλουχίες μπορεί να εξηγηθεί από δύο κυρίως μηχανισμούς. Ο πρώτος σχετίζεται με λάθη κατά την αντιγραφή του DNA (slippage event) και ο δεύτερος με ανωμαλία στον μηχανισμό αποκατάστασης των λαθών κατά την αντιγραφή (DNA mismatch repair system). Ο μηχανισμός αποκατάστασης λαθών κατά την αντιγραφή του DNA συμβάλλει στο να διατηρηθεί η γονιδιακή σταθερότητα, διορθώνοντας τα λάθη που συμβαίνουν κατά την αντιγραφή. Η δυσλειτουργία του συστήματος αυτού μπορεί να οδηγήσει στο χάσιμο της χρωμοσωμικής σταθερότητας γεγονός που παίζει ρόλο στην καρκινογένεση.

Υπάρχουν δύο τύποι γενετικής αποσταθεροποίησης. Ο ένας είναι η χρωμοσωμική αστάθεια που έχει σαν αποτέλεσμα τον ανευπλοϊδισμό και ο άλλος η αστάθεια του μικροδορυφορικού DNA που δημιουργείται λόγω λαθών κατά την αντιγραφή σύντομων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών. Ανάμεσα στα γονίδια που παίζουν το σημαντικότερο ρόλο στα διάφορα στάδια της καρκινογένεσης είναι τα ογκοκατασταλτικά γονίδια. Έχει αποδειχθεί ότι η αλλαγή του γενετικού υλικού σε μία και μόνο αλληλουχία (η απώλεια της ετεροζυγωτίας) μπορεί να οδηγήσει σε καρκινογένεση.

Η αστάθεια του μικροδορυφορικού DNA έχει βρεθεί σε 15% σποραδικών περιπτώσεων με καρκίνο του παχέως εντέρου καθώς και σε διάφορες άλλες κακοήθειες όπως του πνεύμονα, του γαστρεντερικού, του ενδομητρίου, των ωοθηκών, του στήθους, του προστάτη, της ουροδόχου κύστης, της κεφαλής και του αυχένα, και του μελανώματος.

Έχουν ήδη μελετηθεί αρκετές χρωμοσωμικές γενετικές αλλαγές σχετικά με τον καρκίνο του πνεύμονα στον άνθρωπο. Η έλλειψη της ετεροζυγωτίας στο χρωμόσωμα 8p είναι μια πρόσφατη ανακάλυψη στον καρκίνο του πνεύμονα. Άλλες περιοχές όπου συχνά

συμβαίνουν αλλαγές στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων είναι αυτές των χρωμοσωμάτων 1p, 3p, 5p, 9p, 13p, 17p, και 17q.

Στην δημιουργία των πλευριτικών συλλογών εμπλέκεται και η αγγειογένεση, ο ρόλος της όμως στην παθογένεια των συλλογών αυτών δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος. Η αγγειογένεση συνίσταται από την ισορροπία μεταξύ θετικών και αρνητικών ρυθμιστικών παραγόντων οι οποίοι δρώντας μέσω διαφόρων οδών έχουν σαν αποτέλεσμα την αναπαραγωγή, την διαφοροποίηση και την οργάνωση των ενδοθηλιακών κυττάρων σε ένα λειτουργικό δίκτυο αγγειακών καναλιών. Αυτοί οι ρυθμιστικοί παράγοντες έχουν κάποια αγγειογενετική επίδραση και η συντονισμένη συνεργασία τους είναι σημαντική για την αγγειακή ανάπτυξη. Αγγειογενετικές κυτταροκίνες όπως ο vascular endothelial growth factor (VEGF) και ο basic fibroblast growth factor (bFGF) είναι υπεύθυνοι για την δημιουργία των πλευριτικών συλλογών διότι εμπλέκονται στην νεοαγγείωση, στην αγγειακή διαπερατότητα και την αιμορραγία τόσο σε φλεγμονώδης καταστάσεις όσο και στην ογκογένεση. Η έκφραση επομένως τέτοιων αγγειογενετικών παραγόντων μπορεί να αποτελέσει ένα χρήσιμο δείκτη στη διάγνωση και στην παρακολούθηση της πορείας της νόσου.

Έχει ήδη αποδειχθεί ότι ο VEGF παίζει ένα σπουδαίο ρόλο στη δημιουργία συγκεκριμένων πλευριτικών συλλογών. Πολλές μελέτες δείχνουν ότι ο VEGF είναι σημαντικά υψηλότερος στις εξιδρωματικές από τις διδρωματικές πλευριτικές συλλογές. Επίσης οι κακοήθεις πλευριτικές συλλογές φαίνεται να σχετίζονται με υψηλότερα επίπεδα VEGF από τις καλοήθεις πλευριτικές συλλογές. Υποστηρίζεται ότι τα αυξημένα επίπεδα του VEGF στις κακοήθεις πλευριτικές συλλογές αυξάνουν την διαπερατότητα των μεμβρανών και οδηγούν στη συσσώρευση του πλευριτικού υγρού. Παρά το ότι υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα του VEGF μεταξύ κακοηθών και καλοηθών πλευριτικών συλλογών, περιπτώσεις αλληλοεπικάλυψης καθιστούν τον VEGF ως μη χρήσιμο διαγνωστικά δείκτη από μόνο του.

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι ο endothelial cell-specific receptor tyrosine kinase (Tie2) και οι αγγειοποϊετίνες 1 και 2 (Ang-1, Ang-2), παίζουν κάποιο διαφορετικό διαμεσολαβητικό ρόλο στην αγγειογένεση. Έχει αποδειχθεί ότι η Ang-2 δρα ως

ανταγωνιστικός υποδοχέας για το Tie-2 συνδεδεμένο μαζί του με όμοια συγγένεια, αλλά ανταγωνίζεται την Ang-1, μπλοκάρωντας την φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση του Tie-2. Ποντίκια με υπερέκφραση της Ang-2 έχουν όμοια ελαττώματα με ποντίκια που έχουν έλλειψη της Ang-1 ή του Tie-2, γεγονός που δείχνει ότι η Ang-2 δρα σαν φυσικός ανταγωνιστής των Ang-1/Tie-2. Με βάση αυτή την αντίληψη πρόσφατα δημοσιεύτηκε ότι τα επίπεδα της Ang-2 και όχι αυτά της Ang-1 σχετίζονται με τις εξιδρωματικές πλευριτικές συλλογές, υποστηρίζοντας ότι η Ang-2 μαζί με το VEGF συμμετέχουν στην πλευριτική φλεγμονή και την παθογένεια των εξιδρωματικών πλευριτικών συλλογών. Αντιθέτως υποστηρίζεται ότι η Ang-2 παίζει κάποιο ρόλο στην ενεργοποίηση του Tie-2 receptor προκαλώντας in vitro την αγγειογένεση. Αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι ο ρόλος της Ang-2 είναι πιο περίπλοκος, αφού δρα είτε προωθώντας είτε αμβλύνοντας την δράση του Tie-2 receptor στα ενδοθηλιακά κύτταρα ανάλογα με τις τοπικές καταστάσεις.

Τον τελευταίο καιρό επίσης, το ενδιαφέρον των ερευνητών εστιάζεται σε μία συγκεκριμένη οικογένεια υποδοχέων κυτταροκινών που καλούνται CXCR4 και έχει βρεθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην λοίμωξη από HIV. Ο stromal-cell derived factor-1α (SDF-1α/CXCL12) είναι μέλος της οικογένειας των CXC κυτταροκινών και έχει βρεθεί ότι δρα ως χημειοτακτικός παράγοντας για CD34+ αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα, μεγακαρυωκύτταρα, Β κύτταρα και Τ κύτταρα. Ο SDF-1α/CXCL12 εκφράζεται πάνω σε συγκεκριμένους ιστούς. Αν και οι περισσότεροι υποδοχείς κυτταροκινών συνδέονται με αρκετές κυτταροκίνες, ο CXCR4 είναι ειδικός υποδοχέας, διότι αλληλεπιδρά μόνο με το SDF-1α. Η εμπλοκή των CXCR4 και SDF-1α στην διαδικασία αυτή, κάνει το ζεύγος κυτταροκίνη-υποδοχέα σημαντικού ενδιαφέροντος στην δημιουργία των μεταστάσεων. Το τελευταίο διάστημα, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η τάση της δημιουργίας μεταστάσεων από διαφορετικούς τύπους καρκίνου, πνεύμονα, μαστού, ωθηκών, νεφρών και προστάτη, σχετίζεται με την έκφραση του CXCR4. Επίσης έχει βρεθεί ότι στο μη μικροκυττατικό καρκίνο του πνεύμονα καθώς και στο καρκίνο του μαστού η σύνδεση του CXCR4 με το CXCL12 παρουσιάζει μέγιστα επίπεδα έκφρασης στα όργανα που μεθίστανται.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή διερευνήσαμε τον ρόλο του Tie-2 στην παθογένεια των πλευριτικών συλλογών μελετώντας το μονοπάτι δράσης του VEGF μέσω του υποδοχέα της αγγειοποιητίνης Tie-2, το ρόλο του VEGF, των αγγειοποιητινών (Ang-1 και Ang-2) και του βιολογικού άξονα CXCL12 - CXCR4 στο μηχανισμό της δημιουργίας μεταστάσεων στην υπεζωκοτική κοιλότητα από καρκίνο του πνεύμονα και τέλος αν η γενετική ανάλυση του πλευριτικού υγρού σε συγκεκριμένους μικροδορυφορικούς δείκτες μπορεί να συμβάλλει στην διάγνωση των κακοήθων πλευριτικών συλλογών, συγκριτικά με την κυτταρολογική ανάλυση των συλλογών αυτών.

Πιο αναλυτικά, σχετικά με το ρόλο της αγγειογένεσης στις πλευριτικές συλλογές, μελετήσαμε 67 δείγματα πλευριτικών συλλογών και ορών από περιφερικό αίμα ασθενών που νοσηλεύτηκαν στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ηρακλείου Κρήτης από τον Ιανουάριο του 2004 έως τον Αύγουστο του 2005. Από τους 67 ασθενείς που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη μας οι 41 ήταν άνδρες και οι 26 γυναίκες μέσης ηλικίας 73.5 ετών (IQR, 20 ως 95 έτη). 17 ασθενείς είχαν διδρωματική πλευριτική συλλογή λόγω καρδιακής ανεπάρκειας και 50 εξιδρωματική διαφορετικής αιτιολογίας: 22 κακοήθειες (12 από καρκίνο του πνεύμονα και 10 από μεταστατική εξωπνευμονική κακοήθεια), 15 φλεγμονώδεις (12 παραπνευμονικές και 3 φυματιώδεις), και 13 αδιάγνωστες. Σε όλα τα πλευριτικά υγρά και στους ορούς από το περιφερικό αίμα μετρήθηκαν τα επίπεδα της lactate dehydrogenase (LDH), της γλυκόζης, του pH, και των κυττάρων. Επίσης μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις των VEGF, bFGF and Tie-2 στο πλευριτικό υγρό και το αίμα 66, 66 και 62 ασθενών αντίστοιχα, με μέθοδο ELISA.

Τα κυριότερα ευρήματά μας ήταν τα ακόλουθα: (1) Τα επίπεδα του VEGF στο πλευριτικό υγρό αλλά όχι των bFGF και Tie-2 ήταν σημαντικά αυξημένα στα εξιδρώματα συγκριτικά με τα διδρώματα, (2) Τα επίπεδα του Tie-2 στο πλευριτικό υγρό δεν διέφεραν μεταξύ κακοηθών και φλεγμονωδών πλευριτικών συλλογών καθώς και μεταξύ διδρωμάτων και εξιδρωμάτων, (3) Ο λόγος του VEGF βρέθηκε να σχετίζεται με το λόγο της LDH και της ολικής πρωτεΐνης.

Συμπερασματικά η μελέτη μας αυτή επιβεβαίωσε ότι ο VEGF παρουσιάζει μια προς τα πάνω αυτορρυθμιση στις εξιδρωματικές πλευριτικές συλλογές διαφόρων αιτιών. Από την άλλη πλευρά, βρέθηκε ότι αυτή η παθογενετική επίδραση δεν γίνεται μέσω της οδού των angiopoietins/Tie-2, αφού δεν βρήκαμε καμία διαφορά στα επίπεδα του Tie-2 στα πλευριτικά υγρά. Άρα η μέτρηση των επιπέδων των αγγειογενετικών μεσολαβητών δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διαγνωστικούς σκοπούς. Τέλος τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι ο VEGF πιθανά να έχει ένα σημαντικό ρόλο στην παθογένεια των εξιδρωματικών πλευριτικών συλλογών όχι μόνο λόγω της αγγειογενετικής του λειτουργίας αλλά και ως επαγωγέας της αγγειακής διαπερατότητας.

Επίσης μελετήσαμε 25 ασθενείς, 7 με διδρωματική πλευριτική συλλογή λόγω καρδιακής ανεπάρκειας και 18 εξιδρωματικές κακοήθεις πλευριτικές συλλογές (7 από SCLC και 11 από NSCLC). Στα δείγματα αυτά πραγματοποιήθηκε ανάλυση της έκφρασης των VEGF και αγγειοποιητινών 1 και 2 και CXCL12 (και των δύο αντιγράφων, TR1 και TR2) /CXCR4 στο κυτταρικό ίζημα των πλευριτικών υγρών με real-time RT-PCR, ενώ η έκφραση των πρωτεϊνών των VEGF και SDF μετρήθηκε με western blot ανάλυση. Από τη μελέτη αυτή βρέθηκε ότι τα επίπεδα του SDF-TR1 ( $p=0.02$ ) αλλά όχι του SDF-TR2 ( $p=0.23$ ) ή του CXCR4 ( $p=0.23$ ) ήταν υψηλότερα στις κακοήθεις πλευριτικές συλλογές. Τα επίπεδα του SDF-TR1 ( $p=0.04$ ) και όχι αυτά των SDF-TR2 ( $p=0.04$ ) και CXCR4 ( $p=0.123$ ) ήταν υψηλότερα στις πλευριτικές συλλογές από SCLC. Τέλος, στις πλευριτικές συλλογές από NSCLC βρέθηκαν υψηλότερα τα επίπεδα του SDF-TR1 ( $p=0.03$ ) και όχι των SDF-TR2 ( $p=0.6$ ) και CXCR4 ( $p=0.4$ ). Η Ang-1 δεν εκφράστηκε σε κανένα δείγμα, ενώ δεν βρέθηκε καμία σημαντική διαφορά στην έκφραση του VEGF και της Ang-2 μεταξύ κακοηθών πλευριτικών συλλογών και διδρωμάτων, γεγονός που μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι ο VEGF δεν φαίνεται να συμμετέχει στην παθοφυσιολογία των πλευριτικών συλλογών μέσω των αγγειοποιητινών. Η έκφραση των πρωτεϊνών όμως ανιχνεύθηκε αυξημένη για το VEGF και το SDF στις κακοήθεις πλευριτικές συλλογές. Έτσι καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι τα επίπεδα μόνο του SDF-1α αυξάνονται στις κακοήθεις πλευριτικές συλλογές, γεγονός που δείχνει την συμμετοχή του SDF-1α στη δημιουργία των μεταστάσεων στην υπεζωκοτική κοιλότητα.

Τέλος, μελετήσαμε 48 πλευριτικά υγρά από 12 γυναίκες και 36 άνδρες μέσης ηλικίας 71 ετών (38-97 έτη) που νοσηλεύτηκαν στην Πνευμονολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης από το Σεπτέμβριο του 2005 έως το Δεκέμβριο του 2006. Από αυτούς οι 26 είχαν κακοήθη πλευριτική συλλογή (23 από καρκίνο του πνεύμονα και 3 από μεταστατική εξωπνευμονική κακοήθεια). Πιο συγκεκριμένα σε 16 άτομα διεγνώσθη μη μικροκυτταρικός καρκίνος πνεύμονα, σε 6 μικροκυτταρικός καρκίνος πνεύμονα, σε 1 μεσοθηλίωμα, σε 2 μεταστατικό αδenoκαρκίνωμα στήθους και σε 1 μεταστατικό αδenoκαρκίνωμα ενδομητρίου. 19 ασθενείς είχαν ιστορικό καπνίσματος (median pack years 60) και 7 ήταν μη καπνιστές. Η ομάδα ελέγχου αποτελούνταν από καλοήθεις πλευριτικές συλλογές (7 αδιάγνωστα εξιδρώματα, 3 διυδώματα λόγω καρδιακής ανεπάρκειας, 11 παραπνευμονικές συλλογές και 1 φυματιώδη πλευριτική συλλογή). Η μέση ηλικία της ομάδας ελέγχου ήταν 66.5 έτη (38-97 έτη). 17 ασθενείς είχαν ιστορικό καπνίσματος (median pack years 30) και 5 ήταν μη καπνιστές. Κυτταρολογική εξέταση έγινε σε όλα τα πλευριτικά υγρά και ήταν θετική σε 14 κακοήθεις πλευριτικές συλλογές ενώ ήταν αρνητική για όλες τις καλοήθεις πλευριτικές συλλογές.

Μελετήθηκαν έξι πολυμορφικοί μικροδορυφορικοί δείκτες (D17S250, D9S171, D3S1234, D12S363, D5S346, TP53Alu), οι οποίοι βρίσκονται κοντά σε γονίδια που σχετίζονται με την παθογένεια του καρκίνου. Οι ανωτέρω δείκτες μελετήθηκαν με μέθοδο PCR.

Σε δύο από τους 26 (7.6%) ασθενείς με κακοήθη πλευριτική συλλογή βρέθηκε γενετική αλλαγή. Ένας ασθενής με μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα παρουσίασε MSI σε τρεις διαφορετικούς μικροδορυφορικούς δείκτες (D17S250, D9S171, D3S134) και ένας ασθενής με μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα παρουσίασε LOH στο δείκτη D3S134. Ένας από τους 22 (4.5%) ασθενείς με καλοήθη πλευριτική συλλογή (παραπνευμονική) παρουσίασε LOH στο δείκτη D3S134. Όλα τα υπόλοιπα δείγματα πλευριτικών υγρών και των δύο ομάδων έδειξαν μικροδορυφορική σταθερότητα. Καταλήξαμε επομένως στο συμπέρασμα ότι η μοριακή ανάλυση του μικροδορυφορικού DNA του κυτταρικού



ιζήματος των πλευριτικών υγρών δεν μπορεί να αυξήσει την ευαισθησία της κλασσικής κυτταρολογικής εξέτασης.

## **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## ΥΠΕΖΩΚΟΤΑΣ – ΠΛΕΥΡΙΤΙΚΟ ΥΓΡΟ

Ο υπεζωκότας είναι μία μεταβολικά ενεργή μεμβράνη που παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης αλλά και στη συμμετοχή της πλευριτικής φλεγμονής. Αποτελείται από μεσοθηλιακά κύτταρα και από ένα υποκείμενο στρώμα συνδετικού ιστού το οποίο κατέχει ένα σημαντικό ρόλο στην ανοσολογική απάντηση σε τοπικά αλλά και συστηματικά νοσήματα. Λόγω της στενής γειτνίασης του υπεζωκότα με τον πνεύμονα, συμμετέχει σε όλες τις φλεγμονώδεις διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα στον πνευμονικό παρέγχυμα. Ειδικότερα, αρκετά συστηματικά νοσήματα έχουν προτίμηση στην έκφρασή τους μέσω συγκεκριμένων πρωτεϊνών πάνω στην υπεζωκοτική επιφάνεια.

Οι ανοσολογικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στην υπεζωκοτική κοιλότητα έχουν σαν αποτέλεσμα την αύξηση της υπεζωκοτικής διαπερατότητας και τη δημιουργία πλευριτικής συλλογής. Κάτω από αυτές τις συνθήκες η ομαλή λειτουργία του υπεζωκότα διαταράσσεται γεγονός που οδηγεί στην αύξηση της νοσηρότητας και θνητότητας των ασθενών.

Φυσιολογικά υπάρχει μια ελάχιστη ποσότητα υγρού εντός της υπεζωκοτικής κοιλότητας, η οποία διακινείται με βάση ορισμένους μηχανισμούς, οι οποίοι θα αναφερθούν παρακάτω. Η ποσότητα του υγρού αυτού δεν έχει μετρηθεί στον άνθρωπο, αλλά σύμφωνα με μετρήσεις των Agostoni και Miserocchi σε κουνέλια και σκύλους κυμαίνεται από 1 έως 2,5 ml (1). Δεν φαίνεται να υπάρχουν διάλυτοι επικοινωνίας μεταξύ του περισπλάχνιου και περιτόνου πετάλου του υπεζωκότος, παρά την ύπαρξη μικροκροσσών τόσο στο ένα όσο και στο άλλο πέταλο. Σε διάφορες μετρήσεις η περιεκτικότητα σε κύτταρα του φυσιολογικώς υπάρχοντος υπεζωκοτικού υγρού κυμαίνεται περί τα 2500 λευκοκύτταρα ανά ml (1). Η πρωτεΐνη του πλευριτικού υγρού κυμαίνεται από 1.00 έως 1.35 g/dl και είναι φυσικά πολύ χαμηλότερη από εκείνη του ορού. Τα διττανθρακικά είναι αυξημένα κατά 20% σε σχέση με το πλάσμα, ενώ το κάλιο

και η γλυκόζη έχουν την ίδια τιμή. Το pH του πλευριτικού υγρού (δεδομένου ότι η μερική πίεση του CO<sub>2</sub> σε αυτό είναι η ίδια με του πλάσματος) είναι αλκαλικό, λόγω των αυξημένων διττανθρακικών στο υγρό.

Στα φυσιολογικά άτομα η έξοδος και η απορρόφηση του υπεζωκοτικού υγρού γίνεται δια του περιτόνου πετάλου του υπεζωκότος και είναι αποτέλεσμα της ισορροπίας μεταξύ δυνάμεων (υδροστατικών, κολλοειδωσμοτικών, ιστικών) και της ικανότητας του λεμφικού δικτύου του περιτόνου πετάλου για απομάκρυνση του υγρού (2). Η δύναμη η οποία τείνει να προκαλέσει την έξοδο του υγρού εκτός των τριχοειδών του περιτόνου πετάλου του υπεζωκότος, είναι η συνισταμένη της δύναμης η οποία αντιστοιχεί στην υδροστατική πίεση των τριχοειδών του τοιχωματικού υπεζωκότος (περίπου 30 cm H<sub>2</sub>O) και της δύναμης η οποία προκαλεί την αρνητική πίεση στην υπεζωκοτική κοιλότητα και η οποία κυμαίνεται από -4 έως -8 cm H<sub>2</sub>O. Επειδή και οι δύο δυνάμεις έχουν φορά προς την υπεζωκοτική κοιλότητα (καθότι και η δεύτερη λόγω του αρνητικού πρόσημου δρα συνεργικά προς την πρώτη) δημιουργείται μια συνισταμένη δύναμη (σε θέση FRC) η οποία είναι περίπου 34-38 cm H<sub>2</sub>O. Η κολλοειδωσμοτική πίεση εντός των τριχοειδών του περιτόνου πετάλου είναι περίπου 34 cm H<sub>2</sub>O και αντιστοιχεί σε δύναμη η οποία έχει φορά προς τα τριχοειδή, δηλαδή αντίθετη της συνισταμένης των υδροστατικών πιέσεων. Η κολλοειδωσμοτική πίεση εντός της υπεζωκοτικής κοιλότητας είναι περίπου 5-8 cm H<sub>2</sub>O και αντιστοιχεί σε δύναμη η οποία τείνει να μετακινήσει το υγρό εντός της υπεζωκοτικής κοιλότητας (με φορά αντίθετη της δύναμης της κολλοειδωσμοτικής πίεσης των τριχοειδών). Έτσι δημιουργείται τελικά μια συνισταμένη δύναμη, η οποία προκύπτει από το άθροισμα 30+5+8-34=9 cm H<sub>2</sub>O, η οποία μπορεί να είναι και 6 cm H<sub>2</sub>O και έχει φορά από τον τοιχωματικό υπεζωκότα προς της υπεζωκοτική κοιλότητα. Η διαφορά πίεσης που προκαλεί τη ροή αίματος στον περισπλάχνιο υπεζωκότα είναι μικρότερη από εκείνη του τοιχωματικού και συνεπώς η ροή αίματος δια του περιτόνου πετάλου είναι μεγαλύτερη εκείνης του περισπλαχνίου. Με βάση τα παραπάνω, οι υδροστατικές δυνάμεις στο περισπλάχνιο πέταλο αντιστοιχούν σε πίεση +24 cm H<sub>2</sub>O (αντί για 30 cm H<sub>2</sub>O που είναι στο τοιχωματικό) με φορά προς την υπεζωκοτική κοιλότητα και -5 cm H<sub>2</sub>O εκ της κοιλότητας του υπεζωκότος προς το περισπλάχνιο πέταλο, δηλαδή τελικά +5 cm H<sub>2</sub>O προς την υπεζωκοτική κοιλότητα. Η συνισταμένη

δύναμη αντιστοιχεί υδροστατική πίεση  $24+5=29$  cm H<sub>2</sub>O και η φορά της είναι προς την υπεζωκοτική κοιλότητα, ενώ η συνισταμένη των κολοειδωσμοτικών είναι  $34-5=29$  cm H<sub>2</sub>O (όπως και στο περίτονο πέταλο) και με φορά προς το περισπλάχνιο πέταλο. Η τελικώς προκύπτουσα πίεση είναι είτε 0 είτε 3 cm H<sub>2</sub>O (εάν η κολοειδωσμοτική πίεση της υπεζωκοτικής κοιλότητας θεωρηθεί 8 cm H<sub>2</sub>O αντί για 5cm H<sub>2</sub>O) οπότε τότε αντιστοιχεί σε δύναμη που έχει φορά προς την υπεζωκοτική κοιλότητα. Συνεπώς ελάχιστη ή μηδενική πίεση προκαλεί έξοδο υγρού εντός της υπεζωκοτικής κοιλότητας από μέρους του περισπλάχνιου πετάλου, ενώ πίεση 6-9 cm H<sub>2</sub>O προκαλεί έξοδο υγρού εντός της υπεζωκοτικής κοιλότητας από μέρους του περιτόνου πετάλου, η οποία ποσότητα απορροφάται από τα στόμια των βοθρίων (αρχή λεμφικών αγγείων) του περιτόνου μόνον πετάλου, καθότι το περισπλάχνιο δε συμμετέχει στην απορρόφηση αυτή. Ακόμη και η ελάχιστη ποσότητα υγρού που μπορεί να εξέρχεται από το περισπλάχνιο πέταλο προς την υπεζωκοτική κοιλότητα απορροφάται και αυτό από τα στόμια του περιτόνου πετάλου.

## **ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΠΛΕΥΡΙΤΙΚΩΝ ΣΥΛΛΟΓΩΝ**

Όπως ήδη αναφέραμε, παρά το γεγονός ότι υπάρχει καθαρή πίεση 6-9 cm H<sub>2</sub>O από μέρους του περιτόνου πετάλου του υπεζωκότος και έως 3 cm H<sub>2</sub>O από πλευρά του περισπλάχνιου πετάλου, οι οποίες πιέσεις αντιστοιχούν σε δυνάμεις που ωθούν το υγρό εντός της υπεζωκοτικής κοιλότητας, εντούτοις η κοιλότητα παραμένει σχεδόν στεγανή, λόγω της απορρόφησης του υγρού δια των στομιών του περιτόνου πετάλου. Η ποσότητα του υγρού η οποία απορροφάται κυμαίνεται από 0.22 έως 0.40 ml/kg/h (3,4) και μπορεί η αποχετευτική ικανότητα της λεμφικής οδού να αυξηθεί σε σημαντικό βαθμό (άνω του 20πλασίου), προκειμένου να αποτραπεί η συσσώρευση υγρού εντός της υπεζωκοτικής κοιλότητας (5,6). Η ύπαρξη επομένως υγρού εντός της υπεζωκοτικής κοιλότητας σημαίνει ότι η δυνατότητα παροχέτευσής του υπολείπεται σημαντικά του ρυθμού συσσώρευσής του.

Η συχνότερη αιτία ύπαρξης υγρού εντός της υπεζωκοτικής κοιλότητας είναι η αύξηση του υγρού στο διάμεσο ιστό του πνεύμονα. Όταν η συσσώρευση υγρού στο διάμεσο ιστό υπερβαίνει τα 5 g ανά γραμμάριο ξηρού πνευμονικού παρεγχύματος, τότε προκαλείται υπεζωκοτική συλλογή, άσχετα με το αν το υγρό αυτό στο διάμεσο ιστό είναι υψηλής ή χαμηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη (6). Αυτός φαίνεται να είναι ο προεξάρχων μηχανισμός σχηματισμού πλευριτικής συλλογής σε ασθενείς με συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια, παραπνευμονική συλλογή, ARDS και μεταμόσχευση πνεύμονα.

Σε ασθενείς με δεξιά ή αριστερή καρδιακή ανεπάρκεια ή σύνδρομο άνω κοίλης φλέβας, οι πιέσεις στα τριχοειδή του υπεζωκότα είναι αυξημένες και το αποτέλεσμα είναι να αυξάνεται η ποσότητα του υγρού εντός της υπεζωκοτικής κοιλότητας.

Όταν η πρωτεΐνη του πλευριτικού υγρού αυξηθεί (όπως στον αιμοθώρακα ή σε καταστάσεις που προκαλούν το αυξημένης διαπερατότητας πνευμονικό οίδημα), τότε η κολλοειδωσμοτική πίεση αυξάνεται και ευνοείται ο σχηματισμός πλευριτικού υγρού. Ο λόγος είναι ότι η κολλοειδωσμοτική πίεση εντός της υπεζωκοτικής κοιλότητας αντιστοιχεί σε δύναμη η οποία τείνει να προκαλέσει την έξοδο υγρού εντός της κοιλότητας. Ο μηχανισμός αυτός δε φαίνεται να ευθύνεται σε σημαντικό βαθμό για τη δημιουργία πλευριτικής συλλογής.

Η ελάττωση της υπεζωκοτικής πίεσης (καθίσταται πλέον αρνητική), έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των δυνάμεων οι οποίες προκαλούν την έξοδο υγρού εντός της υπεζωκοτικής κοιλότητας. Η συχνότερη αιτία αυτού του μηχανισμού είναι η ατελεκτασία. Ανάλογος είναι ο μηχανισμός με τον οποίο προκαλείται πλευριτική συλλογή επί επικαλύψεως του περισπλάχνιου πετάλου του υπεζωκότος από παχυσμένο στρώμα κολλαγόνου, με αποτέλεσμα να παγιδεύεται ο πνεύμονας και να αρνητικοποιείται περαιτέρω η ενδοϋπεζωκοτική πίεση.

Στην περίπτωση ασκτικής συλλογής, λόγω υπέρξεως τρημάτων στο διάφραγμα, υγρό από την περιτοναϊκή κοιλότητα συσσωρεύεται στις υπεζωκοτικές κοιλότητες. Με παρόμοιο μηχανισμό γίνεται συσσώρευση χυλού εντός της υπεζωκοτικής κοιλότητας σε περιπτώσεις ρήξης του θωρακικού πόρου.

Οι παραπάνω μηχανισμοί προκαλούν αύξηση του πλευριτικού υγρού με την αύξηση της εισόδου υγρού εντός της υπεζωκοτικής κοιλότητας. Πλευριτικό υγρό όμως μπορεί να συσσωρευθεί στον υπεζωκότα όταν η παροχέτευσή του από τα λεμφαγγεία του περιτόνου πετάλου παρακωλύεται. Η δυνατότητα του λεμφικού συστήματος να παροχετεύει το υγρό μπορεί να υπερβεί το 20πλάσιό της υπό κανονικές συνθήκες διακινήσεως του (7). Η δυσχέρεια στην παροχέτευση του υγρού διά του λεμφικού συστήματος οφείλεται κυρίως σε κακοήθη αίτια, όπως το πρωτοπαθές και μεταστατικό νεόπλασμα του πνεύμονα και αρκετά συχνά το μεταστατικό νεόπλασμα του μαστού.

Η παροχέτευση της λεμφικής οδού γίνεται στο φλεβικό σκέλος της συστηματικής κυκλοφορίας. Αυτό σημαίνει ότι η αύξηση της πίεσης στις κεντρικές φλέβες δημιουργεί και δυσχέρεια στη λεμφική κυκλοφορία. Οι Allen και οι συνεργάτες του (8) αναφέρουν ότι σε πρόβατα, ποσότητα υγρού συσσωρεύθηκε στην υπεζωκοτική κοιλότητα, όταν η πίεση στην άνω κοίλη φλέβα υπερέβη τα 15 mmHg και όταν η ποσότητα του υγρού ήταν άνω των 500 ml, τότε η πίεση στην άνω κοίλη φλέβα ήταν περίπου 27-28 mmHg. Οι ίδιοι ερευνητές αναφέρουν ότι όσο η ποσότητα του υγρού ήταν μεγαλύτερη τόσο το επίπεδο της πρωτεΐνης του ήταν μεγαλύτερο. Συμπεραίνοντας δε καταλήγουν στο ότι οι πλευριτικές συλλογές αναπτύχθηκαν λόγω της εξόδου λέμφου δια των λεμφαγγείων τα οποία διασχίζουν τον πνεύμονα και λόγω της εξόδου υγρού διαμέσου πνευμονικού ιστού στην υπεζωκοτική κοιλότητα, λόγω αποφράξεως των λεμφαγγείων του πνεύμονα ή του θωρακικού τοιχώματος.

Η σκοπιμότητα της υπάρξεως της υπεζωκοτικής κοιλότητας, από πλευράς φυσιολογίας, δεν έχει πλήρως διευκρινισθεί. Ο Gaensler μελέτησε την πνευμονική λειτουργία 4 ασθενών, προ και 6-17 μήνες μετά την αποφλοίωση του πνεύμονα από τον υπεζωκότα. Η τιμή της ζωτικής χωρητικότητας παρέμεινε ίδια προ και μετά τη χειρουργική επέμβαση και το ίδιο παρατηρήθηκε και για τον αερισμό και την πρόσληψη οξυγόνου στο χειρουργημένο πνεύμονα προ και μετά την επέμβαση (9).

Μελέτες που έχουν γίνει τόσο σε πρόβατα όσο και σε ελέφαντες είχαν αντιφατικά αποτελέσματα. Έτσι στους μεν ελέφαντες ο υπεζωκοτικός χώρος πληρούται από συνδετικό ιστό, άρα είναι μάλλον άχρηστος (10), ενώ στα πρόβατα όχι μόνο η υπεζωκοτική κοιλότητα είναι ελεύθερη, αλλά τα λεμφαγγεία του περιτόνου πετάλου της χρησιμεύουν για την παροχέτευση του συσσωρευμένου υγρού στο διάμεσο χώρο (11), ενώ δεν είναι γνωστό αν και σε ποιο βαθμό αυτό συμβαίνει και στον άνθρωπο.

## **ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΠΛΕΥΡΙΤΙΚΟ ΥΓΡΟ**

Κατά τη διάρκεια διαφόρων φλεγμονωδών διαδικασιών που λαμβάνουν χώρα στην υπεζωκοτική κοιλότητα, το υπεζωκοτικό μεσοθήλιο είναι υπεύθυνο για την άθροιση των ουδετεροφίλων και των μονοκυρήνων φαγοκυττάρων καθώς και για τη μετακίνηση πρωτεϊνών από το αγγειακό δίκτυο στη υπεζωκοτική κοιλότητα. Η απελευθέρωση κυτταροκινών, όπως IL-8, IL-1β, TNF-α, κ.α. από τα μεσοθηλιακά κύτταρα επιτρέπει την απευθείας μετανάστευση των φαγοκυττάρων από τη βασική επιφάνεια του υπεζωκότα στην κορυφαία. Σε μελέτες που έχουν ήδη γίνει έχει δειχθεί ότι υπάρχει συγκεκριμένη σχέση μεταξύ ποσού IL-8 και του αριθμού των ουδετεροφίλων στο εμπύημα.

Στις φυματιώδεις πλευριτικές συλλογές, το πλευριτικό υγρό αποτελείται κατά κύριο λόγο από μονοκύρηνα κύτταρα. Στις πλευριτικές αυτές συλλογές έχει δειχθεί ότι οι κυτταροκίνες MCP-1 (monocyte chemoattractant protein) και MIP-1α (macrophage inflammatory protein) βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες. Σε ασθενείς με φυματιώδη πλευριτική συλλογή και σύγχρονη εξασθένηση του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως αυτούς που πάσχουν από AIDS, το ποσό των ανωτέρω κυτταροκινών έχει βρεθεί αρκετά μειωμένο. Τέλος η IFN-γ είναι μια κυτταροκίνη υπεύθυνη για την άθροιση των μονοκυρήνων κυττάρων και έχει βρεθεί και αυτή αυξημένη στη φυματιώδη πλευριτική συλλογή. Η δε εξουδετέρωση της παραγωγής της IFN-γ προκαλεί κατάργηση της παραγωγής των τοπικών χημειοτακτικών παραγόντων από τα μεσοθηλιακά κύτταρα και επομένως μείωση στην έκφραση των MIP-1α και MCP-1 κυτταροκινών.



Στα κακοήθη νοσήματα ο υπεζωκότας μπορεί να είναι η αρχική θέση εμφάνισης του όγκου, όπως στο κακόηθες μεσοθηλίωμα, αλλά και η θέση εμφάνισης δευτεροπαθών εντοπίσεων. Συγκεκριμένα είδη καρκίνων, όπως του μαστού, των ωοθηκών, του πνεύμονος και του στομάχου δείχνουν μια προτίμηση για μετάσταση στο υπεζωκοτικό μεσοθήλιο. Η προσέγγιση του καρκινικού κυττάρου στο υπεζωκοτικό μεσοθήλιο γίνεται με πολλούς τρόπους. Ένας από αυτούς είναι η αλληλεπίδραση του καρκινικού κυττάρου και του μεσοθηλίου διαμέσου της αλληλεπίδρασης του υαλουρονικού οξέος και του υποδοχέα CD44. Το σύμπλεγμα υαλουρονικό-CD44 ενώνεται με το καρκινικό κύτταρο και με τον τρόπο αυτό προάγεται η υδρόλυσή του. Το υαλουρονικό οξύ, το οποίο είναι ένα μεγάλο μοριακού βάρους μόριο σπάει σε μικρότερα κομμάτια, τα οποία μπορούν να συμμετάσχουν στην μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων διαμέσου του υπεζωκότος. Τα καρκινικά κύτταρα, είναι γνωστό ότι παράγουν μεγάλες ποσότητες αγγειακού αυξητικού παράγοντα (VEGF), ο οποίος επιτρέπει σε διάφορες πρωτεΐνες να περνούν διαμέσου του υπεζωκοτικού επιθηλίου. Η αλλαγή αυτή στη διαπερατότητα του επιθηλίου σχετίζεται και με την αύξηση της διακίνησης των καρκινικών κυττάρων. Φαίνεται λοιπόν ότι ο λόγος για τον οποίο συγκεκριμένα είδη καρκίνου δείχνουν μια προτίμηση να μεθίστανται στον υπεζωκότα, είναι η δυνατότητά τους να εκφράζουν υποδοχείς για παράφροντες, όπως το υαλουρονικό οξύ, το οποίο παράγεται σε μεγάλες ποσότητες από τα μεσοθηλιακά κύτταρα του υπεζωκότα. Όταν δε το καρκινικό κύτταρο εγκατασταθεί πάνω στον υπεζωκότα παράγει παράγοντες όπως ο VEGF και ο bFGF (basic fibroblast growth factor) που προάγουν την αγγειογένεση, μέσω της οποίας επιτυγχάνεται η μετάσταση του καρκίνου.

## **ΔΙΑΦΟΡΟΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΩΝ ΠΛΕΥΡΙΤΙΚΩΝ ΣΥΛΛΟΓΩΝ**

Η εξέταση της πλευριτικής συλλογής θεωρείται εξαιρετικά χρήσιμη, διότι μπορεί με τον τρόπο αυτό να τεθεί αμέσως η διάγνωση της νόσου, ή να κατευθυνθεί προς το σωστό δρόμο. Η ύπαρξη χυλού ή αίματος εντός της υπεζωκοτικής κοιλότητας, για παράδειγμα, μπορεί να στρέψει τη διάγνωση προς το χυλοθώρακα και αιμοθώρακα απότοκο τραυματισμού ή νεοεξεργασίας. Άλλες πάλι φορές απαιτείται πιο λεπτομερής έλεγχος,

όταν δηλαδή το υγρό είναι εξίδρωμα, οπότε χρειάζονται συμπληρωματικές εξετάσεις για τα τεθεί με ακρίβεια η διάγνωση.

Η πρώτη βασική ενέργεια του ιατρού είναι η επισκόπηση του υγρού, η οποία θα δώσει τις πρώτες πληροφορίες για τη φύση του υγρού, με την αδρή αξιολόγηση της χροιάς του (αιματηρό, διαυγές, θολερό, αχυρόχρουν, κλπ) και της πιθανής οσμής. Το λευκωπό χρώμα μπορεί να μην οφείλεται σε πύον αλλά σε χυλό ή να είναι αποτέλεσμα ψευδοχυλοθώρακα, όπως στη ρευματοειδή αρθρίτιδα και επομένως απαιτείται φυγοκέντρηση και έλεγχος του ιζήματος.

Η αιμορραγική χροιά μπορεί να οφείλεται στην παρουσία λίγων σταγόνων αίματος μετά από ιατρογενή τρώση αγγείου κατά την παρακέντηση, αλλά μπορεί να είναι και αποτέλεσμα διηθήσεως του υπεζωκότα από νεόπλασμα ή πνευμονικής εμβολής ή τραυματισμού του πνεύμονα.

Τα κριτήρια του Light που ισχύουν από το 1972 (12) και σύμφωνα με τα οποία μια πλευριτική συλλογή χαρακτηρίζεται ως διίδρωμα ή εξίδρωμα είναι τα ακόλουθα:

1. LDH πλευριτικού υγρού μεγαλύτερη των 2/3 της ανώτερης φυσιολογικής τιμής της στον ορό του αίματος
2. Σχέση LDH πλευριτικού υγρού προς LDH ορού άνω του 0.60
3. Σχέση πρωτεϊνών πλευριτικού υγρού προς πρωτεΐνες ορού άνω του 0.50

Εάν έστω και ένα από τα ανωτέρω κριτήρια ισχύει, τότε μάλλον πρόκειται για εξίδρωμα, ενώ αν πληρούνται και τα τρία τότε οι πιθανότητες για εξίδρωμα αγγίζουν το 100%.

Εκτός των ανωτέρω κριτηρίων υπάρχουν και άλλα κριτήρια τα οποία μπορούν να βοηθήσουν στη διάγνωση του εξιδρώματος. Η σχέση της χολερυθρίνης του πλευριτικού υγρού προς τη χολερυθρίνη του ορού υπερβαίνει το 0.6 στα εξιδρώματα, ενώ στα διδρώματα η σχέση αυτή είναι μικρότερη (13). Η χοληστερίνη του πλευριτικού υγρού στα εξιδρώματα είναι συνήθως άνω των 60 mg/dl, ενώ στα διδρώματα είναι μικρότερη (14).

Τέλος η αλβουμίνη του πλευριτικού υγρού μπορεί να παίζει ρόλο στη διαφοροδιάγνωση των περιπτώσεων εκείνων οι οποίες δίνουν κλινικοακτινολογική εντύπωση του διυδρώματος, αλλά ορισμένοι δείκτες τα καταστούν ως εξιδρώματα. Έτσι ο Burgess και οι συνεργάτες του (15) αναφέρουν ότι οι διαφορά της αλβουμίνης του ορού από της αλβουμίνη του πλευριτικού υγρού είναι άνω του 1.2 g/dl στα διυδρώματα, αλλά η διαφορά αυτή δε θα πρέπει να χρησιμοποιείται από μόνη της, παρά μόνον εφόσον επί καρδιακής ανεπάρκειας υπάρχει έστω και ένα κριτήριο του Light που θεωρεί το υγρό εξίδρωμα. Επίσης η έντονη διούρηση μπορεί να αυξήσει τόσο την πρωτεΐνη του υγρού, όσο και την LDH και μερικές φορές να προκαλέσει σύγχυση στη διαφοροδιάγνωση του εξιδρώματος από το διίδρωμα.

Η ευαισθησία των κριτηρίων του Light στη διάγνωση του εξιδρώματος είναι περίπου 100% (98%), πράγμα που σημαίνει ότι κανένα σχεδόν εξίδρωμα δεν διαφεύγει της διάγνωσης με τα κριτήρια του Light. Φαίνεται όμως ότι η ειδικότητα, σύμφωνα με κάποιους συγγραφείς μπορεί να μην ξεπερνά το 75% (16,17). Όσο το κατώτερο όριο προσδιορισμού της LDH του υγρού ανέρχεται τόσο η ειδικότητα αυξάνεται (17,18). Θεωρείται επίσης από άλλους συγγραφείς ότι η χοληστερόλη του ορού έχει μεγαλύτερη ειδικότητα (αν και μικρότερη ευαισθησία), από τα κριτήρια του Light στη διάγνωση της εξιδρωματικής συλλογής και θα μπορούσε να εκτελείται επί αμφιβολιών (16).

Η πρωτεΐνη του πλευριτικού υγρού σχεδόν πάντα σε φυματιώδους αιτιολογίας πλευριτική συλλογή είναι άνω των 4.0 g/dl, ενώ τιμές 7.0-8.0 g/dl επιβάλλουν την αναζήτηση μακροσφαιριναιμίας ή πολλαπλού μυελώματος (16).

Όταν η LDH του υγρού προσανατολίζει προς εξίδρωμα, αλλά η πρωτεΐνη του προς διίδρωμα, τότε θα πρέπει να αναζητηθεί ως αίτιο η παραπνευμονική συλλογή ή η κακοήθεια ή σπανιότερα η πνευμονία από πνευμοκύστη *carinii* (16). Η απόλυτη τιμή της LDH μπορεί επίσης να κατευθύνει τη διάγνωση καθότι τιμές άνω των 1000 παρατηρούνται συχνότερα επί πυώδους πλευριτικής συλλογής, ρευματοειδούς πλευρίτιδας ή παραγονιμιάσεως, σπανιότερα επί κακοήθειας και εξαιρετικά σπάνια επί φυματιώδους πλευρίτιδας.

## Βιβλιογραφία

1. Miserocchi G, Agostoni E: Contents of the pleural space. *J Appl Physiol* 1971;30:208-213
2. Staub NC, Winer-Kronish JP, Albertine KH: Transport through the pleura: Physiology of normal liquid and solute exchange in the perietal space. In: Chretien J. Bignon (eds). *The pleura in Health and Disease*. N.Y. Dekker 1985;Vol 30,pp169-193
3. Stewart PB: The rate of formation and lymphatic removal of fluid in pleural effusions. *J Clin Invest* 1963;42:258-262
4. Leckie WJH, Tothill P: Albumin turnover in pleural effusions. *Clin Sci* 1965;29:339-352
5. Agostoni E and Zocchi L: Mechanical coupling and liquid exchanges in the pleural space. In: *Clinics in Chest Medicine: Diseases of the pleura*. June 1998, Saunders, pp 241-260
6. Wiener-Kronish JP, Broaddus VC: Interrelationship of pleural and pulmonary interstitial liquid. *Ann Rev Physiol* 1993;55:209-226
7. Light RW: Pleural diseases. *Physiology of the pleural space*. Lippincott-Williams & Wilkins 2001. 4<sup>th</sup> Ed pp 8-20
8. Allen SJ, Laine GA, Drake RE, Gabel JC: Superior vena cava pressure elevation causes pleural effusion formation in sheep. *Am J Physiol* 1988;255:H492-H495
9. Gaensler EA: Parietal pleurectomy of recurrent spontaneous pneumothorax. *Surg Gynecol Obstet* 1956;102:293-308
10. Agostoni EQ Mechanics of the pleural space. *Physiol Rev* 1972;52:57-128
11. Wiener-Kronish JP, Broaddus VC, Albertine KH, et al. Relationship of pleural effusions to increased permeability pulmonary edema in anesthetized sheep. *J Clin Invest* 1988;82:1422-1429
12. Light RW, Mac Gregor I, Luchsinger PC, et al. Pleural effusion. The diagnostic separation of transudates and exudates. *Ann Intern Med* 1972;77:5-7-513

13. Meisel S, Shamiss A, Thaler M, et al. Pleural fluid to serum bilirubin concentration ratio for the separation of transudates from exudates. *Chest* 1990;98:141-144
14. Valdes L, Pose A, Suarez J, et al. Cholesterol : A useful parameter for distinguishing between pleural exudates and transudates. *Chest* 1991;99:1097-1102
15. Burgess LJ, Maritz FJ, Taljaard JJF: Comparative analysis of the biochemical parameters used to distinguish between pleural transudates and exudates. *Chest* 1995;107:1604-1609
16. Sahn ST. Clinical evaluation of the patient with pleural effusion. In: Bouros D: *Pleural disease*. Dekker M; 2004:pp 267-286
17. Heffner JE, Brown LK, Barbieri C: Diagnostic value of tests that discriminate between exudative and transudative pleural effusions. *Chest* 1997; 111:970-979
18. Joseph J, Badrinath P, Basran G, Sahn SA: Is the pleural fluid transudate or exudate? A revisit of the diagnostic criteria. *Thorax* 2001;56:867-870

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### Η ΚΑΚΟΗΘΗΣ ΠΛΕΥΡΙΤΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ

Η μεταστατική διήθηση του υπεζωκότα αποτελεί τη δεύτερη ή την τρίτη αιτία εξιδρωματικών πλευριτικών συλλογών μετά την παραπνευμονική συλλογή, αναλόγως εάν η επίπτωση της φυματίωσης είναι μικρή ή μεγάλη αντιστοίχως, στην περιοχή από την οποία προέρχεται ο ασθενής.

Ο καρκίνος του πνεύμονα και του μαστού αποτελούν τα δύο συχνότερα αίτια μεταστατικής διήθησης του υπεζωκότα με ποσοστό περί το 70% (45% ο καρκίνος του πνεύμονα και 25% ο καρκίνος του μαστού). Άλλες κακοήθεις νεοπλασίες περιλαμβάνουν το λέμφωμα και τη λευχαιμία, τον καρκίνο των ωοθηκών, το σάρκωμα, τον καρκίνο της μήτρας και τον καρκίνο του πεπτικού (στομάχι, παχύ έντερο, πάγκρεας, χοληδόχος κύστη) (1).

Η κακοήθης πλευριτική συλλογή είναι η πρώτη εκδήλωση της νόσου σε ποσοστό που κυμαίνεται από 10 έως 50% των ασθενών. Ποσοστό άνω του 50% των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα θα αναπτύξει κατά τη διάρκεια της πορείας της νόσου πλευριτική συλλογή (2). Συχνότερα είναι η δημιουργία πλευριτικής συλλογής στο αδενοκαρκίνωμα και σε ασθενείς με anti-p53 αντισώματα (3). Είναι δυνατόν επίσης ασθενείς που έχουν υποστεί χειρουργική επέμβαση για αδενοκαρκίνωμα, να αναπτύξουν κακοήθης πλευριτική συλλογή εντός του πρώτου έτους από την επέμβαση (4).

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η παρουσία υπεζωκοτικού υγρού επί καρκίνου του πνεύμονα, επηρεάζει κατά κανόνα ( $\approx 93\%$ ) αρνητικά την πρόγνωση του καρκίνου, άσχετα με το εάν η κυτταρολογική εξέταση του υγρού είναι θετική ή αρνητική για κακοήθεια (5). Σε ένα 7% των ασθενών με πλευριτική συλλογή, ο Decker και οι συνεργάτες του από την Mayo Clinic ανακοίνωσαν ότι η θωρακοσκοπική διερεύνηση της αρνητικής (κυτταρολογικά) για κακοήθεια συλλογής έδειξε ότι δεν υπήρχε διήθηση του

υπεζωκότα, με αποτέλεσμα οι ασθενείς αυτοί να υποβληθούν σε χειρουργικοί επέμβαση και να εξασφαλίσουν μακροχρόνια επιβίωση (6).

Η προτεινόμενη αντιμετώπιση του ασθενούς με αρνητική για κακοήθεια πλευριτική συλλογή (από την κυτταρολογική εξέταση) και καρκίνο του πνεύμονος είναι:

1. Υποβάλλεται σε θωρακοσκοπική βιοψία υπεζωκότος.
2. Εάν είναι αρνητική, εξετάζεται με αξονική τομογραφία η ύπαρξη λεμφαδένων και το ενδεχόμενο να γίνει μεσοθωρακοσκόπηση και βιοψία.
3. Εάν είναι αρνητική ή αδύνατη λόγω θέσης η μεσοθωρακοσκόπηση και ο ασθενής κατάλληλος για ερευνητική θωρακοτομή, οδηγείται στο χειρουργείο.

Ο καρκίνος του μαστού ακολουθεί σε συχνότητα τον καρκίνο του πνεύμονα ως αιτία πρόκλησης πλευριτικής συλλογής. Εάν συνυπάρχει λεμφαγγειακή προσβολή το ποσοστό είναι αυξημένο και κυμαίνεται στο 65% (7). Το υγρό εντοπίζεται συνήθως σύστοιχα με τον προσβεβλημένο μαστό, εκτός εάν αυτός υποστεί ακτινοθεραπεία, οπότε η συχνότητα της συστοίχου εντοπίσεως ελαττώνεται (8).

Οι ασθενείς με λέμφωμα σε κάποια φάση της πορείας της νόσου τους σε ποσοστό περίπου 15% θα αναπτύξουν πλευριτική συλλογή και ενδοθωρακική λεμφαδενοπάθεια χωρίς τις περισσότερες φορές να υπάρχει διήθηση του υπεζωκότα (9) προκειμένου για Hodgkin λέμφωμα. Αντίθετα το μη Hodgkin λέμφωμα διηθεί σχεδόν πάντοτε τον υπεζωκότα, με αποτέλεσμα η κυτταρολογική εξέταση του πλευριτικού υγρού να είναι θετική (10). Ποσοστό τέλος 5%-10% ασθενών με λευχαιμία εμφανίζουν πλευριτική συλλογή (1).

Η παρουσία πλευριτικής συλλογής σε μεταστατική νόσο στον υπεζωκότα, φαίνεται ότι οφείλεται σε αύξηση της διαπερατότητας των τριχοειδών, πιθανόν λόγω αύξησης παραγωγής του αυξητικού ενδοθηλιακού παράγοντα των αγγείων (VEGF) στους ασθενείς αυτούς (10,11).

Παρά το γεγονός ότι η απόφραξη της λεμφικής οδού με αποτέλεσμα τη μείωση της παροχέτευσης του υγρού από την υπεζωκοτική κοιλότητα παίζει κάποιο ρόλο στην πρόκληση της πλευριτικής συλλογής, αυτός ο παράγοντας φαίνεται ότι είναι δευτερεύον σε σχέση με την αυξημένη διαπερατότητα των τριχοειδών. Η μείωση της ροής οφείλεται σε δύο διαφορετικούς μηχανισμούς κατά το Light. Ο πρώτος είναι η απόφραξη των λεμφικών στομιών λόγω της διήθησης του περιτόνου πετάλου του υπεζωκότος από τις μεταστατικές εστίες (12). Ο δεύτερος είναι ότι η μεταστατική διήθηση των μεσοπνευμονίων λεμφαδένων (όπου παροχετεύει η λεμφική οδός του περιτόνου υπεζωκότος) προκαλεί δυσχέρεια στην παροχέτευση του υγρού.

Το πλευριτικό υγρό σε κακοήγη πλευριτική συλλογή είναι τουλάχιστον στο 95% των περιπτώσεων εξίδρωμα (13). Φαίνεται όμως ότι στο 5% των περιπτώσεων που παρουσίαζαν διίδρωμα, υπήρχε άλλος λόγος πρόκλησης της συλλογής.

Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι σε ποσοστό 20% των κακοηθών συλλογών, η σχέση πρωτεϊνών υγρού-πλάσματος είναι κάτω από 0.5 ενώ αντίθετα η σχέση LDH υπερβαίνει το 0.6, άρα είναι μεν εξίδρωμα αλλά με την ειδική αυτή σχέση των πρωτεϊνών. Αντίστροφα πάλι, η πλειοψηφία των πλευριτικών συλλογών στις οποίες παρατηρείται η ανωτέρω διαπερατότητα των σχέσεων λευκωμάτων υγρού-πλάσματος (με σχέση LDH υγρού-πλάσματος άνω του 0.6) είναι κακοήθεις συλλογές (14).

Ποσοστό 50% των κακοηθών συλλογών είναι αιμορραγικές ενώ ποσοστό 50% των αιμορραγικών συλλογών είναι κακοήθεις (15). Το ποσό των λευκοκυττάρων στις κακοήθεις πλευριτικές συλλογές μπορεί να μην είναι ιδιαίτερα υψηλό και κυμαίνεται από 1000 έως 10.000 ανά mm (15). Ο τύπος των κυττάρων είναι συνήθως λεμφοκυτταρικός ή μονοκυτταρικός με ποσοστό 40-45% ενώ 15% είναι πολυμορφοπυρηνικός. Η ηωσινοφιλία στο πλευριτικό υγρό δεν αποκλείει την κακοήθεια όπως προκύπτει από πρόσφατες μελέτες (16-18).

Η γλυκόζη του πλευριτικού υγρού στη κακοήγη πλευριτική συλλογή είναι συνήθως άνω των 60 mg/dl (>80%), ενώ στο υπόλοιπο ποσοστό, όπου η διήθηση του υπεζωκότα είναι



αρκετά εκτεταμένη, η γλυκόζη του υγρού είναι κάτω των 60 mg. Αυτό φαίνεται να οφείλεται κυρίως σε παρεμπόδιση της μεταφοράς γλυκόζης από το αίμα στην υπεζωκοτική κοιλότητα και δείχνει κακή πρόγνωση (19).

Το pH στο 35% των κακοηθών πλευριτικών συλλογών είναι κάτω του 7.30 (20). Αυτό οφείλεται σε αύξηση παραγωγής οξέων στο υγρό και σε μειωμένη μετακίνηση CO<sub>2</sub> εκτός της υπεζωκοτικής κοιλότητας και σχετίζεται με χαμηλά επίπεδα γλυκόζης και κακή πρόγνωση (19).

Ποσοστό 10-14% των ασθενών με κακοήθη πλευριτική συλλογή εμφανίζουν αυξημένη αμυλάση (σιελική) και αυτό παρατηρείται συχνότερα στο αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα και λιγότερο συχνά στο μεταστατικό καρκίνωμα των ωοθηκών. Κλινικά θεωρείται ότι η αυξημένη σιελική αμυλάση του πλευριτικού υγρού, απουσία ρήξεως του οισοφάγου, τεκμηριώνει τη διάγνωση της κακοήθους πλευριτικής συλλογής (16).

## **ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΚΑΚΟΗΘΟΥΣ ΠΛΕΥΡΙΤΙΚΗΣ ΣΥΛΛΟΓΗΣ**

Η διάγνωση της κακοήθους πλευριτικής συλλογής στηρίζεται στην ανεύρεση κακοηθών κυττάρων είτε στο πλευριτικό υγρό είτε σε υλικό βιοψίας του υπεζωκότα. Η κυτταρολογική εξέταση του πλευριτικού υγρού δίνει τη διάγνωση στο μεγαλύτερο ποσοστό των κακοηθών πλευριτικών συλλογών (άνω του 50%). Εάν μάλιστα αποσταλούν τρία διαφορετικά δείγματα υγρού, τότε η διάγνωση επιτυγχάνεται σε ποσοστό περίπου 80%. Η πιθανότητα να ανευρεθεί θετικό υγρό για κακοήθεια, αποτελεί συνάρτηση του ιστολογικού τύπου του πνευμονικού καρκίνου. Εάν πρόκειται περί αδενοκαρκινώματος, το οποίο συνήθως είναι περιφερικό και διηθεί τον υπεζωκότα, τότε η πιθανότητα ανεύρεσης θετικού για κακοήθεια πλευριτικού υγρού αυξάνει, ενώ το πλακώδες δίνει λιγότερο συχνά ευρήματα στο πλευριτικό υγρό. Αυτό οφείλεται στο ότι το πλακώδες καρκίνωμα προκαλεί πλευριτική συλλογή λόγω βρογχικής απόφραξης ή λόγω παρεμπόδισης της λεμφικής κυκλοφορίας (15). Το μη Hodgkin λέμφωμα δίνει συχνότερα θετική κυτταρολογική εξέταση του πλευριτικού υγρού από το Hogkin

λέμφωμα (21). Η ανεύρεση αδενοκαρκινώματος στην κυτταρολογική εξέταση του πλευριτικού υγρού δεν καθορίζει και την περιοχή προέλευσης του όγκου, αν και συνηθέστερα αυτός προέρχεται από τον πνεύμονα. Τέλος, είναι γνωστό ότι η κυτταρολογική εξέταση δίνει αρνητικό αποτέλεσμα στις περιπτώσεις που το πλευριτικό υγρό περιέχει λιγότερα από 1-10% κακοήθη κύτταρα.

Η χρήση των καρκινικών δεικτών δε συνιστάται για τη διάγνωση της κακοήθους πλευριτικής συλλογής, διότι δεν παρουσιάζουν 100% ειδικότητα και είναι συνεπώς πιθανό να ανευρεθούν σε καλοήγη πλευριτική συλλογή (22). Για το λόγο αυτό δε συνιστάται να αποστέλλεται η εξέταση των καρκινικών δεικτών (1). Αντίθετα ορισμένες ανοσοϊστοχημικές δοκιμασίες μπορεί να αποβούν θετικές, ιδιαίτερα για τη μεγάλη πλειοψηφία των αδενοκαρκινωμάτων και συνεπώς πρέπει να εξετάζεται κατά περίπτωση η δυνατότητα αξιολόγησής τους (23).

Η βιοψία υπεζωκότος υπολείπεται σε ευαισθησία της κυτταρολογικής εξέτασης του πλευριτικού υγρού, προκειμένου να τεθεί η διάγνωση της κακοήθους πλευριτικής συλλογής. Αυτό διότι στο 50% των ασθενών αυτών, η πλευριτική μοίρα του τοιχωματικού υπεζωκότα δεν προσβάλλεται (24). Σε μελέτη των Prakash και Reiman από την Mayo Clinic (25) αναφέρεται ότι η βιοψία του υπεζωκότα ήταν θετική στο 45% περίπου των περιπτώσεων, ενώ η κυτταρολογική εξέταση του υγρού ήταν θετική στο 60% περίπου, σε 281 ασθενείς με κακοήγη πλευριτική συλλογή. Οι ίδιοι ερευνητές αναφέρουν ότι σε 118 κακοήθεις πλευριτικές συλλογές στις οποίες δεν μπόρεσε να τεθεί διάγνωση με κυτταρολογική εξέταση του πλευριτικού υγρού, η βιοψία του υπεζωκότα έθεσε τη διάγνωση σε 20 περιπτώσεις, ποσοστό 17%.

Αρκετοί ιατροί συνιστούν τη θωρακοσκοπική βιοψία του υπεζωκότα, αν η κυτταρολογική εξέταση του υγρού είναι κατ'επανάληψη αρνητική. Ο λόγος είναι ότι παρέχει τη διάγνωση στη μεγάλη πλειοψηφία των ασθενών και συντομεύει το χρόνο νοσηλείας, ενώ δεν συμβαίνει το ίδιο με την κλειστή βιοψία του υπεζωκότα.

Όπως ήδη αναφέρθηκε είναι δυνατό, παρά τον εκτεταμένο έλεγχο, να μην ανευρεθεί η πρωτοπαθής εστία του κακοήθους νεοπλασματος το οποίο διηθεί τον υπεζωκότα. Σε μελέτη που έγινε εξετάστηκαν 42 τέτοιες περιπτώσεις ασθενών, οι οποίοι υποβλήθηκαν σε πλήρη έλεγχο με αξονική τομογραφία θώρακος, βρογχοσκόπηση, αξονική τομογραφία κοιλίας, μαστογραφία και υπερηχογράφημα πύελου. Παρά τον εκτεταμένο έλεγχο, η διάγνωση της πρωτοπαθούς εστίας ετέθη σε 15 από τις 42 περιπτώσεις (36%) και επρόκειτο για καρκίνο του πνεύμονα και στους 15 ασθενείς, ενώ στους υπόλοιπους 27 δεν ανευρέθει η πρωτοπαθή εστία (26). Γενικά από διάφορες μελέτη προκύπτει ότι, μεταξύ των κυτταρολογικά αρνητικών περιπτώσεων μόνο στο 7% αποδείχθηκε κακοήθεια διαμέσου της βιοψίας του υπεζωκότα ενώ ένα 20% των πλευριτικών συλλογών παραμένουν αδιάγνωστες.

## Βιβλιογραφία

1. Light RW. Pleural effusions related to metastatic malignancies. In: Light's RW. Pleural Diseases: Lippincott-Williams & Wilkins 4<sup>th</sup> edition 2001;pp 108-134
2. Johnston WW: The malignant pleural effusion: a review of cytopathologic diagnoses of 584 specimens from 472 consecutive patients. *Cancer* 1985;56:905-909
3. Lai CL, Tsai CM, Tsai TT, et al. Presence of serum anti-p53 antibodies in associated with pleural effusion and poor prognosis in lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 1998;4:3025-3030
4. Renshaw AA, Madge R, Sugarbaker DJ, et al. Malignant pleural effusion after resection of pulmonary adenocarcinoma. *Acta Cytol* 1998;42:1111-1115
5. Sugiura S, Ando Y, Minami H, et al. Prognostic value of pleural effusion in patients with NSCLC. *Clin Cancer Res* 1997;3:47-50
6. Dekker DA, Dines DE, Payne WS, et al. The significance of a cytologically negative pleural effusion in bronchogenic carcinoma. *Chest* 1978;74:640-642
7. Goldsmith HS, Bailey HD, Callahan EL, et al. Pulmonary lymphangitic metastases from breast carcinoma. *Arch Surg* 1967;94:483-488
8. Apffelstaedt JP, Van Zyl JA, Muller AG. Breast cancer complicated by pleural effusion: patient characteristics and results of surgical management. *J Surg Oncol* 1995;58:173-175
9. Stolberg HO, Patt NL, MacEwen KF, et al. Hodgkin's disease of the lung: roentgenologic-pathologic correlation. *AJR* 1964;92:96-115
10. Xaubet A, Diuemenjo MC, Marin A, et al. Characteristics and prognostic value of pleural effusions in non-Hodgkin's lymphomas. *Eur J Resp Dis* 1985;66:135-140
11. Cheng C-S, Rodriguez RM, Perkett EA, et al. Vascular endothelial growth factor in pleural fluid. *Chest* 1999;115:760-765
12. Wang NS. The preformed stomas connecting the pleural cavity and the lymphatics in the parietal pleura. *Am Rev Respir Dis* 1975;111:12-20
13. Ashchi M, Golish J, Eng P, et al. Transudative malignant pleural effusion: prevalence and mechanics. *South Med J* 1998;91:23-26

14. Light RW, Mac Gregor I, Luchsinger PC, et al. Pleural effusion. The diagnostic separation of transudates and exudates. *Ann Intern Med* 1972;77:5-7-513
15. Light RW, Erozon YS, Ball WC. Cells in pleural fluid: their value in differential diagnosis. *Arch Intern Med* 1973;132:854-860
16. Sahn SE: Malignant pleural effusions. In: Bouros D: Pleural disease. Dekker M. 2004:411-438
17. Martinez-Garcia MA, Cases-Viedma E, Cordero PJ, et al. Diagnostic utility of eosinophils in the pleural fluid. *Eur Resp J* 2000;15:166-169
18. Rubins JB, Rubins HB. Etiology and prognostic significance of eosinophilic pleural effusions. A prospective study. *Chest* 1996;110:1271-1274
19. Rodriguez-Panadero F, Lopez-Mejias J. Low glucose and pH levels in malignant pleural effusions. *Am Rev Respir Dis* 1989;139:663-667
20. Rodriguez-Panadero F. Effusions from malignancy. In Light's RW and Lee GYC. *Textbook of pleural disease*. Arnold 2003; pp 296-309
21. Naylor B, Schmidt RW. The case for exfoliative cytology of serous effusions. *Lancet* 1964;1:711-712
22. Miedouge M, Rouzaud P, Salama G, et al. Evaluation of seven tumor markers in pleural fluid for the diagnosis of malignant effusions. *Br J Cancer* 1999;81:1059-1065
23. Ordonez NG. Role of immunohistochemistry in differentiating epithelial mesothelioma from adenocarcinoma. Review and update. *Am J Clin Pathol* 1999;112:75-89
24. Canto A, Rivas J, Saumench J, et al. Points to consider when choosing a biopsy method in cases of pleuricy of unknown origin. *Chest* 1983;84:176-179
25. Prahash UBS, Reiman HM. Comparison of needle biopsy with cytologic analysis for the evaluation of pleural effusion: analysis of 414 cases. *Mayo Clinic Proc* 1985;60:158-164
26. Livingston RB, McCracken JD, Trauth CJ, et al. Isolated pleural effusion in SCLC: favorable prognosis. *Chest* 1982;81:208-211

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### **ΑΣΤΑΘΕΙΑ ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΟΥ DNA (MSI, MICROSATELLITE INSTABILITY) ΚΑΙ ΑΠΩΛΕΙΑ ΕΤΕΡΟΖΥΓΩΤΙΑΣ (LOH, LOSS OF HETEROZYGOSITY)**

Το μικροδορυφορικό DNA αποτελείται από επαναλαμβανόμενα μοτίβα των 1-6 ζευγών νουκλεοτιδίων τα οποία ανευρίσκονται σε όλα τα προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά κύτταρα. Στις περισσότερες περιπτώσεις αποτελούν τμήματα “non-coding DNA” και σπανιότερα περιοχών που κωδικοποιούν κάποιες πρωτεΐνες. Το μικροδορυφορικό DNA παρουσιάζει μεγάλη ποικιλία πολυμορφισμού.

Με τη χρήση της PCR (polymerase chain reaction) το μικροδορυφορικό DNA έχει μετατραπεί σε ένα χρήσιμο γενετικό δείκτη. Το μικροδορυφορικό DNA αποτελεί ένα εξαιρετικά χρήσιμο εργαλείο της γονιδιακής χαρτογράφησης πολλών οργάνων με διάφορες εφαρμογές από ιατροδικαστικές μελέτες, μελέτες αποδόμησης του DNA έως διατήρηση και διαχείριση βιολογικών πηγών. Τέλος μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένα εργαλείο γονιδιακού διαχωρισμού σε διάφορες μελέτες μοριακής επιδημιολογίας.

Η πιο κοινή μικροδορυφορική μονάδα στον άνθρωπο είναι ένα δινουκλεοτίδιο αποτελούμενο από κυστίνη και αδενίνη το οποίο βρίσκεται σε δεκάδες χιλιάδες θέσεις. Επαναλαμβανόμενα τρινουκλεοτίδια έχουν την τάση να επεκτείνονται μέσω της μείωσης και όταν η διαδικασία της επέκτασης δεν γίνεται με τον ορθό τρόπο δημιουργούνται νευρολογικές ανωμαλίες και εύθραυστες περιοχές χρωμοσωμάτων όπως για παράδειγμα η νόσος του εύθραυστου χρωμοσώματος X.

Η Αστάθεια του Μικροδορυφορικού DNA σχετίζεται με υψηλούς ρυθμούς μετάλλαξης και η διαδικασία της μετάλλαξης διαφέρει ανάμεσα στους διάφορους γονιδιακούς τόπους, τα είδη, την ηλικία, το φύλο.

Ο υψηλός ρυθμός μεταλλαξογένεσης στις μικροδορυφορικές αλληλουχίες μπορεί να εξηγηθεί από δύο κυρίως μηχανισμούς. Ο πρώτος σχετίζεται με λάθη κατά την αντιγραφή του DNA (slippage event) και ο δεύτερος με ανωμαλία στον μηχανισμό αποκατάστασης των λαθών κατά την αντιγραφή (DNA mismatch repair system). Συγκεκριμένα κατά την αντιγραφή, ένας αριθμός επαναλαμβανομένων βάσεων στη νεοαντιγραμμένη αλυσίδα μπορεί να διαφέρει από την αρχική και αυτό να έχει ως αποτέλεσμα την επανάληψη μικροδορυφορικών αλληλουχιών είτε στο αρχικό πρότυπο είτε στη νέα αλυσίδα του DNA. Ο μηχανισμός αποκατάστασης λαθών κατά την αντιγραφή του DNA συμβάλλει στο να διατηρηθεί η γονιδιακή σταθερότητα, διορθώνοντας τα λάθη που συμβαίνουν κατά την αντιγραφή. Η δυσλειτουργία του συστήματος αυτού μπορεί να οδηγήσει στο χάσιμο της χρωμοσωμικής σταθερότητας γεγονός που παίζει ρόλο στην καρκινογένεση.

Υπάρχουν δύο τύποι γενετικής αποσταθεροποίησης. Ο ένας είναι η χρωμοσωμική αστάθεια που έχει σαν αποτέλεσμα τον ανευπλοϊδισμό και ο άλλος η αστάθεια του μικροδορυφορικού DNA που δημιουργείται λόγω λαθών κατά την αντιγραφή σύντομων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών. Ανάμεσα στα γονίδια που παίζουν το σημαντικότερο ρόλο στα διάφορα στάδια της καρκινογένεσης είναι τα ογκοκατασταλτικά γονίδια. Έχει αποδειχθεί ότι η αλλαγή του γενετικού υλικού σε μία και μόνο αλληλουχία (η απώλεια της ετεροζυγωτίας) μπορεί να οδηγήσει σε καρκινογένεση.

Η απώλεια ετεροζυγωτίας (LOH) και η αστάθεια του μικροδορυφορικού DNA (MI) αποτελούν φαινόμενα που απαντώνται συχνά σε κακοήθειες. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η LOH και MI ανευρίσκονται και σε αρκετές καλοήθειες παθήσεις.

## **ΑΠΩΛΕΙΑ ΕΤΕΡΟΖΥΓΩΤΙΑΣ**

Η LOH αποτελεί ιδιαίτερη προσφιλή μέθοδο έρευνας της ύπαρξης ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Τα γονίδια αυτά συνδέονται με την παθογένεια πολλών μορφών καρκίνου (1,2). Η απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων σχετίζεται συχνότερα με την

ανάπτυξη καρκίνου σε σύγκριση με την ενεργοποίηση των ογκογονιδίων. Η μετάλλαξη του ενός αλληλόμορφου ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου συνοδεύεται συνήθως από την απώλεια του εναπομείναντος αλληλόμορφου. Εκεί στηρίζεται και η έρευνα που γίνεται στο γενετικό υλικό για την ανεύρεση ογκοκατασταλτικών γονιδίων σε διάφορες χρωμοσωμικές περιοχές (3). Με την έρευνα αυτή αναλύονται περιοχές που υπάρχει απώλεια του ενός αλληλόμορφου (απώλεια ετεροζυγωτίας) ώστε να αναγνωριστεί η περιοχή που βρίσκεται το ογκοκατασταλτικό γονίδιο. Η τεχνική χαρακτηρίζεται από υψηλή διακριτική ικανότητα και ακριβή χαρτογράφηση της περιοχής που εξετάζεται. Έτσι, οι μελέτες απώλειας της ετεροζυγωτίας για συγκεκριμένη νόσο αφενός αποδεικνύουν τη θέση νέων ογκοκατασταλτικών γονιδίων και αφετέρου αν αυτά είναι ήδη χαρακτηρισμένα ως υποψήφια γονίδια της νόσου, τότε ενισχύουν τις ενδείξεις για την συμμετοχή των συγκεκριμένων γονιδίων στη νόσο.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το φαινόμενο της απώλειας ετεροζυγωτίας είναι ανιχνεύσιμο και σε καλοήθη νοσήματα με διαταραχές του πολλαπλασιασμού των κυττάρων με χαρακτήρες είτε υπερπλασίας είτε δυσπλασίας των κυττάρων (3,4). Τέτοια νοσήματα είναι η ακτινική κεράτωση, το οφθαλμικό πτερύγιο και οι αθηρωματικές πλάκες (3-6). Αξιοσημείωτο δε είναι το γεγονός ότι στην ακτινική κεράτωση, που αποτελεί μια καλοήθη κατάσταση που στο παρελθόν θεωρούνταν προκαρκινοματώδης και είχε ερευνηθεί με μελέτες απώλειας ετεροζυγωτίας, το ποσοστό LOH είναι πολύ υψηλότερο συγκριτικά με το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα του δέρματος (3,4). Επιπλέον, απώλεια ετεροζυγωτίας έχει ανευρεθεί με αρκετά μεγάλη συχνότητα σε πνευμονικά νοσήματα όπως στη σαρκοείδωση, στην ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση και στη χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (7-9). Τα ευρήματα υψηλών ποσοστών απώλειας ετεροζυγωτίας σε καλοήθη νοσήματα ενισχύουν την υπόθεση ότι τα ογκοκατασταλτικά γονίδια μπορεί να ενέχονται γενικότερα σε μηχανισμούς μη καρκινικού πολλαπλασιασμού αφού ο ρόλος τους στην ομοιόσταση και την αύξηση των κυττάρων δεν είναι πλήρως κατανοητός (10).



## ΑΣΤΑΘΕΙΑ ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΟΥ DNA

Στη διαδικασία της ογκογένεσης συμμετέχει και μια ομάδα γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες που διορθώνουν τυχόν λάθη στο DNA ή στο σύστημα αντιγραφής του DNA. Μεταλλάξεις στα γονίδια αυτά έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση του ρυθμού μεταλλαξιογένεσης (9,11). Ιδανικό εργαλείο για τον έλεγχο της πιστότητας της αντιγραφής του DNA αποτέλεσε στις μελέτες του καρκίνου το μικροδορυφορικό DNA.

Το μικροδορυφορικό DNA αποτελείται από μικρές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (συνήθως 2-5 νουκλεοτίδια) DNA κατά μήκος του ανθρώπινου γονιδιώματος. Μάλιστα υπολογίζεται ότι τέτοιου είδους αλληλουχίες υπάρχουν σε περίπου 100.000 θέσεις σε όλα τα χρωμοσώματα του ανθρώπου, αποτελώντας το 10-15% του ανθρώπινου γενώματος (12). Όσον αφορά στη λειτουργία των αλληλουχιών αυτών, στην πλειοψηφία των περιπτώσεων δε σχετίζονται με τη ρύθμιση της έκφρασης κάποιων γονιδίων. Εντούτοις, έχουν προταθεί ότι οι αλληλουχίες αυτές έχουν ρόλο στην αποφυγή λαθών κατά τη διάρκεια φαινομένων γενετικού ανασυνδυασμού, καθώς οριοθετούν τις περιοχές που γίνεται η ανταλλαγή αδελφών χρωματίδων. Το αποτέλεσμα είναι μικρά λάθη κατά τον ανασυνδυασμό να μην αλλοιώνουν το πλαίσιο ανάγνωσης σε παρακείμενα γονίδια (13).

Η έλλειψη λειτουργικότητας των αλληλουχιών αυτών σε συνδυασμό με την επαναλαμβανόμενη δομή τους, έχει ως συνέπεια οι αλληλουχίες αυτές να χαρακτηρίζονται από υψηλό βαθμό πολυμορφισμού. Η δημιουργία λαθών λόγω άνισου επιχιασμού κατά το ζευγάρωμα των αδελφών χρωματίδων ή κατά την αντιγραφή του DNA ευνοείται, ενώ η απουσία επιλεκτικής πίεσης στα νεοσχηματισθέντα-μεταλλαγμένα αλληλόμορφα τα σταθεροποιεί στον πληθυσμό, προκαλώντας υψηλό βαθμό πολυμορφισμού (14).

Ο συνηθέστερος τρόπος με τον οποίο εμφανίζονται λάθη κατά την αντιγραφή του μικροδορυφορικού DNA είναι μέσω του φαινομένου της ολίσθησης της DNA

πολυμεράσης (DNA slippage), με αποτέλεσμα την εμφάνιση μικρών ετερόδιπλων αγκυλών ενός ή περισσότερων νουκλεοτιδίων είτε στη μητρική είτε στη νέα άλυσο (15). Τα σημεία αυτά φυσιολογικά αποτελούν στόχους των συστημάτων επιδιόρθωσης του γενώματος και συγκεκριμένα του MMR (mismatch repair system). Ελαττωματική όμως λειτουργία των συστημάτων αυτών, εξαιτίας είτε ενδογενών είτε εξωγενών παραγόντων, έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση αλλαγών στο μήκος του μικροδορυφορικού DNA έτσι ώστε τα δύο αλληλόμορφα να εμφανίσουν τελικά διαφορετικά μεγέθη. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται αστάθεια μικροδορυφορικού DNA (MI). Έχει βρεθεί ότι τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από τη δημιουργία τέτοιων νέων μεταλλαγμένων αλληλόμορφων, που απουσιάζουν από τον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό (15).

Το φαινόμενο της αστάθειας του μικροδορυφορικού DNA συσχετίστηκε για πρώτη φορά, με λάθη αντιγραφής στον κληρονομικό μη πολυποσικό καρκίνο του παχέος εντέρου (hereditary non polyposis colorectal cancer) και αργότερα με αύξηση της μετελλαξιογένεσης και σε άλλους καρκίνους όπως του πνεύμονα, του γαστρεντερικού, του ενδομητρίου, των ωοθηκών, του στήθους, του προστάτη, της ουροδόχου κύστης, της κεφαλής και του αυχένα, και του μελανώματος (16-20).

Έχουν ήδη μελετηθεί αρκετές χρωμοσωμικές γενετικές αλλαγές σχετικά με τον καρκίνο του πνεύμονα στον άνθρωπο. Η έλλειψη της ετεροζυγωτίας στο χρωμόσωμα 8p είναι μια πρόσφατη ανακάλυψη στον καρκίνο του πνεύμονα. Άλλες περιοχές όπου συχνά συμβαίνουν αλλαγές στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων είναι αυτές των χρωμοσωμάτων 1p, 3p, 5p, 9p, 13p, 17p, και 17q.

Εκτός όμως από τα παραπάνω νοσήματα, αυξημένη επίπτωση MI διαπιστώθηκε και σε καλοήθη νοσήματα όπως η αθηρωμάτωση, το πτερύγιο του οφθαλμού, τους εμβρυϊκούς ιστούς αυτόματων αποβολών, τη χορεία του Huntington και το σύνδρομο του εύθραυστου X χρωμοσώματος (5,6,21-23). Πρόσφατες μελέτες άλλωστε του τμήματος μας ανέδειξαν την ύπαρξη MI σε ασθενείς τόσο με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια όσο και με χρόνια βρογχικό άσθμα (8,24-26). Άλλα πνευμονικά νοσήματα που εμφανίζουν MI είναι η σαρκοείδωση και η πνευμονική ίνωση (8,9).

## **Βιβλιογραφία**

1. Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of terinoblastoma. Proc Natl Acad Sci USA. 1971;68:820-823
2. Loeb LA, Christian FC. Multiple mutations in human cancers. Mutation Res. 1996;350:279-286
3. Rehman I, Quinn AG, Healy E, Rees JL. High frequency of loss of heterozygosity in actinic keratosis, a usually benign disease. Lancet 1994;344:788-789
4. Kushida Y, Miki H, Ohmori M. Los of heterozygosity in actinic keratosis, squamous cell carcinoma and sun-exposed normal skin in Japanese: difference between Japanese and Caucasians. Cancer Letters 1999;140:169-175
5. Detorakis ET, Sourvinos G, Tsampralakis J, Spandidos DA. Evaluation of loss of heterozygosity and microsatellite instability in human pterygium: clinical correlationa. Br J Ophthalmol. 1998;82:1324-1328
6. Hatzistamou J, Kiaris H, Ergazaki M, Spandidos DA. Loss of heterozygosity and microsatellite instability in human atherosclerotic plaques. Biochem Biophys Res Commun 1996;225:186-190
7. Vassilakis DA, Sourvinos G, Markatos M, Psathakis K, Spandidos DA, Siafakas NM, Bouros D. Microsatellite DNA instability and loss of heterozygosity in pulmonary sarcoidosis. Am J Respir Crit Care Med 1999;160:1729-1733
8. Paraskakis E, Sourvinos G, Passam F, et al. Microsatellite DNA instability and loss of heterozygosity in bronchial asthma. Eur Respir J 2003;22:951-955
9. Vassilakis DA, Sourvinos G, Spandidos DA, Siafakas NM, Bouros D. Frequent genetic alterations at the microsatellite level in cytologic sputum samples of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 2000;162:1115-1119
10. The BT, Larsson C, Nordenskjold M. Tumor suppressor genes (TSG). Anticancer Res 1999;19:4715-4728
11. Spandidos DA. A unified theory for the development of cancer. Biosci Rep 1986;6:691-708

12. Weber JL, May PE. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 1989;4:388-396
13. Radman M, Wagner R. Mismatch recognition in chromosomal interactions and speciation. *Chromosoma* 1993;102:369-373
14. Schlotterer C, Tautz D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res* 1992;20:211-215
15. Feider A, Fink D. Mutations in DNA mismatch repair genes: implications for DNA damage signaling and drug sensitivity. *Int J Oncol* 2004;24:1039-1047
16. Parsons R, Li GM, Longley MJ, Fang WH, Papadopoulos N, Jen J, de la Chapelle A, Kinzler KW, Vogelstein B, Modrich P. Hypermutable and mismatch repair deficiency in RER+ tumor cells. *Cell* 1993;75:1227-1236
17. Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, Jarvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993;260:812-816
18. Yee CJ, Roodi N, Verrier CS, Parl FF. Microsatellite instability and loss of heterozygosity in breast cancer. *Cancer Res* 1994;54:1641-1644
19. Ιωνω Y, Πειναδο MA, Μαλκησουαν Σ, Σηβατα Δ, Περθηο M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for clonal carcinogenesis. *Nature* 1993;363:558-561
20. Froudarakis ME, Sourvinos G, Fournel P, Bouros D, Vergnon JM, Spandidos DA, Siafakas NM. Microsatellite instability and loss of heterozygosity at chromosomes 9 and 17 in non-small cell lung cancer. *Chwst* 1998;113:1091-1094
21. Kiaris H, Koumantakis E, Ergazaki M, Spandidos DA. Microsatellite instability in aborted embryos. *Mol Hum Reprod* 1996;2:72-74
22. Snell RG, MacMillan JC, Chaedle JP, Fenton I, Lazarou LP, Davies P, MacDonald ME, Gusela JF, Harper PS, Shaw DJ. Relationship between trinucleotide repeat expansion and phenotypic variation in Huntington's disease. *Nat Genet* 1993;4:393-397
23. Yu S, Pritchard M, Kremer E, Lynch M, Nancarrow J, Baker E, Holman K, Mulley JC, Warren ST, Schlessinger D, et al. Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA. *Science* 1991;252:1179-1181

24. Samara K, Zervou M, Siafakas NM, Tzortzaki EG. Microsatellite DNA instability in benign lung diseases. *Respir Med* 2006;100:202-211
25. Siafakas NM, Tzortzaki EG, Sourvinos G, Bouros D, Tzanakis N, Kafatos A, Spandidos D. Microsatellite DNA instability in COPD. *Chest* 1999;116:47-51
26. Zervou MI, Tzortzaki EG, Makris D, Gaga M, Zervas E, Economidou E, Tsoumakidou M, Tzanakis N, Milic-Emilic J, Siafakas NM. Differences in Microsatellite DNA level between Asthma and COPD. *Eur Respir J* 2006;28:472-478

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## Κεφάλαιο 1

Οι κακοήθεις πλευριτικές συλλογές δημιουργούνται λόγω της απευθείας διασποράς των καρκινικών κυττάρων στην υπεζωκοτική κοιλότητα, μηχανισμός ο οποίος δεν είναι πλήρως κατανοητός. Η αυξημένη διαπερατότητα των αγγείων παίζει σημαντικό ρόλο στην δημιουργία των εξιδρωματικών πλευριτικών συλλογών. Όμως, ο ρόλος της αγγειογένεσης στην παθογένεια των πλευριτικών συλλογών δεν έχει μελετηθεί επαρκώς. Αγγειογενετικές κυτταροκίνες, όπως ο VEGF, έχει φανεί ότι κατέχουν θέσεις κλειδιά στην παθογένεια των κακοηθών πλευριτικών συλλογών, παρόλα αυτά η έκφραση του VEGF μοιράζεται μεταξύ των καλοηθών και κακοηθών πλευριτικών συλλογών .

Η μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων και η δημιουργία μεταστάσεων φαίνεται να έχει πολλές ομοιότητες με την μετανάστευση των λευκοκυττάρων, η οποία ρυθμίζεται από διάφορες κυτταροκίνες και τους υποδοχείς τους. Τον τελευταίο καιρό το ενδιαφέρον εστιάζεται σε μία συγκεκριμένη οικογένεια υποδοχέων κυτταροκινών που καλούνται CXCR4 και έχει βρεθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην λοίμωξη από HIV. Ο stromal-cell derived factor-1α (SDF-1α/CXCL12) είναι μέλος της οικογένειας των CXC κυτταροκινών και έχει βρεθεί ότι δρα ως χημειοτακτικός παράγοντας για CD34+ αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα, μεγακαρυωκύτταρα, Β κύτταρα και Τ κύτταρα. Ο SDF-1α/CXCL12 εκφράζεται πάνω σε συγκεκριμένους ιστούς. Αν και οι περισσότεροι υποδοχείς κυτταροκινών συνδέονται με αρκετές κυτταροκίνες, ο CXCR4 είναι ειδικός υποδοχέας, διότι αλληλεπιδρά μόνο με το SDF-1α. Η εμπλοκή των CXCR4 και SDF-1α στην διαδικασία αυτή, κάνει το ζεύγος κυτταροκίνη-υποδοχέα σημαντικού ενδιαφέροντος στην δημιουργία των μεταστάσεων. Το τελευταίο διάστημα, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η τάση της δημιουργίας μεταστάσεων από διαφορετικούς τύπους καρκίνου, πνεύμονα, μαστού, ωοθηκών, νεφρών και προστάτη, σχετίζεται με την έκφραση του CXCR4. Επίσης έχει βρεθεί ότι στο μη μικροκυττατικό καρκίνο του πνεύμονα καθώς και στο καρκίνο του μαστού η σύνδεση του CXCR4 με το CXCL12 παρουσιάζει μέγιστα επίπεδα έκφρασης στα όργανα που μεθίστανται.

Προκειμένου να κατανοήσουμε την διαδικασία της δημιουργίας των κακοηθών πλευριτικών συλλογών ώστε να βρούμε νέες αποτελεσματικές θεραπείες γι' αυτές , θα πρέπει πρώτα να καταλάβουμε τον μοριακό μηχανισμό που εμπλέκεται στη διασπορά των καρκινικών κυττάρων.



## **A. Το αγγειογενετικό μόριο Tie-2 και ο αγγειακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) στην παθολογία των πλευριτικών συλλογών**

### **Ασθενείς και Μέθοδος**

Από τον Ιανουάριο του 2004 ως τον Αύγουστο το 2005, μελετήθηκαν προοπτικά 67 ασθενείς με πλευριτική συλλογή. Τα πλευριτικά υγρά χαρακτηρίστηκαν ως διδρώματα ή εξιδρώματα σύμφωνα με τα κριτήρια του Light. Διδρωματική χαρακτηρίστηκε η συλλογή που οφειλόταν σε καρδιακή ανεπάρκεια, ο ασθενής εμφάνιζε σημεία και συμπτώματα δεξιάς καρδιακής ανεπάρκειας επιβεβαιωμένη με υπέρηχο καρδιάς και που ανταποκρινόταν καλά σε αγωγή με διουρητικά. Κακοήθης χαρακτηρίστηκε η συλλογή στην κυτταρολογική εξέταση της οποίας βρέθηκαν καρκινικά κύτταρα, ή η ταχέως αναπαραγώμενη και εμμένουσα συλλογή σε ασθενείς με γνωστή κακοήθεια ή τέλος όταν κάθε άλλη αιτία συλλογής είχε αποκλεισθεί. Παραπνευμονική συλλογή χαρακτηρίστηκε η συλλογή που σχετιζόταν με πνευμονία. Στις παραπνευμονικές συλλογές συμπεριλήφθησαν και τα εμπύματα. Φυματιώδης χαρακτηρίστηκε η πλευριτική συλλογή στις περιπτώσεις εκείνες που βρέθηκαν Mycobacteria Tuberculosis στο πλευριτικό υγρό, τα πτύελα, στο BALF ή στη βιοψία του υπεζωκότα. Τέλος αδιάγνωστη χαρακτηρίστηκε η συλλογή στην οποία δεν καταφέραμε να βάλουμε διάγνωση ούτε μετά από ανοιχτή βιοψία υπεζωκότα.

Η λήψη του πλευριτικού υγρού έγινε με θωρακέντηση και τα δείγματα του υγρού καθώς και του αίματος συλλέχθησαν σε αποστειρωμένα μπουκαλάκια. Ακολούθως φυγοκεντρήθηκαν στις 1500 στροφές για 10 λεπτά και σε θερμοκρασία  $-4^{\circ}\text{C}$ . Ο ορός του αίματος και το υπερκείμενο του πλευριτικού υγρού αποθηκεύτηκε στους  $-80^{\circ}\text{C}$ . Μετρήθηκαν και καταγράφηκαν οι τιμές στο πλευριτικό υγρό και στον ορό του αίματος των: ολικών λευκωμάτων (TP), γαλακτικής δευδρογονάσης (LDH), γλυκόζης (GLU) και στο πλευριτικό υγρό του pH, των ολικών κυττάρων και του τύπου των κυττάρων.

Τα επίπεδα των αγγειογενετικών παραγόντων vascular endothelial growth factor (VEGF) και ο fibroblast growth factor (bFGF), Tie-2 στο πλευριτικό υγρό και στον ορό του

αίματος μερτήθηκαν με τη μέθοδο enzyme-linked immunosorbent assay (R&D Systems, Minneapolis, MN). Μετά την καθιερωμένη προεργασία τα ελεύθερα κυττάρων δείγματα τοποθετήθηκαν με πιπέτα στα πηγαδάκια, ακολούθως προστέθηκαν ειδικά πολυκλωνικά αντισώματα και καθορίστηκαν τα ανοσοενεργά επίπεδα των VEGF, bFGF, Tie-2. Τιμές κάτω από το ανιχνεύσιμο επίπεδο δόθηκαν ως μηδενικές.

### **Στατιστική ανάλυση**

Οι τιμές αναφέρονται ως διάμεσες (interquartile range [QR]) για τις μη φυσιολογικές μεταβλητές και ως μέσες (SD) για τις φυσιολογικές μεταβλητές. Mann-Whitney, Kruskal-Wallis και Wilcoxon δοκιμασίες χρησιμοποιήθηκαν για την ανεύρεση διαφορών μεταξύ των διαφορετικών ομάδων. Δοκιμασία Spearman χρησιμοποιήθηκε για τους συσχετισμούς μεταξύ των διαφόρων μεταβλητών. Τιμές κάτω από το ανιχνεύσιμο όριο, μετρήθηκαν ως μηδέν, για τη στατιστική ανάλυση. Τέλος, για τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε ένα software πακέτο SPSS, έκδοση 11.0, SPSS inc., Chicago, IL.

### **Αποτελέσματα**

#### **Χαρακτηριστικά των ασθενών**

Εξήντα επτά ασθενείς, 41 άνδρες και 26 γυναίκες συμπεριλήφθησαν στη μελέτη. Η μεση ηλικία τους ήταν 73.5 έτη (QR, 20-95 έτη). Δεκαεπτά είχαν διδρωματική πλευριτική συλλογή (οφειλόμενη σε καρδιακή ανεπάρκεια) και 50 ασθενείς είχαν εξιδρωματική συλλογή διαφορετικών αιτιών: 22 κακοήθεις (12 λόγω καρκίνου πνεύμονα, και 10 μεταστατικών κακοηθειών), 15 φλεγμονώδεις (12 παραπνευμονικές και 3 φυματιώδεις) και 13 αδιάγνωστες εξιδρωματικές συλλογές. Οι παράγοντες VEGF, bFGF και Tie-2 μετρήθηκαν σε 66, 66 και 62 ασθενείς αντίστοιχα.

#### **Επίπεδα του VEGF σε ασθενείς με πλευριτική συλλογή**

Τα επίπεδα του VEGF στο πλευριτικό υγρό και στον ορό του αίματος βρέθηκαν υψηλότερα στα εξιδρώματα ( $p < 0.001$  και  $p < 0.05$  αντίστοιχα) σε σχέση με τα

διδρώματα (Πίνακας 1). Δε βρέθηκαν διαφορές στα επίπεδα του VEGF τόσο στα πλευριτικά υγρά όσο και στο αίμα της φλεγμονώδους και κακοήθους αιτιολογίας. Στα διδρώματα, τα επίπεδα του VEGF στο πλευριτικό υγρό ήταν σημαντικά χαμηλότερα από αυτά του αίματος ( $p=0.02$ ) (Πίνακας 1). Τα επίπεδα του VEGF στο πλευριτικό υγρό ήταν σημαντικά υψηλότερα στις κακοήθεις από ότι στις φλεγμονώδεις και αδιάγνωστες πλευριτικές συλλογές ( $p=0.03$ ) ( Πίνακας 2) Το VEGF πλευριτικού υγρού/ VEGF αίματος είχε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το LDH πλευριτικού υγρού/LDH αίματος ( $r=0.449$ ,  $p=0.0001$ ) (Σχήμα 1) και το Total protein πλευριτικού υγρού /Total Protein αίματος ( $r=0.361$ , $p=0.003$ ) (Σχήμα 2).

### **Επίπεδα του bFGF σε ασθενείς με πλευριτική συλλογή**

Δεν βρέθηκε καμία διαφορά στα επίπεδα του bFGF στα πλευριτικά υγρά και στο αίμα μεταξύ των ασθενών με διδρωματικές και εξιδρωματικές πλευριτικές συλλογές ( $p>0.05$ ) (Πίνακας 1). Στα εξιδρώματα, τα επίπεδα του bFGF στο πλευριτικό υγρό ήταν σημαντικά υψηλότερα από τα αντίστοιχα του αίματος ( $p<0.0001$ ) (Πίνακας 1). Δεν βρέθηκαν διαφορές στα επίπεδα του bFGF τόσο στο πλευριτικό υγρό όσο και στο αίμα μεταξύ ασθενών με φλεγμονώδεις και κακοήθεις πλευριτικές συλλογές. Δεν βρέθηκαν διαφορές στα επίπεδα του bFGF στο πλευριτικό υγρό και στο αίμα μεταξύ των διαφορετικών αιτιών εξιδρωματικών συλλογών (κακοηθών, φλεγμονωδών και αδιάγνωστων ) (Πίνακας 3). Καμία τέλος συσχέτιση δεν βρέθηκε μεταξύ των επιπέδων του bFGF και των LDH ratio και total protein ratio.

### **Επίπεδα του Tie-2 σε ασθενείς με πλευριτική συλλογή**

Τα επίπεδα του Tie-2 στο πλευριτικό υγρό και στο αίμα δεν διέφεραν ( $p>0.05$ ) μεταξύ ασθενών με διδρωματικές και εξιδρωματικές πλευριτικές συλλογές (Πίνακας 1). Τόσο στις διδρωματικές όσο και στις εξιδρωματικές πλευριτικές συλλογές δεν υπήρξε διαφορά μεταξύ των επιπέδων του Tie-2 στο πλευριτικό υγρό και το αίμα ( $p>0.05$ ) (Πίνακας 1). Τα επίπεδα του Tie-2 στο πλευριτικό υγρό και στο αίμα δεν διέφεραν

μεταξύ των διαφόρων εξιδρωμάτων (κακοηθών, φλεγμονωδών και αδιάγνωστων) (Πίνακας 4). Τέλος δεν βρέθηκαν σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των επιπέδων του Tie-2 και των χημικών και αιματολογικών παραμέτρων των πλευριτικών υγρών και του αίματος.

**Πίνακας 1:** Επίπεδα των VEGF, bFGF και Tie-2 στα πλευριτικά υγρά και τους ορούς του αίματος ασθενών με διδρωματικές και εξιδρωματικές πλευριτικές συλλογές\*

	Εξιδρώματα		Διδρώματα	p †
VEGF pg/mL	PF	534(36-4867)	86(25-4867)	<0.001
	Serum	616(81- 13575)	285 (10592.63-60.1)	<0.05
p ††	NS		p=0.02	
bFGF pg/mL	PF	3.8 (1.9-16.4)	3. 1(1.7-7.7)	NS
	Serum	2.1(0.2-16.6)	1.9(4.3-0.3)	NS
p ††	p<0.0001		p=0.06	
Tie-2 pg/mL	PF	0.6 (0.2-3.6)	0.5(0.2-4.1)	NS
	Serum	1 (0.1-30.5)	0.3 (0.2-5.4)	NS
p ††	NS		NS	

\*Οι ανωτέρω τιμές είναι οι μέσες (IQR)

† Αναφέρονται στη διαφορά των επιπέδων στο πλευριτικό υγρό ή στον ορό του αίματος μεταξύ εξιδρωμάτων και διδρωμάτων.

†† Αναφέρονται στη διαφορά των επιπέδων των αυξητικών παραγόντων μεταξύ πλευριτικού υγρού και ορού αίματος

NS = non-significant (μη σημαντική στατιστικά διαφορά)

**Πίνακας 2:** Επίπεδα του VEGF στο πλευριτικό υγρό και τον ορό του αίματος ασθενών με διάφορων αιτιολογιών πλευριτικές συλλογές

VEGF Levels pg/ml			
	Πλευριτικό Υγρό	Ορός Αίματος	P value†
Κακοήθεις	657(116-4870)	571(121-13575)	NS
Φλεγμονώδεις	590(66-4560)	1114(125-9759)	NS
Αδιάγνωστα εξιδρώματα	116(36-2714)	527(81-2944)	NS
p value‡	0.03	NS	

\* οι ανωτέρω τιμές είναι οι μέσες (IQR)

† Αναφέρονται στις διαφορές μεταξύ των επιπέδων του VEGF στο πλευριτικό υγρό και τον ορό του αίματος.

‡ Αναφέρονται στις διαφορές μεταξύ ασθενών με πλευριτικές συλλογές διαφορετικής αιτιολογίας (Kruskal-Wallis test).

NS = non-significant (μη σημαντική στατιστικά διαφορά)

**Πίνακας 3: Επίπεδα του bFGF στο πλευριτικό υγρό και τον ορό του αίματος ασθενών με διαφόρων αιτιολογιών πλευριτικές συλλογές**

bFGF Levels pg/ml			
	Πλευριτικό Υγρό	Ορός Αίματος	P value†
Κακοήθεις	4.8210 (1.640-1.94)	1.626 (16.6-0.2)	<0.05
Φλεγμονώδεις	4.8920 (13.87-2.18)	3.137 (5.5-0.9)	<0.05
Αδιάγνωστα εξιδρώματα	3.1280 (8.91-1.89)	1.716 (7.5-0.6)	<0.05
p value‡	NS	NS	

\* οι ανωτέρω τιμές είναι οι μέσες (IQR)

† Αναφέρονται στις διαφορές μεταξύ των επιπέδων του bFGF στο πλευριτικό υγρό και τον ορό του αίματος.

‡ Αναφέρονται στις διαφορές μεταξύ ασθενών με πλευριτικές συλλογές διαφορετικής αιτιολογίας (Kruskal-Wallis test).

NS = non-significant (μη σημαντική στατιστικά διαφορά)

**Πίνακας 4: Επίπεδα του Tie-2 στο πλευριτικό υγρό και τον ορό του αίματος ασθενών με διαφόρων αιτιολογιών πλευριτικές συλλογές**

Tie-2 Levels pg/ml			
	Πλευριτικό Υγρό	Ορός Αίματος	P value†
Κακοήθειες	0.74(0.2-3.5)	0.44(0.1-7.5)	NS
Φλεγμονώδεις	0.58(0.3-1.7)	1.42(0.2-4.8)	NS
Αδιάγνωστα εξιδρώματα	0.46(0.3-1.4)	0.49(0.1-30.5)	NS
p value‡	NS	NS	

\* οι ανωτέρω τιμές είναι οι μέσες (IQR)

† Αναφέρονται στις διαφορές μεταξύ των επιπέδων του Tie-2 στο πλευριτικό υγρό και τον ορό του αίματος.

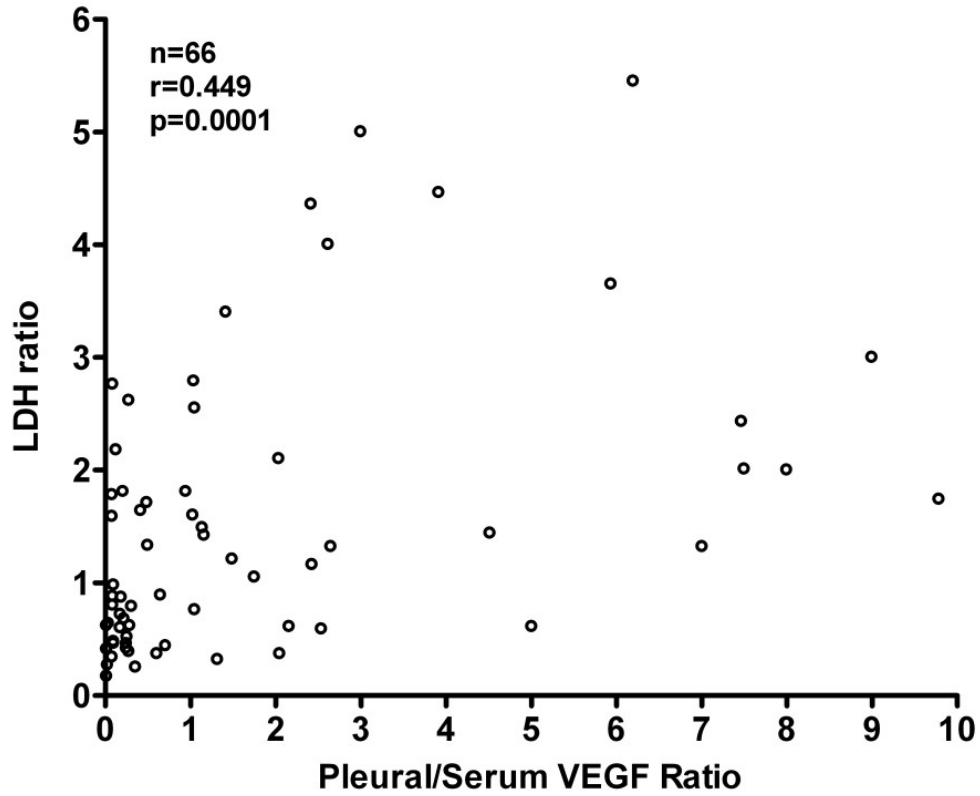
‡ Αναφέρονται στις διαφορές μεταξύ ασθενών με πλευριτικές συλλογές διαφορετικής αιτιολογίας (Kruskal-Wallis test).

NS = non-significant (μη σημαντική στατιστικά διαφορά)

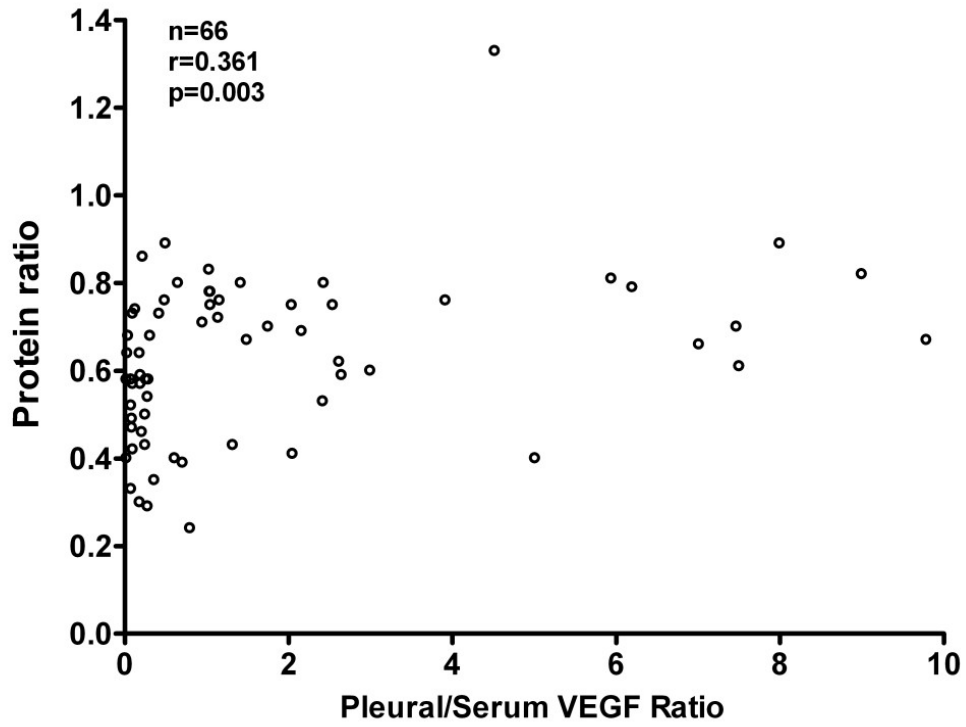


### Σχήματα

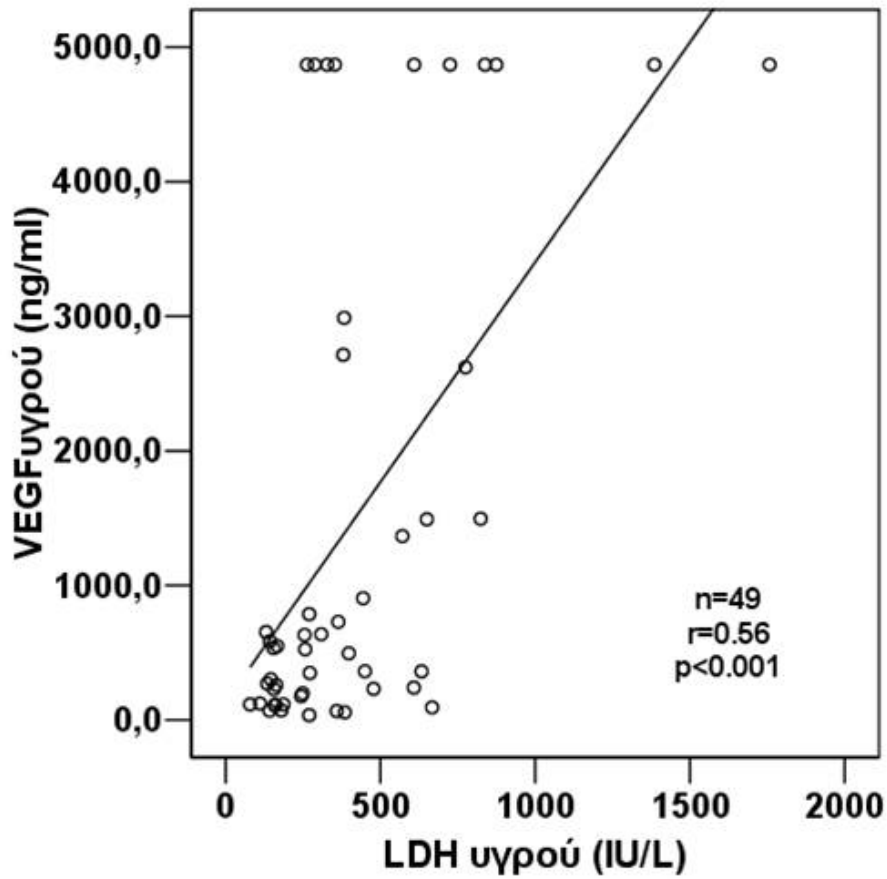
Σχήμα 1: Σχηματική απεικόνιση της σχέσης του VEGF στο πλευριτικό υγρό και στον ορό του αίματος και της LDH αντίστοιχα



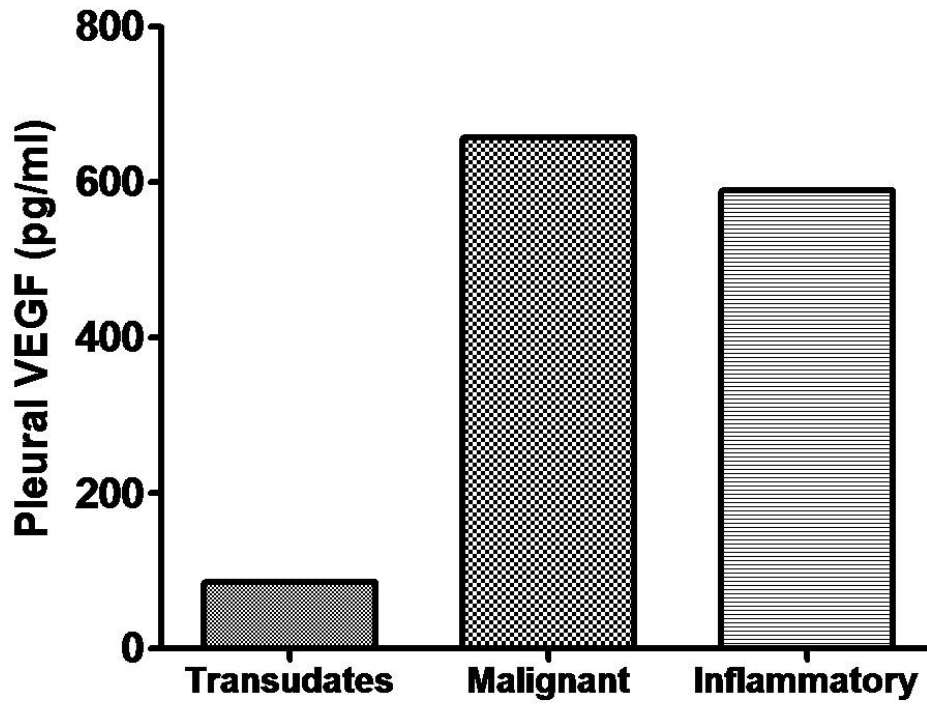
**Σχήμα 2:** Σχηματική απεικόνιση της σχέσης του VEGF στο πλευριτικό υγρό και στον ορό του αίματος και της ολικής πρωτεΐνης αντίστοιχα



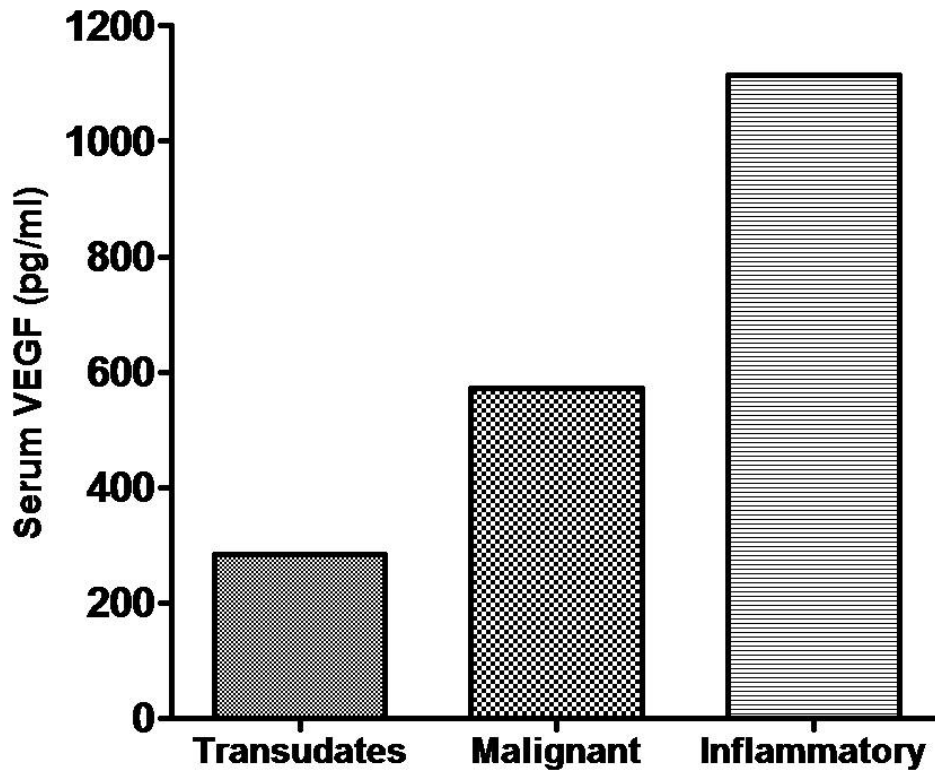
**Σχήμα 3:** Σχηματική απεικόνιση της σχέσης του VEGF και της LDH του πλευριτικού υγρού



**Σχήμα 4:** Σχηματική απεικόνιση του VEGF στις ομάδες των πλευριτικών υγρών (διυδρώματα-ομάδα ελέγχου, κακοήθη και φλεγμονώδη)



Σχήμα 5:



## Συζήτηση

Οι πλευριτικές συλλογές είναι ένα σύνηθες εύρημα στην κλινική πράξη. Η αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων και η διαφυγή του υγρού παίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία των εξιδρωματικών πλευριτικών συλλογών (1). Όμως, ο ρόλος της αγγειογένεσης στην παθογένεια των πλευριτικών συλλογών δεν είναι διευκρινισμένος. Η αγγειογένεση ελέγχεται από την ισορροπία μεταξύ θετικών και αρνητικών ρυθμιστικών παραγόντων οι οποίοι δρώντας μέσω διαφόρων οδών έχουν ως αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων σε ένα λειτουργικό δίκτυο αγγειακών καναλιών (2,3). Αυτοί οι ρυθμιστικοί παράγοντες έχουν συγκεκριμένη αγγειογενετική επίδραση και ο συντονισμός τους είναι σημαντικός για την ανάπτυξη των αγγείων. Αγγειογενετικές κυταροκίνες όπως ο vascular endothelial growth factor (VEGF) και ο fibroblast growth factor (bFGF) ευθύνονται για τη δημιουργία της πλευριτικής συλλογής διότι εμπλέκονται στη νεοαγγειογένεση, στην αγγειακή διαπερατότητα και την αιμορραγία τόσο στη διαδικασία της φλεγμονής όσο και σε αυτή της ογκογένεσης (2-7). Έτσι, η έκφραση των αγγειογενετικών παραγόντων μπορεί να αποτελέσει ένα χρήσιμο δείκτη για τη διάγνωση και την έκβαση της νόσου.

Έχει αναφερθεί ήδη ότι ο VEGF παίζει ένα σημαντικό ρόλο στη δημιουργία συγκεκριμένων πλευριτικών συλλογών (6,8-11). Αρκετές πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα επίπεδα του VEGF είναι σημαντικά υψηλότερα στα εξιδρώματα συγκριτικά με τα διυδώματα (12-14). Επίσης, πλευριτικές συλλογές που σχετίζονται με κακοήθειες φαίνεται να έχουν υψηλότερα επίπεδα VEGF σε σχέση με άλλες (8,9,13,15,17-19). Υποστηρίζεται ότι τα αυξημένα επίπεδα του VEGF στις κακοήθειες πλευριτικές συλλογές αυξάνουν τη διαπερατότητα των αγγείων και οδηγούν στη συσσώρευση του πλευριτικού υγρού (9,16). Παρά τη σημαντική διαφορά στα επίπεδα του VEGF στο πλευριτικό υγρό μεταξύ κακοηθών και καλοηθών πλευριτικών συλλογών, υπάρχει σημαντική αλληλεπικάλυψη, που καθιστά τον VEGF μη χρήσιμο διαγνωστικά από μόνο του δείκτη (20).

Πρόσφατα ένας ενδοθηλιακός ειδικός κυτταρικός υποδοχέας της τυροσινικής κινάσης (Tie-2) και τα συνδεδετικά του μόρια angiopoietin-1 (Ang-1) και angiopoietin-2 (Ang-2) έχει φανεί ότι συμμετέχουν στην αγγειογένεση (20-23). Συγκεκριμένα, η Ang-2 δρα ως

ένα εναλλακτικό συνδετικό μόριο του Tie-2, συνδέεται με το Tie-2, αλλά ανταγωνίζεται τη δράση της Ang-1 μπλοκάροντας τη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση του Tie-2 (20,21). Μελέτες σε ποντίκια που υπερέκφραζαν την Ang-2 έδειξαν ότι τα ποντίκια αυτά είχαν τα ίδια προβλήματα με τα ποντίκια που είχαν έλλειψη της Ang-1 ή του Tie-2, γεγονός που δείχνει ότι η Ang-2 δρα σαν ένας φυσικός ανταγωνιστής της δράσης Ang-1/Tie-2 (20-23). Σε συνέχεια αυτής της αντίληψης, πρόσφατα δημοσιεύτηκε ότι τα επίπεδα της Ang-2 αλλά όχι της Ang-1 είναι αυξημένα στα εξιδρώματα, δείχνοντας ότι η Ang-2 μαζί με τον VEGF συμμετέχουν στην υπεζωκοτική φλεγμονή και στη παθογένεια των εξιδρωματικών πλευριτικών συλλογών (17). Από την άλλη πλευρά, υποστηρίζεται ότι η Ang-2 μπορεί να παίζει απευθείας ρόλο στη διέγερση του υποδοχέα του Tie-2 προκαλώντας την *in vitro* αγγειογένεση (24). Τα δεδομένα αυτά μας δείχνουν ότι ο ρόλος της Ang-2 είναι περισσότερο πολύπλοκος και ακόμη αδιευκρίνιστος.

Για την καλύτερη γνώση του θέματος, σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να καθορίσει τα επίπεδα των VEGF, bFGF και Tie-2 στα πλευριτικά υγρά σε σχέση με τον ορό του αίματος των ασθενών με πλευριτική συλλογή, αποτιμώντας έτσι τη διαδικασία ενεργοποίησης του VEGF μέσω του υποδοχέα των αγγειοποετινών Tie-2. Και τα σημαντικότερα ευρήματά μας ήταν: **1.** Τα επίπεδα του VEGF αλλά όχι του bFGF και του Tie-2 βρέθηκαν σημαντικά πιο αυξημένα στα εξιδρώματα παρότι στα διδρώματα, **2.** Τα επίπεδα του Tie-2 στα πλευριτικά υγρά δεν διέφεραν μεταξύ κακοηθών και φλεγμονωδών πλευριτικών υγρών ούτε μεταξύ εξιδρωμάτων και διδρωμάτων και **3.** Το VEGF ratio συσχετιζόταν με το LDH ratio και το total protein ratio.

Η μελέτη αυτή επιβεβαιώνει ότι ο VEGF, που έχει αγγειογενετικές, μιτογενετικές και ιδιότητες που αυξάνουν την διαπερατότητα των αγγείων, συμμετέχει και στη παθογένεια των εξιδρωματικών πλευριτικών συλλογών διαφόρων αιτιών. Σε συμφωνία με τα δεδομένα που έχουν ήδη δημοσιευτεί (12-14,17), βρήκαμε τα επίπεδα του VEGF σημαντικά υψηλότερα στα εξιδρώματα σε σχέση με τα διδρώματα. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα υψηλά επίπεδα του VEGF σε εξιδρωματικές φλεγμονώδεις και νεοπλασματικές πλευριτικές συλλογές παίζουν ρόλο στη παθογένεια των συλλογών αυτών (12,15,28). Εμείς βρήκαμε επίσης υψηλά επίπεδα VEGF στις κακοήθειες και

παραπνευμονικές πλευριτικές συλλογές. Επιπροσθέτως, τα επίπεδα του VEGF συσχετίστηκαν με δείκτες που αυξάνουν την διαπερατότητα των αγγείων, όπως το LDH ratio και το protein ratio και τα αποτελέσματα αυτά ήταν σύμφωνα με αυτά μιας πρόσφατης μελέτης (17).

Το καινούργιο δεδομένο που προέκυψε από την παρούσα μελέτη είναι ότι τα επίπεδα του Tie-2 τόσο στο πλευριτικό υγρό όσο και στη συστηματική κυκλοφορία δε φάνηκε να διαφέρουν μεταξύ εξιδρωμάτων και διδρωμάτων. Αυτό το δεδομένο, στηρίζει τα δεδομένα πρόσφατης μελέτης που έδειξε ότι τα επίπεδα της Ang-2 αλλά όχι αυτά της Ang-1 βρέθηκαν αυξημένα στα εξιδρώματα (17). Η αγγειογένεση είναι μια αρκετά πολύπλοκη διαδικασία η οποία ρυθμίζεται από πολλούς παράγοντες. Ο VEGF και οι αγγειοποιετίνες φαίνεται ότι είναι οι σημαντικότεροι αγγειογενετικοί παράγοντες. Οι Ang-1 και Ang-2 θεωρούνται ως σημαντικότεροι παράγοντες της νεοαγγειογένεσης και είναι ενεργοποιητές και ανταγωνιστές του υποδοχέα του Tie-2. Η σύνδεση με την Ang-1 προκαλεί την αυτοφωσφορυλίωση του Tie-2 ενώ η σύνδεση με την Ang-2 καταστέλλει την αυτοφωσφορυλίωση (20-22,29). Αν και ο ακριβής ρόλος των angiopoietins/Tie-2 παραμένει αινιγματικός, υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν ότι το σύστημα αυτό με την παρουσία του VEGF παίζει σημαντικό ρόλο στην έναρξη της αγγειογένεσης και την εξάπλωση των αγγείων στους όγκους (2,3,8,9,29). Υποστηρίζοντας την άποψη αυτή, έχει δημοσιευθεί ότι το σύστημα VEGF και angiopoietins/Tie-2 παίζει καθοριστικό ρόλο στη μετατροπή του φυσιολογικού πνευμονικού παρεγχύματος σε μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (30-32). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η έκφραση της οδού angiopoietins/Tie-2 δεν βρίσκεται μόνο στους φυσιολογικούς ιστούς αλλά και σε κακοήθεις ιστούς (30-32). Από την άλλη πλευρά, μέσω ανοσοιστοχημείας ο Peter και οι συνεργάτες του βρήκαν μια αυξημένη έκφραση του Tie-2 στα αγγεία του καρκίνου του πνεύμονα (33). Η ισορροπία μεταξύ VEGF και angiopoietins/Tie-2 έχει μελετηθεί πολλαπλώς με διαφορετικά αποτελέσματα (24,33-35). Οι διαφορές αυτές μπορεί να οφείλονται στις διαφορετικές μεθόδους που χρησιμοποιεί η κάθε ομάδα ερευνητών. Στη δική μας μελέτη δεν βρήκαμε ένα διαφορετικό ρόλο του Tie-2 στις διάφορες πλευριτικές συλλογές. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι ίσως ο Tie-2 δε λειτουργεί μέσω του VEGF στην υπεζωκοτική φλεγμονή και τη δημιουργία εξιδρωματικής πλευριτικής συλλογής.



Επίσης στην παρούσα μελέτη δε βρήκαμε διαφορές στα επίπεδα του bFGF μεταξύ εξιδρωμάτων και διδρωμάτων. Δύο άλλες πρόσφατες μελέτες όμως δημοσίευσαν αντίθετα αποτελέσματα σχετικά με την εμπλοκή του bFGF στις πλευριτικές συλλογές (7,36). Η πιο πρόσφατη από αυτές έδειξε μειωμένη έκφραση των bFGF και IL-8 σε πλευριτικές συλλογές από καρκίνο του μαστού και έκφραση του VEGF (36). Τα αποτελέσματα της δικής μελέτης είναι σύμφωνα με την ανωτέρω μελέτη.

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη επιβεβαιώνει ότι ο VEGF αυξάνεται στις εξιδρωματικές συλλογές οποιασδήποτε αιτιολογίας. Από την άλλη πλευρά, βρήκαμε ότι αυτό το αποτέλεσμα δεν σχετίζεται με την οδό angiopoietins/Tie-2 καθώς δε βρήκαμε καμία διαφορά στα επίπεδα του Tie-2. Όμως, οι μετρήσεις των επιπέδων των αγγειογενετικών παραγόντων στο πλευριτικό υγρό δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για διαγνωστικούς σκοπούς. Μπορούμε όμως να υποστηρίξουμε ότι τα αποτελέσματά μας παρέχουν κάποιες πρώτες ενδείξεις προς την παθογένεια και τη θεραπεία των πλευριτικών συλλογών. Το επόμενο βήμα μας είναι να επιβεβαιώσουμε τα αποτελέσματα μας αυτά χρησιμοποιώντας πιο ποσοτικές μεθόδους όπως reserve transcription-polymerase chain reaction (Real Time RT-PCR) και in situ hybridization (ISH). Τελικά, τα αποτελέσματα μας υποστηρίζουν ότι ο VEGF κατέχει ένα σημαντικό ρόλο στη παθογένεια των εξιδρωματικών πλευριτικών συλλογών, πιθανά όχι μόνο μέσω της αγγειογενετικής του ιδιότητας αλλά και επάγοντας τη διαπερατότητα των αγγείων.

## **Βιβλιογραφία**

1. Brown LF, Detmar M, Claffey K, et al . Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factors: a multifunctional angiogenic cytokine. *EXS* 1997; 79: 233-269
2. Antony VB. Immunological mechanisms in pleural disease. *Eur Respir J* 2003;21:539-44
3. McDonald DM. Angiogenesis and remodeling of airway vasculature in chronic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:S39-S45
4. Hoshino M, Takahashi M, Aoike N. Expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and angiogenin immunoreactivity in asthmatic airways and its relationship to angiogenesis. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: 295-301
5. Hoshino M, Nakamura Y, Hamid QA. Gene expression of vascular endothelial growth factor and its receptors and angiogenesis in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: 1034-1038
6. Sack U, Hoffmann M, Zhao XJ, et al. Vascular endothelial growth factor in pleural effusions of different origin. *Eur Respir J* 2005 ; 25:600-604
7. Ruiz E, Aleman C, Alegre J et al. Angiogenic factors and angiogenesis inhibitors in exudative pleural effusions. *Lung* 2005;183:185-95
8. Cheng D, Rodriguez RM, Perrett EA, et al. Vascular endothelial growth factor in pleural fluid. *Chest* 1999; 116:760-765
9. Grove, CS, Lee, YCG Vascular endothelial growth factor: the key mediator in pleural effusion formation. *Curr Opin Pulm Med* 2002;8:294-301
10. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, et al. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000; 407: 242-248

11. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996; 380: 439-442
12. Cheng, D, Lee, YCG, Rogers, JT, et al. Vascular endothelial growth factor level correlates with transforming growth factor- $\beta$  isoform levels in pleural effusions. *Chest* 2000;118:1747-1753
13. Hamed EA, El-Noweihi AM, Mohamed AZ, et al Vasoactive mediators (VEGF and TNF- $\alpha$ ) in patients with malignant and tuberculous pleural effusions. *Respirology* 2004;9:81-86
14. Momi H, Matsuyama W, Inoue K, et al. Vascular endothelial growth factor and proinflammatory cytokines in pleural effusions. *Respir Med* 2002;96:817-822
15. Yanagawa H, Takeuchi E, Suzuki Y, et al. Vascular endothelial growth factor in malignant pleural effusion associated with lung cancer. *Cancer Immunol Immunother* 1999; 48:396-400
16. Zebrowski BK, Yano S, Liu W, et al. Vascular endothelial growth factor levels and induction of permeability in malignant pleural effusions. *Clin Cancer Res* 1999; 5:3364-3368
17. Kalomenidis I, Kollintza A, Sigala I, et al. Angiopoietin-2 Levels Are Elevated in Exudative Pleural Effusions. *Chest* 2006; 129: 1259 – 1266
18. Lim SC, Jung SI, Kim YC, Park KO. Vascular endothelial growth factor in malignant and tuberculous pleural effusions. *J Korean Med Sci* 2000;15:279-283
19. Ishimoto O, Saijo Y, Narumi K, et al. High level of vascular endothelial growth factor in hemorrhagic pleural effusion of cancer. *Oncology* 2002; 63 :70-75
20. Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, et al. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* 1995; 376: 70-74

21. Suri C, Jones PF, Patan S, et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996; 87: 1171-1180
22. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997; 277: 55-60
23. Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, et al. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 1999; 284: 1994-1998
24. Teichert-Kuliszewska K, Maisonpierre PC, Jones N, et al. Biological action of angiopoietin-2 in a fibrin matrix model of angiogenesis is associated with activation of Tie2. *Cardiovasc Res.*2001;49:659-70
25. Light WR, MacGregor MI, Luchsinger PC, et al. Pleural effusions: the diagnostic separation of transudations and exudates. *Ann Intern Med* 1972; 77:507–514
26. Light RW. Chapter 2. Physiology of the pleural space. In, *Pleural diseases*. 4th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins 2001; 8–20
27. Light RW. Chapter 4. Clinical manifestations and useful tests. In, *Pleural diseases*. 4th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001; 42–86
28. Clifford CA, Hughes D, Beal MW, et al. Plasma vascular endothelial growth factor concentrations in healthy dogs and dogs with hemangiosarcoma. *J Vet Intern Med* 2001;15:131–135
29. Davis S., Aldrich T. H., Jones P. F., et al. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 1996; 87: 1161-1169
30. Takahama M, Tsutsumi M, Tsujiuchi T, et al. Enhanced expression of Tie2, its ligand angiopoietin-1, vascular endothelial growth factor, and CD31 in human non-small cell lung carcinomas. *Clin Cancer Res.*1999;5:2506-10
31. Wong MP, Chan SY, Fu KH, et al. The angiopoietins, tie2 and vascular endothelial growth factor are differentially expressed in the transformation of normal lung to non-small cell lung carcinomas. *Lung Cancer* 2000; 29:11-22

32. Takanami I. Overexpression of Ang-2 mRNA in non-small cell lung cancer: association with angiogenesis and poor prognosis. *Oncol Rep* 2004; 12:849–853
33. Peters K. G., Coogan A., Berry D., et al. Expression of Tie2/Tek in breast tumor vasculature provides a new marker for evaluation of tumor angiogenesis. *Br. J. Cancer* 1998; 77: 51-5
34. Zhang ZL, Liu ZS, Sun Q. Expression of angiopoietins, Tie2 and vascular endothelial growth factor in angiogenesis and progression of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.*2006;12:4241-5
35. Chang H, Wang BW, Kuan P, et al. Cyclical mechanical stretch enhances angiopoietin-2 and Tie2 receptor expression in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Clin Sci* 2003; 104:421–428
36. Konstantinovskiy S, Nielsen S, Vyberg B, et al. Angiogenic molecule expression is downregulated in effusions from breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2005;94:71-80

**B. Η λειτουργική αλληλεπίδραση του βιολογικού άξονα VEGF - Stromal cell derived factor-1α (SDF-1α/CXCL12) σε κακοήθεις πλευριτικές συλλογές από καρκίνο του πνεύμονα**

Από το Σεπτέμβριο του 2007 έως το Φεβρουάριο του 2008 μελετήσαμε προοπτικά 25 ασθενείς με πλευριτική συλλογή. Μελετήσαμε την έκφραση του βιολογικού άξονα CXCL12 (και τα δυο αντίγραφα TR1 και TR2) /CXCR4 σε 25 πλευριτικά υγρά, 7 διυδρώματα που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου και 18 εξιδρώματα (7 από μικροκυττατικό καρκίνο του πνεύμονα-SCLC και 11 από μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα-NSCLC). Τα χαρακτηριστικά των πλευριτικών υγρών φαίνονται στον πίνακα 1.

**Εκχύλιση RNA**

Η απομόνωση και εκχύλιση ολικού RNA από τα δείγματα πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του αντιδραστηρίου Trizol (Invitrogen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του RNA προσδιορίστηκε με φωτομέτρηση στα 260nm και 280nm αντίστοιχα. Η ακεραιότητα του RNA επιβεβαιώθηκε με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 1%.

**Αντίστροφη μεταγραφή και PCR πραγματικού χρόνου (Real-time PCR)**

Η αντίστροφη μεταγραφή 1μg RNA σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του αντιδραστηρίου Thermoscript (Invitrogen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Οι αντιδράσεις PCR πραγματικού χρόνου (Real-time PCR) πραγματοποιήθηκαν στο σύστημα Mx3000P Real-Time PCR System, Stratagene με χρήση του SYBR GREEN Master Mix, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το λογισμικό Mx3000P Real-time PCR software. Η έκφραση του housekeeping gene GAPDH χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

Οι ακολουθίες των primers που χρησιμοποιήσαμε φαίνονται στον Πίνακα 2.

### **Western blot**

Έγινε ηλεκτροφόριση του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος ( 20μg ) σε γέλη πολυακρυλαμίδης 10% , ακολούθως μεταφορά του προϊόντος σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης και επώαση με anti-VEGF αντίσωμα (Cat. No. MAB293, R&D systems, UK) σε αραιώση 1:500, anti-SDF αντίσωμα (Cat. No. MAB350 , R&D systems, UK) σε αραιώση 1:500 και με αντίσωμα έναντι ακτίνης (sc-47778, Santa-Cruz biotechnology, USA) σε αραιώση 1:1000. Η σύζευξη των αρχικών αντισωμάτων πιστοποιήθηκε μέσω χρήσης δευτερεύοντος αντισώματος συνδεδεμένου με υπεροξειδάση. Το τελικό αποτέλεσμα ( ή οι τελικές ταινίες ) έγινε ορατό με την χρήση του SuperSignal West Pico Chemiluminescent υποστρώματος (Pierce, USA) με βάση το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Η εξέταση πραγματοποιήθηκε εις διπλούν για κάθε δείγμα ( φυσιολογικό ή καρκινικό ). Τα φίλμ φωτογραφήθηκαν με το Alpha Imager © system (Alpha Innotec Corp., USA). Οι συγκεντρώσεις των VEGF και SDF πρωτεϊνών στις εξιδρωματικές και διυδρωματικές συλλογές ποσοτικοποιήθηκαν με την χρήση του λογισμικού της Alpha Innotec image analysis .Στην ανάλυση αυτή τα επίπεδα της β-ακτίνης του κάθε δείγματος χρησίμευσαν ως εσωτερικό control της μεθόδου.

### **Στατιστική ανάλυση**

Ο αυξητικός παράγοντας και τα επίπεδα της κυτταροκίνης στο mRNA αρχικά υπολογίστηκαν με one-sample Kolmogorov-Smirnov goodness of fit test, με σκοπό να προσδιοριστεί το πρότυπο κατανομής που ακολουθούσαν. Βασιζόμενη στα αποτελέσματα η non-parametric Spearman rank συσχέτιση χρησιμοποιήθηκε για να αξιολογηθεί η σχέση κάθε ζεύγους. Mann-Whitney U και Kruskal-Wallis H test χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να αξιολογηθεί η έκφραση των SDF1-TR1, SDF1-TR2 και CXCR4 στα διυδρώματα ή στα κακοήθη εξιδρώματα. Τέλος, για τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε ένα software πακέτο SPSS, έκδοση 11.0, SPSS inc., Chicago,

II. Η στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων τεθήκε στο επίπεδο του 95% ( $P$ -value  $< 0.05$ ).

### **Αποτελέσματα**

#### ***a. Τα επίπεδα των χυμοκινών στα mRNA transcripts στις κακοήθεις πλευριτικές συλλογές και στην ομάδα ελέγχου***

Η έκφραση των αγγειογενετικών κυτταροκινών (VEGF και CXCL12-CXCR4) μελετήθηκε στο mRNA που απομονώθηκε από όλα τα δείγματα (κακοήθεις πλευριτικές συλλογές και ομάδα ελέγχου). Η Ang-2 εκφράστηκε σε ποσοστό 40% των διδρώματων, 29% στο SCLC και 27% στο NSCLC. Η Ang-1 δεν παρουσίασε καμία έκφραση στα πλευριτικά υγρά.

Τα επίπεδα του SDF-TR1 ( $p=0.02$ ) αλλά όχι του SDF-TR2 ( $p=0.23$ ) ή του CXCR4 ( $p=0.23$ ) βρέθηκαν υψηλότερα στα εξιδρώματα απ' ό τι στα διδρώματα (Πίνακας 3A). Τα επίπεδα του VEGF και της Ang-2 στο mRNA δεν είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στα εξιδρώματα και στα διδρώματα (Πίνακας 3A).

Τα επίπεδα του SDF-TR1 ( $p=0.04$ ) και του SDF-TR2 ( $p=0.04$ ) αλλά όχι του CXCR4 ( $p=0.123$ ) ήταν υψηλότερα στα πλευριτικά υγρά από SCLC σε σχέση με τα διδρώματα. Τα επίπεδα του SDF-TR1 ( $p=0.03$ ) αλλά όχι του SDF-TR2 ( $p=0.6$ ) και του CXCR4 ( $p=0.4$ ) βρέθηκαν υψηλότερα στα υγρά από NSCLC σε σχέση με τα διδρώματα. Τα επίπεδα έκφρασης του CXCL12-CXCR4 δεν διέφεραν μεταξύ πλευριτικών υγρών από SCLC και NSCLC (Πίνακας 3B).

Δεν βρέθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ VEGF και SDF1 TR1 ( $p=0.04$ ), SDF-TR2 ( $p=0.02$ ), CXCR4 ( $p=0.03$ ) στις κακοήθεις πλευριτικές συλλογές (Πίνακας 4). Βρήκαμε όμως σημαντική συσχέτιση μεταξύ SDF-TR1 και SDF1 TR2 mRNA levels ( $p=0.0001$ ), μεταξύ SDF1 TR1 και CXCR4 mRNA levels ( $p=0.001$ ) και μεταξύ SDF1 TR2 και CXCR4 mRNA levels, ( $p=0.017$ ). Τέλος βρέθηκε μια σημαντική συσχέτιση μεταξύ



VEGF mRNA levels και LDH, στις κακοήθεις πλευριτικές συλλογές (SCLCs και NSCLCs) ( $p=0.013$ ).

Ομοίως τα επίπεδα της Ang-2 στο mRNA μελετήθηκαν στους ασθενείς και στην ομάδα ελέγχου. Η Ang-1 δεν εκφράστηκε στα πλευριτικά υγρά, ενώ η Ang-2 εκφράστηκε αλλά όχι σε όλα τα πλευριτικά υγρά (διυδρώματα 40%, SCLC 29%, NSCLC 27%). Τέλος δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση μεταξύ Ang-2 και pH, GLU, LDH, ολική πρωτεΐνη και αλβουμίνη πλευριτικού υγρού.

***β. Τα επίπεδα των πρωτεϊνών VEGF και SDF στις κακοήθεις πλευριτικές συλλογές και στην ομάδα ελέγχου υπολογισμένες με Western blot ανάλυση***

Οι πρωτεΐνες VEGF και SDF1a εκτιμήθηκαν με western blot ανάλυση σε 17 και 14 κυτταρολύματα πλευριτικών υγρών αντίστοιχα. Η πρωτεΐνη VEGF εκφράστηκε στο 88% (15/17) των δειγμάτων ενώ δεν έδειξε καμία έκφραση στο VEGF το 12% (2/17) των δειγμάτων. Αναλυτικότερα η πρωτεΐνη VEGF ανιχνεύθηκε σε 12 καρκινικά υγρά (6 SCLCs και 6 NSCLCs) και σε 3 δείγματα της ομάδας ελέγχου. Η πρωτεΐνη SDF αντίθετα ανιχνεύθηκε σε όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν (14/14, 100%). Και ειδικότερα η SDF ανιχνεύθηκε σε 11 καρκινικά υγρά (4 SCLCs και 7 NSCLCs) και σε τρία δείγματα της ομάδας ελέγχου.

Υψηλότερα επίπεδα της πρωτεΐνης SDF βρέθηκαν στο SCLC ( $0,42 \pm 0,16$ ) και NSCLC ( $0,38 \pm 0,19$ ) αντίστοιχα συγκρινόμενα με την ομάδα ελέγχου ( $0,16 \pm 0,06$ ). Ομοίως υψηλότερα επίπεδα της πρωτεΐνης VEGF μετρήθηκαν στο SCLC ( $0,76 \pm 0,22$ ) και στο NSCLC ( $0,81 \pm 0,38$ ) συγκρινόμενα αντίστοιχα με την ομάδα ελέγχου ( $0,26 \pm 0,17$ ). Όμως δεν μπορέσαμε να υπολογίσουμε στατιστικά σημαντική διαφορά εξαιτίας του περιορισμένου αριθμού δειγμάτων από κάθε ομάδα ( $<10$ ).

Τα επίπεδα της πρωτεΐνης VEGF δεν είχαν καμία συσχέτιση με τα επίπεδα του VEGF στο mRNA στις κακοήθεις πλευριτικές συλλογές. Η έκφραση όμως της πρωτεΐνης του

SDF είχε αρνητική συσχέτιση με τα επίπεδα του SDF TR1 στο mRNA στις κακοήθεις πλευριτικές συλλογές (NCLCs και NSCLCs) ( $p=0.012$ ). Ειδικότερα η πρωτεΐνη SDF1a βρέθηκε να έχει σημαντική συνέκφραση με την γλυκόζη του πλευριτικού υγρού ( $p=0.019$ ) και την LDH του ορού ( $p=0.043$ ). Τέλος βρέθηκε ότι τα επίπεδα των πρωτεϊνών VEGF και SDF1 συνεκφράζονται ( $p=0,019$ ).

## Συζήτηση

Ο σκοπός της μελέτης αυτής ήταν να διερευνήσουμε την αλληλεπίδραση του βιολογικού άξονα VEGF –angiopoietins με SDF-1a/CXCR4 ώστε να κατανοήσουμε καλύτερα τον αγγειογενετικό μηχανισμό των κακοηθών πλευριτικών συλλογών. Η μελέτη αυτή αποτελεί την πρώτη μελέτη που διερευνά το αγγειογενετικό αυτό μονοπάτι των πλευριτικών υγρών, με δύο διαφορετικές μεθόδους. Το σημαντικότερο εύρημα της μελέτης είναι η αύξηση της έκφρασης του SDF-1a τόσο στο mRNA όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο, στις κακοήθεις πλευριτικές συλλογές. Επιπροσθέτως, βρέθηκε και μία συνέκφραση μεταξύ των επιπέδων των πρωτεϊνών του VEGF και του SDF-1a στα καρκινικά πλευριτικά υγρά. Τέλος βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ των ανωτέρω ευρημάτων και των πλευριτικών LDH και /ή GLU. Έτσι καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι ο SDF-1 α μαζί με το VEGF –Ang-2 εμπλέκονται στην διασπορά των καρκινικών κυττάρων στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Τα διασπειρόμενα καρκινικά κύτταρα πιθανά μπλοκάρουν την παροχέτευση του υπεζωκοτικού χώρου και δημιουργούν την πλευριτική συλλογή.

Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι η σημαντικότερη αιτία πλευριτικής συλλογής. Τουλάχιστον 25% των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα θα αναπτύξει πλευριτική συλλογή σε κάποιο στάδιο της νόσου (1). Η θεραπεία των κακοηθών πλευριτικών συλλογών συνίσταται στην παροχέτευση του υγρού και στην πλευρόδεση μέσω της έγχυσης αντιβιοτικών, αντισηπτικών και αντικαρκινικών φαρμάκων στην υπεζωκοτική κοιλότητα (2-3). Τα αποτελέσματα της θεραπείας αυτής είναι ποικίλα, μια και δεν επηρεάζουν την επιβίωση (2).

Ο SDF-1 ασκεί πολλαπλές επιδράσεις στη διαδικασία της μετάστασης (μετακίνηση των καρκινικών κυττάρων, χημειοταξία, προσκόλληση), όπως και στη νεοαγγείωση των όγκων (4). Αυτό μας δείχνει ότι χρειάζονται καινούργιες θεραπευτικές στρατηγικές που θα μπλοκάρουν τον άξονα SDF-1-CXCR4 και έτσι θα ρυθμίζουν την κυκλοφορία των αιμοποιητικών/λεμφοποιητικών κυττάρων και θα αναστέλλουν την μεταστατική συμπεριφορά των κακοηθών κυττάρων (4). Στη μελέτη μας αυτή, προσπαθήσαμε να βοηθήσουμε στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας του CXCL12-CXCR4 σε σχέση με την επίδραση του VEGF και των αγγειοποιετινών.

Πρόσφατα έχει βρεθεί ότι ο SDF-1α εκφράζεται έντονα στα κύτταρα του καρκίνου του μαστού και στα όργανα που αυτός μεθίσταται και ότι ο SDF-1α προάγει τη μετάσταση διεγείροντας τη μετανάστευση των κυττάρων του καρκίνου του μαστού (5). Για πρώτη φορά στις πνευμονικές μεταστάσεις ο Phillips και οι συνεργάτες του παρατήρησαν ότι ο βιολογικός άξονας CXCL12-CXCR4 παίζει κάποιο ρόλο στη δημιουργία μεταστάσεων από NSCLC (6). Τα δεδομένα τους υποστηρίζουν ότι ο άξονας CXCL12-CXCR4 εμπλέκεται στη ρύθμιση των μεταστάσεων του NSCLC ενισχύοντας την φωσφορυλίωση της εξωκυττάριας cellular signal-related kinase-1/2 χωρίς να επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό ή την απόπτωση (6). Επιπλέον μελέτες υποστήριξαν τα προηγούμενα αποτελέσματα και ενίσχυσαν έτσι την άποψη ότι ο άξονας SDF-1α/CXCR4 συμβάλλει στην παθογένεια των μεταστάσεων του NSCLC (7). Τα επίπεδα του SDF-1α βρέθηκαν σημαντικά υψηλότερα στις κακοήθεις πλευριτικές συλλογές γεγονός που δείχνει μια σημαντική συσχέτιση με τον όγκο του πλευριτικού υγρού (7). Επίσης τα καρκινικά κύτταρα στις κακοήθεις πλευριτικές συλλογές εξέφραζαν τον CXCR4 και τα μεσοθηλιακά κύτταρα του υπεζωκότα βαφόταν θετικά για τον SDF-1α (7).

Όμως στην πρόσφατη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν μελέτες που να υποστηρίζουν την ανωτέρω εμπλοκή του CXCL12/CXCR4 στις κακοήθεις πλευριτικές συλλογές από SCLC. Τα δεδομένα της δικής μας μελέτης είναι σύμφωνα με αυτά των προηγούμενων μελετών (6, 7), παρότι προέκυψαν με διαφορετικές, αλλά πιο σύγχρονες μεθόδους, που εφαρμόστηκαν απευθείας στα κύτταρα του πλευριτικού υγρού ασθενών με κακοήθεια. Τέλος είμαστε της γνώμης ότι η παθοφυσιολογία των μεταστάσεων του SCLC είναι

πιθανά όμοια με αυτή του NSCLC, καθώς δεν βρήκαμε διαφορές στην έκφραση του mRNA στις δύο αυτές ομάδες δειγμάτων.

Από την άλλη πλευρά, δεν βρήκαμε καμία αύξηση στην έκφραση του CXCR4 μεταξύ κακοηθών πλευριτικών συλλογών και ομάδας ελέγχου με τη real-time PCR. Ο Kijima και οι συνεργάτες του ανακοίνωσαν ότι ο υποδοχέας του CXCR4 εκφράζεται στα κύτταρα του SCLC και ρυθμίζει την μετακίνηση, την προσκόλληση και την αλλαγή τους σε συνδυασμό με το stem cell factor/c-kit (8). Άλλες μελέτες επικυρώνουν τη συμμετοχή του CXCR4 στις μεταστάσεις από καρκίνο του πνεύμονα (9, 10), όμως χρησιμοποιώντας διαφορετικές τεχνικές και όχι σε πλευριτικά υγρά. Πρόσφατα έχει δημοσιευθεί μια διαφορετική έκφραση του CXCR4 που σχετίζεται με τις μεταστάσεις από NSCLC (11). Η υπόθεση αυτή οδηγεί στη σκέψη ότι το μπλοκάρισμα του CXCR4/SDF1 μπορεί να μας φέρει μπροστά σε νέες μοριακές θεραπείες του καρκίνου (11).

Το νέο δεδομένο που προκύπτει από τη δική μας μελέτη, είναι ότι η αλληλεπίδραση της έκφρασης των VEGF και SDF σε πρωτεϊνικό επίπεδο στα κακοήθη εξιδρώματα, πιθανά δείχνει την συμμετοχή της βασικής αγγειογενετικής κυτταροκίνης (VEGF), όχι μόνο στη φλεγμονώδη διαδικασία δημιουργίας εξιδρωμάτων, αλλά και στη παθοφυσιολογία των μεταστάσεων. Η αυξημένη έκφραση του VEGF στις κακοήθεις πλευριτικές συλλογές επιβεβαιώθηκε από τη δική μας αλλά και άλλες μελέτες (12,13). Ειδικότερα εμείς με την παρούσα μελέτη επιβεβαιώσαμε με πιο προχωρημένη μεθοδολογία, τα αποτελέσματα μιας προηγούμενης μελέτης (13), δηλαδή ότι μόνο η Ang-2 και όχι η Ang-1 εμπλέκεται στο αγγειογενετικό μονοπάτι VEGF-Tie-2 -angiopoietins για τη δημιουργία των κακοηθών εξιδρωμάτων. Βέβαια, απαιτούνται περισσότερες μελέτες που να επικυρώσουν το αποτέλεσμα αυτό σε περισσότερα δείγματα πλευριτικών υγρών.

Καταλήγουμε λοιπόν στο συμπέρασμα ότι μόνο τα επίπεδα του SDF-1a αυξάνονται στις κακοήθεις πλευριτικές συλλογές και ότι σχετίζονται με τα επίπεδα του VEGF καθώς και άλλων δεικτών των φλεγμονωδών πλευριτικών συλλογών. Γι' αυτό πιθανά ο VEGF μαζί με τον SDF συμμετέχουν εκτός από τη δημιουργία των φλεγμονωδών πλευριτικών συλλογών και στη παθοφυσιολογία των καρκινικών μεταστάσεων. Η παρατήρησής μας

αυτή χρήση περαιτέρω *in vivo* μελέτη, ώστε να διευκρινιστεί ο ρόλος των αγγειογενετικών κυτταροκινών στην παθογένεια των κακοκηθών πλευριτικών συλλογών στον καρκίνο του πνεύμονα.

**Πίνακας 1:** Χαρακτηριστικά των πλευριτικών συλλογών

	Διυδρώματα	SCLC	NSCLC
Αριθμός	7	7	11
Άνδρες/Γυναίκες	6/1	7/0	11/0
Ηλικία (έτη)	76 (70-84)	71 (65-80)	70 (59-82)
RBCs ( $\times 10^3$ cell/ $\mu$ l)	1.1 (0.5-1.6)	2.7 (0.7-9.9)	2.1 (0.7-6.0)
LDH (IU/L)	118 (61-243)	218 (176-664)	204 (151-429)
Πρωτεΐνη (g/dl)	2.3 (1.0-2.8)	2.7 (2.2-3.2)	2.5 (1.4-3.6)
Γλυκόζη (mg/dl)	102 (90-156)	124 (88-222)	101 (67-206)
Ph	7.42 (7.40-7.45)	7.43 (7.39-7.49)	7.46 (7.13-7.49)

Οι τιμές που αναγράφονται είναι οι μέσες (IQR)

Πίνακας 2: Οι εκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην ποσοτική Real-time RT-PCR

<i>Αυξητικός παράγοντας ή κυτταροκίνη</i>	<i>Primer pair Sequence (5'-3')</i>	<i>Ενισχυτική Θερμοκρασία</i>	<i>Μέγεθος προϊόντος</i>
<b>VEGF</b>	ATGACGAGGGCCTGGAGTGTG CCTATGTGCTGGCCTTGGTGAG	60°C	91
<b>SDF1-TR1</b>	TGAGAGCTCGCTTTGAGTGA CACCAGGACCTTCTGTGGAT	55°C	233
<b>SDF1-TR2</b>	CTAGTCAAGTGCCTCCACGA GGACACACCACAGCACAAAC	55°C	221
<b>CXCR4</b>	GGTGGTCTATGTTGGCGTCT TGGAGTGTGACAGCTTGGAG	55°C	229
<b>ANGPT1</b>	TTAATGGACTGGGAAGGGAACC AGGGGCCACAAGCATCAAA	55°C	235
<b>ANGPT2</b>	AGCCGGCAAAAATAAGCAGCATC GGTTGTGGCCTTGAGCGAATAGC	59°C	238
<b>GAPDH</b>	GGAAGGTGAAGGTCGGAGTCA GTCATTGATGGCAACAATATCCACT	60°C	101

**Πίνακας 3: έκφραση του mRNA στα διδρώματα (ομάδα ελέγχου) και στα εξιδρώματα (SCLCs και NSCLCs)**

**A.**

	<b>Διδρώματα</b> (N=7)	<b>Εξιδρώματα</b> (SCLCs& NSCLCs) (N=18)	<b>P value*</b>
<b>VEGF</b>	27.5±14.3	1,65±0,76	NS
<b>SDF1-TR1</b>	0.70±0.16	(11,2 ±8,8) x10 <sup>2</sup>	<b>0.020</b>
<b>SDF1-TR2</b>	0.89±0.15	(16,8 ±9,9) x10 <sup>2</sup>	NS
<b>CXCR4</b>	5.61±2.76	(21,8±16,2) x10 <sup>2</sup>	NS
<b>ANGPT2</b>	33.5±22.1	0,20 ±0,13	NS

Οι τιμές των δεδομένων δίδονται ως Mean±SEM (standard error of the Mean)

\*Mann-Whitney test



**B.**

	<b>Διυδρώματα</b>	<b>SCLCs</b>	<b>NSCLCs</b>	<b>P value*</b>
	<b>(N=7)</b>	<b>(N=7)</b>	<b>(N=11)</b>	
<b>VEGF</b>	27.5±14.3	1,34±0,74	1,8±1,2	NS
<b>SDF1-TR1</b>	<b>0.70±0.16</b>	<b>(2,7±2,2) x10<sup>3</sup></b>	<b>(1,0±1,0) x10<sup>2</sup></b>	<b>0.04</b>
<b>SDF1-TR2</b>	<b>0.89±0.15</b>	<b>(3,56±2,5)x10<sup>3</sup></b>	<b>(4,8±2,0) x10<sup>2</sup></b>	<b>0.04</b>
<b>SDF1-TR2</b>	<b>0.89±0.15</b>	<b>(3,56±2,5)x10<sup>3</sup></b>	<b>(4,8±2,0) x10<sup>2</sup></b>	<b>0.03</b>
<b>CXCR4</b>	5.61±2.76	(4,8±4,1)x10 <sup>3</sup>	(5,06±1,76)x10 <sup>2</sup>	NS
<b>ANGPT2</b>	33.5±22.1	0,33±0,29	0.25±0.13	NS

Οι τιμές των δεδομένων δίδονται ως Mean±SEM (standard error of the Mean)

\*Mann-Whitney test έγινε μεταξύ των ομάδων που αναγράφονται με έντονα μαύρους χαρακτήρες.

**Πίνακας 4:** Pair-wise co-expression ανάλυση στα κακοήθη εξιδρώματα (SCLCs και NSCLCs)

**Spearman correlation  $\rho$  and  $P$  values στα κακοήθη εξιδρώματα**

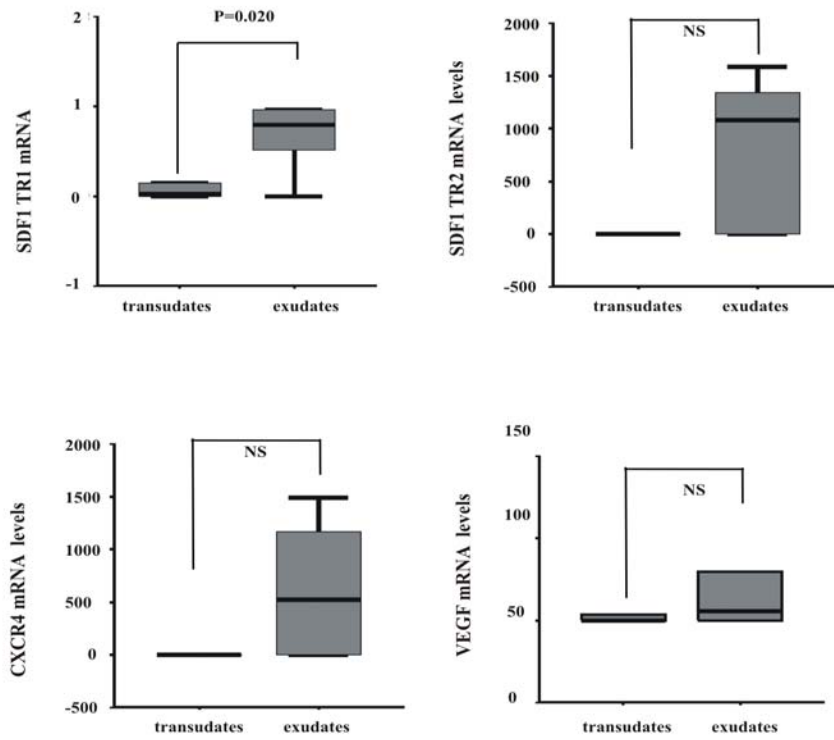
		VEGF	SDF1-TR1	SDF1-TR2	CXCR4	ANGPT2
<b>VEGF</b>	Spearman's	1.000				
	rho					
	Sig. (2-tailed)					
<b>SDF1-TR1</b>	Spearman's	0.472	1.000			
	rho					
	Sig. (2-tailed)	<b>0.048*</b>				
<b>SDF1-TR2</b>	Spearman's	0.538	0.818**	1.000		
	rho					
	Sig. (2-tailed)	<b>0.021*</b>	<b>0.0001</b>			
<b>CXCR4</b>	Spearman's	0.501	0.692	0.553	1.000	
	rho					
	Sig. (2-tailed)	<b>0.034*</b>	<b>0.001</b>	<b>0.017</b>		
<b>ANGPT2</b>	Spearman's	-0.139	0.402	0.216	0.035	1.000
	rho					
	Sig. (2-tailed)	0.582	0.098	0.389	0.890	

\*\* Η συσχέτιση είναι σημαντική στο επίπεδο .01

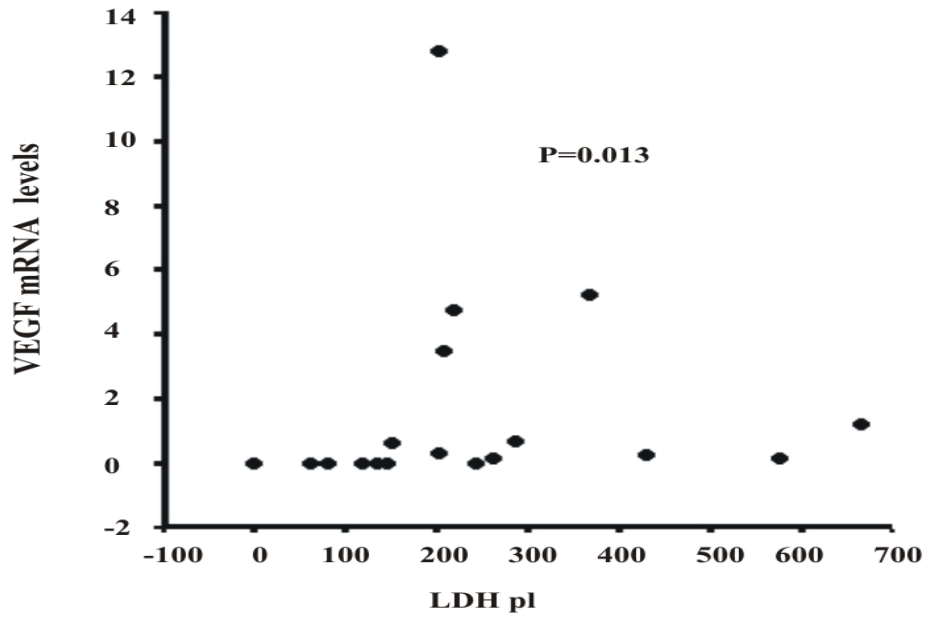
\* Η συσχέτιση είναι σημαντική στο επίπεδο .05

## Σχήματα

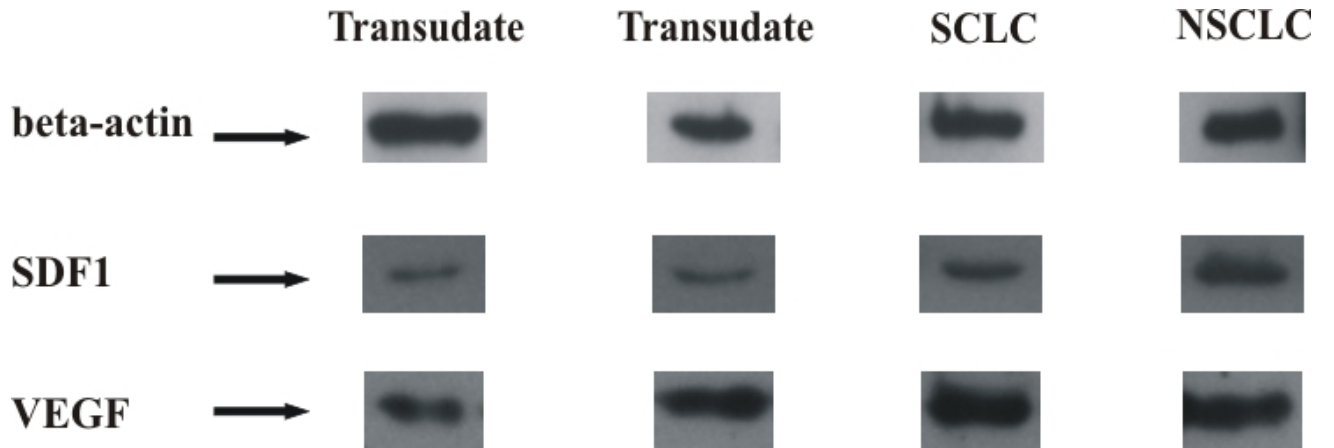
**Σχήμα 1:** Έκφραση των επιπέδων του mRNA των αγγειογενετικών κυτταροκινών στα εξιδρώματα και τα διδρώματα



**Σχήμα 2:** Σχηματική απεικόνιση της συσχέτισης των επιπέδων του VEGF στο mRNA και της LDH στα κακοήθη πλευριτικά υγρά



**Σχήμα 3:** Western blot ανάλυση των διδρωμάτων και των κακοηθών πλευριτικών υγρών



## Βιβλιογραφία

1. Reed C.E. Management of the malignant pleural effusion. In Lung Cancer: Principles and Practice. H.I. Pass, J.B. Mitchel, D.H Johnson, A.T. Turrisi, editors. Lippincott-Raven, Philadelphia. 643-654
2. Hausheer FH, Yarbrow JW. Diagnosis and treatment of malignant pleural effusion. *Semin Oncol* 1985;12:54-57
3. Chen H, Brahmer J. Management of malignant pleural effusion. *Curr Oncol Rep.* 2008;10:287-93
4. Kucia M, Jankowski K, Rea R, Wysoczynski M, Bandura L, Allendorf DJ, Zhang J, Ratajczak J, Ratajczak MZ. CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion. *J Mol Histol.* 2004;35:233-45
5. Lee BC, Lee TH, Avraham S, Avraham HK. Involvement of the chemokine receptor CXCR4 and its ligand stromal cell-derived factor 1alpha in breast cancer cell migration through human brain microvascular endothelial cells. *Mol Cancer Res.* 2004;2:327-38
6. Phillips RJ, Burdick MD, Lutz M, Belperio JA, Keane MP, Strieter RM. The stromal derived factor-1/CXCL12-CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167:1676-1686
7. Oonakahara K, Matsuyama W, Higashimoto I, Kawabata M, Arimura K, Osame M. Stromal-derived factor 1  $\alpha$ /CXCL12-CXCR4 axis is involved in the dissemination of NSCLC cells into pleural space. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004;30:671-677
8. Kijima T, Maulik G, Ma PC, Tibaldi EV, Turner RE, Rollins B, Sattler M, Johnson BE, Salgia R. Regulation of cellular proliferation, cytoskeletal function and signal transduction through CXCR4 and c-kit in small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 2002; 62:6304-6311
9. Burger M, Glodek A, Hartmann T, Schmitt-Gräff A, Silberstein LE, Fujii N, Kipps TJ, Burger JA. Functional expression of CXCR4 (CD184) on small-cell

- lung cancer cells mediates migration, integrin activation, and adhesion to stromal cells. Oncogene. 2003 6;22:8093-101
10. Phillips RJ, Mestas J, Gharaee-Kermani M, Burdick MD, Sica A, Belperio JA, Keane MP, Strieter RM. Epidermal growth factor and hypoxia-induced expression of CXC chemokine receptor 4 on non-small cell lung cancer cells is regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/mammalian target of rapamycin signaling pathway and activation of hypoxia inducible factor-1alpha. *J Biol Chem*. 2005;280:22473-81
  11. Su L, Zhang J, Xu H, Wang Y, Chu Y, Liu R, Xiong S. Differential expression of CXCR4 is associated with the metastatic potential of human non-small cell lung cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2005;11:8273-80
  12. Kalomenidis I, Kollintza A, Sigala I, Papapetropoulos A, Papiris S, Light RW, Roussos C. Angiopoietin-2 levels are elevated in exudative pleural effusions. *Chest*. 2006;129:1259-66
  13. Economidou F, Antoniou KM, Tzanakis N, Sfiridaki K, Siafakas NM, Schiza SE. Angiogenic molecule Tie-2 and VEGF in the pathogenesis of pleural effusions. *Respir Med*. 2008;102:774-9

## Κεφάλαιο 2

### Ο ρόλος του Μικροδορυφορικού DNA στη διαφορική διάγνωση των υπεζωκοτικών συλλογών

#### Ασθενείς και Μέθοδος

Στη μελέτη συμπεριλήφθησαν 48 ασθενείς (12 γυναίκες και 36 άνδρες) που νοσηλεύτηκαν στην Πνευμονολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου λόγω πλευριτικής συλλογής, από τον Ιανουάριο του 2005 έως το Ιούνιο του 2006. Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν 71 έτη (38-97 έτη). 26 ασθενείς, μέσης ηλικίας 72.5 έτη (48-88 έτη), έπασχαν με κακοήγη πλευριτική συλλογή. Από αυτούς οι 23 είχαν καρκίνο του πνεύμονα και 3 μεταστατικό καρκίνο από κάποιο άλλο όργανο. Οι παραπάνω ασθενείς είχαν ιστολογικά επιβεβαιωμένη κακοήθεια, 16 NSCLC, 6 SCLC, 1 μεσοθηλίωμα, και 3 μεταστατικά καρκινώματα (2 από καρκίνο του μαστού και 1 από καρκίνο του ενδομητρίου). 19 ασθενείς είχαν ιστορικό καπνίσματος (median pack years 60), και 7 ήταν μη καπνιστές. Η ομάδα ελέγχου συμπεριλάμβανε ασθενείς με κακοήθεις πλευριτικές συλλογές (7 αδιάγνωστα εξιδρώματα, 3 διδρώματα λόγω καρδιακής ανεπάρκειας, 11 παραπνευμονικές συλλογές και 1 φυματιώδη συλλογή). Οι ασθενείς αυτοί είχαν μέση ηλικία 66.5 έτη (38-97 έτη). 17 από αυτούς είχαν ιστορικό καπνίσματος (median pack years 30) και 5 ήταν μη καπνιστές. Η κυτταρολογική εξέταση των πλευριτικών υγρών έγινε με τη συνήθη διαδικασία και τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν από δύο διαφορετικούς κυτταρολόγους. Μόνο 14 από τις 26 κακοήθεις πλευριτικές συλλογές είχαν θετική κυτταρολογική εξέταση ενώ και οι 22 καλοήθεις πλευριτικές συλλογές είχαν αρνητική κυτταρολογική εξέταση.



## **Κυτταρολογικά δείγματα και απομόνωση του DNA**

Πλευριτικό υγρό και περιφερικό αίμα ελήφθησαν από όλους τους ασθενείς της μελέτης. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους  $-80^{\circ}\text{C}$  ως τη στιγμή που έγινε η εξαγωγή του DNA. Για να έχουμε την μεγαλύτερη ποσότητα κυττάρων από το πλευριτικό υγρό χρησιμοποιήσαμε ειδικά φίλτρα φυγοκέντρησης-συμπύκνωσης (Centricon Plus-20, Millipore Life Science, USA). Με την παραπάνω επεξεργασία συμπυκνώθηκαν περίπου 20 ml υπεζωκοτικού υγρού, σε 150 μl κυτταροβριθούς διαλύματος. Το πλευριτικό υγρό από κάθε ασθενή φυγοκεντρήθηκε στις 1200 στροφές στους  $-4^{\circ}\text{C}$  για 30 λεπτά. Το κυτταρικό ίζημα που προέκυψε από τη φυγοκέντρηση χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή του DNA. Η εκχύλιση του χρωμοσωμικού DNA από το πλευριτικό υγρό και το περιφερικό αίμα έγινε με τη χρήση των τυποποιημένων συσκευασιών QIAamp σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Qiagen extraction kits, QIAamp DNA blood maxi kits, Qiagen Inc.). Στη συνέχεια τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους  $4^{\circ}\text{C}$ .

Έξι πολυμορφικοί μικροδορυφορικοί εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση αστάθειας μικροδορυφορικού DNA και απώλειας ετεροζυγωτίας (D17S250, D9S171, D3S1234, D12S363, D5S346, TP53Alu) οι οποίοι περιγράφονται αναλυτικά στον πίνακα 1. Όλοι οι δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν βρίσκονται κοντά σε γονίδια που εμπλέκονται στην παθογένεια του καρκίνου (24-28). Η επιλογή των αλληλουχιών των παραπάνω δεικτών έγινε μέσω της βάσης δεδομένων NCBI ([www.Ncbi.nih.gov](http://www.Ncbi.nih.gov)).

**Αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση (PCR):** Η αντίδραση της αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράση (polymerase chain reaction) χρησιμοποιήθηκε για την ειδική ενίσχυση των προεπιλεγμένων αλληλουχιών DNA.

Το υπόστρωμα DNA επώαστηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε το ζεύγος των εκκινητών (ένας εκκινητής για ευθεία και ένας για ανάστροφη υβριδοποίηση στις αλληλουχίες κάθε μικροδορυφορικού δείκτη- forward and reverse primers), θερμοανθεκτική Taq-DNA πολυμεράση, μίγμα dNTPs, θειικό αμμώνιο, β-

μερκαπτοαιθανόλη, χλωριούχο μαγνήσιο, Tris-HCL (pH=8.5), 1% Triton-X-100 και λευκωματίνη βοείου ορού.

Η τεχνική της PCR εφαρμόστηκε σε 50 μl τελικού αντιδρώντος όγκου, με τη χρήση των τυποποιημένων συσκευασιών Qiagen Taq PCR Core Kit (QIAGEN Inc), σε PTC-100 θερμικό cycler (M.J. Research Inc., Watertown, MA, USA). Οι εκκινητές ευθείας υβριδοποίησης σημάνθηκαν με το Licor IR800 fluorochrome. Αρχικά έγινε θερμική αποδιάταξη (denaturation) του DNA για 5 λεπτά στους 95 °C. Στη συνέχεια έγινε ο πολυμερισμός του DNA, δηλαδή υβριδισμός των εκκινητών στους 55 °C και σύνθεση των θυγατρικών αλυσίδων DNA στους 72 °C. Τα τρία στάδια (θερμική αποδιάταξη, υβριδισμός, σύνθεση DNA) επαναλήφθηκαν για 30 διαδοχικούς κύκλους για την ενίσχυση των προϊόντων της αντίδρασης.

Τα προϊόντα της αντίδρασης αναλύθηκαν και οπτικοποιήθηκαν με ηλοκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου Long Ranger 8% (BMA, Rockland, Me, USA) και πήκτωμα ουρίας 7M για ενίσχυση, σε ένα Licor 4200 DNA sequencer (Lincoln, NE, USA). Τέλος τα αλληλόμορφα μετρήθηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού GeneProfiler v3.54 (SCANALYTICS, USA).

### **Στατιστική ανάλυση**

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων έγινε με τη χρήση του SPSS version 10.0 (SPSS Inc., Chicago IL, USA). Συσχετισμοί μεταξύ των διαφόρων ομάδων έγινε με τη χρήση unpaired t-test, paired t-test or Mann-Whitney Utests. Το  $p \leq 0.05$  θεωρήθηκε στατιστικά σημαντικό.

### **Αποτελέσματα**

Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών, η καπνιστική συνήθεια και η τελική διάγνωση των δύο ομάδων φαίνονται στον πίνακα 2. Οι μέσες τιμές της ολικής

πρωτεΐνης, της LDH, της γλυκόζης, του pH και του τύπου των κυττάρων των πλευριτικών υγρών των δύο ομάδων φαίνονται στον πίνακα 3.

Η εκχύλιση του DNA έγινε σε ικανοποιητικές ποσότητες από όλα τα δείγματα. Η εικόνα 1 δείχνει χαρακτηριστικές εικόνες ηλεκτροφόρησης μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI) και σταθερότητας (MSS) σε δύο διαφορετικούς μικροδορυφορικούς δείκτες (D17S250, D9S171). Δύο από τους 26 ασθενείς (7.6%) με κακοήγη πλευριτική συλλογή έδειξαν γενετικές αλλοιώσεις. Ένας ασθενής με NSCLC έδειξε MSI σε τρεις διαφορετικούς μικροδορυφορικούς δείκτες (D17S250, D9S171, D3S134) και ένας ασθενής με NSCLC έδειξε LOH στο δείκτη D3S134. Ένας από τους 22 (4.5%) ασθενείς με καλοήγη πλευριτική συλλογή (παραπνευμονική) έδειξε LOH στο δείκτη D3S134. Όλα τα άλλα δείγματα και από τις δύο ομάδες παρουσίασαν σταθερότητα του μικροδορυφορικού DNA στους δείκτες που μελετήσαμε.

**Πίνακας 1.** Οι μικροδορυφορικοί δείκτες του DNA , η χρωμοσωμική περιοχή και τα πιθανά γονίδια που αντιστοιχούν.

Μικροδορυφορικοί δείκτες	Χρωμοσωμική περιοχή	Γονίδια
<b>D17S250</b>	17q11.2-q12	-Apoptosis-antagonizing transcription factor -Colony-stimulating factor-3 (granulocyte)
<b>D9S171</b>	9p22-p21	-Tumor suppressor candidate 1, (TUSC1) -Interferon, beta-1, fibroblast (IFNB1) -Interferon, omega-1(IFNW1)
<b>D3S1234</b>	3p14.2	-Fragile histidine triad gene (FHIT)
<b>D12S363</b>	12p12.3	-KRAS2 oncogene
<b>D5S346</b>	5q21-q22	-Adenomatous polyposis coli (APC)
<b>TP53Alu</b>	17p13.1	-Tumor protein p53 (TP53)

**Πίνακας 2.** Ανθρωπομετρικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών που μελετήθηκαν

<b>Στοιχεία ασθενών</b>	<b>Ασθενείς με κακοήθη υπεζωκοτική συλλογή</b>	<b>Ασθενείς με καλοήθη υπεζωκοτική συλλογή</b>
Αριθμός ασθενών	26	22
Άνδρες/Γυναίκες	21/5	15/7
Μέση ηλικία (έτη), range	72.5 (48-88)	66.5 (38-97)
Καπνιστές (%)	19 (73)	17 (77)
Μη καπνιστές (%)	7 (27)	5 (23)
Μέση τιμή pack years (py), range	60 (0-100)	30 (0-65)
Διάγνωση	Καρκίνος πνεύμονα 23 Μεταστατική κακοήθεια 3 (2 καρκίνοι του μαστού και 1 καρκίνος του ενδομητρίου) 1	Παραπνευμονικές 11 Αδιάγνωστα εξιδρώματα 7 Καρδιακή ανεπάρκεια 3 Φυματίωση 1

**Πίνακας 3.** Εργαστηριακά χαρακτηριστικά κακοήθων και καλοήθων πλευριτικών συλλογών

<b>Χαρακτηριστικά πλευριτικών συλλογών</b>	<b>Κακοήθεις υπεζωκοτικές συλλογές</b>	<b>Καλοήθεις υπεζωκοτικές συλλογές</b>	<b>p value</b>
Cell count type predominance			
Polymorph nucleates (%)	4/26 (15)	12/22 (55)	
Lymocytes (%)	21/26 (81)	10/22 (45)	
Eosinopliles (%)	1/26 (4)	0/22 (0)	
Median pH, range	7.42 (7.13-7.49)	7.38 (6.50-7.56)	0.15*
Median Glu (mg/dl), range	120.5 (30-329)	104 (1-302)	0.19*
Median LDH (IU/L) , range	277.7 (0-1020)	280 (127-22090)	0.29*
Median total Protein (g/dl), range	4.4 (2.5-5.7)	4.2 (2.9-5.8)	0.95*
Median albumin (g/dl), range	2.8 (1.3-3.6)	2.6 (1.5-3.8)	0.76*

(\*): μη στατιστικά σημαντικό

## Συζήτηση

Οι πλευριτικές συλλογές είναι συχνό εύρημα σε ασθενείς με καρκίνο, και από αυτές 20 % οφείλονται σε εξωπνευμονική κακοήθεια ενώ 50% οφείλονται σε καρκίνο του πνεύμονα (1,2). Η κακοήθη πλευριτική συλλογή μπορεί να αποτελεί την πρώτη εκδήλωση της νόσου σε ποσοστό 10-50 % (3). Οι μέχρι τώρα εργαστηριακές τεχνικές στο πλευριτικό υγρό δεν είναι σε θέση να διαγνώσουν τον καρκίνο πριν αυτός έχει εξαπλωθεί αρκετά, στις περισσότερες των περιπτώσεων. Έτσι, η θνητότητα είναι μεγάλη, και η πενταετή επιβίωση είναι μόνο 5% (4). Η παρουσία της πλευριτικής συλλογής επηρεάζει την πρόγνωση και τη θεραπεία της νόσου. Σήμερα η κυτταρολογική εξέταση αποτελεί την πιο έγκριτη, αναγνωρισμένη και πιστοποιημένη μέθοδο για τη διάγνωση της κακοήθους πλευριτικής συλλογής. Όμως η κυτταρολογική ερμηνεία των πλευριτικών συλλογών μπορεί να διαφέρει από κυτταρολόγο σε κυτταρολόγο, γεγονός που καθιστά τη διαγνωστική ακρίβεια της εξέτασης περιορισμένη (5,6). Η ευαισθησία της κυτταρολογικής εξέτασης κυμαίνεται από 43 έως 71% με ένα μέσο όρο 58% (7-9). Η γενική άποψη είναι ότι ενώ το 40 % των κακοηθών πλευριτικών συλλογών έχουν αρνητική κυτταρολογική εξέταση, υπάρχουν καρκινικά κύτταρα που διαφεύγουν από το μικροσκοπική εξέταση (3). Για το λόγο αυτό, εξετάζονται κάποιες άλλες μέθοδοι που θα μπορούσαν να βελτιώσουν την διαγνωστική ακρίβεια της κυτταρολογικής μεθόδου χωρίς να χρειάζεται να προβούμε σε περισσότερο επεμβατικές τεχνικές.

Ο καρκίνος του πνεύμονα χαρακτηρίζεται από πολλαπλές γενετικές και επιγενετικές αλλαγές, συμπεριλαμβανόμενες και αυτές που έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση κάποιων ογκογονιδίων και την αδρανοποίηση των κατασταλτικών για τον καρκίνο γονιδίων (10,11). Η αστάθεια του μικροδορυφορικού DNA (MSI) έχει βρεθεί σε αρκετές καλοήθειες και νεοπλασματικές νόσους (12-21). Παρόλα αυτά, λίγα είναι τα μέχρι τώρα δεδομένα σχετικά με το ρόλο των μικροδορυφορικών δεικτών σαν ένα επιπλέον εργαλείο, στη βελτίωση της διάγνωσης σε ασθενείς που παρουσιάζονται με de novo πλευριτική συλλογή (22,23).

Γενετικές αλλαγές έχουν βρεθεί σε πολλαπλές χρωμοσωμικές περιοχές (loci) σε μελέτες ανίχνευσης κυττάρων από καρκίνο του πνεύμονα. Η δυνατότητα της ανίχνευσης γενετικών αλλαγών (MSI, LOH) στο μικροδορυφορικό DNA των κυττάρων από τις πλευριτικές συλλογές, νωρίς στην πορεία των συλλογών αυτών δεν είναι ερευνημένο ευρέως, όπως προκύπτει από τη βιβλιογραφία (22,23). Η δικής μας υπόθεση εργασίας ήταν να ανιχνευθούν γενετικές βλάβες στο κυτταρικό ίζημα των κακαοηθών πλευριτικών συλλογών. Για το λόγω αυτό επιλέξαμε 6 μικροδορυφορικούς δείκτες που βρίσκονται σε 5 διαφορετικούς χρωμοσωμικούς τύπους και οι οποίοι σχετίζονται με γονίδια της παθογένειας του καρκίνου του πνεύμονα.

Μέχρι τώρα, μόνο δύο προηγούμενες μελέτες έχουν ασχοληθεί με την ανίχνευση MSI/LOH σε καρκινικές πλευριτικές συλλογές (22,23). Ο Lee και οι συνεργάτες του διερεύνησαν με τις αλλαγές στο μικροδορυφορικό DNA κυττάρων που είχαν διαχωρίσει από το πλευριτικό υγρό 40 ασθενών με κακοήθη πλευριτική συλλογή και 17 με φυματιώδη πλευριτική συλλογή και χρησιμοποιώντας 4 μικροδορυφορικούς δείκτες, D3S1234, D3S1285, D9S171 και TP53. 25 κακοήθεις πλευριτικές συλλογές (63%) έδειξαν αλλαγές (MSI και LOH) σε τουλάχιστον ένα δείκτη, ενώ για τις φυματιώδεις συλλογές το αντίστοιχο ποσοστό ήταν 35%. Οι ερευνητές συμπέραναν ότι η ομάδα με τις φυματιώδεις πλευριτικές συλλογές δεν ήταν μια καλή ομάδα ελέγχου και το λάθος θετικό αποτέλεσμα καθιστούσε τους δείκτες αυτούς μη διαγνωστικούς (22). Σε μια άλλη μελέτη, ο Woencckhaus και οι συνεργάτες του μελέτησαν τις γενετικές αλλαγές στο πλευριτικό υγρό (υπερκείμενο και κυτταρικό ίζημα) 14 ασθενών με κακοήθη συλλογή και 6 με καλοήθη χρησιμοποιώντας 12 μικροδορυφορικούς δείκτες (23). Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων γενετικές αλλοιώσεις ανιχνεύθηκαν σε ποσοστό 91.6% των ιστικών δειγμάτων του όγκου ενώ στο υπερκείμενο των υπεζωκοτικών συλλογών το ποσοστό των γενετικών αλλοιώσεων έφτασε το 71%. Τέσσερις δείκτες (D2S1266, D3S1300, D3S1539, D12S335) δεν ανέδειξαν καμία γενετική αλλαγή στο υπερκείμενο των πλευριτικών συλλογών. Από τη μοριακή ανάλυση του κυτταρικού ιζήματος ανιχνεύθηκαν γενετικές αλλοιώσεις σε ποσοστό 7%, αποτέλεσμα που συμφωνεί με αυτό της μελέτης του Lee (22). Ο Woencckhaus και οι συνεργάτες του επίσης δημοσίευσαν ότι κακοήθη DNA ανευρέθηκε σε ελεύθερα κύτταρα στο πλευριτικό υγρό, όπως και στο



υπερκείμενο του πλευριτικού υγρού. Οι συγγραφείς αυτοί συμπεραίνουν ότι η αυξημένη συγκέντρωση των ελεύθερων νουκλεϊτιδικών οξέων στο υπερκείμενο του πλευριτικού υγρού μπορεί να εξηγηθεί λόγω της αυξημένης διεισδυτικής ικανότητας των κακοηθών κυττάρων (23).

Η πρώτη από τις προαναφερθείσες μελέτες (22) βρήκε MSI σε ποσοστό 15% και LOH σε ποσοστό 25% στο δείκτη D3S1234 στους ασθενείς με κακοήθη πλευριτική συλλογή (22). Σε αντίθεση με το εύρημα αυτό, εμείς βρήκαμε MSI και LOH στο δείκτη αυτό μόνο σε 2 από τους 23 ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα (8.6%). Σε καμία από τις μεταστατικές πλευριτικές συλλογές δεν βρέθηκε MSI και LOH στο κυτταρικό ίζημα. Αλλά βρήκαμε LOH σε 1 ασθενή (4.5%) με παραπνευμονική συλλογή, όπως και ο Lee που ανακοίνωσε LOH σε 17 ασθενείς (17.6%) σε ασθενείς με φυματιώδη συλλογή. Ο δείκτης αυτός βρίσκεται στη χρωμοσωμική θέση 3q14 κωδικοποιώντας το fragile histidine triad γονίδιο (FHIT). Το FHIT γονίδιο συχνά καταστέλλεται στον καρκίνο του πνεύμονα και η επανόρθωσή του σε FHIT-negative cancer cell καταστέλλει την ογκογένεση και προάγει την απόπτωση (22,24,29,30).

Στην ίδια μελέτη ο Lee και οι συνεργάτες του βρήκαν MSI και LOH σε 10 (25%) και σε 1 ασθενή (3%) αντίστοιχα με κακοήθη πλευριτική συλλογή, στο δείκτη D9S171(22). Στη δική μας μελέτη 1 ασθενής με NSCLC παρουσίασε MSI στο δείκτη D9S171. Ο δείκτης αυτός βρίσκεται στη χρωμοσωμική περιοχή 9q22-p21 και κωδικοποιεί ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο (TSGs) το tumor suppressor candidate 1(TUSG 1) (23,31). Μελέτες για το LOH δείχνουν ότι γενετικές αλλαγές του χρωμοσώματος 9p συμβαίνουν σε πολλούς τύπους καρκίνου, γεγονός που σημαίνει ότι η παρουσία TSGs στο χρωμόσωμα 9p είναι πολύ σημαντική για την καρκινογένεση (31).

Η δική μας μελέτη δεν ανέδειξε MSI ή LOH στους δείκτες, D12S363, D5S346 και TP53 που έχουν συσχετισθεί με το ογκογονίδιο KRAS, την αδеноματώδη πολύπωση του εντέρου (APC) και την καρκινική πρωτεΐνη p53 (TP53) αντίστοιχα. Αντίθετα, αντικρουόμενα αποτελέσματα βρέθηκαν στις δύο προηγούμενες μελέτες (22,23). Στη μία μελέτη βρέθηκε LOH στο δείκτη D12S363 μόνο σε μία περίπτωση που σχετίζονταν με

κακοήθεια (23) και μόνο στο κυτταρικό ίζημα, γεγονός που είναι σύμφωνο με τα δικά μας αποτελέσματα. Από την άλλη πλευρά όταν εξετάσθηκε το υπερκείμενο των πλευριτικών υγρών από τους ίδιους ερευνητές, LOH και MSI βρέθηκε σε μεγαλύτερα ποσοστά (23). Στη μελέτη αυτή, LOH βρέθηκε στους δείκτες D12S363 και D5S346 σε 9 από τους 14 ασθενείς, ενώ ένας ασθενής παρουσίασε MSI στους παραπάνω δείκτες (23). Τα γονίδια της οικογένειας *ras* χαρακτηρίζονται ως ογκογονίδια που μεταμορφώνουν τους ρετροϊούς (32). Τρεις ομόλογες *ras* πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από τα γονίδια KRAS, HRAS και NRAS. KRAS μεταλλάξεις συμβαίνουν σε ποσοστό μεγαλύτερο από 90% σε αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος, σε ποσοστό περίπου 40% σε καρκίνο του παχέως εντέρου και σε ποσοστό 33% σε μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονος (33).

Επίσης στη μελέτη μας δεν ανιχνεύθηκε καμία LOH ή/και MSI στο δείκτη TP53Alu, που βρίσκεται στη χρωμοσωμική περιοχή 17P13.1 και κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p53 (TP53). Μεταλλάξεις στο γονίδιο TP53 είναι αρκετά συχνές σε διαφόρους τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου του πνεύμονα (34). Ο καρκίνος του πνεύμονα που συμβαίνει στους μη καπνιστές συχνά παρουσιάζει μετάλλαξη του γονιδίου KRAS και μετάλλαξη στο γονίδιο TP53 που είναι η σπάνια μεταστροφή G→T (35,36) και που σημαίνει ότι υπεύθυνη για τη δημιουργία του καρκίνου αυτού είναι η έκθεση σε καρκινογόνα άλλα, εκτός από τον καπνό του τσιγάρου. Ο Lee και οι συνεργάτες του βρήκαν LOH σε 6 ασθενείς με κακοήθη πλευριτική συλλογή (15%), και σε μία (6%) με φυματιώδη συλλογή (22). MSI, από την άλλη βρέθηκε μόνο σε 3 ασθενείς με κακοήθη συλλογή και σε καμία φυματιώδη συλλογή (22).

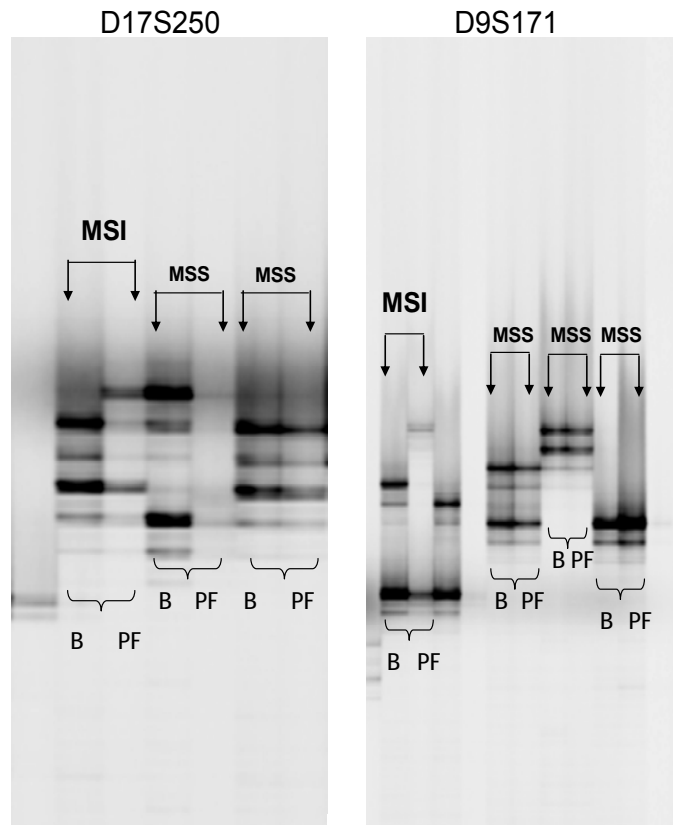
Στη δική μας μελέτη βρέθηκε MSI στο δείκτη D17S250 σε 1 ασθενή με NSCLC, ενώ ο ίδιος ασθενής παρουσίασε MSI και σε 2 διαφορετικούς μικροδορυφορικούς δείκτες D9S171, D3S134. Ο ρόλος του συστήματος διόρθωσης του παθολογικού DNA στην περίπτωση του NSCLC είναι διφορούμενος (37). Η αστάθεια του μικροδορυφορικού DNA συμβαίνει βασικά λόγω της δυσλειτουργίας του hMLH1, ενώ παίζει ρόλο και η υπερμεθίλιωση (HM) της συμβάλλουσας περιοχής (38). Μία πρόσφατη μελέτη αξιολογεί το hMLH1 HM και το φαινότυπο του MSI χρησιμοποιώντας τον D17S250 και 4 ακόμη μικροδορυφορικούς δείκτες σε 94 δείγματα από NSCLC (38). Οι συγγραφείς

δημοσίευσαν ότι hMLH1 HM δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένας επιπλέον διαγνωστικός δείκτης του φαινότυπου του MSI στο NSCLC (38).

Συνοψίζοντας, τονίζουμε ότι πρώτον στη μελέτη μας, σε σύγκριση με τις δύο προηγούμενες μελέτες, χρησιμοποιήσαμε μία μεγαλύτερη ομάδα ελέγχου. Η δική μας ομάδα ελέγχου περιλάμβανε όχι μόνο φυματιώδεις συλλογές αλλά παραπνευμονικές και διυδρώματα. Δεύτερον, αν και χρησιμοποιήσαμε επιπρόσθετες μεθόδους για να συμπυκνώσουμε το πλευριτικό υγρό και να επιτύχουμε έτσι μεγαλύτερη ποσότητα κυττάρων και εκχυλισμένου DNA, δεν μπορέσαμε να επιβεβαιώσουμε τα αποτελέσματα του Lee και των συνεργατών του (22), αφού βρήκαμε μόνο μία περίπτωση LOH σε παραπνευμονική συλλογή ενώ ο Lee βρήκε 35% θετικό ποσοστό στις φυματιώδεις πλευριτικές συλλογές. Οι ίδιοι ερευνητές δημοσίευσαν επίσης 63% LOH και/ή MSI σε ένα τουλάχιστον από τους 4 MSI δείκτες, ενώ εμείς βρήκαμε γενετικές αλλαγές μόνο σε 7.6% των ασθενών με κακοήθη πλευριτική συλλογή χρησιμοποιώντας 6 δείκτες από 5 διαφορετικούς τύπους χρωμοσωμάτων.

Επομένως, η μελέτη μας δείχνει ότι η μοριακή ανάλυση του μικροδορυφορικού DNA του κυτταρικού ιζήματος των πλευριτικών συλλογών δεν μπορεί να αυξήσει την ευαισθησία της κυτταρολογικής εξέτασης. Τα αποτελέσματά μας είναι σύμφωνα με αυτά του Woenckhaus και των συνεργατών του (23) όσον αφορά το κυτταρικό ίζημα όπου βρήκαν θετικό αποτέλεσμα σε ποσοστό 7% και αντικρουόμενα με τα αποτελέσματα του Lee και της ομάδας του (22).

**Εικόνα 1:** Αντιπροσωπευτική εικόνα Microsatellite Instability (MSI) και Microsatellite Stability (MSS) σε δύο διαφορετικούς μικροδορυφορικούς δείκτες (D17S250, D9S171)



## **Βιβλιογραφία**

1. Black RJ, Bray F, Ferlay J, et al. Cancer Incidence and Mortality in the European Union: cancer registry data and estimates of national incidence for 1990. *Eur J Cancer* 1997;33: 1075–1107
2. Marel M, Stastny B, Melinova L, Svandova E, Light RW. Diagnosis of pleural effusions. Experience with clinical studies, 1986 to 1990. *Chest* 1995;107:1598-603
3. Fenton KN, Richardson JD. Diagnosis and management of malignant pleural effusions. *Am J Surg.* 1995;170: 69-74
4. Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, et al. Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin* 2001;51:15–36
5. Garcia-Bonafe M, Moragas A. Differential diagnosis of malignant and reactive cells from serous effusions: image and texture analysis study. *Anal Cell Pathol.* 1996;12:85-98
6. Kjellberg SI, Dresler CM, Goldberg M. Pleural cytologies in lung cancer without pleural effusions. *Ann Thorac Surg.* 1997;64:941-4
7. Martensson G, Pettersson K, Thiringer G. Differentiation between malignant and non-malignant pleural effusion. *Eur J Respir Dis.* 1985;67:326-34
8. Nance KV, Shermer RW, Askin FB. Diagnostic efficacy of pleural biopsy as compared with that of pleural fluid examination. *Mod Pathol.* 1991;4:320-4
9. Motherby H, Nadjari B, Friegel P, Kohaus J, Ramp U, Bocking A. Diagnostic accuracy of effusion cytology. *Diagn Cytopathol.* 1999;20:350-7
10. Rodenhuis, S., and Slebos, R. J. C. Clinical significance of ras oncogene activation in human lung cancer. *Cancer Res* 1992;52:2665s-2669s
11. Boutin C, Viallat JR, Cargnino P, Farisse P. Thoracoscopy in malignant pleural effusions. *Am Rev Respir Dis.* 1981;124:588-92
12. Samara K, Zervou M, Siafakas NM, Tzortzaki EG. Microsatellite DNA instability in benign lung diseases. *Respir Med.* 2006;100:202-11
13. Froudarakis ME, Sourvinos G, Fournel P, Bouros D, Vergnon JM, Spandidos DA, Siafakas NM. Microsatellite instability and loss of heterozygosity at chromosomes 9 and 17 in non-small cell lung cancer. *Chest.* 1998;113:1091-4
14. Siafakas NM, Tzortzaki EG, Sourvinos G, Bouros D, Tzanakis N, Kafatos A, Spandidos D. Microsatellite DNA instability in COPD *Chest.* 1999;116:47-51.

15. Vassilakis DA, Sourvinos G, Spandidos DA, Siafakas NM, Bouros D. Frequent genetic alterations at the microsatellite level in cytologic sputum samples of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162:1115-9.
16. Paraskakis E, Sourvinos G, Passam F, Tzanakis N, Tzortzaki EG, Zervou M, Spandidos D, Siafakas NM. Microsatellite DNA instability and loss of heterozygosity in bronchial asthma. *Eur Respir J.* 2003 Dec;22:951-5
17. Zervou MI, Tzortzaki EG, Makris D, Gaga M, Zervas E, Economidou E, Tsumakidou M, Tzanakis N, Milic-Emili, Siafakas NM. Differences in microsatellite DNA level between asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 2006;28:472-8.
18. Sourvinos G, Kiaris H, Tsikkinis A, Vassilaros S, Spandidos DA. Microsatellite instability and loss of heterozygosity in primary breast tumours. *Tumour Biol.* 1997;18:157-66
19. Sourvinos G, Tsatsanis C, Spandidos DA. Overexpression of the Tpl-2/Cot oncogene in human breast cancer. *Oncogene.* 1999 2;18:4968-73
20. Miyakis S, Spandidos DA. Allelic loss in breast cancer. *Cancer Detect Prev.* 2002;26:426-34
21. Arvanitis DA, Papadakis E, Zafiropoulos A, Spandidos DA. Fractional allele loss is a valuable marker for human lung cancer detection in sputum. *Lung Cancer.* 2003;40:55-66
22. Lee JH, Hong YS, Ryu JS, Chang JH. p53 and FHIT mutations and microsatellite alterations in malignancy-associated pleural effusion. *Lung Cancer.* 2004;44:33-42
23. Woenckhaus M, Grepmeier U, Werner B, Schulz C, Rockmann F, Wild PJ, Rockelein G, Blaszyk H, Schuierer M, Hofstaedter F, Hartmann A, Dietmaier W. Microsatellite analysis of pleural supernatants could increase sensitivity of pleural fluid cytology. *J Mol Diagn.* 2005;7:517-24
24. Toledo G, Sola JJ, Lozano MD, Soria E, Pardo J. Loss of FHIT protein expression is related to high proliferation, low apoptosis and worse prognosis in non-small-cell lung cancer. *Mod Pathol.* 2004;17:440-8
25. Wiest JS, Franklin WA, Otstot JT, Forbey K, Varella-Garcia M, Rao K, Drabkin H, Gemmill R, Ahrent S, Sidransky D, Saccomanno G, Fountain JW, Anderson MW. Identification of a novel region of homozygous deletion on chromosome 9p in squamous

cell carcinoma of the lung: the location of a putative tumor suppressor gene. *Cancer Res.* 1997;57:1-6

26. Divine KK, Pulling LC, Marron-Terada PG, Liechty KC, Kang T, Schwartz AG, Bocklage TJ, Coons TA, Gilliland FD, Belinsky SA. Multiplicity of abnormal promoter methylation in lung adenocarcinomas from smokers and never smokers. *Int J Cancer.* 2005;114:400-5

27. Sarkar FH, Valdivieso M, Borders J, Yao KL, Raval MM, Madan SK, Sreepathi P, Shimoyama R, Steiger Z, Visscher DW, et al. A universal method for the mutational analysis of K-ras and p53 gene in non-small-cell lung cancer using formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Diagn Mol Pathol.* 1995;4:266-73.

28. Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, Nomura M, Suzuki M, Wistuba II, Fong KM, Lee H, Toyooka S, Shimizu N, Fujisawa T, Feng Z, Roth JA, Herz J, Minna JD, Gazdar AF. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97:339-46.

29. Kim CH, Yoo JS, Lee CT, Kim YW, Han SK, Shim YS, Yoo CG. FHIT protein enhances paclitaxel-induced apoptosis in lung cancer cells. *Int J Cancer.* 2006;118:1692-8

30. Roz L, Andriani F, Ferreira CG, Giaccone G, Sozzi G. The apoptotic pathway triggered by the Fhit protein in lung cancer cell lines is not affected by Bcl-2 or Bcl-x(L) overexpression. *Oncogene.* 2004 2;23:9102-10

31. Shan Z, Parker T, Wiest JS. Identifying novel homozygous deletions by microsatellite analysis and characterization of tumor suppressor candidate 1 gene, TUSC1, on chromosome 9p in human lung cancer. *Oncogene.* 2004;23:6612-20

32. Der CJ, Krontiris TG, Cooper GM. Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982;79:3637-3640

33. Adjei AA. Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93:1062-1074

34. Sanz-Ortega J, Roig F, Al-Mousa MM, Saez MC, Munoz A, Sanz-Esponera J, Callol L. 17p13 (p53 locus), 5q21 (APC locus) and 9p21 (p16 locus) allelic deletions are frequently found

in oral exfoliative cytology cells from smoker patients with non-small-cell lung cancer. *Histol Histopathol.* 2007;22:541-5

35. Le Calvez F, Mukeria A, Hunt JD, Kelm O, Hung RJ, Taniere P, Brennan P, Boffetta P, Zaridze DG, Hainaut P. TP53 and KRAS mutation load and types in lung cancers in relation to tobacco smoke: distinct patterns in never, former, and current smokers. *Cancer Res* 2005;65:5076-83

36. Vahakangas KH, Bennett WP, Castren K, Welsh JA, Khan MA, Blomeke B, Alavanja MC, Harris CC. p53 and K-ras mutations in lung cancers from former and never-smoking women. *Cancer Res.*2001;61:4350-6

37. Shayek H, Krupsky M, Yaron A, Simansky DA, Friedman E. Genetic analyses of non-small cell lung cancer in Jewish Israeli patients. *Isr Med Assoc J.* 2006;8:159-163

38. Okuda T, Kawakami K, Ishiguro K, Oda M, Omura K, Watanabe G. The profile of hMLH 1 methylation and microsatellite instability in colorectal and non-small cell lung cancer. *Int J Mol Med.* 2005;15:85-90



## **Τελικά συμπεράσματα και μελλοντικές κατευθύνσεις**

Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί την σημαντικότερη αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως. Ο μέσος όρος πενταετούς επιβίωσης των ασθενών αυτών παραμένει χαμηλός παρά την πρόοδο που έχει γίνει στο επίπεδο της χημειοθεραπείας. Η κακοήθης πλευριτική συλλογή προσδίδει επιπλέον κακή πρόγνωση στους ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα και σχετίζεται με μεγαλύτερη θνητότητα και θνησιμότητα. Οι θεραπείες που εφαρμόζονται συνήθως για το έλεγχο των κακοηθών πλευριτικών συλλογών δεν έχουν επιφέρει καμία βελτίωση στην επιβίωση των ασθενών αυτών.

Οι κακοήθεις πλευριτικές συλλογές μπορεί να δημιουργηθούν λόγω απευθείας διασποράς των καρκινικών κυττάρων στην υπεζωκοτική κοιλότητα, όμως ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι πλήρως γνωστός. Η αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων παίζει κυρίαρχο ρόλο στη δημιουργία των εξιδρωματικών πλευριτικών συλλογών. Παρόλα αυτά ο ρόλος της αγγειογένεσης στην παθογένεια των πλευριτικών συλλογών δεν έχει μελετηθεί πλήρως.

Η αγγειογένεση είναι ένα φυσιολογικό βιολογικό φαινόμενο που σχετίζεται με τη δημιουργία νέων αγγείων σε φυσιολογικές αλλά και παθολογικές καταστάσεις. Αγγειογενετικές κυτταροκίνες όπως ο VEGF έχει φανεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια των κακοηθών πλευριτικών συλλογών, όμως η έκφραση του VEGF μοιράζεται μεταξύ των κακοηθών και καλοηθών πλευριτικών συλλογών. Η ομάδα μας έδειξε ότι ενώ ο VEGF είναι ένας από τους σημαντικότερους μεσολαβητές για τη δημιουργία των κακοηθών εξιδρωματικών συλλογών, αυτό δεν επιτυγχάνεται μέσω του αγγειογενετικού μονοπατιού του υποδοχέα των αγγειοποιητινών Tie-2. Επίσης δείξαμε ότι ο VEGF μαζί με την Ang-2 και όχι με την Ang-1, συμμετέχουν στην πλευριτική φλεγμονή. Σημαντικό εύρημα που προέκυψε από τις μελέτες της ομάδας μας είναι η αλληλεπίδραση του VEGF με τον SDF στις κακοήθεις πλευριτικές συλλογές. Το εύρημα αυτό δείχνει ότι ο VEGF δεν συμμετέχει μόνο στην πλευριτική φλεγμονή αλλά μαζί με τον SDF και στην παθοφυσιολογία των πνευμονικών μεταστάσεων. Τα νέα αυτά δεδομένα πρέπει να μας οδηγήσουν προς νέες θεραπευτικές εφαρμογές που σκοπό θα

έχουν την ρύθμιση της κυκλοφορίας των αιμοποιητικών και λεμφοποιητικών κυττάρων και την αναστολή της μεταστατικής συμπεριφοράς των καρκινικών κυττάρων.

Συμπερασματικά αποτιμώντας τη σπουδαιότητα της αγγειογένεσης στις κακοήθειες καταστάσεις, πρέπει να προσπαθήσουμε να κατανοήσουμε την μη φυσιολογική αγγειογένεση που συμβαίνει μέσα και κοντά στην κακοήθεια, διερευνώντας τα σήματα που ρυθμίζουν κάποια ειδικά γονιδιακά προϊόντα, που αυτά με τη σειρά τους προάγουν και διαιωνίζουν την ανώμαλη αγγειογένεση στους όγκους, ειδικά κάτω από καταστάσεις όπου το μικροπεριβάλλον αλλάζει με το χρόνο ή αλλάζει σαν απάντηση σε θεραπευτικές παρεμβάσεις. Αυτό σημαίνει ότι πρέπει να ψάξουμε στο μικροπεριβάλλον των κακοηθειών για εύρεση επιλέον αγγειογενετικών παραγόντων που σχετίζονται με τις κακοήθειες και να σχεδιάσουμε καταλληλότερες θεραπευτικές στρατηγικές που θα στοχεύουν σε περισσότερους από ένα αγγειογενετικούς παράγοντες.

Στη μελέτη μας προσπαθήσαμε να εξετάσουμε επίσης κάποιες μεθόδους που θα μπορούσαν να βελτιώσουν την διαγνωστική ακρίβεια της κυτταρολογικής εξέτασης, χωρίς να χρειάζεται να προβούμε σε περισσότερο επεμβατικές τεχνικές, διότι οι μέχρι τώρα εργαστηριακές τεχνικές στο πλευριτικό υγρό δεν είναι σε θέση να διαγνώσουν τον καρκίνο πριν αυτός έχει εξαπλωθεί αρκετά, στις περισσότερες των περιπτώσεων.

Η γενική άποψη είναι ότι ενώ στο 40 % των κακοηθών πλευριτικών συλλογών που έχουν αρνητική κυτταρολογική εξέταση, υπάρχουν καρκινικά κύτταρα που διαφεύγουν από το μικροσκοπική εξέταση, ενώ η δυνατότητα της ανίχνευσης γενετικών αλλαγών (MSI, LOH) στο μικροδορυφορικό DNA των κυττάρων από τις πλευριτικές συλλογές, νωρίς στην πορεία των συλλογών αυτών δεν είναι ερευνημένο ευρέως.

Η δικής μας υπόθεση εργασίας ήταν να ανιχνευθούν γενετικές βλάβες στο κυτταρικό ίζημα των κακοηθών πλευριτικών συλλογών. Όμως, η μελέτη μας έδειξε ότι η μοριακή ανάλυση του μικροδορυφορικού DNA του κυτταρικού ιζήματος των πλευριτικών συλλογών δεν μπορεί να αυξήσει την ευαισθησία της κυτταρολογικής εξέτασης.

## Summary

Lung cancer ranks as the leading cause of death from cancer worldwide. Most patients present with locally advanced (37%) or metastatic (38%) disease at the time of diagnosis. The average 5-year survival rate of these patients remains extremely poor despite advances in chemotherapy. Malignant pleural effusion (PE) is the most often caused by lung adenocarcinoma, because this type often forms a primary tumor in the periphery of the lung and invades the pleural cavity. Malignant PE indicates a poor prognosis in patients with advanced lung cancer, being associated with high morbidity and mortality in non-small cell lung cancer (NSCLC). Distinguishing malignant from benign pleural effusions using routine cytological evaluation is a common diagnostic problem. Currently, 40% of patients remain undiagnosed after cytologic examination. The therapies which are commonly used to control malignant PE do not extend the survival of these patients.

Malignant PEs can develop as a direct consequence of cancer cell dissemination into the pleural space, however the exact mechanisms are not fully understood. Increased vascular permeability and leakage play a principal role in the development of exudative pleural PEs. However, the role of angiogenesis in the pathogenesis of PE has not been extensively studied. Angiogenesis is controlled by a balance of positive and negative regulators involved in multiple pathways that result in endothelial cell proliferation, differentiation and organization into a functional network of vascular channels. These regulatory factors have a potent angiogenic effect, and their precise coordination is essential for vascular development. Angiogenic cytokines, such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) are candidates for the induction of pleural effusions because they have been implicated in the induction of neovascularization, vascular permeability, and hemorrhage both in the inflammatory process and in tumor progression. Thus, the expression of angiogenic factors may represent useful markers for diagnosis and prediction of disease outcome.

VEGF has been reported to play an important role in the development of certain types of effusion. Several studies indicate that VEGF is consistently higher in exudative than in

transudative pleural effusions. Effusions associated with malignancies seem to have higher levels of VEGF than benign effusions. It has been suggested that increased VEGF levels in the malignant pleural effusions increases vascular permeability and contributes to fluid accumulation. Despite the statistically significant differences in pleural fluid VEGF levels between malignant and non malignant effusions, substantial overlap exists, suggesting that VEGF levels are unlikely to be useful diagnostically as a single marker.

Recently, another endothelial cell-specific receptor tyrosine kinase (Tie2) and its ligand family, angiopoietin-1 (Ang-1) and angiopoietin-2 (Ang-2), have been shown to mediate different functions of angiogenesis. Identified on the basis of homology screening, Ang-2 acts as an alternative ligand for Tie-2 and binds to Tie-2 with similar affinity, but competitively antagonizes Ang-1 effects with blockage of Tie-2 phosphorylation and activation. Functionally, transgenic mice over-expressing Ang-2 show similar defects as the Ang-1 or Tie-2 deficient mice, suggesting that Ang-2 acts as a natural antagonist to Ang-1/Tie-2 action. In line with this notion, it has been recently reported that Ang-2 levels but not Ang-1 levels are elevated in exudative PEs suggesting that Ang-2 along with VEGF participate in pleural inflammation and the pathogenesis of exudative PEs. On the contrary, it was suggested that Ang2 may have a direct role in stimulating Tie-2 receptor signaling and inducing in vitro angiogenesis. These findings indicate that the physiological role of Ang-2 is more complex than previously recognized: acting alternately to promote or blunt Tie-2 receptor signaling in endothelial cells, depending on local conditions .

To the best of our knowledge, the role of Tie-2 in the pathogenesis of PEs has not been investigated. The aim of the present study was to determine the levels of VEGF, bFGF, and Tie-2 in PF and corresponding serum samples of patients with PEs, in order to further evaluate the signalling pathway of VEGF through the angiopoietins' receptor, Tie-2. Sixty-seven, 17 with transudative PEs due to heart failure and 50 with exudative PEs (malignant, 22; inflammatory, 15; undiagnosed, 13) were included in the study. PF and serum levels of the growth factors (VEGF, bFGF and Tie-2) were measured using enzyme-linked immunosorbent assays. PF and serum VEGF levels but not bFGF and Tie-2 levels were higher ( $p < 0.005$ ) in exudates than in transudates. PF VEGF levels were

significantly higher in malignant than inflammatory and undiagnosed PEs ( $p=0.03$ ). In addition, PF Tie-2 levels were not found different in malignant or in parapneumonic PEs. Our results showed that VEGF is one of the cardinal mediators in exudative pleural effusions, but this effect is not mediated through the angiogenic pathway Ang1/Tie-2. However, the role of angiogenesis and its pathways in the pathogenesis of exudative pleural effusions needs further exploration.

Tumor cell migration and metastasis share many similarities with leukocyte trafficking, which is critically regulated by chemokines and their receptors. Chemokines are small cytokine-like peptides that direct various subsets of hematopoietic cells to home-specific anatomical sites through interaction with their G protein-coupled receptors. Much attention has been paid to one particular member of the chemokine receptor family, termed CXCR4, because of its key role in HIV infection. Stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  (SDF-1 $\alpha$ /CXCL12) is a member of the CXC chemokine family that has been found to recruit CD34 $^{+}$  hematopoietic progenitor cell, megakaryocytes, B cells and T cells. The SDF-1 $\alpha$ /CXCL12 was expressed on target tissues. Although, most chemokine receptors bind several chemokines, CXCR4 is a specific chemokine receptor because it only interacts with SDF-1 $\alpha$ . The involvement of CXCR4 and SDF-1 $\alpha$  in these processes makes this chemokine-receptor pair of particular interest in the tumor metastasis. Recently, many studies have demonstrated that the metastatic propensity of tumors from several different types of cancer including lung, breast, ovarian, renal and prostate is related to the expression of the chemokine receptor CXCR4. Furthermore, in both NSCLC and breast cancer it has been shown that the ligand for CXCR4, CXCL12, exhibited peak levels of expression in organs that were the preferred destination for their respective metastases.

A better understanding of the molecular mechanisms that are involved in cancer cell dissemination is required to understand the process of malignant PE formation and to find ways to design new and effective therapies. So, in our study, we hypothesized that interaction of SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 axis and VEGF through angiopoietins' expression may be involved in the formation of malignant PEs. We have investigated the expression of the

above biological axis in order to identify alterations that may be implicated in the mechanisms of metastases in the pleural space in lung cancer.

Twenty five patients, seven with transudative PEs due to heart failure and 18 with exudative malignant PEs (7 with SCLC and 11 with NSCLC) were prospectively included in the study. Expression analysis of VEGF and angiopoietins 1 and 2, and CXCL12 (both transcripts, TR1 and TR2) /CXCR4 analysis was performed in pleural fluid pellet using real-time RT-PCR. Protein expression has been evaluated by western blot analysis for VEGF and SDF. PF SDF-TR1 ( $p=0.02$ ) but not SDF-TR2 ( $p=0.23$ ) or CXCR4 levels ( $p=0.23$ ) were higher in malignant PEs than in transudates. PF SDF-TR1 ( $p=0.04$ ) and SDF-TR2 levels ( $p=0.04$ ) but not CXCR4 levels ( $p=0.123$ ) were higher in SCLC PEs than in heart failure PEs. PF SDF-TR1 ( $p=0.03$ ) but not SDF-TR2 levels ( $p=0.6$ ) and CXCR4 levels ( $p=0.4$ ) were higher in NSCLC PEs than in transudates. Ang-1 has not been expressed in PEs, while no significant difference has been detected in VEGF and Ang-2 expression between malignant PEs and transudates. However, protein expression showed increased VEGF and SDF expression in malignant PEs. SDF-1 $\alpha$  but not CXCR4 levels are elevated in malignant PEs. In addition, VEGF does not seem to mediate pleural fluid pathophysiology through angiopoietins. Therefore these results may suggest that SDF-1 $\alpha$  participate in pleural trafficking in lung cancer.

Pleural effusions are commonly found in patients with cancer, about 20% of pleural effusions are due to malignancy and 50% of these are due to lung cancer. A malignant pleural effusion may be the initial presentation of cancer in 10-50% of patients. Current clinical techniques are not capable, in the majority of lung cancer cases, to detect tumors before they have already progressed beyond effective treatment, consequently, there is a high mortality rate with a five year overall survival rate of 5%. The diagnosis of the effusion acts directly on the prognosis and the treatment of the disease. So, it is clearly important to detect any cancer cells in the fluid with the greatest specificity and sensitivity. Cytology is the standard method used for the diagnosis of malignant effusion. However, the cytological interpretation of pleural fluids can be challenging, and its

diagnostic accuracy is limited. The sensitivity of conventional cytology ranges from 43% to 71% with an average of 58%. A generally accepted view is that despite 40% of malignant effusions have negative cytology, there exists in the pleural fluid cancer cells that escape light microscopy detection. Thus, many additional methods have been evaluated to improve the diagnostic accuracy and to avoid further invasive diagnostic techniques.

Lung cancer is characterized by the accumulation of multiple genetic and/or epigenetic alterations, including those that result in the activation of oncogene and the inactivation of tumor suppressor genes. Genetic damage has been identified at multiple chromosomal sites (i.e., loci) in lung cancer cells. Deoxyribonucleic acid (DNA) microsatellites (MSI) are highly polymorphic markers used for genome mapping in many organisms, including humans. Microsatellite DNA instability (MSI) has been investigated in a wide range of benign and neoplastic disorders by our and other groups.

However, there are only few reports evaluating the role of genetic markers as a clinical tool to improve the diagnostic yield of patients who present with a de novo pleural effusion. In order to determine if the molecular analysis of pleural fluid pellet could improve diagnostic utility, we investigated LOH and MSI in six microsatellite markers D17S250, D9S171, D3S1234, D12S363, D5S346, TP53Alu at 6 different chromosomal regions.

Pleural fluid (11 transudates and 37 exudates) and peripheral blood from 48 patients (36 male and 12 female, median age 71 years) were analyzed. Twenty six patients had malignancy pleural effusion, including twenty three lung cancer and three metastatic nonpulmonary carcinoma. The control group with benign pleural effusions was included undiagnosed exudates (n=7), transudates due to congestive heart failure (n=3), parapneumonic effusions (n=11), TBC effusion (n=1). Only fourteen malignancy associated pleural effusions were cytology positive for tumor cells, whereas all twenty two patients with benign pleural effusions were diagnosed correctly as negative for malignancy cells in routinely prepared cytology specimens. DNA was extracted from all the samples and analysed for MSI and LOH using the following microsatellite markers:

D3S1234, D9S171, D12S363, D17S250, D5S346 and TP53Alu, who were located at five chromosomal regions: 3p, 9p, 12q, 17q, 5q. Microsatellite analysis of the pleural fluid's pellet showed genetic alteration in two neoplastic pleural fluids cases and in one inflammatory pleural fluid. MSI and LOH were detected in a few cases of pleural effusions and not only in neoplastic origin. Our data suggest that microsatellite analysis does not increase the sensitivity of cytological pleural fluid diagnosis.



## ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ

**1.** Microsatellite DNA analysis does not distinguish malignant from benign pleural effusions.

Economidou F, Tzortzaki EG, Schiza S, Antoniou KM, Neofytou E, Zervou M, Lambiri I, Siafakas NM

Oncol Rep. 2007;18:1507-12

**2.** Angiogenic molecule Tie-2 and VEGF in the pathogenesis of pleural effusions.

Economidou F, Antoniou KM, Tzanakis N, Sfiridaki K, Siafakas NM, Schiza SE.

Respir Med. 2008;102:774-779

**3.** Functional interaction of the biological axis of VEGF-Stromal cell derived factor-1 $\alpha$  (SDF-1 $\alpha$ /CXCL12) in malignant pleural effusion of patients with lung cancer

Economidou F, Antoniou KM, Soufla G, Lasithiotaki I, Lymbouridou R, Proklou A, Karagiannis K, Spandidos D, Siafakas NM.

(Cancer Letters, Under Submission)

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΩΝ

**1. Investigation of genetic alteration in malignant and infectious pleural fluid: preliminary results**

F. Economidou, M. Zervou, K. Samara, E. Tzortzaki, S. Shiza, M. Pougounias, N. Sifakas  
Department of Thoracic Medicine, Medical School, University of Crete, Heraklion Crete  
E-posteur, ERS Annual Congress 2006, in Munich, Germany, September 2-6, 2006

**2. Ο ρόλος της αγγειογένεσης στην διαφοροδιάγνωση των πλευριτικών συλλογών: προκαταρκτικά αποτελέσματα**

Οικονομίδου Φ., Αντωνίου Κ., Σφυριδάκη Κ., Τζανάκης Ν., Σιαφάκας Ν., Σχίζα Σ.  
Πνευμονολογική Κλινική Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης  
Αναρτημένη ανακοίνωση στο 15<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, 2-5  
Νοεμβρίου 2006 Κρήτη

**3. Διερεύνηση των γενετικών αλλοιώσεων σε κακοήθεις και φλεγμονώδεις πλευριτικές συλλογές: προκαταρκτικά αποτελέσματα**

Οικονομίδου Φ., Ζερβού Μ., Σαμαρά Κ., Σχίζα Σ., Τζωρτζάκη Ε., Σιαφάκας Ν.  
Πνευμονολογική Κλινική Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης  
Αναρτημένη ανακοίνωση στο 15<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, 2-5  
Νοεμβρίου 2006 Κρήτη

**4. The role of angiogenesis in the differential diagnosis of pleural effusions**

F. Economidou, MD, K.M. Antoniou, MD, K. Sfiridaki, MD, N.M. Sifakas, Prof, S.E. Schiza MD

Department of Thoracic Medicine, University General Hospital, Heraklion, Greece  
Department of Hematology, Venizeleion General Hospital Heraklion, Greece  
Poster Presentation at annual congress of American Thoracic Society, San Francisco, May 2007

**5. Could Microsatellite Analysis of pleural fluid increase sensitivity of pleural fluid cytology?**

Economidou F., Tzortzaki EG., Neofytou E., Antoniou KM., Tzanakis N., Sifakas NM., Schiza S.

Department of Thoracic Medicine of University Hospital, Heraklion, Grete, Greece

Electronic Poster Discussion, Annual Congress of European Respiratory Society, Stockholm, Sweden, 15-19 September 2007

**6.** Η ανάλυση του μικροδορυφορικού DNA δεν διαχωρίζει τις κακοήθειες από τις καλοήθειες πλευριτικές συλλογές

Φ.Οικονομίδου, Ε.Τζωρτζάκη, Σ.Σχίζα, Κ.Αντωνίου, Ε.Νεοφύτου, Μ.Ζερβού, Κ.Σαμαρά, Γ.Σκουλά, Ν.Σιαφάκας

Πνευμονολογική Κλινική Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης, Ερευνητικό Εργαστήριο Πνευμονολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης

Προφορική ανακοίνωση στο 16<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος

6-9 Δεκεμβρίου 2007, Αθήνα Ξενοδοχείο Hilton

**7.** Increased expression of angiogenic growth factor stromal cell derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) in pleural fluid of patients with lung cancer: preliminary results

Foteini Economidou, Katerina Antoniou, Giannoula Soufla, Athanasia Proklou, Rena Lymbouridou, George Maltezas, Nikolaos Tzanakis, Nikolaos Siafakas

Dept. of Thoracic Medicine, Dept. of Virology, Medical School, University of Crete, Heraklion, Greece

Poster Presentasion, Annual Congress of European Respiratory Society, Berlin, Germany, 4-8 October 2008

**8.** Αυξημένη έκφραση του αγγειογενετικού παράγοντα stromal cell derived factor-1 σε κακοήθειες πλευριτικές συλλογές: προκαταρκτικά αποτελέσματα

Φωτεινή Οικονομίδου, Κατερίνα Αντωνίου, Γιαννούλα Σούφλα, Ρένα Λυμπουρίδου, Αθανασία Πρόκλου, Δέσποινα Μωραϊτάκη, Νικόλαος Τζανάκης, Νικόλαος Σιαφάκας

Εργαστήριο Πνευμονολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης και Εργαστήριο Ιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης

Αναρτημένη ανακοίνωση στο 17<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, 20-23 Νοεμβρίου 2008, Αλεξανδρούπολη

## **ΑΝΑΤΥΠΑ ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ**