

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

Διευθυντής: Καθηγητής κ. Νικόλαος Σιαφάκας

**«Μελέτη της αστάθειας του μικροδορυφορικού
DNA σε υποπληθυσμούς κυττάρων σε χρόνια
αποφρακτική νόσο των πνευμόνων».**

**ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ Δ. ΣΑΜΑΡΑ
Ιατρός - Πνευμονολόγος**

Ηράκλειο 2010

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	2
ΑΦΙΕΡΩΣΗ.....	3
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	4
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ.....	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	24
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	
Κεφάλαιο 1: Χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια.....	39
Κεφάλαιο 2: Αστάθεια μικροδορυφορικού DNA.....	74
Κεφάλαιο 3: Μια υπόθεση για τα αρχικά παθογενετικά γεγονότα στη ΧΑΠ	88
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
Αναζήτηση αστάθειας μικροδορυφορικού DNA σε υπο- πληθυσμούς κυττάρων πτυέλων και βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος ασθενών με ΧΑΠ.....	97
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ	122
ΑΝΑΤΥΠΑ ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ.....	123

ΑΦΙΕΡΩΣΗ

Στον σύζυγο μου Αλέξανδρο
και στην μου κόρη Φάννυ
με πολύ αγάπη

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής θα ήθελα να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου τον δάσκαλο μου, Καθηγητή κ. Νικόλαο Σιαφάκα, για την εμπιστοσύνη του στο πρόσωπο μου και την καθοδήγηση του κατά την διάρκεια εκπόνησης αυτής της διατριβής. Υπήρξε ο άνθρωπος που από τα φοιτητικά μου ακόμα χρόνια με ενέπνευσε να ασχοληθώ με την ειδικότητα της Πνευμονολογίας αλλά και με την ιατρική έρευνα. Θα είμαι πάντοτε ευγνώμων για την υποστήριξη του και τις πολύτιμες συμβουλές του.

Οφείλω επίσης να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Νικόλαο Τζανάκη, χωρίς την καθοδήγηση του οποίου θα ήταν αδύνατη η ολοκλήρωση αυτής της διατριβής.

Θέλω δε να ευχαριστήσω θερμά την Επίκουρη Καθηγήτρια Πνευμονολογίας κ. Ελένη Τζωρτζάκη, υπεύθυνη του εργαστηρίου Μοριακής Πνευμονολογίας, για την αμέριστη συμπαράσταση και υποστήριξη της, καθώς και για την έμπρακτη βοήθεια της κατά την εκπόνηση της διατριβής μου.

Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω την κ. Ελένη Κουταλά και την κ. Ειρήνη Νεοφύτου για την άμογη συνεργασία, την τεχνική τους υποστήριξη, την βοήθεια και τις συμβουλές τους. Επίσης ευχαριστώ τις κυρίες Ειρήνη Ρογδάκη και Ρένα Μιχαλάκη για την βοήθεια τους.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου Φάννυ και Δημήτρη και στην αδερφή μου Ιωάννα για την αγάπη, την εμπιστοσύνη και την υποστήριξη τους.

Ηράκλειο, Φεβρουάριος 2010

Κατερίνα Σαμαρά

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

ΟΝΟΜΑ:	Αικατερίνη Δ. Σαμαρά
ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ:	25 Μαρτίου, 1977
ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ:	Μαρούσι Αττικής
ΥΠΗΚΟΟΤΗΤΑ:	Ελληνική
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ:	Έγγαμος, μητέρα μιας κόρης
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ:	Δαμβέργηδων 52, 71202 Ηράκλειο Κρήτης
ΤΗΛΕΦΩΝΟ ΟΙΚΙΑΣ:	+30 2810 283101 κινητό +3069368092192
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:	Πνευμονολογική Κλινική Πα.Γ.Ν.Η. 71110 Ηράκλειο Κρήτης
ΤΗΛΕΦΩΝΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:	+30 2810 371966
E-MAIL ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ:	kat_samara@hotmail.com
FAX ΕΡΓΑΣΙΑΣ:	+30 2810 542057

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

ΜΕΣΗ & ΑΝΩΤΕΡΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

1988 – 1991: 5^ο Γυμνάσιο Βόλου
(Απολυτήριο με βαθμό Άριστα)

1991 – 1994: 2^ο Γενικό Λύκειο Βόλου
(Απολυτήριο με βαθμό Άριστα, 19 11/12)

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

Αγγλικά

- 1989: First Certificate in English, Univ of Cambridge UK
1991: Certificate of Proficiency in English, Univ of Michigan USA
1991: Certificate of Proficiency in English, Univ of Cambridge UK

Γαλλικά

- 1989 : Certificat de Langue Française
1991 : Certificat Pratique de Langue Française (Sorbonne 1er Degré) Université Paris Sorbonne
1992 : Diplôme d'Etudes Françaises (Sorbonne 2eme Degré) Université Paris Sorbonne
1993 : D.E.L.F. 1er et 2eme degré (Diplôme élémentaire de langue française) Centre international d'études pédagogiques (CIEP) Ministère d' Education de France.
1994 : D.A.L.F. (Diplôme approfondi de langue française) Centre international d'études pédagogiques (CIEP) Ministère d' Education de France.

Γερμανικά

1993 : Zertificat (Grundstufe), Goethe Institut

ΑΝΩΤΑΤΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

06.1994: Εισαγωγή κατόπιν πανελληνίων εξετάσεων στο
 Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης

10.1994 – 07.2000: Φοίτηση στο Τμήμα Ιατρικής,
 Σχολή Επιστημών Υγείας,
 Πανεπιστήμιο Κρήτης,
 Πτυχίο Ιατρικής (Λίαν Καλώς 7,32)

Κλινική Άσκηση σε Πανεπιστήμια του Εξωτερικού

08.1998 – 09.1998: Κλινική άσκηση στην Οφθαλμολογία
 Massachusetts Eye&Ear Infirmary,
 Department of Ophthalmology,
 Harvard Medical School, Βοστώνη, Η.Π.Α.

03.1999 – 05.1999: Κλινική άσκηση στην Παιδιατρική
 Children's Hospital,
 Harvard Medical School, Βοστώνη, Η.Π.Α.

22.08.2000: Άδεια ασκήσεως ιατρικού επαγγέλματος
Ιατρικός Σύλλογος Ηρακλείου

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ- ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

11.2000 – 02.2000: Βενιζέλειο Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου
(Υποχρεωτική τρίμηνη εκπαίδευση)

03.2001 – 02.2002: Υπηρεσία Υπαίθρου στο Π.Ι. Επισκοπής
(Κ.Υ. Καστελλίου, Ηράκλειο Κρήτης)

03.2002 – 05.2004: Έμμισθη Επιστημονικός Συνεργάτης
Πνευμονολογική Κλινική
Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου

06.2004 – 11.2007: Ειδικότητα Πνευμονολογίας
Πνευμονολογική Κλινική,
Βενιζέλειο Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου.

11.2007 – 09.2009: Ειδικότητα Πνευμονολογίας
Πνευμονολογική Κλινική,
Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου

10.2008- 04.2009: Μετεκπαίδευση σε «Επεμβατικές Βρογχοσκοπικές Τεχνικές» στην Νυρεμβέργη Γερμανίας με υποτροφία της Ευρωπαϊκής Πνευμονολογικής Εταιρείας (ERS Short-Term Training Fellowship -Reference number 594).

Department of Pulmonary Medicine, Nuremberg Hospital, Affiliated Teaching Hospital, Erlangen-Friedrich Alexander University, Nuremberg, Germany.

09.09.2009: Επιτυχής ολοκλήρωση των εξετάσεων ειδικότητας «Πνευμονολογίας- Φυματιολογίας» του Ελληνικού Υπουργείου Υγείας.

Λήψη του τίτλου ιατρικής ειδικότητας Πνευμονολογίας.

12.09.2009: Επιτυχής συμμετοχή στις πανευρωπαϊκές εξετάσεις ειδικότητας Πνευμονολογίας «**European Diploma in Respiratory Medicine**» (Hermes) υπό την αιγίδα της Πανευρωπαϊκής Πνευμονολογικής Εταιρείας (ERS).

10.2009 – Σήμερα: Έμμισθη Επιστημονικός Συνεργάτης

Πνευμονολογική Κλινική

Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου

ΕΚΠΟΝΗΣΗ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

2003-2009: Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης με θέμα: «**Μελέτη της αστάθειας του μικροδορυφορικού DNA σε υποπληθυσμούς κυττάρων σε χρόνια αποφρακτική νόσο των πνευμόνων**».

Ολοκλήρωση του πειραματικού μέρους και επιτυχής δημοσίευση σε διεθνές περιοδικό : “Somatic DNA alterations in lung epithelial barrier cells in COPD patients: a case control study”, Pulm Pharmacol Ther.

2009 Dec 28. [Epub ahead of print].

Σε αναμονή για παρουσίαση της διατριβής.

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ -ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ

- ERS “Intensive Hands-on Course on Thoracoscopy”.
Marseille, France, April 6-10 2009.
- 7th ERS Lung Science Conference on “Cell Proliferation, Differentiation and Carcinogenesis”.
Estoril, Portugal, March 27-29 2009.
- Bronchoscopy Seminar, BDI (Berufsverband Deutscher Internisten E.V.), Nuremberg, Germany, March 5-7 2009.
- ERS Research Seminar “Pulmonary Circulation: Scleroderma-related pulmonary arterial hypertension”.
Paris, France, April 14-15 2008
- 1st Pulmonary Board Refreshing Course. Hellenic Respiratory Society, Kamena Vourla, Greece, February 28-March 2 2008.

- 11th Postgraduate Seminar “Basic Principles on Mechanical Ventilation”. Department of Intensive Care, University of Crete Medical School, Heraklion, Crete, Greece, June 9-10 2007.

ΒΡΑΒΕΙΑ ΚΑΙ ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ

- (Ε.Π.Ε.Α.Ε.Κ. ΙΙ) «ΠΥΘΑΓΟΡΑΣ ΙΙ:ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΩΝ ΟΜΑΔΩΝ ΣΤΑ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑ» (50.000 ευρώ)
Επίκτητες μεταλλάξεις / αλλοιώσεις στο επίπεδο του Μικροδορυφορικού DNA : Ανακαλύπτοντας το υπεύθυνο κύτταρο στις αποφρακτικές παθήσεις των πνευμόνων.
Ηράκλειο, 2005-2007.
- ERS Short Term Training Fellowship (Reference number 594).
“Pulmonary endoscopic techniques, diagnostic and therapeutic applications”.
Department of Pulmonary Medicine, Nuremberg Hospital (Affiliated Teaching Hospital, Erlangen- Friedrich Alexander University), Nuremberg, Germany, February 1st- May 1st 2009.
- ERS Bursary allocated to outstanding abstracts, to attend the 7th ERS Lung Science Conference on “Cell Proliferation, Differentiation and Carcinogenesis”, and present the abstract “Identifying the sputum and BALF cell subpopulation with somatic DNA alterations in COPD”.
Estoril, Portugal, March 27-29 2009.

ΜΕΛΟΣ ΣΕ ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΕΤΑΙΡΙΕΣ ΚΑΙ ΣΥΛΛΟΓΟΥΣ

Μέλος του Ιατρικού Συλλόγου Ηρακλείου.

Μέλος της Ελληνικής Πνευμονολογικής Εταιρείας.

Μέλος της Ευρωπαϊκής Πνευμονολογικής Εταιρείας (European Respiratory Society).

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ & ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

Συμμετοχή ως ερευνήτρια στην διεξαγωγή των πολυεθνικών πολυκεντρικών, φαρμακευτικών κλινικών μελετών:

- ZYBAN40030, SAM40027, SAM40040, SAS30024, SCO30003 (TORCH), SCO100470 της εταιρείας GLAXO SMITH KLINE
- START SD-004-0111, INSPIRE D5125C00 , SMILE SD-039-0734, της εταιρείας ASTRA ZENECA
- PEGASUS-004 (PDEAAS-1500-004), A4471008/205.365 της εταιρείας PFIZER
- 205.235 (UPLIFT), 205.254 (RESPIMAT), 352.2046 (COPD), 1199.30 (IPF) της εταιρείας BOEHRINGER INGELHEIM
- 2007-FOR-EL-02 της εταιρείας ELPEN
- EFC6034- CASSIOPEA της εταιρείας SANOFI- AVENTIS
- CIGE025AGR01 (XOLAIR) της εταιρείας NOVARTIS
- P05575 (SCH527123), P06115 της εταιρείας SCHERING PLOUGH
- IG0903 της εταιρείας GRIFOLS
- AMG853 (20080615) της εταιρείας AMGEN

Συμμετοχή ως κλινικός ιατρός στην διεξαγωγή της Πολυεθνικής, Πολυκεντρικής Ευρωπαϊκής Κλινικής Δοκιμής – Μελέτης με τίτλο :

- «Προοπτική εκτίμηση της κλινικής πορείας και των βιολογικών δεικτών στη Βαριά Χρόνια Νόσο των Αεραγωγών». (**BIOAIR**; www.bioair.org)

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. Microsatellite DNA instability in benign lung diseases.
Samara K, Zervou M, Siafakas NM, Tzortzaki E.
Respiratory Medicine, 2006; 100, 202-211.
2. Microsatellite DNA instability in nasal cytology of COPD patients.
Karatzanis AD, **Samara KD**, Tzortzaki E, Zervou M, Helidonis ES, Velegrakis GA, Siafakas NM.
Oncology Reports, 2007; 17(3):661-665.
3. Assessment for microsatellite DNA instability in nasal cytology samples of patients with allergic rhinitis.
Karatzanis AD, **Samara KD**, Zervou M, Tzortzaki E, Helidonis ES, Siafakas N, Velegrakis GA.
American Journal of Rhinology. 2007 Mar-Apr;21(2):236-40.

4. Induced Sputum in Interstitial Lung Diseases: Novel Insights in the Diagnosis, Evaluation and Research.
Economidou F, **Samara KD**, Antoniou KM, Siafakas NM.
Respiration. 2009;77(3):351-8.
5. Microsatellite DNA instability in nasal polyposis.
Karatzanis AD, Tzortzaki E, **Samara KD**, Neofytou E, Zenk J, Iro H, Siafakas NM, Velegarakis G.
Laryngoscope. 2009 Apr;119(4):751-6.
6. Rituximab-induced nonspecific interstitial pneumonia like reaction in a patient with idiopathic thrombocytopenic purpura.
Protopapadakis C, Antoniou KM, Voloudaki A, **Samara KD**, Proklou A, Margaritopoulos G, Siafakas NM.
Respiratory Medicine CME 2009 (in press)
7. Molecular pathways and genetic factors in the pathogenesis of laryngopharyngeal reflux.
Vardouniotis AS, Karatzanis AD, Tzortzaki E, Athanasakis E, **Samara KD**, Chalkiadakis G, Siafakas N, Velegarakis GA.
Eur Arch Otorhinolaryngol. 2009 Jun; 266(6):795-801.
8. Somatic DNA alterations in lung epithelial barrier cells in COPD patients: a case control study.
Samara KD, Tzortzaki EG, Neofytou E, Karatzanis AD, Lambiri I, Tzanakis N, Siafakas NM.
Pulm Pharmacol Ther. 2009 Dec 28. [Epub ahead of print]

9. Different activity of the biological axis VEGF - Flt-1 (fms-like tyrosine kinase 1) and CXC chemokines between granulomatous and fibrotic disorders: a bronchoalveolar lavage study.
Antoniou KM, Soufla, G, Proklou A, Lymbouridou R, Choulaki C, **Samara KD**, Spandidos D, Siafakas NM.
Clinical and Developmental Immunology (accepted for publication)

10. Bronchial artery embolization for management of severe idiopathic hemoptysis.
Samara KD, Tsetis D, Antoniou KM, Protopapadakis C, Maltezakis G, Siafakas NM.
Monaldi Archives for Chest Disease (under revision)

11. Expression analysis of AKT and MAPK signalling pathways in lung tissue of patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF).
Antoniou KM, Margaritopoulos GA, Soufla G, Lymbouridou R, Symvoulakis E, **Samara KD**, Vassalou E, Kappou D, Spandidos DA and Siafakas NM.
International Journal of Biological Markers (under revision)

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΤΗΝ ΣΥΓΓΡΑΦΗ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΣΥΓΓΡΑΜΑΤΩΝ

1. «Παρενέργειες φαρμάκων στον πνεύμονα - Ιατρικά λάθη κατά την άσκηση της κλινικής πνευμονολογίας», Ελληνική Πνευμονολογική Εταιρεία 2008.

Κεφάλαιο : «Ανοσολογικοί μηχανισμοί τοξικότητας φαρμάκων».

Αντωνίου Κ, **Σαμαρά Κ**, Μαργαριτόπουλος Γ, Σιαφάκας Ν.

2. «Η συμβολή του εργαστηρίου στην εκτίμηση του πνευμονολογικού ασθενούς», Ελληνική Πνευμονολογική Εταιρεία 2009.

Κεφάλαιο : «Ορισμός και παθογένεια της ΧΑΠ».

Σαμαρά Κ, Βλαχάκη Ε, Τζανάκης Ν.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Perforin expression in COPD patients with microsatellite DNA instability.

K.D. Samara, E. Neofytou, N. Tzanakis, A.D. Karatzanis, D.

Papandrinopoulou, N. Siafakas, E.G. Tzortzaki.

2010 ATS International Conference in New Orleans, Louisiana, USA.

2. Perforin expression in COPD patients with microsatellite DNA instability.

K.D. Samara, E. Neofytou, N. Tzanakis, A.D. Karatzanis, N. Siafakas,

E.G. Tzortzaki.

8th ERS Lung Science Conference 2019, March 26-28, Estoril, Portugal.

3. Identifying the sputum and BALF cell subpopulation with the somatic DNA alterations in COPD.

K. Samara, E. Tzortzaki, E. Neofytou, N. Tzanakis, N. Siafakas.

19th European Respiratory Society Annual Congress, September 2009, Vienna, Austria.

4. Identifying the sputum and BALF cell subpopulation with the somatic DNA alterations in COPD.

K. Samara, E. Tzortzaki, E. Neofytou, N. Tzanakis, N. Siafakas.

7th ERS Lung Science Conference 2009, March 27-29, Estoril, Portugal.

5. Differential activity of the biological axis VEGF –Flt-1 between granulomatous and fibrotic disorders: A bronchoalveolar lavage fluid study.

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

13th World Congress on Advances in Oncology and 11th International Symposium on Molecular Medicine. 9-11 Oct. 2008. International Journal of Molecular Medicine S86.

6. Microsatellite DNA instability in epithelial barrier cells in COPD.

K. Samara, E. Tzortzaki, E. Neofytou, A. Karatzanis, N. Siafakas.

18th European Respiratory Society Annual Congress, October 4-8 2008, Berlin, Germany.

7. Expression of angiogenic growth factors and stromal cell derived factor-1/CXC chemokine receptor 4 (SDF-1/CXCL12–CXCR4) biological axis in idiopathic pulmonary fibrosis : a lung tissue study.
A. Proklou, K. Antoniou, G. Soufla, F. Economidou, K. Samara, M. Manousakis, I. Drositis, D. Spandidos, N. Siafakas.
18th European Respiratory Society Annual Congress, October 4-8 2008, Berlin, Germany.

8. Angiogenetic profiles (VEGF and VEGF receptor-1, Flt-1) in bronchoalveolar lavage fluid in patients with interstitial lung diseases.
F. Economidou, K. Antoniou, K. Samara, G. Soufla, C. Choulaki, A. Proklou, I. Politis, D. Moraitaki, N. Tzanakis, N. Siafakas.
18th European Respiratory Society Annual Congress, October 4-8 2008, Berlin, Germany.

9. Impaired VEGF receptor-1, FLT-1 expression in bronchoalveolar lavage fluid in patients with pulmonary Sarcoidosis.
Economidou F, Antoniou KM, Soufla G, Proklou A, Samara K, Choulaki C, Lymbouridou R, Siafakas NM
9th WASOG Meeting and 11th BAL International Conference, June 19-22 2008, Athens, Greece.

10. Microsatellite DNA instability in nasal cytologic samples of patients with allergic rhinitis and COPD.
A. Karatzanis, K. Samara, E. Tzortzaki, M. Zervou, E. Prokopakis, E. Helidonis, N. Siafakas, G. Velegrakis.
6th European Congress of Otorhinolaryngology – Head and Neck Surgery, June 30 – July 4, 2007, Vienna, Austria.

11. Microsatellite DNA Instability in COPD. Comparison between nasal and sputum cytological samples.
A. Karatzanis, K. Samara, E. Tzortzaki, M. Zervou, E. Helidonis, G. Velegrakis, N. Siafakas.
ATS 2007 International Conference, May 18-23, San Francisco, California, USA, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, volume 175, Abstracts Issue, April 2007

12. Detection of genetic alterations in nasal aspirates from patients with allergic rhinitis and asthma.
A. Karatzanis, K. Samara, M. Zervou, E. Tzortzaki, E. Helidonis, N. Siafakas, G. Velegrakis.
21st Congress of the European Rhinologic Society and 25th International Symposium on Infection and Allergy of the Nose, June 2006, Tampere Finland.

13. Investigation of genetic alterations in malignant and infectious pleural fluid: preliminary results.
F Economidou, M Zervou, K Samara, E Tzortzaki, S Schiza, M Pougounias, N Siafakas.
16th European Respiratory Society Annual Congress, September 2-6, 2006, Munich Germany,

14. Daily vs weekly administration of epoetin- beta for the control of lung cancer- related anemia after combination chemotherapy in patients with NSCLC (stage IIIa, IIIb and IV).
K Samara, M Ferdoutsis, G Meletis, E Thanou, G Patsourakis, P Gablia, N Bachlitzanakis.

16th European Respiratory Society Annual Congress, Sep 2-6 2006,
Munich Germany.

15. Maximal static inspiratory (Pimax) and expiratory (Pemax) pressures in patients with diabetic autonomic neuropathy.

K Samara, M Ferdoutsis, G Meletis, E Kirlaki, E Thanou, C Pigakis, G Patsourakis, N Kefalogiannis, N Bachlitzanakis.

16th European Respiratory Society Annual Congress, Sep 2-6 2006 ,
Munich, Germany,

16. Can high resolution computed tomography findings predict the recurrence of spontaneous pneumothorax?

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

15th European Respiratory Society Annual Congress, Sep 17-21 2005,
Copenhagen, Denmark.

17. Detection of genetic alterations in nasal aspirates from COPD, asthmatic and allergic rhinitis patients: preliminary results.

A. Karatzanis, K. Samara, M. Zervou, E. Tzortzaki, G. Velegrakis, N. Siafakas.

15th European Respiratory Society Annual Congress, September 17-21
2005, Copenhagen, Denmark.

18. BAL fluid cell sorting via magnetic microbeads followed by flow cytometry and PCR amplification.

K. Samara, E. Tzortzaki, M. Zervou, A. Karatzanis, Tzanakis, N. Siafakas.

15th European Respiratory Society Annual Congress, September 17-22
2005, Copenhagen, Denmark.

19. The importance of intrapleurally γ -interferon in ambulatory management of malignant pleural effusion in elderly patients with end-stage NSCLC.

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

15th European Respiratory Society Annual Congress, September 17-22
2005, Copenhagen, Denmark.

20. Magnetic MicroBeads sputum cell sorting in obstructive airway disease.

K. Samara, E. Tzortzaki, M. Zervou, A. Karatzanis, E. Koutala, A. Damianaki, G. Maltezakis, N. Tzanakis, N. Siafakas.

14th European Respiratory Society Annual Congress, September 4-8
2004, Glasgow, UK.

21. Genetic alterations at the microsatellite DNA level in nasal aspirates from COPD and asthmatic patients: preliminary results.

A. Karatzanis, K. Samara, M. Zervou, E. Tzortzaki, G. Velegrakis, N. Siafakas.

American College of Chest Physicians 2004, October 23-28, 2004,
Seattle, WA, USA.

Chest 126/ 4/ October, 2004 supplement p 810-811.

22. Sputum cell sorting via magnetic microbeads in COPD and asthmatic patients.
K. Samara, E. Tzortzaki, M. Zervou, A. Karatzanis, N. Tzanakis, N. Siafakas.
American College of Chest Physicians Annual Congress 2004, October 23-28, 2004, Seattle, WA, USA.
Chest 126/ 4/ October, 2004 supplement p 810-811.
23. Cross-checking the incidence of microsatellite DNA instability in severe persistent asthma and COPD.
M Zervou, E Tzortzaki, M Tsoumakidou, M Plataki, K Samara, K Antoniou, S Schiza, N Siafakas.
ATS 2004 International Conference, May 18-23, Orlando, Florida, USA.
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2004 volume 169- suppl 7, April 2004
24. Common or disease specific genetic alterations in severe persistent Asthma and COPD?
E Tzortzaki, M Zervou, M Tsoumakidou, M Plataki, E Papadopouli, K Samara, N Siafakas.
4th World Asthma Meeting, February 16-19 2004, Bangkok, Thailand.
25. Genetic comparison between severe persistent asthma and COPD
M Zervou, E Tzortzaki, K Samara, E Papadopouli, M Plataki, M Tsoumakidou, N Siafakas.
13th European Respiratory Society Annual Congress, September 27-October 1, 2003, Vienna, Austria.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

«Μελέτη της αστάθειας του μικροδορυφορικού DNA σε υποπληθυσμούς κυττάρων σε χρόνια αποφρακτική νόσο των πνευμόνων».

Η Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) αποτελεί μια από τις κυριότερες αιτίες νοσηρότητας και θνητότητας παγκοσμίως και έχει ως αποτέλεσμα οικονομική και κοινωνική επιβάρυνση, η οποία είναι ουσιαστική και αυξανόμενη. Αν και η ΧΑΠ είναι μια ασθένεια συχνή, της οποίας ο κυριότερος αιτιολογικός παράγοντας είναι γνωστός και είναι το κάπνισμα τσιγάρων, εντούτοις πολλά ερωτήματα παραμένουν αδιευκρίνιστα σε ότι αφορά την παθογένεια της νόσου και ιδιαίτερα την επίδραση γενετικών, περιβαλλοντικών αλλά και επιγενετικών παραγόντων[1,2].

Το γενετικό υπόβαθρο της ΧΑΠ έχει αποτελέσει το επίκεντρο πολλών πρόσφατων μελετών [3]. Σημαντικός φαίνεται να είναι ο ρόλος των επίκτητων σωματικών μεταλλάξεων στην παθογένεση της ΧΑΠ [4,5]. Οι επίκτητες σωματικές μεταλλάξεις θεωρούνται σποραδικές αλλαγές σε γονίδια ή περιοχές ελέγχου των γονιδίων, οι οποίες προκύπτουν αυτόματα και μάλλον σπάνια. Η συχνότητα των μεταλλάξεων αυτών όμως αυξάνεται κατά πολύ σε ιστούς οι οποίοι εκτίθενται σε επαναλαμβανόμενες εξωγενείς μεταλλαξιογόνες

προσβολές. Αν και η «ευπάθεια» στην εμφάνιση μεταλλάξεων κατ'αυτόν τον τρόπο ενδέχεται να υπόκειται σε έλεγχο από κληρονομούμενα γονίδια, οι σωματικές μεταλλάξεις δεν κληρονομούνται [4].

Η απώλεια ετεροζυγωτίας και η αστάθεια του μικροδορυφορικού DNA είναι γενετικές αλλοιώσεις οι οποίες αποτελούν φαινόμενα που έχουν ανευρεθεί στις περισσότερες ανθρώπινες κακοήθειες [6-12]. Πρόσφατες μελέτες ωστόσο, ανέδειξαν ότι η LOH και η MSI ανευρίσκονται και σε αρκετές καλοήθειες παθήσεις, πνευμονικές και έξω-πνευμονικές [5,6,13-15]. Σε πρόσφατες μελέτες από την ομάδα μας ανιχνεύθηκαν αστάθεια του μικροδορυφορικού DNA ή/και απώλεια ετεροζυγωτίας σε δείγματα κυττάρων πτυέλων ασθενών με ΧΑΠ και βρογχικό άσθμα [5,13-15]. Ωστόσο ο συγκεκριμένος κυτταρικός υποπληθυσμός, ο οποίος εμφανίζει την γενετική αυτή αστάθεια δεν έχει εξακριβωθεί. Έτσι, σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν αφ'ενός να εξετάσει την παρουσία επίκτητων σωματικών γενετικών αλλοιώσεων σε κύτταρα πτυέλων και βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος καθώς και η διερεύνηση του συγκεκριμένου κυτταρικού πληθυσμού που εμφανίζει τις αλλοιώσεις αυτές. Η αναγνώριση του κυτταρικού πληθυσμού που είναι ευπαθής σε βλάβες του DNA στην ΧΑΠ, μπορεί να διαφωτίσει ένα σημαντικό κομμάτι της παθογένεσης της νόσου. Η φυσική ικανότητα του πνεύμονα να λύνει την φλεγμονή και να ξεκινά ιστική επιδιόρθωση μετά απο έκθεση σε εισπνεόμενους βλαπτικούς παράγοντες είναι μια

διαδικασία η οποία εξαρτάται από την ακεραιότητα των μηχανισμών αυτόματης επιδιόρθωσης του DNA, κάτι που όπως φαίνεται δεν ισχύει στην ΧΑΠ.

Μελετήθηκαν συνολικά 35 ασθενείς με ΧΑΠ και 30 μάρτυρες («υγιείς καπνιστές»). Όλοι οι ασθενείς με ΧΑΠ ανήκαν στο στάδιο II κατα GOLD [16] και ήταν πρώην καπνιστές για διάστημα τουλάχιστον 6 μηνών. Οι «υγιείς» καπνιστές ήταν νυν και πρώην καπνιστές.

Οι ασθενείς με ΧΑΠ χωρίστηκαν σε δύο ομάδες: η πρώτη ομάδα (Α) αποτελούνταν από 20 ασθενείς με ΧΑΠ οι οποίοι υποβλήθηκαν σε πρόκληση πτυέλων. Η μέση ηλικία της ομάδας ήταν 69 ± 9 έτη και η μέση καπνιστική συνήθεια 50.5 ± 14 πακέτα/έτη. Από τον σπυρομετρικό έλεγχο οι τιμές μετά βρογχοδιαστολή ήταν: FEV_1 (% pred): 61 ± 8 , FVC (% pred): 77 ± 12 and FEV_1/FVC : 59 ± 4 .

Η δεύτερη ομάδα (Β) αποτελούνταν από 15 ασθενείς με ΧΑΠ οι οποίοι υποβλήθηκαν σε βρογχοσκόπηση και βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα για διαγνωστικούς λόγους άσχετους με την παρούσα μελέτη. Η μέση ηλικία της ομάδας ήταν 64 ± 11 έτη και η μέση καπνιστική συνήθεια 61.3 ± 13 πακέτα/έτη. Από τον σπυρομετρικό έλεγχο οι τιμές μετά βρογχοδιαστολή ήταν FEV_1 (% pred): 63 ± 11.5 , FVC (% pred): 78 ± 9 and FEV_1/FVC : 58 ± 6 .

Η ομάδα ελέγχου (μάρτυρες) αποτελούνταν από 30 καπνιστές με φυσιολογικό λειτουργικό έλεγχο πνευμόνων. Η μέση ηλικία της ομάδας

ήταν 56 ± 17 έτη και η μέση καπνιστική συνήθεια 52 ± 9 πακέτα/έτη. Από τον σπυρομετρικό έλεγχο οι τιμές μετά βρογχοδιαστολή ήταν FEV1 (% pred): 92 ± 4 , FVC (%pred): 88 ± 4 and FEV1/FVC (%): 83 ± 8 .

Στα δείγματα πτυέλων και τα δείγματα BAL έγινε επεξεργασία διαχωρισμού του κυτταρικού συσσωματώματος με τεχνολογία μαγνητικών σφαιριδίων σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Dynabeads, Dynal, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA για τα πύελα και MACS magnetic beads technology/MiniMACS magnetic separation columns, MACS Technology, Miltenyi Biotec, Germany). Όλα τα δείγματα διαχωρίστηκαν σε δυο προϊόντα: α) τα επιθηλιακά κύτταρα και β) τα λευκοκύτταρα (CD 45+). Η τεχνική του μαγνητικού διαχωρισμού επιβεβαιώθηκε με την χρήση του κυτταρομετρητή ροής (COULTER EPICS XL Flow Cytometer, Beckman Coulter, USA).

Στη συνέχεια οι δυο υπο-ομάδες κυττάρων (επιθηλιακά και λευκοκύτταρα) καθώς και δείγμα περιφερικού αίματος κάθε ασθενούς υποβλήθηκαν σε εκχύλιση DNA σύμφωνα με το σύνηθες πρωτόκολλο (QIAmp DNA Blood Mini kits; QIAGEN, Inc., Valencia, CA, USA). Τα δείγματα DNA υποβλήθηκαν σε ενίσχυση για τους μικροδορυφορικούς δείκτες G29802, D6S2223, D6S344, D6S263, D5S207, D13S71, RH70958, and D17S250 με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).

Σε κανένα από τους «υγιείς» καπνιστές που μελετήθηκαν δεν ανευρέθηκε γενετική αστάθεια. Στους ασθενείς με ΧΑΠ βρέθηκαν αλλοιώσεις μικροδορυφορικού DNA μόνο στα δείγματα επιθηλιακών κυττάρων και όχι στα δείγματα λευκοκυττάρων. Συγκεκριμένα στην ομάδα Α (προκλητά πτύελα) 5 ασθενείς εμφάνισαν γενετική αστάθεια (25%). Τρεις ασθενείς εμφάνισαν LOH στους δείκτες D6S344 (1), G29802 (1) και D17S250 (1), και δύο ασθενείς εμφάνισαν MSI στους δείκτες D13S71 (1) and D6S344 (1). Στην ομάδα Β (δείγματα BAL) επτά ασθενείς εμφάνισαν γενετική αστάθεια (47%). LOH ανιχνεύθηκε σε τέσσερις ασθενείς στους δείκτες D5S207 (2), G29802 (1) και D17S250 (1), ενώ MSI σε 6 ασθενείς στους δείκτες D5S207 (1) και D13S71 (5).

Το κύριο εύρημα της μελέτης αυτής είναι ότι οι σωματικές αλλοιώσεις του DNA σε δείγματα πτυέλων και βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος, ανευρέθηκαν αποκλειστικά στα επιθηλιακά κύτταρα. Η παρατήρηση αυτή μπορεί να έχει ιδιαίτερη σημασία αν λάβουμε υπ'οψιν μας τον κεντρικό ρόλο που κατέχουν τα επιθηλιακά κύτταρα στην παθογένεια της ΧΑΠ [17].

Τα ευρήματα της μελέτης αυτής υποστηρίζουν την υπόθεση για τα αρχικά γεγονότα στην παθογένεια της ΧΑΠ [18,19], ότι δηλαδή η επίμονη φλεγμονή και το οξειδωτικό φορτίο από το κάπνισμα των τσιγάρων δύναται να επηρεάσει το σύστημα φραγμού μεταξύ αέρα και

πνεύμονα δηλαδή τα επιθηλιακά πνευμονικά κύτταρα (Lung epithelial Barrier Cells –LEBCs) [20]. Η περαιτέρω απενεργοποίηση του συστήματος αυτόματης επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA (human DNA mismatch repair system –MMR) λόγω του αυξημένου οξειδωτικού φορτίου, πιθανόν να έχει ως εκ νέου αποτέλεσμα επίκτητες σωματικές μεταλλάξεις στο μικροδορυφορικό DNA των επιθηλιακών πνευμονικών κυττάρων (LEBCs), αντανακλώντας έτσι μια δυσλειτουργική μετάπτωση των επιθηλιακών πνευμονικών κυττάρων στην ΧΑΠ [20].

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Pauwels RA, Buist S, Calverley PMA, Jenkins CR, Hurd SS, GOLD Scientific Committee. Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 1256–1276.
2. Celli BR, MacNee W, ATS/ERS Task Force. Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. *Eur Respir J* 2004; 23: 932–946.

3. Silverman EK. Progress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Generics. Proc of the Am Thor Soc, vol 3, 2006.
4. Anderson JP, Bozinovski S. Acquired somatic mutations in the molecular pathogenesis of COPD. Trends Pharmacol Sci 2003; 24(2):71-76.
5. Siafakas NM, Tzortzaki EG, Sourvinos G, Bouros D, Tzanakis N, Kafatos A, Spandidos D. Microsatellite DNA instability in COPD. Chest 1999; 116:47–51.
6. Samara K, Zervou M, Siafakas NM, Tzortzaki EG. Microsatellite DNA instability in benign lung diseases. Respir Med 2006; 100:202-211.
7. Wistuba II, Lam S, Behrens C, Virmani AK, Fong KM, LeRiche J, Samet JM, Srivastava S, Minna JD, Gazdar AF. Molecular damage in the bronchial epithelium of current and former smokers. J Natl Cancer Inst. 1997; 89(18):1366-73.
8. Wistuba II, Behrens C, Virmani AK, Mele G, Milchgrub S, Girard L, Fondon JW 3rd, Garner HR, McKay B, Latif F, Lerman MI, Lam S, Gazdar AF, Minna JD. High resolution chromosome 3p allelotyping of human lung cancer and preneoplastic/preinvasive bronchial epithelium reveals multiple, discontinuous sites of 3p allele loss and three regions of frequent breakpoints. Cancer Res. 2000; 60(7):1949-60.

9. Nishisaka T, Takeshima Y, Inai K. Evaluation of p53 gene mutation and loss of heterozygosity of 3p, 9p and 17p in precancerous lesions of 29 lung cancer patients. *Hiroshima J Med Sci.* 2000;49(2):109-16.
10. Papi A, Casoni G, Caramori G, Guzzinati I, Boschetto P, Ravenna F, Calia N, Petruzzelli S, Corbetta L, Cavallesco G, Forini E, Saetta M, Ciaccia A, Fabbri LM. COPD increases the risk of squamous histological subtype in smokers who develop non-small cell lung carcinoma. *Thorax* 2004;59(8):679-81.
11. Shibukawa K, Miyokawa N, Tokusashi Y, Sasaki T, Osanai S, Ohsaki Y. High incidence of chromosomal abnormalities at 1p36 and 9p21 in early-stage central type squamous cell carcinoma and squamous dysplasia of bronchus detected by autofluorescence bronchoscopy. *Oncol Rep.* 2009; 22(1):81-7.
12. Capkova L, Kalinova M, Krskova L, Kodetova D, Petrik F, Trefny M, Musil J, Kodet R. Loss of heterozygosity and human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in bronchial mucosa of heavy smokers. *Cancer.* 2007;109(11):2299-307.
13. 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;22: 951–955.

14. Zervou MI, Tzortzaki EG, Makris D, Gaga M, Zervas E, Economidou E, Tsoumakidou M, Tzanakis N, Milic-Emili J, Siafakas NM. Differences in microsatellite DNA level between asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2006; 28:472-478.
15. Makris D, Tzanakis N, Damianaki A, Ntaoukakis E, Neofytou E, Zervou M, Siafakas NM, Tzortzaki EG. Microsatellite DNA instability and COPD exacerbations. *Eur Respir J* 2008; 32:612-618.
16. Celli BR, MacNee W. Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS paper. *Eur Respir J* 2004; 23: 932-946.
17. Barnes PJ. Small airways in COPD. *N Engl J Med*. 2004 Jun 24; 350(26): 2635-7.
18. Siafakas NM. "In the Beginning" of COPD: is evolution important? *Am J Resp Crit Care Med*. 2007 Mar 1; 175(5):423-4.
19. Tzortzaki E, Siafakas NM. A new hypothesis for the initiation of COPD. *ERJ* 2009;34: 310-315
20. Samara KD, Tzortzaki EG, Neofytou E, Karatzanis AD, Lambiri I, Tzanakis N, Siafakas NM. Somatic DNA alterations in lung epithelial barrier cells in COPD patients: a case control study. *Pulm Pharmacol Ther*. 2009 Dec 28. [Epub ahead of print]

ABSTRACT

“Somatic DNA alterations in lung epithelial barrier cells in COPD patients”

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a major health problem worldwide with increasing prevalence, morbidity and mortality. Although chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a common disease and its primary cause, cigarette smoking, is well known, a large number of questions remain to be elucidated regarding disease pathogenesis involving genetics, environmental and epigenetic factors. The genetic background of COPD has been the focus of many recent studies. The role of acquired somatic mutations in the pathogenesis of COPD has been shown to be important. Acquired somatic mutations are considered as sporadic changes in genes or gene regulatory regions that occur spontaneously and rarely. However, they dramatically increase in frequency in tissues exposed to repeated exogenous mutagenic insults. Although the susceptibility to acquiring such mutations might be controlled by inherited genes, somatic mutations do not affect the germ line and are not heritable.

Loss of heterozygosity and microsatellite DNA instability are genetic alterations that have been initially reported in a number of human malignancies. However, during recent years such phenomena have also

been detected in various benign pulmonary and extra-pulmonary diseases. We have recently detected microsatellite DNA instability (MSI) and/or loss of heterozygosity (LOH) in sputum cells of COPD and asthmatic patients. To our knowledge MSI and/or LOH have not yet been detected in BAL samples from COPD patients. However the particular sputum and/or BAL cell population exhibiting this genetic instability has not yet been identified. The aims of this study were. to examine whether airway and bronchoalveolar cells are prone to somatic acquired genetic alterations by evaluating sputum and BALF cells and to determine which specific cell population is affected by these somatic acquired genetic alterations. The identification of the susceptible cell population to somatic DNA damage in COPD may elucidate an important component of disease pathogenesis. The natural ability of the injured lung in COPD to shut down persisting inflammation and initiate proper tissue repair is dependent on intact DNA auto repair mechanisms. Thus, our study could answer whether increased inflammatory burden on COPD patients results in acquired somatic DNA mutations of lung epithelia.

A total of 35 patients were studied. All were diagnosed with COPD, stage II and were ex smokers for a period of >6 months. Patients were allocated in two groups: the first group (A) consisted of 20 COPD patients who underwent sputum induction. Their median age was 69 ± 9 years and their smoking habit 50.5 ± 14 p/y. Their mean spirometric

values were: post-bronchodilation FEV₁ (% pred): 61 ±8, ΔFEV₁: 4±1.3 %, FVC (% pred): 77±12 and FEV₁/FVC: 59 ±4. The second group (B) consisted of 15 COPD patients, who underwent bronchoscopy and BALF for diagnostic reasons. Their median age was 64 ±11 years and their smoking habit 61.3 ±13p/y. Group B patients had median spirometric values of post-bronchodilation FEV₁ (% pred): 63 ±11.5, ΔFEV₁: 5.2±2.3%, FVC (% pred): 78±9 and FEV₁/FVC: 58 ±6. The control group consisted of 30 smokers with normal pulmonary function tests. Median age was 56 ±17 years and smoking habit was 52 ± 9 p/y. Their mean spirometric values were FEV₁ (% pred): 92 ±4, FVC (% pred): 88±4 and FEV₁/FVC: 83 ±8.

The sputum and BALF samples were processed with magnetic beads technology to separate antibody-specific cell populations. All sputum samples were processed with Dynabeads (Dyna, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. All BALF samples were processed with MACS magnetic beads technology and MiniMACS magnetic separation columns (MACS Technology, Miltenyi Biotec, Germany). Thus, each sample yielded two products: a. the epithelial positive selected cells and b. the leukocyte positive selected cells. The technique of magnetic separation of epithelial and leukocyte populations from sputum and BAL samples was verified using standard

flow cytometry (COULTER EPICS XL Flow Cytometer, Beckman Coulter, USA).

DNA extraction was carried out separately, after magnetic separation, from each cell population from sputum and BALF samples (leukocytes and epithelial cells). In parallel DNA was extracted from matched peripheral blood samples of each patient according to standard protocols for blood samples. (QIAmp DNA Blood Mini kits; QIAGEN, Inc., Valencia, CA, USA). Microsatellite DNA amplification was performed using the following eight polymorphic primers G29802, D6S2223, D6S344, D6S263, D5S207, D13S71, RH70958, and D17S250.

Not one of the “healthy” smokers studied as a control group exhibited any genetic instability. Microsatellite DNA alterations were detected only in the epithelial cells of both sputum and BALF samples from COPD patients. In the sputum samples group five patients exhibited DNA alterations (25%). LOH was detected in three patients in microsatellite markers D6S344 (1 patient), G29802 (1 patient) and D17S250 (1 patient), while MSI in two patients D13S71 (1 patient) and D6S344 (1 patient). In the BAL samples group seven patients exhibited DNA alterations (47%). LOH was detected in four patients, in markers D5S207 (2 patients), G29802 (1 patient) and D17S250 (1 patient) while MSI in 6 patients, in markers D5S207 (1 patient) and D13S71 (5

patients). The leukocyte cell populations in both sputum and BAL samples did not exhibit any genetic alteration.

The main finding of this study was that somatic DNA alterations in sputum and BALF, was exclusively exhibited in the epithelial cells. This might represent a significant observation taking into account the central role of epithelial cells in COPD pathogenesis. Epithelial cells constitute the outer cellular layer of the bronchial tree and are thus exposed to numerous host and environmental insults. These findings support a new hypothesis for the initiation of COPD [13], that in the initial stages of the disease, cigarette smoke affects the air-lung barrier system (LEBCs- Lung Epithelial Barrier Cells) in the central and peripheral airways via repeated oxidative stress. This leads to oxidative DNA damage and acquired somatic mutations at the Microsatellite DNA of lung epithelial cells. These “altered” epithelial cells are recognised by dendritic cells as foreign or as non-self. Dendritics travel with this information to lymph nodes and present it to naïve T-lymphocytes. As a result a predominant CD8⁺ cytotoxic type 1 T-lymphocyte proliferation is observed, followed by the release of perforin and granzymes from CD8⁺ cells resembling host immune response to a viral infection [13]. Microsatellite DNA alterations in COPD reflects a defective DNA mismatch repair system (MMR) of LEBCs, indicating a dysfunctional turnover of the epithelia.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια

ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΟΡΙΣΜΟΣ

Η Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) αποτελεί ένα σοβαρό πρόβλημα υγείας παγκοσμίως με διαρκώς αυξανόμενη επίπτωση, νοσηρότητα και θνητότητα [1]. Χαρακτηρίζεται από χρόνια απόφραξη των αεραγωγών, από μια πλειάδα παθολογικών μεταβολών στους πνεύμονες καθώς και από σημαντικές εξωπνευμονικές εκδηλώσεις και συν-νοσηρότητες οι οποίες συνεισφέρουν στην βαρύτητα της νόσου σε ορισμένους ασθενείς. Σύμφωνα με τον πιο πρόσφατο ορισμό, που προτάθηκε από την κοινή ομάδα εργασίας των εταιρειών American Thoracic Society (ATS) και European Respiratory Society (ERS) το 2004, «η Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια είναι μια νόσος η οποία προλαμβάνεται και θεραπεύεται. Χαρακτηρίζεται από απόφραξη των αεραγωγών μη πλήρως αναστρέψιμη. Η απόφραξη επιδεινώνεται προοδευτικά και συνδέεται με μη φυσιολογική φλεγμονώδη απάντηση των πνευμόνων στην έκθεση σε τοξικά εισπνεόμενα σωματίδια και αέρια που προέρχονται κυρίως από το κάπνισμα. Αν και η νόσος προσβάλλει

κυρίως τους πνεύμονες, προκαλεί και συστηματικές εκδηλώσεις που επηρεάζουν σοβαρά την πρόγνωση σε ορισμένους ασθενείς» [1].

Στον ορισμό αυτό έχουν προστεθεί καινούρια σημαντικά στοιχεία, όπως το ότι η νόσος προλαμβάνεται και θεραπεύεται, ότι το κάπνισμα είναι η κύρια αιτία της καθώς και ότι παρουσιάζονται και συστηματικές επιπτώσεις. Εντούτοις η θεμελιώδης βάση του ορισμού παραμένει η «μη πλήρως αναστρέψιμη απόφραξη των αεραγωγών» καθιστώντας την σπιρομέτρηση την βασική εξέταση για να προσδιορίσουμε εάν κάποιος πάσχει από ΧΑΠ [2]. Η τεκμηρίωση του βαθμού της απόφραξης είναι ο ελαττωμένος βίαια εκπνεόμενος όγκος στο πρώτο δευτερόλεπτο (FEV1).

Η φύση της νόσου είναι προοδευτική και οφείλεται σε ποικίλους συνδυασμούς χρόνιας βρογχίτιδας και εμφυσηματος [3]. Η χρόνια βρογχίτιδα ορίζεται κλινικά ως η παρουσία χρόνιου παραγωγικού βήχα, σχεδόν καθημερινά, για τουλάχιστον 3 διαδοχικούς μήνες στην διάρκεια 2 συνεχόμενων ετών. Για να τεθεί η διάγνωση αυτή πρέπει να αποκλειστούν άλλες αιτίες παραγωγικού βήχα. Το εμφύσημα ορίζεται παθολογοανατομικά, από την παρουσία μόνιμα, παθολογικά διευρυμένων αεροχώρων περιφερικά των τελικών βρογχιολίων, χωρίς εμφανή ίνωση και με συνοδό καταστροφή των τοιχωμάτων τους. Στη χρόνια βρογχίτιδα ο ελαττωμένος FEV1 μπορεί να προκληθεί από έκκριση βλέννας και υπερπλασία των καλυκοειδών κυττάρων, ενώ στο εμφύσημα η απώλεια της ελαστικής επαναφοράς προκαλεί ελάττωση του FEV1.

ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Η ΧΑΠ αποτελεί μια από τις κυριότερες αιτίες νοσηρότητας και θνησιμότητας παγκοσμίως και έχει ως αποτέλεσμα την οικονομική και κοινωνική επιβάρυνση, η οποία είναι ουσιαστική και αυξανόμενη. Τα δεδομένα επιπολασμού και θνησιμότητας υποτιμούν τη συνολική επιβάρυνση της ΧΑΠ καθώς η διάγνωση της νόσου είναι δυνατή μόνο όταν είναι κλινικά εμφανής και σε σχετικά προχωρημένο στάδιο [4]. Σε άτομα ηλικίας 25-75 ετών στις ΗΠΑ, ο εκτιμώμενος επιπολασμός της ήπιας ΧΑΠ (ορίζεται ως $FEV_1/FVC < 70\%$ και $FEV_1 \geq 80\%$ της προβλεπομένης τιμής) ήταν 6.9% και της μέτριας ΧΑΠ (ορίζεται ως $FEV_1/FVC < 70\%$ και $FEV_1 \leq 80\%$ της προβλεπομένης τιμής) ήταν 6.6%, σύμφωνα με το NHANES (Εθνική μελέτη υγείας και διατροφής). Η ΧΑΠ είναι η τέταρτη αιτία θανάτου στις ΗΠΑ και την Ευρώπη και η θνησιμότητα λόγω ΧΑΠ στις γυναίκες υπερδιπλασιάστηκε τα τελευταία είκοσι έτη [5]. Επί του παρόντος, η θεραπεία της ΧΑΠ είναι πιο δαπανηρή από εκείνη του άσθματος και το μεγαλύτερο τμήμα των δαπανών (50-75%) αφορούν υπηρεσίες που σχετίζονται με την παρόξυνση της νόσου. Χαρακτηριστικά, η ΧΑΠ αποτελεί την κύρια ή την συνοδό αιτία νοσηλείας σε ποσοστό περίπου 20% του συνόλου, στις ηλικίες άνω των 65 ετών [6].

Παράγοντες κινδύνου

Κάθε ασθενής που παρουσιάζει βήχα παραγωγικό και δύσπνοια με συνοδό ιστορικό έκθεσης σε παράγοντες κινδύνου θα πρέπει να ελέγχεται για ΧΑΠ. Οι παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη ΧΑΠ χωρίζονται σε περιβαλλοντικούς και ιδιοσυστασιακούς, και η νόσος είναι πιθανότατα αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης μεταξύ αυτών [7].

Η **μόλυνση του αέρα** έχει αναγνωρισθεί ως συγκεκριμένος παράγοντας κινδύνου για χρόνιες αναπνευστικές παθήσεις μετά τα επεισόδια μόλυνσης του αέρα στα μέσα του 20ού αιώνα, όπως ήταν το νέφος του Λονδίνου το Δεκέμβριο του 1952, στο οποίο αποδόθηκαν 4.000 επιπλέον θάνατοι από καρδιοαναπνευστικές παθήσεις [8]. Οι πνεύμονες κάθε ανθρώπου από την γέννηση μέχρι το βαθύ γήρας υπόκεινται σε επιβλαβή οξειδωτικά γεγονότα μέσω της εισπνοής **περιβαλλοντικών ρυπαντών ή ερεθιστικών ουσιών** όπως διοξείδιο του θείου, οξείδια του αζώτου και διάφορα άλλα μόρια [9]. Επιπλέον έχει αποδειχθεί ότι η ρύπανση του αέρα σε εσωτερικούς χώρους η οποία προκαλείται από την ατελή καύση κάρβουνων ή βιομάζας για θέρμανση/μαγειρική σε αναπτυσσόμενα κράτη αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης ΧΑΠ σε μη καπνίστριες γυναίκες [10,11].

Το **κάπνισμα** τσιγάρων είναι με διαφορά ο κυριότερος και πλέον αποδεδειγμένος περιβαλλοντικός παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη ΧΑΠ [12]. Περίπου το 50% του συνόλου των καπνιστών θα αναπτύξουν

κάποιου βαθμού απόφραξη των αεραγωγών και το 20% κλινικά διαγνωσμένη ΧΑΠ. Επιπλέον πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι και η παθητική έκθεση στον καπνό του τσιγάρου αυξάνει τον κίνδυνο για εμφάνιση ΧΑΠ [13,14].

Στους περιβαλλοντικούς παράγοντες κινδύνου επίσης περιλαμβάνονται η διατροφή, η επαγγελματική έκθεση και το κοινωνικοοικονομικό επίπεδο. Μια υγιεινή **διατροφή** πλούσια σε αντιοξειδωτικούς παράγοντες όπως οι βιταμίνες C και E, το ιχθυέλαιο και το μαγνήσιο, διατηρεί ικανές συγκεντρώσεις αντιοξειδωτικών παραγόντων στους πνεύμονες και προλαμβάνει ή μειώνει την συχνότητα των αναπνευστικών παθήσεων [15]. Σε ότι αφορά την **επαγγελματική έκθεση** υπολογίζεται ότι ευθύνεται για ένα ποσοστό της τάξης του 15-19% του συνόλου των ασθενών με ΧΑΠ [16], ποσοστό το οποίο μπορεί να ανέλθει σε 30% σε ομάδες μη καπνιστών [13]. Αύξηση του κινδύνου για την ανάπτυξη ΧΑΠ περιγράφεται σε σχέση με συγκεκριμένα επαγγέλματα τα οποία περιλαμβάνουν έκθεση σε σκόνες ή καπνούς όπως η σκόνη του άνθρακα, το πυρίτιο, το κάδμιο, ορισμένες ζωοτροφές και διάφορους διαλύτες [17-23]. Οι επιπτώσεις του **κοινωνικο-οικονομικού επιπέδου** στην επίπτωση της ΧΑΠ, είναι δύσκολο να διαχωριστούν, κυρίως λόγω της συσχέτισης τους με άλλους παράγοντες κινδύνου όπως είναι το κάπνισμα, η διατροφή και το επάγγελμα. Εντούτοις αρκετές μελέτες υποδεικνύουν ότι ύστερα από διόρθωση για τους λοιπούς

γνωστούς παράγοντες κινδύνου, ο κίνδυνος ανάπτυξης ΧΑΠ παρουσιάζεται ανεξάρτητα αυξημένος σε σχέση με το κοινωνικοοικονομικό επίπεδο όπως αυτό συνήθως καθορίζεται με βάση το συνολικό εισόδημα [24] και η πνευμονική λειτουργία τείνει να είναι χαμηλότερη στις χαμηλότερες κοινωνικοοικονομικά ομάδες [25]. Τέλος αναφορικά με τις **λοιμώξεις αναπνευστικού**, φαίνεται από μελέτες ότι δεν επιταχύνουν την έκπτωση της πνευμονικής λειτουργίας και δεν αποτελούν ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη ΧΑΠ στους ενήλικες [26].

Στους ιδιοσυστασιακούς παράγοντες σημαντική θέση κατέχει η **γενετική προδιάθεση**. Οι λόγοι που μόνο ένα ποσοστό του συνόλου των καπνιστών αναπτύσσει κλινικές εκδηλώσεις αποφρακτικής πνευμονοπάθειας αποτελούν αντικείμενο μελέτης. Ο καλύτερα αποδεδειγμένος παράγοντας κινδύνου είναι η σπάνια, κληρονομούμενη ανεπάρκεια της α1-αντιθρυψίνης η οποία οδηγεί σε ανεμπόδιστη δράση της ελαστάσης με αποτέλεσμα την καταστροφή του συνδετικού πνευμονικού ιστού (της ελαστίνης) και συνεπώς σε εμφύσημα [27]. Η νόσος αυτή εκφράζεται εντονότερα στους καπνιστές και τα συμπτώματα ξεκινούν σχετικά νωρίς στην ενήλικη ζωή [28]. Άλλα υποψήφια γονίδια τα οποία μελετώνται για την πιθανή συμμετοχή τους στην ΧΑΠ είναι αυτά που ελέγχουν την λειτουργία των πρωτεϊνών και των αντί-πρωτεϊνών (π.χ. σερπίνη2, α1-αντιχυμοθρυψίνη, α2-μακροσφαιρίνη,

ADAM33, matrix μεταλοπρωτεϊνάσες), αντιοξειδωτικά γονίδια (π.χ. μικροσωμιακή έποξυ υδρολάση, γλουταθειόνη-S-τρανσφεράση, κυτόχρωμα P4501A1), γονίδια τα οποία ρυθμίζουν την βλεννοκροσωτή κάθαρση (π.χ. διαμεμβρανικός ρυθμιστής στην κυστική ίνωση) και γονίδια τα οποία επιδρούν σε φλεγμονώδεις μεσολαβητές (π.χ. δεσμευτική πρωτεΐνη βιταμίνης D, παράγοντας TNF-α, ιντερλευκίνη IL-11, IL-13, παράγοντας TGF-β1 και αντιγόνα ομάδων αίματος) [29]. Επιπλέον, θα πρέπει να αναφερθεί το φαινόμενο της αστάθειας του μικροδορυφορικού DNA (Microsatellite Instability /MSI) το οποίο συσχετίζεται με υψηλούς ρυθμούς μεταλλάξεων και άρα θα μπορούσε να αποτελέσει μια χρήσιμη τεχνική για την αναγνώριση περιοχών με γονιδιακές αλλοιώσεις. Η μέθοδος αυτή έχει εφαρμοστεί σε κύτταρα πτυέλων ασθενών με ΧΑΠ, αναδεικνύοντας περιοχές αστάθειας και ίσως μπορεί να αποτελέσει μελλοντικά ένα εργαλείο μελέτης και έρευνας του σύνθετου γενετικού υπόβαθρου της ΧΑΠ [30]. Τέλος σύμφωνα με αρκετές μελέτες το κάπνισμα φαίνεται να έχει μεγαλύτερη επιβαρυντική επίδραση στις **γυναίκες** προκαλώντας ταχύτερα επιδείνωση της αναπνευστικής λειτουργίας [31].

Άλλος ένας παράγοντας ο οποίος συσχετίζεται με την χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια είναι τα **γεγονότα στα πρώτα χρόνια της ζωής**. Η ανάπτυξη των πνευμόνων μπορεί να επηρεαστεί από παράγοντες όπως το κάπνισμα της μητέρας κατά την ενδομήτριο ζωή, το βάρος

γέννησης, την διατροφή της μητέρας κατά την κύηση, την επαφή της με αλλεργιογόνα [32].

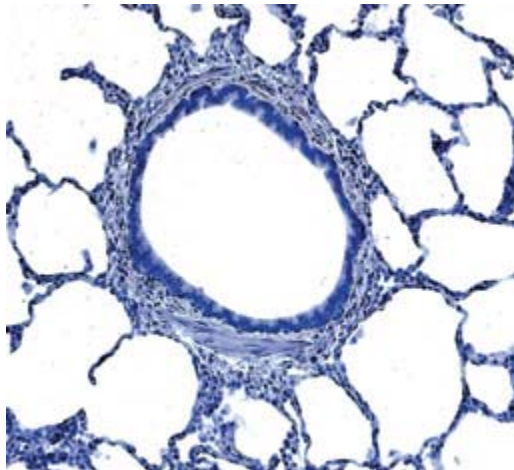
ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΧΑΠ

Ο όρος Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) περιλαμβάνει και έχει κατά πολύ αντικαταστήσει τους παλαιότερα χρησιμοποιούμενους όρους χρόνια βρογχίτιδα (υπερέκκριση βλέννης), νόσος των μικρών αεραγωγών (χρόνια βρογχιολίτιδα) και εμφύσημα [1].

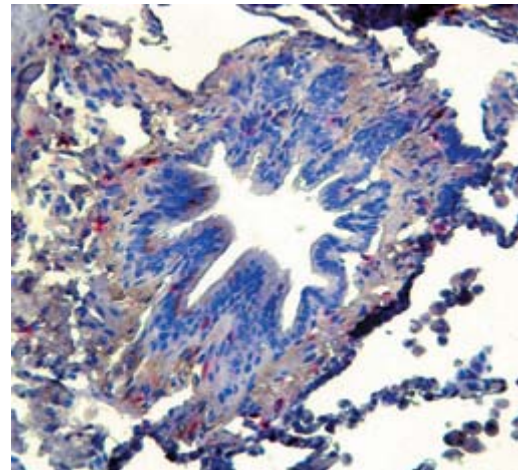
Οι κυρίαρχες παθολογοανατομικές αλλοιώσεις στους πνεύμονες με ΧΑΠ είναι η φλεγμονή των κεντρικών και των περιφερικών (μικρών) αεραγωγών, και η φλεγμονή και καταστροφή των αεροχώρων πέραν των τελικών βρογχιολίων (δηλαδή εμφύσημα) [33].

Οι κεντρικοί αεραγωγοί ευθύνονται κυρίως για την υπερέκκριση βλέννης η οποία αποβάλλεται ως πτύελα. Το βρογχικό επιθήλιο παραμένει ακέραιο, όμως εμφανίζει πλακώδη μετάπλαση και μια αύξηση στον αριθμό των καλυκοειδών κυττάρων [34]. Στην πλειοψηφία των ασθενών με σταθερή απόφραξη, σε αντίθεση με το άσθμα, το πάχος της δικτυωτής βασικής μεμβράνης του επιθηλίου παραμένει φυσιολογικό [34,35]. Υποεπιθηλιακά κυριαρχούν τα μονοπύρηννα κύτταρα, λεμφοκύτταρα και μακροφάγα, με παρουσία και λίγων ουδετερόφιλων. Σε αντιδιαστολή με το άσθμα όπου δεσπόζει ο CD4+ T-helper (T-helper

2) υποτύπος των λεμφοκυττάρων, στην ΧΑΠ κυριαρχεί ο CD8+ T-κυτταροτοξικός κυτταρικός τύπος. Έτσι το κλάσμα CD8+/ CD4+ βρίσκεται αυξημένο στην ΧΑΠ [36].



A



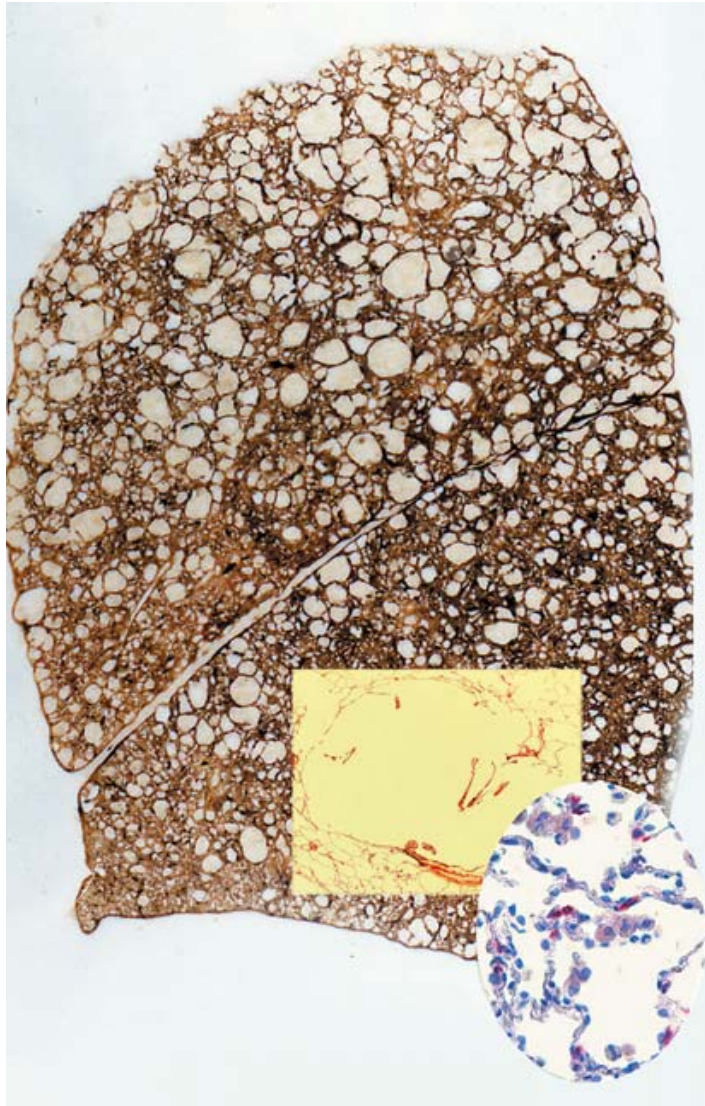
B

Εικόνα 1.

Ιστολογικά δείγματα μικρών αεραγωγών από υγιή πνεύμονα μη-καπνιστή (A) και από ασθενή με ΧΑΠ (B).

Στο δείγμα A παρατηρούμε εικόνα μεμβρανώδους βρογχιολίου από υγιή πνεύμονα μη καπνιστή, με λεπτά τοιχώματα αεραγωγού και ακέραιες κυψελίδες στην περιφέρεια. Στο δείγμα B σημειώνεται η πάχυνση του τοιχώματος του αεραγωγού, η σημαντικά στενωμένη διάμετρος του αυλού του καθώς και η απώλεια πολλών κυψελιδικών συνδέσεων.

Στους περιφερικούς αεραγωγούς (διαμέτρου $<2\text{mm}$) οι παθολογοανατομικές αλλοιώσεις περιλαμβάνουν την αύξηση του αριθμού των φλεγμονωδών κυττάρων και δομικές αλλοιώσεις όπως μετάπλαση των επιθηλιακών καλυκκοειδών κυττάρων, ίνωση του τοιχώματος των αεραγωγών και υπερτροφία των λείων μυϊκών ινών [37]. Η καταστροφή του παρεγχύματος (εμφύσημα) αποτελεί παθολογοανατομικό ορόσημο για την ΧΑΠ. Οι καπνιστές αναπτύσσουν δύο κύρια μορφολογικά είδη εμφύσηματος, τα οποία διαχωρίζονται με βάση την περιοχή του λοβίου που καταστρέφεται. Αυτά είναι 1) το κεντρολοβιώδες εμφύσημα, όταν η καταστροφή περιορίζεται σε αναπνευστικά βρογχιόλια και το κεντρικό τμήμα του λοβίου, ενώ περιβάλλεται από περιοχές φυσιολογικού παρεγχύματος και 2) το πανλοβιώδες εμφύσημα, όταν έχουμε ομοιόμορφη καταστροφή των κυψελιδικών τοιχωμάτων, δηλαδή καταστροφή της δομής όλων των αεροχώρων πέραν των τελικών βρογχολίων. Το κεντρολοβιώδες εμφύσημα έχει την τάση να προσβάλλει τους κάτω λοβούς περισσότερο απ'ότι τους άνω. Το πανλοβιώδες εμφύσημα, χαρακτηριστικά, εμφανίζεται σε νεαρή ηλικία και η οικογενής μορφή του συνήθως συνδέεται με την ανεπάρκεια της $\alpha 1$ -αντιθρυψίνης [38].



Εικόνα 2

Ιστολογικό παρασκεύασμα πνεύμονα από ασθενή με Εμφύσημα και ΧΑΠ. Η τομή (100 μm) αναδεικνύει κεντρολοβιώδες εμφύσημα, ιδιαίτερα στους άνω λοβούς. Το παραλληλόγραμμο ένθετο απεικονίζει κεντρολοβιώδες πρότυπο με διεύρυσμένους αεροχώρους (χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης). Το κυκλικό ένθετο απεικονίζει φλεγμονώδη διήθηση του κυψελιδικού τοιχώματος και των γύρω αεροχώρων από κυψελιδικά μακροφάγα, CD8+ T λεμφοκύτταρα και άλλα κύτταρα.

ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΧΑΠ

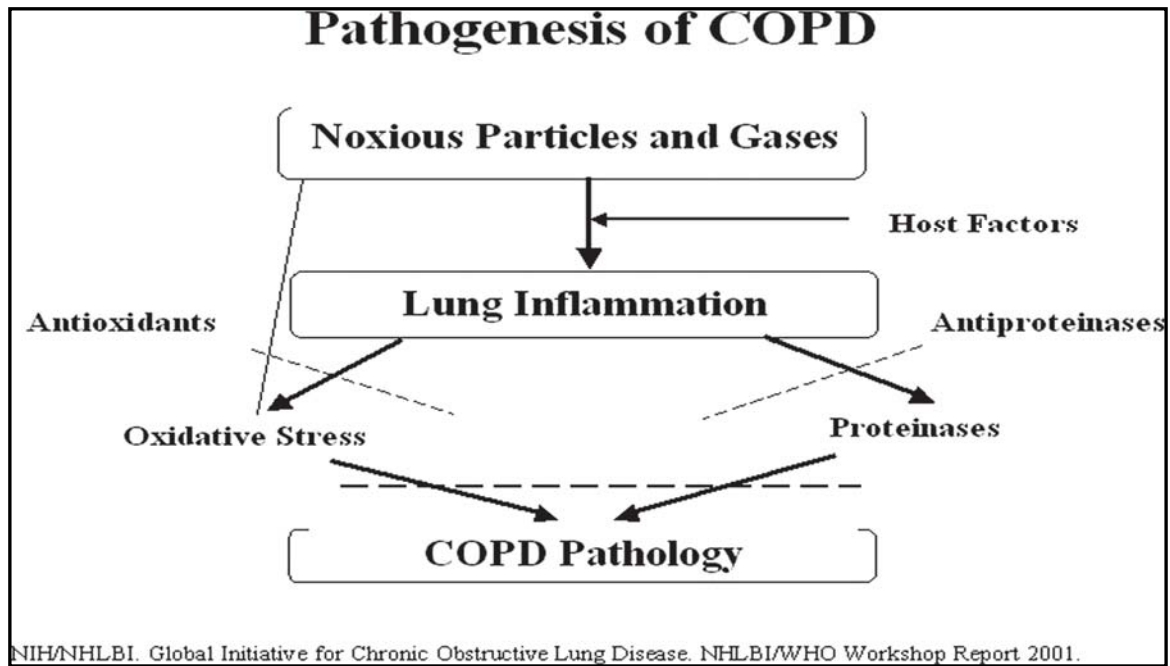
Η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια χαρακτηρίζεται από προοδευτική απόφραξη των αεραγωγών, η οποία είναι μη αναστρέψιμη σε μεγάλο βαθμό [1]. Παλαιότερα, η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια καθοριζόταν από τα συμπτώματα και λειτουργικά από την ύπαρξη απόφραξης της ροής του αέρα [39,40]. Ο πρόσφατος ορισμός δηλώνει ότι η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια χαρακτηρίζεται από παθολογική φλεγμονώδη ανταπόκριση των πνευμόνων σε εισπνεόμενα τοξικά αέρια ή σωματίδια και αναγνωρίζει τη φλεγμονή ως καθοριστικό γνώρισμα αυτής της πάθησης. Η φλεγμονή των αεραγωγών στους ασθενείς με ΧΑΠ δεν είναι παρά μια εντονότερη υπερ-έκφραση της φυσιολογικής φλεγμονώδους απάντησης των αεραγωγών σε χρόνιους ερεθιστικούς παράγοντες όπως ο καπνός του τσιγάρου. Οι μηχανισμοί της ενίσχυσης αυτής δεν είναι πλήρως κατανοητοί και μπορεί να υπάρχει γενετική προδιάθεση [38]. Παρόλο που η περιβαλλοντική μόλυνση και η επαγγελματική έκθεση σε σκόνη συμβάλλουν στην ανάπτυξη χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας, το κάπνισμα είναι ο κύριος αιτιολογικός παράγοντας για αυτή την κατάσταση, που υπερβαίνει κατά πολύ όλους τους άλλους παράγοντες κινδύνου. Η παθογένεια της ΧΑΠ συνδέεται επομένως ισχυρά με τις συνέπειες του καπνού του τσιγάρου επί των πνευμόνων. Οι εξάρσεις της νόσου αποτελούν ένα χαρακτηριστικό

γνώρισμα, ιδιαίτερα καθώς η νόσος εξελίσσεται [41]. Η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια αποτελείται από ένα μίγμα τριών παθολογικών αλλοιώσεων: εμφύσημα στην περιοχή των κυψελίδων των πνευμόνων, υπερπλασία των αδένων του βλεννογόνου κυρίως στους μεγάλους αεραγωγούς, φλεγμονή και ίνωση των μικρών αεραγωγών, αλλοιώσεις οι οποίες υπάρχουν σε διαφορετικό βαθμό σε κάθε ασθενή και συμβάλλουν στην απόφραξη των αεραγωγών [42].

Οξειδωτικό stress

Το οξειδωτικό stress φαίνεται να αποτελεί ένα σημαντικό μηχανισμό ενίσχυσης της φλεγμονής. Οι δείκτες του οξειδωτικού stress (πχ υπεροξείδιο του υδρογόνου, 8-ισοπροστάνιο) βρίσκονται αυξημένοι στα πτύελα, το εκπνεόμενο συμπύκνωμα της αναπνοής αλλά και στην συστηματική κυκλοφορία των ασθενών με ΧΑΠ [43]. Ο καπνός του τσιγάρου ο οποίος είναι ο κυριότερος περιβαλλοντικός βλαπτικός παράγοντας, περιέχει άφθονες ποσότητες ελεύθερων ριζών οξυγόνου, υπεροξείδια και περοξυνιτρίτη, τα οποία έχουν ως αποτέλεσμα την πρόκληση σοβαρού οξειδωτικού stress στους πνεύμονες [43-46]. Οι ουσίες αυτές μέσω της οξείδωσης των κυτταρικών πρωτεϊνών, λιπιδίων, βάσεων του DNA, ενζύμων και εξωκυττάρων στοιχείων όπως το κολλαγόνο της θεμέλιας ουσίας και το υαλουρονικό οξύ, προκαλούν σοβαρές βλάβες στους αεραγωγούς και το παρέγχυμα [47,48]. Οι

συνέπειες του οξειδωτικού stress όπως η χημειοταξία και η ισχυρή προσκόλληση των λευκοκυττάρων έχουν σαν αποτέλεσμα την έναρξη της διαδικασίας της φλεγμονής. Η στρατολόγηση φλεγμονωδών κυττάρων όπως τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα επίσης συνεισφέρει στην διαδικασία της οξείδωσης μέσω απελευθέρωσης ειδικών ενζύμων [49]. Έτσι ο καπνός του τσιγάρου και η τοπική απελευθέρωση οξειδωτικών παραγόντων θέτει σε λειτουργία έναν φαύλο κύκλο ο οποίος προάγει μια παθολογική φλεγμονώδη απάντηση. Επιπλέον συνέπειες του οξειδωτικού stress οι οποίες συνδέονται με την παθογένεια της ΧΑΠ είναι η βλάβη του επιθηλίου των αεροχώρων, η ενίσχυση της κυτταρικής απόπτωσης, η απενεργοποίηση ορισμένων αντί-πρωτεϊνών και η γονιδιακή έκφραση προ-φλεγμονωδών μεσολαβητών [50]. Το οξειδωτικό stress επίσης ενοχοποιείται για την ελάττωση της δραστηριότητας της αποακετυλάσης της ιστόνης (histone deacetylase) στο πνευμονικό παρέγχυμα με αποτέλεσμα την ενισχυμένη έκφραση των φλεγμονωδών γονιδίων καθώς και τη μείωση της αντι-φλεγμονώδους δράσης των κορτικοστεροειδών [47]. Εικ. 3



Εικόνα 3

Στην παθογένεση της ΧΑΠ ενοχοποιείται το οξειδωτικό stress και η καταστροφή του συνδετικού ιστού μέσω της δράσης πρωτεολυτικών ενζύμων.

Φλεγμονή

Πολλά κύτταρα έχουν ενοχοποιηθεί στην παθογένεια της ΧΑΠ, μεταξύ των οποίων τα ουδετερόφιλα, τα μακροφάγα και τα λεμφοκύτταρα. Τα κύτταρα αυτά απελευθερώνουν φλεγμονώδεις μεσολαβητές και αλληλεπιδρούν με τα δομικά κύτταρα των αεραγωγών και του πνευμονικού παρεγχύματος.

Τα **μακροφάγα** φαίνεται να παίζουν ένα κεντρικό ρόλο στην παθογένεια της ΧΑΠ. Παρατηρείται μια σημαντική αύξηση του αριθμού τους (5 έως 10-πλάσια) στους αεραγωγούς, το παρέγχυμα, το βρογχικό

έκπλυμα και στα πτύελα ασθενών με ΧΑΠ [51]. Ο καπνός του τσιγάρου ενεργοποιεί τα μακροφάγα ώστε αυτά απελευθερώνουν μεσολαβητές όπως τον παράγοντα CXCL8 και άλλες CXC χημοκίνες, τον παράγοντα CCL2, την ιντερλευκίνη IL-8, τον παράγοντα LTB4 και τον παράγοντα νέκρωσης όγκου TNF- α , ενορχηστρώνοντας έτσι την φλεγμονή στην ΧΑΠ [52].

Τα ουδετερόφιλα είναι τα πλέον μελετημένα κύτταρα στην ΧΑΠ και όμως ο ρόλος τους δεν είναι ξεκάθαρος [53-55]. Προκαλούν ελαστολύση με την έκκριση της ουδετεροφιλικής ελαστάσης, της καθεψίνης G και της πρωτεϊνάσης 3 [56]. Επιπλέον οι ουδετεροφιλικές πρωτεϊνάσες ενισχύουν την υπερέκκριση βλέννης. Η στρατολόγηση των ουδετερόφιλων είναι αποτέλεσμα της ισχυρής χημειοταξίας που ασκείται από τις IL-8, LTB4 καθώς και της αυξημένης προσκολλητικότητας τους [57]. Η επιβίωση των ουδετερόφιλων στις αναπνευστικές οδούς ενισχύεται στην ΧΑΠ από την αυξημένη παρουσία κυτταροκινών όπως ο παράγοντας GM-CSF. Το γεγονός ότι στην ΧΑΠ η ελαστολυτική δράση των ουδετερόφιλων είναι σαφώς εντονότερη απ'ότι σε άλλες παθήσεις, όπως η κυστική ίνωση, στις οποίες αναγνωρίζονται ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι και άλλοι παράγοντες συμμετέχουν στην ενίσχυση της ελαστολυτικής δράσης των ουδετερόφιλων στην ΧΑΠ [58].

Τα **T-λεμφοκύτταρα** είναι αυξημένα τόσο στο πνευμονικό παρέγχυμα όσο και στους κεντρικούς και περιφερικούς αεραγωγούς ασθενών με ΧΑΠ [59]. Ιδιαίτερα αυξημένα βρίσκονται τα CD8+ κύτταρα, σε αντίθεση με τα CD4+ κύτταρα τα οποία παρουσιάζουν μια πολύ μικρή αύξηση στον αριθμό τους [60]. Τα αυξημένα CD8+ κύτταρα (Tc1 και Th1) εκκρίνουν περφορίνη και ιντερφερόνη γ, επάγουν την έκφραση του υποδοχέα CXCR3, προκαλούν κυτταρόλυση και απόπτωση των κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων [61]. Αν και υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των T-λεμφοκυττάρων και του βαθμού κυψελιδικής καταστροφής καθώς και της βαρύτητας της απόφραξης των αεραγωγών [59,62] εντούτοις ο ρόλος τους στην παθογένεια της ΧΑΠ δεν είναι απόλυτα ξεκαθαρισμένος.

Στοιχεία από πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι τα **επιθηλιακά κύτταρα** στέλνουν «σήματα κινδύνου» σε απάντηση στον ερέθισμα από τον καπνό των τσιγάρων και έτσι είναι υπεύθυνα για την έναρξη και πιθανά την διατήρηση της έμφυτης ανοσολογικής απάντησης των καπνιστών, καθώς επίσης αποτελούν μια σημαντική πηγή φλεγμονωδών μεσολαβητών και πρωτεασών στην ΧΑΠ όπως ο παράγοντας TNF-a και η ιντερλευκίνη IL-8 [63].

Τα **ηωσινόφιλα** αν και είναι το κυρίαρχο λευκοκύτταρο στο άσθμα έχουν έναν λιγότερο σαφή ρόλο στην ΧΑΠ. Ο αριθμός τους αυξάνεται κατά τις παροξύνσεις της νόσου [64]. Αντικείμενο μελέτης αποτελεί η

αλληλεπίδραση τους με τα ουδετερόφιλα και η επακόλουθη αποκοκκίωση τους με αποτέλεσμα υψηλά επίπεδα ηωσινοφιλικής βασικής πρωτεΐνης στα πτύελα [65].

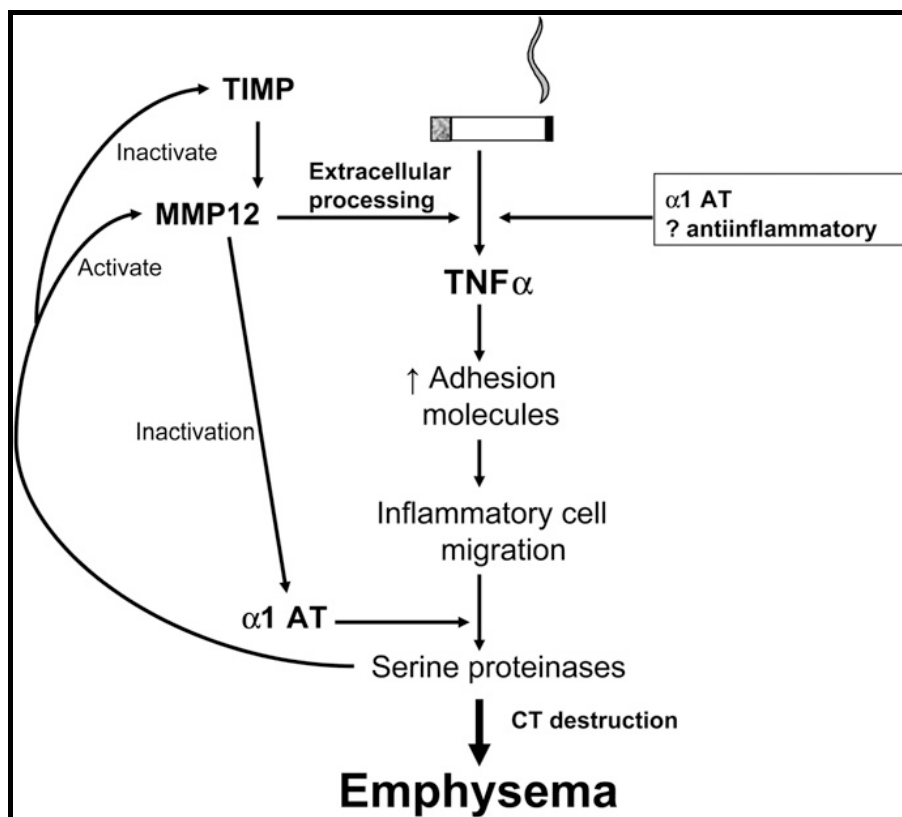
Τέλος τα **δενδριτικά κύτταρα** παίζουν ένα κεντρικό ρόλο στην έναρξη τόσο της έμφυτης όσο και της επίκτητης ανοσολογικής απάντησης και μάλλον παρέχουν έναν σύνδεσμο μεταξύ των δύο [66].

Ιστική βλάβη

Ο καλύτερα μελετημένος μηχανισμός ιστικής βλάβης στην ΧΑΠ είναι η έλλειψη ισορροπίας πρωτεϊνών- αντιπρωτεϊνών (ελασάσης/ αντιελασάσης). Οι πρωτεΐνες είναι ένζυμα τα οποία καταβολίζουν τις πρωτεΐνες της θεμέλιας ουσίας. Ο κυριότερος στόχος τους είναι η ελαστίνη, όμως καταβολίζουν επίσης και το κολλαγόνο, τις πρωτεογλυκάνες, την λαμινίνη και την φμπρονεκτίνη [67-69].

Οι πιο ισχυρές πρωτεΐνες είναι η ουδετεροφιλική ελασάση, η καθεψίνη G, η πρωτεΐνη 3 και οι μεταλλοπρωτεΐνες της θεμέλιας ουσίας [70,71]. Τα ουδετερόφιλα είναι η κύρια πηγή από την οποία προέρχονται οι πρωτεΐνες όμως και άλλα κύτταρα όπως τα μακροφάγα και τα επιθηλιακά συνεισφέρουν. Η ελαστολυτική δράση των πρωτεϊνών ισορροπείται από την δράση των αντί-πρωτεϊνών. Η κύρια αντί-πρωτεΐνη με δράση στο πνευμονικό παρέγχυμα είναι η α1-αντιθρυψίνη και η κύρια αντί-πρωτεΐνη με δράση στους αεραγωγούς

είναι ο αναστολέας της εκκριτικής πρωτεΐνάσης των λευκοκυττάρων (SLPI) [67,72]. Η έλλειψη ισορροπίας στο σύστημα πρωτεϊνών/ αντί-πρωτεϊνών υπέρ των πρωτεϊνών, έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία εμφυσήματος [73].



Εικόνα 4

Σχηματική απεικόνιση των μονοπατιών κυτταροκινών/ κυττάρων/ σερινοπρωτεασών που ενοχοποιούνται στην παθογένεια της ΧΑΠ

Ιστική επιδιόρθωση και παθολογική επαναδιαμόρφωση (remodeling)

Κάθε επεισόδιο ιστικής βλάβης ακολουθείται από μια διαδικασία επιθηλιακής και παρεγχυματικής επιδιόρθωσης. Η διαδικασία αυτή είναι εξαιρετικά πολύπλοκη και όχι πλήρως αποσαφηνισμένη. Στους αεραγωγούς η διαδικασία του remodeling περιλαμβάνει κυτταρική μετανάστευση, κυτταρική διαφοροποίηση και μεταπλασία μεταξύ άλλων μηχανισμών [74]. Έχει δειχθεί ότι ο καπνός του τσιγάρου εμποδίζει τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης και διακόπτει τις διαδικασίες οι οποίες μπορούν να αποκαταστήσουν την δομή των ιστών [75,76]. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση περιβρογχικής ίνωσης και στένωσης, ιδιαίτερα στους μικρούς αεραγωγούς. Η φιμπρονεκτίνη και ο παράγοντας TGF- β οι οποίοι παράγονται από τα επιθηλιακά κύτταρα συμμετέχουν στις φυσιολογικές διαδικασίες επιδιόρθωσης, όμως η υπερπαραγωγή τους οδηγεί σε ίνωση και παθολογική επαναδιαμόρφωση (remodeling) [77,78].

Μελλοντικές κατευθύνσεις στην παθογένεια της ΧΑΠ

Σύμφωνα με τα τελευταία βιβλιογραφικά δεδομένα στην παθογένεια της ΧΑΠ φαίνεται να εμπλέκονται πληθώρα γονιδίων τα οποία σχετίζονται με τους προαναφερθέντες παθογενετικούς μηχανισμούς (οξειδωτικό stress, φλεγμονή, ιστική βλάβη και αναδιαμόρφωση) [79]. Εκτός όμως από την γενετική προδιάθεση

φαίνεται ότι εμπλέκονται και οι επίκτητες σωματικές μεταλλάξεις στην παθογένεια της ΧΑΠ [80]. Το αυξημένο οξειδωτικό stress στη ΧΑΠ, λόγω της χρόνιας φλεγμονής των αεραγωγών, φαίνεται ικανό να αδρανοποιήσει το σύστημα επιδιόρθωσης των «λαθών» του DNA (DNA mismatch repair system) με αποτέλεσμα την δημιουργία γενετικής αστάθειας (microsatellite instability – MSI) [81-83]. Μελέτες από το ερευνητικό εργαστήριο της Πνευμονολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης έχουν ανιχνεύσει υψηλό ποσοστό σωματικών μεταλλάξεων στα πτύελα και το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ασθενών με ΧΑΠ και μάλιστα η συχνότητα εμφάνισης αυτών των αλλοιώσεων φαίνεται να σχετίζεται με τις παροξύνσεις της νόσου [41, 84].

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Celli BR, MacNee W, ATS/ERS Task Force. Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. *Eur Respir J.* 2004 Jun; 23(6):932-46.
2. Siafakas NM, Vermeire P, Pride NB, Paoletti P, Gibson J, Howard P, Yernault JC, Decramer M, Higenbottam T, Postma DS, et al. Optimal assessment and management of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). The European Respiratory Society Task Force. *Eur Respir J.* 1995 Aug; 8(8):1398-1420.
3. American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152:Suppl.5, S77-S121.
4. Coultas DB, Mapel D, Gagnon R, Lydick E. The health impact of undiagnosed airflow obstruction in a national sample of United States adults. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 Aug 1; 164: 372-7.
5. Mannino DM, Homa DM, Akinbami LJ, Ford ES, Redd SC. Chronic obstructive pulmonary disease surveillance--United States, 1971-2000. *MMWR Surveill Summ.* 2002 Aug 2; 51(6):1-16.
6. Mannino DM, Gagnon RC, Petty TL, Lydick E. Obstructive lung disease and low lung function in adults in the United States: data

- from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Arch Intern Med.* 2000 Jun 12; 160(11):1683-9.
7. Siafakas NM, Tzortzaki EG. Few smokers develop COPD. Why? *Respir Med.* 2002 Aug; 96(8):615-24.
 8. Ministry of Health. Mortality and morbidity during the London fog of December 1952. London: HMSO; 1954.
 9. Bascom R, Bromberg PA, Costa DA et al. Health effects of outdoor air pollution. Committee of the Environmental and Occupational Health Assembly of the American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996 Jan; 153(1):3-50.
 10. Bruce N, Perez-Padilla R, Albalak R. Indoor air pollution in developing countries: a major environmental and public health challenge. *Bull World Health Organ.* 2000; 78(9):1078-92.
 11. Ekici A, Ekici M, Kurtipek E, Akin A, Arslan M, Kara T, Apaydin Z, Demir S. Obstructive airway diseases in women exposed to biomass smoke. *Environ Res.* 2005 Sep; 99(1):93-8.
 12. Doll R, Peto R, Wheatley K, Gray R, Sutherland I. Mortality in relation to smoking: 40 years' observations on male British doctors. *BMJ.* 1994 Oct 8; 309(6959):901-11.
 13. Leaderer BP, Samet JM. Passive smoking and adults: new evidence for adverse effects. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994 Nov; 150:1216-8.

14. Leuenberger P, Schwartz J, Ackermann-Liebrich U, Blaser K, Bolognini G, Bongard JP, Brandli O, Braun P, Bron C, Brutsche M, et al. Passive smoking exposure in adults and chronic respiratory symptoms (SAPALDIA Study). Swiss Study on Air Pollution and Lung Diseases in Adults, SAPALDIA Team. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994 Nov; 150(5 Pt 1):1222-8.
15. Bast A, Haenen GR, Doelman CJ. Oxidants and antioxidants: state of the art. *Am J Med*. 1991 Sep 30; 91(3C):2S-13S.
16. Oxman AD, Muir DCF, Shannon HS, Stock SR, Hnizdo E, Lange HJ. Occupational dust exposure and chronic obstructive pulmonary disease. A systematic overview of the evidence. *Am Rev Respir Dis*. 1993 Jul; 148(1):38-48.
17. Burge PS. Occupation and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Eur Respir J*. 1994 Jun; 7(6):1032-4.
18. Hendrick DJ. Occupational and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Thorax*. 1996 Sep; 51(9):947-55.
19. Soutar CA, Hurley JF. Relation between dust exposure and lung function in miners and ex-miners. *Br J Ind Med* 1986;43(5):307-20.
20. Hnizdo E. Loss of lung function associated with exposure to silica dust and with smoking and its relation to disability and mortality in South African gold miners. *Br J Ind Med*. 1992 Jul; 49(7):472-9.

21. Davison AG, Fayers PM, Taylor AJ, Venables KM, Darbyshire J, Pickering CA, Chettle DR, Franklin D, Guthrie CJ, Scott MC, et al. Cadmium fume inhalation and emphysema. *Lancet*. 1988 Mar 26; 1(8587):663-7.
22. Nejjarri C, Tessier JF, Dartigues JF, Barberger-Gateau P, Letenneur L, Salamon R. The relationship between dyspnoea and main lifetime occupation in the elderly. *Int J Epidemiol*. 1993 Oct; 22(5):848-54.
23. Post WK, Heederik D, Kromhout H, Kromhout D. Occupational exposures estimated by a population specific job exposure matrix and 25 year incidence rate of chronic nonspecific lung disease (CNSLD): the Zutphen Study. *Eur Respir J*. 1994; 7:1048-55.
24. Bakke PS, Hanao R, Gulsvik A. Educational level and obstructive lung disease given smoking habits and occupational airborne exposure: a Norwegian community study. *Am J Epidemiol*. 1995; 141:1080-8.
25. Viegi G, Prediletto R, Paoletti P, Carrozzi L, Di Pede F, Vellutini M, Di Pede C, Giuntini C, Lebowitz MD. Respiratory effects of occupational exposure in a general population sample in north Italy. *Am Rev Respir Dis*. 1991 Mar; 143(3):510-5.

26. Fletcher C, Peto R, Tinker C, Speizer FE. The Natural History of Chronic Bronchitis and Emphysema. Oxford, Oxford University Press, 1976.
27. Silverman EK, Province MA, Rao DC, Pierce JA, Campbell EJ. A family study of the variability of pulmonary function in alpha 1-antitrypsin deficiency. *Am Rev Respir Dis.* 1990; 142(5):1015-21.
28. Turino GM, Barker AF, Brantly ML, Cohen AB, Connelly RP, Crystal RG, Eden E, Schluchter MD, Stoller JK. Clinical features of individuals with PI*SZ phenotype of alpha 1-antitrypsin deficiency. Alpha 1-Antitrypsin Deficiency Registry Study Group. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996 Dec; 154(6 Pt 1):1718-25.
29. Tzortzaki EG, Siafakas NM. Genetic susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir Mon* 2006, 38, 84-99.
30. Siafakas NM, Tzortzaki EG, Sourvinos G, Bouros D, Tzanakis N, Kafatos A, Spandidos D. Microsatellite DNA instability in COPD. *Chest* 1999 Jul; 116(1):47-51.
31. Chen Y, Horne SL, Dosman JA. Increased susceptibility to lung dysfunction in female smokers. *Am Rev Respir Dis.* 1991 Jun; 143(6):1224-30.
32. Annesi-Maesano I. Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir Mon*, 2006, 38, 41-70.

33. Saetta M, Turato G, Maestrelli P, Mapp CE, Fabbri LM. Cellular and structural bases of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 May; 163(6):1304-9.
34. Jeffery PK. Comparison of the structural and inflammatory features of COPD and asthma. *Chest*. 2000 May; 117(5 Suppl 1):251S-60S.
35. O'Shaughnessy TC, Ansari TW, Barnes NC, Jeffery PK. Reticular basement membrane thickness on moderately severe asthma and smokers' chronic bronchitis with and without airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:A879.
36. Lams BE, Sousa AR, Rees PJ, Lee TH. Subepithelial immunopathology of the large airways in smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2000 Mar; 15(3):512-6.
37. Saetta M, Turato G, Baraldo S, Zanin A, Braccioni F, Mapp CE, Maestrelli P, Cavallese G, Papi A, Fabbri LM. Goblet cell hyperplasia and epithelial inflammation in peripheral airways of smokers with both symptoms of chronic bronchitis and chronic airflow limitation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Mar; 161(3 Pt 1):1016-21.
38. Kim WD, Eidelman DH, Izquierdo JL, Ghezzi H, Saetta MP, Cosio MG. Centrilobular and panlobular emphysema in smokers.

- Two distinct morphologic and functional entities. *Am Rev Respir Dis.* 1991 Dec; 144(6):1385-90.
39. BTS guidelines for the management of chronic obstructive pulmonary disease. The COPD Guidelines Group of the Standards of Care Committee of the BTS. *Thorax.* 1997 Dec; 52:S1-28.
40. Thurlbeck WM. Chronic airflow obstruction in lung disease. In: Bennington JL, ed. *Major Problems in Pathology, Series No 5.* WB Saunders, Philadelphia, 1976; pp 1-456.
41. Makris D, Tzanakis N, Damianaki A, Ntaoukakis E, Neofytou E, Zervou M, Siafakas NM, Tzortzaki EG. Microsatellite DNA instability and COPD exacerbations. *Eur Respir J* 2008; 32:612-618.
42. Lamb D. Pathology. In: Calverley P, Pride N, ed. *Chronic obstructive pulmonary disease.* London, Chapman & Hall; 1996: 19-34.
43. Rahman I. Oxidative stress in pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: cellular and molecular mechanisms. *Cell Biochem Biophys* 2005; 43(1):167-88.
44. Pryor WA. Biological effects of cigarette smoke, wood smoke, and the smoke from plastics: the use of electron spin resonance. *Free Radic Biol Med.* 1992 Dec; 13(6):659-76.

45. Ludwig PW, Hoidal JR. Alterations in leukocyte oxidative metabolism in cigarette smokers. *Am Rev Respir Dis.* 1982 Dec; 126(6):977-80.
46. Repine JE, Bast A, Lankhorst I. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. Oxidative Stress Study Group. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997 Aug; 156(2 Pt 1):341-57.
47. Ito K, Ito M, Elliott WM, Cosio B, Caramori G, Kon OM, et al. Decreased histone deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2005; 352(19):1967-76.
48. Hautamaki RD, Kobayashi DK, Senior RM, Shapiro SD. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science.* 1997 Sep 26; 277(5334):2002-4.
49. Hoidal JR, Jeffery PK. Cellular and biochemical mechanisms in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir Mon,* 1998, 7, 84-91.
50. MacNee W. Oxidative stress and chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir Mon,* 2006, 38, 100-129.
51. Barnes PJ. Macrophages as orchestrators of COPD. *J COPD* 2004; 1:59-70.
52. Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum

- from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996 Feb; 153(2):530-4.
53. Saetta M, Turato G, Facchini FM, Corbino L, Lucchini RE, Casoni G, Maestrelli P, Mapp CE, Ciaccia A, Fabbri LM. Inflammatory cells in the bronchial glands of smokers with chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997 Nov; 156(5):1633-9.
54. O'Shaughnessy TC, Ansari TW, Barnes NC et al. Inflammatory cells in the airway surface epithelium of bronchitic smokers with and without airflow obstruction. *Eur Respir J.* 1996; 9:14S.
55. Majori M, Gabrielli M, Cuomo A et al. Cellular inflammation in chronic obstructive bronchitis. *Eur Respir J.* 1995; 8:227S.
56. Witko-Sarsat V, Halbwachs-Mecarelli L, Schuster A, Nusbaum P, Ueki I, Canteloup S, Lenoir G, Descamps-Latscha B, Nadel JA. Proteinase 3, a potent secretagogue in airways, is present in cystic fibrosis sputum. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999 Apr; 20(4):729-36.
57. Di Stefano A, Maestrelli P, Roggeri A, Turato G, Calabro S, Potena A, Mapp CE, Ciaccia A, Covacev L, Fabbri LM, et al. Upregulation of adhesion molecules in the bronchial mucosa of subjects with chronic obstructive bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994 Mar; 149(3 Pt 1):803-10.

58. Stockley RA. Neutrophils and the pathogenesis of COPD. *Chest*. 2002 May; 121(5 Suppl):151S-155S.
59. Finkelstein R, Fraser RS, Ghezzi H, Cosio MG. Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995 Nov; 152(5 Pt 1):1666-72.
60. Saetta M, Di Stefano A, Turato G, Facchini FM, Corbino L, Mapp CE, Maestrelli P, Ciaccia A, Fabbri LM. CD8⁺ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Mar; 157(3 Pt 1):822-6.
61. Chrysofakis G, Tzanakis N, Kyriakoy D, Tsoumakidou M, Tsiligianni I, Klimathianaki M, Siafakas NM. Perforin expression and cytotoxic activity of sputum CD8⁺ lymphocytes in patients with COPD. *Chest* 2004;125:71-76.
62. O'Shaughnessy TC, Ansari TW, Barnes NC, Jeffery PK. Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8⁺ T lymphocytes with FEV1. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 Mar;155(3):852-7.
63. Mio T, Romberger DJ, Thompson AB, Robbins RA, Heires A, Rennard SI. Cigarette smoke induces interleukin-8 release from human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 May; 155(5):1770-6.

64. Saetta M, Di Stefano A, Maestrelli P, Turato G, Ruggieri MP, Roggeri A, Calcagni P, Mapp CE, Ciaccia A, Fabbri LM. Airway eosinophilia in chronic bronchitis during exacerbations. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994 Dec; 150(6 Pt 1):1646-52.
65. Liu H, Lazarus SC, Caughey GH, Fahy JV. Neutrophil elastase and elastase-rich cystic fibrosis sputum degranulate human eosinophils in vitro. *Am J Physiol.* 1999 Jan; 276(1 Pt 1):L28-34.
66. Vermaelen K, Pauwels R. Pulmonary dendritic cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005 Sep 1; 172(5):530-51.
67. Drost EM, Selby C, Lannan S, Lowe GD, MacNee W. Changes in neutrophil deformability following in vitro smoke exposure: mechanism and protection. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1992 Mar; 6(3):287-95.
68. Robbins RA, Gossman GL, Nelson KJ, Koyama S, Thompson AB, Rennard SI. Inactivation of chemotactic factor inactivator by cigarette smoke. A potential mechanism of modulating neutrophil recruitment to the lung. *Am Rev Respir Dis.* 1990; 142(4):763-8.
69. Janoff A. Elastases and emphysema. Current assessment of the protease-antiprotease hypothesis. *Am Rev Respir Dis.* 1985 Aug; 132(2):417-33.
70. Morrison HM, Welgus HG, Stockley RA, Burnett D, Campbell EJ. Inhibition of human leukocyte elastase bound to elastin: relative

- ineffectiveness and two mechanisms of inhibitory activity. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1990 Mar; 2(3):263-9.
71. Shapiro SD. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. *Curr Opin Cell Biol.* 1998 Oct; 10(5):602-8.
72. MacNee W, Wiggs B, Belzberg AS, Hogg JC. The effect of cigarette smoking on neutrophil kinetics in human lungs. *N Engl J Med.* 1989 Oct 5; 321(14):924-8.
73. McElvaney NG, Crystal RG. *Proteases and Lung Injury.* Philadelphia, PA: Lippincott Raven, 1997.
74. Punchelle E, Zahm JM. Repair processes of the airway epithelium. In: Lenfant CL (Ed.). *Airways and environments: From injury to repair; Lung biology in health and disease.* New York, NY: Marcel Dekker, 1996.157-182.
75. Nakamura Y, Romberger DJ, Tate L, Ertl RF, Kawamoto M, Adachi Y, Mio T, Sisson JH, Spurzem JR, Rennard SI. Cigarette smoke inhibits lung fibroblast proliferation and chemotaxis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995 May; 151(5):1497-503.
76. Osman M, Cantor JO, Roffman S, Keller S, Turino GM, Mandl I. Cigarette smoke impairs elastin resynthesis in lungs of hamsters with elastase-induced emphysema. *Am Rev Respir Dis.* 1985 Sep; 132(3):640-3.

77. Vignola AM, Chanez P, Chiappara G, Merendino A, Pace E, Rizzo A, la Rocca AM, Bellia V, Bonsignore G, Bousquet J. Transforming growth factor-beta expression in mucosal biopsies in asthma and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 Aug; 156(2 Pt 1):591-9.
78. Shoji S, Ertl RF, Linder J, Romberger DJ, Rennard SI. Bronchial epithelial cells produce chemotactic activity for bronchial epithelial cells. Possible role for fibronectin in airway repair. *Am Rev Respir Dis*. 1990 Jan; 141(1):218-25.
79. Silverman EK. Progress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Generics. *Proc of the Am Thor Soc*, vol 3, 2006.
80. Siafakas NM. “In the Beginning” of COPD: is evolution important? *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Mar 1; 175(5):423-4.
81. Siafakas NM, Tzortzaki EG, Sourvinos G, Bouros D, Tzanakis N, Kafatos A, Spandidos D. Microsatellite DNA instability in COPD. *Chest* 1999; 116:47–51.
82. Samara K, Zervou M, Siafakas NM, Tzortzaki EG. Microsatellite DNA instability in benign lung diseases. *Respir Med* 2006; 100:202-211.
83. Zervou MI, Tzortzaki EG, Makris D, Gaga M, Zervas E, Economidou E, Tsoumakidou M, Tzanakis N, Milic-Emili J,

Siafakas NM. Differences in microsatellite DNA level between asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2006; 28:472-478.

84. Samara KD, Tzortzaki EG, Neofytou E, Karatzanis AD, Lambiri I, Tzanakis N, Siafakas NM. Somatic DNA alterations in lung epithelial barrier cells in COPD patients: a case control study. *Pulm Pharmacol Ther.* 2009 Dec 28. [Epub ahead of print]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Αστάθεια Μικροδορυφορικού DNA (MSI- Microsatellite DNA Instability)

Η απώλεια ετεροζυγωτίας (LOH) και η αστάθεια μικροδορυφορικού DNA (MSI) αποτελούν φαινόμενα που απαντώνται συχνά σε κακοήθειες. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η LOH και η MI ανευρίσκονται και σε αρκετές καλοήθειες παθήσεις [1].

Απώλεια ετεροζυγωτίας

Η LOH αποτελεί ιδιαίτερα προσφιλή μέθοδο διερεύνησης της ύπαρξης ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Τα γονίδια αυτά συνδέονται με την παθογένεια πολλών μορφών καρκίνου [2,3]. 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 [4]. Με την έρευνα αυτή αναλύονται περιοχές που υπάρχει απώλεια του ενός αλληλόμορφου (απώλεια ετεροζυγωτίας) ώστε έμμεσα 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 ετεροζυγωτίας για συγκεκριμένη νόσο αφενός υποδεικνύουν τη θέση νέων ογκοκατασταλτικών γονιδίων και αφετέρου αν αυτά είναι ήδη χαρακτηρισμένα ως υποψήφια γονίδια της νόσου, τότε ενισχύουν τις ενδείξεις για 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 [4,5]. Τέτοια νοσήματα είναι η ακτινική κεράτωση, το οφθαλμικό πτερύγιο και οι αθηρωματικές πλάκες [4-7]. Αξιοσημείωτο δε είναι το γεγονός ότι στην ακτινική κεράτωση, που αποτελεί μια καλοήθη κατάσταση που στο παρελθόν θεωρούταν προκαρκινοματώδης και είχε ερευνηθεί με μελέτες απώλειας ετεροζυγωτίας, το ποσοστό LOH είναι πολύ υψηλότερο συγκριτικά με το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα του δέρματος [4,5]. Επιπλέον, απώλεια ετεροζυγωτίας έχει ανευρεθεί με αρκετά μεγάλη συχνότητα σε πνευμονικά νοσήματα όπως στη σαρκοείδωση, την πνευμονική ίνωση, στο βρογχικό άσθμα και τη χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια [8-10]. Τα ευρήματα υψηλών ποσοστών απώλειας ετεροζυγωτίας σε καλοήθη νοσήματα ενισχύουν την υπόθεση ότι τα 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 [11].

Αστάθεια μικροδορυφορικού DNA

Το μικροδορυφορικό DNA αποτελείται από μικρές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (συνήθως 2-5 νουκλεοτίδια) DNA κατά μήκος του ανθρώπινου γονιδιώματος. Όσον αφορά στη λειτουργία των αλληλουχιών αυτών, στην πλειοψηφία των περιπτώσεων δεν σχετίζεται με τη ρύθμιση της έκφρασης κάποιων γονιδίων. Εντούτοις, έχει προταθεί ότι οι αλληλουχίες αυτές έχουν ρόλο στην αποφυγή λαθών κατά τη διάρκεια φαινόμενων 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. 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 [1,12].

Ο υψηλός πολυμορφισμός των δεικτών αυτών επιτρέπει την χρήση τους για την χαρτογράφηση του γονιδιώματος σε πολλούς οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπινου. Συχνά βρίσκονται σε θέσεις εντός ή πλησίον σημαντικών γονιδιακών τόπων και έτσι μπορούν να

χρησιμοποιηθούν ως δείκτες της νόσου, παρέχοντας μας σημαντικές πληροφορίες για την κατάσταση του γονιδιακού τόπου [1]. Η εκτίμηση της αστάθειας του μικροδορυφορικού DNA (Microsatellite DNA Instability –MSI) ή της απώλειας ετεροζυγωτίας (Loss of Heterozygosity – LOH) σε δείγματα περιφερικών ιστών προσφέρει αξιόπιστες πληροφορίες για την μελέτη των επίκτητων μεταλλάξεων. Αυτό επιτυγχάνεται με την χρήση μικροδορυφορικών δεικτών, οι οποίοι στοχεύουν συγκεκριμένο χρωμοσωμικό τόπο πλησίον ή και εντός γονιδίων τα οποία έχουν γνωστή ή ύποπτη συμμετοχή στην παθογένεια μιας νόσου [1,13].

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 περισσοτέρων

νουκλεοτιδίων είτε στη μητρική είτε στη νέα άλυσσο [15]. Τα σημεία αυτά φυσιολογικά αποτελούν στόχους των συστημάτων επιδιόρθωσης του γονιδιώματος 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 εμφανίζουν τελικά διαφορετικά μεγέθη. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται αστάθεια μικροδορυφορικού DNA (Microsatellite DNA Instability -MSI). 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 με αύξηση της μεταλλαξιογένεσης σε άλλους καρκίνους όπως του μαστού, του παχέος εντέρου και του πνεύμονα [16-20].

Εκτός όμως από τα παραπάνω νοσήματα, αυξημένη επίπτωση MSI διαπιστώθηκε και σε καλοήθη νοσήματα όπως την αθηρωμάτωση, το πτερύγιο του οφθαλμού, τους εμβρυϊκούς ιστούς αυτόματων αποβολών, τη χορεία του Huntington και το σύνδρομο του εύθραυστου X [6,7, 21-23]. Πρόσφατες μελέτες άλλωστε από τους Σιαφάκα και συνεργάτες,

ανέδειξαν την ύπαρξη MSI σε ασθενείς τόσο με ΧΑΠ όσο και με βρογχικό άσθμα [1,9,24-28]. Άλλα πνευμονικά νοσήματα που εμφανίζουν MSI είναι η σαρκοείδωση και η πνευμονική ίνωση [9,10].

Φαίνεται λοιπόν ότι το φαινόμενο της αστάθειας του μικροδορυφορικού DNA δεν είναι αποκλειστικό χαρακτηριστικό του καρκίνου αλλά μπορεί να ανευρίσκεται και σε νόσους με μη κακοήθεις χαρακτήρες που εμφανίζουν διαταραχές πολλαπλασιασμού των κυττάρων τους ή αυξημένο βαθμό μεταλλαξιογένεσης.

Αστάθεια μικροδορυφορικού DNA στη ΧΑΠ

Το γενετικό υπόβαθρο της ΧΑΠ έχει αποτελέσει το επίκεντρο πολλών πρόσφατων μελετών [29]. Σημαντικός φαίνεται να είναι και ο ρόλος των επίκτητων σωματικών μεταλλάξεων στην παθογένεση της ΧΑΠ, η οποία πιθανώς είναι μια νόσος με πολυγονιδιακή γενετική προδιάθεση [13,27]. Επιπλέον, έχει προταθεί ότι η αστάθεια του μικροδορυφορικού DNA στη ΧΑΠ μπορεί να υποδείξει αποσταθεροποίηση του γενώματος σε διάφορους τύπους. Η αποσταθεροποίηση αυτή θεωρείται ότι μπορεί να είναι το αποτέλεσμα τύπου βλάβης του DNA εξαιτίας αυξημένου οξειδωτικού στρες που όχι μόνο οδηγεί σε προϊόντα DNA τα οποία είναι δυνητικά μεταλλαξιογόνα, αλλά επιπλέον προκαλεί «χαλάρωση» στους προστατευτικούς μηχανισμούς του DNA, καταστέλλοντας σημαντικά γονίδια του

συστήματος MMR (mismatch repair system). Έτσι, η μειωμένη ικανότητα επιδιόρθωσης του γενώματος μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα αυξημένο κίνδυνο νοσηρότητας [28].

Παρόλο που το σύστημα MMR αποτελεί το επίκεντρο των περισσότερων ερευνών σχετικά με την αστάθεια του μικροδορυφορικού DNA, υπάρχουν ερευνητές που συσχετίζουν το φαινόμενο αυτό με άλλο σύστημα επιδιόρθωσης του γενώματος και συγκεκριμένα το σύστημα επιδιόρθωσης μέσω αφαίρεσης βάσεων από το DNA (base excision repair system -BER). Με βάση τη δική τους θεωρία, το παραπάνω σύστημα υπερλειτουργεί σε συνθήκες χρόνιας φλεγμονής οδηγώντας τελικά σε αποσταθεροποίηση του γενώματος και αστάθεια του μικροδορυφορικού DNA [30,31]. Ανεξάρτητα πάντως από το ποιο ή ποια μεταξύ των συστημάτων επιδιόρθωσης του DNA είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση της αστάθειας του μικροδορυφορικού DNA, η ακριβής σημασία του γεγονότος αυτού αποτελεί ερώτημα που δεν έχει πλήρως απαντηθεί ακόμα.

Πρόσφατες μελέτες από το εργαστήριο μας έδειξαν ότι σωματικές γενετικές μεταλλάξεις όπως η αστάθεια του μικροδορυφορικού DNA αποτελούν ανιχνεύσιμα φαινόμενα σε δείγματα πτυέλων ασθενών με ΧΑΠ [13,27,28,32]. Περαιτέρω διερευνώντας την σημασία των ευρημάτων αυτών και λαμβάνοντας υπόψη τη συνολική βλαπτική επίδραση του καπνίσματος κατά μήκος της αναπνευστικής οδού,

διερευνήσαμε την πιθανότητα ανίχνευσης αλλοιώσεων σε επίπεδο μικροδορυφορικού DNA στο ανώτερο αναπνευστικό ασθενών με ΧΑΠ, σε ρινικά κυτταρολογικά δείγματα ασθενών με ΧΑΠ, κάνοντας και την σύγκριση με κυτταρολογικά δείγματα πτυέλων των ίδιων ατόμων. Ενδιαφέρον είναι ότι αστάθεια μικροδορυφορικού DNA ανευρέθηκε μόνο σε δείγματα πτυέλων ασθενών με ΧΑΠ. Αντιθέτως δε βρέθηκαν παρόμοιες αλλοιώσεις σε ρινικά κυτταρολογικά δείγματα των ίδιων ατόμων [33].

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η αστάθεια του μικροδορυφορικού DNA σε συγκεκριμένες χρωμοσωμικές περιοχές δεν είναι μόνο ειδικό εύρημα για τη νόσο, όπως ήταν ήδη γνωστό, αλλά είναι και ειδικό εύρημα για τον ιστό στόχο της νόσου, δηλαδή τους πνεύμονες. Έτσι, αν υποθεθεί ότι το μικροδορυφορικό DNA ασκεί λειτουργικό προστατευτικό ρόλο «προασπίζοντας» το γένωμα από τις βλαπτικές επιδράσεις του περιβάλλοντος, όπως έχει ήδη προταθεί, ο ρόλος του αυτός χάνεται μέσω γενετικών αλλαγών που λαμβάνουν μέρος ειδικά στους κατώτερους αεραγωγούς [33,34]. Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν επιπλέον την υπόθεση ότι η αστάθεια του μικροδορυφορικού DNA μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο γενετικό εργαλείο ανίχνευσης στη μοριακή επιδημιολογία, εντοπίζοντας τους καπνιστές που είναι επιρρεπείς στο να εμφανίσουν ΧΑΠ.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Samara K, Zervou M, Siafakas NM, Tzortzaki EG. Microsatellite DNA instability in benign lung diseases. *Respir Med* 2006; 100:202-211.
2. Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1971; 68(4):820-3.
3. Loeb LA, Christian FC. Multiple mutations in human cancers. *Mutation Res*. 1996; 350:279-286.
4. Rehman I, Quinn AG, Healy E, Rees JL. High frequency of loss of heterozygosity in actinic keratosis, a usually benign disease. *Lancet* 1994; 344(8925):788-789.
5. Kushida Y, Miki H, Ohmori M. Loss 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.
6. Detorakis ET, Sourvinos G, Tsamparlakis J, Spandidos DA. Evaluation of loss of heterozygosity and microsatellite instability in human pterygium: clinical correlations. *Br J Ophthalmol*. 1998 Nov; 82(11):1324-8.
7. Hatzistamou J, Kiaris H, Ergazaki M, Spandidos DA. Loss of heterozygosity and microsatellite instability in human

- atherosclerotic plaques. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996 Aug 5; 225(1):186-90.
8. 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 Nov; 160(5 Pt 1):1729-33.
 9. 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.
 10. 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 Sep; 162(3):1115-9.
 11. Teh BT, Larsson C, Nordenskjold M. Tumor suppressor genes (TSG). *Anticancer Res*. 1999 Nov-Dec; 19(6A):4715-28.
 12. Naidoo R, Chetty R. The applications of microsatellites in molecular pathology. *Pathol Oncol Res* 1998; 4(4):310-315.
 13. Anderson JP, Bozinovski S. Acquired somatic mutations in the molecular pathogenesis of COPD. *Trends Pharmacol Sci* 2003; 24(2):71-76.
 14. Spandidos DA. A unified theory for the development of cancer. *Biosci Rep*. 1986 Aug; 6(8):691-708.

15. Weber JL, May PE. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet.* 1989 Mar;4(3):388-96.
16. Radman M, Wagner R. Mismatch recognition in chromosomal interactions and speciation. *Chromosoma.* 1993 Jun;102(6):369-73.
17. Schlotterer C, Tautz D. Slippage synthesis of simple sequence DANN. *Nucleic Acids Res.* 1992; 20(2):211-215.
18. Fedier A, Fink D. Mutatations in DNA mismatch repair genes: Implications for DNA damage signalling and drug sensitivity. *Int J Oncol.* 2004; 24:1039-1047.
19. 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 Dec 17; 75(6):1227-36.
20. 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 May 7; 260(5109):812-6.
21. Yee CJ, Roodi N, Verrier CS, Parl FF. Microsatellite instability and loss of heterozygosity in breast cancer. *Cancer Res.* 1994 Apr 1; 54(7):1641-4.

22. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993 Jun 10; 363(6429):558-61.
23. 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 Apr; 113(4):1091-4.
24. Kiaris H, Koumantakis E, Ergazaki M, Spandidos DA. Microsatellite instability in aborted embryos. *Mol Hum Reprod*. 1996 Jan; 2(1):72-4.
25. Snell RG, MacMillan JC, Cheadle JP, Fenton I, Lazarou LP, Davies P, MacDonald ME, Gusella JF, Harper PS, Shaw DJ. Relationship between trinucleotide repeat expansion and phenotypic variation in Huntington's disease. *Nat Genet*. 1993 Aug; 4(4):393-7.
26. 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 May 24; 252(5010):1179-81.

27. Siafakas NM, Tzortzaki EG, Sourvinos G, Bouros D, Tzanakis N, Kafatos A, Spandidos D. Microsatellite DNA instability in COPD. *Chest* 1999; 116:47-51.
28. Zervou MI, Tzortzaki EG, Makris D, Gaga M, Zervas E, Economidou E, Tsoumakidou M, Tzanakis N, Milic-Emili J, Siafakas NM. Differences in Microsatellite DNA level between Asthma and COPD. *Eur Respir J* 2006; 28(3):472-8.
29. Silverman EK. Progress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Generics. *Proc of the Am Thor Soc*, vol 3, 2006.
30. Guo HH, Loeb LA. Tumbling down a different pathway to genetic instability. *J. Clin. Invest.* 2003; 112:1793–1795.
31. Hofseth LJ, Khan MA, Ambrose A. The adaptive imbalance in base excision–repair enzymes generates microsatellite instability in chronic inflammation. *J. Clin. Invest.* 2003; 112:1887–1894.
32. Makris D, Tzanakis N, Damianaki A, Ntaoukakis E, Neofytou E, Zervou M, Siafakas NM, Tzortzaki EG. Microsatellite DNA instability and COPD exacerbations. *Eur Respir J* 2008; 32:612-618.
33. Karatzanis AD, Samara KD, Tzortzaki E, Zervou M, Helidonis ES, Velegrakis GA, Siafakas NM. Microsatellite DNA instability in nasal cytology of COPD patients. *Oncology Reports*, 2007; 17(3):661-665.

34. Vachier I, Vignola AM, Chiappara G, et al. Inflammatory features of nasal mucosa in smokers with and without COPD. *Thorax* 2004;59;303-307.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Μία υπόθεση για τα αρχικά παθογενετικά γεγονότα στη ΧΑΠ

Η Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ), όπως αναφέρεται και στον πιο πρόσφατο ορισμό της [1] είναι μια νόσος η οποία χαρακτηρίζεται από προοδευτική, μερικώς αναστρέψιμη απόφραξη των αεραγωγών, η οποία θεωρείται αποτέλεσμα της βλαπτικής φλεγμονώδους αντίδρασης των πνευμόνων σε εισπνεόμενα βλαβερά αέρια και σωματίδια [1]. Η συντριπτική πλειοψηφία των ασθενών με ΧΑΠ έχει κοινό βλαπτικό αιτιολογικό παράγοντα, την χρόνια έκθεση στον καπνό των τσιγάρων. Ο καπνός των τσιγάρων αποτελεί σημαντική πηγή σωματιδίων, ελευθέρων ριζών και ενεργών χημικών συστατικών τα οποία έχουν την ικανότητα να παράγουν ένα τεράστιο φορτίο οξειδωτικού stress στους πνεύμονες [2]. Οι βλαπτικές επιδράσεις των παραγόντων αυτών σε μοριακό επίπεδο συνθέτουν την βάση των περισσότερων παθολογικών φαινομένων στην ΧΑΠ, όπως η φλεγμονή, η καταστροφή του πνευμονικού παρεγχύματος –το εμφύσημα, η υπερέκκριση βλέννης και η ίνωση των αεραγωγών [3]. Εντούτοις, μόνο μια μειοψηφία των καπνιστών διαγιγνώσκονται με ΧΑΠ, γεγονός που υποστηρίζει την παθογενετική θεωρία ότι η νόσος είναι αποτέλεσμα

αλληλεπίδρασης μεταξύ του περιβάλλοντος και του οργανισμού του κάθε ασθενούς και ρυθμίζεται από την γενετική πληροφορία [4].

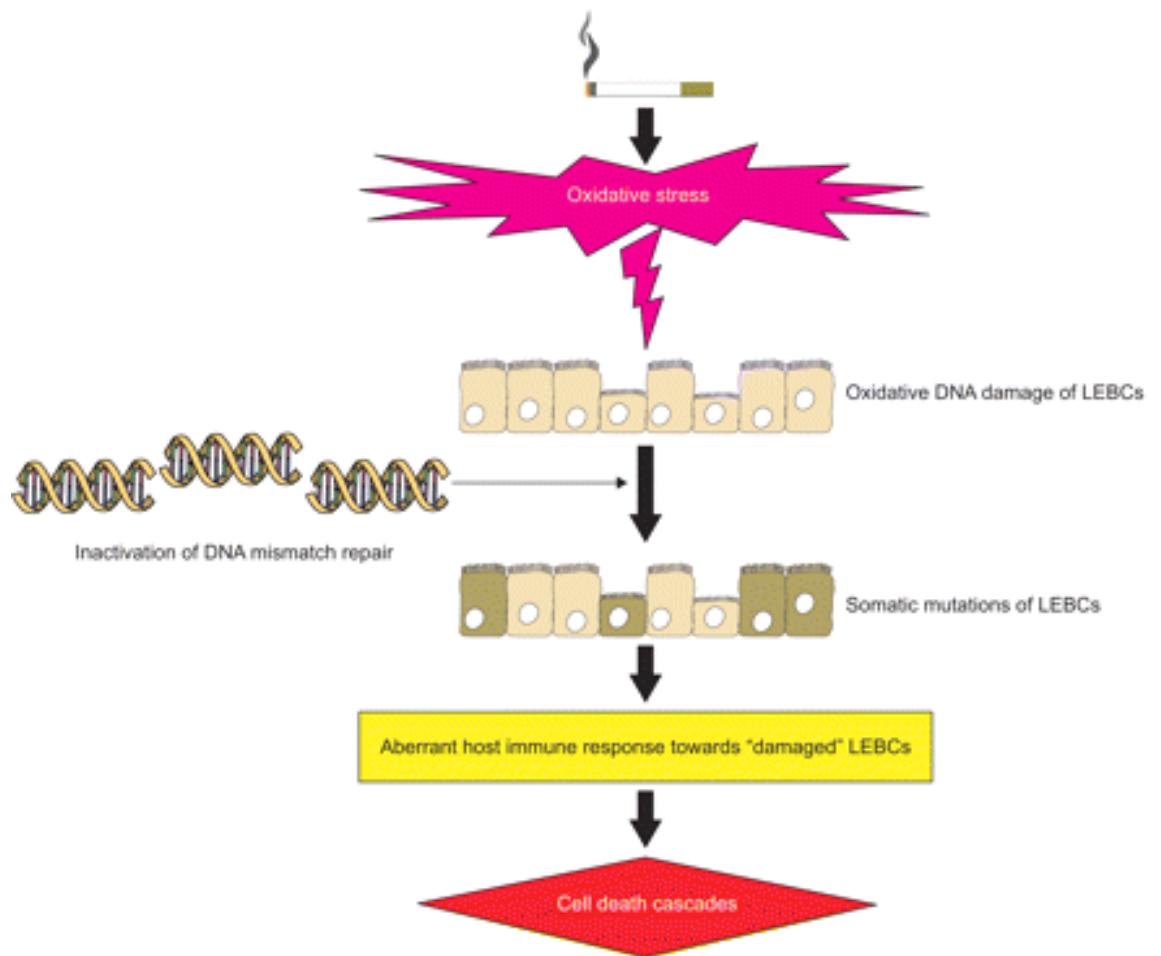
Αν και πολλά παθογενετικά μονοπάτια έχουν μελετηθεί και ενοχοποιηθεί στην παθογένεση της ΧΑΠ, φαίνεται απίθανο ένα μοναδικό μονοπάτι να φέρει όλη την ευθύνη. Μεταξύ των υποψήφιων γονιδίων που βρίσκονται υπο μελέτη είναι και τα γονίδια που επηρεάζουν την παραγωγή πρωτεασών και αντι-πρωτεασών, τα γονίδια που ρυθμίζουν τον μεταβολισμό των τοξικών παραγώγων του καπνού, αυτά που συμμετέχουν στην βλεννοκροσώτη κάθαρση και αυτά που ρυθμίζουν ποικίλους φλεγμονώδεις παράγοντες [4]. Πρόσφατες μελέτες στην παθογένεση της ΧΑΠ, στο μοριακό επίπεδο, εστιάζονται στην συμβολή των επιγενετικών μηχανισμών, όπως οι επίκτητες σωματικές μεταλλάξεις [5]. Η ευπάθεια ενός οργανισμού στην εμφάνιση σωματικών μεταλλάξεων -αν και αυτές δεν επηρεάζουν τα βλαστικά κύτταρα και ούτε κληρονομούνται- φαίνεται ότι ίσως ελέγχεται από κληρονομούμενα γονίδια [5]. Η γενωμική ακεραιότητα κάθε οργανισμού υπόκειται κατά τη διάρκεια των ετών σε πολυάριθμα βλαπτικά ερεθίσματα όπως ο καπνός, τοξικά χημικά, υπεριώδης ακτινοβολία και άλλα. Είναι, ωστόσο, γνωστή η ικανότητα των κυττάρων να επιδιορθώνουν τις ποικίλες γενετικές αλλοιώσεις που προκύπτουν μέσω ειδικών μονοπατιών και να αποκαθιστούν την ακεραιότητα του DNA (συστήματα MMR, BER) [6]. Εντούτοις το αυξημένο και επίμονο οξειδωτικό stress φαίνεται ότι μπορεί

να απενεργοποιεί τα συστήματα επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA με αποτέλεσμα την εμφάνιση επίκτητων μεταλλάξεων. Οι μεταλλάξεις αυτές οι οποίες μόνιμα αλλοιώνουν την ικανότητα αυτό-επιδιόρθωσης του DNA, έχουν ως αποτέλεσμα την γενετική αστάθεια [7]. Ένα μοντέλο το οποίο επιβεβαιώνει την παραπάνω υπόθεση είναι οι βλάβες που ανιχνεύονται στο επίπεδο του μικροδορυφορικού DNA στα πύελα ασθενών με ΧΑΠ [8].

Μια καινούρια υπόθεση για τα αρχικά γεγονότα στην παθογένεια της ΧΑΠ από την ερευνητική μας ομάδα προτείνει ότι η νόσος ίσως εξαρτάται από μια παρεκκλίνουσα ανοσολογική απάντηση σε ένα βλαπτικό ερέθισμα η οποία προκαλεί χρόνια φλεγμονή [9]. Συγκεκριμένα το κάπνισμα τσιγάρων μέσω του επίμονου οξειδωτικού stress που επιφέρει, προκαλεί οξειδωτική βλάβη στο DNA των επιθηλιακών κυττάρων του πνεύμονα (lung epithelial barrier cells –LEBCs), τα οποία είναι η πρώτη γραμμή άμυνας έναντι των εισπνεόμενων βλαπτικών ουσιών [10]. Η οξειδωτική επιβάρυνση που προκύπτει από την έκθεση σε τοξίνες, καπνό τσιγάρων και λοιπά παθογόνα ίσως να έχει ως αποτέλεσμα όχι μόνο τις σωματικές, επίκτητες μεταλλάξεις των επιθηλιακών κυττάρων αλλά και την ενεργοποίηση του συστήματος των δενδριτικών κυττάρων. Τα αντιγονοπαρουσιαστικά δενδριτικά κύτταρα δεν αναγνωρίζουν τα «αλλοιωμένα» επιθηλιακά κύτταρα ως φυσιολογικά και ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα προκειμένου να αμυνθεί

έναντι του «εισβολέα». Τα δενδριτικά κύτταρα ταξιδεύουν στους επιχώριους λεμφαδένες με το σήμα κινδύνου και το παρουσιάζουν σε naïve T λεμφοκύτταρα, τα οποία επάγουν τον πολλαπλασιασμό των CD8+ κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων [11-13]. Τα κυτταροτοξικά CD8+ T λεμφοκύτταρα μεταναστεύουν πίσω στο σημείο της αρχικής βλάβης (πνεύμονας), όπου απελευθερώνοντας πρωτεολυτικά ένζυμα, όπως περφορίνη και granzymes, επιτίθενται στα κύτταρα-στόχο, τα «αλλοιωμένα» επιθηλιακά κύτταρα. Η περφορίνη δρά δημιουργώντας πόρους στις κυτταρικές μεμβράνες ενώ τα granzymes, που είναι σερινο-πρωτεάσες, εισέρχονται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων-στόχων, αλλάζουν την λειτουργία τους και ενεργοποιούν τις διαδικασίες απόπτωσης και κυτταρικού θανάτου [14,15].

Το παραπάνω μοντέλο, αν και χρειάζεται περαιτέρω πειραματική επιβεβαίωση, αποτελεί μια ελκυστική θεωρητική προσέγγιση της πρώιμης φλεγμονώδους αντίδρασης και της παθογένειας της ΧΑΠ, καθώς συμπεριλαμβάνει την οξειδωτική βλάβη του DNA των επιθηλιακών πνευμονικών κυττάρων και την ανοσολογική απάντηση του οργανισμού. Η παρούσα διατριβή αποτέλεσε μέρος της διερεύνησης του παραπάνω μοντέλου με το να προσδιορίσει τα κύτταρα που εμφανίζουν την επίκτητη σωματική αλλοίωση του DNA.



Εικόνα 1

Σχηματική απεικόνιση του προτεινόμενου παθογενετικού μοντέλου για την ΧΑΠ. Το οξειδωτικό φορτίο που προκαλεί το κάπνισμα βλάπτει το DNA των επιθηλιακών κυττάρων του πνεύμονα (lung epithelial barrier cells –LEBCs) και απενεργοποιεί το σύστημα επιδιόρθωσης βλαβών του DNA (MMR -mismatch repair system), με αποτέλεσμα την εμφάνιση επίκτητων σωματικών μεταλλάξεων στα επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα. Η παρουσία των αλλοιώσεων αυτών προκαλεί μια ειδική ανοσολογική απάντηση και ενεργοποιεί τις διαδικασίες κυτταρικού θανάτου. [Tzortzaki E, Siafakas N. ERJ 2009 Aug; 34(2):310-5.]

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Celli BR, MacNee W, ATS/ERS Task Force. Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. *Eur Respir J* 2004; 23: 932–946.
2. MacNee W. Pulmonary and systemic oxidant/antioxidant imbalance in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2: 50-60.
3. Stevenson CS, Koch LG, Britton SL. Aerobic capacity, oxidant stress, and chronic obstructive pulmonary disease--a new take on an old hypothesis. *Pharmacol Ther.* 2006 Apr; 110(1):71-82.
4. Wang IM, Stepaniants S, Boie Y, Mortimer JR et al. Gene expression profiling in patients with chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008 Feb 15; 177(4):402-11.
5. Anderson GP, Bozinovski S. Acquired somatic mutations in the molecular pathogenesis of COPD. *Trends Pharmacol Sci.* 2003 Feb; 24(2):71-6.
6. Budzowska M, Kanaar R. Mechanisms of dealing with DNA damage-induced replication problems. *Cell Biochem Biophys.* 2009; 53(1):17-31.

7. Chang CL, Marra G, Chauhan DP, Ha HT et al, Oxidative stress inactivates the human DNA mismatch repair system. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002 Jul; 283(1):C148-54.
8. Siafakas NM, Tzortzaki EG, Sourvinos G, Bouros D, Tzanakis N, Kafatos A, Spandidos D. Microsatellite DNA instability in COPD. *Chest.* 1999 Jul; 116(1):47-51.
9. Tzortzaki EG, Siafakas NM. A hypothesis for the initiation of COPD. *Eur Respir J.* 2009 Aug; 34(2):310-5.
10. Rahman I. Oxidative stress, chromatin remodeling and gene transcription in inflammation and chronic lung diseases. *J Biochem Mol Biol.* 2003 Jan 31;36(1):95-109.
11. Van Pottelberge GR, Bracke KR, Joos GF, Brusselle GG. The role of dendritic cells in the pathogenesis of COPD: liaison officers in the front line. *COPD* 2009 Aug;6(4):284-90.
12. Barnes PJ, Cosio MG. Characterization of T lymphocytes in chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS Med.* 2004 Oct; 1(1):e20.
13. Chrysofakis G, Tzanakis N, Kyriakoy D, Tsoumakidou M, Tsiligianni I, Klimathianaki M, Siafakas NM. Perforin expression and cytotoxic activity of sputum CD8⁺ lymphocytes in patients with COPD. *Chest.* 2004 Jan;125(1):71-6.
14. Zhao MQ, Amir MK, Rice WR, Enelow RI. Type II pneumocyte-CD8⁺ T-cell interactions. Relationship between target cell

cytotoxicity and activation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001 Sep; 25(3):362-9.

15. Vernooij JH, Möller GM, van Suylen RJ, van Spijk MP, Cloots RH, Hoet PH, Pennings HJ, Wouters EF. Increased granzyme-A expression in type II pneumocytes of patients with severe chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007 Mar 1; 175(5):464-72.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

«ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΑΣΤΑΘΕΙΑΣ ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΟΥ DNA ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥΣ ΥΠΟΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ ΠΤΥΕΛΩΝ ΚΑΙ ΒΡΟΓΧΟΚΥΨΕΛΙΔΙΚΟΥ ΕΚΠΛΥΜΑΤΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΧΑΠ»

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το γενετικό υπόβαθρο της ΧΑΠ έχει αποτελέσει το επίκεντρο πολλών πρόσφατων μελετών. Σημαντικός φαίνεται να είναι και ο ρόλος των επίκτητων σωματικών μεταλλάξεων στην παθογένεση της ΧΑΠ [1-4]. Οι επίκτητες σωματικές μεταλλάξεις θεωρούνται σποραδικές αλλαγές σε γονίδια ή περιοχές ελέγχου των γονιδίων, οι οποίες προκύπτουν αυτόματα και μάλλον σπάνια. Η συχνότητα των μεταλλάξεων αυτών όμως αυξάνεται κατά πολύ σε ιστούς οι οποίοι εκτίθενται σε επαναλαμβανόμενες εξωγενείς μεταλλαξιγόνες προσβολές. Αν και η «ευπάθεια» στην εμφάνιση μεταλλάξεων κατ'αυτόν τον τρόπο ενδέχεται να υπόκειται σε έλεγχο από κληρονομούμενα γονίδια, οι σωματικές μεταλλάξεις δεν κληρονομούνται [3].

Σε πρόσφατες μελέτες από την ομάδα μας ανιχνεύθηκαν αστάθεια του μικροδορυφορικού DNA ή/και απώλεια ετεροζυγωτίας σε δείγματα κυττάρων πτυέλων ασθενών με ΧΑΠ και βρογχικό άσθμα [5-7,18-20]. Ωστόσο ο συγκεκριμένος κυτταρικός πληθυσμός, ο οποίος εμφανίζει την

γενετική αυτή αστάθεια δεν έχει εξακριβωθεί. Έτσι, σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν αφενός να εξετάσει την παρουσία επίκτητων σωματικών γενετικών αλλοιώσεων σε κύτταρα πτυέλων και βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος και αφετέρου η διερεύνηση του συγκεκριμένου κυτταρικού πληθυσμού που εμφανίζει τις αλλοιώσεις αυτές. Η αναγνώριση του κυτταρικού πληθυσμού που είναι ευπαθής σε βλάβες του DNA στην ΧΑΠ, μπορεί να δια φωτίσει ένα σημαντικό κομμάτι της παθογένεσης της νόσου. Η φυσική ικανότητα του πάσχοντος πνεύμονα στην ΧΑΠ να διακόπτει την εμμένουσα φλεγμονή και να ξεκινά την ιστική επιδιόρθωση είναι μια διαδικασία η οποία εξαρτάται από την ακεραιότητα των μηχανισμών αυτόματης επιδιόρθωσης του DNA.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

1) Πληθυσμός

Μελετήθηκαν συνολικά 35 ασθενείς με ΧΑΠ και 30 μάρτυρες («υγιείς καπνιστές»). Όλοι οι ασθενείς με ΧΑΠ ανήκαν στο στάδιο II κατά GOLD [21] και ήταν πρώην καπνιστές για διάστημα τουλάχιστον 6 μηνών. Οι «υγιείς» καπνιστές ήταν νυν και πρώην καπνιστές. Όλοι οι ασθενείς καθώς και οι μάρτυρες που συμμετείχαν στην μελέτη αυτή υπέγραψαν έντυπο ενημέρωσης και συγκατάθεσης.

Οι ασθενείς με ΧΑΠ χωρίστηκαν σε δύο ομάδες: η πρώτη ομάδα (Α) αποτελούνταν από 20 ασθενείς με ΧΑΠ οι οποίοι υποβλήθηκαν σε πρόκληση πτυέλων. Η μέση ηλικία της ομάδας ήταν 69 ± 9 έτη και η μέση καπνιστική συνήθεια 50.5 ± 14 πακέτα/έτη. Από τον σπυρομετρικό έλεγχο οι τιμές μετά βρογχοδιαστολή ήταν: FEV₁ (% pred): 61 ± 8 , FVC (% pred): 77 ± 12 and FEV₁/FVC: 59 ± 4 .

Η δεύτερη ομάδα (Β) αποτελούνταν από 15 ασθενείς με ΧΑΠ οι οποίοι υποβλήθηκαν σε βρογχοσκόπηση και βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα για διαγνωστικούς λόγους άσχετους με την παρούσα μελέτη. Η μέση ηλικία της ομάδας ήταν 64 ± 11 έτη και η μέση καπνιστική συνήθεια 61.3 ± 13 πακέτα/έτη. Από τον σπυρομετρικό έλεγχο οι τιμές μετά βρογχοδιαστολή ήταν FEV₁ (% pred): 63 ± 11.5 , FVC (% pred): 78 ± 9 and FEV₁/FVC: 58 ± 6 . Ασθενείς οι οποίοι διαγνώσθηκαν με κακοήθεια ή διάμεση πνευμονοπάθεια αποκλείστηκαν από την παρούσα μελέτη. Όλοι οι ασθενείς που συμμετείχαν στην μελέτη ήταν ελεύθεροι παροξυσμών ΧΑΠ για χρονικό διάστημα τουλάχιστον ενός μήνα.

Η ομάδα ελέγχου (μάρτυρες) αποτελούνταν από 30 καπνιστές με φυσιολογικό λειτουργικό έλεγχο πνευμόνων. Η μέση ηλικία της ομάδας ήταν 56 ± 17 έτη και η μέση καπνιστική συνήθεια 52 ± 9 πακέτα/έτη. Από τον σπυρομετρικό έλεγχο οι τιμές μετά βρογχοδιαστολή ήταν FEV₁ (% pred): 92 ± 4 , FVC (%pred): 88 ± 4 and FEV₁/FVC (%): 83 ± 8 .

(Πίνακας 1)

Πίνακας 1:

Δημογραφικά και σπυρομετρικά χαρακτηριστικά των ασθενών

Ασθενείς με ΧΑΠ	Σύνολο	Ομάδα Α Δείγματα Πτυέλων	Ομάδα Β Δείγματα BALF	p value[#]
Αριθμός	35	20	15	
Ηλικία (mean± SD)		69 ±9	64 ±11	NS
Φύλο (Α/Γ)	30/5	18/2	12/3	NS
Καπνιστική συνήθεια (mean± SD)		50.5 ±14	61.3 ±13	NS
FEV ₁ % pred		61 ±8	63 ±11,5	NS
ΔFEV ₁ (reversibility)%		4±1.3	5.2±2.3	NS
FVC % pred		77±12	78±9	NS
FEV ₁ /FVC		59 ±4	58 ±6	NS

NS: non significant ($p>0.05$); FEV₁: forced expiratory volume in one second; FVC: forced vital capacity; ΔFEV₁ = reversibility after bronchodilation; [#]: p-value between group A and group B patient data (Mann-Whitney test for continuous variables or Chi-squared test for categorical data, as appropriate)

2) Λήψη προκλητών πτυέλων και βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος

(BAL)

Η πρόκληση πτυέλων έγινε με εισπνοή εκνεφώματος υπέρτονου φυσιολογικού ορού μέσω υπερηχητικού νεφελοποιητή (Ultraneb 2000; DeVilbiss, Somerset, PA, USA) σύμφωνα με την συνήθη διαδικασία [8-10]. Οι βρογχοσκοπήσεις πραγματοποιήθηκαν υπό τοπική αναισθησία με εύκαμπτο βίντεο-βρογχοσκόπιο (Pentax EB1830). Οι ασθενείς οι οποίοι υποβλήθηκαν σε βρογχοσκόπηση και βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ήταν υπό διερεύνηση προηγειθήσας αιμόπτυσης/αιμόφυρτων. Ασθενείς με ενδείξεις κακοήθειας αποκλείστηκαν από την μελέτη. Η τεχνική του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (BAL) διενεργήθηκε στον δεξιό μέσο λοβό.

3) Ανοσο-μαγνητικός διαχωρισμός κυτταρικών πληθυσμών

A. Δείγματα Βρογχοκυψελιδικού Εκπλύματος (BAL).

Στα δείγματα Βρογχοκυψελιδικού Εκπλύματος (BAL) έγινε επεξεργασία διαχωρισμού του κυτταρικού συσσωματώματος με τεχνολογία μαγνητικών σφαιριδίων MACS σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (MACS magnetic beads technology and MiniMACS magnetic separation columns, MACS Technology, Miltenyi Biotec, Germany). Κάθε δείγμα φρέσκου BAL υποβλήθηκε σε φιλτράρισμα μέσω ενός φίλτρου 70μm ώστε να απομακρυνθούν τυχόν συγκρίματα και

στη συνέχεια υποβλήθηκε σε επώαση με διάλυματα μαγνητικών σφαιριδίων συνδεδεμένων με τα αντισώματα CD45⁺ (MACS Technology, Miltenyi Biotec, Germany) για τα λευκοκύτταρα (μακροφάγα, ηωσινόφιλα, ουδετερόφιλα, λεμφοκύτταρα) και HEA-human epithelial antigen (MACS Technology, Miltenyi Biotec, Germany) για τα επιθηλιακά κύτταρα. Μετά την επώαση στα κυτταρικά διαλύματα έγινε επεξεργασία διαχωρισμού με την χρήση των ειδικών μαγνητικών διαχωριστικών στηλών MiniMACS, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Στο τέλος της επεξεργασίας κάθε δείγμα BAL απέδωσε δύο προϊόντα : 1) τον πληθυσμό των επιθηλιακών κυττάρων και 2) τον πληθυσμό των λευκοκυττάρων.

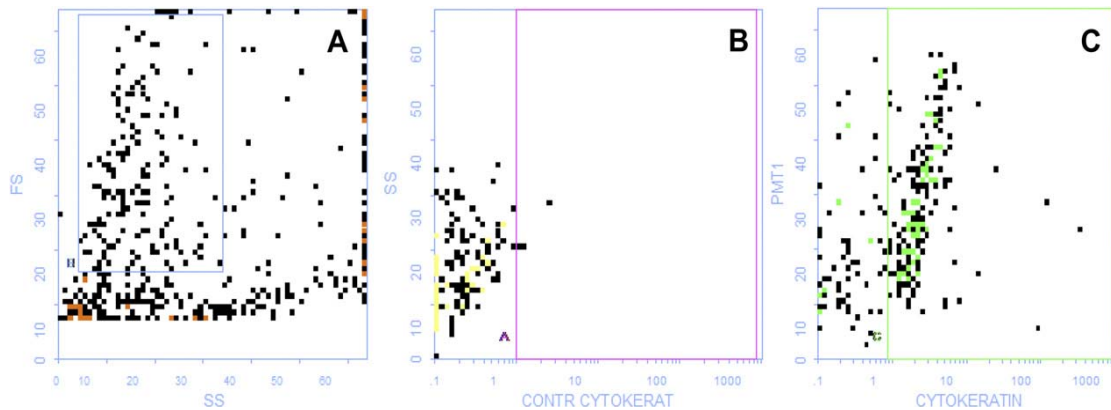
B. Δείγματα πτυέλων

Στα δείγματα πτυέλων έγινε επεξεργασία διαχωρισμού του κυτταρικού συσσωματώματος με τεχνολογία μαγνητικών σφαιριδίων Dynal σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Dynabeads, Dynal, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Σε κάθε φρέσκο δείγμα πτυέλων ξεχωριστά, αρχικά, έγινε επεξεργασία με διάλυμα διθειοθρεϊτόλης (DTT) και με ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) PBS και φυγοκεντρήθηκε στις 1600 rpm για 10 λεπτά. Μετά την φυγοκέντρωση το υπερκείμενο υγρό φυλάχθηκε στους -80°C ενώ η βιωσιμότητα (viability) του δείγματος, ο συνολικός αριθμός κυττάρων (Total cell count) και τα ποσοστά των

υποπληθυσμών (differential cell counts) μετρήθηκαν με την χρήση της πλακας Neubauer ύστερα από χρώση με Trypan Blue σύμφωνα με την συνήθη διαδικασία [8-10]. Στη συνέχεια το κυτταρικό συσσωμάτωμα υποβλήθηκε σε επώαση με διάλυματα μαγνητικών σφαιριδίων συνδεδεμένων με τα αντισώματα CD45+ (DynaI, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) για τα λευκοκύτταρα (μακροφάγα, ηωσινόφιλα, ουδετερόφιλα, λεμφοκύτταρα) και Epithelial Enrich (DynaI, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) για τα επιθηλιακά κύτταρα. Μετα την επώαση τα κυτταρικά διαλύματα εκτέθηκαν στην μαγνητική βάση Dynal, οπότε και ο θετικά επιλεγμένος κυτταρικός πληθυσμός προσκολλήθηκε στο πλαινό τοίχωμα του δοκιμαστικού σωλήνα και διαχωρίστηκε από το δείγμα. Στο τέλος της επεξεργασίας κάθε δείγμα πτυέλων απέδωσε δύο προϊόντα : 1) τον πληθυσμό των επιθηλιακών κυττάρων και 2) τον πληθυσμό των λευκοκυττάρων. Η τεχνολογία Dynal ήταν η πιο κατάλληλη για την επεξεργασία δειγμάτων πτυέλων καθώς η απουσία σταδίου φιλτραρίσματος των δειγμάτων είχε πολύ καλύτερα αποτελέσματα διότι τα δείγματα πτυέλων έχουν πολύ πυκνότερη σύσταση από τα δείγματα BAL.

Όλα τα δείγματα, λοιπόν, διαχωρίστηκαν σε δυο προϊόντα: α) τα επιθηλιακά κύτταρα και β) τα λευκοκύτταρα (CD 45+).

Η τεχνική του μαγνητικού διαχωρισμού επιβεβαιώθηκε με την χρήση του κυτταρομετρητή ροής (COULTER EPICS XL Flow Cytometer, Beckman Coulter, USA).



Εικόνα 1

Αντιπροσωπευτική εικόνα από κυτταρομετρία ροής δείγματος πτυέλων.

(A) Δείγμα κυτάρων πτυέλων πριν την επεξεργασία διαχωρισμού (FS, forward scatter; SS, side scatter).

(B) Background autofluorescence του ίδιου δείγματος.

(C) Προϊόν διαχωρισμού θετικά επιλεγμένο για επιθηλιακά κύτταρα.

4) Επεξεργασία DNA

Εκχύλιση χρωμοσωμικού DNA από κυτταρικούς πληθυσμούς πτυέλων και BAL και από δείγματα περιφερικού αίματος.

Οι δυο υπό-ομάδες κυττάρων (επιθηλιακά και λευκοκύτταρα) καθώς και δείγμα περιφερικού αίματος κάθε ασθενούς υποβλήθηκαν σε

εκχύλιση DNA με τη χρήση των τυποποιημένων συσκευασιών QIAmp για ιστούς και αίμα αντίστοιχα, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (QIAmp DNA Blood Mini kits; QIAGEN, Inc., Valencia, CA, USA). Στη συνέχεια τα δείγματα DNA αποθηκεύτηκαν στους 4⁰ C.

Αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση (PCR)

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 την χρήση των τυποποιημένων συσκευασιών Qiagen Taq PCR Core Kit (QIAGEN Inc), σε PTC-100 θερμικό cyclor (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 βαθμούς Κελσίου. Στη συνέχεια έγινε ο πολυμερισμός του DNA, δηλαδή υβριδισμός των εκκινητών στους 55 βαθμούς Κελσίου και σύνθεση των θυγατρικών αλυσίδων DNA στους 72 βαθμούς Κελσίου. Τα τρία στάδια

(θερμική αποδιάταξη, υβριδισμός, σύνθεση DNA) επαναλήφθηκαν για 30 διαδοχικούς κύκλους για την ενίσχυση των προϊόντων της αντίδρασης.

Τα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν και οπτικοποιήθηκαν με την βοήθεια του λογισμικού LI-COR Saga GT Microsatellite Analysis Software (LI-COR, Lincoln, NE, USA).

Ανάλυση με πολυμορφικούς δείκτες μικροδορυφορικού DNA

Η ύπαρξη αστάθειας (MSI /LOH) αναγνωρίστηκε με την σύγκριση μιας τριπλέτας για κάθε ασθενή (επιθηλιακά κύτταρα και λευκοκύτταρα πτυέλων ή BAL και περιφερικό αίμα). Η αστάθεια του μικροδορυφορικού DNA (MSI) αναγνωρίστηκε με την σύγκριση των ηλεκτροφορητικών μοτίβων των μικροδορυφορικών δεικτών του DNA από τα δείγματα των επιθηλιακών κυττάρων και των λευκοκυττάρων σε σχέση με τα δείγματα από το περιφερικό αίμα, εφόσον παρουσίαζαν μια μετατόπιση σε ένα ή και στα δύο αλληλόμορφα, δίνοντας έτσι καινούρια αλληλόμορφα με την προσθήκη ή την αφαίρεση μιας ή δύο βάσεων.

Δύο ερευνητές που δεν γνώριζαν τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών πραγματοποίησαν ανεξάρτητες μετρήσεις. Η ύπαρξη αστάθειας (MSI /LOH) αναγνωρίστηκε με την σύγκριση μιας τριπλέτας για κάθε ασθενή (επιθηλιακά κύτταρα, λευκοκύτταρα και περιφερικό αίμα). Όλα τα θετικά δείγματα ελέγχθηκαν δύο φορές σε φρέσκο δείγμα DNA με 100% επαναληψιμότητα.

Συνολικά 8 πολυμορφικοί μικροδορυφορικοί δείκτες χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση αστάθειας μικροδορυφορικού DNA και απώλειας ετεροζυγωτίας. Η επιλογή των χρωμοσωμικών περιοχών που μελετήθηκαν βασίστηκε στην γνώση ότι σε προηγούμενες μελέτες είχαν αναδείξει αστάθεια μικροδορυφορικού DNA (MSI) καθώς βρίσκονται κοντά ή μέσα σε υποψήφια γονίδια για την παθογένεια της ΧΑΠ. Οι μικροδορυφορικοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι ακόλουθοι: G29802, D6S2223, D6S344, D6S263, D5S207, D13S71, RH70958, and D17S250 και αναλύονται λεπτομερώς στο πίνακα 2.

Η επιλογή των αλληλουχιών των παραπάνω δεικτών έγινε μέσω της βάσης δεδομένων NCBI. (www.ncbi.nlm.nih.gov)

Πίνακας 2.

Αναλυτική περιγραφή των δεικτών μικροδορυφορικού DNA που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη.

	Μικροδορυφορικοί δείκτες	Χρωμοσωμικές θέσεις	Υποψήφια γονίδια που σχετίζονται με ΧΑΠ
1	RH70958	2p12	-CD8 αντιγόνο, β πολυπεπτίδια 1 & 2
2	D5S207	5q31.3-q33.3	-Ιντερλευκίνη 4 (IL-4) -(β)2- αδρενεργικός υποδοχέας (ADBR2)
3	D6S344	6p25	Serine protease inhibitor genes (Serpins -PI6, PI9)
4	D6S263	6p23-p24.2	-Ενδοθηλίνη-1
5	G29802	10q22	-Περφορίνη (PRF 1)
6	D13S71	13q32	-TNF ligand superfamily, μέλος 13B (B cell proliferation)
7	D6S2223	14q32.1-32.3	-MHC-
8	D17S250	17q11.2-q12	-Αποπτωση-ανταγωνίζοντα transcription factor (AATF) -Μεταφορέας σεροτονίνης -Signal transducer and activator of transcription 5B (STAT5B).

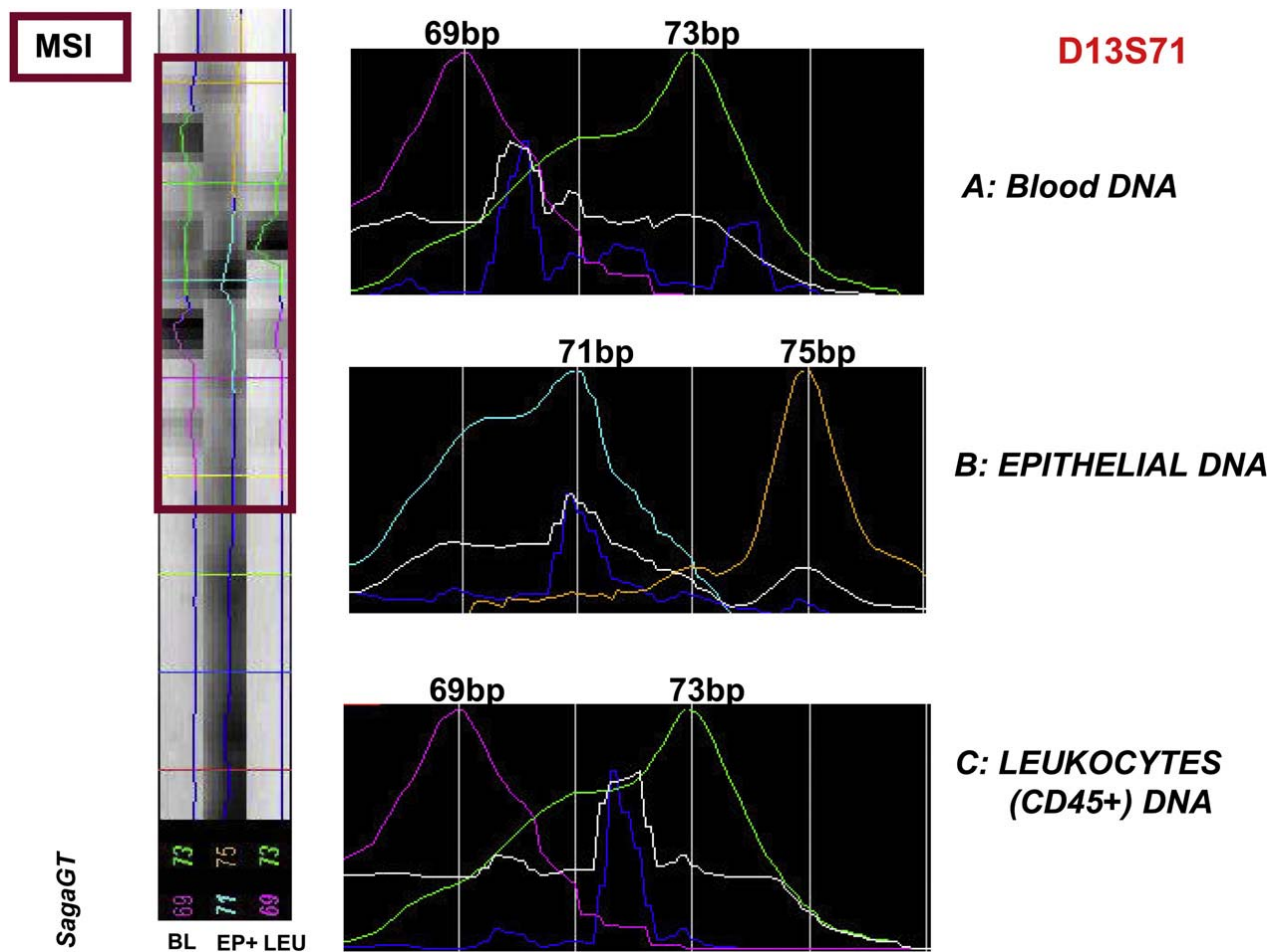
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Σε κανένα απο τους «υγιείς» καπνιστές που μελετήθηκαν δεν ανευρέθηκε γενετική αστάθεια. Στους ασθενείς με ΧΑΠ βρέθηκαν αλλοιώσεις μικροδορυφορικού DNA μόνο στα δείγματα επιθηλιακών κυττάρων και όχι στα δείγματα λευκοκυττάρων.

Συγκεκριμένα στην ομάδα Α (προκλητά πτύελα) 5 ασθενείς εμφάνισαν γενετική αστάθεια (25%). Τρεις ασθενείς εμφάνισαν LOH στους δείκτες D6S344 (1), G29802 (1) και D17S250 (1), και δύο ασθενείς εμφάνισαν MSI στους δείκτες D13S71 (1) [Εικόνα 2] και D6S344 (1).

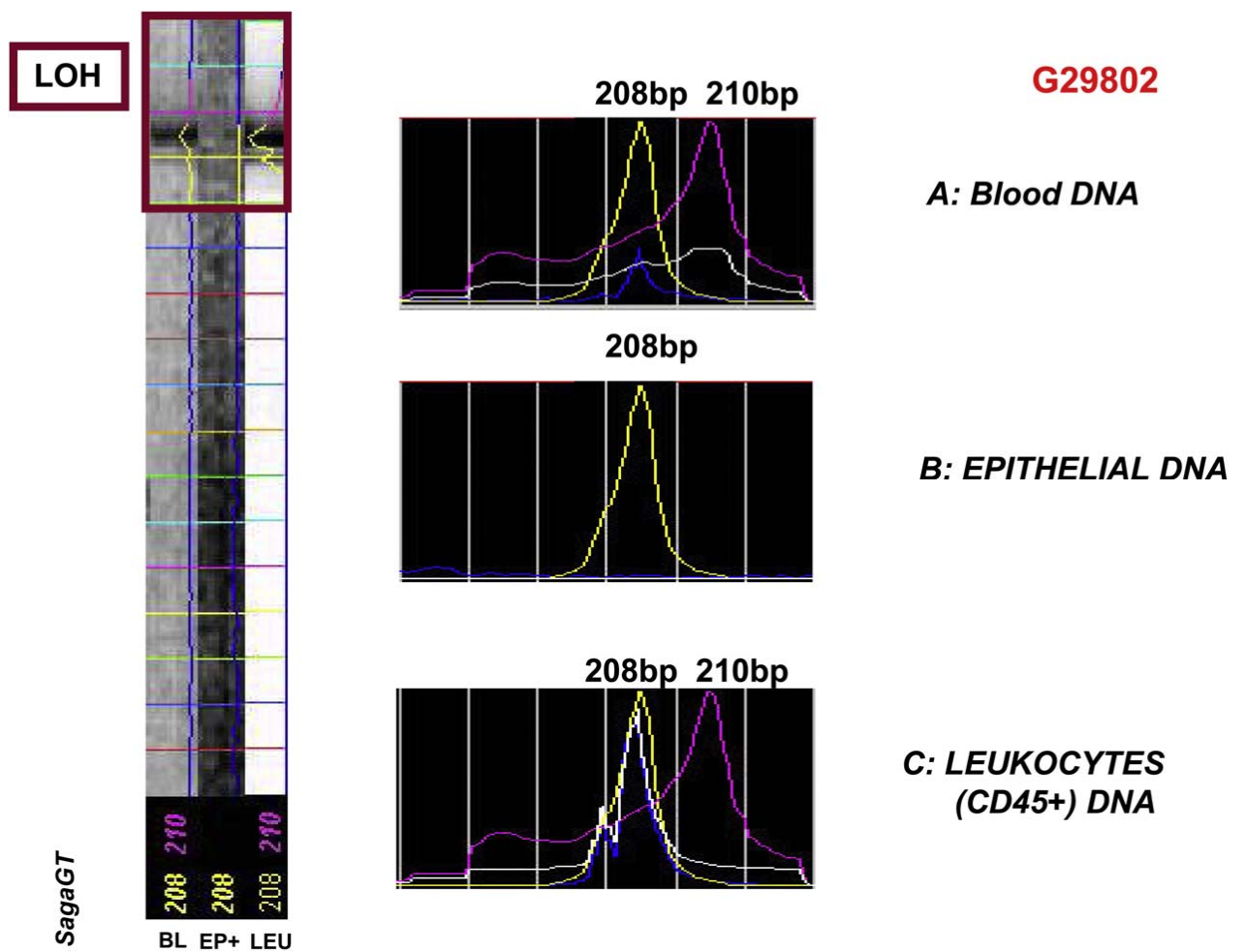
Στην ομάδα Β (δείγματα BAL) επτά ασθενείς εμφάνισαν γενετική αστάθεια (47%). Σε τεσσερις ασθενείς ανιχνεύθηκε LOH στους δείκτες D5S207 (2), G29802 (1) [Εικόνα 3] και D17S250 (1), ενώ MSI σε 6 ασθενείς στους δείκτες D5S207 (1) και D13S71 (5).

Αναλυτικά τα πλήρη αποτελέσματα απεικονίζονται στον **πίνακα 3**.



Εικόνα 2

Αντιπροσωπευτική εικόνα gel, με αστάθεια μικροδορυφορικού DNA στον μικροδορυφορικό δείκτη D13S71, σε δείγμα πτυέλων. Η ανάλυση έγινε με LI-COR Saga GT Microsatellite Analysis Software. Το αναμενόμενο προϊόν της PCR για την θέση D13S71 είναι μεταξύ 67 και 77 bp (NCBI UniSTS: 146806). Κάθε αλληλόμορφο χαρακτηρίζεται από το μέγεθος του.



Εικόνα 3

Αντιπροσωπευτική εικόνα gel, με απώλεια ετεροζυγωτίας (LOH) στον μικροδορυφορικό δείκτη G29802, σε δείγμα BAL. Η ανάλυση έγινε με LI-COR Saga GT Microsatellite Analysis Software. Το αναμενόμενο προϊόν της PCR για την θέση G29802 είναι μεταξύ 200 και 220 bp (NCBI UniSTS: 78816). Κάθε αλληλόμορφο χαρακτηρίζεται από το μέγεθος του.

Πίνακας 3

Πίνακας των MSI και LOH σε ασθενείς με ΧΑΠ.

COPD pts	Marker G29802	Marker D6S2223	Marker D6S344	Marker D6S263	Marker D5S207	Marker D13S71	Marker RH70958	Marker D17S250
<i>Sputum epithelial population</i>								
1	-	-	LOH	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	MSI	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	LOH
11	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	MSI	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-
18	LOH	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>BAL epithelial population</i>								
1	-	-	-	-	LOH	MSI	-	-
2	-	-	-	-	-	MSI	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	MSI	MSI	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	LOH
8	LOH	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	LOH	MSI	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	MSI	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το κύριο εύρημα της μελέτης αυτής είναι ότι οι σωματικές αλλοιώσεις του DNA σε δείγματα πτυέλων και βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος, ανευρέθηκαν αποκλειστικά στα επιθηλιακά κύτταρα των πνευμόνων [22]. Η παρατήρηση αυτή μπορεί να έχει ιδιαίτερη σημασία αν λάβουμε υπ'οψιν μας τον κεντρικό ρόλο που κατέχουν τα επιθηλιακά κύτταρα στην παθογένεια της ΧΑΠ [23]. Τα επιθηλιακά κύτταρα αποτελούν την εξωτερική κυτταρική στοιβάδα του βρογχικού δέντρου και είναι εκτεθειμένα σε πολλές περιβαλλοντικές αλλά και εσωτερικές «προσβολές». Είναι γνωστό ότι ο καπνός του τσιγάρου αποδίδει ένα μεγάλο φορτίο εισπνεόμενων οξειδωτικών ουσιών αλλά και τα διάφορα φλεγμονώδη κύτταρα παράγουν αυξημένο φορτίο από ενεργά παράγωγα οξυγόνου. Οι ουσίες αυτές έχουν άμεση βλαπτική επίδραση στο σύστημα φραγμού μεταξύ αέρα και πνεύμονα. Φαίνεται ότι το αυξημένο οξειδωτικό stress πιθανόν να οδηγεί σε σωματικές μεταλλάξεις στα επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα, στο επίπεδο του μικροδορυφορικού DNA, με αποτέλεσμα την μειωμένη δράση του συστήματος επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA και τελικά την μόνιμη αλλοίωση της ικανότητας των κυτταρών αυτών για αυτόματη επιδιόρθωση [24]. Υπο φυσιολογικές συνθήκες το σύστημα επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA (MMR system) επιδιορθώνει μικρές αλλαγές μιας βάσης και μικρές

βλάβες που προκύπτουν κατά την αντιγραφή (insertion/deletion loops) [25]. Χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις, όπως η ΧΑΠ, παράγουν σημαντική ποσότητα οξειδωτικού stress στα κύτταρα και τους ιστούς. Έχει προταθεί ότι η απενεργοποίηση του συστήματος αυτόματης επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA, ως αποτέλεσμα του οξειδωτικού stress, δύναται να ενοχοποιηθεί για τα φαινόμενα MSI/LOH που παρατηρούνται σε μη-νεοπλαστικές χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις [26].

Οι μικροδορυφορικοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη αυτή επιλέχθηκαν λόγω της εντόπισης τους στο γονιδίωμα σε θέσεις-κλειδιά για την παθογένεια της ΧΑΠ όπως το αντιγόνο CD8+, η ιντερλευκίνη 4, ο β-αδρενεργικός υποδοχέας, ο παράγοντας νέκρωσης του όγκου (TNF), τα γονίδια αναστολής των σερίνο-πρωτεασών (σερπίνες), οι αναστολείς πρωτεασών της ενδοθηλίνης 6 και 9, η περφορίνη, η α1 αντιθρυψίνη [5,19-20].

Τα ευρήματα της μελέτης αυτής υποστηρίζουν την υπόθεση για τα αρχικά γεγονότα στην παθογένεια της ΧΑΠ, ότι δηλαδή η επίμονη φλεγμονή και το οξειδωτικό φορτίο από το κάπνισμα των τσιγάρων δύναται να επηρεάσει το σύστημα φραγμού μεταξύ αέρα και πνεύμονα δηλαδή τα επιθηλιακά πνευμονικά κύτταρα (Lung epithelial Barrier Cells –LEBCs) [22, 27]. Η περαιτέρω απενεργοποίηση του συστήματος αυτόματης επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA (human DNA mismatch repair system –MMR) λόγω του αυξημένου οξειδωτικού φορτίου,

πιθανον να έχει ως εκ νέου αποτέλεσμα επίκτητες σωματικές μεταλλάξεις στο μικροδορυφορικό DNA των επιθηλιακών πνευμονικών κυττάρων (LEBCs), αντανακλώντας έτσι μια δυσλειτουργική μετάπτωση των επιθηλιακών πνευμονικών κυττάρων στην ΧΑΠ.

5. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΕΣ

ΠΡΟΠΤΙΚΕΣ

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής θεωρούνται σημαντικά διότι επιβεβαίωσαν την υπόθεση του τμήματος σε ότι αφορά την αρχική φάση της ΧΑΠ και συγκεκριμένα ότι οι σωματικές επίκτητες αλλαγές του DNA εμφανίζονται στα επιθηλιακά κύτταρα τα οποία αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας του πνεύμονα. Επίσης τα αποτελέσματα είναι συμβατά με την υπόθεση ότι το οξειδωτικό stress του καπνού του τσιγάρου επηρεάζει τα πρώτα κύτταρα με τα όποια έρχεται σε επαφή. Είναι γνωστό ότι η ανταπόκριση στο οξειδωτικό φορτίο του καπνού του τσιγάρου ποικίλει και πιστεύεται ότι υπάρχει γενετική προδιάθεση που ρυθμίζει την διαδικασία αυτή. Ο συνδυασμός γενετικής προδιάθεσης και περιβαλλοντικής προσβολής, υποθέτουμε ότι επιδρά στο σύστημα επιδιόρθωσης των λαθών του DNA με αποτέλεσμα την εμφάνιση διαταραχών στο γονιδίωμα. Η ανίχνευση του φαινομένου της αστάθειας

του μικροδορυφορικού DNA (MSI) μπορεί να θεωρηθεί δείκτης αυτών των διαταραχών του DNA, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν στο μέλλον σαν βιολογικοί δείκτες ανίχνευσης της νόσου σε πρώιμα στάδια.

Τα αποτελέσματα αυτά θεωρούνται αξιόλογα διότι μπορούν να αποτελέσουν το έναυσμα σημαντικών ερωτημάτων και ερευνητικών πρωτοκόλλων. Αρχικά θα πρέπει να απαντηθεί το ερώτημα εάν πράγματι το σύστημα επιδιόρθωσης λαθών του DNA είναι αυτό που κυρίως επηρεάζεται από το οξειδωτικό φορτίο του καπνίσματος και οδηγεί στην κλινική εμφάνιση της ΧΑΠ. Δεύτερον, θα πρέπει να ερευνηθούν οι συγκεκριμένοι τόποι αλλαγής του γονιδιώματος όπου βρέθηκε η αστάθεια του μικροδορυφορικού DNA και ο ρόλος τους στην έναρξη της νόσου. Τρίτον, ερώτημα παραμένει πως η αλλαγή του DNA εκφράζεται στην μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων ώστε τα δενδριτικά κύτταρα να αναγνωρίζουν ως «ξένα» και ενεργοποιούν ανοσοποιητικούς μηχανισμούς απόρριψης.

Τέλος, τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής συνηγορούν ότι το οξειδωτικό φορτίο ενοχοποιείται για την ΧΑΠ, όπως έχει ήδη αποδειχθεί και για άλλες παθήσεις εκτός του αναπνευστικού συστήματος π.χ. στη ρευματοειδή αρθρίτιδα. Κατά συνέπεια είναι επιτακτική η ανάγκη η έρευνα να κατευθυνθεί στην ανακάλυψη τρόπων (φαρμάκων) για την ουσιαστική αντιμετώπιση του οξειδωτικού φορτίου από όποια αίτια και εάν αυτό προέρχεται.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Pauwels RA, Buist S, Calverley PMA, Jenkins CR, Hurd SS, GOLD Scientific Committee. Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 1256–1276.
2. Celli BR, MacNee W, ATS/ERS Task Force. Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. *Eur Respir J* 2004; 23: 932–946.
3. Silverman EK. Progress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Generics. *Proc of the Am Thor Soc*, vol 3, 2006.
4. Anderson JP, Bozinovski S. Acquired somatic mutations in the molecular pathogenesis of COPD. *Trends Pharmacol Sci* 2003; 24(2):71-76.
5. Siafakas NM, Tzortzaki EG, Sourvinos G, Bouros D, Tzanakis N, Kafatos A, Spandidos D. Microsatellite DNA instability in COPD. *Chest* 1999; 116:47–51.
6. Naidoo R, Chetty R. The applications of microsatellites in molecular pathology. *Pathol Oncol Res* 1998; 4(4):310-315.

7. Samara K, Zervou M, Siafakas NM, Tzortzaki EG. Microsatellite DNA instability in benign lung diseases. *Respir Med* 2006; 100:202-211.
8. Sundaresan V, Ganly P, Hasleton P, Rudd R, Sinha G, Bleehen NM, Rabbitts P. p53 and chromosome 3 abnormalities, characteristic of malignant lung tumours, are detectable in preinvasive lesions of the bronchus. *Oncogene*. 1992 Oct;7(10):1989-97
9. Wistuba II, Lam S, Behrens C, Virmani AK, Fong KM, LeRiche J, Samet JM, Srivastava S, Minna JD, Gazdar AF. Molecular damage in the bronchial epithelium of current and former smokers. *J Natl Cancer Inst*. 1997; 89(18):1366-73.
10. Wistuba II, Behrens C, Virmani AK, Mele G, Milchgrub S, Girard L, Fondon JW 3rd, Garner HR, McKay B, Latif F, Lerman MI, Lam S, Gazdar AF, Minna JD. High resolution chromosome 3p allelotyping of human lung cancer and preneoplastic/ preinvasive bronchial epithelium reveals multiple, discontinuous sites of 3p allele loss and three regions of frequent breakpoints. *Cancer Res*. 2000; 60(7):1949-60.
11. Nishisaka T, Takeshima Y, Inai K. Evaluation of p53 gene mutation and loss of heterozygosity of 3p, 9p and 17p in

- precancerous lesions of 29 lung cancer patients. *Hiroshima J Med Sci.* 2000;49(2):109-16.
12. Papi A, Casoni G, Caramori G, Guzzinati I, Boschetto P, Ravenna F, Calia N, Petruzzelli S, Corbetta L, Cavallesco G, Forini E, Saetta M, Ciaccia A, Fabbri LM. COPD increases the risk of squamous histological subtype in smokers who develop non-small cell lung carcinoma. *Thorax* 2004;59(8):679-81.
 13. Lawes DA, SenGupta S, Boulos PB. The clinical importance and prognostic implications of microsatellite instability in sporadic cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2003; 29(3):201-12.
 14. Grepmeier U, Dietmaier W, Merk J, Wild PJ, Obermann EC, Pfeifer M, Hofstaedter F, Hartmann A, Woenckhaus M. Deletions at chromosome 2q and 12p are early and frequent molecular alterations in bronchial epithelium and NSCLC of long-term smokers. *Int J Oncol.* 2005;27(2):481-8.
 15. Woenckhaus M, Grepmeier U, Wild PJ, Merk J, Pfeifer M, Woenckhaus U, Stoelcker B, Blaszyk H, Hofstaedter F, Dietmaier W, Hartmann A. Multitarget FISH and LOH analyses at chromosome 3p in non-small cell lung cancer and adjacent bronchial epithelium. *Am J Clin Pathol.* 2005; 123(5):752-61.
 16. Shibukawa K, Miyokawa N, Tokusashi Y, Sasaki T, Osanai S, Ohsaki Y. High incidence of chromosomal abnormalities at 1p36

- and 9p21 in early-stage central type squamous cell carcinoma and squamous dysplasia of bronchus detected by autofluorescence bronchoscopy. *Oncol Rep.* 2009; 22(1):81-7.
17. Capkova L, Kalinova M, Krskova L, Kodetova D, Petrik F, Trefny M, Musil J, Kodet R. Loss of heterozygosity and human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in bronchial mucosa of heavy smokers. *Cancer.* 2007;109(11):2299-307.
18. 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;22: 951–955.
19. Zervou MI, Tzortzaki EG, Makris D, Gaga M, Zervas E, Economidou E, Tsoumakidou M, Tzanakis N, Milic-Emili J, Siafakas NM. Differences in microsatellite DNA level between asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2006; 28:472-478.
20. Makris D, Tzanakis N, Damianaki A, Ntaoukakis E, Neofytou E, Zervou M, Siafakas NM, Tzortzaki EG. Microsatellite DNA instability and COPD exacerbations. *Eur Respir J* 2008; 32:612-618.

21. Celli BR, MacNee W. Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS paper. *Eur Respir J* 2004; 23: 932-946.
22. Samara K, Tzortzaki EG, Neofytou E, Karatzanis AD, Lambiri I, Tzanakis N, Siafakas NM. Somatic DNA alterations in lung epithelial barrier cells in COPD patients: a case control study. *Pulm Pharmacol Ther.* 2009 Dec 28. [Epub ahead of print]
23. Barnes PJ. Small airways in COPD. *N Engl J Med.* 2004 Jun 24; 350(26): 2635-7.
24. Siafakas NM. “In the Beginning” of COPD: is evolution important? *Am J Respir Crit Care Med.* 2007 Mar 1; 175(5):423-4.
25. Chang DK, Ricciardiello L, Goel A, Chang CL, Boland CR. Steady-state Regulation of the Human DNA Mismatch Repair System. *J Biol Chem* 2000 June; 275(24):18424–18431.
26. Chang CL, Marra G, Chauhan DP, Ha HT, Chang DK, Ricciardiello L, Randolph A, Carethers JM, Boland CR. Oxidative stress inactivates the human DNA mismatch repair system. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 283:C148–C154.
27. Tzortzaki E, Siafakas NM. A new hypothesis for the initiation of COPD. *ERJ* 2009;34: 310-315

ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ

1. Microsatellite DNA instability in benign lung diseases.
Samara K, Zervou M, Siafakas NM, Tzortzaki E.
Respiratory Medicine, 2006; 100, 202-211.
2. Microsatellite DNA instability in nasal cytology of COPD patients.
Karatzanis AD, Samara KD, Tzortzaki E, Zervou M, Helidonis ES,
Velegrakis GA, Siafakas NM.
Oncology Reports, 2007; 17(3):661-665.
3. Somatic DNA alterations in lung epithelial barrier cells in COPD patients: a case control study.
Samara KD, Tzortzaki EG, Neofytou E, Karatzanis AD, Lambiri I,
Tzanakis N, Siafakas NM.
Pulm Pharmacol Ther. 2009 Dec 28. [Epub ahead of print]

ΑΝΑΤΥΠΙΑ ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ