

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ
ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**« Ιστοειδική έκφραση ανοσορυθμιστικών
μεσολαβητών σε πνευμονικό ιστό ασθενών με
Χ.Α.Π. και συσχέτιση με γενετική αστάθεια στο
Μικροδορυφορικό DNA »**

ΕΛΕΝΗ Μ. ΒΛΑΧΑΚΗ
Πνευμονολόγος

Ηράκλειο Κρήτης
Νοέμβριος 2009

Επιβλέπων: Καθ. Ν. Μ. Σιαφάκας

Επιβλέπων

N.M. Σιαφάκας, Καθηγητής Πνευμονολογίας MD, PhD, FCCP

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

N. M. Σιαφάκας, καθηγητής
N. Τζανάκης, επικ. καθηγητής
M. Τζαρδή, επικ. καθηγήτρια

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

N. M. Σιαφάκας, καθηγητής
N. Τζανάκης, επικ. καθηγητής
M. Τζαρδή, επικ. καθηγήτρια
Ε. Τζωρτζάκη, λέκτορας
Δ. Μπούμπας, καθηγητής
Γ. Σαμώνης, καθηγητής
Ε. Ασκητοπούλου, καθηγήτρια

Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή και δάσκαλό μου κ. Νικόλαο Σιαφάκα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου αυτή τη διδακτορική διατριβή, για την πολύτιμη συνεχή καθοδήγηση, βοήθεια και υποστήριξη του στην επιστημονική μου πορεία ως τώρα καθώς και για την αγάπη που μου ενέπνευσε για την κλινική ιατρική και έρευνα.

Την λέκτορα κα Ελένη Τζωρτζάκη που ήταν δίπλα μου από την έναρξη έως την ολοκλήρωση αυτής της διδακτορικής διατριβής, για την υπομονή της για τις ατελείωτες διορθώσεις κειμένων και για την ψυχολογική υποστήριξη.

Τον επίκουρο καθηγητή κ. Νικόλαο Τζανάκη για την πολύτιμη συμβολή του στη δημοσίευση της έρευνάς μας.

Την επίκουρη καθηγήτρια κα Μαρία Τζαρδή που μου έκανε την τιμή να συμμετέχει στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή.

Τον λέκτορα κ. Αναστάσιο Κουτσόπουλο και την κα Κωνσταντίνα Νταμπάκη που με μύησαν στην τεχνική της ανοσοϊστοχημείας και μου έμαθαν να «διαβάζω τον μικρόκοσμο» του πνεύμονα με ένα οπτικό μικροσκόπιο.

Τον κ. Ιωάννη Δροσίτη, κ. Ανδρέα Μονιάκη, κ. Γεώργιο Καϊμασίδη για τη βοήθεια τους στη συλλογή δειγμάτων πνευμονικού ιστού.

Την κα Ειρήνη Νεοφύτου για τη βοήθεια της στην ολοκλήρωση του έργου.

Την κα Ειρήνη Ρογδάκη και Ρένα Μιχαλάκη που είναι πάντα πρόθυμες να βοηθήσουν.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου για την υποστήριξη την αγάπη και την εμπιστοσύνη που μου δείχνουν πάντα.

Στο σύζυγο μου Νίκο για τη βοήθεια, την υπομονή και την αγάπη του και στην κόρη μου για τον χρόνο μαζί της που της έχω στερήσει.

Αφιερωμένο στους γονείς μου,
Μάρω και Μιχάλη.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Αποφοίτησα από το Πανεπιστήμιο της Νάπολης- Ιταλία το 1999 με βαθμό πτυχίου αναγόμενου στην ελληνική βαθμολογική κλίμακα 8.7/10. Η πτυχιακή μου εργασία με τίτλο: «ο ρόλος της εκπαίδευσης στην πρόληψη των επιπλοκών του σακχαρώδη διαβήτη» στηρίχτηκε σε μακροχρόνια έρευνα και νέα πρόταση στην εκπαίδευση των σακχαροδιαβητικών ασθενών στην αντιμετώπιση της ασθένειας. Απέκτησα ευρωπαϊκή άδεια ασκήσεως επαγγέλματος μετά από εξάμηνη εκπαίδευση στο Ospedale Universitario di Napoli και στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ηρακλείου.

Από τον Οκτώβριο του 2000 έως το Δεκέμβριο του 2000 εκπαιδεύτηκα στο Γ.Ν. Χαλκίδας και από τον Ιανουάριο του 2001 υπηρέτησα ως ιατρός υπαίθρου για ένα έτος στο Π.Ι. Ερέτριας. Τον 4/2002 ξεκίνησα την ειδικότητα της Πνευμονολογίας στο 401 Στρατιωτικό Νοσοκομείο για 1,5 έτος και από τον 9/2003 συνέχισα την ειδικότητα μου στο Γ.Ν.Ν.Α. Σωτηρία για ένα έτος. Από τον 4/2004 έως τον Ιανουάριο του 2007 εργάστηκα ως ειδικευόμενη στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου. Απέκτησα τον τίτλο ειδικότητας της Πνευμονολογίας-Φυματιολογίας στις 25/5/2007.

Τον Μάιο του 2004 άρχισε η εκπαίδευση μου στη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας στο Ερευνητικό Εργαστήριο της Πνευμονολογίας, Ιατρικής Σχολής, Πανεπιστημίου Κρήτης και μέχρι σήμερα έχω χρησιμοποιήσει την συγκεκριμένη μέθοδο με επιτυχία, σε πολλαπλά δείγματα, με διαφορετικά αντισώματα. Παράλληλα, έχω εκπαιδευτεί από ειδικό παθολογοανατόμο του Παθολογοανατομικού Τμήματος του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Κρήτης, στην μικροσκοπική μελέτη πνευμονικού ιστού.

Από τον Δεκέμβριο 2007 έως τον Δεκέμβριο 2008 και από τον Ιανουάριο 2009 έως σήμερα υπηρετώ ως επικουρική επιμελήτρια β' στην Πνευμονολογική κλινική του ΠΑ.Γ.Ν.Η.

Μετεκπαιδευτικά σεμινάρια:

1) “ International Sleep Medicine Course (ISMC)” *organized by British Sleep Society*, 27September- 10 October 2009

2) «Κώδικας πρακτικής. Ρόλοι- πρακτικές- συμπεριφορές στη χρήση πληροφοριακών συστημάτων», οργανωμένο από την *Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας*, 15-21 Οκτωβρίου 2008

3) «Εφαρμογή στατιστικών εργαλείων στη διοίκηση υπηρεσιών υγείας στην κλινική πρακτική» οργανωμένο από την *Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας*, 3-12 Νοεμβρίου, 2008

- 4) «Μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα» οργανωμένο από την *E.Π.Ε.*, Λ.Χερσονήσου, 2-5 Νοεμβρίου, 2006
- 5) «Ανοσολογία- Κυτταρική βιολογία πνεύμονα» οργανωμένο από την *E.Π.Ε.*, Λ.Χερσονήσου, 2-5 Νοεμβρίου, 2006
- 6) " Βασικές αρχές μηχανικού αερισμού" *Μ.Ε.Θ., ΠΑ.Γ.Ν.Η.*, Ηράκλειο, Ιούνιος, 2006
- 7)“2nd Post- Graduate course on Medical Thoracoscopy” *organized by ERS*, Athens, November, 2004
- 8) “Bronchoscopy: Science, Art and Technique” *organized by the Hellenic Thoracic Society and the American College of CHEST Physicians*, Athens, June 16th to 18th, 2004
- 9)« Εφαρμοσμένη φυσιολογία της αναπνοής» οργανωμένο από την *E.Π.Ε.*, Αθήνα, Νοέμβριο 2003 έως Ιούνιο 2004
- 10) «Νοσήματα Υπεζωκότα» οργανωμένο από την *E.Π.Ε.*, Αθήνα, Φεβρουάριος 2004 έως Απρίλιος 2004

ΠΡΑΚΤΙΚΑ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ (ABSTRACTS)

- 1) *E.M.Vlachaki, A. Koutsopoulos, K. Dambaki, E.G. Tzortzaki, N. Tzanakis, I. Drositis, G. Maltezakis and N.M.Siafakas*, Increased Perforin Expression in Lung Lymphocytes of COPD patients: Preliminary Results, ATS International Conference, May,2008,Canada
- 2)*E.M.Vlachaki, E.G. Tzortzaki, A. Koutsopoulos, N. Tzanakis,I. Drositis, N.M.Siafakas*, Impaired Surfactant proteine-A (SP-A) expression in pneumocytes II of COPD patients, Sixth ERS Lung Science Conference, Estoril, Portugal, March, 2008
- 3)*E.M.Vlachaki, E.G. Tzortzaki, A. Koutsopoulos, K. Dambaki, A. Moniakis, I. Drositis, G. Kaimasidis, N. Tzanakis, G. Maltezakis and N.M.Siafakas*, Surfactant protein-A (SP-A) expression in COPD, E.R.S. Annual Congress, September 2007, Stockholm
- 4)*E.M.Vlachaki, A. Koutsopoulos, K. Dambaki, E.G. Tzortzaki, N. Tzanakis, I. Drositis, G. Maltezakis and N.M.Siafakas*, Perforin expression in lung tissue of COPD patients: Preliminary results, E.R.S. Annual Congress, September 2007, Stockholm

5) *D. Makris, N. Tzanakis, E. Tzortzaki, M. Zervou, E. Vlachaki, N.M. Siafakas*, Exacerbation and genetic alterations at the microsatellite level in cytologic sputum samples of patients with copd exacerbations, ATS International Conference, May 2007, San Francisco

6) *M. Siganaki, E.G. Tzortzaki, E. Vlachaki, A. Koutsopoulos, N.M. Siafakas*, Apoptotic markers in lung tissue from copd patients: preliminary results, ATS International Conference, May 2007, San Francisco

7) *E. Βλαχάκη, Α. Κουτσόπουλος, Κ. Νταμπάκη, Ε.Γ. Τζωριζάκη, Γ. Καϊμασίδης, Ι. Δροσίτης, Ν. Τζανάκης, Γ. Μαλτεζάκης, και Ν.Μ. Σιαφάκας*, Προσδιορισμός της έκφρασης της περφορίνης σε πνευμονικό ιστό ασθενών με ΧΑΠ, Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Δεκέμβριος, 2007, Αθήνα

8) *Μ. Σιγανάκη, Ε. Τζωριζάκη, Α. Κουτσόπουλος, Ε. Βλαχάκη, Κ. Νταμπάκη, Ι. Μπελένης, Χ. Ζήσης, Α. Ζαγοριανού, Ν.Μ. Σιαφάκας*, Έκφραση των αποπτωτικών δεικτών p53 και Bcl2 σε δείγματα πνευμονικού ιστού ασθενών με ΧΑΠ, Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Δεκέμβριος, 2007, Αθήνα

9) *E. Βλαχάκη, Ε.Γ. Τζωριζάκη, Α. Κουτσόπουλος, Κ. Νταμπάκη, Α. Μονιάκης, Ι. Δροσίτης, Ν. Τζανάκης, Γ. Μαλτεζάκης, και Ν.Μ. Σιαφάκας*, Η έκφραση της πρωτεΐνης-A του επιφανειδραστικού παράγοντα σε βιοψίες πνεύμονα ασθενών με ΧΑΠ, Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Δεκέμβριος, 2007, Αθήνα

10) *E. Vlachaki, E.G. Tzortzaki, A. Koutsopoulos, K. Dambaki, A. Moniakis, I. Drositis, G. Kaimasidis, E. Stathopoulos and N.M. Siafakas*, SURFACTANT protein-A in lung tissue obtained from patients with COPD E.R.S. Annual Congress, September 2006, Munich, Germany

11) *M. Siganaki, E.G. Tzortzaki, E. Vlachaki, A. Koutsopoulos, K. Dambaki, I. Bellenis, C. Zisis, A. Zagorianou, N. M. Siafakas*, Expression of apoptotic markers in lung tissue of COPD patients: preliminary results, E.R.S. Annual Congress, September 2006, Munich, Germany

12) *E. Vlachaki, E.G. Tzortzaki, A. Koutsopoulos, K. Dambaki, A. Moniakis, I. Drositis, D. Tassopoulos, G. Maltezakis and N.M. Siafakas.*, SURFACTANT -A (SP-A) EXPRESSION IN COPD: Preliminary results ,ATS International Conference, May 2006, San Diego, California

13) *E. Βλαχάκη, Ε.Γ. Τζωριζάκη, Α. Κουτσόπουλος, Κ. Νταμπάκη, Α. Μονιάκης, Ι. Δροσίτης, Γ. Μαλτεζάκης, και Ν.Μ. Σιαφάκας*, Ποσοτικός προσδιορισμός της surfactant protein-A σε ασθενείς με Χ.Α.Π., Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο ,Νοέμβριος 2006, Ηράκλειο

14) Γ. Πρινανάκης, Α. Βαπορίδη, Ε.Βλαχάκη, Ε. Κονδύλη, Μ. Πλατάκη, Δ.Γεωργόπουλος, Η τελικό-εισπνευστική αύξηση της πίεσης των αεραγωγών (PAW) σε ασθενείς υπό βοηθούμενο αερισμό σταθερής πίεσης (PSV). Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο ,Νοέμβριος 2006, Ηράκλειο

15) Μ.Σιγανάκη, Ε.Τζωριζάκη, Α.Κουτσόπουλος, Ε.Βλαχάκη, Κ.Νταμπάκη, Ν.Μ.Σιαφάκας, Μελέτη αποπρωτικών δεικτών σε δείγματα πνευμονικού ιστού ασθενών με Χ.Α.Π., Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο ,Νοέμβριος 2006, Ηράκλειο

16) Ε.Βλαχάκη, Ε.Γ.Τζωριζάκη, Α.Κουτσόπουλος, Κ. Νταμπάκη, Α. Μονιάκης, Ι. Δροσίτης, Γ. Μαλιτζάκης, και Ν.Μ. Σιαφάκας, Η έκφραση του επιφανειοδραστικού παράγοντα (surfactant A/ SP-A) στη Χ.Α.Π.: προκαταρκτικά αποτελέσματα. Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο ,Δεκέμβριος 2005, Θεσσαλονίκη

17) Η. Καίνης, Α.Ζέτος, Π. Βάρτζελη, Γ. Πολίτης, Λ.Ζέτου, Ε. Βλαχάκη, Κλινικο-εργαστηριακή προσέγγιση της πνευμονικής εμβολής. 30^ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, 2004

18) G. Politis, E.kainis, A. Zetos, G.Zarbis, E. Vlachaki, C. Crisiotis, K.Frangos, M. Toumbis, Factors affecting the delay in the diagnosis of lung cancer. E.R.S. Annual Congress ,September 2004, Glasgow

Δημοσιεύσεις σε Ελληνικά περιοδικά:

1) Ελένη Τζωριζάκη, Ελίνα Βλαχάκη, Νικόλαος Μ. Σιαφάκας, Επιφανειοδραστικός παράγοντας των πνευμόνων (Pulmonary Surfactant), *PNEUMON*, Number 4, Vol. 20, October - December 2007

2) Ε. Βλαχάκη, Η. Καίνης, Περιλήψεις Σημαντικών άρθρων 2004
α) «Η αποτελεσματικότητα των αναστολέων της νευραμινιδάσης στη θεραπεία και στην πρόληψη της γρίπης Α και Β»
β) «Ο ρόλος της ελάχιστης εισπνευστικής προσπάθειας στην ημερήσια υπνηλία», 2004, *ΠΝΕΥΜΩΝ*, Τόμος 17, Τεύχος 1β

3) Ε. Βλαχάκη, Ε.Μαρκοπούλου, Σ. Λουκίδης, « Οδηγίες GINA 2002» - *Info respiratory medicine* ,2003, Τεύχοι 24, 25 και 26

Δημοσιεύσεις σε ξενόγλωσσα περιοδικά:

1) K.Dimakou, E. Neofytou, K.Tsikritsaki, E.Vlachaki, A.Goussiou, N.M.Siafakas, E.G.Tzortzaki, Microsatellite DNA Instability in non-CF Bronchiectasis: differences with COPD, *Respiratory Medicine*, in process

2) *Marianna Siganaki, Anastasios V. Koutsopoulos, Eirini Neofytou, Eleni Vlachaki, Maria Psarrou, Nikolaos Soultzis, Nikolaos Pentilas, Sophia Schiza, Nikolaos M. Siafakas, and Eleni G. Tzortzaki, Deregulation of apoptosis mediators p53 and bcl2 in lung tissue of COPD patients, Respiratory Medicine, in process*

3) *Vlachaki EM, Koutsopoulos AV, Tzanakis N, Neofytou E, Siganaki M, Drositis I, Moniakis A, Shiza S, Siafakas NM, Tzortzaki EG, ALTERED SURFACTANT PROTEIN-A (SP-A) EXPRESSION IN TYPE II PNEUMOCYTES IN COPD, Chest, 2009 Sep 9. [Epub ahead of print]*

4) *Psathakis K, Mermigkis Ch, Vlachaki E, Pavlopoulos G, Skagias L, Skiadas V, Kokkonouzis I, Tsintiris K. Tuberculous conjunctivitis in a doctor, 2008, Int J Tuberc Lung Dis. Feb;12(2):228*

5) *E.G. Tzortzaki, I.lambiri, E. Vlachaki, N.M.Siafakas, Biomarkers in COPD, Current Medicinal Chemistry, 2007,14, 1037-1048*

6) *E. Vlachaki, K. Psathakis, K. Tsintiris and A. Iliopoulos, Delayed response to anti-tuberculosis treatment in a patient on infliximab. , Respir Med, 2005, May;99(5):648-52.*

Βραβεία- Έπαινοι:

1) Βραβείο ερευνητικής υποτροφίας με χρηματικό έπαθλο, από την Ελληνική Πνευμονολογική Εταιρεία, για την εργασία με τίτλο: “Expression of surfactant protein-A in lung tissue of COPD patients in correlation with genetic instability at the Microsatellite DNA level and COPD susceptibility”, Δεκέμβριος, 2007

2) Έπαινος καλύτερης ανακοίνωσης: «Η τελικό-εισπνευστική αύξηση της πίεσης των αεραγωγών (PAW) σε ασθενείς υπό βοηθούμενο αερισμό σταθερής πίεσης (PSV)» 15ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Ηράκλειο Κρήτης, Νοέμβριος 2006.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	1
Abstract	4
I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
A. ΧΑΠ - ΟΡΙΣΜΟΣ και ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	7
ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ	11
B. ΑΣΤΑΘΕΙΑ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΔΟΥΦΟΡΙΚΟΥ DNA (MI, Microsatellite Instability)	18
ΑΣΤΑΘΕΙΑ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΔΟΥΦΟΡΙΚΟΥ DNA και Χ.Α.Π.....	20
Γ. ΚΥΨΕΛΙΔΙΚΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ	22
Δ. ΠΝΕΥΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ τύπου II	24
E. ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΤΩΝ ΠΝΕΥΜΟΝΩΝ (Pulmonary Surfactant)	26
1) ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ιστορικά δεδομένα	26
2) ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ	28
3) ΛΙΠΙΔΙΑ ΤΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ	29
4) ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ	29
5) Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ SP-A ΤΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ...	31
6) ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ	36
7) ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΜΥΝΑΣ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ	38
8) ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΚΑΙ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ	40
9) ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΣΤΟ ΚΑΠΝΙΣΜΑ ΚΑΙ ΣΤΗ ΧΡΟΝΙΑ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑ	41
10) ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ.....	42
11) ΣΥΝΟΨΗ	43

II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	45
B. ΜΕΘΟΔΟΣ	49
1) ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ	49
2) ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΙΣΤΟΥ	49
3) ΣΤΥΠΩΜΑ κατά WESTERN (WESTERN BLOT)	50
4) ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ	51
5) ΕΚΤΙΜΗΣΗ της ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ	52
6) ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	53
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	54
1) ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ των ΑΤΟΜΩΝ	54
2) ΣΤΥΠΩΜΑ κατά WESTERN	55
3) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ	56
3) ΠΝΕΥΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ ΤΥΠΟΥ II και ΕΚΦΡΑΣΗ της SP-A	59
4) ΚΥΨΕΛΙΔΙΚΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ και ΕΚΦΡΑΣΗ της SP-A	60
5) ΣΧΕΣΗ της ΕΚΦΡΑΣΗ της SP-A στα ΠΝΕΥΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ ΤΥΠΟΥ II με την ΑΠΟΦΡΑΞΗ των ΑΕΡΑΓΩΓΩΝ	61
6) ΣΧΕΣΗ της ΕΚΦΡΑΣΗ της SP-A στα ΚΥΨΕΛΙΔΙΚΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ με την ΑΠΟΦΡΑΞΗ των ΑΕΡΑΓΩΓΩΝ	61
7) ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ και ΗΛΙΚΙΑ	62
Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	63
1) ΕΙΣΑΓΩΓΗ	63
2) ΑΥΞΗΜΕΝΑ ΠΝΕΥΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ ΤΥΠΟΥ II στη Χ.Α.Π	64
3) Η ΜΕΙΩΜΕΝΗ ΕΚΦΡΑΣΗ της SP-A στα ΠΝΕΥΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ ΤΥΠΟΥ II ΣΤΗ Χ.Α.Π. ΣΧΕΤΙΖΕΤΑΙ ΜΕ ΤΟ ΒΑΘΜΟ ΑΠΟΦΡΑΞΗΣ των ΑΕΡΑΓΩΓΩΝ	65
4) Η ΕΚΦΡΑΣΗ της SP-A στα ΚΥΨΕΛΙΔΙΚΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ	67
Ε. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ της SP-A με την ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΣΤΑΘΕΙΑ του ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΟΥ DNA	70
Ζ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	71
Βιβλιογραφία	72
Άρθρο υπό κρίση	79

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας των πνευμόνων (surfactant) αποτελείται από ένα πολύπλοκο μείγμα λιπιδίων και ειδικών πρωτεϊνών και καλύπτει την κυψελιδική επιφάνεια του πνεύμονα. Η κύρια λειτουργία του είναι η διατήρηση χαμηλής επιφανειακής τάσης στον κυψελιδο-αρτηριακό φραγμό και η πρόληψη της κυψελιδικής κατάρρευσης κατά την εκπνοή. Επίσης, έχει σημαντικό ρόλο στο σύστημα της φυσικής ανοσίας του πνεύμονα. Τέσσερις ειδικές πρωτεΐνες (Surfactant Proteins) έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα, η πρωτεΐνη A (SP-A), η B (SP-B), η C (SP-C), και η D (SP-D). Τα τελευταία χρόνια πολλές μελέτες υποστηρίζουν τις ανοσορυθμιστικές ιδιότητες της υδρόφιλης πρωτεΐνης SP-A και SP-B και γίνονται πολλές έρευνες για το ρόλο τους στην παθολογία του πνεύμονα. Ο ρόλος της SP-A και SP-B σε ασθενείς με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (Χ.Α.Π.) έχει ελάχιστα διερευνηθεί.

Πρόσφατες έρευνες για τη μοριακή βάση της Χ.Α.Π. ανέδειξαν σωματικές μεταλλάξεις του τύπου της αστάθειας του μικροδορυφορικού DNA (Microsatellite DNA Instability (MSI)) στον σημαντή G29802 (10q22) παρακείμενο στο γονίδιο της πρωτεΐνης SP-A σε ασθενείς με Χ.Α.Π.. Ετέθει λοιπόν η υποψία ότι και η έκφραση της πρωτεΐνης SP-A ίσως είναι διαφοροποιημένη σε αυτούς τους ασθενείς.

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω που υποστηρίζουν ότι ο επιφανειοδραστικός παράγοντας και κυρίως η ανοσορυθμιστική πρωτεΐνη SP-A θα μπορούσε να

έχει ρόλο στην παθογένεια της ΧΑΠ ερευνήσαμε :1) τα επίπεδα έκφρασης της SP-A (με στύπωμα κατά Western και ανοσοϊστοχημεία) σε πνευμονικό ιστό ασθενών με ΧΑΠ σε σύγκριση με καπνιστές χωρίς ΧΑΠ με παρόμοιο ιστορικό καπνίσματος, και σε μη-καπνιστές ως ομάδα ελέγχου, 2) τη σχέση μεταξύ του επιπέδου έκφρασης της SP-A και του βαθμού απόφραξης των αεραγωγών.

Διενεργήθηκε στύπωμα κατά Western (Western blots) σε τεμαχίδια πνευμονικού ιστού 60 ατόμων (32 ασθενείς με Χ.Α.Π., 18 καπνιστές χωρίς Χ.Α.Π. και 10 μη καπνιστές ως ομάδα ελέγχου) για την πρωτεΐνη SP-A . Επίσης, με ανοσοϊστοχημεία καθορίστηκε η έκφραση της SP-A σε ιστό που έχει εμπεδωθεί σε παραφίνη μετά από μονιμοποίηση σε φορμόλη, των ίδιων ατόμων.

Το στύπωμα κατά Western έδειξε μειωμένα αν και όχι στατιστικά σημαντικά επίπεδα της SP-A σε ασθενείς με Χ.Α.Π. (0.6 ± 0.7) σε σύγκριση με τους καπνιστές χωρίς Χ.Α.Π. (2.4 ± 0.9), ($p=0.12$). Αντίθετα τα επίπεδα της SP-A στην ομάδα ελέγχου μη καπνιστών ήταν σημαντικά υψηλότερα (4.8 ± 0.05), ($p>0.05$). Η ανοσοϊστοχημεία έδειξε αυξημένο συνολικό αριθμό πνευμονοκυττάρων τύπου II στους ασθενείς με Χ.Α.Π. αλλά μειωμένη αναλογία των θετικών SP-A πνευμονοκυττάρων τύπου II προς τα συνολικά πνευμονοκύτταρα τύπου II σε σύγκριση με τους καπνιστές χωρίς Χ.Α.Π. ($p=0.001$). Η αναλογία αυτή συσχετίστηκε με την FEV1 (%pred), ($r=0.490$, $p=0.001$). Ο συνολικός αριθμός των κυψελιδικών μακροφάγων ήταν σημαντικά υψηλότερος στους ασθενείς με Χ.Α.Π. σε σύγκριση με τους καπνιστές χωρίς Χ.Α.Π. ($p=0.001$). Η

ποσοστιαία αναλογία των θετικών για SP-A κυψελιδικών μακροφάγων ήταν σημαντικά υψηλότερη στους ασθενείς με Χ.Α.Π. σε σύγκριση με τους καπνιστές χωρίς Χ.Α.Π. ($p=0.002$) και συσχετίστηκε με την απόφραξη των αεραγωγών ($FEV1\%$ pred), ($r=0.281$, $p=0.04$).

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η διαφοροποιημένη έκφραση της SP-A θα μπορούσε να είναι άλλος ένας κρίκος στην κατανόηση της παθογένειας της Χ.Α.Π. και τονίζει την ανάγκη παραπάνω έρευνας του επιφανειοδραστικού παράγοντα στη Χ.Α.Π..

ABSTRACT

Pulmonary surfactant is a complex mixture of lipids and proteins that constitutes the mobile liquid phase covering the large surface area of the alveolar epithelium. It maintains minimal surface tension within the lungs in order to avoid lung collapse during respiration. Recent studies have shown that components of Pulmonary surfactant also function in the pulmonary host defence as immune mediators. Pulmonary surfactant is composed of phospholipids, neutral lipids and surfactant proteins (SP). The SPs are divided into the hydrophobic SP-B and SP-C and the hydrophilic SP-A and SP-D. SP-B and SP-C lower the alveolar surface tension, while SP-A and SP-D are primarily concerned with host-defense functions, acting as immune mediators. Although pulmonary surfactant has the potential to contribute to the pathogenesis of COPD, very little work has been done in this field.

On the other hand, in a recent study of our laboratory, detected Microsatellite DNA Instability (MSI) on G29802 (10q22) marker next to SP-A locus gene only in COPD patients.

Taking into account all the evidence supporting that surfactant, especially the immunomodulatory protein SP-A, may be involved in the pathogenesis of COPD, we investigate: 1) the expression levels (by western blot and immunostaining) of SP-A in lung tissue of COPD patients in comparison to non-COPD smokers with equivalent smoking

history, and control non-smokers and 2) the relationship between the expression levels of SP-A and the degree of airway obstruction. To the best of our knowledge this is the first study of SP-A expression in lung tissue of COPD patients, non-COPD smokers and control non-smokers.

Western blots on lung tissue specimens from 60 male subjects (32 COPD patients, 18 non-COPD smokers and 10 control non-smokers) for SP-A and the housekeeping actin, have been carried out. In addition, by immunostaining the expression pattern of the SP-A was determined in formalin-fixed, paraffin-embedded lung tissue sections from the same subjects.

Western blots for SP-A showed decreased, but not statistically significant, levels in COPD patients (0.6 ± 0.7) in comparison with non-COPD smokers (2.4 ± 0.9), ($p=0.12$). SP-A levels in control non-smokers were significantly higher (4.8 ± 0.05), ($p > 0.05$). The immunostaining showed increased overall number of pneumocytes type II cells in COPD patients but decreased ratio of SP-A positive pneumocytes type II to total pneumocyte type II cells, compared to control smokers ($p=0.001$). This ratio was correlated with FEV1 (%pred), ($r=0.490$, $p=0.001$). The overall number of alveolar macrophages was significantly higher in COPD patients compared to non-COPD smokers ($p=0.001$). The percentage of SP-A positive alveolar macrophages was higher in COPD patients versus non-COPD smokers ($p=0.002$) and this correlated to airway obstruction (FEV1% pred), ($r=0.281$, $p=0.04$)

In conclusion, our results indicate that alternate SP-A expression could be another link to COPD pathogenesis and highlights the need for further studies on surfactant markers in COPD.

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. ΧΑΠ

1) ΟΡΙΣΜΟΣ και ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Η Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (Χ.Α.Π.) είναι μία από τις κυρίες αιτίες νοσηρότητας και θνησιμότητας στον κόσμο. Αντιπροσωπεύει την πρώτη αιτία θανάτου στις παθήσεις του πνεύμονα και είναι η τρίτη πιο κοινή αιτία θανάτου (8%) στα 25 μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης (1).

Παρόλα αυτά η Χ.Α.Π. παραμένει υποδιαγνωσμένη ή λάθος διαγνωσμένη σε πολλές χώρες. (2) Στη Ελλάδα οι περισσότεροι ασθενείς με Χ.Α.Π. είναι άνδρες (73.3%), και το 40% αυτών μεταξύ 40 και 60 ετών. Το μεγαλύτερο ποσοστό ζει σε αστικές περιοχές (68%). Οι περισσότεροι ασθενείς με Χ.Α.Π. (81.3%) ανέφεραν ιστορικό καπνίσματος ≥ 15 pack-years (3). Έρευνες έχουν δείξει ότι τις επόμενες δεκαετίες η επίπτωση της ΧΑΠ θα αυξηθεί και κατά συνέπεια η θνησιμότητα από τη συγκεκριμένη ασθένεια. Γι' αυτό το λόγο γίνεται εντατική προσπάθεια αφύπνισης στη διάγνωση και την παρακολούθηση της ΧΑΠ (1).

Ο ορισμός της Χ.Α.Π. από την ATS/ERS (4) και την GOLD (5) φαίνονται στον πίνακα (1). Και στους δύο ορισμούς τονίζεται ότι η Χ.Α.Π. είναι μια φλεγμονώδη ασθένεια, η οποία μπορεί να προληφθεί και να θεραπευθεί και χαρακτηρίζεται από περιορισμό της ροής του αέρα που είναι συνήθως προοδευτικά επιδεινούμενος και μη πλήρως αναστρέψιμος.

Επισημαίνεται η συστηματική και εξωπνευμονική συμμετοχή της νόσου καθώς και ο ρόλος της έκθεσης σε βλαπτικά σωματίδια ή αέρια αλλά κυρίως στον καπνό του τσιγάρου (1).

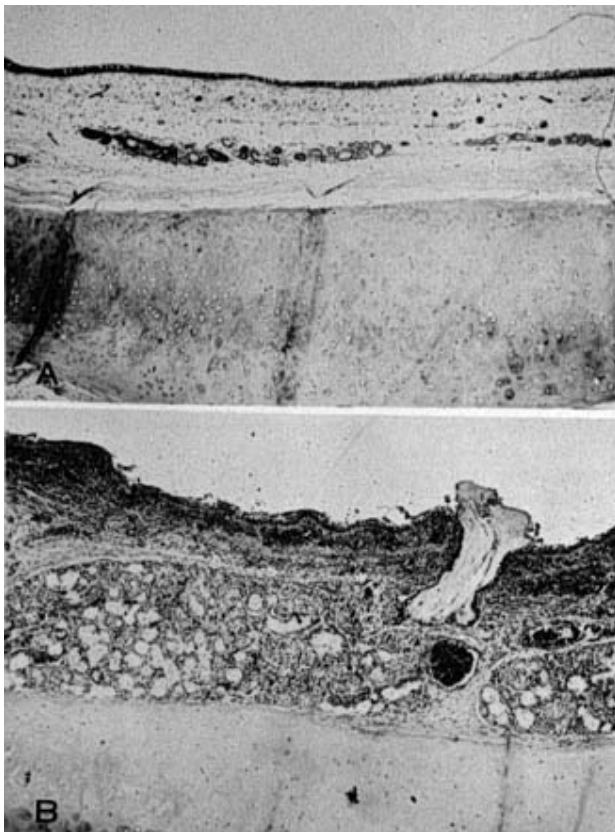
Πίνακας 1. Ορισμοί της Χρόνιας Αποφρακτικής Πνευμονοπάθειας (Χ.Α.Π.)

Πηγή	Ορισμός
ATS & ERS	«Η ΧΑΠ είναι μία νόσος που προλαμβάνεται και θεραπεύεται και η οποία χαρακτηρίζεται από απόφραξη των αεραγωγών, που δεν είναι πλήρως αναστρέψιμη. Η απόφραξη είναι προοδευτική και σχετίζεται με μία παθολογική φλεγμονώδη απάντηση των πνευμόνων σε βλαπτικά σωματίδια ή αέρια και κυρίως προκαλείται από το κάπνισμα τσιγάρων. Αν και η ΧΑΠ προσβάλλει βασικά τους πνεύμονες, προκαλεί επίσης συστηματικές εκδηλώσεις.»
GOLD	«Η ΧΑΠ είναι μια νόσος που μπορεί να προληφθεί και να θεραπευθεί με σημαντικές εξωπνευμονικές εκδηλώσεις που μπορούν να συμβάλλουν στη βαρύτητα της, σε ορισμένους ασθενείς. Χαρακτηρίζεται από περιορισμό της ροής του αέρα, μη πλήρως αναστρέψιμο. Ο περιορισμός αυτός επιδεινώνεται συνήθως προοδευτικά και συνοδεύεται από μη φυσιολογική φλεγμονώδη αντίδραση του πνεύμονα σε επιβλαβή σωματίδια και αέρια».

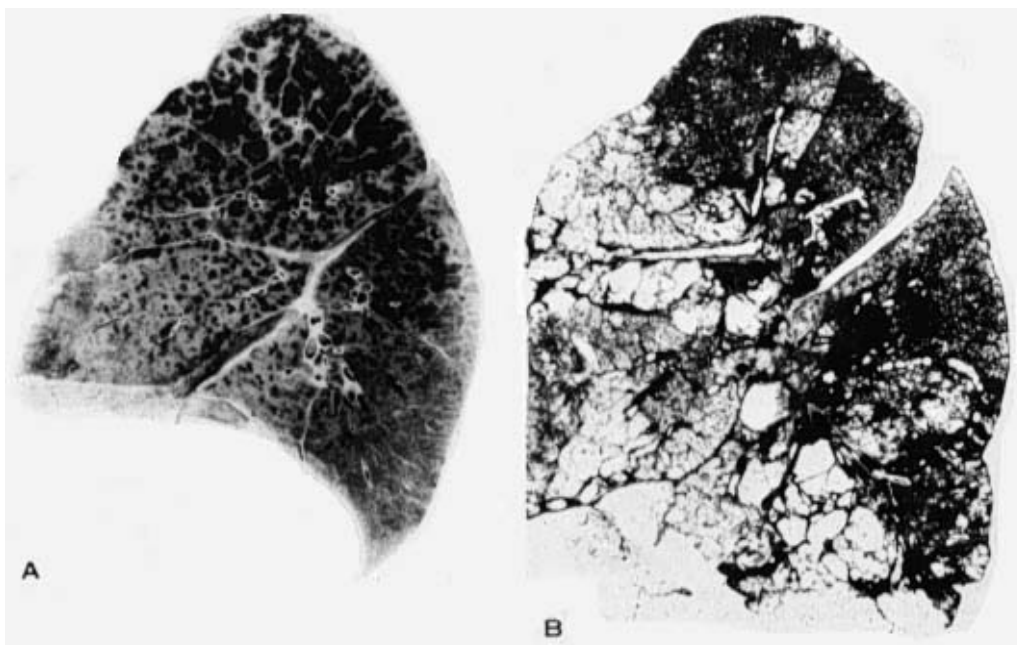
Ο κύριος διαχωρισμός της Χ.Α.Π. είναι στη χρόνια βρογχίτιδα και το εμφύσημα (6). Η χρόνια βρογχίτιδα χαρακτηρίζεται από «χρόνια ή περιοδική αύξηση των βρογχικών εκκρίσεων που προκαλούν απόχρεμψη. Ο παραγωγικός βήχας πρέπει να διαρκεί το λιγότερο 3 μήνες το

χρόνο για τουλάχιστον 2 συνεχόμενα χρόνια και δε μπορεί να αποδοθεί σε άλλη πνευμονολογική ή καρδιολογική αιτία.

Υπερ- έκκριση μπορεί να συμβαίνει χωρίς να συνυπάρχει περιορισμός ροής». (εικ. 1.A και B). Το εμφύσημα ορίζεται ανατομικά και χαρακτηρίζεται από μόνιμη καταστροφική διάταση των απομακρυσμένων κυψελίδων των τελικών βρογχιολίων χωρίς να υπάρχει εμφανή ίνωση (εικ. 2.A και B.).



Εικ.1. A και B Βρόγχος φυσιολογικός **(A)** και απόμου με χρόνια βρογχίτιδα **(B)**. Παρατηρείται αυξημένο πάχος των αδένων παραγωγής βλέννας στη βρογχική βλενώδη μεμβράνη (submucosa) στον πνεύμονα χρόνιου βρογχιτιδικού ασθενούς **(B)** σε σύγκριση με το φυσιολογικό βρόγχο **(A)**.



Εικ. 2 Εμφύσημα **A.** κεντρολοβιδιακό (υψηλότερες ζώνες) **B.** πανλοβιδιακό (κατώτερες ζώνες)

Στο κεντρολοβιδιακό εμφύσημα εμπλέκονται μόνο τα κεντρικά και τα εγγύς αναπνευστικά βρογχιόλια. Συνήθως αφορά τους άνω λοβούς του πνεύμονα και είναι ο πιο κοινός τύπος εμφυσήματος. Συνδέεται με το κάπνισμα και με τη σκόνη καολίνης. Στο πανλοβιδιακό εμφύσημα εμπλέκεται όλο το αναπνευστικό λοβίδιο (όλες οι κυψελίδες ενός αναπνευστικού λοβιδίου). Τυπικά αφορά τις κατώτερες ζώνες του πνεύμονα και την πρόσθια επιφάνειά του. Σχετίζεται με την έλλειψη της α1- αντιθριψίνης.

Η διαφορο-διάγνωση της Χ.Α.Π. περιλαμβάνει το άσθμα, την συμφοριτική καρδιακή ανεπάρκεια, τις βρογχιεκτασίες, τη φυματίωση, τη βρογχιολίτιδα, και τη διάχυτη πανβρογχιολίτιδα (6). Το ιστορικό του ασθενούς, η ακτινογραφία θώρακος, ο λειτουργικός έλεγχος και οι απεικονιστικές μέθοδοι μπορούν να βοηθήσουν στην τελική διάγνωση. Σε μερικούς ασθενείς με βαρύ χρόνιο άσθμα δεν είναι δυνατός ο κλινικός διαχωρισμός από τη ΧΑΠ ακόμα και με τη βοήθεια των απεικονιστικών τεχνικών ή το λειτουργικό

έλεγχο του αναπνευστικού. Σε αυτές τις περιπτώσεις καταλήγουμε ότι το βρογχικό άσθμα και η ΧΑΠ συνυπάρχουν (1,6).

2) ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Η πιο κοινή αιτία της Χ.Α.Π. είναι ο καπνός του τσιγάρου. Η έκθεση στον καπνό του τσιγάρου αλλά και στα βλαπτικά ατμοσφαιρικά σωματίδια και αέρια ενάγουν τη φλεγμονή των αεραγωγών στην οποία λαμβάνουν μέρος μια ποικιλία από κύτταρα. Εκτός από τα ουδετερόφιλα, τα μακροφάγα και τα λεμφοκύτταρα, τα επιθηλιακά κύτταρα φαίνεται να έχουν σημαντικό ρόλο στη φλεγμονώδη διαδικασία στην εμφάνιση της Χ.Α.Π.. Η διήθηση των κυττάρων ενορχηστρωμένα από χημειοκύτταροκίνες, το σύστημα πρωτεασών- αντιπρωτεασών, το οξειδωτικό στρες και η αναδιαμόρφωση (remodeling) των αεραγωγών είναι οι κεντρικές διαδικασίες που σχετίζονται με την ανάπτυξη της Χ.Α.Π. (7,8).

Το ποσοστό ασθενών που έχουν Χ.Α.Π. λόγω έλλειψης α1- αντιθρυψίνης ανέρχεται μόλις στο 2% των αναφερόμενων περιπτώσεων. Η παθογένεια της Χ.Α.Π. βασίζεται κυρίως στην απάντηση του πνεύμονα σε εισπνεόμενα τοξικά σωματίδια ή αέρια όπως ο καπνός του τσιγάρου. Οι ασθενείς με Χ.Α.Π. είναι σε ποσοστό 80% καπνιστές αλλά από τους καπνιστές μόνο το 15-25% πάσχει από Χ.Α.Π.

Εκτός το κάπνισμα, άλλες αιτίες της Χ.Α.Π. περιλαμβάνουν την έκθεση σε σκόνη στον εργασιακό χώρο, τη

μόλυνση του περιβάλλοντος και τις ιογενείς λοιμώξεις. Όμως δεν έχει διευκρινιστεί εάν κάποια από τις παραπάνω αιτίες μπορεί από μόνη της να προκαλέσει Χ.Α.Π. ή μπορεί αυξήσει την ευπάθεια των ατόμων (8).

Η παθολογία των πνευμόνων των χρόνιων καπνιστών δείχνει χαμηλού βαθμού διήθηση φλεγμονωδών κυττάρων στους μεγαλύτερους βρόγχους και στο πνευμονικό παρέγχυμα ενώ στους καπνιστές που αναπτύσσουν Χ.Α.Π. η φλεγμονώδης απάντηση είναι ενισχυμένη, διαρκεί για αρκετό καιρό μετά τη διακοπή καπνίσματος, και συνδέεται με ιστική αναδιαμόρφωση (remodeling) με συνέπεια βλάβη του πνεύμονα που συνδέεται με χρόνια βρογχίτιδα, απόφραξη των μικρών αεραγωγών, εμφύσημα και πνευμονική υπέρταση (7).

Η παθογένεια της Χ.Α.Π. στηρίζεται σε 3 κύριους μηχανισμούς: 1) Στην έλλειψη ισορροπίας των πρωτεασών-αντιπρωτεασών που οδηγεί στο εμφύσημα 2) Στην ανισσοροπία των οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών στοιχείων με συνέπεια το οξειδωτικό stress και φυσικά 3) στη φλεγμονή και το remodeling.

Επίσης τα τελευταία χρόνια γίνεται λόγος για το ρόλο της απόπτωσης στην παθογένεια της Χ.Α.Π.. (8).

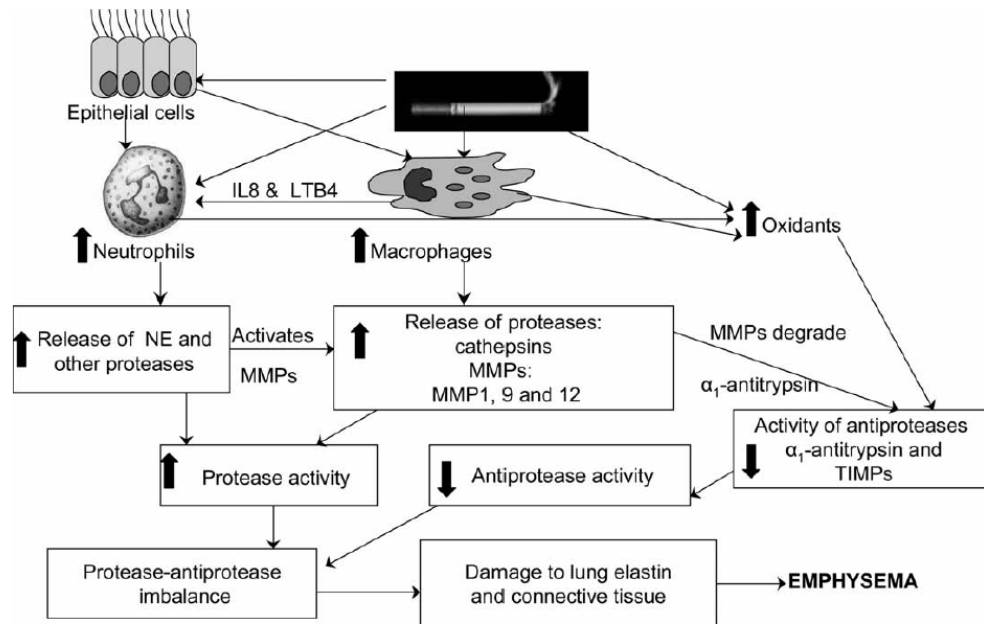
Η ανακάλυψη ότι η σοβαρή έλλειψη α1- αντιθρυψίνης (ο κύριος αναστολέας της ελαστάσης των ουδετερόφιλων) οδηγεί σε εμφύσημα, και η παρατήρηση ότι η ενδοτραχειακή ενστάλαξη πρωτεολυτικών ενζύμων σε ποντίκια προκαλεί εμφυσηματικές αλλοιώσεις άνοιξε το δρόμο για την «πρωτεολυτική υπόθεση» του εμφυσήματος. Σύμφωνα με αυτή την υπόθεση το κάπνισμα προκαλεί αύξηση των

ουδετερόφιλων και των μακροφάγων στον πνεύμονα και απελευθέρωση πρωτεολυτικών ενζύμων από αυτά τα κύτταρα .

Η απελευθέρωση των ενζύμων που δεν αναστέλλονται πλήρως από τις αντι-πρωτεάσες προκαλούν πρωτεόλυση του συνδετικού πνευμονικού ιστού (πιο ειδικά της ελαστίνης) και κατά συνέπεια εμφύσημα. Αλλά και σε ασθενείς με Χ.Α.Π. χωρίς έλλειψη α1-αντιθρυψίνης, παρατηρείται έλλειψη ισορροπίας των πρωτεασών-αντιπρωτεασών στον πνεύμονα . Το κάπνισμα διεγείρει τα επιθηλιακά κύτταρα να παράγουν κυτταροκίνες οι οποίες με τη σειρά τους διεγείρουν τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα. Επίσης ο καπνός του τσιγάρου μπορεί να δράσει άμεσα στα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα ενεργοποιώντας τα, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση πρωτεολυτικών ενζύμων.

Φαίνεται ότι τα κυψελιδικά μακροφάγα έχουν σημαντικό ρόλο στη παθογένεια του εμφυσήματος, εκφράζοντας ελαστολυτικά ένζυμα, καθεψίνες και επιθηλιακές μεταλοπρωτεάσες (MMPs) που ενάγονται από τον καπνό του τσιγάρου. Ο αριθμός των κυψελιδικών μακροφάγων είναι αυξημένος στα αναπνευστικά βρογχιόλια όπου αναπτύσσεται το κεντρολοβιδιακό εμφύσημα. Οι καθεψίνες των μακροφάγων αναστέλλονται από την αντιπρωτεάση κυστατίνη C ενώ οι MMPs αναστέλλονται από τις TIMPs (αναστολείς μεταλλοπρωτεασών). Μερικοί από τους προ-φλεγμονώδεις μεσολαβητές απελευθερώνουν MMPs από τα μακροφάγα χωρίς να προκαλείται σύγχρονη αύξηση των TIMPs οδηγώντας έτσι στην έλλειψη ισορροπίας πρωτεασών –αντιπρωτεασών (εικ.3). Μελέτες στις πρωτεάσες των κυψελιδικών μακροφάγων

που λήφθηκαν με βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα και από πνευμονικό ιστό έδειξαν αυξημένη έκφραση σε άτομα με Χ.Α.Π. σε σύγκριση με άτομα χωρίς Χ.Α.Π.(8).



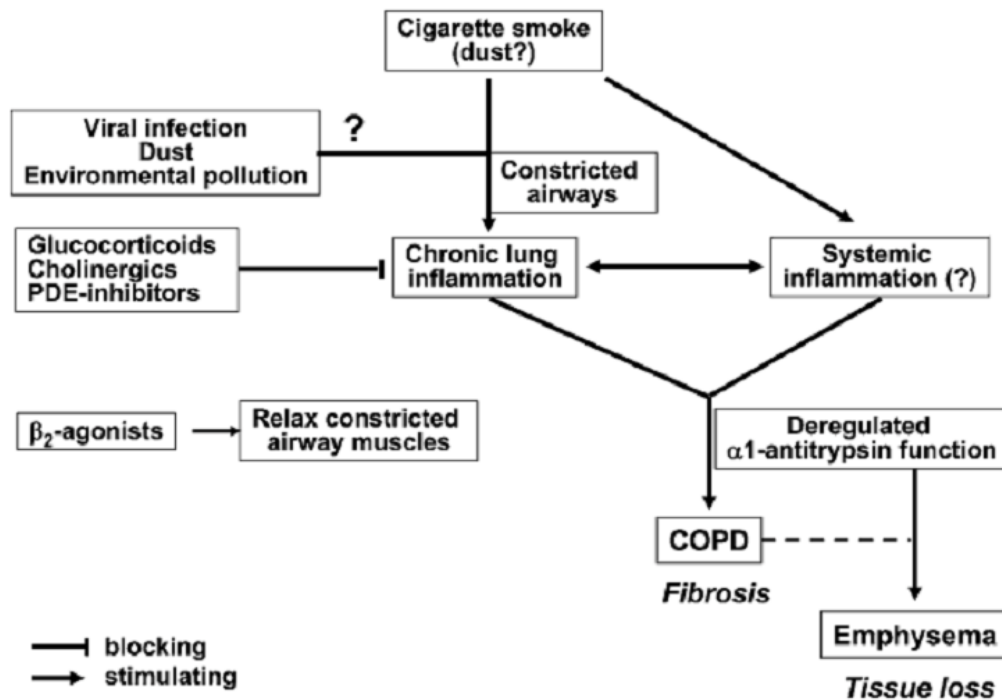
Εικ. 3 Το παραπάνω διάγραμμα δείχνει τα μονοπάτια που οδηγεί το κάπνισμα με την προκαλούμενη έλλειψη ισορροπίας πρωτεασών-αντιπρωτεασών στον πνεύμονα. Το προκαλεί τα επιθηλιακά κύτταρα να παράγουν κυτταροκίνες που ενεργοποιούν τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα. Επίσης, ο καπνός του τσιγάρου περιέχει οξειδωτικά τα οποία μπορούν να απενεργοποιήσουν τις αντι-πρωτεάσες επιπρόσθετα με την απενεργοποίηση των αντι-πρωτεασών από τα οξειδωτικά στοιχεία που ελευθερώνονται από τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα. Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα αποδεσμεύουν πρωτεολυτικά ένζυμα. Η ουδετεροφιλική ελαστάση μπορεί να ενεργοποιήσει τις MMPs ενώ οι MMPs μπορούν να απενεργοποιήσουν την α1- αντιθριψίνη. Στο διάγραμμα δε φαίνεται ο ρόλος της MMP-12 στην απελευθέρωση του TNF ο οποίος ενισχύει τη φλεγμονώδη αντίδραση. Αυτές οι διαδικασίες οδηγούν στην ανισοροπία πρωτεασών-αντιπρωτεασών η οποία μπορεί να επιφέρει αποδομή της ελαστίνης και του συνδετικού ιστού και κατά συνέπεια εμφύσημα
 IL: interleukin, LTB: leukotriene B, NE: neutrophil elastase, MMP: matrix metalloproteases, TIMP: tissue inhibitor of metalloproteases, TNF-a : tumor necrosis factor alpha.

Αν και η παθογένεια της Χ.Α.Π. παραμένει μερικώς αδιευκρίνιστη η σημασία του οξειδωτικού στρες στον πνεύμονα έχει τεκμηριωθεί. Η πηγή του οξειδωτικού στρες είναι τα φλεγμονώδη κύτταρα όπως τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα τα οποία παράγουν ενεργά παράγωγα οξυγόνου (ROS) όταν ενεργοποιηθούν. Μαζί με τα εισπνεόμενα ROS και τα ενεργά παράγωγα του αζώτου (RNS) τα οποία είναι σε αφθονία στον καπνό του τσιγάρου, μπορούν να επιφέρουν μέγιστο οξειδωτικό φορτίο στον πνεύμονα. Στα υγιή άτομα υπάρχει ισορροπία μεταξύ των οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών στοιχείων διατηρώντας το εξωκυτταρικό περιβάλλον σε μειωμένα επίπεδα οξειδωτικών ουσιών. Ο καπνός του τσιγάρου ο οποίος περιέχει μαζική ποσότητα οξειδωτικών σε αέρια φάση αλλά και σε μικροσωματίδια (περίπου 10^{14} ελεύθερες ρίζες ανά «puff») είναι ο πιο σημαντικός αιτιολογικός παράγοντας για την ανάπτυξη της Χ.Α.Π. και υπάρχει μια σχέση δόσο-εξαρτώμενη μεταξύ του αθροιστικού συνόλου καπνίσματος και της επίπτωσης της νόσου. Το οξειδωτικό στρες επέρχεται όταν η επιβάρυνση των οξειδωτικών στοιχείων δεν αντισταθμίζεται από το αντιοξειδωτικό σύστημα άμυνας (9).

Η οξεία και χρόνια φλεγμονή των αεραγωγών στη Χ.Α.Π. είναι γνωστή από πολλές μελέτες ενώ τα τελευταία χρόνια γίνεται λόγος για τη συστηματική φλεγμονή των ασθενών με Χ.Α.Π.. Ένα από τα πιο σημαντικά αναπάντητα ερωτήματα είναι γιατί ενώ όλοι οι καπνιστές παρουσιάζουν χρόνια φλεγμονή του πνεύμονα ένα σχετικά μικρό ποσοστό αυτών εμφανίζει Χ.Α.Π. Ακόμα, δεν είναι γνωστό γιατί σε άτομα που

έχουν διακόψει το κάπνισμα πολλά χρόνια, εμμένει η χρόνια φλεγμονή των πνευμόνων. Το κάπνισμα συνδέεται με τη διήθηση των μακροφάγων, των ουδετερόφιλων και των CD8 Τ-λεμφοκυττάρων τα οποία ελευθερώνουν προ-φλεγμονώδεις παράγοντες στον πνεύμονα. Η ένταση της διήθησης και της ενεργοποίησης των ανοσολογικών κυττάρων είναι ανάλογη με τη βαρύτητα της Χ.Α.Π.. Τα ενεργοποιημένα ανοσολογικά κύτταρα ελευθερώνουν ένα μεγάλο αριθμό προ-φλεγμονωδών, μιτογενετικών και προ-ινωτικών παραγόντων οι οποίοι τροποποιούν τη συμπεριφορά των επιθηλιακών κυττάρων, των ινοβλαστών και των λείων μυϊκών κυττάρων των αεραγωγών. Οι προ-φλεγμονώδεις παράγοντες που αποδεσμεύονται από τα ενεργοποιημένα ανοσολογικά κύτταρα διεγείρουν τα υπόλοιπα κύτταρα να εκκρίνουν επιπρόσθετους προ-φλεγμονώδεις παράγοντες προσελκύοντας περισσότερα ανοσολογικά κύτταρα στο σημείο φλεγμονής. Αυτός ο φαύλος κύκλος διατηρεί τη φλεγμονώδη διεργασία (εικ.4). Παρόλο τον προφανή σημαντικό ρόλο της φλεγμονής στην παθογένεια της Χ.Α.Π. τα αποτελέσματα της αντιφλεγμονώδους θεραπείας είναι απογοητευτικά (10).

Επίσης, η φλεγμονή που προκαλείται από το κάπνισμα συνδέεται με αυξημένη έκφραση των πρωτεασών που εκφυλίζει το εξωκυττάριο επιθηλιακό ιστό και ενάγει την ιστική αναδιαμόρφωση η οποία είναι γνωστό ότι συμβαίνει στους αθeneίς με Χ.Α.Π.(7,10).



Εικ. 4 Η επίδραση του καπνού του τσιγάρου και πιθανών άλλων παραγόντων στην ανάπτυξη της Χ.Α.Π. και του εμφυσήματος. Δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα εάν οι ιογενείς λοιμώξεις ή η έκθεση στην περιβαλλοντική ή στην εργασιακή σκόνη είναι επιπρόσθετοι παράγοντες ή μπορούν να επιτελέσουν από μόνοι τους παράγοντα ανάπτυξης Χ.Α.Π.. Τα σύγχρονα διαθέσιμα φάρμακα μειώνουν τη φλεγμονή ή χαλαρώνουν τον μυϊκό τόνο (β2- αγωνιστές).

B. ΑΣΤΑΘΕΙΑ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΟΥ DNA (MI, Microsatellite Instability)

Το μικροδορυφορικό DNA αποτελείται από μικρές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (συνήθως δινουκλεοτίδια ή τρινουκλεοτίδια) DNA στο ανθρώπινο γονιδίωμα . Μάλιστα υπάρχουν σε 100000 διαφορετικές θέσεις σε όλα τα χρωμοσώματα του ανθρώπου (11). Όσον αφορά τη λειτουργία των αλληλουχιών αυτών, στην πλειοψηφία των περιπτώσεων δεν σχετίζεται με τη ρύθμιση της έκφρασης κάποιων γονιδίων. Πάραυτα, έχει προταθεί ότι οι αλληλουχίες αυτές έχουν ρόλο στην αποφυγή λαθών κατά τη διάρκεια φαινομένων γενετικού ανασυνδιασμού, καθώς οριοθετούν τις περιοχές που γίνεται η ανταλλαγή των αδελφών χρωματίδων. Το αποτέλεσμα είναι τα μικρά λάθη κατά τον ανασυνδυασμό να μην αλλοιώνουν το πλαίσιο ανάγνωσης σε παρακείμενα γονίδια (12) . 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 ευνοούνταν, ενώ η απουσία επιλεκτικής πίεσης στα νεοσχηματισθέντα-μεταλλαγμένα αλληλόμορφα τα σταθεροποιούσε στον πληθυσμό, προκαλώντας ένα υψηλό βαθμό πολυμορφισμού (13).

Έχει βρεθεί ότι τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από τη δημιουργία τέτοιων νέων μεταλλαγμένων αλληλομόρφων, που απουσιάζουν από τον παρακείμενο

φυσιολογικό ιστό. Ο σχηματισμός των νέων αυτών αλληλομόρφων είναι προϊόν του φαινομένου που χαρακτηρίζεται ως αστάθεια του μικροδορυφορικού DNA (MI, Microsatellite Instability).

Το φαινόμενο της αστάθειας του μικροδορυφορικού DNA συσχετίσθηκε με λάθη αντιγραφής (14) στον κληρονομικό μη πολυποσικό καρκίνο του παχέος εντέρου (15) (hereditary non polyposis colorectal cancer) και με αύξηση της μεταλλαξιογένεσης σε άλλους καρκίνους όπως του μαστού (16), του παχέος εντέρου (17) και του πνεύμονα (18).

Εκτός όμως από τα παραπάνω νοσήματα, αυξημένη επίπτωση MI διαπιστώθηκε και σε καλοήγη νοσήματα όπως την αθηρωμάτωση (19), το πτερύγιο του οφθαλμού (20,21), τους εμβρυϊκούς ιστούς αυτόματων αποβολών (22), τη χορεία του Huntington (23) και το σύνδρομο εύθραυστου X (24). Επίσης πρόσφατες μελέτες από τον Σιαφάκα και συναδέλφους (25) έδειξαν αυξημένη συχνότητα MI σε ασθενείς με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) σε ποσοστό 24%. Ενδιαφέρον εύρημα της μελέτης αυτής είναι ότι παρόμοιο φαινόμενο δεν ήταν ανιχνεύσιμο σε καπνιστές που δεν έπασχαν από ΧΑΠ. Άλλα πνευμονικά νοσήματα που επίσης εμφάνισαν MI ήταν τόσο η σαρκοείδωση (σε ποσοστό 43% των εξεταζομένων ασθενών) όσο και η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση (19% των ασθενών) (26).

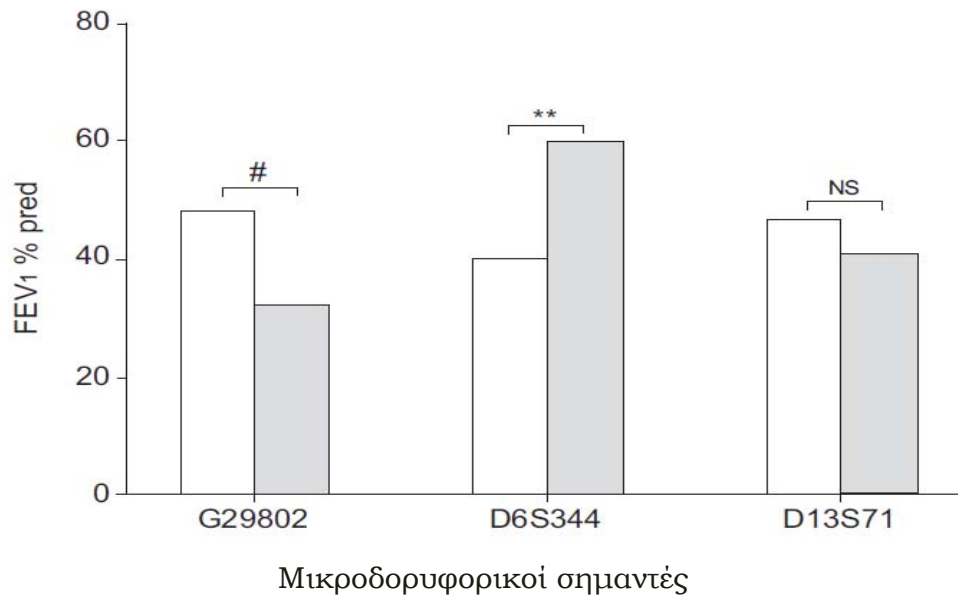
ΑΣΤΑΘΕΙΑ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΟΥ DNA και Χ.Α.Π.

Υπάρχουν αρκετά στοιχεία που στηρίζουν την άποψη ότι η Χ.Α.Π. παρουσιάζει γενετική προδιάθεση και είναι πιθανώς πολυγονιδιακή νόσος. Προκειμένου να ερευνηθεί περαιτέρω το γενετικό υπόβαθρο της Χ.Α.Π., το μικροδορυφορικό DNA χρησιμοποιήθηκε ως γενετικό διαγνωστικό εργαλείο σε πολλές έρευνες του εργαστηρίου μας (25,26,27,28,29,30). Κύτταρα πτυέλου χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση του φαινομένου της μικροδορυφορικής αστάθειας σε ασθενείς με αποφρακτικά νοσήματα.

Μια πιθανή υπόθεση θα μπορούσε να αναφέρεται στο ότι το φαινόμενο της μικροδορυφορικής αστάθειας απεικονίζει μια δυσλειτουργία στη διαδικασία επισκευής της ζημιάς του DNA που έχει προκληθεί από το οξειδωτικό στρες του καπνού του τσιγάρου. Κατά συνέπεια προκαλούνται μη αναστρέψιμες γενετικές αλλαγές στα επιθηλιακά και άλλα θεμελιώδη κύτταρα των αεραγωγών και του πνευμονικού παρεγχύματος που μπορούν να οδηγήσουν σε λειτουργικές διαταραχές του πνεύμονα.

Το φαινόμενο της Μικροδορυφορικής Αστάθειας αποτελεί ανιχνεύσιμο φαινόμενο σε ασθενείς που πάσχουν από Χ.Α.Π. όπως έδειξε αρχική έρευνα του εργαστηρίου μας (29). Επόμενη μελέτη του εργαστηρίου μας (30) έδειξε ότι συγκεκριμένοι σημαντές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση Μικροδορυφορικής Αστάθειας στη Χ.Α.Π. και το άσθμα, έδειξαν ειδικότητα στη Χ.Α.Π.. Ο σημαντής που αφορά την παρούσα έρευνα είναι ο G29802 και έδειξε

Μικροδορυφορική Αστάθεια στη χρωμοσωμική περιοχή 10q22 όπου εδράζεται το γονίδιο της πρωτεΐνης SP-A. Ο συγκεκριμένος σημαντής συνδέθηκε με σημαντική μείωση της FEV₁% pred. (εικ.5). Τα αποτελέσματα αυτά ήταν και η πρώτη ώθηση να ερευνησουμε το ρόλο της πρωτεΐνης SP-A στην παθολογία της Χ.Α.Π..



Εικ. 5 Οι ασθενείς με Χ.Α.Π. έδειξαν μικροδορυφορική σταθερότητα και αστάθεια σε συγκεκριμένους σημαντές ανάλογα με την FEV₁ (%pre). Ο σημαντής G29802 που έδειξε Μικροδορυφορική Αστάθεια στη χρωμοσωμική περιοχή όπου εδράζεται το γονίδιο της πρωτεΐνης SP-A συνδέθηκε με τη μεγαλύτερη μείωση της FEV₁% pred. NS : μη σημαντικό, #: p<0.05, **:p<0.01

Η αστάθεια του μικροδορυφορικού DNA φαίνεται ότι αποτελεί μέρος της σύνθετης γενετικής βάσης της Χ.Α.Π., αναδεικνύοντας κάποιες χρωμοσωμικές περιοχές που εμφανίζουν γενετικές αλλαγές.

Γ. ΚΥΨΕΛΙΔΙΚΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ

Τα κυψελιδικά μακροφάγα έχουν ανώμαλο περίγραμμα και εμφανή ψευδοπόδια . Το κυτταρόπλασμά τους περιέχει πολλά λυσοσώματα, φαγοσώματα και φαγολυσοσώματα. Στους καπνιστές, τα φαγολυσοσωματικά έγκλειστα είναι άφθονα και περιέχουν «σωματίδια πίσσας» και λεπτούς κρυστάλλους καολιτίνη. Το κυψελιδικό μακροφάγο είναι φυσιολογικός κάτοικος της κυψελίδας και εμφανίζει έντονη φαγοκυτταρική δραστηριότητα (31).

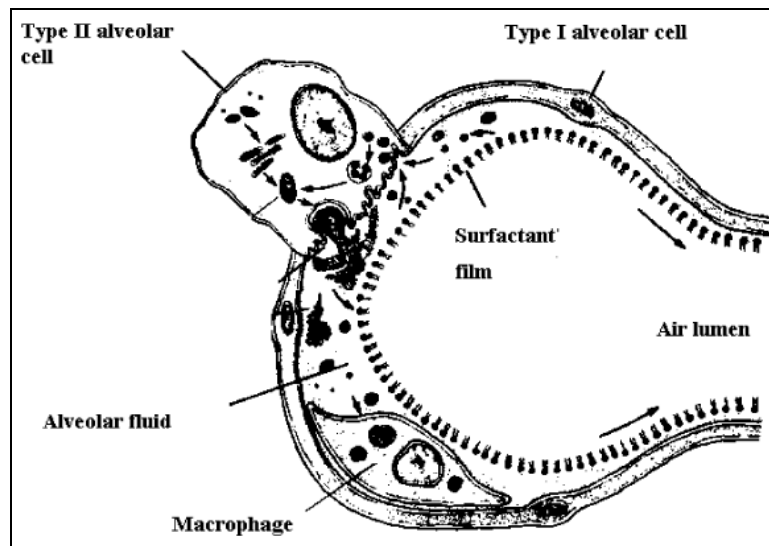
Τα μακροφάγα είναι κύτταρα με δυνατότητα παραγωγής μεγάλου αριθμού μεσολαβητών, ανάλογα με το ερέθισμα μπορεί είτε να ενισχύσουν είτε να μειώσουν τη φλεγμονώδη αντίδραση . Προέρχονται από τα μονοκύτταρα του αίματος και κυκλοφορούν στους αεραγωγούς των αποφρακτικών ασθενών, ενώ ενεργοποιούνται μέσω των χαμηλής συγγένειας υποδοχέων της IgE (FcεRII) (32). Ένας μεγάλος αριθμός κυτταροκινών επηρεάζει τη μετανάστευσή τους και στον κυψελιδικό χώρο. Τα μονοκύτταρα/ μακροφάγα CD68⁺ αυξάνονται σημαντικά σε αριθμό στο βρογχικό επιθήλιο του χρόνιου αποφρακτικού ασθενή (33,34) και η αύξηση είναι ανάλογη με τη βαρύτητα της Χ.Α.Π.(35). Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα συμμετέχουν στην απόφραξη των αεραγωγών και στη φλεγμονώδη αντίδραση με την έκκριση ουσιών με βλαπτική δράση στους βρόγχους όπως ένζυμα (36), παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF) (37), μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMP-9), ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, κυτταροκίνες κυρίως TNF-α (38), και ουσίες προαγωγής της έκκρισης της βλέννης (39). Επίσης,

δυναμικά συμμετέχουν στη ρύθμιση της διαδικασίας της επαναδιάταξης (remodeling) των αεραγωγών, μέσω της έκκρισης αυξητικών παραγόντων όπως ο PDGF (Platelet Derived Growth Factor), βFGF (basic Fibroblast Growth Factor), και TGF (Transforming Growth Factor), που ενέχονται στην ίνωση των αεραγωγών (40). Από την άλλη πλευρά, τα μακροφάγα μπορεί να διαδραματίσουν αντιφλεγμονώδη ρόλο προστατεύοντας τον οργανισμό από την ανάπτυξη της φλεγμονώδους αντίδρασης (41). Τέλος τα μακροφάγα πιθανά δρουν και ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα των αλλεργιογόνων στα T-λεμφοκύτταρα (42).

Δ. ΠΝΕΥΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ τύπου II

Τα πνευμονοκύτταρα τύπου II είναι διπλάσια σε αριθμό από τα κύτταρα τύπου I αλλά λόγω του κυβικού τους σχήματος καλύπτουν μόνο το 7% της κυψελιδικής επιφάνειας (εικόνα 6). Συχνά καταλαμβάνουν τις γωνίες της κυψελίδας και η επιφάνεια τους εμφανίζει άφθονες μικρολάγχες. Το κυτταρόπλασμά τους περιέχει μεγάλα μιτοχόνδρια με ευδιάκριτες ακρολοφίες, αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο, σύστημα Golgi και χαρακτηριστικές πεταλοειδής δομές που χρώνονται όσμιο και αντιπροσωπεύουν τα εκκριτικά σωματίδια του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων (surfactant). Ο ρόλος τους στην έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα έχει διευκρινιστεί με αυτοραδιογραφικές μελέτες ενσωμάτωσης πρόδρομων μορίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Με τεχνικές διαχωρισμού κυττάρων μελετήθηκαν *in vitro* αμιγή εναιωρήματα κυττάρων τύπου II και επιβεβαιώθηκε ότι αυτά τα κύτταρα εκκρίνουν τον επιφανειοδραστικό παράγοντα. Η εξωκυττάρια στοιβάδα του επιφανειοδραστικού παράγοντα φυσιολογικά καλύπτει όλη την κυψελίδα. Τα πνευμονοκύτταρα τύπου II είναι τα στελεχιαία κύτταρα από τα οποία αντικαθίστανται τα καταστραμμένα τύπου I. Σε χρόνιες βλάβες τα πνευμονοκύτταρα τύπου II πολλαπλασιάζονται αλλά δε διαφοροποιούνται αρχικά, ενώ το κυψελιδικό τοίχωμα καλύπτεται από ένα κυβικό επιθήλιο που φαίνεται στο οπτικό μικροσκόπιο. Μελέτες σε ζώα έχουν δείξει ότι στο φυσιολογικό πνεύμονα ο χρόνος ανανέωσης των πνευμονοκυττάρων τύπου

II είναι 25 ημέρες περίπου και η μετατροπή των πνευμονοκυττάρων τύπου II σε πνευμονοκύτταρα τύπου I διαρκεί περίπου 2 ημέρες. Ο ρόλος των πνευμονοκυττάρων τύπου II στην παθογένεια της Χ.Α.Π. παραμένει αδιευκρίνιστος (43).



Εικ. 6: Σχηματική απεικόνιση της κυψελίδας με πνευμονοκύτταρο τύπου I, II, και κυψελιδικό μακροφάγο.

Ε. ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΤΩΝ ΠΝΕΥΜΟΝΩΝ (Pulmonary Surfactant)

1) ΕΙΣΑΓΩΓΗ- ιστορικά δεδομένα

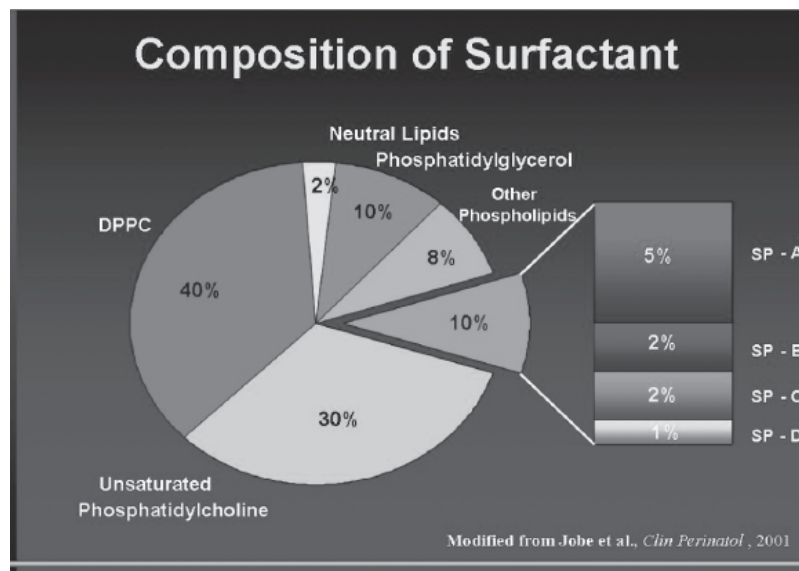
Η ύπαρξη της επιφανειοδραστικής ουσίας στον πνεύμονα προτάθηκε για πρώτη φορά το 1929 από τον Von Neegraard. Μέσα Στη δεκαετία του 1950 , οι Pattle και Clements βρήκαν μια ουσία στο υγρό του πνευμονικού οιδήματος και σε εκχυλίσματα πνευμόνων που μείωνε δραματικά την επιφανειακή τάση. Το υγρό βρέθηκε να αποτελείται από ένα φωσφολιπιδικό και ένα πρωτεϊνικό τμήμα και ονομάστηκε επιφανειοδραστικός παράγοντας των πνευμόνων (surfactant-surface active agent). Το 1959 οι Avery και Mead διαπίστωσαν το ρόλο της έλλειψης του επιφανειοδραστικού παράγοντα στη νόσο της υαλοειδούς μεμβράνης των πρόωρων νεογνών, η οποία τώρα αποκαλείται σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας των νεογνών (IRDS). Από την εποχή εκείνη η κατανόηση του συστήματος του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων έχει διερευνηθεί. Το κυψελιδικό κύτταρο τύπου II έχει ταυτοποιηθεί ως η περιοχή της σύνθεσης του επιφανειοδραστικού παράγοντα των κυψελίδων. Η ακριβής σύσταση του υλικού είναι τώρα γνωστή μέχρι τους γενετικούς κώδικες των πρωτεϊνών του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Πολλές λεπτομέρειες που αφορούν τη σύνθεση και την έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα και της ρύθμισης του μεταβολισμού του έχουν διευκρινιστεί (44,45).

Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας καλύπτει την κυψελιδική επιφάνεια του πνεύμονα. Η κύρια λειτουργία του

είναι η διατήρηση χαμηλής επιφανειακής τάσης στο φραγμό αέρος υγρού (κυψελιδο-αρτηριακή διεπαφή) και η πρόληψη της κυψελιδικής κατάρρευσης κατά την εκπνοή (46). Πρόσφατα έχει αποκαλυφθεί ο ρόλος του επιφανειοδραστικού παράγοντα στους μηχανισμούς άμυνας και στην τοπική ανοσορύθμιση του πνεύμονα (47,48). Επιπλέον, ο ρόλος του επιφανειοδραστικού παράγοντα σε διάφορα πνευμονικά νοσήματα είναι φαίνεται να είναι σημαντικός, απαιτώντας περισσότερη έρευνα.

2) ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ

Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας των πνευμόνων αποτελείται από ένα μοναδικό και πολύπλοκο μείγμα λιπιδίων (85–90%) και ειδικών αποπρωτεϊνών (10%) (εικόνα 7). Η υπολογιζόμενη συγκέντρωση του επιφανειοδραστικού παράγοντα στην κυψελιδική καλυπτική στοιβάδα του φυσιολογικού ενήλικα πνεύμονα είναι περίπου 120mg/ml. Υπολογίζοντας μια συνολική κυψελιδική επιφάνεια 100m² με περιεκτικότητα επιφανειοδραστικού παράγοντα 50ml·m², ο ολικός όγκος του παράγοντα φτάνει τα 5ml ή 600mg (44,45).



Εικ. 7: Σύσταση του επιφανειοδραστικού παράγοντα.

3) ΛΙΠΙΔΙΑ ΤΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ

Περίπου το 90% του λιπιδικού τμήματος του επιφανειοδραστικού παράγοντα αποτελείται από μείγμα φωσφολιπιδίων, ενώ το υπόλοιπο 10% από τριγλυκερίδια και χοληστερόλη (48).

Η φωσφατιδυλοχολίνη, αποτελεί περίπου το 80% των ολικών φωσφολιπιδίων του επιφανειοδραστικού παράγοντα και σε μεγάλο ποσοστό ανευρίσκεται πλήρως κορεσμένη. Η κορεσμένη φωσφατιδυλοχολίνη συνήθως ανιχνεύεται ως διπαλμιτολ-φωσφατιδυλοχολίνη [DPPC] και είναι το συστατικό που είναι κυρίως υπεύθυνο για τη μείωση της κυψελιδικής επιφανειακής τάσης (46). Το υδρόφιλο τμήμα της (χολίνη) συνδυάζεται με την υγρή φάση του κυψελιδικού περιεχομένου, ενώ το υδρόφοβο (παλμιτικό οξύ) με τον αέρα (48).

4) ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ

Το πρωτεϊνικό τμήμα του επιφανειοδραστικού παράγοντα αποτελεί περίπου το 10% του ολικού του βάρους. Τέσσερις ειδικές πρωτεΐνες (Surfactant Proteins) έχουν ταυτοποιηθεί και χαρακτηρίζονται ως πρωτεΐνες του επιφανειοδραστικού παράγοντα A (SPA), B (SPB), C (SPC), και D (SPD). Διαιρούνται σε υδρόφοβες (SP-B και SP-C) οι οποίες μειώνουν την κυψελιδική επιφανειακή τάση και σε υδρόφιλες (SP-A και SP-D) οι οποίες μεσολαβούν πρωτίστως στην φυσική

άμυνα του πνεύμονα (47). Οι βιοφυσικές καθώς και οι ανοσολογικές ιδιότητες του πνευμονικού επιφανειοδραστικού παράγοντα συνοψίζονται στον Πίνακα 2 (47).

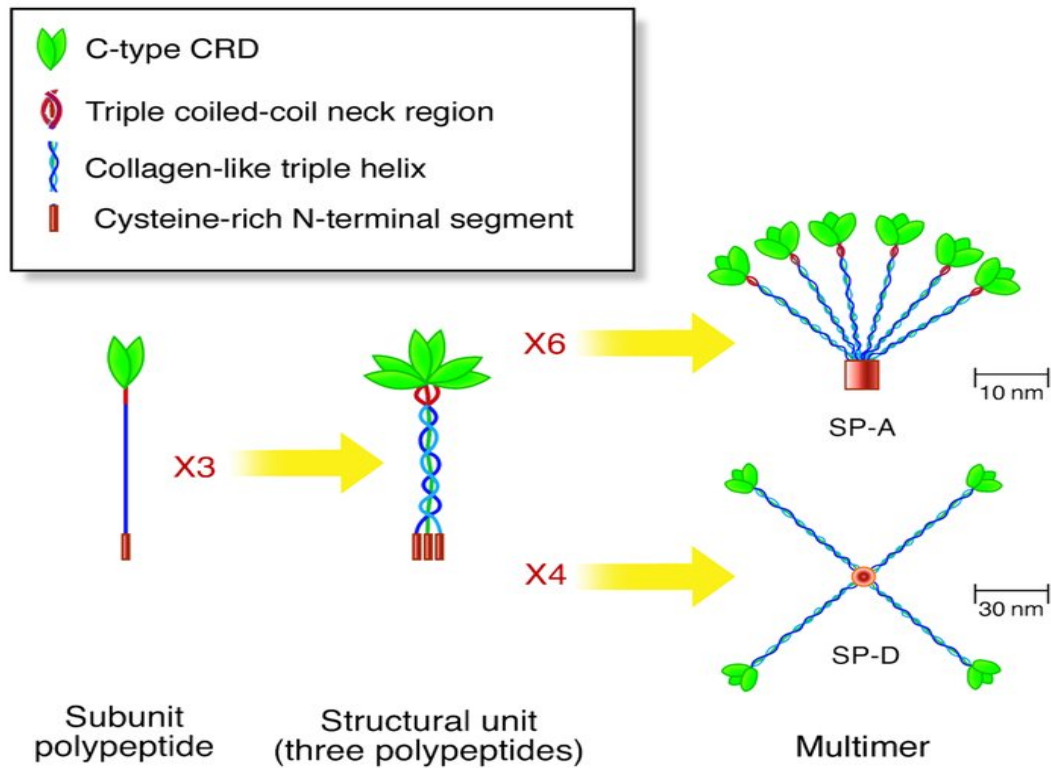
Πίνακας 1. Βιοφυσικές και Ανοσολογικές Ιδιότητες του Πνευμονικού Επιφανειοδραστικού Παράγοντα (47).

A) ΒΙΟΦΥΣΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ
<ul style="list-style-type: none"> • Αποτροπή της κατάρρευσης των κυψελίδων κατά τη διάρκεια της εκπνοής • Υποστήριξη της έκπτυξης του πνεύμονα κατά τη διάρκεια της εισπνοής • Πρόληψη πνευμονικού οιδήματος [εξισορρόπηση υδροστατικών δυνάμεων] • Σταθεροποίηση και διατήρηση της δομής των μικρών αεραγωγών • Βελτίωση της βλεννοκροσσωτής κάθαρσης • Μεταφορά σωματίδια < 6 μm στο υπόστρωμα (hyrophase) του υγρού επένδυσης του επιθηλίου • Διευκόλυνση της μεταφοράς των μορίων και των κυτταρικών συντριμμίων από τις κυψελίδες στους μεγάλους αεραγωγούς με τη μείωση της επιφανειακής τάσης κατά τη διάρκεια του τέλους της εκπνοής (Εικόνα 3)
B) ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΗ ΒΙΟΦΥΣΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ
<ul style="list-style-type: none"> • Καταστολή του πολλαπλασιασμού και της παραγωγής των ανοσοσφαιρινών και της κυτταροτοξικότητας των λεμφοκυττάρων, διαμέσου των φωσφολιπιδίων. • Καταστολή της απελευθέρωσης κυτταροκινών (TNF, IL-1, IL-6) από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα. • Ρύθμιση της φαγοκυττάρωσης, του χημειοτακτισμού και της οξειδωτικής δράσης των μακροφάγων [SP-A και SP-D]. • Ουδετεροποίηση των ενδογενών μεσολαβητών (π.χ. ελεύθερες ρίζες) • Επαγωγή και υποβοήθηση της φαγοκυττάρωσης διαφόρων μικροοργανισμών διαμέσου των ειδικών πρωτεϊνών SP-A και SP-D (Εικόνα 3). • Σύνδεση και αδρανοποίηση των βακτηριδιακών τοξινών διαμέσου των ειδικών πρωτεϊνών SP-A και SP-D (Εικόνα 3).

5) Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ SP-A ΤΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ

Η πρωτεΐνη του επιφανειοδραστικού παράγοντα A (SP-A) είναι η αφθονότερη του επιφανειοδραστικού παράγοντα στον κυψελιδικό χώρο. In vivo βρίσκεται ως μια ομάδα ισοτύπων με μοριακό βάρος που κυμαίνεται από 26-38 kDa στην αναχθείσα μορφή, που εξαρτάται από την έκταση των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Η πρωτεΐνη SP-A φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό της σωληναριακής μυελίνης, μιας μεταβατικής μορφής επιφανειοδραστικού παράγοντα που βρίσκεται αμέσως μετά την κυψελιδική έκκριση. Μετά την κυψελιδική έκκριση, η SP-A βρίσκεται κυρίως ως ένα εξαμερές με τριμερείς υπομονάδες πολυπεπτιδικών αλύσεων, οι οποίες σχηματίζουν έτσι μια δεκαοχταμερή δομή που μοιάζει με «μπουκέτο λουλουδιών» (Εικ.8) Από την άλλη πλευρά, η σημασία της SP-A για την επιφανειακή δραστικότητα του επιφανειοδραστικού παράγοντα φαίνεται μικρή και αποτελεί ακόμη αντικείμενο διχογνωμίας. Οι ανοσορυθμιστικές ιδιότητες της πρωτεΐνης SP-A συνοψίζονται στον πίνακα 3. Μια άλλη λειτουργία της SP-A είναι η διατήρηση της ομοιοστασίας μεταξύ ενδοκυττάριας και εξωκυττάριας δεξαμενής του επιφανειοδραστικού παράγοντα. In vitro, η SP-A αναστέλλει την έκκριση της φωσφατιδυλοχολίνης από καλλιέργειες επιθηλιακών κυττάρων τύπου II με ανάδρομη αναστολή. Επίσης, αυξάνει την πρόσληψη λιπιδίων του

επιφανειοδραστικού παράγοντα κύτταρα τύπου II. Αυτές οι δράσεις διαμεσολαβούνται από ένα υποδοχέα της SP-A στα κύτταρα τύπου II (44).



Εικ. 8 Οι πρωτεΐνες SP-A και SP-D είναι μέλη της οικογένειας των κολλεκτινών. Διακρίνονται από τις άμινο (N)-τελικές- collagen like-περιοχές τους και από την περιοχή «C-type recognition domain (CRD)» η οποία είναι εκείνη που αναγνωρίζει και «δένεται» με τους υδρογονάνθρακες στην επιφάνεια των παθογόνων μικροοργανισμών. Η SP-A αποτελείται από έξι δομικές μονάδες οι οποίες συνδέονται σε μορφή «μπουκέτου λουλουδιού». Η SP-D αποτελείται από τέσσερις δομικές μονάδες οι οποίες συνδέονται σε μορφή «X».

Πίνακας 3. Λειτουργίες των ειδικών πρωτεϊνών του επιφανειοδραστικού παράγοντα SP-A και SP-D (52).

Προτεινόμενες Λειτουργίες	Εμπλεκόμενοι Μηχανισμοί	Βιβλιογραφικές Αναφορές
Ομοιόσταση του Surfactant και βιοφυσικές δραστηριότητες (για την SP -A)	<ul style="list-style-type: none"> • Αναστολή έκκρισης του surfactant από τα πνευμονοκύτταρα II • Αύξηση λήψης DPPC από τα πνευμονοκύτταρα II και συνεπώς ενσωμάτωση στα πεταλοειδή σωμάτια • Αύξηση της προσρόφησης των φωσφολιπιδίων στην κοινή επιφάνεια αέρα-υγρού και βελτίωση της επιφανειακής τάσης του surfactant • Πρόληψη της έκκρισης πρωτεϊνών σε πνευμονικό οίδημα • Σχηματισμός σωληναριακής μυελίνης και συσσωματωμάτων surfactant 	Haagsman and van Golde (1991) Wright and Dobbs (1991) Weaver and Whitsett (1991) Kuroki and Akino (1991) Childs et al. (1992) Ogasawara et al.(1992)
Αντι-ιικές Ιδιότητες	<ul style="list-style-type: none"> • Αδρανοποίηση και συγκόλληση των ιών • Επαγωγή της φαγοκυττάρωσης από τα μακροφάγα • Επαγωγή της ουδετεροφιλικής υπεροξειδωτικής ρήξης • Ουδετεροποίηση της καταστολής από ιούς ουδετεροφιλικής υπεροξειδωτικής ρήξης. 	Hartshorn et al. (1994) Hartshorn et al. (1994) Hartshorn et al. (1996) Hartshorn et al. (1996, 1997)
Αντι- βακτηριδιακές και αντι-μυκητιασικές ιδιότητες	<ul style="list-style-type: none"> • Συγκόλληση • Αύξηση της φαγοκυττάρωσης και της εξόντωσης τους από τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα • Αύξηση της παραγωγής νιτρικών παραγώγων και υπεροξειδωτικών αντιδράσεων • Αντίσταση στην είσοδο των μικροβίων και των ιών σε μη-φαγοκυτταρικά κύτταρα 	Kishore and Reid (2001) ' Wright (2005)
Άμεση καταστολή της ανάπτυξης των	<ul style="list-style-type: none"> • Αύξηση της διαπερατότητας της βακτηριδιακής μεμβράνης και 	Wu et al. (2003) Wang et al. (1996)

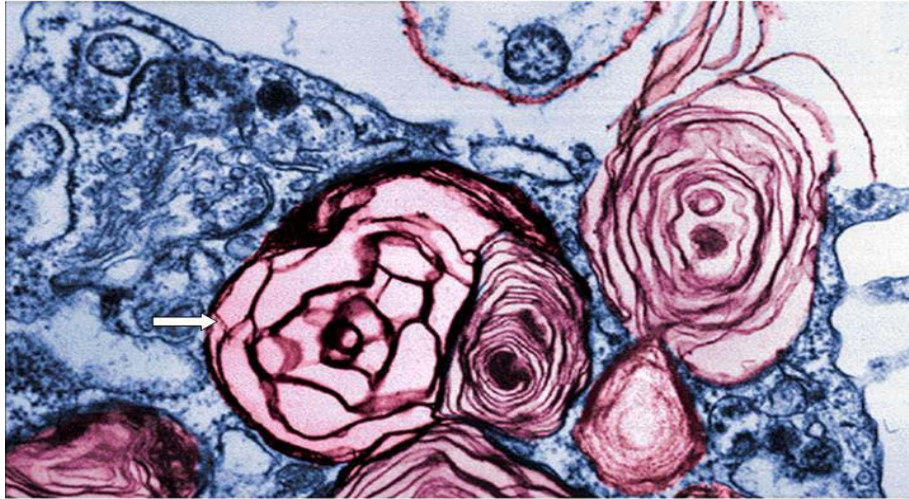
μικροβίων	<p>πρόκληση ρήξης</p> <ul style="list-style-type: none"> • Επιβράδυνση του χρόνου ανάπτυξης των μυκήτων 	Madan et al. (1997b)
Μείωση της Βρογχικής Υπεραντιδραστικότητας και καταστολή της αντίδρασης μετά από έκθεση σε αλλεργιογόνα	<ul style="list-style-type: none"> • Αναγνώριση των γλυκοπρωτεϊνών των αλλεργιογόνων • Καταστολή της έκλυσης ισταμίνης από τα βασεόφιλα και τα μαστοκύτταρα • Καταστολή του πολλαπλασιασμού των Β και Τ λεμφοκυττάρων • Μετατροπή της πόλωσης των T-helper λεμφοκυττάρων • Ρύθμιση της ωρίμανσης και της παρουσίασης του αντιγόνου από τα δενδριτικά κύτταρα 	Wang et al. (1996) Madan et al. (1997b) Wang et al. (1998) Madan et al. (1997b) Wang et al. (1998) Madan et al. (2001) Singh et al. (2003) Brinker et al. (2001, 2003)
Πόλωση των T-helper λεμφοκυττάρων	<ul style="list-style-type: none"> • Καταστολή των Th2 κυττάρων και των κυτταροκινών τους • Αύξηση των Th2 κυτταροκινών • Μετατροπή της επιφανειακής έκφρασης του TLR4 	Madan et al. (2001) Singh et al. (2003) Madan et al. (2001) Singh et al. (2003) Schaub et al. (2004)
Κάθαρση των αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων	<ul style="list-style-type: none"> • Αύξηση της φαγοκυττάρωσης από τα μακροφάγα και τα πολυμορφοπύρρηνα • Επαγωγή της έκκρισης της αντιφλεγμονώδους TGF-β1 από τα κυψελιδικά μακροφάγα 	Schagat et al. (2001) Clark et al. (2002) Reid and Wright (2002)
Έλεγχος της πνευμονικής φλεγμονής	<ul style="list-style-type: none"> • Καταστολή της παραγωγής κυτταροκινών σε απάντηση του LPS στα <i>buffy-coat</i> κύτταρα • Αύξηση της παραγωγής TNF-A και CSF από τα κυψελιδικά μακροφάγα • Αύξηση της παραγωγής των TNF- α, IL-1α, IL-1β, IL-6, INF- γ, από τα ανθρώπινα PBMCs • Κάθαρση των ενδοτοξινών και ρύθμιση της μεσολαβούμενης από το LPS φλεγμονή • Χημειοταξία : SP-D και SP-A • Καταστολή της κλασσικής αντίδρασης του συμπληρώματος από την SP-A, με τη σύνδεσή 	Hickling et al. (1998) Song and Phelps (2000) Borron et al. (1998) Wright (2005) Quintero et al. (2002) Madan et al. (1997a) Watford et al. (2001)

	της με το C1q	
Φαγοκυττάρωση	<ul style="list-style-type: none"> • Η SP-A αυξάνει το ενδοκυττάριο Ca^{+2} και τη συγκέντρωση της τριφωσφορικής ινοσιτόλης στα κυψελιδικά μακροφάγα. Η ινοσιτόλη είναι απαραίτητη για τη μεσολαβούμενη από την SP-A, φαγοκυττάρωση 	Ohmer-Schrock et al. (1995)
Καταστολή της υπεροξειδωσής των λιπιδίων	<ul style="list-style-type: none"> • Προστασία των φωσfolιπιδίων του surfactant και των μακροφάγων από το οξειδωτικό stress εξαιτίας του ατμοσφαιρικού ή το συμπληρωματικού οξυγόνου, τους ατμοσφαιρικούς ρύπους, και τη φλεγμονή. 	Bridges et al. (2000)
Εξω-πνευμονική μη ειδική ανοσία	<ul style="list-style-type: none"> • Πιθανή προστασία ενάντια στην ενδομήτρια μόλυνση και τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις • Αύξηση της φαγοκυττάρωσης των παθογόνων χλαμυδίων στα αναπαραγωγικά όργανα • Παρεμπόδιση της εισβολής των κερατοειδών επιθηλιακών κυττάρων από την <i>Pseudomonas aeruginosa</i> στα δάκρυα • Επαγωγή του τοκετού στα ποντίκια από την SP-A 	Kishore et al. (2005) Oberley et al. (2004) Ni et al. (2005) Condon et al. (2004)
Αναδιαμόρφωση ιστού	<ul style="list-style-type: none"> • Η Decorin, είναι μία άφθονη πρωτεογλυκάνη στις εμβρυϊκές μεμβράνες και στο μητρικό τράχηλο που η συγκέντρωση συσχετίζεται αντιστρόφως με την SP-D. Η αλληλεπίδραση SP-D - Decorin φαίνεται να εμπλέκεται στην ενδομήτρια αναδιαμόρφωση ιστού κατά τη διάρκεια του τοκετού, και πιθανώς στον έλεγχο της φλεγμονής κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. 	Nadesalingam et al. (2003) Groeneveld et al. (2005)

6) ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ

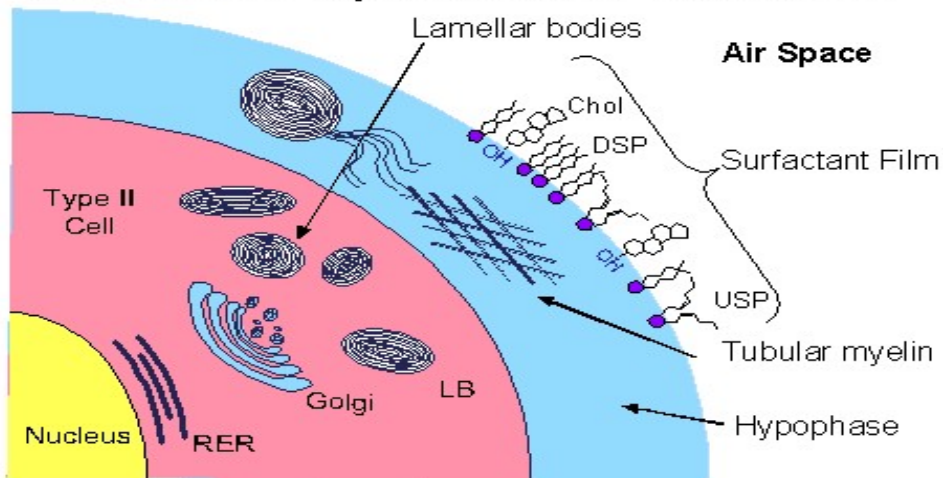
Ο τόπος της σύνθεσης και της έκκρισης του επιφανειοδραστικού παράγοντα είναι το πνευμονοκύτταρο τύπου II, το οποίο καλύπτει λιγότερο από το 10% της επιφάνειας των κυψελίδων, αλλά αποτελεί περίπου το 15% του ολικού αριθμού των κυττάρων που βρίσκονται στον πνεύμονα ενήλικου (48). Επιπλέον, mRNA και πρωτεΐνες του επιφανειοδραστικού παράγοντα σε μικρότερες ποσότητες, έχουν εντοπιστεί και σε άλλα όργανα .

Τα πνευμονοκύτταρα τύπου II συνθέτουν και τις τέσσερις πρωτεΐνες καθώς και τα λιπίδια του επιφανειοδραστικού παράγοντα, και σχηματίζουν τα αποκαλούμενα πεταλοειδή σωμάτια (lamellar bodies) στο κυταρόπλασμα (εικόνα9). Τα ώριμα πεταλοειδή σωμάτια μεταφέρονται στον κυψελιδικό χώρο με μεροκρινή έκκριση, όπου και μετατρέπονται σε σωληναριακή μυελίνη (δίκτυο σωληναρίων υψηλής οργάνωσης). Μετά από το κατάλληλο ερέθισμα όπως η γέννηση ή η βαθιά αναπνοή (49,50) το περιεχόμενο των πεταλοειδών σωματίων εκκρίνεται στο λεπτό υγρό υπόστρωμα που καλύπτει το κυψελιδικό επιθήλιο (50,51), (Εικόνα 10). Σε μια διαδικασία που διευκολύνεται από την πρωτεΐνη SP-B, δημιουργείται ένα επιφανειακό κυψελιδικό στρώμα, εμπλουτισμένο με φωσφατιδυλοχολίνη το οποίο είναι σε θέση να μειώσει την επιφανειακή τάση επιτρέποντας την έκπτυξη του πνεύμονα (48).



Εικ. 9 Απέκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα από το ενδοπλασματικό δίκτυο του πνευμονοκυττάρου τύπου II, υπό σχηματισμό πεταλοειδών σωματιδίων (lamellar bodies). Εικόνα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου ψηφιακή επεξεργασία με ψευδοχρωματισμό, X 20000

Surfactant Synthesis & Secretion



Εικ. 10: Τα πνευμονοκύτταρα τύπου II συνθέτουν και τις τέσσερις πρωτεΐνες καθώς και τα λιπίδια του επιφανειοδραστικού παράγοντα, τα οποία σχηματίζουν τα αποκαλούμενα πεταλοειδή σωματίδια (lamellar bodies) στο κυταρόπλασμα. Τα ώριμα πεταλοειδή σωματίδια μεταφέρονται στον κυψελιδικό χώρο με μεροκρινή έκκριση, όπου και μετατρέπονται σε σωληναριακή μυελίνη (δίκτυο σωληναρίων υψηλής οργάνωσης). Μετά από το κατάλληλο ερέθισμα όπως η γέννηση ή η βαθιά αναπνοή (5, 6) το περιεχόμενο των πεταλοειδών σωματιδίων εκκρίνεται στο λεπτό υγρό υπόστρωμα που καλύπτει το κυψελιδικό επιθήλιο (50,51).

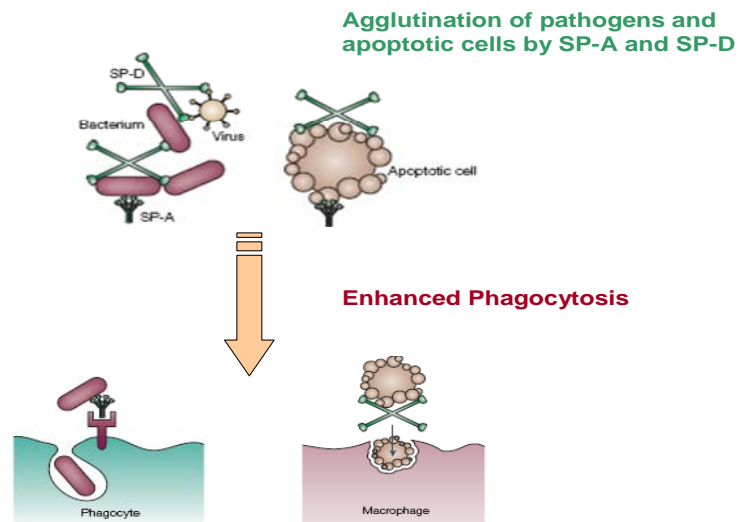
Οι ειδικές πρωτεΐνες SP-A, SP- B και SP-D του επιφανειοδραστικού παράγοντα συντίθενται επίσης από τα βρογχικά κύτταρα, τα κύτταρα Clara , και από τα υποβλεννογόνια κύτταρα. Δεν είναι γνωστό, ωστόσο, εάν οι λειτουργίες των ειδικών πρωτεϊνών του Surfactant που εκκρίνονται από τα κύτταρα των βρόγχων είναι παρόμοιες με εκείνες των πρωτεϊνών που εκκρίνονται από τα κυψελιδικά κύτταρα. Η έλλειψη λιπιδίων στα εκκριτικά προϊόντα των βρογχικών κυττάρων δείχνουν ότι οι πρωτεΐνες αυτές δεν είναι λειτουργικά αποτελεσματικές στη μείωση της επιφανειακής τάσης του πνεύμονα (48).

Ειδικές πρωτεΐνες SP-A, SP-B και SP-D του επιφανειοδραστικού παράγοντα έχουν εντοπιστεί και σε μη-πνευμονικές περιοχές, συμπεριλαμβανομένης της τραχείας, του εγκεφάλου, των όρχεων, των σιελογόνων αδένων, των δακρυϊκών αδένων, της καρδιάς, του προστάτη, των νεφρών, του παγκρέατος και του θηλυκού ουρογεννητικού συστήματος. Παρόλαυτα, δεν έχει καθοριστεί εάν τα παραπάνω όργανα εκκρίνουν ικανοποιητικές ποσότητες πρωτεΐνης ώστε να είναι και λειτουργικά αποτελεσματικές.(45)

7) ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΜΥΝΑΣ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Η επίδραση του Surfactant στη άμυνα του ξενιστή συνδέεται με τις ειδικές πρωτεΐνες SP-A και SP-D, οι οποίες είναι μέλη της οικογένειας των κολλεκτινών (45). Οι κολλεκτίνες συνεισφέρουν στην ομοιόσταση του επιφανειοδραστικού παράγοντα, στην άμυνα του πνεύμονα

(κατά ιών, βακτηρίων, μυκήτων), στην καταστολή της αλλεργικής αντίδρασης και στην λύση της φλεγμονής. Διακρίνονται από τις αμινο (N)-τελικές- collagen like-περιοχές τους οι οποίες έχουν έναν τριπλό έλικα επανάληψης του τριμερούς Gly-X-Y, (όπου X οποιοδήποτε αμινοξύ, και όπου Y μια υδροξυπρολίνη). Η αμινο (N)-τελική περιοχή παρέχει δομική σταθερότητα στην πρωτεΐνη. Οι τελικές καρβοξυλικές περιοχές των κολλεκτινών περιέχουν μία εξαρτώμενη από ιόντα ασβεστίου περιοχή «C-type lectin domain», (Εικόνα 8), (45,48). Οι συγκεκριμένες περιοχές μεσολαβούν στην αλληλεπίδραση των κολλεκτινών με ένα ευρύ φάσμα παθογόνων (Εικόνα 11), (45,52).



Εικ. 11: Η SP-A και η SP-D προσδένονται στα βακτήρια, στους ιούς, στα αλλεργιογόνα και στα αποπτωτικά κύτταρα ενισχύοντας την διαδικασία της απομάκρυνσης και φαγοκυττάρωσης τους (τροποποίηση από την βιβλιογραφική αναφορά 45).

Η πρωτεΐνη D του επιφανειοδραστικού παράγοντα (SP-D) είναι μια κολλαγονώδης γλυκοπρωτεΐνη με παρόμοιες δομικές και βιοφυσικές ομοιότητες με τη SP-A αλλά πιθανώς είναι

ακόμη περισσότερο διαλυτή στο υδαρές κυψελιδικό μικροπεριβάλλον. Όπως συμβαίνει και με την SP-A, η πρωτεΐνη SP-D φαίνεται να παίζει κρίσιμο ρόλο στην καταστολή της ενεργοποίησης των κυψελιδικών μακροφάγων (48, 52).

Οι λειτουργίες των ειδικών πρωτεϊνών SP-A και SP-D του επιφανειοδραστικού παράγοντα στην άμυνα του πνεύμονα συνοψίζονται στον Πίνακα 3 (52).

8) ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΚΑΙ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ.

Ο ρόλος του Surfactant εκτιμήθηκε αρχικά στα νήπια με σύνδρομο Αναπνευστικής Δυσχέρειας (Respiratory Distress Syndrome) και νόσο υαλοειδών μεμβρανών (Hyaline Membrane Disease), καταστάσεις που σήμερα συνήθως αντιμετωπίζονται με θεραπεία υποκατάστασης του Surfactant. Αλλοιωμένη βιοχημική σύσταση του Surfactant έχει περιγραφεί στα Αποφρακτικά Νοσήματα (Άσθμα, Βρογχιολίτιδα, Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια, μετά από μεταμόσχευση πνευμόνων), στα μολυσματικά και διαπυητικά νοσήματα (Κυστική Ίνωση, Πνευμονία, Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσοανεπάρκειας), στο Σύνδρομο Αναπνευστικής Δυσχέρειας των Ενηλίκων (ARDS), στο Πνευμονικό Οίδημα, στα Διάμεσα Νοσήματα (Σαρκοείδωση, Ιδιοπαθής Πνευμονική Ίνωση, και Πνευμονίτιδα εξ' Υπερευαισθησίας), στην Πνευμονική Κυψελιδική Πρωτεΐνωση, και στους καπνιστές (47,53).

9) ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΣΤΟ ΚΑΠΝΙΣΜΑ ΚΑΙ ΣΤΗ ΧΡΟΝΙΑ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑ

Οι Wirtz και Schmidt (55) απέδειξαν την οξεία καταστολή της παραγωγής της φωσφατιδυλοχολίνης από τα πνευμονοκύτταρα τύπου II στους αρουραίους, μετά από την έκθεση τους σε καπνό τσιγάρων (55).

Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι η περιεκτικότητα των ειδικών πρωτεϊνών SP-A και SP-D στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα καπνιστών είναι σημαντικά μειωμένη σε σύγκριση με τους μη καπνιστές. Οι παραπάνω αλλαγές στις υδρόφιλες πρωτεΐνες του Surfactant στους καπνιστές μπορούν να επιδράσουν σημαντικά το αμυντικό σύστημα των περιφερικών αεραγωγών του πνεύμονα και μπορούν έτσι να συμβάλλουν στην παθοφυσιολογία της Χρόνιας Αποφρακτικής Πνευμονοπάθειας (56). Οι μεταβολές στον επιφανειοδραστικό παράγοντα μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά την επιφανειακή τάση στην κυψελίδα, οδηγώντας στην αύξηση της πίεσης στο κυψελιδικό τοίχωμα, και έτσι να συμβάλουν στη ρήξη του κυψελιδικού τοιχώματος και στην ανάπτυξη του εμφυσήματος (53).

Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι το χρόνιο κάπνισμα μειώνει τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης SP-D στο επιθηλιακό υγρό φιλμ του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος, ανεξάρτητα από την παρουσία εμφυσήματος. Ενώ το γήρας, μόνο του, ή σε συνδυασμό με το χρόνιο κάπνισμα ή και το

εμφύσημα μπορούν να οδηγήσουν σε μείωση της πρωτεΐνης SP-A (57). Τα αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης υποστηρίζουν ότι η επίκτητη ανεπάρκεια της πρωτεΐνης SP-D λόγω του καπνίσματος τσιγάρων μπορεί να συμβάλει στην ανάπτυξη εμφυσήματος στους ανθρώπους, και οι ερευνητές προτείνουν ότι η εξωγενής χορήγηση της ειδικής πρωτεΐνης SP-D μπορεί να έχει ευεργετικά αποτελέσματα (57).

10) ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ

Ο γονιδιακός τόπος της ειδικής πρωτεΐνης SP-A του ανθρώπου βρίσκεται στο χρωμόσωμα 10q22-23 και αποτελείται από δύο λειτουργικά γονίδια, το *SP-A1* και το *SP-A2*, και ένα ψευδογονίδιο. Διάφορα αλληλόμορφα έχουν χαρακτηριστεί για κάθε λειτουργικό γονίδιο της SP-A (58). Το γονίδιο της ειδικής πρωτεΐνης SP-D συνδέεται με το γονιδιακό τόπο της SP-A και βρίσκεται εγγύς του κεντρομερούς. Διάφοροι πολυμορφισμοί έχουν περιγραφεί για την SP-D (58, 59). Ο τόπος της ειδικής πρωτεΐνης SP-B βρίσκεται στο χρωμόσωμα 2p12-p11.2. Διάφοροι πολυμορφισμοί έχουν χαρακτηριστεί για την SP-B και μερικοί από αυτούς έχουν συνδεθεί με ασθένειες. Επιπλέον, διάφοροι μικροδορυφορικοί δείκτες (microsatellite markers) που πλαισιώνουν το γονιδιακό τόπο της SP-B έχουν χαρακτηριστεί (59).

Πολλές μελέτες μέχρι τώρα προτείνουν, ότι πιθανές γενετικές αλλαγές στις πρωτεΐνες του επιφανειοδραστικού παράγοντα θα μπορούσαν να σχετίζονται με την ανάπτυξη υποξείας πνευμονικής νόσου στον ενήλικα. Γονιδιακοί

πολυμορφισμοί του Surfactant είναι πιθανόν να εμπλέκονται στην παθογένεια διάφορων ασθενειών όπως π.χ. στη Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια. Μια πρόσφατη μελέτη σε ασθενείς με Χ.Α.Π. και καπνιστές χωρίς Χ.Α.Π. αποκάλυψε ότι ορισμένα αλληλόμορφα της ειδικής πρωτεΐνης SP-A σχετίζονται με αυξημένη ευπάθεια στη Χ.Α.Π. (60). Μελέτες συσχετίσεως αλληλόμορφων (*allele associations studies*) προτείνουν τη δυνατότητα να χαρακτηρίσουν σε γενετικό επίπεδο υποομάδες της Χ.Α.Π. ή να προσδιορίσουν καπνιστές με αυξημένη ή μειωμένη ευπάθεια για την ανάπτυξη της νόσου (60). Επιπλέον, θα μπορούσαν να συνδράμουν στην κατανόηση της παθογένειας της Χ.Α.Π. και πιθανά να απαντήσουν ερωτήματα όπως γιατί, παραδείγματος χάριν, μόνο ένα μέρος των καπνιστών θα αναπτύξει τελικά Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (61,62). Τέλος, πρόσφατες μελέτες, από το εργαστήριο μας ανέδειξαν Αστάθεια του Μικροδορυφορικού DNA σε δείκτη παρακείμενο της πρωτεΐνης SP-A, μόνο σε ασθενείς με Χ.Α.Π., και όχι σε «υγιείς» καπνιστές ή σε ασθματικούς ασθενείς, υποδεικνύοντας πιθανή δυσλειτουργία στην έκφραση της SP-A στους ασθενείς με Χ.Α.Π. (63).

11) ΣΥΝΟΨΗ

Η κύρια λειτουργία του επιφανειοδραστικού παράγοντα είναι η διατήρηση χαμηλής επιφανειακής τάσης στο φραγμό αέρος υγρού (κυψελιδο-αρτηριακή διεπαφή) και η πρόληψη

της κυψελιδικής κατάρρευσης κατά την εκπνοή (46). Πρόσφατα έχει αποκαλυφθεί ο ρόλος του επιφανειοδραστικού παράγοντα στους μηχανισμούς άμυνας και στην τοπική ανοσορύθμιση του πνεύμονα (47,48).

Το πρωτεϊνικό τμήμα του επιφανειοδραστικού παράγοντα αποτελεί περίπου το 10% του ολικού του βάρους. Τέσσερις ειδικές πρωτεΐνες (Surfactant Proteins) έχουν ταυτοποιηθεί και χαρακτηρίζονται ως πρωτεΐνες του επιφανειοδραστικού παράγοντα A (SPA), B (SPB), C (SPC), και D (SPD). Διαιρούνται σε υδρόφοβες (SP-B και SP-C) οι οποίες μειώνουν την κυψελιδική επιφανειακή τάση και σε υδρόφιλες (SP-A και SP-D) οι οποίες μεσολαβούν πρωτίστως στην φυσική άμυνα του πνεύμονα (47). Οι πρωτεΐνες SP-A και SP-D είναι μέλη της οικογένειας των κολλεκτινών (45). Οι κολλεκτίνες συνεισφέρουν στην ομοιόσταση του επιφανειοδραστικού παράγοντα, στην άμυνα του πνεύμονα (κατά ιών, βακτηρίων, μυκήτων), στην καταστολή της αλλεργικής αντίδρασης και στην λύση της φλεγμονής.

Ο γονιδιακός τόπος της ειδικής πρωτεΐνης SP-A του ανθρώπου βρίσκεται στο χρωμόσωμα 10q22-23. Πρόσφατες μελέτες, από το εργαστήριο μας ανέδειξαν Αστάθεια του Μικροδορυφορικού DNA σε δείκτη παρακείμενο της πρωτεΐνης SP-A, μόνο σε ασθενείς με Χ.Α.Π., και όχι σε «υγιείς» καπνιστές ή σε ασθματικούς ασθενείς, υποδεικνύοντας πιθανή δυσλειτουργία στην έκφραση της SP-A στους ασθενείς με Χ.Α.Π. (63).

II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο πνευμονικός επιφανειοδραστικός παράγοντας (SP) είναι ένα σύμπλεγμα λιπιδίων και πρωτεϊνών που συνθέτονται κυρίως από τα πνευμονοκύτταρα τύπου II (52). Αρχικά υπήρχε η άποψη ότι οι πρωτεΐνες του επιφανειοδραστικού παράγοντα παίζουν σημαντικό ρόλο μόνο στη βιοφυσική συμπεριφορά του πνεύμονα. Πρόσφατα εδραιώθηκαν οι ανοσορρυθμιστικές ιδιότητες αυτών των πρωτεϊνών που φαίνεται να έχουν σημαντικό ρόλο σε πολλές ασθένειες του πνεύμονα(52).

Αν και ο επιφανειοδραστικός παράγοντας ενδεχομένως συνεισφέρει στην παθογένεια της Χ.Α.Π. , οι μελέτες είναι περιορισμένες πάνω σε αυτό το θέμα (63). Η Χ.Α.Π. είναι μια αργά επιδεινούμενη ασθένεια που χαρακτηρίζεται από μείωση της μέγιστης εκπνευστικής ροής και αργό «άδειασμα» των πνευμόνων, χαρακτηριστικά που δεν είναι πλήρως αναστρέψιμα(64). Το κάπνισμα είναι ο μεγαλύτερος παράγοντας κινδύνου για τη Χ.Α.Π., αλλά μόνο ένα ποσοστό καπνιστών αναπτύσσει σημαντική μείωση ροής, υποδηλώνοντας ότι γενετικοί παράγοντες συνεισφέρουν στην παθογένεια της Χ.Α.Π.(64). Στις μέρες μας είναι ευρέως αποδεκτό ότι η υπερβολική φλεγμονώδη απάντηση σε διάφορους βλαπτικούς παράγοντες όπως το κάπνισμα, συμπεριλαμβάνει μία ποικιλία φλεγμονωδών κυττάρων και

κυτταροκινών. Επιπρόσθετα, η εμμένουσα οξειδωτική καταστροφική διεργασία παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της Χ.Α.Π.. Όλοι αυτοί οι φλεγμονώδεις μεσολαβητές μπορεί να επηρεάζουν τη σύνθεση και την λειτουργία του επιφανειοδραστικού παράγοντα.

Με αυτά τα δεδομένα οι Otto-Verberne και συνεργάτες (65) ερεύνησαν τις προστατευτικές ιδιότητες του επιφανειοδραστικού παράγοντα σε ποντίκια με εμφύσημα προκαλούμενο από τη χορήγηση ελασάσης. Επίσης, άλλες έρευνες έχουν δείξει ότι το κάπνισμα μπορεί να προσβάλλει την ομοιοστασία και τη λειτουργία του επιφανειοδραστικού παράγοντα (55). Ο Honda και οι συνεργάτες του (56) μελέτησαν τα επίπεδα της ανοσορυθμιστικής πρωτεΐνης του επιφανειοδραστικού παράγοντα SP-A και D σε καπνιστές σε σύγκριση με μη-καπνιστές. Τα αποτελέσματά τους έχουν πρόσφατα επιβεβαιωθεί από τους Betsuyaku και τους συνεργάτες του (57) και τον Guo και τους συνεργάτες του (61) οι οποίοι μελέτησαν ασθενείς με Χ.Α.Π. σε σύγκριση με καπνιστές ως ομάδα ελέγχου και αποκάλυψαν ότι ορισμένα αλληλόμορφα της πρωτεΐνης SP-A μπορούν να αυξήσουν την ευπάθεια στη Χ.Α.Π.. Σε μία μόνο μελέτη από τον Anzueto και τους συνεργάτες του (66) έχει αναφερθεί ότι ασθενείς με σταθερή Χ.Α.Π. που έχουν λάβει εισπνεόμενα φωσφολιπίδια τρεις φορές την ημέρα καθημερινά για δύο εβδομάδες είχαν μία μέτρια βελτίωση ροής σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου που έλαβαν φυσιολογικό ορό. Σε μια ανασκόπηση (67) από τον Bernhard και τους συνεργάτες του, προτείνεται μία νέα υπόθεση για να εξηγήσει τις δομικές και λειτουργικές

διαφορές μεταξύ του επιφανειοδραστικού παράγοντα των αεραγωγών και του επιφανειοδραστικού παράγοντα των κυψελίδων. Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας εμπεριέχεται στο υγρό που επαλείφει τους αεραγωγούς αν και οι βρόγχοι δεν υπόκεινται στο ίδιο δυναμικό στρες όπως οι κυψελίδες. Οι συγγραφείς προτείνουν ότι η σύνθεση του ανθρώπινου επιφανειοδραστικού παράγοντα είναι προσαρμόσιμη στις διαφορές της αρχιτεκτονικής των πνευμονικών επιφανειών (κυψελίδων και αεραγωγών) και στις δυναμικές αλλαγές της επιφάνειας κατά τη διάρκεια της αναπνοής (67). Επίσης προτείνουν ότι οι πιθανές διαφορές μεταξύ του κυψελιδικού επιφανειοδραστικού παράγοντα και του επιφανειοδραστικού παράγοντα των αεραγωγών όσο αφορά τη σύνθεση και τη λειτουργικότητα του, μπορεί να έχει μείζων σημασία στην παθογένεια της Χ.Α.Π., προσβάλλοντας και τους αεραγωγούς και το πνευμονικό παρέγχυμα (67). Τα παραπάνω συμπεράσματα είναι σε συμφωνία με την προτεινόμενη «μηχανική» υπόθεση της Χ.Α.Π. (68).

Από την άλλη πλευρά, σε μία πρόσφατη έρευνα του εργαστηρίου μας, ανιχνεύθηκε αστάθεια του μικροδοριφορικού DNA (Microsatellite DNA Instability (MSI)) στον σημαντή G29802 (10q22) παρακείμενο στο γονίδιο της πρωτεΐνης SP-A, μόνο στους ασθενείς με Χ.Α.Π. και όχι στους καπνιστές χωρίς Χ.Α.Π. ή τους ασθματικούς ασθενείς (30) . Ετέθει λοιπόν η υποψία ότι η έκφραση της πρωτεΐνης SP-A ίσως είναι διαφοροποιημένη στους ασθενείς με Χ.Α.Π..

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω που υποστηρίζουν ότι ο επιφανειοδραστικός παράγοντας αλλά

κυρίως η ανοσορυθμιστική πρωτεΐνη SP-A θα μπορούσε να έχει ρόλο στην παθογένεια της ΧΑΠ ερευνήσαμε :1) τα επίπεδα έκφρασης της SP-A (με στύπωμα κατά Western και ανοσοϊστοχημεία) σε πνευμονικό ιστό ασθενών με ΧΑΠ σε σύγκριση με καπνιστές χωρίς ΧΑΠ με παρόμοιο ιστορικό καπνίσματος, και με μη-καπνιστές ως ομάδα ελέγχου, 2) τη σχέση μεταξύ του επιπέδου έκφρασης της SP-A και του βαθμού απόφραξης των αεραγωγών.

B. ΜΕΘΟΔΟΣ

1) ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ

Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δείγματα πνευμονικού ιστού, 60 ατόμων που υποβλήθηκαν σε εκτομή λοβού πνεύμονα λόγω κακοήθους περιφερικού μονήρη όζου. Τα δείγματα πνεύμονα της μελέτης ελήφθησαν από τμήμα φυσιολογικού ιστού όσο το δυνατόν μακρύτερα από τον όζο. Μία εβδομάδα πριν τη λοβεκτομή όλοι οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε σπιρομέτρηση σύμφωνα με τα διεθνή πρωτόκολλα. Οι ασθενείς που είχαν μία σοβαρή παρόξυνση Χ.Α.Π. ή λοίμωξη αναπνευστικού τις τελευταίες 4 εβδομάδες προεγχειρητικά αποκλείστηκαν από τη μελέτη.

Ορίστηκαν 3 ομάδες : 32 καπνιστές με Χ.Α.Π., 18 καπνιστές χωρίς Χ.Α.Π. με φυσιολογική σπιρομέτρηση και 10 μη καπνιστές ως ομάδα ελέγχου. Για τη διάγνωση και την κατάταξη της βαρύτητας της Χ.Α.Π. των ασθενών χρησιμοποιήθηκαν οι οδηγίες της Αμερικάνικης και Ευρωπαϊκής Πνευμονολογικής Εταιρίας [14]. Όλοι οι ασθενείς υπέγραψαν έντυπο συγκατάθεσης και το πρωτόκολλο εγκρίθηκε από την επιτροπή ηθικής και ιατρικής δεοντολογίας του πανεπιστημιακού νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης.

2) ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΙΣΤΟΥ

Τα δείγματα πνευμονικού ιστού όλων των ατόμων ελήφθησαν από τον υποϋπεζωκοτικό παρέγχυμα, τουλάχιστον 5 εκ. μακρύτερα από το μονήρη όζο, από υγιή τμήμα του

πνεύμονα. Όλοι οι ασθενείς κατά τη διάρκεια της λοβεκτομής είχαν λάβει γενική αναισθησία και ήταν υπό ελεγχόμενο μηχανικό αερισμό. Τα δείγματα που προοριζόταν για στύπωμα κατά Western καταψύχθηκαν άμεσα σε υγρό άζωτο και αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι τη χρήση τους. Επιπρόσθετα, για την ανοσοϊστοχημεία τεμαχίδια πνευμονικού ιστού μονιμοποιήθηκαν άμεσα με φορμαλδεΐδη 10% για τουλάχιστον 24 ώρες και στη συνέχεια εγκλείστηκαν σε παραφίνη. Στη συνέχεια κόπηκαν τομές 5 μm πάχους ακολουθώντας τις διαδικασίες ρουτίνας. Για να υπερνικήσουμε την πιθανή διαφορά όγκου των ιστών μεταξύ των διαφορετικών ομάδων κατά την καταμέτρηση των κυττάρων (πνευμονοκύτταρα και κυψελιδικά μακροφάγα), αναλύσαμε την αναλογία των θετικών SP-A πνευμονοκυττάρων τύπου II προς τα συνολικά πνευμονοκύτταρα τύπου II και την αναλογία των θετικών SP-A κυψελιδικών μακροφάγων προς τα συνολικά κυψελιδικά μακροφάγα.

3) ΣΤΥΠΩΜΑ κατά WESTERN (WESTERN BLOT)

Ο προσδιορισμός της SP-A και της ακτίνης με τη μέθοδο Western blot πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τα αναγνωρισμένα πρωτόκολλα. Συγκεκριμένα, τα δείγματα πνευμονικού ιστού όλων των ασθενών ομογενοποιήθηκαν για να εξασφαλισθεί η εξαγωγή της συγκεκριμένης πρωτεΐνης. Προστέθηκε η πρωτεΐνη λυσάτη στο 1/3 του όγκου του

ρυθμιστικού διαλύματος (NuPAGE LDS 4X LDS Sample Buffer, Invitrogen Corp., USA). Κάθε πρωτεϊνικό δείγμα (50ng) διαχωρίστηκε σε 12.5% SDS- γέλη πολυακρυλαμιδίου ακολουθώντας τυποποιημένη μεθοδολογία. Στη συνέχεια οι ζελατίνες (gels) μεταφέρθηκαν με ανοσοφθορισμό σε μία μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

Ο ανοσοπροσδιορισμός της SP-A έγινε με το άμεσο αντίσωμα mouse anti-SP-A (PE-10, Dako, Ltd, Hellas), με χρόνο αποκάλυψης 1min και στη συνέχεια έγινε εμπλουτισμός με τη μέθοδο φωτοχημειοεκπομπής. Σαν πρωτεΐνη αναφοράς μετρήθηκε η ακτίνη ειδικό αντι-ακτίνη αντίσωμα (MAB 1501, Chemicon, Temecula, CA). Η ποσοτικοποίηση των μεμβρανών έγινε με το λογισμικό πρόγραμμα Photoshop Image Analysis Software (CS2, Adobe Systems Inc., CA).

4) ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ

Η ανοσοϊστοχημεία πραγματοποιήθηκε σε τομές πνευμονικού ιστού εμπεδωμένου σε παραφίνη. Αρχικά έγινε αποπαραφίνωση των τομών με ξυλόλη και στη συνέχεια σταδιακή ενυδάτωση με φθίνοντες βαθμούς αιθανόλης (από αιθανόλη 100% σε αιθανόλη 30%). Η ανοσοϊστοχημική χρώση για την SP-A και την TTF-1 έγινε χρησιμοποιώντας το ειδικό σετ Link-Label Super Sensitive IHC Detection Systems (BioGenex, CA, USA) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και χρώση fast-red. Για τον προσδιορισμό της

SP-A χρησιμοποιήθηκε το μονοκλωνικό αντίσωμα Mouse Anti-Human SP-A, Clone PE 10 antibody (DAKO Ltd, Hellas) σε αραιώση 1:50 και η επώαση έγινε σε θερμοκρασία δωματίου για μία ώρα. Το μονοκλωνικό αντίσωμα TTF-1, ως ειδικός δείκτης των πνευμονοκυττάρων, (anti-Thyroid Transcription Factor 1, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe) χρησιμοποιήθηκε σε επόμενες εν σειρά τομές για την καταμέτρηση των συνολικών πνευμονοκυττάρων τύπου II και των θετικών για την SP-A πνευμονοκυττάρων τύπου II. Στη συνέχεια έγινε στις τομές αντίθετη χρώση με αιματοξυλίνη του Mayer. Πειράματα αρνητικού ελέγχου για μη ειδικό δέσιμο πραγματοποιήθηκαν χωρίς αντίσωμα, ακολουθώντας την ίδια μεθοδολογία.

5) ΕΚΤΙΜΗΣΗ της ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ

Η καταμέτρηση του συνόλου των πνευμονοκυττάρων τύπου II (κυβοειδή, εν σειρά, κυψελιδικά κύτταρα), των κυψελιδικών μακροφάγων (κύτταρα ακαθόριστα κατανεμημένα στις κυψελίδες με αφρώδη κυτταρόπλασμα και οδοντωτό πυρήνα) και των κυττάρων με θετική έκφραση (κόκκινο χρώμα) για SP-A, πνευμονοκύτταρα τύπου II και κυψελιδικά μακροφάγα, έγινε χρησιμοποιώντας πλέγμα ισαπεχόντων γραμμών (grid , Olympus) με διαστάσεις 10×10 για οπτικό μικροσκόπιο σε μεγέθυνση 40X (manual counting). Δύο παρατηρητές, ειδικοί παθολογοανατόμοι με εξειδίκευση στην παθολογία του πνεύμονα, εξέτασαν τις τομές,

ανεξάρτητα ο ένας από τον άλλο, χωρίς να γνωρίζουν τα κλινικά δεδομένα των ασθενών. Μετρήθηκαν είκοσι μικροσκοπικά πεδία, με σταυροειδή σχηματισμό, κάθε τομής, όλων των ατόμων. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε κύτταρα ανά mm^2 .

6) ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Τα κλινικά χαρακτηριστικά παρουσιάστηκαν ως μέση τιμή \pm SD σταθερή απόκλιση και τα χαρακτηριστικά των κυττάρων ως μέσος όρος εκτός εάν δηλώνονται διαφορετικά. Οι διαφορές μεταξύ των ομάδων των ατόμων εξετάστηκε χρησιμοποιώντας το τεστ Mann-Whitney U για μη φυσιολογικά κατανομημένες μεταβλητές και για τις φυσιολογικές χρησιμοποιήθηκε το τεστ student's t-test για ανεξάρτητες ομάδες. Για τη μελέτη συσχετισμού μεταξύ απόλυτων τιμών ομάδων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος συσχέτισης Pearson's Test r^2 ή Spearman's t-Test Rho ανάλογα με το είδος της μεταβλητής. Το στατιστικό λογισμικό SPSS Version 15 for windows (SPSS In., Chicago IL, USA) χρησιμοποιήθηκε για τη συνολική ανάλυση της μελέτης. Η τιμή $p < 0.05$ θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική.

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1) ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ των ΑΤΟΜΩΝ

Τα ανθρωπομετρικά και σπιρομετρικά χαρακτηριστικά των ατόμων με Χ.Α.Π. και των καπνιστών χωρίς Χ.Α.Π. φαίνονται στον πίνακα 4. Οι δύο ομάδες ατόμων είχαν παρόμοια χαρακτηριστικά όσο αφορά το φύλο (όλοι άνδρες) και το ιστορικό καπνίσματος (pack years). Η μέση ηλικία των ασθενών με Χ.Α.Π. ήταν μεγαλύτερη από τους καπνιστές χωρίς Χ.Α.Π. ($p=0.03$). Όπως ήταν αναμενόμενο, οι καπνιστές με Χ.Α.Π. είχαν σημαντικά μικρότερη τιμή της FEV1 (pred %) και του λόγου FEV1/FVC (%) από τους καπνιστές χωρίς Χ.Α.Π. (table 1). Η μέση ηλικία μη καπνιστών ήταν 55 ± 11 έτη, η FEV1 (% pred) : 101 ± 12 και το πηλίκιο FEV1/FVC (%): 80 ± 4 .

Πίνακας 4 Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά και σπιρομετρικές τιμές των ατόμων της μελέτης.

	Χ.Α.Π.	ΚΑΠΝΙΣΤΕΣ ΧΩΡΙΣ Χ.Α.Π.	ΜΗ ΚΑΠΝΙΣΤΕΣ	*P value
Φύλο (Α/Γ)	32/0	18/0	10/0	
Ηλικία (έτη)	64+6.5*	56.5+10.2*	57.6+16.7	0.03
Κάπνισμα (P-Y)	59+20.4*	49.1+26.7*	Non-smokers	NS
FEV1 (% pred.)	63.6+15.5*	94.7+12.4*	101.2+14	0.0001
FVC (% pred)	79.3+17.6*	91+12.5*	95.8+15	0.02
FEV1/FVC (%)	62.3+6.2*	81.4+4.7*	83.4+2	0.0001

A/Γ: άνδρας/γυναίκα

P-Y: pack years of smoking

FEV1: forced expiratory volume in 1 second

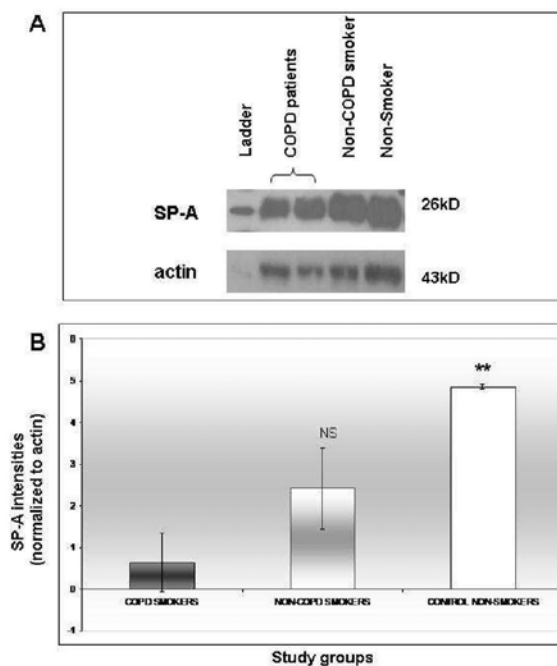
FVC: forced vital capacity

NS: non significant- μη σημαντικό

*p value: σύγκριση μεταξύ ασθενών με Χ.Α.Π. και καπνιστών χωρίς Χ.Α.Π.

2) ΣΤΥΠΩΜΑ κατά WESTERN (WESTERN BLOT)

Τα επίπεδα της πρωτεΐνης SP-A ήταν μειωμένα, αλλά όχι στατιστικά σημαντικά, στους ασθενείς με Χ.Α.Π. (0.6 ± 0.7) σε σύγκριση με τους καπνιστές χωρίς Χ.Α.Π. (2.4 ± 0.9), ($p=0.12$). Τα επίπεδα της πρωτεΐνης SP-A στην ομάδα ελέγχου μη καπνιστών ήταν σημαντικά υψηλότερα (4.8 ± 0.05), ($p<0.05$) σε σύγκριση με τους καπνιστές με ή χωρίς Χ.Α.Π. (Εικ. 12)



Εικ. 12 **A.** Αντιπροσωπευτικά στυπώματα κατά Western της πρωτεΐνης-A του επιφανειοδραστικού παράγοντα (SP-A) και της ακτίνης σε ανθρώπινο πνευμονικό ιστό δύο ασθενών με Χ.Α.Π., ενός καπνιστή χωρίς Χ.Α.Π. και ενός μη-καπνιστή. Ο ανοσοπροσδιορισμός έγινε με το

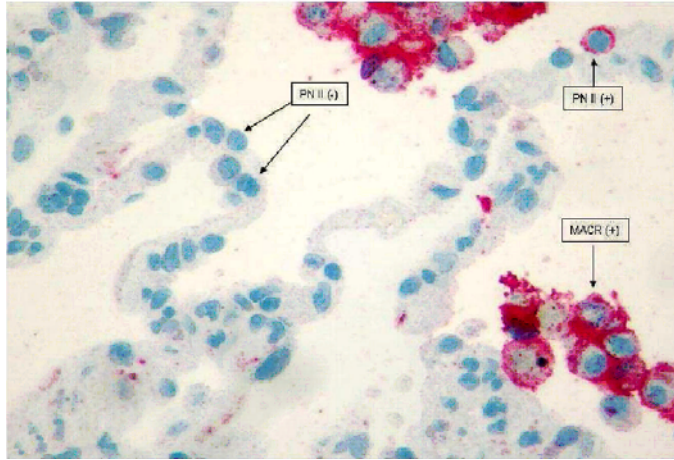
πρωτογενές αντίσωμα ποντικού αντί- SP-A. **B.** Η ποσοτικοποιημένη ανάλυση διορθωμένη προς την ακίνη έδειξε μειωμένα αλλά όχι στατιστικά σημαντικά επίπεδα στους ασθενείς με Χ.Α.Π. σε σύγκριση με τους καπνιστές χωρίς Χ.Α.Π., ενώ στους μη-καπνιστές τα επίπεδα της SP-A ήταν σημαντικά υψηλότερα από τους καπνιστές με ή χωρίς Χ.Α.Π. (NS): μη σημαντικό ($p=0.12$) μεταξύ των ασθενών με Χ.Α.Π. και των καπνιστών χωρίς Χ.Α.Π., ** Σημαντική διαφορά ($p<0.05$) μεταξύ των ασθενών με Χ.Α.Π. και των μη-καπνιστών.

3) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ

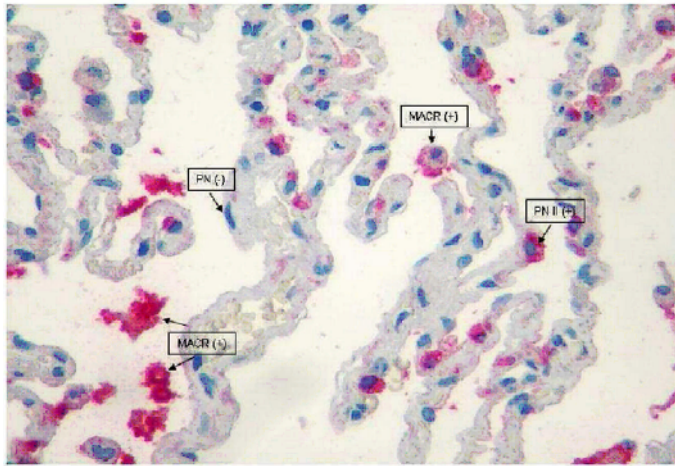
Η εικόνα 13 δείχνει αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοϊστοχημείας του πνευμονικού ιστού σε ασθενείς με Χ.Α.Π. (Εικ.13.A), σε καπνιστές χωρίς Χ.Α.Π. (Εικ. 13.B) και στην ομάδα ελέγχου μη καπνιστών (Εικ. 13Γ). Η εικόνα 14 δείχνει θετική χρώση ανοσοϊστοχημείας για TTF-1 σε πνευμονοκύτταρα τύπου II σε ασθενείς με Χ.Α.Π. (Εικ.14.A) και σε καπνιστές χωρίς Χ.Α.Π. (Εικ. 14.B). Τα κυψελιδικά μακροφάγα ήταν TTF-1 αρνητικά.

Εικ. 13 : Ανοσοϊστοχημεία για την SP-A σε ανθρώπινο πνευμονικό ιστό (μεγέθυνση 400x).

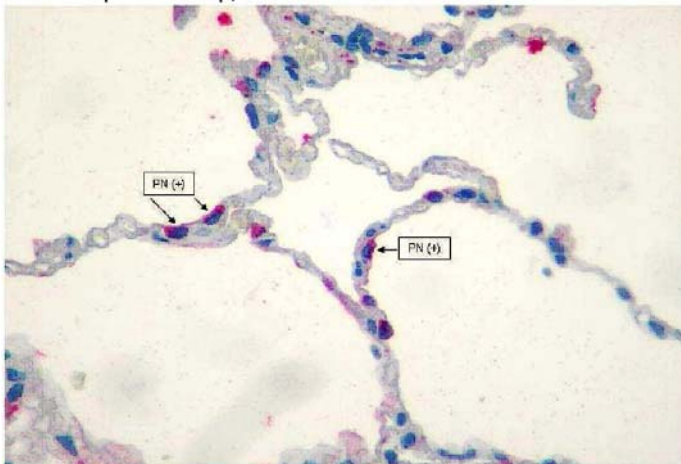
13.A Ασθενής με Χ.Α.Π.



13.B Καπνιστής χωρίς Χ.Α.Π.



13.Γ Μη-καπνιστής

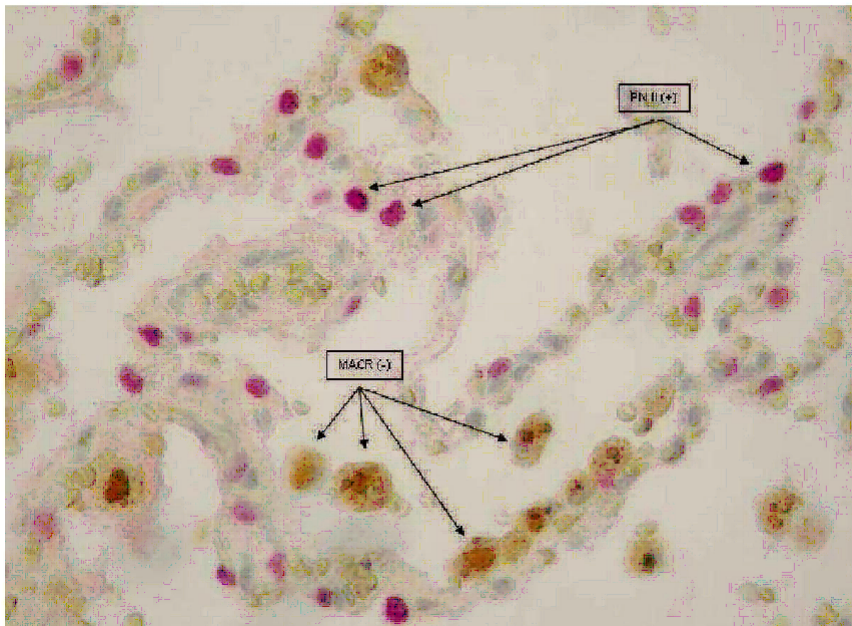


A. Η θετική έκφραση της πρωτεΐνης SP-A αποδίδεται με κόκκινο χρώμα στα πνευμονοκύτταρα τύπου II [PN II (+)] και στα κυψελιδικά μακροφάγα [MACR (+)]. Τα αρνητικά για την SP-A πνευμονοκύτταρα τύπου II [PN II (-)] φαίνονται βαμμένα μπλέ, σε ένα αντιπροσωπευτικό ασθενή με Χ.Α.Π..

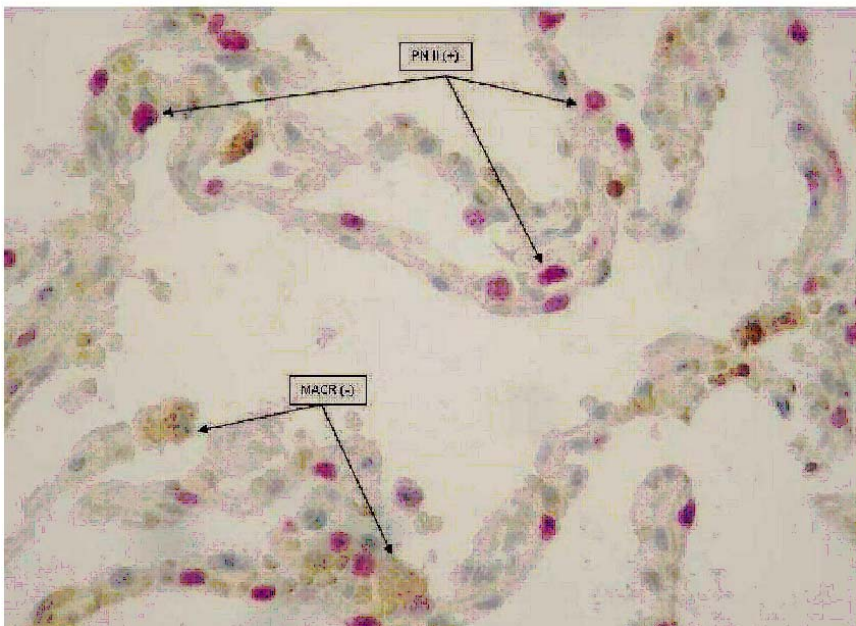
B. Η θετική έκφραση της πρωτεΐνης SP-A αποδίδεται με κόκκινο χρώμα στα πνευμονοκύτταρα τύπου II [PN II (+)] και στα κυψελιδικά μακροφάγα [MACR (+)]. Τα αρνητικά για την SP-A πνευμονοκύτταρα τύπου II [PN II (-)] φαίνονται βαμμένα μπλέ, σε ένα αντιπροσωπευτικό καπνιστή χωρίς Χ.Α.Π.

Γ. Θετικά για την SP-A πνευμονοκύτταρα τύπου II βαμμένα κόκκινα, σε έναν αντιπροσωπευτικό μη-καπνιστή.

14.A Ασθενής με Χ.Α.Π.



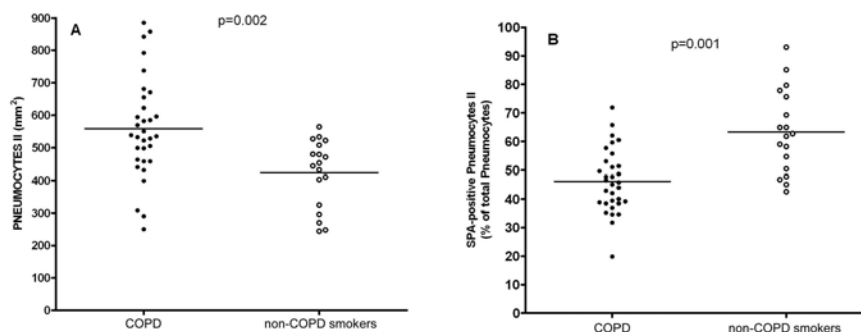
14.B Καπνιστής χωρίς Χ.Α.Π.



Εικ.14: Θετική ανοσοϊστοχημική χρώση για την TTF-1 σε πνευμονοκύτταρα τύπου II ασθενών με Χ.Α.Π.(Α) και καπνιστών χωρίς Χ.Α.Π. (Β). Τα κυψελιδικά μακροφάγα ήταν αρνητικά για την TTF-1 (μεγέθυνση 400x).

3) ΠΝΕΥΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ ΤΥΠΟΥ II και ΕΚΦΡΑΣΗ της SP-A

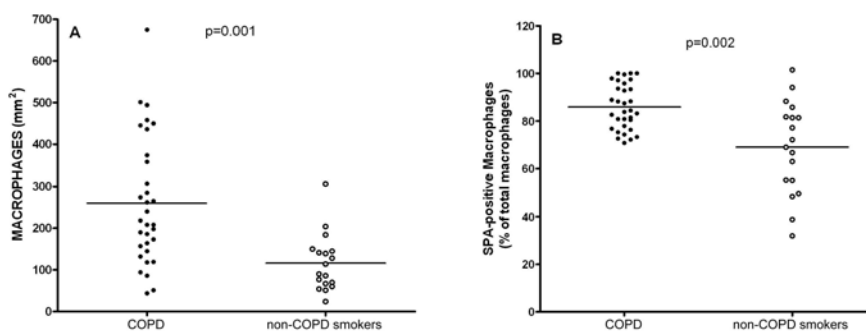
Οι εικόνες 13A και 13B είναι αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοϊστοχημείας για την SP-A σε πνευμονοκύτταρα τύπου II σε τομές πνευμονικού ιστού ασθενών με Χ.Α.Π. και καπνιστών χωρίς Χ.Α.Π. αντίστοιχα. Ο συνολικός αριθμός των πνευμονοκυττάρων τύπου II ήταν υψηλότερος στους ασθενείς με Χ.Α.Π. σε σύγκριση με τους καπνιστές χωρίς Χ.Α.Π. όπως δείχνει το γράφημα 1.A. ($p=0.002$). Ο λόγος των θετικών πνευμονοκυττάρων τύπου II (θετικά πνευμονοκύτταρα τύπου II / συνολικά πνευμονοκύτταρα τύπου II %) ήταν υψηλότερος τους καπνιστές χωρίς Χ.Α.Π. σε σύγκριση με τους ασθενείς Με Χ.Α.Π. ($p = 0.001$), (γραφ. 1.B).



Γράφημα 1. A. Ο συνολικός αριθμός πνευμονοκυττάρων τύπου II/ mm² σε ασθενείς με Χ.Α.Π. και σε καπνιστές χωρίς Χ.Α.Π. **B.** Θετικά πνευμονοκύτταρα τύπου II (εκφρασμένα % των συνολικών πνευμονοκυττάρων τύπου II) σε ασθενείς με Χ.Α.Π. και σε καπνιστές χωρίς Χ.Α.Π. Οι γραμμές αντιπροσωπεύουν τις μέσες τιμές [κλειστοί κύκλοι: ασθενείς με Χ.Α.Π. , ανοικτοί κύκλοι : καπνιστές χωρίς Χ.Α.Π.].

4) ΚΥΨΕΛΙΔΙΚΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ και ΕΚΦΡΑΣΗ της SP-A

Οι εικόνες 13.A και 13.B δείχνουν κυψελιδικά μακροφάγα θετικά για την SP-A σε πνευμονικό ιστό ασθενών με Χ.Α.Π. και καπνιστών χωρίς Χ.Α.Π. αντίστοιχα. Ο συνολικός αριθμός των μακροφάγων ανά mm^2 ήταν σημαντικά υψηλότερος στους ασθενείς με Χ.Α.Π. από τους καπνιστές χωρίς Χ.Α.Π. ($p = 0.001$), (γράφημα 2.A.). Η αναλογία των θετικών κυψελιδικών μακροφάγων (θετικά για την SP-A κυψελιδικά μακροφάγα / συνολικά κυψελιδικά μακροφάγα) ήταν σημαντικά υψηλότερη ($p = 0.002$) στους ασθενείς με Χ.Α.Π. σε σύγκριση με τους καπνιστές χωρίς Χ.Α.Π. όπως δείχνει το γράφημα 2.B. Επιπρόσθετα, η διασπορά των τιμών στους ασθενείς με Χ.Α.Π. ήταν μικρότερη.



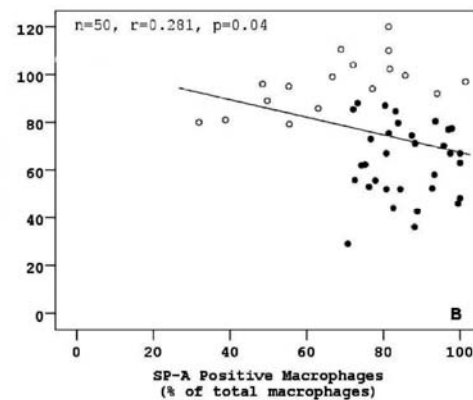
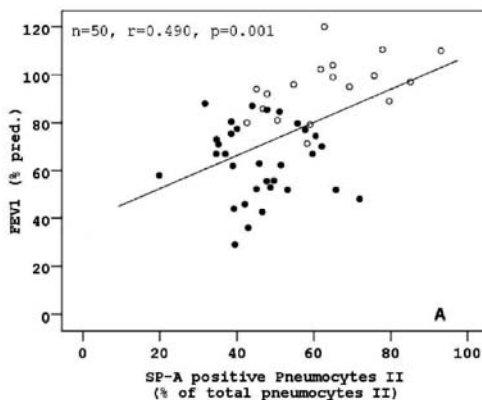
Γράφημα 2 A. Ο συνολικός αριθμός των μακροφάγων ανά mm^2 σε ασθενείς με Χ.Α.Π. και σε καπνιστές χωρίς Χ.Α.Π. **B.** Θετικά για την SP-A κυψελιδικά μακροφάγα (εκφρασμένα % των συνολικών κυψελιδικών μακροφάγων) σε ασθενείς με Χ.Α.Π. και σε καπνιστές χωρίς Χ.Α.Π. Οι γραμμές αντιπροσωπεύουν τις μέσες τιμές [κλειστοί κύκλοι: ασθενείς με Χ.Α.Π. , ανοικτοί κύκλοι : καπνιστές χωρίς Χ.Α.Π.].

5) ΣΧΕΣΗ της ΕΚΦΡΑΣΗ της SP-A στα ΠΝΕΥΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ ΤΥΠΟΥ II με την ΑΠΟΦΡΑΞΗ των ΑΕΡΑΓΩΓΩΝ

Η αναλογία των θετικών για την SP-A πνευμονοκυττάρων τύπου II προς τα συνολικά πνευμονοκύτταρα τύπου II συσχετίστηκε σημαντικά με τις τιμές της FEV1 ($r= 0.490$, $p=0.001$), (γράφημα 3.A). Στο γράφημα 3.A. δείξαμε ότι η μείωση της αναλογίας της SP-A σχετίστηκε με μεγαλύτερο βαθμό απόφραξης των αεραγωγών (χαμηλότερη FEV1 % pred).

6) ΣΧΕΣΗ της ΕΚΦΡΑΣΗ της SP-A στα ΚΥΨΕΛΙΔΙΚΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ με την ΑΠΟΦΡΑΞΗ των ΑΕΡΑΓΩΓΩΝ

Η αναλογία των θετικών για την SP-A κυψελιδικών μακροφάγων προς τα συνολικά κυψελιδικά μακροφάγα ήταν σημαντικά συσχετιζόμενη ($r= 0.281$, $p= 0.04$) με την FEV1 (γράφημα 3.B.)



Γράφημα 3 : **A.** Σχέση των θετικών για την SP-A πνευμονοκυττάρων τύπου II εκφρασμένη % των συνολικών πνευμονοκυττάρων τύπου II και της FEV1 % pred σε ασθενείς με Χ.Α.Π. και σε καπνιστές χωρίς Χ.Α.Π.
B. Σχέση των θετικών για την SP-A κυψελιδικών μακροφάγων εκφρασμένη % των συνολικών κυψελιδικών μακροφάγων και της FEV1 % pred όλων των ατόμων [κλειστοί κύκλοι: ασθενείς με Χ.Α.Π. , ανοικτοί κύκλοι : καπνιστές χωρίς Χ.Α.Π.].

7) ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ και ΗΛΙΚΙΑ

Δεν υπήρξε σημαντική συσχέτιση μεταξύ των συνολικών θετικών για την SP-A πνευμονοκυττάρων τύπου II και την ηλικία των ατόμων όλων των ομάδων.

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1) ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Αυτή η μελέτη είναι η πρώτη που ερευνά τα επίπεδα και την ιστική κατανομή της πρωτεΐνης SP-A σε βιοψίες ανθρώπινου πνεύμονα ασθενών με Χ.Α.Π., καπνιστών χωρίς Χ.Α.Π. και μη καπνιστών ως ομάδα ελέγχου, χρησιμοποιώντας ένα αρκετά μεγάλο αριθμό δειγμάτων και δύο διαφορετικές πειραματικές προσεγγίσεις για κάθε ασθενή. Τα επίπεδα της SP-A που αποκαλύφθηκαν με στύπωμα κατά Western αντικατοπτρίζουν τη συνολική έκφραση της πρωτεΐνης από την εκκύλιση των ομογενοποιημένων πνευμονικών ιστών (συμπεριλαμβάνοντας την SP-A από τα πνευμονοκύτταρα τύπου II και τα κυψελιδικά μακροφάγα), ενώ η ανοσοϊστοχημεία αποκάλυψε ειδικά τα κύτταρα που εξέφρασαν την πρωτεΐνη SP-A στον ανθρώπινο πνευμονικό ιστό.

Το στύπωμα κατά Western έδειξε υψηλότερα επίπεδα της SP-A στην ομάδα ελέγχου μη-καπνιστών σε σύγκριση με τους ασθενείς με Χ.Α.Π. και τους καπνιστές χωρίς Χ.Α.Π. ($p < 0.05$). Όμως, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα της SP-A μεταξύ ασθενών με Χ.Α.Π. και καπνιστών χωρίς Χ.Α.Π. ($p = 0.12$), (Εικ. 12).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι αν και η ανοσοϊστοχημεία έδειξε υψηλότερο συνολικό αριθμό πνευμονοκυττάρων τύπου II στους ασθενείς με Χ.Α.Π. σε σύγκριση με τους καπνιστές χωρίς Χ.Α.Π. (γράφημα 1. Α), η αναλογία των θετικών για την

SP-A πνευμονοκυττάρων τύπου II προς τα συνολικά πνευμονοκύτταρα τύπου II ήταν μειωμένη στους ασθενείς με Χ.Α.Π. (γράφημα 2.Β). Επιπρόσθετα, η μειωμένη αναλογία στους ασθενείς με Χ.Α.Π. συσχετίστηκε με τη μείωση της FEV1 (% pred), (γράφημα 3.Α). Επίσης, ο συνολικός αριθμός των κυψελιδικών μακροφάγων ήταν σημαντικά υψηλότερος στους ασθενείς με Χ.Α.Π. σε σύγκριση με τους καπνιστές χωρίς Χ.Α.Π. ($p = 0.001$), (γράφημα 2.Α.). Ενώ η αναλογία των θετικών κυψελιδικών μακροφάγων προς τα συνολικά ήταν σημαντικά υψηλότερη στους ασθενείς με Χ.Α.Π. (γράφημα 2.Β.), το οποίο σχετίστηκε και με την απόφραξη των αεραγωγών (FEV1% pred), (γράφημα 3.Β). Ο ρόλος του επιφανειοδραστικού παράγοντα στην παθογένεια του πνεύμονα περιγράφηκε πρώτη φορά στο σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας των νεογνών όπου η έλλειψη του προκαλεί την ασθένεια (69, 70). Αργότερα, βιοχημικές, λειτουργικές και ανοσορρυθμιστικές ανωμαλίες περιγράφηκαν και σε άλλα νοσήματα του πνεύμονα συμπεριλαμβάνοντας τη Χ.Α.Π. (69,71).

2) ΑΥΞΗΜΕΝΑ ΠΝΕΥΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ ΤΥΠΟΥ II στη Χ.Α.Π.

Τα αποτελέσματα μας έδειξαν αυξημένα πνευμονοκύτταρα τύπου II στους ασθενείς με Χ.Α.Π. σε σύγκριση με τους καπνιστές χωρίς Χ.Α.Π. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο γνωρίζοντας την εκτεταμένη ιστική βλάβη στη Χ.Α.Π. και έρχεται σε συμφωνία με την υπόθεση της

«μηχανικής» βλάβης (“mechanical” injury hypothesis) (67,68).

Αυξημένος αριθμός πνευμονοκυττάρων τύπου II έχει αναφερθεί και σε προηγούμενες μελέτες και ειδικά σε ποντίκια μετά από προκαλούμενη βλάβη του πνεύμονα (55,72). Το κυψελιδικό επιθήλιο όταν βλάπτεται από τον καπνό του τσιγάρου αρχίζει τη διαδικασία διόρθωσης με διαφοροποίηση και πολλαπλασιασμό των κυττάρων για να καλύψει το έλλειμμα της προκαλούμενης βλάβης (73,74). Τα πνευμονοκύτταρα τύπου II πολλαπλασιάζονται κατά την πνευμονική βλάβη και τις χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις (74), όπως η Χ.Α.Π., για να παράγουν πνευμονοκύτταρα τύπου I. Επίσης, τα πνευμονοκύτταρα τύπου II παράγουν ειδικά μόρια, ένζυμα και πρωτεΐνες όπως η SP-A η οποία λαμβάνει μέρος στην άμυνα κατά των βλαπτικών παραγόντων (45,75).

3) Η ΜΕΙΩΜΕΝΗ ΕΚΦΡΑΣΗ της SP-A στα ΠΝΕΥΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ ΤΥΠΟΥ II ΣΤΗ Χ.Α.Π. ΣΧΕΤΙΖΕΤΑΙ ΜΕ ΤΟ ΒΑΘΜΟ ΑΠΟΦΡΑΞΗΣ των ΑΕΡΑΓΩΓΩΝ

Το πιο ενδιαφέρον εύρημα σε αυτή τη μελέτη ήταν η μειωμένη αναλογία των θετικών πνευμονοκυττάρων τύπου II για την SP-A (θετικά πνευμονοκύτταρα τύπου II για την SP-A / συνολικά πνευμονοκύτταρα τύπου II %) στη Χ.Α.Π. σε σύγκριση με τους καπνιστές χωρίς Χ.Α.Π. (γράφημα 1.Β) το οποίο μάλιστα σχετίστηκε με υψηλότερο βαθμό απόφραξης

των αεραγωγών (γράφημα 3.A). Μια εξήγηση που θα μπορούσε να δοθεί είναι ότι τα επίπεδα της SP-A είναι μικρότερα στη Χ.Α.Π. λόγω της καταστροφής του επιθηλίου που σχετίζεται με τη νόσο, προκαλώντας λειτουργικές μεταβολές στα πνευμονοκύτταρα τύπου II που είναι κυρίως υπεύθυνα για την παραγωγή της SP-A. Σε υποστήριξη της παραπάνω θεωρίας, η μείωση της αναλογίας της SP-A σχετίστηκε με μεγαλύτερο βαθμό απόφραξης των αεραγωγών. Σε φυσιολογικές συνθήκες η SP-A έχει προστατευτικό ρόλο για τον πνεύμονα κατά των οξειδωτικών και φλεγμονωδών ουσιών και το μολυσματικό στρες (75). Επίσης, έχει σημαντικό ρόλο στην εκκαθάριση των αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων (45). Όμως, μελέτες έχουν δείξει ότι οι αμυντικές λειτουργίες του επιφανειοδραστικού παράγοντα ίσως βλάπτονται στους χρόνιους καπνιστές (57,76). Αναφέρθηκαν μειωμένα επίπεδα της SP-A στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL) χρόνιων καπνιστών προτείνοντας ότι αυτό συμβάλλει στην αυξημένη συχνότητα λοιμώξεων του αναπνευστικού (56), στην ελλειμματική απομάκρυνση των αποπτωτικών κυττάρων (impaired efferocytosis) και τη μη φυσιολογική ιστική αναδιαμόρφωση του πνεύμονα (remodelling) (45). Δύο πρόσφατες έρευνες από τον Hu και συνεργάτες (77,78) ανέφεραν μειωμένα επίπεδα της SP-A σε ποντίκια, σε πνευμονικό ιστό και στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα, μετά από χρόνια έκθεση σε καπνό του τσιγάρου, συμπεραίνοντας ότι το κάπνισμα μπορεί να επηρεάσει το μεταβολισμό της SP-A και τις λειτουργίες άμυνας του ξενιστή (77,78).

Για τη σχέση μεταξύ του καπνού του τσιγάρου, της φυσικής ανοσίας, της φλεγμονής του πνεύμονα και της παθογένειας της Χ.Α.Π. έχουν γίνει πολλές μελέτες και έχουν προταθεί πολλές θεωρίες (79,80,81,82). Στον «ευπαθή» καπνιστή, η συνεχής έκθεση προσβάλλει αρχικά το πνευμονικό επιθήλιο και κυρίως τα κύτταρα μέσω του οξειδωτικού στρες το οποίο μπορεί να προκαλέσει ζημιά του DNA και επίκτητες σωματικές μεταλλάξεις αυτών των κυττάρων (81,82,83,84). Σε προηγούμενες έρευνες του εργαστηρίου μας αναφέραμε επίκτητη γενετική αστάθεια σε ασθενείς με Χ.Α.Π. στο σημαντή G29802 (30,92), υποθέτοντας ότι αυτό θα μπορούσε να είναι μια ένδειξη ελαττωματικής επιδιόρθωσης του DNA της περιοχής και ίσως μια αλλοίωση του διπλανού γονιδίου της SP-A. Η μειωμένη έκφραση της SP-A στα πνευμονοκύτταρα τύπου II στους ασθενείς με Χ.Α.Π. όπως έδειξε αυτή η μελέτη, θα μπορούσε να υποστηρίξει την αρχική μας υπόθεση.

4) Η ΕΚΦΡΑΣΗ της SP-A στα ΚΥΨΕΛΙΔΙΚΑ ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ

Σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, βρήκαμε αυξημένο αριθμό κυψελιδικών μακροφάγων στο πνευμονικό παρέγχυμα ασθενών με Χ.Α.Π. (85). Επιπρόσθετα, αναφέραμε υψηλότερο αριθμό θετικών κυψελιδικών μακροφάγων για την SP-A στους ασθενείς με Χ.Α.Π. σε σύγκριση με τους καπνιστές χωρίς Χ.Α.Π.. Επίσης, η αναλογία των θετικών για την SP-A κυψελιδικών μακροφάγων προς τα συνολικά

κυψελιδικά μακροφάγα σχετίστηκε σημαντικά με την FEV1 (γράφημα 3B). Μια πιθανή εξήγηση για την αύξηση της SP-A στα κυψελιδικά μακροφάγα ασθενών με Χ.Α.Π. θα μπορούσε να είναι η αυξημένη εκκαθάριση τμημάτων της SP-A από τον κυψελιδικό χώρο. Αυτό θα μπορούσε να αντικατοπτρίζει ή ένα αλλοιωμένο μηχανισμό παραγωγής της SP-A ή ένα διαταραγμένο «turnover» της SP-A στα πνευμονοκύτταρα τύπου II στη Χ.Α.Π. ή και τα δύο.

Μια σειρά από μελέτες έχουν δείξει ότι η SP-A έχει τη δυναμική ικανότητα να διεγείρει τα μακροφάγα και να αυξάνει τη φαγοκυττάρωση διαφόρων βακτηριδίων, ιών, αλλεργιογόνων και αποπτωτικών κυττάρων. Ακόμα, λειτουργώντας ως αντίσωμα μπορεί να προάγει τη λήψη των τμημάτων της SP-A από τα κυψελιδικά μακροφάγα (63,45).

Η μελέτη μας έχει μερικούς περιορισμούς. Πρώτα απ' όλα, τα τμήματα πνευμονικού ιστού που χρησιμοποιήθηκαν, πάρθηκαν μόνο από άτομα που υποβλήθηκαν σε πνευμονεκτομή λόγω κακοήθειας του πνεύμονα. Αν και είναι γνωστό ότι ο καρκίνος επηρεάζει την έκφραση του επιφανειοδραστικού παράγοντα (86,87), όλα τα άτομα που έλαβαν μέρος σε αυτή τη μελέτη είχαν το ίδιο νόσημα. Δεύτερον, οι βιοψίες πνευμονικού ιστού δε λήφθηκαν από άτομα με σοβαρή Χ.Α.Π.. Αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει σε υποεκτίμηση των αποτελεσμάτων μας, αφού τα μέχρι τώρα δεδομένα μας προτείνουν ότι αυτοί οι ασθενείς προφανώς και θα έχουν ακόμα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης της SP-A. Τρίτον, η μέση ηλικία των ασθενών με Χ.Α.Π. ήταν μεγαλύτερη από τους καπνιστές χωρίς Χ.Α.Π. ($p=0.03$), αν και

δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ της συνολικής έκφρασης της SP-A και της ηλικίας. Ενδιαφέρον παρουσιάζει μια προηγούμενη μελέτη από τον Betsuyaku και συνεργάτες (57) που ανέφεραν ότι οι καπνιστές μέσης και μεγαλύτερης ηλικίας με εμφύσημα έχουν χαμηλότερα επίπεδα SP-A στο BAL όταν συγκρίθηκαν με νεότερα άτομα και καπνιστές μέσης και μεγαλύτερης ηλικίας χωρίς εμφύσημα(57). Προηγούμενοι ερευνητές είχαν παραθέσει αντιφατικά αποτελέσματα όσο αφορά τα επίπεδα της SP-A σε BAL και σε ορό καπνιστών και ασθενών με Χ.Α.Π.. Μερικές μελέτες ανέφεραν μειωμένα επίπεδα της SP-A (56,57) άλλες αυξημένα (88) και άλλες αμετάβλητα (89). Έρευνες σε ποντίκια εκτεθειμένα στον καπνό του τσιγάρου, δεν έδειξαν μεταβολές στα επίπεδα της SP-A στο BAL (72), αλλά κυψελιδικά κύτταρα τύπου II ποντικίου, σε καλλιέργεια, έδειξαν βλάβη στην έκκριση του επιφανειοδραστικού παράγοντα (55). Από την άλλη πλευρά, ο Shibata και συνεργάτες (90) ανέφεραν αυξημένη έκφραση της SP-A σε πνεύμονα ποντικίων εκτεθειμένα στον καπνό του τσιγάρου σε σύγκριση με ποντίκια εκτεθειμένα στον ατμοσφαιρικό αέρα (90). Ο Ohlmeier και συνεργάτες (91) ανέφεραν αυξημένη έκφραση της SP-A σε πνευμονικό ιστό και προκλητό πτύελο ασθενών με Χ.Α.Π. συγκριτικά με φυσιολογικά άτομα και άτομα με ίνωση ενώ δεν παρατηρήθηκαν τέτοιες αλλαγές με άλλες πρωτεΐνες του επιφανειοδραστικού παράγοντα(SP-B, SP-C, SP-D), (91).

Ε. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ της SP-A με την ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΣΤΑΘΕΙΑ του ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΟΥ DNA

Η παρούσα μελέτη αποτελεί τη συνέχεια προηγούμενων ερευνών του εργαστηρίου μας που έχουν στόχο την αποσαφήνιση της παθογένειας των αποφρακτικών νοσημάτων του πνεύμονα και συγκεκριμένα του άσθματος και της Χ.Α.Π..

Προηγούμενη έρευνα του εργαστηρίου μας έδειξε αυξημένη συχνότητα μικροδορυφορικής αστάθειας του DNA σε ασθενείς με Χ.Α.Π.(25). Το φαινόμενο της αστάθειας του μικροδορυφορικού DNA συσχετίστηκε με λάθη αντιγραφής των γονιδίων και απεικονίζει μια δυσλειτουργία στη διαδικασία επισκευής της ζημιάς του DNA που έχει προκληθεί από το οξειδωτικό στρες του καπνού του τσιγάρου. Κατά συνέπεια προκαλούνται μη αναστρέψιμες γενετικές αλλαγές στα επιθηλιακά και άλλα θεμελιώδη κύτταρα των αεραγωγών και του πνευμονικού παρεγχύματος που μπορούν να οδηγήσουν σε λειτουργικές και μεταβολικές διαταραχές του πνεύμονα.

Συγκεκριμένα, μία από τις προηγούμενες έρευνες μας έδειξε ότι ο σημαντής G29802 που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση μικροδορυφορικής αστάθειας του DNA στη Χ.Α.Π. και το άσθμα, έδειξε ειδικότητα στη Χ.Α.Π.. Ο σημαντής G29802 έδειξε μικροδορυφορική αστάθεια στη χρωμοσωμική περιοχή 10q22 όπου εδράζεται το γονίδιο της πρωτεΐνης SP-A. Ετέθει λοιπόν η υποψία ότι και η έκφραση της πρωτεΐνης SP-A ίσως είναι διαφοροποιημένη στους ασθενείς με Χ.Α.Π.. Έτσι δόθηκε η πρώτη ώθηση να ερευνήσουμε το ρόλο της πρωτεΐνης SP-A στην παθογένεια της Χ.Α.Π.

Z. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στη μελέτη μας δείξαμε ότι η μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης SP-A στους ασθενείς με Χ.Α.Π. σχετίζεται με την απόφραξη των αεραγωγών. Η προαναφερόμενη συσχέτιση αν και δεν έχει μια άμεση σχέση αιτίας- αιτιατού, προτείνει είτε μια μη φυσιολογική παραγωγή της SP-A από τα πνευμονοκύτταρα τύπου II είτε ένα αυξημένο turnover της SP-A στον πνεύμονα ασθενών με Χ.Α.Π.. Σίγουρα είναι μια ενδιαφέρουσα υπόθεση που χρειάζεται περισσότερη έρευνα.

Βιβλιογραφία

1. Viegi G, Pistelli F, Sherrill DL, Maio S, Baldacci S, Carrozzi L. Definition, epidemiology and natural history of COPD. *Eur Respir J* 2007 Nov;30(5):993-1013.
2. William MacNee. Update in Chronic Obstructive Pulmonary Disease 2007 *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2008; Vol 177. pp. 820-829.
3. Nikolaos Tzanakis, MD; Urania Anagnostopoulou, MD; Vassiliki Filaditaki, MD; Pandora Christaki, MD; and Nikolaos Sifakas, MD, PhD, FCCP. Prevalence of COPD in Greece; *Chest* 2004;125;892-900
4. 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.
5. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. www.goldcopd.com. Date last accessed: June 30, 2007.
6. Sifakas NM. Definition and differential diagnosis of chronic obstructive pulmonary disease. In: Sifakas NM,ed. *Management of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. *Eur Respir Mon* 2006; 38: 1–6.
7. Néstor A. Molfino, Peter K. Jeffery. Chronic obstructive pulmonary disease: Histopathology, inflammation and potential therapies. *Pulm Pharmacol Ther*. 2007;20(5):462-72.
8. R. T. Abboud, S. Vimalanathan. Pathogenesis of COPD. Part I. The role of protease-antiprotease imbalance in emphysema *INT J TUBERC LUNG DIS* 2008;12(4):361–367
9. J. C. W. Mak. Pathogenesis of COPD. Part II. Oxidative-antioxidative imbalance *INT J TUBERC LUNG DIS* 2008; 12(4):368–374
10. M. Roth. Pathogenesis of COPD. Part III. Inflammation in COPD. *INT J TUBERC LUNG DIS* 2008; 12(4):375–380
11. Weber JL, May PE. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet*. 1989; 44(3): 388-96.
12. Radman M, Wagner R. Mismatch recognition in chromosomal interactions and speciation. *Chromosoma*. 1993;102(6):369-73.
13. Schlotterer C, Tautz D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res*. 1992; 20(2): 211-5.

14. Parsons R, Li GM, Longley MJ, Fang WH, Papadopoulos N, Jen J, de la Chapelle A, Kinzler KW, Vogelstein B, Modrich P. Hypermutable and mismatch repair deficiency in RER+ tumor cells. *Cell* 1993; 75(6):1227-36.
15. Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, Jarvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*. 1993; 260(5109): 812-6.
16. Yee CJ, Roodi N, Verrier CS, Parl FF. Microsatellite instability and loss of heterozygosity in breast cancer. *Cancer Res*. 1994; 54(7): 1641-4.
17. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260(5109): 816-9.
18. Froudarakis ME, Sourvinos G, Fournel P, Bouros D, Vergnon JM, Spandidos DA, Siafakas NM. Microsatellite instability and loss of heterozygosity at chromosomes 9 and 17 in non-small cell lung cancer. *Chest* 1998; 113(4): 1091-1094.
19. Spandidos DA, Ergazaki M, Arvanitis D, Kiaris H. Microsatellite instability in human atherosclerotic plaques. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996; 220(1): 137-140.
20. Detorakis ET, Sourvinos G, Tsampralakis J, Spandidos DA. Evaluation of loss of heterozygosity and microsatellite instability in human pterygium: clinical correlations. *Br J Ophthalmol*. 1998; 82(11): 1324-8.
21. Spandidos DA, Sourvinos G, Kiaris H, Tsampralakis J. Microsatellite instability and loss of heterozygosity in human pterygia. *Br J Ophthalmol*. 1997; 81(6): 493-6.
22. Kiaris H, Koumantakis E, Ergazaki M, Spandidos DA. Microsatellite instability in aborted embryos. *Mol Hum Reprod*. 1996; 2(1): 72-4.
23. Snell RG, MacMillan JC, Cheadle JP, Fenton I, Lazarou LP, Davies P, MacDonald ME, Gusella JF, Harper PS, Shaw DJ. Relationship between trinucleotide repeat expansion and phenotypic variation in Huntington's disease. *Nat Genet*. 1993; 4(4): 393-7.
24. Yu S, Pritchard M, Kremer E, Lynch M, Nancarrow J, Baker E, Holman K, Mulley JC, Warren ST, Schlessinger D, et al. Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA. *Science* 1991; 252(5010): 1179-81.
25. Siafakas NM, Tzortzaki EG, Sourvinos G, Bouros D, Tzanakis N, Kafatos A, Spandidos D. Microsatellite DNA instability in chronic obstructive pulmonary disease. A marker of genetic susceptibility?. *Chest*. 1999; 116(1): 47-51.
26. Vassilakis DA, Sourvinos G, Spandidos DA, Siafakas NM, Bouros D. Frequent genetic alterations at the microsatellite level in cytologic sputum samples of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 162: 1115-1119

27. DIMITRIS A. VASSILAKIS, GEORGE SOURVINOS, MILTIADIS MARKATOS, KOSTAS PSATHAKIS, DEMETRIOS A. SPANDIDOS, NIKOLAOS M. SIAFAKAS, and DEMOSTHENES BOUROS. Microsatellite DNA Instability and Loss of Heterozygosity in Pulmonary Sarcoidosis *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, Volume 160, Number 5, November 1999, 1729-1733
28. E. Paraskakis, G. Sourvinos, F. Passam, N. Tzanakis, E.G. Tzortzaki, M. Zervou, D. Spandidos and N.M. Siafakas. Microsatellite DNA instability and loss of heterozygosity in bronchial asthma. *Eur Respir J* 2003; 22:951-955
29. Nikolaos M. Siafakas, MD, PhD, FCCP, Eleni G. Tzortzaki, MD, George Sourvinos, MSc, Demosthenes Bouros, MD, FCCP, Nikolaos Tzanakis, MD, Antony Kafatos, MD, and Dimitrios Spandidos, PhD. Microsatellite DNA Instability in COPD. *Chest*. 1999 Jul;116(1):47-51
30. M. I. Zervou, E. G. Tzortzaki, D. Makris, M. Gaga, E. Zervas, E. Economidou, M. Tsoumakidou, N. Tzanakis, J. Milic-Emili, N. M. Siafakas. Differences in microsatellite DNA level between asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2006; 28:472-478
31. G. J. Gibson, D.M. Geddes, U.Costabel, P.J.Sterk, B.Corrin, *Pneumonology*, text book, third edition 2003;48-49
32. Poulter LW, Burke CM. Macrophages and allergic lung disease. *Immunobiology* 1996; 195: 574–587.
33. 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
34. Saetta M, Baraldo S, Corbino L, Turato G, Braccioni F, Rea F, Cavallese G, Tropeano G, Mapp CE, Maestrelli P, Ciaccia A, Fabbri LM. CD8+ve cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Aug;160(2):711-7.
35. Di Stefano A, Capelli A, Lusuardi M, Balbo P, Vecchio C, Maestrelli P, Mapp CE, Fabbri LM, Donner CF, Saetta M. Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Oct;158(4):1277-85.
36. Joseph, M., A. B. Tonnel, G. Torpier, A. Capron, B. Arnoux, and J. Benveniste. 1983. Involvement of immunoglobulin E in the secretory processes of alveolar macrophages from asthmatic patients. *J. Clin. Invest.* 1983; 71: 221-230.

37. Arnoux, B., E. Jouvin-Marche, A. Arnoux, J. Chrétien, and J. Benveniste. Release of PAF-acether from human monocytes. *Agents Action* 1982; 12: 713-716.
38. Wagner JG, Roth RA. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacol Rev.* 2000 Sep;52(3):349-74.
39. Sperber, K., P. Chanez, J. Bousquet, S. Goswami, and Z. Marom. Detection of a novel macrophage-derived mucus secretagogue (MMS-68) in bronchoalveolar lavage fluid of patients with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1995; 95: 868-876.
40. Kovacs, E., and L. DiPietro. Fibrogenic cytokines and connective tissue production. *FASEB J.* 1994; 8: 854-861.
41. Aldonyte R, Jansson L, Piitulainen E, Janciauskiene S. Circulating monocytes from healthy individuals and COPD patients. *Respir Res.* 2003;4:11.
42. Holt PG, McMennamin C. Defence against allergic sensitization in the healthy lung: the role of inhalation tolerance. *Clin Exp Allergy* 1989; 19: 255–262.
43. G. J. Gibson, D.M. Geddes, U. Costabel, P.J. Sterk, B. Corrin, *Pneumonology*, text book, third edition 2003;46
44. G. J. Gibson, D.M. Geddes, U. Costabel, P.J. Sterk, B. Corrin, *Pneumonology*, text book, third edition 2003;93-94
45. Wright JR. Immunoregulatory functions of surfactant proteins. *Nat Rev Immunol*, 2005; 5: 58–68
46. Seamus A, Rooney, Stephen L, et al. Molecular and cellular processing of lung surfactant. *The FASEB Journal*, 1994; 957-967.
47. Griese M. Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: State of the Art *Eur Respir J*, 1999; 13:145-1476.
48. Hohlfeld JM. Pulmonary surfactant and liquid equilibrium in the lung. In Gibson J et al *Respiratory Medicine*, 3ed, (Saunders WB Ltd, eds, a division of Elsevier Science) 2003; 93-104.
49. Rooney SA. Phospholipid composition, biosynthesis, and secretion. In *Comparative Biology of the Normal Lung* (Parent R.A., ed) 1992; 511-544.
50. Wirtz HR, Dobbs LG. Calcium mobilization and exocytosis after one mechanical stretch of lung epithelial cells. *Science*, 1990; 250:1266–1269

51. Haller T, Dietl P, Pfaller K, et al. Fusion pore expansion is a slow, discontinuous, and Ca²⁺-dependent process regulating secretion from alveolar type II cells. *J Cell Biol*, 2001; 155: 279–289.
52. Kishore U, Greenhough TJ, Waters P, et al. Surfactant proteins SP-A and SP-D: Structure, function and receptors. *Mol Immunol*, 2006; 43:1293-1315
53. Devendra G, Spragg GR. Lung surfactant in subacute pulmonary diseases. *Respir Res*, 2002; 3:19.
54. Hohlfeld MJ. The role of surfactant in asthma. *Respir Res*, 2002; 3:4
55. Wirtz HRW, Schmidt M. Acute influence of cigarette smoke on secretion of pulmonary surfactant in rat alveolar type II cells in culture. *Eur Respir J*, 1996; 9:24–33
56. Honda Y, Takahashi H, Kuroki Y, et al. Decreased contents of surfactant proteins A and D in BAL fluids of healthy smokers. *Chest*, 1996; 109:1006-1009
57. Betsuyaku T, Kuroki Y, Nagai K, et al. Effects of ageing and smoking on SP-A and SP-D levels in bronchoalveolar lavage fluid. *Eur Respir J*, 2004; 24:964-970
58. Kavuru MS, Sullivan EJ, Piccin R, et al. Exogenous granulocytemacrophage colony-stimulating factor administration for pulmonary alveolar proteinosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000; 161:1143-1148
59. Wang G, Phelps DS, Umstead TM, et al. Human SP-A protein variants derived from one or both genes stimulate TNF- production in the THP-1 cell line. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000; 278:L946-L954
60. Lin Z, Pearson C, Chinchilli V, et al. Polymorphisms of human SP-A, SP-B, and SP-D genes: association of SP-B Thr131Ile with ARDS. *Clin Genet*, 2000; 58:181-91.
61. Guo X, Lin HM, Lin Z, et al. Surfactant protein gene A, B, and D marker alleles in chronic obstructive pulmonary disease of a Mexican population. *Eur Respir J*, 2001; 18:482-490
62. American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 1995; 152:77s–120s
63. Pastva AM, Wright JR, Williams KL. Immunomodulatory roles of surfactant proteins A and D: implications in lung disease. *Proc Am Thorac Soc* 2007; 4:252-257
64. Fabbri L, Pauwels RA, Hurd SS. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: GOLD Executive Summary updated 2003. *COPD*. 2004;1(1):105-41; discussion 103-4
65. Otto-Verberne CJ, Ten Have-Oproek AA, Franken C, et al. Protective effect of

- pulmonary surfactant on elastase-induced emphysema in mice. *Eur Respir J* 1992; 5:1223-1230
66. Anzueto A, Jubran A, Ohar JA, et al. Effects of aerosolized surfactant in patients with stable chronic bronchitis: a prospective randomized controlled trial. *JAMA* 1997; 278:1426-1431
67. Bernhard W, Haslam PL, Floros J. From birds to humans: new concepts on airways relative to alveolar surfactant. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 30:6-11
68. Milic-Emili J. Does mechanical injury of the peripheral airways play a role in the genesis of COPD in smokers? *COPD*. 2004 Apr;1(1):85-92
69. Kishore U, Bernal AL, Kamran MF, et al. Surfactant proteins SP-A and SP-D in human health and disease. *Arch Immunol Ther Exp* 2005; 53:399-417
70. Garvey J. Infant respiratory distress syndrome. *Am J Nurs* 1975; 75:614-617
71. Gunther A, Siebert C, Schmidt R, et al. Surfactant alterations in severe pneumonia, acute respiratory distress syndrome, and cardiogenic lung edema. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153:176-184
72. Subramaniam S, Whitsett JA, Hull W, Gairola CG. Alteration of pulmonary surfactant proteins in rats chronically exposed to cigarette smoke. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996;140:274-280
73. Sulkowski S, Nowak HF, Szynaka B, Alveolar epithelial cells in experimental lung emphysema. Ultrastructural analysis of cells in situ in TEM. *Exp Toxicol Pathol*. 1994 ;45(8):513-8.
74. Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms, *Eur Respir J* 2003; 22:672-688
75. Sorensen GL, Husby S, Holmskov U. Surfactant protein A and surfactant protein D variation in pulmonary disease. *Immunobiology* 2007;212:381-416
76. Robin M, Dong P, Hermans C, Bernard A, Bersten AD, Doyle IR, Serum levels of CC16, SP-A and SP-B reflect tobacco-smoke exposure in asymptomatic subjects, *Eur Respir J*. 2002; 20(5):1152-61,
77. Hu QJ, Xiong SD, Zhang HL, et al. Altered surfactant protein A gene expression and protein homeostasis in rats with emphysematous changes. *Chin Med J (Engl)*. 2008;121(13):1177-82.
78. Hu Q, Zhang H, Xiong S, et al. The alteration and significance of surfactant protein A in rats chronically exposed to cigarette smoke. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2008;28(2):128-31

79. Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, *et al.* 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.
80. Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2000; 343:269–280.
81. Siafakas NM. “In the Beginning” of COPD. Is Evolution Important? *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175:1-2.
- 82.. Tzortzaki EG, Siafakas NM. A new hypothesis for the initiation of COPD. *Eur Respir J* 2009, *in press*.
83. Siafakas NM, Tzortzaki EG, Sourvinos G, *et al.* 1999. Microsatellite DNA instability in COPD. *Chest* 1999; 116:47–51.
84. Chizhikov VV, Chikina SI, Tatosian AG, *et al.* Development of chronic obstructive pulmonary disease correlates with mini-and microsatellite locus instability. *Genetika* 2003; 39(5):694-701.
85. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, *et al.* The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004; 350:2645–2653.
86. Camilo R, Capelozzi VL, Siqueira SA, Del Carlo Bernardi F. Expression of p63, keratin 5/6, keratin 7, and surfactant-A in non-small cell lung carcinomas. *Hum Pathol.* 2006 ;37(5):542-6.
87. Uzaslan E, Stuempel T, Ebsen M, Freudenberg N, Nakamura S, Costabel U, Guzman J. Surfactant protein A detection in primary pulmonary adenocarcinoma without bronchioloalveolar pattern. *Respiration* 2005;72(3):249-53
88. Kobayashi H, Kanoh S, Motoyoshi K. Serum surfactant protein-A, but not surfactant protein-D or KL-6, can predict preclinical lung damage induced by smoking. *Biomarkers* 2008; 13(4): 385-92.
89. Nomori H, Horio H, Fuyuno G, Kobayashi R, Morinaga S, Suemasu K. Serum surfactant protein A levels in healthy individuals are increased in smokers. *Lung* 1998;176(6):355-61
90. Shibata Y, Abe S, Inoue S, *et al.* Altered expression of antimicrobial molecules in cigarette smoke-exposed emphysematous mice lungs. *Respirology* 2008; 13: 1061-5.
91. Ohlmeier S, Vuolanto M, Toljamo T, *et al.* Proteomics of Human Lung Tissue identifies Surfactant Protein A as a Marker of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J Proteome Res* 2008; [Epub ahead of print].
92. 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(3):612-8.