



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ - ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ - ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑΣ**

**«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΩΝ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ
ΚΥΚΛΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΘΑΝΑΤΟΥ ΥΠΟ ΤΗΝ
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ»**

**ΙΡΙΣ ΖΑΜΠΙΡΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2011

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν.5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

Ημερομηνία αίτησης της κ. Ζαμπίρα Ίριδας: 27-6-2006

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 592^α/24-10-2006

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπουσα

Δαλαβάρκα Παναγιώτα -Άννα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ανατομίας –Ιστολογίας –
Εμβρυολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Καναβάρος Παναγιώτης Καθηγητής Ανατομίας που καλύπτει και την Ιστολογία –
Εμβρυολογία Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Κυρίτσης Αθανάσιος Καθηγητής Νευρολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 21-11-2006

«Διερεύνηση των μεταβολών του κυτταρικού κύκλου και του κυτταρικού θανάτου υπό την επίδραση κυτταροκινών»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 704^α/25-1-2011

Ευαγγέλου Άγγελος	Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Καναβάρος Παναγιώτης	Καθηγητής Ανατομίας που καλύπτει και την Ιστολογία - Εμβρυολογία Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κυρίτσης Αθανάσιος	Καθηγητής Νευρολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κωνσταντόπουλος Σταύρος	Καθηγητής Παθολογίας -Πνευμονολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Δαλαβάρκα Παναγιώτα- Άννα	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ανατομίας –Ιστολογίας – Εμβρυολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Παπαδοπούλου Χρυσάνθη	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Καλαμίδας Στέφανος	Επίκουρος Καθηγητής Ανατομίας –Ιστολογίας - Εμβρυολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 28-1-2011

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Ιωάννης Γουδέβενος

Καθηγητής Παθολογίας- Καρδιολογίας



Η Γραμματέας της Σχολής

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΒΕΝΤΖΟΥΡΗ -ΖΩΗ

Στους γονείς μου Χρήστο και Αλεξάνδρα

και

στην αδερφή μου Έλενα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μελέτη επιχειρεί να συμβάλει στην κατανόηση της in vitro συμπεριφοράς επιθηλιακών κυττάρων, ερευνώντας τον τρόπο που αυτά λειτουργούν όταν παρεμβάλλονται παράγοντες που λειτουργούν ρυθμιστικά στην διατήρηση της ομοιόστασης. Φιλόδοξος στόχος είναι τα αποτελέσματα της διατριβής να αποτελέσουν χρήσιμο εργαλείο στην επιστημονική κοινότητα.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στα εργαστήρια της Ανατομίας- Ιστολογίας- Εμβρυολογίας και του Νευροχειρουργικού Ινστιτούτου που στεγάζεται στο χώρο της Ιστολογίας στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας κας Γιωτάννας Δαλαβάγκα.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου κα Γιωτάννα Δαλαβάγκα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια της Ανατομίας – Ιστολογίας – Εμβρυολογίας, για την εμπιστοσύνη που έδειξε προς το πρόσωπο μου για την διεκπεραίωση αυτής της ερευνητικής εργασίας και που μου έκανε την τιμή να αποτελέσω μέλος της ερευνητικής της ομάδας. Την ευχαριστώ για το χρόνο που μου αφιέρωσε, για την πολύτιμη βοήθεια που προσέφερε, για το ενδιαφέρον και την διαρκή στήριξη της. Ακόμη θα ήθελα να εκφράσω το βαθύτατο σεβασμό και εκτίμηση μου προς το πρόσωπό της.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Παναγιώτη Καναβάρο, Καθηγητή της Ανατομίας – Ιστολογίας - Εμβρυολογίας, για την υλική υποστήριξη που μου προσέφερε στην διεξαγωγή των πειραμάτων μου αλλά και για την πολύτιμη καθοδήγηση και βοήθειά του.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Αθανάσιο Κυρίση, Καθηγητή της Νευρολογίας, για την σημαντική βοήθεια που μου προσέφερε στην διεξαγωγή του υλικοτεχνικού μέρους των πειραμάτων μου ειδικά όσο αφορά την τεχνική των κυτταροκαλλειργειών. Επίσης θα ήθελα να τον ευχαριστήσω ως υπεύθυνο του Νευροχειρουργικού Ινστιτούτου που μου έδωσε την δυνατότητα να εργαστώ στο εργαστήριο αυτό.

Ευχαριστώ θερμότατα την κα Φανή Ταχμάζογλου του Νευροχειρουργικού Ινστιτούτου για τις πολύτιμες εργαστηριακές τεχνικές που με δίδαξε, τεχνικές που χρησιμοποίησα κατά την εκπόνηση της διατριβής.

Από την Πνευμονολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά, τον κ. Σταύρο Κωνσταντόπουλο, Καθηγητή της Παθολογίας-Πνευμονολογίας και τους συνεργάτες του για την συλλογή των δειγμάτων καθώς και για τις εύστοχες παρατηρήσεις του.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερω την Πνευμονολόγο κα Αθηνά Γόγαλη για την αξιοσημείωτη βοήθειά της στη συλλογή των δειγμάτων αλλά και για την αδιάκοπη στήριξη της όλα αυτά τα χρόνια.

Από το εργαστήριο Ανατομίας – Ιστολογίας – Εμβρυολογίας, ευχαριστώ τον κ Στέφανο Καλαμίδα, Επίκουρο Καθηγητή, για τις πολύτιμες συμβουλές του.

Από το Πανεπιστήμιο του Λίβερπουλ της Αγγλίας ευχαριστώ τον κ Τριαντάφυλλο Λιλόγλου για την προσφορά της κυτταρικής σειράς SKMES.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου πρωτίστως την οικογένεια μου αλλά και τους στενούς μου φίλους που χωρίς την αγάπη και την αδιάκοπη στήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια, η διεκπεραίωση της παρούσας διατριβής θα ήταν αδύνατη...

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	ΣΕΛ.2
2. A549	ΣΕΛ.3
3. SKMES	ΣΕΛ.5
4. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ	ΣΕΛ.6
5. ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ	ΣΕΛ.7
5.1. ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗ 18 (IL-18)	ΣΕΛ.9
5.2. ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΝΕΚΡΩΣΗΣ ΟΓΚΩΝ α (TNF- α)	ΣΕΛ.10
5.3. ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΗ 13 (IL-13).....	ΣΕΛ.10
5.4. ΙΝΤΕΡΦΕΡΟΝΗ γ (IFN- γ)	ΣΕΛ.12
6. ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΠΝΕΥΜΟΝΑ	ΣΕΛ.14
6.1. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ.....	ΣΕΛ.14
6.2. ΠΑΘΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ	ΣΕΛ.15
6.3. ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ	ΣΕΛ.16
6.4. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ ΚΑΙ ΦΛΕΓΜΟΝΗ.....	ΣΕΛ.19
7. ΧΡΟΝΙΑ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑ (ΧΑΠ).....	ΣΕΛ.21
8. ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ.....	ΣΕΛ.25
8.1. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ.....	ΣΕΛ.25
8.2. ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ.....	ΣΕΛ.26
8.3. ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	ΣΕΛ.26
8.4. ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ.....	ΣΕΛ. 27
8.5. ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ.....	ΣΕΛ.27
8.6. ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗΣ.....	ΣΕΛ.29
8.7. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗΣ	ΣΕΛ.30
8.8. ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΟΚΚΙΩΜΑΤΟΣ.....	ΣΕΛ.31

8.9. ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ.....	ΣΕΛ.32
8.10 ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ.....	ΣΕΛ.34
9. ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΤΟΥ ΕΠΙΔΕΡΜΙΚΟΥ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ (EGFR).....	ΣΕΛ.37
10. ΑΝΑΣΤΟΛΕΑΣ ΤΟΥ EGFR (Erbix/ Cetuximab).....	ΣΕΛ.46
11. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	ΣΕΛ.49
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
A. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	ΣΕΛ.52
1. ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	ΣΕΛ.52
2. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ.....	ΣΕΛ.54
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	ΣΕΛ.55
3.1 ΓΕΝΙΚΟΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ.....	ΣΕΛ.55
3.2 ΥΛΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ	ΣΕΛ.55
3.3 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ (ΓΕΝΙΚΑ)	ΣΕΛ.56
3.4 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ A549	ΣΕΛ.56
3.5 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ SKMES.....	ΣΕΛ.56
3.6 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΓΙΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ.....	ΣΕΛ.56
3.7 ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ	ΣΕΛ. 57
3.8 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΑΝΟΣΟΚΥΤΤΑΡΟΧΗΜΕΙΑΣ.....	ΣΕΛ.57
3.9 ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ	ΣΕΛ.57
4. ΜΕΘΟΔΟΙ	ΣΕΛ.58
4.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΑΝΘΡΩΠΕΙΟΥ ΟΡΟΥ	ΣΕΛ.58
4.2 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ.....	ΣΕΛ.58
4.3 ΕΚΘΕΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΕΙΟ ΟΡΟ.....	ΣΕΛ.59
4.4 ΕΚΘΕΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ A549 ΚΑΙ SKMES ΣΤΟΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ ΤΟΥ EGF _r (CETUXIMAB) ΠΑΡΟΥΣΙΑ Η ΑΠΟΥΣΙΑ ΟΡΟΥ ΑΣΘΕΝΟΥΣ ΜΕ ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ.....	ΣΕΛ.60
4.5 ΕΚΘΕΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ A549 ΚΑΙ SKMES ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ.....	ΣΕΛ. 60

4.6	ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΤΩΝ Α549 ΚΑΙ SKMES ΚΥΤΤΑΡΩΝ	ΣΕΛ.61
4.7	ΑΝΟΣΟΚΥΤΤΑΡΟΧΗΜΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ EGF _r ΣΤΙΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ Α549 SKMES ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΑΒΙΔΙΝΗΣ-ΒΙΟΤΙΝΗΣ-ΑΝΟΣΟΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗΣ	ΣΕΛ.61
4.8	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	ΣΕΛ.64
Β.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	ΣΕΛ.65
1.	Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ IL-1 β , IL-13, IFN- γ ΚΑΙ TNF- α ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΥΚΛΟ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ Α549 ΚΑΙ SKMES	ΣΕΛ.65
2.	Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΝΘΡΩΠΕΙΟΥ ΟΡΟΥ ΣΤΟΝ ΡΥΘΜΟ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ Α549	ΣΕΛ.83
3.	Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΝΘΡΩΠΕΙΟΥ ΟΡΟΥ ΣΤΟΝ ΡΥΘΜΟ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ SKMES.....	ΣΕΛ.89
4.	Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΟΥ EGF [EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR / EGFR (CETUXIMAB)] ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΥΚΛΟ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ Α549 ΚΑΙ SKMES.....	ΣΕΛ.96
5.	ΑΝΟΣΟΚΥΤΤΑΡΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΟΥ EGF [EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR / EGFR] ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ Α549 ΚΑΙ SKMES.....	ΣΕΛ.102
Γ.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	ΣΕΛ.106
Δ.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	ΣΕΛ.107
Ε.	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	ΣΕΛ.117
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	ΣΕΛ.121

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή

Έχει αναγνωρισθεί ότι η απορρύθμιση των μηχανισμών ελέγχου της απόπτωσης (προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου) και του κυτταρικού κύκλου ενέχονται στην ογκογένεση και στην φλεγμονή. Ο κυτταρικός κύκλος και η απόπτωση διατηρούν την κυτταρική ομοιόσταση, χρησιμοποιώντας εν μέρει, αλληλοεξαρτώμενες ρυθμιστικές οδούς (π.χ. η πρωτεΐνη p53 συμμετέχει στην απόπτωση αλλά και στον κυτταρικό κύκλο). Κατά συνέπεια η τελική κατάληξη (πολλαπλασιασμός ή απόπτωση), καθορίζεται από τη δυναμική σχέση των διαδικασιών κυτταρικής αύξησης/πολλαπλασιασμού και των μηνυμάτων κυτταρικής επιβίωσης. Η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και του κυτταρικού θανάτου υπό την επίδραση μεσολαβητών ευοδωτικών ή κατασταλτικών της φλεγμονής (κυτταροκίνες, χημειοκίνες) δεν έχει αποσαφηνιστεί. Η παρούσα διατριβή προσπάθησε να ασχοληθεί με κάποια από αυτά τα ερωτήματα. Στόχος της, είναι να βοηθήσει στη διαδικασία αποκωδικοποίησης της πιθανής συμβολής των κυτταροκινών στον κυτταρικό κύκλο και ειδικότερα στον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων. Επιλέξαμε να εξετάσουμε τις πιο αντιπροσωπευτικές από αυτές. Συμπληρωματικά, επιλέξαμε συγχρόνως να μελετήσουμε και την επίδραση που ενδεχομένως να έχουν ορισμένα χρόνια φλεγμονώδη νοσήματα. Η προσέγγιση αυτή βασίστηκε στο γεγονός ότι, τα επίπεδα ποικίλλων κυτταροκινών καθώς και άλλων μεσολαβητών της φλεγμονής, είναι σχεδόν πάντοτε διαταραγμένα. Προς το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν οροί αίματος από ασθενείς με σαρκοείδωση, με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια και με καρκίνωμα του πνεύμονα. Στα νοσήματα αυτά οι μεσολαβητές της φλεγμονής δρουν ως ένα «καλοκουρδισμένο» δίκτυο, το οποίο δεν είναι εύκολο να αναπαραχθεί με τη διαδικασία της προσομοίωσης σε ένα εργαστήριο. Εντούτοις, οι τεχνικές που χρησιμοποιήσαμε στην έρευνα μας όπως θα φανεί και στη συνέχεια επιτυγχάνουν στο μέγιστο δυνατό πραγματικές συνθήκες πλησιάζοντας πολύ στον τρόπο που λειτουργεί ο ανθρώπινος οργανισμός.

2. Κυτταρική σειρά A549

Η κυτταρική αυτή σειρά δημιουργήθηκε το 1972 από τον Δρ. J. Giard, κατόπιν λήψης κακοήθους πνευμονικού ιστού (αδενοκαρκίνωμα) από έναν λευκό άντρα ηλικίας 58 ετών και καλλιέργειάς του σε τεχνητό μέσο (Giard et al, 1973). Τα καρκινικά κύτταρα A549 έχουν μορφολογία παρόμοια με εκείνη των επιθηλιακών κυττάρων. Αναπτύσσονται προσκολλώμενα στο υπόστρωμα και μεγαλώνουν σε ένα στίχο κύτταρων. Ακόμη συνθέτουν λεκιθίνη με υψηλό ποσοστό ακόρεστων λιπαρών οξέων χρησιμοποιώντας το μονοπάτι της κυστιδίνης-διφωσφοχολίνης (Lieber et al, 1976). Άλλα χαρακτηριστικά των A549 κυττάρων είναι η έκφραση των υποδοχέων των αυξητικών παραγόντων όπως ο EGF α (Mukuhara et al, 2005 & Zhao YX et al, 2006) ή κυτταροκινών όπως ο TNF- α (Lee IT et al, 2010) ή υποδοχέων ποικίλων κυτταροκινών μεταξύ των οποίων ο υποδοχέας της οικογένειας IL-1 (Nakane et al, 1990). Επιπλέον εκφράζουν νικοτινικούς (Zhang Q et al, 2007) καθώς και σεροτονινεργικούς υποδοχείς (Bayer et al, 2006).

Τα A549 κύτταρα χαρακτηρίζονται και ως τύπου II επιθηλιακά πνευμονοκύτταρα, αφού εμφανίζουν μεταβολικές ιδιότητες αλλά και ιδιότητες μεταφοράς παρόμοιες με αυτές των επιθηλιακών πνευμονοκυττάρων τύπου II *in vivo* (Kimberly et al, 1998). Για το λόγο αυτό, έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς ως πειραματικό μοντέλο για τη μελέτη της κυψελιδικής αντίδρασης έναντι μικροοργανισμών, σωματιδίων και μακρομορίων.

Η καρκινική σειρά A549 αποτελεί ίσως το πιο διαδεδομένο πειραματικό μοντέλο διερεύνησης φαρμακευτικών εφαρμογών. Έχει χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη των μηχανισμών κινητικής φαρμάκων χορηγούμενων δια της αναπνευστικής οδού. Επίσης, έχει χρησιμοποιηθεί στη μελέτη του μεταβολισμού αλλά και της κατανομής φαρμάκων στο αναπνευστικό επιθήλιο (Kimberly et al, 1998). Πιο πρόσφατα έχει χρησιμοποιηθεί στη διερεύνηση των συνεπειών εισπνοής αερολυμάτων (Forbes et al, 2005) αλλά και στον πειραματικό σχεδιασμό ανακάλυψης νέων φαρμάκων κατά του καρκίνου του πνεύμονα (Wang et al, 2006 & Yi-Fan Hsu et al, 2010). Άλλες εφαρμογές αυτής της κυτταρικής σειράς

είναι στη μελέτη των μηχανισμών που εμπλέκονται στο οξειδωτικό στρες (Brown DM et al, 2007), των μηχανισμών αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Lu XD et al, 2009) και στη μελέτη του ρόλου των προσταγλανδινών στην κυτταρική μετανάστευση (Kim et al, 2010). Τέλος, έχει χρησιμοποιηθεί και σε μελέτες πρωτεομικής που σχετίζονται με την κυτταρική μετανάστευση (Lu QY et al, 2009).

3. Κυτταρική σειρά SKMES

Η κυτταρική αυτή σειρά όπως και η κυτταρική σειρά A549 χρησιμοποιείται καθαρά για ερευνητικούς σκοπούς. Η κυτταρική σειρά SKMES προέρχεται από κακοήγη πνευμονικό ιστό λευκού άνδρα 65 ετών και συγκεκριμένα πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα. Τα SKMES καρκινικά κύτταρα είναι επιθηλιακού τύπου και έχουν χρησιμοποιηθεί σε πολλές ερευνητικές μελέτες κυρίως στον τομέα των φαρμάκων.

Μια από τις πρώτες εφαρμογές της κυτταρικής σειράς SKMES είναι η μελέτη της δράσης των ογκογονιδίων (Robinson et al, 1995) αλλά και η μελέτη της κυτταροτοξικότητας της αντικαρκινικής δράσης και της βιοδιανομής διαφόρων ουσιών *in vitro* (Zhang et al, 1997). Ακόμη, η κυτταρική αυτή σειρά έχει χρησιμοποιηθεί για μελέτες που αφορούν στην επίδραση των ρετινοειδών στον κυτταρικό κύκλο και συγκεκριμένα στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων *in vitro* (Lee et al, 1997). Επίσης, τα κύτταρα αυτά έχουν χρησιμοποιηθεί σε μελέτες σχετικά με την απορρόφηση ή τη συσσώρευση ή τη δράση φαρμάκων και τους μηχανισμούς δράσης αυτών (Cleary et al, 1997 & Graves et al, 1997 & Sands et al, 2002 & Murphy et al, 2008 & Breen et al, 2008 & Safarpour et al, 2009). Άλλη εφαρμογή της κυτταρικής σειράς SKMES αφορά στη μελέτη γονιδίων που η έκφραση τους διαφοροποιείται στον καρκίνο του πνεύμονα (Botti et al, 2000).

4. Κυτταρικός κύκλος

Η έναρξη του κυτταρικού κύκλου του φυσιολογικού κυττάρου συνήθως πυροδοτείται από ένα εξωκυττάριο μιτογόνο ερέθισμα (π.χ. αυξητικό παράγοντα), το οποίο ενεργοποιεί μια σειρά από ενδοκυττάρια βιοχημικές μεταβολές που καλούνται «οδοί μεταγωγής σήματος». Τα σημαντικά μόρια των θετικών ρυθμιστικών μηχανισμών των φάσεων του κυτταρικού κύκλου είναι μια ομάδα σερίνο- θρεονινο- κινασών οι οποίες καλούνται κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες (Cyclin Dependent Kinases- CDKs). Οι καταλυτικές υπομονάδες αυτών των κινασών (CDKs) είναι ενεργές μόνο όταν σχηματίσουν συμπλέγματα με μέλη μιας κατηγορίας ρυθμιστικών μορίων, τα επίπεδα των οποίων μεταβάλλονται κατά τη διάρκεια του κύκλου και για αυτό καλούνται κυκλίνες (Cyclins). Τα ενεργά αυτά συμπλέγματα δρουν σε συγκεκριμένες φάσεις του κύκλου, κατά τις οποίες φωσφορλιώνουν τα κατάλληλα υποστρώματα.

Εκτός από τη δράση των θετικών ρυθμιστικών μηχανισμών, το κύτταρο έχει αναπτύξει και αρνητικούς μηχανισμούς ρύθμισης και μηχανισμούς ελέγχου (checkpoints) του κυτταρικού κύκλου οι οποίοι επιτρέπουν, αφενός μεν κάτω από ορισμένες συνθήκες τη διαφοροποίηση του κυττάρου, αφετέρου δε την άμυνα του κυττάρου στο γενεοτοξικό stress του περιβάλλοντος, το οποίο μπορεί να προκαλέσει είτε βλάβη του DNA, είτε διαταραχή στο σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου. Αν συμβούν τέτοιες διαταραχές, αυτές οδηγούν σε γονιδιακές μεταλλάξεις και γενομική αστάθεια (genomic instability), οι οποίες με τη σειρά τους, αν δε διορθωθούν, μπορεί να οδηγήσουν το κύτταρο σε απόπτωση (τύπος προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου) ή σε κακοήγη νεοπλασματική εκτροπή. Στα καρκινικά κύτταρα ο κυτταρικός κύκλος έχει «τροποποιηθεί». Αυτό ερμηνεύεται ως διαφορετική ρύθμιση και λειτουργία με αποτέλεσμα να παρατηρείται ανεξέλεγκτος κυτταρικός πολλαπλασιασμός. Μεταξύ των μορίων που ενοχοποιούνται για την διαδικασία της καρκινογένεσης είναι και οι κυτταροκίνες.

5. Κυτταροκίνες

Οι κυτταροκίνες είναι μόρια πρωτεϊνικής προέλευσης που ρυθμίζουν την ένταση τη διάρκεια των ανοσοαπαντήσεων, τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των λευκοκυττάρων και συμμετέχουν στα δίκτυα ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης. Συμμετέχουν στους μηχανισμούς επιβίωσης τόσο των φυσιολογικών όσο και των νεοπλασματικών κυττάρων.

Οι κυτταροκίνες είναι πρωτεΐνες εξωκυτταρικής σηματοδότησης, με μοριακό βάρος ως επί το πλείστον κοντά στα 80 kDa, παράγονται από διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους και εμπλέκονται στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων. Επηρεάζουν κυρίως τα παρακείμενα (γειτονικά) κύτταρα και γι' αυτό το λόγο δρουν κυρίαρχα με παρακρινικό τρόπο. Ωστόσο μπορούν να δράσουν και σε κύτταρα που βρίσκονται σε μεγάλη απόσταση (ενδοκρινική δράση) αλλά και να επηρεάσουν το ίδιο το κύτταρο που τις παρήγαγε (αυτοκρινική δράση).

Οι κυτταροκίνες, σπανίως παράγονται μεμονωμένες. Συνήθως παράγονται μαζί με άλλες σε μοτίβα χαρακτηριστικά της εκάστοτε νόσου. Υπάρχει μεγάλο εύρος πλειοτροπίας και ένα στοιχείο αυτής είναι ότι κάθε κυτταροκίνη έχει πολλές αλληλεπικαλύπτουσες λειτουργίες, με κάθε λειτουργία της να δύναται να τελεστεί από περισσότερες από μια κυτταροκίνες. Ωστόσο, οι δράσεις μιας κυτταροκίνης μπορούν να επηρεασθούν από άλλες κυτταροκίνες που απελευθερώνονται ταυτόχρονα από το ίδιο κύτταρο ή από τα κύτταρα-στόχους που ενεργοποιήθηκαν από αυτή, προάγοντας είτε συνεργιστικές είτε ανταγωνιστικές δράσεις. Οι δράσεις των κυτταροκινών διαμεσολαβούνται από την υψηλής συγγένειας δέσμευσή τους στους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας, οι οποίοι βρίσκονται συνήθως σε χαμηλές συγκεντρώσεις, αλλά που μπορούν να αυξηθούν με την ενεργοποίηση του κυττάρου.

Οι ίδιες οι κυτταροκίνες μπορούν να επάγουν την έκφραση υποδοχέων, οι οποίοι στη συνέχεια μεταβάλλουν την ευαισθησία και του αρχικού κυττάρου αλλά και

του κυττάρου-στόχου. Από την άλλη πλευρά, μερικές κυτταροκίνες μπορούν να προκαλέσουν την ίδια τους την παραγωγή με έναν αυτοκρινικό μηχανισμό, ενώ κάποιες άλλες επάγουν την σύνθεση διαφορετικών κυτταροκινών που έχουν θετική ανάδραση στις πρώτες με αποτέλεσμα να ενισχύεται η δράση τους.

Οι κυτταροκίνες ομαδοποιούνται συνήθως βάσει της δράσης τους στη διαδικασία της φλεγμονής. Υπάρχουν κυτταροκίνες που προάγουν αμιγώς τη φλεγμονή και ονομάζονται «προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες», ενώ εκείνες που καταστέλλουν τη δραστηριότητα των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών ονομάζονται «αντι-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες». Η ισορροπία μεταξύ προ-φλεγμονωδών και αντι-φλεγμονωδών κυτταροκινών παίζει σημαντικό ρόλο στη παθογένεια μιας νόσου και θεωρείται ότι καθορίζει την έκβαση της είτε βράχυ- είτε μακροπρόθεσμα. Ακόμη, αρκετές μελέτες υποστηρίζουν ότι η ευπάθεια ως προς ορισμένες νόσους, είναι γενετικά καθορισμένη από την ισορροπία ή την έκφραση των προ-φλεγμονωδών ή των αντι-φλεγμονωδών κυτταροκινών. Η πιθανή αυτή συμβολή των κυτταροκινών στις διάφορες ασθένειες έχει μελετηθεί χρησιμοποιώντας ανταγωνιστές κυτταροκινών, που εμποδίζουν τις δράσεις συγκεκριμένων κυτταροκινών, αλλά και μέσω της υπερέκφρασης και απαλοιφής τους σε διαγονιδιακά ζώα (ποντίκια) και σε γενετικές μελέτες.

Σε νοσήματα που χαρακτηρίζονται από χρόνια φλεγμονή, παρατηρούνται διαταραχές των επιπέδων (αυξήσεις ή μειώσεις) ορισμένων κυτταροκινών είτε τοπικά στο σημείο της φλεγμονής είτε στα διάφορα υγρά του ανθρώπινου σώματος όπως στο πλάσμα του αίματος, στο βρογχοκυψελικτικό έκπλυμα και στα πτύελα. Σε τοπικό επίπεδο παρατηρούνται διαφορές της έκφρασης των κυτταροκινών τόσο από τον ίδιο τον ιστό όσο και από τα διάφορα κύτταρα του αμυντικού μηχανισμού του οργανισμού που συγκεντρώνονται στο σημείο της φλεγμονής (π.χ. μακροφάγα).

5.1. Κυτταροκίνη IL-1β (Interleukin-1b)

Η κυτταροκίνη IL-1β ανήκει στην οικογένεια των κυτταροκινών IL-1. Υπάρχουν 3 είδη γονιδίων στην οικογένεια αυτή: το γονίδιο *IL-1a*, το *IL-1β* και ο ανταγωνιστής του υποδοχέα IL-1 το γονίδιο *IL-1Ra*. Οι κυτταροκίνες *IL-1a* και *IL-1β* είναι αγωνιστές, ενώ η κυτταροκίνη *IL-1Ra* είναι ειδικός ανταγωνιστής του υποδοχέα IL-1. Υπάρχουν δύο IL-1 υποδοχείς (IL-1R): ο υποδοχέας τύπου I (IL-1RI) που μεταδίδει το σήμα και ο υποδοχέας τύπου II (IL-1RII) που προσδένει την IL-1 αλλά δε μεταδίδει το σήμα. Στην πραγματικότητα λειτουργεί σαν «φρεάτιο» για την IL-1β και έχει ονομαστεί υποδοχέας «παγίδα», κάτι που είναι μοναδικό στην βιολογία των κυτταροκινών. Όταν η IL-1 προσδένεται στον υποδοχέα IL-1RI, σχηματίζεται ένα σύμπλοκο, που έπειτα προσδένεται στην παραπληρωματική πρωτεΐνη του IL-1R (IL-1R-AcP), με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται ένας δεσμός υψηλότερης συγγένειας. Είναι πιθανό ότι ο ετεροδιμερισμός των κυτταροπλασματικών περιοχών των IL-1R και IL-1R-AcP πυροδοτεί τη μετάδοση του σήματος της IL-1. Τα εξωκυττάρια ή τα διαλυτά τμήματα των IL-1RI (IL-s1R) και IL-1RII (IL-1sRII), κυκλοφορούν σε υγρή και σε πάσχοντα άτομα λειτουργώντας σαν φυσικά ρυθμιστικά διαλύματα που προσδένουν τις *IL-1a*, *IL-1β* και *IL-1Ra*. Επιπροσθέτως, υπάρχουν διάφορες κυτταροκίνες που ασκούν αρνητική επιρροή τόσο στην παραγωγή όσο και στην δραστηριότητα της IL-1.

Σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις παρατηρείται αύξηση των επιπέδων της IL-1β και όχι της IL-1a στην κυκλοφορία του αίματος. Η ανίχνευση της IL-α θεωρείται σπάνια διότι η κυτταροκίνη αυτή εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα και απελευθερώνεται σε ασυνήθιστες *in vitro* ή/ και *in vivo* συνθήκες (κυρίως στον κυτταρικό θάνατο). Ωστόσο, τα επίπεδα της IL-β στην κυκλοφορία είναι χαμηλότερα σε σχέση με εκείνα παραδείγματος χάρη των IL-6, IL-8 και TNF-α. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι, η IL-6 συνδέεται με μεγάλες πρωτεΐνες όπως η α2-μακροσφαιρίνη, το συμπλήρωμα και ο διαλυτός υποδοχέας τύπου II της IL. Διαταραχές στα επίπεδα της IL-1β σημειώνονται και στην χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια που χαρακτηρίζεται από χρόνια φλεγμονή αλλά και στη σαρκοείδωση, ένα συστηματικό νόσημα που και αυτό χαρακτηρίζεται

από την ύπαρξη χρόνιας φλεγμονής. Τέλος, μεταξύ των νοσημάτων που εμπλέκεται η δράση της IL-1β είναι και ο καρκίνος, όπου από την μια πλευρά ευνοεί την ανάπτυξη νεοπλασίας (λόγω χρόνιας φλεγμονής) και από την άλλη όταν ήδη υπάρχει κακοήθεια ευνοεί την επέκτασή της (Ron n Arpte et al, 2006 & Charles Dinarello, 1996 & Daniel N. Sauder, 1989).

5.2. Παράγοντας Νέκρωσης Ογκών-α (TNF-α/ Tumor Necrosis Factor α)

Η κυτταροκίνη TNF-α είναι μια πρωτεΐνη 185 αμινοξέων γλυκοζυλιωμένη στις θέσεις 73 και 172, που παράγεται από διάφορους κυτταρικούς τύπους, αλλά κυρίως από ενεργοποιημένα μονοκύτταρα, ινοβλάστες και από ενδοθηλιακά κύτταρα. Υπάρχουν 2 υποδοχείς για την TNF, ο p55 υποδοχέας ή TNFR1 και ο p75 υποδοχέας ή TNFR2. Παρόλο που ο TNF δεσμεύεται και ενεργοποιεί και τους δύο υποδοχείς, η κυτταροπλασματική περιοχή αυτών των υποδοχέων επιστρατεύει διαφορετικές πρωτεΐνες που μεταβιβάζουν περαιτέρω το σήμα του. Στη μια περίπτωση, η κυτταροπλασματική περιοχή του p55 υποδοχέα συνδέεται με μονοπάτια κυτταρικού θανάτου, ενώ η κυτταροπλασματική του p75 υποδοχέα όχι. Παρόλα αυτά και οι δύο υποδοχείς προσδένονται στον NF-κΒ και τον μετατοπίζουν στον πυρήνα, και ο οποίος NF-κΒ με τη σειρά του προσδένεται στους υποκινητές πολλών γονιδίων. Τα γονιδιακά προϊόντα που ακολουθούν είναι συχνά όμοια με αυτά που παράγονται μετά από μεταγωγή σήματος από την IL-1, η οποία επίσης προκαλεί μετατόπιση του NF-κΒ στον πυρήνα. Η διαφορά μεταξύ των δύο αυτών υποδοχέων, έγκειται στο γεγονός ότι οι κυτταροπλασματικές περιοχές του υποδοχέα p55 TNF (TNFR) έχουν τη μοναδική ικανότητα να ενεργοποιούν ενδοκυττάρια σήματα που οδηγούν στην απόπτωση. Ο TNF-α παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές φλεγμονώδεις παθήσεις του πνεύμονα και τα υψηλά επίπεδα του συνδέονται με παθολογικές καταστάσεις, όπως το άσθμα, η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια και η σαρκοειδωση (Wajant H. et al, 2003 & Srirupa Mukhopadhyay et al, 2006).

5.3. Κυτταροκίνη IL-13 (Interleukin-13)

Η κυτταροκίνη IL-13, που αποτελεί έναν ισχυρό *in vitro* τροποποιητή των ανθρωπίνων μονοκυττάρων και της λειτουργίας των Β λεμφοκυττάρων, εκκρίνεται από τα Τ λεμφοκύτταρα. Είναι μια μη γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη 132

αμινοξέων με μοριακό βάρος περίπου 10 kd. Το ανθρώπινο γονίδιο της IL-13, που περιλαμβάνει 4 εξώνια και 3 εσόνια, έχει χαρτογραφηθεί πολύ κοντά στο γονίδιο της IL-4 στο μεγάλο βραχίονα του 5^{ου} χρωμοσώματος και θεωρείται ότι υπάρχει μια κοινή αρχέγονη προέλευση. Η IL-13 και η IL-4 μοιράζονται έναν κοινό κυτταρικό υποδοχέα (υποδοχέας IL-4 τύπου 1), οποίος ευθύνεται για πολλές ομοιότητες μεταξύ αυτών των δύο αντι-φλεγμονωδών κυτταροκινών. Αν και οι δύο αυτές κυτοκίνες παρουσιάζουν πολλές δομικές ομοιότητες, έχουν μερικές σημαντικές διαφορές. Μια ειδοποιός διαφορά είναι ότι η IL-4 είναι ειδική του κάθε είδους, ενώ η IL-13 όχι, δηλαδή η ανθρώπινη IL-4 δρα μόνο σε ανθρώπινα κύτταρα και η IL-4 του ποντικού δρα μόνο σε κύτταρα ποντικού. Η IL-13 του ποντικού όμως μπορεί να δράσει είτε σε ανθρώπινα κύτταρα είτε σε κύτταρα ποντικού. Παρόλα αυτά, η IL-13 φαίνεται να είναι επιλεκτική του είδους, διότι η IL-13 του ανθρώπου έχει μεγαλύτερη δραστικότητα στα ανθρώπινα κύτταρα από ότι στα κύτταρα ποντικού.

Οι ουσιαστικές λειτουργικές διαφορές μεταξύ των IL-4 και IL-13, σχετίζονται με τις δράσεις τους στα T κύτταρα. Η IL-4 είναι ο επικρατής τροποποιητής για την διαφοροποίηση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και δραστηριότητα των Th2 κυττάρων, ενώ η IL-13 έχει μηδαμινές επιδράσεις στη λειτουργία των T κυττάρων. Στα ανθρώπινα B λεμφοκύτταρα, η ανθρώπινη IL-13 έχει παρόμοιες δράσεις με την IL-4, προάγοντας τον πολλαπλασιασμό των B λεμφοκυττάρων. Από την άλλη, αναστέλλει την παραγωγή των προ-φλεγμονωδών μεσολαβητών από τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα συμπεριλαμβανομένου των TNF- α , IL-1, IL-8, και MIP-1a των μονοκυττάρων, ενώ έχει βαθύτατες επιδράσεις στην έκφραση των μορίων επιφανείας των μονοκυττάρων και των μακροφάγων. Η IL-13 αυξάνει την έκφραση στην επιφάνεια των κυττάρων, των b2 ιντεγκρινών και των αντιγόνων του συμπλόκου ιστοσυμβατότητας τύπου II (MHC class II) και μειώνει την έκφραση του CD14 και του Fc γ υποδοχέα. Ακόμη, η IL-13 αναστέλλει την ενεργοποίηση του NF-kB στα μακροφάγα και προστατεύει από την θνητότητα που επάγεται από το LPS στα πειραματικά μοντέλα με πειραματόζωα (Steven M. Opal et al, 2000 & Gurjit K. Khurana, 2003). Επίσης, η IL-13 καταστέλλει τη φλεγμονή μετά από τραυματισμό στον πνεύμονα. Σε ότι αφορά

στα ηωσινόφιλα, έχει άμεσες επιδράσεις, συμπεριλαμβανομένης της προώθησης της επιβίωσης, της ενεργοποίησης και της επιστράτευσης τους.

Πέραν από τις προαναφερθείσες δράσεις της, η IL-13 έχει σημαντικές επιδράσεις και σε μη αιμοποιητικά κύτταρα, όπως τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα κύτταρα των λειών μυϊκών ινών, τους ινοβλάστες και τα επιθηλιακά κύτταρα. Ειδικότερα, στα ενδοθηλιακά κύτταρα η IL-13 αποτελεί ισχυρό επαγωγέα του ενδοθηλιακού κυτταρικού μορίου προσκόλλησης 1, το οποίο είναι πολύ σημαντικό στην στρατολόγηση των ηωσινόφιλων. Στα λεία μυϊκά κύτταρα προάγει την πολλαπλασιασμό και την χολινεργική επαγόμενη συστολή τους, ενώ στους ινοβλάστες του δέρματος προκαλεί την σύνθεση του κολλαγόνου τύπου I. Στα επιθηλιακά κύτταρα από την άλλη, η IL-13 χαρακτηρίζεται ως ένας πολύ ικανός επαγωγέας της έκφρασης των χημειοκινών, μεταβάλλει την διαφοροποίηση και μειώνει τη συχνότητα παλμού των κροσσών των κροσσωτών επιθηλιακών κυττάρων και οδηγεί σε μεταπλασία των καλυκοειδών κυττάρων.

Εν τέλει, η IL-13 έχει συσχετισθεί με διάφορα νοσήματα, όπως το αλλεργικό άσθμα και η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) όπου παρατηρείται αύξηση των επιπέδων της. Επίσης, αυξημένη έκφραση της IL-13 παρατηρείται στους ασθενείς με σαρκοείδωση (HP Hauber et al, 2002).

5.4. Ιντερφερόνη γ (Interferon-γ IFN-γ)

Η ιντερφερόνη γ ανήκει στην υποκατηγορία των κυτταροκινών που ονομάζονται ιντερφερόνες, οι οποίες διακρίνονται σε δύο υποομάδες: στις ιντερφερόνες τύπου I και II. Οι ιντερφερόνες τύπου I περιλαμβάνουν της ιντερφερόνες α και β, οι οποίες σχετίζονται δομικά και προσδένονται σε έναν κοινό ετεροδιμερή υποδοχέα, τον IFNRA (που αποτελείται από τις αλυσίδες IFNARI και IFNRAII. Παρά το γεγονός ότι οι ιντερφερόνες τύπου I εκκρίνονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις από σχεδόν όλους τους κυτταρικούς τύπους, τα αιμοποιητικά κύτταρα είναι οι κύριοι παραγωγοί της IFN-α, ενώ οι ινοβλάστες της IFN-β αν και με το κατάλληλο ερέθισμα η IFN-β μπορεί να παραχθεί από τα μακροφάγα. Το κλασικό ερέθισμα για την παραγωγή τόσο της IFN-α όσο και της IFN-β είναι ιογενής μόλυνση.

Από την άλλη πλευρά η IFN- γ είναι η μοναδική ιντερφερόνη τύπου II. Δε σχετίζεται δομικά με τις ιντερφερόνες τύπου I, προσδένεται σε διαφορετικό υποδοχέα και κωδικοποιείται από διαφορετικό χρωμοσωμικό τόπο (Kate Shroder et al, 2004). Το γονίδιο που την κωδικοποιεί αποτελείται από τέσσερα εξόνια και τρία ιντρόνια και εντοπίζεται στο 12ο χρωμόσωμα. Η IFN- γ είναι μια αλληλουχία 166 αμινοξέων, από την οποία τα 23 αντιπροσωπεύουν μια υδροφοβική αλληλουχία σηματοδότησης και η πρωτεΐνη αυτή φαίνεται να υφίσταται λειτουργικά ως ένα μη ομοιοπολικό ομοδιμέρες μόριο (Howard Young et al, 1995). Η παραγωγή της IFN- γ ελέγχεται από άλλες κυτταροκίνες, οι οποίες μπορούν είτε να προάγουν την παραγωγή της, όπως οι IL-12 και IL-18, είτε να την καταστέλλουν. Αρνητικοί ρυθμιστές της σύνθεσης IFN- γ είναι οι IL-4, η IL-10, TGF- β και τα γλυκοκορτικοειδή. Ρόλος της IFN- γ είναι να ενορχηστρώνει την προσέλκυση των λευκοκυττάρων και κατευθύνει την ανάπτυξη, την ωρίμανση και την διαφοροποίηση πολλών κυτταρικών τύπων (Kate Shroder et al, 2004).

6. Καρκίνωμα του πνεύμονα

6.1. Επιδημιολογία

Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα υγείας που παρατηρούνται σήμερα στις αναπτυγμένες χώρες. Επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου μετά τις καρδιοπάθειες. Παγκοσμίως, ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί την πιο κοινή αιτία θανάτου από καρκίνο τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες. Στην Ευρώπη, είναι υπεύθυνος για το 21% των θανάτων που οφείλονται σε καρκίνο στους άνδρες και για το 29% στις γυναίκες.

Η επίπτωση του καρκίνου του πνεύμονα παρουσίασε ραγδαία αύξηση στις αρχές του αιώνα μέχρι τις αρχές της δεκαετίας του '90 (1990-1994). Έκτοτε, αν και παρατηρείται αισθητή μείωση της επίπτωσης στους άνδρες στην Αμερική και στις περισσότερες ευρωπαϊκές χώρες, στις γυναίκες (ιδίως στις νεαρές ηλικίες) εξακολουθεί να αυξάνεται. Ενδεχομένως δε, η επίπτωση του καρκίνου του πνεύμονα δεν έχει φτάσει στο αποκορύφωμα της σε άλλα μέρη του κόσμου και ειδικά στην Κίνα. Επίσης, έχουν σημειωθεί και αλλαγές στις συχνότητες εμφάνισης των διάφορων ιστολογικών τύπων του καρκίνου του πνεύμονα. Παρά την πληθώρα κλινικών δοκιμών, τις προόδους στις σύγχρονες διαγνωστικές τεχνικές και στην υποστηρικτή φροντίδα των ασθενών, η πρόγνωση παραμένει δυσμενής και τα ποσοστά της μακροπρόθεσμης επιβίωσης δεν έχουν αλλάξει ιδιαίτερα. Συγκεκριμένα, η πενταετής επιβίωση των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα είναι περίπου 15% και το ποσοστό αυτό παραμένει το ίδιο εδώ και τρεις δεκαετίες (Janssen-Hijen MI et al, 2003 & AIRT working Group 2006 & Kosacka M et al, 2007 & Jay M et al, 2008 & Bray FL et al, 2010 & Jemal A et al, 2010).

6.2. Παθογενετικοί παράγοντες και καρκίνος του πνεύμονα.

Το κάπνισμα είναι ο κύριος ενοχοποιητικός παράγοντας για τη θνητότητα κάθε αιτιολογίας και σε αυτόν οφείλεται το ένα πέμπτο των θανάτων που σχετίζονται με καρκίνο (Bray FL et al, 2010). Σε μια μελέτη που έλαβαν μέρος περισσότεροι από 5000 ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα διαγνωσθέντα μεταξύ 1997 και 2002, το 25% ήταν καπνιστές, και το 60% πρώην καπνιστές. Συνεπώς το 85% των περιπτώσεων αφορούσε σε όγκους του πνεύμονα που σχετιζόνταν με τη συνήθεια του καπνίσματος (Julian R. Molina et al, 2008)! Το Lung Cancer Group του Εδιμβούργου αναφέρει χαρακτηριστικά ότι από 3070 νέους ασθενείς μόνο το 2% δεν ήταν ποτέ καπνιστές. Επιπλέον, αιτιολογική συσχέτιση μεταξύ παθητικού καπνίσματος και καρκίνου του πνεύμονα ενδεχομένως να υφίσταται στο 1.6% των περιπτώσεων (Boffeta P., 2006). Επιπροσθέτως, τα αποτελέσματα μιας μετά-ανάλυσης (Hackshaw AK et al, 1997) και μιας συστηματικής επισκόπησης (Whitrow MJ et al, 2003) έδειξαν την ύπαρξη ενός σχετικού κινδύνου ανάμεσα σε 1.14 και σε 5.20 σε άτομα που δεν κάπνισαν ποτέ αλλά είχαν ζήσει με έναν καπνιστή. Μια πιο πρόσφατη μελέτη, αναφέρει ότι το παθητικό κάπνισμα κατά την παιδική ηλικία προκαλεί αύξηση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα κατά 3.6 φορές (Vineis P. et al, 2005). Τέλος, βάσει κάποιων ερευνών, η επικινδυνότητα εμφάνισης της νόσου από το κάπνισμα σιγαρέτων (με μικρότερη περιεκτικότητα σε νικοτίνη) δε φαίνεται να διαφοροποιείται από το κάπνισμα πίπας ή πούρου (Shaper AG et al, 2003 & Henley SJ et al, 2004).

Επίσης ορισμένα επαγγέλματα προδιαθέτουν στην εμφάνιση του καρκίνου του πνεύμονα. Αυτό συμβαίνει επειδή εκθέτουν τους εργαζόμενους σε καρκινογόνες ουσίες. Το διοξείδιο του πυριτίου κρυσταλλικής μορφής και ο αμιάντος είναι γνωστά καρκινογόνα για τον άνθρωπο. Επομένως, είναι αναμενόμενο, οι εργαζόμενοι που εκτίθενται σε σκόνη του διοξειδίου του πυριτίου και σε ίνες αμιάντου να αντιμετωπίζουν μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Ακόμη, είναι γνωστό ότι και οι μεταλλωρύχοι ουρανίου και οι εργαζόμενοι σε πυρηνικά εργοστάσια έχουν περισσότερες πιθανότητες να αναπτύξουν νεοπλασία λόγω της έκθεσής τους σε ραδιενεργά μόρια (Boffetta P, 2004).

Ένας ακόμη παράγοντας που φαίνεται να συμβάλλει στην εμφάνιση της νόσου, είναι η ατμοσφαιρική ρύπανση. Ο καρκίνος του πνεύμονα θα μπορούσε να αποτελεί μια από τις μακροπρόθεσμες επιδράσεις της συσσωρευμένης έκθεσης στον μολυσμένο αέρα του περιβάλλοντος, ο οποίος περιέχει μεγάλες ποσότητες πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων. Οι επιδράσεις αυτές, είναι πολύ πιθανόν να πραγματοποιούνται μέσω του οξειδωτικού στρες και της φλεγμονής. Υπάρχει στατιστικά αποδεδειγμένη διαφορά στη συχνότητα του καρκίνου του πνεύμονα μεταξύ αγροτικών και βιομηχανικών περιοχών. Το ποσοστό των όγκων του πνεύμονα που οφείλονται στην αστική ατμοσφαιρική ρύπανση στην Ευρώπη, εκτιμάται ότι είναι της τάξης του 11% (Boffetta P., 2006 & Alfano CM et al, 2004 & Vineis P. et al, 2005).

6.3. Ιστολογική ταξινόμηση του καρκίνου του πνεύμονα

Η ιστολογική ταξινόμηση του καρκίνου του πνεύμονα περιλαμβάνει έξι βασικές κατηγορίες (πίνακας 1):

- 1. Επιθηλιακά νεοπλάσματα**
- 2. Νεοπλάσματα συνδετικού ιστού**
- 3. Μεσοθηλιακά νεοπλάσματα**
- 4. Διάφορα**
- 5. Μεταστατικά νεοπλάσματα**
- 6. Ογκόμορφες (tumor like) βλάβες.**

Από τις κατηγορίες αυτές, τα επιθηλιακά νεοπλάσματα αποτελούν τη συντριπτική πλειοψηφία των όγκων του πνεύμονα. Ο συνηθέστερος διαχωρισμός των επιθηλιακών όγκων είναι η κατάταξη τους σε μη μικροκυτταρικούς (non small cell lung cancer-NSCLC) και σε μικροκυτταρικούς όγκους (small cell lung cancer- SCLC) (πίνακας 2). Ο μη μικροκυτταρικός τύπος αφορά περίπου στο 85% όλων των περιπτώσεων του καρκίνου του πνεύμονα, ενώ ο μικροκυτταρικός τύπος αφορά μόνο στο 15%. Από τις υποκατηγορίες του μη μικροκυτταρικού καρκίνου, το πλακώδες καρκίνωμα αφορά το 30-40% και το αδenoκαρκίνωμα το 25-30% των περιπτώσεων (Stefan Hammerschmed et al, 2009).

Παρόλο που οι κλινικές πορείες αυτών των δύο υποκατηγοριών είναι παρόμοιες, τα αδενοκαρκινώματα εντοπίζονται στην περιφέρεια του πνεύμονα και συχνά εμφανίζουν ενεργές μεταλλάξεις του ογκογονιδίου *K-ras* (Gadzar A.F. et al, 1994 & Graziano SL, et al, 1999). Αντιθέτως, τα πλακώδη καρκινώματα εντοπίζονται κυρίως στο κέντρο στον πνεύμονα και φέρουν συχνότερα μεταλλάξεις που αφορούν στο γονίδιο *P53* (Niklinska W. et al, 2001). Επιπλέον, η αιτιολογία του πλακώδους καρκινώματος συνδέεται πολύ στενά με το κάπνισμα, ενώ η αιτιολογία κάποιων αδενοκαρκινωμάτων παραμένει άγνωστη και είναι η συχνότερη μορφή καρκίνου στους μη καπνιστές (Bennett WP et al, 1999 & Hainaut P et al, 2001).

Πίνακας 1. Κατηγορίες καρκίνου του πνεύμονα

1. Επιθηλιακά νεοπλάσματα
 - a. Καλοήθεις μορφές
 - i. Θηλώματα
 - ii. αδενώματα
 - b. Δυσπλασία και καρκίνωμα in situ
 - c. Κακοήθεις μορφές
 - i. Ακανθοκυτταρικό ή επιδερμοειδές ή πλακώδες καρκίνωμα
 - ii. Μικροκυτταρικό καρκίνωμα
 - iii. Αδενοκαρκίνωμα
 - iv. Μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα
 - v. Αδενοπλακώδες καρκίνωμα
 - vi. Καρκινοειδές
 - vii. Αδενοκυστικό καρκίνωμα
 - viii. Βλεννοεπιδερμοειδές καρκίνωμα
 - ix. Άλλα
2. Νεοπλάσματα συνδετικού ιστού
 - a. Καλοήθεις μορφές
 - i. Λιπώματα
 - ii. Ινώματα
 - iii. Νευρινώματα
 - iv. Λεμφαγγειώματα
 - v. Αιμαγγειώματα
 - vi. Μυοβλαστώματα
 - vii. Χονδρώματα
 - viii. Άλλα
 - b. Κακοήθεις μορφές
 - i. Σαρκώματα
 - ii. Αιμαγγειοπερικυτώματα
 - iii. Πλασμοκυτώματα
3. Μεσοθηλιακά νεοπλάσματα
 - a. Καλοήθη μεσοθηλιώματα
 - b. Κακοήθη μεσοθηλιώματα
4. Διάφορα
 - a. Καλοήθεις μορφές
 - b. Κακοήθεις μορφές
 - i. Καρκινοσαρκώματα
 - ii. Πνευμονικά βλαστώματα
 - iii. Κακοήθη μελανώματα
5. Μεταστατικά νεοπλάσματα
6. Ογκόμορφες (tumor like) βλάβες
 - a. Σκληρυντικά αιμαγγειώματα
 - b. Φλεγμονώδεις ψευδοόγκοι
 - c. Άλλα

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Κατηγορίες επιθηλιακών καρκίνων του πνεύμονα

1. Μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα
2. Μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα
 - a. Επιδερμοειδές καρκίνωμα
 - b. Αδενοκαρκίνωμα
 - c. Αδενοπλακώδες καρκίνωμα
 - d. Αναπλαστικό μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα
3. Καρκινοειδής όγκος του πνεύμονα
 - a. Καλοήθης
 - b. Κακοήθης

6.4. Καρκίνος του πνεύμονα και φλεγμονή.

Η φλεγμονή θεωρείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση. Υπάρχουν πολλές μελέτες που υποστηρίζουν ότι η φλεγμονή των αεραγωγών η προκαλούμενη από το κάπνισμα, αυξάνει σημαντικά τις πιθανότητες εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα στους καπνιστές (Brody JS et al, 2006 & Smith CJ et al , 2006). Βέβαια, ο λειτουργικός ρόλος της χρόνιας φλεγμονής στον καρκίνο δεν αποτελεί νέα είδηση. Το 1863, ο Rudolf Virchow υπέθεσε ότι ορισμένες ερεθιστικές ουσίες που συσχετίζονται με τον ιστικό τραυματισμό και την επακόλουθη κυτταρική φλεγμονή, πιθανόν να παίζουν κάποιο ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην ανάπτυξη νεοπλασίας.

Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει εκτενής έρευνα σε αυτό το πεδίο και έχει καταστεί σαφές ότι ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός από μόνος του δεν μπορεί να παράξει καρκίνο. Ατέρμονη ικανότητα κυτταρικού πολλαπλασιασμού μπορεί να επιτευχθεί σε ένα περιβάλλον πλούσιο σε φλεγμονώδη κύτταρα, όπου παράγονται άφθονες ελεύθερες ρίζες οι οποίες με τη σειρά τους προάγουν αδιάκοπη βλάβη στο DNA, απενεργοποίηση της απόπτωσης, αύξηση της έκφρασης των αυξητικών παραγόντων/ κυτταροκινών και ενεργοποίηση των

αυξητικών βοηθητικών γονιδίων, με τελικό αποτέλεσμα την καρκινογένεση (Cook et al, 2004).

Η αιτία της φλεγμονής μπορεί να είναι κάποια λοίμωξη ή κάποια μη λοιμογόνος φυσική και/ ή χημική ερεθιστική ουσία (Philip M, et al, 2004). Υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι οι λοιμώξεις των ιστών που συνοδεύονται από χρόνια φλεγμονή, ευθύνονται για το ένα τρίτο όλων των γνωστών καρκίνων (Ames et al, 1995). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί στον γαστρεντερικό σωλήνα, η λοίμωξη από το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού, η οποία φέρεται ως η πρωταρχική αιτία του αδενοκαρκινώματος του στομάχου (Coussens LM et al, 2002 & Macarthur M., et al, 2004). Από την άλλη πλευρά, και η χρόνια φλεγμονή που δεν οφείλεται σε λοίμωξη μπορεί επίσης να συμβάλλει στην καρκινογένεση. Μελέτες επισημαίνουν την πιθανότητα αυξημένου κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα σε φλεγμονώδεις νόσους όπως η σαρκοείδωση (Askling J. et al, 1999).

Η εμφάνιση μεγάλου αριθμού όγκων σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς δείχνει ότι το αμυντικό σύστημα παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο ανάπτυξης όγκων. Η σημασία της ανοσολογικής εποπτείας στον έλεγχο της ανάπτυξης καρκίνου δεν έχει μελετηθεί επαρκώς. Τόσο τα αρμόδια κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος όσο και τα καρκινικά κύτταρα εκκρίνουν πολλές κυτταροκίνες, οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση της κυτταρικής και χυμικής δραστηριότητας. Οι κυτταροκίνες διαμεσολαβούν σε πολυάριθμες φυσιολογικές και ανοσολογικές αντιδράσεις, οι οποίες συμμετέχουν σε ποικίλες βιολογικές ενέργειες, συμπεριλαμβανομένης της καρκινογένεσης. Πληθώρα ερευνών δείχνουν μεταβολές στα επίπεδα των προ- φλεγμονωδών και αντι-φλεγμονωδών κυτταροκινών των ατόμων που πάσχουν από καρκίνο του πνεύμονα, τόσο στο μικροπεριβάλλον του όγκου (ιστός), όσο στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα/ BAL (bronchioalveolar lavage) αλλά και στο πλάσμα του αίματος (De Vita F. et al, 1998 & Tas F. et al, 2005 & Lindsey Enewold et al, 2009 & D. Matanic et al, 2002).

7. Χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ)

Η Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) είναι ένα σοβαρό παγκόσμιο πρόβλημα υγείας και αφορά κυρίως άτομα ηλικίας άνω των 50 ετών. Η συχνότητα εμφάνισης της καθώς και η θνητότητα που προκαλεί αυξάνονται συνεχώς. Αποτελεί μια παθολογική κατάσταση που σχετίζεται με φλεγμονώδεις διεργασίες στον πνεύμονα (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, 2006) και χαρακτηρίζεται από μειωμένη ροή αέρα λόγω στένωσης των αεραγωγών, η οποία όμως δεν είναι πλήρως αναστρέψιμη (Pauwels R A, et al. 2001 & Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, 2005 & British Thoracic Society, 1997 & Mannino D M, et al, 2007 & Lokke A et al, 2006 & Sampsonas F et al, 2006). Παρόλο που η ΧΑΠ έχει περιγραφεί ως μια όργανο-ειδική παθολογική κατάσταση του πνεύμονα με οξεία και χρόνια φλεγμονή των αεραγωγών, πρόσφατα έχει αναγνωρισθεί ένας αριθμός ασθενών που παρουσιάζουν χαρακτηριστικά συστηματικής νόσου (Yanbaeva D G et al, 2007 & Yanbaeva D G et al, 2006 & Agusti A Get al, 2003).

Το 2% των περιπτώσεων ασθενών με ΧΑΠ, οφείλεται σε κληρονομική ανωμαλία κατά την οποία παρατηρείται ανεπάρκεια α1- αντιθρυψίνης (Sampsonas F et al , 2006 & Molfino N A, 2007 & Teramoto 2007). Παρά το γεγονός ότι, η πλειονότητα των ασθενών με ΧΑΠ (80%) είναι καπνιστές σιγαρέτων, η νόσος προσβάλλει μόνο το 15-25% των καπνιστών. Ωστόσο, ο καπνός του τσιγάρου θεωρείται η κύρια αιτία της χρόνιας φλεγμονής στους πνεύμονες. Η φλεγμονή αυτή δεν σταματά ακόμη και μετά τη διακοπή του καπνίσματος (Teramoto S. 1, 2007 & Yanbaeva D G et al, 2007 & Lapperre T S et al, 2006). Σήμερα, η ΧΑΠ αποτελεί μία από τις κορυφαίες αιτίες θανάτου παγκοσμίως (Mannino D M, 2007 & Lokke A et al , 2006) και δυστυχώς δεν υπάρχει καμία διαθέσιμη θεραπεία για αυτή. Αν και η διακοπή του καπνίσματος και η χειρουργική επέμβαση μείωσης του όγκου μεταβάλλουν την πορεία της νόσου, η θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή, β2 αγωνιστές, αντιχολινεργικά και αναστολείς της φωσφοδιεστεράσης μπορούν να βοηθήσουν μόνο στον έλεγχο των συμπτωμάτων της (Dahl R, et al, . 2001 &

Niewoehner D E et al, 2005 & Leigh R et al, 2006 & Cazzola M et al, 2004 & Calverley P et al, 2003).

Το κάπνισμα δεν αποτελεί τη μοναδική αιτία της νόσου. Στον χώρο εργασίας η έκθεση στη σκόνη, στην περιβαλλοντική ρύπανση και στις ιογενείς λοιμώξεις μπορεί επίσης να προκαλέσει την πάθηση αυτή (Blanc P D et al, 2007 & Khan A J et al, 2007). Ωστόσο, παραμένει ασαφές αν κάποιος από αυτούς τους περιβαλλοντικούς παράγοντες μπορεί να είναι η μοναδική αιτία της ΧΑΠ, ή εάν οι παράγοντες αυτοί αυξάνουν την ευαισθησία του ατόμου. Η έκθεση στην ατμοσφαιρική ρύπανση θα μπορούσε να αποτελεί έναν ακόμη σημαντικό αιτιολογικό παράγοντα, λόγω του γεγονότος ότι οδηγεί σε φλεγμονή του αναπνευστικού στην οποία συμμετέχουν διάφοροι κυτταρικοί τύποι. Εκτός από τα ουδετερόφιλα, τα μακροφάγα και τα λεμφοκύτταρα, τα κύτταρα του αναπνευστικού επιθηλίου παίζουν ιδιαίτερο ρόλο στη διαδικασία της φλεγμονής και στην ανάπτυξη εμφυσήματος. Η κυτταρική διήθηση ενορχηστρώνεται από χημειοκίνες και άλλους χημειοτακτικούς παράγοντες, ενώ το σύστημα πρωτεασών - αντιπρωτεασών, το οξειδωτικό στρες και η αναδιαμόρφωση του αναπνευστικού επιθηλίου αποτελούν κύριες διαδικασίες που σχετίζονται με την ανάπτυξη της νόσου (Larsson K et al, 2007).

Παρόλο που η παθογένεια της ΧΑΠ δεν έχει κατανοηθεί πλήρως, η σημασία του οξειδωτικού στρες τόσο στους πνεύμονες όσο και στη συστηματική κυκλοφορία έχει υπογραμμισθεί έντονα (MacNee W, 2005 & Domej W et al, 2006). Οι εστίες του οξειδωτικού στρες πηγάζουν από τα κύτταρα της φλεγμονής, όπως τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα, τα οποία όταν ενεργοποιηθούν παράγουν ελεύθερες ρίζες οξυγόνου. Αν προσθέσουμε σε αυτές και τις εισπνεόμενες ελεύθερες ρίζες αζώτου, οι οποίες είναι άφθονες στον καπνό των σιγαρέτων, καταλήγουμε σε μείζον οξειδωτικό φορτίο στους πνεύμονες. Στα υγιή άτομα υπάρχει μια ισορροπία οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών ουσιών, που διατηρεί με αυτόν τον τρόπο στο εξωκυττάριο περιβάλλον χαμηλά τα επίπεδα των οξειδωτικών παραγόντων. Ο καπνός των σιγαρέτων, που περιέχει τεράστιες ποσότητες οξειδωτικών τόσο στην αέρια φάση όσο και σε σωματιδιακό επίπεδο (περίπου 10^{14} ελεύθερες ρίζες ανά φύσημα) (Pryor WA et al, 1993), αποτελεί τον

σπουδαιότερο αιτιολογικό παράγοντα για την ανάπτυξη της ΧΑΠ και υπάρχει μια δοσοεξαρτώμενη σχέση μεταξύ συσσωρευτικής ποσότητας καπνίσματος και επίπτωσης της νόσου (Sethi JM et al, 2000). Το οξειδωτικό στρες εμφανίζεται όταν το φορτίο των οξειδωτικών δεν αντισταθμίζεται από αντιοξειδωτικό μηχανισμό του οργανισμού. Στους ασθενείς με ΧΑΠ, έχει παρατηρηθεί διαταραχή της ισορροπίας οξειδωτικών –αντιοξειδωτικών μηχανισμών.

Έτσι, ένα από τα σημαντικά ανοικτά ζητήματα σχετικά με τη ΧΑΠ, είναι ο λόγος για τον οποίο ενώ όλοι οι καπνιστές εμφανίζουν σημάδια εμμένουσας χρόνιας φλεγμονής των πνευμόνων, η πλειοψηφία του πληθυσμού αυτού δεν αναπτύσσει ΧΑΠ! Η βάση αυτής της παθολογίας δεν είναι κατανοητή. Η σύνθεση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος κατά τη φλεγμονώδη διήθηση στη ΧΑΠ είναι διαφορετική από αυτή που παρατηρείται στο άσθμα (Caramori G et al, 2005 & Fabbri L M et al, 2003 & Watt A P et al, 2005). Το κάπνισμα συνδέεται με συσσώρευση μακροφάγων, ουδετερόφιλων και των CD8+ T-κύτταρων, τα οποία απελευθερώνουν προ-φλεγμονώδεις μεσολαβητές στον πνεύμονα (van der Vaart H et al, 2005 & de Boer W I et al, 2007). Η ένταση της διήθησης με ενεργοποιημένα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος συσχετίζεται με τον βαθμό της εξέλιξης της νόσου (Tetley T D, 2005 & Gadgil A et al, 2006 & Domagala-Kulawik J et al, 2003 & Hogg J C et al, 2004). Τα ενεργοποιημένα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος απελευθερώνουν ένα ευρύ φάσμα προ-φλεγμονωδών, μιτογόνων και προ-ινωτικών παραγόντων (Watt A P et al, 2005 & Hogg J C et al, 2004 & Hoshino T et al, 2007 & Chung K F, 2005 & Fujimoto K et al, 2005 & Aoshiba K et al, 2004), οι οποίοι με τη σειρά τους διαμορφώνουν τη συμπεριφορά των κυττάρων που σχηματίζουν το τοίχωμα των αεραγωγών, συμπεριλαμβανομένων των επιθηλιακών κυττάρων, των ινοβλαστών και των λείων μυϊκών κυττάρων των αεραγωγών (Hogg J C et al, 2004 & Kardos P et al, 2006). Οι προ-φλεγμονώδεις παράγοντες που απελευθερώνονται από τα ενεργοποιημένα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος ενισχύουν την παραγωγή και την έκκριση πρόσθετων προ-φλεγμονωδών παραγόντων από τα αυτόχθονα κύτταρα, με αποτέλεσμα την προσέλκυση περισσότερων κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος στην περιοχή της φλεγμονής. Αυτός ο κύκλος

στηρίζει την διαδικασία της φλεγμονής (Fujimoto K et al, 2005 & Aoshiba K et al, 2004).

Αν και η αναπνευστική λειτουργία μπορεί να βελτιωθεί ή τουλάχιστον να επιβραδυνθεί ο ρυθμός επιδείνωσης εφ' όσον σε ασθενείς με ΧΑΠ διακόψουν το κάπνισμα (Scanlon P D, et al, 2000 & Willemse B W et al, 2005 & Gamble E, 2007), η φλεγμονή των αεραγωγών εμμένει παρά την άρση του ερεθίσματος (ο καπνός του τσιγάρου) (Teramoto S. 1. et al, 2007 & Lapperre T S et al, 2006 & van der Vaart H et al, 2005 & de Boer W I et al, 2007 & Tetley T D, 2005 & Gadgil A et al, 2006 & Domagala-Kulawik J et al, 2003 & Hogg J C et al, 2004 & Lapperre T S et al, 2007 & Scanlon P D et al, 2000 & Willemse B W et al, 2005 & Gamble E et al, 2007). Αυτό έρχεται σε αντίθεση με άλλες ασθένειες στις οποίες η φλεγμονή που προκλήθηκε έγινε μόνο παρουσία ενός ερεθίσματος. Επομένως, μπορεί να υποθεθεί ότι ο πνεύμονας δεν είναι σε θέση να αφαιρέσει ορισμένα από τα συστατικά του καπνού των τσιγάρων, ή ότι δεν είναι σε θέση να αποκαταστήσει τους ιστούς που υπέστησαν βλάβες. Επιπλέον, φαίνεται ότι η διαδικασία ιστικής αποκατάστασης στον πνευμονικό ιστό μετά τη διακοπή του καπνίσματος είναι ειδική για κάθε κυτταρικό τύπο (Lapperre T S et al, 2007 & Gamble E et al, 2007 & Sietta M et al, 1997).

8. Σαρκοείδωση

Η σαρκοείδωση είναι μια πολυσυστηματική νόσος που χαρακτηρίζεται από την δημιουργία κοκκιωμάτων στους ιστούς που προσβάλλει. Πρωτοπεριγράφηκε το 1899 από τον Νορβηγό δερματολόγο Caesar Boeck, ο οποίος επινόησε τον όρο για να περιγράψει δερματικά οζίδια που χαρακτηρίζονταν από συμπαγείς και περιγεγραμμένες εστίες «επιθηλιοειδών κυττάρων», οι οποίες έφεραν μεγάλους και αδρούς πυρήνες καθώς και λίγα γιγαντοκύτταρα (Iannuzzi et al, 2007).

Τα κύρια όργανα που προσβάλλει είναι οι πνεύμονες και το λεμφικό σύστημα, ωστόσο κάθε όργανο δύναται να προσβληθεί. Το δέρμα, οι οφθαλμοί, οι περιφερικοί λεμφαδένες και το ήπαρ εμπλέκονται στο 10-25% των περιπτώσεων. Η εξέλιξη και η σοβαρότητα της νόσου ποικίλλουν σημαντικά. Σοβαρές εκδηλώσεις της ασθένειας αφορούν καρδιακές, νευρολογικές, οφθαλμικές, νεφρικές ή λαρυγγικές εντοπίσεις. Η πνευμονική νόσος μπορεί να εξελιχθεί σε πνευμονική ίνωση, η οποία μαζί με την καρδιακή και την νευρολογική προσβολή, ευθύνεται για τη νοσηρότητα και τη θνητότητα στις δυτικές χώρες (Nunes et al, 2005 & 2007).

8.1. Επιδημιολογία

Η σαρκοείδωση είναι μια πολύ διαδεδομένη ασθένεια που η εμφάνιση της ποικίλλει βάσει της ηλικίας, του φύλου, της φυλής και της γεωγραφικής θέσης. Ωστόσο, προσβάλλει άτομα όλων των φυλών και όλων των εθνικοτήτων και μπορεί να εμφανισθεί σε οποιαδήποτε ηλικία. Συνήθως εκδηλώνεται πριν την ηλικία των 50 ετών με ηλικίες αιχμής τα 20 μέχρι τα 39 έτη. Η εμφάνιση της νόσου σε ηλικίες μικρότερες των 15 ετών θεωρείται ιδιαίτερος σπάνια (1/1.000.000) και σχεδόν απίθανη στις ηλικίες κάτω των 4 ετών. Η εκδήλωση της νόσου παγκοσμίως υπολογίζεται 16.5/100,000 για τους άνδρες, ενώ για τις γυναίκες υπολογίζεται 19/100,000. Η συχνότητα εμφάνισης της νόσου είναι υψηλότερη στις γυναίκες (1.3%) από ότι στους άνδρες (1%), και στην μαύρη (2.4%) από ότι στην λευκή φυλή (0.8%)(Nunes et al, 2007 & Iannuzzi et al, 2007).

8.2. Αιτιολογία

Δυστυχώς, δεν έχει ακόμα αποσαφηνισθεί ο ενοχοποιητικός παράγοντας που προκαλεί ή πυροδοτεί τη νόσο. Παρόλα' αυτά, υπάρχουν πολλές θεωρίες που προσπαθούν να εξηγήσουν τα αίτια της σαρκοείδωσης. Πολλοί χαρακτηρίζουν τη σαρκοείδωση ως αυτοάνοσο νόσημα μιας και το ανοσοποιητικό σύστημα εμπλέκεται άμεσα. Η σαρκοείδωση θα μπορούσε να θεωρηθεί συνέπεια μιας χρόνιας ανοσολογικής απόκρισης σε εξωγενείς λοιμογόνους ή περιβαλλοντικούς παράγοντες εφ' όσον υποστηρίζεται από το κατάλληλο γενετικό υπόστρωμα.

8.3. Σαρκοείδωση και μικροβιακοί παράγοντες

Οι ομοιότητες της ιστικής βλάβης μεταξύ σαρκοείδωσης και μολύνσεων από μυκοβακτηρίδια, όπως το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης, προκάλεσαν για μεγάλο χρονικό διάστημα υποψίες για το ρόλο που μπορεί να παίζουν τα μυκοβακτηρίδια στην αιτιολογία της σαρκοείδωσης χωρίς μέχρι σήμερα να έχει δοθεί απολύτως σαφής απάντηση σ' αυτό το ερώτημα. Η απόπειρα ανίχνευσης ή απομόνωσης μυκοβακτηριδίων από ιστό με σαρκοείδωση, χρησιμοποιώντας τις συμβατικές μικροβιολογικές μεθόδους, έχει αποτύχει στο να στηρίξει αυτήν την υπόθεση (Nunes et al, 2005). Όμως, ο Song και οι συνεργάτες του κατάφεραν να εντοπίσουν την καταλάση-υπεροξειδάση του *Mycobacterium tuberculosis* στο αίμα ασθενών με σαρκοείδωση (Song et al, 2002).

Ενώ ο ρόλος των μυκοβακτηριδίων στην αιτιολογία της σαρκοείδωσης παραμένει θέμα συζήτησης, διερευνάται ο ρόλος και άλλων μικροβίων. Πρόσφατα, η μελέτη ενός μεγάλου πληθυσμού ασθενών με σαρκοείδωση από την Ιαπωνία και την Ευρώπη (Ιταλία, Γερμανία και Αγγλία) έδειξε ότι υπάρχει μεγάλος αριθμός αντιγράφων προπιονιβακτηριακού DNA, είτε του στελέχους *Propionibacterium acnes* είτε του *P.Granulosum*, στους ιστούς όλων των ασθενών που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη εκτός από δύο (Eishi et al, 2002). Χρησιμοποιώντας την τεχνική της PCR (polymerase chain reaction) στο υαλοειδές υγρό, οι Yasuhara και συνεργάτες ανίχνευσαν γενετικό υλικό του βακτηρίου *P.Acnes* στους οφθαλμούς έξι ασθενών με σαρκοείδωση η οποία σχετιζόταν με ραγοειδίτιδα, ενώ δεν βρέθηκε γενετικό υλικό του συγκεκριμένου βακτηρίου στους οφθαλμούς των μαρτύρων (Yasuhara et al, 2005). Μια άλλη μελέτη που

διεξάχθηκε στην Ελλάδα, επίσης ανέφερε την παρουσία του *P.Granulosum* σε ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών με σαρκοειδωση (Gazouli et al, 2002). Επιπλέον, ο εντοπισμός γενετικού υλικού του *P.Acnes* στα κύτταρα του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (BAL) φαίνεται να είναι σημαντικά πιο συνήθης στους Ιάπωνες ασθενείς με σαρκοειδωση (Hiramatsu et al, 2003).

Τα ευρήματα αυτά είναι μεν ενδεικτικά κάποιας εμπλοκής μικροοργανισμών στην νόσο, αλλά πολύ δύσκολα στοιχειοθετούν αιτιολογική συσχέτιση μεταξύ αυτών και της σαρκοειδωσης .

8.4. Σαρκοειδωση και περιβαλλοντικοί παράγοντες

Λόγω του γεγονότος ότι η σαρκοειδωση εκδηλώνεται πρωτίστως στους πνεύμονες, στους οφθαλμούς και στο δέρμα, η αναζήτηση των περιβαλλοντικών αιτιών εστιάστηκε κυρίως στα αντιγόνα που υπάρχουν στον εισπνεόμενο αέρα. Μια από τις αρχικές αιτίες, θεωρήθηκε η έκθεση σε ερεθιστικές ουσίες που ανευρίσκονται σε εξοχικές- αγροτικές εγκαταστάσεις, λόγω χάρη οι εκπομπές ουσιών από σόμπες που καίνε καυσόξυλα ή η γύρη των δέντρων (Bresnitz et al, 1983). Μελέτες της τελευταίας δεκαετίας, αναφέρουν την πιθανή εμπλοκή της έκθεσης σε ανόργανα σωματίδια, σε εντομοκτόνα και σε περιβάλλοντα όπου υπάρχει μούχλα (Rybicki et al, 2004 & Newman et al, 2004 & Kucera et al, 2003 & Kajdasz et al, 2001). Ακόμη, ορισμένα επαγγέλματα έχουν συσχετισθεί με το ενδεχόμενο εκδήλωσης της νόσου, όπως οι συντηρητές πλοίων στο ναυτικό, οι μεταλλωρύχοι, οι προμηθευτές οικοδομικών υλικών, μεταλλικών σκευών, κηπευτικών υλικών, οι εκπαιδευτές και οι πυροσβέστες (Kucera GP et al, 2003 & Gorham ED et al, 2004 & Barnard J et al, 2005 & Prezant DJ et al, 1999), χωρίς όμως σημαντικά στοιχεία που να στηρίζουν αιτιολογική σχέση.

8.5. Σαρκοειδωση και γενετικά χαρακτηριστικά

Είναι ξεκάθαρο ότι οι γενετικοί παράγοντες εμπλέκονται στην εμφάνιση της σαρκοειδωσης. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην μεγάλη ποικιλία σχετικά με την εξάπλωση και εμφάνιση της νόσου σε άτομα διαφορετικών φυλετικών και εθνικών ομάδων, αλλά και στην ύπαρξης οικογενειών, τα μέλη των οποίων,

έχουν υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου σε σχέση με το γενικό πληθυσμό (Verleden GM et al, 2001 & Du Bois RM et al, 2003).

Η οικογενής σαρκοείδωση πρωτοαναφέρθηκε το 1923 και αφορούσε δυο πάσχουσες αδερφές. Επίσης, παρόλο που δεν έχει διεξαχθεί επίσημη έρευνα για τα δίδυμα, η συχνότητα εμφάνιση της νόσου φαίνεται να είναι υψηλότερη στα μονοζυγωτικά δίδυμα από ότι στα διζυγωτικά δίδυμα (journal: Tubercle, 1973). Ακόμη, σε μια άλλη μελέτη παρατηρήθηκε ότι οι ασθενείς με σαρκοείδωση είχαν αδέρφια ή γονείς με σαρκοείδωση πέντε φορές συχνότερα από ότι η ομάδα του υγιούς πληθυσμού (Rybicki BA et al, 2001). Παρόλο που η πιθανότητα εμφάνισης της νόσου είναι αυξημένη μεταξύ συγγενών και ιδίως μεταξύ αδελφών, τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά αλλά και οι κλινικές εκδηλώσεις μπορεί να διαφέρουν (Judson et al, 2006).

Τα γονίδια που κωδικοποιούν τα κύρια σύμπλοκα ιστοσυμβατότητας τύπου I και II έχουν συσχετισθεί με τη νόσο (Grunewald J et al, 2004). Υπάρχουν όμως και άλλα γονίδια που είναι γνωστή η έκφραση τους στην πορεία της νόσου (Verleden GM et al, 2001 & Du Bois et al, 2003). Παραδειγματος χάρη, πιστεύεται ότι τα αλληλόμορφα γονίδια ή οι πολυμορφισμοί των γονιδίων που κωδικοποιούν τα μόρια IL-1α, TNF-α, τον υποδοχέα της CC 2 και 5, το ένζυμο ACE, τον υποδοχέα της βιταμίνης D καθώς και άλλα είναι πιθανό να εμπλέκονται στην ύπαρξη προδιάθεσης εκδήλωσης της νόσου. Από αυτές τις μελέτες έχει προκύψει επίσης, ότι διαφορετικοί απλότυποι μπορεί να σχετίζονται με τις διαφορετικές μορφές της νόσου. Προσφάτως, βάσει των προαναφερθέντων, έχει αναφερθεί πως είναι πιθανό να υπάρχει ένας στενός συσχετισμός μεταξύ πολυμορφισμών του υποδοχέα CCR2 και του συνδρόμου Lofgren, υποδηλώνοντας ένα σημαντικό ρόλο αυτού του υποδοχέα στο σύνδρομο αυτό (Spragnolo P. et al, 2003).

Τέλος, έχουν σημειωθεί γενετικές αλλαγές όπως η αστάθεια των μικροδορυφόρων ή η απώλεια της ετεροζυγωτίας σε ασθενείς με σαρκοείδωση (Vassilakis DA et al, 1999). Τέτοιου είδους γενετικές αλλαγές, που είναι γνωστό ότι αποτελούν σημαντικό στάδιο στην καρκινογένεση, μπορεί να συμβάλλουν στο να

ερμηνευθεί ο μεγαλύτερος κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου ο οποίος έχει επισημανθεί από πολλούς ερευνητές σε ασθενείς με σαρκοείδωση (Askling J et al, 1999).

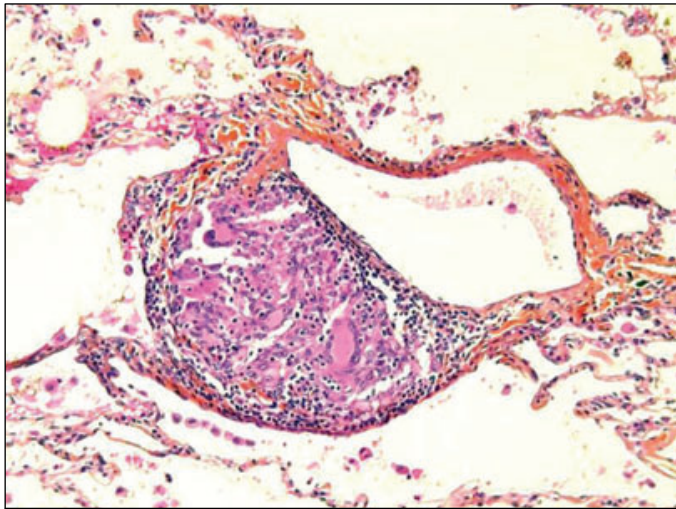
8.6. Σταδιοποίηση σαρκοείδωσης

Βάσει των ακτινογραφιών θώρακος των ασθενών η σαρκοείδωση κατατάσσεται σε τέσσερα στάδια:

- **Στάδιο 1^ο**: λεμφαδενοπάθεια σε αμφότερες πύλες του πνεύμονα χωρίς διηθήματα στο πνευμονικό παρέγχυμα.
- **Στάδιο 2^ο**: λεμφαδενοπάθεια σε αμφότερες πύλες του πνεύμονα με διηθήματα στο πνευμονικό παρέγχυμα
- **Στάδιο 3^ο**: μόνο διηθήματα στο πνευμονικό παρέγχυμα
- **Στάδιο 4^ο**: πνευμονική ίνωση

8.7. Παθογένεια της σαρκοειδωσης

Είναι γνωστό, ότι η σαρκοειδωση αποτελεί μια κοκκιωματώδη διαταραχή που προκαλείται από την ανεξέλεγκτη κυτταρική απόκριση σε άγνωστο μέχρι στιγμής αντιγόνο, του ανοσοποιητικού συστήματος. Η απόκριση αυτή χαρακτηρίζεται από την παρουσία τυπικών κοκκιωμάτων στα σημεία εκδήλωσης της νόσου



Εικόνα 1: Περιαγγειακό σαρκοειδικό κοκκίωμα με τυπική σύσταση επιθηλιοειδών κυττάρων και γιγαντοκυττάρων στο κέντρο που περιβάλλεται από έναν δακτύλιο λεμφοκυττάρων (Nunes et al, 2005).

(Newman LS et al, 1997 & ATS/ERS/WASOG Committee 1999 & Robinson DS et al, 1997). Τα σαρκοειδικό κοκκίωμα, είναι ένα ανοσολογικό κοκκίωμα που αποτελείται κυρίως από «επιθηλιοειδή κύτταρα». Τα επιθηλιοειδή κύτταρα αποτελούν μια ενεργοποιημένη μορφή μακροφάγων. Προέρχονται από τα μονοκύτταρα και με τη βοήθεια της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας έχει αποδειχθεί ότι έχουν εκκριτικές ικανότητες. Τα ανοσολογικά κοκκιώματα είναι σύνθετες και δυναμικές δομές που εξελίσσονται με την πάροδο του χρόνου. Ονομάζονται και «επιθηλιοειδή» κοκκιώματα, διότι το προεξάρχον κύτταρο είναι το επιθηλιοειδές κύτταρο. Τα επιθηλιοειδή κύτταρα περιβάλλονται από λεμφοκύτταρα και άλλα ώριμα μακροφάγα. Επίσης, το κοκκίωμα περιλαμβάνει πολυπύρηννα γιγαντοκύτταρα προερχόμενα από τα μονοπύρηννα μακροφάγα. Τα κύτταρα που παρεμβάλλονται μεταξύ των επιθηλιοειδών κυττάρων είναι κυρίως CD4 T-λεμφοκύτταρα. Στην περιφέρεια του κοκκιώματος μπορεί να ανευρεθούν πρώιμες ινωτικές αλλοιώσεις που περιλαμβάνουν ινοβλάστες και κολλαγόνο (εικόνα 1).

8.8. Σχηματισμός κοκκιώματος

Ο σχηματισμός ενός ανοσολογικού κοκκιώματος μπορεί να πυροδοτηθεί από λοιμογόνους, ανόργανους ή οργανικούς παράγοντες. Τα μονοκύτταρα/μακροφάγα είναι τα πρώτα κύτταρα που προσελκύνονται στην περιοχή όπου πρόκειται να αναπτυχθεί ένα κοκκίωμα. Εάν ο αντιγονικός παράγοντας που είναι υπεύθυνος για την προσέλκυση των κυττάρων δεν αποδομηθεί πλήρως ή έστω σταδιακά, τότε τα κύτταρα αυτά συσσωρεύονται στο σημείο εντοπισμού του αντιγόνου και σταδιακά ωριμάζουν- μετατρέπονται σε επιθηλιοειδή κύτταρα. Ταυτόχρονα, T λεμφοκύτταρα διεισδύουν σε αυτά τα συσσωματώματα κυττάρων, τα οποία οργανώνονται σε συμπαγή κοκκιώματα. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών των δύο κυτταρικών τύπων παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόωμη ανάπτυξη ενός κοκκιώματος.

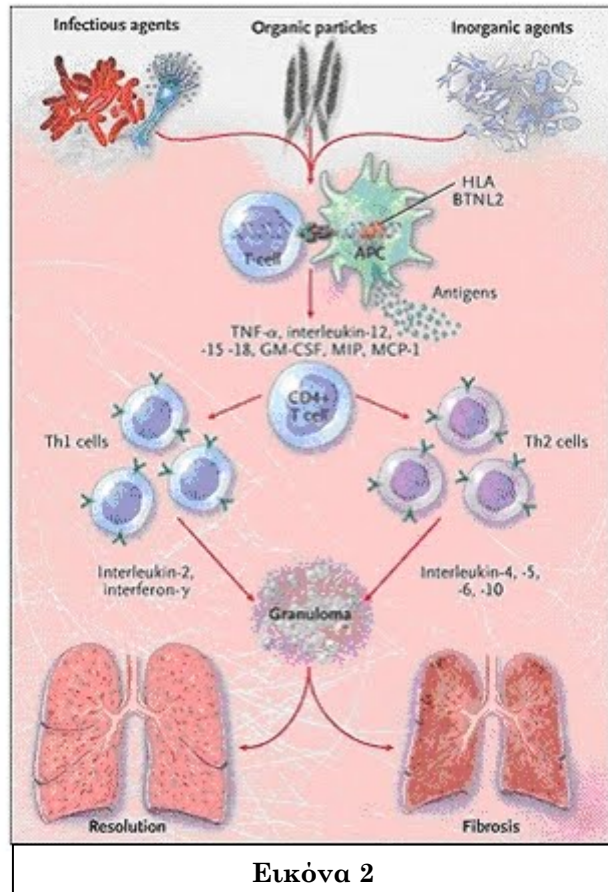
Οι αντιγονικές ουσίες που είναι υπεύθυνες για την προσέλκυση των μακροφάγων, ενδοκυττώνονται, υπόκεινται σε επεξεργασία και παρουσιάζονται σε ειδικά T λεμφοκύτταρα. Στην αναγνώριση των αντιγόνων αυτών εμπλέκονται τα μόρια του συμπλόκου ιστοσυμβατότητας τύπου II. Το αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των T λεμφοκυττάρων είναι ο πολλαπλασιασμός τους μέσω της παραγωγής της ιντερλευκίνης 2 (IL-2). Τα ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα απελευθερώνουν μια σειρά λεμφοκινών, οι οποίες με τη σειρά τους ενεργοποιούν τα μακροφάγα. Εν συνεχεία, αμφότεροι οι κυτταρικοί τύποι απελευθερώνουν διάφορους μεσολαβητές που ενισχύουν τη κυτταρική ανοσολογική απόκριση με το να «στρατολογούν» άλλα λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα τα οποία ενεργοποιούνται στην περιοχή και διαφοροποιούνται, σχηματίζοντας νέα κοκκιώματα.

Η περιφέρεια των κοκκιωμάτων, αποτελεί μια περιοχή συνεχούς διέλευσης νεοπροσελκόμενων μονοκυττάρων, τα οποία διεισδύουν στο εσωτερικό του κοκκιώματος. Εκεί, διαφοροποιούνται σε επιθηλιοειδή κύτταρα τα οποία σχηματίζουν υποομάδες όπου καθεμία από αυτές περιβάλλεται από λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα. Μετά την παραμονή τους μέσα στο κοκκίωμα, τα επιθηλιοειδή κύτταρα το εγκαταλείπουν μέσω της περιφερικής ζώνης. Τα

σαρκοειδικά κοκκιώματα μπορεί να επιμείνουν μερικούς μήνες μέχρι και χρόνια, αλλά συνήθως διαλύονται αφήνοντας μερικές φορές μικρές ινώδεις ουλές.

8.9. Σαρκοειδωση και κυτταροκίνες

Η σαρκοειδωση είναι μια χρόνια φλεγμονώδης νόσος κατά την οποία η συστηματική κοκκιωματώδης διαδικασία συνήθως περιλαμβάνει τους πνεύμονες και τους θωρακικούς λεμφαδένες (Thomas PD, 1987). Παρόλο που η παθογένεια της νόσου απέχει πολύ από το να κατανοηθεί πλήρως, ολοένα και πληθαίνουν οι ενδείξεις που σχετίζουν τη σαρκοειδωση με διαταραχές της λειτουργίας του ανοσοολογικού συστήματος. Ειδικότερα, έχει υποδειχθεί ότι τα ενεργοποιημένα T κύτταρα



Εικόνα 2

και μακροφάγα παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενορχήστρωση της φλεγμονώδους διαδικασίας (εικόνα 2).

Κατά τη διάρκεια της ανοσοολογικής απόκρισης, τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και T λεμφοκύτταρα παράγουν πληθώρα κυτταροκινών και άλλων μεσολαβητών που ευοδώνουν όχι μόνο το σχηματισμό, αλλά και την διατήρηση του κοκκιώματος (Nunes H. et al, 2005). Τα κύτταρα του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος ασθενών με κοκκιωματώδεις σαρκοειδικές βλάβες, σημειώνουν χαρακτηριστική αύξηση του αριθμού των CD4+ λεμφοκυττάρων και αυξημένα επίπεδα των T βοηθητικών κυτταροκινών (Minshall EM et al, 1997). Παρόλη τη συστηματική φύση της νόσου, η οποία μπορεί να επηρεάσει σχεδόν όλα τα όργανα του οργανισμού, μόνο τα κυψελιδικά T κύτταρα όχι τα T κύτταρα του αίματος εκκρίνουν IL-2. Το φαινόμενο αυτό υποδηλώνει ότι πιθανόν ο

παράγοντας που πυροδοτεί τη νόσο εδρεύει στον πνεύμονα (Ziegenhagen MW et al, 2003). Τα σαρκοειδικά T λεμφοκύτταρα εκφράζουν υψηλά επίπεδα κυτταροκινών όπως, IL-2 και IFN- γ . Η ιντερλευκίνη-2 δρα τοπικά σαν αυξητικός παράγοντας για T κύτταρα, ενώ η IFN- γ προάγει τις επικουρικές και κυτταροτοξικές δράσεις των μακροφάγων του ιστού, αυξάνει την κυτταροτοξική δράση των T κυττάρων και ρυθμίζει την έκκριση άλλων λεμφοκινών.

Όσο αφορά στα κυψελιδικά μακροφάγα των ασθενών με σαρκοειδωση, έχει αποδειχθεί ότι είναι μεταβολικώς ιδιαίτερος ενεργά. Οι φαγοκυτταρικές τους ικανότητες είναι αυξημένες και παράγουν περισσότερες μεταλλοπρωτεΐνες, ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και αζώτου, περισσότερο μετατρεπτικό ένζυμο αγγειοτενσίνης και περισσότερα λυσοσώματα σε σχέση με τα μακροφάγα των υγιών ατόμων. Ακόμη, εκφράζουν τον υποδοχέα της ιντερλευκίνης 2 (CD25) και της τρανοφερίνης (CD71), όπως τα κύτταρα που πολλαπλασιάζονται κατόπιν ενεργοποίησης τους από αυξητικούς παράγοντες. Επίσης, εκφράζουν τους υποδοχείς των M-CSF και GM-CSF, οι οποίοι εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό των μακροφάγων, και πολλαπλασιάζονται με πιο γρήγορο ρυθμό από ότι τα μακροφάγα του υγιούς πληθυσμού. Επιπλέον, εκφράζουν περισσότερα μόρια του συμπλόκου ιστοσυμβατότητας τύπου II στην επιφάνειά τους και διαφορετικά μόρια προσκόλλησης που είναι απαραίτητα για τις αλληλεπιδράσεις τους με τα T κύτταρα. Επιπροσθέτως, είναι πιο ικανά ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα σε σχέση με τα μακροφάγα των υγιών ατόμων. Τέλος, τα μακροφάγα των ασθενών με σαρκοειδωση παράγουν πολυάριθμες κυτταροκίνες και χημειοκίνες που εμπλέκονται στις κοκκιωματώδεις αντιδράσεις (Nunes H. et al, 2005). Οι κυτταροκίνες που παράγουν μπορεί να είναι είτε αντι-φλεγμονώδεις είτε προ-φλεγμονώδεις. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα των κυτταροκινών IL-1, IL-6, TNF α , MIP-1a, RANTES, IL-8, IL-12 και IL-18 είναι αυξημένα σε σχέση με τον υγιή πληθυσμό (Nunes H. et al, 2005 & Minshall EM et al, 1997) και στην σαρκοειδωση του πνεύμονα, η αυξημένη έκκριση της ιντερλευκίνης 6 δρα συνεργικά με την ιντερλευκίνη 1 για να προάγει τον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων (Sahashi K et al, 1994).

8.10. Σαρκοείδωση και Καρκίνος

Η ύπαρξη χρόνιας φλεγμονής έχει σχετισθεί με αύξηση του κινδύνου εμφάνισης κακοήθων λεμφωμάτων ή καρκίνου στην περιοχή του προσβληθέντος ιστού. Θεωρητικά, αυτό θα μπορούσε να συμβαίνει και στην σαρκοείδωση, μιας και αποτελεί πολυσυστηματική χρόνια φλεγμονώδη νόσο. Ωστόσο, αν και έχουν γίνει πολλές επιδημιολογικές μελέτες με σκοπό την καταγραφή του επιπολασμού του καρκίνου στους ασθενείς με σαρκοείδωση, δεν έχει μέχρι στιγμής, αρθεί ένα σαφές συμπέρασμα (Mellemkjaer L., et al 1997 & Holmes G.K et al, 1976 & Baecklund E., et al, 1998 & La Vecchia C., et al 1992).

Έρευνες που σχετίζονται με την επίπτωση του καρκίνου σε μεγάλες ομάδες σαρκοειδικών ασθενών, δημοσιεύθηκαν για πρώτη φορά το 1972. Οι πρώτες ανασκοπήσεις, στις οποίες φαίνεται να υπάρχει κάποια σχέση μεταξύ σαρκοείδωσης και κακοήθων λεμφωμάτων ή καρκίνου του πνεύμονα, έγιναν από τους Sakula (1963) και Brincker (1972). Ωστόσο, οι μελέτες αυτές δεν επέτρεπαν σαφή συσχέτιση μεταξύ σαρκοείδωσης και κακοήθειας. Ο Brincker (1972), σε μια έρευνα που πραγματοποίησε, σε 1500 ασθενείς με σαρκοείδωση, βρήκε 5 περιπτώσεις κακοήθους λεμφώματος. Ο αριθμός αυτός θεωρήθηκε υψηλός, αν ληφθεί υπ' όψη ότι η συχνότητα εμφάνισης της σαρκοείδωσης υπολογίζεται σε 5 περιπτώσεις ανά 100,000 στον γενικό πληθυσμό (Horwitz, 1967; Horwitz, Payne και Wilbek, 1967). Ακόμη, αξιοσημείωτο θεωρήθηκε το γεγονός ότι και στις 5 αυτές περιπτώσεις η σαρκοείδωση προηγήθηκε της κακοήθειας.

Σε ακόλουθη μελέτη των Brincker και Wilbek το 1974, που αφορούσε την εμφάνιση νεοπλασίας σε 2561 Δανούς ασθενείς με σαρκοείδωση, φάνηκε ότι οι 34 εμφάνισαν κάποιον τύπο κακοήθειας σε μεταγενέστερο στάδιο από αυτό της διάγνωσης της σαρκοείδωσης. Ακόμη, φάνηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ ορισμένων αναμενόμενων και παρατηρούμενων κακοήθων όγκων. Οι ερευνητές υπέθεσαν, ότι η σαρκοείδωση είχε προδιαθεσιακό ρόλο στην ανάπτυξη νεοπλασίας λόγω της μειωμένης ανοσολογικής εποπτείας ή, στην περίπτωση των λεμφωμάτων, ότι προκάλεσε αύξηση των μιτώσεων των λεμφοκυττάρων με αποτέλεσμα να αυξηθούν οι πιθανότητες εμφάνισης

μεταλλάξεων. Αντιθέτως, ένα χρόνο μετά, ο Laverby (1975) ανέφερε μόνο μια περίπτωση σαρκοείδωσης σε μελέτη 7344 ασθενών με νεοπλασίες στον πνεύμονα. Ομοίως, ο Battisti και οι συνεργάτες του (1977), σε μια ανασκόπηση 580 ασθενών με σαρκοείδωση, βρήκαν μόνο 7 ασθενείς (1,2%) να έχουν και καρκίνο. Μια δεκαετία αργότερα, ο Brincker (1987) αναφέρει 8 περιπτώσεις ασθενών, στους οποίους η σαρκοείδωση διαγνώσθηκε μετά από την εμφάνιση συμπαγών όγκων. Λίγα χρόνια αργότερα Ιάπωνας ερευνητής, αναφέρει σε μελέτη στην οποία συμμετείχαν 148 ασθενείς με σαρκοείδωση, ότι 9 άτομα είχαν και νεοπλασία. Από αυτούς, η κακοήθεια προϋπήρχε της σαρκοείδωσης σε 2 ασθενείς, ο ένας διαγνώσθηκε να πάσχει ταυτόχρονα από σαρκοείδωση και καρκίνο, ενώ οι υπόλοιποι εμφάνισαν καθέννας διαφορετικό τύπο καρκίνου σε μεταγενέστερη χρονική περίοδο από αυτή κατά την οποία έγινε η διάγνωση της σαρκοείδωσης (Kataoka et al, 1992).

Παρά το γεγονός ότι η υπόθεση «σχέσης μεταξύ σαρκοείδωσης και νεοπλασίας» δεν είναι αποδεικτική και αμφισβητήθηκε δυναμικά από άλλους ερευνητές (Romer et al, 1998 & Romer et al, 1999), ολοένα και περισσότερες μελέτες τείνουν να υποστηρίζουν την υπόθεση αυτή (Reich JM et al, 1995 & Reich JM 1999 & Askling et al, 1999).

Ο Askling και οι συνεργάτες του (1999), πραγματοποίησαν μια μελέτη που αφορούσε τις διαγνωσμένες περιπτώσεις ασθενών με σαρκοείδωση στη Σουηδία για τα έτη 1966 έως 1980. Από τη μελέτη αυτή προέκυψε αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης νεοπλασίας, συγκεκριμένα καρκίνου του πνεύμονα, κακοήθων λεμφωμάτων και γενικότερα καρκίνων στα όργανα που είχαν προσβληθεί από σαρκοείδωση και θεώρησαν ότι η χρόνια φλεγμονή είναι ο διαμεσολαβητής του φαινομένου αυτού.

Τέλος, κατόπιν μιας λεπτομερέστατης ανασκόπησης της υπάρχουσας βιβλιογραφίας πάνω στη σχέση σαρκοείδωσης- καρκίνου από τους Philip Cohen και Razelle Kurzrock, φάνηκε ότι οι καρκίνοι που σχετίζονται με την σαρκοείδωση δεν περιλαμβάνουν μόνο λεμφώματα, αλλά και άλλες

αιματολογικές κακοήθειες [π.χ. λευχαιμίες, πολλαπλούν μυέλωμα (εικόνα 2), λεμφοκυττάρωση] καθώς και συμπαγείς όγκους που συναντώνται κυρίως στο αναπνευστικό σύστημα (καρκίνος του πνεύμονα), στο γαστρεντερικό (π.χ. καρκίνος στομάχου, κόλου) και στο ουρογεννητικό (π.χ. καρκίνος μήτρας, όρχεων). Επιπροσθέτως, σε ορισμένους ασθενείς με καρκίνο, τα κυτταροστατικά φάρμακα φαίνεται να συσχετίζονται με την επαγωγή νέων αναζωπυρώσεων της σαρκοειδωσης ή στην επιδείνωση της πορείας ήδη υπάρχουσας νόσου (Philip Cohen & Razelle Kurzrock, 2007).

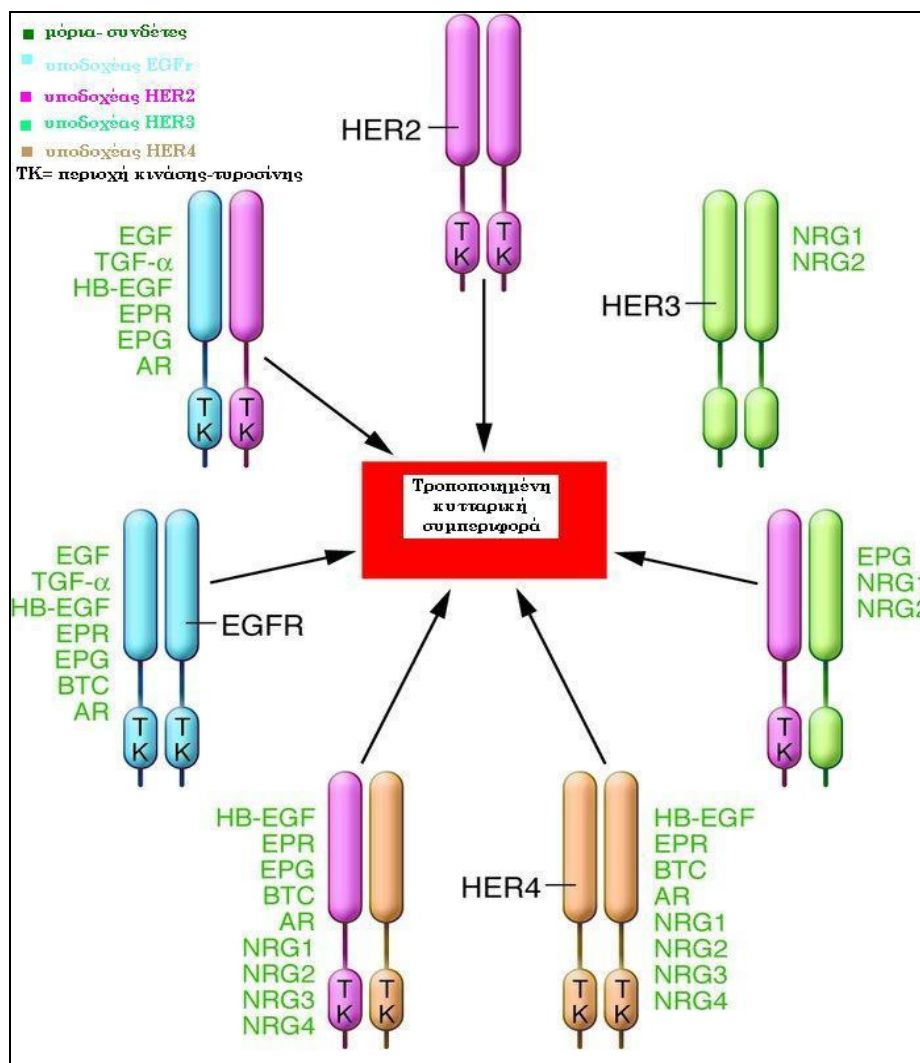
9. Ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFr = Epidermal Growth Factor receptor).

Η αύξηση και η ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων θεωρείται ότι λαμβάνει χώρα μέσω γενετικών γεγονότων που προκαλούν θεμελιώδεις αλλαγές στα μονοπάτια που ρυθμίζουν την κυτταρική διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και την κινητικότητα. Η ενεργοποίηση του πρωτο-ογκογονιδίου που κωδικοποιεί τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor receptor/ EGFr), έναν υποδοχέα κινάσης -τυροσίνης, μπορεί να συμβάλλει στον μετασχηματισμό των κυτταρικών φαινοτύπων και να παρέχει στα καρκινικά κύτταρα ουσιαστικά πλεονεκτήματα στην αύξηση και στην ανάπτυξη τους (Huang SM et al, 1999).

Τα τελευταία 20 χρόνια, τα αυξημένα επίπεδα του EGFr και των συγγενών προσδετών του, έχουν προσδιορισθεί ως ένα κοινό συστατικό στην εμφάνιση πολλών τύπων καρκίνου (π.χ. κόλου, μαστού, πνεύμονα, εγκεφάλου). Σε πολλές περιπτώσεις, η παρεκκλίνουσα ενεργοποίηση του EGFr, με τη μεσολάβηση κυρίως αλλαγών στην γονιδιακή επέκταση και στην αυτοκρινή διέγερση, φαίνεται να αποτελεί έναν σημαντικό παράγοντα στην καρκινογένεση καθώς και μία κινητήριο δύναμη για την επιθετική συμπεριφορά της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων (Salomon DS et al, 1995).

Η ανακάλυψη του EGFR έγινε το 1975, όπου αναφέρθηκε για πρώτη φορά η ύπαρξη ενός ειδικού υποδοχέα του EGF στην μεμβράνη ενός ινοβλάστη. Ο υποδοχέας αυτός ανήκει στην οικογένεια EGFr (ErbB/ HER), η οποία αποτελείται από μια ομάδα τεσσάρων υποδοχέων κινασών τυροσίνης με παρόμοια δομή (EGFR/ HER-1/ ErbB1, ErbB-2/ HER2/ neu, ErbB-3, και ErbB-4) που διμερίζονται, (σχηματίζοντας είτε ομοδιμερή είτε ετεροδιμερή) μόλις συνδεθούν με ορισμένα μόρια-συνδέτες. Τα μόρια-συνδέτες της οικογένειας ErbB μέχρι σήμερα είναι 13: i) επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF), ii) μετατροπέας του αυξητικού παράγοντα α (TGF-α= transforming growth factor-α), iii) αμφιρεγουλίνη (amphiregulin), iv) ο αυξητικός παράγοντας δέσμευσης

ηπαρίνης (HB-EGF= heparin-binding EGF-like growth factor), ν) η β-σελουλίνη (betacellulin), νι) η επιρεγουλίνη (epiregulin), νιι) erigen, νιιι) νευρεγουλίνη (neuregulin-1= NRG-1), ιx) NRG-2, x) NRG-3, xi) NRG-4, xii) NRG-5 και xiii) NRG-6 (Higashiyama Shigeki et al, 2008). Οι συνδέτες αυτοί μπορούν να διακριθούν σε δύο ομάδες: στους αγωνιστές του EGF, που ενεργοποιούν τον υποδοχέα EGFR και στις νευρεγουλίνες, που ενεργοποιούν στους υποδοχείς ErbB-3 και ErbB-4. Επίσης, διακρίνουμε μία υποομάδα αυτών των συνδετών, που είναι γνωστοί ως διττοί συνδέτες (betacellulin, HB-EGF και epiregulin), επειδή μπορούν να ενεργοποιούν εκτός από τον EGFR και τον ErbB-4 (εικόνα 3).



Εικόνα 3: Διμερή υποδοχέων και οι συνδέτες τους.

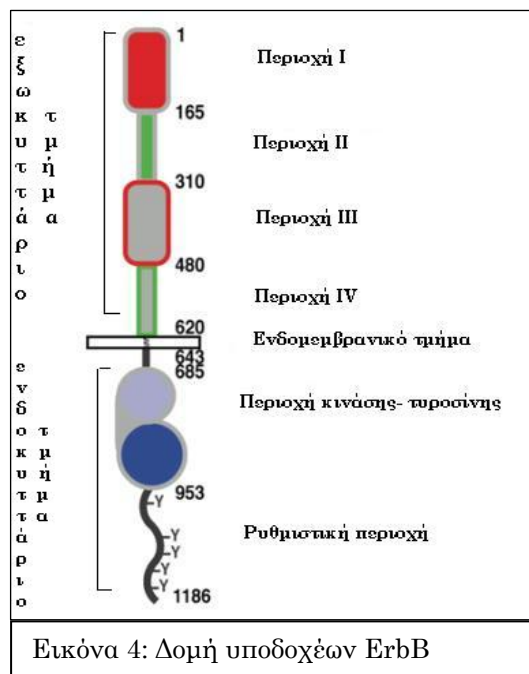
Κάθε συνδέτης περιέχει μια περιοχή 60 αμινοξέων που παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με τον συνδέτη EGF που είναι επαρκής για τη βιολογική του δραστηριότητα. Για τον υποδοχέα HER2, δεν έχει βρεθεί ακόμη κάποιος διαλυτός

συνδέτης και πιστεύεται πως παίζει σημαντικό ρόλο την ενεργοποίηση των ErbB υποδοχέων σχηματίζοντας ετεροδιμερή με τα άλλα μέλη της οικογένειας ErbB. Επίσης, ο υποδοχέας HER2 διακρίνεται από τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας στο γεγονός ότι η υπερέκφραση του προκαλεί ανεξάρτητο από συνδέτη κυτταρικό μετασχηματισμό (εξαλλαγή).

Οι υποδοχείς της οικογένειας ErbB είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες που διακρίνονται σε 3 τμήματα (εικόνα 4): ένα εξωκυττάριο τμήμα, που είναι υπεύθυνο για την σύνδεση του μορίου-προσδέτη, ένα διαμεμβρανικό λιποφιλικό τμήμα, που είναι υπεύθυνο για το σχηματισμό του διμερούς ή ετεροδιμερούς (Stevan R. Hubbard, 2009) και ένα

ενδοκυττάριο τμήμα, που είναι υπεύθυνο για την ενεργοποίηση κάποιου μονοπατιού μεταγωγής σήματος (ο N -λοβός της κινάσης είναι με ανοιχτό μπλε χρώμα, ενώ ο C- λοβός με πιο σκούρο μπλε χρώμα). Το εξωκυττάριο τμήμα, αποτελείται από 4 περιοχές: 2 ομόλογες περιοχές πρόσδεσης του συνδέτη, περιοχές I (κόκκινη) και III (γκρι με κόκκινο περίγραμμα), που έχουν κατά 37% ταυτόσημη ακολουθία και 2 περιοχές,

περιοχές II (πράσινη) και IV, (γκρι με πράσινο περίγραμμα) που είναι πλούσιες σε κυστεΐνη. Οι περιοχές I-IV μερικές φορές ονομάζονται και L1(L= λευκίνη), CR1 (CR=πλούσια σε κυστεΐνη), L2 και CR2 ή L1, S1, L2 και S2. (Kathryn M. Ferguson, 2008).



Γενετική δομή του EGFR

Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα EGFR, έχει μήκος 200kb και αποτελείται από 28 εξώνια και 27 ιντρόνια. Εντοπίζεται στο μικρό βραχίονα του 7^{ου} χρωμοσώματος στη θέση 12 (7p12). Τα εξώνια 1 έως 16 κωδικοποιούν το εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα, ενώ το 17^ο εξώνιο κωδικοποιεί το διαμεμβρανικό τμήμα και τα εξώνια 18 έως 28 κωδικοποιούν το ενδοκυττάριο τμήμα του. Το τμήμα που αφορά στην δράση κινάσης-τυροσίνης κωδικοποιείται από τα εξώνια 18 έως 24 ενώ τα εξώνια 25 έως 28 κωδικοποιούν το καρβοξυτελικό ενδοκυττάριο άκρο του υποδοχέα.

Ενεργοποίηση του EGFr και μεταγενέστερη σηματοδότηση

Η ενεργοποίηση του EGFr προκαλεί τη διαβίβαση εξωκυττάρων σημάτων στην ενδοκυττάρια περιοχή, η οποία με μεταγωγή σήματος μεταφέρει τα ερεθίσματα στον πυρήνα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της μεταγραφής, που οδηγεί σε πρωτεϊνοσύνθεση και σε μετατροπή των κυτταρικών λειτουργιών αλλά και της αρχιτεκτονικής του κυττάρου. Ως μονοπάτια μεταγωγής σήματος, το Ras/ Raf/ MAPK (mitogen-activated protein kinase), το PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase)/ Akt pathway, και το Jak (Janus kinase)/ STAT (μετατροπής σήματος και ενεργοποιητές μεταγραφικής δραστηριότητας) είναι όλα σημαντικά (Kentaro Inamura et al, 2010).

Το μονοπάτι Ras/Raf/MAPK

Μετά την ενεργοποίηση του υποδοχέα EGFr και την ακόλουθη φωσφορυλίωση της κινάσης-τυροσίνης, οι πρωτεΐνες του συμπλόκου προσδέτη GRB2/Sos προσδένονται είτε άμεσα είτε έμμεσα, μέσω της πρωτεΐνης προσαρμογέα Shc, σε ειδικές περιοχές αγκυροβόλησης του EGFr. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών αυτών και του υποδοχέα έχει σαν αποτέλεσμα τρισδιάστατες δομικές αλλαγές της Sos, που οδηγούν σε επιστράτευση της Ras-GDP και επακόλουθη ενεργοποίηση της Ras (Ras-GTP). Η ενεργοποιημένη πλέον Ras ενεργοποιεί τα μόρια RAF1 και MAPK1 και MAPK2 (MK01 και MK03). Οι ενεργοποιημένες MAPKs φωσφορυλιώνουν συγκεκριμένους ενδοπυρηνικούς μεταγραφικούς

παράγοντες, προάγοντες με αυτόν τον τρόπο την κυτταρική μετανάστευση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Το μονοπάτι PI3K/Akt

Το μονοπάτι PI3K/Akt ρυθμίζει την κυτταρική αύξηση, την ανθεκτικότητα της απόπτωσης στη χημειοθεραπεία, καθώς και την εισβολή του όγκου και την μετανάστευση. Η EGFR εξαρτώμενη ενεργοποίηση της PI3K πραγματοποιείται μέσω του σχηματισμού του ετεροδιμέρους EGFR και ERBB3. Στην πραγματικότητα, δεν υπάρχουν περιοχές αγκυροβόλησης της PI3K στον EGFR, εν αντιθέσει με τον ERBB3, ο οποίος φέρει πολλές θέσεις αγκυροβόλησης για την PI3K. Οι PI3Ks είναι διμερή ένζυμα που αποτελούνται από χωριστές ρυθμιστικές (p85) και καταλυτικές (p110) υπομονάδες. Η p85 σχετίζεται με την άμεση αγκυροβόληση στις ειδικές περιοχές πρόσδεσης του υποδοχέα erbB μέσω της αλληλεπίδρασης της Src2 ομόλογης περιοχής (SH2) με τα φωσφοτυρονισικά κατάλοιπα, ενώ οι υπομονάδες p110 καταλύουν δευτέρα μηνυματοφόρα μόρια τα οποία με τη σειρά τους φωσφορυλιώνουν την πρωτεΐνη AKt.

Το μονοπάτι STAT

Εκτός από το μονοπάτι PI3K/Akt, ο EGFR μπορεί να ρυθμίζει και τα STAT μονοπάτια είτε μέσω της κίνησης Janus (JAK) είτε μέσω ενός μηχανισμού ανεξάρτητα από την JAK. Οι πρωτεΐνες STAT είναι μια οικογένεια κυτταροπλασματικών μεταγραφικών παραγόντων που υπάρχουν ως ανενεργά μονομερή και τα οποία αλληλεπιδρούν με φωσφοτυροσινικά κατάλοιπα μέσω της SH2 περιοχής τους και αφού διμεριστούν, μετατοπίζονται στον πυρήνα και επάγουν την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων- στόχων. Στα φυσιολογικά κύτταρα, η ενεργοποίηση της STAT είναι προσωρινή, και διαρκεί από μερικά λεπτά μέχρι λίγες ώρες. Στους καρκινικούς ιστούς όμως, υπάρχει δομική ενεργοποίηση της STAT, ειδικά της STAT-3. η αυξημένη δραστηριότητα των μεμβρανικών υποδοχέων με ενεργότητα κινάσης-τυροσίνης προάγει την συνεχή ενεργοποίηση της STAT-3 και κατά συνέπεια προάγεται η ογκογένεση και η εξέλιξη των όγκων.

Το μονοπάτι της κινάσης Src

Παρόλο που η κινάση Src έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη και την εξέλιξη του καρκίνου εδώ και πολλά χρόνια, δεν έχει γίνει ακόμη πλήρως κατανοητός ο ρόλος της στον καρκίνο. Η Src εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και το μονοπάτι της μεταγωγής σήματος της διασταυρώνεται με άλλα σημαντικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος όπως τα μονοπάτια PI3K και STAT. Επομένως, αν και η δραστηριότητα κινάσης Src είναι ανεξάρτητη από την σηματοδότηση των υποδοχέων με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης, μπορεί να αλληλεπιδρά με τέτοιους υποδοχείς, όπως ο EGFR. Ως εκ τούτου, η αλληλεπίδραση Src-EGFR μπορεί να ενισχύσει την erbB σηματοδότηση και από την άλλη να εμπλέκεται στην αντοχή έναντι της θεραπείας που στοχεύει στον EGFR (Georg Lurje et al 2009).

Υπερέκφραση του EGFR

Σε ένα ευρύ φάσμα συμπαγών κακοηθών όγκων, έχουν παρατηρηθεί διαφορετικά επίπεδα υπερέκφρασης του EGFR. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν ο καρκίνος σε κεφαλής και τραχήλου όπου το ποσοστό υπερέκφρασης κυμαίνεται από 80 έως 100%, ο καρκίνος των νεφρών με ποσοστά 50-90% και ο καρκίνος του πνεύμονα με ποσοστά 40-80%. Παρόλο που η διαγνωστική αξία του EGFR παραμένει ασαφής, αφού έρευνες πάνω στο θέμα αυτό έχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα, μια αναδρομική ανασκόπηση των μελετών για τον EGFR επισημαίνει ότι τα επίπεδα έκφρασης του έχουν μεγάλη προγνωστική αξία για ασθενείς με καρκίνο των ωθηκών, του τραχήλου της μήτρας, της ουροδόχου κύστης, του οισοφάγου, της κεφαλής και του τραχήλου. Μέτρια προγνωστική αξία έχει η υπερέκφραση του EGFR για τον καρκίνο του στομάχου, του ορθού, του μαστού και του ενδομητρίου, ενώ χαμηλή προγνωστική αξία έχει για τους μη μικροκυτταρικούς καρκίνους του πνεύμονα (Kentaro Inamura et al, 2010). Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειωθεί το γεγονός ότι φαινόμενα υπερέκφρασης δεν παρατηρούνται στον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (Franklin WA et al, 2002)!

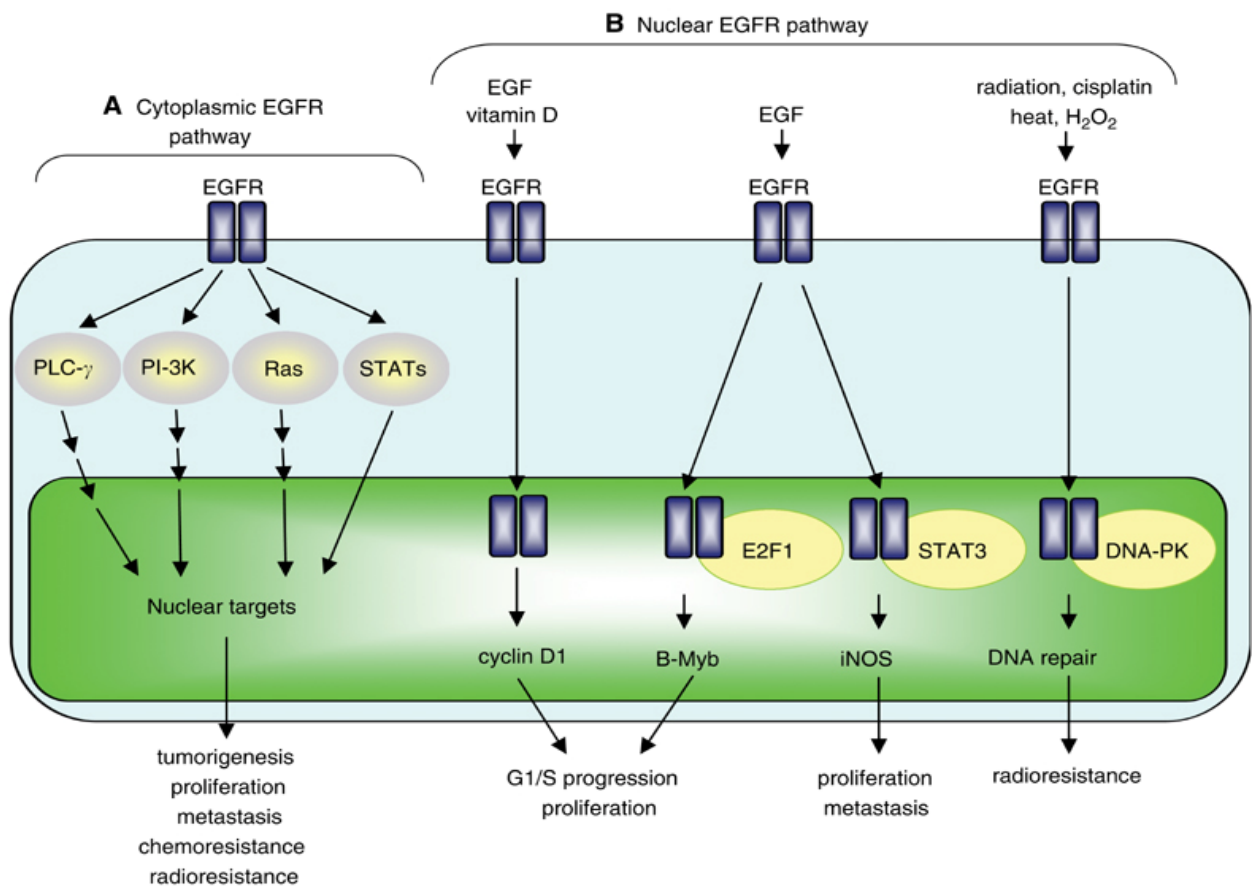
EGFR και μεταλλάξεις

Μεταλλάξεις στον υποδοχέα EGFR έχουν παρατηρηθεί τόσο στο εξωκυττάριο όσο και στο ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα. Όσον αφορά στην εξωκυττάρια περιοχή, έχει καταγραφεί μια γονιδιακή μετάλλαξη ελλείμματος, που έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός παθολογικού EGFR υποδοχέα που είναι γνωστός ως EGFRvIII. Ο υποδοχέας αυτός είναι κατά 30 kDa βραχύτερος, δηλαδή έχει μήκος 140 kDa αντί για 170 kDa που είναι το φυσιολογικό του μήκος, και παρουσιάζει σημαντική αύξηση της δραστηριότητας της κινάσης-τυροσίνης απουσία συνδέτη. Ειδικότερα, λόγω της μετάλλαξης αυτής, απουσιάζει η περιοχή πρόσδεσης του συνδέτη με αποτέλεσμα ο υποδοχέας να είναι διαρκώς ενεργοποιημένος. Ο EGFRvIII σχετίζεται με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την κακοήθεια σε νεοπλασίες που αφορούν τον καρκίνο του μαστού, τους καρκίνους του πνεύμονα μικροκυτταρικού τύπου, τα γλοιώματα και τον καρκίνο του προστάτη.

Από την άλλη έχουν καταγραφεί και μεταλλάξεις της ενδοκυττάριας περιοχής του EGFR που απαντώνται στους καρκίνους του πνεύμονα μη μικροκυτταρικού τύπου. Συγκεκριμένα, οι μεταλλάξεις αυτές χωρίζονται σε 4 τύπους: i) σημειακές μεταλλάξεις στο 18^ο εξώνιο, ii) ελλείμματα στο 19^ο εξώνιο, iii) ενθέσεις στο 20^ο εξώνιο και iv) σημειακές μεταλλάξεις στο 21^ο εξώνιο. Ειδικότερα, οι δύο πιο κοινές μεταλλάξεις είναι ελλείμματα γύρω από το κωδικόνιο 746 έως 750 του 19^{ου} εξωνίου και μεταλλάξεις μεταστροφής της T (θυμίνης) σε G (γουανίνη) στο κωδικόνιο 858 του 21^{ου} εξωνίου με αποτέλεσμα να αλλαγή του αμινοξέος λευκίνη σε αργινίνη (L858R). Αυτές οι δύο μεταλλάξεις ενοχοποιούνται για 90% των μεταλλάξεων του ενδοκυττάριας τμήματος του EGFR και προκαλούν μεταβολή στη διαμόρφωση της περιοχής πρόσδεσης του ATP, που οδηγεί σε συνεχή ενεργοποίηση του EGFR χωρίς να έχει προσδεθεί κάποιο μόριο- συνδέτης. Ακόμη, οι 2 αυτές μεταλλάξεις έχουν παρατηρηθεί και σε υγιή τμήματα ιστού γύρω από καρκίνο και τα διαγονιδιακά ποντίκια για το μεταλλαγμένο γονίδιο EGFR αναπτύσσουν καρκίνο του πνεύμονα. Τα στοιχεία αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι, οι μεταλλάξεις του EGFR εμπλέκονται στην νεοπλασία πρώιμου σταδίου στον πνεύμονα (Kentaro I. et al, 2010).

Εντοπισμός του EGFR

Ο EGFR αλλά και τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας ErbB εντοπίζονται κυρίως στην κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου, αλλά μπορεί να εντοπιστούν και στον πυρήνα. Η πυρηνική έκφραση των υποδοχέων αυτών έχει βρεθεί σε φυσιολογικούς ιστούς, αλλά παρατηρείται πολύ συχνότερα σε καρκινικά κύτταρα. Οι μηχανισμοί μεταφοράς των μεμβρανικών πρωτεϊνών περιλαμβάνουν τη δραστηριότητα συνοδών μορίων που προσδέονται στην διαμεμβρανική περιοχή, πυρηνική μετατόπιση με διαμεσολάβηση του ενδοσώματος και ρетро-μετατόπιση από το μηχανισμό διακίνησης του ενδοπλασματικού δικτύου. Οι δύο τελευταίοι μηχανισμοί υποστηρίζονται περισσότερο από τις έρευνες. Μόλις ενεργοποιηθεί ο υποδοχέας από τον συνδέτη, μεταφέρεται στο εσωτερικό του κυττάρου μέσω ενός κυστιδίου κλαθρίνης. Στον μηχανισμό διαμεσολάβησης του ενδοσώματος, το εσωτερικευμένο ενδόσωμα κατευθύνεται από τις πυρηνικές πρωτεΐνες εισαγωγής (importins), οι οποίες αναγνωρίζουν το σήμα πυρηνικού εντοπισμού των erbB πρωτεϊνών μέσω των συμπλόκων των πυρηνικών πόρων. Το μοντέλο της ρетро-μετατόπισης περιλαμβάνει και αυτό την εσωτερικευση του υποδοχέα επιφάνειας στο ενδόσωμα, ο οποίος απορροφάται από το ενδοπλασματικό δίκτυο μέσω του συμπλέγματος Golgi. Ο προσδεμένος στο ενδοπλασματικό δίκτυο EGFR ρетро-μετατίθεται στο κυτταρόπλασμα και με τη βοήθεια του μεταθετού Sec61 που σχηματίζει ένα κανάλι επί του ενδοπλασματικού δικτύου. Ένας άλλος εναλλακτικός τρόπος μεταφοράς ολόκληρων μεμβρανικών πρωτεϊνών από το ενδοπλασματικό δίκτυο είναι μέσω της ιμπορτίνης με πλευρική διάχυση (Wang SC et al, 2009). Μέχρι στιγμής έχουν διεκρινισθεί 2 βασικές λειτουργίες των πυρηνικών erbB: η ρύθμιση της μεταγραφικής δραστηριότητας και η φωσφορυλίωση του πυρηνικού αντιγόνου κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Li Chunrong et al, 2009). Ως μεταγραφικός παράγοντας ο EGFR, επειδή στερείται περιοχής πρόσδεσης στο DNA, αλληλεπιδρά με τα μόρια STAT3 και E2F1 για να μεσολαβήσει στη μεταγραφή των γονιδίων D1 κυκλίνης, iNOS, B-Myb και Aurora kinase A (εικόνα 5).



Εικόνα 5: το ενδοκυττάριο και το πυρηνικό μονοπάτι του EGFR.

10.Αναστολέας του υποδοχέα του EGF, Cetuximab (Erbix)

Το Erbix είναι ένα φάρμακο που έχει ως δραστική ουσία τη κετουξιμάμπη, που είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα. Τα μονοκλωνικά αντισώματα είναι (τύπος πρωτεϊνών) σχεδιασμένα ώστε να αναγνωρίζουν και να προσκολλώνται σε συγκεκριμένες δομές στον οργανισμό (που ονομάζονται αντιγόνα). Η κετουξιμάμπη (cetuximab) έχει σχεδιαστεί ώστε να προσκολλάται στον

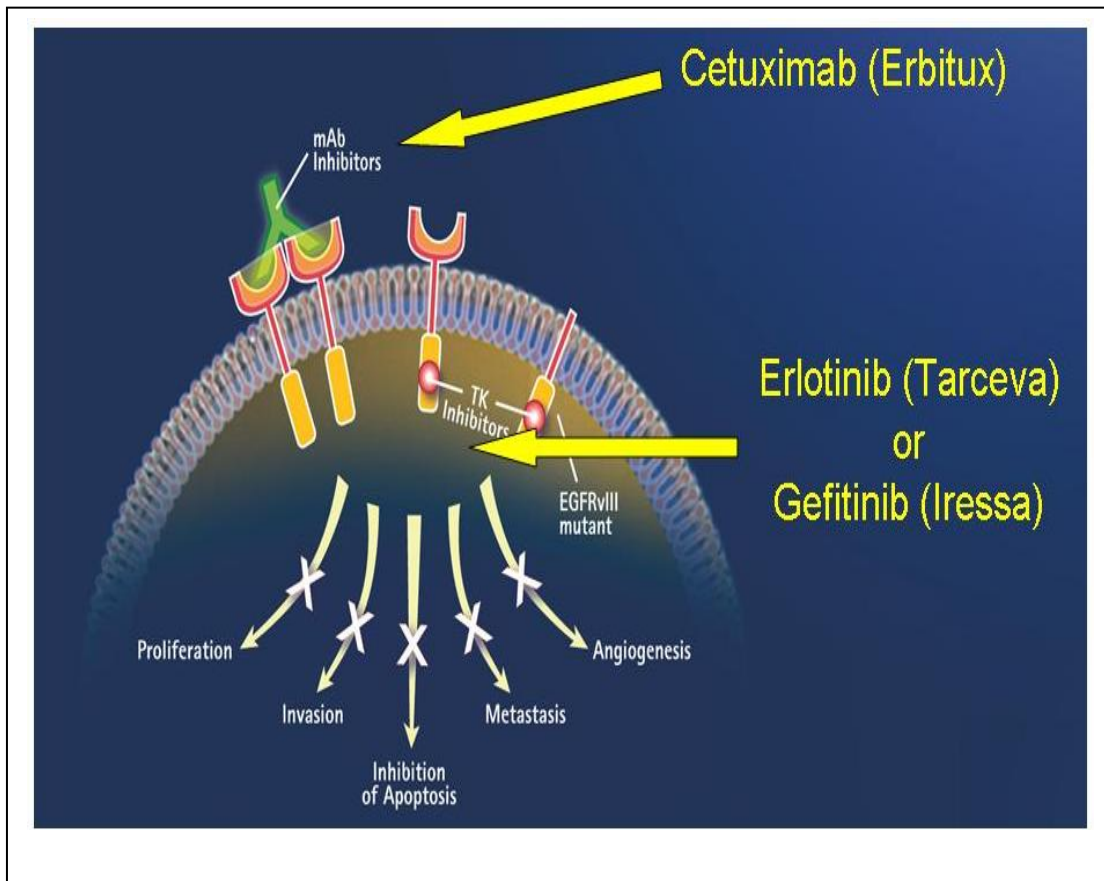


υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR), ο οποίος βρίσκεται στην επιφάνεια ορισμένων καρκινικών κυττάρων. Ως εκ τούτου, τα καρκινικά κύτταρα δεν μπορούν πλέον να λάβουν τις πληροφορίες που χρειάζονται για ανάπτυξη, εξέλιξη και εξάπλωση.

Το cetuximab είναι ένα χημειοθεραπευτικό μονοκλωνικό αντίσωμα με ανασταλτικές επιδράσεις στον υποδοχέα του EGF. Έχει μελετηθεί και εγκριθεί για την αντιμετώπιση του μεταστατικού καρκίνου του παχέος εντέρου και των καρκινωμάτων από πλακώδη κύτταρα στην κεφαλή και τον τράχηλο και πιστεύεται ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε άλλες κακοήθειες συμπεριλαμβανομένου του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (Hoag Jeffrey B et al, 2009).

Ο EGFR συχνά υπερεκφράζεται στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα και έχει εμπλακεί στην παθογένεια της νόσου. Μέχρι σήμερα ακολουθούνται 2 στρατηγικές που στοχεύουν στην αναστολή της δράσης του EGFR: α) μικρομοριακοί αναστολείς του τμήματος του υποδοχέα με δραστηριότητα κινάσης τυρόσινης (κυτταροπλασματικό τμήμα), όπως οι erlotinb και gefinitib, και β) μονοκλωνικά αντισώματα όπως το cetuximab, που δρουν απευθείας στο εξωκυττάριο τμήμα του EGFR (εικόνα 6). Συγκεκριμένα το cetuximab καταλαμβάνει την περιοχή III του εξωκυτταρίου τμήματος του υποδοχέα εμποδίζοντας την πρόσδεση των μορίων συνδετών, αναστέλλει το διμερισμό του

υποδοχέα και με αυτόν τον τρόπο εμποδίζει την αυτοφωσφορύλιωση και ενεργοποίηση του EGFR (Shiqing Li et al, 2005), γεγονός που συνεπάγεται αναστολή της φωσφορύλιωσης και της ενεργοποίησης των μονοπατιών PI3K/Akt και Ras/Raf MAPK (Isamu Okamoto, 2009). Ακόμη, προάγει την ενδοκυττάρωση του υποδοχέα (Mukohara Toru et al, 2005).



Εικόνα 6: Συγκριτική απεικόνιση των δράσεων των ομάδων αναστολής του EGFR.

Αν και η θέση πρόσδεσης κάποιου μορίου-συνδέτη στην περιοχή I μένει ανεπηρέαστη από δράση του cetuximab, ο υποδοχέας θα πρέπει να έχει δεσμευμένες και τις δύο θέσεις (στις περιοχές I και III αντίστοιχα) για να επιτύχει υψηλής συγγένειας σύνδεση προκειμένου να ενεργοποιηθεί. Επομένως, η επαρκής παρεμπόδιση μίας από τις δύο περιοχές πρόσδεσης των συνδετών, είναι επαρκής ώστε να εξασθενήσει η δράση του υποδοχέα (Shiqing Li et al, 2005).

Το cetuximab δρα καλύτερα σε κυτταρικές σειρές που εκφράζουν κάποιο μεταλλαγμένο τύπο του EGFR και γι' αυτό χαρακτηρίζονται ως ευαίσθητες στο cetuximab. Αντιθέτως, από τις κυτταρικές σειρές που εκφράζουν τον άγριο τύπο του υποδοχέα, κάποιες είναι ευαίσθητες και κάποιες άλλες όχι (π.χ. A549). Η εκδήλωση ευαισθησίας φαίνεται να εξαρτάται από την ύπαρξη ή όχι μεταλλαγμένου γονιδίου KRAS. Η KRAS πρωτεΐνη, είναι μια πρωτεΐνη που εδρεύει στην εσωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης και οι μεταλλάξεις που οδηγούν στην ενεργοποιημένη μορφή της, έχουν σαν επακόλουθο ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης μέσω MAPKs, ανεξάρτητα από την ενεργοποίηση του EGFR. Οι δράσεις αυτές της μεταλλαγμένης KRAS πρωτεΐνης, υποστηρίζουν τη συνεχή επιβίωση των καρκινικών κυττάρων ακόμη και παρουσία αναστολέα που δρα πριν από το βήμα της εμπλοκής της KRAS (David Raben et al, 2005 & Mukohara Toru et al, 2005 & Isamu Okamoto, 2009 & Yi-Fan Hsu et al, 2010).

11. ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Ο σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν να μελετηθεί εάν και κατά πόσο οι κυτταροκίνες επηρεάζουν τον κυτταρικό κύκλο και τον θάνατο των κυττάρων, καθώς η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και του κυτταρικού θανάτου των υπό την επίδραση μεσολαβητών ευοδωτικών ή κατασταλτικών της φλεγμονής (κυτταροκίνες, χημειοκίνες) δεν έχει αποσαφηνιστεί. Η παρούσα διατριβή εστιάζει στη μελέτη της δράσης των κυτταροκινών στον κυτταρικό κύκλο επιθηλιακών κυττάρων του πνεύμονα και ειδικότερα στον πολλαπλασιασμό αυτών. Η πιθανή συμβολή των κυτταροκινών στην κυτταρική επιβίωση και πολλαπλασιασμό ή στον κυτταρικό θάνατο μελετήθηκε είτε μεμονωμένα είτε ως ένα καλά οργανωμένο δίκτυο, όπως είναι ο ορός ασθενών με χρόνια φλεγμονή, και καθορίστηκε σε διαφορετικούς χρόνους και συγκεντρώσεις επί των επιθηλιακών κυττάρων του πνεύμονα. Η χρήση ορού από ασθενείς με χρόνια φλεγμονώδη νοσήματα αποτελεί μια σπάνια ερευνητική προσέγγιση και προσπαθεί να δώσει κάποιες απαντήσεις στην παθογένεια της σαρκοείδωσης, που είναι μια χρόνια φλεγμονώδης νόσος, με πιθανή σχέση με τον καρκίνο.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Πληθυσμός μελέτης

Τον πληθυσμό της παρούσας μελέτης αποτέλεσαν 24 ασθενείς με σαρκοείδωση, 10 ασθενείς με διαγνωσμένο καρκίνωμα του πνεύμονα και 10 ασθενείς με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ). Ως ομάδα ελέγχου χρησιμοποιηθήκαν 10 υγιείς εθελοντές. Η συλλογή του βιολογικού υγρού (ορός αίματος) έγινε σε συνεργασία με το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων και το Νοσοκομείο Χατζηκώστα Ιωαννίνων. Τα δείγματα ελήφθησαν με την συγκατάθεση των ασθενών και των υγιών ατόμων που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου (μάρτυρες) των πειραμάτων.

Την ομάδα ελέγχου αποτέλεσαν 10 άτομα, 4 γυναίκες (40%) και 6 άνδρες (60%). Το εύρος της ηλικίας κυμάνθηκε από τα 36 μέχρι τα 55 έτη, με μέσο όρο τα 44 ± 6 έτη (γυναίκες= 42 ± 6 και άντρες= 46 ± 6). Ένας μόνο ήταν καπνιστής.

Όσον αφορά στους ασθενείς με σαρκοείδωση, (n=24) οι 17 ήσαν γυναίκες (70,8%) και οι 7 άντρες (29,2%) . Η ηλικία κυμαινόταν από τα 32 έτη έως τα 78 έτη, με μέσο όρο τα 50 ± 12 έτη (γυναίκες= 54 ± 12 και άντρες= 41 ± 7). Από αυτούς τους 2 ήταν καπνιστές, 2 πρώην καπνιστές και οι υπόλοιποι 20 μη καπνιστές. Επιπλέον, 10 ασθενείς κατατάσσονται στο στάδιο I της νόσου, 11 στο στάδιο II και 3 στο στάδιο III. Οκτώ δεν είχαν λάβει ποτέ θεραπευτική αγωγή, 9 είχαν λάβει στο παρελθόν και 7 βρίσκονταν υπό θεραπευτική αγωγή κατά την χρονική περίοδο της αιμοληψίας.

Από τους ασθενείς με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ), (n=10), δύο ήταν γυναίκες (20%) και οι 8 άντρες (80%). Η ηλικία κυμαίνονταν από τα 60 έτη έως τα 80 έτη με μέσο όρο τα 69 ± 8 έτη (γυναίκες= 62 ± 2 και άντρες= 71 ± 8). Από αυτούς τους οι 9 ήταν καπνιστές και ένας μόνο ήταν μη καπνιστής, Από τους 10 ασθενείς, οι εννέα ευρίσκονταν υπό θεραπευτική αγωγή.

Από τους ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα (n=10) οι 5 ήσαν γυναίκες (50%) και οι 5 άντρες (50%). Η ηλικία κυμαίνονταν από τα 46 έτη έως τα 72 έτη με μέσο όρο τα 63 ± 17 έτη (γυναίκες= 65 ± 6 και άντρες= 62 ± 10). Από αυτούς οι 4 βρίσκονταν υπό θεραπευτική αγωγή, 1 είχε λάβει στο παρελθόν και ολοκληρώσει την θεραπεία και 5 δεν είχαν λάβει θεραπευτική αγωγή κατά την χρονική περίοδο της αιμοληψίας. Εννέα ήταν καπνιστές και ένας μη καπνιστής.

2. Κυτταρικές σειρές

Κυτταρική σειρά A549

Η κυτταρική σειρά A549 προέρχεται από ασθενή με αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα (American Type Culture Collection). Αναπτύσσεται προσκολλώμενη στο τρυβλίο σε θρεπτικό μέσο F12 με L-γλουταμίνη, εμπλουτισμένο με 1,5g/L ανθρακικό νάτριο (sodium bicarbonate), με 2mM L-γλουταμίνη και με 10% απενεργοποιημένο με θέρμανση ορό από έμβρυο βοός (Fetal Bovine serum, FBS) και 1% αντιβιοτικό πενικιλίνη/ στρεπτομοκίνη.

Κυτταρική σειρά SKMES

Η κυτταρική σειρά SKMES προέρχεται από ασθενή με πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα και ήταν ευγενής προσφορά από τον κ. Τριαντάφυλλο Λιλόγλου (Roy Castle Lung Cancer Research Programme /University of Liverpool Cancer Research Centre, 200 London Road Liverpool L39TA). Η κυτταρική σειρά SKMES αναπτύσσεται προσκολλώμενη στο τρυβλίο σε θρεπτικό μέσο Megacell εμπλουτισμένο με 2mM L-γλουταμίνη και με 10% απενεργοποιημένο με θέρμανση ορό από έμβρυο βοός (Fetal Bovine serum, FBS) και 1% αντιβιοτικό πενικιλίνη/ στρεπτομοκίνη.

3. Υλικά και Όργανα

3.1. Γενικός εργαστηριακός εξοπλισμός

- Ανεστραμμένο Μικροσκόπιο (Olympus IM, Hamburg, Germany)
- Απαγωγός κυτταροκαλλιιεργειών (Jouan Msc 12)
- Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer (SIGMA Chemical Company (St. Louis, MO, USA)
- Αυτόκαυστο (P-selecta Presoclave 30)
- Επώαστικός θάλαμος (Forma Scientific, Waltham, MA, USA)
- Ξηραντήρας (P-selecta)
- Φυγόκεντρος (Jouan MR 22i)
- Υδατόλουτρο (P-selecta Unitronic OR)
- Καταψύκτης -80oC (Forma Scientific, Waltham, MA, USA)

3.2. Υλικά Κυτταροκαλλιιεργειών

- Καλυπτρίδες (Menzel-Glaser)
- Αντικειμενοφόροι γυάλινες πλάκες (Menzel-Glaser)
- Ορολογικά βαθμονομημένα σιφώνια των 5 ml, των 10 ml και των 25 ml (Corning Incorporated Costar)
- Πιπέττες τύπου Gilson όγκου 2 μl, 100 μl, 200 μl και 1000 μl (Gilson)
- Πλαστικοί βαθμονομημένοι σωλήνες τύπου Falcon των 15ml (Corning Costar)
- Πλαστικοί σωλήνες τύπου Eppendorf των 1,8 ml (Eppendorf)
- Ακρορύγχη πιπέττας τύπου Gilson χωρητικότητας 1000μl, 200μl, 100μl και 10μl (Gilson)
- Στατώ
- Τρυβλία κυτταροκαλλιιεργειας: Petri 100mm (Corning Costar)
- Τρυβλία κυτταροκαλλιιεργειας: 6-πηγαδιών mm (Corning Costar)
- Αντικειμενοφόροι πλάκες κυτταροκαλλιιεργειας 8 πηγαδιών (chamber slides, BD Falcon)
- Απορροφητικό χαρτί

3.3. Διαλύματα (γενικά)

- Απεσταγμένο νερό (dH₂O)
- Δις Απεσταγμένο νερό (ddH₂O)
- Αιθυλική αλκοόλη 70%
- Χλωρίνη

3.4. Διαλύματα κυτταρικής σειράς A549

- Θρεπτικό υλικό Ham's F12 εμπλουτισμένο με L-γλουταμίνη (GIBCO BRL)
- Ανθρακικό νάτριο (sodium bicarbonate) (GIBCO BRL)
- L-γλουταμίνη (L-glutamine) (PAA Laboratories GmbH)
- Αντιβιοτικό πενικιλίνη/ στρεπτομυκίνη (penicillin/ streptomycin), (PAA Laboratories GmbH)
- Ορός από έμβryo βοός (Fetal Bovine Serum) (PAA Laboratories GmbH)
- Τρυψίνη/EDTA (trypsin/ EDTA) (PAA Laboratories GmbH)
- Διάλυμα φωσφορικών αλάτων (Phosphate Buffer Saline) (Sigma Chemical Company)
- DMSO (Dimethyl sulfoxide) (Sigma Chemical Company)

3.5. Διαλύματα κυτταρικής σειράς SKMES

- Θρεπτικό υλικό Megacell (Dubelco's Modified Eagle's Medium/ Nutrient mixture F-12 Ham), Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)
- L-γλουταμίνη (L-glutamine), (PAA Laboratories GmbH)
- Αντιβιοτικό πενικιλίνη/ στρεπτομυκίνη (penicillin /streptomycin), (PAA Laboratories GmbH)
- Ορός από έμβryo βοός (Fetal Bovine Serum) (PAA Laboratories GmbH)
- Τρυψίνη/EDTA (trypsin/ EDTA) (PAA Laboratories GmbH)
- Διάλυμα φωσφορικών αλάτων (Phosphate Buffer Saline), (Sigma Chemical Company)
- DMSO (Dimethyl sulfoxide) (Sigma Chemical Company)

3.6. Διαλύματα για Δοκιμασία Βιωσιμότητας

- Trypan-Blue (Sigma Chemical Company)
- Τρυψίνη/EDTA (trypsin/ EDTA) (PAA Laboratories GmbH)

3.7. Κυτταροκίνες

- Ιντερλευκίνη 1β (Interleukin 1β /IL-1β) (human recombinant), (Sigma Chemical Company)
- Ιντερλευκίνη 13 (Interleukin 13/ IL-13) (human recombinant), (Sigma Chemical Company)
- Κυτταροκίνη TNF-α (Tumor Necrosis alpha/ TNF-α) (human recombinant), (Sigma Chemical Company)
- Ιντερφερόνη γ (Interferon γ/ IFN-γ) (hBA143), (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)

3.8. Αντιδραστήρια ανοσοκυτταροχημείας

- Απεσταγμένο νερό (dH₂O)
- Δις Απεσταγμένο νερό (ddH₂O)
- Ταμπλέτες PBS (Phosphate Buffer Saline) (SIGMA)
- Αιθυλική αλκοόλη (PA Panreac)
- Ακετόνη (Riedel- de-Haen)
- Μεθανόλη (Riedel-de Haen)
- Διάλυμα 3% H₂O₂ (MERCK)
- ZytoChem Plus HRP Kit, Broad Spectrum (Zytomed Systems)
- DAB (3,3-diaminobenzidine) Kit (IHC Chemicon)
- Methyl green (πράσινο του μεθυλενίου) (MERCK)
- Αιματοξυλίνη (MERCK)
- Ηωσίνη (MERCK)

3.9. Αντισώματα

- anti-EGFr (Epidermal Growth Factor receptor) (mouse anti-human) (Becton Dickinson)
- anti β-actin (mouse anti-human) (Sigma Chemical Company)

4. Μέθοδοι

4.1. Απομόνωση ανθρώπινου ορού

Η δειγματοληψία των ανθρώπινων ορών έγινε με καθιερωμένη τεχνική. Για σκοπούς της εργασίας αυτής χρησιμοποιήθηκε ορός αίματος από

- υγιή άτομα και
- ασθενείς με :
 - Σαρκοείδωση,
 - Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) και
 - Καρκίνωμα πνεύμονα

Η λήψη αίματος, τόσο των μαρτύρων όσο και των ασθενών, έλαβε χώρα τις πρωινές ώρες. Αμέσως μετά την αιμοληψία ακολούθησε επώαση του αίματος επί μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (22-24°C). Στη συνέχεια το αίμα φυγοκεντρήθηκε σε 2000g επί 10 λεπτά με στόχο το διαχωρισμό των τριών φάσεων του αίματος (από πάνω προς τα κάτω) :

- ορός (διάφανη κίτρινη χροιά),
- λευκά αιμοσφαίρια (λευκή χροιά) και
- ερυθρά αιμοσφαίρια (κόκκινη χροιά).

Μετά τη φυγοκέντρηση, συλλέχθηκε ο ορός, ο οποίος κατανεμήθηκε σε μικρότερους όγκους και αποθηκεύτηκε στους -80° C.

4.2. Κυτταροκαλλιέργειες

Για τα πειράματα της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκαν οι ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές πνεύμονα: A549 και SKMES. Η ανάπτυξη αμφοτέρων των κυτταρικών σειρών έγινε σε επωαστικό θάλαμο (Forma Scientific) στους 37° C, σε υγρή ατμόσφαιρα με 95% αέρα και 5% CO₂.

4.3. Έκθεση των κυτταρικών σειρών σε ανθρώπειο ορό

A. Κυτταρική σειρά A549

Για τα πειράματα της παρούσας μελέτης, συλλέχθηκαν τα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα τύπου A549 στην λογαριθμική φάση ανάπτυξης μετά από φυγοκέντρηση σε 2000g επί 2 λεπτά. Μετά την φυγοκέντρηση τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε φρέσκο θρεπτικό υλικό και υπολογίστηκε η πυκνότητά τους με χρήση αιμοκυτταρόμετρου Neubauer (SIGMA) και οπτικού ανεστραμμένου μικροσκοπίου (Olympus IM). Στρώθηκαν 100,000 κύτταρα ανά πηγάδι σε τρυβλία καλλιέργειας 6-πηγαδιών και παρέμειναν επί 2 ώρες σε συνθήκες καλλιέργειας. Με το πέρας των 2 ωρών τα κύτταρα επώαστηκαν με θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με 1% ανθρώπινο ορό¹, επί 24, 48 ή 72 ώρες². Τα πειράματα έγιναν εις διπλούν. Σε κάθε πείραμα το κάθε δείγμα ήταν διπλό και ως μάρτυρας για την τήρηση των σωστών προδιαγραφών χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που δεν επώαστηκαν με κάποιο παράγοντα παρά μόνο με το θρεπτικό τους υλικό.

B. Κυτταρική σειρά SKMES

Για τα πειράματα της παρούσας μελέτης, συλλέχθηκαν τα ανθρώπινα καρκινικά πλακώδη κύτταρα πνεύμονα τύπου SKMES στην λογαριθμική φάση ανάπτυξης μετά από φυγοκέντρηση σε 2000g επί 2 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντρηση επαναιωρήθηκαν σε φρέσκο θρεπτικό υλικό και υπολογίστηκε η πυκνότητά τους με χρήση αιμοκυτταρόμετρου Neubauer και οπτικού ανεστραμμένου μικροσκοπίου (Olympus IM). Στρώθηκαν 100,000 κύτταρα ανά πηγάδι σε τρυβλίο καλλιέργειας 6-πηγαδιών και παρέμειναν επί 2 ώρες σε συνθήκες καλλιέργειας. Με το πέρας των 2 ωρών, τα κύτταρα εκτέθηκαν στον ορό επί 24, 48

¹ Η συγκέντρωση του ορού που χρησιμοποιήθηκε, επελέχθη κατόπιν σειράς πειραμάτων με διαβαθμιζόμενες συγκεντρώσεις (0%, 1%, 5%, 10%) με στόχο την εκλογή της μικρότερης δυνατής συγκέντρωσης που επιφέρει αλλαγή στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Η ελάχιστη δυνατή συγκέντρωση που επιφέρει αλλαγή στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων είναι το 1%.

² Η στιγμή εμπλουτισμού του θρεπτικού μέσου των κυττάρων με ορό, θεωρείται χρονικά το σημείο στατικής φάσης ανάπτυξης των κυττάρων και κατ' επέκταση ο χρόνος έναρξης των πειραμάτων. Οι 72 ώρες θεωρήθηκαν το σημείο Plateau- σημείο κορεσμού, μετά το πέρας του οποίου σταματάει η ανάπτυξη των κυττάρων και αρχίζει η αύξηση της θνησιμότητας αυτών.

ή 72 ώρες. Τα πειράματα έγιναν εις διπλούν. Σε κάθε πείραμα το κάθε δείγμα ήταν διπλό και ως μάρτυρας για την τήρηση των σωστών προδιαγραφών χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που δεν επώαστηκαν με κάποιο παράγοντα παρά μόνο με το θρεπτικό τους υλικό.

4.4. Έκθεση των κυτταρικών σειρών A549 και SKMES στον αναστολέα του EGFr (cetuximab) παρουσία ή απουσία ορού ασθενούς με σαρκοείδωση.

Συλλέχθηκαν κύτταρα και των δύο κυτταρικών σειρών στην λογαριθμική φάση ανάπτυξης μετά από φυγοκέντρηση σε 2000g επί 2 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντρηση επαναιωρήθηκαν σε φρέσκο θρεπτικό υλικό και υπολογίστηκε η πυκνότητά τους με χρήση αιμοκυτταρόμετρου Neubauer και οπτικού ανεστραμμένου μικροσκοπίου (Olympus IM). Στρώθηκαν 100,000 κύτταρα ανά πηγάδι σε τρυβλίο καλλιέργειας 6-πηγαδιών και παρέμειναν 2 ώρες σε συνθήκες καλλιέργειας. Με το πέρας των 2 ωρών οι δυο κυτταρικές σειρές επώαστηκαν ταυτόχρονα:

1. σε θρεπτικό υλικό
2. σε θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο με ορό ασθενούς με σαρκοείδωση 1%,
3. σε θρεπτικό που περιείχε τον αναστολέα του EGFr (Epidermal Growth Factor receptor) (cetuximab) σε συγκέντρωση 100ng/ml και
4. σε θρεπτικό εμπλουτισμένο με ορό ασθενούς με σαρκοείδωση 1% μαζί με τον αναστολέα του EGFr (100ng/ml)³.

Τα κύτταρα εκτέθηκαν στους ανωτέρω παράγοντες επί 24 ώρες. Τα πειράματα έγιναν εις διπλούν.

4.5. Έκθεση των κυτταρικών σειρών A549 και SKMES σε κυτοκίνες

Συλλέχθηκαν κύτταρα των κυτταρικών σειρών του πνεύμονα A549 και SKMES στην λογαριθμική φάση ανάπτυξης μετά από φυγοκέντρηση σε 2000g επί 2 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντρηση τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε φρέσκο θρεπτικό υλικό

³ Η χορηγηθείσα συγκέντρωση (100ng/ml) του αναστολέα είναι αυτή που προτείνεται στην βιβλιογραφία για in vitro πειράματα σε κυτταρικές σειρές.

και υπολογίστηκε η πυκνότητά τους με χρήση αιμοκυτταρόμετρου Neubauer και οπτικού ανεστραμμένου μικροσκοπίου (Olympus IM). Στρώθηκαν 100,000 κύτταρα ανά πηγάδι (well) σε τρυβλίο καλλιέργειας 6-πηγαδιών (6-well plate) και παρέμειναν 2 ώρες σε συνθήκες καλλιέργειας. Με το πέρας των 2 ωρών οι δυο κυτταρικές σειρές επώασθηκαν με έναν από τους παρακάτω παράγοντες:

1. θρεπτικό μέσο
2. θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο με IL-1 β (σε συγκεντρώσεις 0,1ng/ ml και 0,5ng/ ml)
3. θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο με IL-13 (σε συγκεντρώσεις 0,5ng/ml και 2,5ng/ ml)
4. θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο με IFN- γ (σε συγκεντρώσεις $2,5 \times 10^4$ U/ ml και $12,5 \times 10^4$ U/ ml)
5. θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο με TNF-a (σε συγκεντρώσεις 0,5ng/ ml και 2,5ng/ ml).

Τα κύτταρα επώασθηκαν με τους ανωτέρω παράγοντες 12 και 24 ώρες. Τα πειράματα έγιναν εις διπλούν.

4.6. Μέτρηση της βιωσιμότητας και του πολλαπλασιασμού των A549 και SKMES κυττάρων

Αφού εκτέθηκε η κάθε κυτταρική σειρά σε ανθρώπινο ορό για 24, 48 ή 72 ώρες, προσδιορίστηκε η βιωσιμότητα και ο ρυθμός πολλαπλασιασμού αμφοτέρων των κυτταρικών σειρών. Η μέτρηση της βιωσιμότητας και του αριθμού των A549 καθώς και των SKMES κυττάρων έγινε σε αιμοκυττόμετρο, με την τεχνική της χρώσης με Trypan blue και με τη χρήση ανεστραμμένου μικροσκοπίου (Olympus IM).

4.7. Ανοσοκυτταροχημικός προσδιορισμός του υποδοχέα EGFr στις κυτταρικές σειρές A549 και SKMES με τη τεχνική αβιδίνης - βιοτίνης - ανοσοϋπεροξειδάσης.

Η ανοσοκυτταροχημεία είναι τεχνική που βασίζεται στη χρήση αντισωμάτων που στοχεύουν σε συγκεκριμένα αντιγόνα πρωτεϊνών των κυττάρων μέσω ειδικών

επιτόπων. Η μέθοδος αυτή προσδιορισμού των αντιγόνων, βασίζεται στην αρχή αντίδρασης αντιγόνου-αντισώματος. Συνήθως χρησιμοποιείται η έμμεση τεχνική, όπου το αντίσωμα κατά του μελετώμενου μορίου δεν είναι σεσημασμένο και η ανίχνευση του γίνεται με ένα δεύτερο, αντίσωμα κατά του πρώτου, το οποίο είναι σεσημασμένο.

Η έμμεση τεχνική είναι πιο ευαίσθητη λόγω της ενίσχυσης του σήματος, καθώς δημιουργούνται περισσότερες θέσεις σύνδεσης με το αντίσωμα. Στην τεχνική της ανοσοκυτταροχημείας με ανοσοϋπεροξειδάση, το δεύτερο ένζυμο είναι συνδεδεμένο με το ένζυμο της υπεροξειδάσης. Το ένζυμο-ιχνηθέτης εντοπίζεται αφού αντιδράσει με το κατάλληλο υπόστρωμα που δημιουργεί ορατό αδιάλυτο προϊόν. Εάν το αντιγόνο εντοπίζεται στην επιφάνεια του κυττάρου, δηλαδή στην κυτταρική του μεμβράνη, τότε από την αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος θα προκύψει ένας δακτύλιος στην επιφάνεια του κυττάρου. Εάν όμως το αντιγόνο εντοπίζεται στο εσωτερικό του κυττάρου, κυτταρόπλασμα/ πυρήνας, τότε από την αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος θα προκύψει η εικόνα στικτών κουκίδων.

Για τις ανάγκες αυτής της μελέτης, συλλέχθηκαν κύτταρα των κυτταρικών σειρών του πνεύμονα A549 και SKMES στην λογαριθμική φάση ανάπτυξης μετά από φυγοκέντρηση στα 2000g επί 2 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντρηση επαναιωρήθηκαν σε φρέσκο θρεπτικό υλικό και υπολογίστηκε η πυκνότητά τους με χρήση αιμοκυτταρόμετρου Neubauer και οπτικού ανεστραμμένου μικροσκοπίου (Olympus IM). Στρώθηκαν 10,000 κύτταρα ανά πηγάδι (chamber) σε ειδικές αντικειμενοφόρους πλάκες κυτταροκαλλιέργειας 8-πηγαδιών (chamber slides) τα οποία επώασθησαν ταυτόχρονα:

- με απλό θρεπτικό μέσο,
- με θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο με 1% ορό ασθενούς με σαρκοειδωση,
- με θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο με 100μg/ml cetuximab (αναστολέας του υποδοχέα EGF)
- με θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο με ορό ασθενούς με σαρκοειδωση και αναστολέα του EGFr

Με το πέρασ των 24 ωρών το υπερκείμενο διάλυμα απομακρύνθηκε και τα πηγάδια ξεπλύθηκαν 2 φορές με PBS. Στη συνέχεια αφαιρέθηκαν τα διαχωριστικά των θαλάμων και οι αντικειμενοφόροι πλάκες μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα ακετόνης 70% επί 10 λεπτά.

Πρωτόκολλο χρώσης αιματοξυλίνης-ηωσίνης για την μορφολογική ανάλυση των κυττάρων

1. Ξέπλυμα σε dH₂O (10 δευτερόλεπτα)
2. Ξέπλυμα σε dH₂O (10 δευτερόλεπτα)
3. Εμβάπτιση σε αιματοξυλίνη (15-20 δευτερόλεπτα)
4. Ξέπλυμα σε H₂O (3 λεπτά)
5. Αφυδάτωση σε διάλυμα αιθανόλης 80% (1 λεπτό)
6. Εμβάπτιση σε ηωσίνη (2,5 λεπτά)
7. Αφυδάτωση σε διάλυμα αιθανόλης 95% (1 λεπτό)
8. Αφυδάτωση σε διάλυμα αιθανόλης 95% (1 λεπτό)
9. Αφυδάτωση σε διάλυμα αιθανόλης 100% (1 λεπτό)
10. Εμβάπτιση σε ξυλόλη (1 λεπτό)
11. Εμβάπτιση σε ξυλόλη (1 λεπτό)
12. Επικάλυψη με διάλυμα Endelan / καλυπτρίδα
13. Μικροσκόπηση

Πρωτόκολλο ανοσοκοκταροχημείας

1. Απενεργοποίηση ενδογενών υπεροξειδασών: επώαση σε διάλυμα 3% H₂O₂ 10 λεπτά
2. Ξέπλυμα με PBS 1 φορά, 2 λεπτά
3. Επώαση με blocking serum, (με σκοπό την δέσμευση μη ειδικών για το 1^ο αντίσωμα θέσεων πρόσδεσης) για 5 λεπτά
4. Ξέπλυμα με PBS 1 φορά για 2 λεπτά
5. Επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα για 1 ώρα.
6. Ξέπλυμα με PBS 3 φορές για 2 λεπτά
7. Επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα για 15 λεπτά.
8. Ξέπλυμα με PBS 3 φορές για 2 λεπτά
9. Επώαση με διάλυμα στρεπταβιδίνης – Horse Radish Peroxidase για 15 λεπτά.
10. Ξέπλυμα με PBS 3 φορές για 2 λεπτά
11. Χρώση με DAB
12. Παύση αντίδρασης με ddH₂O.
13. Αντιχρώση με methyl green 2 %.
14. Εμβάπτιση σε ξυλόλη (1 λεπτό)
15. Εμβάπτιση σε ξυλόλη (1 λεπτό)
16. Επικάλυψη με διάλυμα Endelan / καλυπτρίδα
17. Μικροσκόπηση

4.8. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το Student's t-test, ενώ το επίπεδο σημαντικότητας καθορίστηκε σε $p < 0,05$.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Η επίδραση των κυτταροκινών IL-1b, IL-13, IFN γ και TNF-a στον κυτταρικό κύκλο των καρκινικών κυτταρικών σειρών του πνεύμονα A549 και SKMES.

Οι κυτταροκίνες που χορηγήθηκαν στις καρκινικές κυτταρικές σειρές A549 και SKMES ήταν οι ακόλουθες:

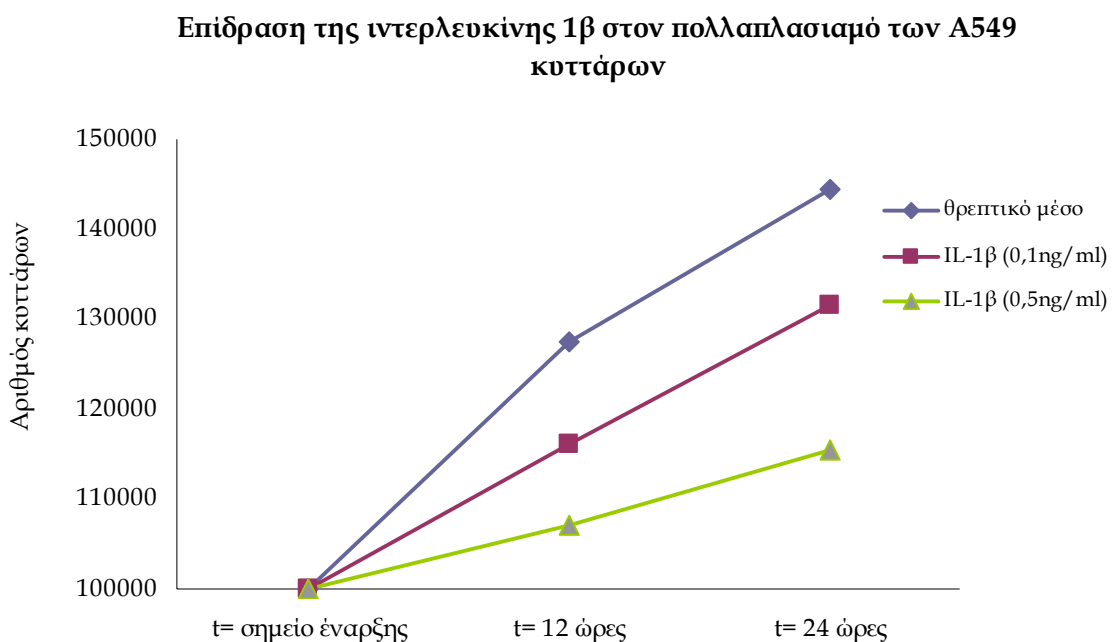
1. IL-1b (Interleukin-1 β) σε συγκέντρωση 0,1 και 0,5 ng/ml
2. IL-13 (Interleukin-13) σε συγκέντρωση 0,5 και 2,5 ng/ml
3. IFN- γ (Interferon - γ) σε συγκέντρωση 2,5 και 12,5 $\times 10^4$ U/ml
4. TNF-a (Tumor necrosis factor-a) σε συγκέντρωση 0,5 και 2,5 ng/ml

Η επώαση των A549 και SKMES κυττάρων με καθεμία από τις παραπάνω κυτταροκίνες διήρκησε 12 και 24 ώρες. Στόχος μας ήταν να παρατηρήσουμε αν η προσθήκη των κυτταροκινών στο θρεπτικό υλικό και επώαση των κυτταρικών σειρών επί 12 ή 24 ώρες, επηρεάζει τη συμπεριφορά των A549 και SKMES κυττάρων, αλλά και να παρατηρήσουμε αν κάποια από αυτές επηρεάζει τον κυτταρικό κύκλο (πολλαπλασιασμό ή την απόπτωση) αυτών.

Ιντερλευκίνη-1β (Interleukin 1β) / IL-1β

Στο **γράφημα 1** που ακολουθεί απεικονίζεται η δράση της κυτοκίνης IL-1β στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων A549 μετά από επώαση διάρκειας αφ' ενός 12, αφ' ετέρου 24 ωρών. Στον **πίνακα 1** παρατίθενται αναλυτικά οι τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις των μετρήσεων μας.

ΓΡΑΦΗΜΑ 1: Συγκριτική απεικόνιση της δράσης της κυτταροκίνης IL-1β στον πολλαπλασιασμό της καρκινικής σειράς A549 μετά από επώαση διάρκειας 12 και 24 ωρών.



Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SD), εκφράζονται σε ακέραιους αριθμούς, και αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των κυττάρων πριν κ μετά την επίδραση της κυτταροκίνης IL-1b (σε συγκέντρωση 0.1ng/ml & 0.5ng/ml) για n=10. Η στατιστική ανάλυση έγινε με t-student test, $p < 0,05$.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1

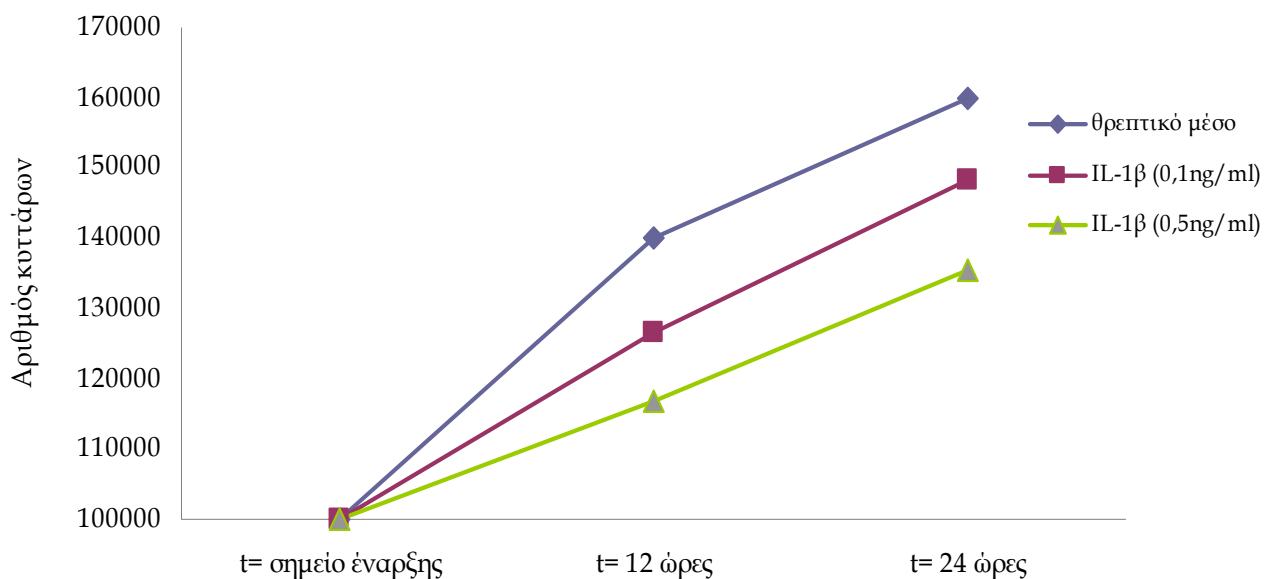
Επώαση A549 κυττάρων με Αριθμός κυττάρων στις	Θεραπευτικό μέσο (n=10)	Ιντερλευκίνη 1β (0.1 ng/ml) (n=10)	Ιντερλευκίνη 1β (0.5 ng/ml) (n=10)
12 ώρες	127563 \pm 7549	116125 \pm 5186 ($p < 0,000$)	107063 \pm 6096 ($p < 0,000$)
24 ώρες	144375 \pm 10593	131313 \pm 9807 ($p < 0,05$)	115156 \pm 9337 ($p < 0,0000$)

-
- ✓ Από την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων που λάβαμε κατόπιν επώασης των A549 κυττάρων με την κυτταροκίνη IL-1β (σε συγκέντρωση 0,1 και 0,5 ng/ml) διάρκειας 12 και 24 ωρών, προκύπτει ότι IL-1β *προκαλεί επιβράδυνση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων αυτών και μάλιστα με δόσοεξαρτώμενο τρόπο.*

Στο **γράφημα 2** που ακολουθεί απεικονίζεται η δράση της κυτοκίνης IL-1β στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων SKMES τόσο επί 12 όσο και επί 24 ώρες. Στον **πίνακα 2** παρατίθενται αναλυτικά οι τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις των μετρήσεων μας.

ΓΡΑΦΗΜΑ 2: Συγκριτική απεικόνιση της δράσης της κυτταροκίνης IL-1β στον πολλαπλασιασμό της καρκινικής σειράς SKMES στις 12 και 24 ώρες.

Επίδραση της ιντερλευκίνης 1β στον πολλαπλασιασμό των SKMES κυττάρων



Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SD), εκφράζονται σε ακέραιους αριθμούς, και αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των κυττάρων πριν κ μετά την επίδραση της κυτταροκίνης IL-1b (σε συγκέντρωση 0.1ng/ml & 0.5ng/ml) για n=10, η στατιστική ανάλυση έγινε με t-student test, p<0,05

ΠΙΝΑΚΑΣ 2

Επώαση SKMES κυττάρων με Αριθμός κυττάρων στις	Θρεπτικό μέσο (n=10)	Ιντερλευκίνη 1β (0.1 ng/ml) (n=10)	Ιντερλευκίνη 1β (0.5 ng/ml) (n=10)
12 ώρες	140125 \pm 7602	126625 \pm 3283 *(p<0,0000)	116938 \pm 8439 *(p<0,0000)
24 ώρες	160038 \pm 8920	148375 \pm 8899 *(p< 0,05)	135375 \pm 8800 *(p<0,0000)

- ✓ Από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων που λάβαμε κατόπιν επώασης των SKMES κυττάρων με την κυτταροκίνη IL-1β (σε συγκέντρωση 0,1 και 0,5 ng/ml) διάρκειας 12 και 24 ωρών, προκύπτει ότι η κυτταροκίνη IL-1β προκαλεί επιβράδυνση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων αυτών και μάλιστα με δόσοεξαρτώμενο τρόπο.

Σχόλιο:

Παρατηρούμε ότι τόσο η A549 (αδενοκαρκίνωμα) όσο και η SKMES (πλακώδης καρκίνος) κυτταρική σειρά του πνεύμονα παρουσιάζουν την ίδια «συμπεριφορά» κατά την επώαση τους με την κυτοκίνη IL-1β ως προς το ρυθμό πολλαπλασιασμού τους.

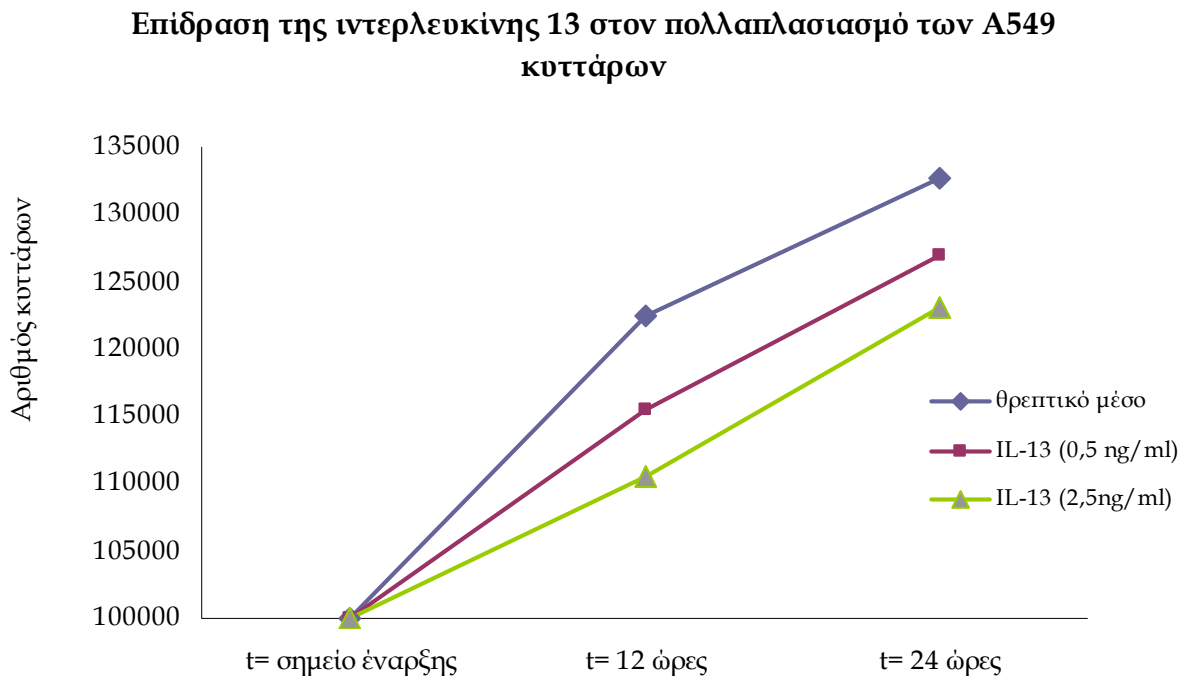
 Συμπέρασμα:

Η κυτοκίνη IL-1β προκαλεί επιβράδυνση του πολλαπλασιασμού των A549 και SKMES κυττάρων!

Ιντερλευκίνη-13 (Interleukin 13) / IL-13

Στο **γράφημα 3** που ακολουθεί απεικονίζεται η δράση της κυτοκίνης IL-13 στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων A549 μετά από επώαση διάρκειας 12 και 24 ωρών. Στον **πίνακα 3** παρατίθενται αναλυτικά οι τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις των μετρήσεων μας.

ΓΡΑΦΗΜΑ 3: Συγκριτική απεικόνιση της δράσης της κυτταροκίνης IL-13 στον πολλαπλασιασμό της καρκινικής σειράς A549 στις 12 και 24 ώρες.



Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SD), εκφράζονται σε ακέραιους αριθμούς, και αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των κυττάρων πριν κ μετά την επίδραση της κυτταροκίνης IL-13 (σε συγκέντρωση 0.5ng/ml & 2.5ng/ml) για n=10, η στατιστική ανάλυση έγινε με t-student test, $p < 0,05$

ΠΙΝΑΚΑΣ 3

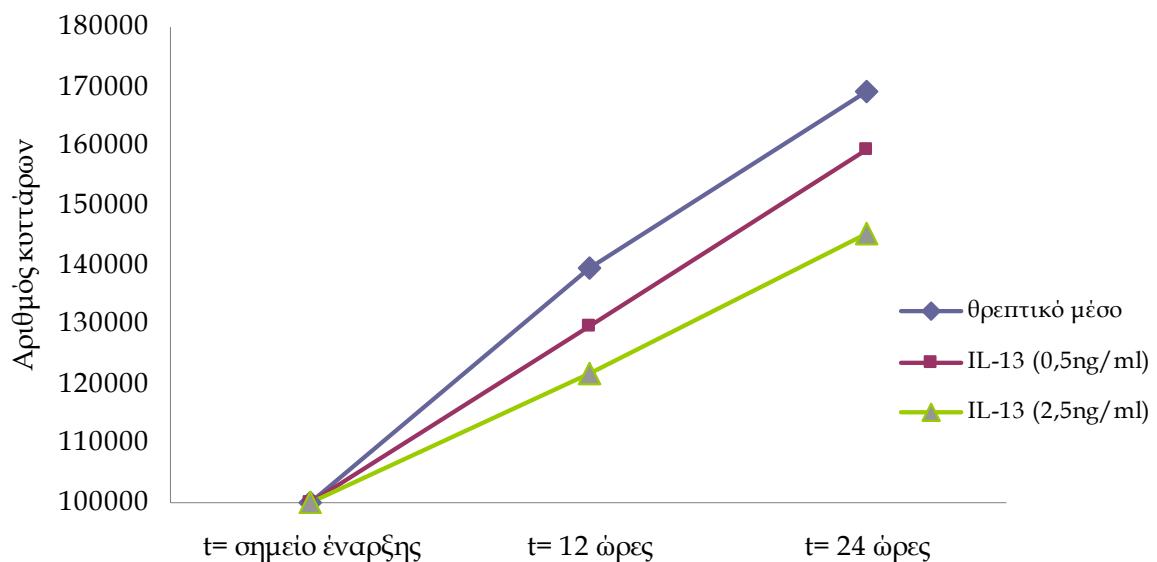
Επώαση A549 κυττάρων με Αριθμός κυττάρων στις	Θεραπευτικό μέσο (n=10)	Ιντερλευκίνη 13 (0.5 ng/ml) (n=10)	Ιντερλευκίνη 13 (2.5 ng/ml) (n=10)
12 ώρες	122400 \pm 6944	115438 \pm 5804 *(p=0,025)	110563 \pm 8732 *(p=0,003)
24 ώρες	132713 \pm 8574	126938 \pm 10526 (p=0,09)	123025 \pm 8240 *(p=0,019)

-
- ✓ Από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων που λάβαμε κατόπιν επώασης των A549 κυττάρων με την κυτταροκίνη IL-13 (σε συγκέντρωση 0,5 και 2,5 ng/ml) διάρκειας 12 και 24 ωρών, *προκύπτει ότι η κυτοκίνη IL-13 προκαλεί επιβράδυνση του πολλαπλασιασμού των A549 καρκινικών κυττάρων στις 12 ώρες, αλλά όσον αφορά στις 24 ώρες προκαλεί επιβράδυνση στατιστικώς σημαντική σε συγκέντρωση 2,5 ng/ml.*

Στο **γράφημα 4** που ακολουθεί απεικονίζεται η δράση της κυτοκίνης IL-13 στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων SKMES μετά από επώαση διάρκειας 12 και 24 ωρών. Στον **πίνακα 4** παρατίθενται αναλυτικά οι τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις των μετρήσεων μας.

ΓΡΑΦΗΜΑ 4: Συγκριτική απεικόνιση της δράσης της κυτταροκίνης IL-13 στον πολλαπλασιασμό της καρκινικής σειράς SKMES στις 12 και 24 ώρες.

Επίδραση της ιντερλευκίνης 13 στον πολλαπλασιασμό των SKMES κυττάρων




Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SD), εκφράζονται σε ακέραιους αριθμούς, και αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των κυττάρων πριν κ μετά την επίδραση της κυτταροκίνης IL-13 (σε συγκέντρωση 0.5ng/ml & 2.5ng/ml) για n=10, η στατιστική ανάλυση έγινε με t-student test, p<0,05

ΠΙΝΑΚΑΣ 4

Επώαση SKMES κυττάρων με Αριθμός κυττάρων στις	Θρεπτικό μέσο (n=10)	Ιντερλευκίνη 13 (0.5 ng/ml) (n=10)	Ιντερλευκίνη 13 (2.5 ng/ml) (n=10)
12 ώρες	139500 \pm 13297	129750 \pm 9661	121875 \pm 9114 (p=0,0028)
24 ώρες	169063 \pm 13697	159450 \pm 10363	145250 \pm 11987 p<0,0000)

- ✓ Από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων που λάβαμε κατόπιν επώασης των SKMES κυττάρων με την κυτταροκίνη IL-13 (σε συγκέντρωση 0,5 και 2,5 ng/ml) διάρκειας 12 και 24 ωρών, *προκόπτει πως η κυτοκίνη IL-13 προκαλεί στατιστικώς σημαντική επιβράδυνση του πολλαπλασιασμού των SKMES καρκινικών κυττάρων μόνο σε συγκέντρωση 2,5 ng/ml.*

 Συμπέρασμα:

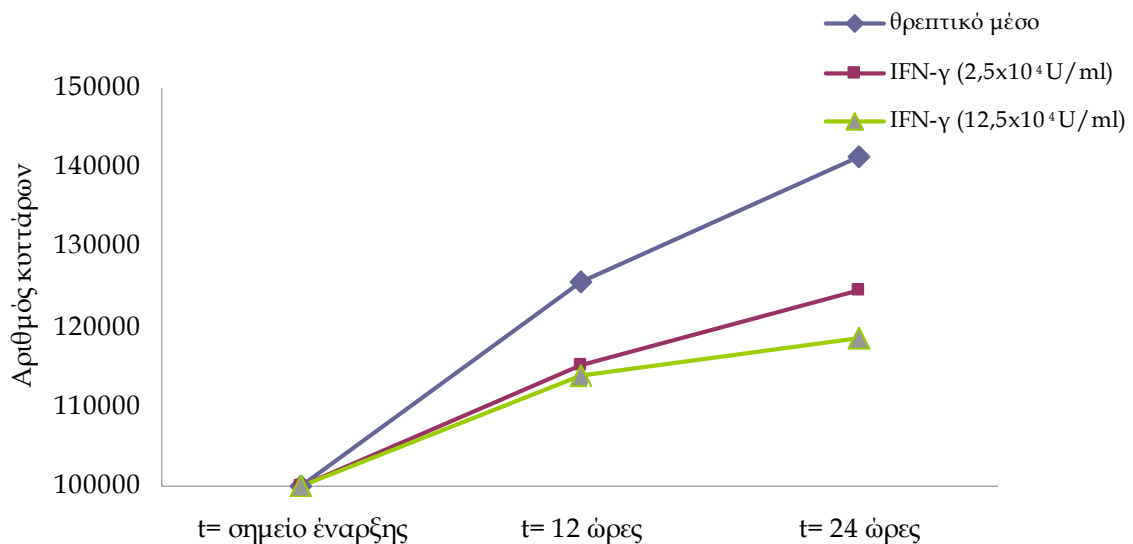
Η κυτοκίνη IL-13 σε συγκέντρωση 2.5ng/ml προκαλεί επιβράδυνση του πολλαπλασιασμού των A549 και SKMES καρκινικών κυττάρων!

Ιντερφερόνη-γ (Interferon-γ) / IFN-γ

Στο **γράφημα 5** που ακολουθεί απεικονίζεται η δράση της κυτοκίνης IFN-γ στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων A549 μετά από επώαση διάρκειας 12 και 24 ωρών. Στον **πίνακα 5** παρατίθενται αναλυτικά οι τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις των μετρήσεων μας.

ΓΡΑΦΗΜΑ 5: Συγκριτική απεικόνιση της δράσης της κυτταροκίνης IFN-γ στον πολλαπλασιασμό της καρκινικής σειράς A549 στις 12 και 24 ώρες.

Επίδραση της ιντερφερόνης- γ στον πολλαπλασιασμό των A549 κυττάρων



Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SD), εκφράζονται σε ακέραιους αριθμούς, και αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των κυττάρων πριν κ μετά την επίδραση της κυτταροκίνης IFN-γ (σε συγκέντρωση 2.5×10^4 U/ml & 12.5×10^4 U/ml) για $n=10$. Η στατιστική ανάλυση έγινε με *t*-student test, $p < 0,05$

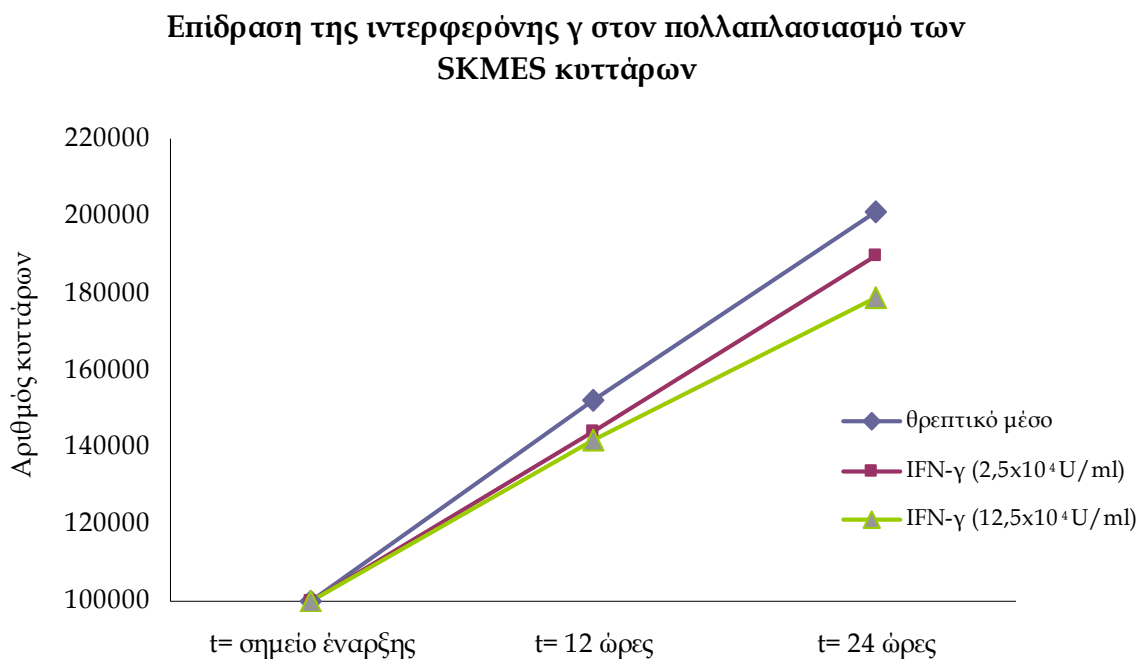
ΠΙΝΑΚΑΣ 5

Επώαση A549 κυττάρων με Αριθμός κυττάρων στις	Θρεπτικό μέσο (n=10)	Ιντερφερόνη-γ (2.5×10^4 U/ml) (n=10)	Ιντερφερόνη-γ (12.5×10^4 U/ml) (n=10)
12 ώρες	125735 \pm 7818	115250 \pm 6118 *(p<0,05)	113388 \pm 7995 *(p< 0,05)
24 ώρες	141438 \pm 12607	124638 \pm 13676 *(p< 0,05)	119125 \pm 13287 *(p< 0,05)

-
- ✓ Από την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων που λάβαμε κατόπιν επώασης των A459 με την κυτταροκίνη IFN- γ (σε συγκέντρωση 2,5 και 12,5 $\times 10^4$ U/ml) διάρκειας 12 και 24 ωρών, προκύπτει ότι *η κυτοκίνη IFN- γ προκαλεί επιβράδυνση του πολλαπλασιασμού των A549 καρκινικών κυττάρων.*

Στο **γράφημα 6** που ακολουθεί απεικονίζεται η δράση της κυτοκίνης IFN- γ στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων SKMES μετά από επώαση διάρκειας 12 και 24 ωρών. Στον **πίνακα 6** παρατίθενται αναλυτικά οι τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις των μετρήσεων μας.

ΓΡΑΦΗΜΑ 6: Συγκριτική απεικόνιση της δράσης της κυτταροκίνης IFN- γ στον πολλαπλασιασμό της καρκινικής σειράς SKMES στις 12 και 24 ώρες.



Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SD), εκφράζονται σε ακέραιους αριθμούς, και αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των κυττάρων πριν κ μετά την επίδραση της κυτταροκίνης IFN- γ (σε συγκέντρωση $2,5 \times 10^4$ U/ml & $12,5 \times 10^4$ U/ml) για $n=10$, η στατιστική ανάλυση έγινε με *t*-student test, $p < 0,05$

ΠΙΝΑΚΑΣ 6

Επώαση SKMES κυττάρων με Αριθμός κυττάρων στις	Θρεπτικό μέσο (n=10)	Ιντερφερόνη- γ ($2,5 \times 10^4$ U/ml) (n=10)	Ιντερφερόνη- γ ($12,5 \times 10^4$ U/ml) (n=10)
12 ώρες	152344 \pm 13270	143750 \pm 11100	142031 \pm 14062
24 ώρες	200938 \pm 22238	189688 \pm 20956	178750 \pm 22609

- ✓ Από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων που λάβαμε κατόπιν επώασης των SKMES με την κυτταροκίνη IFN- γ (σε συγκέντρωση 2,5 και 12,5 $\times 10^4$ U/ml) διάρκειας 12 και 24 ωρών, προκύπτει πως η κυτοκίνη IFN- γ δεν έχει κάποια επίδραση στον πολλαπλασιασμό των SKMES καρκινικών κυττάρων.

Σχόλιο:

Παρατηρούμε ότι ο πολλαπλασιασμός των A549 (αδενοκαρκίνωμα) και των SKMES (πλακώδης καρκίνος) κυττάρων επηρεάζεται διαφορετικά όταν επωασθούν με την κυτοκίνη IFN- γ .

Συμπέρασμα:

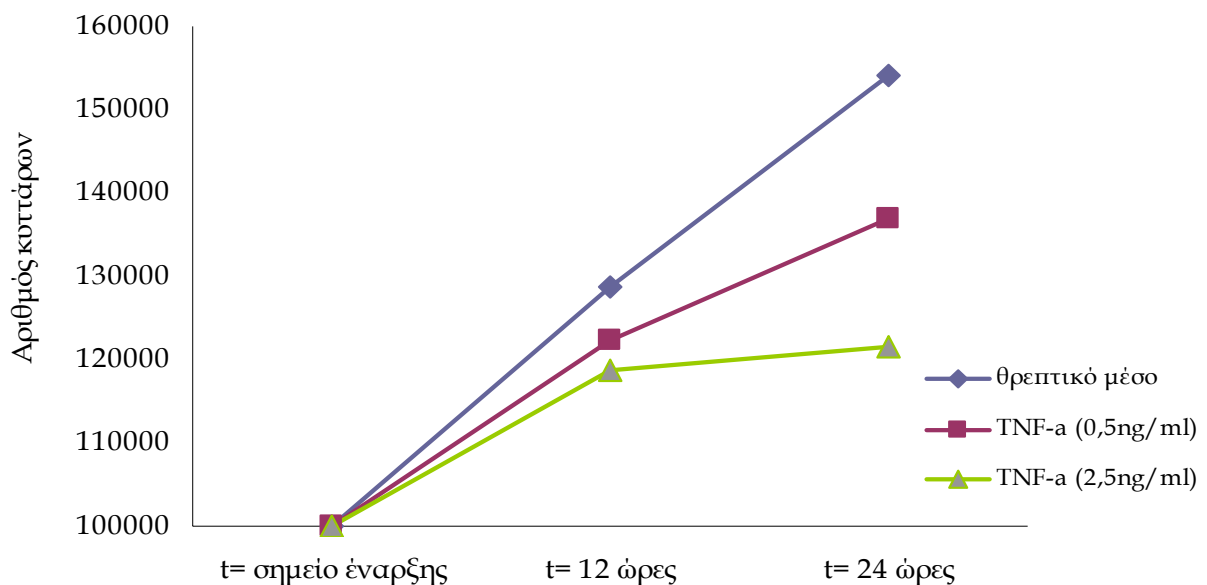
Η κυτοκίνη IFN- γ δεν προκαλεί στασιakώς σημαντική μεταβολή στον πολλαπλασιασμό των SKMES καρκινικών κυττάρων (μόνο τάση προς επιβράδυνσή του) αλλά σε συγκέντρωση 2.5×10^4 U/ml προκαλεί επιβράδυνση του πολλαπλασιασμού των A549 καρκινικών κυττάρων!

Tumor Necrosis Factor - α / TNF- α

Στο **γράφημα 7** που ακολουθεί απεικονίζεται η δράση της κυτοκίνης TNF- α στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων A549 μετά από επώαση διάρκειας 12 και 24 ωρών. Στον **πίνακα 7** παρατίθενται αναλυτικά οι τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις των μετρήσεων μας.

ΓΡΑΦΗΜΑ 7: Συγκριτική απεικόνιση της δράσης της κυτταροκίνης TNF- α στον πολλαπλασιασμό της καρκινικής σειράς A549 στις 12 και 24 ώρες.

Επίδραση του παράγοντα νέκρωσης όγκων- α (TNF- α) στον πολλαπλασιασμό των A549 κυττάρων



Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SD), εκφράζονται σε ακέραιους αριθμούς, και αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των κυττάρων πριν κ μετά την επίδραση της κυτταροκίνης TNF- α (σε συγκέντρωση 0.5ng/ml & 2.5ng/ml) για n=10, η στατιστική ανάλυση έγινε με t-student test, p<0,05

ΠΙΝΑΚΑΣ 7

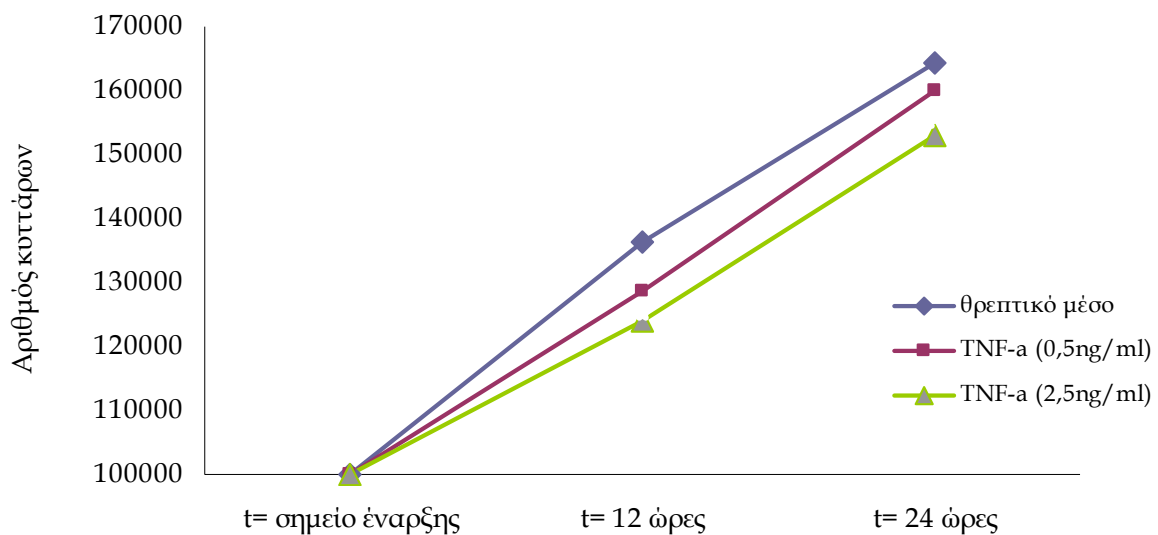
Επώαση A549 κυττάρων με Αριθμός κυττάρων στις	Θρεπτικό μέσο (n=10)	Παράγονας Νέκρωσης όγκων- α (0.5 ng/ml) (n=10)	Παράγονας Νέκρωσης όγκων- α (2.5 ng/ml) (n=10)
12 ώρες	128638 \pm 8104	122450 \pm 9994	120200 \pm 10092
24 ώρες	154125 \pm 11427	137500 \pm 12910 (p<0,05)	121500 \pm 7989 (p<0,0000)

-
- ✓ Από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων που λάβαμε κατόπιν επώασης των A549 κυττάρων με την κυτταροκίνη TNF-a (σε συγκέντρωση 0,5 και 2,5 ng/ml) διάρκειας 12 και 24 ωρών, προκύπτει ότι η *κυτοκίνη TNF-a* μετά από 24 ώρες προκαλεί επιβράδυνση στον πολλαπλασιασμό των A549 κυττάρων μάλιστα με δόσοεξαρτώμενο τρόπο.

Στο **γράφημα 8** που ακολουθεί απεικονίζεται η δράση της κυτοκίνης TNF- α στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων SKMES μετά από επώαση διάρκειας 12 και 24 ωρών. Στον **πίνακα 8** παρατίθενται αναλυτικά οι τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις των μετρήσεων μας.

ΓΡΑΦΗΜΑ 8: Συγκριτική απεικόνιση της δράσης της κυτταροκίνης TNF- α στον πολλαπλασιασμό της καρκινικής σειράς SKMES στις 12 και 24 ώρες.

Επίδραση του παράγοντα νέκρωσης όγκων- α (TNF- α) στον πολλαπλασιασμό των SKMES κυττάρων




Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SD), εκφράζονται σε ακέραιους αριθμούς, και αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των κυττάρων πριν κ μετά την επίδραση της κυτταροκίνης TNF- α (σε συγκέντρωση 0.5ng/ml & 2.5ng/ml) για n=10, η στατιστική ανάλυση έγινε με t-student test, p<0,05

ΠΙΝΑΚΑΣ 8

Επώαση SKMES κυττάρων με Αριθμός κυττάρων στις	Θρεπτικό μέσο (n=10)	Παράγοντας Νέκρωσης όγκων- α (0.5 ng/ml) (n=10)	Παράγοντας Νέκρωσης όγκων- α (2.5 ng/ml) (n=10)
12 ώρες	136000 \pm 8203	128550 \pm 9093	124125 \pm 9683 (p<0,05)
24 ώρες	164200 \pm 8483	159500 \pm 11137	153250 \pm 9469 (p<0,05)

- ✓ Από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων που λάβαμε κατόπιν επώασης των SKMES κυττάρων με την κυτταροκίνη TNF- α (σε συγκέντρωση 0,5 και 2,5 U/ml) διάρκειας 12 και 24 ωρών, προκύπτει ότι *η κυτοκίνη TNF- α σε συγκέντρωση 2,5 ng/ml προκαλεί επιβράδυνση του πολλαπλασιασμού των SKMES κυττάρων.*

 Συμπέρασμα:

Η κυτοκίνη TNF- α προκαλεί επιβράδυνση στον ρυθμό πολλαπλασιασμού των A549 κυττάρων κατόπιν επώασης διάρκειας 24 ωρών και μάλιστα με δόσοεξαρτώμενο τρόπο, αλλά μόνο συγκέντρωση 2.5ng/ml επιβραδώνει τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των SKMES κυττάρων(επώαση διάρκειας 12 και 24 ωρών).

Συνοψίζοντας

Παρατηρούμε ότι ο (πολλαπλασιασμός) διαφορετικών καρκινικών σειρών του πνεύμονα (αδενοκαρκίνωμα & πλακώδες καρκίνωμα) να μην δεν μεταβάλλεται με τον ίδιο ακριβώς τρόπο υπό την επίδραση ορισμένων φλεγμονωδών κυτταροκινών, όμως ανιχνεύεται μία γενική τάση, άλλοτε άλλης εντάσεως, επιβράδυνσης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Έχει όμως φανεί ότι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες πολύ συχνά είναι αυξημένες στον ορό ασθενών που πάσχουν από χρόνια φλεγμονώδη νοσήματα κάποια από τα οποία, φαίνεται ότι εμπλέκονται στους παθογενετικούς μηχανισμούς των νεοπλασιών, πιθανότατα παρέχοντας ένα μικροπεριβάλλον ευνοϊκό για την ανάπτυξη τους σε γενετικώς προδιατεθειμένα άτομα υπό κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες.

Η επιτάχυνση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού αποτελεί απαραίτητη συνθήκη για την ανάπτυξη νεοπλασίας και προφανώς είναι αποτέλεσμα της δράσης ποικίλων παραγόντων. Για τον λόγο αυτόν, επειδή ο σκοπός αυτής της μελέτης σχετίζεται με την συμπεριφορά των κυττάρων σε περιβάλλον φλεγμονής και νεοπλασίας και παρά το γεγονός ότι οι συγκεκριμένες κυτταροκίνες δεν φάνηκαν να επηρεάζουν ουσιαστικά τον πολλαπλασιασμό των κυτταρικών σειρών, θεωρήθηκε λογικό το όλο θέμα να διερευνηθεί παραπάνω.

Έτσι στο επόμενο βήμα της μελέτης αναλύθηκε η «συμπεριφορά» των A549 και SKMES καρκινικών κυττάρων υπό την επίδραση ορού αίματος ασθενών με σαρκοείδωση και χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (δύο χρόνια φλεγμονώδη νοσήματα) ως πηγή του συνόλου των κυκλοφορούντων κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων οι οποίοι ενδεχομένως θα μπορούσαν να επηρεάσουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν οροί από υγιή άτομα (αρνητικό control). Οροί από ασθενείς με καρκίνωμα του πνεύμονα χρησιμοποιήθηκαν για ανίχνευση πιθανής ευοδωτικής δράσης τους στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, καθώς το καρκίνωμα αυτού του τύπου είναι αποτέλεσμα της χρόνιας φλεγμονής του αναπνευστικού συστήματος που προκαλείται από το κάπνισμα.

2. Η επίδραση ανθρώπινου ορού στον ρυθμό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στην κυτταρική σειρά A549.

Η κυτταρική σειρά A549 επώασθη με ανθρώπινο ορό (σε συγκέντρωση 1%) από:

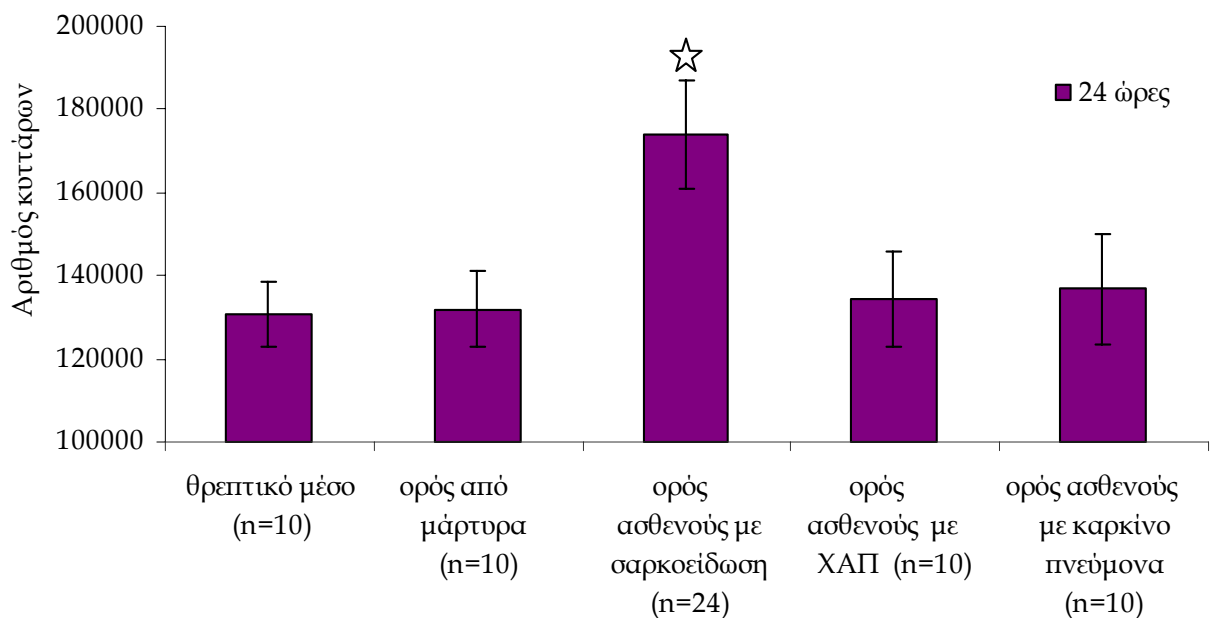
1. υγιή άτομα (φυσιολογικός ορός, μάρτυρες/ control),
2. ασθενείς με σαρκοείδωση,
3. ασθενείς με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια και
4. ασθενείς με καρκίνωμα του πνέυμονα.

Η επώαση της κυτταρικής σειρά A549 με καθένα από τους παραπάνω ορούς διήρκησε 24, 48 ή 72 ώρες. Στόχος μας ήταν να παρατηρήσουμε αν η προσθήκη του ανθρώπινου ορού επηρεάζει τον κυτταρικό κύκλο - πολλαπλασιασμό ή απόπτωση - των κυττάρων αυτών.

Στο **γράφημα 9** που ακολουθεί, απεικονίζεται συγκριτικά η επίδραση των προαναφερθέντων ορών στον πολλαπλασιασμό της κυτταρικής σειράς A549 (επώαση → 24 ώρες). Ενώ, στον **πίνακα 9** παρατίθενται αναλυτικά οι τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις των μετρήσεων μας.

Γράφημα 9: Συγκριτική απεικόνιση της επίδρασης των ανθρώπειων ορών στον ρυθμό πολλαπλασιασμού της κυτταρικής σειράς A549 (24 ώρες).

Επίδραση των ανθρώπειων ορών στον πολλαπλασιασμό των A549 κυττάρων



Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SD), εκφράζονται σε ακέραιους αριθμούς, και αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των κυττάρων πριν κ μετά την επίδραση του ορού(σε συγκέντρωση 1%). Η στατιστική ανάλυση έγινε με *t-student test*, $p < 0,001$.

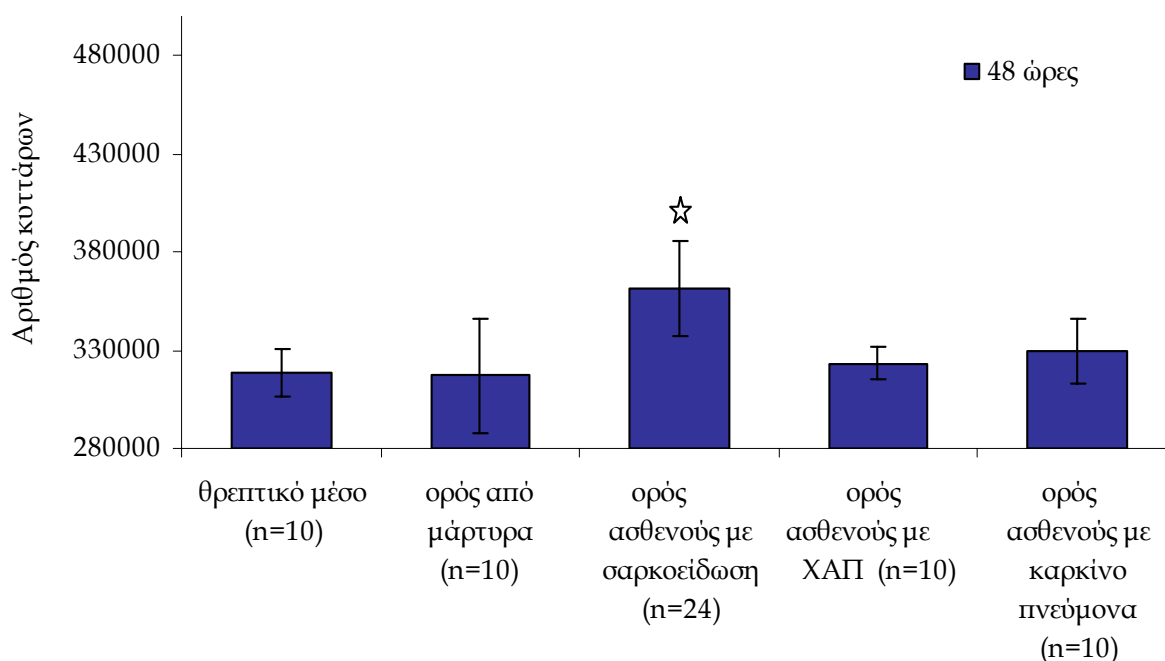
ΠΙΝΑΚΑΣ 9

Επώαση A549 κυττάρων με Αριθμός κυττάρων στις	Θρεπτικό μέσο (n=10)	Ορός από υγιές άτομο (n=10)	Ορός από ασθενή με σαρκοειδωση (n=24)	Ορός από ασθενή με ΧΑΠ (n=10)	Ορός από ασθενή με καρκίνο πνεύμονα (n=10)
24 ώρες	130972 \pm 7821	132003 \pm 9064	174062 \pm 13128 *($p < 0,0000$)	136775 \pm 12091	134310 \pm 11589

Στο **γράφημα 10** που ακολουθεί, απεικονίζεται συγκριτικά η επίδραση των προαναφερθέντων ορών στον πολλαπλασιασμό της κυτταρικής σειράς A549 (επώαση → 48 ώρες). Ενώ, στον **πίνακα 10** παρατίθενται αναλυτικά οι τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις των μετρήσεων μας.

Γράφημα 10: Συγκριτική απεικόνιση της επίδρασης των ανθρώπειων ορών στον ρυθμό πολλαπλασιασμού της κυτταρικής σειράς A549 (48 ώρες).

Επίδραση των ανθρώπειων ορών στον πολλαπλασιασμό των A549 κυττάρων



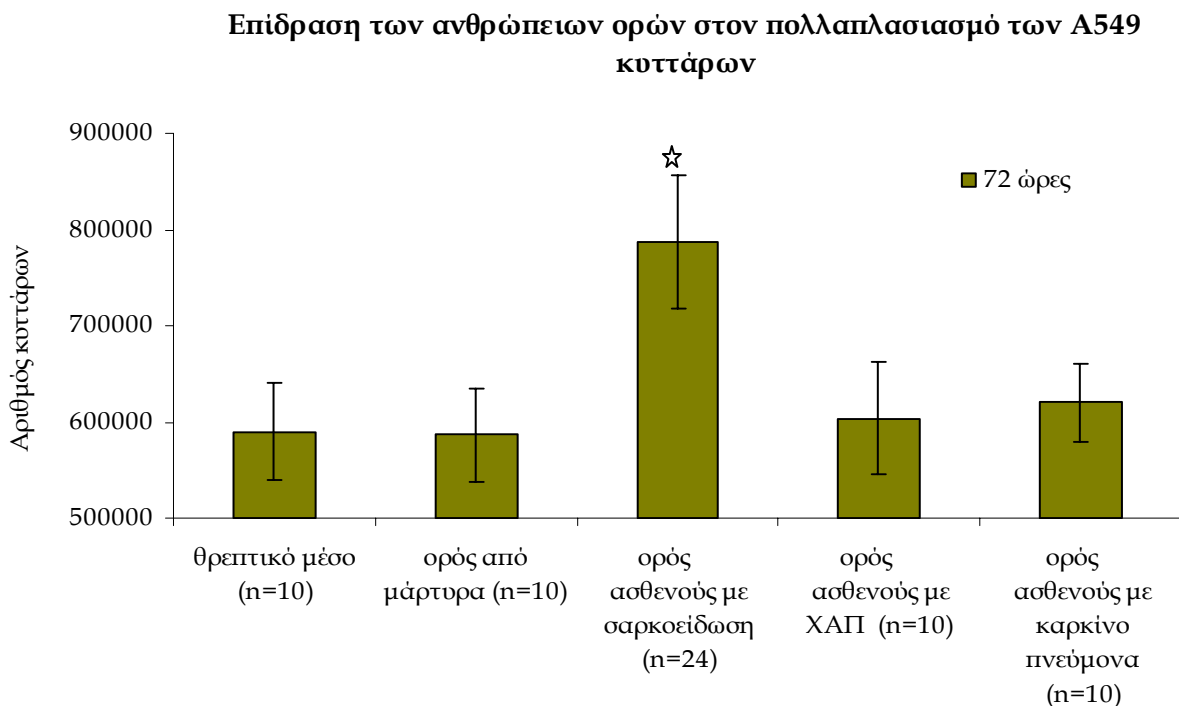
Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SD), εκφράζονται σε ακέραιους αριθμούς, και αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των κυττάρων πριν κ μετά την επίδραση του ορού (σε συγκέντρωση 1%). Η στατιστική ανάλυση έγινε με t-student test, $p < 0,05$.

ΠΙΝΑΚΑΣ 10

Επώαση A549 κυττάρων με	Θρεπτικό μέσο (n=10)	Ορός από υγιές άτομο (n=10)	Ορός από ασθενή με σαρκοειδωση (n=24)	Ορός από ασθενή με ΧΑΠ (n=10)	Ορός από ασθενή με καρκίνο πνεύμονα (n=10)
Αριθμός κυττάρων στις					
48 ώρες	318000 \pm 12085	316875 \pm 28901	361250 \pm 24367 *($p < 0,05$)	323125 \pm 8260	329375 \pm 16378

Στο **γράφημα 11** που ακολουθεί, απεικονίζεται συγκριτικά η επίδραση των προαναφερθέντων ορών στον πολλαπλασιασμό της καρκινικής κυτταρικής σειράς A549 (επώαση → 72 ώρες). Ενώ, στον **πίνακα 11** παρατίθενται αναλυτικά οι τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις των μετρήσεων μας.

Γράφημα 11: Συγκριτική απεικόνιση της επίδρασης των ανθρώπειων ορών στον ρυθμό πολλαπλασιασμού της κυτταρικής σειράς A549 (72 ώρες).



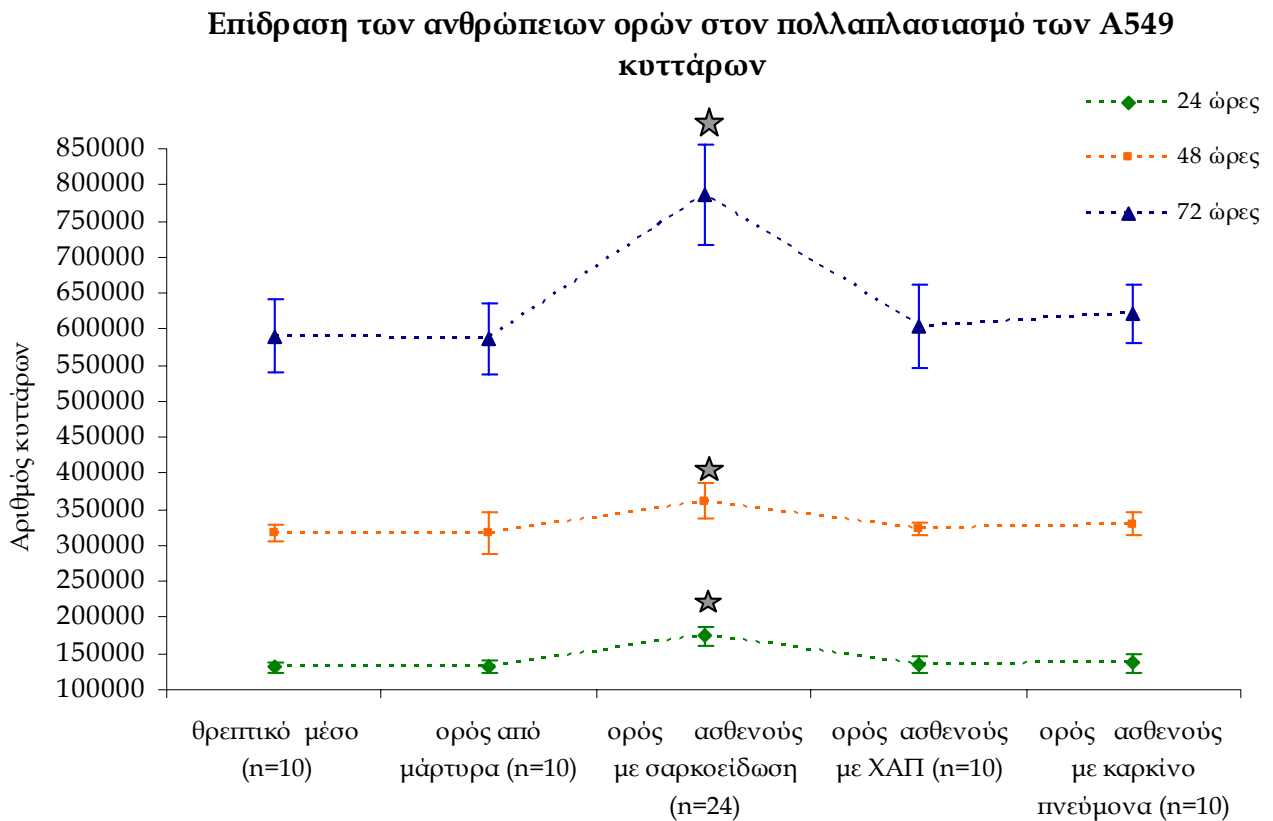
Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SD), εκφράζονται σε ακέραιους αριθμούς, και αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των κυττάρων πριν κ μετά την επίδραση του ορού (σε συγκέντρωση 1%) για η στατιστική ανάλυση έγινε με *t-student test*, $p < 0,0001$.

ΠΙΝΑΚΑΣ 11

Επώαση A549 κυττάρων με Αριθμός κυττάρων στις	Θεραπευτικό μέσο (n=10)	Ορός από υγιές άτομο (n=10)	Ορός από ασθενή με σαρκοειδωση (n=24)	Ορός από ασθενή με ΧΑΠ (n=10)	Ορός από ασθενή με καρκίνο πνεύμονα (n=10)
72 ώρες	590000 \pm 51265	586177 \pm 49141	786996 \pm 68777 *($p < 0,0000$)	620344 \pm 40760	603922 \pm 57470

- ✓ Από την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων που λάβαμε, προκύπτει ότι η χορήγηση του ορού από υγιή άτομα, ασθενείς με ΧΑΠ και ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα στα A549 κύτταρα επί 24, 48 ή 72 ώρες, δεν επηρεάζει τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων αυτών.
- ✓ Αντιθέτως, ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των A549 κυττάρων μεταβάλλεται παρουσία ορού από ασθενείς με σαρκοείδωση, ο οποίος προκαλεί σημαντική αύξηση του πολλαπλασιασμού των κύτταρων αυτών.

ΓΡΑΦΗΜΑ 12: Συγκριτική απεικόνιση της δράσης των ανθρώπειων ορών στον πολλαπλασιασμό της καρκινικής σειράς A549 για χρονικό διάστημα ίσο με 24, 48 και 72 ώρες.



Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SD), εκφράζονται σε ακέραιους αριθμούς

✋ Συμπέρασμα:

Ο ορός ασθενών με σαρκοειδωση προκαλεί αύξηση του πολλαπλασιασμού των A549 καρκινικών κυττάρων!

3. Η επίδραση ανθρώπινου ορού στον ρυθμό πολλαπλασιασμού της κυτταρικής SKMES.

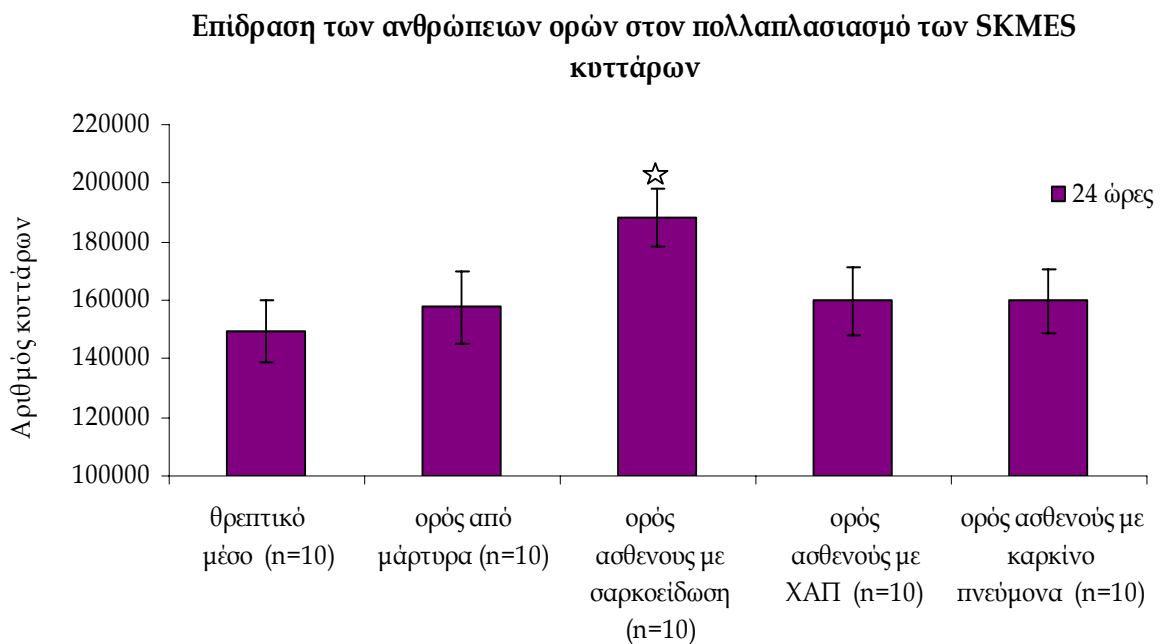
Η κυτταρική σειρά SKMES επωάσθηκε με ανθρώπινο ορό (σε συγκέντρωση 1%) από:

1. Υγιή άτομα (φυσιολογικός ορός, μάρτυρες /control),
2. Ασθενείς με σαρκοείδωση,
3. Ασθενείς με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια και
4. Ασθενείς με καρκίνο του πνέυμονα.

Η επώαση της κυτταρικής σειράς SKMES με καθένα από τους παραπάνω ορούς διήρκησε 24, 48 και 72 ώρες. Στόχος μας ήταν να παρατηρήσουμε αν η προσθήκη του ανθρώπινου ορού επηρεάζει τον κυτταρικό κύκλο (πολλαπλασιασμό ή απόπτωση) των κυττάρων αυτών.

Στο **γράφημα 13** που ακολουθεί, απεικονίζεται συγκριτικά η επίδραση των προαναφερθέντων ορών στον πολλαπλασιασμό της καρκινικής κυτταρικής σειράς SKMES (επώαση → 24 ώρες). Ενώ, στον **πίνακα 12** παρατίθενται αναλυτικά οι τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις των μετρήσεων μας.

Γραφημα 13: Συγκριτική απεικόνιση της επίδρασης των ανθρώπειων ορών στον ρυθμό πολλαπλασιασμού της κυτταρικής σειράς SKMES (24 ώρες).



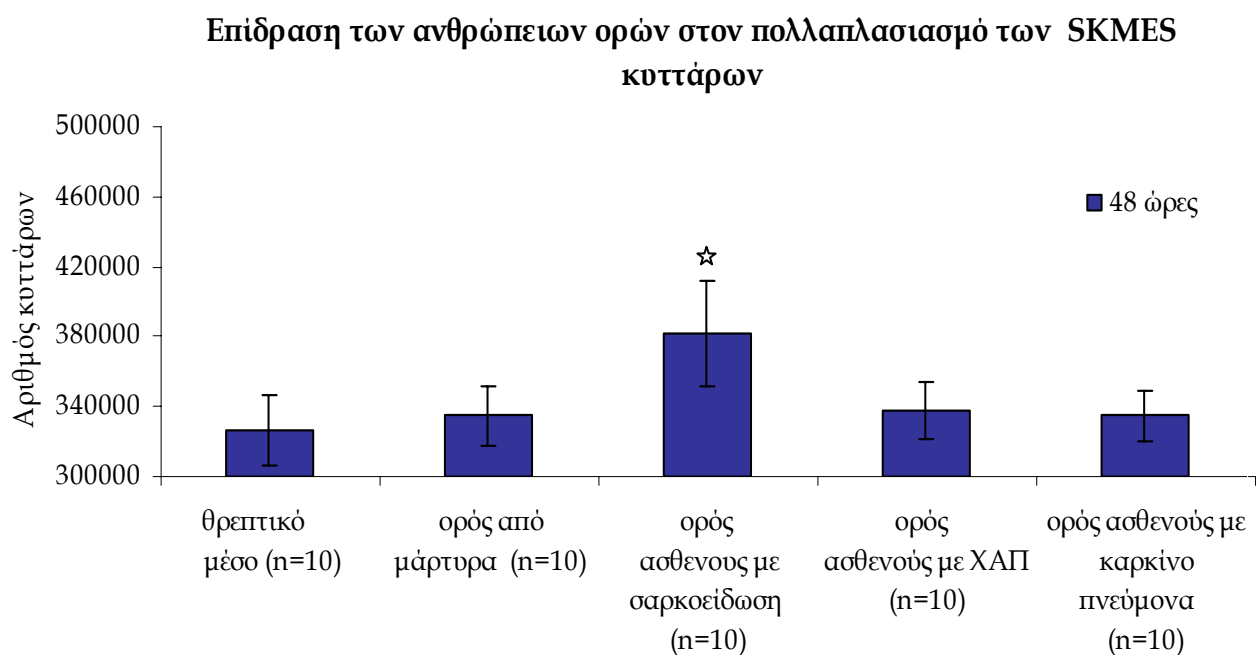
Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο ± τυπικό σφάλμα (SD), εκφράζονται σε ακέραιους αριθμούς, και αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των κυττάρων πριν κ μετά την επίδραση του ορού (σε συγκέντρωση 1%) για n=10, η στατιστική ανάλυση έγινε με t-student test, p<0,001.

ΠΙΝΑΚΑΣ 12

Επώαση SKMES κυττάρων με Αριθμός κυττάρων στις	Θρεπτικό μέσο (n=10)	Ορός από υγιές άτομο (n=10)	Ορός από ασθενή με σαρκοειδωση (n=10)	Ορός από ασθενή με ΧΑΠ (n=10)	Ορός από ασθενή με καρκίνο πνεύμονα (n=10)
24 ώρες	149688 ± 10539	157675 ± 12476	188325 ± 9789 *(p<0,0000)	159825 ± 11804	159713 ± 10663

Στο **γράφημα 14** που ακολουθεί, απεικονίζεται συγκριτικά η επίδραση των προαναφερθέντων ανθρώπινων ορών στον πολλαπλασιασμό της καρκινικής κυτταρικής σειράς SKMES (επώαση → 48 ώρες). Ενώ, στον **πίνακα 13** παρατίθενται αναλυτικά οι τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις των μετρήσεων μας.

Γραφημα 14: Συγκριτική απεικόνιση της επίδρασης των ανθρώπειων ορών στον ρυθμό πολλαπλασιασμού της κυτταρικής σειράς SKMES (48 ώρες).



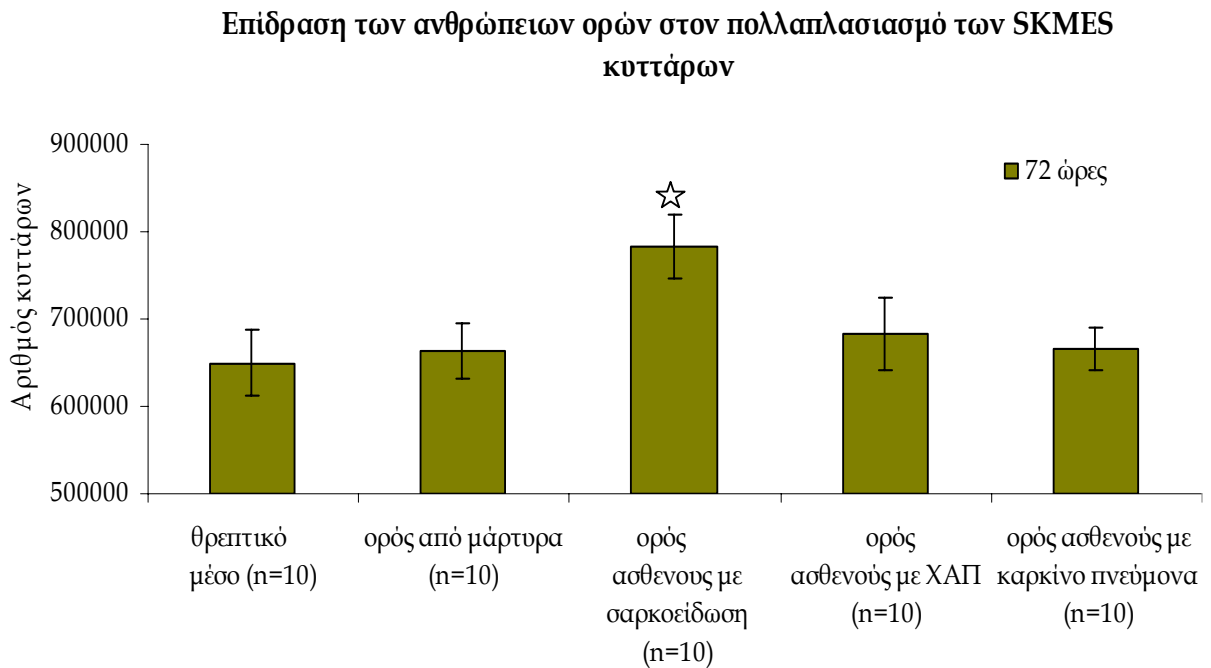
Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SD), εκφράζονται σε ακέραιους αριθμούς, και αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των κυττάρων πριν κ μετά την επίδραση του ορού (σε συγκέντρωση 1%) για n=10, η στατιστική ανάλυση έγινε με t-student test, $p < 0,001$.

ΠΙΝΑΚΑΣ 13

Επώαση SKMES κυττάρων με	Θρεπτικό μέσο (n=10)	Ορός από υγιές άτομο (n=10)	Ορός από ασθενή με σαρκοειδωση (n=10)	Ορός από ασθενή με ΧΑΠ (n=10)	Ορός από ασθενή με καρκίνο πνεύμονα (n=10)
Αριθμός κυττάρων στις					
48 ώρες	326250 \pm 19692	334688 \pm 17135	381938 \pm 30379 *(p< 0,001)	337500 \pm 16651	334750 \pm 147236

Στο **γράφημα 15** που ακολουθεί, απεικονίζεται συγκριτικά η επίδραση των προαναφερθέντων ορών στον πολλαπλασιασμό της καρκινικής κυτταρικής σειράς SKMES (επώαση → 72 ώρες). Ενώ, στον **πίνακα 14** παρατίθενται αναλυτικά οι τιμές και οι τοπικές αποκλίσεις των μετρήσεων μας.

Γραφημα 15: Συγκριτική απεικόνιση της επίδρασης των ανθρώπειων ορών στον ρυθμό πολλαπλασιασμού της κυτταρικής σειράς SKMES (72 ώρες).



Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SD), εκφράζονται σε ακέραιους αριθμούς, και αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των κυττάρων πριν κ μετά την επίδραση του ορού (σε συγκέντρωση 1%) για $n=10$, η στατιστική ανάλυση έγινε με *t-student test*, $p<0,001$.

ΠΙΝΑΚΑΣ 14

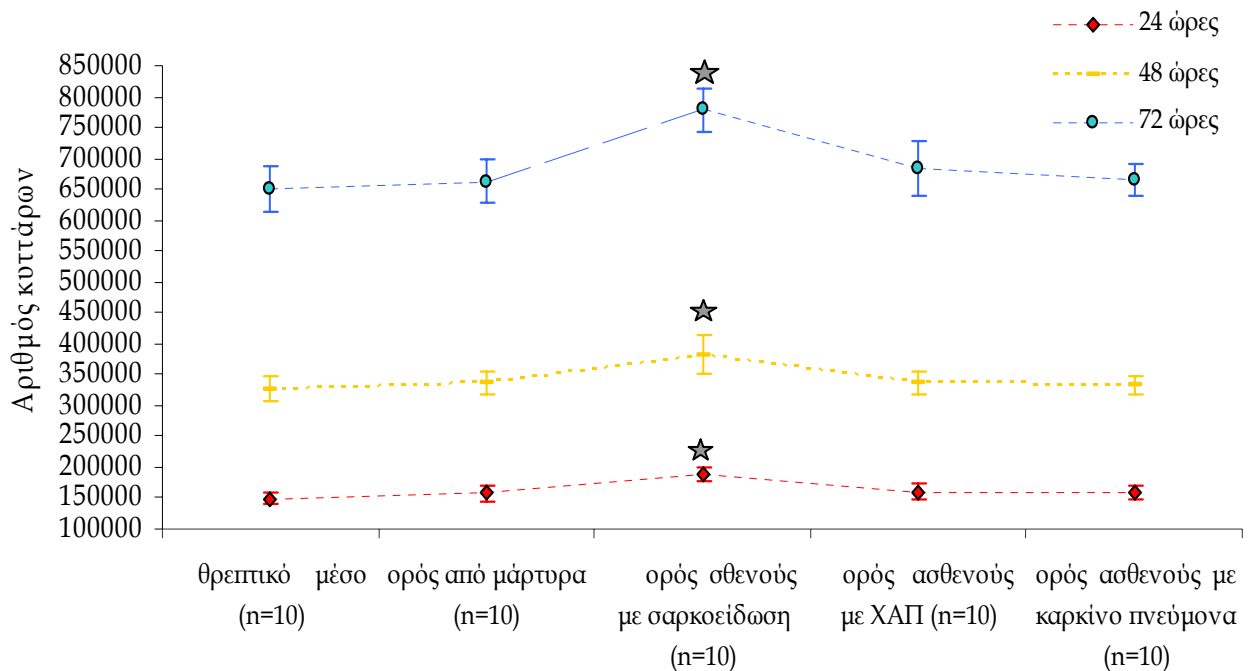
Επώαση SKMES κυττάρων με Αριθμός κυττάρων στις	Θεραπευτικό μέσο (n=10)	Ορός από υγιές άτομο (n=10)	Ορός από ασθενή με σαρκοειδωση (n=10)	Ορός από ασθενή με ΧΑΠ (n=10)	Ορός από ασθενή με καρκίνο πνεύμονα (n=10)
72 ώρες	649375 \pm 37479	664188 \pm 31819	783094 \pm 36035 *($p<0,0000$)	683125 \pm 41823	665781 \pm 24849

-
- ✓ Από την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων που λάβαμε, προκύπτει ότι η χορήγηση του ορού από υγιή άτομα, ασθενείς με ΧΑΠ και ασθενείς με καρκίνο στα SKMES κύτταρα επί 24, 48 και 72 ώρες, δεν επηρεάζει τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων αυτών.

 - ✓ Αντιθέτως, ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων αυτών μεταβάλλεται παρουσία ορού από ασθενή με σαρκοείδωση, ο οποίος προκαλεί σημαντική αύξηση του πολλαπλασιασμού των SKMES κυττάρων.

ΓΡΑΦΗΜΑ 16: Συγκριτική απεικόνιση της δράσης των ανθρωπίνων ορών στον πολλαπλασιασμό της καρκινικής σειράς SKMES για χρονικό διάστημα ίσο με 24, 48 και 72 ώρες.

Επίδραση των ανθρωπείων ορών στον πολλαπλασιασμό των SKMES κυττάρων



Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SD), εκφράζονται σε ακέραιους αριθμούς

✋ Συμπέρασμα:

Μόνο ο ορός από ασθενείς με σαρκοείδωση προκαλεί αύξηση του πολλαπλασιασμού των SKMES καρκινικών κυττάρων !

Συνοψίζοντας

Βάσει των αποτελεσμάτων των πειραμάτων του Β και Γ μέρους της παρούσας μελέτης, το συμπέρασμα που προέκυψε ήταν ότι ο κυτταρικός κύκλος δύο διαφορετικών κυτταρικών σειρών του πνεύμονα εμφανίζει την ίδια μεταβολή ως προς την παράμετρο του πολλαπλασιασμού και συγκεκριμένα αύξησή του, υπό την επίδραση ορού από ασθενείς με Σαρκοείδωση. Καθώς οι κυτταροκίνες που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα του Α μέρους δεν φάνηκαν να επηρεάζουν την συμπεριφορά των κυττάρων και επειδή και οι δύο κυτταρικές σειρές είναι επιθηλιακού τύπου (καρκίνωμα πνεύμονα), θεωρήθηκε ότι η αύξηση του πολλαπλασιασμού ενδεχομένως προκύπτει μέσω της ενεργοποίησης κάποιου αυξητικού παράγοντα και ειδικότερα του μονοπατιού του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor/ EGF).

4. Η επίδραση του αναστολέα του υποδοχέα του EGF [Epidermal Growth Factor Receptor / EGFr (cetuximab)] στον κυτταρικό κύκλο των κυτταρικών σειρών A549 και SKMES.

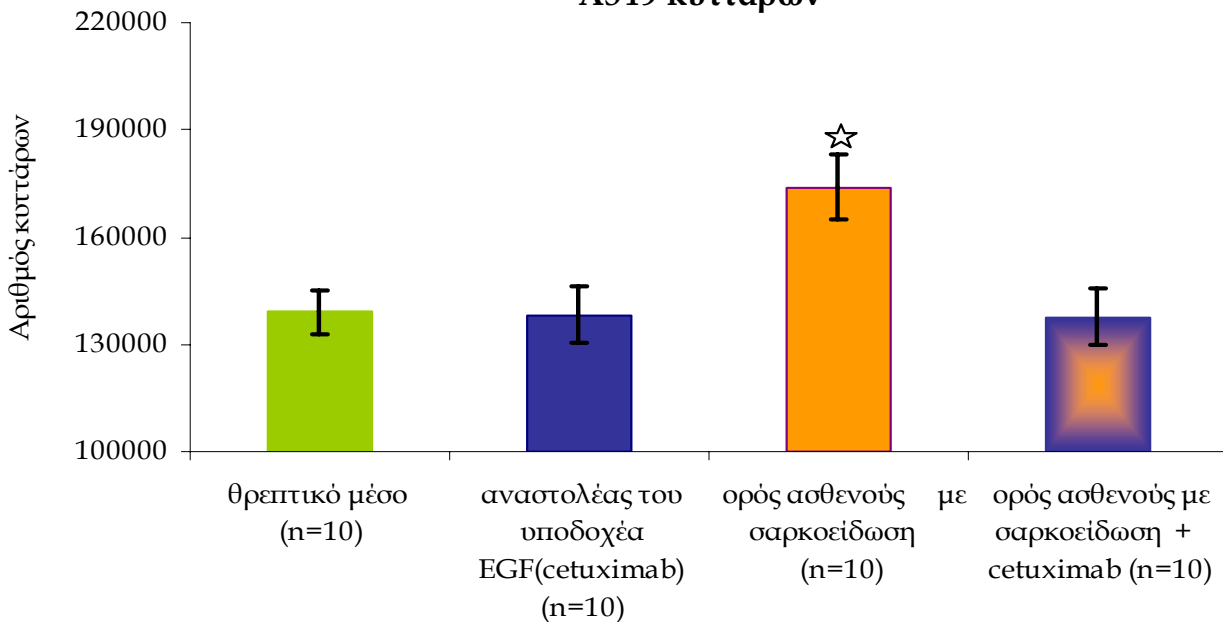
Βάσει των ανωτέρω αποτελεσμάτων, η επίδραση του ορού από ασθενείς με σαρκοειδωση προκαλεί αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των επιθηλιακών καρκινικών σειρών A549 και SKMES, οι οποίες προέρχονται από το αναπνευστικό επιθήλιο. Ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFr) είναι ένας παράγοντας που φυσιολογικά προάγει τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων, όταν καταληφθεί από τον αυξητικό παράγοντα ή άλλον κατάλληλο συνδέτη.

Ο στόχος μας ήταν να παρατηρήσουμε αν ένας αναστολέας της δράσης του υποδοχέα αυτού (EGFr inhibitor) θα είχε πρωτίστως κάποια επίδραση στον ρυθμό πολλαπλασιασμού των A549 και SKMES κυττάρων, και δεύτερον αν θα είχε ανασταλτική λειτουργία υπό την επίδραση του σαρκοειδικού ορού. Ο αναστολέας του υποδοχέα EGF που χρησιμοποιήθηκε είναι το φαρμακευτικό σκεύασμα (cetuximab) που χρησιμοποιείται συνηθώς σε θεραπευτικά σχήματα στο καρκίνωμα του πνεύμονα, όταν ο τελευταίος συσχετίζεται με υπερέκφραση του EGFr στην κυτταρική επιφάνεια ή με αύξηση των επιπέδων του EGFr στο αίμα. Η επιλογή του συγκεκριμένου αναστολέα βασίστηκε στο γεγονός ότι ο αναστολέας αυτός προσδένεται στο εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα, εμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο την πρόσδεση κάποιου ή κάποιων συστατικών του ορού που έχει σαν επακόλουθο την αύξηση του πολλαπλασιασμού των κυτταρικών σειρών της μελέτης. Η χορηγηθείσα συγκέντρωση (100ng/ml) είναι αυτή που προτείνεται στην βιβλιογραφία για *in vitro* πειράματα σε κυτταρικές σειρές.

Στο **γράφημα 17** που ακολουθεί απεικονίζεται η δράση του αναστολέα του υποδοχέα του EGF (cetuximab) στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων A549 παρουσία ή απουσία του ορού ασθενούς με σαρκοείδωση. Στον **πίνακα 16** παρατίθενται αναλυτικά οι τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις των μετρήσεων.

ΓΡΑΦΗΜΑ 17: Απεικόνιση της επίδρασης επί 24 ώρες i) του αναστολέα του υποδοχέα EGF (cetuximab), ii) του ορού από ασθενείς με σαρκοείδωση και iii) του συνδυασμού αυτών, στον πολλαπλασιασμό της καρκινικής σειράς A549.

Επίδραση του αναστολέα του υποδοχέα του EGF (cetuximab) ή/ και ορού ασθενούς με σαρκοείδωση στον πολλαπλασιασμό των A549 κυττάρων



Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SD), εκφράζονται σε ακέραιους αριθμούς, και αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των κυττάρων πριν κ μετά την επίδραση του ανθρώπινου σαρκοειδικού ορού (συγκέντρωση 1%), του αναστολέα του υποδοχέα του EGFR (cetuximab, 100ng/ml) ή του συνδυασμού αυτών για n=10, η στατιστική ανάλυση έγινε με t-student test, $p < 0,001$

ΠΙΝΑΚΑΣ 16

Επώαση A549 κυττάρων με Αριθμός κυττάρων στις	Θεραπευτικό μέσο (n=10)	Αναστολέας του EGFR (cetuximab) (n=10)	Ορός από ασθενή με σαρκοείδωση (n=10)	Ορός από ασθενή με σαρκοείδωση & cetuximab (n=10)
24 ώρες	138958 \pm 6296	138333 \pm 7935	173875 \pm 9137 ($p < 0,0000$)	137688 \pm 7851

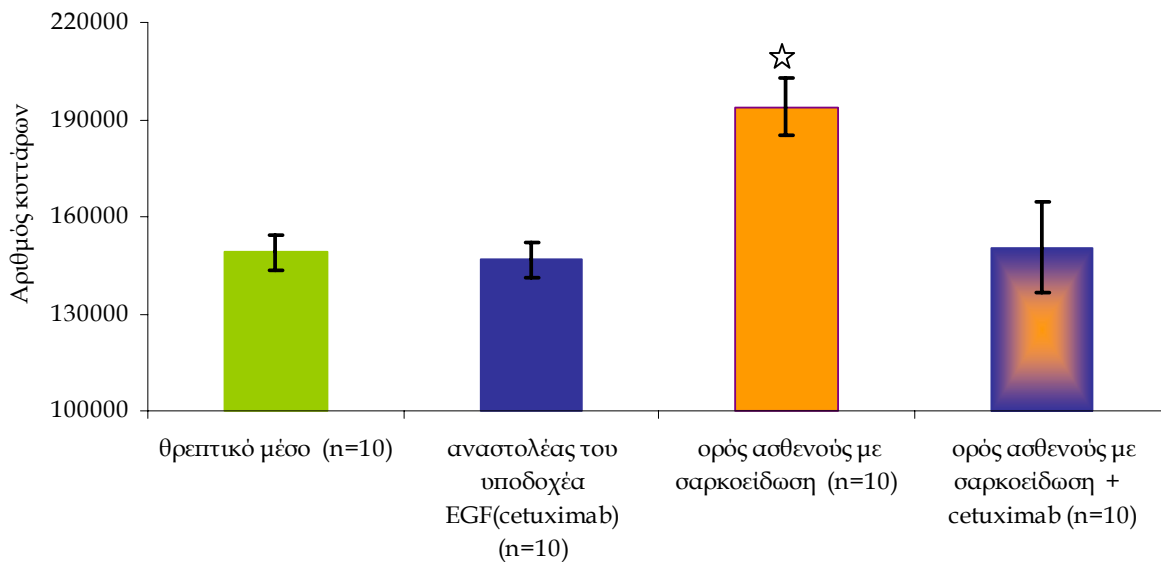
Από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων που λάβαμε, προκύπτει ότι:

- ✓ η χορήγηση του αναστολέα του υποδοχέα EGF (EGFr inhibitor) *δεν επηρεάζει τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των A549 κυττάρων.*
- ✓ ο ορός από ασθενή με σαρκοείδωση *επηρεάζει τον κυτταρικό κύκλο των A549 καρκινικών κυττάρων προκαλώντας αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού.*
- ✓ η ταυτόχρονη χορήγηση αναστολέα του υποδοχέα EGF και του ορού από ασθενείς με σαρκοείδωση *αναστέλλει την ευοδωτική δράση του ορού στον ρυθμό πολλαπλασιασμού των A549 κυττάρων.*

Στο **γράφημα 18** που ακολουθεί απεικονίζεται η δράση του αναστολέα του υποδοχέα του EGF (cetuximab) στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων SKMES παρουσία ή απουσία του ορού ασθενούς με σαρκοείδωση. Στον **πίνακα 17** παρατίθενται αναλυτικά οι τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις των μετρήσεων μας.

ΓΡΑΦΗΜΑ 18: Απεικόνιση της δράσης του αναστολέα του υποδοχέα EGF (cetuximab), του ορού ασθενούς με σαρκοείδωση, αλλά και του συνδυασμού αυτών στον πολλαπλασιασμό της καρκινικής σειράς SKMES επί 24 ώρες.

Επίδραση του αναστολέα του υποδοχέα του EGF (cetuximab) ή/ και ορού ασθενούς με σαρκοείδωση στον πολλαπλασιασμό των SKMES κυττάρων



Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SD), εκφράζονται σε ακέραιους αριθμούς, και αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των κυττάρων πριν κ μετά την επίδραση του ανθρώπινου σαρκοειδικού ορού (σε συγκέντρωση 1%), του αναστολέα του υποδοχέα του EGF (cetuximab, 100ng /ml) ή του συνδυασμού αυτών για n=10, η στατιστική ανάλυση έγινε με t-student test, $p < 0,001$

ΠΙΝΑΚΑΣ 17

Επώαση SKMES κυττάρων με Αριθμός κυττάρων στις	Θρεπτικό μέσο (n=10)	Αναστολέας του EGFR (cetuximab) (n=10)	Ορός από ασθενή με σαρκοείδωση (n=10)	Ορός από ασθενή με σαρκοείδωση & cetuximab (n=10)
24 ώρες	148958 \pm 5269	146625 \pm 5554	193875 \pm 8742 ($p < 0,0000$)	150525 \pm 13871

Από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων που λάβαμε, προκύπτει ότι:

- ✓ η χορήγηση του αναστολέα του υποδοχέα EGF (EGFr inhibitor) *δεν επηρεάζει τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των SKMES κυττάρων.*
- ✓ ο ορός ασθενών με σαρκοείδωση *επηρεάζει τον κυτταρικό κύκλο των SKMES καρκινικών κυττάρων προκαλώντας αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού.*
- ✓ η ταυτόχρονη χορήγηση του αναστολέα του υποδοχέα EGF με ορό ασθενών με σαρκοείδωση, *αναστέλλει την ευοδωτική δράση του ορού στον ρυθμό πολλαπλασιασμού*

Σχόλιο:

Παρατηρούμε ότι τόσο τα A549 (αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα) όσο και τα SKMES (πλακώδες καρκίνωμα πνεύμονα) παρουσιάζουν την ίδια συμπεριφορά σε σχέση με την παρουσία ορού από ασθενείς με σαρκοείδωση, αναστολέα του EGFr (cetuximab) και του συνδυασμού αυτών ως προς το ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων αυτών.

Συμπέρασμα:

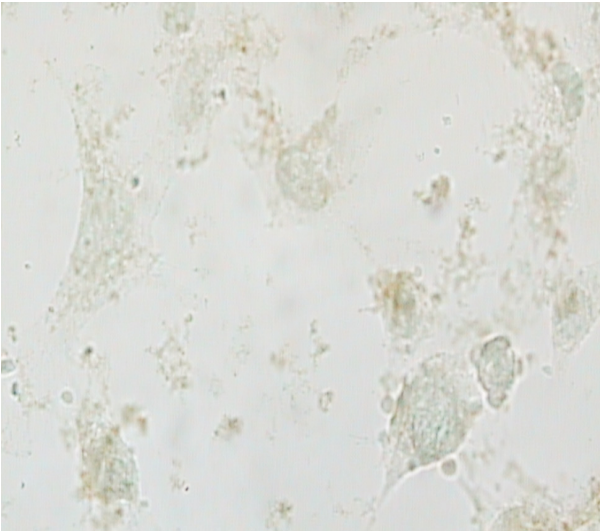
Ο ορός από ασθενή με σαρκοείδωση είναι πιθανόν να προκαλεί αύξηση του πολλαπλασιασμού των A549 και SKMES καρκινικών κυττάρων μέσω του μονοπατιού του υποδοχέα του EGF!

Συνοψίζοντας

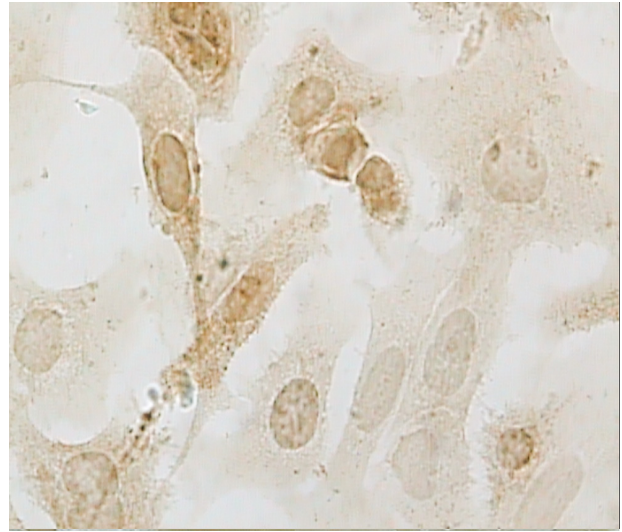
Βάσει των ανωτέρω αποτελεμάτων το συμπέρασμα που προέκυψε ήταν ότι ο κυτταρικός κύκλος 2 διαφορετικών καρκινικών σειρών του πνεύμονα φαίνεται να μεταβάλλεται μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού του υποδοχέα του EGF. Για το λόγο αυτό κρίθηκε σκόπιμο να διερευνηθεί και ανοσοκυτταροχημικά η έκφραση του υποδοχέα του EGF.

5. Ανοσοκυτταροχημική ανίχνευση της έκφρασης του υποδοχέα του EGF [Epidermal Growth Factor Receptor / EGFr] της σειράς SKMES.

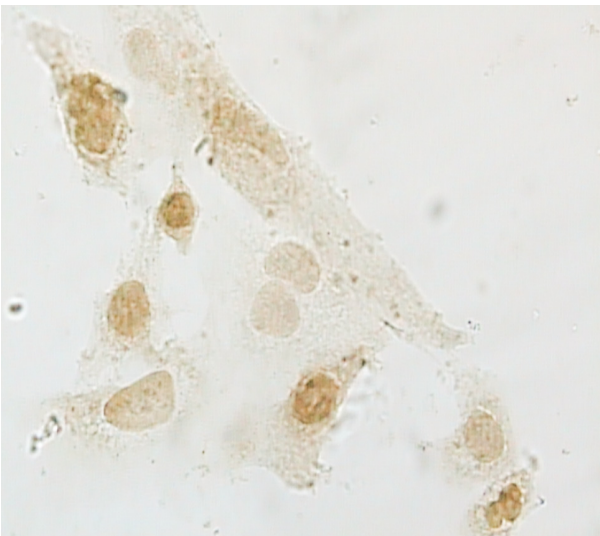
Μελετήθηκαν με ανοσοκυτταροχημεία για την έκφραση του EGFR (με χρήση μονοκλωνικού αντισώματος εναντίον του EGFR), κύτταρα A549 και SKMES που επωάσθηκαν με 5 διαφορετικούς ορούς από ασθενείς με σαρκοείδωση. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια κύτταρα, που επωάσθηκαν με θρεπτικό υλικό μόνο. Η ανάλυση έγινε στο μικροσκόπιο με την χρήση του καταδυτικού φακού (X100), με καταγραφή της αντίδρασης αφ' ενός της κυτταρικής μεμβράνης και αφ' ετέρου του πυρήνα (εικόνες 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15).



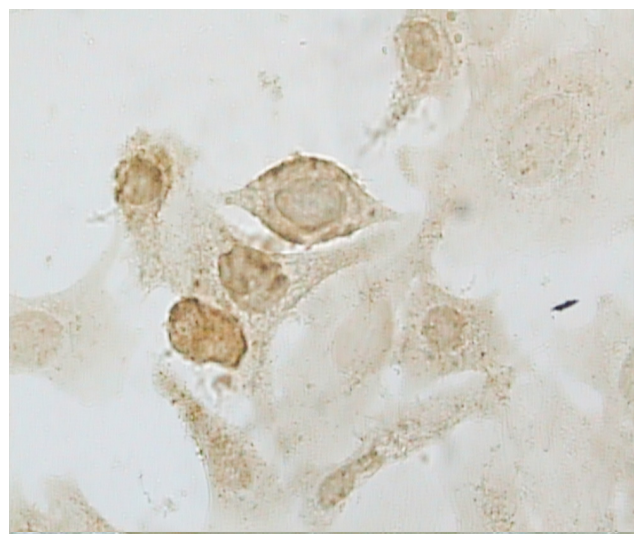
Εικόνα 7: Ανοσοκυτταροχημική ανίχνευση του EGFR στην κυτταρική σειρά A549 (μάρτυρας)



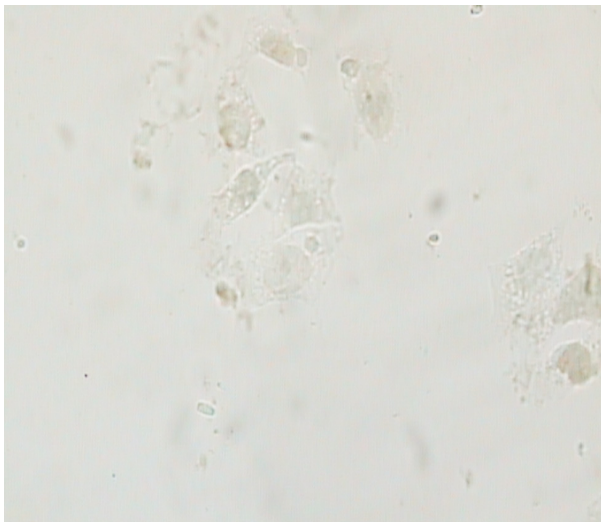
Εικόνα 9: Ανοσοκυτταροχημική ανίχνευση του EGFR στην κυτταρική A549 κατόπιν επώασης της, με ορό ασθενών με σαρκοείδωση



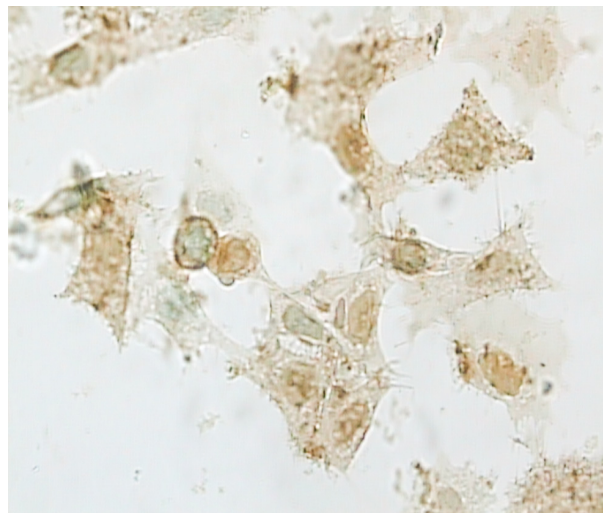
Εικόνα 8: Ανοσοκυτταροχημική ανίχνευση του EGFR στην κυτταρική σειρά A549 κατόπιν επώασης της με ορό ασθενών με σαρκοείδωση και με τον αναστολέα του EGFR



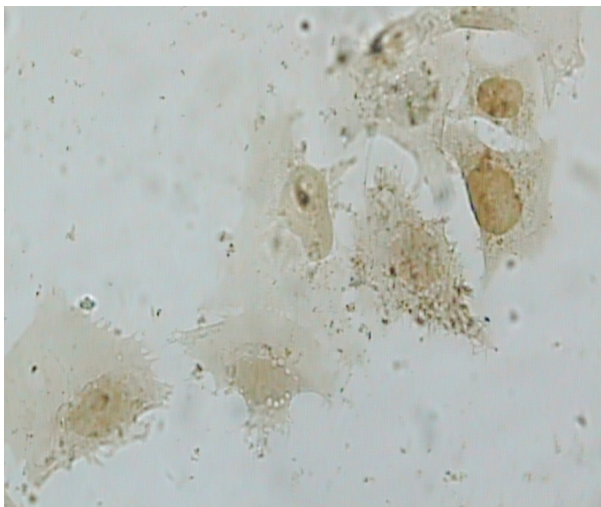
Εικόνα 10: Ανοσοκυτταροχημική ανίχνευση του EGFR στην κυτταρική σειρά A549 κατόπιν επώασης της, με ορό ασθενών με σαρκοείδωση



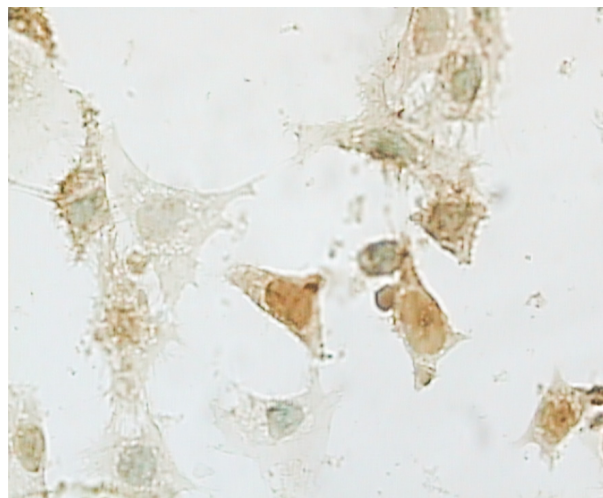
Εικόνα 11: Ανοσοκυτταροχημική ανίχνευση του EGFR στην κυτταρική σειρά SKMES (μάρτυρας)



Εικόνα 13: Ανοσοκυτταροχημική ανίχνευση του EGFR στην κυτταρική σειρά SKMES κατόπιν επώασης της, με ορό ασθενών με σαρκοείδωση



Εικόνα 12: Ανοσοκυτταροχημική ανίχνευση του EGFR στην κυτταρική σειρά SKMES κατόπιν επώασης της, με ορό ασθενών με σαρκοείδωση και με τον αναστολέα του EGFR



Εικόνα 14: Ανοσοκυτταροχημική ανίχνευση του EGFR στην κυτταρική σειρά SKMES κατόπιν επώασης της, με ορό ασθενών με σαρκοείδωση

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως εκατοστιαία αναλογία των κυττάρων που αντιδρούν σε σχέση με το σύνολο των κυττάρων που παρατηρήθηκαν (πίνακας 18).

Πίνακας 18

% θετικής αντίδρασης κυττάρων	Μάρτυρας		Ορός ασθενούς με σαρκοείδωση		Αναστολέας		Ορός ασθενούς με σαρκοείδωση & αναστολέας	
	Μεμβράνη (%)	Πυρήνας (%)	Μεμβράνη (%)	Πυρήνας (%)	Μεμβράνη (%)	Πυρήνας (%)	Μεμβράνη (%)	Πυρήνας (%)
Κυτ. σειρά								
A549	38	16	55	17	36	10	31	14
SKMES	21	21	53	41	29	16	26	15

Συμπέρασμα

Από την ανάλυση της έκφρασης του EGFR φαίνεται ότι η έκφραση του υποδοχέα τόσο στην κυτταρική μεμβράνη όσο και στον πυρήνα είναι εντονότερη στα κύτταρα που έχουν προηγουμένως επωασθεί με ορό από ασθενείς με σαρκοείδωση. Η έκφραση αυτή δε είναι μεγαλύτερη και ως προς τον αριθμό των κυττάρων που αντιδρούν, αλλά και ως προς την ένταση της αντίδρασης σε κάθε κύτταρο.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- ❖ Οι κυτταροκίνες **IL-1β**, **TNF-α**, **IL-13** και **IFN-γ** προκαλούν επιβράδυνση ή τάση προς επιβράδυνση στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων A549 (αδενοκαρκίνωμα) και SKMES (πλακώδης καρκίνος). Οι διαφορές που παρατηρούνται στη δράση τους όμως σχετίζονται με τη δόση και το χρόνο επώασης.
- ❖ Ο ορός από ασθενείς με σαρκοείδωση, είναι ο μόνος «παθολογικός» ορός που φαίνεται να επιδρά στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυτταρικών σειρών που μελετήθηκαν. Συγκεκριμένα, προκαλεί αύξηση (στατιστικώς σημαντικό αποτέλεσμα) του ρυθμού πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων A549 και SKMES!
- ❖ *Το μονοπάτι μέσω του οποίου ο ορός από ασθενείς με σαρκοείδωση προκαλεί αύξηση του πολλαπλασιασμού των A549 και SKMES κυττάρων, φαίνεται να είναι το μονοπάτι της ενεργοποίησης του υποδοχέα του EGF!*
- ❖ Η έκφραση του υποδοχέα του EGF τόσο στην κυτταρική μεμβράνη όσο και στον πυρήνα είναι εντονότερη στα κύτταρα που έχουν προηγουμένως επωασθεί με ορό από ασθενείς με σαρκοείδωση.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι κυτταροκίνες είναι ενδοκυττάρια μόρια σηματοδότησης, αποτελούν ισχυρούς διαμεσολαβητές σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες αλλά είναι και απαραίτητα στοιχεία της ρύθμισης των ανοσολογικών αποκρίσεων (Stina Salomonsson et al, 2004). Παράγονται από πολλά κύτταρα και ασκούν προ-φλεγμονώδεις και αντι-φλεγμονώδεις δράσεις δρώντας σε δίκτυα συνήθως με ιεραρχικό τρόπο. Έχουν ρόλο- κλειδί σε πολλές παθήσεις που χαρακτηρίζονται από χρόνια φλεγμονή και γι' αυτό μελετώνται εκτενώς σε παγκόσμιο επίπεδο. Η διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ προ-φλεγμονωδών και αντι-φλεγμονωδών κυτταροκινών είναι αυτή που αποτρέπει την εδραίωση μιας νόσου. Η διαταραχή της ισορροπίας αυτής θεωρείται ότι καθορίζει την έκβαση μιας ασθένειας, είτε βραχυπρόθεσμα είτε μακροπρόθεσμα, αλλά και ότι η ευπάθεια για ορισμένες νόσους, είναι γενετικά καθορισμένη από την ισορροπία ή την έκφραση αυτών των κυτταροκινών.

Στο πρώτο στάδιο της εργασίας αυτής μελετήθηκε η επίδραση κάποιων αντιπροσωπευτικών κυτταροκινών της φλεγμονής και συγκεκριμένα των προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών IL-1β, TNF-α και IFN-γ καθώς και της αντι-φλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-13 μόνο στον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα. Η επίδραση των συγκεκριμένων κυτταροκινών στην απόπτωση αποτέλεσε αντικείμενο άλλης μελέτης στο εργαστήριο Ανατομίας-Ιστολογίας - Εμβρυολογίας, στην οποία μελετήθηκε η επίδραση των κυτταροκινών στον κυτταρικό θάνατο των A549 καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα και βρέθηκε ότι οι κυτταροκίνες IL-1β, TNF-α και IL-13 μειώνουν τον Fas- επαγόμενο κυτταρικό θάνατο στα κύτταρα αυτά.

Στην παρούσα μελέτη, η δράση των κυτταροκινών **IL-1β**, **TNF-α**, **IFN-γ**, **IL-13**, μελετήθηκε σε διαφορετικούς χρόνους και συγκεντρώσεις. Παρατηρήθηκε ότι η ιντερλευκίνη **IL-1β** σε συγκεντρώσεις 0,1 ng/ml και 0,5 ng/ml και επώαση ίση με 12 και 24 ώρες, επηρέασε με τον ίδιο ακριβώς τρόπο 2 διαφορετικές νεοπλασματικές σειρές του πνεύμονα (αδενοκαρκίνωμα και πλακώδες

καρκίνωμα). Συγκεκριμένα, προκάλεσε επιβράδυνση του πολλαπλασιασμού με χρόνο- και δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Παρόμοιες μελέτες, έχουν δείξει διαφορετικά αποτελέσματα και το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι τα πειράματα αυτά πραγματοποιούνταν διαφορετικές κυτταρικές σειρές, διαφορετικές χορηγούμενες συγκεντρώσεις και συχνά υπήρξαν διαφορετικοί χρόνοι επώασης. Ειδικότερα: i) σε μια μελέτη όπου χρησιμοποιήθηκαν φυσιολογικά κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα αρουραίου τύπου Π, η χορήγηση της IL-1β σε συγκέντρωση 20ng/ml για 24 ώρες δεν είχε καμία επίδραση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων αυτών (Thomas Geiser et al, 2000), ii) σε μια άλλη μελέτη όπου χρησιμοποιήθηκαν φυσιολογικά λεία μυϊκά κύτταρα τραχείας από χοίρους, η IL-1β προκάλεσε την αύξηση του πολλαπλασιασμού τους με δόσοεξαρτώμενο τρόπο, με βέλτιστο αποτέλεσμα σε συγκέντρωση 10ng/ml αλλά παρουσία και ινδομεθακίνης (1mg/ml) (De S Zelazny et al, 1993), iii) από την άλλη μεριά, η χορήγηση της IL-1β σε καρκινικά κύτταρα στομάχου (AGS) σε συγκεντρώσεις από 1 έως 100 ng/ml είχε μέγιστη δράση στα 10 ng/ml προκαλώντας αύξηση του κυτταρικού αριθμού μετά από επώαση 48 ωρών (Ian LP Beales, 2002).

Στην παρούσα μελέτη οι συγκεντρώσεις που επελέγησαν ήταν μικρότερες και η επώαση των κυττάρων διήρκησε λιγότερο χρόνο. Η επιλογή των συνθηκών αυτών έγινε με γνώμονα *in vivo* καταστάσεις, όπου δεν παρατηρούνται τόσο υψηλές συγκεντρώσεις κυτταροκινών και παρόλο που μπορεί να υπάρχει συνεχής παραγωγή κυτταροκινών, η δράση τους είναι βραχεία.

Όσο αφορά στην κυτταροκίνη **TNF-a**, προκάλεσε τάσης επιβράδυνσης του πολλαπλασιασμού των A549 κυττάρων μετά από 12 ώρες επώασης, ενώ μετά από 24 ώρες επώασης προκάλεσε στατιστικώς σημαντική επιβράδυνση του πολλαπλασιασμού σε συγκεντρώσεις 0,5 και 2,5ng/ml. Μάλιστα παρατηρήθηκε ότι η επιβράδυνση αυτή είναι εντονότερη όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της TNF-a. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με την βιβλιογραφία όπου η χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων TNF- α (0, 0.1, 1, 5 και 10 ng/ml) επί 24 ώρες είχε σαν αποτέλεσμα αύξησης της αναστολής του πολλαπλασιασμού των A549 κυττάρων (Zhao YX et al, 2006). Επανερχόμενοι, στα αποτελέσματα της

παρούσας μελέτης, στα SKMES κύτταρα, παρατηρήθηκε τάση επιβράδυνσης όταν επώασθησαν με TNF- α σε συγκέντρωση 0,5ng/ml, ενώ παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική επιβράδυνση όταν επώασθησαν με 2,5ng/ml τόσο επί 12 όσο και 24 ώρες. Παρατηρούμε λοιπόν πως τα αποτελέσματα της δράσης της TNF- α φαίνεται να είναι παρόμοια με τα αυτά των A549 κυττάρων, παρόλο που οι συνθήκες δράσης δεν είναι πανομοιότυπες.

Η επώαση των A549 κυττάρων με IFN- γ σε συγκεντρώσεις $2,5 \times 10^4$ U/ml και $12,5 \times 10^4$ U/ml και για χρόνο ίσο με 12 και 24 ώρες, είχε σαν αποτέλεσμα στατιστικώς σημαντική επιβράδυνση του πολλαπλασιασμού τους. Αντιθέτως, η επώαση των SKMES κυττάρων με την ιντερφερόνη γ , δεν προκάλεσε στατιστικώς σημαντική επιβράδυνση του πολλαπλασιασμού τους, παρά μόνο τάση προς επιβράδυνση. Σε μια παρόμοια μελέτη, υπήρξαν διαφορετικά αποτελέσματα και αυτό πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι στη μελέτη αυτή υπήρξαν διαφορετικοί χρόνοι επώασης (72 ώρες), διαφορετικές συγκεντρώσεις (μικρότερες) και οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν ως πειραματικό μοντέλο [δύο πλακώδους καρκινώματος (QG-56, QG-95) και δύο αδενοκαρκινικού τύπου (PC-9, PC-12)], έφεραν όλες μεταλλάξεις στο 7^ο εξόνιο του γονιδίου p53 (Yano T et al, 2000).

Τέλος, η χορήγηση της IL-13 σε συγκεντρώσεις 0,5 και 2,5 ng/ml, προκάλεσε στατιστικώς σημαντική επιβράδυνση του πολλαπλασιασμού των A549 κυττάρων μετά από 24 ώρες επώασης, ενώ μετά από 12 ώρες επώασης προκάλεσε στατιστικώς σημαντική επιβράδυνση του πολλαπλασιασμού σε συγκέντρωση 0,5 ng/ml, ενώ η συγκέντρωση των 2,5 ng/ml, προκάλεσε τάση προς επιβράδυνση. Στα SKMES κύτταρα, παρατηρήθηκε ότι η IL-13 προκάλεσε στατιστικώς σημαντική επιβράδυνση μετά από 24 ώρες επώασης, ενώ στις 12 ώρες επώασης παρατηρήθηκε τάση προς επιβράδυνση. Η αναζήτηση βιβλιογραφικών δεδομένων σχετικά με την δράση της IL-13, έδειξε πως η IL-13 ασκεί ανασταλτική δράση στον πολλαπλασιασμό της καρκινικής σειράς του πνεύμονα (Rose MC et al, 2000).

Λαμβάνοντας υπόψη κανείς τα ανωτέρω αποτελέσματα, οδηγείται στο συμπέρασμα πως η δράση της κάθε κυτταροκίνης σχετίζεται όχι μόνο με τη συγκέντρωση στην οποία βρίσκεται αλλά και με το χρόνο δράσης της και πως μπορεί να επιδρά είτε με τον ίδιο είτε με διαφορετικό τρόπο σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές. Άρα, πρόκειται για ένα ιδιαίτερος πολύπλοκο σύστημα δράσης που είναι δύσκολο να μελετηθεί μονομερώς (δηλαδή να μελετηθεί ξεχωριστά η κάθε κυτοκίνη που εμπλέκεται σε μια φλεγμονώδη κατάσταση), αφού η προσέγγιση αυτή δεν οδηγεί σε σαφή συμπεράσματα. Επιπλέον, λόγω του γεγονότος ότι, ως απόκριση σε μια φλεγμονή σπανίως παράγεται μια και μόνο κυτταροκίνη και ότι η δράση της εξαρτάται από την παρουσία άλλων κυτταροκινών και από την αλληλεπίδραση τους, κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η δράση των κυτταροκινών όχι μεμονωμένα, αλλά ως ένα σύνολο παραγόντων που παίζουν καθοριστικό ρόλο στην έκβαση μιας φλεγμονώδους κατάστασης.

Έτσι, το δεύτερο στάδιο της παρούσας διατριβής είχε ως στόχο τη διερεύνηση της επίδρασης ορού αίματος ασθενών με νοσήματα που προσβάλλουν τον πνεύμονα και έχουν ως κύριο χαρακτηριστικό την χρόνια φλεγμονή (ΧΑΠ και καρκίνος πνεύμονα). Δηλαδή χρησιμοποιήθηκε **το σύνολο των κυκλοφορουσών κυτταροκινών** το οποίο δρα συνεργικά και κατ' επέκταση προσομοιώνει στο μέγιστο δυνατό πραγματικές συνθήκες-καταστάσεις. Η πειραματική αυτή προσέγγιση της διερεύνησης, δηλαδή της επίδρασης αυτούσιου ανθρώπινου ορού αίματος (και όχι κλασμάτων αυτού) στην συμπεριφορά κυτταρικών σειρών *in vitro*, έχει καταγραφεί μόλις 3 φορές στη διεθνή βιβλιογραφία και συγκεκριμένα από τους Pittenger και συνεργάτες (1993), Bengtsson και συνεργάτες (2004), τους Jonathan Growston και συνεργάτες (2006). Συγκεκριμένα: i) η ερευνητική ομάδα του Pittenger μελέτησε την τοξική επίδραση ορού ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη τύπου I σε κύτταρα νευροβλαστώματος ποντικού, ii) η ερευνητική ομάδα του Bengtsson μελέτησε την επίδραση ορού ασθενών με συστηματικό ερυθρηματώδη λύκο στην απόπτωση των μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων *in vitro*, ενώ iii) η ερευνητική ομάδα του Crowston μελέτησε την επίδραση των παραγόντων του φυσιολογικού ανθρώπινου ορού στην κυτταροτοξικότητα της μιτομυκίνης σε ινοβλάστες από τένοντα ανθρώπου. Στο δικό μας εργαστήριο, η

διδασκαρική διατριβή του Πέτρου Οικονομίδη, έδειξε πως ο όρος των ασθενών με σαρκοείδωση προκαλεί αύξηση του πολλαπλασιασμού των αδενοκαρκινικών κυττάρων του πνεύμονα A549. Στις μελέτες αυτές όμως, μελετήθηκαν τα φαινόμενα της απόπτωσης και της κυτταροτοξικότητας σε φυσιολογικά και νεοπλασματικά κύτταρα του ανθρώπινου οργανισμού και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός χωρίς να εμπλέκεται πούθενά το στοιχείο της φλεγμονής.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης i) επιβεβαίωσαν το εύρημα προηγούμενης μελέτης του εργαστηρίου μας (Π.Οικονομίδης). Επιπλέον, ii) παρατηρήθηκε πως η επίδραση του ορού από ασθενείς με σαρκοείδωση είναι ίδια και στην καρκινική σειρά πνεύμονα SKMES, η οποία προέρχεται από πλακώδες καρκίνωμα. Στο σημείο αυτό, θα πρέπει να επισημάνουμε και το γεγονός ότι, η επίδραση του συγκεκριμένου ορού ήταν ίδια είτε για χρόνο επώασης ίσο με 24 είτε 48 είτε 72 ώρες και στις δύο κυτταρικές σειρές, που σημαίνει πως ο ορός των ασθενών αυτών περιέχει κάποιο ή κάποια στοιχεία, η δράση των οποίων δεν επηρεάζεται από την επεξεργασία του ορού και ότι η επίδραση που ασκείται είναι μακράς διάρκειας, αφού μπορούν και επιδρούν ακόμη και μετά από 72 ώρες αφότου εισήχθησαν στην καλλιέργεια. Παρόλο που δεν υπάρχουν αντίστοιχα δεδομένα στη διεθνή βιβλιογραφία είτε πάνω σε άλλες κυτταρικές σειρές, είτε από ερευνητικά μοντέλα με πειραματόζωα είτε για άλλα νοσήματα, υπάρχει μια έρευνα που φαίνεται να υποστηρίζει την επίδραση της σαρκοείδωσης στις διεργασίες γενικά του πολλαπλασιασμού. Ειδικότερα, ο Bihl MP και συνεργάτες (2006) έδειξαν πως η προοδευτική σαρκοείδωση στον πνεύμονα χαρακτηρίζεται από διαταραχή της ρύθμισης του πολλαπλασιασμού των ινοβλαστών με αποτέλεσμα την προαγωγή φαινόμενων ίνωσης.

Είναι γνωστό πως η σαρκοείδωση αποτελεί ένα πολυσυστηματικό νόσημα με κύριο χαρακτηριστικό την ύπαρξη χρόνιας φλεγμονής. Η επίδραση του ορού ασθενών με σαρκοείδωση προκαλεί σημαντική αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού *in vitro*, αλλά δεν έχει μελετηθεί το εύρημα αυτό σε σχέση με αίτιο που το προκαλεί. Είναι τα στοιχεία της φλεγμονής, δηλαδή κατά κύριο λόγο οι κυτταροκίνες, που προκαλούν αυτήν την κυτταρική αύξηση ή μήπως

κάποιο άλλο μόριο ή μόρια που ευοδώνουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό; Στην σαρκοείδωση, το μικροπεριβάλλον των προσβεβλημένων οργάνων επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό. Διάφοροι φλεγμονώδεις παράγοντες, όπως κυτταροκίνες και αυξητικοί παράγοντες, έχουν ανιχνευθεί σε αυξημένα επίπεδα στον ορό ασθενών με σαρκοείδωση (Nunes et al, 2005 & Iannuzzi MC et al, 2007 & Noor et al, 2007 & Pinkston P et al, 1983). Τέτοιοι παράγοντες όμως ανιχνεύονται σε αυξημένα επίπεδα και στον ορό ασθενών με ΧΑΠ και ασθενών με καρκίνο.

Παρατηρήθηκε λοιπόν βάσει των πειραμάτων της παρούσας διατριβής, πως παρά το γεγονός ότι και το καρκίνωμα του πνεύμονα και η ΧΑΠ σχετίζονται πολύ στενά με τα φαινόμενα της φλεγμονής, η προσθήκη ορού ασθενών με αυτές τις παθήσεις, δεν επηρέασαν τον πολλαπλασιασμό των κυτταρικών σειρών. Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν σημάδια τοξικότητας αλλά ούτε αυξημένου κυτταρικού θανάτου. Απεναντίας, τα καρκινικά κύτταρα πολλαπλασιάζονταν σαν μην υπήρχε πρόσθετος ορός (ο ανθρώπιος ορός) στο θρεπτικό τους μέσο. Δηλαδή, ο αριθμός των κυττάρων που επωασθήκαν παρουσία των συγκεκριμένων παθολογικών ορών, ήταν σχεδόν πανομοιότυπος με αυτόν των κυττάρων που επωασθήκαν μόνο με το θρεπτικό τους μέσο. Επομένως, η αύξηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων δεν οφείλεται σε παράγοντες οποιασδήποτε φλεγμονής, αλλά σε κάποιον άλλον παράγοντα που υπάρχει μόνο στον ορό των ασθενών με σαρκοείδωση. *Δηλαδή μόνο η φλεγμονή της σαρκοείδωσης, προκάλεσε την αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των κυτταρικών σειρών που μελετήθηκαν.* Διαφορετικά, εάν η αύξηση του πολλαπλασιασμού οφειλόταν γενικά σε φλεγμονή, τότε θα περίμενε κανείς πως και η ΧΑΠ θα προκαλούσε αύξηση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό αφού και αυτή ανήκει στα χρόνια φλεγμονώδη νοσήματα. Επίσης, βάσει αυτού του συλλογισμού, και ο ορός ασθενών με καρκίνωμα στον πνεύμονα, που είναι το αποτέλεσμα πρόκλησης χρονίων φαινομένων φλεγμονής λόγω του καπνού του τσιγάρου, θα έπρεπε και αυτός να επηρεάσει «θετικά» τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. **Επομένως, η αύξηση του πολλαπλασιασμού που παρατηρήθηκε, δεν οφείλεται στους φλεγμονώδεις παράγοντες των νοσημάτων αυτών, αλλά ενδεχομένως σε**

φλεγμονώδεις παράγοντες που δρουν μόνο στο περιβάλλον της σαρκοείδωσης.

Τέλος, σε ότι αφορά στον ορό των μαρτύρων, δεν είχε και αυτός κάποια επίδραση στον πολλαπλασιασμό των κυτταρικών σειρών. Τα αποτελέσματα από την προσθήκη του στο θρεπτικό μέσο ήταν ίδια με εκείνα των ορών των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα και ΧΑΠ.

Τα τελευταία χρόνια πολλοί ερευνητές έχουν ασχοληθεί με την Σαρκοείδωση και από μια άλλη σκοπιά. Εκείνη του συσχετισμού της με τον καρκίνο. Το έναυσμα ήταν η επιδημιολογική μελέτη των Brincker H, Wilbeck E. το 1974, όπου παρατηρήθηκε αυξημένος επιπολασμός καρκίνου στους ασθενείς με σαρκοείδωση της μελέτης. Έκτοτε καταγράφεται μεγάλος αριθμός μελετών με αντικρουόμενα αποτελέσματα. Οι μελέτες αυτές στην πλειοψηφία τους είναι επιδημιολογικές, ενώ καταγράφεται και μικρότερος αριθμός κλινικών μελετών.

Η δική μας προσέγγιση του θέματος έγκειται στην καταγραφή μεταβολών στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό *in vitro* υπό την επίδραση ορού από ασθενείς με σαρκοείδωση. Είναι δηλαδή η πρώτη πειραματική μελέτη που ασχολείται με το θέμα.

Τα ευρήματα της μελέτης υποδηλώνουν ότι η αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού που παρατηρείται οφείλεται σε κάποιον ή κάποιους παράγοντες που εμπεριέχονται **μόνο** στον ορό των ασθενών με Σαρκοείδωση. Η υπόθεσή μας είναι ότι το φαινόμενο αυτό πιθανόν να αποτυπώνεται και στον οργανισμό ενός ασθενούς με Σαρκοείδωση. Στην περίπτωση αυτή τα όργανα που προσβάλλονται από την νόσο πιθανόν καθίστανται επιρρεπή στην ανάπτυξη νεοπλασίας. Είναι πιθανόν ο έλεγχος του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στο μικροπεριβάλλον του οργάνου να διαταράσσεται μέσα στην γενικότερη αποδιοργάνωση της λειτουργίας του. Ο αυξημένος ρυθμός πολλαπλασιασμού αυξάνει και τον αριθμό ελαττωματικών κυττάρων. Τέτοια κύτταρα υπό κανονικές συνθήκες καταστρέφονται. Είναι πιθανόν, στο διαταραγμένο μικροπεριβάλλον της Σαρκοείδωσης, ο πλημμελής έλεγχος, λόγω αυξημένης παραγωγής αλλά και παραγομένων κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων,

να οδηγεί στην επιβίωση μεταλλαγμένων κυττάρων σε μικρά αθροίσματα μέσα στην μάζα του οργάνου. Οι μικρές αυτές εστίες σε ένα περιβάλλον με κατάλληλο γενετικό υπόστρωμα και συνεχή αντιγονικό ερεθισμό θα μπορούσαν να εξελιχθούν σε νεοπλασία.

Βάσει του αξιοσημείωτου αυτού αποτελέσματος, και της υπόθεσης στην οποία οδήγησε, κρίθηκε σκόπιμο να προσδιορισθεί το μονοπάτι που πυροδοτεί αυτήν την αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Δεδομένου ότι, οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν (αδενοκαρκίνωμα και πλακώδες καρκίνωμα) στην μελέτη είναι επιθηλιακού τύπου, η αναζήτηση στράφηκε στη διερεύνηση της συμμετοχής του κατεξοχήν υπεύθυνου για τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων, τον υποδοχέα του EGF (Epidermal growth Factor). Η εμπλοκή του μονοπατιού που εξυπηρετεί ο EGFR, εξετάστηκε με τη βοήθεια ενός αναστολέα της ενεργοποίησης του, το μονοκλωνικό αντίσωμα cetuximab. **Παρατηρήθηκε λοιπόν, πως όταν στο θεραπευτικό μέσο των νεοπλασματικών κυττάρων υπήρχε εκτός από τον ορό των ασθενών με σαρκοείδωση και αναστολέας, τότε η δράση του ορού έπαυε να «υπάρχει».** Δηλαδή τα καρκινικά κύτταρα πολλαπλασιάζονταν με το ίδιο ρυθμό που πολλαπλασιάζονταν τα κύτταρα που είχαν απλό θεραπευτικό μέσο. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει, πως υπάρχει κάποιο μόριο-συνδέτης του υποδοχέα του EGF στον ορό που προκαλεί αυτήν την πρόσθετη αύξηση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αφού όταν οι υποδοχείς «αδρανοποιούνται» από τον αναστολέα η δράση αυτή αναιρείται.

Επιπλέον, η πειραματική αυτή προσέγγιση, έδειξε πως το μονοπάτι μέσω του οποίου επιτυγχάνεται αυτή η αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού συμπίπτει ενδεχομένως με αυτό του EGFR, αφού όταν εμποδίστηκε η δίοδος μέσω αυτού, με την βοήθεια του αναστολέα του, ο ορός των ασθενών με σαρκοείδωση δεν προκάλεσε την αναμενόμενη αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Επομένως, ορισμένα από τα συστατικά του ορού αυτού και μόνον αποτελούν μόρια- προσδέτες μόνο του συγκεκριμένου υποδοχέα, διαφορετικά θα περίμενε κανείς να επάγεται αύξηση στον πολλαπλασιασμό είτε ίδιου ή έστω μικρότερου βαθμού ασχέτως παρουσίας του αναστολέα του EGF.

Η ύπαρξη του EGFR τόσο στην κυτταρική επιφάνεια όσο και στον πυρήνα έχει παρατηρηθεί ανοσοϊστοχημικά σε πλακώδες καρκίνωμα της στοματικής κοιλότητας (Seta A Sarkis et al, 2010), αλλά και ανοσοκυτταροχημικά σε κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος (COL, WOL, OS-187, Saos-2 και SJS), καρκινώματος του μαστού (MCF7,καρκίνωμα), επιδερμοειδούς καρκινώματος (A431) και καρκινώματος ωοθηκών (SKOV-3) (Dennis P. et al, 2004).

Στην παρούσα εργασία, η ανοσοκυτταροχημική μελέτη της επίδραση του ορού στην λειτουργία του EGFR στις κυτταρικές σειρές A549 και SKMES, έδειξε εντοπισμό του υποδοχέα τόσο στην κυτταρική μεμβράνη όσο και στον πυρήνα. Επιπλέον, η ανίχνευση του υποδοχέα είναι εντονότερη στα κύτταρα που έχουν προηγουμένως επωασθεί με ορό από ασθενείς με σαρκοείδωση. Η έκφραση αυτή δε, είναι μεγαλύτερη και ως προς τον αριθμό των κυττάρων που αντιδρούν, αλλά και ως προς την ένταση της αντίδρασης σε κάθε κύτταρο. Δηλαδή, υπάρχει κάποια/ες ουσία/ες στον ορό των ασθενών με σαρκοείδωση που ευθύνονται για την ενεργοποίηση του υποδοχέα, προκαλώντας αύξηση του αριθμού των υποδοχέων στην κυτταρική επιφάνεια, γεγονός που συνεπάγεται μεγαλύτερη απόκριση στο εξωτερικό ερέθισμα, το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα και την αύξηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του πυρήνα, αφού ανιχνεύονται περισσότερα μόρια EGFR και στον πυρήνα του κυττάρου. Ο EGFR μπορεί να εντοπισθεί πέραν της κυτταρικής μεμβράνης, (ως δίοδος μετάδοσης ενός εξωτερικού σήματος στο εσωτερικό του κυττάρου), και στον πυρήνα όπου δημιουργεί συμπλέγματα με άλλα μόρια προκειμένου να επάγει την μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με την κυτταρική αύξηση, ανάπτυξη, επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό. Επομένως, δε θα πρέπει να μας εκπλήσσει το γεγονός ότι ο ορός των ασθενών με σαρκοείδωση, μπορεί και προκαλεί αύξηση του αριθμού του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μέσω του EGFR.

Ανακεφαλαιώνοντας

Με την παρούσα εργασία δείξαμε πως i) οι κυτταροκίνες που είναι οι ακρογωνιαίοι λίθοι της φλεγμονής δρουν ποικιλοτρόπως σε ένα *in vitro* σύστημα μελέτης του πολλαπλασιασμού κυττάρων, όπως αυτό της καλλιέργειας μιας κυτταρικής σειράς. Η δράση τους εξαρτάται τόσο από την συγκέντρωση στην οποία βρίσκονται όσο και από το χρόνο δράσης αλλά και από τον κυτταρικό τύπο στον οποίο επιδρούν. Από την άλλη, ii) στην προσπάθεια να μελετήσουμε πως δρουν τα στοιχεία αυτά της φλεγμονής ως ένας *in vivo* παράγοντας, χρησιμοποιήσαμε ορό ασθενών με παθήσεις που έχουν ως κύριο χαρακτηριστικό τη χρόνια φλεγμονή (σαρκοείδωση, ΧΑΠ). Ωστόσο, η μεταβολή στην αύξηση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων παρατηρήθηκε μόνο υπό την επίδραση ορού ασθενών με σαρκοείδωση αλλά όχι και από ασθενείς με ΧΑΠ, και το εύρημα αυτό πιθανόν δηλώνει ότι η αύξηση αυτή οφείλεται σε στοιχεία της φλεγμονής που υπάρχουν στους ορούς των ασθενών με σαρκοείδωση αλλά όχι σε ορούς ασθενών με ΧΑΠ. Με αυτήν παρατήρηση, σημειώθηκε για πρώτη φορά πειραματικά η ύπαρξη πιθανής σχέσης μεταξύ σαρκοείδωσης και καρκίνου, η οποία έχει υποδειχθεί από επιδημιολογικές μελέτες. Και δείξαμε ότι το μονοπάτι μέσω του οποίου πραγματοποιείται αυτή η δράση είναι αυτό του EGFR!

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της δράσης των κυτταροκινών στον κυτταρικό κύκλο και ειδικότερα στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Μελετήθηκε η μεταβολή του ρυθμού πολλαπλασιασμού δύο κυτταρικών σειρών (A549 και SKMES) υπό την επίδραση διαφόρων μεσολαβητών της φλεγμονής. Στην πρώτη φάση της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν αντιπροσωπευτικές κυτταροκίνες της φλεγμονής (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ και IL-13 των οποίων η δράση πάνω στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό κατεγράφη σε συγκεκριμένους χρόνους και συγκεκριμένες συγκεντρώσεις. Οι κυτταροκίνες που χρησιμοποιήθηκαν φάνηκε ότι προκαλούν επιβράδυνση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση ορού από ασθενείς με δύο από τα πιο αντιπροσωπευτικά συστηματικά φλεγμονώδη νοσήματα με όργανο στόχο το αναπνευστικό επιθήλιο, Σαρκοείδωση και Χρονία Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια, καθώς και ορός από ασθενείς με καρκίνωμα του πνεύμονα. Ο ορός επελέγη ως διαδραστικό υλικό της ερευνητικής μελέτης καθώς αποτελεί την πηγή του δικτύου των κυτταροκινών και μεταβολιτών που δρουν σε πραγματικές συνθήκες κατά την πορεία μίας νόσου. Η διερεύνηση αυτού του τύπου της δράσης των μεσολαβητών της φλεγμονής θεωρούμε ότι έχει σημαντική βιολογική αξία καθώς αντιπροσωπεύει πραγματικές συνθήκες και συγκεντρώσεις και καλύπτει το πολύπλοκο φάσμα κυτταροκινών που απαντάται *in vivo*.

Από τους ορούς που μελετήθηκαν, μόνο ο ορός από ασθενείς με σαρκοείδωση επηρέασε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό προκαλώντας σημαντική αύξηση αυτού (επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα προγενέστερης αρχικής μελέτης που είχε γίνει στο εργαστήριό μας, με χρήση μόνο ορού από ασθενείς με σαρκοείδωση).

Το γεγονός ότι η σαρκοείδωση έχει συνδεθεί με εμφάνιση νεοπλασίας, κάνει τα ευρήματα αυτά ακόμα πιο σημαντικά. Η μελέτη αυτή υποδεικνύει ότι πιθανόν να ενεργοποιούνται μηχανισμοί πέραν αυτών μίας συστηματικής φλεγμονώδους νόσου (η ΧΑΠ δεν έχει την ίδια δράση), με αποτέλεσμα την δημιουργία συνθηκών ευνοϊκών για την ανάπτυξη νεοπλασίας.

Βάσει του σημαντικού αυτού αποτελέσματος, κρίθηκε μείζονος σημασίας η αναζήτηση του μονοπατιού μέσω του οποίου προκαλείται αυτή η αντίδραση των κυττάρων. Επειδή και οι δύο κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη είναι επιθηλιακού τύπου και παρατηρείται αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, θεωρήθηκε ότι θα έπρεπε να διερευνηθεί η συμμετοχή του κατ'έξοχην υπεύθυνου μεσολαβητή, ως προς τον πολλαπλασιασμό τους, του αυξητικού παράγοντα των επιθηλιακών κυττάρων / Epithelial Growth Factor, και πιο συγκεκριμένα του υποδοχέα του EGF (Epithelial Growth Factor Receptor / EGFR). Για να μελετηθεί η συμμετοχή του EGFR, χρησιμοποιήθηκε ένας αναστολέας της ενεργοποίησής του (cetuximab). Ο αναστολέας που μελετήθηκε, χρησιμοποιείται στην θεραπεία του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα. Η διερεύνηση αυτή έδειξε ότι ο αναστολέας, όταν χορηγηθεί ταυτόχρονα, ακυρώνει την ευοδωτική δράση του ορού από ασθενείς με Σαρκοείδωση, στον ρυθμό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η ανοσοκυτταροχημική μελέτη του EGFR έδειξε πως τα κύτταρα των οποίων το θεραπευτικό μέσο ήταν εμπλουτισμένο με ορό ασθενών με σαρκοείδωση, εκφράζουν τον υποδοχέα σε μεγαλύτερη έκταση και ένταση στην κυτταρική μεμβράνη, στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα, σε σχέση με τα κύτταρα των οποίων το θεραπευτικό μέσο είχε εμπλουτισθεί με τον αναστολέα.

Με την παρούσα διατριβή υπογραμμίζεται η ποικίλη δράση των κυτταροκίνων στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Επιβεβαιώνονται ευρήματα της ομάδας μας για την ερευνητική αξία της χρήσης του ορού από ασθενείς με ποικίλα νοσήματα στην διερεύνηση της παθογένειας φλεγμονωδών νοσημάτων αλλά και νεοπλασιών. Και τελικώς υποδεικνύεται μία πιθανή σχέση του EGF και ειδικότερα του υποδοχέα του, (EGFR), σε παθογενετικές διεργασίες στο πλαίσιο της σαρκοείδωσης οι οποίες επιπλέον ενδεχομένως να εμπλέκονται σε καρκινογένεση μέσα στο ίδιο αυτό πλαίσιο της συγκεκριμένης συστηματικής φλεγμονώδους νόσου.

SUMMARY

The aim of the present thesis was to study the in vitro effect of inflammatory cytokines on the cell cycle and in particular on cell proliferation of the A549 and SKMES cell lines. Cytokines that are considered as key players in inflammatory conditions (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ and IL-13) were initially used in order to analyze their effect on cell proliferation at specific time points and concentrations. All of the studied cytokines seemed to cause a slowdown of the proliferation rate of both cell lines.

The next step was to study the effect of whole human serum, as serum is evidently the source of this complicated and interactive network of cytokines in health and disease.

Sarcoidosis and chronic obstructive pulmonary disease (COPD), were selected as representative systemic inflammatory diseases in which the lung is the target organ. Serum from healthy individuals and patients with lung cancer were also included in the study, which highlights the potential role of human serum as a research tool of significant biological value.

The study revealed that only serum from patients with sarcoidosis had an effect, causing a considerable increase on cell proliferation.

The results of the study also strengthened the results of a previews (pilot) study from our team, which used only serum from patients with sarcoidosis, with similar outcome.

Sarcoidosis has been considered a possible partner of favorable predisposition in carcinogenesis in a number of epidemiological studies. The present study suggests a possible implication of the inflammatory environment of sarcoidosis (but not COPD) as a unique set up favorable to carcinogenesis. The study also suggests the implication of cytokines and mediators other than the cytokines analyzed in its first step.

Since the cell lines used originate from lung epithelium and the sera used come from patients with lung diseases, Epithelial Growth Factor/EGF and more specifically its receptor / EGFR, was chosen as an eligible mediator to be tested on cell proliferation. The EGFR inhibitor cetuximab, is currently used in lung

cancer treatment and was used to test the effect of EGFR on cell proliferation. This part of the study revealed that when the EGFR inhibitor was added to the cell culture medium simultaneously with serum from patients with sarcoidosis, it abolished the stimulatory effect of the latter on cell proliferation. The immunocytochemistry revealed increased expression of EGFR on cell membrane, cytoplasm and nucleus of the cells treated with serum from patients with sarcoidosis compared to the cells treated with EGFR inhibitor.

In conclusion, the present study demonstrated a mild inhibitory effect of certain inflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ and IL-13) on cell proliferation. It also showed the potential role of human serum as the source of all mediators. The use of serum from patients with inflammatory diseases of the lung results in different effects depending on the underline disease and not the inflammatory process per se. So Sarcoidosis, but not COPD, caused a considerable increase in cell proliferation mediated by EGF receptor. EGFR inhibitor abolishes the serum effect when added concomitantly to the cell culture medium.

Our results showed that only Sarcoidosis and not other inflammatory lung diseases, could create a microenvironment which is rather favorable for the cells to proliferate through the EGFR pathway. Under the “right” circumstances this specific inflammation of sarcoidosis could lead to malignant transformation and carcinogenesis.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. 2 Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease—updated 2005. Modena, Italy: GOLD, 2005.
2. Agusti A G, Noguera A, Sauleda J, et al. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2003; 21: 347–360.
3. AIRT Working Group. Italian cancer figures—report 2006:1.incidence, mortality and estimates. *Epidemiol Prev.*2006 Jan-Feb; 30(1 suppl 2):8-10, 12-28, 30-101 passim.
4. Aoshiba K, Nagai A. Differences in airway remodeling between asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Rev Allergy Immunol* 2004; 27: 35–43.
5. Askling J, Grunewald J, Eklund A, Hillerdal G, Ekborn A. Increased risk for cancer following sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:1668-1672.
6. Assoian RK, B E Fleurdelys, H C Stevenson, P J Miller, D K Madtes, E W Raines, R Ross, and M B Sporn R. Expression and secretion of type beta transforming growth factor by activated human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 September; 84(17): 6020–6024.
7. ATS/ ERS/ WASOG Committee. Statement on sarcoidosis. *Am J Respi Crit Care Med* 1999; 160: 736:755.
8. Baecklund , A. Ekbom, P Sparen, N Feltelius, L. Klareskog. 1998. Disease activity and risk of lymphoma in patients with rheumatoid arthritis: nested case-control study. *B.M.J.* 317:180-181.
9. Barnard J, Rose C, Newman L, Canner M, Martyny J, McCammon C, Bresnitz E, Rossman M, Thompson B, Rybicki B, Weinberger SE, Moller DR, McLennan G, Hunninghake G, DePalo L, Baughman RP, Iannuzzi MC, Judson MA, Knatterud GL, Teirstein AS, Yeager H Jr, Johns CJ, Rabin DL, Cherniack R. Job and industry classifications associated with

- sarcoidosis in A Case-Control Etiologic Study of Sarcoidosis (ACCESS). *J Occup Environ Med* 2005; 47:226-234.
10. Barnes P J. New molecular targets for the treatment of neutrophilic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 1055–1062.
 11. Battisti JP, Turiaf J, Hincky JM, Dournovo P. Sarcoidosis and malignant tumors. *Nouv Presse Med* 1997; 6(14):1213-5.
 12. Bayer H, Müller T, Myrtek D, Soricther S, Ziegenhagen M, Norgauer J, Zissel G, Idzko M. Serotonergic receptors on human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007 Jan;36(1):85-93. Epub 2006 Jul 27.
 13. Bengtsson AA, Sturfelt G, Gullstrand B, Truedsson L. Induction of apoptosis in monocytes and lymphocytes by serum from patients with systemic lupus erythematosus - an additional mechanism to increased autoantigen load? *Clin Exp Immunol*. 2004 Mar;135(3):535-43.
 14. Bennett WP, Hussain SP, Vahakangas KH, Khan MA, Shields PG, Harris CC. Molecular epidemiology of human cancer risk: gene-environment interactions and p53 mutation spectrum in human lung cancer. 1999. *J Pathol*. Jan; 187, 8-18.
 15. Bihl MP, Laule-Kilian K, Bubendorf, Rutherford RM, Baty F, Kehren J, Eryuksel E, Staedtler, Yang JQ, Goulet S, Gilmartin JJ, Tamm M and Brutsche MH. Progressive pulmonary sarcoidosis: a fibroproliferative process potentially triggered by EGR-1 and IL-6. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*. 206 Mar; 23(1):38-50.
 16. Blanc P D, Toren K. Occupation in chronic obstructive pulmonary disease and chronic bronchitis: an update. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007; 11: 251–257.
 17. Botti C, Seregni E, Menard S, Collini P, Tagliabue E, Campiglio M, Vergani B, Girelli C, Aiello P, Pilotti S, Bombardieri E. Two novel monoclonal antibodies against MUC4 tandem repeat reacting with an antigen overexpressed by lung cancer. *Int J Biol Markers*. 2000 Oct-Dec; 15(4):312-20.
 18. Bray FL, Weiderpass E. Lung cancer mortality trends in 36 European countries: secular trends and birth cohort patterns by sex and region 1970-2007. *Int J Cancer*. 2010 Mar 15; 126(6):1454-66.

19. Breen L., Murphy L., Keenan J., Clynes M. Development of taxane resistance in a panel of human lung cancer cell lines. *Toxicol In vitro*. 2008 Aug; 22(5): 1234-41.
20. Bresnitz EA, Strom BL. Epidemiology of sarcoidosis. *Epidemiol Rev* 1983; 5:124-56.
21. Brincker H, Wilbek E. The incidence of malignant tumors in patients with sarcoidosis. *Ugeskr Laeger*. 1974 Sep 23;136(39):2192-5.
22. Brincker H. Sarcoid reactions and sarcoidosis in Hodgkin's disease and other malignant lymphomata. *Br. J. Cancer* (1972) 26, 120
23. Brincker H. Solid tumors preceding or following sarcoidosis. *Med Pediatr Oncol*. 1987;15(2):82-8.
24. British Thoracic Society. BTS COPD guidelines summary. *Thorax* 1997; 52 (Suppl 5): S1-S32.
25. Brody JS, Spira A. State of art. Chronic pulmonary obstructive disease, inflammation and lung cancer. *Proc Am Thorac Soc* 2006 Aug; 3(6): 535-537.
26. Brown DM, Hutchison L, Donaldson K, MacKenzie SJ, Dick CA, Stone V. The effect of oxidative stress on macrophages and lung epithelial cells: the role of phosphodiesterases 1 and 4. *Toxicol Lett*. 2007 Jan 10; 168 (1):1-6. Epub 2006 Nov 6.
27. Calverley P, Pauwels R, Vestbo J, et al. Combined salmeterol and fluticasone in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease: a randomised controlled trial. *Lancet* 2003; 361: 449-456.
28. Caramori G, Pandit A, Papi A. Is there a difference between chronic airway inflammation in chronic severe asthma and chronic obstructive pulmonary disease? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005; 5: 77-83.
29. Cazzola M, Centanni S, Santus P, et al. The functional impact of adding salmeterol and tiotropium in patients with stable COPD. *Respir Med* 2004; 98: 1214-1221.
30. Charles A. Dinarello. Biologic basis for interleukin-1 in Disease. *Blood* vol 87, no6 (March 15), 1996: pp 2095-2147.
31. Charles A. Dinarello. Proinflammatory cytokines. *Chest* 2000;118;503-508

32. Chase MW. Delayed-type hypersensitivity and the immunology of Hodgkin's disease, with a parallel examination of sarcoidosis. *Cancer Res.* 1966 Jun;26(6):1097-120
33. Chung K F. Inflammatory mediators in chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005; 4: 619-625.
34. Chung K F. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2001; 18: Suppl. 34, 50s-59s
35. Cleary I., Doherty G, Moran E, Clynes M. The multidrug-resistant human lung tumor cell line, DLKP-A10, expresses novel drug accumulation and sequestration systems. *Biochem Pharmacol.* 1997 May 15; 53 (10): 1493-502.
36. Cohen Philip, Razelle Kurzrock. Sarcoidosis and malignancy. *Clinics in dermatology*, 2007;25;326-333.
37. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420:860-7.
38. Crowston JG, Wang XY, Khaw PT, Zoellner H, Healey PR. Human serum reduces mitomycin-C cytotoxicity in human tenon's fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006 Mar;47(3):946-52.
39. Dahl R, Greefhorst L A, Nowak D, et al. Inhaled formoterol dry powder versus ipratropium bromide in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 778-784.
40. Daniel n Sauber. Interleukin 1. *Arch Dermatol.* 1989;125:679-682
41. De Boer W I, Alagappan V K, Sharma H S. Molecular mechanisms in chronic obstructive pulmonary disease; potential targets for therapy. *Cell Biochem Biophys* 2007; 47: 131-148.
42. De S, Zelazny ET, Souhrada Jf, Souhrada M. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993 Dec; 9 (6):645-51.
43. De Vita F, Orditura M, auriemma A, Infusino S, Caqtalano G. Serum concentrations of proinflammatory cytokines in advanced non small cell lung cancer patients. *J Exp Clin Cancer Res.*1998 Dec;17(4):413-7.
44. Dennis P. M. Hughes, Dafydd G. Thomas, Thomas J. Giordano, Laurence H. Baker, and Kevin T. McDonagh. Cell Surface Expression of Epidermal Growth Factor Receptor and Her-2 with Nuclear Expression of Her-4 in

- Primary Osteosarcoma. *CANCER RESEARCH* 64, 2047–2053, March 15, 2004.
45. Dentener MA, Bazil V, Von Asmuth EJ, Ceska M, Buurman WA. Involvement of CD14 in lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha, IL-6 and IL-8 release by human monocytes and alveolar macrophages. *J Immunol.*1993; 150: 2885-2891
 46. Domagala-Kulawik J, Maskey-Warzechowska M, Krasweska I, et al. The cellular composition and macrophage phenotype in induced sputum in smokers and ex-smokers with COPD. *Chest* 2003; 123: 1054–1059.
 47. Du Bois RM, Goh N, McGrath D, Cullinan P. Is there a role for microorganisms in the pathogenesis of sarcoidosis? *J Intern Med* 2003; 253:4-17.
 48. Eishi Y, Suga M, Ishige I, Kobayashi D, Yamada T, Takemura T. Quantitative analysis of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes of Japanese and European patients with sarcoidosis. *J Clin Microbiol* 2002; 40 198-204.
 49. Fabbri L M, Romagnoli M, Corbetta, et al. Differences in airway inflammation in patients with fixed airflow obstruction due to asthma or chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 418–424.
 50. Familial associations in sarcoidosis: a report to the Research Committee of the British Thoracic and Tuberculosis Association. *Tubercle.*1973 Jun; 54(2):87-98.
 51. Filiz S_{en},; Karen P. Mann, L. Jeffrey Medeiros. Multiple Myeloma and Sarcoidosis. *Arch Pathol Lab Med – Vol 126*, March 2002
 52. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O' Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol.*1991; 147: 3815-3822
 53. Franklin WA, Veve R, Hirsch FR, Helfrich BA, Bunn PA Jr. Epidermal growth factor receptor family in lung cancer and premalignancy. *Semin Oncol* 2002 Feb;29(1 Suppl 4):3-14.

54. Fujimoto K, Yasuo M, Urushibata K, et al. Airway inflammation during stable and acutely exacerbated chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2005; 25: 640–646.
55. Gadgil A, Zhu X, Sciruba F C, et al. Altered T-cell phenotypes in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3: 487–488.
56. Gadzar A.F. 1994. The molecular and cellular basis of human lung cancer. *Anticancer*. Jan- Feb 14, 261-267.
57. Gamble E, Grootendorst D C, Hattotuwa K, et al. Airway mucosal inflammation in COPD is similar in smokers and exsmokers: a pooled analysis. *Eur Respir J* 2007; 30: 467–471.
58. Gazouli M, Ikonopoulou J, Trigidou R, Foteinou M, Kittas C, Gorgoulis V. Assessment of mycobacterial, propionibacterial and human herpesvirus 8 DNA in tissues of Greek patients with sarcoidosis. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3060:3060-63.
59. Giard DJ, Aaronson SA, Torado GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl cancer Inst.* 1973 Nov; 51 (5): 1417-23.
60. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, 2006). (GOLD). Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. GOLD workshop report, updated November 2006. Bethesda, MD, USA: GOLD, 2006)
61. Gorham ED, Garland FC, Garland FC, Kaiser K, Travis WD, Centeno JA. Trends and occupational associations in incidence of hospitalized pulmonary sarcoidosis and other lung diseases in Navy personnel: a 27-year historical prospective study, 1975-2001. *Chest* 2004; 126:1431-1438.
62. Graves R, Davies R, Owen P, Clynes M, Cleary I, O' Beirne G. An homogenous assay for measuring the uptake and efflux of radiolabelled drugs in adherent cells. *J Biochem Biophys Methods*. 1997 Jun 9; 34(3):177-87.
63. Graziano SL, Gamble GP, Newman NB, Abbott LZ, Rooney M, Mookherjee S, Lamb ML, Kohman LJ, Poiesz BJ. Prognostic significance of K-ras codon 12

- mutations in patients with resected stage I and II non-small-cell lung cancer. 1999 J Clin. Oncol. Feb 17, 668-675.
64. Grunewald J, Eklund A, Olerup O. Human leukocyte antigen class I alleles and the disease course in sarcoidosis patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169: 696-702.
 65. Guo L, Zhang F, Cai Y, Liu T. Expression profiling of integrins in lung cancer cells. *Pathol Res Pract*. 2009; 205(12):847-53. Epub 2009 Aug 11.
 66. Gurjit K. Khurana Hershey. IL-13 receptors and signaling pathways: an evolving web. *J allergy Clin Immunol* 2003.;111:677-90.
 67. Hackshaw AK, Law MR, Wald NJ. The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke. *BMJ*. 1997; 315(7114): 980-988.
 68. Hainaut P, Pfeifer GP. Patterns of p53 G-->T transversions in lung cancers reflect the primary mutagenic signature of DNA-damage by tobacco smoke. 2001. *Carcinogenesis*. Mar 22, 367-374.
 69. Hammerschmidt Stefan, Hubert Wirtz. Lung Cancer: Current Diagnosis and Treatment. *Dtsch Arztebl Int* 2009. 106(49):809-20.
 70. Henley SJ, Thun MJ, chao A, Calle EE. Association between exclusive pipe smoking and mortality from cancer and other diseases. *J Natl cancer Inst*. 2004; 96(11):853-861.
 71. Higashiyama S, Iwabuki H, Morimoto C, Hieda M, Inoue H, Matsushita N. Membrane-anchored growth factors, the epidermal growth factor family: beyond receptor ligands. *Cancer Sci*. 2008 Feb; 99(2):214-20. Review.
 72. Hiramatsu J, Katakao M, Nakata Y, Okazaki K, Tada S, Tanimoto M. Propionibacterium acnes DNA detected in bronchioalveolar lavage cells from patients with sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc. Diffuse Lung Dis* 2003; 20:197-203.
 73. Hoag Jeffrey B. Aimel Azizi, Timothy J Doherty, Jason Lu, Rudolph E Willis and Mark E Lund. Association of cetuximab with adverse pulmonary events in cancer patients: a comprehensive review. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2009, 28:113

74. Hogg J C, 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.
75. Holmes G.K., P.L. Stokes, T.M. Sorahan, P. Prior, J.A. Waterhouse, W.T. Cooke. 1976. Coeliac disease, gluten-free diet, and malignancy. *Gut* 17:612-619.
76. Hoshino T, Kato S, Oka N, et al. Pulmonary inflammation and emphysema: role of cytokines IL-18 and Il-13. *J Respir Crit Care Med* 2007; 176: 49–62.
77. Howard A. Young and Kenneth J. Hardy. Role of interferon- γ in immune cell regulation. *J Leukoc Biol.* 58:373-381; 1995.
78. HP Hauber, D Gholami, A Meyer and A Pforte. Increased interleukin-13 expression in patients with sarcoidosis. *Thorax* 2003; 58:519-524.
79. Hsu YF, Ajona D, Corrales L, Lopez-Picazo JM, Gurrpide A, Montuenga LM, Pio R. Complement activation mediates cetuximab inhibition of non-small cell lung cancer tumor growth in vivo. *Mol Cancer.* 2010 Jun 7; 9 :139.
80. Huang SM, Harari PM. Epidermal growth factor receptor inhibition in cancer therapy: biology, rationale and preliminary clinical results. *Invest New Drugs.* 1999; 17(3):259-69. Review.
81. Hubbard Stevan R. The Juxtamembrane Region of EGFR Takes Center Stage. *Cell* 137, June 26, 2009
82. Ian LP Beales. Effect of interleukin-1b on proliferation of gastric epithelial cells in culture. *BMC Gastroenterology* 2002, 2:7.
83. Iannuzzi M, Rybicki B, Teirstein A. Sarcoidosis. *N Engl J Med* 2007; 357:2153-65.
84. Isamu Okamoto. Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR-targeted anticancer therapy. *FEBS Journal* 277 (2010)309-315.
85. Janseen-Heijen ML, Coebergh JW. The changing epidemiology of lung cancer in Europe. *Lung Cancer.* 2003 Sep; 41(3):245-58.
86. Jay M. Lee, Jane Yanagawa, Katherine A. Peebles, Sherven Sharma, Jenny T. Mao, Steven M. Dubinett. Inflammation in lung carcinogenesis: New

- Targets for Lung Cancer Chemoprevention and Treatment. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2008 June; 66(3): 208-217.
87. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*. 2010 Sep-Oct; 60(5):277-300.
88. Judson MA, Hirst K, Iyengar SK, Rybicki BA, El-Ghormli L, Baughman RP, Donohue JF, Elston RC, Kavuru MS, Moller DR, Newman LS, Rabin DL, Rossman MD, Teirstein AS, Iannuzzi MC. Comparison of sarcoidosis phenotypes among affected African-American siblings. *Chest* 2006; 130:855-62.
89. Julian R. Molina, Ping Yang, Stephen D. Cassivi, Steven E. Schild, Alex A. Adjel. Non-small cell lung cancer: Epidemiology, Risk Factors, Treatment, and Survivorship. *Mayo clin Proc*. 2008; 83(5): 585-594.
90. Kajdasz DK, Lackland DT, Mohr LC, Judson MA. A current assessment of rurally linked exposures as potential risk factors for sarcoidosis. *Ann Epidemiol* 2001; 11:111-117.
91. Kardos P, Keenan J. Tackling COPD: a multicomponent disease driven by inflammation. *Med Gen Med* 2006; 8: 54.
92. Kataoka M, Nakata Y, Hioka T, Hosoya S, Shiomi K, Nishizaki H, Morishita R, Ono Y, Ohnoshi T, Kimura I. Malignancies in patients with sarcoidosis. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi*. 1992 Apr;30(4):598-603
93. Kate schroder, Paul J Hertzog, Timothy Ravasi and David Hume. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J Luekoc Biol*. 75: 163-189; 2004.
94. Kentaro Inamura, Hironori Ninomiya, Yuichi Ishikawa, and Osamu Matsubar. Is the Epidermal Growth Factor Receptor Status in Lung Cancers Reflected in Clinicopathologic Features? *Arch Pathol Lab Med – Vol 134*, January 2010
95. Khan A J, Nanchal R. Cotton dust lung diseases. *Curr Opin Pulm Med* 2007; 13: 137-141.
96. Kim JI, Lakshmikanthan V, Frilot N, Daaka Y. Prostaglandin E2 promotes lung cancer cell migration via EP4-betaArrestin1-c-Src signalsome. *Mol Cancer Res*. 2010 Apr; 8(4):569-77. Epub 2010 Mar 30.

97. Kimberly A. Foster, Christine G. Oster, Mary M. Mayer, Michael L. Avery, Kenneth L. Audus. Characterization of the A549 Cell Line as Type II Pulmonary Epithelial Cell Model for Drug Metabolism. *Experimental Cell Research*, 1998, 243, 359-366.
98. Kosacka M, Jankowska R. The epidemiology of lung cancer. *Pneumonol Alergol Pol.* 2007; 75(1):776-80.
99. Kucera GP, Rybicki BA, Kirkley KL. Occupational risk factors of sarcoidosis in African-American siblings. *Chest* 2003; 123:1527-35.
100. La Vecchia C., E. Negri, S. Franceschi. 1992. Medical history and the risk of non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer Epidimiol. Biomarkers Prev.* 1:533-36.
101. Lapperre T S, Postma D S, Gosman M M, et al. Relation between duration of smoking cessation and bronchial inflammation in COPD. *Thorax* 2006; 61: 115-121.
102. Lapperre T S, Sont J K, van Schadewijk A, et al. Smoking cessation and bronchial epithelial remodelling in COPD: a crosssectional study. *Respir Res* 2007; 8: 85. Scanlon P D, Connett J E, Waller L A, et al. Smoking cessation and lung function in mild-to-moderate chronic obstructive pulmonary disease. The Lung Health Study. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 381-390.
103. Larsson K. Aspects on pathophysiological mechanisms in COPD. *J Intern Med* 2007; 262: 311-340.
104. Laverby P. Sarcoidosis in pulmonary neoplasms. *Scand J Respir Dis* 1975; 56:20-7.
105. Lee HY, Dawson MI, Claret FX, Chen JD, Walsh GL, Hong WK, Kurie JM. Evidence of a retinoid signaling alteration involving the activator protein 1 complex in tumorigenic human bronchial epithelial cells and non- small cell lung cancer cells. *Cell Growth Differ.* 1997 Mar; 8 (3):283-91.
106. Lee IT, Lin CC, Wu YC, Yang CM. TNF-alpha induces matrix metalloproteinase-9 expression in A549 cells: role of TNFR1/TRAF2/PKCalpha-dependent signaling pathways. *J Cell Physiol.* 2010 Aug;224(2):454-64.

107. Leigh R, Pizzichini M, Morris M, et al. Stable COPD: predicting benefit from high dose inhaled corticosteroid treatment. *Eur Respir J* 2006; 27: 964-971.
108. Li C, Iida M, Dunn EF, Ghia AJ, Wheeler DL. Nuclear EGFR contributes to acquired resistance to cetuximab. *Oncogene*. 2009 Oct 29;28(43):3801-13. Epub 2009 Aug 17.
109. Li S, Schmitz KR, Jeffrey PD, Wiltzius JJ, Kussie P, Ferguson KM. Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell*. 2005 Apr; 7(4):301-11.
110. Lieber M, Smith B, Szakai A, Nelson-Rees W, Todaro S. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int. J. Cancer*, 1976, 17:62-70.
111. Lindsey Enewold, Leah E. Mechanic, Elise D. Bowman, Yun-Ling zheng, Zhipeng Yu, Glenwood Trivers, Anthony J, Alberg, Curtis Harris. Serum Concentrations of Cytokines and Lung Cancer Survival in African Americans and Caucasians. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18(1).
112. Lokke A, Lange P, Scharling H, et al. Developing COPD: a 25 year follow-up study of the general population. *Thorax* 2006; 61: 935-939.
113. Lu QY, Yang Y, Jin YS, Zhang ZF, Heber D, Li FP, Dubinett SM, Sondej MA, Loo JA, Rao JY. Effects of green tea extract on lung cancer A549 cells: proteomic identification of proteins associated with cell migration. *Proteomics*. 2009 Feb;9(3):757-67.
114. Lu XD, Zhu XL, Chen C, Zhang GB, Zhang XG, Huang JA. Inhibition of lung cancer cell proliferation by CD40 signaling through tumor necrosis factor I. 2009 Jan;28(1):20-3. Epub 2009 Jan 12
115. Lurje G, Lenz HJ. EGFR signaling and drug discovery. *Oncology*. 2009; 77(6):400-10. Epub 2010 Feb 2. Review.
116. Macarthur m, Hold GL, El-Omar EM. Inflammation and cancer. II. Role of chronic inflammation and cytokine polymorphisms in the pathogenesis of gastrointestinal malignancy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: G515-20.
117. MacNee W. Pulmonary and systemic oxidant/antioxidant imbalance in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2: 50-60.

- 4 & Domej W, Foldes-Papp Z, Flogel E, Haditsch B. Chronic obstructive pulmonary disease and oxidative stress. *Curr Pharm Biotechnol* 2006; 7: 117-123.
118. Mannino D M, Buist A S. Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends. *Lancet* 2007; 370: 765-773.
119. Matanic D, Beg-Zec Z., Stojanovic D, Matakoric-Mileusnic V. Flego, Et. F. Milevoj-Ribic. Cytokines in patients with Lung Cancer. *Scandinavian Journal of Immunology* 57, 173-178.
120. Mellemkjaer L., V. Andersen, M.S. Linet, G. Gridley, R. Hoover J.H. Olsen. 1997. Non-Hodgkin's lymphoma and other cancers among a cohort of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 40:761-768.
121. Michael C. Iannuzzi, M.D., Benjamin A. Rybicki, Ph.D. and Alvin S. Teirstein, M.D. Sarcoidosis. *N Engl J Med* 2007; 357:2153-65.
122. Minshall EM, Tsicopoulos A, Yasruel Z, Wallaert B, Akoum H, Vorng H, Tonnel AB, Hamid Q. Cytokine mRNA gene expression in active and nonactive pulmonary sarcoidosis. *Eur Respir J.* 1997 Sep; 10 (9):2034-9.
123. Molino N A. Current thinking on genetics of chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Pulm Med* 2007; 13: 107- 113.
124. Mukohara T., Engelmann J.A., Hanna N.H., Yeap, B.Y, Kobayashi S., Lindeman N., Halmos B., Pearlberg J. Tsuchihashi Z., Cantley L.C., Tenen D.G., Johnson B.E., Janne P.A. Differential effects of Gefitinib and cetuximab on non-small-cell lung cancers bearing epidermal growth factor receptor mutations. *J Nati Cancer Inst.* 2005 Aug 17;97 (16) : 1185-94.
125. Mukohara Toru, Jeffrey A Engelman, Nasser h Hanna, Beow Y Yeap, Suzsumu kobayashi, Neal Linderman, Balazs Halmos, Joseph Pearlberg, Zenta Tsuchihashi, Lewis C. Cantley, Daniel g. Tenen, Bruce E Johnson, Pasi A Janne. Differential effects of Gefitinib and Cetuximab on Non-small-cell Lung Cancers bearing epidermal Growth Factor Receptor mutations. *Journal of the National Cancer Institute.* Vol 97. No 16 august 17, 2005.
126. Murphy L, Henry M, Meleady P, Clynes M, Keenan J. Proteomic investigation of taxol and taxotere resistance and invasiveness in a

- squamous lung carcinoma cell line. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Sep; 1784(9):1184-91.
127. Nakane T., Szentendrei T., Stern L., Virmani M., Seely J., Kunos G. Effects of IL-1 and cortisol on β -adrenergic receptors, cell proliferation, and differentiation in cultured human A549 tumor cells. *J Immunol*. 1990 Jul 1; 145 (1): 260-6.
128. Newman LS, Rose CS, Bresnitz EA. A case control etiologic study of sarcoidosis: environmental and occupational risk factors. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170:1324-30.
129. Newman LS, Rose CS, Maier LA. Sarcoidosis. *N Engl J Med* 2003; 168:1162-1234.
130. Niewoehner D E, Rice K, Cote C, et al. Prevention of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease with tiotropium, a once-daily inhaled anticholinergic bronchodilator: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2005; 143: 317-326.
131. Niklinska W, Chyczewski L, Laudanski J, Sawicki B, Niklinski J. Detection of p16 abnormalities in early-stage non-small cell lung cancer. 2001. *Folia Histochem Cytobiol*. 39, 147-148.
132. Nunes H., Bouvry D., Soler P., Valeyre D. Sarcoidosis. *Orphanet Journal of rare diseases* 2007, 2:46.
133. Nunes H., P. Solar., D. Valeyre. Pulmonary Sarcoidosis. *Allergy* 2005:60: 565-582.
134. Pauwels R A, Buist A S, Calverley P M, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. National Heart, Lung and Blood Institute /World Health Organization Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) workshop summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 1256-1276.
135. Philip M, Rowley DA, Schreiber H. Inflammation, as a tumor promoter in cancer induction. *Semin Cancer Biol* 2004;14:433-9

136. Pinkston P, Bitterman PB, and. Crystal RG. Spontaneous release of interleukin-2 by lung T lymphocytes in active pulmonary sarcoidosis. *N Engl J Med.* 1983 Apr 7;308(14):793-800.
137. Pittenger GL, Liu D, Vinik AI. the toxic effects of serum from patients with type 1 diabetes mellitus on mouse neuroblastoma cells: a new mechanism for development of diabetic autonomic neuropathy. *Diabet Med.* 1993 Dec; 10(10):925-32.
138. Prezant Dj, Dhalad A, Goldstein A, Janus D, Ortiz F, Aldrich TK, Kelly KJ. The incidence, prevalence, and severity of sarcoidosis in New York City firefighters. *Chest* 1999; 116:1183-1193.
139. Pryor W A, Stone K. Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 686: 12-27.
140. Raben D, Helfrich B, Chan DC, Ciardiello F, Zhao L, Franklin W, Barón AE, Zeng C, Johnson TK, Bunn PA Jr. The effects of cetuximab alone and in combination with radiation and/or chemotherapy in lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2005 Jan 15;11(2 Pt 1):795-805.
141. Robinson DS, Richeldi L, Saltini C, DuBois R.M. Granulomatous proceses. In: Crystal RG, west JB, editors. *The lung.* Scientific foundations, 2nd edn. New York: Raven press, 1997:2395-2409.
142. Robinson LA, Smith Lj, Fontaine MP, Kay HD, Mountjoy CP, Pirruccello SJ. C-myc antisense oligodeoxyribonucleotides inhibit proliferation of non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg.* 1995 Dec; 60(6):1583-91.
143. Rømer FK, Hommelgaard P, Schou G. Sarcoidosis and cancer revisited: a long-term follow-up study of 555 Danish sarcoidosis patients. *Eur Respir J.* 1998 Oct;12(4):906-12.
144. Rømer FK, Schou G. Sarcoidosis and cancer revisited. From the authors (letter). *Eur Respir J.* 1999 ;14:483.
145. Ron N. Apte, shahar Dotan, Moshe Elkabets, Malka R., White, Eli Reich, Yaron Carmi, Xiaping Song, Tatyana Dvozkin, Yakov Krelin and Elena Voronov. The involment of Il-1 in tumoigenesis, tumor invasiveness,

- metastasis and tumor-host interactions. *Cancer Metastasis Rev* (2006) 25:387-408.
146. Rose MC, Piazza FM, Chen YA, Alimam MZ, Bautista MV, Letwin N, Rajput B. Model systems for investigating mucin gene expression in airway diseases. *J Aerosol Med* 200, Fall;!(3):245-61.
147. Rybicki BA, Amend KL, Maliarik MJ, Iannuzzi MC. Photocopier exposure and risk of sarcoidosis in African-American sibs. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2004; 21:49-55.
148. Rybicki BA, Iannuzzi MC, Frederick MM, Thompson BW, Rossman MD, Bresnitz EA, Terrin ML, Moller DR, Barnard J, Baughman RP, DePalo L, Hunninghake G, Johns C, Judson MA, Knatterud GL, McLennan G, Newman LS, Rabin DL, Rose C, Teirstein AS, Weinberger SE, Yeager H, Cherniack R. Familial aggregation of sarcoidosis: a case-control etiologic study of sarcoidosis (ACCESS). *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:2085-2091.
149. Saetta M, Turato G, Facchini F M, et al. Inflammatory cells in the bronchial glands of smokers with chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 1633-1639. Ferguson Kathryn M. A structure-based view of Epidermal Growth Factor Receptor regulation. *Annu Rev Biophys.* 2008; 37: 353-373
150. Safarpour H, Conoly P, Tong X, Bielawski M, Wilcox E. Overcoming extractability hurdles of a ¹⁴C labeled taxane analogue milataxel and its metabolite from xenograft mouse tumor and brain tissues. *J Pharm Biomed Anal.* 2009 Apr 5; 49(3):774-9.
151. Sahashi K, Ina Y, Takada K, Sato T, Yamamoto M, Morishita M. Significance of interleukin-6 in patients with sarcoidosis. *Chest* 1994;106:16-160.
152. Sakula A. Bronchial Carcinoma and Sarcoidosis. *BR J Cancer*, 1963 Jun;17:206-1
153. Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1995 Jul;19(3):183-232

154. Sampsonas F, Karkoulis K, Kaparianos A, et al. Genetics of chronic obstructive pulmonary disease, beyond α_1 -antitrypsin deficiency. *Curr Med Chem* 2006; 13: 2857-2873.
155. Sands H, Mishra A, Stoeckler JD, Hollister B, Chen SF. Preclinical activity of an i.v. formulation of rubitecan in IDD- human solid tumor xenografts. *Anticancer Drugs*. 2002 Oct; 13(9):965-75.
156. Seta A Sarkis, Bashar H Abdullah, Ban A Abdul Majeed, and Nazar G Talabani. Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in oral squamous cell carcinoma in relation to proliferation, apoptosis, angiogenesis and lymphangiogenesis. *Head Neck Oncol*. 2010; 2: 13.
157. Sethi J M, Rochester C L. Smoking and chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chest Med* 2000; 21: 67-86.
158. Shaper AG, Wannamethee SG, Walker M. Pipe and cigar smoking and major cardiovascular events, cancer incidence and all-cause mortality in middle-aged British men. *Int J Epidemiol*. 2003; 32(5): 802-808.
159. Smith CJ, Perfetti TA, King JA. Perspectives on pulmonary inflammation and lung cancer risk in cigarette smokers. *Inhal toxicol* 2006. Aug;18(9): 667-677
160. Song Z, Marzilli L, Greenlee BM. Mycobacterial catalase-peroxidase is a tissue antigen and a target of the immune response in systemic sarcoidosis. *J Exp. Med* 2005; 201:755-767.
161. Spagnolo P., Renzoni EA, Wells AU, Sato H, Grutters JC, Sestini P, Abdallah A, Gramiccioni E, Ruven HJ, du Bois RM, Welsh KI. C-C chemokine receptor 2 and sarcoidosis: association with Lofgren's syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168:1162-1166. Thomas PD, Hunninghake GW. Current concepts of the pathogenesis of sarcoidosis. *A Respir Dis* 1987; 135:747-760.
162. Srirupa Mukhopadhyay, John r Hoidal and Tapan K Mukherjee. Role of TNF-a in pulmonary pathophysiology. *Respiratory Research* 2006, 7:125.
163. Steven M. Opal and Vera A. DePalo. Anti-Inflammatory Cytokines. *CHEST* 2000; 117:1162-1172.

164. Stina salomonsson and Ingrid E. Lundberg. Cytokines in idiopathic inflammatory myopathies. *Autoimmunity*, May 2006; 39(3): 177-190.
165. Tas F, Duranyildiz D, Argon A, Oguz H, Camlica H, Yasasever V, Topuz E. Serum levels of leptin and proinflammatory cytokines in advanced-stage non-small cell lung cancer. *Med Oncol*. 2005; 22(4):353-8.
166. Teramoto S. 1. COPD pathogenesis from the viewpoint of risk factors. *Intern Med* 2007; 46: 77-79.
167. Tetley T D. Inflammatory cells and chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005; 4: 607-618.
168. Thomas Geiser, Pierre-Henrei Jarreau, Kamran Atabai and Micheal A. Matthay. Interleukin-1b augments in vitro alveolar epithelial repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L1184-L1190, 2000.
169. Trepicchio LW, Wang L, Bozza M, Dorner JA. IL-11 regulates macrophage effector function through the inhibition of nuclear factor-kappa. *B. J Immunol*.1997; 159: 5661-5670
170. Van der Vaart H, Postma D S, Timens W, et al. Acute effects of cigarette smoking on inflammation in healthy intermittent smokers. *Respir Res* 2005; 16: 22.
171. Vassilakis DA, Sourvinos G, Markatos M, Psathakis K, Spandidos DA, Siafakas NM et al. Microsatellite DNA instability and loss of heterozygosity in pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:1729-1733.
172. Verleden GM, du Bois RM, Bouros D, Drent M, Millar A, Muller-Quernheim J et al. Genetic predisposition and pathogenic mechanisms of interstitial lung diseases of unknown origin. *Eur Respir J* 2001; 32:17s-29s.
173. Vineis P, Airoidi L, Veglian P et al. Environmental tobacco smoke and risk of respiratory cancer and chronic obstructive pulmonary disease in former smokers and never smokers in the EPIC prospective study. *BMJ* 2005 Feb 5; 330(7486):277.
174. Wajant H, K Pfizenmaier and P Scheurich. Tumor Necrosis Factor signaling. *Cell death and differentiation* (2003)10, 45-65.

175. Wang SC, Hung MC. Nuclear translocation of the epidermal growth factor receptor family membrane tyrosine kinase receptors. *Clin Cancer Res.* 2009 Nov 1; 15(21):6484-9. Epub 2009 Oct 27. Review
176. Watt A P, Schock B C, Ennis M. Neutrophils and eosinophils: clinical implications of their appearance, presence and disappearance in asthma and COPD. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005; 4: 415–423.
177. Whitrow MJ, Smith BJ, Pilotto LS, Pisaniello D, Nitschke M. Environmental exposure to carcinogens causing lung cancer; epidemiological evidence from the medical literature. *Respirology.* 2003;8(4)515-521.
178. Willemse B W, ten Hacken N H, Rutgers B, et al. Effect of 1-year smoking cessation on airway inflammation in COPD and asymptomatic smokers. *Eur Respir J* 2005; 26: 835–845.
179. Yanbaeva D G, Dentener M A, Creutzberg E C, et al. Systemic effects of smoking. *Chest* 2007; 131: 1557–1566.
180. Yanbaeva D G, Dentner M A, Creutzberg E C, et al. Systemic inflammation in COPD: is genetic susceptibility a key factor? *COPD* 2006; 3: 51–61.
181. Yano T, Sugio K, Yamazaki K, Kase S, Yamaguchi M, Ondo K and Sugimachi K. Direct IFNfluence of interferon-gamma on proliferation and cell-surface antigen expression of non-small cell lung cancer cells. *Lung Cancer* 2000, Dec; 30 (3):169-74.
182. Yasuhara T, Tada R, Nakano Y. The presence of *Propionibacterium* ssp. in the vitreous fluid of uveitis patients with sarcoidosis. *Acta Ophthalmol Scand* 2005; 83:364-369.
183. Zhang Q, Tang X, Zhang ZF, Velikina R, Shi S, Le AD. Nicotine induces hypoxia-inducible factor-1alpha expression in human lung cancer cells via nicotinic acetylcholine receptor-mediated signaling pathways. *Clin Cancer Res.* 2007 Aug 15; 13 (16):4686-94.
184. Zhang X, Burt HM, Von Hoff D, Dexter D, Mangold G, Degen D, Oktaba AM, Hunter WL. An investigation of the antitumour activity and biodistribution of polymeric micellar paclitaxel. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1997; 40(1): 81-6.

-
185. Zhao Y.X., Wang L., Liu D., Yu R.J., 2006. Retinoid acid inhibits tumor necrosis factor- alpha induced injury in human lung epithelial cells. *Zhonghua Yi xue Za Zhi*. 2006 Dec 19; 86 (47): 3358-61.
186. Ziegenhagen MW, Müller-Quernheim J. The cytokine network in sarcoidosis and its clinical relevance. *J Intern Med*. 2003 Jan; 253(1):18-30. Review.

