



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ ΚΑΝΑΒΑΚΗΣ

«ΜΕΛΕΤΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΙΝΤΕΡΛΕΥΚΙΝΩΝ (IL) 12 ΚΑΙ 18 ΤΟΥ
ΓΟΝΙΔΙΟΥ BTNL2 ΣΕ ΕΛΛΗΝΕΣ ΠΑΣΧΟΝΤΕΣ ΑΠΟ ΣΑΡΚΟΕΙΔΩΣΗ»

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΔΕΛΑΒΕΡΗ

ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2014

Ημερομηνία αίτησης για εκπόνηση διδακτορικής διατριβής: 15/05/2006

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής: 06/10/2006

Μέλη τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής:

- Εμμανουήλ Καναβάκης, Καθηγητής Γενετικής, (επιβλέπων)
- Μαρία Τζέτη, Επίκουρη Καθηγήτρια Γενετικής
- Χαράλαμπος Ρούσος, Ομότιμος Καθηγητής

Καθορισμός θέματος διδακτορικής διατριβής: 12/01/2007

Ημερομηνία κατάθεσης διατριβής: 07-06-2013

Ημερομηνία ορισμού επταμελούς επιτροπής: 10/07/2013

Μέλη επταμελούς εξεταστικής επιτροπής:

- Εμμανουήλ Καναβάκης, Καθηγητής Γενετικής
- Μαρία Τζέτη, Επίκουρη Καθηγήτρια Γενετικής
- Χαράλαμπος Ρούσος, Ομότιμος Καθηγητής
- Νικόλαος Κουλούρης, Καθηγητής Πνευμονολογίας
- Πέτρος Μπακάκος, Επίκουρος Καθηγητής Πνευμονολογίας
- Ιωάννα -Ραχήλ Συνοδινού, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενετικής
- Κωνσταντίνος Πρίφτης, Επίκουρος καθηγητής Παιδιατρικής Πνευμονολογίας

Πίνακας περιεχομένων

Ιπποκρατικός όρκος.....	3
Βιογραφικό Σημείωμα	5
Πρόλογος.....	7
Γενικό μέρος	9
Περιγραφή της σαρκοείδωσης.....	9
Επιδημιολογικά δεδομένα	9
Αιτιολογία και Παθογένεση.....	11
Το σαρκοειδικό κοκκίωμα	13
Ανοσολογικό παράδοξο.....	17
Κλινικά χαρακτηριστικά.....	17
Προσβολή οργάνων	19
Προσβολή του αναπνευστικού συστήματος	19
Πνευμονική προσβολή	19
Ακτινολογικά ευρήματα	19
Ακτινογραφία θώρακος.....	19
Αξονική τομογραφία θώρακος.....	20
Προσβολή του υπεζωκότα	24
Προσβολή αεραγωγών.....	25
Λειτουργικός έλεγχος της αναπνοής.....	26
Προσβολή λεμφικού συστήματος	27
Προσβολή του δέρματος	27
Προσβολή ήπατος και γαστρεντερικού συστήματος	29
Προσβολή των οφθαλμών	31
Προσβολή της καρδιάς	34
Προσβολή του νευρικού συστήματος	35
Προσβολή των νεφρών.....	37
Προσβολή του μυοσκελετικού συστήματος.....	38
Προσβολή των παρωτίδων	41
Ενδοκρινολογικές εκδηλώσεις.....	41
Προσβολή του αναπαραγωγικού συστήματος.....	42
Σαρκοείδωση και εγκυμοσύνη	42
Σαρκοείδωση στα παιδιά.....	42
Σαρκοείδωση και τρίτη ηλικία	44
Σαρκοείδωση και σπάνιες περιπτώσεις	44
Διάγνωση	45
Βιοψία.....	45
Βρογχοκυψελιδική έκπλυση (BAL).....	48
Ακτινολογικός έλεγχος.....	49
Kveim-Siltzbach τεστ	51
Εργαστηριακά ευρήματα	51
Πρόγνωση	52

Θεραπεία	53
Κορτικοειδή.....	54
Εναλλακτικές θεραπείες	55
Χλωροκίνη και Υδροξυχλωροκίνη	55
Μεθοτρεξάτη	55
Αζαθειοπρίνη	56
Μουκοφενολάτη Μοφετίλ.....	56
Κυκλοφωσφαμίδη	56
Κυκλοσπρίνη	57
Ανταγωνιστές του παράγοντα TNF-α	57
Άλλοι ανταγωνιστές του TNF-α	58
Μεταμόσχευση	58
Ανοσολογικός μηχανισμός της σαρκοείδωσης	59
Σκοπός της μελέτης.....	65
Υλικό και Μέθοδοι.....	65
Ασθενείς και ομάδα ελέγχου	65
Πειραματική μεθοδολογία	67
Απομόνωση DNA	67
Ανίχνευση μεταλλάξεων του γονιδίου BTNL2	68
Μέθοδος Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης	68
Αρχή της μεθόδου	68
Αντιδραστήρια και διαδικασία της αντίδρασης.....	69
Καθαρισμός των προϊόντων της PCR	72
Ανάλυση της πρωτοταγούς δομής του DNA	74
Αρχή της μεθόδου	74
Αντιδραστήρια και διαδικασία της αντίδρασης.....	75
Ανίχνευση πολυμορφισμών IL-18 και IL-12B p40.....	76
Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR-SSPs).....	77
Στατιστική ανάλυση.....	79
Αποτελέσματα	80
Γονίδιο BTNL2	80
Ανάλυση νέων μεταλλάξεων γονιδίου BTNL2	80
Ανάλυση μεταλλάξεων του γονιδίου BTNL2	81
Ανάλυση της μετάλλαξης rs2076530.....	84
Ανάλυση πολυμορφισμών εξονίων και ιντρονίων του γονιδίου BTNL2	85
Μελέτη κλινικών στοιχείων και συσχέτιση μεταλλάξεων του γονιδίου BTNL2	87
Γονίδιο IL-12Br40	91
Γονίδιο IL-18.....	92
Συζήτηση και συμπεράσματα	94
Περίληψη.....	100
Summary	101
Βιβλιογραφία	102

Ιπποκρατικός όρκος

“Ομνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἀσκληπιὸν, καὶ Ὑγείαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἵστορας ποιεύμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν ὅρκον τόνδε καὶ συγγραφὴν τήνδε.

Ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρῶν χρρίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ αὐτοῦ ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καὶ διδάξῃν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρρίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ συγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσί τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμῆ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοις τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἰητρικῷ, ἄλλῳ δὲ οὐδενί.

Διαιτήμασί τε χρῆσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἴρξῃν.

Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑψηγήσομαι συμβουλίην τοίνδε. Ὅμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω.

Ἀγνῶς δὲ καὶ ὁσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμήν.

Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε.

Ἐς οἰκίας δὲ ὀκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίας, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμάτων καὶ ἀνδρῶν, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων.

Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἦ ἴδω, ἦ ἀκούσω, ἦ καὶ ἄνευ θεραπήης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρρητα ἡγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα.

Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι, καὶ μὴ συγχέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιорκοῦντι, τάναντία τουτέων.

Ιπποκρατικός όρκος

Ορκίζομαι στο θεό Απόλλωνα τον ιατρό και στο θεό Ασκληπιό και στην Υγεία και στην Πανάκεια και επικαλούμενος τη μαρτυρία όλων των θεών ότι θα εκτελέσω κατά τη δύναμη και την κρίση μου τον όρκο αυτόν και τη συμφωνία αυτή.

Να θεωρώ τον διδάσκαλό μου της ιατρικής τέχνης ίσο με τους γονείς μου και την κοινωνό του βίου μου. Και όταν χρειάζεται χρήματα να μοιράζομαι μαζί του τα δικά μου. Να θεωρώ την οικογένειά του αδέρφια μου και να τους διδάσκω αυτήν την τέχνη αν θέλουν να την μάθουν χωρίς δίδακτρα ή άλλη συμφωνία.

Να μεταδίδω τους κανόνες ηθικής, την προφορική διδασκαλία και όλες τις άλλες ιατρικές γνώσεις στους γιους μου, στους γιους του δασκάλου μου και στους εγγεγραμμένους μαθητές που πήραν τον ιατρικό όρκο, αλλά σε κανέναν άλλο.

Θα χρησιμοποιώ τη θεραπεία για να βοηθήσω τους ασθενείς κατά τη δύναμη και την κρίση μου, αλλά ποτέ για να βλάψω ή να αδικήσω.

Ούτε θα δίνω θανατηφόρο φάρμακο σε κάποιον που θα μου το ζητήσει, ούτε θα του κάνω μια τέτοια υπόδειξη. Παρομοίως, δεν θα εμπιστευτώ σε έγκυο μέσο που προκαλεί έκτρωση.

Θα διατηρώ αγνή και άσπιλη και τη ζωή και την τέχνη μου.

Δεν θα χρησιμοποιώ νυστέρι ούτε σε αυτούς που πάσχουν από λιθίαση, αλλά θα παραχωρώ την εργασία αυτή στους ειδικούς της τέχνης.

Σε όσα σπίτια πηγαίνω, θα μπαίνω για να βοηθήσω τους ασθενείς και θα απέχω από οποιαδήποτε εσκεμμένη βλάβη και φθορά, και ιδίως από γενετήσιες πράξεις με άνδρες και γυναίκες, ελεύθερους και δούλους.

Και όσα τυχόν βλέπω ή ακούω κατά τη διάρκεια της θεραπείας ή και πέρα από τις επαγγελματικές μου ασχολίες στην καθημερινή μου ζωή, αυτά που δεν πρέπει να μαθευτούν παραέξω δεν θα τα κοινοποιώ, θεωρώντας τα θέματα αυτά μυστικά.

Αν τηρώ τον όρκο αυτό και δεν τον παραβώ, ας χαίρω πάντοτε υπολήψεως ανάμεσα στους ανθρώπους για τη ζωή και για την τέχνη μου. Αν όμως τον παραβώ και επιορκήσω, ας πάθω τα αντίθετα.

Βιογραφικό Σημείωμα

A. ΑΤΟΜΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Επώνυμο : Δελαβέρη
Όνομα : Αικατερίνη
Δ/ση Ιατρείου : Χρ. Σμύρνης 62 Μοσχάτο ΤΚ 18344
Τηλ.- Fax (Ιατρείου) : 210 – 9480121
Ημ. Γέννησης : 20-02-1972
Υπηκοότητα : Ελληνική
Κιν. Τηλ. : 6977 373329
e-mail : delaverik@yahoo.gr

B. ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

2007 - Σήμερα Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής Πανεπιστημίου Αθηνών, Νοσοκομείο Παίδων «Η Αγία Σοφία» με θέμα «Μελέτη πολυμορφισμών Ιντερλευκινών (IL) 12 και 18 και του γονιδίου BTNL2 σε Έλληνες πάσχοντες από σαρκοείδωση»

2002 - 2008 Εκπαίδευση στην Ιατρική ειδικότητα «Πνευμονολογίας-Φυματιολογίας» στο Νοσοκομείο ΝΝΘΑ «Η Σωτηρία»

2000 - 2001 Τρίμηνη εκπαίδευση στο Γ.Ν.Ν.Λιβαδείας στα τμήματα καρδιολογίας, παθολογίας και χειρουργικής και στην συνέχεια ως ιατρός υπόχρεος υπηρεσίας υπαίθρου στο περιφερειακό ιατρείο Κορώνειας του Νομού Βοιωτίας

1995 - 1999 Απόφοιτη Ιατρικής Σχολής Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών με βαθμό «Λίαν Καλώς» (7,81/10)

1995 Κατατακτήριες Εξετάσεις μαθημάτων 1^{ου} έτους Ιατρικής Σχολής

1990 - 1994 Απόφοιτη Μαιευτικής Σχολής Αθηνών με βαθμό πτυχίου 7,9/10 (υποτροφία Γ,Δ,Ε εξαμήνων με μέσο όρο 8,52)

Γ. ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

Αγγλικά (Πτυχίο First Certificate in English)
Ιταλικά (Πτυχίο Soglia)

Δ. ΓΕΝΙΚΕΣ - ΕΙΔΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΤΗΝ ΣΥΓΓΡΑΦΗ ΘΕΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΕΜΙΝΑΡΙΩΝ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΒΡΟΓΧΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΙΑΣ

19^ο Μεταπτυχιακό Σεμινάριο της Ελληνικής Βρογχολογικής Εταιρίας με θέμα «Υπνηλία» [Μάιος 2003]

19^ο Μεταπτυχιακό Σεμινάριο της Ελληνικής Βρογχολογικής Εταιρίας με θέμα «Κυστική Ίνωση» [Μάιος 2003]

20^ο Μεταπτυχιακό Σεμινάριο της Ελληνικής Βρογχολογικής Εταιρίας με θέμα «Τι Νεώτερο στη διάγνωση των Ιδιοπαθών Διαμέσων Πνευμονιών» [Μάρτιος 2004]

20^ο Μεταπτυχιακό Σεμινάριο της Ελληνικής Βρογχολογικής Εταιρίας με θέμα «Διάγνωση Επαγγελματικών Διαμέσων Πνευμονοπαθειών» [Μάρτιος 2004]

21^ο Μεταπτυχιακό Σεμινάριο της Ελληνικής Βρογχολογικής Εταιρίας με θέμα «Στεροειδή per os στις Διάχυτες Πνευμονοπάθειες» [Φεβρουάριος 2005]

22^ο Μεταπτυχιακό Σεμινάριο της Ελληνικής Βρογχολογικής Εταιρίας με θέμα «Νεώτερο στη διάγνωση των Ιδιοπαθών Διαμέσων Πνευμονιών» [Μάρτιος 2006]
22^ο Μεταπτυχιακό Σεμινάριο της Ελληνικής Βρογχολογικής Εταιρίας με θέμα «Διάγνωση: Σαρκοείδωση» [Μάρτιος 2006]

ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΘΕΜΑΤΩΝ ΣΤΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΑ ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΒΡΟΓΧΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΙΑΣ

19^ο Μεταπτυχιακό Σεμινάριο της Ελληνικής Βρογχολογικής Εταιρίας με θέμα «Υπνηλία» [Μάιος 2003]
19^ο Μεταπτυχιακό Σεμινάριο της Ελληνικής Βρογχολογικής Εταιρίας με θέμα «Κυστική Ίνωση» [Μάιος 2003]
20^ο Μεταπτυχιακό Σεμινάριο της Ελληνικής Βρογχολογικής Εταιρίας με θέμα «Διάγνωση Επαγγελματικών Διαμέσων Πνευμονοπαθειών» [Μάρτιος 2004]
22^ο Μεταπτυχιακό Σεμινάριο της Ελληνικής Βρογχολογικής Εταιρίας με θέμα «Νεώτερο στη διάγνωση των Ιδιοπαθών Διαμέσων Πνευμονιών» [Μάρτιος 2006]

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΩΝ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

Long term Roxithromycin effect on patients with bronchiectasis. 8TH STATE-OF-THE-ART (3^ο Βραβείο) [Μάιος 2004]

Laboratory and clinical effect of long-term Roxithromycin treatment in adult patients with Cystic Fibrosis. 8TH STATE-OF-THE-ART [Μάιος 2004]

Effectiveness of macrolides in patients with Cystic Fibrosis in related to transformation of mucoid *Pseudomonas Aeruginosa* to the less virulent non-mucoid phenotype. 9TH STATE-OF-THE-ART [Απρίλιος 2005]

V. Dionysopoulou, E. Stefanou, , G. Perpati , E. Armeniakou, E. Karianou, K, Delaverik, A. Georgiadi , E. Pouliou. The effect of a multimodality on respiratory muscles and clinical indices in adult patients with Cystic Fibrosis. 28th European Cystic Fibrosis Conference [Ιούνιος 2005]

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

V. Dionysopoulou, E. Stefanou, , G. Perpati , E. Armeniakou, E. Karianou, K Delaveri, A. Georgiadi , E. Pouliou. The effect of a multimodality on respiratory muscles and clinical indices in adult patients with Cystic Fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis* 4 (2005) S70.

Delaveri A, Tzetis M, Rapti A, Makrythanasis P, Latsi P, Roussos C, Kanavakis E. *BTNL2* gene SNPs as a contributing factor to sarcoidosis pathogenesis in a cohort of Greek patients. *Meta Gene* 2 (2014) 619-630.

Πρόλογος

Η γενετική μελέτη της κάθε νόσου αποτελεί πρόκληση για την επιστημονική κοινότητα και θεωρείται απαραίτητη για την κατανόηση των μηχανισμών παθογένεσης της κάθε μίας νόσου ξεχωριστά. Σημαντικές είναι οι γενετικές μελέτες που έχουν γίνει στον τομέα της Πνευμονολογίας όσον αφορά την συσχέτιση γονιδίων με την εκδήλωση νοσημάτων που προσβάλλουν τον πνεύμονα.

Στη παρούσα μελέτη διερευνήθηκε το γενετικό υπόβαθρο της σαρκοείδωσης με σκοπό την κατανόηση των μηχανισμών παθογένεσης της νόσου και την φυσική της πορεία στον Ελληνικό πληθυσμό.

Η σαρκοείδωση είναι μία πολυσυστηματική κοκκιωματώδης νόσος αγνώστου αιτιολογίας που προσβάλλει κυρίως άτομα ηλικίας 20 έως 40 ετών. Χαρακτηρίζεται από την ενεργοποίηση των Th1 λεμφοκυττάρων με αποτέλεσμα την παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών και άλλων συνενεργοποιητών με αποτέλεσμα τον σχηματισμό μη τυροειδοποιημένου κοκκιώματος στους προσβεβλημένους ιστούς.

Συχνότερα προσβάλλεται ο πνεύμονας και το λεμφικό σύστημα και παρουσιάζει αυτόματα ύφεση τα δύο πρώτα έτη σε ποσοστό που διαφέρει ανάλογα με το ακτινολογικό στάδιο της νόσου. Έχει παρατηρηθεί εποχική κατανομή της νόσου με αυξημένη επίπτωση τους μήνες Μάρτιο με Μάιο στην Ελλάδα, αυξημένη συχνότητα εκδήλωσης σε ορισμένες ομάδες εργαζομένων όπως πυροσβέστες και επαγγελματίες υγείας, ενώ εκδηλώνεται σε μικρότερο ποσοστό σε καπνιστές οδηγώντας στην υπόθεση ότι ίσως το κάπνισμα να αποτελεί προστατευτικό παράγοντα.

Η εκπόνηση της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Αθηνών στο Χωρέμιο Ερευνητικό Εργαστήριο του Νοσοκομείου Παίδων «Αγία Σοφία».

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον επιβλέπων αυτής της διδακτορικής διατριβής Καθηγητή Γενετικής κ. Εμμανουήλ Καναβάκη που με εμπιστεύτηκε και μου έδωσε την ευκαιρία να πραγματοποιήσω αυτή την μελέτη καθώς και για την υποστήριξή του κατά την διάρκεια αυτής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια Κα Μαρία Τζέτη για την καθοδήγηση, την υπομονή της και τις πολύτιμες συμβουλές της κατά την διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής. Πάντα με στήριζε, με ενθάρρυνε και με συμβούλευε σε όποια δυσκολία και αν συναντούσα κατά το πειραματικό σκέλος της μελέτης αλλά και στην ανάλυση των αποτελεσμάτων αυτής.

Σημαντική ήταν και η συμβολή όλων των μελών του εργαστηρίου στην ολοκλήρωση αυτής της διατριβής και θα ήθελα να τους ευχαριστήσω θερμά.

Με καθοδηγούσαν και με συμβούλευαν κατά την διάρκεια των πειραμάτων και με βοηθούσαν να ξεπερνάω κάθε δυσκολία που συναντούσα κατά την εκτέλεση αυτών. Με βοήθησαν να κατανοήσω τις μοριακές τεχνικές οι οποίες αποτελούσαν ένα νέο γνωστικό αντικείμενο για εμένα και ήταν πάντα πρόθυμοι να μου εξηγήσουν κάθε λεπτομέρεια.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τον Καθηγητή κ. Χαράλαμπο Ρούσσο για την ευκαιρία που μου έδωσε να ξεκινήσω αυτήν την διδακτορική διατριβή από το Νοσοκομείο «Η Σωτηρία» όπου ειδικεύτηκα ως Πνευμονολόγος-φυματιολόγος και όπου έγινε η συλλογή των δειγμάτων αίματος από τους ασθενείς με σαρκοείδωση μετά από συγκατάθεσή τους.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θέλω να εκφράσω στις ιατρούς Δρ Αγγελική Ράπτη και στη εκλιπούσα Δρ Παναγιώτα Λάτση Λέκτορα Πνευμονολογίας που συνεισέφεραν στην συλλογή των δειγμάτων που μελετήθηκαν. Η Δρ Παναγιώτα Λάτση η οποία έχασε την μάχη με τη επάρατη νόσο κατά την διάρκεια εκπόνησης αυτής της διατριβής ήταν η εμπνευστής αυτής της μελέτης. Αποτέλεσε για όλη την ερευνητική ομάδα παράδειγμα με την δύναμη, την υπομονή και την αφοσίωση που έδειχνε στους ασθενείς της παρά τις δύσκολες στιγμές που περνούσε η ίδια. Ήταν ένας άνθρωπος δυναμικός, αφοσιωμένη στην επιστήμη αλλά και στον ασθενή προσφέροντας απλόχερα την βοήθειά της σε όποιον της το ζητούσε.

Με το ερευνητικό της έργο συνεισέφερε στην κατανόηση σπάνιων παθήσεων του αναπνευστικού. Προσωπικά η Δρ Λάτση με δίδαξε και με καθοδήγησε μέχρι την τελευταία στιγμή στην κατανόηση των διάχυτων διάμεσων πνευμονοπαθειών και συνέβαλλε τα μέγιστα, με τις συμβουλές της, στην πορεία μου ως Πνευμονολόγος και για αυτό της αφιερώνω αυτήν την διατριβή.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και ιδιαίτερα το σύζυγο μου και τα δύο μου παιδιά για την υπομονή που έδειξαν για τον χρόνο που χρειάστηκε να αφιερώσω στην εκτέλεση και συγγραφή αυτής της διδακτορικής διατριβής.

Γενικό μέρος

Περιγραφή της σαρκοείδωσης

Η σαρκοείδωση είναι μία πολυσυστηματική κοκκιωματώδης νόσος αγνώστου αιτιολογίας που προσβάλλει κυρίως τους πνεύμονες και το λεμφικό σύστημα του οργανισμού. Προσβάλλει νεαρής και μέσης ηλικίας ενήλικες και παρουσιάζεται συχνότερα με αμφοτερόπλευρη πυλαία λεμφαδενοπάθεια, πνευμονική διήθηση, οφθαλμικές και δερματικές βλάβες. Το ήπαρ, ο σπλήνας, οι λεμφαδένες, οι σιελογόνοι αδένες, η καρδιά, το νευρικό σύστημα, οι μύες, τα οστά και άλλα όργανα μπορούν να προσβληθούν.

Η διάγνωση βασίζεται στα κλινικοακτινολογικά ευρήματα και στην ιστολογική επιβεβαίωση με την ανεύρεση του μη τυροειδοποιημένου επιθηλιοειδούς κοκκιώματος, καθώς και στον αποκλεισμό άλλων κοκκιωματωδών νοσημάτων.

Η σαρκοείδωση περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1877 από έναν Άγγλο ιατρό τον Jonthon Hutchinson και συνεχίζει από τότε να συναρπάζει τους κλινικούς ιατρούς αλλά και την ιατρική επιστημονική κοινότητα. Έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στην κατανόηση των κλινικών και μοναδικών ανοσολογικών και παθολογικών χαρακτηριστικών της νόσου. Συχνά παρατηρούμενα ανοσολογικά ευρήματα είναι η καταστολή της δερματικής επιβραδυνόμενης αντίδρασης υπερευαισθησίας και η αύξηση της ανοσολογικής αντίδρασης των βοηθητικών Τ κυττάρων τύπου 1 (Th1). Κυκλοφορούντα ανοσοσυμπλέγματα σε συνδυασμό με σημεία υπεραντιδραστικότητας των Β-λεμφοκυττάρων μπορούν επίσης να παρατηρηθούν. Λίγα γνωρίζουμε για την επιδημιολογία και τους γενετικούς παράγοντες που συμβάλλουν στην ανάπτυξη και την εμφάνιση της νόσου.

Η πορεία και η πρόγνωση της νόσου σχετίζεται με την έναρξη και την εξέλιξή της. Οξεία έναρξη με οζώδες ερύθημα ή ασυμπτωματική αμφοτερόπλευρη πυλαία λεμφαδενοπάθεια συνήθως προδιαγράφουν αυτοπεριοριζόμενη πορεία της νόσου, ενώ αντίθετα σταδιακή έναρξη με πολλαπλές εξωπνευμονικές εκδηλώσεις μπορεί να ακολουθηθεί από σταδιακή ίνωση των πνευμόνων και προσβολή και άλλων οργάνων.

Η κατάλληλη θεραπεία για την σαρκοείδωση δεν έχει πλήρως καθοριστεί για όλους τους ασθενείς. Αν και τα κορτικοειδή παραμένουν η κύρια θεραπεία, υπάρχουν ελάχιστα στοιχεία για τον κατάλληλο χρόνο έναρξης, τη δοσολογία και την διάρκεια της θεραπείας.^{1,2}

Επιδημιολογικά δεδομένα

Η σαρκοείδωση προσβάλλει άνδρες και γυναίκες όλων των φυλών και όλων των ηλικιών. Συνήθως προσβάλλει νεαρούς ενήλικες έως 40 ετών και συχνότερα εμφανίζεται στις ηλικίες μεταξύ 20 και 29 ετών. Εκδηλώνεται συχνότερα στις γυναίκες από ότι στους άνδρες.

Η γενική επίπτωση στις γυναίκες είναι 19/100.000 και στους άνδρες είναι 16,5/100.000 που συνεπάγεται πιθανότητα εκδήλωσης της νόσου στο σύνολο της ζωής 1,3% για τις γυναίκες και 1% για τους άνδρες. Στις σκανδιναβικές χώρες, Γερμανία και Ιαπωνία παρατηρείται μια δεύτερη αύξηση της επίπτωσης της νόσου σε γυναίκες ηλικίας άνω των 50 ετών. Η σαρκοείδωση σπάνια εμφανίζεται σε παιδιά, όπου έχει καλύτερη πρόγνωση, σε εγκυμονούσες, όπου η νόσο επιδεινώνεται το 6^ο μήνα της κύησης και σε ηλικιωμένους.²

Η φυλή διαδραματίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην εκδήλωση της νόσου καθώς η επίπτωσή της είναι 3 φορές μεγαλύτερη στους Αμερικανούς Αφρικανικής καταγωγής (2,4%) σε σχέση με τους Καυκάσιους (0,8%). Η σαρκοείδωση εμφανίζεται συχνότερα στην Κεντρική Ευρώπη, την Αμερική και την Ιαπωνία και σπανιότερα στη Κεντρική και Βόρεια Αμερική, Ασία και Αφρική.

Η κλινική εκδήλωση και η σοβαρότητα της νόσου εξαρτάται από επιδημιολογικούς παράγοντες. Το οζώδες ερύθημα το οποίο σχετίζεται με οξεία νόσο και καλή πρόγνωση, εμφανίζεται σε ποσοστό 3-44% και παρατηρείται συχνότερα στις γυναίκες από ότι στους άνδρες, στην Καυκάσια φυλή από ότι στην Μαύρη φυλή ή τους Κινέζους και στις Νότιες από ότι στις Βόρειες Ευρωπαϊκές χώρες. Σε αντίθεση οι δερματικές μορφές της σαρκοείδωσης σχετίζονται με χρόνια νόσο και εμφανίζονται συχνότερα στους Αφρο-Αμερικανούς από ότι στους Καυκάσιους.

Στους ασθενείς Μαύρης φυλής η εξέλιξη της νόσου είναι σοβαρότερη και προσβάλλει πολλαπλά συστήματα οφθαλμούς, δέρμα, ήπαρ και λεμφικό σύστημα. Στην Ιαπωνία η κύρια αιτία θανάτου στους ασθενείς με σαρκοείδωση είναι η προσβολή του μυοκαρδίου, ενώ η αναπνευστική ανεπάρκεια είναι η κύρια αιτία θανάτου οπουδήποτε αλλού. Ενδιαφέροντα είναι τα αποτελέσματα από μία επιδημιολογική μελέτη που έγινε στην Σιγκαπούρη, της οποίας ο πληθυσμός απαρτίζεται από διαφορετικές ασιατικές φυλές όπως Κινέζους, Ασιάτες-Ινδιάνους και Ασιάτες Ευρωπαϊκής καταγωγής. Η γενική επίπτωση της σαρκοείδωσης στην Σιγκαπούρη είναι χαμηλή 0,56/100,000 σε σχέση με την Μαύρη φυλή που η επίπτωση είναι 35,5/100,000 και τη Λευκή φυλή που είναι 10,9/100,000.

Επίσης η ηλικία διάγνωσης της σαρκοείδωσης στους Ασιάτες διαφέρει από τους μη Ασιάτες και κυμαίνεται μεταξύ 35-45 ετών, ενώ πάνω από το ένα τρίτο των περιπτώσεων εντοπίζονται μετά την ηλικία των 50. Στην ίδια μελέτη διαπιστώθηκε ότι η εμφάνιση και η βαρύτητα της νόσου είναι μεγαλύτερη στους Ινδιάνους από ότι στους Κινέζους στους οποίους έχει καλοήγη πορεία. Ωστόσο δεν διαπιστώθηκε καμία διαφορά μεταξύ των διαφορετικών εθνοτήτων όσον αφορά το ακτινολογικό στάδιο, την αρχική αντιμετώπιση ή την εξωθωρακική εντόπιση.

Τέλος το 75% των ασθενών που παρουσίαζαν ακτινολογική επιδείνωση ήταν Ινδιάνοι. Η σαρκοείδωση γενικά απαντάται σποραδικά αλλά και σε ποσοστό 1,7-17% των περιπτώσεων έχει οικογενή εμφάνιση και η συχνότητα επίπτωσής της είναι μεγαλύτερη μεταξύ των ομοζυγωτών διδύμων και μεταξύ των γονιών και των παιδιών.

Ενδιαφέρον έχει η μελέτη των Marc A. Judson et al.³⁰ όπου εξέτασε τη συσχέτιση των φαινοτύπων της σαρκοείδωσης ανάμεσα σε δίδυμα Αφρο-Αμερικανικής καταγωγής. Όπως διαπιστώθηκε η φαινοτυπική έκφραση της σαρκοείδωσης στα ζευγάρια διδύμων έχει μικρή συσχέτιση με την προσβολή των οργάνων, τη σοβαρότητα της πνευμονικής προσβολής ή την κλινική πορεία της νόσου, με εξαίρεση την οφθαλμική και ηπατική προσβολή η οποία παρατηρήθηκε σε αυξημένη συχνότητα στο δεύτερο

μέλος από το ζευγάρι των διδύμων, αν έχει προσβληθεί το πρώτο από τα μέλη των διδύμων.

Σε ότι αφορά την κατανομή της νόσου ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι έχει περιγραφεί σε αρκετές περιπτώσεις συγκέντρωση κρουσμάτων σαρκοείδωσης σε κάποια περιοχή με χαρακτηριστικά επιδημίας αλλά και διαφορετική συχνότητα σε ότι αφορά την διάγνωση των κρουσμάτων της νόσου στις διάφορες εποχές του χρόνου. Περιοχές με γεωγραφική έξαρση είναι το νησί Μαν στο Ηνωμένο Βασίλειο, η βόρεια Σουηδία και η κεντρική Ιαπωνία. Εποχική κατανομή παρατηρείται στην Ελλάδα (70% των περιπτώσεων μεταξύ Μαρτίου και Μαΐου), στην Ισπανία (50% των διαγνώσεων μεταξύ Απριλίου και Ιουνίου) και στην Ιαπωνία (διαγιγνώσκεται κυρίως στο διάστημα μεταξύ Ιουνίου και Ιουλίου).

Επίσης στην Αμερική και στο Ηνωμένο Βασίλειο έχει καταγραφεί αυξημένο ποσοστό περιπτώσεων σε ορισμένες ομάδες εργαζομένων, όπως επαγγελματίες υγείας, ιατρικό και παραϊατρικό προσωπικό, πυροσβέστες και υπηρετούντες σε αεροπλανοφόρα. Τέλος η σαρκοείδωση εμφανίζεται συχνότερα σε μη καπνιστές από ότι σε καπνιστές.^{2,3,4,5,6,30}

Αιτιολογία και Παθογένεση

Υπάρχουν διάφορες θεωρίες ως προς τα αίτια που προκαλούν την εμφάνιση της σαρκοείδωσης. Αν και τα αίτια της νόσου παραμένουν άγνωστα, η υπόθεση ότι η σαρκοείδωση είναι αποτέλεσμα έκθεσης ενός γενετικά ευάλωτου οργανισμού σε ειδικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες, υποστηρίζεται από τα αποτελέσματα των επιδημιολογικών μελετών, από την φλεγμονώδη απάντηση του οργανισμού με σημαντική αύξηση των ενεργοποιημένων μακροφάγων και T- λεμφοκυττάρων και παραγωγή κυτοκινών λόγω ενεργοποίησης, από κάποιο αντιγόνο, των T1 κυττάρων και τέλος από τις αλλαγές που ανιχνεύθηκαν, σε διάφορες μελέτες, στους υποδοχείς των T κυττάρων σε ασθενείς με σαρκοείδωση.¹

Τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδο στην διερεύνηση των πιθανών αιτιών της σαρκοείδωσης. Στη μελέτη ACCESS συμμετείχαν 706 ασθενείς που είχαν διαγνωσθεί πρόσφατα με βιοψία καθώς και μάρτυρες οι οποίοι επιλεγήκαν με βάση την ηλικία, το φύλο, τη φυλή και την γεωγραφική περιοχή. Διαπιστώθηκαν αρκετοί περιβαλλοντικοί παράγοντες που σχετίζονται με τον κίνδυνο εμφάνισης της σαρκοείδωσης όπως είναι η αγροτική απασχόληση, η μούχλα, οι ερεθιστικές οσμές και τα εντομοκτόνα.

Το κάπνισμα δεν σχετίζονταν με την εκδήλωση της σαρκοείδωσης επιβεβαιώνοντας προηγούμενες μελέτες στις οποίες φαινόταν το κάπνισμα να έχει προστατευτικό ρόλο έναντι της σαρκοείδωσης. Επίσης με μειωμένο κίνδυνο για εμφάνιση της σαρκοείδωσης σχετίζονταν και η έκθεση σε διάφορα αλλεργιογόνα όπως είναι η οικιακή σκόνη, τα φτερά ή τα πουπουλένια μαξιλάρια.^{7,8}

Η εποχιακή αύξηση των κρουσμάτων της σαρκοείδωσης κυρίως την άνοιξη, η αυξημένη συχνότητα σε ορισμένες περιοχές, όπως το νησί Μαν, και σε ορισμένες κατηγορίες εργαζομένων, όπως επαγγελματίες υγείας, οδηγούν στην υπόθεση ότι η αιτία της νόσου είναι μικροβιακή.

Επιπλέον η σαρκοείδωση προσβάλλει και τα μεταμοσχευθέντα όργανα καρδιά ή μυελό των οστών, όταν αυτά προέρχονται από δότες που πάσχουν από σαρκοείδωση.⁶

Αρκετοί μικροοργανισμοί έχουν ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση σαρκοείδωσης όπως ιοί (Ερπητοϊός, ιός Epstein-barr, Ρετροϊοί, Μεγαλοκυτταροϊός, ιός Coxsackie-B), τα βακτήρια (*Borrelia burgdoferi*, *Propionibacterium acnes*, *Mycoplasma*, *Chlamydia*, *Nocardia*), Μυκοβακτηρίδια (*Mycobacteria tuberculosis*, *Mycobacteria paratuberculosis*). Τουλάχιστον 19 μελέτες έχουν ερευνήσει το ρόλο των Μυκοβακτηριδίων στην ενεργοποίηση της σαρκοείδωσης με διάφορες μεθόδους.

Τα ποσοστά των θετικών αποτελεσμάτων των δημοσιευμένων μελετών που συσχετίζουν τη σαρκοείδωση με τα Μυκοβακτηρίδια κυμαίνονται από 0% έως 89%, έτσι είναι δύσκολο να προκύψουν ασφαλή συμπεράσματα, χωρίς όμως να αποκλείουν την πρόκληση σαρκοείδωσης σε κάποιους ασθενείς.

Ορολογικές μελέτες έχουν ανιχνεύσει αυξημένα επίπεδα αντισωμάτων όλων των παραπάνω παραγόντων που ίσως αποτελεί ένα επιφανόμενο λόγω αυξημένης παραγωγής ανοσοσφαιρινών από τα ενεργοποιημένα Β-κύτταρα και όχι μία ειδική απάντηση σε κάποιο αιτιολογικό παράγοντα. Επιπλέον διάφοροι μη μικροβιακοί περιβαλλοντικοί ανόργανοι ή οργανικοί παράγοντες όπως το αλουμίνιο, το ζirkόνιο ή τάλκη, ο πηλός και τα πεύκα μπορούν να πυροδοτήσουν την αντίδραση του οργανισμού σχηματίζοντας κοκκίωμα όμοιο με αυτό της σαρκοείδωσης.

Παρ' όλα αυτά για να τεθεί η διάγνωση της σαρκοείδωσης πρέπει να υπάρχει πιθανή έκθεση και σε οργανικά και ανόργανα αντιγόνα, χωρίς όμως να αποκλείεται και η συμμετοχή του ίδιου του οργανισμού σαν πηγή αντιγόνων για τη δημιουργία κοκκιώματος. Επομένως καμία μελέτη δεν κατάφερε έως τώρα να επαληθεύσει την αιτία της σαρκοείδωσης για τους εξής πιθανούς λόγους:

- α) η σαρκοείδωση είναι μια μοναδική νόσο με μοναδική αιτία,
- β) ο αιτιολογικός παράγοντας μπορεί να είναι ένας μικροοργανισμός που δεν έχει ακόμα αναγνωρισθεί και τέλος,
- γ) ο μηχανισμός πρόκλησης σαρκοείδωσης μπορεί να είναι αποτέλεσμα όχι ενός αλλά πολλών οργανισμών ή αντιγόνων και μπορεί να σχετίζονται με ανοσοενισχυτικούς παράγοντες.^{1,6,4,3,8}

Σύμφωνα με την μελέτη ACCESS των Rybicki et al.(2001) που συμμετείχαν 10.862 πρώτου βαθμού συγγενείς και 17.047 δευτέρου βαθμού συγγενείς που προέρχονταν από 706 ασθενείς με σαρκοείδωση και μάρτυρες αντιστοιχίζοντας τους ως προς την ηλικία, το φύλο, τη φυλή και τα γεωγραφικά χαρακτηριστικά, η πιθανότητα εμφάνισης της σαρκοείδωσης σε αδέρφια ή γονείς με ιστορικό σαρκοείδωσης ήταν πέντε φορές μεγαλύτερη από ότι στους μάρτυρες.

Όμως παρά την αυξημένη επίπτωση της σαρκοείδωσης στους συγγενείς πρώτου και δευτέρου βαθμού, ο απόλυτος κίνδυνος εμφάνισης της σαρκοείδωσης στα μέλη μιας οικογένειας για τον καθένα χωριστά είναι 1%.

Αυτό σημαίνει ότι στην εκδήλωση της νόσου στα μέλη των οικογενειών συμμετέχουν και άλλοι αιτιολογικοί παράγοντες.

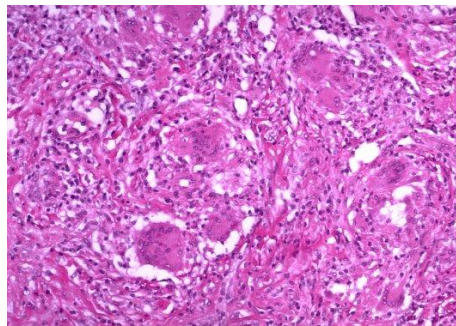
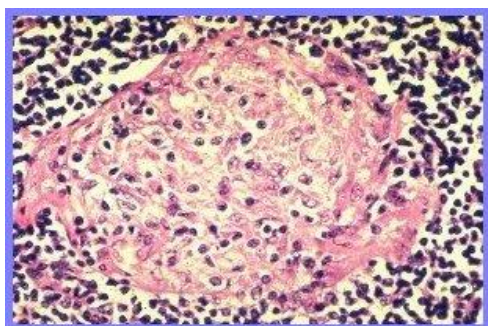
Για παράδειγμα η επίπτωση της σαρκοείδωσης είναι μεγαλύτερη σε οικογένειες λευκής φυλής σε σχέση με οικογένειες Αμερικανών Αφρικανικής καταγωγής, υποδηλώνοντας την παρουσία γενετικών παραγόντων στους οποίους οφείλεται η προσβολή περισσότερων μελών των οικογενειών λευκής φυλής.¹⁰

Το σαρκοειδικό κοκκίωμα

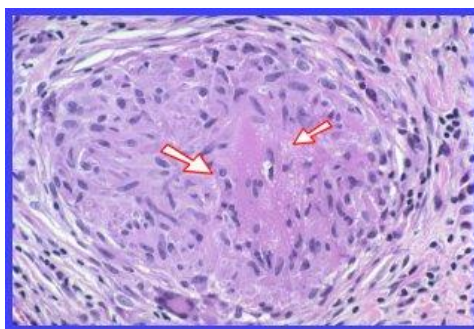
Αν και δεν υπάρχει ξεκάθαρη απάντηση για τα αίτια της σαρκοείδωσης, τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στην κατανόηση της παθογένεσης και των μηχανισμών δημιουργίας του σαρκοειδικού κοκκιώματος το οποίο αποτελεί χαρακτηριστικό παθολογοανατομικό εύρημα.

Η παρουσία αυτού αποτελεί αναγκαία αλλά όχι και ικανή προϋπόθεση για τη διάγνωση της σαρκοείδωσης αφού πρόκειται για μια μη ειδική βλάβη που ανευρίσκεται σε πολλές κοκκιωματώδεις νόσους.

Το σαρκοειδικό κοκκίωμα αποτελεί ένα συμπαγές μη τυροειδοποιημένο επιθηλιοειδές κοκκίωμα και σε σπάνιες περιπτώσεις μπορεί να παρουσιάζει ελάχιστη νέκρωση, με αποτέλεσμα να πρέπει να γίνει διαφορική διάγνωση από άλλες νόσους που προκαλούν νεκρωτικό κοκκίωμα όπως είναι η φυματίωση, και η λοίμωξη από μύκητες^{6,9} (Εικόνα 1,2).



Εικόνα 1α και 1β :Σαρκοειδικό κοκκίωμα (granuloma.homestead.com)

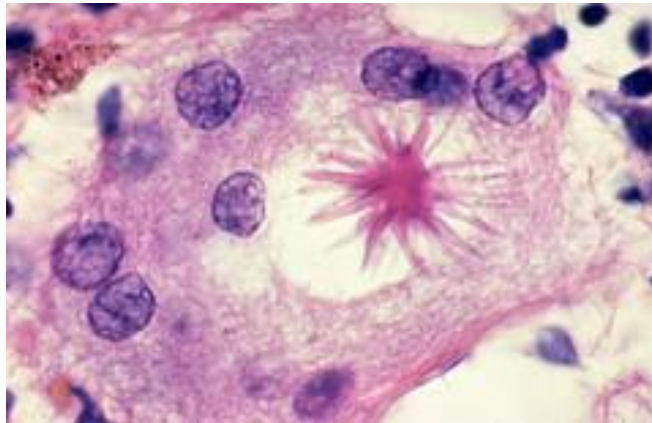


Εικόνα 2 : Σαρκοειδικό κοκκίωμα με μικρές περιοχές νέκρωσης όπως δείχνουν τα βέλη. Αυτή είναι η πιο συχνή μορφή νέκρωσης στην σαρκοείδωση (granuloma.homestead.com)

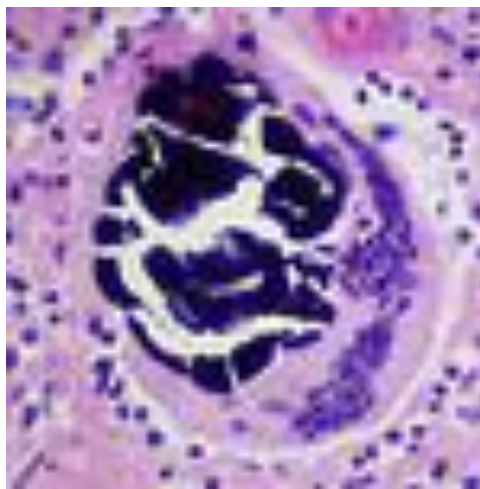
Ο σχηματισμός του κοκκιώματος είναι αποτέλεσμα μιας ειδικής ανοσολογικής απάντησης σε κάποιο αντιγονικό παράγοντα είτε οργανικό ή ανόργανο είτε μικροβιακό. Τα πρώτα κύτταρα που κινητοποιούνται για το σχηματισμό του κοκκιώματος είναι τα μονοπύρρηνα μακροφάγα τα οποία προοδευτικά μετατρέπονται σε ενεργοποιημένα επιθηλιοειδή κύτταρα.¹¹

Επομένως το σαρκοειδικό κοκκίωμα το οποίο ονομάζεται και «επιθηλιοειδές» κοκκίωμα, αποτελείται από ενεργοποιημένα επιθηλιοειδή κύτταρα, από γιγαντοκύτταρα και λεμφοκύτταρα.

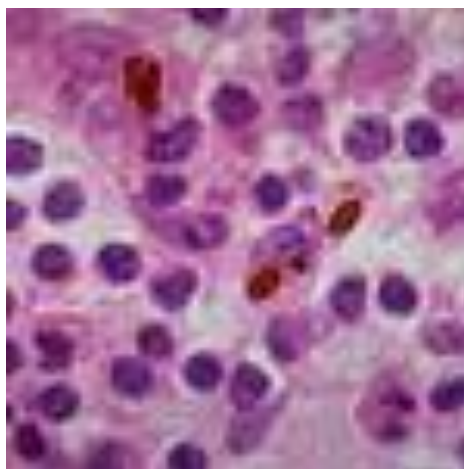
Τα γιγαντοκύτταρα μπορεί να περιέχουν στο κυτταρόπλασμά τους διάφορα σωματίδια όπως τα αστεροειδή σωματίδια (εικόνα 3), τα σωματίδια schaumann (εικόνα 4) και τα σωματίδια Hamazaki-Wesenberg (εικόνα 5).



Εικόνα 3: Αστεροειδές σωματίδιο (www.flickr.com/photos/pulmonary-path)



Εικόνα 4: Σωμάτιο Schaumann (χρωματισμένο μαύρο). Παρουσιάζουν κεντρική ασβέστωση και βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα γιγαντοκυττάρων στην σαρκοείδωση και σε άλλες κοκκιωματώδεις νόσους. Σε αυτή την εικόνα δεν είναι εμφανής η ασβέστωση. (www.flickr.com/photos/pulmonary-path)



Εικόνα 5: Σωματίδια Hamazaki-Wesenberg. Παρατηρούνται περιστασιακά σε ασθενείς με σαρκοείδωση σε προσβεβλημένους και σε υγιείς ιστούς αλλά δεν είναι ειδικό εύρημα της νόσου. (www.flickr.com/photos/pulmonary-path)

Στο κέντρο του κοκκιώματος βρίσκονται τα CD4⁺ T-λεμφοκύτταρα ενώ τα CD8⁺ T-λεμφοκύτταρα και τα B-λεμφοκύτταρα απαντώνται στην περιφερική ζώνη.

Το κοκκίωμα μπορεί να παρουσιάσει ινωτικές αλλοιώσεις οι οποίες συνήθως ξεκινούν από την περιφέρεια και κατευθύνονται προς το κέντρο, καταλήγοντας σε ίνωση.^{1,11}

Μεγάλος αριθμός κυτταροκινών και άλλων διαμεσολαβητών παράγονται από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και τα T-λεμφοκύτταρα κατά τη διάρκεια της κοκκιωματώδους διεργασίας. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα πολλών μελετών η ιντερφερόνη- γ (INF- γ), οι κυτταροκίνες TNF- α , IL-12, και IL-18, το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγιοτενσίνης (ACE) και ο υποδοχέας της βιταμίνης D (VDR), συμμετέχουν ενεργά στο σχηματισμό του κοκκιώματος.

Αντιφατικά είναι τα αποτελέσματα μελετών όσον αφορά την συσχέτιση της αυξημένης τιμής στο περιφερικό αίμα του ACE με την αυξημένο κίνδυνο για σαρκοείδωση. Σε κάποιες μελέτες διαπιστώθηκε ότι τα υψηλά επίπεδα ACE στο αίμα σχετίζονταν με αυξημένο κίνδυνο για σαρκοείδωση σε Αμερικανούς Αφρικανικής καταγωγής, σε γυναίκες Ιαπωνικής καταγωγής και σε μέλη οικογενειών Γερμανικής καταγωγής, ενώ αντίθετα δεν επιβεβαιώθηκαν σε άλλες μελέτες που έγιναν σε Καυκάσιους και Ιάπωνες.

Λόγω της δημιουργίας παρόμοιου κοκκιώματος και στη φυματίωση για αρκετό καιρό επικρατούσε η άποψη ότι τα μυκοβακτηρίδια ήταν η αιτία της σαρκοείδωσης. Νεότερες όμως μελέτες κατέρριψαν αυτό τον μύθο χρησιμοποιώντας μία πιο ευαίσθητη μέθοδο απομόνωσης των μυκοβακτηριδίων, την polymerase chain reaction (PCR) με την οποία δεν απομονώθηκε το μυκοβακτηριδιακό DNA.

Σύμφωνα όμως με την μελέτη των Shiv Saidha et al. μία μεταανάλυση των μελετών που ερεύνησαν την παρουσία μυκοβακτηριδιακού DNA δείχνει ότι στο 26% των σαρκοειδικών ιστών που μελετήθηκαν, ανευρέθη μυκοβακτηριδιακό νουκλεϊνικό οξύ ενισχύοντας την συσχέτιση της σαρκοείδωσης με την μυκοβακτηριδιακή λοίμωξη. Επίσης νεότερες μελέτες έχουν αναγνωρίσει το DNA του *Mycobacterium tuberculosis* για την πρωτεΐνη mKatG (πρωτεΐνη καταλάση-υπεροξειδάση του μυκοβακτηριδίου) στο 38% των δειγμάτων βιοψίας και υπάρχουν ενδείξεις για την ανίχνευση της IgG mKatG στο 50% ασθενών που διερευνώνται για σαρκοείδωση, καθώς και αυξημένη ανταπόκριση των T-κυττάρων που βρίσκονται στο περιφερικό αίμα και στους πνεύμονες ασθενών με σαρκοείδωση, στην παρουσία της πρωτεΐνης mKatG και σε άλλα μυκοβακτηριδιακά αντιγόνα σε σχέση με υγιείς.

Ωστόσο δεν ανευρέθηκε σε καμία μελέτη ενεργό μυκοβακτηριακή λοίμωξη πριν ή μετά την διάγνωση της σαρκοείδωσης, υποδηλώνοντας ότι πρόκειται για μία αντίδραση τύπου σαρκοείδωσης και όχι ενεργό ή λανθάνουσα λοίμωξη από την έκθεση σε συγκεκριμένο μικροοργανισμό. Επομένως η παρουσία μυκοβακτηριδιακών αντιγόνων σε σαρκοειδικούς ιστούς δεν αποτελεί αιτιολογική συσχέτιση αυτών με την σαρκοείδωση. Έχει διαπιστωθεί ωστόσο ότι η IL-12 που παράγεται από τα μακροφάγα συμβάλλει στην ανοσολογική απάντηση του οργανισμού στους ενδοκυττάριους μικροοργανισμούς όπως το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης, το *Toxoplasma gondii* και το *Listeria monocytogenes*. Αυτή η αντίδραση σε συνδυασμό με την διαταραχή στο σύστημα των υποδοχέων 12/IL12R οδηγεί στο σχηματισμό κοκκιώματος και ευθύνεται για άτυπες μορφές προσβολής από μυκοβακτηρίδια.^{3,9,12}

Έχει διαπιστωθεί ότι σε ασθενείς που βρίσκονται σε οξεία φάση της νόσου με παρουσία οζώδους ερυθήματος, αρθραλγίες, καταβολή, υπάρχει αυξημένη

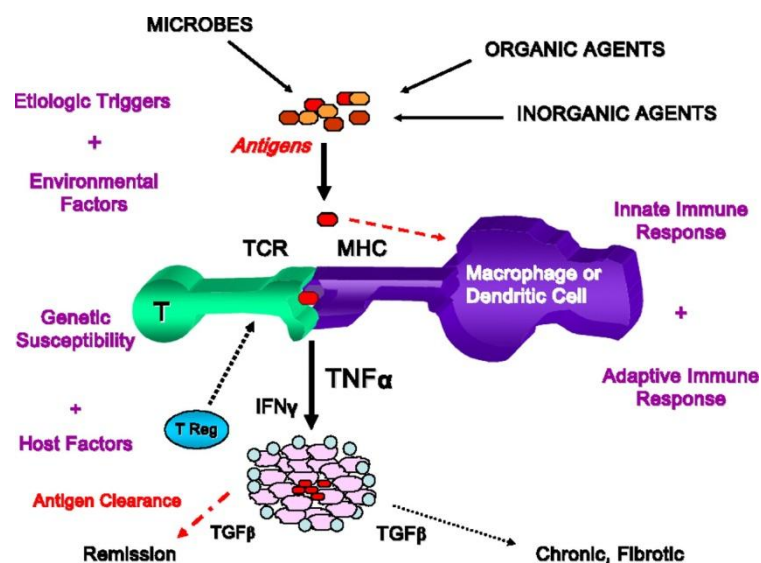
παραγωγή $CD4^+$ λεμφοκυττάρων (Th1 βοηθητικά κύτταρα) η οποία υπερέχει των $CD8^+$ (T-κυτταροτοξικών κυττάρων) όπως διαπιστώθηκε στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL) αυτών των ασθενών. Έτσι ο λόγος $CD4^+/CD8^+ > 3,5$ στο BAL είναι παθογνωμονικός για την διάγνωση της σαρκοείδωσης.

Η επικρατέστερη θεωρία για την δημιουργία του κοκκιώματος και την εξέλιξη της νόσου είναι η διαταραχή της ισορροπία των Th1/Th2 κυττάρων. Τα Th1 βοηθητικά κύτταρα καθώς ενεργοποιούνται αυξάνονται οι υποδοχείς της IL-2 και απελευθερώνεται η IL-2 η οποία μαζί με την IL-18 παίζουν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό του κοκκιώματος καθώς και στην ενεργοποίηση των μακροφάγων τα οποία παράγουν ιντερφερόνη- γ .

Η παραγωγή των Th1 κυτταροκινών μειώνει την παραγωγή εξωκυττάρων πρωτεϊνών με αποτέλεσμα την έναρξη τοπικής φλεγμονώδους διεργασίας μέσα στο κοκκίωμα και την αναστολή της διαδικασίας ίνωσης. Στο 60% των ασθενών με σαρκοείδωση η κοκκιωματώδης διεργασία αναστέλλεται σε διάστημα 2-5 έτη με τη διείσδυση των $CD8^+$ λεμφοκυττάρων. Ανάλογα με τη ευαισθησία του κάθε ατόμου η επικράτηση των Th2 κυττάρων συνδέεται με τη χρόνια μορφή της νόσου που εξελίσσεται σε ίνωση παράγοντας κυτταροκίνες όπως IL-4 η οποία ενεργοποιεί την παραγωγή εξωκυττάρων πρωτεΐνης και αποτελεί χημειοτακτικό παράγοντα για τους ινοβλάστες. Η παραμονή του κοκκιώματος σχετίζεται με τη IL-12, ενώ η διάλυσή του με την IL-10 η οποία μειώνει την φλεγμονώδη απάντηση.

Οι κυτταροκίνες που σχετίζονται με την χρόνια νόσο είναι η IL-8, IL-12 και ο TNF- α , ο οποίος παράγεται από τα κυψελιδικά μακροφάγα και οδηγεί στη χρήση μακροχρόνιας θεραπείας. Η IL-8 συνήθως δεν ανευρίσκεται στο BAL ασθενών με οξεία νόσο αλλά με χρόνια νόσο και σχετίζεται με την κυτταροκίνη TGF- β (transforming-growth-factor- β) η οποία προάγει την ίνωση (Σχήμα 1).

Η πνευμονική ίνωση παρατηρείται σε ποσοστό 20-25% των ασθενών με σαρκοείδωση. Σε αυτούς τους ασθενείς έχουν διαπιστωθεί αυξημένα επίπεδα των μεταλοπρωτεϊνών 8 και 9 στο BAL και μειωμένα επίπεδα του αναστολέα της μεταλοπρωτεϊνάσης 1.^{6,13,14,15}



Σχήμα 1: Υποθετικό μοντέλο ανοσοπαθογένεσης της σαρκοείδωσης και ανοσολογική εξήγηση της θεραπείας της νόσου. INF = ιντερφερόνη, MHC= μείζων σύστημα ιστοσυμβατότητας, TCR= υποδοχείς T-κυττάρων, TGF= τροποποιητικός αυξητικός παράγοντας, TNF= παράγοντας νέκρωσης όγκου, T Reg= Τα ρυθμιστικά κύτταρα.⁷

Εκδήλωση σαρκοείδωσης και επομένως σχηματισμό σαρκοειδικού κοκκιώματος έχει αναφερθεί μετά από χορήγηση θεραπείας με Ιντερφερόνη-α σε ασθενείς με ηπατίτιδα C. Ο σχηματισμός κοκκιώματος οφείλεται στην αύξηση παραγωγής της Ιντερφερόνης-γ και της Ιντερλευκίνης-2 από την χορήγηση της Ιντερφερόνης-α.¹⁴

Ανοσολογικό παράδοξο

Στην σαρκοείδωση παρατηρείται και ένα ανοσολογικό παράδοξο παρά την εκτεταμένη φλεγμονή. Συγκεκριμένα παρατηρείται ανενεργία με μειωμένη ανοσολογική απάντηση στην φυματίνη που χορηγείται ενδοδερμικά και ίσως οφείλεται στην παραγωγή των CD25^{bright} ρυθμιστικών T-κυττάρων στην ενεργό σαρκοείδωση. Τα κύτταρα αυτά αποτελούν υποκατηγορία των CD4+ κυττάρων και συμβάλλουν σε αυτή την ανενεργία σταματώντας την παραγωγή της ιντερλευκίνης-2 και αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων.¹⁴

Κλινικά χαρακτηριστικά

Η σαρκοείδωση όπως ήδη έχει αναφερθεί εκτενώς είναι μια πολυσυστηματική κοκκιωματώδης νόσος και τα κλινικά χαρακτηριστικά εξαρτώνται από την εθνικότητα, το φύλο, την ηλικία, τη διάρκεια της νόσου, το είδος και την έκταση προσβολής του οργάνου και την ενεργότητα της κοκκιωματώδους διεργασίας.

Το 30-60 % των ασθενών είναι ασυμπτωματικοί και η διάγνωση τίθεται από τυχαίο εύρημα σε ακτινογραφία θώρακος σε έλεγχο ρουτίνας. Ο χρόνιος ξηρός βήχας, η δύσπνοια και ο θωρακικός πόνος οδηγούν συχνά τους ασθενείς στην αναζήτηση ιατρικής βοήθειας. Ο χρόνιος ξηρός βήχας είναι το συχνότερο σύμπτωμα του αναπνευστικού, ενώ η χρόνια δύσπνοια είναι σπάνια και συνήθως σχετίζεται με πνευμονική ίνωση.

Οι συχνότερες εξωθωρακικές εντοπίσεις είναι κυρίως οι περιφερικοί λεμφαδένες, τα μάτια και το δέρμα.

Το ένα τρίτο των ασθενών παρουσιάζει μη ειδικά συστηματικά συμπτώματα όπως είναι η κόπωση (27%), η απώλεια βάρους (28%), ο πυρετός (10-17%), οι νυχτερινές εφιδρώσεις, τα οποία εμφανίζονται συχνότερα στη μαύρη φυλή και στους Ασιάτες Ινδιάνους, ενώ τα όργανα που θα προσβληθούν ποικίλουν ανάλογα με τον ασθενή.

Στην μελέτη των Ingrid H.E.Korenromp et al.(2011) διαπιστώθηκε ότι η κόπωση, σε ασθενείς με κλινική ύφεση της σαρκοείδωσης είναι ένα σοβαρό και παρατεταμένης διάρκειας πρόβλημα που συνοδεύεται από συμπτώματα άγχους, κατάθλιψης, διαταραχή συγκέντρωσης, πόνους, μη ξεκούραστος ύπνος και εξάντληση μετά από άσκηση, συμπτώματα που μοιάζουν με το σύνδρομο χρόνιας κόπωσης και η οποία δεν οφείλεται στην προηγούμενη θεραπεία με κορτικοειδή.

Κανένας από τους ασθενείς που συμμετείχαν στη μελέτη δεν παρουσίαζε σημεία ενεργού νόσου και κανένας δείκτης φλεγμονής δεν ήταν αυξημένος.

Παρόλα αυτά υπάρχει το ερώτημα αν η σοβαρή κόπωση είναι ένας δείκτης ήπιας φλεγμονής, η οποία δεν έχει ακόμα ανακαλυφθεί με τις συνήθεις μεθόδους διάγνωσης και παραμένει αρκετά χρόνια μετά την ύφεση της νόσου.

Μια άλλη υπόθεση είναι ότι ο εγκέφαλος των ασθενών με σοβαρή κόπωση ίσως να ευαίσθητοποιείται από κυτοκίνες, κατά την διάρκεια της ενεργού φάσης της νόσου,

προκαλώντας αλλαγή του ρυθμιστικού συστήματος που αφορά την κόπωση και την κατάθλιψη, με αποτέλεσμα η παραγωγή των φλεγμονωδών διαμεσολαβητών να είναι η ίδια με αυτή των υγιών αλλά να είναι αυξημένη η ευαισθησία των υποδοχέων των ανοσολογικών διαμεσολαβητών οδηγώντας στο φαινόμενο της κόπωσης.

Σε αυτούς τους ασθενείς παρατηρείται μείωση της φυσικής δραστηριότητας και αδυναμία των μυών, χωρίς όμως να έχει διευκρινισθεί ο μηχανισμός αυτής της προ-φλεγμονώδους κόπωσης και χωρίς να έχει επιβεβαιωθεί καμία υπόθεση.

Υπάρχουν δύο διαφορετικές μορφές εκδήλωσης της σαρκοείδωσης.

Η πρώτη μορφή είναι η οξεία και αιφνίδια έναρξη της νόσου που εμφανίζεται συχνότερα στους Καυκάσιους από ότι στους Αφρο-Αμερικανούς και μπορεί να παρουσιασθεί ως σύνδρομο Löfgren το οποίο χαρακτηρίζεται από οζώδες ερύθημα, αμφοτερόπλευρη πυλαία λεμφαδενοπάθεια ενδοθωρακικά, αρθραλγίες αστραγάλων και γενικά συμπτώματα όπως πυρετός μυαλγίες, κακουχία και απώλεια βάρους.

Αυτό το σύνδρομο εμφανίζεται σε ποσοστό 20-50% και αποτελεί καλοήγη μορφή της νόσου. Έχει διαπιστωθεί ότι το οζώδες ερύθημα είναι συχνότερο σε Ευρωπαϊές γυναίκες λευκής φυλής, ενώ αρθρίτις χωρίς οζώδες ερύθημα είναι συχνότερο σε άνδρες.

Ένα άλλο ειδικό αλλά όχι συχνό σύνδρομο είναι το Heerfordt's σύνδρομο το οποίο περιλαμβάνει διόγκωση παρωτίδων, πρόσθια ραγοειδίτιδα, πάρεση προσωπικού και εμπύρετο. Η οξεία μορφή της νόσου έχει καλή πρόγνωση και υποχωρεί αυτόματα μέσα σε δύο έτη.

Γενικά η σαρκοείδωση παρουσιάζει αυτόματη ύφεση στα δύο τρίτα των ασθενών μέσα σε μία δεκαετία από την διάγνωση, ενώ στους περισσότερους η ύφεση εμφανίζεται στα πρώτα τρία έτη. Δυστυχώς στο ένα τρίτο των ασθενών παρουσιάζει εξέλιξη της νόσου και προσβολή οργάνων.

Στη μαύρη φυλή παρατηρείται αυξημένη συχνότητα προσβολής του πνεύμονα, χειρότερη πρόγνωση και συχνότερες υποτροπές. Η επανεμφάνιση της νόσου ένα χρόνο μετά την ύφεση είναι σπάνια (<5%) αλλά μπορεί να συμβεί σε οποιαδήποτε ηλικία και σε οποιοδήποτε όργανο.

Η δεύτερη μορφή της νόσου είναι η χρόνια σαρκοείδωση η οποία παρουσιάζεται σε ποσοστό 10-30%, με συμπτώματα ανάλογα με το προσβεβλημένο όργανο, συχνά σχετίζεται με πνευμονική διήθηση και προϋπάρχουν συμπτώματα όπως βήχας και δύσπνοια ενώ τα γενικά συμπτώματα είναι πιο σπάνια από ότι στην οξεία μορφή.

Η χρόνια μορφή παρουσιάζει περισσότερες υποτροπές και μικρότερη πιθανότητα ύφεσης μετά από μεγαλύτερο διάστημα.

Το ποσοστό των ασθενών που πεθαίνουν από τη σαρκοείδωση είναι μικρότερο από 5% και συνήθως οφείλεται στην πνευμονική ίνωση με συνοδό αναπνευστική ανεπάρκεια ή στην προσβολή της καρδιάς ή του νευρικού συστήματος.^{2,3,4,11,13,14,31}

Προσβολή οργάνων

Το σαρκοειδικό κοκκίωμα μπορεί να σχηματισθεί σε οποιοδήποτε όργανο αλλά στο 90% των ασθενών η σαρκοείδωση εκδηλώνεται με διόγκωση ενδοθωρακικών λεμφαδένων, προσβολή των πνευμόνων, του δέρματος ή των οφθαλμών ή κάποιος συνδυασμός αυτών.¹⁴

Προσβολή του αναπνευστικού συστήματος

Πνευμονική προσβολή

Οι πνεύμονες προσβάλλονται σε ποσοστό μεγαλύτερο από 90% των ασθενών που πάσχουν από σαρκοείδωση και τα κυριότερα συμπτώματα είναι η δύσπνοια, ο ξηρός βήχας, η δυσφορία στον θώρακα και η συρίττουσα αναπνοή τα οποία εμφανίζονται σε ποσοστό 30-50%. Η αιμόπτυση είναι σπάνια εκδήλωση. Επίσης το 50% των ασθενών είναι ασυμπτωματικοί και η διάγνωση τίθεται από τον ακτινολογικό έλεγχο ρουτίνας. Η προσβολή του πνευμονικού παρεγχύματος είναι συχνότερη στη μαύρη φυλή και έχει χειρότερη πρόγνωση και συχνότερες υποτροπές.²

Η αντικειμενική εξέταση του θώρακα είναι φυσιολογική στους περισσότερους ασθενείς με σαρκοείδωση. Σε ποσοστό μικρότερο του 20% ανευρίσκονται λίγοι ρεγχάζοντες κατά την ακρόαση του θώρακα, ενώ η πληκτροδακτυλία είναι σπάνια σε αντίθεση με τις υπόλοιπες διάχυτες διάμεσες πνευμονοπάθειες όπου είναι συχνότερο εύρημα.¹¹

Η φυσική πορεία της πνευμονικής σαρκοείδωσης είναι απρόβλεπτη και μπορεί να οδηγήσει σε αυτόματη ύφεση ή σε προοδευτική μείωση της λειτουργίας των πνευμόνων και πνευμονική ίνωση.²

Ακτινολογικά ευρήματα

Ακτινογραφία θώρακος

Η ακτινογραφία θώρακος παραμένει ο ακρογωνιαίος λίθος στην διάγνωση, πρόγνωση και παρακολούθηση της πνευμονικής σαρκοείδωσης. Η ακτινογραφία θώρακος είναι παθολογική σε ποσοστό 86-92% των περιπτώσεων. Με βάση τα ευρήματα στην ακτινογραφία θώρακος η σαρκοείδωση ταξινομείται σε πέντε στάδια σύμφωνα με το σύστημα σταδιοποίησης του Siltzbach που χρησιμοποιείται εδώ και σαράντα χρόνια.

Στάδιο 0: Φυσιολογική ακτινογραφία θώρακος

Στάδιο I: Αμφοτερόπλευρη πυλαία και μεσοθωρακική λεμφαδενοπάθεια χωρίς προσβολή του παρεγχύματος

Στάδιο II: Αμφοτερόπλευρη πυλαία και μεσοθωρακική λεμφαδενοπάθεια με προσβολή του παρεγχύματος

Στάδιο III: Προσβολή μόνο του πνευμονικού παρεγχύματος χωρίς λεμφαδενοπάθεια

Στάδιο IV : Πνευμονική ίνωση

Κατά την διάγνωση το 5%-10% των ασθενών είναι σε στάδιο 0, το 50% σε στάδιο I, το 25%-30% σε στάδιο II, και το 10%-12% σε στάδιο III.

Αν και το μεγαλύτερο ποσοστό αυτών των ασθενών παρουσιάζουν ύφεση ή σταθερότητα της νόσου το ένα τέταρτο αυτών παρουσιάζουν εξέλιξη της νόσου σε πνευμονική ίνωση και μη αναστρέψιμη καταστροφή του πνευμονικού παρεγχύματος.(Εικόνα 6)

Αυτόματη ύφεση παρατηρείται σε ποσοστό 60%-90% των ασθενών με νόσο σταδίου I, 40%-70% στο στάδιο II, 10%-20% στο στάδιο III και 0% στο στάδιο IV.^{11,27}



Εικόνα 6: Οπισθοπρόσθιες ακτινογραφίες θώρακος δείχνουν : (αριστερά) αμφοτερόπλευρη πυλαία λεμφαδενοπάθεια – στάδιο I, (στο κέντρο) προσβολή πνευμονικού παρεγχύματος – στάδιο III, και (δεξιά) πνευμονική ίνωση – στάδιο IV.²

Αξονική τομογραφία θώρακος

Πιο ευαίσθητη απεικονιστική μέθοδο ανίχνευσης των παρεγχυματικών αλλοιώσεων και των προσβεβλημένων ενδοθωρακικών λεμφαδένων είναι η αξονική τομογραφία θώρακος και ιδιαίτερα η υψηλής ευκρίνειας αξονική η οποία είναι πιο ευαίσθητη στην ανίχνευση αλλοιώσεων όπως οζιδίων, πάχυνση μεσολόβιων διαφραγμάτων, δικτυοζώδεις αλλοιώσεις και συμβάλλει στην διάκριση της ενεργού φλεγμονής από την μη αναστρέψιμη ίνωση ασθενών που πάσχουν από σαρκοείδωση σταδίου II και III.

Η παρουσία οζιδίων, η θολερότητα του πνευμονικού παρεγχύματος και των κυψελίδων αποτελούν κοκκιωματώδη φλεγμονή η οποία μπορεί να αναστραφεί με την κατάλληλη θεραπεία της νόσου. Αντίθετα εικόνες μελικυρήθρας με κύστες, φυσαλλίδες αέρα (bullae), πάχυνση μεσολόβιων διαφραγμάτων, διαταραχή της αρχιτεκτονικής του πνευμονικού παρεγχύματος, απώλεια πνευμονικού όγκου και βρογχιεκτασίες από έλξη, αποτελούν ευρήματα μη αναστρέψιμης ίνωσης.

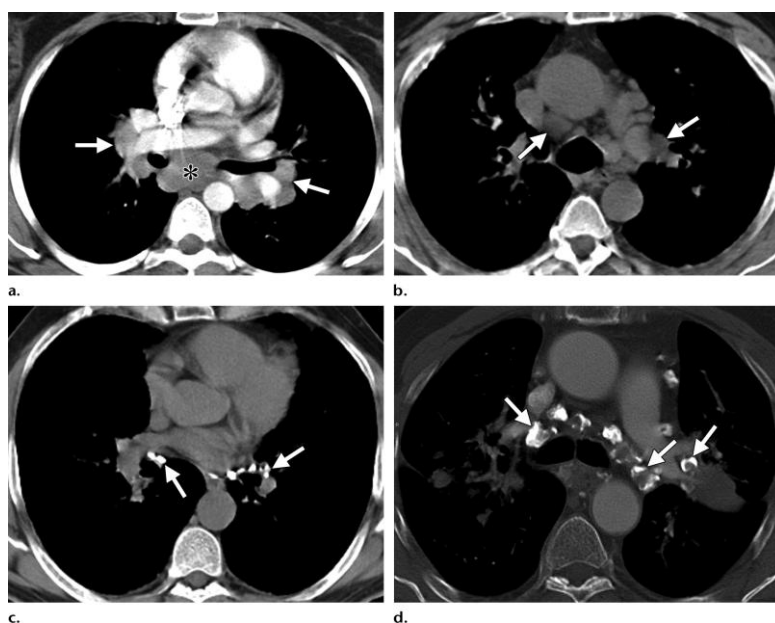
Η αξονική τομογραφία θώρακος υψηλής ευκρίνειας μπορεί να βοηθήσει στην επιβεβαίωση διάγνωσης σε ασθενείς με άτυπη κλινική εικόνα ή ασυνήθιστα ακτινολογικά ευρήματα.²⁷

Το συχνότερο ακτινολογικό εύρημα σε ασθενείς σταδίου I όπου δεν προσβάλλεται το παρέγχυμα είναι η διόγκωση αμφοτερόπλευρα, συμμετρικά των πυλαίων λεμφαδένων και δεξιού παρατραχειακού λεμφαδένα η οποία σε συνδυασμό με την διόγκωση μεσοθωρακικών λεμφαδένων εμφανίζεται σε ποσοστό 95% των ασθενών

με σαρκοείδωση. Η διόγκωση των λεμφαδένων του μέσου μεσοθωρακίου (οι αριστεροί παρατραχειακοί, υποτροπιδικοί, και αορτοπνευμονικού παραθύρου) και οι προαγγειακοί συμμετέχουν σε ποσοστό 50% των ασθενών.

Η ετερόπλευρη διόγκωση λεμφαδένων και κυρίως αριστερά είναι σπάνια, ενώ αποτιτανωμένοι πυλαίοι λεμφαδένες παρατηρούνται σε ποσοστό 5% και είναι ένδειξη μεγάλης διάρκειας της νόσου.

Οι αποτιτανώσεις μπορεί να μοιάζουν με κέλυφος αυγού όπως στην πυριτίαση, να είναι στικτές, άμορφες ή να έχουν μορφή σαν ποπ κορν. Οι άτυπες μορφές λεμφαδενοπάθειας εμφανίζονται συχνότερα σε ασθενείς ηλικίας μεγαλύτερης των πενήντα ετών (εικόνα 7).



Εικόνα 7: Τυπικά (a,b) και άτυπα (c,d) ακτινολογικά ευρήματα λεμφαδενοπάθειας σε τέσσερις ασθενείς με σαρκοείδωση. **(a)** Αξονική τομογραφία θώρακος (παράθυρο μεσοθωρακίου) δείχνει τυπική αμφοτερόπλευρη συμμετρική πυλαία (βέλη) και υποτροπιδική (*) λεμφαδενοπάθεια **(b)** Αξονική τομογραφία θώρακος (παράθυρο μεσοθωρακίου) στο επίπεδο της αριστερής πνευμονικής αρτηρίας δείχνει διόγκωση των δεξιών παρατραχειακών και των αριστερών πυλαίων λεμφαδένων (βέλη). Αν και οι δεξιοί πυλαίοι λεμφαδένες δεν φαίνονται σε αυτή την τομή, έχουν προσβληθεί **(c)** Αξονική τομογραφία θώρακος (παράθυρο μεσοθωρακίου) δείχνει στικτή αποτιτάνωση των πυλαίων λεμφαδένων (βέλη), πρότυπο που απαντάται και σε άλλες χρόνιες κοκκιωματώδεις νόσους. **(d)** Αξονική τομογραφία θώρακος που δείχνει αμφοτερόπλευρες, δίκην κέλυφος αυγού, αποτιτανώσεις πυλαίων και μεσοθωρακικών λεμφαδένων (βέλη), ευρήματα που ανευρίσκονται και στην πυριτίαση και η οποία πρέπει να συμπεριληφθεί στην διαφορική διάγνωση αυτής της περίπτωσης.²⁷

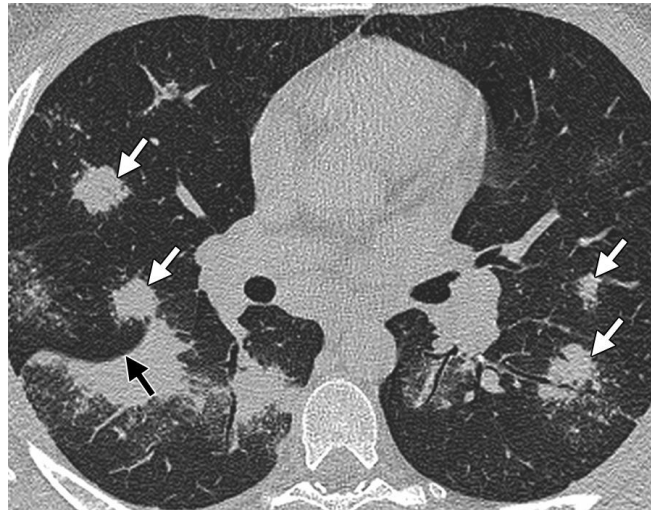
Στα στάδια II και III όπου προσβάλλεται το πνευμονικό παρέγχυμα, το συχνότερο ακτινολογικό εύρημα είναι το δικτυομικροοζώδες πρότυπο που κατανέμεται περιλεμφαγγειακά κυρίως στους άνω και μέσο λοβούς.

Τα οζίδια ανευρίσκονται συχνά υποϋπεζωκοτικά και περιβρογχαγγειακά και λιγότερα συχνά στα μεσολόβια διαφραγμάτια και εκτός από μικροοζώδεις αλλοιώσεις μπορεί να σχηματισθούν μεγαλύτεροι όζοι.

Ένα άλλο εύρημα είναι η παρουσία πυκνωτικών περιοχών στο παρέγχυμα αμφοτερόπλευρα με ακανόνιστα όρια με την παρουσία ή όχι εντός αυτών αεροβρογχογράμματος(Εικόνα 8,9).

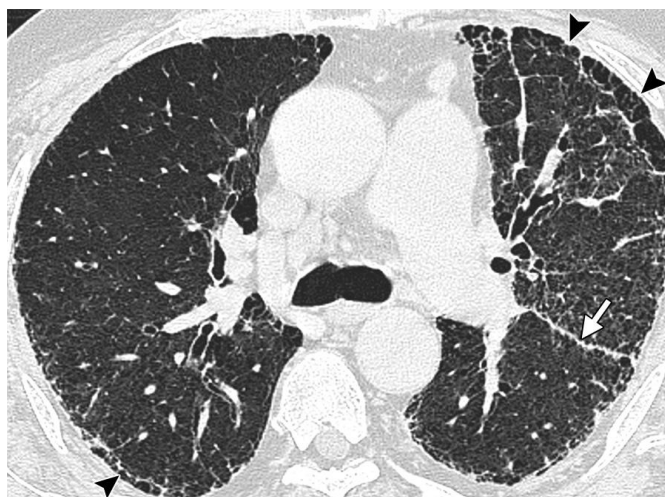


Εικόνα 8: Τυπικά ευρήματα της πνευμονικής σαρκοείδωσης στην υψηλής ευκρίνειας αξονική τομογραφία θώρακος. Επικρατεί το μικροοζώδες πρότυπο περιβρογχοαγγειακά και υπουπεζωκοτικά με χαρακτηριστική λεμφαγγειακή κατανομή.¹¹



Εικόνα 9: Αξονική τομογραφία θώρακος υψηλής ευκρίνειας που δείχνει πολυάριθμα, μεγάλα, σαφώς καθορισμένα οζίδια και περιοχές με πυκνωτικές αλλοιώσεις οι οποίες είναι αποτέλεσμα συρροής πολλών παρεγχυματικών μικροοζιδίων που σχηματίζονται από πολυάριθμα μικρά κοκκιώματα και στους δύο πνεύμονες. Λεπτές οζώδεις περιοχές θολερότητας παρατηρούνται γύρω από τους μεγάλους όζους (άσπρα βέλη) καθώς και σημεία μερικής συνένωσης μικρών οζιδίων περιφερικά. Αυτή η απεικόνιση αποτελεί το χαρακτηριστικό εύρημα της σαρκοείδωσης το «galaxy sign». Επίσης παρατηρείται παραμόρφωση της μείζονος μεσολοβίου σχισμής δεξιά (μαύρο βέλος).²⁷

Στο στάδιο IV όπου υπάρχει πνευμονική ίνωση τα ακτινολογικά ευρήματα είναι, πάχυνση μεσολόβιων διαφραγμάτων, βρογχεκτασίες από έλξη, καταστροφή της αρχιτεκτονικής του παρεγχύματος, σχηματισμός κύστεων, φυσαλίδων αέρα και εικόνα μελικυρήθρας (honeycombing) υποϋπεζωκοτικά στους άνω και μέσο λοβούς και σπανιότερα στους κάτω λοβούς, οπότε λανθασμένα να τεθεί η διάγνωση της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης (εικόνα 10).



Εικόνα 10: Αξονική τομογραφία θώρακος που δείχνει ασύμμετρες υποϋπεζωκοτικές κύστες δίκην μελικυρήθρας (κεφαλές βελών), καταστροφή της αρχιτεκτονικής και παρουσία οζιδίων στην αριστερή μεσολόβιο σχισμή (βέλος). Αν και αυτά τα ευρήματα είναι χαρακτηριστικά της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης, η παρουσία, κυρίως στους άνω λοβούς, των κύστεων δίκην μελικυρήθρας και η κατανομή των μικροοζιδίων περιβρογχοαγγεϊκά και στις μεσολόβιες σχισμές σε αυτή την περίπτωση θέτουν ως πιθανότερη διάγνωση τη σαρκοείδωση.²⁷

Άτυπα ακτινολογικά ευρήματα είναι η παρουσία πνευμονικών όζων και μαζών σε ποσοστό 15%-25%, κατά τόπους περιοχές θαμβής υάλου (ground-glass) σε ποσοστό 40%, κατά τόπους περιοχές με παρουσία πυκνωτικών αλλοιώσεων με αεροβρογχόγραμμα σε ποσοστό 10%-20% και οι οποίες οφείλονται στην συρροή πολλών μικροοζιδίων και έχουν την εικόνα πνευμονίας, φυματίωσης ή κρυπτογενούς οργανούμενης πνευμονίας.

Άλλα άτυπα ακτινολογικά ευρήματα είναι η παρουσία γραμμοειδών δικτυωτών αλλοιώσεων σε ποσοστό 50% ασθενών με σαρκοείδωση ενώ αποτελεί προεξάρχον εύρημα σε ποσοστό 15%-20%.

Αυτό το πρότυπο οφείλεται στην πάχυνση μεσολόβιων και ενδολόβιων διαφραγμάτων και εντοπίζεται υποϋπεζωκοτικά στους άνω και μέσο λοβούς και μοιάζει με αλλοιώσεις της λεμφαγγειακής καρκινωμάτωσης η οποία όμως παρουσιάζει πιο εκτεταμένες και σοβαρές αλλοιώσεις υποϋπεζωκοτικά και στα μεσολόβια διαφραγμάτια σε αντίθεση με την σαρκοείδωση και το λέμφωμα. Η κοιλοποίηση παρεγχυματικών αλλοιώσεων είναι σπάνια και παρατηρείται σε ποσοστό 10% των ασθενών με σαρκοείδωση σταδίου IV και αποτελεί ουσιαστικά το σχηματισμό κύστεων και φυσαλίδων αέρα στις περιοχές ίνωσης.

Σε μερικές περιπτώσεις μπορεί να προκληθεί πνευμοθώρακας από την ρήξη αυτών των κύστεων ή των φυσαλίδων ή λόγω νέκρωσης του σαρκοειδικού κοκκιώματος (εικόνα 11). Ο πνευμοθώρακας αποτελεί μία επιπλοκή η οποία παρατηρείται σε ποσοστό 2-4% των ασθενών με σαρκοείδωση. Στα παραπάνω ευρήματα του σταδίου IV μπορεί να δημιουργηθεί μυκήτωμα, το οποίο αποτελείται από μυκητιασικές μπάλες οι οποίες αναπτύσσονται σε προϋπάρχουσες κύστες και φυσαλίδες και αποικίζονται από σαπροφυτικούς μύκητες κυρίως διάφορα είδη ασπέργιλλου και σε δεύτερο χρόνο επιμολύνονται και δημιουργούν απόστημα.

Η παρουσία υδραερικού επιπέδου μέσα στην ψευδοκύστη είναι ένδειξη μυκητιασικής λοίμωξης. Η συχνότητα εμφάνισης του ασπεργιλώματος είναι 1%-3% αλλά είναι υψηλότερο στο στάδιο III και IV και σχετίζεται συχνά με αιμόπτυση η

οποία αποτελεί τη δεύτερη συνηθέστερη αιτία θανάτου των ασθενών με σαρκοείδωση.

Η παρουσία κεγχροειδούς προτύπου στο πνευμονικό παρέγχυμα είναι πολύ σπάνιο, εμφανίζεται σε ποσοστό μικρότερο του 1% και θα πρέπει να γίνει διαφορική διάγνωση από άλλες ασθένειες που μπορεί να εμφανίσουν παρόμοιο πρότυπο όπως είναι η φυματίωση, οι πνευμονοκονιάσεις, οι μεταστάσεις, η ιστοπλάσμωση, η ιστιοκυττάρωση Langerhans και άλλες.^{27,4,47}



Εικόνα 11: Πνευμοθώρακας σαν επιπλοκή της πνευμονικής σαρκοείδωσης.⁴⁷

Προσβολή του υπεζωκότα

Η προσβολή του υπεζωκότα σε ασθενείς με σαρκοείδωση είναι σπάνια και απαντάται σε ποσοστό 1%-4%.

Τα ευρήματα είναι εξιδρωματική ή δυϊδρωματική υπεζωκοτική συλλογή, αιμοθώρακας ή χυλοθώρακας ο οποίος είναι εξαιρετικά σπάνιος και προκαλείται αν προσβληθούν μεσοθωρακικοί λεμφαδένες ή ο θωρακικός πόρος, πάχυνση του υπεζωκότα και πιο σπάνια παρουσία ασβετώσεων του υπεζωκότα.

Η υπεζωκοτική συλλογή σε ασθενείς με σαρκοείδωση εμφανίζεται συχνότερα στο δεξιό πνεύμονα (45%) από ότι στον αριστερό (33%) χωρίς να γνωρίζουμε την αιτία, ενώ σε ποσοστό 22% είναι αμφοτερόπλευρη.

Στο μεγαλύτερο ποσοστό είναι εξιδρωματική με αυξημένο αριθμό λεμφοκυττάρων και απαιτείται βιοψία υπεζωκότα για να τεθεί η διάγνωση της σαρκοείδωσης με την ανεύρεση μη νεκρωτικών κοκκιωμάτων, αποκλείοντας και τις άλλες κοκκιωματώδεις νόσους. Η υπεζωκοτική συλλογή εμφανίζεται σε ασθενείς με ενεργό νόσο στα στάδια I έως IV, συνήθως είναι περιορισμένη αν και έχουν αναφερθεί και εκτεταμένες συλλογές και υποχωρεί σε δύο με τρεις μήνες με την κατάλληλη θεραπεία με κορτικοειδή.^{27,32}

Αλλοιώσεις σαν υπεζωκοτικές πλάκες δημιουργούνται από την συνένωση των μικροοζιδίων στο παρέγχυμα δημιουργώντας βλάβες με ανώμαλα, καθορισμένα όρια, αμφοτερόπλευρα στους άνω και μέσο λοβούς σε επαφή με τον υπεζωκότα και μπορεί να συνδυάζονται με υπεζωκοτική συλλογή.²⁷

Προσβολή αεραγωγών

Η σαρκοείδωση προσβάλλει συχνότερα το αναπνευστικό σε ποσοστό 90% και κυρίως τους ενδοθωρακικούς λεμφαδένες και το πνευμονικό παρέγχυμα. Πολλοί κλινικοί ιατροί υποεκτιμούν τη προσβολή των αεραγωγών από την σαρκοείδωση καθώς είναι λιγότερο συχνή και της οποίας η συχνότητα αυξάνεται καθώς εξελίσσεται η προσβολή του πνευμονικού παρεγχύματος με αποτέλεσμα να αυξάνεται η νοσηρότητα, τα αναπνευστικά συμπτώματα και η θνητότητα. Όλα τα τμήματα των αεραγωγών από τη μύτη και το στόμα έως τα βρογχιόλια μπορεί να προσβληθούν από την σαρκοείδωση προκαλώντας εισπνευστικό συριγμό απόφραξη των αεραγωγών και βρογχεκτασίες.

Οι αρχικές μορφολογικές ανωμαλίες των προσβεβλημένων αεραγωγών είναι οίδημα και ερύθημα του βλεννογόνου των αεραγωγών και σχηματισμός κοκκιώματος. Καθώς η νόσος εξελίσσεται ο βλεννογόνος γίνεται οζώδης, κοκκιωματώδης, σκληρός και ινώδης.³³

Η προσβολή της μύτης, του στοματοφάρυγγα και της υπογλωττιδικής περιοχής παρατηρείται σε ποσοστό 6% των ασθενών με σαρκοείδωση. Η παρουσία οζιδίων στην γλωττίδα και υπογλωττιδικά προκαλούν δύσπνοια εισπνευστικό συριγμό, δυσφωνία, ερεθιστικό βήχα, δυσφαγία και οπισθορινική απόφραξη.

Η λαρυγγοσκόπηση και οι καμπύλες ροής-όγκου στον λειτουργικό έλεγχο της αναπνοής βοηθούν στην διάγνωση και την αντιμετώπιση. Σε ποσοστό μεγαλύτερο από 5% εμφανίζεται αποφρακτική άπνοια στον ύπνο στους ασθενείς με προσβολή των ανώτερων αεραγωγών από την σαρκοείδωση και συνοδό χειμελτοειδή λύκο (lupus pernio). Στην πλειοψηφία των ασθενών όμως η αποφρακτική άπνοια στον ύπνο οφείλεται κυρίως στην παχυσαρκία λόγω χορήγησης κορτικοειδών.³³

Ο λάρυγγας προσβάλλεται σε ποσοστό 1,2% και μπορεί να οδηγήσει σε απόφραξη των αεραγωγών απειλητική για την ζωή του ασθενούς. Η προσβολή του λάρυγγα αντιμετωπίζεται με συστηματική και τοπική έγχυση κορτικοειδών, χειρουργική επέμβαση, διάνοιξη με χρήση Laser CO και εξωτερική ακτινοβολήση. Παράλυση της αριστερής φωνητικής χορδής και βράγχος φωνής μπορεί να εμφανισθούν από την πίεση του αριστερού παλίνδρομου λαρυγγικού νεύρου από διογκωμένο λεμφαδένα και υποχωρούν με την χορήγηση κορτικοειδών συστηματικά. Η τραχεία και οι κύριοι βρόγχοι προσβάλλονται πιο σπάνια σε σχέση με τους λοβαίους, τους τμηματικούς, υποτμηματικούς και απομακρυσμένους βρόγχους και τα βρογχιόλια, στα οποία προκαλείται φλεγμονή του βλεννογόνου, σχηματισμός ενδοβρογχικών κοκκιωμάτων, βρογχική στένωση, εξωτερική συμπίεση, παραμόρφωση, βρογχεκτασίες, βρογχιολίτις, βρογχική υπεραντιδραστικότητα των αεραγωγών και αιμόπτυση.

Όλες οι παραπάνω καταστάσεις μπορεί να προκαλέσουν δυσλειτουργία των αεραγωγών και συμπτώματα από το αναπνευστικό.³³

Η βρογχική στένωση σύμφωνα με ορισμένες μελέτες εμφανίζεται σε ποσοστό 14%, ενώ στην αναδρομική μελέτη των Chambellan A.et al.(2005) στο σύνολο 2.500 ασθενών με σαρκοείδωση μόνο 18 παρουσίασαν βρογχική στένωση μεγαλύτερη από 50%. Η βρογχική στένωση μπορεί να είναι μονήρης ή πολλαπλή, σε λοβαίους ή τμηματικούς βρόγχους με ή χωρίς συμπτώματα και μπορεί να παρουσιασθεί σε οποιοδήποτε στάδιο πνευμονικής σαρκοείδωσης.

Είναι μία σπάνια αλλά σοβαρή εκδήλωση της νόσου, η διάγνωση τίθεται με την βρογχοσκόπηση και η θεραπεία με κορτικοειδή πρέπει να ξεκινήσει έγκαιρα καθώς

εξελίσσεται γρήγορα σε ινωτικές βλάβες οι οποίες δεν ανταποκρίνονται στην θεραπεία με κορτικοειδή.^{33,34}

Η προσβολή των βρογχιολίων μπορεί να εμφανισθεί στα αρχικά στάδια της σαρκοείδωσης και χωρίς προσβολή του πνευμονικού παρεγχύματος. Συχνό εύρημα στην αξονική τομογραφία θώρακος υψηλής ευκρίνειας είναι η παγίδευση αέρα (airtrapping) το οποίο αποτελεί ένδειξη νόσου μικρών αεραγωγών όπως επιβεβαιώνεται από τα ευρήματα του λειτουργικού ελέγχου της αναπνοής.

Η παραμόρφωση των αεραγωγών οφείλεται στις κοκκιωματώδεις αλλοιώσεις γύρω από αυτούς και στις βρογχιεκτασίες από έλξη στο στάδιο της πνευμονικής ίνωσης οι οποίες παρατηρούνται στο 40% των ασθενών που βρίσκονται στο στάδιο της ίνωσης.

Η βρογχική υπεραντιδραστικότητα παρατηρείται σε ποσοστό 20% των ασθενών με σαρκοείδωση, προκαλεί βήχα, δύσπνοια, συριγμό και είναι ανεξάρτητη από την προσβολή των αεραγωγών. Πιθανόν η μικρή διάμετρος των προσβεβλημένων αεραγωγών αυξάνει την αντίσταση αυτών με αποτέλεσμα την ψευδώς θετική ανταπόκριση στην βρογχοδιαστολή.³³

Η θεραπευτική προσέγγιση ασθενών με προσβολή των αεραγωγών από την σαρκοείδωση θα πρέπει να βασίζεται στην παρουσία και στην σοβαρότητα των συμπτωμάτων από το αναπνευστικό. Σε απουσία συμπτωμάτων ακόμα και αν ο λειτουργικός έλεγχος της αναπνοής δείχνει διαταραχή της λειτουργίας των αεραγωγών συνίσταται τακτική παρακολούθηση των ασθενών και όχι θεραπεία.³³

Λειτουργικός έλεγχος της αναπνοής

Η ακριβής εκτίμηση της επίπτωσης της δυσλειτουργίας των αεραγωγών σε ασθενείς που πάσχουν από σαρκοείδωση είναι δύσκολη. Ο λειτουργικός έλεγχος της αναπνοής είναι μία εξέταση η οποία χρησιμοποιείται στη αρχική αλλά και στην μετέπειτα παρακολούθηση των ασθενών που πάσχουν από πνευμονική σαρκοείδωση και παρουσιάζουν αποφρακτικού ή περιοριστικού τύπου διαταραχή του αναπνευστικού σε οποιοδήποτε στάδιο της πνευμονικής σαρκοείδωσης.

Η συχνότερη διαταραχή της αναπνευστικής λειτουργίας είναι η περιοριστικού τύπου που οφείλεται σε προσβολή του πνευμονικού παρεγχύματος και προκαλεί μείωση των πνευμονικών όγκων και του δείκτη διαχυτικής ικανότητας του μονοξειδίου του άνθρακα (TLCO). Η μειωμένη τιμή της TLCO αντανάκλα την διαταραχή της ικανότητας διάχυσης του μονοξειδίου του άνθρακα και επομένως και του οξυγόνου, λόγω της υψηλής συγγένειας του μονοξειδίου με την αιμοσφαιρίνη, διαμέσου της βασικής μεμβράνης των κυψελίδων λόγω προσβολής του πνευμονικού παρεγχύματος.^{11,33}

Αποφρακτικού τύπου διαταραχή της αναπνευστικής λειτουργίας παρατηρείται όπως προκύπτει από πολλές μελέτες σε ποσοστό 4% έως 75% των ασθενών και είναι αποτέλεσμα των χρόνιων παρεγχυματικών βλαβών που προκαλούν παραμόρφωση των αεραγωγών, σχηματισμό κύστεων, περιβρογχικές και περιβρογχιολικές ινώδεις αλλοιώσεις.

Η αποφρακτικού τύπου διαταραχή του αναπνευστικού παρατηρείται συχνότερα στους Αφροαμερικανούς ασθενείς σε ποσοστό 63% σε σχέση με τους Ευρωπαίους λευκής φυλής, τους Αμερικανούς και τους Ιάπωνες όπου παρατηρείται σε χαμηλότερο ποσοστό.³³

Προσβολή λεμφικού συστήματος

Η διόγκωση των περιφερικών λεμφαδένων σε ασθενείς με σαρκοείδωση είναι συχνή, εμφανίζεται περίπου στο ένα τρίτο των ασθενών, είναι ασυμπτωματικοί, κινητοί, μαλακής υφής, ποικίλου μεγέθους, δεν ελκοποιούνται και αποτελούν κατάλληλες θέσεις βιοψίας.

Οι πιο συχνοί προσβεβλημένοι λεμφαδένες είναι οι τραχηλικοί, μασχαλιαίοι και βουβωνικοί.

Στον τράχηλο προσβάλλονται συχνότερα οι οπίσθιοι από ότι οι πρόσθιοι. Συχνά προσβάλλεται ο σπλήνας σε ποσοστό 40%-80%.

Η διόγκωση του σπλήνα συνήθως είναι μικρή ενώ σπάνια μπορεί να παρουσιαστούν συμπτώματα σπληνομεγαλίας όπως τοπική πίεση και αιματολογικές διαταραχές λόγω υπερσπληνισμού (αναιμία, λευκοπενία, θρομβοκυτταροπενία).

Σημαντική σπληνομεγαλία είναι πολύ σπάνια και μπορεί να προκληθεί ρήξη σπλήνα αυτόματη ή τραυματική.^{3,1,4}

Προσβολή του δέρματος

Οι δερματικές βλάβες ως εκδήλωση της σαρκοείδωσης περιγράφηκαν για πρώτη φορά από τον Jonathan Hutchinson το 1877 σε ασθενή που έπασχε από δερματική σαρκοείδωση, ενώ αργότερα ανέφερε έναν δεύτερο ασθενή με βλάβες στη μύτη και στα αυτιά, χαρακτηριστικές του χειμετλοειδή λύκου (lupus pernio).⁴⁵

Οι δερματικές βλάβες σε ασθενείς με σαρκοείδωση είναι η δεύτερη συχνότερη εκδήλωση της σαρκοείδωσης, οι οποίες παρατηρούνται σε ποσοστό 25%-35% και εμφανίζονται συχνότερα και με σοβαρότερη μορφή στους Αφροαμερικανούς σε σχέση με τους Καυκάσιους.

Ταξινομούνται σε μη ειδικές αν δεν χαρακτηρίζονται από κοκκιωματώδη φλεγμονή και σε ειδικές όπου ανευρίσκονται κοκκιώματα στις αλλοιώσεις.

Σύμφωνα με την μελέτη ACCESS οι μη ειδικές βλάβες παρατηρούνται στο 24,2% των ασθενών με σαρκοείδωση και οι ειδικές στο 15,9% των ασθενών.^{35,45}

Το οζώδες ερύθημα είναι η πιο συχνή μη ειδική δερματική μορφή που εμφανίζεται στην οξεία σαρκοείδωση σε ποσοστό 10%, δεν σχετίζεται με την παρουσία κοκκιώματος και έχει καλή πρόγνωση καθώς υποχωρεί αυτόματα σε 6-8 εβδομάδες. Επομένως δεν είναι χρήσιμη η βιοψία του οζώδους ερυθήματος στην διάγνωση της σαρκοείδωσης.

Το οζώδες ερύθημα αποτελεί μία μη ειδική δερματική αντίδραση σε διάφορα αντιγόνα με τη συμμετοχή ανοσοποιητικών μηχανισμών. Υπάρχουν κάποιες άμεσες και έμμεσες ενδείξεις που υποστηρίζουν τη συμμετοχή της καθυστερημένης αντίδρασης υπερευαισθησίας τύπου IV έναντι σε διάφορα αντιγόνα.

Το οζώδες ερύθημα εμφανίζεται συχνότερα στους Ευρωπαίους, Πορτορικανούς, Μεξικανούς ασθενείς καθώς και σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας, ενώ εντοπίζεται σπανιότερα στους Ιάπωνες και στους Αφροαμερικανούς.

Δεν αποτελεί παθογνωμονικό εύρημα για την σαρκοείδωση καθώς ανευρίσκεται και σε άλλες παθήσεις όπως λοιμώξεις από σταφυλόκοκκο, μυκοβακτηρίδια, μυκόπλασμα, χλαμύδια, Yersinia, ιστοπλάσμα, κοκκιοδομύκητα, ιούς, βακτήρια και παράσιτα.

Η λήψη κάποιων αντιβιοτικών όπως πενικιλίνη, η λήψη αντισυλληπτικών, η εγκυμοσύνη και φλεγμονώδεις παθήσεις του εντέρου μπορεί να προκαλέσουν το σχηματισμό οζώδους ερυθήματος.

Χαρακτηρίζεται από κόκκινα οζίδια επώδυνα, συμμετρικά κατανομημένα στην πρόσθια επιφάνεια των κνημών, δεν ελκοποιούνται και παρουσιάζουν κυανό χρώμα μέχρι την πλήρη εξαφάνισή τους σε περίπου έξι εβδομάδες.

Όταν συνυπάρχει με το οζώδες ερύθημα πυρετός, αμφοτερόπλευρη πυλαία λεμφαδενοπάθεια και αρθραλγία αποτελεί το σύνδρομο Löfgren το οποίο είναι καλοήγη μορφή της σαρκοείδωσης και περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1950 από τους Löfgren και Lundback.

Σύμφωνα με μια μελέτη σε Νότιο-Ευρωπαίους η παρουσία του πολυμορφισμού HLA-DRB1*0301 σχετίζεται με καλύτερη πρόγνωση στο σύνδρομο Löfgren και αυτό ίσως να οφείλεται στην μειωμένη ανταπόκριση της Th1 κυτοκίνης.^{1,3,35,36,45}

Μία άλλη ειδική χαρακτηριστική μορφή δερματικής σαρκοείδωσης αποτελεί ο χειμετλοειδής λύκος (Lupus pernio) η οποία αποτελεί χρόνια μορφή και συνοδεύεται από οστικές κύστες, κοκκιωματώδεις αλλοιώσεις του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος, πνευμονική ίνωση και χρόνια ραγοειδίτιδα.

Οι αλλοιώσεις οι οποίες εντοπίζονται κυρίως στη μύτη, στα μάγουλα, στα χείλη και στα αυτιά χαρακτηρίζονται από διηθητικές κόκκινο-καφέ ή ροδόχρες πλάκες και εμφανίζονται συχνότερα σε γυναίκες Αφροαμερικανές (εικόνα 12,13,14).

Άλλες ειδικές δερματικές βλάβες οι οποίες παρατηρούνται στην χρόνια σαρκοείδωση είναι οι πλάκες, τα υποδόρια οζίδια, το κηλιδοβλατιδώδες εξάνθημα, αλλαγές σε παλιές ουλές, αλωπεκία, υπό ή υπέρχρωση του δέρματος και μπορούν να εμφανιστούν σε οποιοδήποτε μέρος του σώματος.

Οι σαρκοειδικές πλάκες είναι πιο πιθανό να δημιουργήσουν ουλή, απαιτούν θεραπεία και αποτελούν σοβαρότερη και συστηματική μορφή της νόσου.

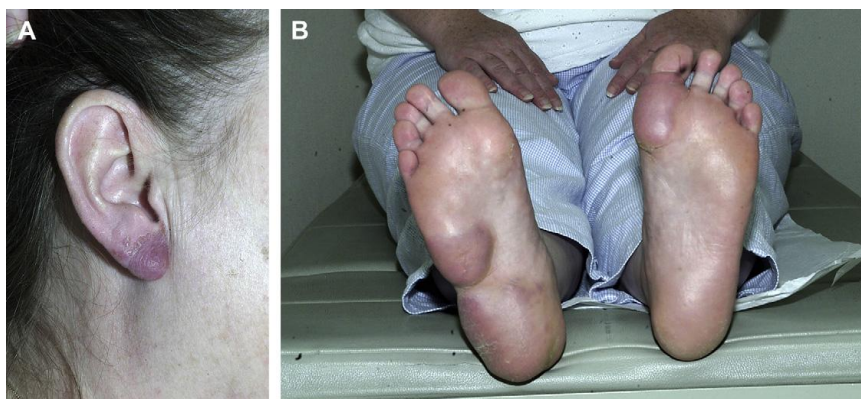
Οι παραπάνω δερματικές βλάβες δεν παρουσιάζουν κνησμό ή πόνο, δεν εξελκοποιούνται και στην βιοψία ανευρίσκεται μη τυροειδοποιημένο κοκκίωμα.

Η θεραπεία της δερματικής σαρκοείδωσης περιλαμβάνει κυρίως τοπικά και συστηματικά κορτικοειδή.

Εναλλακτικές θεραπείες με ανθελονοσιακά, μεθοτρεξάτη, τετρακυκλίνη, κυκλοφωσφαμίδη και ανταγωνιστές του παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF-α) εφαρμόζονται σε δύσκολες περιπτώσεις που ανθίσταται στην αγωγή πρώτης γραμμής.^{1,3,36,37,35,45}



Εικόνα 12: Δερματική σαρκοείδωση (lupus pernio) Κόκκινες - ροδόχρες σκληρές πλάκες και οζίδια στη μύτη και τα μάγουλα.³⁸



Εικόνα 13: Δερματική σαρκοείδωση (lupus pernio) αυτιού και άκρων ποδιών.⁴⁵



Εικόνα 14: Βλατίδες στο λαιμό και στο πρόσωπο πριν (A,C) και μετά (B,D) την θεραπεία με infliximab⁴⁵

Προσβολή ήπατος και γαστρεντερικού συστήματος

Η εξωθωρακική προσβολή από την σαρκοείδωση με ταυτόχρονη προσβολή των πνευμόνων παρουσιάζεται σε ποσοστό 50% των ασθενών ενώ είναι σπάνια η μη συμμετοχή των πνευμόνων. Η προσβολή του ήπατος από την σαρκοείδωση έχει διαπιστωθεί σε ποσοστό 11,5% από τους 736 ασθενείς που συμμετείχαν στην μελέτη ACCESS.

Η ηπατική σαρκοείδωση προσβάλλει κυρίως νεαρούς ενήλικες μεταξύ 20 και 40 ετών και σε διπλάσια συχνότητα εμφανίζεται στους μαύρους από ότι στους λευκούς. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης SAGA, γενετικής ανάλυσης της σαρκοείδωσης, σε διδύμους, στο 16% των ασθενών που παρουσίαζαν προσβολή του ήπατος, το άλλο προσβεβλημένο από σαρκοείδωση δίδυμο άτομο είχε τρεις φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να παρουσιάσει επίσης προσβολή του ήπατος. Συνοδεύεται συνήθως σε ποσοστό 20-50% από ασυμπτωματική αύξηση των ηπατικών ενζύμων κυρίως της αλκαλικής φωσφατάσης και των τρανσαμινασών.

Το επίπεδο αύξησης των ηπατικών ενζύμων εξαρτάται από το βαθμό κοκκιωματώδους φλεγμονής και ίνωσης του ηπατικού παρεγχύματος.^{39,40}

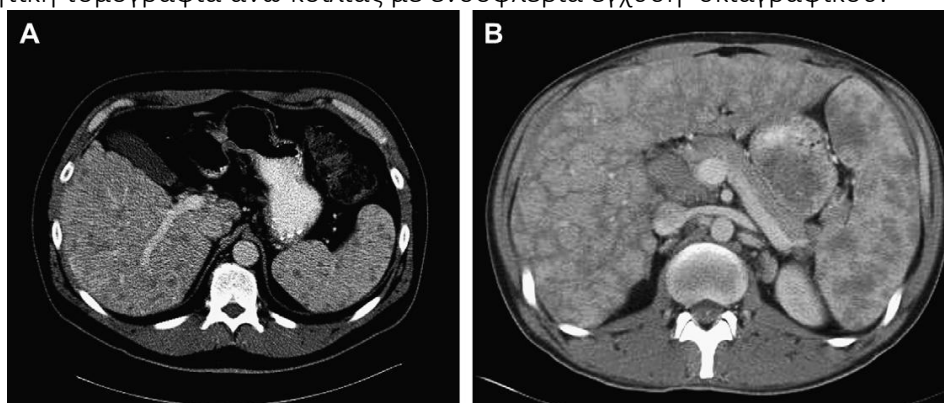
Έχει περιγραφεί από τους Ramin et al.(2010) μια σπάνια περίπτωση σαρκοείδωσης σε γυναίκα 49 ετών Αφροαμερικανικής καταγωγής με ηπατοσπληνική προσβολή χωρίς προσβολή των πνευμόνων και αύξηση του καρκινικού δείκτη Ca-125 ο οποίος

αποτελεί δείκτη καρκίνου ωοθηκών. Η διάγνωση ετέθη με βιοψία ήπατος και αποτελεί την πρώτη περίπτωση εντοπισμένης ηπατοσπληνικής σαρκοείδωσης που συνοδεύεται από αύξηση του καρκινικού δείκτη Ca-125.⁴³

Το 60% των ασθενών παρουσιάζουν γενικά μη ειδικά συμπτώματα όπως πυρετός, ανορεξία, νυχτερινές εφιδρώσεις, απώλεια βάρους, ίκτερο, κοιλιακό άλγος, ναυτία και εμετό, ενώ το ήπαρ είναι ψηλαφητό στο 20% των ασθενών.

Οι αλλοιώσεις στο ήπαρ και στο σπλήνα ανιχνεύονται στην αξονική τομογραφία κοιλίας σε ποσοστό 5% και 15% αντίστοιχα, με τη μορφή υπόπυκνων αναρίθμητων οζιδίων με διάμετρο από 1mm έως 3cm (εικόνα 15).

Χρήσιμο επίσης είναι και το υπερηχογράφημα άνω κοιλίας όπου μπορεί να ανιχνευθούν υπερηχογενή οζίδια και ετερογένεια του παρεγχύματος των σπλαχνικών οργάνων. Πιο ξεκάθαρη εικόνα των οζιδίων παρατηρείται στην μαγνητική τομογραφία άνω κοιλίας με ενδοφλέβια έγχυση σκιαγραφικού.^{39,40,45,14,1,3.}



Εικόνα 15: (Α) Υπόπυκνες αλλοιώσεις σαρκοείδωσης στο ήπαρ και στο σπλήνα. (Β) Οζώδεις διηθήσεις στο ήπαρ.⁴⁵

Σπάνια η προσβολή του ήπατος είναι σοβαρή προκαλώντας ίκτερο, χρόνια ενδοηπατική χολόσταση, πυλαία υπέρταση ή /και σύνδρομο Budd-Chiari λόγω θρόμβωσης ηπατικών φλεβών, ηπατοπνευμονικό σύνδρομο με ανθιστάμενη υποξαιμία και ηπατική κίρρωση που οδηγεί σε ηπατική ανεπάρκεια σε ποσοστό 1% των ασθενών με σαρκοείδωση οπότε και ενδείκνυται έναρξη θεραπείας.^{4,14,39,40}

Η διάγνωση της ηπατικής σαρκοείδωσης αποτελεί πρόκληση καθώς δεν υπάρχουν ειδικά συμπτώματα, σημεία, εργαστηριακά ή ακτινολογικά ευρήματα.

Επομένως η διάγνωση πρέπει να βασίζεται στα κλινικά και ακτινολογικά ευρήματα που υποδηλώνουν σαρκοείδωση σε συνδυασμό με την ανεύρεση των χαρακτηριστικών μη τυροειδοποιημένων κοκκιωμάτων στην βιοψία ήπατος, αφού αποκλεισθούν άλλες αιτίες σχηματισμού κοκκιώματος στο ήπαρ, όπως λέμφωμα, συμπαγής όγκος, πρωτοπαθή χολική κίρρωση, κοκκιωμάτωση Wegener, αντιδράσεις σε φάρμακα και έκθεση σε επαγγελματικούς ή περιβαλλοντικούς παράγοντες.

Η παρουσία κοκκιώματος στο ήπαρ ανιχνεύεται στο 60-80% των δειγμάτων βιοψίας του ήπατος.³⁹

Η θεραπεία της ηπατικής σαρκοείδωσης είναι αμφιλεγόμενη. Σε ασυμπτωματικούς ασθενείς δεν απαιτείται θεραπεία, η οποία καθορίζεται από τα συμπτώματα και από την σοβαρότητα της νόσου.

Τα κορτικοειδή αποτελούν την πρώτη γραμμή θεραπείας της ηπατικής σαρκοείδωσης, η οποία βελτιώνει τα συμπτώματα, μειώνει το μέγεθος του ήπατος,

τον αριθμό των ηπατικών κοκκιωμάτων και των ηπατικών ενζύμων, αλλά δεν επηρεάζει την εξέλιξη της νόσου. Εναλλακτικές θεραπείες περιλαμβάνουν την χορήγηση ανοσοκατασταλτικών όπως αζαθειοπρίνη, μεθοτρεξάτη, υδροξυχλωροκίνη και infliximab (αντι-TNF παράγοντας). Οι ασθενείς στους οποίους η ηπατική σαρκοείδωση εξελίσσεται σε χρόνια χολοστατική νόσο, πυλαία υπέρταση, και κίρρωση μπορεί να χρειασθούν μεταμόσχευση ήπατος.^{39,40,41}

Το ποσοστό προσβολής των άλλων τμημάτων του γαστρεντερικού συστήματος είναι μικρότερο του 1%. Συχνότερα προσβάλλεται το στομάχι και λιγότερο συχνά ο οισοφάγος, το λεπτό έντερο, το ορθό και το πάγκρεας. Η σαρκοείδωση μπορεί να παρουσιάσει παρόμοια κλινική εικόνα με την νόσο του Grohn, την φυματίωση, την λοίμωξη από μύκητες και τον καρκίνο στο πάγκρεας.¹

Μία σπάνια εντόπιση της σαρκοείδωσης είναι το λεπτό έντερο και συχνότερα το σιγμοειδές όπως δημοσιεύθηκε από τους Sami Daldoul et al.(2012) σε μία γυναίκα 64 ετών από την Τυνησία με ανενεργό πνευμονική σαρκοείδωση και συμπτωματολογία δυσκοιλιότητας και διάρροιας.

Τα συμπτώματα της νόσου δεν διαφέρουν από αυτά των άλλων παθήσεων του λεπτού εντέρου και περιλαμβάνουν διάρροιες, δυσκοιλιότητα, αιματοχεσία, τυμπανισμό, κοιλιακό άλγος, εμέτους, και απώλεια βάρους. Επομένως θα πρέπει να αποκλεισθούν άλλες κοκκιωματώδης νόσοι όπως η φυματίωση, μυκητιασική φλεγμονή, φλεγμονώδης νόσοι του εντέρου, καρκίνος και καθυστερημένη αντίδραση υπερευαισθησίας σε ξένα αντιγόνα, ώστε να τεθεί η διάγνωση της σαρκοείδωσης με βάση και το ιστορικό προσβολής και άλλων οργάνων από την σαρκοείδωση.⁴²

Η προσβολή του παγκρέατος είναι σπάνια. Σε ανασκόπησης της βιβλιογραφίας από τους Garcia C.et al.(1996) ανακάλυψαν μόνο 13 ασθενείς με αποδεδειγμένη, με βιοψία, προσβολή του παγκρέατος ή περιπαγκρεατικών λεμφαδένων.

Τα συμπτώματα των ασθενών με παγκρεατική προσβολή ποικίλουν. Τα δύο τρίτα των ασθενών παρουσιάζουν κοιλιακό άλγος και στα τρία τέταρτα αυτών συνυπάρχει αμφοτερόπλευρη πυλαία λεμφαδενοπάθεια.

Η διάγνωση τίθεται με την βιοψία του παγκρέατος καθώς τα εργαστηριακά και ακτινολογικά ευρήματα δεν διαφέρουν από τις άλλες φλεγμονώδεις ή κακοήθεις νόσους αυτού. Η πρόγνωση της παγκρεατικής σαρκοείδωσης είναι καλή.⁴⁸

Προσβολή των οφθαλμών

Οι οφθαλμοί προσβάλλονται με αυξημένη συχνότητα στους ασθενείς με σαρκοείδωση, η οποία κυμαίνεται από 10% έως 80% ανάλογα με τα αποτελέσματα των δημοσιευμένων μελετών και μπορεί να αποτελεί την πρώτη εκδήλωση της νόσου. Πιο συχνά προσβάλλονται οι Ιάπωνες, οι γυναίκες και άτομα της μαύρης φυλής.

Η σαρκοείδωση μπορεί να προσβάλλει κάθε τμήμα του οφθαλμού και χωρίς να υπάρχουν πάντα συμπτώματα, καθιστώντας απαραίτητη την οφθαλμολογική εξέταση συμπεριλαμβάνοντας και την εξέταση με σχισμοειδή λυχνία και τη βυθοσκόπηση, σε όλους τους ασθενείς που πάσχουν από σαρκοείδωση.

Παρουσία οζιδίων στον επιπεφυκότα που διαπιστώνονται μακροσκοπικά παρατηρείται σε ποσοστό 6-40% των ασθενών επιτρέποντας την ανεύρεση κοκκώματος στο 67% των περιπτώσεων.

Η πιο συχνή εκδήλωση οφθαλμικής προσβολής από την σαρκοείδωση είναι η πρόσθια ραγοειδίτιδα που εμφανίζεται σε ποσοστό 65% των ασθενών με οφθαλμολογική προσβολή και είναι συχνότερη στη μαύρη φυλή. Σύμφωνα με την μελέτη των Andrea D Birnbaum et al.(2011) η προσβολή του ραγοειδούς χιτώνα από την σαρκοείδωση παρατηρείται συχνότερα σε ασθενείς Αφροαμερικανικής καταγωγής ηλικίας μικρότερης των 50 ετών και σε καυκάσιους ηλικίας μεγαλύτερης των 50 ετών.

Η πρόσθια ραγοειδίτιδα μπορεί να εμφανισθεί κατά την έναρξη της νόσου με οξεία εμφάνιση και συμπτωματολογία που περιλαμβάνει φωτοφοβία, ερυθρότητα των οφθαλμών, θόλωση της όρασης ή να έχει χρόνια πορεία οδηγώντας σε γλαύκωμα και απώλεια τη όρασης, συχνότερα από την οξεία ραγοειδίτιδα, καθιστώντας απαραίτητη την λεπτομερή οφθαλμολογική εξέταση.

Η οξεία πρόσθια ραγοειδίτιδα μπορεί να συνυπάρχει με το σύνδρομο Löfgren και έχει καλή πρόγνωση. Παρόμοια, η ενδιάμεση ραγοειδίτιδα μπορεί να είναι συμπτωματική ή ασυμπτωματική.

Η οπίσθια ραγοειδίτιδα αναφέρεται στο 30% των ασθενών με οφθαλμική σαρκοείδωση εμφανίζεται συχνότερα στη λευκή φυλή και συχνά συνοδεύεται από προσβολή του κεντρικού νευρικού συστήματος.

Με βάση τα δεδομένα της μελέτης ACCESS η παρουσία του γενετικού πολυμορφισμού HLABRB1*0401 σε άτομα λευκής και μαύρης φυλής, φαίνεται να σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο οφθαλμικής σαρκοείδωσης. Σε ότι αφορά το οπίσθιο τμήμα του οφθαλμού, 25%-94% των ασθενών θα εμφανίσουν κάποιες αλλοιώσεις στο υαλοειδές, στον αμφιβληστροειδή, στον χοριοειδή ή στο οπτικό νεύρο.

Οι βλάβες μπορεί να έχουν την μορφή ουλών στον κερατοειδή, αγγειίτις του αμφιβληστροειδή, αιμορραγίας ή φλεγμονής εντός του υαλοειδούς, φλεγμονής του οπτικού νεύρου και παρουσία νεοαγγείων.

Στην εξέταση του αμφιβληστροειδή, το συχνότερο εύρημα είναι οι διηθήσεις στον αμφιβληστροειδή και το χοριοειδές με κατανομή γύρω από τις φλέβες και εικόνα σαν «λιωμένο κερί». Συχνά είναι και τα ευρήματα από το υαλοειδές όπου παρατηρούνται στρόγγυλες ποικίλου μεγέθους αλλοιώσεις γνωστές ως «μπάλες χιονιού».

Η φλουρο-αγγειογραφία είναι μια εξέταση που μπορεί να εκτιμήσει το βαθμό προσβολής των αγγείων του αμφιβληστροειδή και την νεοαγγείωση του χοριοαμφιβληστροειδή και να εντοπίσει την υποκλινική προσβολή του οπίσθιου ραγοειδούς σε ασθενείς που παρουσιάζουν περιορισμένη πρόσθια ραγοειδίτιδα.

Η προσβολή του οπίσθιου τμήματος του οφθαλμού αποτελεί σοβαρή επιπλοκή και απειλεί την όραση του ασθενούς. Η πρόσθια και οπίσθια ραγοειδίτιδα συνυπάρχει σε ποσοστό 10-15% των ασθενών που πάσχουν από ραγοειδίτιδα.

Η φλεγμονή και των τριών τμημάτων των οφθαλμών του πρόσθιου του ενδιάμεσου και του οπίσθιου τμήματος του ραγοειδούς χιτώνα ή η πανραγοειδίτις είναι αρκετά συχνή και αποτελεί φτωχό προγνωστικό δείκτη.

Η οπτική νευροπάθεια είναι σπάνια και μπορεί να προκαλέσει ταχεία και μόνιμη απώλεια της όρασης χωρίς την άμεση και κατάλληλη συστηματική θεραπεία.

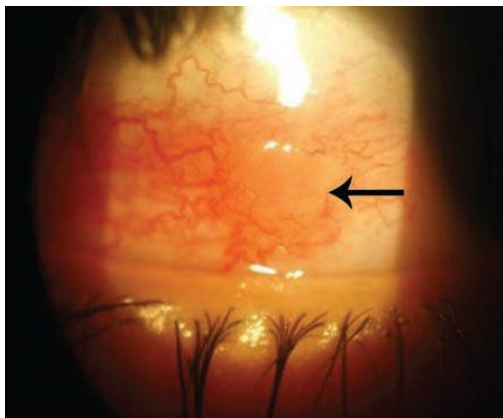
Η οξεία ραγοειδίτιδα μπορεί να υποχωρήσει αυτόματα ή με τοπική θεραπεία με κορτικοειδή ενώ στην οπίσθια ραγοειδίτιδα είναι απαραίτητη η συστηματική θεραπεία.

Επίσης έχει παρατηρηθεί προσβολή του σκληρού (εικόνα 16).

Η προσβολή των δακρυϊκών αδένων ή η δακρυοκυστίτις είναι συχνά ευρήματα που εντοπίζονται στο σπινθηρογράφημα με γάλλιο με την χαρακτηριστική εικόνα panda (αμφοτερόπλευρη συμμετρική διόγκωση δακρυϊκών αδένων και παρωτίδων), και μπορεί να οδηγήσει σε κερατοεπιπεφυκίτιδα.

Η αμφοτερόπλευρη διόγκωση των δακρυϊκών αδένων είναι σπάνια (εικόνα 17).

Έχει περιγραφεί φλεγμονή των περιοφθαλμικών ιστών με αποτέλεσμα τη παρουσία εξόφθαλμου που μοιάζει με την κλινική εικόνα της νόσου του Graver's.



Εικόνα 16: Μονόπλευρη οζώδης επισκληρίτις σε ασθενή 13 ετών.⁴⁶



Εικόνα 17: Προσβολή εν τω βάθει δακρυϊκού αδένος.⁴⁵

Η θεραπεία της οφθαλμικής σαρκοείδωσης περιλαμβάνει κυρίως τα κορτικοειδή. Η αρχική θεραπεία της ραγοειδίτιδας περιλαμβάνει τοπικά κορτικοειδή ενώ συστηματικά κορτικοειδή χορηγούνται σε υποτροπιάζουσα ραγοειδίτιδα, στην χρόνια και οπίσθια ραγοειδίτιδα και σε περιπτώσεις με φτωχή ανταπόκριση στην τοπική θεραπεία, καθώς και σε προσβολή των δακρυϊκών αδένων και του οπτικού νεύρου.

Η θεραπεία με κορτικοειδή μπορεί να προκαλέσει επιπλοκές στους οφθαλμούς, όπως καταρράκτη και γλαύκωμα, με αποτέλεσμα να κρίνεται, σε ορισμένες περιπτώσεις, απαραίτητη η χρήση εναλλακτικών θεραπειών με ανοσοκατασταλτικούς παράγοντες.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αναδρομικής μελέτης 11 ασθενών με πανραγοειδίτιδα η μεθοτρεξάτη είναι αποτελεσματική εναλλακτική θεραπεία.

Σε ασθενείς που δεν είναι ανεκτή η λήψη μεθοτρεξάτης έχει διαπιστωθεί ότι είναι εξίσου αποτελεσματική η χρήση της λεφλουνομίδης, της αζαθειοπρίνης, και του αντι-TNF παράγοντα στην θεραπεία της οφθαλμικής σαρκοείδωσης.^{3,4,14,44,45}

Προσβολή της καρδιάς

Η προσβολή της καρδιάς από την σαρκοείδωση παρατηρείται σε μεγαλύτερη συχνότητα στους Ιάπωνες και ιδιαίτερα στις γυναίκες ηλικίας άνω των 50 ετών από ότι στους Ευρωπαίους και Αμερικανούς και εκδηλώνεται κλινικά σε ποσοστό περίπου 5%, ενώ το κοκκίωμα ανευρίσκεται σε αυτοψία σε ποσοστό 20-25% των ασθενών.³

Μπορεί να εκδηλωθεί σε οποιοδήποτε στάδιο εξέλιξης της νόσου και προσβάλλει συχνότερα το μυοκάρδιο της αριστερής κοιλίας και ιδιαίτερα το μεσοκοιλιακό διάφραγμα και το ελεύθερο πλάγιο τοίχωμα της αριστερής κοιλίας.

Τα κλινικά χαρακτηριστικά της καρδιακής σαρκοείδωσης περιλαμβάνουν συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια, υπερκοιλιακές ή κοιλιακές αρρυθμίες, ταχυαρρυθμίες ή βραδυαρρυθμίες, διαταραχές αγωγιμότητας, κοιλιακό ανεύρυσμα, περικαρδιακή συλλογή και αιφνίδιος θάνατος.^{3,49}

Σύμφωνα με την μελέτη των J-Peter Smedema et al.(2011) όπου συμμετείχαν 101 ασθενείς με πνευμονική σαρκοείδωση, το ποσοστό της καρδιακής σαρκοείδωσης ήταν χαμηλό 4% και η πρόγνωση ήταν καλή. Στους ασθενείς με καρδιακή σαρκοείδωση που παρουσίαζαν καρδιακή ανεπάρκεια ή κοιλιακές αρρυθμίες παρατηρήθηκε σημαντική νοσηρότητα και θνητότητα σε ποσοστό 25% κατά την διάρκεια παρακολούθησής τους για διάστημα 15 μηνών.

Επομένως κρίνεται απαραίτητος ο έλεγχος όλων των ασθενών, με πνευμονική σαρκοείδωση, με ηλεκτροκαρδιογράφημα και σε ασθενείς με ανεξήγητη κόπωση, δύσπνοια ή αίσθημα παλμών, θα πρέπει να γίνεται περαιτέρω καρδιολογικός έλεγχος με υπερηχογράφημα ή μαγνητική τομογραφία καρδιάς. Στο ηλεκτροκαρδιογράφημα παρατηρούνται παθολογικά ευρήματα σε ποσοστό 50% των ασθενών με συστηματική σαρκοείδωση και χωρίς κλινικές εκδηλώσεις.

Συχνά το ηλεκτροκαρδιογράφημα αν και αποτελεί σημαντική εξέταση για την εκτίμηση των ασθενών, μπορεί να μην είναι διαγνωστικό, ενώ η 24ωρη παρακολούθηση του καρδιακού ρυθμού με την τοποθέτηση Holter έχει ευαισθησία και ειδικότητα 67% και 62% αντίστοιχα, σύμφωνα με την μελέτη των Suzuki et al.(1994), όταν υπάρχουν έκτοποι κοιλιακοί παλμοί πάνω από 100 ανά ημέρα.^{3,14,49,50}

Σύμφωνα με την προοπτική μελέτη των Metha et al.(2008) η καρδιολογική εξέταση των ασθενών που πάσχουν από σαρκοείδωση με ηλεκτροκαρδιογράφημα, υπερηχογράφημα καρδιάς και Holter ρυθμού παρουσιάζει 100% ευαισθησία και 87% ειδικότητα στην ανίχνευση καρδιακής σαρκοείδωσης.⁵¹

Τα ευρήματα στο υπερηχογράφημα Doppler καρδιάς ποικίλουν και μπορεί να παρατηρηθούν τμηματικές διαταραχές της κινητικότητας του τοιχώματος του μυοκαρδίου, πάχυνση του μεσοκοιλιακού τοιχώματος, λέπτυνση του κοιλιακού τοιχώματος, σχηματισμός ανευρύσματος, διαστολική δυσλειτουργία αριστερής κοιλίας, ενώ η συστολική λειτουργία μπορεί να είναι φυσιολογική.

Η διαστολική δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας ίσως αποτελεί μία πρόωμη ένδειξη κοκκιωματώδους προσβολής του μυοκαρδίου.

Τα περισσότερα από αυτά τα ευρήματα απαντώνται και στην ισχαιμία, οπότε είναι απαραίτητος ο αποκλεισμός στεφανιαίας νόσου με στεφανιογραφία.^{50,52}

Στην μελέτη των Mehta et al.(2008) το υπερηχογράφημα καρδιάς έχει ευαισθησία 25% και ειδικότητα 95%.⁵¹

Στην διάγνωση της καρδιακής σαρκοείδωσης συμβάλλουν και άλλες εξετάσεις όπως το σπινθηρογράφημα με θάλλιο 201, όπου παρατηρούνται περιοχές μειωμένης πρόσληψης στο κοιλιακό μυοκάρδιο οι οποίες εξαφανίζονται ή μειώνονται σε

μέγεθος, κατά την κόπωση ή την χορήγηση διπυριδαμόλης. Αυτά τα ευρήματα δεν είναι όμως ειδικά για την διάγνωση της καρδιακής σαρκοείδωσης, καθώς ανευρίσκονται και σε άλλης αιτιολογίας μυοκαρδιοπάθειες οι οποίες πρέπει να αποκλεισθούν. Στην διάγνωση της καρδιακής σαρκοείδωσης συμβάλλει και το σπινθηρογράφημα με γάλλιο-67 όπου παρατηρούνται ευρήματα στην καρδιά αλλά και εξωκαρδιακά, καθιστώντας αυτή τη εξέταση χρήσιμη στην ανίχνευση κατάλληλων θέσεων βιοψίας για την διάγνωση της σαρκοείδωσης και για την παρακολούθηση της ενεργότητας της νόσου. Στους ασθενείς όπου υπάρχουν ευρήματα και στο σπινθηρογράφημα με θάλλιο-201 και στο γάλλιο-67, η καρδιακή προσβολή είναι σοβαρότερη.⁵²

Άλλες διαγνωστικές εξετάσεις οι οποίες συμβάλλουν στην διάγνωση της καρδιακής σαρκοείδωσης είναι η ολόσωμη τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων με 18-φλουροδεοξυ-γλυκόζη (18-FDG PET) και η μαγνητική τομογραφία καρδιάς με γαδολίνιο. Στην μαγνητική καρδιάς τα ευρήματα σε οξεία προσβολή του μυοκαρδίου από την σαρκοείδωση είναι εντοπισμένες περιοχές πάχυνσης και αύξηση της έντασης του σήματος T2 και πρώιμη ενίσχυση των εικόνων με γαδολίνιο, καθώς και περιοχές με διαταραχές κινητικότητας του τοιχώματος του μυοκαρδίου. Σε σοβαρή καρδιακή προσβολή μπορεί να παρατηρηθεί διάχυτη πάχυνση του μυοκαρδίου, διαταραχές συσταλτικότητας, περιοριστική μυοκαρδιοπάθεια και καρδιακή ανεπάρκεια.^{52,53}

Η βιοψία του μυοκαρδίου έχει χαμηλή διαγνωστική απόδοση μικρότερη του 20% καθώς η προσβολή του μυοκαρδίου είναι τμηματική και τα κοκκιώματα εντοπίζονται κυρίως στην αριστερή κοιλία και στο μεσοκοιλιακό διάφραγμα σε σχέση με την δεξιά κοιλία όπου συνήθως γίνονται οι βιοψίες.¹⁴

Η προσβολή της καρδιάς από την σαρκοείδωση αποτελεί ένδειξη έναρξη θεραπείας καθώς υπάρχει αυξημένος κίνδυνος αιφνίδιου θανάτου, ακόμα και σε υποψία καρδιακής προσβολής και αρνητική βιοψία του μυοκαρδίου.

Η θεραπεία περιλαμβάνει τη χορήγηση κορτικοειδών σε υψηλές δόσεις 60-80mg ανά 24ωρο σε σοβαρή καρδιακή προσβολή με σταδιακή μείωση σε διάστημα 6 μηνών. Άλλες αποτελεσματικές θεραπείες, οι οποίες χρησιμοποιούνται όταν δεν είναι ανεκτές ή αντενδείκνυται οι υψηλές δόσεις κορτικοειδών, είναι η χορήγηση αζαθειοπρίνης, μεθοτρεξάτης, κυκλοφωσφαμίδης και ο αναστολέας του παράγοντα νέκρωσης TNF-α. Δεν υπάρχει ομοφωνία σχετικά με την διάρκεια της θεραπείας, ενώ υποτροπή μπορεί να παρουσιασθεί κατά την μείωση της αγωγής.

Η θεραπεία της καρδιακής σαρκοείδωσης περιλαμβάνει αντιαρρυθμική αγωγή για τον έλεγχο της κοιλιακής ταχυκαρδίας, ενώ σε τελικού σταδίου νόσο με ανθεκτική κοιλιακή ταχυαρρυθμία, σοβαρή καρδιακή ανεπάρκεια κυρίως σε νεαρά άτομα η μόνη θεραπεία είναι η μεταμόσχευση καρδιάς. Η έγκαιρη έναρξη της αγωγής με κορτικοειδή πριν την εμφάνιση της συστολικής δυσλειτουργίας μπορεί να αποτρέψει την μεταμόσχευση καρδιάς.⁵⁰

Προσβολή του νευρικού συστήματος

Το νευρικό σύστημα προσβάλλεται από την σαρκοείδωση σε ποσοστό 5-13% των περιπτώσεων και μπορεί να αποτελεί μεμονωμένη προσβολή ή στα πλαίσια συστηματικής σαρκοείδωσης. Προσβάλλει συχνότερα ηλικίες 33 έως 41 ετών κυρίως στην μαύρη φυλή και τις γυναίκες, όπως και η συστηματική σαρκοείδωση.

Το 50% των ασθενών παρουσιάζουν γενικευμένη νόσο και το 30-70% αυτών παρουσιάζει νευρολογικά συμπτώματα. Η νευροσαρκοείδωση είναι ασυμπτωματική στο 10% των περιπτώσεων, ενώ τα συμπτώματα και τα σημεία για την διάγνωσή της δεν είναι ειδικά. Η νευροσαρκοείδωση μπορεί να προσβάλλει τις ενδοκρανιακές δομές όπως τις λεπτές μήνιγγες του εγκεφάλου, τα κρανιακά νεύρα και τον υποθάλαμο, καθώς και τον νωτιαίο μυελό, τα περιφερικά νεύρα και μυς.

Η κρανιακή νευροπάθεια είναι η πιο συχνή εκδήλωση, ενώ τα κρανιακά νεύρα που προσβάλλονται συχνότερα είναι το προσωπικό και το οπτικό νεύρο.

Άλλες εκδηλώσεις αποτελούν η άσηπτη μηνιγγίτιδα, ο υδροκέφαλος η περιφερική νευροπάθεια και η μυοπάθεια. Βλάβες στο παρέγχυμα του εγκεφάλου ανευρίσκονται στο 50% των ασθενών με την μορφή εγκεφαλοπάθειας, αγγειοπάθειας, σπασμοί εστιακοί ή γενικευμένοι, εστιακές βλάβες ή όγκοι.

Οι μήνιγγες του εγκεφάλου προσβάλλονται σε ποσοστό 20-40%, ενώ ο νωτιαίος μυελός προσβάλλεται σε ποσοστό μικρότερο του 10%.

Αυτόματη βελτίωση ή ύφεση των συμπτωμάτων παρατηρείται στο 60% των ασθενών με νευροσαρκοείδωση. Το ποσοστό θνητότητας κυμαίνεται από 1% έως 5% όπως και στις άλλες σοβαρές μορφές πνευμονικής και καρδιακής σαρκοείδωσης.

Τα συμπτώματα της κρανιακής σαρκοείδωσης ποικίλουν και συνήθως περιλαμβάνουν πονοκέφαλο, αταξία, διαταραχές της όρασης, κόπωση, ναυτία, έμετο.

Άλλα συμπτώματα που μπορούν να εμφανισθούν ανάλογα με την περιοχή που εντοπίζεται η φλεγμονώδη διεργασία, είναι διαταραχές αισθητικότητας, αδυναμία, σπασμοί, γνωσιακές διαταραχές, κατάθλιψη, αφασία, τρόμος, οφθαλμικός πόνος, και ενδοκρινικές διαταραχές όπως άποιος διαβήτης, υπερπρολακτιναιμία.

Η διάγνωση της νευροσαρκοείδωσης αποτελεί πρόκληση καθώς και άλλες παθήσεις έχουν παρόμοια κλινική εικόνα.

Τα κριτήρια για την διάγνωση της νευροσαρκοείδωσης περιλαμβάνουν, συμβατές κλινικές εκδηλώσεις, ιστολογική επιβεβαίωση με την ανεύρεση μη τυροειδοποιημένου κοκκιώματος σε οποιοδήποτε ιστό και απεικονιστικές ή εργαστηριακές εξετάσεις που να ενισχύουν την διάγνωση. Η αξονική τομογραφία εγκεφάλου μπορεί να εντοπίσει ευρήματα όπως τον υδροκέφαλο, ενδοκρανιακές ασβεστώσεις και οζίδια, αλλά είναι λιγότερο ευαίσθητη από την μαγνητική εγκεφάλου η οποία μπορεί να ανιχνεύσει φλεγμονή των μηνίγγων, διεγκεφαλκή προσβολή, πάχυνση και ενίσχυση των κρανιακών νεύρων, υδροκέφαλο και παρεγχυματικές βλάβες σε ποσοστό 40%. Μη ειδικά είναι τα ευρήματα από την εξέταση του εγκεφαλονωτιαίου υγρού όπου διαπιστώνεται λεμφοκυττάρωση, αυξημένα επίπεδα πρωτεϊνών, μειωμένα επίπεδα γλυκόζης και υψηλή πίεση.

Αυτά τα ευρήματα συμβάλλουν στον αποκλεισμό άλλων ασθενειών με νευρολογικά συμπτώματα. Αυξημένα επίπεδα του ενζύμου ACE στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό αποτελεί μη ειδικό εύρημα το οποίο απαντάται, σύμφωνα με αναδρομικές μελέτες, με χαμηλή ευαισθησία 24-55% αλλά με υψηλή ειδικότητα 94-95%.

Το εγκεφαλογράφημα μπορεί να ανακαλύψει εστιακή ή γενικευμένη επιβράδυνση, αλλά συνήθως είναι φυσιολογικό, εκτός αν ο ασθενής παρουσιάζει σπασμούς. Το εγκεφαλογράφημα αποτελεί χρήσιμη εξέταση για την εκτίμηση της περιφερικής εγκεφαλοπάθειας.

Σε όλες τις μορφές νευροσαρκοείδωσης τα κορτικοειδή αποτελούν πρώτη γραμμή θεραπείας. Δεν υπάρχουν κλινικές μελέτες που να καθορίζουν την δοσολογία των

κορτικοειδών η οποία εξατομικεύεται ανάλογα με τη βαρύτητα των συμπτωμάτων και την ανταπόκριση, ενώ η συνηθέστερη δοσολογία που χρησιμοποιείται είναι 40-80mg το 24ωρο. Σε σοβαρότερες μορφές νευρολογικής νόσου μπορεί να χορηγηθούν κορτικοειδή ενδοφλεβίως. Στις περιπτώσεις που δεν είναι ανεκτή η αγωγή με τα κορτικοειδή, χορηγούνται ανοσοκατασταλτικοί παράγοντες που περιλαμβάνουν την μεθοτρεξάτη, την κυκλοσπορίνη, την αζαθειοπρίνη, την κυκλοφωσφαμίδη, την χλωραμβουκίλη, την χλωροκίνη, την mycophenolate mofetil και τον αναστολέα του παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF-α), χωρίς την ίδια ανταπόκριση σε όλες τις περιπτώσεις.

Σύμφωνα με την μελέτη των Michael Moravan et al.(2009) η συνδυασμένη θεραπεία της νευροσαρκοείδωσης με mycophenolate mofetil και infliximab (αναστολέας του παράγοντα νέκρωσης TNF-α) είναι αποτελεσματική και πολλά υποσχόμενη, καθώς οι ασθενείς παρουσίασαν βελτίωση των νευρολογικών συμπτωμάτων χωρίς σοβαρές παρενέργειες από την αγωγή. Απαιτούνται όμως περαιτέρω μελέτες που να επιβεβαιώνουν αυτά τα αποτελέσματα κι αυτή η αγωγή συστήνεται αυστηρά σε ασθενής με αποδεδειγμένη με βιοψία σαρκοείδωση.^{54,55,56,57}

Προσβολή των νεφρών

Η προσβολή των νεφρών από την σαρκοείδωση είναι σπάνια και αναφέρεται σε ποσοστό 0,7% των περιπτώσεων σαρκοείδωσης.^{3,58}

Η συχνότερη εκδήλωση είναι η κοκκιωματώδης διάμεση νεφρίτιδα η οποία σπάνια προκαλεί νεφρική ανεπάρκεια. Άλλες εκδηλώσεις της προσβολής των νεφρών από την σαρκοείδωση αποτελούν η νεφρολιθίαση, υπερασβεστιαμία, υπερασβεστιουρία, νεφρασβέστωση, προσβολή των νεφρικών σωληναρίων και σπειραματονεφρίτιδα. Έχουν περιγραφεί στην διεθνή βιβλιογραφία περιπτώσεις μεμονωμένης νεφρικής προσβολής από την σαρκοείδωση σε συνδυασμό με εργαστηριακά ευρήματα διαταραχής του μεταβολισμού του ασβεστίου και η διάγνωση ετέθη με βιοψία νεφρού.^{3,59,60,61,62}

Η υπερασβεστιουρία παρατηρείται σε ποσοστό 40% των ασθενών που πάσχουν από σαρκοείδωση, η υπερασβεστιαμία σε ποσοστό 11% και η νεφρολιθίαση σε ποσοστό 10%.¹⁴ Στην διαταραχή του μεταβολισμού του ασβεστίου συμμετέχουν τα μακροφάγα του σαρκοειδικού κοκκιώματος, τα οποία περιλαμβάνουν το ένζυμο 1α-υδροξυλάση η οποία μετατρέπει την 25-υδροξυκαλσιφερόλη στον πιο ενεργό μεταβολίτη της βιταμίνης D, την 1,25-διυδροξυκαλσιφερόλη, με αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή ασβεστίου που οδηγεί σε υπερασβεστιαμία.

Άλλες αιτίες που προκαλούν υπερασβεστιαμία, όπως ο παραθυρεοειδισμός πρέπει να αποκλειστούν.⁵⁴

Η εναπόθεση ασβεστίου στα νεφρά μπορεί να οδηγήσει σε κάποιες περιπτώσεις σε νεφρική ανεπάρκεια.¹⁴ Οι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί που ευθύνονται για την νεφρική ανεπάρκεια είναι, η υπερασβεστιαμία, η αφυδάτωση, η νεφρασβέστωση και η προσβολή των διαμέσων σωληναρίων.⁶²

Το συχνότερο ιστολογικό εύρημα είναι η κοκκιωματώδης διάμεση νεφρίτιδα σε ποσοστό 0,5%-0,9% και ανευρίσκεται εκτός από την σαρκοείδωση και σε άλλες καταστάσεις όπως σε επιπλοκές από φάρμακα, φλεγμονές, εναπόθεση κρυστάλλων, παραπρωτεϊναιμία, κοκκιωμάτωση Wegener και ιδιοπαθής.

Επομένως τα ιστολογικά ευρήματα από την βιοψία νεφρού σε ποσοστό 50% δεν είναι ειδικά για την διάγνωση της σαρκοείδωσης, αλλά η συσχέτισή τους με τα εργαστηριακά ευρήματα διαταραχής του μεταβολισμού του ασβεστίου μπορούν να θέσουν την διάγνωση της σαρκοείδωσης, καθιστώντας επιβεβλημένη την βιοψία νεφρού σε ασθενείς με οξεία νεφρική βλάβη.⁵⁸

Για την αντιμετώπιση της ασβεστιουρίας και υπερασβεστιαϊκής συστήνεται στον ασθενή αποφυγή έκθεσης στον ήλιο και χρήση ρούχων με μακριά μανίκια και προϊόντων ρουχισμού που μπλοκάρουν την υπεριώδη ακτινοβολία, καθώς και αυστηρή διαιτητική αγωγή όπου αποφεύγονται τα γαλακτοκομικά και τα τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα με βιταμίνη D και ασβέστιο.⁵⁴

Πρώτης γραμμής θεραπεία για την νεφρική προσβολή από την σαρκοείδωση καθώς και για την υπερασβεστιαϊκή και την ασβεστιουρία αποτελούν τα κορτικοειδή σε δοσολογία 1mg/Kg/ημέρα. Σε ασθενείς που υπάρχουν αντενδείξεις για την χορήγηση κορτικοειδών ή παρατηρείται θεραπευτική αποτυχία με τα κορτικοειδή και παρουσιάζουν συχνές υποτροπές κατά την μείωσή τους, χορηγούνται εναλλακτικά υδροξυχλωροκίνη, κυκλοφωσφαμίδη, infliximab, αζαθειοπρίνη, μυκοφαινόλη μοφελ. Μια εναλλακτική θεραπεία αποτελεί η χορήγηση κετοκοναζόλης η οποία αναστέλλει το ενζυμικό σύστημα που είναι συνδεδεμένο με το κυτόχρωμα P450 και το οποίο συμμετέχει στην σύνθεση της 25υδροξυD3-1α-υδροξυλάσης, με αποτέλεσμα της μείωση της παραγωγής ασβεστίου. Παρόμοιο μηχανισμό δράσης παρουσιάζει και η χορήγηση της υδροξυχλωροκίνη. Τα αποτελέσματα των εναλλακτικών θεραπειών ποικίλουν ανάλογα με την ανταπόκριση του ασθενούς.^{54,58,61}

Προσβολή του μυοσκελετικού συστήματος

Η προσβολή των οστών από την σαρκοείδωση όπως αναφέρεται σε πολλές μελέτες κυμαίνεται από 1% έως 13% ανάλογα με την εθνικότητα αλλά και τα διαγνωστικά κριτήρια που χρησιμοποιούνται.^{63,64} Η προσβολή των οστών παρατηρείται συχνότερα στις γυναίκες και σε ασθενείς της μαύρης φυλής και σχετίζεται με χρόνια πολυσυστηματική προσβολή.

Τα όργανα που προσβάλλονται συχνότερα από την σαρκοείδωση όταν υπάρχει και οστική προσβολή είναι οι πνεύμονες (80-90%), το δέρμα (χειμετλοειδής λύκος) (48-70%) και οι οφθαλμοί (ραγοειδίτιδα) (30-50%).⁶³

Η προσβολή των οστών σε ποσοστό 50% των ασθενών είναι ασυμπτωματική και ανιχνεύεται σε τυχαίο ακτινολογικό έλεγχο. Συνήθως προσβάλλει τα μικρά οστά των χεριών και των ποδιών, κυρίως τις μεσαίες και άπω φάλαγγες, αλλά και οποιοδήποτε άλλο οστό. Τα χέρια προσβάλλονται συχνότερα από τα πόδια και μπορεί να παρουσιασθεί δακτυλίτιδα.

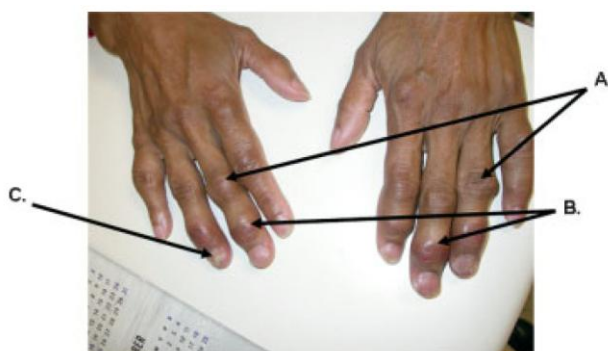
Τα συχνότερα συμπτώματα περιλαμβάνουν τοπικό οίδημα, πόνο και ερύθημα του υποδόριου ιστού, καθώς και ακαμψία (εικόνα 18). Σπάνια προσβάλλονται τα μακριά οστά, οι σπόνδυλοι, τα πλευρά, τα οστά του κρανίου και της λεκάνης. Η προσβολή των οστών της σπονδυλικής στήλης μπορεί να προκαλέσει πόνο και νευρολογικές διαταραχές.

Η προσβολή των οστών του προσώπου συνήθως συνοδεύεται από κοκκιωμάτωσης αλλοιώσεις παραρρινίων κόλπων, του δέρματος και του βλεννογόνου της μύτης και των δακρυϊκών αδένων.

Οι αλλοιώσεις του προσώπου μπορεί να μιμούνται νεοπλάσματα, κοκκιωμάτωση Wegener, λέπρα, σύφιλη, μυκητίαση, ή άλλες κοκκιωματώδης φλεγμονές. Έχουν περιγραφεί μεμονωμένες περιπτώσεις πληκτροδαχτυλίας με ή χωρίς υπερτροφική οστεοαρθροπάθεια. Οι οστικές αλλοιώσεις ανιχνεύονται με απλές ακτινογραφίες οστών, όπου τα ακτινολογικά ευρήματα δεν είναι ειδικά. Τα συχνότερα ευρήματα είναι οστεολυτικές βλάβες στα μικρά οστά των χεριών και των ποδιών και οστεοσκληρυντικές αλλοιώσεις στα μακριά οστά και στους σπονδύλους.

Οι οστεολυτικές βλάβες συνήθως συνοδεύονται από το σχηματισμό κύστεων οι οποίες είναι μικρές εντοπισμένες αλλοιώσεις κεντρικές ή περιφερικές. Οι μεγάλες κύστεις που καταλαμβάνουν και το φλοιό και το μυελό του οστού προκαλούν παθολογικά κατάγματα. Η οστεοσκληρύωση παρατηρείται σπανιότερα από την οστεόλυση και όταν προσβάλλει τα μικρά οστά χεριών και ποδιών προκαλεί τον σχηματισμό οζιδίων στην μυελώδη κοιλότητα του οστού. Επίσης μπορεί να παρατηρηθεί ακροοστεοσκληρύωση με τον σχηματισμό οζιδίων στις τελικές φάλαγγες των δαχτύλων. Με την μαγνητική τομογραφία οστών και την τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PET) ανιχνεύεται αυξημένη δραστηριότητα στα προσβεβλημένα οστά.^{54,63,64}

Η θεραπεία της προσβολής των οστών από την σαρκοείδωση είναι περιορισμένη και χωρίς ικανοποιητικά αποτελέσματα. Πρώτη γραμμής θεραπεία αποτελούν τα κορτικοειδή τα οποία μειώνουν τον πόνο και το οίδημα, αλλά επηρεάζουν ελάχιστα τις οστικές βλάβες. Επιπλέον τα κορτικοειδή αυξάνουν τον κίνδυνο οστεοπόρωσης και αυτόματων καταγμάτων και επιταχύνουν την μείωση της οστικής μάζας. Για την αποφυγή των παραπάνω παρενεργειών των κορτικοειδών μπορεί να χορηγηθούν εναλλακτικά μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη για την αντιμετώπιση των συμπτωμάτων. Εναλλακτικές θεραπείες περιλαμβάνουν την χορήγηση αναστολέα του παράγοντα TNF- α (infliximab), ανοσοκατασταλτικών παραγόντων όπως μεθοτρεξάτη, αζαθειοπρίνη και ανθελονοσιακών όπως υδροξυχλωροκίνη χωρίς όμως τεκμηριωμένα αποτελέσματα.^{63,64}



Εικόνα 18: Στην εικόνα φαίνεται: **(Α)** οίδημα και ερύθημα των εγγύς φαλαγγικών αρθρώσεων, **(Β)** οίδημα και ερύθημα των άπω φαλαγγικών αρθρώσεων και **(C)** δυστροφικές αλλοιώσεις των νυχιών.⁶⁴

Η προσβολή των μυών από την σαρκοείδωση αποτελεί συχνότερη εκδήλωση από την προσβολή των οστών και εμφανίζεται σε ποσοστό έως 75% των ασθενών. Όπως η προσβολή των οστών έτσι και η προσβολή των μυών σχετίζεται με χρόνια νόσο και συχνά είναι ασυμπτωματική. Σε περιπτώσεις πιθανής προσβολής των μυών, στη

βιοψία μυός ανευρίσκεται μη τυροειδοποιημένο κοκκίωμα σε ποσοστό 20-75% των ασθενών ακόμα όταν απουσιάζουν τα συμπτώματα από τους μύες.

Σε συμπτωματικές περιπτώσεις η μυοπάθεια εκδηλώνεται ως οξώδη μυοπάθεια, χρόνια μυοπάθεια ή οξεία μυοσίτιδα. Η οξώδη μυοπάθεια είναι σπάνια και εκδηλώνεται με την παρουσία πολλαπλών ψηλαφητών οζιδίων που μοιάζουν με όγκοι. Η χρόνια μυοπάθεια προσβάλλει πολλές μυϊκές ομάδες και χαρακτηρίζεται από προοδευτική αδυναμία και αναπηρία σε διάστημα μηνών ή και ετών. Προσβάλλει συχνότερα τις γυναίκες και εντοπίζεται συμμετρικά στους εγγύς μύες και σπανιότερα στους μυς του κορμού και του λαιμού, ενώ εξελίσσεται αργά και σταθερά, αλλά και με υφέσεις και εξάρσεις, παρουσιάζοντας παρόμοια κλινική εικόνα με την μυϊκή δυστροφία από την οποία πρέπει να διαφοροδιαγνωστεί. Η χορήγηση κορτικοειδών στην χρόνια μυοπάθεια ελάχιστα βελτιώνει τους ασθενείς με σοβαρή αναπηρία.

Τα κορτικοειδή, η μεθοτρεξάτη και η αζαθειοπρίνη χορηγούνται στις σοβαρές μορφές οξώδους και χρόνιας μυοπάθειας χωρίς όμως κλινικά αποδεδειγμένα αποτελέσματα. Πιο σπάνια μορφή μυοπάθειας αποτελεί η οξεία μυοσίτιδα η οποία συνήθως εκδηλώνεται μαζί με την οξεία αρθρίτιδα σε αρχικό στάδιο της σαρκοείδωσης και σε ασθενείς ηλικίας μικρότερης των 40 ετών.

Οι ασθενείς με οξεία μυοσίτιδα παρουσιάζουν οίδημα των μυών, διάχυτες μυαλγίες, σύσπαση των μυών, υπερτροφία αυτών καθώς και μη ειδικά συμπτώματα όπως πυρετό και κόπωση. Σπάνια παρατηρείται γενικευμένη αδυναμία.

Η κλινική εικόνα της οξείας μυοσίτιδας μιμείται την πολυμυοσίτιδα, επομένως κρίνεται απαραίτητη η βιοψία μυών για την διαφορική διάγνωση αυτών των δύο νοσημάτων.

Στην θεραπεία της οξείας μυοσίτιδας η χορήγηση μεθοτρεξάτης παρουσιάζει ικανοποιητικά αποτελέσματα, σε αντίθεση με την ενδοφλέβια χορήγηση ανοσοσφαιρίνης, την θεραπεία με τον αντι- TNF-α παράγοντα ή την μυκοφαινόλητη μοφετίλ.^{63,64,54}

Η προσβολή των αρθρώσεων αφορά το 25% των ασθενών με εξαίρεση τους Ιάπωνες στους οποίους η εμφάνιση της αρθρίτιδας σε ασθενείς με σαρκοείδωση είναι σπάνια και μόνο το 1,6% των ασθενών παρουσιάζει αρθραλγίες. Η αρθρίτιδα σε ασθενείς που πάσχουν από σαρκοείδωση απαρτίζεται από δύο κατηγορίες, την παροδική οξεία μορφή και την επίμονη χρόνια μορφή αρθρίτιδας.⁶⁴

Η οξεία πολυαρθρίτιδα εμφανίζεται σε ποσοστό 10-39% των ασθενών που πάσχουν από σαρκοείδωση και ειδικά στο αρχικό στάδιο της νόσου.

Συνήθως συνυπάρχει πυρετός, αμφοτερόπλευρη πυλαία λεμφαδενοπάθεια και οξώδες ερύθημα στα πλαίσια του συνδρόμου Löfgren.

Η οξεία αρθρίτιδα είναι συμμετρική και προσβάλλει συχνότερα τους αστραγάλους σε ποσοστό 77-100%, καθώς και τα γόνατα, τις μικρές αρθρώσεις των χεριών ή των ποδιών, τους καρπούς και τους αγκώνες σε ποσοστό 15-40%. Συνοδεύεται από άλγος στην προσβεβλημένη άρθρωση, οίδημα των μαλακών μορίων αυτής, καθώς και παρουσία αρθρικού υγρού εντός αυτής σε μερικές περιπτώσεις.

Ο ακτινολογικός έλεγχος της άρθρωσης μπορεί να μην είναι διαγνωστικός καθώς δεν ανευρίσκονται παθολογικά ευρήματα ή παρατηρείται μόνο οίδημα των παρακείμενων ιστών.

Οι Visser et al.(2002) πρότειναν κάποια κριτήρια για την διάγνωση της αρθρίτιδας σε ασθενείς με σαρκοείδωση.

Για να τεθεί η διάγνωση της αρθρίτιδας ο ασθενής θα πρέπει να παρουσιάζει τρία από τα τέσσερα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

- (1) οζώδες ερύθημα,
- (2) διάρκεια συμπτωμάτων μεγαλύτερη των δύο μηνών,
- (3) ηλικία άνω των 40 ετών και
- (4) συμμετρική αρθρίτιδα των αστραγάλων.

Τα παραπάνω διαγνωστικά κριτήρια παρουσιάζουν ευαισθησία 99% και ειδικότητα 93%. Επομένως η διάγνωση μπορεί να τεθεί με βάση τα κλινικά χαρακτηριστικά χωρίς να χρειασθεί παρακέντηση του αρθρικού υγρού ή βιοψία του αρθρικού υμένα. Εμφανίζεται συχνότερα την άνοιξη και στην αρχή του καλοκαιριού, προσβάλλει κυρίως τις γυναίκες, και τους ασθενείς με το γονίδιο HLA-B8. Η πρόγνωσή της είναι καλή και υποχωρεί αυτόματα σε διάστημα δύο μηνών σε ποσοστό 85% των ασθενών. Η θεραπεία περιλαμβάνει μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη ή κολχικίνη για την αντιμετώπιση των συμπτωμάτων σε ήπιες μορφές, ενώ σε πιο σοβαρές μορφές χορηγούνται κορτικοειδή.^{63,64}

Η χρόνια αρθρίτιδα εμφανίζεται σε ποσοστό 1-4% των ασθενών που πάσχουν από σαρκοείδωση και προσβάλλει τα γόνατα, τους αγκώνες, τους καρπούς, τα χέρια ή και τα πόδια. Μπορεί να εκδηλωθεί είτε ως μη παραμορφωτική συνοδευόμενη από κοκκιωμάτωση του αρθρικού επιθηλίου, είτε ως παραμορφωτική μη καταστροφική (παραμόρφωση Jaccoud), είτε ως οίδημα της άρθρωσης, είτε ως οίδημα ενός δακτύλου. Συχνά συνυπάρχει συλλογή αρθρικού υγρού στην προσβεβλημένη άρθρωση και πάχυνση του αρθρικού υμένα. Η διαφορική διάγνωση περιλαμβάνει την αντιδραστική αρθρίτιδα και την ρευματοειδή αρθρίτιδα, ειδικά σε συμμετρική προσβολή των αρθρώσεων και σε αυξημένες τιμές του ρευματοειδή παράγοντα.

Σε κάποιες περιπτώσεις κρίνεται απαραίτητη η βιοψία του αρθρικού υμένα για να τεθεί η διάγνωση.

Η χρόνια αρθρίτιδα σε ασθενείς με σαρκοείδωση σπάνια ανταποκρίνεται στην θεραπεία και παρά τα λίγα κλινικά δεδομένα χορηγούνται εμπειρικά θεραπείες που περιλαμβάνουν κορτικοειδή, ή ανθελνοσιακά, ή ανοσοκατασταλτικά σε ασθενείς που δεν ανταποκρίνονται στα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη.^{63,64}

Προσβολή των παρωτίδων

Η αμφοτερόπλευρη διόγκωση των παρωτίδων όταν συνυπάρχει με εμπύρετο, πάρεση του προσωπικού νεύρου και πρόσθια ραγοειδίτιδα αποτελεί το σύνδρομο Heerfordt.

Σε ποσοστό 6% των ασθενών παρατηρείται ετερόπλευρη ή αμφοτερόπλευρη φλεγμονή των παρωτίδων με οίδημα, άλγος και διόγκωση των αδένων, ενώ στο 40% των ασθενών η διόγκωση των παρωτίδων υποχωρεί αυτόματα.¹

Ενδοκρινολογικές εκδηλώσεις

Έχουν αναφερθεί, σε ασθενείς που πάσχουν από σαρκοείδωση, περιπτώσεις άποιου διαβήτη που οφείλεται σε προσβολή της υπόφυσης ή του υποθαλάμου από την νόσο.

Σπάνιες εκδηλώσεις αποτελούν ο υπερθερεοειδισμός, ο υποθυρεοειδισμός, η υποθερμία και η καταστολή των επινεφριδίων.¹

Προσβολή του αναπαραγωγικού συστήματος

Συνηθέστερα προσβάλλεται το γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα και οι μαστοί, όπου παρατηρούνται ασυμπτωματικά οζίδια στη μήτρα ή στο στήθος.

Σπάνια προσβάλλεται το ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα, κυρίως οι όρχεις και η επιδιδυμίδα και σε κάποιες περιπτώσεις συγχέεται με τον καρκίνο όρχεων με αποτέλεσμα το ένα τρίτο των ασθενών να υποβάλλονται σε άσκοπη ορχεκτομή. Επομένως κρίνεται απαραίτητη η ιστολογική επιβεβαίωση του καρκίνου όρχεων, ειδικά όταν προσβάλλεται και η επιδιδυμίδα, πριν την ορχεκτομή.¹

Σαρκοείδωση και εγκυμοσύνη

Η σαρκοείδωση δεν επιδρά αρνητικά στην εγκυμοσύνη, ενώ η βελτίωση της νόσου κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης παραμένει αμφιλεγόμενη. Είναι σαφές ότι η σαρκοείδωση μπορεί να επιδεινωθεί τους πρώτους έξι μήνες μετά τον τοκετό για αυτό κρίνεται απαραίτητη η ακτινογραφία θώρακος και η στενή παρακολούθηση της ασθενούς αυτό το διάστημα.

Η συχνότητα εμφάνισης αυτόματης έκτρωσης ή αποβολής ή γενετικών ανωμαλιών του εμβρύου δεν διαφέρει σε γυναίκες που πάσχουν από σαρκοείδωση σε σχέση με τις γυναίκες που δεν πάσχουν από την συγκεκριμένη νόσο.

Η εγκυμοσύνη θα πρέπει να αποφεύγεται κατά την διάρκεια της θεραπείας με κορτικοειδή λόγω πιθανής τοξικότητας στο έμβρυο ή τερατογένεσης.

Επίσης αντενδείκνυται η εγκυμοσύνη σε περιπτώσεις σοβαρής προσβολής οργάνων και σε σοβαρή αναπνευστική ανεπάρκεια.^{1,3}

Σαρκοείδωση στα παιδιά

Η εμφάνιση της σαρκοείδωσης στα παιδιά ηλικίας μικρότερης των 15 ετών είναι σπάνια σε σχέση με τους ενήλικες και ακόμα πιο σπάνια σε ηλικία μικρότερη των 4 ετών.

Σύμφωνα με την μελέτη του Hoffmann et al.(2004) η επίπτωση της σαρκοείδωσης σε παιδιά ηλικίας μικρότερα των 4 ετών ήταν 0,06 περιπτώσεις ανα 100.000 παιδιά, ενώ η συχνότητα αυξάνονταν προοδευτικά με την ηλικία και στις ηλικίες 14-15 ετών η επίπτωση ήταν 1,02 περιπτώσεις ανα 100.000 παιδιά.

Από τις μέχρι τώρα μελέτες δεν παρατηρείται υπεροχή κάποιου φύλου κατά την προσβολή των παιδιών από την σαρκοείδωση, σε αντίθεση με τους ενήλικες όπου προσβάλλονται συχνότερα οι γυναίκες.

Οι κλινικές εκδηλώσεις στα μεγαλύτερα παιδιά είναι όμοιες με αυτές των ενηλίκων και προσβάλλονται πιο συχνά οι πνεύμονες, οι λεμφαδένες και τα μάτια, ενώ σε παιδιά ηλικίας μικρότερης των 4 ετών προεξάρχουν οι δερματικές βλάβες, η πολυαρθρίτιδα, η ραγοειδίτιδα και σπάνια παρατηρείται ενδοθωρακική προσβολή (εικόνα 19).

Παρόμοιες κλινικές εκδηλώσεις με την παιδική σαρκοείδωση παρουσιάζει η οικογενή νεανική μορφή της συστηματικής κοκκιωμάτωσης, γνωστή ως σύνδρομο Blau.

Τα παιδιά που πάσχουν από το σύνδρομο Blau παρουσιάζουν κοκκιωματώδη αρθρίτιδα, εκδηλώσεις από τα μάτια και το δέρμα, αλλά δεν προσβάλλονται οι πνεύμονες, το δερματικό τεστ του Kveim-Siltzbach είναι αρνητικό και η γενετική

μετάλλαξη της πρωτεΐνης CARD15 σχετίζεται μόνο με αυτό το σύνδρομο και όχι με την σαρκοείδωση.

Η διάγνωση της σαρκοείδωσης στα παιδιά τίθεται με βάση τα συμβατά κλινικοακτινολογικά ευρήματα σε συνδυασμό με το ιστολογικό εύρημα του μη τυροειδοποιημένου κοκκιώματος στο προσβεβλημένο όργανο και αφού αποκλειστούν άλλες κοκκιωματώδης νόσοι.

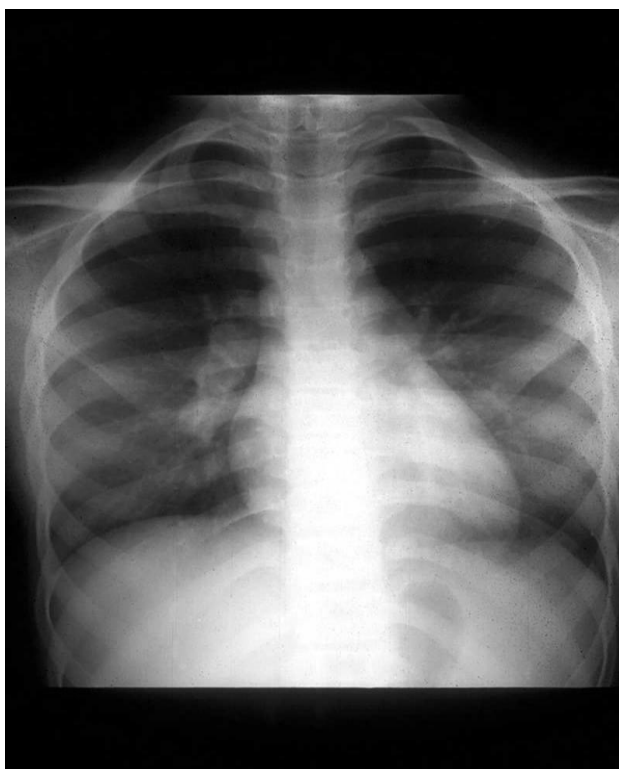
Η θεραπεία εκλογής σε παιδιά με συστηματική σαρκοείδωση αποτελούν τα κορτικοειδή.

Εναλλακτική θεραπεία αποτελεί η μεθοτρεξάτη η οποία έχει χρησιμοποιηθεί με ασφάλεια σε χαμηλές δόσεις σε κάποια παιδιά και με ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Οι ανοσοκατασταλτικοί παράγοντες όπως είναι η αζαθειοπρίνη, η κυκλοσπορίνη, η κυκλοφωσφαμίδη και η χλωραμβουκίλη δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερη αποτελεσματικότητα στους ενήλικες, ενώ αυξάνουν το κίνδυνο για λεμφοϋπερπλαστικές διαταραχές και καρκίνο, για αυτό αποφεύγεται η χορήγησή τους στα παιδιά.

Έχει περιγραφεί μεμονωμένη περίπτωση χορήγησης μουκοφενολάτης μοφετίλ σε συνδυασμό με χαμηλή δόση κορτικοειδών σε έφηβο ασθενή που έπασχε από μεμονωμένη νεφρική προσβολή από σαρκοείδωση η οποία προκάλεσε νεφρική ανεπάρκεια.

Η πρόγνωση της σαρκοείδωσης στα παιδιά είναι καλύτερη από αυτή των ενηλίκων εκτός από τη μορφή που εμφανίζεται σε ηλικία μικρότερη των 4 ετών.^{3,14,66}



Εικόνα 19: Ακτινογραφία θώρακος ενός κοριτσιού ηλικίας 10 ετών που πάσχει από σαρκοείδωση και παρουσιάζει πυλαία λεμφαδενοπάθεια.⁶⁶

Σαρκοείδωση και τρίτη ηλικία

Ενδιαφέρον έχει η αναδρομική μελέτη των Pascal Chevalet et al.(2004) στην οποία συμμετείχαν τριάντα ασθενείς ηλικίας άνω των εβδομήντα ετών, των οποίων η διάγνωση της σαρκοείδωσης ετέθη στο πανεπιστημιακό νοσοκομείο Nantes της Γαλλίας. Το 63% των ασθενών παρουσίαζαν ενδοθωρακικά και συστηματικά συμπτώματα και διαπιστώθηκε ότι η εκδήλωση της σαρκοείδωσης διέφερε στα μεγαλύτερης ηλικίας άτομα από ότι στους νεότερους.

Τα συμπτώματα με τα οποία εκδηλώνεται η σαρκοείδωση σε ηλικιωμένους είναι σοβαρότερα, ενώ στις ενδοπνευμονικές μορφές η διάγνωση τίθεται από τις λειτουργικές αναπνευστικές δοκιμασίες.

Η βιοψία θεωρείται απαραίτητη όταν υπάρχει υποψία σαρκοείδωσης σε ηλικιωμένους, ανεξαρτήτου κλινικής μορφής της νόσου και θα πρέπει να προτιμάται η βιοψία σιελογόνου αδένος η οποία είναι απλή και βοηθάει στην διάγνωση χωρίς περαιτέρω εξετάσεις. Κατευθυνόμενες βιοψίες είναι επίσης χρήσιμες στην διάγνωση δύσκολων περιπτώσεων σε συνδυασμό με τη βρογχοκυψελιδική έκπλυση (BAL), το ολόσωμο σπινθηρογράφημα με γάλλιο και την αντιφυματική θεραπεία.

Η προσβολή των οργάνων καθώς και η εξέλιξη της νόσου στους ηλικιωμένους δεν διαφέρει από τους νεότερους και με την κατάλληλη θεραπεία ακόμα και οι ηλικιωμένοι μπορούν να βελτιώσουν ή να σταθεροποιήσουν τη νόσο και να βελτιώσουν την ποιότητα ζωής τους.¹⁷

Σαρκοείδωση και σπάνιες περιπτώσεις

Η σαρκοείδωση μπορεί να συνυπάρχει με άλλες αυτοάνοσες παθήσεις, όπως είναι τα νοσήματα του συνδετικού ιστού. Το σκληρόδερμα απαντάται συχνότερα στον ασθενή που πάσχει από σαρκοείδωση, αλλά και το σύνδρομο Sjogren, η αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα, η πρωτοπαθή χολική κίρρωση και αυτοάνοσα νοσήματα του θυρεοειδούς.³ Επώδυνη διόγκωση των σιελογόνων παρατηρείται σε ποσοστό 4% των ασθενών, ενώ μπορεί να παρατηρηθούν ξηροστομία και ξηροφθαλμία, εκδηλώσεις που μοιάζουν με αυτές του συνδρόμου Sjogren.⁶⁷

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η συσχέτιση της σαρκοείδωσης με την νόσο του Crohn και άλλες κοκκιωματώδης νόσους αγνώστου αιτιολογίας, καθώς και με λεμφοϋπερπλαστικές διαταραχές και συμπαγείς όγκους.³

Μία σπάνια επιπλοκή της χρόνιας μορφής της σαρκοείδωσης αποτελεί η εμφάνιση πνευμονικής υπέρτασης. Μελέτες έχουν δείξει ότι η πίεση στην πνευμονική αρτηρία αυξάνεται σε ποσοστό 6%-23% των ασθενών σε ηρεμία και στο 43% των ασθενών σε κόπωση. Ο συνηθέστερος μηχανισμός πρόκλησης πνευμονικής υπέρτασης στην σαρκοείδωση αποτελεί η πνευμονική ίνωση η οποία ευθύνεται για τις αλλοιώσεις των πνευμονικών αγγείων.

Στις περιπτώσεις σαρκοείδωσης όπου απουσιάζει η πνευμονική ίνωση, η πνευμονική υπέρταση προκαλείται από την κοκκιωματώδη διήθηση των πνευμονικών αρτηριολίων ή από το συνυπάρχον υπνοαπνοϊκό σύνδρομο το οποίο παρατηρείται συχνά σε ασθενείς με σαρκοείδωση. Επομένως η πνευμονική υπέρταση μπορεί να εμφανισθεί σε ασθενείς που πάσχουν από σαρκοείδωση ανεξάρτητα από τον βαθμό προσβολής του πνευμονικού παρεγχύματος και αποτελεί μία σοβαρή επιπλοκή της

νόσου η οποία πρέπει να διαγνωσθεί έγκαιρα καθώς αυξάνει σημαντικά την θνητότητα και την θνησιμότητα.

Κάθε ασθενής με δύσπνοια η οποία δεν δικαιολογείται από την πνευμονική προσβολή από την σαρκοείδωση, θα πρέπει να ελέγχεται για πνευμονική υπέρταση, ενώ η θεραπευτική προσέγγιση της είναι όμοια με αυτή της ιδιοπαθούς πνευμονικής υπέρτασης χωρίς όμως τεκμηριωμένα αποτελέσματα.^{14,68}

Διάγνωση

Η διάγνωση της σαρκοείδωσης αποτελεί πρόκληση καθώς δεν παρουσιάζει ειδικά κλινικά χαρακτηριστικά στις περισσότερες περιπτώσεις. Σε ασθενείς με συμπτώματα από το αναπνευστικό και το δέρμα διαγιγνώσκεται έγκαιρα η νόσος, ενώ στις υπόλοιπες περιπτώσεις καθυστερεί.²

Σύμφωνα με την μελέτη των Marc A.Judson et al.(2003) στο ένα τρίτο των ασθενών που έπασχαν από σαρκοείδωση, η διάγνωση τέθηκε τρεις μήνες μετά την έναρξη των συμπτωμάτων και σε πάνω από ένα τέταρτο των ασθενών η διάγνωση καθυστέρησε έξι μήνες από την έναρξη των συμπτωμάτων. Επίσης σύμφωνα με τη συγκεκριμένη μελέτη η διάγνωση της σαρκοείδωσης τέθηκε από τον πρώτο ιατρό σε χαμηλό ποσοστό 15,3% των περιπτώσεων ενώ σε περισσότερους από τους μισούς ασθενείς απαιτήθηκαν τέσσερις ή και περισσότερες επισκέψεις στους ιατρούς ώστε να τεθεί η διάγνωση της σαρκοείδωσης.¹⁶

Η παρουσία δερματικών βλαβών σχετίζεται με συντομότερη διάγνωση της σαρκοείδωσης σε χρονικό διάστημα μικρότερο των έξι μηνών από την πρώτη επίσκεψη στον ιατρό λόγω βιοψίας των συγκεκριμένων βλαβών.

Επίσης σύμφωνα με την ίδια μελέτη οι ασθενείς με συμπτωματολογία από το αναπνευστικό παρουσίαζαν μεγαλύτερη καθυστέρηση στην διάγνωση της σαρκοείδωσης σε σχέση με τους ασθενείς χωρίς συμπτώματα από το αναπνευστικό καθώς προηγούνταν άλλες διαγνώσεις και καθυστέρουσε ο ακτινολογικός έλεγχος των πνευμόνων.

Επομένως σε ασθενείς όπου συνυπάρχουν συμπτώματα από το αναπνευστικό και εξωπνευμονικά, συμβατά με σαρκοείδωση θα πρέπει να γίνεται έγκαιρα ακτινογραφία θώρακος με στόχο την έγκαιρη διάγνωση και αντιμετώπιση της σαρκοείδωσης.¹⁶

Η λήψη λεπτομερούς ιατρικού ιστορικού και η προσεκτική κλινική εξέταση μπορούν να βοηθήσουν στην διάκριση της σαρκοείδωσης από άλλες πιθανές διαγνώσεις.

Βιοψία

Η διάγνωση της σαρκοείδωσης βασίζεται στον συνδυασμό συμβατών κλινικών και ακτινολογικών ευρημάτων που υποστηρίζονται από την ιστολογική επιβεβαίωση του μη τυροειδοποιημένου επιθηλιοειδούς κοκκιώματος σε ένα ή περισσότερα όργανα και τον αποκλεισμό κακοήθειας ή μικροοργανισμών όπως είναι το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης, μύκητες ή άλλων παθήσεων που προκαλούν το σχηματισμό κοκκιώματος όπως λέπρα, βηρυλλίωση, πνευμονίτιδα από υπερευαισθησία, νόσος του Grohn, πρωτοπαθή χολική κίρρωση.²⁷

Σε ασθενείς με σύνδρομο Löfgren (οζώδες ερύθημα, πυρετός, αρθρίτιδα, και πυλαία λεμφαδενοπάθεια στην ακτινογραφία θώρακος), το σύνδρομο Heerfort (πυρετός, παρωτίτιδα, ραγοειδίτιδα) και με την χαρακτηριστική εικόνα Panda στο ολόσωμο σπινθηρογράφημα με γάλλιο-67 όπου παρατηρείται πρόσληψη του γαλλίου από τις παρωτίδες και τους δακρυικούς αδένες και την εικόνα Lambda όπου παρατηρείται πρόσληψη του γαλλίου από τον δεξιό παρατραχειακό μεσοθωρακικό και του πυλαίους λεμφαδένες αμφοτερόπλευρα, δεν απαιτείται βιοψία καθώς η διάγνωση τίθεται με ασφάλεια με βάση τα κλινικοακτινολογικά ευρήματα.²⁶

Σε όλες τις άλλες περιπτώσεις οι εξετάσεις που είναι απαραίτητες για την διάγνωση της σαρκοείδωσης είναι η βρογχοσκόπηση με διαβρογχική βιοψία (TBLB), η συμβατική βιοψία λεμφαδένων μέσω βελόνης (TBNA), η βρογχοκυψελιδική έκπλυση (BAL) και σε κάποιες περιπτώσεις η μεσοθωρακοσκόπηση.¹⁸

Όπου είναι απαραίτητη η βιοψία θα πρέπει να γίνει στο πιο εύκολα προσβάσιμο προσβεβλημένο όργανο όπως είναι το δέρμα, οι περιφερικοί λεμφαδένες, οι δακρυικοί αδένες ή ο επιπεφυκότας.

Στις περιπτώσεις που απαιτείται πνευμονικός ιστός, η διαβρογχική βιοψία κατά την διάρκεια της βρογχοσκόπησης μπορεί να θέσει την διάγνωση σε μεγάλο ποσοστό που κυμαίνεται σύμφωνα με την μελέτη των Susan Garwood et al.(2007) από 46%-90%, αν ληφθούν βιοψίες από περισσότερα από ένα τμήματα του πνεύμονα.

Πολλοί ερευνητές πιστεύουν ότι χρειάζονται 4-6 δείγματα διαβρογχικής βιοψίας από διαφορετικά τμήματα πνεύμονα σε σαρκοείδωση σταδίου II και έως 10 βιοψίες σε στάδιο I, ώστε να αυξηθεί το ποσοστό ευαισθησίας της μεθόδου.

Καθώς το σαρκοειδικό κοκκίωμα δεν παρουσιάζει ειδικά ιστολογικά χαρακτηριστικά από τα άλλα κοκκιώματα θεωρείται απαραίτητο για να τεθεί η διάγνωση να αποκλειστούν, με ειδικές καλλιέργειες, μικροοργανισμοί που προκαλούν το σχηματισμό παρόμοιου κοκκιώματος.

Αν τα αποτελέσματα από τη διαβρογχική βιοψία είναι αρνητικά και δεν έχουν προσβληθεί άλλα όργανα, αλλά υπάρχουν μεσοθωρακικοί λεμφαδένες θα πρέπει να γίνει διαβρογχική βιοψία λεμφαδένων μέσω λεπτής βελόνης (TBNA), της οποίας η διαγνωστική απόδοση, αν γίνει από έμπειρους ιατρούς, φθάνει μέχρι και 90%. Συγκεκριμένα το ποσοστό ανεύρεσης μη τυροειδοποιημένου κοκκιώματος με την TBNA χρησιμοποιώντας το άκαμπτο βρογχοσκόπιο είναι 66% ενώ χρησιμοποιώντας το εύκαμπτο είναι 50-72%.

Η διαγνωστική απόδοση αυξάνεται έως 80%-90% αν συνδυαστεί η TBNA με την TBLB²².

Ο συνδυασμός της βιοψίας TBNA με διαβρογχικό υπερηχογράφημα (EBUS) αυξάνει την ασφάλεια και την διαγνωστική απόδοση και απομακρύνει την πιθανότητα εκτέλεσης μεσοθωρακοσκόπησης για την διάγνωση της σαρκοείδωσης. Σύμφωνα με την μελέτη των Susan Garwood et al.(2007), η οποία διεξήχθη στην Νότια Καρολίνα με υψηλό ποσοστό σαρκοείδωσης και μικρότερο ποσοστό άλλων κοκκιωματωδών νοσημάτων, η διαβρογχική βιοψία μεσοθωρακικών λεμφαδένων μέσω βελόνης κατευθυνόμενη από διαβρογχικό υπερηχογράφημα (EBUS-TBNA) έχει διαγνωστική ακρίβεια 85% ενώ αν συνδυαστεί και με διαβρογχική βιοψία πνεύμονα αυξάνεται η διαγνωστική απόδοση στο 94% αλλά σπάνια χρειάστηκε. Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και από άλλες μελέτες.

Οι επιπλοκές που μπορεί να παρουσιασθούν κατά τη διαβρογχική βιοψία (TBLB) είναι πνευμοθώρακας 2% και αιμορραγία 5% σε αντίθεση με την EBUS-TBNA η οποία

είναι ασφαλέστερη και με μικρότερα ποσοστά επιπλοκών καθώς η βιοψία λεμφαδένων κατευθύνεται από το διαβρογχικό υπερηχογράφημα.

Στις περιπτώσεις που δεν τίθεται η διάγνωση με τις παραπάνω μεθόδους και υπάρχουν πυλαίοι ή μεσοθωρακικοί λεμφαδένες συστήνεται η μεσοθωρακοσκόπηση, η οποία παραμένει η “gold standard” εξέταση για την διάγνωση της σαρκοείδωσης καθώς λαμβάνονται μεγαλύτερα δείγματα ιστού για ιστοπαθολογική εξέταση με αποτέλεσμα η διαγνωστική απόδοση να κυμαίνεται από 82% έως 97%.

Το ποσοστό θνητότητας κυμαίνεται από 1,4% έως 2,3%.

Τα μειονεκτήματα αυτής της εξέτασης η οποία είναι πιο επεμβατική, είναι το υψηλό κόστος, η ανάγκη χορήγηση ολικής αναισθησίας, και η παρουσία ουλής στο λαιμό. Πολλές μελέτες οι οποίες έγιναν στην Αμερική και στην Ευρώπη την τελευταία δεκαετία επιβεβαίωσαν την υψηλή διαγνωστική απόδοση και ασφάλεια της EBUS-FNA (διαβρογχική βιοψία μεσοθωρακικών ή πυλαίων λεμφαδένων δια λεπτής βελόνης κατευθυνόμενη από διαβρογχικό υπερηχογράφημα) και της EBUS-TBNA στην διάγνωση της σαρκοείδωσης οι οποίες πλέον χρησιμοποιούνται ευρέως και είναι ασφαλής. Η EBUS-TBNA επιτρέπει την πρόσβαση σε πολλές λεμφαδενικές ομάδες συμπεριλαμβανομένων των παρατραχειακών ομάδων 2, 4, των υποτροπιδικών της ομάδας 7 και των πυλαίων λεμφαδένων ομάδας 10 και 11.

Η EBUS-FNA είναι μια τεχνική ακριβείας που επιτρέπει την πρόσβαση στους αριστερούς κατώτερους μεσοθωρακικούς, παραοισοφαγικούς των ομάδων 4ΑΡ, 5, 7, 8, 9 και του αορτοπνευμονικού παραθύρου με διαγνωστική ακρίβεια, σε ασθενείς με πιθανή πνευμονική σαρκοείδωση σταδίου I ή II, 82% ανευρίσκοντας μη τυροειδοποιημένο κοκκίωμα (εικόνα 20). Η διαγνωστική απόδοση της μεθόδου είναι ίδια για την διάγνωση λεμφαδενικών μεταστάσεων και για σταδιοποίηση καρκίνου πνεύμονα σύμφωνα με την μελέτη των J.T. Annema et al.(2005).

Τα δεδομένα της μεγάλης αυτής προοπτικής μελέτης από 51 ασθενείς επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα της προηγούμενης μελέτης των Fritscher-Ravens et al.(2000) σε 19 ασθενείς, καθώς διαπιστώθηκε ότι η ευαισθησία και η ειδικότητα της EBUS-FNA στην διάγνωση της σαρκοείδωσης είναι 100% και 94% αντίστοιχα.²²

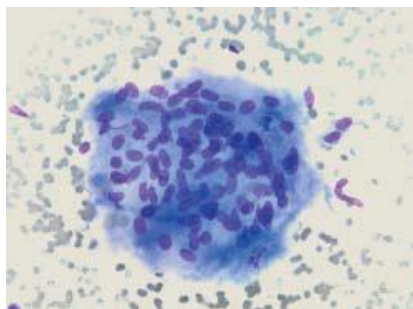
Σύμφωνα με την ανασκόπηση μελετών των Skaidrius Miliauskas et al.(2010) είναι ξεκάθαρη η θέση των εξετάσεων EBUS-FNA και EBUS-TBNA στην διάγνωση της σαρκοείδωσης αλλά υπάρχει διχογνωμία για το κατάλληλο χρόνο που πρέπει να χρησιμοποιούνται.

Η μία άποψη είναι ότι πρέπει να χρησιμοποιηθεί όταν τα αποτελέσματα είναι αρνητικά από τη κλασσική βρογχοσκόπηση και το BAL σε συνδυασμό με ενδοβρογχική και διαβρογχική βιοψία. Η δεύτερη άποψη υποστηρίζει ότι θα πρέπει να εφαρμόζονται από ειδικά εξειδικευμένα κέντρα στην αρχή της διερεύνησης της πιθανής σαρκοείδωσης, αφού αποκλεισθούν η κακοήθεια, το λέμφωμα, η φυματίωση και οι μυκητιασικές λοιμώξεις.

Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για να επιβεβαιωθεί μία από τις δύο απόψεις, ενώ ήταν σε εξέλιξη από το Μάρτιο του 2009 μία μεγάλη διεθνή τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη, η “GRANULOMA” που αφορά την διάγνωση της σαρκοείδωσης.

Αυτή η μελέτη ερευνήσε δύο διαφορετικές διαγνωστικές στρατηγικές σε ασθενείς με πιθανή πνευμονική σαρκοείδωση σταδίου I και II εξετάζοντας το ρόλο της EBUS-FNA στην ανεύρεση μη τυροειδοποιημένου κοκκιώματος σε σύγκριση με τη κλασσική βρογχοσκόπηση η οποία συνδυάζεται με διαβρογχική (TBLB) και ενδοβρογχική

βιοψία (EBB). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης η EBUS-FNA υπερέρχει στην διάγνωση της σαρκοείδωσης.^{20,21,22}



Εικόνα 20: Βιοψία λεμφαδένια μέσω ενδοβρογχικού υπερηχογραφήματος όπου διαπιστώθηκε μη τυροειδοποιημένο κοκκίωμα χωρίς νέκρωση όπως φαίνεται στην σαρκοείδωση J.T. Annema, M. Veselic, # and K.F. Rabe* Eur Respir J 2005; 25: 405–409

Σε μία προοπτική μελέτη που αφορούσε τη διαγνωστική αξία της ενδοβρογχικής βιοψίας ακόμα και σε φυσιολογικούς μακροσκοπικά βρόγχους, σε Αμερική και Ευρώπη διαπιστώθηκε ότι η μέθοδο αυτή αύξησε την διαγνωστική ακρίβειά της η οποία ήταν συγκρίσιμη με την διαβρογχική βιοψία πνεύμονα καθώς και την διαγνωστική αξία της βρογχοσκόπησης.^{19,20}

Συγκεκριμένα στις μελέτες που έγιναν σε πληθυσμό της Αμερικής από τους Armstrong et al.(1981), και Shorr et al.(2001) διαπιστώθηκε ότι με την ενδοβρογχική βιοψία σε φυσιολογικούς βρόγχους ανευρεθεί μη νεκρωτικό κοκκίωμα στο 30-37% των ασθενών με σαρκοείδωση από τους οποίους το 64,7% ήταν Αφροαμερικανοί οι οποίοι παρουσιάζουν, σύμφωνα με την μελέτη του Torrington et al.(1997), συχνότερα βλάβες του βρογχικού βλεννογόνου από τους καυκάσιους Αμερικανούς.

Η κύρια αιτία αυτών των φυλετικών διαφορών είναι η παρουσία πυκνότερου κοκκιώματος στους βρόγχους και στο πνευμονικό ιστό Αφροαμερικανών ασθενών σε σχέση με τους καυκάσιους ασθενείς.¹⁹

Ωστόσο καμία μελέτη σε Ασιάτες ασθενείς δεν διαπίστωσε την παρουσία επιθηλιοειδούς κοκκιώματος στην ενδοβρογχική βιοψία φυσιολογικού βρογχικού βλεννογόνου. Στην μελέτη των Hiroshi Ishii et al.(2011) εξετάσθηκε η χρησιμότητα της ενδοβρογχικής βιοψίας φυσιολογικού βρογχικού βλεννογόνου στην διάγνωση της σαρκοείδωσης σε Ιάπωνες ασθενείς. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής η ενδοβρογχική βιοψία (EBB) δεν αύξησε την διαγνωστική απόδοση σε συνδυασμό με την διαβρογχική βιοψία (TBLB) και τη βρογχοκυψελιδική έκπλυση (BAL) σε Ιάπωνες ασθενείς. Λόγω του μικρού αριθμού των ασθενών απαιτείται να γίνει στο μέλλον μια μεγαλύτερη πολυκεντρική μελέτη σε Ιάπωνες ασθενείς για την επιβεβαίωση των παραπάνω αποτελεσμάτων.^{13,14,18,19}

Βρογχοκυψελιδική έκπλυση (BAL)

Σύμφωνα με την μελέτη των Susan Garwood et al.(2007) η βρογχοκυψελιδική έκπλυση (BAL) δεν είναι ακριβής μέθοδος διάγνωσης της σαρκοείδωσης καθώς το ποσοστό απόδοσής της είναι 47% και αυτό το αποτέλεσμα συμφωνεί και με άλλες μελέτες που αποδεικνύουν την ανεπαρκή ευαισθησία και ειδικότητα της λευκοκυττάρωσης του BAL και του λόγου CD4/CD8 για την διάγνωση της

σαρκοείδωσης.^{18,20} Ο λόγος CD4/CD8>3,5 σύμφωνα με τους Costabel et al.(2001) αλλά και άλλων ερευνητών σχετίζεται σε υψηλό ποσοστό με την σαρκοείδωση και η ευαισθησία του κυμαίνεται από 42% έως 59% ενώ η ειδικότητά του είναι μεταξύ 76%-96%. Στην μελέτη των Welker et al.(2004) η θετική προγνωστική αξία του λόγου CD4/CD8 ήταν 69% σε μία ομάδα ασθενών με υποψία διάμεσης πνευμονοπάθειας. Η λευκοκυττάρωση στο BAL δεν μπορεί να καθορίσει την εξέλιξη ή την ύφεση της νόσου.¹³

Στην μελέτη των Winterbaur et al.(1993) διαπιστώθηκε ότι η ανεύρεση λεμφοκυττάρων στο BAL >16% και ο λόγος CD4/CD8 >4:1 είχε θετική προγνωστική αξία για την διάγνωση της σαρκοείδωσης 94% ενώ ο λόγος CD4/CD8 <1:1 απέκλειε την σαρκοείδωση. Η θετική προγνωστική αξία του λόγου CD4/CD8 σύμφωνα με την ίδια μελέτη, μειώθηκε στο 50% όταν χρησιμοποιήθηκε για την διαφορική διάγνωση της σαρκοείδωσης από άλλες ομάδες παθήσεων όπου παρουσιάζουν λεμφοκυττάρωση στο BAL, καθώς αυτό το εύρημα δεν είναι ειδικό της σαρκοείδωσης και το ένα τρίτο των ασθενών με σαρκοείδωση έχουν λεμφοκύτταρα στο BAL<16%.

Στην ίδια μελέτη διαπιστώθηκε ότι ο συνδυασμός ανεύρεσης μη τυροειδοποιημένου κοκκιώματος στην διαβρογχική βιοψία και ο λόγος CD4/CD8 >4 :1 στο BAL έχει 100% θετική προγνωστική αξία στην διάκριση της σαρκοείδωσης από άλλες διάχυτες διάμεσες πνευμονοπάθειες και 81% στην διάκριση της σαρκοείδωσης από άλλες παθήσεις.²⁴ Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα της μελέτης των Drent et al.(1993). Όσον αφορά την θετική προγνωστική αξία του BAL σε ασθενείς με σαρκοείδωση σταδίου I και II η οποία ήταν 92,2% και η αρνητική προγνωστική αξία ήταν 97,1%.

Στη μελέτη των S.P. Kantrow et al.(1997) διαπιστώθηκε ότι το 40% των ασθενών με διαγνωσμένη σαρκοείδωση με βιοψία, είχε CD4/CD8>4:1 και το 52% είχε CD4/CD8>3.5, ενώ CD4/CD8<1 παρατηρήθηκε στο 12% της συγκεκριμένης ομάδας των ασθενών. Τα αποτελέσματα της τελευταίας μελέτης δείχνουν ότι δεν πρέπει ο λόγος CD4/CD8<1 να χρησιμοποιείται για τον αποκλεισμό της σαρκοείδωσης από την διαφορική διάγνωση. Έχει διαπιστωθεί ότι παράγοντες όπως η φυλή και το ακτινολογικό στάδιο της σαρκοείδωσης μπορεί να επηρεάσουν τα ευρήματα στο BAL και ο λόγος CD4/CD8 αυξάνεται με την ηλικία σε μη πάσχοντες.

Επομένως είναι σαφές ότι η μελέτη του πληθυσμού των κυττάρων στο BAL και ο λόγος CD4/CD8 βοηθούν στην διάγνωση της σαρκοείδωσης σε συσχέτιση με θετική βιοψία, ενώ δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την διάγνωση ή αποκλεισμό της σαρκοείδωσης σε ασθενείς με αρνητική βιοψία.²³

Ακτινολογικός έλεγχος

Σημαντική είναι η συμβολή στην διάγνωση της σαρκοείδωσης των διάφορων απεικονιστικών μεθόδων ανάλογα με τα όργανα που έχουν προσβληθεί.

Η πιο σημαντική ακτινολογική εξέταση που συμβάλλει στην διάγνωση, σταδιοποίηση και πρόγνωση της πνευμονικής σαρκοείδωσης είναι η ακτινογραφία θώρακος.

Εδώ και 40 χρόνια χρησιμοποιείται ευρέως το σύστημα σταδιοποίησης της σαρκοείδωσης που ανέπτυξε ο Siltzbach βασιζόμενος στο είδος των ευρημάτων της ακτινογραφίας θώρακος και το οποίο έχει ακόμα και σήμερα σημαντική προγνωστική αξία. Σύμφωνα με αυτό το σύστημα υπάρχουν πέντε στάδια πνευμονικής σαρκοείδωσης. Το στάδιο 0 με φυσιολογική ακτινογραφία θώρακος, το

στάδιο I με λεμφαδενοπάθεια μεσοθωρακίου, το στάδιο II με λεμφαδενοπάθεια και προσβολή του πνευμονικού παρεγχύματος, το στάδιο III με προσβολή μόνο του πνευμονικού παρεγχύματος και το στάδιο IV με πνευμονική ίνωση.

Αυτό το σύστημα σταδιοποίησης αναπτύχθηκε πριν από την εμφάνιση της αξονικής τομογραφίας θώρακος, η οποία είναι πολύ πιο ευαίσθητη στην αναγνώριση αρχόμενων παρεγχυματικών βλαβών σε αρχικά στάδια, ακόμα και στο στάδιο I που έχουν καλύτερη πρόγνωση και δεν είναι εμφανή στην ακτινογραφία θώρακος.²⁷

Η χρήση της αξονικής τομογραφίας θώρακος σαν εξέταση ρουτίνας σε ασθενείς που πάσχουν από σαρκοείδωση είναι αμφιλεγόμενη καθώς είναι ακριβή και μη απαραίτητη για τους περισσότερους ασθενείς. Η αξονική τομογραφία θώρακος θα πρέπει να γίνεται όταν τα ευρήματα στην ακτινογραφία θώρακος δεν είναι τυπικά ή όταν εμφανισθεί αιμόπτυση.¹⁴ Ωστόσο στην αξονική τομογραφία θώρακος μπορεί να υπάρχουν χαρακτηριστικά ευρήματα που να συμβάλλουν στην διάγνωση της σαρκοείδωσης όπως είναι η μεσοθωρακική και πυλαία λεμφαδενοπάθεια, η προσβολή των άνω λοβών των πνευμόνων καθ' υπεροχή και η παρουσία μικροοζιδίων περιβρογχικά και υπουπεζωκοτικά. Κανένα από αυτά τα ευρήματα δεν είναι επαρκή για να τεθεί η διάγνωση της σαρκοείδωσης αλλά μπορεί η αξονική τομογραφία θώρακος να βοηθήσει στην προσπέλαση των πνευμόνων με διάφορες διαγνωστικές μεθόδους όπως είναι η βρογχοσκόπηση και η μεσοθωρακοσκόπηση, ώστε να τεθεί η διάγνωση της σαρκοείδωσης σε ασθενείς με εξωθωρακική σαρκοείδωση όπως νευρολογική και οφθαλμική μορφή.⁶

Τα ευρήματα στην αξονική τομογραφία θώρακος υψηλής ευκρίνειας (HRCT) είναι πιο τυπικά στην πνευμονική σαρκοείδωση σε σχέση με την κλασσική αξονική τομογραφία θώρακος, καθώς παρέχει σημαντικές πληροφορίες για το πνευμονικό παρέγχυμα και συμβάλλει στην διάκριση της ενεργού φλεγμονής του πνευμονικού παρεγχύματος από την πνευμονική ίνωση στα στάδια II και III.²⁷

Ένα άλλο χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο είναι η ολόσωμη τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων με 18-φλουρο-δεοξυ-γλυκόζη (FGD PET) η οποία συμβάλλει στην ανίχνευση θέσεων βιοψίας σε ασθενείς με πιθανή σαρκοείδωση, οι οποίες δεν μπορούν να ανιχνευθούν με άλλες απεικονιστικές μέθοδοι καθώς και στον καθορισμό της ενεργότητας της νόσου σε ασθενείς με σαρκοείδωση σταδίου IV και πνευμονική ίνωση. Η FGD PET είναι πιο ευαίσθητη από το ολόσωμο σπινθηρογράφημα με γάλλιο 67(Ga⁶⁷) που χρησιμοποιούνταν για αυτό το σκοπό στο παρελθόν. Τα θετικά αποτελέσματα της FGD PET δεν είναι διαγνωστικά για την σαρκοείδωση καθώς παρατηρούνται και σε άλλες κοκκιωματώδεις νόσους, φλεγμονώδεις παθήσεις και κακοήθειες.

Έχει μεγάλη σημασία να διαφοροδιαγνωσθεί η σαρκοείδωση από την κακοήθεια και αυτό φαίνεται να επιτυγχάνεται, όπως διαπιστώθηκε στην μελέτη της Kaira et al.(2007) στην οποία προτείνεται ο συνδυασμός της FGD PET με ολόσωμη τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων με τη χρήση άλλης σεσημασμένης ουσίας, της 18-φλουρο-α μεθυλ-τυρισίνη (18F-FMT PET) και η οποία είναι πιο ειδική και μπορεί να διακρίνει την σαρκοείδωση από το κακόηθες νεόπλασμα.^{28,29}

Η μαγνητική τομογραφία με την έγχυση σκιαγραφικού γαδολίνιου συμβάλλει επίσης στην ανίχνευση περιοχών με ευρήματα σαρκοείδωσης ιδιαίτερα στην καρδιά και στον εγκέφαλο.²⁶

Kveim-Siltzbach τεστ

Στον παρελθόν και για πολλά χρόνια χρησιμοποιούνταν για την διάγνωση της σαρκοείδωσης το Kveim-Siltzbach τεστ στο οποίο εγχύονταν ενδοδερμικά ομογενοποιημένος ανθρώπινος σαρκοειδικός ιστός σε ασθενείς με πιθανή σαρκοείδωση. Μετά από τέσσερις εβδομάδες δημιουργούνταν στην περιοχή της έγχυσης μία βλατίδα στην οποία γίνονταν βιοψία.

Αυτό το τεστ δεν χρησιμοποιείται πια για ποικίλους λόγους. Πρώτον δεν υπάρχει εμπορικά διαθέσιμο αντιγόνο για την προετοιμασία, δεύτερον η χρήση εκχυλίσματος ανθρώπινου ιστού για κλινικούς σκοπούς έχει πολλούς περιορισμούς και τρίτον κάθε νέα προετοιμασία του τεστ απαιτεί αξιολόγηση *in vivo*. Αν αυτό το τεστ ήταν διαθέσιμο θα ήταν χρήσιμο σε ασθενείς όπου οι βλάβες δεν είναι εύκολα προσβάσιμες για βιοψία και δεν χρειάζονται ανοσοκατασταλτική θεραπεία κατά την διάρκεια των τεσσάρων εβδομάδων αναμονής του αποτελέσματος του τεστ.

Από την εμπειρία 50 ετών των Iannuzzi et al.(2007) στο νοσοκομείο Mt.Sinai Medical Center, New York, όπου έχουν γίνει πάνω από 10.000 Kveim-Siltzbach τεστ, το ποσοστό των θετικών αποτελεσμάτων ήταν μεγαλύτερο από 50%, ενώ τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα ήταν σχεδόν μηδενικά. Η μόνη επιπλοκή αυτού του τεστ ήταν μία ουλή 3-4mm στην περιοχή της βιοψίας.¹⁴

Εργαστηριακά ευρήματα

Ένα από τα συχνότερα εργαστηριακά ευρήματα σε ασθενείς με σαρκοείδωση είναι η υπερασβεστιουρία η οποία συναντάται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 40% των ασθενών. Η υπερασβεστιαμία ανευρίσκεται σε ποσοστό μικρότερο του 5% κυρίως σε ασθενείς ηλικίας μεγαλύτερης των 40 ετών. Η αύξηση του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγιοτενσίνης (ACE) στον ορό σχετίζεται με την ενεργότητα και την εξέλιξη της νόσου και συμβάλλει στην εκτίμηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας, μειώνεται με την χορήγηση των κορτικοειδών, καθώς και στην ανίχνευση των υποτροπών, όπου και αυξάνεται η τιμή του στον ορό. Στο 20-80% των περιπτώσεων παρατηρείται πολυκλωνική υπεργαμμοσφαιριναιμία, ενώ η υπογαμμοσφαιριναιμία είναι άτυπη και θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη στην διάγνωση της σαρκοείδωσης. Από τις ηπατικές μετρήσεις παθολογική είναι σε ποσοστό 20% η αλκαλική φωσφατάση. Αυξημένα επίπεδα κρεατινίνης μπορεί να υποδηλώνουν προσβολή των νεφρών. Η συχνότερη αιματολογική διαταραχή είναι η λεμφοπενία η οποία όμως δεν είναι διαγνωστική καθώς μπορεί να οφείλεται και σε άλλες παθήσεις όπως η φυματίωση. Άλλες αιματολογικές διαταραχές όπως η ουδετεροπενία ή η αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία ή /και η θρομβοπενία είναι σπάνιες.¹¹

Πολλοί ερευνητές συνεχίζουν να αναζητούν βιολογικούς δείκτες που να σχετίζονται με την ενεργότητα και τη πρόγνωση της νόσου. Η χιτοτριοσιδάση αποτελεί έναν πιθανό βιολογικό δείκτη για την σαρκοείδωση ο οποίος μελετήθηκε πρόσφατα. Πρόκειται για ένα ένζυμο που παράγεται από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και συμμετέχει στην αποδόμηση της χιτίνης. Στην μελέτη των Bargagli et al.(2008) διαπιστώθηκαν αυξημένα επίπεδα της χιτοτριοσιδάσης στον ορό ασθενών με σαρκοείδωση σε σχέση με τους μάρτυρες, καθώς και αυξημένα επίπεδα σε ασθενείς με ενεργό σαρκοείδωση σε σχέση με ασθενείς με μη ενεργό νόσο. Αυξημένα επίπεδα αυτού του ενζύμου έχουν παρατηρηθεί σε πολλές παθήσεις που αφορούν τα λυσοσώματα όπως η νόσο του Gaucher.

Το 2004 αναφέρθηκε για πρώτη φορά παρουσία αυξημένων επιπέδων χιτοτριοσιδάση στον ορό και στην βρογχοκυψελιδική έκπλυση (BAL) ασθενών με σαρκοείδωση σε σχέση με τους μάρτυρες. Το 2007 διαπιστώθηκε αυξημένη δραστηριότητα αυτού του ένζυμου σε νεαρά άτομα που έπασχαν από σαρκοείδωση. Έχει διαπιστωθεί ότι η δραστηριότητα της χιτοτριοσιδάσης συνδέεται με τα επίπεδα του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης (ACE) στον ορό, το ακτινολογικό στάδιο και τα ευρήματα στην αξονική τομογραφία θώρακος, υποδηλώνοντας ότι το ένζυμο ότι αυτό μπορεί να αποτελέσει δείκτη βαρύτητας της νόσου αλλά χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Επίσης η χιτοτριοσιδάση ίσως επάγει την υπερέκφραση του ινωτικού τύπου-2 κυτοκίνης και καθορίζει την βαρύτητα και πρόγνωση της σαρκοείδωσης.

Η ιντερλευκίνη-2 είναι μία κυτοκίνη που επάγει τον πολλαπλασιασμό και ενεργοποίηση των Τ-κυττάρων αλληλεπιδρώντας με τους υποδοχείς τους. Πρόσφατα έχουν διαπιστωθεί αυξημένα επίπεδα του υποδοχέα της ιντερλευκίνης-2 στον ορό και στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ασθενών με σαρκοείδωση και ίσως έχει προγνωστική αξία, καθώς σε ασθενείς που πάσχουν από εξωθωρακική σαρκοείδωση, συμπεριλαμβάνοντας και το σύνδρομο Löfgren, διαπιστώθηκαν υψηλότερα επίπεδα στον ορό του διαλυτού υποδοχέα της ιντερλευκίνης-2 σε σχέση με ασθενείς που πάσχουν από πνευμονική σαρκοείδωση. Στην κλινική πράξη όμως δεν έχουν ακόμα αναγνωρισθεί αξιόπιστοι και πρακτικοί βιολογικοί δείκτες που να καθορίζουν την ενεργότητα της νόσου.^{7,25}

Από τα επιθηλιοειδή κύτταρα του σαρκοειδικού κοκκιώματος παράγεται το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης (ACE) του οποίου τα επίπεδα αυξάνονται σε ποσοστό 60% των ασθενών που πάσχουν από σαρκοείδωση. Η σημασία αυτού του ενζύμου στην διάγνωση και στην πρόγνωση της σαρκοείδωσης είναι αμφιλεγόμενη καθώς σε πολλές μελέτες η προγνωστική της αξία είναι χαμηλή. Συγκεκριμένα στην μελέτη των Studdy PR et al.(1989) η θετική προγνωστική αξία ήταν 84% ενώ η αρνητική ήταν 74%. Σε μία άλλη μελέτη των Studdy PR et al.(1983) όπου συμμετείχαν 1.941 ασθενείς με σαρκοείδωση, 1.575 υγιείς μάρτυρες και 1.355 ασθενείς που έπασχαν από άλλες ασθένειες, τα αυξημένα επίπεδα της ACE είχαν ευαισθησία στην διάγνωση της σαρκοείδωσης 57% και ειδικότητα 90% και θετική προγνωστική αξία 90% ενώ η αρνητική προγνωστική αξία ήταν 60%.

Επομένως το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης (ACE) δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την διάγνωση της σαρκοείδωσης καθώς τα επίπεδά του στον ορό αυξάνονται και σε άλλες καταστάσεις όπως στη φυματίωση, μυκητιασικές λοιμώξεις, υπερθυρεοειδισμό και νόσο του Gaucher, μπορεί όμως να συμβάλλει στην διάγνωση ή στον αποκλεισμό της σαρκοείδωσης σε συνδυασμό και με άλλα ευρήματα.^{14,26}

Πρόγνωση

Η σαρκοείδωση γενικά είναι μία καλοήθης νόσο με καλή πρόγνωση. Η θνησιμότητα είναι χαμηλή κυμαίνεται 1%-5% και οφείλεται στην αναπνευστική ανεπάρκεια, την προσβολή του κεντρικού νευρικού συστήματος ή της καρδιάς. Παρουσιάζει υψηλό ποσοστό αυτόματης ίασης, στα δύο πρώτα έτη 60%-70% των ασθενών με οξεία μορφή της νόσου, ενώ στην χρόνια μορφή το ποσοστό αυτόματης ίασης είναι μικρότερο 10%-30% ανάλογα με τις γεωγραφικές και φυλετικές διαφορές.

Καλύτερη πρόγνωση παρατηρείται σε οξεία έναρξη της νόσου όπως στο σύνδρομο Löfgren, ενώ χειρότερη είναι η πρόγνωση σε σοβαρές εξωθωρακικές εκδηλώσεις από το ήπαρ, την καρδιά, το νευρικό σύστημα οι οποίες εμφανίζονται σε ποσοστό 4%-7% των ασθενών. Οι κυριότεροι προγνωστικοί δείκτες παραμένουν η μορφή έναρξης της νόσου, η έκταση της νόσου και το στάδιο της νόσου με βάση την ακτινογραφία θώρακος. Η οξεία έναρξη και η ασυμπτωματική αμφοτερόπλευρη πυλαία λεμφαδενοπάθεια έχουν καλή πρόγνωση και αυτόματη ίαση.

Αντίθετα η ηλικία έναρξης της νόσου μετά τα 40 έτη, η μαύρη φυλή, ο χειμετλοειδής λύκος, η χρόνια ραγοειδίτιδα, η προσβολή των οστών, της καρδιάς, του κεντρικού νευρικού συστήματος, του βλεννογόνου της μύτης, η χρόνια υπερασβεσταιμία, η νεφρασβέστωση, και τα στάδια III και IV της νόσου σχετίζονται με πιο σοβαρή μορφή και μεγαλύτερης διάρκειας νόσου.^{3,4}

Σύμφωνα με την μελέτη Mañá et al. διαπιστώθηκε ότι στο 83% των ασθενών με οξεία έναρξη της σαρκοείδωσης που συμμετείχαν στην μελέτη, η νόσο είχε υποχωρήσει σε διάστημα πέντε ετών, ενώ σχεδόν σε όλες οι περιπτώσεις η ύφεση παρατηρήθηκε στα πρώτα δύο έτη. Αυτή η διαπίστωση οδήγησε στο συμπέρασμα ότι οι ασθενείς που συνεχίζουν να παρουσιάζουν συμπτώματα μετά τα δύο έτη σπάνια παρουσιάζουν αυτόματη ίαση. Αντίθετα σε μελέτες σε Ιάπωνες, Φιλανδούς και Σουηδούς διαπιστώθηκε σημαντική βελτίωση των ακτινολογικών ευρημάτων μέχρι πέντε έτη μετά την διάγνωση της σαρκοείδωσης, ενώ μικρή είναι η βελτίωση που παρατηρείται στο διάστημα μεταξύ πέντε και δέκα έτη.

Η διάκριση της σοβαρής εξωθωρακικής σαρκοείδωσης σε οξεία και χρόνια μορφή δεν είναι χρήσιμη καθώς η φυσική πορεία και πρόγνωση της νόσου σε αυτούς τους ασθενείς είναι χειρότερη.⁶⁹

Σε ασθενείς της μαύρης φυλής η πρόγνωση της νόσου γενικά είναι χειρότερη καθώς είναι αυξημένο το ποσοστό εμφάνισης χρόνιας εξελισσόμενης πνευμονικής νόσου, σοβαρής εξωπνευμονικής προσβολής και χειμετλοειδή λύκου με υψηλό ποσοστό θνησιμότητας.⁶⁹

Θεραπεία

Η κατάλληλη θεραπεία, ο χρόνος έναρξης της θεραπείας και η διάρκεια αυτής, σε ασθενείς που πάσχουν από σαρκοείδωση δεν έχει καθοριστεί απόλυτα, καθώς 30%-70% των ασθενών παρουσιάζουν αυτόματη ύφεση σε διάστημα 2 ετών και δεν απαιτείται θεραπεία. Η προσβολή της καρδιάς, του νευρικού συστήματος, των νεφρών, των οφθαλμών από την σαρκοείδωση καθώς και η επίμονη υπερασβεσταιμία συνήθως απαιτούν συστηματική θεραπεία.

Στους ασυμπτωματικούς ασθενείς που πάσχουν από πνευμονική σαρκοείδωση σταδίου I, II ή III δεν χορηγείται θεραπεία αλλά θα πρέπει να παρακολουθούνται σε τακτά χρονικά διαστήματα ανά τρεις-έξι μήνες με ακτινογραφία θώρακος και λειτουργικό έλεγχο της αναπνοής, καθώς δεν μπορεί να προβλεφθεί ποιοί ασθενείς θα παρουσιάσουν αυτόματη ύφεση και σε ποιούς θα εξελιχθεί η νόσο και θα χρειασθούν συστηματική θεραπεία.

Σε συμπτωματικούς ασθενείς η χορήγηση θεραπείας συνήθως είναι περιορισμένη και το 50% των ασθενών δεν χρειάζονται μακροχρόνια θεραπεία. Σε ασθενείς με ήπια νόσο, δερματικές βλάβες, πρόσθια ραγοειδίτιδα ή βήχα, η τοπική σε μορφή κρέμας, κολλύριου ή εισπνεόμενου κορτικοειδούς αντίστοιχα είναι αρκετή για τον έλεγχο της

νόσου. Σε ασθενείς με σύνδρομο Löfgren που χαρακτηρίζεται από πυλαία λεμφαδενοπάθεια, εμπύρετο, πολυαρθραλγίες και οζώδες ερύθημα συνήθως δεν χορηγείται θεραπεία καθώς υποχωρεί αυτόματα ή αν επιμένουν τα συμπτώματα αντιμετωπίζονται με βραχεία χορήγηση μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών. Δεν υπάρχουν όμως σαφή δεδομένα από τις μέχρι τώρα μελέτες ότι η χορήγηση κορτικοειδών ή άλλων παραγόντων θα αποτρέψει την εξέλιξη της νόσου ή την πνευμονική ίνωση.^{1,3,26,69,14}

Κορτικοειδή

Τα κορτικοειδή αποτελούν πρώτη γραμμής θεραπεία σε συμπτωματικούς ασθενείς που πάσχουν από πνευμονική ή εξωπνευμονική σαρκοείδωση. Αντιφατικά είναι τα αποτελέσματα των μελετών για τον ρόλο των εισπνεόμενων κορτικοειδών στην συμπτωματική πνευμονική σαρκοείδωση. Στην τυχαίοποιημένη διπλή-τυφλή μελέτη των Pietinalho et al.(1999) οι ασθενείς που έλαβαν θεραπεία τρεις μήνες με συστηματική χορήγηση κορτικοειδών ακολουθούμενη από υψηλές δόσεις εισπνεόμενης βουδεσονίδης για 15μήνες, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, διαπιστώθηκε ότι η ομάδα που έλαβε θεραπεία βελτίωσε την αναπνευστική λειτουργία στο τέλος της θεραπείας και παρουσίασε λιγότερες υποτροπές μετά από πέντε έτη⁷⁰.

Αντίθετα σε άλλες μελέτες δεν επιβεβαιώθηκε η αποτελεσματικότητα της εισπνεόμενης φλουτικαζόνης στην πνευμονική σαρκοείδωση.^{6,69}

Η συστηματική χορήγηση κορτικοειδών είναι αποτελεσματική σε ασθενείς με πνευμονική σαρκοείδωση σταδίου II και III που παρουσιάζουν συμπτώματα από το αναπνευστικό, σημαντική μείωση των τιμών της αναπνευστικής λειτουργίας και παθολογική ακτινογραφία θώρακος. Σε αυτή την ομάδα των ασθενών παρατηρείται βελτίωση των αναπνευστικών συμπτωμάτων, των ακτινολογικών ευρημάτων και της αναπνευστικής λειτουργίας. Η δόση έναρξης της θεραπείας, η διάρκεια της θεραπείας και ο ρυθμός μείωσης αυτής εξαρτάται.

Για την πνευμονική σαρκοείδωση η συνιστώμενη δόση είναι 20-40 mg(0,5mg/Kg) πρενιζολόνης την ημέρα ή αντίστοιχη δοσολογία κάθε δεύτερη ημέρα με σταδιακή μείωση σε διάστημα 1-3 μηνών, ανάλογα με την ανταπόκριση των ασθενών, ανά 5-10mg κάθε 4 με 6 εβδομάδες μέχρι μία ελάχιστη δόση 10-15mg την ημέρα όπου ελέγχεται πλήρως η νόσο. Η θεραπεία με την δόση συντήρησης των κορτικοειδών θα πρέπει να διαρκέσει τουλάχιστον 12 μήνες. Κατά την μείωση των κορτικοειδών σε διάστημα δύο ετών μπορεί να παρουσιασθεί υποτροπή στο ένα τρίτο των ασθενών οπότε και απαιτείται επανέναρξη της θεραπείας.

Οι ασθενείς που δεν βελτιώνονται με την θεραπεία σε διάστημα τριών μηνών δεν φαίνεται να ανταποκρίνονται σε παρατεταμένη χορήγηση κορτικοειδών. Υψηλότερη δόση κορτικοειδών 40-80mg την ημέρα απαιτείται σε σοβαρή προσβολή της καρδιάς ή του νευρικού συστήματος με σταδιακή μείωση σε διάστημα έξι μηνών, χωρίς να είναι αποδεδειγμένη η αποτελεσματικότητα των υψηλότερων δόσεων κορτικοειδών καθώς θεωρείται ότι ο ρυθμός ανταπόκρισης στην θεραπεία αυτών των συστημάτων πιθανών να είναι πιο σταδιακός.^{1,3,4,69}

Στα παιδιά η δοσολογία έναρξης της πρενιζολόνης είναι 1-2mg/Kg την ημέρα για διάστημα 4-8 εβδομάδες. Η θεραπεία συνεχίζεται μέχρι να βελτιωθεί σημαντικά η κλινική κατάσταση του ασθενούς και στην συνέχεια μειώνεται η δόση σε διάστημα

2-3 μηνών μέχρι μία ελάχιστη δοσολογία 10-15mg την ημέρα, η οποία ελέγχει την νόσο. Ανάλογα με τα προσβεβλημένα όργανα και την ενεργότητα της νόσου η θεραπεία διαρκεί τουλάχιστον έξι μήνες και στην συνέχεια μειώνεται και διακόπτεται.⁶⁶

Η συχνότερη παρενέργεια των κορτικοειδών είναι η οστεοπόρωση που εμφανίζεται στο 70% των ασθενών με σαρκοείδωση, για αυτό κρίνεται απαραίτητη η προληπτική χορήγηση ασβεστίου, αν δεν υπάρχει υπερασβεστιασμία, με αυστηρό περιοδικό έλεγχο του μεταβολισμού του ασβεστίου ή η χορήγηση διφωσφωνικών.

Άλλες παρενέργειες των κορτικοειδών αποτελούν η αύξηση του σωματικού βάρους, η αρτηριακή υπέρταση, η εμφάνιση σακχαρώδη διαβήτη και η παρουσία γαστρεντερικών διαταραχών, αυπνίας και ψυχικών διαταραχών.

Εναλλακτικές Θεραπείες

Χλωροκίνη και Υδροξυχλωροκίνη

Η χλωροκίνη και υδροξυχλωροκίνη είναι ανθελονοσιακοί παράγοντες οι οποίοι συχνά χρησιμοποιούνται για την θεραπεία της δερματικής σαρκοείδωσης, της υπερασβεστιασμίας και της χρόνιας πνευμονικής σαρκοείδωσης.

Σύμφωνα με την μελέτη των Baltzan et al.(1999) η χορήγηση χλωροκίνης, η οποία είναι πιο αποτελεσματική, σε ασθενείς με πνευμονική σαρκοείδωση για διάστημα έξι μηνών είχε ικανοποιητικά αποτελέσματα, καθώς βελτίωσε την αναπνευστική λειτουργία, τα συμπτώματα και τα ακτινολογικά ευρήματα. Ικανοποιητικά αποτελέσματα διαπιστώθηκαν και στην μελέτη του Sharma et al.(1998) με την θεραπεία της σαρκοείδωσης του νευρικού συστήματος με τη χλωροκίνη και υδροξυχλωροκίνη μετά από αποτυχία ή μη ανεκτικότητα της θεραπείας με κορτικοειδή.

Τα ποσοστά ανταπόκρισης ήταν υψηλότερα με την χλωροκίνη ενώ η υδροξυχλωροκίνη είναι λιγότερο τοξική και μπορεί να χορηγηθεί για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Η συνιστώμενη δόση της χλωροκίνης(Aralen) είναι 250-500mg ημερησίως και της υδροξυχλωροκίνης(Plaquenil) 200-400mg ημερησίως. Οι συννηθέστερες παρενέργειες είναι η οφθαλμοτοξικότητα, για αυτό θα πρέπει να γίνεται τακτικός οφθαλμολογικός έλεγχος κάθε 6-12 μήνες.^{1,2,4,69}

Μεθοτρεξάτη

Η μεθοτρεξάτη χρησιμοποιείται ευρέως στην θεραπεία της σαρκοείδωσης. Είναι ένας αντιμεταβολίτης που δρά ως αναστολέας της διϋδροφολικής ρεδοукτάσης που μετατρέπεται στο ήπαρ σε πολυγλουταμινάση, η οποία συμβάλλει στην συγκέντρωση της εξωκυττάριας αδενοσίνης, ενός ισχυρού αντιφλεγμονώδους μεσολαβητή. Χορηγείται στην θεραπεία της χρόνιας σαρκοείδωσης, σε περιπτώσεις ανθεκτικές στα κορτικοειδή ή που αντενδείκνυται η χορήγησή τους.

Η μεθοτρεξάτη έχει χορηγηθεί με ικανοποιητικά αποτελέσματα για την θεραπεία της πνευμονικής, δερματικής, ηπατικής, οφθαλμικής, νευρολογικής, καρδιακής και μυοσκελετικής σαρκοείδωσης. Έχει διαπιστωθεί ότι καταστέλλει τη δράση των μακροφάγων αλλά και την παραγωγή TNF-α από τα κυψελιδικά μακροφάγα σε

ασθενείς με πνευμονική σαρκοείδωση. Τα θεραπευτικά αποτελέσματα της σαρκοείδωσης παρατηρούνται μετά από έξι μήνες θεραπείας.

Η συνήθης δοσολογία είναι 10-20mg την εβδομάδα. Οι κυριότερες παρενέργειες είναι η ναυτία, διάρροια, κόπωση, εξάνθημα, πονοκέφαλο που είναι παροδικές καθώς και ουδετεροπενία, ηπατοτοξικότητα, πνευμονίτιδα και σπάνια πνευμονική ίνωση.

Επομένως κρίνεται απαραίτητος ο συχνός αιματολογικός έλεγχος των λευκών και των ηπατικών ενζύμων κάθε 4-6 εβδομάδες. Η ηπατοτοξικότητα δεν ανιχνεύεται πάντα με τον αιματολογικό έλεγχο καθώς οι μισοί ασθενείς με ηπατοτοξικότητα έχουν φυσιολογικές τρανσαμινάσες, για αυτό συστήνεται βιοψία ήπατος μετά από συνολική θεραπεία 1-2g. Για την μείωση των ανεπιθύμητων ενεργειών και της τοξικότητας χορηγείται φολικό οξύ 1-2 mg την ημέρα.^{6,11,69,71}

Αζαθειοπρίνη

Η αζαθειοπρίνη είναι ένας αναστολέας σύνθεσης της πουρίνης. Δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα για την αποτελεσματικότητά της στην θεραπεία της σαρκοείδωσης. Χορηγείται σαν δεύτερη γραμμής θεραπεία σε δόση 50-150mg ημερησίως, στην χρόνια σαρκοείδωση με ποσοστά ανταπόκρισης 20-80%. Η κυριότερη παρενέργεια είναι η σοβαρή ουδετεροπενία. Πριν τη χορήγηση της αζαθειοπρίνης θα πρέπει να γίνεται μέτρηση του ενζύμου θειοπουρίνη τρανσφεράση καθώς ανεπάρκεια αυτού του ενζύμου μπορεί να προκαλέσει σοβαρή ουδετεροπενία με αποτέλεσμα την διακοπή της θεραπείας.^{6,69}

Μουκοφενολάτη Μοφετίλ

Ο μηχανισμός της αντιφλεγμονώδους δραστηριότητας της μουκοφενολάτης μοφετίλ δεν είναι ξεκάθαρος, αλλά πιθανόν αναστέλλει την σύνθεση των πουρινών μέσω των λεμφοκυττάρων. Σε μικρό αριθμό μελετών διαπιστώθηκε ότι βελτίωσε την οπτική οξύτητα και τα συμπτώματα της ραγοειδίτιδας.

Οι συχνότερες ανεπιθύμητες ενέργειες αφορούν το γαστρεντερικό και περιλαμβάνουν ναυτία, διάρροια και οισοφαγίτιδα. Αυτές οι παρενέργειες είναι δοσοεξαρτώμενες και υποχωρούν με τη μείωση της δόσης. Η σοβαρότερη παρενέργεια είναι η λευκοπενία για αυτό απαιτείται συχνός αιματολογικός έλεγχος. Η συνιστώμενη δόση είναι 500-3000mg την ημέρα διαιρεμένη σε δύο δόσεις.⁶⁹

Κυκλοφωσφαμίδη

Η κυκλοφωσφαμίδη είναι ένας αλκυλιωτικός παράγοντας ο οποίος χορηγείται για τη θεραπεία της νευροσαρκοείδωσης, της οπτικής νευροπάθειας και του προσβεβλημένου επιπεφυκότα από την σαρκοείδωση. Χορηγείται είτε σε μορφή χαπιού σε δόση 50-150mg την ημέρα, είτε ενδοφλεβίως σε δόση 500-1500mg κάθε δύο ή τέσσερις εβδομάδες.

Λόγω της τοξικότητάς της προκαλεί καταστολή του μυελού με αποτέλεσμα λευκοπενία, ναυτία και αιμορραγική κυστίτιδα. Μακροχρόνιες επιπλοκές αποτελούν

ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου ουροδόχου κύστεως ή κακοήθεια του αιματολογικού συστήματος, ακόμα και χρόνια μετά την διακοπή της θεραπείας.^{69,2}

Κυκλοσπρίνη

Η κυκλοσπορίνη όπως δείχνουν κλινικές μελέτες, έχει περιορισμένη αποτελεσματικότητα στην πνευμονική σαρκοείδωση, ενώ έχει καλή ανταπόκριση σε κάποιους ασθενείς με σοβαρή προσβολή του νευρικού συστήματος, όταν τα κορτικοειδή και οι άλλοι ανοσοκατασταλτικοί παράγοντες έχουν αποτύχει. Χορηγείται σε δόση 25-200mg την ημέρα και αυξάνει τον κίνδυνο για λοιμώξεις, νεφρική ανεπάρκεια, υπέρταση και καρδιοτοξικότητα.^{1,2,71}

Ανταγωνιστές του παράγοντα TNF-α

Ο TNF-α είναι μια προφλεγμονώδη κυτοκίνη που παράγεται από μονοκύτταρα και μακροφάγα και συνδέεται με δύο υποδοχείς. Μπορούμε να τροποποιήσουμε την επίδραση του TNF-α στην σαρκοείδωση είτε επιδρώντας πάνω στην σύνθεσή του TNF-α το οποίο διασπάται από τις μεταλλοπρωτεϊνάσες, είτε στην σύνδεσή του με τους υποδοχείς.

Με την εισαγωγή βιολογικών παραγόντων ικανών να αναστέλλουν την δράση του παράγοντα TNF-α(α-παράγοντας νέκρωσης όγκου), τροποποιήθηκε η θεραπεία της σαρκοείδωσης.

Τα κριτήρια για την χορήγηση αυτών των παραγόντων είναι:

- α) η μείωση της FVC (βίαιη ζωτική χωρητικότητα)<70%,
- β) η παρουσία δύσπνοιας κλίμακας 1 σύμφωνα με την Αμερικάνικη Πνευμονολογική Εταιρία,
- γ) διάρκεια νόσου μεγαλύτερη των δύο ετών,
- δ) αυξημένα επίπεδα CRP(C-αντιδρώσα πρωτεΐνη) και
- ε) σοβαρή μορφή εξωπνευμονικής σαρκοείδωσης όπως χειμετλοειδής λύκος και προσβολή του νευρικού συστήματος.²⁶

Η ινφλιξιμάμπη(Remicade) είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ενάντια στον παράγοντα νέκρωσης (TNF-α) και συνδέεται τόσο με το διαλυτό όσο και με το συνδεδεμένο σε κυτταρικό υποδοχέα TNF-α.

Χορηγείται για την θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας και της ενεργού νόσου του Crohn. Έχει αποδειχθεί αποτελεσματικό στις ανθεκτικές μορφές χρόνιας σαρκοείδωσης σε διάφορα προσβεβλημένα όργανα, όταν οι άλλες θεραπείες έχουν αποτύχει. Η συνιστώμενη είναι 5mg ανά Kg ενδοφλεβίως ανά 2 εβδομάδες τα πρώτα σχήματα και μετά ανά 4 με 8 εβδομάδες. Η χορήγηση αυτού του παράγοντα αυξάνει τον κίνδυνο λοιμώξεων κυρίως της φυματίωσης και της συστηματικής μυκητίασης, μπορεί να προκαλέσει αλλεργικές αντιδράσεις και αντενδείκνυται η χορήγησή του σε συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια. Η διάρκεια της θεραπείας δεν είναι σαφώς καθορισμένη και παρατηρούνται υποτροπές 3-12 μήνες μετά την διακοπή της θεραπείας.^{69,2,26,72}

Η ετανερσέπτη (Enbrel)αποτελεί μία πρωτεΐνη σύντηξης που δεσμεύει το διαλυτό TNF-α με αποτέλεσμα να αναστέλλει την σύνδεση του TNF-α στον κυτταρικό

υποδοχέα. Σύμφωνα με μελέτες που έγιναν σε ασθενείς με πνευμονική ή οφθαλμική σαρκοείδωση δεν επιβεβαιώθηκε η αποτελεσματικότητα της θεραπείας της ετανερσέπτης σε αυτούς τους ασθενείς και επομένως δεν συστήνεται η χορήγησή του.⁶⁹

Η ανταλιμουμάμπη (Humira) είναι ένα ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα ενάντια στον TNF-α(διαλυτό και συνδεδεμένο). Έχουν αναφερθεί μεμονωμένες περιπτώσεις ασθενών με σαρκοείδωση όπου ανταποκρίθηκαν στην θεραπεία με ανταλιμουμάμπη όταν είχαν αποτύχει όλες οι άλλες θεραπευτικές επιλογές, αλλά χρειάζονται περισσότερες μελέτες για να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα και η ασφάλειά της στην θεραπεία της πνευμονικής σαρκοείδωσης.⁶⁹

Άλλοι ανταγωνιστές του TNF-α

Η πεντοφυλλίνη είναι ένας αναστολέας της φωσφοδιεστεράσης εμποδίζοντας την απελευθέρωση του παράγοντα TNF-α από τα κυψελιδικά μακροφάγα ασθενών που πάσχουν από σαρκοείδωση και είναι αποτελεσματική σε πιο ήπιες μορφές σαρκοείδωσης.

Η θαλιδομίδη επηρεάζει την απελευθέρωση της IL-12 και εμποδίζει την απελευθέρωση του παράγοντα TNF-α από τα κυψελιδικά μακροφάγα συμβάλλοντας στην θεραπεία του χειμετλοειδή λύκου και της νευροσαρκοείδωσης, ενώ αμφίβολη είναι η αποτελεσματικότητά του στην πνευμονική σαρκοείδωση.

Τέλος η μινουκυκλίνη είναι ένα αντιβιοτικό με αντιφλεγμονώδη δράση μέσω εξασθένισης του παράγοντα TNF-α και το οποίο χορηγείται σε δόση 200mg την ημέρα για την θεραπεία της μέτριας και ήπιας δερματικής σαρκοείδωσης.^{6,69}

Μεταμόσχευση

Σε ασθενείς όπου η νόσος είναι ανθεκτική σε όποια θεραπεία η μόνη επιλογή αποτελεί η μεταμόσχευση του πάσχοντος οργάνου σε ποσοστό 3% για τον πνεύμονα και λιγότερο από 1% για την καρδιά και το ήπαρ. Η πενατετής επιβίωση μετά από μεταμόσχευση πνεύμονα ή ήπαρ σε ασθενείς που πάσχουν από σαρκοείδωση είναι η ίδια με αυτή των ασθενών που πάσχουν από άλλη νόσο.

Η πιθανότητα επανεμφάνισης σαρκοείδωσης μετά από μεταμόσχευση πνεύμονα είναι 50%.

Συνήθως εκδηλώνεται με την παρουσία μη νεκρωτικών κοκκιωμάτων τα οποία σπάνια προκαλούν συμπτώματα και διαταραχή της λειτουργίας του οργάνου, ενώ αντιμετωπίζονται αποτελεσματικά χωρίς να επηρεάζουν τον κίνδυνο επιπλοκών και την επιβίωση των ασθενών.^{14,69}

Ανοσολογικός μηχανισμός της σαρκοείδωσης

Η παθογένεια της νόσου δεν είναι σαφώς καθορισμένη, αλλά σύμφωνα με τις τελευταίες βιβλιογραφικές αναφορές, είναι αποτέλεσμα έκθεσης γενετικά ευπαθών ατόμων σε ειδικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες.¹

Πρόσφατες μελέτες συνδέουν την σαρκοείδωση με το μείζων σύμπλεγμα ιστό-συμβατότητας στην περιοχή του χρωμοσώματος 6p ενισχύοντας την υπόθεση της γενετικής προδιάθεσης. Τα στοιχεία αυτά δείχνουν ότι πιθανόν να υπάρχει κάποια γενετική προδιάθεση για τη νόσο αλλά κανένα μοντέλο γενετικής κληρονομικότητας δεν μπορεί να εξηγήσει σαφώς τον τρόπο κληρονομικότητας οδηγώντας τους ερευνητές στην θεωρία της πολυγονιδιακής/ πολυπαραγοντικής κληρονομικότητας.¹⁰

Η αρχική εκδήλωση της νόσου περιλαμβάνει την επίδραση άγνωστου αντιγόνου στα T-λεμφοκύτταρα και με την συμμετοχή γονιδίων του μείζων συστήματος ιστοσυμβατότητας II(MHCII), προκαλείται συσσώρευση μονοπύρηνων φλεγμονωδών κυττάρων, κυρίως των ενεργοποιημένων CD4 τύπου 1 βοηθητικών T- λεμφοκυττάρων (Th1).

Τα ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα απελευθερώνουν κυτοκίνες οι οποίες περιλαμβάνουν τις ιντερλευκίνες IL-1,IL-2,IL-6,IL-8 και την ιντερφερόνη-γ(INF-γ).⁷³

Ταυτόχρονα αυξάνεται η έκκριση των ιντερλευκινών IL-12 και IL-18 που μέσω θετικής ανατροφοδότησης αυξάνουν ακόμη περισσότερο την έκκριση της ιντερφερόνης-γ.

Η ιντερλευκίνη-18 είναι μία προ-φλεγμονώδη κυτταροκίνη η οποία αρχικά απομονώθηκε από τα ηπατοκύτταρα. Παράγεται κυρίως από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και η οποία συνεργικά με την ιντερλευκίνη-12 προάγουν την απάντηση των Th1 λεμφοκυττάρων μέσω της επαγωγής της ιντερφερόνης-γ.

Αυτή η διαδικασία επιτυγχάνεται μέσω της ιντερλευκίνης-12 η οποία ρυθμίζει την έκφραση του υποδοχέα της ιντερλευκίνης-18 στα κύτταρα στόχους.

Επίσης η IL-18 ενισχύει την κυτταροτοξικότητα των φονικών κυττάρων(Nk) και των T κυττάρων. Ο ρόλος της ιντερλευκίνης-18 είναι σημαντικός στην ανάπτυξη αυτοάνοσων, φλεγμονωδών και λοιμωδών παθήσεων όπως στον σακχαρώδη διαβήτη τύπου Ι, την νόσο του Crohn, την αλλεργική ρινίτιδα, την ρευματοειδή αρθρίτιδα κ.α.^{74,75,76}

Η ιντερφερόνη-γ είναι σημαντικός παράγοντας στην άμυνα του ξενιστή και στην φλεγμονώδη απάντηση μέσω πολλών ανοσορυθμιστικών επιδράσεων.⁷⁷

Σύμφωνα με αρκετές μελέτες τα επίπεδα της ιντερλευκίνης-18 και της ιντερφερόνης-γ είναι αυξημένα στον ορό και στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ασθενών που πάσχουν από σαρκοείδωση.

Αρκετοί γενετικοί πολυμορφισμοί έχουν αναφερθεί ότι συμβάλλουν στις ατομικές διαφορές του γενετικού υποστρώματος ως προς την ρύθμιση της παραγωγής ή και την λειτουργία αυτών των μορίων καθώς και στην φλεγμονώδη διαδικασία.

Αυτοί οι ειδικοί γονότυποι ίσως αυξάνουν την ευαισθησία ορισμένων ατόμων στην σαρκοείδωση, καθορίζουν την σοβαρότητα και την πρόγνωση της νόσου και προάγουν το σχηματισμό κοκκιώματος.

Σύμφωνα με την μελέτη των R.Janssen et al.(2004) εξετάστηκε ο ρόλος των πολυμορφισμών της ιντερλευκίνης-18 στην ανάπτυξη της σαρκοείδωσης σε Ολλανδούς πάσχοντες από τη νόσο.

Συγκεκριμένα μελετήθηκαν οι μονονουκλεοτιδικές αλλαγές: -656T/G, -607A/C, -137G/C και +1248 A/G.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ αυτών των πολυμορφισμών και της ανάπτυξης σαρκοείδωσης σε Ολλανδούς. Αντίθετα, στην μελέτη των Takada et al.(2002) διαπιστώθηκε ότι ο πολυμορφισμός της ιντερλευκίνης-18 στην θέση -607A/C και ιδιαίτερα ο γονότυπος -607C/C ίσως να αποτελεί γενετικό παράγοντα κινδύνου ανάπτυξης σαρκοείδωσης σε πληθυσμό Ιαπώνων, σε αντίθεση με τον γονότυπο -137G/C στον οποίο δεν διαπιστώθηκε σημαντική διαφορά στην συχνότητα κατανομής του φαινοτύπου και του γονότυπου. Ενδιαφέρον είναι ότι στην παραπάνω μελέτη τα αποτελέσματα έδειξαν στατιστικά μεγαλύτερη συχνότητα του γονότυπου CA στην θέση -607 σε ασθενείς με σαρκοείδωση, από ότι στους ασθενείς με τον γονότυπο AA και στατιστικά μεγαλύτερη αναλογία στους ασθενείς που είχαν τον γονότυπο -607A/A συγκριτικά με τους μάρτυρες. Επίσης δεν παρατηρήθηκε προσβολή συγκεκριμένου οργάνου που να σχετίζεται με συγκεκριμένο γονότυπο ή φαινότυπο.^{78,79}

Σε μια άλλη μελέτη των Zhou et al.(2005) διαπιστώθηκε αυξημένη έκφραση του υποδοχέα α της ιντερλευκίνης-18(IL-18Ra) από τα CD4⁺ T-κύτταρα και στους πνεύμονες και στο περιφερικό αίμα σε ασθενείς με σαρκοείδωση, υποδεικνύοντας τη σημασία της ιντερλευκίνης-18 και του συστήματος του υποδοχέα της, καθώς και των CD4⁺ T-κυττάρων στην φλεγμονώδη διαδικασία της σαρκοείδωσης και αντανάκλα τη συστηματική φύση της νόσου.⁸⁰

Σε μία άλλη μελέτη των Zhou et al.(2005) αναζητήθηκε η συσχέτιση των τριών πολυμορφισμών -137G/C, -167C/A, και του -656G/T των υποκινητών του γονιδίου της ιντερλευκίνης 18, με την εκδήλωση της σαρκοείδωσης.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης η δραστηριότητα του υποκινητή του πιο συχνού απλότυπου -137G/-167C/-656 G ήταν αυξημένη σε σχέση με τον άλλο απλότυπο -137G/-167 A/-656T, αλλά δεν υπήρχε σημαντική συσχέτιση με την κλινική εμφάνιση της σαρκοείδωσης.

Επομένως αυτοί οι απλότυποι αλλάζουν την έκφραση της πρωτεΐνης στην σαρκοείδωση αλλά δεν συμβάλλουν στην εκδήλωση της σαρκοείδωσης.⁸¹

Στον ανοσολογικό μηχανισμό ανάπτυξης της σαρκοείδωσης, όπως ήδη έχει αναφερθεί, συμμετέχει και η ιντερλευκίνη-12 η οποία παίζει ρόλο στην διαμόρφωση της ανοσολογικής απάντησης προάγοντας την απάντηση των T-βοηθητικών λεμφοκυττάρων (Th1). Η ιντερλευκίνη-12 είναι μία κυτοκίνη η οποία ανιχνεύεται σε μεγάλο αριθμό αυτοάνοσων και φλεγμονωδών παθήσεων όπου κυριαρχεί η έκφραση των Th1 λεμφοκυττάρων και ευθύνεται για την διαταραχή της ισορροπίας του ανοσοποιητικού συστήματος. Σύμφωνα με την μελέτη των Hata et al.(2007) διαπιστώθηκαν στον ορό αυξημένα επίπεδα της IL-12p40 σε ασθενείς με σαρκοείδωση σε σχέση με τους υγιείς καθιστώντας την ένα σημαντικό δείκτη ενεργότητας της νόσου.⁸⁶

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον υπάρχει τελευταία για την ανίχνευση πολυμορφισμών της IL-12 που σχετίζονται με αυξημένη ευαισθησία σε αυτοάνοσες παθήσεις όπως είναι η σαρκοείδωση. Ο πρώτος πολυμορφισμός που έχει περιγραφεί στο γονίδιο IL-12p40 είναι μία μονονουκλεοτιδική αλλαγή rs3212227 στην θέση που ίσχυε παλαιότερα +1188A/C στο μη μεταφραζόμενο 3' άκρο του γονιδίου (3'UTR) το οποίο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 5q31-33. Η ισχύουσα θέση σήμερα η οποία μελετήθηκε είναι +1602(A/C)(rs3212227).

Έχουν δημοσιευθεί μερικές μελέτες οι οποίες είχαν στόχο την αναζήτηση συσχέτισης του παραπάνω πολυμορφισμού σε αυτοάνοσες παθήσεις όπως την νόσο του

Crohn (DC), την ρευματοειδή αρθρίτιδα (RA), το σύνδρομο Felty και την σκλήρυνση κατά πλάκας (MS), ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση, όπου κυριαρχούν τα Th1 λεμφοκύτταρα. Σύμφωνα με την μελέτη των Seegers et al.(2002) ο πολυμορφισμός TaqI (RFLP) rs3212227 (+1188A/C) στην 3'UTR περιοχή του γονιδίου της IL-12 σχετίζεται με αυξημένη έκκριση της IL-12p70 in vitro αλλά όχι της p40 σε ασθενείς με νόσο του Crohn. Διαπιστώθηκε ότι οι ομοζυγώτες +1188 C/C παρουσίαζαν αυξημένη έκκριση της IL-12p70 in vitro, ενώ οι +1188 A/A χαμηλή έκκριση και οι ετεροζυγώτες +1188 A/C ενδιάμεση έκκριση.

Αντίθετα δεν υπήρχε συσχέτιση γονότυπου και ικανότητας των μονοκυττάρων να παράγουν την IL-12p40. Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα της μελέτης των Hall et al.(2000) όπου δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση της μονονουκλεοτιδικής αλλαγής της IL-12 p40 στην ρευματοειδή αρθρίτιδα, στο σύνδρομο Felty στην σκλήρυνση κατά πλάκας και στην πνευμονική ίνωση. Αν και σύμφωνα με τα πρόσφατα δεδομένα από τις μελέτες δεν υπάρχει συσχέτιση του πολυμορφισμού της IL-12 p40 με τη ανάπτυξη αυτοάνοσων παθήσεων, χρειάζεται να γίνουν περισσότερες μελέτες σε άλλους λειτουργικούς πολυμορφισμούς του γονιδίου που ρυθμίζει την έκφραση των κυτοκινών από τα Th1 λεμφοκύτταρα ή των υποδοχέων τους που εμπλέκονται στην παθογένεια αυτών των νοσημάτων όπως είναι η σαρκοείδωση.^{82,83,84,85}

Από την ανασκόπηση της πιο πρόσφατης βιβλιογραφίας προκύπτει ότι στην παθογένεια της σαρκοείδωσης συμμετέχουν αρκετά γονίδια και οι πολυμορφισμοί τους. Σημαντικός είναι ο ρόλος πολυμορφισμών των γονιδίων BTNL2 (MIM606000) και του SLC11A1(NRAMP1) στην ανάπτυξη φλεγμονώδους απάντησης σε ασθενείς με σαρκοείδωση.

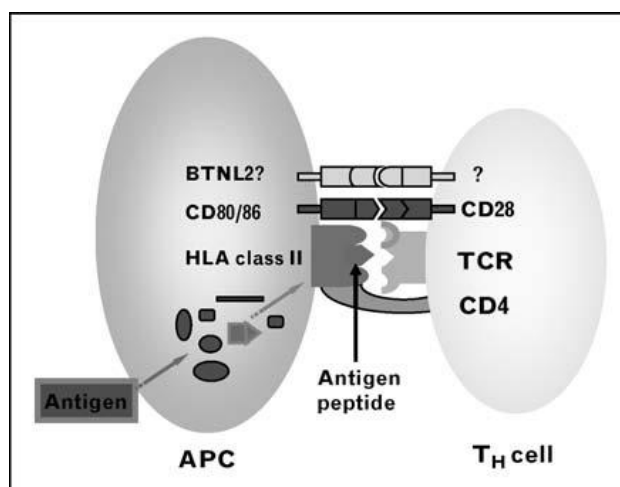
Πρόσφατη μελέτη των Dubaniewicz et al.(2005) συσχετίζει μονονουκλεοτιδικές αλλαγές (SNPs) καθώς και πολυμορφικές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες του γονιδίου SLC11A1 με την παθογένεια της σαρκοείδωσης.

Στην συγκεκριμένη μελέτη διαπιστώθηκε συσχέτιση ορισμένων πολυμορφισμών και συγκεκριμένων επαναλαμβανόμενων αλληλίων του γονιδίου με την ανάπτυξη σαρκοείδωσης σε Πολωνούς. Τα πολυμορφικά αλληλία του γονιδίου SLC11A1 έχουν συσχετισθεί με αυξημένη ευαισθησία σε μολυσματικούς παράγοντες όπως στην φυματίωση και την λέπρα καθώς και με διαταραχή του ανοσοποιητικού συστήματος. Αποδεικνύεται από πολλές μελέτες η παρουσία του SLC11A1 στα λυσοσώματα των μακροφάγων και των πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων. Το SLC11A1 κωδικοποιεί την φυσική αντίσταση που σχετίζεται με την πρωτεΐνη 1 των μακροφάγων η οποία ρυθμίζει το δισθενές κατιόν της ομοιοστασίας των μακροφάγων και έχει πλειοτροπική επίδραση στην λειτουργία τους.^{87,88}

Το γονίδιο BTNL2 αποτελεί μέλος της οικογένειας του υποδοχέα B7 που πιθανόν συμβάλλει και αυτό το μόριο στην ενεργοποίηση των T- κυττάρων. Ανήκει στην τάξη II του μείζονος συμπλέγματος ιστό-συμβατότητας στην περιοχή του χρωμοσώματος 6p21.3. Πρόκειται για μία πρωτεΐνη της οποίας συγκεκριμένη μονονουκλεοτιδική αλλαγή (rs2076530 G/A) η οποία εντοπίζεται στο 3' άκρο της κωδικοποιούσας περιοχής του εξονίου 5, έχει πρόσφατα συσχετισθεί με αυτοάνοσες φλεγμονώδεις παθήσεις όπως είναι η σαρκοείδωση και η μυοσίτιδα, αν και δεν είναι ξεκάθαρη η ανοσολογική βάση αυτής της συσχέτισης.

Το αλληλόμορφο A της μονονουκλεοτιδικής αλλαγής SNP (rs2076530 G/A) του γονιδίου BTNL2 οδηγεί στην παραγωγή πρωτεΐνης μικρότερου μεγέθους από την κανονική. Αυτή η πρωτεΐνη πιστεύεται ότι είναι συνενεργοποιητής μορίων που

συσχετίζονται με τους υποδοχείς CD80 και CD86 οι οποίοι με τη σειρά τους μπορεί να επηρεάσουν την ενεργοποίηση και ρύθμιση των Τ-λεμφοκυττάρων (εικόνα 21).



Εικόνα 21: Σε αυτή την εικόνα φαίνεται η αλληλεπίδραση του συνενεργοποιητικού μορίου CD28 με τα μόρια υποδοχείς CD80/86. Επίσης απεικονίζεται ο πιθανός ρόλος του BTNL2 ως επιπλέον συνενεργοποιητής μορίων.⁹²

Στην μελέτη των Nguyen et al.(2006) έχει διαπιστωθεί ότι το γονίδιο BTNL2 συνδέεται σε ένα θεωρούμενο υποδοχέα των ενεργοποιημένων Τ-κυττάρων και λειτουργεί σαν αναστολέας πολλαπλασιασμού αυτών των κυττάρων.^{89,90,91,92}

Υπάρχουν μελέτες που αποδεικνύουν συσχέτιση του SNP rs2076530 του γονιδίου BTNL2 με την ανάπτυξη σαρκοείδωσης σε λευκούς Γερμανούς, καθώς και σε λευκούς Αμερικανούς και Αφροαμερικανούς. Οι τελευταίοι εμφανίζουν συχνότερα ενδοθωρακική συμπτωματική νόσο για την οποία απαιτείται θεραπεία και έχουν χειρότερη πρόγνωση σε σχέση με τη λευκή φυλή.⁹³

Σε μία μελέτη σε πληθυσμό Γερμανών διαπιστώθηκε αυξημένη συχνότητα εμφάνισης του αλληλομόρφου A της μονονουκλεοτιδικής αλλαγής rs2076530 G/A σε ασθενείς που έπασχαν από σαρκοείδωση και ιδιαίτερα από την χρόνια μορφή αυτής, σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες.

Αντίθετα σε μία πρόσφατη μελέτη των Spagnolo et al.(2007) αναφέρεται ότι η αυξημένη συχνότητα του αλληλομόρφου A η οποία διαπιστώθηκε σε Άγγλους και Ολλανδούς ασθενείς που έπασχαν από σαρκοείδωση, δεν ήταν πια σημαντική όταν εξαιρέθηκαν οι ασθενείς που έπασχαν από σύνδρομο Löfgren και προσαρμόστηκε στο σύμπλεγμα ιστό-συμβατότητας HLA- DRB1.⁹⁴

Επίσης αποδείχθηκε ότι στους λευκούς ασθενείς η συσχέτιση του BTNL2 με την σαρκοείδωση ήταν ανεξάρτητη από την παρουσία των γονιδίων του συστήματος HLA-DRB1, ενώ διαπιστώθηκε αρνητική αλληλεπίδραση μεταξύ των γονιδίων BTNL2 και της τάξης II του συμπλέγματος HLA, το οποίο όμως δεν αποδεικνύεται στην μελέτη των Valentonyte et al.(2005).

Ενδιαφέρον έχει η μελέτη των Iannuzzi et al.(2003) όπου διαπιστώθηκε ότι σε άτομα που δεν φέρουν τους πολυμορφισμούς DQB1*0201 και DQB1*0602 και έχουν εκτεθεί σε υψηλό ποσοστό υγρασίας στο χώρο εργασίας για πάνω από ένα χρόνο έχουν αυξημένη συχνότητα εμφάνισης σαρκοείδωσης. Αντίθετα η παρουσία μόνο

του πολυμορφισμού DQB1*0201 έχει προστατευτικό ρόλο στην ανάπτυξη σαρκοείδωσης.⁹⁵

Μία πρόσφατη μελέτη των Morais et al.(2012) σε Πορτογάλους επιβεβαιώθηκε η συσχέτιση της μετάλλαξης rs2076530 G>A του γονιδίου BTNL2 και συγκεκριμένα του αλληλίου A, με την αυξημένη συχνότητα εμφάνισης της σαρκοείδωσης.⁹⁶ Σύμφωνα με την μελέτη των Orozco G. et al.(2005) η μετάλλαξη rs2076530 G>A του γονιδίου BTNL2 δεν συνεισφέρει σημαντικά στην παθογένεια και την συχνότητα εμφάνισης των αυτοάνοσων νοσημάτων, του σακχαρώδη διαβήτη τύπου II, της ρευματοειδούς αρθρίτιδας και του συστηματικού ερυθηματώδους λύκου.⁹⁷

Αντίθετα στην πρόσφατη μελέτη των Mitsunaga S. Et al.(2013) σε Ιάπωνες ανιχνεύθηκαν τρεις non-synonymous μονονουκλεϊτιδικές αλλαγές(SNP) οι οποίες αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης της ρευματοειδούς αρθρίτιδας.⁹⁸

Έχουν γίνει πρόσφατες μελέτες με στόχο να διαπιστωθεί η ύπαρξη συσχέτισης συγκεκριμένου πολυμορφισμού με άλλες κοκκιωματώδεις νόσους, όπως είναι η φυματίωση, η βηρυλλίωση και η νόσος Wegener.

Στη μελέτη των Marlo Möller et al.(2007) σε πληθυσμό Νότιο-Αφρικανών, δεν επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη συσχέτισης του SNP rs2076530 (G>A) του γονιδίου BTNL2 με την ανάπτυξη φυματίωσης, αλλά χρειάζεται να γίνουν και άλλες μελέτες σε άλλους πληθυσμούς μη Αφρικανικής καταγωγής.⁹⁹

Ως προς τη βηρυλλίωση, η οποία είναι μία κοκκιωματώδης νόσος με την ίδια ακτινολογική και κλινική εικόνα με την σαρκοείδωση, αναζητήθηκε στην μελέτη των Sato H et al.(2007) η συσχέτιση αυτής με το rs3117099 (T/T) SNP του γονιδίου BTNL2 η οποία δεν επιβεβαιώθηκε.¹⁰⁰ Απουσία συσχέτισης διαπιστώθηκε και στην κοκκιωματώδη νόσο Wegener.⁹⁰ Επιπλέον στην μελέτη των Simmonds M. et al.(2006) διαπιστώθηκε πιθανή συσχέτιση του πολυμορφισμού rs2076530 G/A με την νόσο Grave's η οποία είναι δευτερεύουσα σε συνδυασμό με την συσχέτιση με το DRB1 στο εξόνιο 2 στην θέση β74.¹⁰¹

Στην μελέτη των Traherne J.A. et al.(2006) σε οικογένειες Άγγλων, Αμερικανών και Αφροαμερικανών διαπιστώθηκε συσχέτιση του γονιδίου BTNL2 με την σκλήρυνση κατά πλάκας μόνο στους Αφροαμερικανούς με πρωταρχική συσχέτιση του DRB1*15.¹⁰²

Σε μία ακόμη μελέτη των Johnson M. C. et al.(2007) δεν υπήρξε σημαντική συσχέτιση της μετάλλαξης rs2076530 του γονιδίου BTNL2 με την νόσο του Grohn, την φυματίωση, ενώ παρατηρήθηκε συσχέτιση με την λέπρα¹⁰³.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης των M. Coudurier et al.(2009) η παρουσία του πολυμορφισμού rs2076530 σε ετερόζυγη μορφή G>A σε οικογένειες ασθενών με σαρκοείδωση, συνδέονταν με ενδιάμεσο κίνδυνο για ανάπτυξη κοκκιωματώδους φλεγμονής, ενώ σε ομόζυγη μορφή A/A παρατηρήθηκε αυξημένος κίνδυνος κοκκιωματώδους φλεγμονής, καθιστώντας τον προγνωστικό παράγοντα σε σοβαρές μορφές σαρκοείδωσης¹⁰⁴.

Σε μία μελέτη των Thomas Meyer et al.(2008) εντοπίστηκε η μετάλλαξη rs2076530 (G>A) σε ομόζυγη μορφή στον εξόνιο 5 του γονιδίου BTNL2 σε ασθενή που έπασχε από μεμονωμένη καρδιακή σαρκοείδωση επιβεβαιωμένη με βιοψία μυοκαρδίου και με συνοδό συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια και σοβαρή ταχυαρρυθμία.

Η προσβολή της καρδιάς από την σαρκοείδωση αποτελεί σοβαρή μορφή της νόσου και η έγκαιρη διάγνωσή της, η οποία δεν μπορεί να αποκλεισθεί με μία αρνητική βιοψία μυοκαρδίου, είναι σημαντική για την πρόληψη της καρδιακής ανεπάρκειας.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι η ανίχνευση των μεταλλάξεων του γονιδίου BTNL2 μπορεί να βοηθήσει στην διάγνωση της σαρκοείδωσης σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια και στην χορήγηση της κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής.¹⁰⁵

Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών υπογραμμίζουν την πολυπλοκότητα των γενετικών παραγόντων κινδύνου για την σαρκοείδωση που απορρέουν από την περιοχή του μείζονος συμπλέγματος ιστό-συμβατότητας.^{102,106,107,108}

Όλα τα παραπάνω οδηγούν στη διαμόρφωση της θεωρίας της γενετικής προδιάθεσης της σαρκοείδωσης αλλά και την καθοριστική σημασία κάποιου ή κάποιων επιγενετικών παραγόντων.

Σκοπός της μελέτης

Η σαρκοείδωση είναι μια πολυσυστηματική νόσος αγνώστου αιτιολογίας με σαφή ανοσολογική βάση όπως προκύπτει από πολλές μελέτες. Φαίνεται να υπάρχει κάποια ανωμαλία στο ανοσολογικό προφίλ των ασθενών με σαρκοείδωση, η οποία αφορά τα T- λεμφοκύτταρα και τις εκκρινόμενες από αυτά κυτταροκίνες. Εκφράζεται πλέον η άποψη ότι οι κυτταροκίνες δεν αποτελούν μόνο το αποτέλεσμα της αλλαγής στην ανοσολογία των ασθενών, αλλά ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην φυσική πορεία της νόσου. Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης το γεγονός ότι συγκεκριμένοι γονότυποι των κυτταροκινών αυτών έχουν συνδεθεί με την αυξημένη παραγωγή τους δημιουργώντας το ερώτημα σχετικά με το κατά πόσο οι συγκεκριμένοι γονότυποι μπορούν να επηρεάζουν την προδιάθεση για την νόσο ή την εξέλιξή της. Σκοπός της μελέτης αυτής είναι να ταυτοποιηθούν συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί των ιντερλευκινών 12 και 18 και να μελετηθούν τα έξι εξόνια του γονιδίου BTNL2 για την ανίχνευση μεταλλάξεων ή πολυμορφισμών, σε Έλληνες ασθενείς με σαρκοείδωση και να συγκριθεί η συχνότητά τους με υγιή άτομα του γενικού πληθυσμού. Ο απώτερος στόχος της μελέτης ήταν η ανεύρεση συσχετίσεων που θα μπορούσαν να βοηθήσουν στην καλύτερη κατανόηση της παθοφυσιολογίας της νόσου.

Υλικό και Μέθοδοι

Ασθενείς και ομάδα ελέγχου

Στην μελέτη συμμετείχαν συνολικά 146 ασθενείς που έπασχαν από σαρκοείδωση. Οι ασθενείς προήρθαν από το εξωτερικό ιατρείο «Διαμέσων Πνευμονοπαθειών» της Α' Πανεπιστημιακής Πνευμονολογικής κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών και από το εξωτερικό ιατρείο «Σαρκοείδωσης» του Ν.Ν.Θ.Α. «Η Σωτηρία».

Η ομάδα των ασθενών αποτελούνταν από 56 άνδρες και 90 γυναίκες με μέσο όρο ηλικίας $46 \pm 12,7\%$. Η διάγνωση των ασθενών έγινε με βάση τυπικά κλινικά και ακτινολογικά ευρήματα σε ποσοστό 37% ενώ σε ποσοστό 92,5% πραγματοποιήθηκε και βιοψία σε κάποιο προσβεβλημένο όργανο. Το μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών 69,9% ήταν μη καπνιστές, επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα και προηγούμενων μελετών που υποστηρίζουν ότι το κάπνισμα ίσως προστατεύει από την εκδήλωση της σαρκοείδωσης.

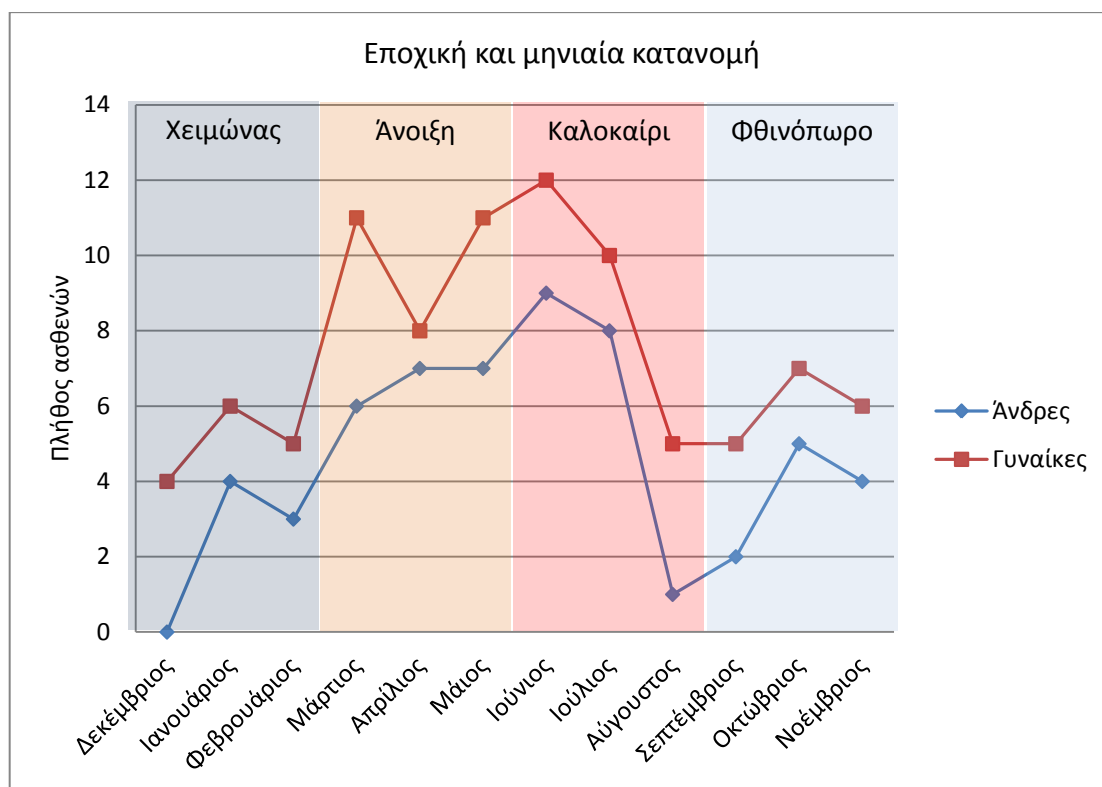
Στον πίνακα 1 συνοψίζονται τα επιδημιολογικά στοιχεία των ασθενών. Όπως παρατηρείται η συχνότερη ηλικία διάγνωσης αποτελεί η δεκαετία μεταξύ 40 και 50 ετών, ενώ η διάγνωση γίνεται συνήθως στα στάδια Ι και ΙΙ.

Αυξημένη συχνότητα εκδήλωσης της σαρκοείδωσης σε Έλληνες ασθενείς παρατηρείται, όπως δείχνει το σχεδιάγραμμα 1, την άνοιξη και το καλοκαίρι από τον μήνα Μάρτιο έως τον Ιούλιο. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η αυξημένη συχνότητα δερματικής εκδήλωσης της νόσου στις γυναίκες σε ποσοστό 17,8% έναντι εκδήλωσής της στους άνδρες σε ποσοστό 4,1%.

Η ομάδα ελέγχου αποτελείται από 90 υγιή άτομα εθελοντές, 37 άνδρες και 53 γυναίκες από το γενικό πληθυσμό με μέση ηλικία $46 \pm 18,4$, με φυσιολογική ακτινογραφία θώρακος και φυσιολογικό λειτουργικό έλεγχο της αναπνοής.

	Συνολικά		Άνδρες		Γυναίκες	
Πλήθος	146	(100,0%)	56	(38,4%)	90	(61,6%)
Μέση ηλικία (±SD)	46	±12,7	40	±11,8	50	±11,9
Μέση ηλικία διάγνωσης (±SD)	45	±12,5	39	±12,1	48	±11,4
20-30	20	(13,7%)	11	(7,5%)	9	(6,2%)
30-40	33	(22,6%)	22	(15,1%)	11	(7,5%)
40-50	44	(30,1%)	14	(9,6%)	30	(20,5%)
50-60	31	(21,2%)	4	(2,7%)	27	(18,5%)
60-70	14	(9,6%)	4	(2,7%)	10	(6,8%)
70-80	4	(2,7%)	1	(0,7%)	3	(2,1%)
Στάδιο νόσου κατά την διάγνωση						
0	10	(6,8%)	2	(1,4%)	8	(5,5%)
I	64	(43,8%)	22	(15,1%)	42	(28,8%)
II	52	(35,6%)	22	(15,1%)	30	(20,5%)
III	15	(10,3%)	5	(3,4%)	10	(6,8%)
IV	5	(3,4%)	5	(3,4%)	0	(0,0%)
Κάπνισμα						
Όχι	102	(69,9%)	27	(18,5%)	75	(51,4%)
Ναι	31	(21,2%)	21	(14,4%)	10	(6,8%)
Πρώην	13	(8,9%)	8	(5,5%)	5	(3,4%)
Μήνας / Εποχή διάγνωσης						
Χειμώνας	22	(15,1%)	7	(4,8%)	15	(10,3%)
Δεκέμβριος	4		0		4	
Ιανουάριος	10		4		6	
Φεβρουάριος	8		3		5	
Άνοιξη	50	(34,2%)	20	(13,7%)	30	(20,5%)
Μάρτιος	17		6		11	
Απρίλιος	15		7		8	
Μάιος	18		7		11	
Καλοκαίρι	45	(30,8%)	18	(12,3%)	27	(18,5%)
Ιούνιος	21		9		12	
Ιούλιος	18		8		10	
Αύγουστος	6		1		5	
Φθινόπωρο	29	(19,9%)	11	(7,5%)	18	(12,3%)
Σεπτέμβριος	7		2		5	
Οκτώβριος	12		5		7	
Νοέμβριος	10		4		6	
Τρόπος διάγνωσης						
Βιοψία	135	(92,5%)	45	(30,8%)	90	(61,6%)
Βιοψία λεμφαδένων	32	(21,9%)	10	(6,8%)	22	(15,1%)
Βιοψία δέρματος	27	(18,5%)	5	(3,4%)	22	(15,1%)
Βιοψία χειρουργική	13	(8,9%)	4	(2,7%)	9	(6,2%)
Βιοψία ενδοβρογχική	31	(21,2%)	12	(8,2%)	19	(13,0%)
Βιοψία διαβρογχική	32	(21,9%)	14	(9,6%)	18	(12,3%)
Κλινικοακτινολογικά	54	(37,0%)	27	(18,5%)	27	(18,5%)
Εξωθωρακική σαρκοείδωση						
Ασβεστιουρία	35	(24,0%)	19	(13,0%)	16	(11,0%)
Καρδιά	9	(6,2%)	3	(2,1%)	6	(4,1%)
Μάτια	9	(6,2%)	2	(1,4%)	7	(4,8%)
Δέρμα	32	(21,9%)	6	(4,1%)	26	(17,8%)
Loefgren	27	(18,5%)	11	(7,5%)	16	(11,0%)
Νεύρα	2	(1,4%)	0	(0,0%)	2	(1,4%)
Ασθενείς με υποτροπές	36	(24,7%)	14	(9,6%)	22	(15,1%)
Πλήθος ατόμων με Follow	121	(82,9%)	43	(29,5%)	78	(53,4%)
Λειτουργικός έλεγχος κατά τη διάγνωση (±SD)						
FVC%	99	±20	93	±23	102	±17
FEV1%	94	±21	90	±23	96	±20
DLCO%	83	±24	85	±23	82	±25

(*) Τα ποσοστά έχουν υπολογιστεί επί του συνόλου του πλήθους του δείγματος



Σχεδιάγραμμα 1

Πειραματική μεθοδολογία

Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του γενωμικού DNA πραγματοποιήθηκε με την εμπορικά διαθέσιμη μέθοδο απομόνωσης Nucleospin Blood L της εταιρίας MACHEREY-NAGEL, από 146 δείγματα ολικού αίματος ασθενών που πάσχουν από σαρκοείδωση και από 90 δείγματα ολικού αίματος υγιών ατόμων και φύλαξη σε κατάψυξη στους -20°C μέχρι περαιτέρω επεξεργασίας. Η διαδικασία απομόνωσης του DNA περιγράφεται παρακάτω.

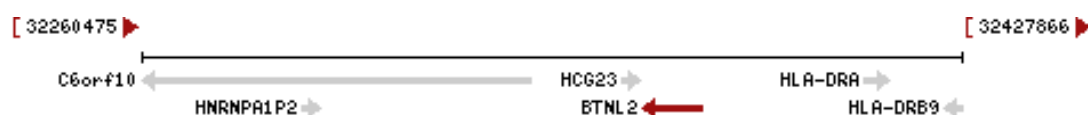
Αρχικά προστίθενται σε 2ml περιφερικού αίματος 150μl διαλύματος πρωτεΐνάσης K και 2ml του ρυθμιστικού διαλύματος BQ1 για να επιτευχθεί λύση της μεμβράνης των λευκοκυττάρων. Εν συνεχεία τοποθετούνται τα σωληνάρια με το παραπάνω δείγμα σε υδατόλουτρο στους 56°C για 15min. Προστίθενται 2 ml αιθανόλης (96-100%) σε κάθε δείγμα ώστε να επιτευχθεί η κατακρήμνιση του DNA. Κατόπιν 3ml από το παραπάνω μείγμα μεταφέρονται σε ειδική στήλη και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 3min στις 4,500 στροφές.

Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται για το υπόλοιπο δείγμα. Ακολουθεί το πλύσιμο της μεμβράνης διοξειδίου του πυριτίου σε 2 στάδια. Στο πρώτο στάδιο προστίθενται 2ml ρυθμιστικού διαλύματος BQ2 και φυγοκεντρείται για 2min στις 4,500 στροφές. Στο δεύτερο στάδιο προστίθενται άλλα 2ml του διαλύματος BQ2 και φυγοκεντρείται για 10min στις 4,500 στροφές. Σε αυτό το στάδιο επιτυγχάνεται και

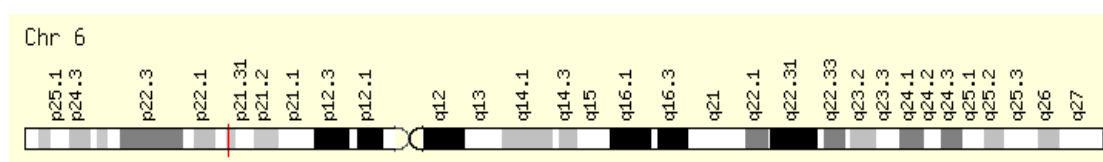
το στέγνωμα της μεμβράνης. Στο τελευταίο στάδιο για την εξαγωγή του καθαρού DNA τοποθετείται η ειδική στήλη σε νέα σωληνάρια και προστίθενται 200μl από το προθερμασμένο ρυθμιστικό διάλυμα BE (70°C) στο κέντρο της μεμβράνης και παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για 2min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 2min στις 4,500 στροφές και συλλέγεται το υποκείμενο μείγμα κεκαθαρμένου DNA σε ειδικά σωληνάρια (epredorf) και τα δείγματα καταψύχονται στους -20°C μέχρι περαιτέρω επεξεργασίας.

Ανίχνευση μεταλλάξεων του γονιδίου BTNL2

Το γονίδιο της βουτυροφιλίνης-2 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 6 στη θέση 6p21.3 με ID:56244, MIM: 606000, NM: 019602 και συνδέεται με το μείζων σύστημα ιστοσυμβατότητας II (MHC class II), όπως φαίνεται στην εικόνα 22 και 23.



Εικόνα 22: Παρατηρούμε στην εικόνα το χρωμόσωμα 6 και την θέση του γονιδίου BTNL2 σε αυτό. Η εικόνα ελήφθη από την ηλεκτρονική διεύθυνση www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/56244.



Εικόνα 23: Παρατηρούμε στην εικόνα ολόκληρο το χρωμόσωμα 6 και την θέση του γονιδίου BTNL2 σε αυτό (κόκκινη γραμμή). Η εικόνα ελήφθη από την ηλεκτρονική διεύθυνση : www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=Btln2

Για την ανίχνευση των μεταλλάξεων και πολυμορφισμών του γονιδίου αρχικά χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) για την απομόνωση του DNA και στην συνέχεια ακολούθησε καθαρισμός και ανάλυση της πρωτοταγούς δομής του DNA για την εύρεση γενετικών αλλαγών με την μέθοδο της αλληλούχισης του DNA (DNA sequencing).

Μέθοδος Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης

Αρχή της μεθόδου

Μετά την απομόνωση του DNA από το ολικό αίμα, τα προς μελέτη τμήματα του γενετικού υλικού πολλαπλασιάστηκαν με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR). Η αρχή της PCR συνοψίζεται στην in vitro ενίσχυση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA με τη χρήση διαδοχικών μεταβολών θερμοκρασίας. Η PCR επιτρέπει την ενζυμική σύνθεση της επιθυμητής αλληλουχίας του DNA, το οποίο μπορεί να έχει μέγεθος από 100 ζεύγη βάσεων έως περισσότερα από 2000 σε χρονικό διάστημα λίγων ωρών.

Κατά τη διαδικασία αυτή παράγονται πολλαπλά αντίγραφα (περίπου 1×10^9) ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA, που οριοθετείται από τις αλληλουχίες των εκκινητών, ξεκινώντας ακόμη και από απειροελάχιστη ποσότητα υποστρώματος (1-2 κύτταρα).

Η μέθοδος βασίζεται στην ιδιότητα της DNA πολυμεράσης να συνθέτει συμπληρωματική αλυσίδα DNA σε κατεύθυνση 5'→3', χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα μονόκλωνο DNA.

Ο σχεδιασμός των εκκινητών για τον πολλαπλασιασμό των εξονίων του γονιδίου BTNL2 έγινε με βάση την αλληλουχία που έχει δημοσιευθεί στην βάση δεδομένων Ensembl (www.ensembl.org) με ταυτότητα μεταγράφου ENST00000374993 το οποίο αποτελείται από έξι εξόνια και με μήκος 1368 ζεύγη βάσεων. Η παραγόμενη πρωτεΐνη αποτελείται από 455 αμινοξέα.

Αντιδραστήρια και διαδικασία της αντίδρασης

Απαραίτητα στοιχεία για την πραγματοποίηση της αντίδρασης PCR, εκτός από το DNA που χρησιμοποιείται σαν εκμαγείο για την παρασκευή αντιγράφων, είναι το ένζυμο (DNA πολυμεράση), μείγμα τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs), χλωριούχο μαγνήσιο ($MgCl_2$), ζευγάρια εκκινητών που θα καθορίζουν και το μέγεθος των αντιγράφων DNA, ένα ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει στοιχεία που βελτιστοποιούν την αντίδραση και τη δράση του ενζύμου και νερό. Το νερό παρέχει το υγρό περιβάλλον στο οποίο θα πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο και απιονισμένο νερό.

Η αντίδραση είχε τελικό όγκο 25 μL . Τα συστατικά της αντίδρασης αυτής είναι το ένζυμο, ο κατάλληλος διαλύτης. Το επόμενο συστατικό που χρησιμοποιήθηκε είναι το διάλυμα Hotstart της εταιρίας QIAGEN, το οποίο περιέχει το ένζυμο που ευθύνεται για τον πολυμερισμό του επιθυμητού τμήματος DNA. Το ένζυμο αυτό είναι μια θερμοανθεκτική Taq DNA πολυμεράση. Η πολυμεράση αυτή, που απομονώθηκε από το θερμοφίλο βακτήριο των θερμοπηγών *Thermus aquaticus*, είναι σταθερή σε θερμοκρασία 95°C και εισάγεται μόνο μια φορά στο μίγμα, στην αρχή της αντίδρασης.

Εκτός από το ένζυμο το μείγμα Hotstart περιέχει το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα ώστε να εξασφαλίζεται το άριστο pH και η βέλτιστη ιονική ισχύς για την αντίδραση. Επίσης περιέχει $MgCl_2$ σε συγκέντρωση 1,5mM. Το $MgCl_2$ παρέχει στην αντίδραση τα δισθενή κατιόντα μαγνησίου που αποτελούν συμπαραγόντες για ένζυμα όπως περιοριστικές ενδονουκλεάσες και πολυμεράσες που χρησιμοποιούνται στην τεχνική PCR.

Εκτός από την αναγκαιότητά τους για τη λειτουργία του ενζύμου, τα ιόντα μαγνησίου σχηματίζουν διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs, κάτι που διευκολύνει την ενσωμάτωσή τους στην αλυσίδα του DNA και επηρεάζουν την αποδιάταξη των εκκινητών. Επιπλέον αυξάνουν την T_m (melting temperature), δηλαδή την θερμοκρασία κατά την οποία η μετάβαση από το δίκλωνο στο μονόκλωνο μόριο του DNA έχει πραγματοποιηθεί κατά 50%.

Σε κάθε αντίδραση πρέπει να βρίσκεται η ιδανικότερη συγκέντρωση ιόντων μαγνησίου. Χαμηλότερες συγκεντρώσεις από την ιδανική έχουν σαν αποτέλεσμα την χαμηλότερη απόδοση της αντίδρασης, ενώ υψηλότερες συγκεντρώσεις διευκολύνουν την παραγωγή μη ειδικών προϊόντων.

Το διάλυμα Hotstart περιέχει επίσης μείγμα από dNTPs σε ίσες συγκεντρώσεις των dATP, dTTP, dCTP και dGTP. Η βέλτιστη συγκέντρωση των dNTPs καθορίζεται, εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως η συγκέντρωση ιόντων μαγνησίου, η συγκέντρωση των εκκινητών, το μήκος των αντιγράφων του DNA και ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης. Τα dNTPs παρέχουν ενέργεια στην αντίδραση, με τις β και γ φωσφορικές ομάδες τους.

Ο σχεδιασμός των κατάλληλων εκκινητών είναι ιδιαίτερα σημαντικός για την επιτυχία της αντίδρασης. Οι εκκινητές πρέπει να έχουν συμπληρωματική αλληλουχία με τα μόρια του DNA στόχου. Το μήκος τους, που πρέπει να κυμαίνεται από 20-30 bp, καθορίζει το T_m και κατά συνέπεια τη θερμοκρασία αναδιάταξης. Μικρότεροι εκκινητές μπορεί να συνδεθούν με άλλα τμήματα του DNA και να δώσουν μη ειδικά προϊόντα, ενώ μεγαλύτεροι μειώνουν την απόδοση της αντίδρασης.

Το ποσοστό των βάσεων G+C δεν πρέπει να υπερβαίνει το 40-60% των βάσεων του εκκινητή. Σημαντική είναι και η συγκέντρωση που χρησιμοποιείται. Υψηλότερες συγκεντρώσεις από την ιδανική για κάθε ζεύγος εκκινητή δίνουν μη ειδικά προϊόντα και διμερή των εκκινητών (primer-dimers).

Επιπρόσθετα, απαραίτητο είναι να είναι γνωστή η T_m του κάθε εκκινητή. Στις περισσότερες περιπτώσεις η ιδανική θερμοκρασία αναδιάταξης είναι $3-5^{\circ}\text{C}$ μικρότερη της T_m . Γι' αυτό το λόγο κατά τον σχεδιασμό των εκκινητών επιλέχθηκαν εκκινητές με παραπλήσιες τιμές της T_m . Ένας άλλος παράγοντας που διαδραματίζει πολύ σπουδαίο ρόλο στην πραγματοποίηση της αντίδρασης είναι η συμπληρωματικότητα. Επαναλαμβανόμενες δομές με υψηλό ποσοστό των βάσεων G+C μπορεί να οδηγήσουν σε αναδιπλώσεις φουρκέτας (hairpin loops).

Επίσης το 5' άκρο του κάθε εκκινητή δεν πρέπει να είναι συμπληρωματικό με το 3' άκρο ούτε του ίδιου ούτε των άλλων εκκινητών, γιατί αυτό θα οδηγήσει στο σχηματισμό διμερών των εκκινητών.

Επιπλέον οι εκκινητές δεν πρέπει να έχουν σε υψηλό ποσοστό ομολογία και κυρίως στο 3' άκρο τους με περιοχές του γονιδιώματος διαφορετικές από αυτήν που επιθυμούμε να πολλαπλασιάσουμε. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σχεδιάστηκαν έτσι ώστε στο 3' άκρο των εκκινητών ο ένας να είναι συμπληρωματικός για τη φυσιολογική αλληλουχία ενώ ο άλλος για τον πολυμορφισμό.

Για τον σχεδιασμό τους χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα H/Y IDT (Integrated DNA Technologies, www.idtdna.com). Με τη βοήθεια του προγράμματος αυτού προσδιορίστηκαν οι τιμές των T_m , το ποσοστό (G+C)%, η πιθανότητα δημιουργίας αναδιπλώσεων φουρκέτας και διμερών των εκκινητών.

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε αυτόματους θερμικούς κυκλοποιητές, που μεταβαίνουν αυτόματα στις καθορισμένες επιθυμητές θερμοκρασίες κάθε κύκλου. Τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιούνται σε κάθε πείραμα ποικίλουν ανάλογα με τις απαιτήσεις του ενζύμου, τη δομή και το μέγεθος του DNA που χρησιμοποιείται σαν εκμαγείο καθώς και τις βέλτιστες συνθήκες πρόσδεσης του εκκινητή.

Το μέγεθος του εκάστοτε PCR προϊόντος είχε άμεση σχέση με τις δυνατότητες του συστήματος αλληλούχισης που χρησιμοποιήθηκε και κυμάνθηκε περίπου από 200 bp έως 800 bp. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να απέχουν τουλάχιστον 40 bp από την έναρξη της κάθε κωδικοποιούσας περιοχής, προκειμένου να μην χαθεί πολύτιμη πληροφορία κατά την αλληλούχιση του DNA.

Επιπλέον επιλέχθηκαν τα ζεύγη εκκινητών που είχαν παραπλήσιες τιμές T_m , ενώ η συγκέντρωσή τους στην αντίδραση ήταν 5μM. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που

χρησιμοποιήθηκαν για το γονίδιο καθώς επίσης και το μέγεθος των προϊόντων PCR, παρουσιάζονται στον πίνακα 2.

BTNL 2

ΕΞΟΝΙΑ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ FORWARD	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ REVERSE	Μέγεθος προϊόντος PCR	Tm
ΕΞΟΝΙΟ 1	AATGGAGCCAAGCCCATTTCACTG	ATGTTGTTCTCGACCTTTGGACCC	304bp	55°C
ΕΞΟΝΙΟ 2	TCTCCCTCTTCTAGTTGCCTCCAT	CCTCAACTGTCAAAAGCTTACCAC	532bp	55°C
ΕΞΟΝΟ 3	TCTCAGCCTCTGTGATTTCTGCCT	GCAGGCGCCATAACAGCTATTCAA	538bp	55°C
ΕΞΟΝΙΟ 4	GCTGTATCATTGGGTAATCTGTGGG	TTTCCTCTGGGTCACATGGTCT	290BP	55°C
ΕΞΟΝΙΟ 5	CCAATGGAGCTGTTCTTAGAGATG	CTATGACAGTTTCACACACTGGAG	582bp	55°C
ΕΞΟΝΙΟ 6	CCTTCTTCTCCCAAGTGAATTG	CCTGAAGGAACATAAGGAATCACC	389bp	55°C

Πίνακας 2: Καταγραφή αλληλουχιών εκκινήτων forward και reverse που χρησιμοποιήθηκαν για την αλληλούχιση των κωδικοποιουσών περιοχών του γονιδίου BTNL2.

Η αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε σε αυτόματους θερμικούς κυκλοποιητές (Flexigene, TECHNE), που μεταβαίνουν αυτόματα στις καθορισμένες επιθυμητές θερμοκρασίες κάθε κύκλου. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε στο συγκεκριμένο πείραμα είναι το εξής:

α) Αποδιάταξη αρχικού δείγματος (denaturation): Το κάθε μείγμα θερμάνθηκε αρχικά στους 95°C για 15 min, ώστε να αποδιαταχθεί το DNA με τη διάσπαση των δεσμών υδρογόνου και την καταστροφή δευτεροταγών και τριτοταγών δομών και η διπλή έλικα να ανοίξει σε δύο μονόκλωνες αλυσίδες.

β) Υβριδισμός (annealing): Η θερμοκρασία μειώθηκε στους 55°C για 45sec ώστε να προσδεθούν οι εκκινήτες στο μονόκλωνο DNA-εκμαγείο στο 3' άκρο κάθε αλυσίδας. Η θερμοκρασία αυτή είναι άμεσα συνδεδεμένη με τη βέλτιστη θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινήτων (Πίνακας 2).

γ) Προέκταση (extension) ή επιμήκυνση (elongation): Η θερμοκρασία αυξήθηκε στους 72°C, που είναι η βέλτιστη θερμοκρασία για τη θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση, όπου και πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA χρησιμοποιώντας τα dNTPs του διαλύματος. Ο χρόνος επώασης στο στάδιο αυτό ήταν 45sec. Η τιμή του χρόνου επώασης εξαρτάται από το μέγεθος του τμήματος DNA που θέλουμε να πολλαπλασιαστεί.

δ) Αποδιάταξη προϊόντων: Η θερμοκρασία αυξήθηκε στους 95°C για 45sec, ώστε τα μικρά τμήματα του δίκλωνου DNA που δημιουργήθηκαν να αποχωριστούν πάλι και να αποτελέσουν εκμαγεία για τον επόμενο κύκλο σύνθεσης DNA.

Στη συνέχεια επαναλήφθηκαν 36 κύκλοι των σταδίων 2-4. Η χρονική διάρκεια προέκτασης του τελευταίου κύκλου ήταν 8 min, προκειμένου να υπάρξει χρόνος για την επέκταση όλων των προϊόντων από τη DNA πολυμεράση.

Κατά τη διάρκεια του πρώτου και του δεύτερου κύκλου, το παραγόμενο προϊόν είχε ενδιάμεσο μέγεθος ενώ από τον τρίτο κύκλο εμφανίστηκαν οι αλυσίδες του DNA που

έχουν το επιθυμητό μέγεθος. Από αυτό το σημείο και πέρα, η παραγωγή προϊόντων επιθυμητού μεγέθους αυξήθηκε εκθετικά και στο τελικό προϊόν της αντίδρασης ανιχνεύθηκαν μόνο μόρια συγκεκριμένου μεγέθους. Οι συνθήκες και τα αντιδραστήρια της αντίδρασης PCR φαίνονται στους πίνακες 3 και 4.

Στη συνέχεια τα προϊόντα της αντίδρασης PCR ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%.

Στάδιο PCR	Θερμοκρασία	Χρονική διάρκεια	Αριθμός κύκλων
1. Ενεργοποίηση της HotStarTaq DNA πολυμεράσης	95°C	15 min	1
2. Αποδιάταξη	95°C	45 sec	36
Υβριδισμός εκκινητών	55°C	45 sec	
Πολυμερισμός	72°C	45 sec	
3. Τελική επέκταση	72°C	8 min	1

Πίνακας 3: Συνθήκες της αντίδρασης PCR.

Αντιδραστήριο	Τελική συγκέντρωση
HotStarTaq MasterMix	2.5 units HotStarTag DNA πολυμεράση
	1.5mM MgCl ₂
	200μM από κάθε dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
Εκκινητές	5μM

Πίνακας 4: Αντιδραστήρια και συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση PCR.

Καθαρισμός των προϊόντων της PCR

Τα προϊόντα των PCR αντιδράσεων αποτέλεσαν το υπόστρωμα για την αντίδραση της αλληλούχισης που ακολούθησε. Προκειμένου, λοιπόν, να γίνουν κατάλληλα για χρήση υπέστησαν μία διαδικασία καθαρισμού έτσι ώστε να απομακρυνθούν όλες οι ανεπιθύμητες χημικές ουσίες. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το MinElute 96 UF PCR Purification Kit της εταιρείας Qiagen.

Με το εν λόγω kit είναι εφικτός ο γρήγορος και εύκολος καθαρισμός των προϊόντων PCR, αφού μπορούν να χρησιμοποιηθούν πλακίδια με 96 πηγαδάκια, τα οποία συγκρατούν τα προϊόντα PCR με τη βοήθεια μιας υπερδιηθητικής μεμβράνης.

Οι πλατφόρμες που χρησιμοποιούνται επιτρέπουν τη γρήγορη και αποτελεσματική ανάκτηση των δίκλωνων θραυσμάτων DNA μεγέθους μεγαλύτερου ή ίσου από 100 bp και την ταυτόχρονη απομάκρυνση των εκκινητών, των αδέσμευτων νουκλεοτιδίων και των αλάτων.

Τα PCR προϊόντα τοποθετήθηκαν στα πηγαδάκια της πλατφόρμας υπερδιήθησης και εφαρμόστηκε αντλία κενού. Μόρια μικρού μοριακού βάρους, όπως εκκινητές και άλατα, μπορούσαν να διαπεράσουν τη μεμβράνη, σε αντίθεση με τα μόρια του DNA, που παρέμειναν συγκρατημένα σε αυτήν.

Τα καθαρά, πλέον, προϊόντα της PCR, που βρίσκονταν στην επιφάνεια της μεμβράνης, διαλύθηκαν σε μικρό όγκο νερού (20 µL). Έτσι, προέκυψαν διαλύματα υψηλής συγκέντρωσης DNA, με ποσοστά ανάκτησης 85%-95%, τα οποία ήταν έτοιμα να χρησιμοποιηθούν στην αντίδραση αλληλούχισης που ακολούθησε.

Μετά τον καθαρισμό, μετρήθηκε η συγκέντρωση στα καθαρά PCR προϊόντα μέσω της μέτρησης της οπτικής τους πυκνότητας με φασματοφωτόμετρο NanoDrop της εταιρίας Thermo Fisher Scientific. Η ακριβής συγκέντρωση των PCR προϊόντων υπολογίστηκε αφού αφαιρέθηκε η συγκέντρωση των αρνητικών δειγμάτων ελέγχου στην κάθε αντίδραση.

Για να βρεθούν τα fmoles σε κάθε αντίδραση PCR, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα H/Y Science Launcher (www.sciencelauncher.com/MWcalc.html). Στη συνέχεια, στα δείγματα με ποσότητα πάνω από 200 fmoles έγινε αραιώση με νερό. Επομένως, η τελική ποσότητα σε κάθε δείγμα ήταν από 100 έως 200 fmoles. Η ποσότητα του DNA σε κάθε δείγμα PCR ήταν σημαντικός παράγοντας για την επιτυχία της αντίδρασης αλληλούχισης που ακολούθησε.

Εκτός από το πρωτόκολλο αυτό, σε ορισμένα δείγματα χρησιμοποιήθηκε το σύστημα καθαρισμού ExoSAP-IT της εταιρίας Affymetrix. Το σύστημα αυτό είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό για την απομάκρυνση των dNTPs και των εκκινητών που δεν έχουν χρησιμοποιηθεί στην αντίδραση PCR.

Το ExoSAP-IT στηρίζεται στην χρήση δύο υδρολυτικών ενζύμων, της εξωνουκλεάσης I (exonuclease I) και της αλκαλικής φωσφατάσης (Shrimp alkaline phosphatase), προκειμένου να απομακρυνθούν οι ανεπιθύμητες χημικές ουσίες.

Η εξωνουκλεάση καταστρέφει τα μονόκλινα τμήματα DNA, από τους εκκινητές και από τα ατελή προϊόντα PCR και η αλκαλική φωσφατάση υδρολύει τα εναπομείναντα dNTPs που υπάρχουν στο μίγμα, ώστε να μην παρεμποδίζουν την αλληλούχιση των τμημάτων DNA που θα ακολουθήσει. Το μίγμα ExoSAP-IT, που περιέχει τα δύο ένζυμα, προστίθεται απευθείας στα προϊόντα PCR.

Τα ένζυμα είναι ενεργά στο υγρό όπου είναι διαλυμένο το PCR και απενεργοποιούνται όταν θερμανθούν στους 80°C για 15 min. Αφού προστέθηκαν τα ένζυμα στα προϊόντα PCR, ακολούθησαν δύο στάδια επώσεων και στη συνέχεια τα δείγματα ήταν έτοιμα για περαιτέρω επεξεργασία.

Οι συνθήκες και τα αντιδραστήρια απεικονίζονται στους πίνακες 5 και 6. Σε σχέση με τον καθαρισμό μέσω διήθησης σε κενό, η διαδικασία αυτή είναι πιο απλή και πιο αποτελεσματική.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
PCR προϊόντα	5 μ L
ExoSAP-IT	2 μ L
Συνολικός όγκος	7 μ L

Πίνακας 5: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τον καθαρισμό των PCR προϊόντων με το πρωτόκολλο ExoSAP-IT.

Διαδικασία ExoSAP-IT	Θερμοκρασία	Χρονική διάρκεια
Επώαση	37 ⁰ C	15 min
Απενεργοποίηση ενζύμων	80 ⁰ C	15 min

Πίνακας 6: Στάδια που πραγματοποιήθηκαν κατά την διαδικασία καθαρισμού με το σύστημα ExoSAP-IT.

Ανάλυση της πρωτοταγούς δομής του DNA

Αρχή της μεθόδου

Στην παρούσα μελέτη η ανάλυση της πρωτοταγούς δομής για την εύρεση γενετικών αλλαγών έγινε με την μέθοδο της αλληλούχησης του DNA (DNA sequencing). Η αλληλούχηση του DNA είναι μία μέθοδος, που επιτρέπει την ανάλυση και τον ακριβή προσδιορισμό της πρωτοταγούς δομής του DNA. Παρέχει τη δυνατότητα ανάλυσης της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων ενός γονιδίου ή τμήματός του και ανίχνευσης αλλαγών σε αυτή, ακόμα και της αλλαγής μίας μόνο βάσης.

Η μέθοδος αυτή είναι ταχύτατα εξελισσόμενη και πλέον υπάρχει η δυνατότητα προσδιορισμού της πρωτοταγούς δομής σε ολόκληρο το γονιδίωμα ή σε μεγάλα τμήματά του με τη χρήση βελτιωμένων συστημάτων αλληλούχησης.

Η αλληλούχηση του DNA βασίζεται στην ενζυμική μέθοδο του Sanger. Η αρχή της συγκεκριμένης μεθόδου είναι ο τερματισμός της σύνθεσης της νέας αλυσίδας σε συγκεκριμένες θέσεις, οι οποίες στη συνέχεια μπορούν να ανιχνευθούν. Αναλυτικότερα, στη μέθοδο αυτή η μία αλυσίδα χρησιμοποιείται ως μήτρα προκειμένου να συντεθεί η συμπληρωματική αλυσίδα, με πρόδρομα μόρια τα τριφωσφορικά νουκλεοτίδια (dNTPs) αλλά και με συγκεκριμένη ποσότητα από τα διδεοξυ-αναλογά τους (ddNTPs).

Η βασική δομή των dNTPs και ddNTPs παρουσιάζεται στην Εικόνα 24.

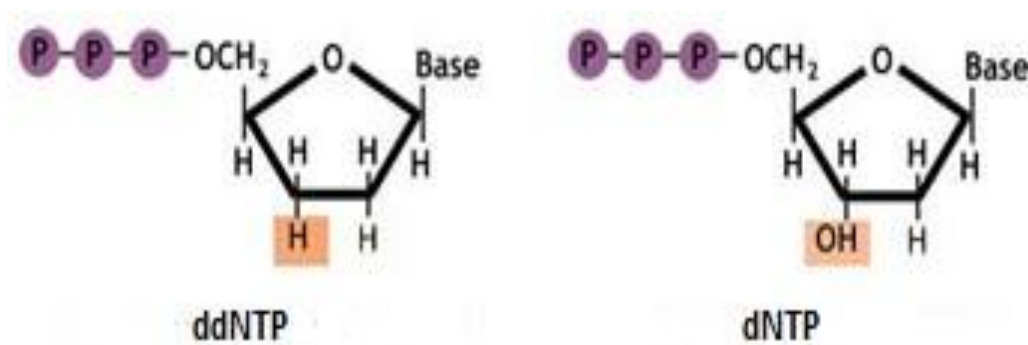
Τα τριφωσφορικά 2', 3'-διδεοξυνουκλεοτίδια στερούνται των υδροξυλομάδων στα 2' και 3' άτομα άνθρακα αντίστοιχα, σε σχέση με τα δεοξυνουκλεοτίδια. Έτσι, μπορούν να ενσωματωθούν σε μία νεοσυντιθέμενη αλυσίδα DNA μέσω της δημιουργίας φωσφοδιεστερικού δεσμού με το προηγούμενο νουκλεοτίδιο.

Πιο συγκεκριμένα, το 5' άτομο άνθρακα του ddNTP ενώνεται με το 3' άτομο άνθρακα του προηγούμενου νουκλεοτιδίου, αλλά δε μπορούν να σχηματίσουν

φωσφοδιεστερικό δεσμό με το επόμενο νουκλεοτίδιο διότι δε διαθέτουν την 3' υδροξυλομάδα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, να μην μπορούν να ενσωματωθούν άλλα ddNTPs στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα και επομένως διακόπτεται η σύνθεσή της στη θέση αυτή.

Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης sequencing απαιτείται το αρχικό τμήμα DNA, που λειτουργεί ως υπόστρωμα, μία DNA πολυμεράση και ένας εκκινητής, ο οποίος είναι συμπληρωματικός προς συγκεκριμένη περιοχή του υποστρώματος. Τέσσερις παράλληλες αντιδράσεις διεξάγονται, κάθε μία ειδική για μία βάση (αδενίνη, θυμίνη, γουανίνη, κυτοσίνη), χρησιμοποιώντας μίγμα των τεσσάρων τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων και των τεσσάρων διδεόξυ αναλόγων, σε συγκεκριμένη αναλογία. Η αναλογία dNTPs: ddNTPs καθορίζεται έτσι ώστε να προκύπτει ένα σύνολο τμημάτων DNA διαφορετικού μήκους, με κοινό 5' άκρο και διαφορετικό 3' άκρο.

Το 5' άκρο ορίζεται από τον εκκινητή, ενώ το 3' άκρο στο οποίο τερματίζεται η σύνθεση της αλυσίδας διαφέρει, γιατί η συγκέντρωση του ddNTP αναλόγου είναι μικρότερη από την αντίστοιχη του dNTP και η ενσωμάτωση του ddNTP γίνεται κάθε φορά τυχαία στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα.



Εικόνα 24: Απεικόνιση διδεοξυνουκλεοτιδίου(ddNTP) και δεοξυνουκλεοτιδίου (dNTP).

Αντιδραστήρια και διαδικασία της αντίδρασης

Η ανάλυση της πρωτοταγούς δομής των κωδικοποιουσών περιοχών του γονιδίου BTNL2 έγινε με το MegaBACE SNP Genotyping System της εταιρίας GE Healthcare. Πρόκειται για ένα σύστημα ηλεκτροφόρησης μέσω τριχοειδών, που περιλαμβάνει το όργανο MegaBACE, τα απαραίτητα αντιδραστήρια και το SNP Profiler λογισμικό.

Η συγκεκριμένη μεθοδολογία βασίζεται στο γεγονός ότι καθένα από τα τέσσερα είδη ddNTPs είναι σημασμένο με μία διαφορετική φθορίζουσα χρωστική, η οποία ανιχνεύεται από ειδικό laser.

Τα τριχοειδή περιέχουν μία μήτρα διαχωρισμού, η οποία συντίθεται από πολυακρυλαμίδα. Η εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου προκαλεί τη μετακίνηση των δειγμάτων κατά μήκος των τριχοειδών.

Κατά την ηλεκτροφόρηση τα θραύσματα του DNA διαχωρίζονται με βάση το μέγεθός τους, με τα μικρότερα θραύσματα να μετακινούνται πιο γρήγορα από τα μεγαλύτερα. Στο τέλος της ηλεκτροφόρησης το λογισμικό παρέχει πληροφορίες για την αλληλουχία του DNA σε κάθε τριχοειδές ξεχωριστά.

Η πειραματική διαδικασία της αλληλούχισης του DNA περιλαμβάνει, αρχικά, την αντίδραση που λαμβάνει χώρα στον θερμοκυκλοποιητή. Οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν σε όλες τις κωδικοποιούσες περιοχές παρουσιάζονται στον Πίνακα 7. Χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές, forward ή reverse, σε όλα τα εξώνια.

Τα προϊόντα της αντίδρασης που προκύπτουν καθαρίζονται με χρήση αιθανόλης και διαδοχικές φυγοκεντρήσεις, προκειμένου να απομονωθεί όσο το δυνατόν καθαρότερο διάλυμα DNA. Ακολουθεί η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων, με πλήρως αυτοματοποιημένο τρόπο, στο μηχάνημα του MegaBACE με συνθήκες που προσαρμόζονται κάθε φορά στο μέγεθος των θραυσμάτων που ηλεκτροφορούνται. Το ηλεκτροφόρημα που προκύπτει αποτελείται από ένα σύνολο καμπυλών τεσσάρων χρωμάτων, καθένα από τα οποία αντιστοιχεί σε μία αζωτούχο βάση.

Το σύστημα MegaBACE έχει τη δυνατότητα αλληλούχισης έως και 96 δειγμάτων σε χρονικό διάστημα δύο ωρών.

Θερμοκρασία	Χρόνος	Αριθμός κύκλων
95°C	20 sec	25
50°C	15 sec	
72°C	1 min	

Πίνακας 7: Καταγραφή των συνθηκών που εφαρμόστηκαν στην αντίδραση αλληλούχισης.

Ανίχνευση πολυμορφισμών IL-18 και IL-12B p40

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί το γονίδιο της IL-18 είναι μία προφλεγμονώδη κυτοκίνη η οποία ενισχύει την δραστηριότητα των φυσικών φονικών κυττάρων (NK) στα κύτταρα του σπλήνα και επάγει την παραγωγή της ιντερφερόνης-γ από τα βοηθητικά Th1 λεμφοκύτταρα. Το γονίδιο της IL-18 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 11 στη θέση 11q22.2-q22.3 με ID:3606 (εικόνα25).

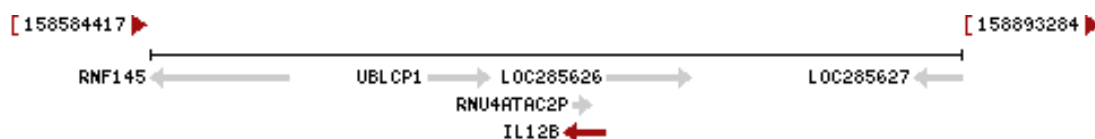


Εικόνα 25: Παρατηρούμε στην εικόνα το χρωμόσωμα 11 και την θέση του γονιδίου IL18 σε αυτό. Η εικόνα ελήφθη από την ηλεκτρονική διεύθυνση www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3606.

Το γονίδιο της IL-12B κωδικοποιεί την υπομονάδα p40 η οποία αποτελεί μία κυτοκίνη που επιδρά στα T-λεμφοκύτταρα και στα φυσικά φονικά κύτταρα και παρουσιάζει ευρύ φάσμα βιολογικών δραστηριοτήτων.

Αυτή η κυτοκίνη εκφράζεται από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και τα B λεμφοκύτταρα και έχει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή των Th1 λεμφοκυττάρων και στη διατήρηση των Th1 κυττάρων μνήμης, προστατεύοντας σε κάποιο βαθμό τον

οργανισμό από ενδοκυττάρια παθογόνα. Εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 5 στη θέση 5q31.1-q33.1 με ID:3593 (εικόνα 26).



Εικόνα 26: Παρατηρούμε στην εικόνα το χρωμόσωμα 5 και την θέση του γονιδίου IL12B σε αυτό. Η εικόνα ελήφθη από την ηλεκτρονική διεύθυνση www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3593.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η συσχέτιση του μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού στο άκρο 3' της μη μεταφρασμένης περιοχής της υπομονάδας του γονιδίου IL-12B p40 στην θέση +1602(A/C)(rs3212227), με την εκδήλωση της σαρκοείδωσης καθώς και του υποκινητή 1 του γονιδίου IL-18 στη θέση -137 G/C(rs187238) στο άκρο 5' της μη μεταφρασμένης περιοχής του.

Μελετήθηκε η αλληλουχία της υπομονάδας του γονιδίου IL-12 p40(MIM:161561, NM:002187), και του γονιδίου IL-18 (MIM:600953, NM:001243211) η οποία είχε δημοσιευθεί στην βάση δεδομένων του Ensembl στην ηλεκτρονική διεύθυνση www.ensembl.org.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των συγκεκριμένων πολυμορφισμών των γονιδίων είναι η PCR-SSPs.

Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR-SSPs)

Η μέθοδος PCR-SSPs αποτελεί μια παραλλαγή της τεχνικής της αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) η οποία σε συνδυασμό με την ειδική αλληλουχία επαγωγέων (sequence-specific primers) επιτρέπει την άμεση ανίχνευση γνωστών μεταλλάξεων-πολυμορφισμών με εξειδικευμένο πολλαπλασιασμό ενός αλληλόμορφου από το σύνολο του γενομικού DNA.

Η μέθοδος βασίζεται στην ιδιότητα της θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης να μην μπορεί να πολυμερίσει έναν εκκινητή όταν το 3' άκρο του δεν είναι συμπληρωματικό με το DNA υπόστρωμα. Πρόκειται για απλή, γρήγορη και αξιόπιστη μέθοδο, ιδανική για την ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων και πολυμορφισμών.

Για τον προσδιορισμό κάθε πολυμορφισμού γίνονται δύο PCR για κάθε δείγμα, μία για την ανίχνευση του πολυμορφισμού και μία για την φυσιολογική αλληλουχία. Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιείται ένα ζεύγος εκκινητών οι οποίοι είναι κοινοί για τις δύο αντιδράσεις.

Οι εκκινητές αυτοί χρησιμεύουν για τον πολλαπλασιασμό μιας περιοχής του γονιδιώματος διαφορετικής από την περιοχή όπου βρίσκεται η πολυμορφική θέση, απ' τον οποίο προκύπτει προϊόν διαφορετικού μεγέθους προκειμένου να μπορούν να διαχωριστούν τα προϊόντα σε επόμενη φάση του πειράματος. Το ζευγάρι αυτών των εκκινητών χρησιμοποιείται ως εσωτερικός μάρτυρας ελέγχου της αντίδρασης για την αποφυγή πειραματικών λαθών. Έτσι αποκλείεται η περίπτωση να μην υπάρχει DNA αν δεν εμφανιστεί η επιθυμητή αλληλουχία μετά την αντίδραση. Το δεύτερο ζευγάρι εκκινητών διαφέρει για κάθε αντίδραση. Η διαφορά βρίσκεται στο 3' άκρο των εκκινητών όπου ο ένας είναι συμπληρωματικός για τη φυσιολογική αλληλουχία ενώ ο

άλλος για τον πολυμορφισμό. Στη συνέχεια για το κάθε δείγμα γίνονται δύο αντιδράσεις, μία με τους «φυσιολογικούς» εκκινητές και μία με τους εκκινητές που είναι συμπληρωματικοί με τον πολυμορφισμό. Ανάλογα με το αν θα σχηματιστεί προϊόν και σε ποια αντίδραση, το άτομο μπορεί να είναι ομόζυγο για το ένα από τα δύο αλληλόμορφα ή ετερόζυγο.

Επειδή όμως είναι πιθανό να σχηματιστεί προϊόν όταν υπάρχει αλλαγή σε μία βάση στο 3' άκρο, κατά τον σχεδιασμό των εκκινητών προστίθεται μία ακόμη αλλαγή κοντά στο 3' άκρο, έτσι ώστε να περιοριστεί το πρόβλημα αυτό και να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα να υπάρχουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα.

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε αυτόματους θερμικούς κυκλοποιητές, που μεταβαίνουν αυτόματα στις καθορισμένες επιθυμητές θερμοκρασίες κάθε κύκλου. Τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιούνται σε κάθε πείραμα ποικίλουν ανάλογα με τις απαιτήσεις του ενζύμου, τη δομή και το μέγεθος του DNA που χρησιμοποιείται σαν εκμαγείο καθώς και τις βέλτιστες συνθήκες πρόσδεσης του εκκινητή.

Μετά το πέρας της αντίδρασης, τα προϊόντα της αντίδρασης PCR διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 2% με βάση το μέγεθος των μορίων του DNA. Το πήκτωμα ηλεκτροφορήθηκε στα 100V για 20min και παρατηρήθηκαν οι μπάντες με την χρήση συσκευής υπεριώδους ακτινοβολίας.

Με την μέθοδο αυτή προσδιορίστηκε η ύπαρξη ή μη των πολυμορφισμών 1602A/C (rs3212227) και -137 G/C(rs187238) στους ασθενείς με σαρκοείδωση και στα φυσιολογικά άτομα.

Για την ανίχνευση του πολυμορφισμού -137G/C(rs187238) στο άκρο 5' της μη μεταφρασμένης περιοχής της IL-18 σχεδιάστηκε το πρόγραμμα PCR με τις εξής συνθήκες: 94°C για 2 λεπτά ακολουθούμενα από 5 κύκλους (94°C 20 δευτερόλεπτα, 68°C 60 δευτερόλεπτα) ακολουθούμενα από 25 κύκλους (94°C 20 δευτερόλεπτα, 62°C 20 δευτερόλεπτα και 72°C 40 δευτερόλεπτα).

Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη του πολυμορφισμού με μέγεθος παραγόμενου προϊόντος 260 νουκλεοτίδια και των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν σαν εσωτερικοί μάρτυρες ελέγχου της αντίδρασης με παραγόμενο προϊόν μεγέθους 796 νουκλεοτίδια παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα 8.

Εκκινητές	Αλληλουχία
For G	5'CCCCAACTTTTACGGAAGAAAAG3'
For C	5' CCCCCAACTTTTACGGAAGAAAAC3'
Rev	5'AGG-AGGGCAAAATGCACTGG3'
CON 63	5'TGCCAAGTGGAGCACCCAA3'
CON 64	5'GCATCTTGCTCTGTGCAGAT3'

Πίνακας 8: Αλληλουχία εκκινητών για την ανίχνευση του πολυμορφισμού -137G/C(rs187238) της IL-18.

Το πρωτόκολλο της PCR που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του πολυμορφισμού της IL-12 p40 στην θέση 1602 A/C (rs3212227) στο άκρο 3' της μη μεταφρασμένης περιοχής περιγράφεται στον πίνακα 9.

Στάδιο PCR	Θερμοκρασία	Χρονική διάρκεια	Αριθμός κύκλων
1. Ενεργοποίηση της HotStarTaq DNA πολυμεράσης	94°C	2 min	1
2. Αποδιάταξη Υβριδισμός εκκινητών Πολυμερισμός	94°C	45 sec	30
	61°C	1min	
	72°C	45 sec	
3. Τελική επέκταση	72°C	10 min	1

Πίνακας 9: Συνθήκες της αντίδρασης PCR.

Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη του πολυμορφισμού με μέγεθος παραγόμενου προϊόντος 780 νουκλεοτίδια και των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν σαν εσωτερικοί μάρτυρες ελέγχου της αντίδρασης με παραγόμενο προϊόν μεγέθους 230 νουκλεοτίδια παρουσιάζονται στον πίνακα 10.

Εκκινητές	Αλληλουχία
Reverse T	5' TTG TTT CAA TGA GCA TTT AGC ATC T 3'
Reverse G	5' GTT TCA ATG AGC ATT TAG CAT CG 3'
For	5' ATC TTG GAG CGA ATG GGC AT 3'
CON 210	5' ATG ATG TTG ACC TTT CCA GGG 3'
CON 211	5' TTC TGT AAC TTT TCA TCA GTT GC 3'

Πίνακας10: Αλληλουχία εκκινητών για την ανίχνευση του πολυμορφισμού rs3212227 της IL12p40.

Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 17.0. Οι τιμές p υπολογίστηκαν μέσω του double-sided Fisher's τεστ για τα γονίδια BTNL2, IL-12 και IL-18. Στατιστικά σημαντικές θεωρούνται οι τιμές $p < 0.05$.

Αποτελέσματα

Γονίδιο BTNL2

Από την ανάλυση του γονιδίου BTNL2 ανιχνεύθηκαν 24 διαφορετικές μεταλλάξεις σε 102 ασθενείς (69,9%) με σαρκοείδωση και 15 διαφορετικές μεταλλάξεις σε 56 μάρτυρες (62,2%) όπως περιγράφονται στον πίνακα 11. Στην πλειοψηφία των ατόμων και από τις δύο ομάδες μελέτης ανιχνεύθηκαν περισσότερες από μία μεταλλάξεις.

Χρησιμοποιώντας τα προγράμματα γενετικής ανάλυσης shift, Polyphen, Proven and PMut (in silico μελέτη) διαπιστώσαμε ότι οι μεταλλάξεις p.D118N, p.A142P, p.G143D, p.T165I, p.E242G, p.S334L, p.G412C, p.A430D, p.G454C είναι παθολογικές καθώς προκαλούν αλλαγή στην δομή και λειτουργία της παραγόμενης πρωτεΐνης.

Ανάλυση νέων μεταλλάξεων γονιδίου BTNL2

Από τις προαναφερθείσες παθολογικές μεταλλάξεις οι p.A142P, p.E242G, p.G412C, p.A430D δεν έχουν καταχωρηθεί στη διεθνή βάση δεδομένων Ensemble (www.ensembl.org) και αποτελούν νέα ευρήματα που προέκυψαν από της δικής μας μελέτη της αλληλουχίας DNA του γονιδίου BTNL2. Επίσης ανιχνεύθηκαν και δύο νέες μεταλλάξεις οι p.S149T, p.S406A που δεν ήταν παθολογικές βάσει των προγραμμάτων γενετικής ανάλυσης. Η στατιστική ανάλυση της συχνότητας των συγκεκριμένων μεταλλάξεων χωριστά μεταξύ των ασθενών και της ομάδας ελέγχου έγινε με το double-sided Fisher's test και έδειξε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην συχνότητα εμφάνισης τους, ενώ δεν ανιχνεύθηκαν καθόλου στην ομάδα ελέγχου.

Η μετάλλαξη p.A142P ανιχνεύθηκε σε μία γυναίκα 28 ετών που παρουσίαζε στάδιο I πνευμονικής σαρκοείδωσης και διόγκωση παρωτίδων και στην οποία η νόσο παρουσίασε καλοήγη πορεία. Σε αυτή την ασθενή ανιχνεύθηκαν και οι μεταλλάξεις p.D118N, p.K196E, p.S360G από τις οποίες η τελευταία έχει διαπιστωθεί από πολλές μελέτες ότι σχετίζεται με την εκδήλωση της σαρκοείδωσης κυρίως στους Αφροαμερικανούς και λευκής φυλής,¹⁰⁶ Γερμανούς,¹⁰⁹ και τελευταία στους Πορτογάλους⁹⁶.

Η μετάλλαξη p.E242G ανιχνεύθηκε σε άνδρα 52 ετών, καπνιστή, με πνευμονική σαρκοείδωση σταδίου II με συνοδό δύσπνοια, βήχα, ασβεστιουρία και υποτροπή κατά την διάρκεια των 12 μηνών παρακολούθησης, ενώ δεν συνυπήρχαν άλλες μεταλλάξεις ή πολυμορφισμοί. Το διάστημα παρακολούθησης του συγκεκριμένου ασθενή ήταν μικρό για εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για τον φαινότυπο της νόσου που συνυπάρχει με τη συγκεκριμένη μετάλλαξη.

Η μετάλλαξη p.G412C ανιχνεύθηκε σε δύο γυναίκες με ήπια μορφή νόσου. Η μία ασθενής 55 ετών παρουσίαζε δερματική μορφή σαρκοείδωσης με καλή ανταπόκριση στην θεραπεία και στην οποία ανιχνεύθηκε και η μετάλλαξη p.S334L. Στην δεύτερη ασθενή ηλικίας 27 ετών που ανιχνεύθηκε η μετάλλαξη G412C συνυπήρχαν οι μεταλλάξεις p.S360G, p.P379L, p.M380I, p.P393Q, και έπασχε από πνευμονική σαρκοείδωση σταδίου I, ασβεστιουρία και καλή ανταπόκριση στην θεραπεία.

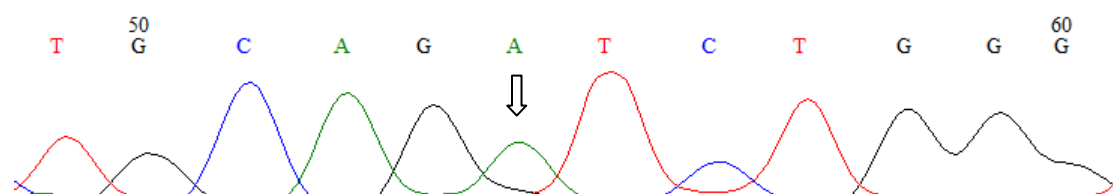
Η μετάλλαξη p.A430D ανιχνεύθηκε σε ασθενή 34 ετών με πνευμονική προσβολή σταδίου I και ραγοειδίτιδα με καλή ανταπόκριση στην θεραπεία. Στο συγκεκριμένο

ασθενή συνυπήρχε η μετάλλαξη p.W94R της οποίας η συχνότητα εμφάνισής της μεταξύ ασθενών και ομάδας ελέγχου στην μελέτη μας είναι στατιστικά σημαντική ($p=0.00058$) μετά από double-sided Fisher's test, καθώς και η μετάλλαξη p.S360G της οποίας η συσχέτιση με την σαρκοείδωση έχει επιβεβαιωθεί από ορισμένες μελέτες σε Ευρωπαίους.

Ανάλυση μεταλλάξεων του γονιδίου BTNL2

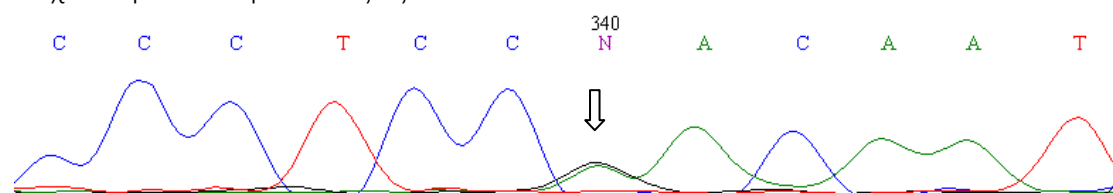
Από τις υπόλοιπες γνωστές μεταλλάξεις p.D118N, p.G143D, p.T165I, p.S334L, p.G454C, οι οποίες ανιχνεύθηκαν και είναι παθολογικές, μετά από την στατιστική ανάλυση της συχνότητας εμφάνισης της κάθε μίας μετάλλαξης χωριστά μεταξύ ασθενών και μαρτύρων με το double-sided Fisher's test δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά. Οι 9 παθολογικές μεταλλάξεις ανευρέθηκαν σε ετερόζυγη μορφή, σε 38 ασθενείς και σε 12 μάρτυρες. Η συχνότητα εμφάνισης αυτών των μεταλλάξεων ήταν οριακά στατιστικά σημαντική ($p=0.02$) σύμφωνα με το double-sided Fisher's test, ενώ εξαιρώντας τους 8 ασθενείς που έπασχαν από σύνδρομο Löfgren που αποτελεί καλοήγη μορφή της νόσου, η συχνότητα εμφάνισής τους δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0.16$). Από την μελέτη των κλινικών στοιχείων των ασθενών που ανιχνεύθηκαν οι παθολογικές μεταλλάξεις διαπιστώθηκε ότι 8 ασθενείς έπασχαν από το σύνδρομο Löfgren (21,1%), 5 ασθενείς (13,1%) έπασχαν από πνευμονική ίνωση ή εξελίχθηκαν σε πνευμονική ίνωση, 13 ασθενείς (34,21%) παρουσίαζαν υποτροπές της νόσου και δύσπνοια κατά την διάρκεια της θεραπείας ή κατά την μείωση της δοσολογίας αυτής.

Στην εικόνα 27 παρατηρούνται τα αποτελέσματα από την αλληλούχιση του DNA σε ένα ασθενή που ανιχνεύθηκε η παθολογική μετάλλαξη p.G143D και ο οποίος έπασχε από το σύνδρομο Löfgren που είναι καλοήγη μορφή και δεν έλαβε καμία θεραπεία.

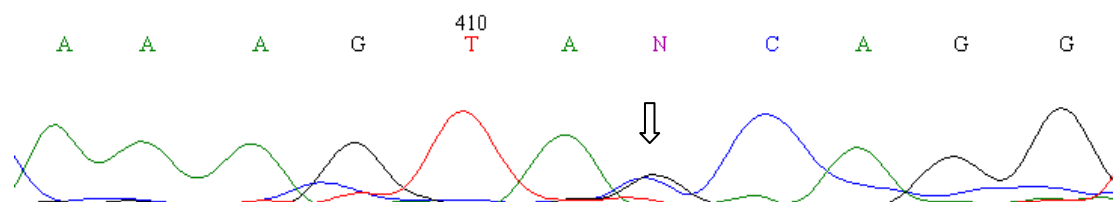


Εικόνα 27: Παρουσίαση μιας τυπικής εικόνας αποτελεσμάτων από αλληλούχιση του DNA. Η κάθε κορυφή αντιστοιχεί σε μία βάση. Το βέλος δείχνει την παθολογική μετάλλαξη c.428 G>A ή p.G143D.

Στις εικόνες 28α και 28β παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την αλληλούχιση DNA (sequencing) μίας ασθενούς που έπασχε από πνευμονική σαρκοείδωση σταδίου I και διόγκωση παρωτίδων και με καλή ανταπόκριση στην θεραπεία και στην οποία ανιχνεύθηκαν δύο μεταλλάξεις.



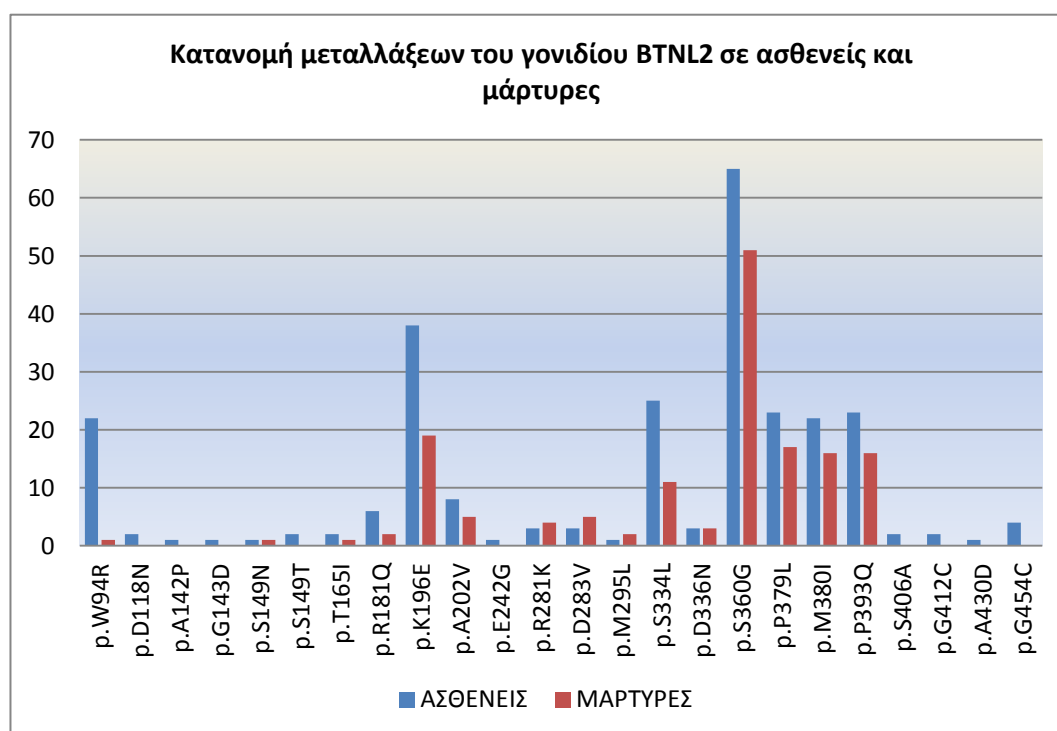
Εικόνα 28α: Σε αυτή την αλληλούχια παρατηρείται η μετάλλαξη c.352G>A ή p.D118N (βέλος)



Εικόνα 28β: Σε αυτή την αλληλουχία διαπιστώθηκε στην ίδια ασθενή η νέα μετάλλαξη c.424 G>C ή p.A142P(βέλος).

Από την στατιστική ανάλυση με το double-sided Fisher's τεστ των υπόλοιπων μεταλλάξεων που ανιχνεύτηκαν, όπως φαίνεται στο σχεδιάγραμμα 2 και στον πίνακα 11, η συχνότητα εμφάνισης της μετάλλαξης p.W94R (rs28362682) μεταξύ των ασθενών και της ομάδας ελέγχου ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0,00058$).

Από τους 19 ασθενείς που ανιχνεύθηκε η συγκεκριμένη μετάλλαξη οι 6 (31,6%) ασθενείς παρουσίασαν δύσπνοια και υποτροπές, 5 (26,3%) ασθενείς έπασχαν από σύνδρομο Löfgren, 18 (94,7%) ασθενείς έπασχαν από πνευμονική σαρκοείδωση σταδίου 0 ή Ι και 2 (10,5%) ασθενείς παρουσίαζαν και προσβολή της καρδιάς που αποτελεί σοβαρή μορφή της νόσου που μπορεί να είναι θανατηφόρα σε ποσοστό περίπου 50%¹¹⁰.



Σχεδιάγραμμα 2

ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ BTNL2	Variation ID	ΑΣΘΕΝΕΙΣ n:146	ΜΑΡΤΥΡΕΣ n:90	p value
p.W94R	rs28362682	19	1	0.00058
p.D118N	rs143211074	2	0	0.52
p.A142P	novel	1	0	1
p.G143D	rs115653647	1	0	1
p.S149N	rs60263670	1	1	1
p.S149T	novel	1	0	1
p.T165I	rs78587369	2	1	1
p.R181Q	rs28362681	5	1	0.49
p.K196E	rs2076523	38	17	0.46
p.A202V	rs28362680	7	3	1
p.E242G	novel	1	0	1
p.R281K	rs41355746	3	3	0.43
p.D283V	rs34423804	3	3	0.26
p.M295L	rs41417449	1	2	0.56
p.S334L	rs28362679	24	11	0.37
p.D336N	rs41441651	3	2	0.67
p.S360G	rs2076530	60	39	0.15
p.P379L	rs28362678	22	16	0.61
p.M380I	rs28362677	22	16	0.60
p.P393Q	rs41521946	22	16	0.73
p.S406A	novel	2	0	0.52
p.G412C	novel	2	0	0.52
p.A430D	novel	1	0	1
p.G454C	rs28362675	4	0	0.16

Πίνακας 11. Ανάλυση των μεταλλάξεων που ανιχνεύθηκαν από την μελέτη του γονιδίου BTNL2 στις δύο ομάδες μελέτης. Στην 1^η και 2^η στήλη αναφέρονται οι μεταλλάξεις και ο κωδικός της κάθε μίας, ενώ στην 3^η και 4^η στήλη αναφέρεται ο απόλυτος αριθμός των μεταλλάξεων που βρέθηκαν στην ομάδα των ασθενών και στην ομάδα των μαρτύρων αντίστοιχα. Στην τελευταία στήλη αναφέρεται η τιμή στατιστικής σημαντικότητας p που υπολογίσθηκε με το double-sided Fisher's test.

Ανάλυση της μετάλλαξης rs2076530

Από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας οι περισσότερες μελέτες του γονιδίου BTNL2 αφορούν την συσχέτιση της μετάλλαξης rs2076530 με την εκδήλωση της σαρκοείδωσης.

Στην μελέτη των Schurmann et al.(2001) διαπιστώθηκε η ύπαρξη συσχέτισης των γονιδίων στην περιοχή HLA(Human leukocyte antigen)με την σαρκοείδωση και ακολούθησε η μελέτη των Valentonyte et al.(2005) οι οποίοι για πρώτη φορά ανέφεραν μία νέα μετάλλαξη, την rs2076530, στο εξόνιο 5 του γονιδίου BTNL2, που σχετίζεται με την εκδήλωση της σαρκοείδωσης, ανεξάρτητα από τα γονίδια στην περιοχή HLA-DRB1 που σχετίζονται με την σαρκοείδωση.

Πρόκειται για μία μονονουκλεοτιδική αλλαγή η οποία οδηγεί σε πρόωρη διακοπή αντιγραφής της αλληλουχίας (early stop codon) με αποτέλεσμα την παραγωγή πρωτεΐνης μικρότερου μεγέθους.

Σύμφωνα με τους Arnett et al.(2007) η βασική λειτουργία του γονιδίου BTNL2 είναι η μείωση του πολλαπλασιασμού και της παραγωγής των κυτοκινών από τα ενεργοποιημένα T-κύτταρα, δρώντας ως αρνητικό συνδιεγερτικό μόριο επηρεάζοντας την πορεία των φλεγμονωδών νόσων.

Το αλληλίο A του πολυμορφισμού rs2076530 διαταράσσει την παραγωγή της φυσιολογικής πρωτεΐνης με αποτέλεσμα να εμποδίζει τη είσοδο στην μεμβράνη των κυττάρων, διαδικασία απαραίτητη για την μείωση της δραστηριότητας των T-κυττάρων.

Η παραγωγή πρωτεΐνης μικρότερου μεγέθους αυξάνει τον κίνδυνο εκδήλωσης της σαρκοείδωσης ανεξάρτητα από τα αλληλίο που εντοπίζονται στην περιοχή HLA-DRB1 τα οποία σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης της σαρκοείδωσης. Είναι αποδεδειγμένη από πολλές μελέτες η συσχέτιση της χρόνιας σαρκοείδωσης με την σύνδεση της μετάλλαξης rs2076530 και του HLA-DRB1*15. Επίσης είναι γνωστό ότι οι συγκεκριμένοι απλότυποι DQB1*0602/DRB1*1501 σχετίζονται με πιο σοβαρές μορφές σαρκοείδωσης, ενώ το DRB1*03 σχετίζεται με καλύτερη πρόγνωση.¹¹¹

Στην παρούσα μελέτη η συχνότητα εμφάνισης της μετάλλαξης rs2076530 μεταξύ ασθενών και ομάδας ελέγχου δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0.15$).

Από τους 60 ασθενείς που ανιχνεύθηκε αυτή η μετάλλαξη οι 30 ασθενείς (50%) έπασχαν από πνευμονική σαρκοείδωση σταδίου I και από αυτούς οι 3(10%) παρουσίαζαν και προσβολή της καρδιάς κατά την εξέλιξη της νόσου.

Επίσης διαπιστώθηκε ότι 10 ασθενείς (16,6%) έπασχαν από το σύνδρομο Löfgren, την καλοήγη μορφή, 2 ασθενείς (3,3%) έπασχαν από πνευμονική ίνωση και 15 ασθενείς (25%) παρουσίαζαν δύσπνοια και υποτροπές κατά την εξέλιξη της νόσου. Μελετώντας την συνύπαρξη και άλλων μεταλλάξεων ή πολυμορφισμών στους 60 ασθενείς που φέρουν την μετάλλαξη rs2076530 διαπιστώσαμε ότι στους 26(43,3%) ασθενείς ανιχνευθήκαν οι δύο πολυμορφισμοί p.V313V και p.Q350Q και η μετάλλαξη p.K196E.

Το μεγαλύτερο ποσοστό αυτών των ασθενών 18/26(69,2%) έπασχαν από ήπια πνευμονική νόσο σταδίου 0 ή I ή εξελίχθηκαν σε στάδιο 0 ή I και 8/26(30,8%) παρουσίασαν υποτροπές.

Από το σύνολο των 146 ασθενών που μελετήθηκαν οι 14 ασθενείς(9,6%) παρουσίασαν επιδείνωση της πνευμονικής σαρκοείδωσης, ενώ 33 ασθενείς (22,6%) παρουσίασαν συχνά υποτροπές κατά την διάρκεια της θεραπείας τους ή στην προσπάθεια μείωσης της δοσολογίας της αγωγής τους.

Επίσης διαπιστώθηκε ότι από τους 33 ασθενείς που παρουσίασαν υποτροπές οι 15(45,5%) έφεραν την μετάλλαξη rs2076530.

Μελετώντας την μονονουκλεοτιδική αλλαγή rs2076530 σύμφωνα με την βάση δεδομένων (www.ensembl.org) διαπιστώσαμε ότι το αλληλίο A ανευρίσκεται σε μεγαλύτερη συχνότητα 62% παγκοσμίως και 57% στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό σε σχέση με το αλληλίο G του οποίου η συχνότητα είναι 38% και 43% αντίστοιχα.

Τα ευρήματα της μελέτης μας συμφωνούν με τα διεθνή δεδομένα καθώς η συχνότητα του αλληλίου A στην υπό μελέτη ομάδα ασθενών ήταν 77,7% και του αλληλίου G ήταν 22,3% ενώ στην ομάδα ελέγχου ήταν 71,7% και 28,3% αντίστοιχα.

Η συχνότητα εμφάνισης του αλληλίου A μεταξύ των δύο ομάδων μελέτης στον Ελληνικό πληθυσμό δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0.15$) μετά από την ανάλυση με το double-sided Fisher's test.

Επομένως στην δική μας μελέτη δεν επαληθεύτηκε η συσχέτιση της μετάλλαξης rs2076530 με τη εκδήλωση της σαρκοείδωσης στον Ελληνικό πληθυσμό.

Ανάλυση πολυμορφισμών εξονίων και ιντρονίων του γονιδίου BTNL2

Στους παρακάτω πίνακες 12 και 13 αναφέρονται οι γνωστοί πολυμορφισμοί των εξονίων και των ιντρονίων αντίστοιχα που διαπιστώθηκαν από την μελέτη του γονιδίου BTNL2.

Η συχνότητα εμφάνισής του μεταξύ της ομάδας ασθενών και της ομάδας ελέγχου δεν ήταν στατιστικά σημαντική για τους πολυμορφισμούς που ανιχνεύθηκαν στα εξόνια μετά από την στατιστική ανάλυση με το double-sided Fisher's test και δεν θεωρείται ότι έχουν συσχέτιση με την εκδήλωση της νόσου.

Σε ότι αφορά τους πολυμορφισμούς των ιντρονίων διαπιστώθηκε ότι η συχνότητα εμφάνισης του πολυμορφισμού 710-61T/C ήταν στατιστικά σημαντική αλλά ανιχνεύθηκε σε περισσότερα άτομα από την ομάδα ελέγχου και πιθανόν να αποτελεί προστατευτικό παράγοντα έναντι της εκδήλωσης της νόσου αλλά θα πρέπει να μελετηθεί μεγαλύτερο δείγμα ασθενών και μαρτύρων για να επιβεβαιωθεί.

Οι υπόλοιποι πολυμορφισμοί των ιντρονίων που ανευρέθηκαν και των οποίων η συχνότητα εμφάνισης δεν ήταν στατιστικά σημαντική, δεν θεωρείται ότι έχουν σχέση με την παθογένεια της νόσου.

ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΕΞΟΝΙΩΝ	Variation ID	ΑΣΘΕΝΕΙΣ n:146	MARTYΡΕΣ n:90	p value
p.H60H	rs28362683	19	5	0.14
p.G145G	rs57116766	1	1	1
p.P171P	rs59129682	5	1	0.49
p.A202A	rs147483338	1	0	1
p.R209R	rs60036207	5	1	0.49
p.N210N	rs78107756	2	2	0.37
p.E279E	rs41333546	3	3	0.43
p.E307E	rs41392447	3	3	0.43
p.V313V	rs2076529	53	23	0.1
p.Q350Q	rs9268480	33	22	0.39
p.L366L	rs76868526	3	1	1
p.S404S	rs41449245	23	16	0.73
p.H414H	rs41535850	23	13	1

Πίνακας 12. Ανάλυση των πολυμορφισμών των εξονίων που ανιχνεύθηκαν από την μελέτη του γονιδίου BTNL2 στις δύο ομάδες μελέτης. Στην 1^η και 2^η στήλη αναφέρονται οι πολυμορφισμοί και ο κωδικός της κάθε μίας, ενώ στην 3^η και 4^η στήλη αναφέρεται ο απόλυτος αριθμός των πολυμορφισμών που βρέθηκαν στην ομάδα των ασθενών και στην ομάδα των μαρτύρων αντίστοιχα. Στην τελευταία στήλη αναφέρεται η τιμή στατιστικής σημαντικότητας p που υπολογίσθηκε με το double-sided Fisher's test.

ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ INTRONΙΩΝ	ΑΣΘΕΝΕΙΣ n:146	MARTYPEΣ n:90	p value
709+28 T/C	9	2	0.21
709+66 T/C	4	1	0.65
709+88 G/A	2	0	0.52
709+96 A/G	25	8	0.097
709+125 C/G	2	1	1
710-19 A/G	1	3	0.30
710-23 T/C	2	3	0.37
710-29 T/G	1	0	1
710-61 T/C	1	6	0.013
710-93 T/C	1	0	1
730+29 T/G	2	0	0.52
730+32 A/C	1	0	1
730+74 C/T	2	3	0.37
1078+26 T/C	1	3	0.30
1078+42 C/T	22	16	0.60
1078+44 G/A	1	3	0.30

Πίνακας 13. Ανάλυση των πολυμορφισμών των ιντρονίων που ανιχνεύθηκαν από την μελέτη του γονιδίου BTNL2 στις δύο ομάδες μελέτης. Στην 1^η και 2^η στήλη αναφέρονται οι πολυμορφισμοί και ο κωδικός της κάθε μίας, ενώ στην 3^η και 4^η στήλη αναφέρεται ο απόλυτος αριθμός των πολυμορφισμών που βρέθηκαν στην ομάδα των ασθενών και στην ομάδα των μαρτύρων αντίστοιχα. Στην τελευταία στήλη αναφέρεται η τιμή στατιστικής σημαντικότητας p που υπολογίστηκε με το double-sided Fisher's test.

Μελέτη κλινικών στοιχείων και συσχέτιση μεταλλάξεων του γονιδίου BTNL2

Από το σύνολο των 146 ασθενών που συμμετείχαν στην μελέτη αναλύσαμε τα κλινικά δεδομένα 121 ασθενών που παρέμειναν στην μελέτη για χρονικό διάστημα δύο ετών και άνω, όπως παρουσιάζονται στον πίνακα 14. Αυτή η ομάδα ασθενών χωρίστηκε σε δύο υποομάδες με βάση το στάδιο πνευμονικής σαρκοείδωσης όπως

αυτό προκύπτει από την ακτινογραφία θώρακος. Η μία υποομάδα περιλαμβάνει 40 ασθενείς με εμμένουσα πνευμονική νόσο και η άλλη υποομάδα περιλαμβάνει 81 ασθενείς με μη εμμένουσα πνευμονική νόσο.

Εμμένουσα πνευμονική νόσο χαρακτηρίσαμε τη νόσος όταν οι ασθενείς παραμένουν σταθεροί σε στάδιο II ή III ή IV μετά τα δύο έτη παρακολούθησης ή εξελίσσονται από στάδιο 0 ή I σε στάδιο II III ή IV.

Μη εμμένουσα πνευμονική νόσος χαρακτηρίζεται η νόσος όταν οι ασθενείς παραμένουν σε στάδιο 0 ή I ή παρουσιάζουν ύφεση μετά τα δύο έτη σε στάδιο 0 ή I.

Όπως προκύπτει από την ανάλυση των κλινικών στοιχείων που παρουσιάζονται στον πίνακα 14, οι ασθενείς με εμμένουσα νόσο είναι συχνότερα γυναίκες, ηλικίας άνω των 40 ετών, μη καπνιστές, με συχνότερες υποτροπές και πιο συχνή χορήγηση θεραπειάς.

Από την στατιστική ανάλυση της συχνότητας του καπνίσματος με το double-sided Fisher's τεστ, μεταξύ των δύο ομάδων ασθενών διαπιστώθηκε ότι είναι στατιστικά σημαντική ($p=0.042$).

Επιπλέον διαπιστώσαμε ότι το ποσοστό των μη καπνιστών ήταν μεγαλύτερο και στις δύο ομάδες ασθενών γεγονός που συμφωνεί με τις βιβλιογραφικές αναφορές ότι το κάπνισμα δεν συμβάλλει στην παθογένεια της νόσου και θεωρείται ότι ίσως αποτελεί προστατευτικό παράγοντα έναντι της σαρκοείδωσης.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η πρόσφατη μελέτη των Mark W. Julian et al.¹¹² η οποία βασίστηκε σε πρόσφατες ενδείξεις ότι η νικοτίνη συνδέεται με την ρύθμιση των φλεγμονωδών T-λεμφοκυττάρων μέσω ενεργοποίησης του α7 νικοτινικού χολινεργικού υποδοχέα και με αυτό τον μηχανισμό η χρόνια έκθεση σε νικοτίνη μειώνει την επίπτωση των κοκκιωμωτών νοσημάτων. Μελέτες που έγιναν σε ασθενείς με χρόνιες φλεγμονώδεις νόσους διαπίστωσαν ότι η θεραπεία με νικοτίνη μειώνει την φλεγμονή και τα χαρακτηριστικά συμπτώματα αυτών, όπως την νόσο του Grohn και τις ιδιοπαθείς μη μικροβιακές κοκκιωματώδεις νόσους του εντέρου όπου ιστοπαθολογικά έχουν ομοιότητες με την σαρκοείδωση.

Επίσης σε άλλες μελέτες διαπιστώθηκε ότι η έκθεση σε νικοτίνη μειώνει τη κοκκιωματώδη φλεγμονή, καθυστερεί την έναρξη της νόσου στην πνευμονίτιδα από υπερευαισθησία και μειώνει την σοβαρότητα φλεγμονώδους προσβολής των αρθρώσεων στην ρευματοειδή αρθρίτιδα. Βασιζόμενοι στα συμπεράσματα των παραπάνω μελετών η ομάδα των Mark W. Julian et al.(2013) χορήγησαν για πρώτη φορά σε συμπτωματικούς ασθενείς που έπασχαν από σαρκοείδωση, νικοτίνη διαδερμικά για διάστημα 12 εβδομάδων και διαπίστωσαν μεταβολή των φλεγμονωδών κυττάρων καθώς βελτιώθηκε η ανταπόκριση των υποδοχέων TLR-2 και TLR-9, με αποτέλεσμα ο ανοσολογικός φαινότυπος να είναι παρόμοιος με αυτό των ασυμπτωματικών ασθενών. Αυτή η διαπίστωση οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η θεραπεία με νικοτίνη μπορεί να είναι αποτελεσματική σε ασθενείς με συμπτωματική σαρκοείδωση.

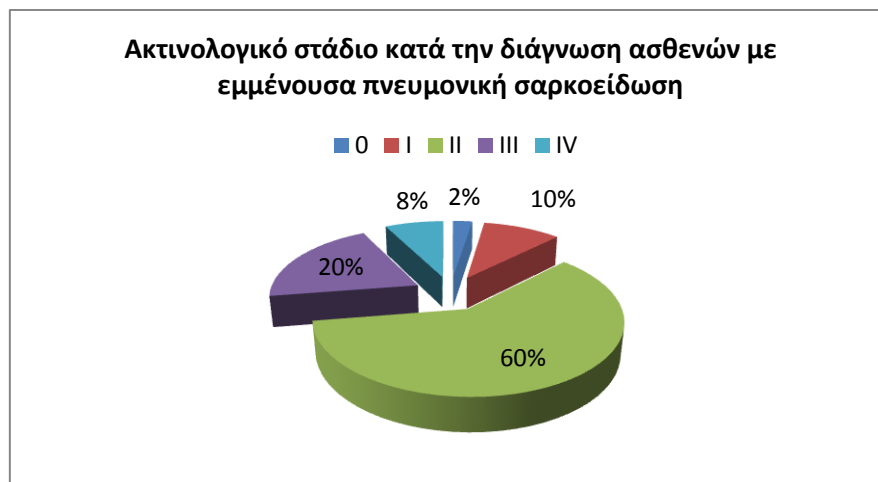
Διαπιστώθηκε επίσης στην μελέτη μας ότι η προσβολή της καρδιάς η οποία αποτελεί σοβαρή μορφή της νόσου δεν ήταν συχνότερη στους ασθενείς με εμμένουσα νόσο, αποτελώντας μια ένδειξη ότι η χρόνια πνευμονική νόσο δεν συνοδεύεται απαραίτητα από σοβαρή προσβολή της καρδιάς και η συχνότητα προσβολής μεταξύ των δύο ομάδων ελέγχου δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0.72$).

Επίσης το μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών με εμμένουσα πνευμονική νόσο έπασχαν από στάδιο II σύμφωνα με την ακτινογραφία θώρακος κατά την διάγνωση

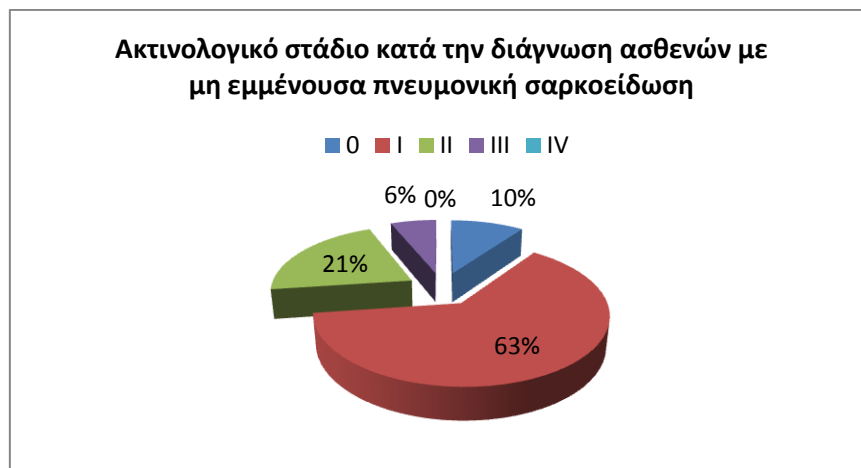
αλλά και κατά την παρακολούθηση αυτών, ενώ η ομάδα με μη εμμένουσα πνευμονική σαρκοείδωση έπασχαν από στάδιο Ι (σχεδιαγράμματα 3 και 4). Από τον λειτουργικό έλεγχο της αναπνοής διαπιστώθηκε ότι οι τιμές των παραμέτρων FVC (βίαια εκπνεόμενη ζωτική χωρητικότητα), FEV1(βίαια εκπνεόμενος όγκος αέρα στο 1^ο δευτερόλεπτο) και DLCO (δείκτης διαχυτικής ικανότητας CO) και στις 2 υποομάδες ασθενών που μελετήθηκαν, ήταν σε μεγαλύτερο ποσοστό εντός φυσιολογικών ορίων ($\geq 80\%$).

Επίσης παρατηρήσαμε ότι στην ομάδα με την μη εμμένουσα πνευμονική νόσο το ποσοστό των φυσιολογικών παραμέτρων FVC/FEV1/DLCO $\geq 80\%$ ήταν υψηλότερο έναντι της ομάδας με την εμμένουσα πνευμονική νόσο (95,1%/88,9%/59,3% αντίστοιχα έναντι 75,0%/65,2%/55,0%).

Από την στατιστική ανάλυση των τιμών αυτών των παραμέτρων μεταξύ των δύο υποομάδων ασθενών σύμφωνα με το double-sided Fisher's test τα αποτελέσματα ήταν στατιστικά σημαντικά για τις παραμέτρους FVC και FEV1($p=0.0021$ και $p=0.00096$ αντίστοιχα) ενώ για την DLCO δεν ήταν στατιστικά σημαντικά ($p=0.69$).



Σχεδιάγραμμα 3



Σχεδιάγραμμα 4

	ΣΥΝΟΛΟ ΑΣΘΕΝΩΝ n:121(%)		ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΕΜΜΕΝΟΥΣΑ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΝΟΣΟ n:40(%)		ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΜΗ ΕΜΜΕΝΟΥΣΑ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΝΟΣΟ n:81(%)		p value ^a
ΦΥΛΟ							
ΑΝΔΡΕΣ	43	35,5%	18	45,0%	25	30,9%	0.16
ΓΥΝΑΙΚΕΣ	78	64,5%	22	55,0%	56	69,1%	
ΗΛΙΚΙΑ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΔΙΑΓΝΩΣΗ							
ΜΕΣΗ ΗΛΙΚΙΑ	44	±11,7	47	±12,4	43	±11,2	0.84
≤ 40 ΕΤΩΝ	51	42,1%	16	40,0%	35	43,2%	
> 40 ΕΤΩΝ	70	57,9%	24	60,0%	46	56,8%	
ΚΑΠΝΙΣΜΑ							
ΝΑΙ	23	19,0%	11	27,5%	12	14,8%	0.042
ΟΧΙ	87	71,9%	23	57,5%	64	79,0%	
ΠΡΩΗΝ	11	9,1%	6	15,0%	5	6,2%	
ΥΠΟΤΡΟΠΕΣ							
ΝΑΙ	33	27,3%	13	32,5%	20	24,7%	0.39
ΟΧΙ	88	72,7%	27	67,5%	61	75,3%	
ΠΡΟΣΒΟΛΗ ΚΑΡΔΙΑΣ							
ΝΑΙ	9	7,4%	2	5,0%	7	8,6%	0.72
ΟΧΙ	112	92,6%	38	95,0%	74	91,4%	
ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ							
ΝΑΙ	60	49,6%	21	52,5%	39	48,1%	0.7
ΟΧΙ	61	50,4%	19	47,5%	42	51,9%	
ΣΤΑΔΙΟ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΔΙΑΓΝΩΣΗ							
0	9	7,4%	1	2,5%	8	9,9%	< 0.0001 ^b
I	55	45,5%	4	10,0%	51	63,0%	
II	41	33,9%	24	60,0%	17	21,0%	
III	13	10,7%	8	20,0%	5	6,2%	
IV	3	2,5%	3	7,5%	0	0,0%	
ΣΤΑΔΙΟ ΤΕΛΕΥΤΑΙΑΣ Α/Α ΘΩΡΑΚΟΣ							
0	40	33,1%	0	0,0%	40	49,4%	< 0.0001 ^b
I	41	33,9%	0	0,0%	41	50,6%	
II	20	16,5%	20	50,0%	0	0,0%	
III	13	10,7%	13	32,5%	0	0,0%	
IV	7	5,8%	7	17,5%	0	0,0%	
DLCO ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΔΙΑΓΝΩΣΗ							
< 80%	51	42,1%	18	45,0%	33	40,7%	0.69
≥ 80%	70	57,9%	22	55,0%	48	59,3%	
FEV1 ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΔΙΑΓΝΩΣΗ							
< 80%	24	19,8%	15	37,5%	9	11,1%	0.00096
≥ 80%	97	80,2%	25	62,5%	72	88,9%	
FVC ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΔΙΑΓΝΩΣΗ							
< 80%	14	11,6%	10	25,0%	4	4,9%	0.0021
> 80%	107	88,4%	30	75,0%	77	95,1%	

Πίνακας 14. Ανάλυση των κλινικών δεδομένων των ασθενών με παρακολούθηση ≥ 2 ετών και των υποομάδων αυτών ανάλογα με την βαρύτητα της νόσου. Στην 1^η αναφέρονται ο απόλυτος αριθμός των κλινικών στοιχείων και τα ποσοστά αυτών στο σύνολο των 121 ασθενών. Στην 2^η και 3^η στήλη αναφέρεται ο απόλυτος αριθμός των κλινικών στοιχείων και τα ποσοστά αυτών στις ομάδες ασθενών με χρόνια πνευμονική νόσο και με ήπια πνευμονική νόσο αντίστοιχα. Στην τελευταία στήλη αναφέρεται η τιμή στατιστικής σημαντικότητας p που υπολογίσθηκε με το double-sided Fisher's τεστ.

^a Σύγκριση ομάδας με εμμένουσα πνευμονική νόσο με την ομάδα με μη εμμένουσα πνευμονική νόσο.

^b Σύγκριση ακτινολογικού σταδίου 0+I με τα στάδια II +III+ IV μεταξύ των δύο ομάδων.

Συσχετίζοντας τα κλινικά στοιχεία των 121 ασθενών που παρακολουθήθηκαν 2 έτη και άνω, με τα γενετικά ευρήματα διαπιστώσαμε ότι σε 49 ασθενείς (40,5%) ανιχνεύθηκε η μετάλλαξη rs2076530, σε 42 ασθενείς (34,7%) ο πολυμορφισμός p.V313V (rs2076529) και σε 33 ασθενείς (27,3%) η μετάλλαξη p.K196E (rs2076523). Επίσης διαπιστώσαμε ότι σε 11 ασθενείς (9,1%) ανιχνεύθηκαν ταυτόχρονα οι μεταλλάξεις: p.S360G(rs2076530), p.P379L(rs28362678), p.M380I(rs28362677) και p.P393Q(rs41521946) και οι πολυμορφισμοί: p.V313V(rs2076529), p.S404S(rs41449245), p.H414H(rs41535850), εκ των οποίων οι 8 ασθενείς (72,7%) έπασχαν από ήπια πνευμονική νόσο σύμφωνα με την ακτινογραφία θώρακος.

Η συνύπαρξη των προαναφερθέντων μεταλλάξεων και πολυμορφισμών στον ίδιο ασθενή πιθανόν να σχετίζεται με ήπια πνευμονική νόσο, χωρίς όμως να μπορεί να τεκμηριωθεί καθώς η σαρκοείδωση θεωρείται πολυπαραγοντική νόσος και πιθανόν να συμβάλλουν και άλλοι παράγοντες στην εκδήλωση της ήπιας πνευμονικής νόσου. Στην ομάδα των 81 ασθενών με μη εμμένουσα πνευμονική νόσο, ανιχνεύθηκε η μετάλλαξη p.S360G(rs2076530) στους 37 ασθενείς (45,7%), ενώ στη ομάδα των 40 ασθενών με εμμένουσα πνευμονική νόσο ανιχνεύθηκε η συγκεκριμένη μετάλλαξη σε 12 ασθενείς (30%).

Παρατηρούμε ότι η προαναφερθείσα μετάλλαξη ανιχνεύεται σε μεγαλύτερη συχνότητα στη ομάδα με μη εμμένουσα πνευμονική νόσο σε σχέση με την ομάδα με εμμένουσα πνευμονική νόσο, αλλά δεν είναι στατιστικά σημαντική ($p=0.12$) σύμφωνα με το double-sided Fisher's τεστ. Απαιτούνται περισσότερες μελέτες στον Ελληνικό πληθυσμό για να διευκρινισθεί η συσχέτιση της μετάλλαξης rs2076530 με την παθογένεια της νόσου καθώς και με συγκεκριμένους φαινοτύπους αυτής.

Γονίδιο IL-12Bp40

Μελετήσαμε τη συσχέτιση του μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού στο άκρο 3' της μη μεταφρασμένης περιοχής της υπομονάδας του γονιδίου IL-12B p40 στην θέση +1602(A/C)(rs3212227) με την εκδήλωση της σαρκοείδωσης, σε 96 ασθενείς και 90 μάρτυρες. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας το αλληλίο A ανιχνεύθηκε με αυξημένη συχνότητα και στην ομάδα των ασθενών (72%) και στην ομάδα των μαρτύρων (74%), δεδομένα που συμφωνούν με την συχνότητα εμφάνισής στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό (78%) αλλά και παγκοσμίως (66%).

Από την στατιστική ανάλυση με το double-sided Fisher's τεστ διαπιστώθηκε ότι η συχνότητα εμφάνισης αυτού του μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού μεταξύ των δύο ομάδων ελέγχου δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0.81$).

Η IL-12 είναι μία κυτοκίνη η οποία παράγεται από τα Th1-κύτταρα (T-βοηθητικά λεμφοκύτταρα) και έχει διαπιστωθεί ότι είναι αυξημένη η έκφρασή της σε πολλές αυτοάνοσες φλεγμονώδεις παθήσεις.

Τα αποτελέσματα των μελετών όσον αφορά την συσχέτιση του πολυμορφισμού rs3212227 της IL-12 με φλεγμονώδεις παθήσεις είναι αντιφατικά καθώς στην μελέτη των A. Hall et al.⁸² δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού σε Έλληνες ασθενείς και σε Αμερικανούς λευκής φυλής με την εκδήλωση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, αλλά ούτε με την εκδήλωση της σκλήρυνσης κατά πλάκας σε πληθυσμό Ιρλανδών, ούτε με την εκδήλωση πνευμονικής ίνωσης⁸⁴ ενώ στις μελέτες των van Veen T. Et al.¹¹³ και των Moranhan G. Et al.¹¹⁴ διαπιστώθηκε

συσχέτιση του πολυμορφισμού με την σκλήρυνση κατά πλάκας και τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 αντίστοιχα.

Γονίδιο IL-18

Ένα ακόμα γονίδιο που μελετήσαμε είναι η ιντερλευκίνη-18(IL-18). Συγκεκριμένα μελετήθηκε η συσχέτιση του υποκινητή 1 του γονιδίου IL-18 στη θέση -137 G/C(rs187238) στο άκρο 5' της μη μεταφρασμένης περιοχής του με την παθογένεια της σαρκοείδωσης σε 91 ασθενείς και 85 μάρτυρες. Διαπιστώσαμε ότι η συχνότητα εμφάνισης των αλληλίων μεταξύ των δύο ομάδων ελέγχου ήταν στατιστικά σημαντική($p=0.029$) από την στατιστική ανάλυση με το double-sided Fisher's τεστ. Τα αποτελέσματα από την ανάλυση των γονοτύπων και των αλληλίων περιγράφονται στον πίνακα 15.

Όπως διαπιστώθηκε η συχνότητα του αλληλίου C είναι μεγαλύτερη στην ομάδα των ασθενών 32% έναντι 21% στην ομάδα των μαρτύρων καθιστώντας αυτό το αλληλίο στην θέση -137 του υποκινητή της IL-18 πιθανό προδιαθεσικό παράγοντα στην εκδήλωση της σαρκοείδωσης. Αντίθετα το αλληλίο G ανιχνεύθηκε σε αυξημένη συχνότητα στην ομάδα των μαρτύρων 79% έναντι 68% στην ομάδα των ασθενών καθιστώντας αυτό το αλληλίο πιθανό προστατευτικό παράγοντα στην εκδήλωση της σαρκοείδωσης.

IL-18 PROMOTER 1 -137 G/C					
	Ασθενείς (n91)(%)		Μάρτυρες (n85)(%)		p-value ^a
Γονότυποι					
G/G	38	(42%)	50	(59%)	0,03
G/C	48	(53%)	34	(40%)	0,09
C/C	5	(5%)	1	(1%)	0,21
Αλληλία					
G	124	(68%)	134	(79%)	0,029
C	58	(32%)	36	(21%)	

Πίνακας 15: Συσχέτιση των γονοτύπων και των αλληλίων του υποκινητής 1 της IL-18 στη θέση -137G/C. ^a Υπολογισμός του p value με το double-sided Fisher's τεστ.

Ο γονότυπος G/G ανιχνεύθηκε σε αυξημένο ποσοστό 59% στην ομάδα των μαρτύρων σε σχέση με την ομάδα των ασθενών όπου το ποσοστό ήταν 42% και η διαφορά αυτή ήταν στατιστικά σημαντική($p=0.03$) από την στατιστική ανάλυση με το double-sided Fisher's τεστ. Πιθανόν στους ομοζυγώτες το αλληλίο G να έχει προστατευτικό ρόλο στην εκδήλωση της σαρκοείδωσης. Χρειάζονται όμως περισσότερες μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών και μαρτύρων για να διερευνηθεί ο ρόλος των αλληλίων του πολυμορφισμού του υποκινητή 1 της IL-18 στη θέση -137 G/C καθώς

δεν υπάρχουν άλλες μελέτες με αντίστοιχα αποτελέσματα σε σχέση με την εκδήλωση της σαρκοείδωσης.

Στην μελέτη των R. Janssen et al.⁷⁹ όπου εξετάστηκε η συσχέτιση τεσσάρων πολυμορφισμών της IL-18 -656(G/T), -607(A/C), -137(C/G) και 1248(A/G) σε Ολλανδούς ασθενείς με σαρκοείδωση, δεν επιβεβαιώθηκε θετική συσχέτιση με εκδήλωση της σαρκοείδωσης σε Ευρωπαίους Καυκάσιους, ενώ ανευρέθηκαν σημαντικές διαφορές συγκρίνοντας τις συχνότητες των αλληλίων μεταξύ Ολλανδών και Ιαπώνων.

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης επιβεβαιώνουν προηγούμενη μελέτη των T. Takada et al.⁷⁸ σε πληθυσμό Ιαπώνων όπου διαπιστώθηκε ότι το αλληλίο C του πολυμορφισμού -607 αποτελεί γενετικό παράγοντα κινδύνου για την σαρκοείδωση, αλλά δεν επιβεβαιώθηκε η συσχέτιση με τον πολυμορφισμό -137(G/C).

Οι μελέτες αυτές επιβεβαιώνουν την γενετική ποικιλομορφία που παρατηρείται μεταξύ διαφορετικών εθνικοτήτων με αποτέλεσμα να ποικίλουν τα αποτελέσματα συσχετίσεων γονιδίων με διάφορα νοσήματα.

Καθώς η σαρκοείδωση είναι πολυπαραγοντική νόσος, στις διαφορές που παρατηρούνται ως προς τα γονίδια που σχετίζονται με την νόσου αλληλεπιδρούν και άλλοι περιβαλλοντικοί, εξωγενείς παράγοντες που διαφέρουν σε κάθε φυλή και σε κάθε εθνικότητα.

Συζήτηση και συμπεράσματα

Η σαρκοείδωση είναι μία πολυσυστηματική, κοκκιωματώδη, φλεγμονώδη νόσος αγνώστου αιτιολογίας, η οποία χαρακτηρίζεται από ενεργοποίηση των μακροφάγων και των CD4+ T-λεμφοκυττάρων και το σχηματισμό μη τυροειδοποιημένου κοκκιώματος κυρίως στους πνεύμονες και στο λεμφικό σύστημα. Είναι παγκοσμίως αποδεκτή η υπόθεση ότι η παθογένεση της νόσου είναι αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης γενετικών παραγόντων με άγνωστους περιβαλλοντικούς παράγοντες.

Πολλές μελέτες έχουν διαπιστώσει την οικογενή προδιάθεση της νόσου καθώς είναι αυξημένος ο κίνδυνος εκδήλωσής της μεταξύ συγγενών πρώτου βαθμού και διδύμων, σε ποσοστό 19% σε Αφροαμερικανούς και σε ποσοστό 5% σε Καυκάσιους. Σύμφωνα με την πολυκεντρική μελέτη ACCESS των B.A. Rybicki et al.(2001) μεταξύ οικογενειών που πάσχουν από σαρκοείδωση διαπιστώθηκε αυξημένος κίνδυνος εκδήλωσης της νόσου μεταξύ ομοζυγωτών διδύμων, συγγενών πρώτου και δευτέρου βαθμού και μεταξύ οικογενειών λευκής φυλής σε σχέση με οικογένειες Αφροαμερικανών¹⁰.

Στην πρώτη δημοσιευμένη ευρεία γενετική μελέτη (The first genome-wide linkage study (GWLS)) των Schürmann et al.(2001) η οποία αφορούσε 63 οικογένειες Γερμανών που έπασχαν από σαρκοείδωση και αποτελούνταν από 138 διδύμους που έπασχαν από σαρκοείδωση και 95 πρώτου βαθμού συγγενείς, διαπιστώθηκε μεγαλύτερη συσχέτιση με τα γονίδια στην περιοχή 6p12 έως 6p22 του χρωμοσώματος 6 συμπεριλαμβάνοντας και το μείζων σύστημα ιστοσυμβατότητας τύπου II (MCH II) και πιθανή συσχέτιση με γονίδια που εντοπίζονταν στα χρωμοσώματα 3p21, 1p22, 9q33, X, 7Q22, και 7q36.^{115,116}

Σε μία δεύτερη γενετική μελέτη για τη σαρκοείδωση, η μελέτη SAGA (Sarcoidosis Genetic Analysis Consortium) όπου αφορούσε ζευγάρια διδύμων από 229 οικογένειες Αφροαμερικανών, δεν επιβεβαιώθηκε η συσχέτιση με τα γονίδια στην περιοχή MCH II. Τα διαφορετικά αποτελέσματα αυτών των δύο μελετών μεταξύ Γερμανών και Αφροαμερικανών ενισχύουν την άποψη που επικρατεί για την ετερογένεια της νόσου ως προς την εκδήλωσή της μεταξύ των διαφορετικών εθνικοτήτων λόγω της επίδρασης γενετικών παραγόντων.¹¹⁷

Σε μια μεγάλη πολυκεντρική αιτιολογική μελέτη για την σαρκοείδωση (ACCESS), μεταξύ Αφροαμερικανών και ατόμων λευκής φυλής, όπου μελετήθηκαν εκτενώς τα γονίδια που εντοπίζονται στην περιοχή του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας II, διαπιστώθηκε ισχυρή συσχέτιση με πολυμορφισμούς στην περιοχή HLA-DRB1. Συγκεκριμένα διαπιστώθηκε ότι το αλληλίο HLA-DRB1*1501 αυξάνει τον κίνδυνο για εκδήλωση της σαρκοείδωσης στα άτομα λευκής φυλής ενώ έχει προστατευτικό ρόλο στους Αφροαμερικανούς.¹¹⁸ Σύμφωνα με την μελέτη των Benjamin et al.(2003) στην περιοχή μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας(MHC) σε Αφροαμερικανούς διαπιστώθηκε επίσης ότι το γονίδιο HLA-DQB1 έχει θετική συσχέτιση στην εκδήλωση της σαρκοείδωσης αλλά όχι το HLA-DRB1.¹¹⁹

Παρόλο που δεν υπάρχει σαφής ομοφωνία για τα αλληλία στην περιοχή HLA που σχετίζονται με την νόσο, όπως προκύπτει από διάφορες μελέτες σε διαφορετικούς πληθυσμούς, τα HLA-DRB1*01 και HLA-DRB1*04 παρουσιάζουν αρνητική συσχέτιση με την νόσο και φαίνεται ότι έχουν προστατευτικό ρόλο έναντι αυτής, ενώ τα αλληλία

HLA-DRB1*03, HLA-DRB1*11, HLA-DRB1*12, HLA-DRB1*14 και HLA-DRB1*15 σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο για εκδήλωση της σαρκοείδωσης.

Επιπλέον, συγκεκριμένα HLA αλληλία σχετίζονται με την πορεία της νόσου όπως το αλληλίο HLA-DRB1*0301 είναι γνωστό ότι συνδέεται με την οξεία έξαρση της νόσου, την αυτόματη ύφεση και την καλοήγη μορφή, το σύνδρομο Löfgren, καθώς και το αλληλίο HLA-DQB1*0201 στην λευκή φυλή σχετίζεται με καλή πορεία.

Αντίθετα το αλληλίο HLA-DRB1*1501/DQB1*0602 συνδέεται με χρόνια πορεία της νόσου και το HLA-DQB1*0602/DRB1*150101 σχετίζεται με σοβαρή πνευμονική νόσο, ενώ το αλληλίο HLA-DQB1*0601 έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται με την καρδιακή σαρκοείδωση στους Ιάπωνες.⁹²

Πολλά είναι τα γονίδια που έχει μελετηθεί η συσχέτισή τους με την σαρκοείδωση σε διάφορους πληθυσμούς με αντικρουόμενα αποτελέσματα. Σε μια ευρεία γενετική μελέτη σε Γερμανικό πληθυσμό αλλά και άλλες μικρότερες σε άλλους Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς διαπιστώθηκε η παρουσία ενός μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού (SNP) rs1049550 του γονιδίου ανεξίνης A11(ANXA11)που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 10 και σχετίζεται με την εκδήλωση της σαρκοείδωσης.^{120,121}

Στην πρώτη ευρεία γενετική μελέτη των Indra Adrianto et al.(2012) μεταξύ Αφρικανών και Ευρωπαίων Αμερικανών διαπιστώθηκε η παρουσία ενός νέου γονιδίου NOTCH4 που σχετίζεται με την σαρκοείδωση και στις δύο ομάδες μελέτης ανεξάρτητα από την παρουσία άλλων γονιδίων στην περιοχή MHC, καθώς και των γονιδίων ANXA11, BTNL2, HLA-DRA, HLA-DRB5, HLA-DRB1 και στις περιοχές HLA-C και HLA-B.¹²²

Γονίδια που δεν εντοπίζονται στη θέση HLA έχουν μελετηθεί επίσης για την συσχέτισή τους με την σαρκοείδωση όπως είναι το γονίδιο CARD15/NOD2 στο χρωμόσωμα 16 στο οποίο δεν επιβεβαιώθηκε από τις μελέτες των Rybicki et al.(1999)και Schurmann et al.(2003) αλλά πιθανόν να παίζει ρόλο στην πρώιμη εκδήλωση της νόσου καθώς διαπιστώθηκε στην μελέτη των Gazouli M.et al.(2006), συσχέτιση αυτού του γονιδίου με την σαρκοείδωση στον Ελληνικό πληθυσμό, και ιδιαίτερα η συνύπαρξή του με το γονίδιο CD14.^{88,123}

Επίσης μελετήθηκε το γονίδιο SLC11A1(NRAMP1) το οποίο κωδικοποιεί την φυσική αντίσταση που σχετίζεται με την πρωτεΐνη 1 των μακροφάγων, και δεν επιβεβαιώθηκε η συσχέτισή του με την εκδήλωση της νόσου σε Αφροαμερικανούς, αλλά επιβεβαιώθηκε σε Πολωνούς ασθενείς⁹⁰ και Τούρκους¹²⁴.

Σε πρόσφατη μελέτη των Fischer A et al.(2012) διαπιστώθηκε ένας νέος μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός rs479777 στο χρωμόσωμα 11q13.1 που σχετίζεται με την σαρκοείδωση σε Ευρωπαίους, ενώ μέχρι πρόσφατα η παρουσία του συνδεόταν με την νόσο του Crohn, την ψωρίαση και την γυροειδή αλωπεκία.

Στην θέση αυτή εντοπίζονται τα γονίδια KCNK4, PRDX5, PCLB3, και τα πολλά υποσχόμενο γονίδιο CCDC88B τα οποία πιθανόν να αυξάνουν τον κίνδυνο εκδήλωσης της νόσου, αλλά απαιτούνται περισσότερες μελέτες για την διερεύνηση της συσχέτισης αυτών των γονιδίων.¹²⁵

Πολλά ακόμα γονίδια μελετήθηκαν μέχρι σήμερα, για τον ρόλο τους στην εκδήλωση της σαρκοείδωσης με αντιφατικά αποτελέσματα σε διαφορετικούς πληθυσμούς, όπως ο υποδοχέας της βιταμίνης D(VDR), πολυμορφισμοί του γονιδίου ACE, ο υποδοχέας 2 και 5 των χυμοκινών CCR2 και CCR5 αντίστοιχα, η Ιντερφερόνη-α (IFN-α), ο παράγοντας TGF-β, ο υποδοχέας TLR4¹²⁶, ο παράγοντας νέκρωσης όγκου

(TNF-α), ο αγγειακός επιθηλιακός παράγοντας ανάπτυξη (VEGF) και του γονιδίου CFTR που σχετίζεται με την κυστική ίνωση.⁸⁸

Η μετάλλαξη R75Q του γονιδίου CFTR έχει συσχετισθεί με την σαρκοείδωση σύμφωνα με την μελέτη των Bombieri et.al.¹²⁷ και Makrythanasis P.et al.¹²⁸ ενώ δεν επιβεβαιώθηκε στην μελέτη των Schurmann et al.¹²⁹

Το γονίδιο VEGF και οι υποδοχείς του διαπιστώθηκε στην μελέτη των Pabst S.et al.(2010) ότι σχετίζονται με την εκδήλωση της σαρκοείδωσης και επηρεάζουν την πορεία της.¹³⁰

Στην μελέτη των Plant B.J. et al.(2007) εξετάστηκε η συσχέτιση του γονιδίου MIF (αναστολέας μετανάστευσης μακροφάγων) με την παθογένεση της σαρκοείδωσης σε Ιρλανδούς, χωρίς επιβεβαίωση.¹³¹

Η φλεγμονώδη απάντηση κατά την εξέλιξη της νόσου χαρακτηρίζεται από την αυξημένη παραγωγή αρκετών φλεγμονωδών κυτοκινών από τα Th1 βοηθητικά κύτταρα και τα μακροφάγα όπως IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, IL-16 και IL-18.

Οι πολυμορφισμοί της IL-10 μελετήθηκαν από την ομάδα των Kenichi Sakuyama et al.¹³² στον πληθυσμό Ιαπώνων για την συσχέτισή τους με την παθογένεση της σαρκοείδωσης χωρίς όμως να επιβεβαιωθεί.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη των Kim et al.¹³³ όπου διερεύννησαν το ρόλο του υποδοχέα της IL-23(IL-23R) με την εκδήλωση της σαρκοείδωσης. Οι πολυμορφισμοί της IL-23R έχουν συσχετισθεί με την ψωρίαση και την αγκυλοποιητική αρθρίτιδα και σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης συσχετίστηκαν και με την σαρκοείδωση και κυρίως με την εκδήλωση ραγοειδίτιδας.

Πολλές μελέτες αφορούν την συσχέτιση φλεγμονωδών νόσων⁸⁵, ρευματοειδούς αρθρίτιδας⁸², σκλήρυνσης κατά πλάκας⁸², νόσο του Crohn(CD)⁸³, Ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση⁸⁴, με τη ιντερλευκίνη-12(IL-12) και συγκεκριμένα με τη υπομονάδα p40 χωρίς να βρεθεί θετική συσχέτιση σε καμία από αυτές.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της δικής μας μελέτη στον Ελληνικό πληθυσμό για την μονονουκλεοτιδική αλλαγή στη θέση +1602A/C(rs3212227), της υπομονάδας p40 της ιντερλευκίνης 12(IL-12Br40) σε σχέση με την σαρκοείδωση, δεν διαπιστώθηκε θετική συσχέτιση. Από την γενετική ανάλυση της ομάδας των ασθενών και των μαρτύρων ανευρέθηκε σε μεγαλύτερη συχνότητα το αλληλίο A και στις δύο ομάδες και η συχνότητα εμφάνισής του μεταξύ των δύο ομάδων δεν ήταν στατιστικά σημαντική (p=0.81) από την στατιστική ανάλυση με το double-sided Fisher's τεστ.

Επομένως στον Ελληνικό πληθυσμό ο πολυμορφισμός της IL-12Br40 δεν σχετίζεται με τη παθογένεια της σαρκοείδωσης.

Η IL-12 αποτελεί την πιο σημαντική κυτοκίνη η οποία προάγει την δραστηριότητα των Th1 λεμφοκυττάρων τα οποία συμμετέχουν ενεργά στην παθογένεια της σαρκοείδωσης. Με βάση αυτό το κριτήριο μελετήθηκαν από πολλές ερευνητικές ομάδες τα επίπεδα της IL-12Br40 στον ορό και στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα(BAL) σε ασθενείς που έπασχαν από πνευμονική σαρκοείδωση.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτών των μελετών τα επίπεδα της IL-12Br40 ήταν υψηλότερα στον ορό των ασθενών σε σχέση με τους μάρτυρες,^{86,134} και στο BAL αυτών^{135,136,137,138,139}, ιδιαίτερα σε ασθενείς με πνευμονική σαρκοείδωση, με επίμονη μορφή νόσου που χορηγήθηκε θεραπεία με κορτικοειδή και σε ασθενείς με προσβολή και άλλων εξωθωρακικών οργάνων.

Αυτά τα αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η IL-12Br40 αποτελεί έναν χρήσιμο δείκτη ενεργότητας της νόσου καθώς και πιθανό προγνωστικό παράγοντα

καθώς διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα της IL-12 ήταν υψηλότερα στο BAL ασθενών που παρουσίαζαν επιδείνωση της νόσου χωρίς θεραπεία σε σχέση με τους ασθενείς που παρουσίαζαν αυτόματη ύφεση.¹³⁵ Επομένως δεν υπάρχουν μελέτες που να συσχετίζουν συγκεκριμένο πολυμορφισμό της IL-12Bp40 με την παθογένεια της σαρκοείδωσης όπως προέκυψε και από την δική μας μελέτη αλλά συμμετέχει ως κυτοκίνη στην φλεγμονώδη διεργασία της νόσου.

Η ιντερλευκίνη-18 είναι μία κυτοκίνη η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό του σαρκοειδικού κοκκιώματος καθώς έχει συνεργική δράση με την ιντερλευκίνη-12 ενεργοποιώντας την παραγωγή της ιντερφερόνης-γ (INF-γ) από τα Th1 λεμφοκύτταρα. Πολλές μελέτες διαπίστωσαν την παρουσία αυξημένων επιπέδων της ιντερλευκίνης 18 και 12 στο BAL και στον ορό ασθενών που έπασχαν από πνευμονική σαρκοείδωση, επιβεβαιώνοντας την συμμετοχή της (IL-18) στον ανοσολογικό μηχανισμό της σαρκοείδωσης.^{138,140,141,142}

Στην μετανάλυση των Liu DH et al.¹⁴³ που αφορούσε την συσχέτιση της IL-18 με την πνευμονική σαρκοείδωση, διαπιστώθηκε από την ανάλυση έξι μελετών ότι τα επίπεδα της IL-18 ήταν σημαντικά υψηλότερα στο BAL και το αίμα ασθενών με πνευμονική σαρκοείδωση σε σχέση με τους μάρτυρες, επιβεβαιώνοντας το σημαντικό ρόλο της IL-18 στην πρόγνωση και την εξέλιξη της νόσου.

Η συσχέτιση συγκεκριμένων πολυμορφισμών και απλοτύπων της IL-18 με την εκδήλωση της σαρκοείδωσης μελετήθηκαν σε διαφορετικούς πληθυσμούς με αντιφατικά αποτελέσματα. Συγκεκριμένα διαπιστώθηκε συσχέτιση του αλληλίου C του πολυμορφισμού στην θέση -607 σε Ιάπωνες⁷⁸, ενώ δεν διαπιστώθηκε καμία συσχέτιση αυτού του πολυμορφισμού αλλά ούτε κάποιου άλλου πολυμορφισμού σε Ολλανδούς⁷⁹ ασθενείς με σαρκοείδωση.

Πολυμορφισμοί της ιντερλευκίνης-18 έχουν συσχετισθεί με την εκδήλωση και άλλων νοσημάτων όπως του αλληλίου C στην θέση 137 με την εκδήλωση του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 σε Ολλανδούς⁷⁵, του γονότυπου AA στην θέση 607 με την εκδήλωση της ηπατίτιδας B σε Κινέζους, ενώ στην ίδια μελέτη διαπιστώθηκε ο πιθανός προστατευτικός ρόλος του αλληλίου C στην θέση -137 έναντι της ηπατίτιδας B.¹⁴⁴ Άλλες μελέτες διαπίστωσαν συσχέτιση πολυμορφισμών της ιντερλευκίνης-18 με την ευαισθητοποίηση του οργανισμού έναντι συνήθων αλλεργιογόνων και με την εκδήλωση αλλεργικής ρινίτιδας⁷⁶, ενώ στην μελέτη των Giedraitis V. Et al⁷⁴ δεν αποδείχθηκε συσχέτιση πολυμορφισμών της ιντερλευκίνης-18 με την σκλήρυνση κατά πλάκας σε Σουηδούς.

Στην δική μας μελέτη στην οποία εξετάστηκε η συσχέτιση του πολυμορφισμού του υποκινητή 1 του γονιδίου IL-18 στη θέση -137G/C με την εκδήλωση της σαρκοείδωσης, διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική αυξημένη συχνότητα του αλληλίου C στην ομάδα των ασθενών σε σχέση με την ομάδα των υγιών.

Αυτό το εύρημα συμφωνεί με την μελέτη των Kretowski A. Et al.⁷⁵ όπου διαπιστώθηκε η ίδια συσχέτιση με την εκδήλωση του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 σε πληθυσμό Ολλανδών.

Επομένως το αλληλίο C του πολυμορφισμού στην θέση -137 της IL-18 αποτελεί πιθανό παράγοντα κινδύνου εκδήλωσης της σαρκοείδωσης στον Ελληνικό πληθυσμό. Λόγω της γενετικής ετερογένειας της σαρκοείδωσης μεταξύ των διαφόρων εθνικοτήτων και της επίδρασης πολλών παραγόντων στην εκδήλωση της νόσου κρίνεται απαραίτητο να γίνουν και άλλες μελέτες στον Ελληνικό πληθυσμό με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών και μαρτύρων ώστε να επιβεβαιωθεί η συσχέτιση

αυτού του πολυμορφισμού με την σαρκοείδωση καθώς και σε άλλες θέσεις του γονιδίου.

Το γονίδιο το οποίο μελετήθηκε σε αρκετούς και διαφορετικούς πληθυσμούς για την συσχέτιση του με την σαρκοείδωση είναι το BTNL2 καθώς και η σύνδεσή του με τα γονίδια στην περιοχή HLA II.

Τα αποτελέσματα διαφέρουν μεταξύ διαφορετικών φυλών και εθνικοτήτων. Η πρώτη συσχέτιση του γονιδίου BTNL2 με την σαρκοείδωση διαπιστώθηκε από την ομάδα των Valentonyte et al.¹⁰⁹ σε πληθυσμό Γερμανών. Συγκεκριμένα ανιχνεύθηκε ο μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός rs2076530 που συσχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης σαρκοείδωσης ανεξάρτητα από τα γονίδια στην περιοχή HLA. Τα αποτελέσματα των μετέπειτα μελετών που δημοσιεύθηκαν για τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό ήταν αντιφατικά.

Στη μελέτη των Rybicki et al.¹⁰⁷ μεταξύ ασθενών λευκής φυλής και Αφροαμερικανούς διαπιστώθηκε συσχέτιση του πολυμορφισμού rs2076530 με την σαρκοείδωση μόνο στους ασθενείς λευκής φυλής. Η αυξημένη συσχέτιση του BTNL2 στους Καυκάσιους επιβεβαιώθηκε και από άλλες μελέτες όπου διαπιστώθηκε η παρουσία του αλληλίου A του πολυμορφισμού rs2076530 σε Γερμανούς σχετίζεται με χρόνια μορφή νόσου. Αντίθετα στην μελέτη των Spagnolo et al.⁹⁴ η συσχέτιση του αλληλίου A του πολυμορφισμού rs2076530 με την σαρκοείδωση σε Βρετανούς και Ολλανδούς εξαφανίστηκε μετά την εξαίρεση των ασθενών με Löfgren και την προσαρμογή στο HLA-DRB1.

Η συσχέτιση του αλληλίου A του πολυμορφισμού rs2076530 του γονιδίου BTNL2 με πολλές άλλες παθήσεις όπως η σκλήρυνση κατά πλάκας, η ελκώδης κολίτις, ο διαβήτης τύπου 1, η ρευματοειδής αρθρίτις, ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, η φυματίωση, νόσος του Grave's, η λέπρα και η νόσος του Grohn's είναι δύσκολη να επιβεβαιωθεί σε αυτήν την περιοχή όπου υπάρχουν πολλά άλλα γονίδια και φαίνεται ότι εξαρτάται από την επίδραση αλληλίων HLA-DRB1. Επομένως απαιτείται κάθε σημαντικό αποτέλεσμα που σχετίζεται με τους απλότυπους του γονιδίου BTNL2 να προσαρμόζεται στα αλληλία της περιοχής HLA-DR.^{96,145}

Στην παρούσα μελέτη όπου εξετάστηκε όλη η αλληλουχία του γονιδίου BTNL2 ανιχνεύθηκαν 24 διαφορετικές μεταλλάξεις σε 102 ασθενείς (69,9%) με σαρκοείδωση και 15 διαφορετικές μεταλλάξεις σε 56 μάρτυρες (62,2%) και στην πλειοψηφία τους στα άτομα και από τις δύο ομάδες μελέτης ανιχνεύθηκαν περισσότερες από μία μεταλλάξεις.

Από τις 24 μεταλλάξεις οι 9 μεταλλάξεις p.D118N, p.A142P, p.G143D, p.T165I, p.E242G, p.S334L, p.G412C, p.A430D, p.G454C διαπιστώθηκαν, από την in silico ανάλυση, ότι ήταν παθολογικές αλλά η συχνότητα εμφάνισή τους μεταξύ των δύο ομάδων μελέτης δεν ήταν στατιστικά σημαντική όπως φαίνεται στον πίνακα 11. Από αυτές τις μεταλλάξεις τέσσερις ανιχνεύτηκαν για πρώτη φορά στην μελέτη μας. Πρόκειται για τις μεταλλάξεις p.A142P, p.E242G, p.G412C, p.A430D οι οποίες δεν έχουν καταχωρηθεί στη διεθνή βάση δεδομένων Ensemble και δεν ανιχνεύθηκαν στην ομάδα των μαρτύρων.

Η συχνότητα εμφάνισης τους για την κάθε μία χωριστά δεν ήταν στατιστικά σημαντική, ενώ στην πλειοψηφία τους σχετίζονταν με ήπια πνευμονική νόσο και καλή ανταπόκριση στην θεραπεία, εκτός της μετάλλαξης p.E242G όπου ο ασθενής που ανιχνεύθηκε η μετάλλαξη έπασχε από πνευμονική σαρκοείδωση σταδίου II και

με υποτροπές, αλλά λόγω του μικρού χρονικού διαστήματος παρακολούθησης δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για τον φαινότυπο αυτής.

Από την μελέτη των κλινικών στοιχείων των ασθενών που ανιχνεύθηκαν οι παθολογικές μεταλλάξεις διαπιστώθηκε ότι 8 ασθενείς έπασχαν από το σύνδρομο Löfgren (21,1%), 5 ασθενείς (13,1%) έπασχαν από πνευμονική ίνωση ή εξελίχθηκαν σε πνευμονική ίνωση, ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό 13 ασθενείς (34,21%) παρουσίαζαν υποτροπές της νόσου και δύσπνοια κατά την διάρκεια της θεραπείας ή κατά την μείωση της δοσολογίας αυτής.

Το δείγμα των ασθενών όμως που ανιχνεύθηκαν αυτές οι μεταλλάξεις είναι μικρό και παράλληλα διαπιστώθηκε συνύπαρξη και άλλων μεταλλάξεων ή πολυμορφισμών οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι κρίνεται απαραίτητη η μελέτη μεγαλύτερου δείγματος Ελλήνων ασθενών για να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για αυτές τις μεταλλάξεις.

Όσον αφορά το μονονουκλεοτιδικό πολυμορφισμό rs2076530 οποίος έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται με την εκδήλωση της σαρκοείδωσης σε Ευρωπαίους, στην παρούσα μελέτη δεν αποδείχθηκε η συγκεκριμένη συσχέτιση στο Ελληνικό πληθυσμό καθώς η συχνότητά του μεταξύ των δύο ομάδων ελέγχου δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0.15$) σύμφωνα με την στατιστική ανάλυση με το double-sided Fisher's test.

Μελετήσαμε τα κλινικά στοιχεία 121 ασθενών με διάρκεια παρακολούθησης 2 ετών και άνω και χωρίστηκαν σε δύο υποομάδες. Στην υποομάδα των 81 ασθενών με μη εμμένουσα πνευμονική νόσο, ανιχνεύθηκε η μετάλλαξη p.S360G(rs2076530) στους 37 ασθενείς (45,7%), ενώ στη ομάδα των 40 ασθενών με εμμένουσα πνευμονική νόσο ανιχνεύθηκε η συγκεκριμένη μετάλλαξη σε 12 ασθενείς (30%). Παρατηρούμε ότι η προαναφερθείσα μετάλλαξη ανιχνεύεται σε μεγαλύτερη συχνότητα στη ομάδα με την μη εμμένουσα πνευμονική νόσο σε σχέση με την ομάδα με χρόνια πνευμονική νόσο, αλλά δεν είναι στατιστικά σημαντική ($p=0.12$) σύμφωνα με το double-sided Fisher's test. Επίσης σε κανέναν ασθενή δεν παρατηρήθηκε προσβολή της καρδιάς ή του δέρματος. Ακόμα διαπιστώθηκε ραγοειδίτιδα σε 5 ασθενείς από τους 49 που φέρουν την μετάλλαξη δηλαδή σε ποσοστό 10%.

Απαιτούνται περισσότερες μελέτες στον Ελληνικό πληθυσμό για να διευκρινισθεί η συσχέτιση της μετάλλαξης rs2076530 με την παθογένεια της νόσου καθώς και με συγκεκριμένους φαινοτύπους αυτής.

Από την στατιστική ανάλυση των υπολοίπων μεταλλάξεων στατιστικά σημαντική ήταν η ανίχνευση της μετάλλαξης p.W94R (rs28362682) μεταξύ των ασθενών και της ομάδας μαρτύρων ($p=0.00058$). Από τους 19 ασθενείς που ανιχνεύθηκε η συγκεκριμένη μετάλλαξη το μεγαλύτερο ποσοστό 18 ασθενείς (94,7%) έπασχε από ήπια πνευμονική νόσο σταδίου 0 ή I, ενώ 6 (31,6%) ασθενείς παρουσίασαν δύσπνοια και υποτροπές και 2 (10,5%) ασθενείς παρουσίαζαν και προσβολή της καρδιάς που αποτελεί σοβαρή μορφή της νόσου. Δεν υπάρχουν μελέτες στη διεθνή βιβλιογραφία που να συσχετίζουν αυτή την μετάλλαξη με την εκδήλωση της σαρκοείδωσης. Λαμβάνοντας υπόψη ότι ανιχνεύθηκαν και άλλες μεταλλάξεις και πολυμορφισμοί στα άτομα που φέρουν τη μετάλλαξη rs28362682 πιθανόν επηρεάζουν και ίσως καθορίζουν την συσχέτισή της με τη σαρκοείδωση καθιστώντας επιβεβλημένη την περαιτέρω διερεύνηση αυτής της συσχέτισης και σε άλλες μελέτες στον Ελληνικό πληθυσμό.

Περίληψη

Η σαρκοείδωση είναι μία πολυσυστηματική κοκκιωματώδης νόσος αγνώστου αιτιολογίας που προσβάλλει κυρίως άτομα ηλικίας 20 έως 40 ετών. Χαρακτηρίζεται από την ενεργοποίηση των Th1 λεμφοκυττάρων με αποτέλεσμα την παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών και τον σχηματισμό μη τυροειδοποιημένου κοκκιώματος στους προσβεβλημένους ιστούς.

Συχνότερα προσβάλλεται ο πνεύμονας και το λεμφικό σύστημα αλλά και οποιοδήποτε άλλο όργανο και παρουσιάζει αυτόματη ύφεση τα δύο πρώτα έτη σε ποσοστό που διαφέρει ανάλογα με το ακτινολογικό στάδιο της νόσου ενώ σε κάποιους ασθενείς εξελίσσεται σε πνευμονική ίνωση ή σε άλλες θανατηφόρες επιπλοκές ανάλογα με το προσβεβλημένο όργανο.

Η διάγνωση βασίζεται στα κλινικοακτινολογικά ευρήματα και στην ιστολογική επιβεβαίωση με την ανεύρεση του μη τυροειδοποιημένου επιθηλιοειδούς κοκκιώματος σε προσβεβλημένο όργανο, καθώς και στον αποκλεισμό άλλων κοκκιωματωδών νοσημάτων.

Η παθογένεια της νόσου δεν είναι σαφώς καθορισμένη, αλλά σύμφωνα με τις τελευταίες βιβλιογραφικές αναφορές, είναι αποτέλεσμα έκθεσης γενετικά ευπαθών ατόμων σε ειδικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες. Πολλά γονίδια έχουν μελετηθεί για την συσχέτισή τους με την σαρκοείδωση.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η συσχέτιση των γονιδίων IL-12B p40 στην θέση +1602A/C(rs3212227), IL-18 στη θέση -137G/C(rs187238) και BTNL2 με την παθογένεια της σαρκοείδωσης. Η ομάδα των ασθενών αποτελούνταν από 146 Έλληνες ασθενείς που έπασχαν από σαρκοείδωση και προήρθαν από την Α' Πανεπιστημιακή Πνευμονολογική κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών και από την 8^η Πνευμονολογική κλινική του Ν.Ν.Θ.Α. «Η Σωτηρία». Η ομάδα ελέγχου αποτελούνταν από 90 υγιή άτομα εθελοντές από το γενικό πληθυσμό.

Από την μελέτη των γονιδίων διαπιστώθηκε ότι ο πολυμορφισμός rs3212227 της IL-12Br40 δεν σχετίζεται με τη παθογένεια της σαρκοείδωσης στον Ελληνικό πληθυσμό, ενώ για τον πολυμορφισμό -137G/C(rs187238) του γονιδίου IL-18 διαπιστώθηκε ότι το αλληλίο C αποτελεί πιθανό παράγοντα κινδύνου εκδήλωσης της σαρκοείδωσης στον Ελληνικό πληθυσμό. Αντίθετα το αλληλίο G ανιχνεύθηκε σε αυξημένη συχνότητα στην ομάδα των μαρτύρων καθιστώντας αυτό το αλληλίο πιθανό προστατευτικό παράγοντα στην εκδήλωση της σαρκοείδωσης.

Από την μελέτη της αλληλουχίας του γονιδίου BTNL2 ανιχνεύθηκαν 24 διαφορετικές μεταλλάξεις σε 102 ασθενείς (69,9%) με σαρκοείδωση και 15 διαφορετικές μεταλλάξεις σε 56 μάρτυρες (62,2%) και στην πλειοψηφία τους στα άτομα και από τις δύο ομάδες μελέτης ανιχνεύθηκαν περισσότερες από μία μεταλλάξεις. Η μετάλλαξη p.W94R (rs28362682) διαπιστώθηκε ότι σχετίζεται με την εκδήλωση ήπιας πνευμονικής νόσου ενώ δεν διαπιστώθηκε ανάλογη συσχέτιση των υπόλοιπων μεταλλάξεων ούτε και του πολυμορφισμού rs2076530 οποίος έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται με την εκδήλωση της σαρκοείδωσης σε άλλους Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς.

Summary

Sarcoidosis is a multisystemic granulomatous disease of unknown etiology that primarily affects adults between the ages 20 and 40 years old. Characterized by the activation of Th1 lymphocytes resulting in the production of inflammatory cytokines and the formation of noncaseating epithelioid cell granulomas in affected tissues.

Frequently affected lung and lymphatic system and any other organ and presents spontaneous remission the first two years at a rate that varies with radiographic stage of the disease and in some patients progressing to pulmonary fibrosis or other fatal complications depending on the affected organ.

The diagnosis of sarcoidosis is established when typical clinical-radiological findings are supported by histologic evidence of epithelioid granulomas of affected organ system and excluded of other granulomatous disease.

The pathogenesis of sarcoidosis is not clearly defined, but according to the latest literature reports is a result of exposure of genetically susceptible individuals to specific environmental factors. Many genes have been studied for their correlation with sarcoidosis.

In the present study we investigated the correlation of genes IL-12B p40 at position +1602 A/C (rs3212227), IL-18 at position -137 G/C (rs187238) and BTNL2 with the pathogenesis of sarcoidosis. The group of patients consisted of 146 Greek patients with sarcoidosis that came from the First Pulmonary Clinic of the University of Athens and the 8TH Pulmonary Clinic Of the "Sotiria" Hospital. The control group consisted of 90 healthy volunteers from the general population.

From the study of genes was found that the rs3212227 polymorphism of IL-12Bp40 is not associated with the pathogenesis of sarcoidosis in the Greek population, while for the polymorphism -137G/C (rs187238) of gene IL-18 was found that the C allele is a potential risk factor of sarcoidosis in Greek population. Unlike the G allele was detected in increased frequency in the control group making this allele likely protective agent in manifestation of sarcoidosis.

From the study of gene sequence BTNL2 were detected 24 different mutations in 102 patients (69.9%) with sarcoidosis and 15 different mutations in 56 controls (62.2%) and the majority of individuals of the two study groups were detected more than one mutation. The mutation p.W94R (rs28362682) was found to be associated with the onset of mild pulmonary disease and not found a similar association of other mutations nor polymorphism rs2076530 which has been shown to be associated with the onset of sarcoidosis in other European populations.

Βιβλιογραφία

1. American Thoracic Society, European Respiratory Society, World Association of sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders. Statement on sarcoidosis. Am J Respir Crit Care Med 1999; 160: 736-755
2. Jennifer J. WU, M.D., and Karin Rashcovsky S, M.D., C.M. Sarcoidosis. American Family Physician 2004;70:312-322
3. Hilario Nunes, Diane Bouvry, Paul Soler and Dominique Valeyre. Review. Sarcoidosis. Orphanet Journal of Rare Diseases 2007, 2:46.
4. U Costabel. Review. Sarcoidosis: clinical update. Eur. Respir. J. 2001; 18: Suppl. 32,56s-68s
5. Devanand Anantham, Sin Jen Ong, Khoon Leong Chuah, Stephanie Fook-Chong, Ann Hsu and Philip Eng . Sarcoidosis in Singapore: Epidemiology, clinical presentation and ethnic differences. Respirology (2007)12,355-360
6. Robert P Baughman, Elyse E Lower, Roland M du Bois. Sarcoidosis. Lancet 2003; 361: 1111-18
7. Adam S. Morgenthau, MD, FCCP; and Michael C. Iannuzzi, MD, MBA, FCCP. Recent Advances in Sarcoidosis. Chest 2011; 139(1):174-182
8. Lee S. Newman, Cecile S. Rose, Eddy A. Bresnitz, Milton D. Rossman, Juliana Barnard, Margaret Frederick, Michael L.Terrin, Steven E. Weinberger, David R. Moller, Geoffrey McLennan, Gary Hunnighake, Louis DePalo, Robert P. Baughman, Michael C. Iannuzzi, Marc A. Judson, Genell L.Knatterud, Bruce W. Thompson, Alvin S. Teirstein, Henry Yeager, Jr., Carol J. Johns, David L. Rabin, Benjamin A. Rybicki, Reuben Cherniack, and the ACCESS Research Group. A Case control Etiology Study of Sarcoidosis. Environmental and Occupational Risk Factors. Am J Respir Crit Care Med Vol 170. pp 1324-1330, 2004
9. Shiv Saidha, MRCPI, Elias S. Sotirchos, MD, Christopher Eckstein, MD . Etiology of Sarcoidosis: Does Infection Play a Role? Yale Journal of Biology and Medicine. 85(2012), pp.133-141
10. Rybicki BA, Iannuzzi MC, Frederick MM, Thompson BW, Rossman MD, Bresnitz EA, Terrin ML, Moller DR, Barnard J, Baughman RP, De Palo L, Hunnighake G, Johns C, Judson MA, Knatterud GL, McLennan G, Newman LS, Rabin DL, Rose C, Teirstein AS, Weinberger SE, Yeager H, Cherniack R; ACCESS Research Group. Familial aggregation of sarcoidosis. A case-control etiologic study of sarcoidosis (ACCESS). Am J Respir Crit Care Med. 2001 Dec 1; 164(11):2085-91
11. H. Nunes, P.Soler, D.Valeyre. Review article. Pulmonary sarcoidosis. Allergy 2005;60:565-582
12. B.A. Rybicki, M.J. Malierik, L.M. Poisson, M.C. Iannuzzi. Sarcoidosis and granuloma genes: a family-based study in African-Americans. Eur Respir J 2004; 24:251-257
13. Jan A. Wiegand, Martin H. Brutsche. Sarcoidosis is a multisystem disorder with variable prognosis – information for treating physicians. SWISS MED WKLY 2006; 136:201-209
14. Michael C. Iannuzzi, MD., Benjamin A. Rybicki, PhD., and Alvin S. Teirstein, M.D. Review Article. Sarcoidosis. N Engl J Med 2007; 357: 2153-65
15. Carlo Agostini, Fausto Adami, and Gianpietro Semenzato. New pathogenetic insights into the sarcoid granuloma Current Opinion in Rheumatology 2000, 12:71-76

16. Marc A. Judson, MD, FCCP; Bruce W. Thompson, PhD; David L. Rabin, MD, MPH; Joanne Steimel, RN, BSN; Genell L. Knatterud, PhD; Daniel T. Lackland, DrPH; Cecile Rose, MD, MPH; Cynthia S. Rand, PhD; Robert P. Baughman, MD, FCCP; Alvin S. Teirstein, MD, FCCP; for the ACCESS Research Group. The Diagnostic Pathway to Sarcoidosis. *Chest* 2003; 123:406-412
17. Pascal Chevalet, MD; Renaud Clément, MD; Olivier Rodat, MD; Anne Moreau, MD; Jean-Marie Brisseau, MD; and Jean-Patrick Clarke, MD. Sarcoidosis Diagnosed in Elderly Subjects. Retrospective Study of 30 Cases. *CHEST* 2004; 126:1423-1430
18. Susan Garwood, MD; Marc A. Judson, MD, FCCP; Gerard Silvestri, MD, FCCP; Rana Hoda, MD; Mostafa Fraig, MD; and Peter Doelken, MD, FCCP. Endobronchial Ultrasound for the Diagnosis of Pulmonary Sarcoidosis. *CHEST* 2007; 132: 1298-1304
19. Hiroshi Ishii, Satoshi Otani, Atsuko Iwata, Hiroaki Oka, Kosaku Komiya, Daisuke Yoshioka, Kazuhiko Hashinaga and Jun-ichi Kadota. Limited Role of Auxilliary Endobronchial Biopsy in the Diagnosis of Japanese Patients with Sarcoidosis. *Tohoku J. Exp. Med.*, 2011, 223, 119-123
20. Skaidrius Miliauskas, Marius Zemaitis, Raimundas Sakalauskas. Reviews. Sarcoidosis-moving to the new standard of diagnosis. *Medicina (Kaunas)* 2010; 46(7):443-6
21. Martin B. von Bartheld, MD; Olaf M. Dekkers, MD, PhD; Artur Szlubowski, MD, PhD; Ralf Eberhardt, MD, PhD; Felix J. Herth, MD, PhD; Johannes C. C. M. in 't Veen, MD, PhD; Ynze P. de Jong, MD; Erik H. F. M. van der Heijden, MD, PhD; Kurt G. Tournoy, MD, PhD; Martin Claussen, MD, PhD; Bernt van den Blink, MD, PhD; Pallav L. Shah, MD, MBBS, FRCP; Zaid Zoumot, MBBS, MRCP; Paul Clementsen, MD, PhD; Celeste Porsbjerg, MD, PhD; Thais Mauad, MD, PhD; Fabiola D. Bernardi, MD, PhD; Erik W. van Zwet, PhD; Klaus F. Rabe, MD, PhD; Jouke T. Annema, MD, PhD. Endosonography vs Conventional Bronchoscopy for the Diagnosis of Sarcoidosis. The GRANULOMA Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2013; 309(23):2457-2464
22. J.T. Annema, M. Veselic and K.F. Rabe. Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration for the diagnosis of sarcoidosis. *Eur Respir J* 2005; 25:405-409
23. S.P. Kantrow, K.C. Meyer, P. Kidd, G. Raghu. The CD4/CD8 ratio in BAL fluid is highly variable in sarcoidosis. *Eur. Respir. J* 1997; 10: 2716-2721
24. Richard H. Winterbauer, MD., F.C.C.P. Joyce Lammert, MD. Mark Selland, MD.; Rae Wu, MD., M.P.H., David Corley, MD. and Steven C. Springmeyer, MD., F.C.C.P. Bronchoalveolar Lavage Cell Populations in the Diagnosis of Sarcoidosis. *Chest* 1993; 104:352-61
25. Elena Bargagli Claudia Maggiorelli Paola Rottoli. Human Chitotriosidase: A Potential New Marker of Sarcoidosis Severity. *Respiration* 2008; 76: 234-238
26. Robert P. Baughman, Daniel A. Culver, and Marc A. Judson. A Concise Review of Pulmonary Sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* Vol 183.pp573-581, 2011
27. Eva Criado, MD . Marcelo Sánchez, MD. José Ramírez, MD, PhD Pedro Arguis, MD. Teresa M. de Caralt, MD, PhD. Rosario J. Perea, MD, PhD. Antonio Xaubet, MD, PhD. Pulmonary Sarcoidosis : Typical and Atypical Manifestations at High-Resolution CT with Pathologic Correlation. *RadioGraphics* 2010; 30:1567-1586
28. Alvin S. Teirstein, MD, FCCP; Josef Machal, MD; Orlandino Almeida, MD; Ping Lu, MD; Maria L. Padilla, MD, FCCP; and Michael C. Iannuzzi, MD, FCCP. Results of 188 Whole-Body Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography Scans in 137 Patients With Sarcoidosis. *Chest* 2007; 132:1949-1953

29. Kyoichi Kaira, MD; Noboru Oriuchi, MD; Yoshimi Otani, MD; Norico Yanagitani, MD; Noriaki Sunaga, MD; Takeshi Hisada, MD; Tamotsu Ishizuka, MD; Keigo Endo, MD; and Masatomo Mori, MD. Diagnostic Usefulness of Fluorine -18-a-Methyltyrosine Positron Emission Tomography in Combination With ¹⁸F-Fluorodeoxyglucose in Sarcoidosis Patients. *Chest* 2007; 131:1019-1027
30. Marc A. Judson, MD, FCCP; Kathryn Hirst, PhD; Sudha K. Iyengar, PhD; Benjamin A. Rybicki, PhD; Laure El Ghormli, MS; Robert P. Baughman, MD, FCCP; James F. Donohue, MD, FCCP; Robert C. Elston, PhD; Mani S. Kavuru, MD, FCCP; David R. Moller, MD; Lee S. Newman, MD; David L. Rabin, MD; Milton D. Rossman, MD; Alvin S. Teirstein, MD, FCCP; and Michael C. Iannuzzi, MD, FCCP; for the SAGA Study Consortium. Comparison of Sarcoidosis phenotypes among affected African-American siblings. *Chest* 2006; 130: 855-862
31. Ingrid H.E. Korenromp, MSc; Cobi J. Heijnen, PhD; Oscar J. M. Vogels, MD, PhD; Jules M. M. Van den Bosch, MD PhD; and Jan C. Grutters, MD, PhD. Characterization of Chronic Fatigue in Patients With Sarcoidosis in Clinical Remission. *Chest* 2011; 140(2):441-447
32. John t. Huggins, MD; Peter Doelken, MD, FCCP; Steven A. Sahn, MD, FCCP; Lydia King, MPH; and Marc A. Judson, MD, FCCP. Pleural Effusions in a Series of 181 Outpatients With Sarcoidosis. *Chest* 2006; 129:1599-1604
33. Vlassis S. Polychronopoulos, MD, FCCP; and Udaya B. S. Prakash, MD, FCCP. Airway Involvement in Sarcoidosis. *Chest* 2009; 136:1371-1380
34. Arnaud Chambellan, MD; Philippe Turbie, MD; Hilario Nunes, MD; Michel Brauner, MD; Jean- Paul Battesti, MD; and Dominique Valeyre, MD. Endoluminal Stenosis of Proximal Bronchi in Sarcoidosis Bronchoscopy, Function and Evolution. *Chest* 2005; 127:472-481
35. Marchell RM, Judson MA. Cutaneous sarcoidosis. *Semin Respir Crit Care Med* 2010 Aug; 31(4):442-51
36. Robert A. Schwartz, MD., M.P.H. and Stephen J. Nervi, MD., Erythema Nodosum: A Sign of Systemic Disease. *Am Fam Physician* 2007; 75:695-700
37. Matteo Bordognon, Paola Rottoli, Carlo Agostini, and Mauro Alaibac. Adaptive Immune Responses in Primary Cutaneous Sarcoidosis. *Clinical and Developmental Immunology*. Volume 2011. Article ID 235142:1-6
38. Michael Sand, Daniel Sand, Christina Thrandorf, Volker Paech, Peter Altmeuyer, and Falk G Bechara. Cutaneous lesions of the nose. *Head Face Med*. 2010;6:7
39. Christopher B. Tan, Sadat Rashid, Dhyan Rajan, Wondwoosen Gebre, Paul Mustacchia. Hepatic sarcoidosis presenting as portal hypertension and liver cirrhosis: Case report and review of the literature. *Case Rep Gastroenterol* 2012; 6:183-189
40. Ayyala US, Padilla ML. Diagnosis and treatment of hepatic sarcoidosis. *Curr Treat Options Gastroenterol*. 2006; 9(6):475-83
41. Hitoshi Yoshiji, Kou Kitagawa, Ryuichi Noguchi, Masahito Uemura, Yasuhide Ikenaka, Yosuke Aihara, Keisuke Nakanishi, Yusaku Shirai, Chie Morioka, Hiroshi Fukui. A histologically proven case of progressive liver sarcoidosis with variceal rupture. *World J Hepatol* 2001 October 27; 3(10):271-274
42. Sami Daldoul, Wissem Triki, Kaouther El Jeri, and Abdeljelil Zaouche. Case report. Unusual presentation of a colonic sarcoidosis. *Case Reports in Medicine*. Volume 2012, Article ID 169760, 4 pages

43. Ramin S. Herati, Joyce M. Koh, and Emmanuel C. Gorospe. Localized hepatosplenic sarcoidosis with an elevated serum CA -125 level. *The Scientific World Journal* (2010)10, 298-300
44. Andrea D. Birnbaum, MD, PhD; Fred S. Oh, MD; Anindita Chakrabarti, MD; Howard H. Tessler, MD; Debra A. Goldstein, MD. Clinical features and diagnostic evaluation of biopsy- proven ocular sarcoidosis. *Arch Ophthalmol*.2011; 129 (4):409-413
45. Rose AS, Tielker MA, Knox KS. Hepatic, ocular, and cutaneous sarcoidosis. *Clin Chest Med*. 2008 Sep; 29(3):509-24, ix
46. Maria Do Socorro Costa Da Silva, MD, and Leonardo Rodrigues Campos. Ocular sarcoidosis. *Mayo Clin Proc*. October 2010; 85(10):876
47. Mihailovic- Vucinic V, Jovanovic D. Pulmonary sarcoidosis. *Clin Chest Med*. 2008 Sep; 29(3):459-73
48. Garcia C, Kumar V, Sharma OP. Pancreatic sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*. 1996 Mar; 13(1):28-32
49. Jan- Peter Smedema, MD, MMed(Int); Gabriel Snoep, MD; Marinus P. G. van Kroonenburgh, MD, PhD; Robert-Jan van Geuns, MD, PhD; Willem R. M. Dassen, PhD; Anton P. Gorgels, MD, PhD; and Harry J. G. M. Crijns, MD, PhD. Cardiac involvement in patients with pulmonary sarcoidosis assessed at two university medical centers in the Netherlands. *Chest* 2005;128:30-35
50. Vishal Sekhri, Shireen Sanal, Lawrence J. Delorenzo, Wilbert S. Aronow, George P. Maguire. Cardiac sarcoidosis: a comprehensive review. *Arch Med Sci* 2011; 7, 4:546-554
51. Nabeel Y. Hamzeh, MD, FCCP; Frederick S. Wamboldt, MD; and Howard D. Weinberger, MD. Management of cardiac sarcoidosis in the United States. *Chest* 2012; 141(1):154-162
52. Simon W Dubrey, Alex Bell, Tarun K Mittal. Sarcoid heart disease. *Postgrad Med J* 2007; 83:618-623
53. Davendra Metha, MD, PhD; Steven A. Lubitz, MD; Zev Frankel, MD; Juan P. Wisnivesky, MD, MPH; Andrew J. Einstein, MD, PhD; Martin Goldman, MD; Josef Machac, MD; and Alvin Teirstein, MD. Cardiac involvement in patients with sarcoidosis. Diagnostic and Prognostic value of outpatient testing. *Chest* 2008; 133:1426-1435
54. Nabeel Hamzeh, MD, FCCP. Sarcoidosis. *Med. Clin. N. Am.* 95(2011)1223-1234
55. Masafumi Uchino, Takeki Nagao, Naoyuki Harada, Iekado Shibata, Shigeharu Hamatani, and Hiroshi Mutou. Neurosarcoidosis without systemic sarcoidosis -Case report - *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* 41, 48-51, 2001
56. Ted M. Burns, MD. Neurosarcoidosis. *Arch. Neurol.* 2003; 60:1166-1168
57. Michael Moravan, BS Benjamin M. Segal, MD. Treatment of CNS sarcoidosis with infliximab and mycophenolate mofetil. *Neurology*. 2009; 72:337-340
58. Ravish Shah, Ganesh Shidham, Anil Agarwal, Alia Albawardi, Tibor Nadasdy. Diagnostic utility of kidney biopsy in patients with sarcoidosis and acute kidney injury. *International Journal of Nephrology and Renovascular Disease* 2011;4; 131-136
59. Unsal A, Basturk T, Koc Y, Sakaci T, Ahbap E, Ozagari A, Arar AS, Akgül C, Sevinc M. Renal sarcoidosis with normal serum vitamin D and refractory hypercalcemia. *Int. Urol. Nephrol.* 2013 Dec; 45(6):1779-83
60. Mitome J, Kawaguchi Y, Arase S, Horino T, Okada H, Osaka N, Hanaoka K, Shimada T, Kawamura T, Hosoya T, Yamaguchi Y, Hano H. A case of renal sarcoidosis: a special

reference to calcium metabolism as a diagnostic and the therapeutic implications. Clin. Exp. Nephrol. 2004 Dec; 8(4):375-9

61. Rudrudee Karnchanasorn, Molly Sarikonda, Saleh Aldasouqi, and Ved V. Gossain. Severe hypercalcemia and acute renal failure: An unusual presentation of sarcoidosis. Case Reports in Medicine .Volume 2010, Article ID 423659, 5 pages

62. A Awasthi, R Nada, P Malhotra, R Goel, K Joshi. Fatal renal failure as the first manifestation of sarcoidosis diagnosed on necropsy in a young man: a case report. J. Clin. Pathol 2004; 57:1101-1103

63. David A. Zisman, M.D., Andrew F. Shorr, M.D., M.P.H., and Joseph P. Lynch, III, M.D. Sarcoidosis involving the musculoskeletal system. Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine, volume 23, number 6,2002:555-570

64. Nadera J. Sweiss, MD., Karen Patterson, MD., Ray Sawaqed, MD., Umair Jabbar, Peter Korsten, MD., Kyle Hogarth, MD.,Robert Wollman, MD.,Joe G.N.Garcia, MD. Timothy B. Niewold, MD., and Robert P. Baughman, MD. Rheumatologic manifestations of sarcoidosis. Semin Respir Crit Care Med. 2010 August; 31(4):463-473

65. Lisa G. Smyth, MD; Roman M. Long, MD; Gerald Lennon,MD. A case of epididymal sarcoidosis. Can.Urol.Assoc.J 2011; 5(5):E90-E91

66. Avinash K Shetty and Abraham Gedalia. Childhood sarcoidosis: A rare but fascinating disorder. Pediatric Rheumatology 2008, 6:16

67. Yuhanisa Ahmad, Nur Shuhaila Shahril, Heselynn Hussein, Mohd Shahrir Mohamed Said. Case review of sarcoidosis resembling Sjogren's syndrome. J Clin Med Res.2010; 2(6):284-288

68. Enrique Diaz- Guzman, MD, Carol Farver, MD, Joseph Parambil, MD, and Daniel A. Culver, DO. Pulmonary hypertension caused by sarcoidosis. Clin Chest Med. 2008 September; 29(3):549-x

69. Catherine A. M.D. and Daniel A. Culver, D.O. Treatment of sarcoidosis. Semin Respir Crit Care Med 2010;31:501-518

70. Anne Pietinalho, MD; Pentti Tukiainen, MD, PhD, FCCP;Tari Haahtela, MD, PhD; Tore Persson, PhD; Olof Selroos, MD, PhD, FCCP; and the Finnish Pulmonary Sarcoidosis Study Group. Oral prednisolone followed by inhaled budesonide in newly diagnosed pulmonary sarcoidosis. A double-blind, placebo-controlled multicenter study. CHEST 1999; 116:424-431

71. Michael C. Iannuzzi, MD, Joseph R. Fontana, MD. Sarcoidosis. Clinical presentation,immunopathogenesis,andtherapeutics. JAMA.2011; 305(4):391-399

72. R.P.Baughman & J.P.Lynch Difficult treatment issues in sarcoidosis. Journal of Internal Medicine 2003; 253:41-45

73. Kelly DM, Greene CM, Meachery G, O' Mahony M, Gallagher PM, Taggart CC, O'Neill SJ, McElvaney NG. Endotoxin up-regulates Interleukin-18: potential role for gram-negative colonization in sarcoidosis. Am J Respir Crit Care Med vol 172. Pp 1299-1307, 2005

74. V Giedraitis, Bing He, Wen-Xin Huang, J Hillert. Cloning and mutation analysis of the human IL-18 promoter: a possible role of polymorphisms in expression regulation. J Neuroimmunol. 112(2001):146-152

75. Adam Kretowski, Katarzyna Mironczuk, Anna Karpinska, Urszula Bojaryn, Maciej Kinalski, Zbigniew Puchalski, and Ida Kinalska. Interleukin-18 Promoter Polymorphisms in Type 1 Diabetes. Diabetes 51:3347- 3349, 2002

76. Kruse S, Kuehr J, Moseler M, Kopp M.V, Kurz T, Deichmann K.A, Foster P.S, Mattes J. Polymorphisms in the IL-18 gene are association with specific sensitization to common allergens and allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2003; 111(1):117-122
77. Nakahira M, Ahn H.J, Park W.R, Gao P, Tomura M, Park C.S, Hamaoka T, Ohta T, Kurimoto M, Fujiwara H. Synergy of IL-12 and IL-18 for INF- γ Gene Expression:IL-12-Induced STAT4 Contributes to INF- γ Promoter Activation by Up-Regulation the Binding Activity of IL-18-Induced Activator Protein 1. *J Immunol*.2002, 168: 1146-1153
78. Takada T, Suzuki E, Morohashi K, Gejyo F. Association of single nucleotide polymorphisms in the IL-18 gene with sarcoidosis in a Japanese population. *Tissue Antigens*. 2002 Jul; 60(1):36-42
79. Janssen R, Grutters JC, Ruven H.J.T., Zanen P, Sato H, Welsh K.I., Du Bois R.M., van den Bosch J.M.M. No association between interleukin-18 gene polymorphisms and haplotypes in Dutch sarcoidosis patients. *Tissue Antigens*. 2004 Jun; 63(6):578-83
80. Zhou Y, Yamaguchi E, Fukui Y, Konno S, Maeda Y, Kimata K, Nishimura M. Enhanced Expression of Interleukin-18 Receptor α Chain by CD4⁺ T-Cells in Sarcoidosis. *Chest* 2005; 128:2497-2503
81. Zhou Y, Yamaguchi E, Hizawa N, Nishimura M.Roles of functional polymorphisms in the interleukin-18 gene promoter in sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*. 2005 Jun; 22(2):105-13
82. Hall A, Glinn EM, Coakley G, Fisher SA, Boki K, Middleton D, Kaklamani E, Moutsopoulos, Loughran TP, Ollier W, Panayi GS, Lanchbury JS. Genetic polymorphism of IL-12 p40 gene in immune-mediated disease. *Genets and Immunity* (2000) 1, 219-224
83. Seegers D, Zwiers A, Strober W, Peña AS, Bouma G. A Taql polymorphism in the 3' UTR of the IL-12 p40 gene correlates with increased IL-12 secretion. *Genes and Immunity* (2002) 3, 419-423
84. Latsi P, Pantelidis P, Vassilakis D, Sato H, Welsh I. K, and Du Bois R.M.Analysis of IL-12p40 subunit gene and INF- γ G5644A polymorphisms in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory Research* 2003, 4:6
85. Huang D, Cancilla MR,and Morahan G. Complete primary structure, chromosomal localization, and definition of polymorphisms of the gene encoding the human interleukin-12 p40 subunit. *Genes and Immunity* (2000)1,515-520
86. Hata M, Sugisaki K, Miyazaki E, Kumamoto T and Tsuda T. Circulating IL12p40 is increased in the patients with sarcoidosis, correlation with clinical markers. *Internal Medicine*. 2007:1387-1393
87. Dubaniewicz A, Jamieson SE, Dubaniewicz- Wybieralska M, Fakiola M, Miller EN,Blackwell M. Association between SLC11A1 (formerly NRAMP1) and the risk of sarcoidosis in Poland. *European J Human Genetics* (2005) 13, 829-834
88. Michael C. Iannuzzi and Benjamin A. Rybicki. Genetics of Sarcoidosis. *Candidate Genes and Genome Scans. Proc Am Thorac Soc* Vol 4. pp 108-116, 2007
89. Nguyen T, Liu XK, Zhang Y, Dong C. BTNL2, a Butyrophilin-Like Molecule That Functions to Inhibit T Cell Activation. *J Immunol*. 2006 Jun 15; 176(12):7354-60
90. Michael C. Iannuzzi .Advances in the genetics of sarcoidosis. *Proc Am Thorac Soc* Vol 4. pp 457-460, 2007
91. Y. Li, S. Pabst, S. Lokhande, C. Grohe & B. Wollnik. Extended genetic analysis of BTNL2 in sarcoidosis. *Tissue Antigens* 2009 Jan; 73(1):59-61

92. Johan Grunewald. Genetics of sarcoidosis. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 2008, 14:434-439
93. M. A. Judson, K. Hirst, S. K. Iyengar, B. A. Rybicki, L.El. Ghormli, R. P. Baughman, J. F. Donohue, R. C. Elston, M. S. Kavuru, D. R. Moller, L. S. Newman, D. L. Rabin, M. D. Rossman, A. S. Teirstein and M. C. Iannuzzi for the SAGA Study Consortium. Comparison of sarcoidosis phenotypes among affected African-American siblings. *CHEST* 2006; 130:855-862
94. P. Spagnolo. H. Sato. J. C. Grutters, E.A.Renzoni, S. E.Marshall, H. J. T. Ruven, A. U. Wells, A. Tzouvelekis, C. H. M. Van Moorsel, J. M.M.van den Bosch, R.M. Du Bois & K.I.Welsh. Analysis of BTNL2 genetic polymorphisms in British and Dutch patients with sarcoidosis. *Tissue Antigens* 70, 219-227, 2007
95. M.C.Iannuzzi, M. J. Maliarik, Laila M. Poisson, and B. A. Rybicki. Sarcoidosis Susceptibility and Resistance HLA-DQB1 Alleles in African Americans. *Am J Respir Crit Care Med* Vol 167. pp 1225-1231, 2003
96. Morais A, Lima B, Peixoto MJ, Alves H, Marques A, Delgado L. BTNL2 gene polymorphism associations with susceptibility and phenotype expression in sarcoidosis. *Respir Med*. 2012 Dec; 106(12):1771-7
97. G. Orozco, P. Eerligh, E. Sanchez, S. Zhernakova, B. O. Roep, M. A. Gonzalez-Gay, M.A. Lopez-Nevot, J. L. Callejas, C. Hidalgo, D. Pascual-Salcedo, A. Balsa, M. F. Gonzalez – Escribano, B. P. C. Koeleman and J. Martin. Analysis of a functional BTNL2 polymorphism in type 1 Diabetes, Rheumatoid Arthritis, and Systemic Lupus Erythematosus. *Human Immunology* 66, 1235-1241 (2005)
98. Mitsunaga S.Hosomichi K, Okudaira Y, Nakaoka H, Kunii N, Suzuki Y, Kuwana M, Sato S, Kaneko Y, Homma Y, kashiwase K, Azuma F, Kulski JK, Inoue I, Inoko H. Exome sequencing indentifies novel rheumatoid arthritis-susceptible variants in the BTNL2. *J Hum Genet*.2013 Jan31 doi:10.1038/jhg.2013.2
99. M. Möller, R. Kwiatkowski, A. Nebel, P. D. van Helden, E. G. Hoal, S. Schreiber. Allelic variation in BTNL2 and susceptibility to tuberculosis in a South African population. *Microbes and Infection* 9 (2007) 522-528
100. H. Sato, P. Spagnolo, L. Silveira, K. I. Welsh, R. M. du Bois, L. S. Newman & L. A. Maier. BTNL2 allele associations with chronic beryllium disease in HLA-DPB1*Glu69-negative individuals. *Tissue Antigens* 2007Dec; 70(6):480-486
101. M. J. Simmonds, J.M. Heward, J. C. Barrett, J. A. Franklyn and S. C. L. Gough. Association of the BTNL2 rs2076530 single nucleotide polymorphism with Grave's disease appears to be secondary to DRB1 exon 2 position β 74. *Clinical Endocrinology* 2006 Oct; 65(4):429-432
102. Traherne JA, Barcellos LF, Sawcer SJ, Compston A, Ramsay PP, Hauser SL, Oksenberg JR, Trowsdale J. Assosiation of the truncating splice site mutation in BTNL2 with multiple sclerosis is secondary to HLA-DRB1*15. *Human Molecular Genetics*, 2006 Jan 1; 15(1): 155-161
103. C. M. Johnson, J. A. Traherne, S. E. Jamieson, M. Tremelling, S. Bingham, M. Parkes, J. M. Blackwell & J. Trowsdale. Analysis of the BTNL2 truncating splice site mutation in tuberculosis, leprosy and Crohn's disease. *Tissue Antigens* 69 (236-241) 2007
104. M. Coudurier, N. Freymond, S. Aissaoui, A. Calender, Y. Pacheco, G. Devouassoux. Homogygous variant rs2076530 of BTNL2 and familial sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasculitis and Diffuse Lung Diseases* 2009; 26; 162-166

105. Meyer T, Lauschke J, Ruppert V, Richter A, Pankuweit S, Maisch B. Isolated cardiac sarcoidosis associated with the expression of a splice variant coding for a truncated BTNL2 protein. *Cardiology* 2008; 109:117-121
106. Li Y, Wollnik B, Pabst S, Lennarz M, Rohmann E, Gillissen A, Vetter H, Grohe C. BTNL2 gene variant and sarcoidosis. *Thorax*.2006 Mar; 61(3):273-4
107. Rybicki BA, Walewski JL, Maliarik MJ, Kian H, Iannuzzi MC; ACCESS Research Group. The BTNL2 gene and sarcoidosis susceptibility in African Americans and Whites. *Am J Hum Genet* .2005 Sep; 77(3):491-9
108. Iannuzzi MC. Genetics of sarcoidosis. *Semin Respir Crit Care Med*. 2007 Feb; 28(1):15-21
109. Valentonyte R, Hampe J, Huse K, Rosenstiel P, Albrecht M, Stenzel A, Nagy M, Gaede KI, Franke A, Haesler R, Koch A, Lengauer T, Seegert D, Reiling N, Ehlers S, Schwinger E, Platzer M, Krawczak M, Muller-Quernheim J, Schürmann M, Schreiber S. Sarcoidosis is associated with a truncating splice site mutation in BTNL2. *Nat Genet*. 2005 Apr; 37(4):357-64
110. John Yeboah, Christopher Lee and Om P. Sharma. Cardiac sarcoidosis: a review 2011. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 2011, 17:308-315
111. Petal A. Wijnen, Christina E. Voorter, Patty J. Nelemans, Johny A. Verschakelen, Otto Bekers, Marjolein Drent. Butyrophilin-like2 in pulmonary sarcoidosis: a factor for susceptibility and progression? *Human Immunology* 72 (2011) 342-347
112. Julian M.W, Shao G, Schlesinger LS, Huang Q, Cosmar DG, Bhatt NY, Culver DA, Baughman RP, Wood KL, Crouser ED. Nicotine treatment improves Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 9 responsiveness in active pulmonary sarcoidosis. *Chest*. 2013 Feb 1; 143(2):461-70
113. Van Veen T, Crusius JB, Schrijver HM, Bouma G, Killestein J, van Winsen L, Salvador Peña A, Polman CH, Uitdehaag BM. Interleukin-12p40 genotype plays a role in the susceptibility to multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2001 Aug; 50(2):275
114. Morahan G, Huang D, Ymer SI, Cancilla MR, Stephen K, Dabadghao P, Werther G, Tait BD, Harrison LC, Colman PG. Linkage disequilibrium of a type 1 diabetes susceptibility locus with a regulatory IL12B allele. *Nat Genet*. 2001 Feb; 27(2):218-21
115. M. Schürmann, P. Reichel, B. Müller-Myhsok, M. Schlaak, J. Müller-Querneim, and E. Schwinger. Results from a Genome-wide search for predisposing genes in sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* Vol 164. pp 840–846, 2001
116. Annegret Fischer, PhD; Michael Nothnagel, PhD; Manfred Schürmann, MD; Joachim Müller-Quernheim, MD; Stefan Schreiber, MD; and Sylvia Hofmann, PhD. A Genome-Wide Linkage analysis in 181 German sarcoidosis families using Clustered biallelic markers. *CHEST* 2010; 138(1):151-157
117. Mark P. Steele and Kevin K. Brown. Genetic predisposition to respiratory diseases: Infiltrative lung diseases. *Respiration*.2007; 74(6):601-608.
118. Design of a case control etiologic study of sarcoidosis (ACCESS). ACCESS Research Group. *J Clin Epidemiol* 1999 Dec; 52(12):1173-1186
119. Rybicki BA, Maliarik MJ, Poisson LM, Sheffer R, Chen KM, Major M, Chase GA, Iannuzzi MC. The major histocompatibility complex gene region and sarcoidosis susceptibility in African Americans. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Feb 1; 167(3):444-9

120. Levin AM, Iannuzzi MC, Montgomery CG, Trudeau S, Datta I, McKeigue P, Fischer A, Nebel A, Rybicki BA. Association of ANXA11 genetic variation with sarcoidosis in African Americans and European Americans. *Genes Immun*. 2013 Jan; 14(1):13-8
121. Mrazek F, Stahelova A, Kriegova E, Fillerova R, Zurkova M, Kolek V, Petrek M. Functional variant ANXA11 R230C: true marker of protection and candidate disease modifier in sarcoidosis. *Genes Immun*. 2011 Sep; 12(6):490-4
122. Adrianto I, Lin CP, Hale JJ, Levin AM, Datta I, Parker R, Adler A, Kelly JA, Kaufman KM, Lessard CJ, Moser KL, Kimberly RP, Harley JB, Iannuzzi MC, Rybicki BA, Montgomery CG. Genome-wide association study of African and European Americans implicates multiple shared and ethnic specific loci in sarcoidosis susceptibility. *PLoS One*. 2012; 7(8):e43907
123. Gazouli M, Koundourakis A, Ikononopoulos J, Gialafos EJ, Rapti A, Gorgoulis VG, Kittas C. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis. 2006 Mar;23(1):23-9. CARD15/NOD2, CD14, and toll-like receptor 4 gene polymorphisms in Greek patients with sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*. 2006 Mar; 23(1):23-9
124. Akçakaya P, Azeroglu B, Even I, Ates O, Turker H, Ongen G, Topal-Sarikaya A. The functional SLC11A1 gene polymorphisms are associated with sarcoidosis in Turkish population. *Mol Biol Rep*. 2012 Apr; 39(4):5009-16
125. Fischer A, Schmid B, Ellinghaus D, Nothnagel M, Gaede KI, Schürmann M, Lipinski S, Rosenstiel P, Zissel G, Höhne K, Petrek M, Kolek V, Pabst S, Grohé C, Grunewald J, Ronninger M, Eklund A, Padyukov L, Gieger C, Wichmann HE, Nebel A, Franke A, Müller-Quernheim J, Hofmann S, Schreiber S. A novel sarcoidosis risk locus for Europeans on chromosome 11q13.1. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012 Nov 1; 186(9):877-85
126. Iliadi A, Makrythanasis P, Tzetis M, Tsiipi M, Traeger-Synodinos J, Ioannou PC, Rapti A, Kanavakis E, Christopoulos TK. Association of TLR4 single-nucleotide polymorphisms and sarcoidosis in Greek patients. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2009 Dec; 13(6):849-53
127. Bombieri C, Belpinati F, Pignatti PF, Luisetti M. Comment on 'CFTR gene mutations in sarcoidosis. *Eur J Hum Genet*. 2003 Aug; 11(8):553-4
128. Makrythanasis P, Tzetis M, Rapti A, Papatheodorou A, Tsiipi M, Kitsiou S, Tsiamouri A, Poulou M, Roussos C, Kanavakis E. Cystic fibrosis conductance regulator, tumor necrosis factor, interferon alpha-10, interferon alpha-17, and interferon gamma genotyping as potential risk markers in pulmonary sarcoidosis pathogenesis in Greek patients. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2010 Aug; 14(4):577-84
129. Schürmann M, Albrecht M, Schwinger E, Stuhmann M. CFTR gene mutations in sarcoidosis. *Eur J Hum Genet*. 2002 Nov; 10(11):729-32
130. Pabst S, Karpushova A, Diaz-Lacava A, Herms S, Walier M, Zimmer S, Cichon S, Nickenig G, Nöthen MM, Wienker TF, Grohé C. VEGF gene haplotypes are associated with sarcoidosis. *Chest*. 2010 Jan; 137(1):156-63
131. Plant BJ, Ghani S, O'Mahony MJ, Morgan L, O'Connor CM, Morgan K, Baugh JA, Donnelly SC. Sarcoidosis and MIF gene polymorphism: a case-control study in an Irish population. *Eur Respir J*. 2007 Feb; 29(2):325-9
132. Sakuyama K, Meguro A, Ota M, Ishihara M, Uemoto R, Ito H, Okada E, Namba K, Kitaichi N, Morimoto S, Kaburaki T, Ando Y, Takenaka S, Yuasa T, Ohno S, Inoko H, Mizuki N. Lack of association between IL10 polymorphisms and sarcoidosis in Japanese patients. *Mol Vis*. 2012; 18:512-8. Epub 2012 Jan 25

- 133.** Kim HS, Choi D, Lim LL, Allada G, Smith JR, Austin CR, Doyle TM, Goodwin KA, Rosenbaum JT, Martin TM. Association of interleukin 23 receptor gene with sarcoidosis. *Dis Markers*. 2011; 31(1):17-24
- 134.** K. Shigehara, N. Shijubo, M. Ohmichi, K. Kamiguchi, R. Takahashi, S. Morita-Ichimura, T. Ohchi, T. Tatsuno, Y. Hiraga, S. Abe & N. Sato. Increased circulating interleukin-12 (IL-12) p40 in pulmonary sarcoidosis. *Clin Exp Immunol* 2003; 132:152-157
- 135.** Kim DS, Jeon YG, Shim TS, Lim CM, Lee SD, Koh Y, Kim WS, Kim WD. The value of interleukin-12 as an activity marker of pulmonary sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*. 2000 Oct; 17(3):271-6
- 136.** Moller DR, Forman JD, Liu MC, Noble PW, Greenlee BM, Vyas P, Holden DA, Forrester JM, Lazarus A, Wysocka M, Trinchieri G, Karp C. Enhanced expression of IL-12 associated with Th1 cytokine profiles in active pulmonary sarcoidosis. *J Immunol*. 1996 Jun 15; 156(12):4952-60
- 137.** R.M. Mrozi, M. Korniluk, A. Stasiak-Barmuta, E. Chyczewska. Increased levels of Interleukin-12 and Interleukin-18 in bronchoalveolar lavage fluid of patients with pulmonary sarcoidosis. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2008, 59, Suppl 6, 507-513
- 138.** Barbarin V, Petrek M, Kolek V, Van Snick J, Huaux F, Lison D. Characterization of p40 and IL-10 in the BALF of patients with pulmonary sarcoidosis. *J Interferon Cytokine Res*. 2003 Aug; 23(8):449-56
- 139.** Shigehara K, Shijubo N, Ohmichi M, Kamiguchi K, Takahashi R, Morita-Ichimura S, Ohchi T, Tatsuno T, Hiraga Y, Abe S, Sato N. Increased circulating interleukin-12 (IL-12) p40 in pulmonary sarcoidosis. *Clin Exp Immunol*. 2003 Apr; 132(1):152-7
- 140.** Shigehara K, Shijubo N, Ohmichi M, Takahashi R, Kon S, Okamura H, Kurimoto M, Hiraga Y, Tatsuno T, Abe S, Sato N. IL-12 and IL-18 are increased and stimulate IFN-gamma production in sarcoid lungs. *J Immunol*. 2001 Jan 1; 166(1):642-9
- 141.** Shigehara K, Shijubo N, Ohmichi M, Yamada G, Takahashi R, Okamura H, Kurimoto M, Hiraga Y, Tatsuno T, Abe S, Sato N. Increased levels of interleukin-18 in patients with pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Nov; 162(5):1979-82
- 142.** Zhou Y, Yamaguchi E, Fukui Y, Konno S, Maeda Y, Kimata K, Nishimura M. Enhanced expression of interleukin-18 receptor alpha chain by CD4+ T-cells in sarcoidosis. *Chest*. 2005 Oct; 128(4):2497-503
- 143.** Liu DH, Yao YT, Cui W, Chen K. Liu DH, Yao YT, Cui W, Chen K. The association between interleukin-18 and pulmonary sarcoidosis: a meta-analysis. *Scand J Clin Lab Invest*. 2010 Oct; 70(6):428-32
- 144.** Zhang PA, Wu JM, Li Y, Yang XS. Association of polymorphisms of interleukin-18 gene promoter region with chronic hepatitis B in Chinese Han population. *World J Gastroenterol*. 2005 Mar 21; 11(11):1594-8
- 145.** Paolo Spagnolo, Johan Grunewald. Recent advances in the genetics of sarcoidosis. *J Med Genet*. 2013 May; 50(5):290-7