



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΓΕΝΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ «ΚΛΙΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ RANKL ΣΤΗΝ
ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗΣ ΙΝΩΣΗΣ

ΣΟΜΠΑΤΖΗ ΕΛΕΝΗ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ

ΜΑΡΤΙΟΣ 2017

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ RANKL ΣΤΗΝ
ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗΣ ΙΝΩΣΗΣ

ΣΟΜΠΑΤΖΗ ΕΛΕΝΗ

A.M.:71407

Επιβλέπων: Αϊδίνης Βασίλης, Ερευνητής Α' στο Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών (ΕΚΕΒΕ) «Αλέξανδρος Φλέμινγκ»

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Αϊδίνης Βασίλης: Ερευνητής Α' στο Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών (ΕΚΕΒΕ) «Αλέξανδρος Φλέμινγκ».

Χρήστος Κρούπης: Επίκουρος Καθηγητής Κλινικής Βιοχημείας - Μοριακής Βιολογίας, Π.Γ.Ν. «Αττικόν», Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Ευρύκλεια Λιανίδου: Καθηγήτρια Αναλυτικής Χημείας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Περίληψη

Η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση (IPF) είναι μια θανατηφόρα ασθένεια, αγνώστου αιτιολογίας. Τα βασικά χαρακτηριστικά της νόσου είναι η αυξημένη εναπόθεση κολλαγόνου στον πνεύμονα, που φυσιολογικά παράγεται ως απόκριση στην επούλωση πληγών. Για την ανάλυση των χαρακτηριστικών της IPF, χρησιμοποιείται το μοντέλο της μπλεομυκίνης στο ζωικό μοντέλο. Πρόκειται για πολύπλοκη ασθένεια στην οποία εμπλέκονται πολλά διαφορετικά βιολογικά μόρια που μπορεί να επηρεάσουν το μηχανισμό και την εξέλιξη της. Πρόσφατα βρέθηκε η έκφραση των γονιδίων RANKL/RANK/OPG σε συγκεκριμένα κύτταρα ιστών ποντικών με πνευμονική ίνωση και ο ρόλος της αναλογίας RANKL/OPG στην ασθένεια.

Ο βασικός ρόλος των μορίων αυτών είναι η ρύθμιση του οστικού μεταβολισμού. Η RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) ελέγχει την αναδόμηση των οστών ρυθμίζοντας την διαφοροποίηση, ωρίμανση και επιβίωση των οστεοκλαστών, των κυττάρων που ευθύνονται για την οστική αποδόμηση. Η RANK είναι γνωστός υποδοχέας σηματοδότησης του RANKL (receptor activator of NF- κ B) και συμμετέχει στο σχηματισμό οστεοκλαστών. Το OPG ως διαλυτός υποδοχέας της RANKL, δρα ως ενδογενής αναστολέας της δεσμεύοντάς την ειδικά και αναστέλλοντας έτσι την αλληλεπίδρασή της με τη RANK.

Σύμφωνα με αυτά τα δεδομένα, επικεντρωθήκαμε στην επαλήθευση της έκφρασης των μορίων αυτών σε ιστούς ποντικών με πνευμονική ίνωση και στη διερεύνηση του ρόλου των γονιδίων RANKL/RANK/OPG στην παθογένεση της ασθένειας. Για αυτό το λόγο προκαλέσαμε IPF σε TghuRANKL και C57/Bl6 ποντίκια με ενδοτραχειακή ένεση μπλεομυκίνης, για να αξιολογήσουμε τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων αυτών και κυρίως να καταλάβουμε αν λειτουργούν θετικά ή αρνητικά στην εξέλιξη της ασθένειας στους δύο γονότυπους.

Συμπεραίνουμε, με βάσει τα πειραματικά αποτελέσματα, πως δεν υπάρχει διαφορά στην παθογένεια της πνευμονικής ίνωσης στους δύο γονοτύπους. Βασικό ρόλο στη δράση του RANKL παίζει η αναλογία RANKL/OPG.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Πνευμονική ίνωση, RANK, RANKL, OPG, TghuRANKL

Abstract

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a fatal disease of unknown etiology. The main features of the disease is the increased collagen deposition in the lung, which is normally produced in response to wound healing. In order to analyse the characteristics of IPF we used the bleomycin induced animal model. This complicated disease involving many different biological pathways that can affect the mechanism and progression . Recently found the expression of RANKL / RANK / OPG in specific tissue cells with pulmonary fibrosis and the role of RANKL / OPG ratio in the disease.

The main role of these molecules is bone metabolism. RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) controls the remodeling of bone, regulating the differentiation, maturation and survival of osteoclasts, which are responsible for bone resorption. RANK known as RANKL signaling receptor (receptor activator of NF- κ B) participates in the formation of osteoclasts. The OPG as a soluble decoy receptor of RANKL, competes with RANK for RANKL binding, thereby blocking RANK activation.

According to these data, we focused on verifying the expression of these molecules in tissues of mice with pulmonary fibrosis and explore the role of genes RANKL / RANK / OPG in the pathogenesis of the disease. For this reason we challenged IPF in TghuRANKL and C57 / Bl6 mice by intratracheal injection of bleomycin, to evaluate the expression levels of these genes and especially to understand if they work positively or negatively in the development of the disease in both genotypes.

In conclusion ,based on the experimental results, there is no difference in the pathogenesis of pulmonary fibrosis in both genotypes. Key role in RANKL action plays the RANKL / OPG ratio.

KEYWORDS: Idiopathic pulmonary fibrosis RANKL, RANK, OPG, TghuRANKL.

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών (ΕΚΕΒΕ) «Αλέξανδρος Φλέμινγκ» στα πλαίσια του Γενικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Διπλώματος Ειδίκευσης «Κλινική Χημεία» του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών, κατά τα ακαδημαϊκά έτη 2014-2016, υπό την επίβλεψη του Δρ. Βασίλη Αϊδίνη, Ερευνητής Α' στο Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών (ΕΚΕΒΕ) «Αλέξανδρος Φλέμινγκ» και της κας Ευρύκλειας Λιανίδου, Καθηγήτριας Αναλυτικής και Κλινικής Χημείας του Τμήματος Χημείας, του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Ολοκληρώνοντας την διπλωματική μου εργασία, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Αϊδίνη, ερευνητή Α' του ΕΚΕΒΕ Φλέμινγκ, που μου έδωσε την ευκαιρία να πραγματοποιήσω τη διπλωματική μου στο εργαστήριο Ανοσολογίας σ' ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα. Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άτομα του εργαστηρίου με τα οποία συνεργάστηκα, για την πολύτιμη βοήθεια τους. Πιο συγκεκριμένα την Ιωάννα Νίνου, διδακτορική φοιτήτρια που με εκπαίδευε, με καθοδηγούσε καθημερινά και μου έλυνε όλες τις απορίες σε ότι αφορά το πειραματικό μέρος της εργασίας μου. Τέλος, τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Μαρκέλλα Ζαννίκου, Χριστιάννα Μαγκριώτη και τη διδακτορική φοιτήτρια Αγγελική Κατσίφα που ήταν πάντα πρόθυμοι να βοηθήσουν και να απαντήσουν σε οποιαδήποτε ερώτηση.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	2
Abstract.....	3
Πρόλογος.....	4

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1. Προσδέτης του ενεργοποιητή του υποδοχέα του πυρηνικού παράγοντα-κΒ (Receptor activator of nuclear Factor-κB ligand RANKL).....	7
--	---

1.1 Η δομή της πρωτεΐνης RANKL.....	8
1.2 Η πρωτεΐνη RANKL και οι υποδοχείς της RANK και OPG.....	10
1.2.1 RANK (Receptor activator of NF-κB).....	10
1.2.2 Οστεοπροτεγερίνη (OPG).....	12
1.3 Κυτταρικό μονοπάτι σηματοδότησης RANKL/RANK/OPG.....	13
1.4 Ο ρόλος των RANKL/RANK/OPG σε φλεγμονώδεις ασθένειες.....	17
1.5 Το μονοπάτι σηματοδότησης RANKL/RANK στον καρκίνο.....	31
1.6 RANKL/RANK/OPG σε ασθένειες του πνεύμονα.....	36

Κεφάλαιο 2. Πνευμονική Ίνωση.....	39
-----------------------------------	----

2.1 Ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση.....	39
2.2 Μηχανισμός.....	45
2.2.1 Ο ρόλος των φλεγμονωδών μυελοδών κυττάρων.....	48
2.2.2 Ο ρόλος των μακροφάγων στην ίνωση.....	49
2.2.3 Μυοϊνοβλάστες.....	51
2.2.4 Ρύθμιση της ίνωσης μέσω φλεγμονωδών μεσολαβητών.....	52
2.2.5 Ο ρόλος του TGF-β στην παθογένεση της IPF.....	55
2.2.5.1 TGF-β στον τραυματισμό του επιθηλίου.....	56
2.2.5.2 TGF-β στο εξωκυττάριο υπόστρωμα.....	57
2.2.6 Χημειοκίνες.....	58
2.3 Πειραματικό μοντέλο πνευμονικής Ίνωσης.....	59
2.3.1 Μπλεομυκίνη.....	60
2.3.3 Μπλεομυκίνη σε ζώικό μοντέλο.....	60
2.3.3 Διαγονιδιακά ποντίκια (TghuRANKL).....	61

Κεφάλαιο 3. Σκοπός της εργασίας.....	64
--------------------------------------	----

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 4. Υλικά-Μέθοδοι	
---------------------------	--

4.1 Εξοπλισμός-Όργανα.....	65
----------------------------	----

4.2 Υλικά.....	66
4.3 Δείγματα.....	68
4.4 Μέθοδοι.....	71
4.4.1 Απομόνωση DNA.....	72
4.4.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	73
4.4.3 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πραγματικού χρόνου (qPCR).....	79
4.4.4 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης 2% σε TBE.....	82
4.4.5 Απομόνωση RNA από ιστούς πνευμόνων ποντικού.....	85
4.4.6 Κατεργασία καθαρισμού του απομονωμένου ολικού RNA.....	86
4.4.7 Μετατροπή του RNA σε cDNA με χρήση του ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης.....	88
4.4.8 Μηχανικός Αναπνευστήρας –Flexivent.....	89
4.4.9 Καταμέτρηση βιώσιμων κυττάρων χρησιμοποιώντας αιματοκυτταρόμετρο.....	92
4.4.10 FACS Staining.....	94
4.4.11 Προσδιορισμός Πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford.....	94
4.4.12 Μέτρηση διαλυτού κολλαγόνου σε BALF.....	95
4.4.13 Χρώση Αιματοξυλίνης-Εωσίνης.....	97
4.4.14 Masson's Trichrome stain.....	98
4.4.15 Modified Ashcroft score.....	102
 Κεφάλαιο 5. Αποτελέσματα	
5.1 Ποσοτικοποίηση έκφρασης γονιδίων RANKL,RANK,OPG σε πρωτογενή καλλιέργεια ινοβλαστών (fibroblasts).....	105
5.2 Εφαρμογή του μοντέλου της μπλεομυκίνης σε C57Bl/6 (Wt) και TghuRANKL ποντίκια.....	106
5.2.1 Εφαρμογή του μοντέλου της μπλεομυκίνης σε C57Bl/6 (Wt) ποντίκια.....	107
5.2.2 Εφαρμογή του μοντέλου της μπλεομυκίνης σε TghuRANKL ποντίκια.....	115
 Κεφάλαιο 6. Συμπεράσματα-Συζήτηση.....	123
 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α'.....	126
 Συντμήσεις	
 Βιβλιογραφία.....	130

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1: Προσδέτης του ενεργοποιητή του υποδοχέα του πυρηνικού παράγοντα-κΒ (Receptor activator of nuclearFactor-kB ligand-RANKL)

Ο RANKL [receptor activator of NF-kB ligand, γνωστός και ως tumor necrosis factor-related activation induced cytokine, (TRANCE) ή osteoprotegerin ligand (OPGL) ή osteoclast differentiation factor (ODF)] αποτελεί μέλος της υπερικογένειας των TNF και ελέγχει την αναδόμηση των οστών ρυθμίζοντας την διαφοροποίηση, ωρίμανση και επιβίωση των οστεοκλαστών, των κυττάρων που ευθύνονται για την οστική αποδόμηση. [14] Η πρωτεΐνη RANKL εκφράζεται από τα δενδριτικά κύτταρα, τα CD4+ T κύτταρα, τους ινοβλάστες [1], τα κύτταρα στρώματος του μυελού των οστών, κύτταρα του ενδοθηλίου και του επιθηλίου, οστεοβλάστες και οστεοκύτταρα. [15] Η έκφραση της εντοπίζεται ιδιαίτερα στους λεμφαδένες, στο θύμο, στους μαστικούς αδένες, στον πνεύμονα και σε χαμηλά επίπεδα στην σπλήνα και στον μυελό των οστών. [32]

Η κυτοκίνη RANKL θεωρείται ουσιαστικός παράγοντας σχηματισμού των οστεοκλαστών όντας υπεύθυνη για τη σύντηξη των προ-οστεοκλαστών σε ώριμους πολυπύρηνους οστεοκλάστες, για την ενεργοποίηση και την επιβίωσή τους, συντελώντας κατά αυτό τον τρόπο στη διαδικασία της οστικής απορρόφησης και της οστικής απώλειας. Η χορήγηση RANKL σε φυσιολογικούς μύς οδήγησε σε αυξημένη οστική απορρόφηση [3], αντίθετα μύς με έλλειψη του RANKL γονιδίου εμφανίζουν οστεοπέτρωση λόγω πλήρους απουσίας οστεοκλαστών και διαταραχών στη λειτουργία των χονδροκυττάρων του επιφυσιακού δίσκου γεγονός που οδηγεί στη δημιουργία βραχύτερων οστών. [11] Διαγονιδιακοί μύες που υπερεκφράζουν το RANKL γονίδιο και κατά συνέπεια υπερεκφράζουν τη διαλυτή μορφή της κυτοκίνης RANKL παρουσιάζουν αυξημένο αριθμό οστεοκλαστών και ελαττωμένη οστική πυκνότητα. [13]

Πέρα από την αναδόμηση των οστών, η πρωτεΐνη RANKL φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στο ανοσοποιητικό σύστημα, καθώς συμμετέχει στην ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων (DCs). [1] Η δράση του RANKL στα DCs αποδεικνύεται in

νίνο, καθώς χορήγηση RANKL σε ποντίκια, είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση των DCs στους επιχώριους λεμφαδένες. [9] Επίσης, έχειδειχθεί ότι η RANKL εκφράζεται σε κερατινοκύτταρα και μεσολαβεί στην UVB ανοσοκαταστολή μέσω των τοπικών δενδριτικών κυττάρων (DCs) του δέρματος. [54]

Επιπλέον, η RANKL πρωτεΐνη βρέθηκε ότι εκφράζεται σε κύτταρα του αρθρικού υμένα και ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα στις αρθρώσεις των ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα συμβάλλοντας εν μέρει, στην οστική καταστροφή.

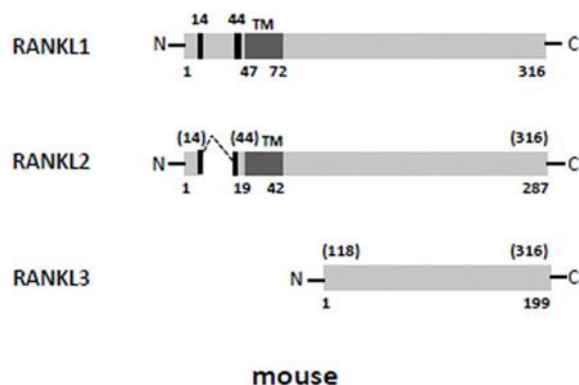
Μελέτες σε ποντίκια έχουν δείξει ότι η RANKL εκφράζεται σε επιθηλιακά κύτταρα του μαστικού αδένα στη διάρκεια της εγκυμοσύνης και απαιτείται κατά τη γαλουχία για την υπερπλασία των μαστικών επιθηλιακών κυττάρων και την παραγωγή γάλακτος. [55,16]

Τέλος, εκφράζεται από ορισμένα κακοήγη κύτταρα όγκου που εκφράζουν επίσης RANK, και έτσι μπορεί να παίζει ρόλο στον πολλαπλασιασμό και την μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων είτε με αυτοκρινή μηχανισμό είτε με παρακρινή τρόπο εάν παράγεται από τα T βοηθητικά κύτταρα. [16]

1.1 Η δομή της πρωτεΐνης RANKL

Η RANKL είναι μια ομοτριμερής διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου II, η οποία παρουσιάζει περίπου 30% ομολογία με τον αποπτωτικό παράγοντα TNF, με τα CD40 και περίπου 20% ομολογία με το συνδέτη Fas. Περιέχει μια C-τερματική περιοχή δέσμευσης υποδοχέα, μία διαμεμβρανική περιοχή και μια σχετικά μακρά ενδοκυτταρική περιοχή. Έχουν αναγνωριστεί 3 ισομορφές του μορίου: α) η RANKL1 είναι η διαμεμβρανική μορφή της πρωτεΐνης που αποτελείται από 317 αμινοξέα με μοριακό βάρος 35.5kDa, β) η RANKL2 είναι επίσης διαμεμβρανική μορφή της πρωτεΐνης από την οποία όμως, λείπει ένα μικρό ενδοκυττάριο τμήμα μήκους 244 αμινοξέων και γ) μία διαλυτή πρωτεΐνη χωρίς κυτταροπλασματική και διαμεμβρανική περιοχή, μήκους 172 αμινοξέων με μοριακό βάρος 27.7 kDa. Η εκκρινόμενη πρωτεΐνη προέρχεται από τη μεμβρανική μορφή της σαν αποτέλεσμα είτε πρωτεολυτικής διάσπασης στη θέση 140 ή 145 είτε εναλλακτικού ματίσματος. [8] Η πρωτεολυτική διάσπαση της RANKL διεξάγεται από μεταλλοπρωτεάσες (MMP3 ή 7) ή μεταλλοπεπτιδάσες της οικογένειας ADAM (ντισιντεγκρίνη και μεταλλοπρωτεάση

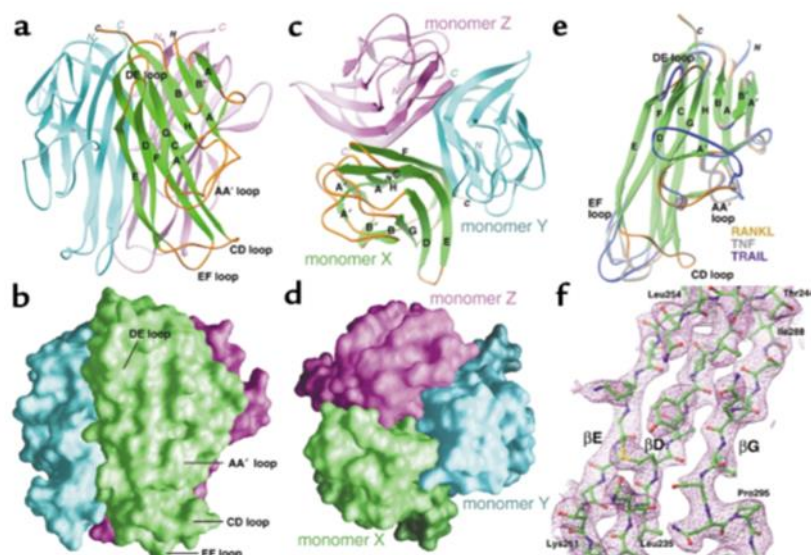
19). [4] Παρόλο που και οι τρεις ισομορφές είναι βιολογικά ενεργές, η διαμεμβρανική πρωτεΐνη είναι η μορφή που απαντάται σε φυσιολογικές καταστάσεις, ενώ η διαλυτή RANKL σηματοδοτεί παθολογικά φαινόμενα.



Σχήμα 1.1: Οι 3 ισομορφές της πρωτεΐνης RANKL που συναντώνται στο ποντίκι. Οι RANKL1 και RANKL2 είναι οι διαμεμβρανικές μορφές της πρωτεΐνης, ενώ η RANKL3 αποτελεί την εκκρινόμενη μορφή της.

Κάθε μόριο RANKL που παράγεται, αλληλεπιδρά αυθόρμητα με άλλα δύο σχηματίζοντας τριμερή τα οποία είναι απαραίτητα για την δραστικότητα του RANKL. Κάθε ένα από τα μονομερή της πρωτεΐνης RANKL, αποτελείται από μια δομή β-σάντουιτς, η οποία περιέχει δύο επίπεδες, αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες. Το πρώτο φύλλο σχηματίζεται από β-επιφάνειες A", A, H, C, και F, ενώ το δεύτερο φύλλο σχηματίζεται από B', B, G, D, και E (Σχ. 1.1 a-d). Εσωτερική είναι η A"AHCF β-επιφάνεια, ενώ η B'BGDE συνεισφέρει στην εξωτερική επιφάνεια. [12]

Το τμήμα της RANKL που βρίσκεται έξω από το κύτταρο αποκτά την χαρακτηριστική διαμόρφωση των μελών της οικογένειας TNF κυτοκινών. Το τριμερές σχηματίζεται έτσι ώστε στην άκρη του β-σάντουιτς κάθε μονομερούς RANKL, τα μέλη E και F διπλώνουν προς την εσωτερική υδρόφοβη πλευρά AHCF της β-πτυχωτής επιφάνειας του γειτονικού μονομερούς (Σχ. 1.1 a,c). Προς το παρόν, δεν υπάρχει καμία απόδειξη ότι η RANKL δημιουργεί ετεροτριμερή με άλλα μέλη της οικογένειας TNF.



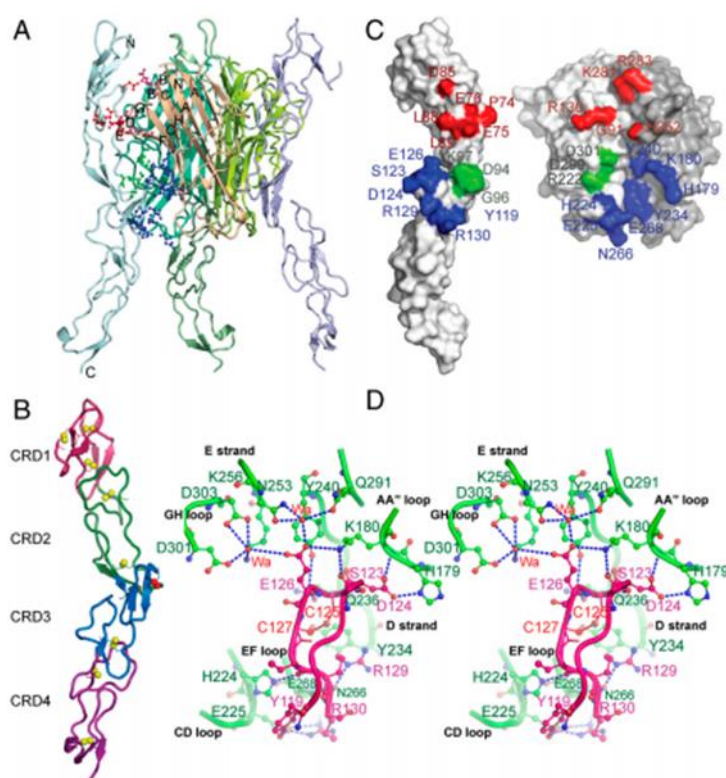
Σχήμα 1.2: Μοριακή απεικόνιση της πρωτεΐνης RANKL.

1.2 Η πρωτεΐνη RANKL και οι υποδοχείς της RANK και OPG

1.2.1 RANK (Receptor activator of NF- κ B)

Ο υποδοχέας RANK είναι μια ομοτριμερής διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου I, της υπερικογένειας των υποδοχέων TNF (γνωστός ως TNFRSF11A, OFE, PDFR, TRANCE-R, ODAR, CD265). Παρουσιάζει υψηλή ομολογία με τα CD40 και αποτελεί τον μόνο γνωστό υποδοχέα σηματοδότησης του RANKL. Ο υποδοχέας RANK στον άνθρωπο αποτελείται από 625 αμινοξέα, με μια αμινοτελική εξωκυττάρια περιοχή, ένα μικρό διαμεμβρανικό τμήμα 21 αμινοξέων και μια μεγάλη κυτταροπλασματική περιοχή των 383 αμινοξέων. [35] Εκφράζεται ευρέως όπως η RANKL, αλλά σε λιγότερους ιστούς για παράδειγμα σε μαστικούς αδένες, σε σκελετικούς μύες και το πάγκρεας. Η έκφραση του αρχικά εντοπίστηκε σε κύτταρα της σειράς μονοκυττάρων/μακροφάγων, συμπεριλαμβανομένου των πρόδρομων οστεοκλαστών, από T και B κύτταρα, δένδριτικά κύτταρα και ινοβλάστες. [34, 35] Η συμμετοχή του υποδοχέα RANK στο σχηματισμό οστεοκλαστών επιβεβαιώθηκε με την δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών με έλλειψη του RANK. [6,16] Διαγονιδιακοί μύς με έλλειψη του RANK γονιδίου (RANK^{-/-}) παρουσιάζουν τον ίδιο φαινότυπο με τους RANKL^{-/-} διαγονιδιακούς μύς, εμφάνιση οστεοπέτρωσης λόγω απουσίας των οστεοκλαστών. Σε αντίθεση με τους RANKL^{-/-} διαγονιδιακούς μύς, η

οστεοπέτρωση στους RANK-/- μυς μπορεί να θεραπευθεί με μεταμόσχευση μυελού των οστών από φυσιολογικούς μυς, γεγονός που αποδεικνύει τη διαταραχή στην οστεοκλαστική παραγωγή. Είναι ενδιαφέρον ότι, τα ποντίκια RANK-/- στερούνταν τους περιφερικούς λεμφαδένες και είχαν ελαττωματική ωρίμανση B και T κυττάρων, αλλά σε αντίθεση με τα RANKL-/- ποντίκια, είχαν φυσιολογική ανάπτυξη του θύμου αδένος καθώς και διαφοροποίηση και λειτουργία των μακροφάγων και των δενδριτικών κυττάρων. Επομένως η απουσία των οστεοκλαστών δεν οφειλόταν σε έλλειψη των προγονικών αδιαφοροποιητών κυττάρων [34], ενώ επιβεβαιώθηκε ότι το σύστημα RANKL/RANK εμπλέκεται στο σχηματισμό των λεμφαδένων και στον έλεγχο της ανάπτυξης του θύμου αδένος.



Σχήμα 1.3: Γενική δομή της σύνδεσης eRANK-eRANKL (A) Ribbon διάγραμμα συμπλόκου eRANK-eRANKL. Τρία μόρια eRANKs (χλωμό κυανό, ανοιχτό πράσινο και γαλάζιο) προσδένονται σε ένα τριμερές eRANKL (ανοιχτό πορτοκαλί, πράσινο κυανό, και ανοιχτό κίτρινο). Τα υπολείμματα που εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση συνδέτη-υποδοχέα, απεικονίζεται ως μοντέλα μπάλα-και-ράβδος, είναι κόκκινο (βρόχος 1), πράσινο (βρόχος 2) και μπλε (βρόχος 3). N και O άκρα και β-κλώνοι eRANKL είναι επισημασμένα. (B) Η δομή του eRANK στο Ribbon διάγραμμα. Τεσσάρα CRD είναι ροζ, πράσινο, θαλασσί, και ματζέντα, και οι συντηρημένα δισουλφιδικοί δεσμοί είναι κίτρινοι, μοντέλα μπάλας και-ράβδου. (C) Παρουσίαση των επιφανειών των δεσμευτικών διεπαφών του μονομερούς eRANK (Αριστερά) και του διμερούς eRANKL (Δεξιά). Τα υπολείμματα eRANK

στους δεσμευτικούς βρόχους είναι κόκκινα (βρόχου 1), πράσινα, (βρόχου 2), και μπλε (βρόχου 3). Αντίστοιχα υπολείμματα RANKL είναι το ίδιο χρώμα του σχήματος. (D) Στερεοχημική παρουσίαση του τρόπου σύνδεσης του βρόχου 3 του RANKL. Τα eRANKL και eRANK είναι πράσινο και ροζ, αντίστοιχα. Τα κατάλοιπα εμπλέκονται στην δέσμευση συνδέτη -υποδοχέα απεικονίζονται και επισημαίνονται ως μοντέλα μπάλα και ραβδί. Μπλε διακεκομμένες γραμμές αντιπροσωπεύουν υδρογόνο ή ιοντικούς δεσμούς. Τα νερά απεικονίζεται ως κίτρινο και κόκκινο στα μοντέλα μπάλα και ραβδί, αντίστοιχα. [17]

1.2.2 Οστεοπροτεγερίνη (OPG)

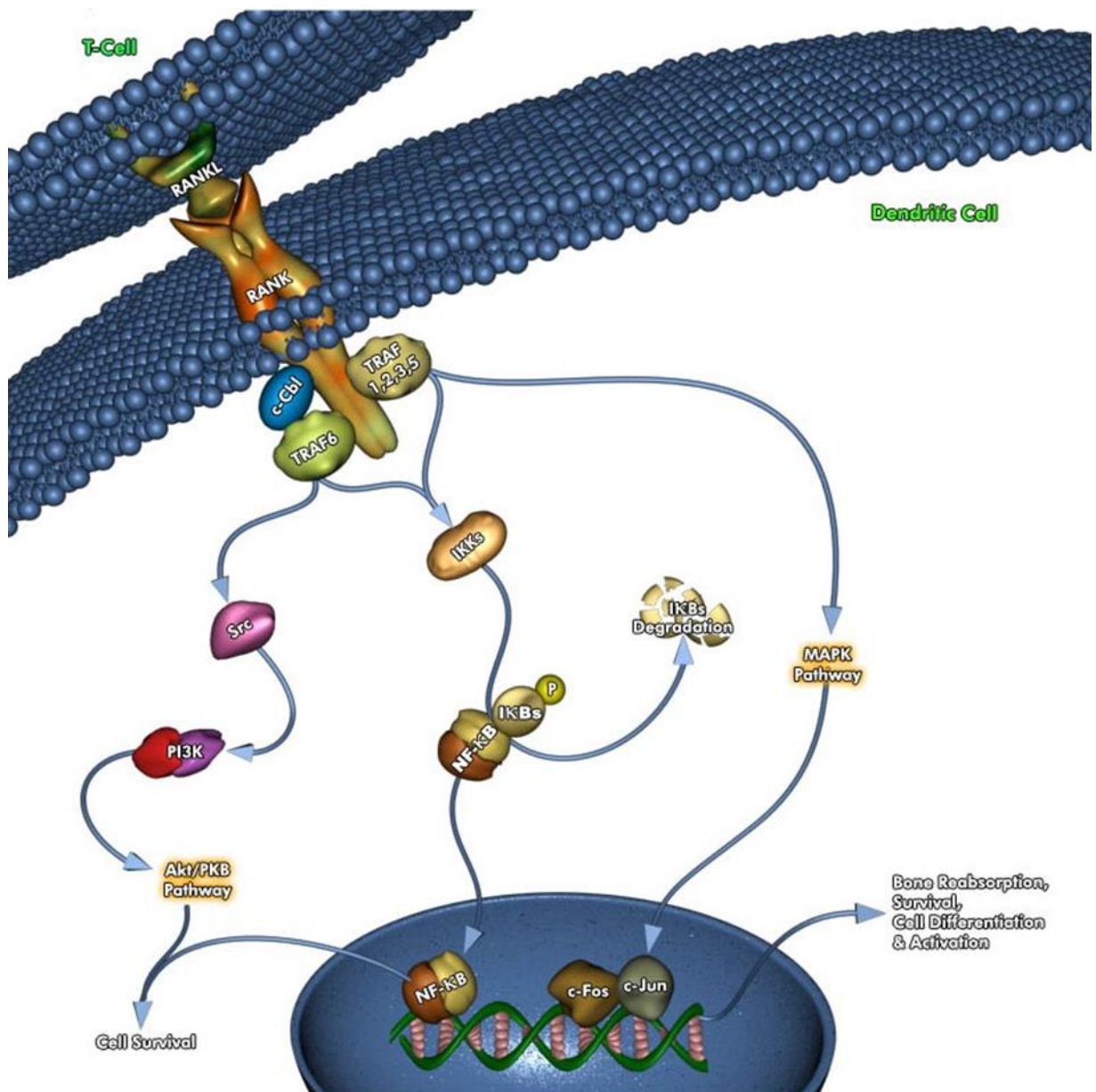
Το σύμπλοκο οστεοπροτεγερίνη (OPG) είναι ένα πεπτίδιο 401 αμινοξέων, τα οποία με μία σηματοδοτική πεπτιδάση αποκόπτονται σε μια ώριμη πρωτεΐνη 380 αμινοξέων με μοριακό βάρος 44kDa. Σε αντίθεση με τα υπόλοιπα μέλη της υπερικογένειας των υποδοχέων TNF, η OPG δεν περιέχει διαμεμβρανική και κυτταροπλασματική περιοχή στο μόριο της αλλά εκκρίνεται ως διαλυτή πρωτεΐνη. Η N-τερματική περιοχή της πρωτεΐνης περιέχει τέσσερις περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνη (D1-D4), οι οποίες είναι υπεύθυνες για την δράση της οστεοπροτεγερίνης να αναστέλλει τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών και τη δραστηριότητά τους. Η C-τερματική περιοχή περιείχε δύο ομόλογες περιοχές των αλληλουχιών νέκρωσης (D5 και D6), καθώς και μια περιοχή (D7) που περιέχει θέση πρόσδεσης ηπαρίνης και θέση κυστεΐνης που είναι απαραίτητα για τον ομοδιμερισμό. Ως υποδοχέας TNF, δρα ως ενδογενής αναστολέας της RANKL δεσμευοντάς την ειδικά και αναστέλλοντας έτσι την αλληλεπίδρασή της με τη RANK. Επιπροσθέτως, το OPG παρουσιάζει χαμηλή συγγένεια σύνδεσης με τον TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand). [15, 53] Το OPG βρέθηκε να εκφράζεται σε έναν μεγάλο αριθμό ιστών, συμπεριλαμβανομένων των πνευμόνων, της καρδιάς, των νεφρών, του ήπατος, του στομάχου, του εντέρου, του εγκεφάλου, του νωτιαίου μυελού, του θυρεοειδούς αδένος και των οστών. Σε κυτταρικό επίπεδο η οστεοπροτεγερίνη εκκρίνεται κυρίως από τους προ-οστεοβλάστες/κύτταρα του στρώματος, ενώ έχει βρεθεί ότι τα Β κύτταρα μπορεί να είναι υπεύθυνα για το 64% της συνολικής παραγωγής OPG από κύτταρα μυελού των οστών. [11] Επίσης, βρέθηκε ότι εκκρίνεται τόσο από τα δένδριτικά κύτταρα όσο και από τα θυλακοειδή δένδριτικά κύτταρα, στα ενδοθηλιακά κύτταρα (ECs), στα λεία μυϊκά κύτταρα της αορτής (VSMCs), στους ινοβλάστες, στα δένδριτικά κύτταρα και στις λεμφικές κυτταρικές σειρές.

1.3 Κυτταρικό μονοπάτι σηματοδότησης RANKL/RANK/OPG

Η RANKL αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα της, RANK, προκαλώντας την ενεργοποίηση των κυτοσολικών πρωτεϊνών της οικογένειας TRAF (Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factors, TRAF1-6), οι οποίες με τη σειρά τους ενεργοποιούν πολλαπλές οδούς σηματοδότησης. Συγκεκριμένα, η ένωση της RANK με την TRAF2 επάγει την ενεργοποίηση τριών σηματοδοτικών μονοπατιών των MAPK κινασών (Mitogen-Activated Protein Kinase): α) το μονοπάτι του NF-κΒ, β) το μονοπάτι των JNK (c-Jun N-τελική κινάση) και γ) το μονοπάτι των ERK (extracellular signal-regulated kinases).

Η ενεργοποίηση της NF-κΒ επαγωγικής κινάσης, οδηγεί στην ενεργοποίηση των IKKS (I-κΒ κινάσες), οι οποίες με τη σειρά τους φωσφορυλιώνουν τα κατάλοιπα σερίνης για I-KappaBs (αναστολέας της ελαφράς αλυσού κ Gene Enhancer σε B-κύτταρα). Η στοχευμένη αποικοδόμηση του πρωτεασώματος I-KappaBs υποβαθμίζει την αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού NF-κΒ, εκθέτοντας την πυρηνική εισαγωγή του. Εντός του πυρήνα, η NF-κΒ επαγωγική κινάση ενεργεί σε συνεννόηση με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες για τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Η RANK κυτταροπλασματική ουρά συνδέεται με c-Src κινάση, η οποία ενεργοποιεί την αντι-αποπτωτική κινάση σερίνης/θρεονίνης Akt/PKB (Protein Kinase-B) μέσω ενός συμπλέγματος σηματοδότησης που περιλαμβάνει c-Src και TRAF6. Επιπλέον, η RANK προσλαμβάνει πρωτεΐνες της οικογένειας c-Cbl και PI3K (κινάσης φωσφατιδυλινοσιτόλης-3) σε ένα σύμπλοκο και με Src-εξαρτώμενο τρόπο. Οι c-Src και TRAF6 αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και με τη RANKL ακόλουθη δέσμευση του υποδοχέα, και με ανεπάρκεια σε c-Src ή η προσθήκη Src αναστολέων της οικογένειας κινάσης μπλοκάρει η ενεργοποίηση Akt/PKB σε οστεοκλάστες με μεσολάβηση της RANK. Η TRAF6 ενισχύει την δραστηριότητα της κινάσης του c-Src που οδηγεί σε φωσφορυλίωση τυροσίνης των κατάντη μορίων σηματοδότησης όπως c-Cbl, NF-κΒ και c-Fos, η οποία είναι ένας σημαντικός μεσολαβητής της διαφοροποίησης οστεοκλαστών

Τέλος, υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός κυτοκινών και ορμονών τα οποία επιδρούν στην στη ρύθμιση παραγωγής των OPG, RANKL και RANK και παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 1.1).



Σχήμα 1.4: Μονοπάτι σηματοδότησης RANKL/RANK

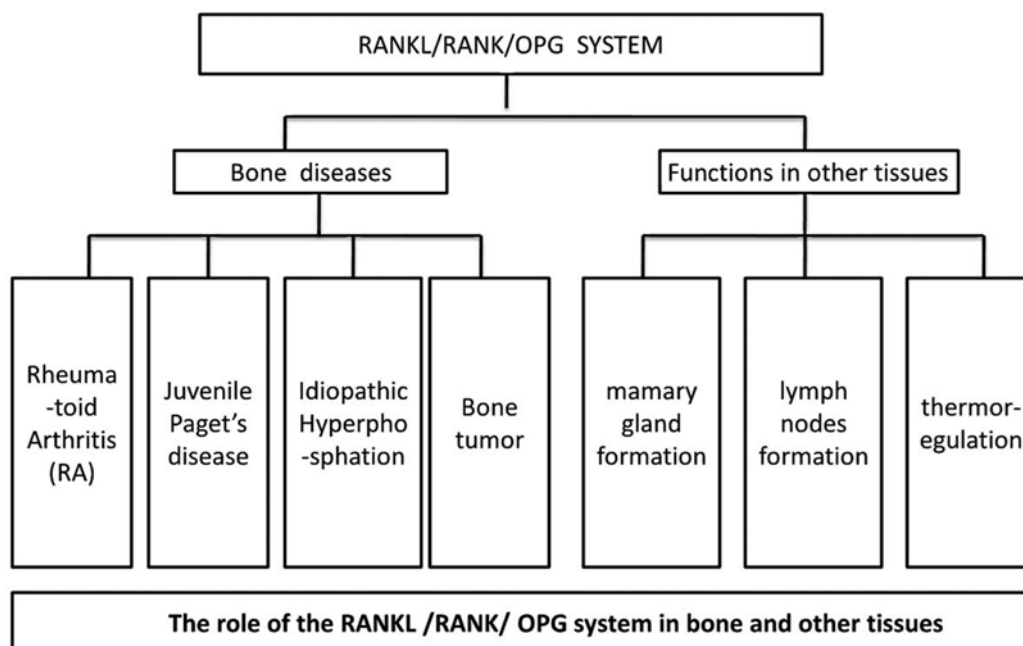
Πίνακας 1.1: Παράγοντες ρύθμισης της έκφρασης των RANKL, RANK, OPG.

[6]

	RANKL	OPG	RANK
Hormones			
Vitamin D3	↑	↑	↑
PTH	↑	↓	
PTHrP	↑		
Estradiol		↑	
Testosterone		↑	
Prolactin	↑	↓	
Cytokines			
TNF α	↑	↑	
IL-1 β	↑	↑	
IL-6	↑	↑	↓
IL-17	↑		
CD40L		↑	
Growth factors			
TGF- β	↓	↑	↓
BMP-2	↑	↑	
Others	↑		
ProstaglandinE2	↑	↓	
LPS	↑	↓	

Glucocorticoid	↑	↓	
----------------	---	---	--

Οι πρωτεΐνες RANKL και RANK όπως αναφέρθηκε και παραπάνω εκφράζονται και σε άλλους ιστούς εκτός από τα οστά, συμπεριλαμβανομένου του πνεύμονα, των νεφρών, του σπλήνα, του θύμου και μαστικών αδένων. Διαταραχές στο μονοπάτι σηματοδότησης RANKL/RANK/OPG εντοπίζονται στη ρευματοειδή αρθρίτιδα, στη νόσο του Paget, στην ιδιοπαθή hyperphosphatasia και στον καρκίνο των οστών. Επιπλέον, οι RANKL και RANK εντοπίζονται στον πλευρικό διαφραγματικό πυρήνα του υποθαλάμου του εγκεφάλου, μια περιοχή που σχετίζεται με τη θερμορύθμιση, υποδηλώνοντας έναν πιθανό ρόλο των RANKL/RANK στη μεσολάβηση της διαδικασίας αυτής. Ορισμένες φυσιολογικές ή παθολογικές λειτουργίες του υποδοχέα RANK και της αναλογίας RANKL/OPG συνοψίζονται στην παρακάτω εικόνα (Σχ. 1.5).



Σχήμα 1.5: Το σύστημα RANKL / RANK / OPG συνδέεται με ασθένειες των οστών και άλλες φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις. [52]

1.4 Ο ρόλος των RANKL/RANK/OPG σε φλεγμονώδεις ασθένειες

Η φλεγμονή έχει αναμφισβήτητα μια σημαντική επίδραση στο μεταβολισμό των οστών που οδηγεί σε αύξηση της απορρόφησης και τον κίνδυνο κατάγματος. Η συσχέτιση μεταξύ οστεοκλαστών, του παράγοντα διέγερσης αποικίας μακροφάγων, προ-φλεγμονωδών κυτοκινών, ειδικά του παράγοντα νέκρωσης όγκων-α και της ιντερλευκίνη-1, μπορεί να εξηγήσει τη σχέση μεταξύ φλεγμονής και οστεοπόρωσης. Αρκετές φλεγμονώδεις ασθένειες έχουν συσχετιστεί με την επαναρρόφηση οστού. Η ρευματοειδής αρθρίτιδα (RA), για παράδειγμα, συνδέεται με την εστιακή διάβρωση του οστού στο περιθώριο της προσβεβλημένης άρθρωσης. Η περιοδοντική νόσος, μια χρόνια φλεγμονή των ούλων, συνδέεται με καταστροφή του φατνιακού οστού της γνάθου. Επιπλέον, η οστεοπόρωση και τα κατάγματα ευθραυστότητας είναι διαδεδομένα στον συστηματικό ερυθματώδη λύκο (SLE), στην ασθένεια φλεγμονώδους εντέρου (IBD), στην πνευμονική αρτηριακή υπέρταση, στην οξεία στεφανιαία νόσο και σε άλλες φλεγμονώδεις νόσους, σε σύγκριση με τον υγιή πληθυσμό. Η κατανόηση της δράσης των λευκοκυττάρων και των κυτοκινών στην οστική μάζα είναι εξαιρετικά σημαντική για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων που επηρεάζουν θετικά τον μεταβολισμό των οστών και μπορεί να αποδειχθεί ισχυρό εργαλείο για τη θεραπεία της οστικής απώλειας που σχετίζεται με φλεγμονώδεις νόσους. Όλες οι ασθένειες που περιλαμβάνουν απώλεια οστού έχουν ένα κοινό μοτίβο: ο οστεοκλάστης είναι η κυτταρική αποκλειστικά υπεύθυνος για την επαναρρόφηση οστού, και η οστεοπόρωση εμφανίζεται όταν η δραστηριότητα των οστεοκλαστών υπερνικά τη δραστηριότητα των οστεοβλαστών. Η φλεγμονή ρυθμίζει την επαναρρόφηση οστού κυρίως μέσω μηχανισμών στους οποίους κεντρικό ρόλο παίζουν οι προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες και αποικίες μακροφάγων (M-CSF).

Ο ρόλος του RANKL στην Οστεοκλαστογένεση

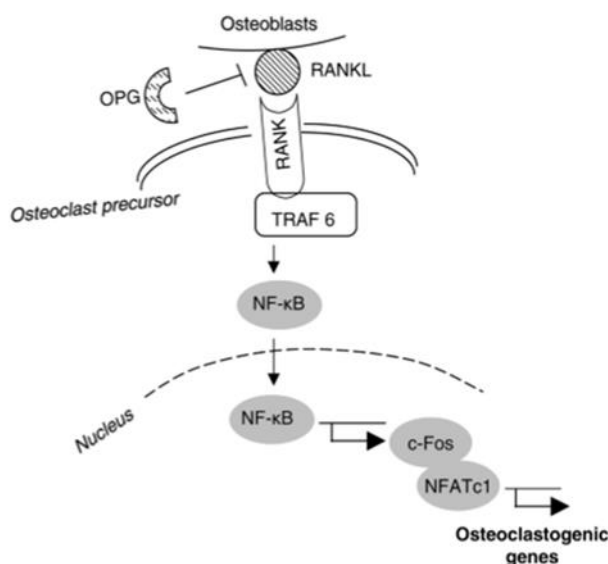
Σύμφωνα με τη διαδικασία της οστικής ανακατασκευής, το οστό συνεχώς απορροφάται σχηματίζοντας ειδικές θέσεις στο σκελετό, που ονομάζονται βασικές πολυκυτταρικές μονάδες. Η διαδικασία ξεκινά από την μετανάστευση των οστεοκλαστών σε αυτές τις περιοχές (ενεργοποίηση), την επαναρρόφηση των οστών από αυτά τα κύτταρα, μία φάση αναστροφής η οποία χαρακτηρίζεται από την απόπτωση των οστεοκλαστών και τέλος μια φάση αντικατάστασης του οστού με το νεοσχηματισμένο από τους οστεοβλάστες. Ως εκ τούτου, είναι λογικό ότι η κρίσιμη

αρχική φάση σε αυτή τη διαδικασία είναι η ανάπτυξη των οστεοκλαστών, η οποία θα πρέπει να είναι υπό τον έλεγχο πρωτεοβλαστών/στρωματικών κυττάρων. Οι διεργασίες αυτές επιτρέπουν για κάθε κύκλο σχηματισμού οστού να ακολουθήσει ο κύκλος της οστικής απορρόφησης, διατηρώντας έτσι την σκελετική ακεραιότητα (Σχ.1.6). [36]

Η έκφραση M-CSF από οστεοβλαστικά στρωματικά κύτταρα είναι απαραίτητη για τη διαφοροποίηση των προγονικών κυττάρων σε οστεοκλάστες, αλλά τα M-CSF από μόνα τους δεν είναι σε θέση να ολοκληρώσουν αυτή τη διαδικασία. Η ολοκλήρωση της διαφοροποίησης των πρόδρομων οστεοκλαστών απαιτεί την έκφραση του RANKL από οστεοβλαστικά στρωματικά κύτταρα και του RANK από πρόδρομα μονοκύτταρα (OCPs). [16] Η OCP διαφοροποίηση ρυθμίζεται από έναν αριθμό παραγόντων μεταγραφής και σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από την αλληλεπίδραση RANK /RANKL. Μετά τη σύνδεση της RANKL με τη RANK, ένα βασικό πρώτο βήμα για το σχηματισμό οστεοκλαστών, ξεκινά η σηματοδότηση προς τα κάτω (downstream) με τη δέσμευση από TRAFs σε συγκεκριμένες θέσεις μέσα στην κυτταροπλασματική περιοχή της RANK. Οι TRAF2, -5 και -6 συνδέονται με RANK, αλλά μόνο η TRAF6 φαίνεται να είναι απαραίτητη στους οστεοκλάστες. Τουλάχιστον επτά οδοί σηματοδότησης ενεργοποιούνται από τη RANK με τη μεσολάβηση πρωτεϊνικής κινάσης. Τέσσερις από αυτές μεσολαβούν άμεσα στην οστεοκλαστογένεση (αναστολέας της NF-κB κινάσης/NF-κB, c-Jun αμινο-τελική κινάση/ενεργοποιητή πρωτεΐνης-1, c-myc, και καλσινευρίνης/πυρηνικού παράγοντα των ενεργοποιημένων T κυττάρων [NFAT] c1) και τρεις μεσολαβούν στην ενεργοποίηση και στην επιβίωση των οστεοκλαστών (src και MKK6/p38/MITF). Με βάση τις μελέτες, NFATc1 έχει περιγραφεί ως κύριος ρυθμιστής του οστεοκλαστογένεσης (Σχ.1.6). Αυτός ο μηχανισμός για τον ενισχυμένο σχηματισμό οστεοκλαστών σε φλεγμονώδη νόσο των οστών μπορεί να αυξηθεί επίσης με TNF, η οποία επάγει όχι μόνο τη c-fms έκφραση με OCPs αλλά επίσης αυξάνει τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση αυτών των κυττάρων, καθώς και την ενίσχυση της εξόδου τους από τον μυελό των οστών στην κυκλοφορία του αίματος, από όπου μπορούν να αποβιβάζονται με αυξημένους αριθμούς σε θέσεις φλεγμονής. [37]

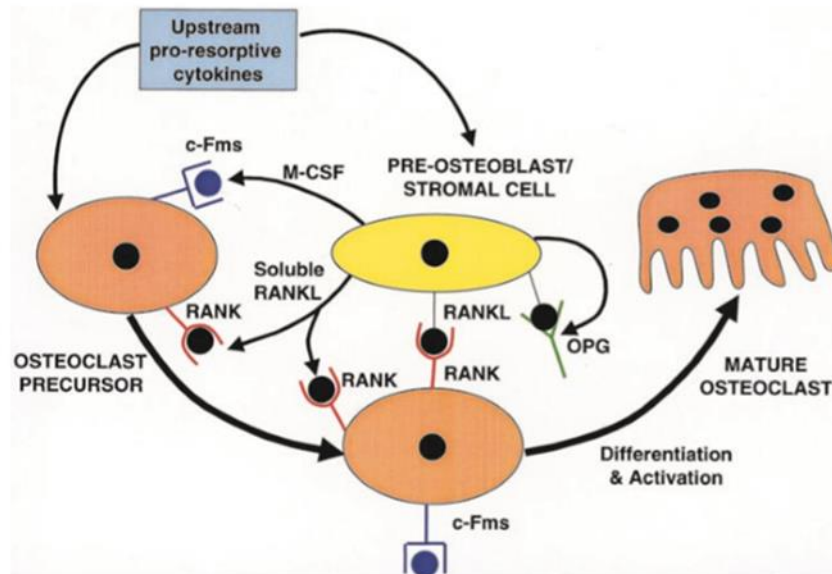
Ωστόσο, η παραγωγή του RANKL από τα κύτταρα T επάγει επίσης την έκφραση της ιντερφερόνης-β (INF-β) από ενεργοποιημένους οστεοκλάστες. Η INF-γ

είναι μια κυτοκίνη που εκκρίνεται κυρίως από ενεργοποιημένα T κύτταρα και NK κύτταρα και αρχικά χαρακτηρίζεται ως ισχυρός ενεργοποιητής μακροφάγων μέσω της έκφρασης MHC τάξης II σε μακροφάγα. Έχει αναφερθεί ότι είναι ένας ισχυρός καταστολέας της οστεοκλαστογένεσης *in vitro* μέσω αναστολής της σηματοδότησης RANKL. Ο μηχανισμός αυτός μπορεί να ενισχυθεί από T κύτταρα που παράγουν ιντερφερόνη- γ (INF γ), η οποία διασπά τον υποδοχέα TNF (TRAF6) (Σχ. 1.6). Ωστόσο, οι επιδράσεις στο σχηματισμό οστεοκλαστών είναι αμφιλεγόμενη. Η INF- γ ενισχύει επίσης την παραγωγή οστεοκλαστών σε καλλιέργειες περιφερικού αίματος από οστεοπετρωτικούς ασθενείς, εν μέρει, από την ομαλοποίηση παραγωγής υπεροξειδίου και έχει αποδειχθεί ότι είναι αποτελεσματική στην θεραπεία της οστεοπόρωσης σε ανθρώπους. [16]



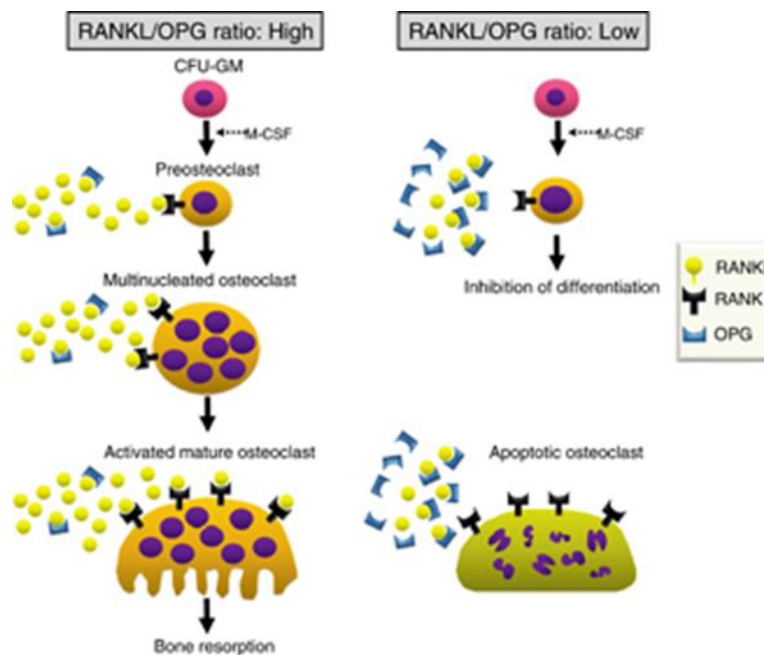
Σχήμα 1.6: Μονοπάτι σηματοδότησης για τη φυσιολογική οστεοκλαστογένεση.
[2]

Η RANKL, που εκφράζεται στην επιφάνεια των πρωτεοβλαστικών/στρωματικών κυττάρων, συνδέεται με τον υποδοχέα RANK στα πρόδρομα οστεοκλαστικά κύτταρα. Τα macrophage-colony stimulating factor (M-CSF), τα οποία συνδέονται με τον υποδοχέα του c-fms, πάνω στα πρωτεοκλαστικά κύτταρα, φαίνεται ότι είναι ο κύριος καθοριστικός παράγοντας για την ανάπτυξη των οστεοκλαστών ανάμεσα στην πληθώρα των προδρόμων κυττάρων. Η RANKL, ωστόσο, είναι κρίσιμης σημασίας για τη διαφοροποίηση, τη σύντηξη σε πολυπύρηννα, την ενεργοποίηση, και την επιβίωση των οστεοκλαστών (Σχ. 1.7). [38]



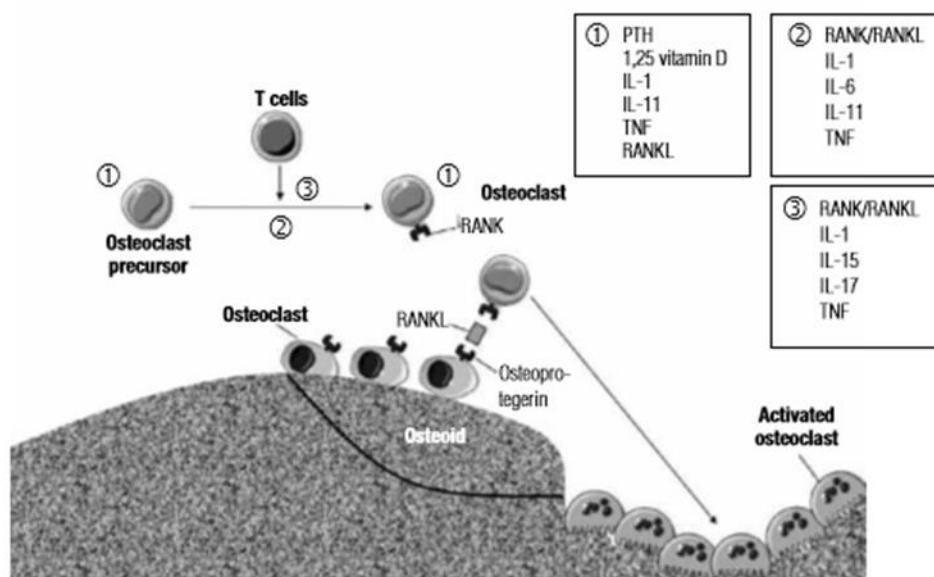
Σχήμα 1.7: Ρύθμιση των προοστεοβλαστών στρωματικών κυττάρων στην οστεοκλαστογένεση. [10]

Όταν η ποσότητα του RANKL που παράγεται στο μικροπεριβάλλον γύρω από τη RANK στους προοστεοκλάστες είναι συντριπτικά μεγαλύτερη σε σχέση με την ποσότητα της OPG (φυσικός ανταγωνιστής RANKL), η RANKL τότε γίνεται διαθέσιμη για να δεσμεύεται με τη RANK που εκφράζεται στους προοστεοκλάστες, η ανατροπή της ισορροπίας των σκελετικών διεργασιών αναδιαμόρφωσης ευνοούν την ενεργοποίηση των σχηματισμό οστεοκλαστών και την οστική απορρόφηση. Από την άλλη πλευρά, στην κατάσταση όπου η αναλογία RANKL πάνω στο OPG είναι χαμηλή, το OPG μεσολαβεί στην αναστολή της σύνδεσης μεταξύ RANKL και RANK μειώνοντας την οστεοκλαστογένεση. Η αναστολή της σύνδεσης RANKL-RANK με OPG προωθεί επίσης την απόπτωση των ενεργοποιημένων ώριμων οστεοκλαστών. Ως εκ τούτου, η σχετική αναλογία του RANKL πάνω στο OPG καθορίζει την ταχύτητα και την ένταση της επαναρρόφησης των οστών που προκαλείται από την οστεοκλαστογένεση (Σχ. 1.8). [27]



Σχήμα 1.8: RANKL στη μεσολάβηση της οστεοκλαστογένεσης. [27]

Συνοπτικά, όλες οι ασθένειες που περιλαμβάνουν απώλεια οστού έχουν ένα κοινό μοτίβο: οι οστεοκλάστες είναι αποκλειστικά υπεύθυνοι για την επαναρρόφηση οστού, και η οστεοπόρωση εμφανίζεται όταν δραστηριότητα των οστεοκλαστών υπερνικά τη δραστηριότητα των οστεοβλαστών. Η φλεγμονή ρυθμίζει την επαναρρόφηση του οστού κυρίως με δύο μηχανισμούς. Πρώτον, οι προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες έχουν μια τελική κοινή μεσολάβηση της λειτουργίας των οστεοκλαστών: ενεργοποιούν τον υποδοχέα του πυρηνικού παράγοντα-B (RANK) και του λειτουργικού συνδέτη αυτού (RANKL), επίσης γνωστός ως TRANCE (TNF που σχετίζεται με την ενεργοποίηση που προκαλείται από κυτοκίνη) (Σχ. 1.9). Δεύτερον, η οστεοκλαστογένεση μπορεί να ρυθμιστεί μέσω της ρύθμισης του παράγοντα διέγερσης αποικιών μακροφάγων (M-CSF). [25]



Σχήμα 1.9: RANKL/RANK/OPG σύστημα και η σύνδεση τους με προφλεγμονώδεις κυτοκίνες. [25]

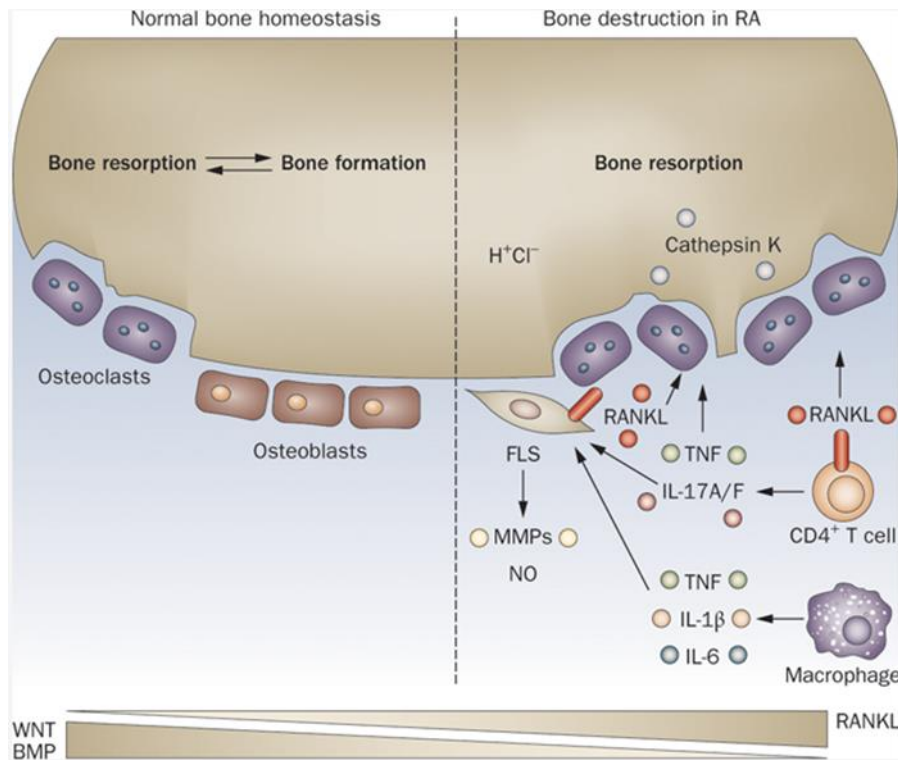
Ρευματοειδής Αρθρίτιδα

Η ρευματοειδής αρθρίτιδα (RA) είναι μια σύνθετη φλεγμονώδης διαταραχή που χαρακτηρίζεται από τουλάχιστον 3 σημαντικά γεγονότα, στενά συνδεδεμένα μεταξύ τους: χρόνια φλεγμονή του αρθρικού υμένα, καταστροφή του χόνδρου και διάβρωση των οστών. [26] "Pannus" είναι ένα αποτέλεσμα της φλεγμονώδους διαδικασίας που εισβάλλει στο αρθρικό χόνδρο, προκαλώντας διαβρώσεις των οστών, περιαρθρική οστεοπόρωση και τέλος, καταστροφή της άρθρωσης.

Η φλεγμονή του αρθρικού υμένα συμβαίνει με την ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των αρθρικών κυττάρων, τα μακροφάγα, λεμφοκύτταρα, κύτταρα πλάσματος και τα δενδριτικά κύτταρα τα οποία διηθούν και νέα αιμοφόρα αγγεία πολλαπλασιάζονται. Τα λεμφοκύτταρα και η αρθρική κυτταρική επέκταση εντοπίζονται πριν από την καταστροφή του οστού που υποδηλώνει ότι αυτά τα κύτταρα είναι υπεύθυνα για τον σχηματισμό και την ενεργοποίηση των οστεοκλαστών και ως εκ τούτου για την οστική απώλεια σε επαφή με τον αρθρικό.

Όπως γνωρίζουμε, τα ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα εκφράζουν RANKL και παράγουν προ-φλεγμονώδεις παράγοντες, IL-1, IL-17, TNF-α και PGs

δημιουργώντας την ανισορροπία του μεταβολισμού των οστών, ευνοώντας την επαναρρόφηση οστού. Υπάρχει άμεση συσχέτιση μεταξύ OPG του ορού, την ταχύτητα καθίζησης ερυθρών και της δραστηριότητας τους σε ασθενείς με RA. Ο ρόλος του TNF στη φλεγμονή των αρθρώσεων, τη διάβρωση του οστού και την καταστροφή του χόνδρου είναι καθοριστικός και μπορεί να εξαρτάται από διαφορές στους μοριακούς μηχανισμούς. Ο TNF είναι ένας ισχυρός επαγωγέας της IL-1, η οποία θεωρείται ότι είναι ένας κρίσιμος μεσολαβητής στην παθογένεση της καταστρεπτικής αρθρίτιδας. Ο TNF δεν μπορεί μόνος του να ενεργοποιήσει την οστεοκλαστογένεση, αλλά μπορεί να προκαλέσει οστεοκλαστογένεση παρουσία μόνο ελάχιστων ποσοτήτων RANKL. Ο αποκλεισμός της RANKL μέσω διαφοροποίησης των οστεοκλαστών και επεξεργασίας με OPG ή με γενετική διαγραφή RANKL έχει αποδειχθεί ότι είναι ισχυρό εργαλείο για το μπλοκάρισμα της αρθριτικής διάβρωσης των οστών χωρίς να επηρεάζει την φλεγμονή των αρθρώσεων (Σχ. 1.10). Τα αποτελέσματα του OPG, και ο αποκλεισμός των αλληλεπιδράσεων RANKL-RANK, μπορεί να είναι πιο πολύπλοκα υπό συνθήκες αποκλεισμού του TNF, καθώς έχει δείχθει ότι ο συνδυασμός OPG και αντι-TNF είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικός στη μείωση αρθρικής φλεγμονής. Έτσι, οι αλληλεπιδράσεις RANKL-RANK που ρυθμίζονται από τον TNF μπορούν επίσης να ασκήσουν κάποιο προφλεγμονώδη ρόλο στον αρθρικό υμένα. Η κυτταρική βάση της διαδικασίας αυτής περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση του RANKL που εκφράζουν τα T κύτταρα και ινοβλάστες με κύτταρα που παράγουν RANK όπως τα μακροφάγα ή δένδριτικά κύτταρα. Ωριμοί οστεοκλάστες, ωστόσο, είναι απίθανο να έχουν σημαντική επίπτωση στην αρθρική φλεγμονή, αφού η διαμεσολάβηση του TNF της αρθρικής φλεγμονής δεν επηρεάζεται από την έλλειψη των οστεοκλαστών. [26]



Σχήμα 1.10: Ομοιόσταση των οστών σε υγιείς και RA-επηρεαζόμενες αρθρώσεις.

Σε κανονικές αρθρώσεις, ο σχηματισμός και η επαναρρόφηση οστού συντηρούνται από την ισορροπία των οστεοβλαστών και οστεοκλαστών. Κάτω από τις φλεγμονώδεις καταστάσεις του RA, δραστηριότητα ενδοδιάθησης μακροφάγων και CD4⁺ T κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα την έκφραση των προφλεγμονωδών κυτοκινών, όπως TNF, που οδηγούν τον σχηματισμό οστεοκλαστών μέσω επαγωγής RANKL στον αρθρικό υμένα. [18]

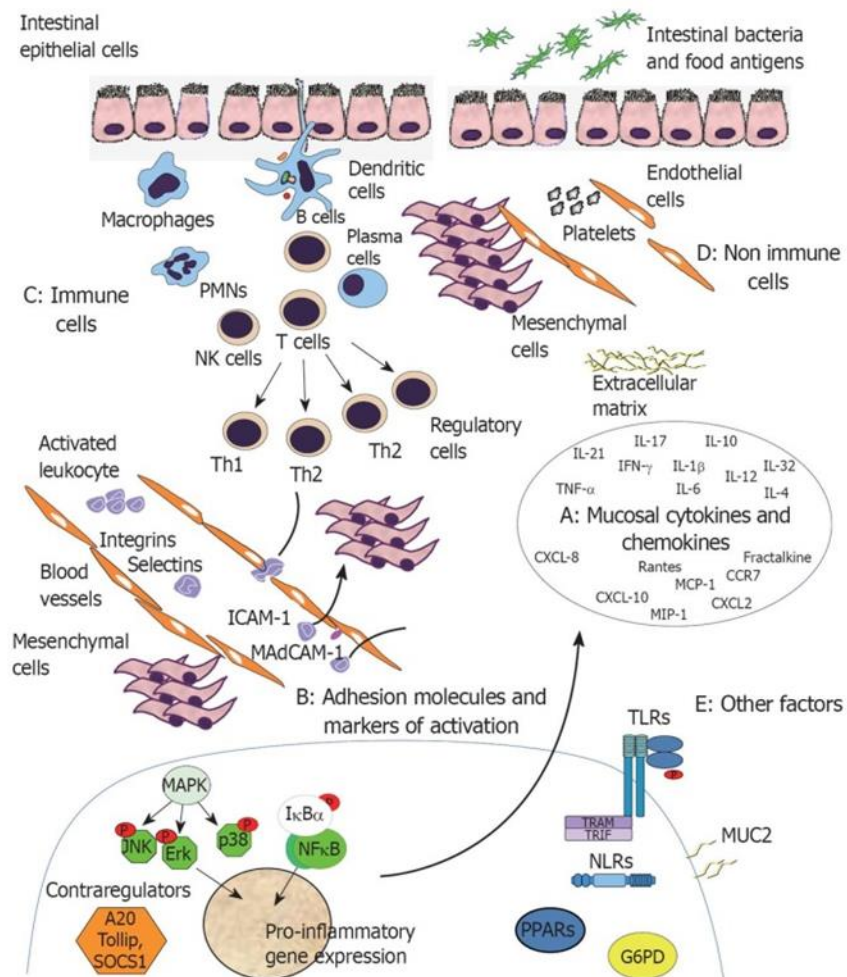
Φλεγμονώδεις παθήσεις του Εντέρου

Στη χρόνια κολίτιδα, τα T κύτταρα σχετίζονται με την ενεργοποίηση των εντερικών και συστηματικών ανοσοαποκρίσεων. Συγκεκριμένα, τα ρυθμιστικά κύτταρα T (TR) CD25⁺CD4⁺, τα οποία έχουν ανιχνευθεί κυρίως σε λεμφοειδή περιοχές συμπεριλαμβανομένου του θύμου αδένου, των λεμφαδένων και του σπλήνα, παίζουν κεντρικό ρόλο στη διατήρηση της ανοσολογικής ομοιόστασης λόγω ικανότητας καταστολής των ανοσολογικών αντιδράσεων. Επιπλέον, τα περιφερειακά CD4⁺CD25⁺ TR κύτταρα μεταναστεύουν στο έντερο και καταστέλλουν την ανάπτυξη της κολίτιδας. Έχειδειχθεί ότι τα CD4⁺CD25⁺ TR κύτταρα, εκφράζουν ένα μέλος της οικογένειας TNF, ο οποίος είναι ο ενεργοποιητής του υποδοχέα του συμπλόκου NF-κΒ (RANKL). Σε πειράματα όπου καταστέλλεται η οδός σηματοδότησης RANKL

/RANK μέσω της χορήγησης αντι-RANKL αντισωμάτων (mAb) παρατηρήθηκε αδυναμία εξάλειψης της εντερικής φλεγμονής πιθανότατα λόγω διατάραξης της ισορροπίας των CD4⁺ κυττάρων και των ρυθμιστικών Τ_α κυττάρων (Tregs) υποδεικνύοντας τον κρίσιμο ρόλο του μονοπατιού σηματοδότησης RANKL/RANK στη λειτουργία των CD4⁺CD25⁺ TR κύτταρων και κατ' επέκταση στην εξασθένηση της κολίτιδας. [21]

Στις φλεγμονώδεις παθήσεις του εντέρου (IBD) σε μοντέλο ποντικών με κολίτιδα και ανεπάρκεια στην IL-2 είναι γνωστό ότι αναπτύσσονται τόσο κολίτιδα, όσο και χαμηλή οστική μάζα. Αντίστοιχα δεν παρουσιάζεται σε αρουραίους με έλλειψη T-κυττάρων, υποδεικνύοντας έτσι τον κεντρικό ρόλο των ενεργοποιημένων T κυττάρων στην οστική απώλεια σε μοντέλα με ασθένεια φλεγμονώδους εντέρου (IBD). Υψηλά επίπεδα των φλεγμονωδών κυτοκινών (TNF-α, IL-1, IL-6, IL-11, IL-17, TGF-α, επιδερμικό αυξητικό παράγοντα, και προσταγλανδίνη E2) ανιχνεύονται στο βλεννογόνο του εντέρου και στο περιφερικό αίμα των IBD ασθενών (Σχ 1.11). Η κύρια κυτοκίνη φαίνεται να είναι η IL-6, η οποία εμφανίζεται σε μια συγκέντρωση στον ορό που συσχετίζεται αρνητικά με την οστική πυκνότητα (BMD).

Η RANKL επίσης διεγείρεται στους ασθενείς με IBD. Τα επίπεδα OPG στο πλάσμα είναι αυξημένα κατά 2,4 φορές στη νόσο του Crohn και 1,9 φορές στην ελκώδη κολίτιδα, πιθανώς αντιπροσωπεύοντας μια απόπειρα απόκριση για την αναστροφή της αύξησης RANKL. [25]



Σχήμα 1.11: Βιοδείκτες βλεννογόνου σε φλεγμονώδη νόσο του εντέρου (IBD).

[19]

Περιοδοντίτιδα

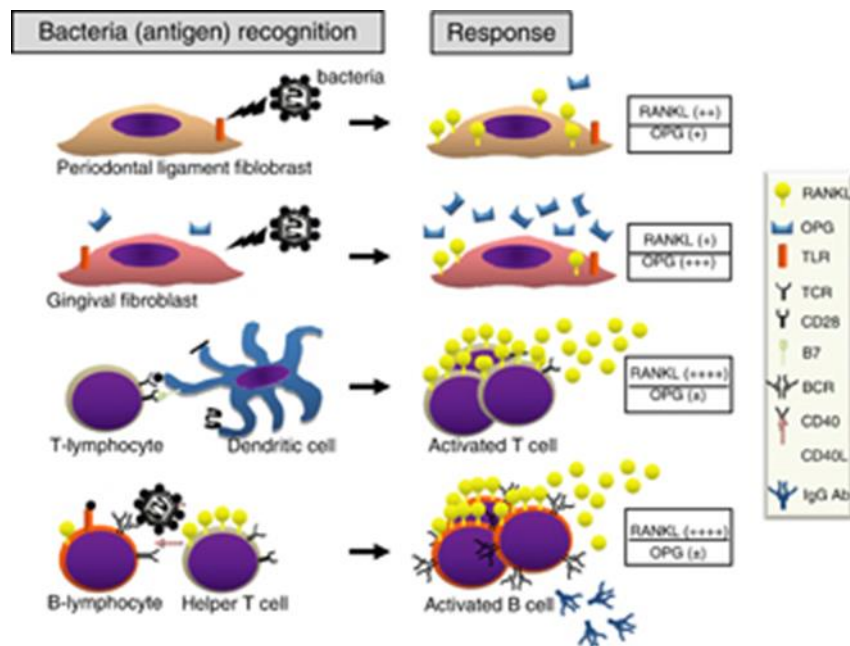
Η περιοδοντίτιδα είναι μια φλεγμονώδης ασθένεια που συνοδεύεται από την καταστροφή των μαλακών ιστών και την επαναρρόφηση οστού στη δομή στηρίξεως του δοντιού. Η αυξημένη απόκριση αντισώματος IgG έρχεται ως απάντηση στην ύπαρξη βακτηρίων που αποικίζουν στην περιοδοντική σχισμή των δοντιών. Ωστόσο, παρά την ανοσολογική απόκριση στα περιοδοντικά βακτήρια τίθεται το ερώτημα εάν είναι προστατευτική ή παθογόνα ως προς την νόσο, καθώς η φλεγμονή ή/και επαναρρόφηση του οστού προωθούν τις αλλοιώσεις της περιοδοντίτιδας,

Ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχει αξιολογήσει τα πρότυπα έκφρασης των φλεγμονωδών κυτοκινών που παράγονται από λευκοκύτταρα, ινοβλάστες και επιθηλιακά κύτταρα των ούλων στο πλαίσιο της περιοδοντικής ανοσοαποκρίσης. Πολλές προφλεγμονώδης κυτοκίνες προσδιορίστηκαν ως μόρια κλειδιά που συμβάλλουν στην καταστροφή των περιοδοντικών ιστών, συμπεριλαμβανομένης της ιντερλευκίνης-1 (IL-1), παράγοντα Νέκρωσης Όγκων-άλφα (TNF-α), ιντερφερόνη-γ (IPN-γ), ιντερλευκίνη-6 (IL-6) και της RANKL. Σε αντίθεση με τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες (IL-1, IFN-γ, TNF-α, και IL-6), οι οποίες παίζουν ρόλους στην επαγωγή και αυξορρύθμιση των φλεγμονωδών αποκρίσεων στην περιοδοντική αλλοίωση, η RANKL ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά ως μια κυτοκίνη που επάγει άμεσα την οστεοκλαστογένεση οδηγώντας σε μία εύλογη εξήγηση για τον υποκείμενο μηχανισμό της οστικής επαναρρόφηση στη περιοδοντίτιδα.

Έχει δειχθεί ότι τα T και B κύτταρα είναι οι βασικοί κυτταρικοί πληθυσμοί που εκφράζουν RANKL. Στην περίπτωση της περιοδοντικής βλάβης οι πληθυσμοί αυτοί κατέχουν εξέχοντα ρόλο. Η αυξημένη έκφραση της RANKL με την ταυτόχρονη έλλειψη παραγωγής της OPG έχει ως αποτέλεσμα την διατάραξη της αναλογίας RANKL/OPG και την επακόλουθη επαναρροφητική αλλοίωση των οστών. Κλινικές μελέτες, επιβεβαιώνουν την αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης RANKL στον ιστό των ούλων, ασθενών με περιοδοντική νόσο σε σχέση με τα υγιή άτομα. Αντίθετα, τα επίπεδα της OPG πρωτεΐνης ήταν χαμηλότερα στα νοσούντα άτομο σε σχέση με τα υγιή.

Οι ινοβλάστες γνωρίζουμε ότι αποτελούν άλλον έναν βασικό κυτταρικό πληθυσμό για την παραγωγή RANKL και OPG. Έχει δειχθεί ότι ινοβλάστες που απομονώθηκαν από σημεία περιοδοντικής βλάβης δεν εκκρίνουν την διαλυτή μορφή

της RANKL άλλα εκφράζουν στην μεμβράνη τους RANKL. Με την ταυτόχρονη παραγωγή OPG από τα κύτταρα αυτά, αναστέλλεται ο σχηματισμός οστεοκλαστών. Τέλος, η IL-1 και ο TNF-α που εντοπίζονται στη φλεγμονή των ούλων είναι γνωστό ότι επάγουν την έκφραση RANKL από οστεοβλαστοκύτταρα. [22]



Σχήμα 1.12: Επιδράσεις των βακτηρίων για την παραγωγή του RANKL και OPG. [27]

Πνευμονική Αρτηριακή Υπέρταση και Οξεία Στεφανιαία Νόσος

Ο ανώμαλος πολλαπλασιασμός και η μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων της πνευμονικής αρτηρίας (PA-SMCs) διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην παθογένεση της πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης (PAH). Η συμμετοχή πολλών μονοπατιών κυτταρικής σηματοδότησης απαιτείται για την παραγωγή της απορρύθμισης του πολλαπλασιασμού PA-SMC και τη μετανάστευση σε PAH.

Τα επίπεδα αρκετών φλεγμονωδών μεσολαβητών, συμπεριλαμβανομένης της ιντερλευκίνης IL-1 και IL-6, είναι αυξημένα σε ασθενείς με πνευμονική υπέρταση. Αυτές οι παρατηρήσεις υποδηλώνουν ότι φλεγμονώδεις κυτοκίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στον υποκείμενο μηχανισμό της ανάπτυξης PAH.

Υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις ότι το OPG μπορεί να παίζει ένα σημαντικό ρόλο, καθώς οι συγκεντρώσεις OPG αυξάνονται σε IPAH στον ορό και στον πνεύμονα του ασθενούς και ότι η πρωτεΐνη OPG εντοπίζεται σε πνευμονικές αγγειακές αλλοιώσεις. Αυτό υποστηρίζεται από περαιτέρω μελέτες για PA-SMCs που αναπτύχθηκαν σε καλλιέργεια. Επίσης η σηματοδότηση BMP-R2, 5-HT, και τα φλεγμονώδη μονοπάτια σηματοδότησης, τα οποία έχουν εμπλακεί σε PAH παθογένεση, είναι σημαντικοί ρυθμιστές της έκφρασης και έκκρισης OPG σε PA-SMCs. Επιπλέον, η ανασυνδυασμένη OPG επάγει ένα παρόμοιο φαινότυπο με την SMC μιτογόνο PDGF από την άποψη τόσο του πολλαπλασιασμού όσο και τη μετανάστευση των PA-SMCs. Μέχρι σήμερα, ο ρόλος του RANKL δεν έχει διερευνηθεί στην PAH. Αντίστοιχα σε εξέλιξη βρίσκονται οι μελέτες σχετικά με το ρόλο του TRAIL και RANKL στην PAH και κατά πόσον TRAIL ή / και RANKL, είτε με δική τους ή μέσω αλληλεπίδρασης με OPG μεσολαβούν την βιολογική δραστηριότητα και την αντιμετώπιση αυτού του μορίου. [23]

Ακόμη, έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα OPG στον ορό ασθενών με στεφανιαία νόσο και έχει αποδειχθεί ως προβλεπτικός παράγοντας στην καρδιαγγειακή θνησιμότητα σε ηλικιωμένες γυναίκες. Συμμετέχει στην αγγειακή νόσο καθώς φαίνεται ότι τα OPG knockout ποντίκια εμφανίζουν αυξημένη αγγειακή ασβεστοποίηση, και επιπροσθέτως, το OPG έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλει στην εξέλιξη της πλάκας σε αθηροσκληρωτικό ApoE ^{-/-} μοντέλο ποντικού. Πολυάριθμες

φλεγμονώδεις μεσολαβητές φαίνεται να παίζουν ένα παθογόνο ρόλο σε νόσο στεφανιαίας αρτηρίας (CAD), στην προώθηση της αθηρογένεσης και στην αποσταθεροποίηση της πλάκας, που οδηγεί στο σχηματισμό θρόμβου με την ανάπτυξη του οξέος στεφανιαίου συνδρόμου. Η OPG έκφραση έχει επιδειχθεί σε διαφορετικούς τύπους αγγειακών κυττάρων, και στα δύο στεφανιαία SMCs και ενδοθηλιακά κύτταρα έχουν ενοχοποιηθεί ως κυτταρικές πηγές της παραγωγής OPG. Επίσης έχει δειχθεί ότι διαλυτή RANKL προκαλείται από MMP δραστηριότητα στο αγγειακό SMC. Επιπλέον, λαμβάνοντας υπόψη ότι η OPG εξουδετερώνει τη δράση RANKL αναστέλλοντας τη σύνδεση RANKL με τη RANK, βρέθηκε ότι OPG, τουλάχιστον σύμφωνα με χαμηλότερες αναλογίες OPG/RANKL, ενισχύει την επαγωγική δράση MMP της RANKL. Παρ' όλα αυτά, τα δεδομένα υποδηλώνουν ένα δυναμικό για την ενίσχυση της RANKL από OPG και προκαλούν την εντύπωση ότι τα υψηλά επίπεδα OPG εντός της αθηροσκληρωτικής βλάβης μπορεί να λειτουργούν μόνο προστατευτικά. [24] Πρόσφατες εκθέσεις έδειξαν μια αύξηση στην έκφραση RANKL από T κύτταρα κατά τη διάρκεια της αθηροσκλήρωσης και προτείνει μια σύνδεση με την αποσταθεροποίηση της πλάκας. Μια προηγούμενη μελέτη έδειξε την έκφραση RANKL και OPG σε μη νοσούντα άτομα και στις αρχές της αθηροσκλήρωσης. Είναι ενδιαφέρον ότι στα ασβεστοποιημένα τμήματα των προχωρημένων αθηρωματικών βλαβών, το OPG εκφράστηκε μέσα στα αποθέματα ασβεστίου στις περιοχές αυτές με το RANKL στις περιοχές γύρω από αυτές. [23]

1.5 Το μονοπάτι σηματοδότησης RANKL/RANK στον καρκίνο

Τα προϊόντα της οστεοκλαστικής επαναρρόφησης οστού, σε συνδυασμό με την ύπαρξη αυξητικών παραγόντων όπως TGF- β , ινσουλίνη με αυξητικό παράγοντα I (IGF-I) και τα υψηλά επίπεδα ασβεστίου, αυξάνουν τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων και διεγείρουν την περαιτέρω παραγωγή οστεολυτικών και οστεοβλαστικών παραγόντων.

Οι οστεοκλάστες μπορεί έμμεσα να παράγουν προογκογονικούς παράγοντες για παράδειγμα αυξητικούς παράγοντες, ιντερλευκίνη 1 (IL-1), TNF, IL-6, IGF- I ή αγγειογενετικούς παράγοντες (VEGFa, VEGFc, bFGF) και την παραγωγή των μεταλλοπρωτεϊνών (MMP-7, MMP-9, MMP-14), συμβάλλοντας στη δημιουργία σκελετικών όγκων και στην εξέλιξη τους. Πολλοί άλλοι όγκοι, συμπεριλαμβανομένου του προστάτη, του πνεύμονα, των νεφρών, το μελάνωμα, και του θυρεοειδούς, έχουν υψηλή τάση για μετάσταση στα οστά, καθώς το μικροπεριβάλλον των οστών μπορεί να αποτελέσει γόνιμη μεταστατική θέση ικανή να συντηρεί τον αποικισμό του όγκου και την ενεργό προώθηση της ανάπτυξης των σκελετικών όγκων. [29]

Μονοπάτι RANKL/RANK/OPG στον καρκίνο των οστών και στη μετάσταση

Στις παθολογικές διαδικασίες (καταστροφή των οστών, μεταστατική εγκατάσταση και εξέλιξη του όγκου), ο όγκος συνδέεται με την ανατροπή της ισορροπίας 2 βασικών παραγόντων που κανονικά συμμετέχουν στο φυσιολογικό σχηματισμό οστεοκλαστών και στην οστική αναδιαμόρφωση. Ο καρκίνος που επάγεται από τα σήματα που είναι ικανά να αλλοιώσουν την κανονική καλά ισορροπημένη αναλογία RANKL/OPG μπορεί να διαφέρουν, αντανakλώντας έτσι τις διαφορετικές πηγές RANKL και OPG, την ποικιλία των τύπων όγκων που επηρεάζουν τα οστά, και την ετερογένεια των επιμέρους τύπων όγκου. Το πιο σημαντικό, από αυτά τα ποικίλα σήματα και τους μηχανισμούς που ανεβάζουν την οστεοκλαστογένεση και την καταστροφή των οστών σχετίζεται με την οδό RANKL.

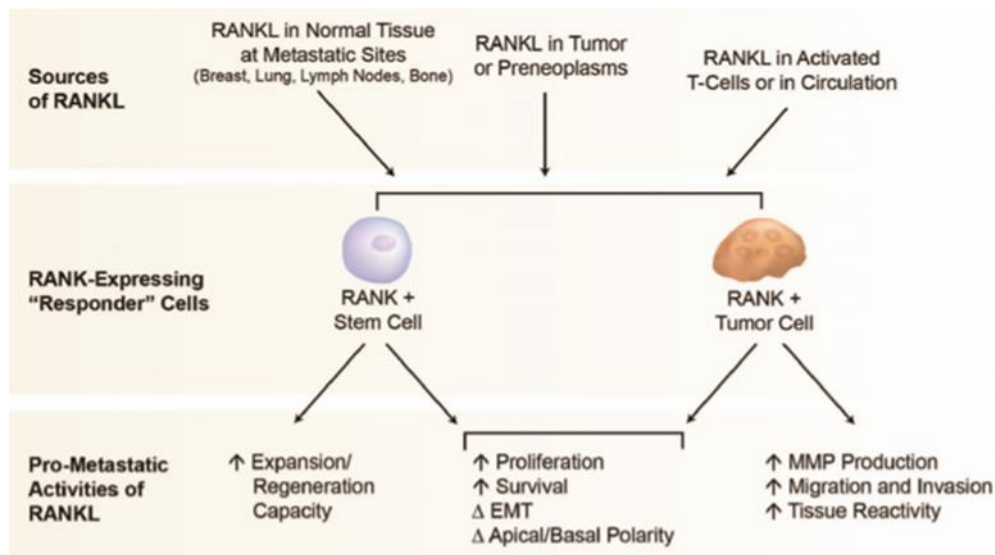
Πολλές διαφορετικές κυτοκίνες ή παράγοντες που παράγονται από τους σκελετικούς όγκους [π.χ., IL-1b, IL-6, IL-8, IL-11, IL-17, φλεγμονώδη πρωτεΐνη 1a

μακροφάγων, TNF α , πρωτεΐνη παραθυρεοειδούς ορμόνη απελευθέρωσης (PTHrP), προσταγλανδίνη E (PGE2)] προκαλούν αυξημένη παραγωγή RANKL από στρωματικά κύτταρα στο μικροπεριβάλλον των οστών συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων της γενεαλογίας των οστεοβλαστών. Αντίθετα, μειωμένη σύνθεση ή ενεργή αποικοδόμηση του OPG στο οστό παρατηρείται ως συνέπεια των παραγόντων που προέρχονται από όγκους.

Ορισμένοι παράγοντες σε μεταστατικό καρκίνο έχουν διπλά αποτελέσματα στη δραστηριότητα των οστεοκλαστών και στην αναλογία RANKL/OPG. Για παράδειγμα, PTHrP, IL-1, και PGE2 έχουν δείχθει ότι δρουν επί του στρώματος των οστών και διεγείρουν την οστεοκλαστική δραστηριότητα με την αύξηση και τη μείωση RANKL, OPG ταυτόχρονα. [29]

Άμεσος φαίνεται να είναι ο ρόλος του μονοπατιού RANKL φαίνεται να είναι σε μακρινές μεταστάσεις. Υπάρχουν προκλινικές ενδείξεις ότι ο αποκλεισμός της RANKL μειώνει μακρινή μετάσταση, ενδεχομένως μέσω μηχανισμών που διακρίνονται από το οστό με την επίδραση των οστεοκλαστών. [31] Αναλύσεις και επεξεργασία των κυττάρων *in vitro* με RANKL έδειξαν τη λειτουργική έκφραση της πρωτεΐνης RANK στην επιφάνεια του προστάτη, του μαστού, στο οστεοσάρκωμα, στο μελάνωμα, και σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του πνεύμονα. Στις περισσότερες μελέτες, η RANKL δεν φαίνεται να αυξάνει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων που εκφράζουν RANK, παρόλο που αυξάνεται ο αριθμός κυττάρων και η ανθεκτικότητα ως προς τη βλάβη του DNA και τον κυτταρικό θάνατο που προκαλείται με χημειοθεραπεία ή g-ακτινοβολία, έχει παρατηρηθεί σε ορισμένες κυτταρικές σειρές. Επιπλέον, η RANKL θα επηρεάσει τη συμπεριφορά μιας ποικιλίας άλλων καρκινικών κυτταρικών σειρών ενδεχομένως στην εξέλιξη του όγκου και στη μετάσταση. Η RANKL έχει τεκμηριωθεί για να επάγει μια ποικιλία παραγόντων που εμπλέκονται στη μετανάστευση, στην αγγειογένεση, και στην εισβολή, συμπεριλαμβανομένων MMP1, MMP9, μίγμα μεταλλοπρωτεϊνών που επάγουν EMMPRIN /CD47, ICAM-1, IL-6, IL-8, και VEGF. Η RANKL εξαρτώμενη προώθηση της μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων και εισβολή μπορεί ασφαλώς να συμβάλει στην αύξηση των απομακρυσμένων μεταστάσεων που παρατηρήθηκαν *in vivo* (Σχ. 1.12). Η RANKL θα προβλεπόταν να εκφράζεται ιδιαίτερα σε κανονικούς ιστούς σε απομακρυσμένες θέσεις των μεταστάσεων, συμπεριλαμβανομένων των περιφερειακών λεμφαδένων και στα οστά εκτός από την

έκφραση της σε πρωτογενή όγκο. Σε κυτταρικές σειρές όγκων, η έκφραση RANK στα κύτταρα του όγκου δεν απαιτείται αυστηρά για μετάσταση στα οστά. Σύμφωνα με πρόσφατες αναλύσεις η υψηλή έκφραση RANK σε πρωτογενείς όγκους του μαστού συνδέεται με τη συμμετοχή λεμφαδένων και μεγαλύτερο κίνδυνο να ανάπτυξης οστικών μεταστάσεων. Έχειδειχθεί ότι RANKL προάγει την δραστικότητα των T-regs και των μακροφάγων, τα είδη κυττάρων τα οποία είναι ικανά να ενισχύσουν την εξέλιξη του όγκου και των μεταστάσεων. Μέχρι στιγμής, δεν υπάρχουν μελέτες για την άμεση αντιμετώπιση οποιασδήποτε λειτουργίας της RANKL στα ανοσοποιητικά συστατικά του μικροπεριβάλλοντος του όγκου, αλλά θα μπορούσε να θεωρηθεί ως πιθανός προογκογονικός και προμεταστατικός μηχανισμός μαζί με τις άμεσες επιδράσεις στα κύτταρα του όγκου ή / και του φυσιολογικού μαστικού επιθηλίου. [29]



Σχήμα 1.13: Μηχανισμοί μεσολάβησης RANKL στη μετάσταση του καρκίνου.
[30]

Μονοπάτι RANKL/RANK στον καρκίνο του μαστικού αδένα

Η έκφραση RANKL αυξάνεται σημαντικά στον αυλό του μαστού σε επιθηλιακά κύτταρα στην εγκυμοσύνη και μπορεί να προκληθεί από παράγοντες όπως η προλακτίνη, PTHrP, και προγεστερόνη. Στα ποντίκια, η έκφραση RANK παρατηρείται σε χαμηλά επίπεδα στον αυλό και στα βασικά κύτταρα του μαστικού επιθηλίου και γίνεται πιο έντονη η έκφραση στην εγκυμοσύνη, και πιο επιλεκτικά σε πορογενή σημεία διακλάδωσης. Γενετικές μελέτες αποκάλυψαν ότι τόσο RANKL

όσο και ο υποδοχέας προγεστερόνης (PR) λειτουργούν σε παρόμοια στάδια γαλουχίας και ότι οι πρωτεΐνες εντοπίζονται στον αυλό επιθηλιακών κυττάρων του μαστού. Επιπλέον, άλλες πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι RANKL μπορεί να μεσολαβήσει στη μη παραγωγική επέκταση του μαστικού αδένα μέσω αύξησης του αριθμού και της αναγεννητικής ικανότητας των μαστικών βλαστικών κυττάρων (MASc). Εκτός από τον ER/PR φαινότυπο, τα MASc ανταποκρίνονται στις σηματοδοτήσεις των ορμονών των ωοθηκών, και η RANKL αναγνωρίζεται ως παρακρινής παράγοντας εξαρτώμενος από τα αποτελέσματα της προγεστερόνης που συμβαίνουν στα MASc κατά τη διάρκεια της κύησης. [29] Επιπλέον, η RANKL βρέθηκε να διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και να κατέστέλλει την απόπτωση μέσω αναστολής της σηματοδότησης NP-κΒ άλφα κινάσης (IKKα) - κυκλίνης D1 και της σηματοδότησης ID2-P21 σε επιθηλιακά κύτταρα μαστού. [31]

Πρόσφατα, βρέθηκε ότι η RANK προωθεί την μαστική ογκογένεση συμπεριλαμβανομένου τη μετάβαση επιθηλιακών-μεσεγχυματικών κυττάρων. Η προγεστερόνη έχει δείχθει ότι διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των μαστικών βλαστοκυττάρων, τα οποία έχουν τη δυνατότητα να μετατρέπουν τα προνεοπλασματικά κύτταρα. Η καταστολή της έκφρασης RANKL σε επιθηλιακά κύτταρα μαστού και μαστικών βλαστοκυττάρων μπλοκάρουν την προγεστερόνη που επάγεται με τη μορφογένεση του μαστού και την ογκογένεση, αντιστοίχως. Μαζί αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν έντονα ότι άξονας προγεστερόνη-RANKL-RANK παίζει έναν κρίσιμο ρόλο στην έναρξη των μαστικών όγκων με αυτοκρινή τρόπο. Η διάσπαση αυτού του άξονα θα μπορούσε να είναι μια νέα προσέγγιση για τη θεραπεία και την πρόληψη του όγκου μαστικού αδένα και την καρκινογένεση, αντίστοιχα. Σε περιπτώσεις πρωτοπαθών όγκων του μαστού ανθρώπου εκφράζεται RANK και RANKL. Επιπλέον, τα επίπεδα έκφρασης RANKL συσχετίζονται με τον αριθμό των μαστικών βλαστοκυττάρων. Αυτά τα αποτελέσματα εγείρουν την πιθανότητα ότι οι καρκίνοι του μαστού σε προεμμηνοπαυσιακές νεαρές γυναίκες είναι πιο επιθετική από ό, τι εκείνοι σε μετεμμηνοπαυσιακές ηλικιωμένες γυναίκες. Ακόμη, έχει αναφερθεί ότι τα CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα διεισδύουν σε όγκους του μαστού παράγοντας αυξημένες ποσότητες RANKL, όπου στη συνέχεια διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων μαστικού όγκου και προστατεύει από την απόπτωση με ένα παρακρινή τρόπο, οδηγώντας σε αυξημένο φορτίο του όγκου και πνευμονικές μεταστάσεις. Η στόχευση ρυθμιστικών T

κυττάρων που παράγουν RANKL, μπορεί να ανατρέψει την αντικαρκινική ανοσία και θα μπορούσε να είναι μια μοναδική θεραπευτική παρέμβαση για ασθενείς με καρκίνο του μαστού με μετάσταση στα οστά.

Καρκίνος του Προστάτη

Έχειδειχθεί η υψηλή έκφραση RANK/RANKL/OPG στον προστάτη από μεταστατικούς όγκους, αποδεικνύοντας έτσι ότι μπορεί να διευκολυνθεί η μετάσταση του προστάτη μέσω αυτού του μονοπατιού. Τα επίπεδα του OPG στον ορό και στον ιστό των ασθενών με καρκίνο του προστάτη έχουν συσχετισθεί με την εξέλιξη της νόσου θετικά, γεγονός που υποδεικνύει ότι OPG μπορεί να παράγεται από κύτταρα PCA, το οποίο στη συνέχεια απελευθερώνεται στο ορό. Σύμφωνα με τα δεδομένα η σύνδεση του OPG με τη RANKL, αναστέλλει την οστεοκλαστογένεση, το οποίο είναι απαραίτητο για να εγκατασταθούν τα κύτταρα του προστάτη στο περιβάλλον των οστών. Ως κρίσιμος παράγοντας διαφοροποίησης οστεοκλαστών, η RANKL μπορεί να προκαλέσει κυτταροσκελετικές αλλαγές και να προωθήσει την εισβολή των διαφόρων τύπων ανθρώπινων επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων που εκφράζουν RANK. Η RANKL δεσμεύεται με RANK σε θετικά κύτταρα του προστάτη και αυξάνεται η μετανάστευση των κυττάρων in vitro. Βρέθηκε ότι siRNA RANK μπλοκάρει την επαγόμενη από RANKL εισβολή κυττάρων PCA, είτε πλήρως είτε εν μέρει εξαρτάται από τον τύπο του κυττάρου. Δεδομένου ότι η άμεση ρύθμιση προς τα κάτω του RANK με siRNA ήταν αποτελεσματική στη μείωση της επίδρασης του sRANKL στην κυτταρική εισβολή, η επίδραση της sRANKL έγινε με τη μεσολάβηση RANK. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η OPG και διαλυτή RANK-Fc δραστηριότητα μπλοκάρουν τη RANKL. Η έρευνα υποδεικνύει ότι η αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων του όγκου με OPG μπορεί να διαμεσολαβείται μέσω του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών και όχι με άμεση επίδραση επί των καρκινικών κυττάρων. Τα παρόντα δεδομένα έδειξαν ότι η αναστολή της σηματοδότησης RANK/RANKL με OPG μειώνουν σημαντικά την ικανότητα εισβολής των κυττάρων του προστάτη, ενώ η έκφραση OPG συσχετίστηκε θετικά με τη μετάσταση του καρκίνου προστάτη στα οστά. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα υψηλά επίπεδα έκφρασης RANK/RANKL/OPG μπορούν να βοηθήσουν στην αναγνώριση ασθενών με καρκίνο του προστάτη που διατρέχουν υψηλό κίνδυνο να αναπτύξουν μετάσταση στα οστά. Η έκφραση RANK από κύτταρα του προστάτη και το OPG μπορεί να μειώσει αποτελεσματικά την κυτταρική διείσδυση μέσω της

απόφραξης της δραστηριότητας RANKL. Η αναστολή του RANK/RANKL με OPG μπορεί να προσφέρει μια πολλά υποσχόμενη θεραπευτική στρατηγική για την καταστολή της μετάστασης του καρκίνου προστάτη στα οστά. [28]

1.6 RANKL/RANK/OPG σε ασθένειες του πνεύμονα.

Κυστική ίνωση

Η κυστική ίνωση (CF) οφείλεται σε ελάττωμα του διαμεμβρανικού ρυθμιστή αγωγιμότητας, ένα κανάλι μεταφοράς χλωρίου, με αποτέλεσμα την έκκριση παχύρρευστου υγρού στους πνεύμονες, στο πάγκρεας, στο έντερο, στη χοληφόρο οδό και στο ανδρικό γεννητικό σύστημα, η οποία οδηγεί σε φλεγμονή, μόλυνση, καταστροφή των ιστών και τελικά σε ανεπάρκεια οργάνων. Η φλεγμονή παρουσιάζεται ως απάντηση στην χρόνια μόλυνση των αεραγωγών.

Σε αυτή την ασθένεια μετά τη μεταμόσχευση πνεύμονα όπου είναι η κύρια θεραπεία παρατηρείται κακή υγεία των οστών που αποτελεί αντένδειξη για αυτή τη θεραπεία. Τα άτομα με κυστική ίνωση, σε σύγκριση με υγιή άτομα παρουσιάζουν 100 φορές αυξημένο κίνδυνο σπονδυλικών καταγμάτων και δέκα φορές αυξημένο κίνδυνο καταγμάτων πλευρών, οι δύο πιο κοινές περιοχές για κατάγματα. Χαμηλή BMD είναι διαδεδομένη σε 30% αυτών των ασθενών, ιδιαίτερα σε ηλικιωμένους, υποσιτισμένα και όχι υγιή άτομα. Ο πιο σημαντικός παράγοντας που σχετίζεται με την οστεοπόρωση κατά τη διάρκεια της νόσου η οποία καθορίζεται από τη λειτουργία των πνευμόνων αλλά και άλλων παραγόντων είναι η δυσασπορρόφηση (κυρίως λόγω υποβιταμίνωσης D και κακής διατροφής). Στον ορό εντοπίζονται αυξημένα IL-6, IL-1, TNF- α , και M-CSF σε άτομα με λοιμώξεις του πνεύμονα. Το αμινοτελικό πεπτίδιο του κολλαγόνου τύπου I (NTX), οι συγκεντρώσεις πρωτεΐνης IL-6, TNF- α , η C-αντιδρώσα μειώνονται μετά από επιτυχή θεραπεία με αντιβιοτικά και η οστεοκαλσίνη αυξάνεται. Μια άλλη απόδειξη της οστεοπόρωσης που σχετίζεται με την κυστική ίνωση (CF) είναι ο σύνδεσμος μεταξύ C-αντιδρώσα πρωτεΐνη και τη σοβαρότητα της νόσου των οστών. Ο αυξητικός παράγοντας ινσουλινομόρφος της ινσουλίνης (IGF-1) στον ορό, ένας αναβολικός παράγοντας οστού, συχνά μειώνεται σε ασθενείς με κυστική ίνωση πιθανώς λόγω τόσο του υποσιτισμού όσο και των φλεγμονωδών κυτοκινών που προκαλούν την ανοχή αυξητικής ορμόνης. [25]

Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια

Ο όρος Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) χρησιμοποιείται για τα άτομα που έχουν χρόνια βρογχίτιδα, εμφύσημα ή και τα δύο. Είναι χρόνια πάθηση του αναπνευστικού συστήματος. Όταν κάποιος έχει ΧΑΠ εμποδίζεται η εκπνευστική ροή αέρα από τους πνεύμονες. Η συνηθέστερη αιτία που προκαλεί ΧΑΠ είναι το κάπνισμα για αυτό και η πιο σημαντική θεραπεία είναι το σταμάτημα του καπνίσματος.

Η Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) μπορεί να παρουσιαστεί με συστηματικές επιπλοκές συμπεριλαμβανομένης της οστεοπόρωσης, ακόμη και εν απουσία της χρήσης γλυκοκορτικοειδών (GC). Χαμηλή οστική μάζα μπορεί να εμφανιστεί σε ασθενείς με ΧΑΠ, ακόμη και αν η ασθένεια είναι σταθερή, σχετιζόμενη με την παρουσία αυξημένης συγκέντρωσης των IL-6, TNF-α και CRP στο αίμα. [25]

Μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (NSCLC)

Μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (NSCLC) είναι η πιο συχνή κακοήθεια που διαγιγνώσκεται και η κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο, στην Ασία και σε δυτικούς πληθυσμούς. Περίπου 9% έως 30% των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα αναπτύσσουν οστικές μεταστάσεις, οι οποίες οδηγούν σε σημαντική νοσηρότητα από συμπίεση του νωτιαίου μυελού, παθολογικά κατάγματα, και ανίατο πόνο. Ο σκελετός αποτελεί τον πιο κοινό στόχο της μετάστασης του όγκου.

Στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC) έχουν μετρηθεί διάφορα επίπεδα έκφρασης RANKL, RANK και OPG σε ορό από ασθενείς με NSCLC, ενώ η ανοσοϊστοχημικός χαρακτηρισμός αυτών των τριών συστατικών είναι περιορισμένος. Αυτό αποδεικνύει ότι η κίνηση των κυττάρων NSCLC από πρωτογενείς περιοχές σε δευτερεύουσες τοποθεσίες (δηλαδή, περιφερειακούς λεμφαδένες ή απομακρυσμένα όργανα) μπορεί να εξαρτάται από το επίπεδο έκφρασης της RANKL. Ο υποδοχέας της RANKL, RANK, εκφράζεται ιδιοσυστατικά σε ένα ευρύ φάσμα ιστών. Επομένως, όταν τα καρκινικά κύτταρα υψηλής συγκέντρωσης RANKL εισβάλουν σε περιφερειακούς ιστούς ή κάνουν μετάσταση στους λεμφαδένες, είναι δυνατόν να υποβληθούν σε υψηλές συγκεντρώσεις RANK.

Τα καρκινικά κύτταρα μπορεί να ενεργοποιήσουν τους οστεοκλάστες άμεσα με την παραγωγή RANKL ή/και OPG, είτε έμμεσα μέσω της παραγωγής άλλων παραγόντων που διεγείρουν την παραγωγή RANKL ή OPG από οστεβλάστες/στρωματικά κύτταρα. Αυτή η μετατόπιση μπορεί τότε να δημιουργήσει ένα ευνοϊκό περιβάλλον στο οστό για την εξάπλωση των κυττάρων του όγκου και την ανάπτυξη των μεταστάσεων. Έχει βρεθεί ότι η αναλογία RANKL/OPG παίζει σημαντικό ρόλο στη μετάσταση όγκων, έτσι υπολογίστηκε σε κυτταρικές σειρές NSCLC και σε διαφορετικούς ιστούς όγκων. Βρέθηκε ότι η αναλογία RANKL/OPG αυξήθηκε στα δύο επίπεδα μεταγραφής και πρωτεϊνών στην πιο μεταστατική κυτταρική γραμμή και σε NSCLC ιστούς με μετάσταση στα οστά παρουσίασαν υψηλότερη αναλογία RANKL/ OPG σε σχέση με το πρωτογενές βλάβες. [20]

Κεφάλαιο 2: Πνευμονική Ίνωση

2.1 Ιδιοπαθής Πνευμονική Ίνωση

Η ίνωση είναι ένα σημαντικό παθολογικό χαρακτηριστικό πολλών χρόνιων αυτοάνοσων ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων της σκληροδερμίας, της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, της νόσου του Crohn, της ελκώδους κολίτιδας, της μυελοϊνώσεως και του ερυθηματώδη λύκου. Βασικό χαρακτηριστικό της ίνωσης είναι η επιδιόρθωση και αντικατάσταση ερεθισμένων ιστών ή οργάνων με συνδετικούς ιστούς. Η διαδικασία έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση φυσιολογικών κυττάρων με ινοβλάστες και τελικά την αντικατάσταση φυσιολογικού ιστού με ουλώδη ιστό. Παρά το γεγονός ότι η ινωδογένεση αναγνωρίζεται ολοένα και περισσότερο ως μια σημαντική αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας στις περισσότερες χρόνιες φλεγμονώδεις ασθένειες, υπάρχουν λίγες διαθέσιμες θεραπείες που στοχεύουν ειδικά την παθογένεια της ίνωσης.

Η ιδιοπαθής διάμεση πνευμονία (IPPs) είναι μια ετερογενής ομάδα ασθενειών που περιλαμβάνει επτά διαφορετικές κλινικές και παθολογικές καταστάσεις. Η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση (IPF), είναι η πιο κοινή και σοβαρή μορφή της ιδιοπαθής διάμεσης πνευμονίας (IPPs) αναφέρεται ως κρυπτογενής κυψελιδική ίνωση με απρόβλεπτη και μεταβλητή κλινική πορεία και σχετίζεται με εξαιρετικά φτωχή πρόγνωση. Παρά το γεγονός ότι τα παθολογικά χαρακτηριστικά της φλεγμονής και της ίνωσης είναι ευρέως αντιληπτά, άλλες διαγνωστικές πρακτικές είναι ελάχιστα κατανοητές. Στην πραγματικότητα, θεωρείται ότι τα παθολογικά χαρακτηριστικά της IPF είναι μη ειδικά και ότι η διάγνωση γίνεται μόνο με τον αποκλεισμό με βάση την ιστολογία άλλων συγκεκριμένων ασθενειών. [43]

Η IPF συνήθως εκδηλώνεται με κόπωση, αύξηση βήχα και δύσπνοιας και η επιδείνωση της πνευμονικής λειτουργίας μπορεί να προκληθεί με την εισπνοή παρασίτων. Η αναπνευστική ανεπάρκεια μπορεί να είναι αργή και προοδευτική (το πιο συχνό κλινικό χαρακτηριστικό), με ή χωρίς οξείες παροξύνσεις ή ταχεία και επιταχυνόμενη, με αποτέλεσμα να υπάρχουν διακριτά πρότυπα επιβίωσης. Η διάγνωση γίνεται μετά από 6 έως 24 μήνες μετά τα αρχικά συμπτώματα. Αν και η νόσος εμφανίζεται πιο συχνά σε μεσήλικες, υπάρχει ένα ευρύ φάσμα ηλικιών, με τα συμπτώματα να εμφανίζονται, ακόμη και σε μικρά παιδιά και βρέφη. Μέχρι σήμερα δεν έχει υπάρξει ικανοποιητική εξήγηση για τις διαφορές στην ηλικία έναρξης, την

παρουσίαση, την κλινική πορεία και την ανταπόκριση στη θεραπεία ορισμένων ασθενών με IPF.

Στον Πίνακα 2.1 αναφέρονται οι τέσσερις ιστολογικά διαφορετικές μορφές της διάμεσης πνευμονίας οι οποίες αποτελούν ένα ευρύ μορφολογικό φάσμα συμπτωμάτων που χαρακτηρίζει την IPF. Η αποτυχία να διαχωρίσουμε/αναγνωρίσουμε αυτές τις διαφορετικές περιπτώσεις μπορεί να εξηγήσει την κλινική ποικιλομορφία που παρατηρείται μεταξύ των ασθενών με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση. Αυτή η παθολογική ταξινόμηση των IPF μπορεί επίσης να βοηθήσει στην αξιολόγηση της πρόγνωσης και επιλογή κατάλληλης θεραπείας, καθώς και στην ενίσχυση της κατανόησης της παθογένεσης της νόσου. [44]

Πίνακας 2.1. Παθολογική κατάταξη της Ιδιοπαθούς Πνευμονικής Ίνωσης. [44]

PATHOLOGIC CLASSIFICATION OF IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS
Usual interstitial pneumonia (UIP) Desquamative interstitial pneumonia (DIP)/Respiratory bronchiolitis interstitial lung disease (RBILD) Acute interstitial pneumonia (AIP) Nonspecific interstitial pneumonia (NSIP)

Η παρουσία των ινοβλαστών σε ορισμένα σημεία, των ουλών με την εναπόθεση κολλαγόνου ή η αλλαγή του κυτταροσκελετού σε άλλα σημεία, περιγράφει την ετερογένεια, ένα χαρακτηριστικό που είναι βασικής σημασίας για τη διάγνωση της συνήθους διάμεσης πνευμονίας (UIP) και τη διάκριση από άλλη ιδιοπαθή διάμεση πνευμονία. Η φλεγμονή, συνήθως ήπιου βαθμού εμφανίζεται κυρίως στις περιοχές της εναπόθεσης κολλαγόνου ή αλλαγής του κυτταροσκελετού, σπάνια στο πρώιμο "κυτταρικό στάδιο" της UIP και αποτελείται από μικρά λεμφοκύτταρα. Διάσπαρτα κύτταρα πλάσματος καθώς και περιστασιακά ουδετερόφιλα και ηωσινόφιλα μπορούν επίσης να είναι παρόντα, αλλά γενικά δεν είναι πολυάριθμα. Η παρουσία σοβαρής φλεγμονής, στην πραγματικότητα, δεν θα

πρέπει να υποδηλώνουν διάγνωση της UIP. Η συσσώρευση ενδοκυψελιδικών μακροφάγων είναι ένα κοινό εύρημα στην μη ειδική UIP αλλά δεν σχετίζεται με τη νόσο. Η παρουσία τους όμως, έχει προκαλέσει μεγάλη σύγχυση και διαμάχη, τόσο για την ύπαρξη αποφολιδωτικής διάμεσης πνευμονίας (DIP) ως ξεχωριστή κατηγορία όσο και για τη σχέση της UIP και DIP. Μόλις αναγνωρίστηκαν τα άλλα διαγνωστικά χαρακτηριστικά της UIP, ειδικά η ανομοιόμορφη κατανομή των αλλαγών και η χρονική ετερογένεια, η διάκριση της UIP από DIP δεν ήταν δύσκολη, ακόμη και σε περιπτώσεις με διακεκριμένη συσσώρευση ενδοκυψελιδικών μακροφάγων.

Η συσσώρευση μακροφάγων στην DIP συχνά εντοπίζεται στην περιβρογχιολική περιοχή, αλλά όταν η συσσώρευση των μακροφάγων περιορίζεται σε αυτές τις περιοχές και συνοδεύεται με περιορισμένο χώρο σε αέρα, αυτή η διαδικασία ονομάζεται αναπνευστική βρογχιολίτιδα-διάμεση πνευμονοπάθεια (RBILD). Αυτός ο όρος προέρχεται από την αναπνευστική βρογχιολίτιδα, επίσης γνωστή ως «βρογχιολίτιδα καπνιστών», η οποία εμφανίζεται συχνά στους καπνιστές. Χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση ενεργοποιημένων μακροφάγων εντός αναπνευστικών βρογχιολίων, χωρίς σημαντική συνοδευτική διάμεση πνευμονοπάθεια. Στην RBILD, η διάμεση πάχυνση βρογχιολίων είναι παρόμοια με αυτή που παρατηρήθηκε στην DIP και συνοδεύει τις ανταλλαγές αερίων, αλλά περιορίζεται στο περιβρογχιολικό παρέγχυμα. Παρότι οι αρχικές διαπιστώσεις, υποστηρίζουν ότι η RBILD είναι διαφορετική από τη DIP, φαίνεται πιο πιθανό ότι αυτές οι δύο περιπτώσεις αντιπροσωπεύουν διαφορετικά άκρα του φάσματος της ίδιας ασθένειας. Το συμπέρασμα αυτό βασίζεται στην ελλιπή ιστολογική διάκριση μεταξύ των δύο αλλοιώσεων. Η RBILD μπορεί να είναι καλύτερος όρος από τη DIP επειδή είναι ανατομικά σωστή και επίσης επειδή δίνει έμφαση στον υποτιθέμενο ρόλο του καπνίσματος ή άλλων περιβαλλοντικών αιτιών ως προς την παθογένεση αυτής της κατάστασης. [44, 45, 42]

Μια από τις κατηγορίες της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης είναι η οξεία διάμεση πνευμονία (AIP) η οποία χαρακτηρίζεται από διάχυτη διάμεση ίνωση, αλλά διαφέρει από τις άλλες διάμεσες πνευμονίες καθώς η ίνωση είναι ενεργή, υπάρχουν ινοβλάστες και μυοϊνοβλάστες οι οποίοι πολλαπλασιάζονται με ελάχιστη απόθεση κολλαγόνου. Πρόσφατα περιγράφηκε η μη ειδική διάμεση πνευμονία (NSIP) η οποία χαρακτηρίζεται από την παρουσία διαφόρων βαθμών φλεγμονής και ίνωσης εντός κυψελιδικών τοιχωμάτων, αλλά στερείται πιο συγκεκριμένες αλλαγές που φαίνονται

σε μια διάγνωση της UIP, DIP, ή AIP. Τα περισσότερα παραδείγματα αναφέρουν παρουσία φλεγμονής με ελάχιστη ίνωση ή ταυτόχρονη παρουσία/ανάπτυξη φλεγμονής και ίνωσης, αν και κυρίως παρατηρείται ίνωση με ελάχιστη φλεγμονή. Η διαδικασία μπορεί να είναι ανομοιογενής και να περιλαμβάνει ανεπηρέαστες περιοχές στον πνεύμονα, αλλά οι αλλαγές γίνονται σταδιακά ομοιόμορφες σε σχετικά μικρό χρονικό διάστημα. Αυτή η χρονική ομοιομορφία έρχεται σε έντονη αντίθεση με τη χαρακτηριστική χρονική ετερογένεια της UIP.

Η αποφρακτική βρογχολίτιδα-διάμεση πνευμονία (BIP), τώρα είναι γνωστή ως αποφρακτική βρογχολίτιδα-οργανωμένη πνευμονία (BOOP), έχει γίνει ευρέως αποδεκτή και υπάρχει κοινή διάγνωση. Η λεμφοκυτταρική διάμεση πνευμονία (LIP), είναι μία λεμφοϋπερπλαστική διαταραχή που συχνά συνδέεται με ανοσοανεπάρκειες, είναι σπάνια και έχει αναλάβει νέα σημασία λόγω της σύνδεσής του με το σύνδρομο επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (AIDS). Η κυτταρική διάμεση πνευμονία (GIP) έχει αποδειχθεί ότι αντιπροσωπεύει την παθολογική εκδήλωση μέταλλο-πνευμονοκοκκίωσης. [44, 45, 42] Οι LIP και GIP αν και παρέμειναν ως μορφές διάμεσης πνευμονίας σε γενικές γραμμές, δεν περιλαμβάνονται στην κατηγορία των IPF επειδή δεν είναι συνήθως ιδιοπαθής. Η BIP ή BOOP, επίσης δεν περιλαμβάνεται σε αυτή την κατάταξη, δεδομένου ότι, παθολογικά, είναι κατά κύριο λόγο ενδοαυλική παρά διάμεση ανωμαλία. Επίσης, ακτινογραφικά, πιο συχνή εκδήλωση της χαρακτηρίζεται από αποσπασματικές εναέριες στο χώρο σκιάσεις και όχι διάχυτες διάμεσες σκιές. Αυτές οι παθολογικές υποκατηγορίες IPF δεν έχουν γίνει ευρέως γνωστές και αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι η IPF συχνά διαγιγνώσκεται με βάση την κλινική αξιολόγηση, χωρίς το όφελος μιας βιοψίας πνεύμονα. [44]

Τα παθολογικά κριτήρια για τη διάγνωση που χρησιμοποιούνται από τους περισσότερους ερευνητές περιλαμβάνουν μόνο την παρουσία της ίνωσης και της φλεγμονής σε διάφορες αναλογίες, ένα κοινό χαρακτηριστικό σε όλες τις κατηγορίες της ιδιοπαθούς διάμεσης πνευμονίας. Σημαντικές διαφορές στην κατανομή, την ένταση και τη φύση της ίνωσης και της φλεγμονής, γενικά δεν εκτιμώνται, παρά μόνο αποτελούν τη βάση για την παθολογική ταξινόμηση στις κατηγορίες που αναφέρθηκαν παραπάνω. [44] Τα παραπάνω χαρακτηριστικά και οι λεπτομερείς παθολογικές και κλινικές περιγραφές των τεσσάρων κατηγοριών της ιδιοπαθούς διάμεσης πνευμονίας περιγράφονται στους Πίνακες 2.2 και 2.3. Η διάγνωση αυτών, απαιτεί εικόνα των πνευμόνων που μπορεί να παρέχεται μόνο από θωρακοσκόπηση ή

θωρακοτομή, και μικρά δείγματα βιοψίας με διαδερμική βελόνα και διαβρογχική βιοψία αν και δεν μπορούν να παρέχουν επαρκή ιστό.

Πίνακας 2.2: Παθολογικά χαρακτηριστικά της Ιδιοπαθούς Πνευμονικής Ύψωσης.

[44]

CONTRASTING PATHOLOGIC FEATURES OF THE IDIOPATHIC INTERSTITIAL PNEUMONIAS				
Features	UIP	DIP/RBILD	AIP	NSIP
Temporal appearance	Variegated	Uniform	Uniform	Uniform
Interstitial inflammation	Scant	Scant	Scant	Usually prominent
Collagen fibrosis	Yes, patchy	Variable, diffuse (DIP) or focal, mild (RBILD)	No	Variable, diffuse
Fibroblast proliferation	Fibroblast foci prominent	No	Diffuse	Occasional, diffuse, or rare fibroblast foci
BOOP	No	No	No	Occasional, focal
Microscopic honey-comb change	Yes	No	No	Rare
Intraalveolar macrophage accumulation	Occasional, focal	Yes, diffuse (DIP) or peribronchiolar (RBILD)	No	Occasional, patchy
Hyaline membranes	No	No	Occasional, focal	No

Πίνακας 2.3: Κλινικά χαρακτηριστικά της Ιδιοπαθούς Πνευμονικής Ίνωσης. [44]

CONTRASTING CLINICAL FEATURES OF THE IDIOPATHIC INTERSTITIAL PNEUMONIAS					
Features	UIP	DIP	RBILD	AIP	NSIP
Mean age, yr	57	42	36	49	49
Occurrence in children	No	Rare	No	Rare	Occasionally
Onset	Insidious	Insidious	Insidious	Acute	Subacute, insidious
Mortality rate (mean survival)	68% (5–6 yr) (ref. 24, 28, 30, 31)	27% (12 yr) (ref. 30)	0% (ref. 32, 33)	62% (1–2 mo) (ref. 16, 17, 34)	11% (17 mo) (ref. 18)
Response to steroids	Poor	Good	Good	Poor	Good
Complete recovery possible	No	Yes	Yes	Yes	Yes

Definition of abbreviations: AIP = acute interstitial pneumonia; DIP = desquamative interstitial pneumonia; NSIP = nonspecific interstitial pneumonia; RBILD = respiratory bronchiolitis interstitial lung disease; UIP = usual interstitial pneumonia.

Το 2000, η Αμερικανική Πνευμονολογική Εταιρεία (ATS) συνεργάστηκε με την Ευρωπαϊκή Πνευμονολογική Εταιρεία (ERS) και ανέπτυξε μια κοινή δήλωση για τη διάγνωση και τη θεραπεία της IPF, η οποία αναθεωρήθηκε το 2011. Σύμφωνα με τις επικυρωμένες κατευθυντήριες γραμμές, η διάγνωση IPF απαιτεί τον αποκλεισμό των γνωστών αιτιών της διάμεσης πνευμονοπάθειας (ILD) και την παρουσία τυπικού μοτίβου της UIP με σχετικά υψηλής ευκρίνειας υπολογιστικής τομογραφίας (HRCT) σάρωσης ή ένα συγκεκριμένο μοτίβο βιοψίας του πνεύμονα. Η εμφάνιση και επικράτηση της IPF ποικίλλει μεταξύ των μελετών. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η συχνότητα και η θνησιμότητα των IPF κρουσμάτων, αυξάνονται. Η συχνότητα εμφάνισης της IPF υπολογίζεται σε 6 έως 16 περιπτώσεις ανά 100.000 ανά έτος στις Ηνωμένες Πολιτείες, και η μέση επιβίωση από τη στιγμή της διάγνωσης είναι 3 έως 5 έτη ανεξάρτητα από τη θεραπεία. Ωστόσο, η πραγματική επίπτωση και ο επιπολασμός της IPF δεν είναι καλά εδραιωμένος λόγω της έλλειψης ενός ενιαίου ορισμού της IPF, τα διαγνωστικά κριτήρια, οι διαφορές στις μεθοδολογίες διαπίστωσης της ασθένειας και στα σχέδια της μελέτης. [42]

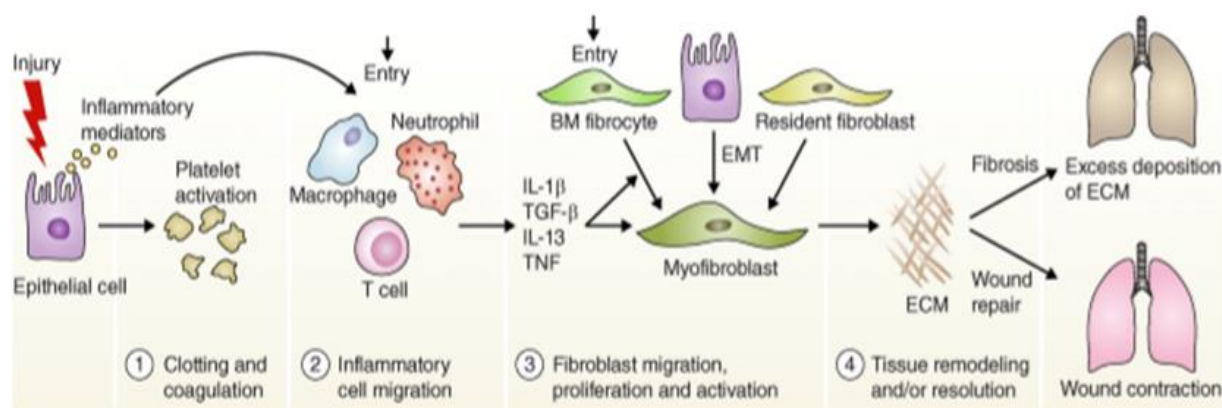
2.2 Μηχανισμός

Όσον αφορά τους μηχανισμούς της IPF, δυο πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν έντονα τον ρόλο της επιθηλιακής απόπτωσης ως προϋποκείμενο στάδιο. Η απόπτωση των κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων που βρίσκονται στους πνεύμονες των ασθενών με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση, καθώς και σε πειραματικά μοντέλα της νόσου, συσχετίζονται με την αυξημένη έκφραση παραγόντων που "επάγουν το θάνατο", όπως παράγοντες νέκρωσης όγκου/μέλη υποδοχέων παράγοντων νέκρωσης όγκου και διάφορους αποπτωτικούς δείκτες. Επιπλέον, η επαγωγή της απόπτωσης των επιθηλιακών κυττάρων είναι επαρκής για να ξεκινήσει μια ινωτική απόκριση σε πειραματικά μοντέλα, ενώ η γενετική ή φαρμακολογική δέσμευση των αποπτωτικών σημάτων μπορεί να αποτρέψει την ινωτική απόκριση με μπλεομυκίνη (BLM). Οι παρατηρήσεις αυτές έχουν συμβάλει σημαντικά στην επικρατούσα υπόθεση ότι οι μηχανισμοί που οδηγούν σε IPF, αποτελούν μια ανώμαλη απορυθμισμένη επούλωση των πληγών ως απόκριση σε πολλαπλές εξελισσόμενες κυψελιδικές επιθηλιακές βλάβες.

Η αποκατάσταση των κατεστραμμένων ιστών είναι ένας θεμελιώδης βιολογικός μηχανισμός που επιτρέπει την αντικατάσταση των νεκρών ή κατεστραμμένων κυττάρων μετά από τραυματισμό, μια διαδικασία εξαιρετικά σημαντική για την επιβίωση. Το κολλαγόνο που εναποτίθεται για την επούλωση του τραύματος είναι απαραίτητο, η κανονική επισκευή του ιστού όμως μπορεί να εξελιχθεί σταδιακά σε μη αναστρέψιμη ινωτική απόκριση εάν ο τραυματισμός του ιστού είναι σοβαρός ή επαναλαμβανόμενος ή εάν η απόκριση στην επούλωση της πληγής καθίσταται απορυθμισμένη. Έτσι μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη μιας μόνιμης ινωτικής ουλής, η οποία χαρακτηρίζεται από την υπερβολική συσσώρευση εξωκυττάρων συστατικών (ECM), ινωδονεκτίνη, πρωτεογλυκάνες και διάμεσα είδη κολλαγόνων, μέσα και γύρω από τη φλεγμονή ή τη βλάβη του ιστού. Κατά συνέπεια, η ινωδογενέση συχνά ορίζεται ως εκτός ελέγχου απόκριση στην επούλωση πληγών και στην υπερβολική συσσώρευση ινώδους συνδετικού ιστού. [40,41]

Επίσης ένα βασικό χαρακτηριστικό του μηχανισμού, είναι η ενεργοποίηση των εκκρινόμενων μυοϊνοβλαστών από εξωκυττάρια συστατικά (ECM), οι οποίοι είναι οι μεσολαβητές για την αναδιαμόρφωση του ινώδους ιστού. Η έρευνα ως προς την ίνωση έχει επικεντρωθεί στην αποσαφήνιση των μοριακών και ανοσολογικών

μηχανισμών που κινούν και διατηρούν τη διαφοροποίηση των αδρανών ινοβλαστών σε ενεργούς πολλαπλασιαζόμενους μυοϊνοβλάστες οι οποίοι παράγονται από ECM (Σχ. 2.1).



Σχήμα 2.1: Διαταραχές στην κανονική επούλωση τραύματος συμβάλλουν στην ανάπτυξη της πνευμονικής ίνωσης. [40]

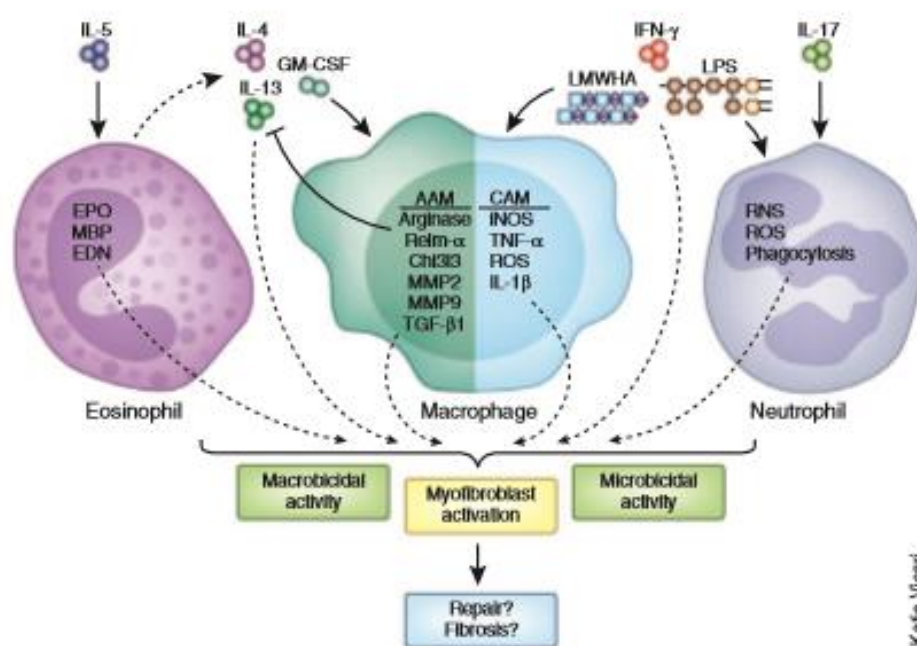
Η επούλωση του τραύματος έχει τέσσερις διακριτές φάσεις που περιλαμβάνουν τη φάση πήξης, τη φλεγμονώδη φάση, τον πολλαπλασιασμό και τη μετάβαση ινοβλαστών, και την τελική φάση αναδιαμόρφωσης της αρχιτεκτονικής του ιστού (Σχ 2.1). Η απόκριση πήξης είναι ο πρώτος μηχανισμός επούλωσης των πληγών που ενεργοποιούνται μετά τον τραυματισμό. Όταν το ενδοθήλιο έχει υποστεί βλάβη, τα κυκλοφορούντα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται μόλις εκτεθούν στο κολλαγόνο και στον παράγοντα von Willebrand στο υποενδοθηλιακό τμήμα. Ο παράγοντας πήξεως II (προθρομβίνη) διασπάται πρωτεολυτικά προς το σχηματισμό θρομβίνης. Η θρομβίνη, με τη σειρά της, λειτουργεί ως μια πρωτεάση σερίνης η οποία μετατρέπει το διαλυτό ινωδογόνο σε αδιάλυτο τμήμα του ινώδους, το οποίο βοηθά τα αιμοπετάλια να συσσωματώνονται μαζί για να σχηματίσουν τον θρόμβο ινώδους που εξασφαλίζει γρήγορη αιμόσταση. Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια απελευθερώνουν επίσης παράγοντες ανάπτυξης όπως παράγοντα ανάπτυξης που προέρχεται από αιμοπετάλια (PDGF), ένα ισχυρό χημειοελκτικό για φλεγμονώδη κύτταρα, και έναν αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού- β 1 (TGF- β 1), ο οποίος διεγείρει τη σύνθεση της ECM από τους τοπικούς ινοβλάστες. Κατά συνέπεια, κάθε παρατεταμένη διαταραχή στην διαδικασία πήξης μπορεί να οδηγήσει σε ίνωση. Ωστόσο, αν και η διαδικασία θρομβώσεως μπορεί να είναι σημαντική για την έναρξη της ίνωσης,

βλάβες στο μονοπάτι της πήξης έχουν αποδειχθεί ότι συμβάλλουν στην ίνωση. [41] Τα φλεγμονώδη κύτταρα που έχουν μεταφερθεί στο σημείο της βλάβης είναι κυρίως τα ουδετερόφιλα, μακροφάγα, λεμφοκύτταρα, και ηωσινόφιλα. Τα ουδετερόφιλα είναι φλεγμονώδη κύτταρα και εντοπίζονται άφθονα στα πρώιμα στάδια της επούλωσης του τραύματος, αλλά γρήγορα αντικαθίσταται από τα μακροφάγα μετά την αποκοκκίωση των ουδετερόφιλων. Κατά τη διάρκεια αυτής της αρχικής φάσης της μετανάστευσης των λευκοκυττάρων, τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και ουδετερόφιλα καθαρίζουν την πληγή για να εξαλείψουν τυχόν εισβολή των οργανισμών. Παράγουν επίσης μια ποικιλία από κυττοκίνες και χημειοκίνες που ενισχύουν τη φλεγμονώδη απόκριση και την εξάπλωση και πρόσληψη των ινοβλαστών. Οι μυοϊνοβλάστες προέρχονται από μια ποικιλία πηγών, συμπεριλαμβανομένων των τοπικών μεσεγγυματικών κυττάρων, προγονικών κυττάρων μυελού των οστών (που ονομάζεται ινοκύτταρο), και μέσω μιας διαδικασίας μετάβασης επιθηλιακών σε μεσεγγυματικά (EMT), όπου τα επιθηλιακά κύτταρα διαφοροποιούνται σε ινοβλάστες. Μόλις οι ινοβλάστες ενεργοποιούνται, μετατρέπονται σε μυοϊνοβλάστες μέσω της έκφρασης λείας μυϊκής ακτίνης που εκκρίνουν τα συστατικά του ECM. Τέλος, στη φάση ωρίμανσης της πληγής και αναδιαμόρφωσης, οι μυοϊνοβλάστες προάγουν τη συστολή του τραύματος, μια διαδικασία στην οποία τα άκρα της πληγής μεταναστεύουν προς το κέντρο και τα επιθηλιακά/ενδοθηλιακά κύτταρα διαιρούνται και μεταναστεύουν κατά τη διάρκεια της προσωρινής μεσοκυττάριας ουσίας για την αναγέννηση του κατεστραμμένου ιστού. Κεντρικό ρόλο στην παθογένεια της πνευμονικής ίνωσης παίζει ο TGF- β με την προώθηση της ενεργοποίησης, του πολλαπλασιασμού, και τη διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων και του κολλαγόνου που παράγεται από μυοϊνοβλάστες. [40,41]

2.2.1 Ο ρόλος των φλεγμονωδών μυελοδών κυττάρων

Τα φλεγμονώδη μυελοειδή κύτταρα έχουν σημαντικό ρόλο στην ίνωση. Εκτός από την ενεργοποίηση του μηχανισμού πήξης, τα αιμοπεταλία και τα κατεστραμμένα επιθηλιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα απελευθερώνουν μια ποικιλία χημειοτακτικών παραγόντων που προσλαμβάνουν φλεγμονώδη μονοκύτταρα και ουδετερόφιλα στο σημείο της βλάβης του ιστού (Σχ. 2.2). Αυτά τα κυκλοφορούντα μυελοειδή κύτταρα προσλαμβάνονται σε κατεστραμμένους ιστούς, όπου διαφοροποιούνται σε μακροφάγα που φαγοκυτταρώνουν το θρόμβο και τα κυτταρικά θραύσματα ECM. Έχει επίσηςδειχθεί ότι είναι σημαντικοί οδηγοί της ίνωσης διεγείροντας την παραγωγή χημειοκίνων και προφλεγμονωδών κυτοκινών από φλεγμονώδη μονοκύτταρα και μακροφάγα. Τα ουδετερόφιλα επίσης προσλαμβάνονται γρήγορα μετά τον τραυματισμό και συμμετέχουν στην απομάκρυνση των κατεστραμμένων ιστών και στην εξουδετέρωση των βακτηρίων. Αν και η στρατολόγηση των φλεγμονωδών μονοκυττάρων και ουδετερόφιλων στο σημείο της βλάβης του ιστού είναι σημαντική για τη διαδικασία επούλωσης των πληγών, τα κύτταρα αυτά εκκρίνουν επίσης μια ποικιλία από τοξικούς μεσολαβητές. Κατά συνέπεια, αν τα φλεγμονώδη μακροφάγα και ουδετερόφιλα δεν απομακρυνθούν γρήγορα, μπορούν να επιδεινώσουν περαιτέρω τον ιστό και να οδηγήσει σε άλλες ουλές. Πράγματι, η σωστή επούλωση του τραύματος μπορεί να συμβεί μόνο όταν τα φλεγμονώδη κύτταρα έχουν αποχωρήσει από το σημείο βλάβης, όπως αποδεικνύεται από μια πρόσφατη μελέτη στην οποία η γρήγορη απομάκρυνση μακροφάγων είχε αποδειχθεί ότι μειώνει σημαντικά την ανάπτυξη της ίνωσης του ήπατος σε ποντίκια. Άλλες μελέτες έχουν εντοπίσει παρόμοιο ινωτικό ρόλο για τα ουδετερόφιλα σε ποντίκια με πνευμονική ίνωση προκαλούμενη από μπλεομυκίνη, και ενδεχομένως σε IPF ασθενείς. Ο περιορισμός της προφλεγμονώδους δραστηριότητας των μυελοδών κυττάρων μπορεί να αποδειχθεί ιδιαίτερα επωφέλης σε μια ποικιλία χρόνιων φλεγμονωδών και ινωδών ασθενειών. Άλλα έμφυτα κύτταρα μυελοειδούς προέλευσης (όπως ιστιοκύτταρα, ηωσινόφιλα και βασεόφιλα) έχουν επίσης ενοχοποιηθεί για την παθογένεια της ίνωσης σε συστήματα πολλαπλών οργάνων και θεωρούνται ως πιθανοί θεραπευτικοί στόχοι. Παρά το γεγονός ότι τα ηωσινόφιλα πιο συχνά συνδέονται με την ανάπτυξη της πνευμονικής ίνωσης, αυξημένος αριθμός ηωσινοφίλων έχει επίσης συνδεθεί με την ενεργοποίηση των μυοϊνοβλαστών στο δέρμα και στην ίνωση του ήπατος, καθώς και στην ιδιοπαθή οπισθοπεριτοναϊκή

ίνωση. Η ηωσινοφιλία στο βρογχοκυψελιδικό τμήμα των πνευμόνων έχει επίσης αναγνωριστεί ως προγνωστικός βιοδείκτης της IPF και στην πνευμονική ίνωση που σχετίζεται με αγγειακή διαταραχή κολλαγόνου. Τέλος, αν και τα βασεόφιλα έχουν λιγότερο σαφή ρόλο στην ανάπτυξη της ίνωσης από τους άλλους πληθυσμούς μυελοειδών κυττάρων, έχουν ενοχοποιηθεί για την παθογένεση της διάμεσης πνευμονικής ασθένειας. Τα βασεόφιλα επίσης πιστεύεται ότι είναι μια σημαντική πηγή κυτοκινών, υποδηλώνοντας ότι θα μπορούσε να λειτουργούν ως κινητήρια πηγή των L-4 και / ή IL-13 στην ίνωση. [41]



Σχήμα 2.2: Κύτταρα ανοσοποιητικού συστήματος σε απόκριση της ίνωσης. [41]

2.2.2. Ο ρόλος των μακροφάγων στην ίνωση

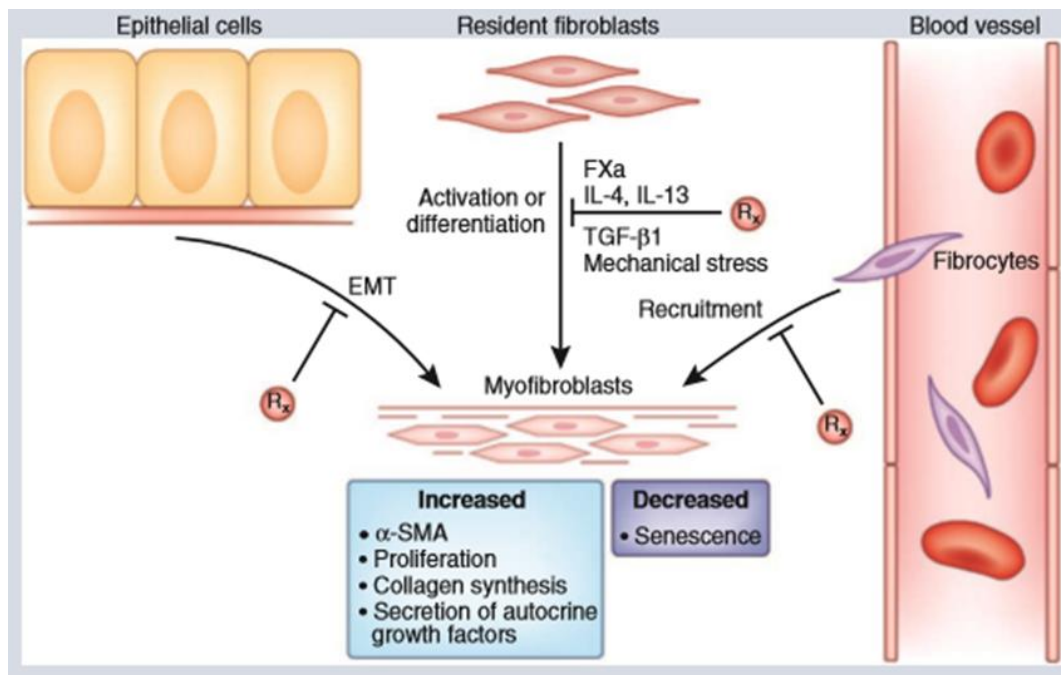
Τα μακροφάγα είναι κύτταρα εξαιρετικά ετερογενή, λόγω του γεγονότος ότι οι λειτουργικές αποκρίσεις τους επηρεάζονται έντονα από τον τοπικό μικροπεριβάλλον. Κατά την βλάβη του ιστού, τα μονοκύτταρα του αίματος κατευθύνονται στη θέση της βλάβης και στη συνέχεια διαφοροποιούνται ως απόκριση στο μικροπεριβάλλον που μπορεί να περιλαμβάνει το οξειδωτικό στρες, την υποξία και τοξίνες. Υπάρχουν δύο τύποι ενεργοποιημένων μακροφάγων, ο υπότυπος M1 προφλεγμονωδών μακροφάγων και ο υπότυπος M2 εναλλακτικώς ενεργοποιημένων μακροφάγων. [46]

Τα μακροφάγα είναι παρόντα σε όλα τα στάδια της διαδικασίας της ίνωσης, επειδή χρησιμεύουν ως βασικοί ρυθμιστές της πρόσληψης των ινοβλαστών, του πολλαπλασιασμού και της ενεργοποίησής τους. Μπορούν να προάγουν την ίνωση εκκρίνοντας χημειοκίνες και ειδικές μεταλλοπρωτεΐνες που αποδομούν τα συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας (ECM), διευκολύνοντας έτσι την στρατολόγηση των φλεγμονωδών κυττάρων σε θέσεις βλάβης ιστού. Παράγουν επίσης διάφορους ινωτικούς μεσολαβητές, συμπεριλαμβανομένου του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού-β1 (TGF-β1) και του παράγοντα ανάπτυξης που προέρχεται από αιμοπετάλια (PDGF) που διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό και την ενεργοποίηση των μυοϊνοβλαστών και του κολλαγόνου που εκκρίνουν. [40] Παρόλα αυτά, άλλα μακροφάγα υποτύπων M2 εμπλέκονται στην παθογένεση της ίνωσης και μπορεί να διευκολύνουν ή/και να αναστρέψουν την ίνωση καθώς συμμετέχουν στην φλεγμονώδη φάση και στην φάση αναδιαμόρφωσης και επούλωσης πληγών της ίνωσης. Αναλυτικά, ενεργοποιούνται με IL-4 (ή IL-13), με μια εναλλακτική κατάσταση ενεργοποίησης που είναι διαφορετική από εκείνη των κλασικών ενεργοποιημένων μακροφάγων (M1) που προκαλείται από ιντερφερόνη-γ (IFN-γ). *In vitro* και *in vivo* μελέτες σε ποντίκια έχουν δείξει ότι αυτός ο φαινότυπος M2 χαρακτηρίζεται από αυξημένη έκφραση του ενζύμου αργινάση-1 (Arg1) το οποίο ελέγχει την παραγωγή της L-προλίνης, η οποία είναι απαραίτητη για τη σύνθεση του κολλαγόνου από ενεργοποιημένους μυοϊνοβλάστες. Τα M2 κύτταρα έχουν επίσης εμπλακεί στην ανάπτυξη του T βοηθητικού τύπου 2 (Th2), στην παραγωγή ινωτικών κυτοκινών, την καταστολή των ανταποκρίσεων M1 και την πρόσληψη ινοβλαστών. Έχει παρατηρηθεί ότι κατά τη διάρκεια της ινωτικής ανοσοαπόκρισης, τα μακροφάγα M2 είναι σημαντικοί επαγωγείς της επούλωσης του τραύματος και της ίνωσης. Μελέτες που έχουν γίνει, πρότειναν ότι κύτταρα M2 ανταγωνίζονται τα κύτταρα Th2 και τους ινοβλάστες για την L-αργινίνη, η οποία απαιτείται για την παραγωγή των πολυαμινών και L-προλίνης, που ρυθμίζουν την κυτταρική ανάπτυξη και τη σύνθεση κολλαγόνου, αντίστοιχα. Η ανασταλτική δραστηριότητα των κυττάρων M2 είναι επίσης σύμφωνη με μελέτες που δείχνουν να είναι σημαντικοί επαγωγείς των Treg κυττάρων τα οποία έχουν επίσης ενοχοποιηθεί για την καταστολή της ίνωσης. Έτσι, αντί να προωθούν την ίνωση, τα κύτταρα M2 φαίνεται να εκμεταλλεύονται πολλαπλούς μηχανισμούς για την αναστολή της σύνθεσης ECM από μυοϊνοβλάστες. Δεδομένου αυτού του ρόλου των M2 μακροφάγων, θα είναι σημαντικό να

διερευνηθεί εάν τα κύτταρα M2 έχουν ένα παρόμοιο ανασταλτικό ρόλο σε άλλα μοντέλα ίνωσης. [41]

2.2.3 Μυοϊνοβλάστες

Κατά τη διάρκεια της ισορροπίας, οι ινοβλάστες που βρίσκονται στον ιστό είναι σε κατάσταση ηρεμίας, αν και είναι μεταβολικά ενεργοί και υποστηρίζουν βιοχημικά τη λειτουργία του οργάνου στο οποίο βρίσκονται. Για την επισκευή, την αναγέννηση και την αποκατάσταση της ομοιόστασης του ιστού μετά από τραυματισμό, οι ινοβλάστες ενεργοποιούνται και μετατρέπονται σε μυοϊνοβλάστες, συσταλτικά κύτταρα εκφράζουν α -SMA και δέσμες μυοσίνης. Οι μυοϊνοβλάστες εκκρίνουν μεγάλη ποσότητα ECM η οποία είναι ζωτικής σημασίας στον κοκκιώδη ιστό του τραύματος, βοηθώντας στη σύσπαση και στο κλείσιμο των πτυχών απόκρισης της επούλωσης. Αλλαγές στο πρόγραμμα επούλωσης πληγών ή σε άλλες παθολογικές καταστάσεις μπορούν να εμφανισθούν και να διατηρήσουν οι μυοϊνοβλάστες, και έχειδειχθεί ότι είναι μια σημαντική πηγή κολλαγόνου στις ενεργές ινωτικές περιοχές. Επίσης πολλά στοιχεία δείχνουν ότι σε μια ποικιλία ιστών ένα μέρος των κυττάρων αυτών προκύπτουν από την αναγέννηση των επιθηλιακών ή ενδοθηλιακών κυττάρων ή από επιθηλιακά προγονικά βλαστικά κυττάρων μέσω EMT ή από τη μετάβαση ενδοθηλιακών σε μεσεγχυματικά (EndMT). Σε ορισμένες περιπτώσεις, τα κυκλοφορούντα CD34+ του μυελού των οστών, προερχόμενα προγονικά κύτταρα, που ονομάζονται ινοκύτταρα, συμβάλλοντας στη συγκέντρωση μυοϊνοβλαστών στο σημείο της αποκατάστασης τραύματος και στην ίνωση. Η ενεργοποίηση των μυοϊνοβλαστών, ο πολλαπλασιασμός και η επιβίωση τους προκαλούνται από πολλούς εκκρινόμενους, διαλυτούς και φυσικούς παράγοντες στο περιβάλλον, όπως είναι οι κυτοκίνες (IL-1, TNF, TGF- β 1 και IL-13), αυξητικούς παράγοντες (CTGF και PDGF) και μείγμα παραγόντων (θραύσματα υαλουρονάνη, μηχανικό στρες και/ή δυσκαμψία). Κατά την κανονική επούλωση τραύματος, οι μυοϊνοβλάστες υφίστανται απόπτωση μετά την εκ νέου επιθηλίωση του τραύματος, αλλά οι μυοϊνοβλάστες ανακάμπτουν σε ινωτικές περιοχές και είναι γνωστό ότι είναι ανθεκτικοί στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (Σχ. 2.3). [41]



Σχήμα 2.3: Μονοπάτια που προκαλούν την πρόσληψη μεγάλου αριθμού μυοϊνοβλαστών και εκείνων που θα προκληθούν κατά την αντίσταση στην απόπτωση. [41]

2.2.4. Ρύθμιση της ίνωσης μέσω φλεγμονωδών μεσολαβητών

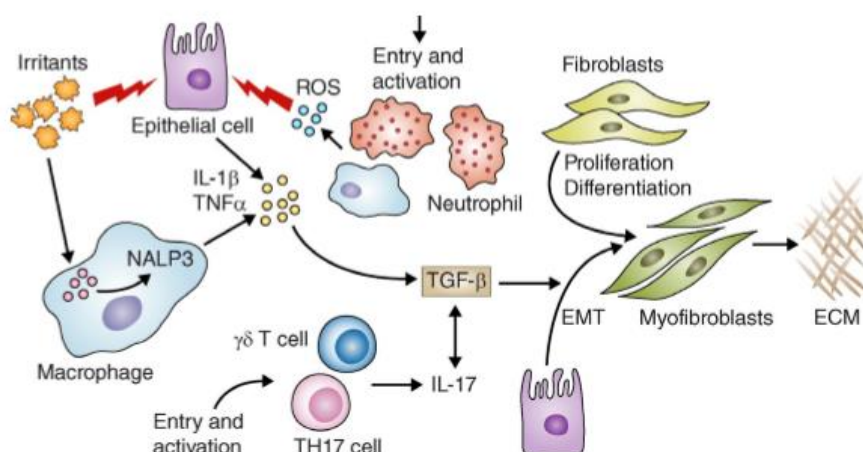
Ο ρόλος των φλεγμονωδών μεσολαβητών είναι πολύ σημαντικός στην έναρξη και την εξέλιξη ορισμένων μορφών πνευμονικής ίνωσης. Σε δείγματα ορού και σε βιοψίες ασθενών με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση έχει παρατηρηθεί αύξηση των επιπέδων TNF και σε ποντίκια με προοδευτική πνευμονική ίνωση, η υπερέκφραση κυτοκινών που εκκρίνονται από φλεγμονώδη κύτταρα (συμπεριλαμβανομένου μακροφάγα, ουδετερόφιλα, μαστοκύτταρα και τα ηωσινόφιλα) και έχουν αναδειχθεί ως πιθανοί στόχοι για τη θεραπεία της ίνωσης. Τα μακροφάγα και πολλοί άλλοι τύποι κυττάρων παράγουν TNF στον πνεύμονα μετά από έκθεση σε διοξείδιο του πυριτίου, αμίαντο, και μπλεομυκίνη. Οι αναστολείς του TNF έχουν δείξει αποτελεσματικοί για τη θεραπεία της IPF, διότι μπορούν να αναστείλουν τη σύνθεση κολλαγόνου στους μυοϊνοβλάστες, οι ανταγωνιστές του TNF μπορεί να έχουν ανεπιθύμητο αποτέλεσμα ως προς την επιδείνωση της νόσου. Όπως ο TNF, έτσι και η IL-1β μπορεί να επάγουν την οξεία πνευμονική βλάβη και να συμβάλλουν στην εξέλιξη της πνευμονικής ίνωσης. Μελέτες έχουν δείξει τον ουσιαστικό ρόλο του TNF-α στην ανάπτυξη της

πνευμονικής ίνωσης με μπλεομυκίνη καθώς και στην υπερέκφραση των TNF-α και (IL-1β) σε ποντίκια με προοδευτική πνευμονική ίνωση. Οι ασθενείς με ιδιοπαθή ή συστηματική σκλήρυνση που σχετίζονται με την πνευμονική ίνωση όπως και άλλες ασθένειες που προκαλούν την πνευμονική ίνωση έχουν υψηλά επίπεδα του TNF-α. Παρόμοιες μελέτες με τον TNF-α, έχουν τεκμηριώσει την ινωτική δραστηριότητα της IL-1β και NALP3/ASC προφλεγμονωδών παραγόντων στη σηματοδότηση στα μακροφάγα. Όπως ο TNF-α, η IL-1β είναι ένας ισχυρός προφλεγμονώδης μεσολαβητής που επιδεινώνει τον τραυματισμό παρεγχυματικών κυττάρων και προκαλεί επίσης τη μετάβαση επιθηλιακών σε μεσεγχυματικά (EMT) και την ενεργοποίηση μυοϊνοβλαστών μέσω του TGF-β1 μέσω ενός μηχανισμού, επιβεβαιώνοντας ότι λειτουργεί ως ένας ισχυρός παράγοντας προώθησης της ίνωσης. Η IL-1β και ο TNF-α αυξάνουν επίσης την έκφραση της IL-6, η οποία δείχνει δραστηριότητα ως αυτοκρινής αυξητικός παράγοντας για ινοβλάστες και ως σημαντικός μεσολαβητής της ίνωσης του ήπατος μετά την έκθεση σε CCL4 και της ίνωσης από απόρριψη μοσχεύματος σε χρόνια καρδιακή πάθηση. Έτσι, φαίνεται ότι πολλοί προφλεγμονώδεις κυτοκίνες έχουν κρίσιμους ρόλους στην παθογένεση της ίνωσης. [41]

Ακόμη, τα ουδετερόφιλα προσελκύουν CXC χημειοκίνες CXCL1 (KC) και CXCL2 (MIP-2) που επίσης αυξάνονται από την IL-β, όπως αντίστοιχα οι ινωτικές κυττοκίνες προέρχονται από αιμοπετάλια και τον αυξητικό παράγοντα (PDGF) και τον αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού-β1 (TGF-β1), που απεικονίζουν το πώς ξεκίνησε οξεία πνευμονική βλάβη. Με τις προφλεγμονώδεις κυτοκίνες και τα ουδετερόφιλα μπορεί γρήγορα να εξελιχθεί μια προοδευτική ινωτική απόκριση και ο ανταγωνιστής του υποδοχέα IL-1 να μειώσει τις ινωτικές επιδράσεις της IL-1β. Η IL-17A έχει επίσης έχει ενοχοποιηθεί για την παθογένεση της πνευμονικής ίνωσης καθώς είναι αυξημένη στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL) των ασθενών με IPF και η έκφραση της συνδέεται με τα ουδετεροφιλα που έχουν παρατηρηθεί σε μια ποικιλία διαταραχών των πνευμόνων, όπως πνευμονία και κυστική ίνωση. Η στρατολόγηση ουδετερόφιλων στο BALF είναι ένας σημαντικός προγνωστικός παράγοντας της πρόωρης θνησιμότητας σε ασθενείς με IPF. Μελέτες όσο αναφορά το μηχανισμό, σε ποντικούς με επαγόμενη ίνωση από μπλεομυκίνη, αναφέρουν ότι η IL-23 και πιθανώς IL-12 είναι σημαντικοί επαγωγείς της IL-17A η οποία εξαρτάται από την ίνωση. Ακόμη τα γδΤ κύτταρα αποτελούν σημαντική πηγή της IL-17A,

CD4⁺ T κύτταρα ταυτοποιήθηκαν ως κυρίαρχοι παραγωγοί της IL-17A μετά από έκθεση σε μπλεομυκίνη. Η παραγωγή της επαγόμενης από μπλεομυκίνη, IL-17A είναι αυξημένη και εξαρτάται από την σηματοδότηση του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού-β1 (TGF-β1) και την ανασυνδυασμένη IL-17α η οποία εξαρτάται από την δραστηριότητα του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού-β1 (TGF-β1), υποδηλώνοντας την αλληλοεξάρτηση των ρόλων IL-17A και TGF-β1 στην ανάπτυξη της πνευμονικής ίνωσης. [40]

Το οξειδωτικό στρες διαιωνίζει επίσης ινωτικές φλεγμονώδεις αντιδράσεις καθώς, η ενεργοποίηση του ινωτικού παράγοντα Nalp3 και την έκκριση IL-1β ρυθμίζονται σε μεγάλο βαθμό από ενεργά είδη οξυγόνου (ROS) που προέρχονται από τα μιτοχόνδρια και την οικογένεια οξειδασών NADPH (NOX) της οι οποίες εκφράζονται στα μακροφάγα και στα ουδετερόφιλα. Η ενεργοποίηση των NOX4 προκαλείται στους πνεύμονες των ποντικών μετά από φαγοκυττάρωση των σωματιδίων και προωθούν την ινογένεση σε δύο διακριτά μοντέλα πνευμονικής ίνωσης. Η NOX4 είναι επίσης αυξημένη σε περιπτώσεις ανθρώπινης IPF. Με βάση το μηχανισμό, η NOX4 είναι απαραίτητη για την επαγόμενη από τον αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού-β1 (TGF-β1), διαφοροποίηση μυοϊνοβλαστών, σύνθεση ECM, και συστατικότητα ινοβλαστών. [40]



Σχήμα 2.4: Προφλεγμονώδη και ινωτικοί μεσολαβητές στην έναρξη και διατήρηση της ίνωσης. [40]

2.2.5 Ο ρόλος του TGF-β στην παθογένεση της IPF

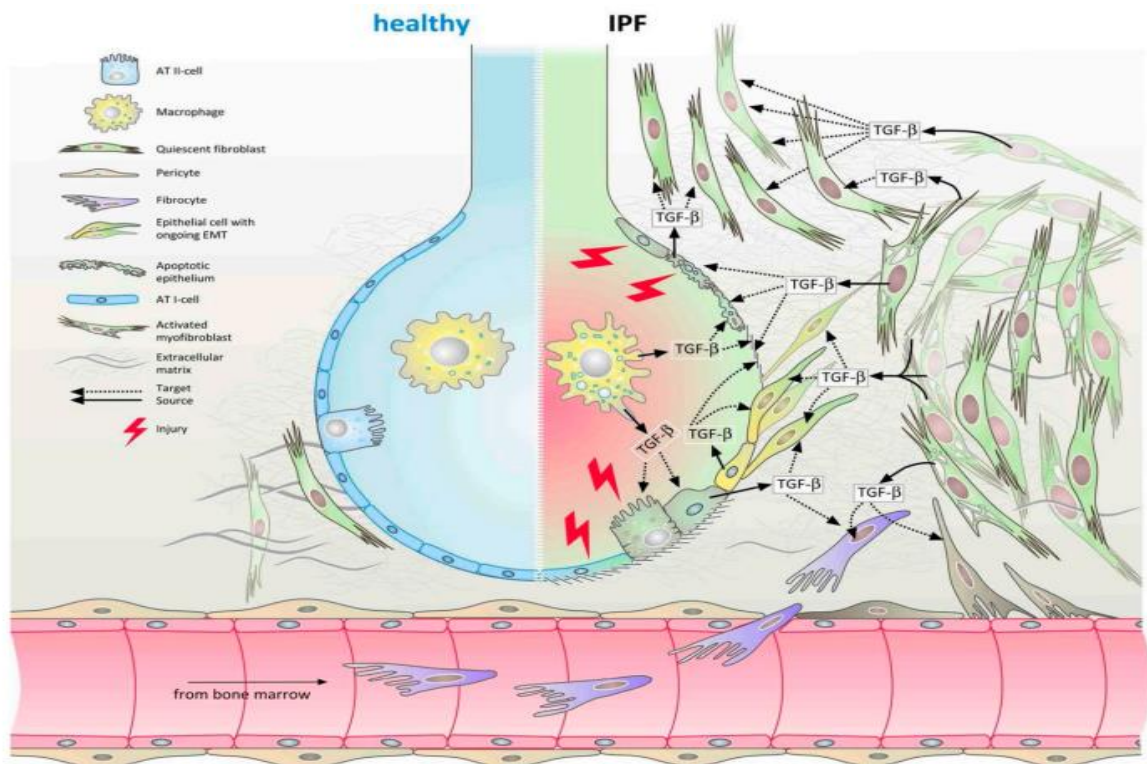
Ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού-β (TGF-β) ανήκει σε μία υπερικογένεια κυτταροκίνων, η οποία συμμετέχει σε ένα ευρύ φάσμα βιολογικών λειτουργιών όπως η κυτταρική διαφοροποίηση, ο πολλαπλασιασμός, η καρκινογένεση και η απόπτωση.

Ο TGF-β είναι μια πρωτεΐνη του εξωκυττάριου χώρου η οποία παράγεται κατά κύριο λόγο από τα T κύτταρα, αλλά εκφράζεται σχεδόν από όλα τα κύτταρα. Στους πνεύμονες, ο TGF-β παράγεται από ποικίλους κυτταρικούς τύπους, τα κυψελιδικά μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα, τα ενεργοποιημένα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τους ινοβλάστες και μυοϊνοβλάστες (Σχ. 2.5).

Έχουν ταυτοποιηθεί τρεις ισομορφές του TGF-β οι β1, β2, και β3. Ο TGF-β1 σχετίζεται περισσότερο με την ανάπτυξη της πνευμονικής ίνωσης (IPF). Συνήθως, εκκρίνεται σε λανθάνουσα κατάσταση και ενεργοποιείται από πρωτεάσες. Έτσι, η ενζυμική πρωτεόλυση από μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMP) MMP9 και MMP2, η απογλυκοζυλίωση ή η αλληλεπίδραση με ιντεγκρίνες (αVb3, αVb5, αVb8, και αVb6), Μπορούν να οδηγήσουν στην ενεργοποίηση του TGF-β.

Ο ρόλος του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού-β (TGF-β) στην παθογένεση της IPF είναι πολύ βασικός καθώς επιδρά στην κυψελιδική βλάβη των επιθηλιακών κυττάρων, στη διαφοροποίηση μυοϊνοβλαστών, στη μετάβαση επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά και στην απόθεση ECM με έμφαση στην ενεργοποίηση σημαντικών μονοπατιών σηματοδότησης.

Όταν ενεργοποιηθεί, ο TGF-β είναι αυξητικός παράγοντας με χημειοτακτική και πολλαπλασιαστικές ιδιότητες. Ο TGF-β επάγει την πρόσληψη μακροφάγων και ινοβλαστών, καθώς και τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών μέσω της έκφρασης του αυξητικού παράγοντα που προέρχεται από αιμοπετάλια (PDGF). Σε αυτά τα κύτταρα, ο TGF-β διεγείρει επίσης την έκφραση ενός αριθμού προφλεγμονωδών και ινωτικών κυτοκίνων, όπως TNF-α, PDGF, IL-1β, ή IL-13, ενισχύοντας την ινωτική απόκριση. [48]



Σχήμα 2.5: Υποθετικό σχήμα για το ρόλο του TGF-β στην παθογένεση της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης (IPF) και πιθανές πηγές του ενεργοποιημένου μυοϊνοβλάστη. [48]

2.2.5.1 TGF-β στον τραυματισμό του επιθηλίου

Η διάσπαση των επιθηλιακών κυττάρων εκκινεί την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων για τον σχηματισμό θρόμβου και αντι-ινωδολυτικών παραγόντων, η οποία χαρακτηρίζεται από επιθηλιακή αύξηση του PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) μία διαδικασία που ρυθμίζεται από τον TGF-β/Smad3. Ο TGF-β παίζει κεντρικό ρόλο ως ένας ισχυρός επαγωγέας απόπτωσης των κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων. Ο υποδοχέας Fas που μεσολαβεί στην απόπτωση είναι απαραίτητος για την επαγόμενη απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων του πνεύμονα από TGF-β. Στη συνέχεια μεσολαβεί η σηματοδότηση Smad3 που απαιτείται για τη ρύθμιση του θανάτου με την επαγωγή Daxx, η οποία είναι μια πρωτεΐνη υποδοχέας που συνδέεται με τη Fas, αλληλεπιδρά με TGF-β II, ενεργοποιεί την JNK/MAPK, και μεσολαβεί στην απόπτωση μέσω Fas. Κατά τη διάρκεια του τραυματισμού, τα επιθηλιακά κύτταρα εκτίθενται σε μια ποικιλία από παράγοντες που προωθούν οξειδωτικές-αντιοξειδωτικές ανισορροπίες. Ενεργά είδη οξυγόνου προωθούν το προϊνωτικό

μικροπεριβάλλον με μεταβολή της ισορροπίας μεταξύ των MMPs και των αναστολέων τους και με άμεση ή έμμεση ενεργοποίηση του TGF-β. [48]

2.2.5.2 TGF-β στο εξωκυττάριο υπόστρωμα

Τα επιθηλιακά κύτταρα ATII (alveolar type II) που έχουν τραυματιστεί, εκκρίνουν ινωτικούς παράγοντες που προωθούν τη διαφοροποίηση των ινοβλαστών σε μυοϊνοβλάστες. Οι μυοϊνοβλάστες εκκρίνουν τον αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού-β (TGF-β), ο οποίος προκαλεί την απόπτωση των κυττάρων ATII, διαιωνίζοντας έτσι την παρεκκλίνουσα διαδικασία επούλωσης. Οι μυοϊνοβλάστες εκφράζουν επίσης υψηλά επίπεδα από τους αναστολείς μεταλλοπρωτεασών (TIMPs) και ECM πρωτεΐνες, αλλά κυρίως κολλαγόνα και ινωδονεκτίνη, προάγοντας έτσι την απόθεση κολλαγόνου που συμβάλλει στην ίνωση. Ο TGF-β, μέσω των μονοπατιών σηματοδότησης Smad, αυξάνει άμεσα τη μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων κολλαγόνου, ιδίως κολλαγόνου A1, -A2, και A3, κολλαγόνο 5 και κολλαγόνο 6. Ένα άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό του TGF-β στην αύξηση της απόθεσης ECM είναι η δημιουργία ενός μικροπεριβάλλοντος που ευνοεί την εναπόθεση ECM (π.χ., επάγοντας μια ανισορροπία μεταξύ των ενζύμων αποικοδόμησης των εξωκυττάρων συστατικών και των αναστολέων τους). Ακόμα κι αν ο ρόλος τους σε ίνωση δεν έχει διευκρινιστεί λόγω της περίπλοκης δράση τους στην διάσπαση ECM συστατικών όπως επίσης και οι υποδοχείς κυτταρικής επιφάνειας ή οι ανενεργοί αυξητικοί παράγοντες, οι MMPs έχει αποδειχθεί ότι είναι σημαντικές στην ανάπτυξη της IPF σε προκλινικές μελέτες και σε ζώα. Η επίδραση των MMPs ελέγχεται περαιτέρω και με μία οικογένεια αναστολέων που ονομάζεται TIMPs. Μερικές ομάδες έχουν προτείνει ότι η MMP-7 μπορεί να έχει ρυθμιστική δράση στην επισκευή επιθηλιακών με την απελευθέρωση προσχηματισμένων TGF-β από ECM. Έχει αποδειχθεί ότι η MMP-7 έκφραση είναι αυξημένη σε ασθενείς με IPF και ότι τα knockout ποντίκια MMP-7/- προστατεύονται από την επαγόμενη ίνωση από μπλεομυκίνη. Επίσης, σε ορό ασθενών με IPF, βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα MMP-1 και MMP-7. [48]

2.2.6 Χημειοκίνες

Οι χημειοκίνες αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια μικρών κυτοκινών με χαμηλό μοριακό βάρος που κυμαίνεται από 7 έως 15kDa. Οι χημειοκίνες και οι υποδοχείς τους είναι σε θέση να ελέγχουν την μετανάστευση και τη διαμονή όλων των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος.

Υπάρχουν δύο οικογένειες χημειοκινών: η οικογένεια των βήτα-χημειοκινών γνωστές ως χημειοκίνες CC και η οικογένεια CXC, που είναι γνωστή ως άλφα-χημειοκίνες. Οι CC χημειοκίνες διεγείρουν κυρίως μονοκύτταρα, αλλά επίσης και τα βασεόφιλα, ηωσινόφιλα, T-λεμφοκύτταρα και φυσικά κύτταρα NK. ενώ οι CXC διεγείρουν κυρίως ουδετερόφιλα. [46]

Ορισμένες χημειοκίνες θεωρούνται προ-φλεγμονώδεις και η απελευθέρωση τους μπορεί να επάγεται κατά την διάρκεια μίας ανοσολογικής απόκρισης καθώς και να εμπλέκονται στην κυτταρική μετανάστευση κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης ή της διατήρησης των ιστών. Οι χημειοκίνες στον πνεύμονα αποτελούν μία μεγάλη οικογένεια χημειοελκτικών που προσλαμβάνουν λευκοκύτταρα, προδρόμους ινοβλάστες και άλλα βασικά κύτταρα που υπάρχουν σε θέσεις τραυματισμού του ιστού. Στον ορό ασθενών με πνευμονική ίνωση διαφόρων αιτίων, τα επίπεδα CCL18 μειώνονται με πτώση της πνευμονικής λειτουργίας, γεγονός που υποδηλώνει ότι θα μπορούσε να αναπτυχθεί ως βιοδείκτης. Αναστολή ή γενετική διαγραφή των CCL2 (μονοκύτταρη χημειοελκτική πρωτεΐνη-1), CCL6 (C10), ή CCR1 παρέχει σημαντική προστασία στην πνευμονική ίνωση που προκαλείται από μπλεομυκίνη. Επίσης, οι CXCL12, CCL12, και CCR2 παίζουν σημαντικό ρόλο στην επαγόμενη από μπλεομυκίνη πνευμονική ίνωση λόγω της διευκόλυνσης πρόσληψης ινοκυττάρων κολλαγόνου που εκκρίνονται. Ωστόσο, δεν προωθούν όλα τα χημειοελκτικά την πνευμονική ίνωση. Οι CXCL10, CXCL11, και CXCR3 αναστέλλουν την επαγόμενη από μπλεομυκίνη ίνωση εμποδίζοντας την πρόσληψη ινοβλαστών, μειώνοντας την αγγειογένεση στον πνεύμονα και την προώθηση της παραγωγής της αντινωτικών κυτοκινών. Έτσι, διαταράσσοντας ή αυξάνοντας ένα ειδικό μονοπάτι σηματοδότησης χημειοκινών μπορεί να έχει σημαντικές επιπτώσεις στην εξέλιξη της πνευμονικής ίνωσης. [40]

2.3 Πειραματικό μοντέλο πνευμονικής Ίνωσης

Τα ζωικά μοντέλα παίζουν σημαντικό ρόλο στην έρευνα των ασθενειών και έχουν προταθεί πολλά μοντέλα για την εξέταση της πνευμονικής παθολογίας. Για τις χρόνιες ασθένειες είναι πιο δύσκολο να βρεθεί αντίστοιχο μοντέλο. Η παθολογία της IPF είναι αρκετά περίπλοκη, δεδομένου ότι η αιτιολογία της νόσου είναι ασαφής και καμία μεμονωμένη μέθοδος η οποία να προκαλεί “IPF” σε ζώα δεν είναι γνωστή. Πολλά διαφορετικά μοντέλα πνευμονικής ίνωσης έχουν αναπτυχθεί όλα αυτά τα χρόνια. Τα περισσότερα από αυτά μιμούνται κάποια, αλλά ποτέ όλα τα χαρακτηριστικά της ανθρώπινης IPF, ιδιαίτερα την προοδευτική και μη αναστρέψιμη φύση της κατάστασης. Μερικές κοινές μέθοδοι περιλαμβάνουν βλάβες από ακτινοβολία, την χορήγηση μπλεομυκίνης, το διοξείδιο του πυριτίου ή αμίαντο, διαγονιδιακά ποντίκια ή τη μεταφορά γονιδίων ινωγόνων κυτοκινών. Μέχρι τώρα, η βασική μέθοδος για την επαγωγή της πειραματικής πνευμονικής ίνωσης στα ζώα είναι η χορήγηση μπλεομυκίνης.

2.3.1 Μπλεομυκίνη

Η μπλεομυκίνη, είναι ένα σύμπλοκο υδατοδιαλυτών πεπτιδίων που προέρχονται από το βακτήριο *Streptomyces verticillatus*. Έχει βρεθεί ότι είναι ένα αποτελεσματικό χημειοθεραπευτικό αντιβιοτικό για τον έλεγχο ορισμένων ανθρώπινων καρκίνων όπως του καρκίνου του δέρματος, του λεμφώματος, του πλακώδους κυτταρικού καρκινώματος, των γεννητικών οργάνων και του κακήθες πλευριτικού εξιδρώματος. Η απουσία της τοξικότητας των αιμοποιητικών κυττάρων ή της ανοσοκατασταλτικής δραστηριότητας έχουν αναφερθεί ως πλεονεκτήματα αυτής της θεραπευτικής ουσίας. Με την αυξανόμενη χρήση, ωστόσο, εμφανίζεται η διάχυτη πνευμονική ίνωση ως μια σοβαρή και ανεξήγητη επιπλοκή της θεραπείας με μπλεομυκίνη. [51,39] Πιστεύεται ότι η μπλεομυκίνη δρα προκαλώντας θραύσματα μονόκλωνων και δίκλωνων τμημάτων DNA και έτσι διακόπτουν τον κυτταρικό κύκλο των καρκινικών κυττάρων. Αυτό συμβαίνει με χηλίωση μεταλλικών ιόντων και την αντίδραση του σχηματιζόμενου ψευδοενζύμου με οξυγόνο, το οποίο οδηγεί στην παραγωγή υπεροξειδίου λόγω διάσπασης του DNA και των ελεύθερων ριζών οξυγόνου. Η υπερπαραγωγή ενεργού υπεροξειδίου μπορεί να οδηγήσει σε μια φλεγμονώδη απόκριση που προκαλεί πνευμονική τοξικότητα, ενεργοποίηση των ινοβλαστών και την επακόλουθη ίνωση. Η υδρολάση της μπλεομυκίνης, είναι ένα

ένζυμο που αδρανοποιεί τη μπλεομυκίνη και επηρεάζει τα αποτελέσματα αυτού του φαρμάκου σε διαφορετικούς ιστούς. Οι πνεύμονες διατηρούν χαμηλά επίπεδα του ενζύμου και ως εκ τούτου είναι πιο επιρρεπείς σε βλάβη του ιστού προκαλούμενη από μπλεομυκίνη. Πνευμονικά ανεπιθύμητα αποτελέσματα σε ασθενείς εξαρτώνται από την δόση της μπλεομυκίνης, σχετίζονται με την ηλικία και εμφανίζονται πιο συχνά με την παρουσία προϋπαρχόντων πνευμονικών νόσων ή το κάπνισμα. Η τοξικότητα του πνεύμονα αναπτύσσεται στο 10% των ασθενών που έλαβαν μπλεομυκίνη και κλινικά σχετίζεται με βήχα, δύσπνοια, πυρετό, κυάνωση, και χειροτέρευση των παραμέτρων πνευμονικής λειτουργίας. Μέσα σε λίγες εβδομάδες έως μήνες αυτή η απάντηση θα μπορούσε να εξελιχθεί σε πνευμονική ίνωση σε 1% των ασθενών. [39]

2.3.2 Μπλεομυκίνη σε ζωϊκό μοντέλο

Η μπλεομυκίνη σε ποντικούς προκαλεί φλεγμονώδεις και ινωτικές αντιδράσεις μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα, ακόμα πιο έντονα μετά από ενδοτραχειακή ενστάλαξη. Η αρχική αύξηση των προ-φλεγμονωδών κυτοκινών (Ιντερλευκίνη-1, Παράγοντα Νέκρωσης Όγκου-α, ιντερλευκίνη-6, η ιντερφερόνη-γ) ακολουθείται από αυξημένη έκφραση των προ-ινωτικών δεικτών (αυξητικός παράγοντας μεταμόρφωσης-β1, ινωδονεκτίνης, προκολλαγόνου-1), με αποκορύφωση την 14^η μέρα. Η εναλλαγή μεταξύ φλεγμονής και ίνωσης φαίνεται να συμβαίνει περίπου την 9^η ημέρα μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης. Αξιοσημείωτες φαίνεται να είναι οι διαφορές ως προς την ευαισθησία ανάπτυξης ίνωσης επαγόμενη με μπλεομυκίνη, στα διάφορα στελέχη ποντικών με CBA και C57BL6 ποντικούς να ανταποκρίνονται ισχυρά και ποντικούς Balbc να είναι σχετικώς ανθεκτικοί στην ίνωση. Οι διαφορές αυτές πιθανόν να οφείλονται σε διαφορετικά πρότυπα έκφρασης κυτοκινών και πρωτεασών/αντι-πρωτεασών. Έχει αναφερθεί ότι τα βασικά ιστολογικά χαρακτηριστικά των ζώων στα οποία έχει χορηγηθεί μπλεομυκίνη όπως η ενδο-κυψελιδική μορφολογία, η ενσωμάτωση του κολλαγόνου και η εξάλειψη του κυψελιδικού χώρου είναι παρόμοια με των ασθενών με IPF. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στην παραδοχή, ότι η μπλεομυκίνη αναπαράγει τα τυπικά χαρακτηριστικά της ανθρώπινης νόσου και ως εκ τούτου, η χρήση του μοντέλου αυτού έχει γίνει πολύ δημοφιλής. Έχουν καθοριστεί για κάθε είδος συγκεκριμένες δόσεις για την επίτευξη μιας ινωτικής απόκρισης, και, ανάλογα με τον τρόπο εισαγωγής της, έχουν αναπτυχθεί διαφορετικά ινωτικά μοτίβα. Η ενδοτραχειακή ενστάλαξη της

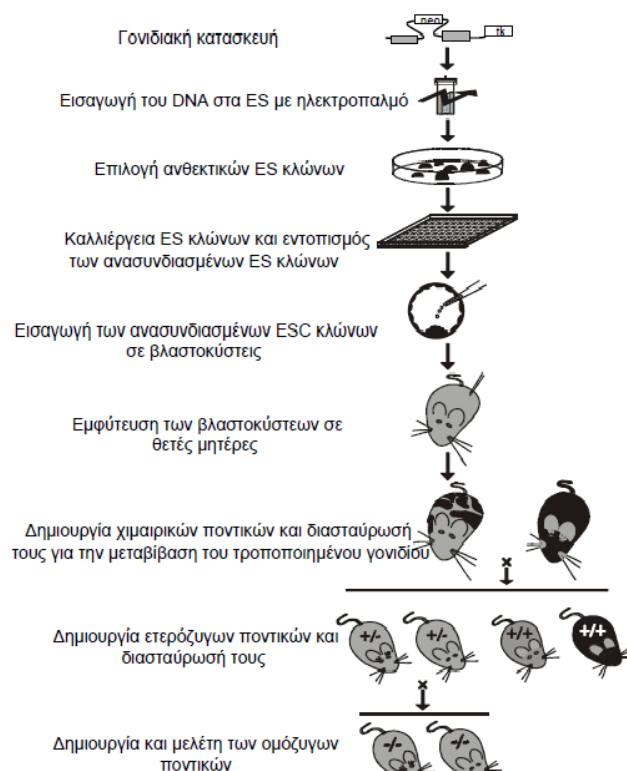
μπλεομυκίνης, είναι η τυπική οδός χορήγησης. Επίσης το μοντέλο μπλεομυκίνης συνέβαλε δραματικά να διευκρινιστούν οι ρόλοι των κυτοκινών, αυξητικών παραγόντων και μονοπατιών σηματοδότησης που εμπλέκονται στην πνευμονική ίνωση. [39]

2.3.3 Διαγονιδιακά ποντίκια (TghuRANKL)

Διαγονιδιακό είναι το ζώο το οποίο έχει υποστεί μια μεταλλαγή στο γονιδίωμα του ή στο οποίο έχει εξαχθεί το γονίδιο, και η αλλαγή αυτή μεταφέρεται στους γαμέτες και κληρονομείται από τους απογόνους. Οι στόχοι της προσθήκης του διαγονιδίου είναι η ανάλυση της γονιδιακής λειτουργίας μέσα από την πειραματική υπερέκφραση και ο συσχετισμός της υπερέκφρασης με τον παθολογικό φαινότυπο.

Τα διαγονιδιακά ποντίκια TghuRANKL εκφράζουν την ανθρώπινη RANKL (huRANKL) σε ορισμένη γονιδιωματική περιοχή. Για την παραγωγή των ποντικών human RANKL transgenic, έγινε εισαγωγή με ένεση γονιδιωματικού θραύσματος 200-kb που περιέχει ολόκληρο το ανθρώπινο γονίδιο RANKL στον πυρήνα εμβρύων ενός κυττάρου. Η τεχνική αυτή είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για τη δημιουργία ζωϊκών μοντέλων για ερευνητικούς σκοπούς.

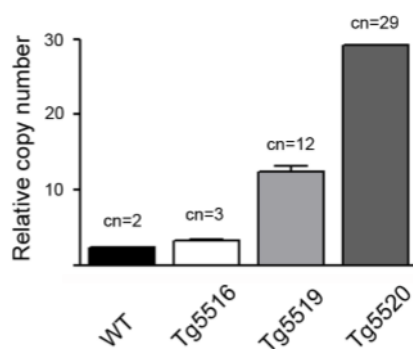
Το DNA που εισάγεται περιέχει ολόκληρο το ανθρώπινο γονίδιο RANKL το οποίο απομονώνεται από ένα κλώνο BAC (RP11-86N24, imagenes GmbH) και κανένα άλλο γονίδιο εκτός από το RANKL δεν κωδικοποιείται στο θραύσμα που εισάγεται. Αποτελείται από έναν επιλεγμένο ενισχυτή και έναν υποκινητή που κατευθύνει τη γονιδιακή έκφραση σε ένα συγκεκριμένο ιστό ή σε ένα συγκεκριμένο αναπτυξιακό στάδιο, σχετικό με την προς έκφραση αλληλουχία. Με την προσέγγιση αυτή μπορεί να μελετηθεί άμεσα στο ποντίκι ο ρόλος των προϊόντων επιλεγμένων γονιδίων ή μεταλλαγών. Η βασική μεθοδολογία για τη δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών απεικονίζεται στο Σχήμα 2.6. Θεωρητικά από τη στιγμή που το ενέσιμο DNA ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του ποντικού, μπορεί να εκδηλώσει τη λειτουργία του. Ωστόσο, αφού η προσθήκη γίνεται τυχαία, υπάρχει ποικιλότητα θέσεων και η λειτουργία των ενδογενών γονιδίων μπορεί να επηρεαστεί.



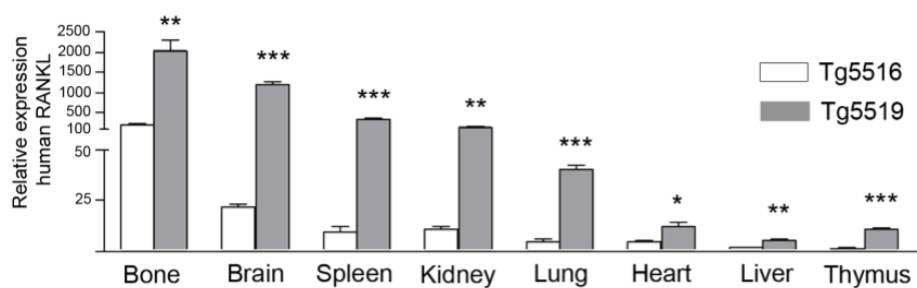
Σχήμα 2.6: Δημιουργία μεταλλαγμένων ποντικών με τη χρήση του ομόλογου ανασυνδιασμού σε ESC .Βασική στρατηγική δημιουργίας knockout ποντικών.

Προέκυψαν τέσσερα διαγονιδιακά ποντίκια, Tg5516, Tg5519, Tg5520, και Tg5521 τα οποία φέρουν διαφορετικά αντίγραφα του γονιδίου huRANKL. Ο αριθμός των αντιγράφων του διαγονιδίου προσδιορίστηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qPCR) χρησιμοποιώντας DNA ουράς από τους ποντικούς TghuRANKL και C57/Bl6 (WT), χρησιμοποιώντας ένα κοινό ζεύγος εκκινητών που ενισχύει τη γονιδιωματική αλληλουχία της ανθρώπινης RANKL και του ποντικού (Σχ. 2.7.A). Προέκυψε, η σειρά Tg5516 χαμηλής έκφραση αντιγράφου (1 επιπλέον αντίγραφο), η σειρά Tg5519 μέσης έκφρασης αντιγράφων (10 επιπλέον αντίγραφα), και η υψηλή έκφραση αντιγράφων της σειράς Tg5520 (27 επιπλέον αντίγραφα). Η ανάλυση των επιπέδων έκφρασης huRANKL στη σειρά Tg5519 σε διάφορους ιστούς, συμπεριλαμβανομένων των οστών, εγκέφαλο, σπλήνα, θύμο, νεφρό, πνεύμονα, καρδιά και το συκώτι φάνηκε να είναι υψηλότερη σε σχέση με τη σειρά Tg5516 (Σχ. 2.7.C).

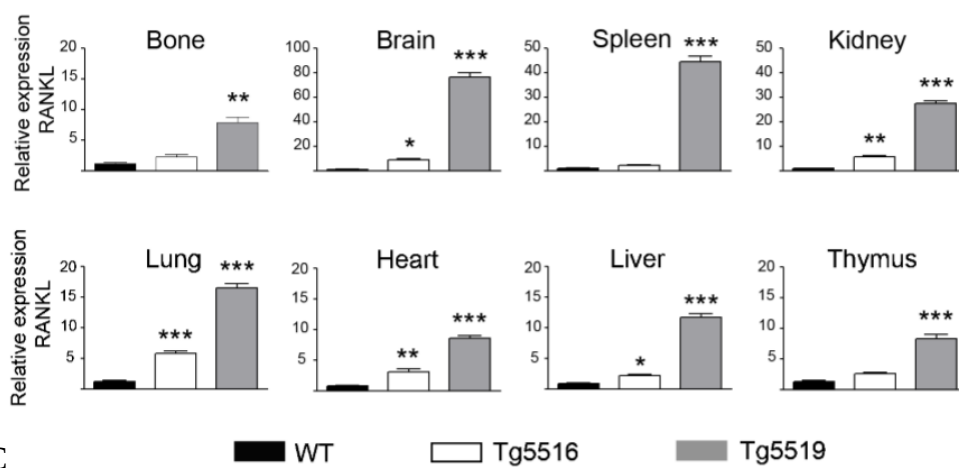
A



B



C



Σχήμα 2.7: Διαγονιδιακά huRANKL ποντίκια και η συγκριτική ανάλυση της έκφρασης τους. Α) Αριθμός των αντιγράφων των διαγονιδίων και ενδογενής έκφραση RANKL ποντικού σε WT, Tg5516, Tg5519 καθώς και σε Tg5520. Β) Έκφραση huRANKL και ποντικού. Γ) Έκφραση RANKL σε διάφορους ιστούς των Tg5516, Tg5519, και WT.[50]

Κεφάλαιο 3: Σκοπός

Η παρούσα εργασία αφορά τη διερεύνηση του ρόλου των γονιδίων RANKL,RANK,OPG στην παθογένεση της πνευμονικής ίνωσης. Είναι γνωστό ότι η πρωτεΐνη RANKL ρυθμίζει τον μεταβολισμό των οστών και οι υποδοχείς της, RANK και OPG συμμετέχουν στην ισορροπία των σκελετικών διεργασιών αναδιαμόρφωσης των οστών. Η έκφραση των γονιδίων αυτών έχει ταυτοποιηθεί σε πολλούς άλλους ιστούς πέρα από τα οστά, συμπεριλαμβανομένου και του πνεύμονα και έχει εντοπιστεί σε πολλές φλεγμονώδεις ασθένειες.

Η αφορμή για να ασχοληθούμε με τα γονίδια RANKL,RANK,OPG στην πνευμονική ίνωση ήταν το άρθρο που δημοσιεύτηκε το 2015 στο European Respiratory Journal, με τίτλο «*The RANKL-OPG balance in pulmonary fibrosis*» από την ομάδα του C.E. Boersma. Σύμφωνα με το άρθρο, έχει προσδιοριστεί η έκφραση της RANKL από τα επιθηλιακά και Τ κύτταρα, της RANK από τα κυψελιδικά μακροφάγα και του OPG από τους ινοβλάστες και τα λεία μυϊκά κύτταρα. Υποστηρίζεται ότι το OPG ρυθμίζει τη διάσπαση ECM (extracellular matrix) και εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα σε ιστούς με πνευμονική ίνωση. Η χορήγηση διαλυτής RANKL σε ποντίκια με πνευμονική ίνωση απέδειξε την επαγωγή του OPG και τη σημασία της αναλογίας RANKL/ OPG στην παθογένεια της PF.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι αρχικά η επιβεβαίωση της έκφρασης των γονιδίων RANKL,RANK,OPG σε ινωτικούς ιστούς πνευμόνων και η σύγκριση με φυσιολογικούς ιστούς, και βασικώς, η μελέτη του ρόλου αυτών των γονιδίων στην εξέλιξη της πνευμονικής ίνωσης σε την χρήση των διαγονιδιακών TghuRANKL ποντικών.

Κεφάλαιο 4. Υλικά και Μέθοδοι

4.1 Εξοπλισμός- Όργανα

- Ανακινούμενοι επωαστήρες
- Αναλυτικός ζυγός
- Θερμικοί κυκλοποιητές-Thermal cyclers (Peqlab και Biorad)
- Μαγνητικός αναδευτήρας
- Μετασχηματιστής- Τροφοδοτικό Power supply (Biorad # 164-5050)
- Πιπέτες
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Συσκευή απιονισμού ύδατος
- Σωληνάρια (0,5/1,5/2ml eppendorfs, Greiner bio-one # 616201)
- Σωληνάρια 0.2 ml eppendorfs PCR tubes thick wall (Sarstedt #72.699)
- Φωτόμετρα
- Ψηφιακή Φωτογραφική μηχανή
- pHμετρο
- Πλαστικά ακρορύχια (tips) της εταιρείας Costar.
- Δοκιμαστικοί σωλήνες των 15ml και 50ml της εταιρείας Falcon.
- Συσκευή με λάμπα UV
- Φούρνος μικροκυμάτων
- Ομογενοποιητής ULTRA TURRAX T25 basic (IKA-Werke)
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος Heraeus Fresco 17 (Thermo scientific)
- Συσκευή Vortex
- Σωληνάρια BIJOUX
- Συσκευή Υδατόλουτρου Memert TYP:WB 10
- Φασματοφωτόμετρο Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific)
- Συσκευή PCR “PeqStar 2x”
- Πλάκα 96-φρεατίων

Όλα τα υαλικά και πλαστικά είδη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αποστειρωμένα.

4.2 Υλικά

- Αγαρόζη, Agarose (Invitrogen # 16500500)
- Διάλυμα λύσης (Tail Buffer) 1L
- Πρωτεΐνάση K, Proteinase K (10 mg/ml) (Roche #3115879)
- Ρυθμιστικό διάλυμα 10x TBE
- Χρωστική Orange G (DNA loading buffer)
- Taq πολυμεράση
- Μονοφασικό διάλυμα φαινόλης και ισοθειοκυανικής γουανιδίνης-TRIzol Reagent Invitrogen (TR118)
- DEPC-H₂O (RNase free)
- Χλωροφόρμιο
- Διάλυμα άλατος (0.8M C₆H₅Na₃O₇·2H₂O και 1,2M NaCl)
- Αιθανόλη 75%
- Διάλυμα 10x PCR (500 mM χλωριούχο κάλιο, 100mM Tris-υδροχλωρίου με pH 9.0 στους 25 °C, 1% Triton X-100)
- Χλωριούχο μαγνήσιο (Panreac, CR 161696)
- Εκκινητές με συγκέντρωση 5 pmol/μL, Macrogen
- Ένζυμο αντίστροφης μεταγραφάσης, M-MLV RT (Promega)
- Ένζυμο: RQ1 & RNase-free DNase (Promega), (M6101)
- Διάλυμα γλυκογόνου 10 μg/μL
- Διάλυμα οξικού νατρίου 3M
- Αιθανόλη 100%
- Βορικό οξύ, Boric acid (Fisher Scientific #BP168-1)
- dNTPs δεόξυριβονουκλεοτίδια (Invitrogen#18427-088 και Fermentas#R0181)
- DPX (Dibutyl phthalate), (Sigma, #80100)
- EtBr Βρωμιούχο αιθίδιο ethidium bromide (Sigma, #E1510)
- EDTA αιθύλενο διαμινω τετρα οξικό οξύ (Applichm #A2937 1000)
- Ισοπροπανόλη (AppliChem #DS-22,0005)
- Μεθανόλη (Merk #K40357009)
- H₂O PCR, Gibco distilled water DNase/RNase Free (Invitrogen #05686)
- Na₂CO₃, ανθρακικό νάτριο (Merck #1.06393.1000)
- NaHCO₃, όξινο ανθρακικό νάτριο (Sigma #S-7277)

- Acid fuchsin
- Aniline blue
- Biebrich scarlet
- Ferric chloride
- Φορμαλδεΰδη (37-40%)
- Οξικό οξύ 0,5 M
- Αιματοξυλίνη
- Υδροχλωρικό οξύ
- Phosphomolybdic acid
- Phosphotungstic acid
- Πικρικό οξύ (κορεσμένο)
- Διάλυμα Scott's
- Διάλυμα Εωσίνης
- Διάλυμα Bradford (Sigma-Aldrich)
- Direct Red 80 (Sigma-Aldrich)
- Κολλαγόνο Type I, από Rat Tail (Sigma-Aldrich)
- PBS pH7.4

4.3 Δείγματα

Ζώα

Όλα τα ποντίκια ανατράφηκαν στις εγκαταστάσεις ζώων στο Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών “Αλέξανδρος Φλέμινγκ”, υπό συγκεκριμένες μη παθογόνες συνθήκες. Η θερμοκρασία ήταν σταθερή στους 20-22°C, η υγρασία στο 55±5% και ο κύκλος μέρας-νύχτας ήταν 12 ώρες. Τα ποντίκια διατηρήθηκαν στα αντίστοιχα γενετικά τους υπόβαθρα για περισσότερο από δέκα γενιές. Όλα τα πειράματα είχαν την έγκριση τόσο της Επιτροπής Βιοηθικής του Ε.Κ.Ε.Β.Ε., όσο και της Διεύθυνσης Κτηνιατρικής Υπηρεσίας της Περιφέρειας Αττικής. Όλες οι ενέργειες και οι επεμβάσεις στα ζώα πραγματοποιήθηκαν με τον λιγότερο επώδυνο τρόπο, ενώ η ευθανασία των ζώων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τα διεθνή πρωτόκολλα.

Κύτταρα

Για τα *in vitro* πειράματα καλλιέργηθηκαν πρωτογενή κύτταρα ινοβλαστών από C57/Bl6 τα οποία αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο που περιέχει Dulbecco's Mod Eagle Medium 10x (DMEM με 4.5 g/L D-glucose και 8 mg/L phenol red, F0455 της Biochrom) σε αραίωση 1x, 10% ορό εμβρύου μόσχου (FBS, Sigma-Aldrich) για την παροχή αυξητικών παραγόντων, 2 mM L-glutamine (25030, GIBCO) αμινοξέπου λειτουργεί ως πηγή αζώτου και ενέργειας, 0,375 % (w/v) διττανθρακικό νάτριο (sodium bicarbonate, 25080, GIBCO) μια αμφοτερική ένωση για τη διατήρηση του pH και ένα μίγμα αντιβιοτικών πενικιλίνης - στρεπτομυκίνης (15140, GIBCO) σε συγκέντρωση 100 units/ml πενικιλίνη και 100 µg/ml στρεπτομυκίνη, ενώσεις που αναστέλλουν την ανάπτυξη κατά Gram θετικών και κατά Gram αρνητικών βακτηρίων, αντίστοιχα. Οι καλλιέργειες διατηρούνται σε θάλαμο 37 °C και σταθερής συγκέντρωσης διοξειδίου του άνθρακα 5%, ενώ ανακαλλιεργούνται κάθε τρεις ημέρες. Στις καλλιέργειες αυτές έγινε προσθήκη διάφορων συγκεντρώσεων TGF-β για τη δημιουργία ινωτικού περιβάλλοντος. Το γκρουπ ελέγχου δεν περιείχε TGF-β.

Μπλεομυκίνη και μοντέλο πνευμονικής ίνωσης

Με σκοπό να μελετήσουμε την έκφραση των γονιδίων RANKL, RANK, OPG κατά τη διάρκεια της πνευμονικής ίνωσης ακολουθήσαμε το μοντέλο της μπλεομυκίνης. Συγκεκριμένα, την ημέρα 0 χορηγούνται μπλεομυκίνη (0,08U/ποντίκι)

ή φυσιολογικός ορός (saline) με ενδοτραχειακή ένεση, στην πειραματική και στην ομάδα ελέγχου αντίστοιχα. Στη 14η ημέρα έχουμε επαρκή ανάπτυξη ίνωσης που έχει ξεκινήσει από την 7η ημέρα. Την ημέρα 14 γίνεται λήψη βρογχοκυψελιδικού υγρού (BALF), αίματος και η συλλογή του ιστού για περεταίρω μελέτη.

Συλλογή αίματος (πλάσματος)

Η συλλογή αίματος από τα ποντίκια πραγματοποιήθηκε μετά την ευθανασία του ζώου, με την χρήση ξηρού πάγου. Το αίμα λαμβάνεται από την κοιλιακή αορτή, και προστίθεται 10% του όγκου 5mM EDTA ως αντιπηκτικό και μετά από φυγοκέντρηση στα 2000 g για 20 min λαμβάνεται το υπερκείμενο (πλάσμα). Το πλάσμα αποθηκεύεται σε ειδικά σωληνάκια (0,5ml και siliconised eppendorf) στους -20°C για περαιτέρω μελέτη.

Συλλογή BALF

Η συλλογή BALF πραγματοποιείται με τη χρήση ενδοτραχειακού καθετήρα. Συγκεκριμένα, πραγματοποιούνται 3 εγχύσεις φυσιολογικού ορού (saline) όγκου 1 ml η καθεμία. Σε κάθε ένα από τα στάδια αυτά εγχύεται 1 ml saline ενδοτραχειακά και αναρροφάται (συνήθως λιγότερο από 1ml). Το πρώτο δείγμα συλλογής BALF (BALF 1) φυγοκεντρείται για δέκα λεπτά στις 1200 rpm στους 4°C, μεταφέρεται το υπερκείμενο υγρό σε siliconised eppendorf και αποθηκεύεται στους -80°C για να χρησιμοποιηθούν στις μετρήσεις Bradford και Direct Red. Το ίζημα, δηλαδή τα κύτταρα επαναδιαλύονται στο BALF2-3 και στη συνέχεια φυγοκεντρείται για δέκα λεπτά στις 1200 rpm στους 4°C, αφαιρείται το υπερκείμενο υγρό και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 1 ml PBS για τη μέτρηση των κυττάρων.

Συλλογή ιστού

Γίνεται έγχυση 5-10 ml PBS στην δεξιά πλευρά της καρδιάς για τον καθαρισμό του πνεύμονα από το αίμα. Απομονώνεται ο αριστερός λοβός με ράμματα, μεταφέρεται σε σωληνάριο και φυλάσσεται σε υγρό άζωτο. Μεταφέρονται τα δείγματα στους -80°C για την περεταίρω επεξεργασία του ιστού, για την απομόνωση RNA ή πρωτεϊνών. Ακολουθεί η διασωλήνωση της τραχείας με καθετήρα και η έγχυση 1 ml φορμαλίνης. Απομακρύνεται ο καθετήρας, κόβεται η τραχεία με ράμματα και μεταφέρονται μαζί με τον υπόλοιπο πνεύμονα και την καρδιά σε σωληνάκια (5ml) με φορμαλίνη (4%) για 24 ώρες. Μετά αντικαθιστάται η φορμαλίνη

με PBS και αποθηκεύονται στους 4°C. Αφαιρείται η καρδιά και η τραχεία, κόβεται ο πνεύμονας σε 4 λοβούς και τοποθετούνται σε κασέτες. Στη συνέχεια, οι ιστοί παραφινοποιούνται σε ένα ειδικό μηχάνημα και στη συνέχεια ακολουθεί η σκίνωση με υγρή παραφίνη που κάτω από τους 62°C στερεοποιείται. Έτσι έχουμε τους παραφινοποιημένους ιστούς στις κασέτες, για την ιστολογική μελέτη.

4.4 Μέθοδοι

4.4.1 Απομόνωση DNA

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος της φαινόλης βασίζεται στην ισχυρή πρωτεολυτική δράση της πρωτεάσης K συνδυασμένης με την ικανότητα αποδιάταξης του ιονικού αντιδραστηρίου SDS (δωδεκυλοσουλφονικού νατρίου). Σύμφωνα με το βασικό πρωτόκολλο στο τμήμα του ιστού προστίθεται διάλυμα προτεΐνάσης K και SDS, αφήνεται προς επώαση έως ότου το μεγαλύτερο ποσοστό της κυτταρικής πρωτεΐνης αποσυντεθεί. Κατόπιν το δείγμα υφίσταται αποπρωτεΐνωση με την προσθήκη φαινόλης και εν συνεχεία ισοπροπανόλη για την εξαγωγή και καταβύθιση του DNA.

Μέθοδος

1. Ονοματίζεται το ποντίκι
2. Κόβεται όχι περισσότερο από 5 mm ουράς και τοποθετείται σε σωληνάριο (eppendorf) 1,5ml
3. Προστίθενται 400 μ l διάλυμα λύσης, με 4 μ L προτεΐνάσης (proteinase) K σε κάθε σωληνάριο
4. Επώαζεται όλη την νύχτα στους 55°C σε υδατόλουτρο έως ότου το τρίχωμα της ουράς γίνει ορατό. Αν το δείγμα αποθηκευτεί σε αυτό το στάδιο προστίθεται διάλυμα λύσης χωρίς προτεΐνάση K και καταψύχεται στους -20°C
5. Προστίθενται 400 μ l φαινόλη σε κάθε σωληνάριο
6. Αναδεύεται πολύ ισχυρά για 5 min
7. Φυγοκεντρείται για 10 min στις 16.200 g
8. Με ιδιαίτερη προσοχή μεταφέρονται 350 μ l από την πάνω φάση σε καθαρά σωληνάριο του 1,5ml
9. Προστίθεται 315 μ l (0.9 του όγκου που πήραμε) ισοπροπανόλη
10. Φυγοκεντρείται για 10 min στις 16.200 g στους 4°C ώστε να γίνει η καταβύθιση του DNA

11. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και στο ίζημα προστίθονται 500μL 70% αιθανόλης. Ακολουθεί φυγοκέντρηση όπως παραπάνω και απόρριψη εκ νέου του υπερκείμενου
12. Αφήνεται σε ξηρό αέρα
13. Τέλος επαναδιαλύεται το DNA σε σωληνάρια 1,5 ml που περιέχουν 50 μL (ο όγκος επαναδιάλυσης εξαρτάται από την μάζα του DNA) ddH₂O, για 15 min
14. Αποθηκεύονται στους 4°C αν πρόκειται να επεξεργαστούν σύντομα ειδάλλως για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα στους -20°C.

Παρασκευή διαλυμάτων μεθόδου.

➤ Διάλυμα λύσης (Tail Buffer) 1L

Tris pH 8,0 1M 50 ml (50 mM τελική συγκέντρωση)

EDTA 0,5 M 200 ml (100 mM τελική συγκέντρωση)

NaCl 5 M 20 ml (100 mM τελική συγκέντρωση)

ddH₂O 630 ml

Φίλτρο 0,22μm, αποστείρωση

SDS 10% 100 ml (1% τελική συγκέντρωση)

Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

➤ Πρωτεΐνάση K, Proteinase K (10 mg/ml)

100 mg Proteinase K

10 ml 50mM Tris pH 8.0

Καλή ανάδευση, διαιρείται σε κλάσματα των 500 μL και φυλάσσεται στους -20°C.

4.4.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Αρχή της μεθόδου

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια μέθοδος για την *in vitro* ενίσχυση συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Μέσω της PCR καθίσταται δυνατή η παραγωγή τεράστιου αριθμού πιστών αντιγράφων μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA με σχετικά απλό τρόπο. Η αντίδραση PCR σχεδιάστηκε και παρουσιάστηκε από τον Dr K. Mullis το 1983. Το 1989 το περιοδικό *Science* επέλεξε την PCR σαν το "μέγιστο επιστημονικό επίτευγμα" και την Taq DNA πολυμεράση σαν το "μόριο της χρονιάς". Το 1993 ο K. Mullis τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ Χημείας. Η αντίδραση PCR εκμεταλλεύεται ορισμένα χαρακτηριστικά του *in vivo* μηχανισμού αντιγραφής του DNA με σκοπό την *in vitro* ενίσχυση συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί μονόκλωνο μόριο DNA ως εκμαγείο για την σύνθεση ενός νέου συμπληρωματικού κλώνου. Τα μονόκλωνα μόρια μπορούν να παραχθούν με απλό τρόπο από δίκλωνα μόρια DNA, όταν αυτά θερμαίνονται σε υψηλές θερμοκρασίες, οπότε αποχωρίζονται. Η DNA πολυμεράση απαιτεί επίσης την παρουσία ενός μικρού τμήματος δίκλωνου DNA για την έναρξη της σύνθεσης. Επομένως το σημείο έναρξης της σύνθεσης του DNA μπορεί να καθοριστεί με τη χρήση ενός ολιγονουκλεοτιδικού εναρκτήριου μορίου (εκκινητή, primer) που συνδέεται με τη μήτρα σε αυτό ακριβώς το σημείο. Σημαντικό χαρακτηριστικό της αντίδρασης PCR είναι ότι μπορούμε μέσω των κατάλληλων εκκινητών να κατευθύνουμε την DNA πολυμεράση να συνθέσει συγκεκριμένη περιοχή του DNA. Και οι δύο κλώνοι του DNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εκμαγεία για την σύνθεση DNA, εφόσον υπάρχει ένας εκκινητής για κάθε μία αντίδραση. Ακόμη ένα χαρακτηριστικό της αντίδρασης PCR είναι η εκθετική "ενίσχυση" της συγκεκριμένης περιοχής του DNA-στόχου. Το τελικό αποτέλεσμα μιας αντίδρασης PCR μετά από n κύκλους είναι η παραγωγή, θεωρητικά, $2n$ δίκλωνων μορίων DNA, που είναι πιστά αντίγραφα της αλληλουχίας του DNA που περικλείεται μεταξύ των εκκινητών. Ένα τυπικό πρωτόκολλο PCR περιλαμβάνει πολλούς κύκλους (συνήθως 25-35), ο καθένας εκ των οποίων περιλαμβάνει επώαση των δειγμάτων σε 3 διαφορετικές θερμοκρασίες με βάση τα ακόλουθα βήματα:

- Αποδιάταξη (denaturation) Το μίγμα θερμαίνεται αρχικά στους 95°C για περίπου 5 min. Σε αυτή τη θερμοκρασία τα δίκλωνα μόρια DNA αποχωρίζονται

τελείως και έτσι παράγονται οι μονόκλωνες αλυσίδες που θα χρησιμεύσουν ως εκμαγεία για τους εκκινητές και τη DNA πολυμεράση.

- Υβριδισμό (annealing). Στη συνέχεια η θερμοκρασία μειώνεται ώστε οι εκκινητές να υβριδοποιηθούν με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στα μόρια του μονόκλωνου DNA. Η θερμοκρασία υβριδισμού αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την εξειδίκευση της αντίδρασης PCR. Οι θερμοκρασίες και οι χρόνοι που χρησιμοποιούνται ποικίλουν ανάλογα με τις αλληλουχίες που ενισχύονται.
- Επέκταση (extension) Στο επόμενο βήμα η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C, περιοχή βέλτιστης θερμοκρασίας για την θερμοσταθερή Taq DNA πολυμεράση, ώστε να εκτελέσει τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσού DNA. Ο χρόνος επώασης στους 72°C ποικίλει ανάλογα με το μήκος του τμήματος στόχου που θέλουμε να ενισχύσουμε.
- Τέλος, η θερμοκρασία αυξάνεται και πάλι στους 95°C, μόνο για λίγα δευτερόλεπτα, έτσι ώστε τα μικρά τμήματα δίκλωνου DNA (που αποτελούνται από την αρχική και τη νεοσυντιθέμενη συμπληρωματική αλυσίδα) να αποχωριστούν και πάλι. Αυτές οι μονόκλωνες αλυσίδες αποτελούν τα εκμαγεία για τον επόμενο γύρο σύνθεσης DNA και επαναλαμβάνονται συνήθως 25-35 κύκλοι αποχωρισμού των αλυσίδων, υβριδισμού των εκκινητών και σύνθεσης DNA. Ο χρόνος προέκτασης του τελικού κύκλου είναι συνήθως μεγαλύτερος (~5min) έτσι ώστε να δοθεί χρόνος στην πολυμεράση για την ολοκλήρωση της προέκτασης όλων των προϊόντων

Μέθοδος

1. Το αρχικό υλικό για μία αντίδραση PCR είναι δείγμα DNA το οποίο περιέχει την αλληλουχία-στόχο. Δεν είναι απαραίτητο να έχει απομονωθεί μόνο η αλληλουχία DNA που πρόκειται να ενισχυθεί διότι αυτή μπορεί να καθορισθεί από τους εκκινητές που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση. Έτσι πρώτα, προστίθεται 1μL (80ng) του προτύπου DNA στο κατάλληλο σωλήνα.
2. Οι εκκινητές ήταν αποθηκευμένοι στους -20°C σε συγκέντρωση 100 pmol/μL. Από αυτούς ένα μέρος αραιώθηκε σε τελική συγκέντρωση 5 pmol/μL για χρήση στα πειράματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Συγκεκριμένα σε σωληνάρια τύπου eppendorf 1.5 mL, προστέθηκαν 5 μL του αντίστοιχου εκκινητή και 95 μL H₂O.

3. Στη συνέχεια προστίθενται τα συστατικά με την ακόλουθη σειρά: αποστειρωμένο mqH_2O , 10x Buffer PCR, MgCl_2 , dNTPs, εκκινητές και στη συνέχεια προστίθεται η Taq πολυμεράση. Ανακίνηση του διαλύματος και διανομή 19 μL σε κάθε σωλήνα. Ένα γενικό πρωτόκολλο εργασίας περιγράφεται στον πίνακα 4.1

Πίνακας 4.1 Ενδεικτική σύσταση μίγματος αντίδρασης PCR.

Αντιδραστήριο	Όγκος
Εκμαγείο DNA	1 μL
Taq πολυμεράση	0.4 μL
10x buffer	2 μL
DNTPs	2 μL
MgCl_2	1.2 μL
Reverse primer	1 μL
Forward primer	1 μL
dsH ₂ O	11.4 μL
Συνολικός όγκος	20 μL

4. Τέλος εκτελείται το κατάλληλο πρόγραμμα. Η θερμοκρασία υβριδισμού (annealing temperature), εξαρτάται από το μήκος και τη σύσταση των εκκινητών σε βάσεις GC. Όταν το μήκος των εκκινητών δεν είναι μεγαλύτερο των 20 βάσεων, η θερμοκρασία τήξης μπορεί να προσεγγισθεί από τον τύπο: $T_m = (A+T) \times 2^\circ\text{C} + (G+C) \times 4^\circ\text{C}$. Η γνώση της T_m βοηθά κυρίως για τον καθορισμό του πειραματικού σημείου έναρξης της βελτιστοποίησης. Θερμοκρασία 55°C είναι καλή για αρχή, όσον αφορά ένα τυπικό ολιγονουκλεοτιδικό εκκινητή 20 βάσεων με περίπου 50% σύσταση σε GC. Μεγαλύτερες θερμοκρασίες μπορεί να είναι απαραίτητες προς αύξηση της ειδικότητας του εκκινητή. Ως καλύτερη θερμοκρασία υβριδοποίησης επιλέγεται συνήθως η υψηλότερη θερμοκρασία που δίνει τα καλύτερα προϊόντα. Η πολύ μεγάλη μοριακή περίσσεια των εκκινητών στο μίγμα της αντίδρασης καθιστά δυνατή την υβριδοποίηση σχεδόν στιγμιαία και δεν απαιτείται περαιτέρω επώαση στη θερμοκρασία υβριδισμού.

Παρασκευή διαλυμάτων μεθόδου.

➤ Taq πολυμεράση

Το *Thermus aquaticus*, ένα θερμοφίλο βακτήριο, απομονώθηκε στο Yellowstone National Park και περιγράφηκε 20 χρόνια πριν την ανακάλυψη της Taq πολυμεράσης. Η Taq πολυμεράση είναι το πιο δημοφιλές ένζυμο για χρήση στην PCR. Η βέλτιστη θερμοκρασία για την ενζυμική δράση της Taq πολυμεράσης είναι οι 72°C, αλλά είναι αρκετά σταθερή ακόμα και στους 94°C. Προστίθεται μόνο μία φορά στην αρχή της αντίδρασης και παραμένει ενεργός σε όλη την διάρκεια των κύκλων, καθιστώντας δυνατή την αυτοματοποίηση της PCR με την χρήση ειδικών οργάνων, των θερμικών κυκλοποιητών (thermal cyclers).

➤ Εκκινητές, primers:

Ο σχεδιασμός και η επιλογή ενός ικανού και ειδικού εκκινητή αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την επιτυχία της αντίδρασης PCR. Αν και δεν υπάρχουν συγκεκριμένοι κανόνες οι οποίοι να βοηθούν στην επιλογή ενός αποτελεσματικού ζεύγους εκκινητών, υπάρχουν ειδικά λογισμικά προγράμματα που βοηθούν αρκετά στην επιλογή. Είναι φανερό ότι οι εκκινητές είναι αυτοί που θα οδηγήσουν στην επιτυχία ή αποτυχία της αντίδρασης, περισσότερο από κάθε άλλον παράγοντα. Η μοριακή αναλογία των εκκινητών ως προς το DNA στόχο πρέπει να είναι αρκετά μεγάλη. Οι εκκινητές διατηρούνται σε απόθεμα 100pmol/μl. Η συγκέντρωση που χρησιμοποιείται είναι 5pmol/μl. Στον πίνακα 2.4.2.2 παρουσιάζονται οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 4.2. Αλληλουχίες των χρησιμοποιούμενων εκκινητών (Rinotas, V et al. 2014).

	Primer Length	Sequence (5'→3')	Gene
Reverse primer	20bp	5'CTTGC CTTGAT GGAGAG CCT;	Mouse RANKL
Forward primer	19bp	5'TCGCT CGATTT GCAGGT CT	

Reverse primer	20bp	5'TGTAC TTTCGA GCGCAG ATG	OPG
Forward primer	20bp	5'AGGCT TGTTTC ATCCTC CTG	
Reverse primer	20bp	5'ACGCG TATTTA CAGCCA GTG	Human RANKL
Forward primer	20bp	5'CCCGT AATTGC TCCAAT CTG	

➤ **Συγκέντρωση ιόντων Mg^{2+} σε μορφή $MgCl_2$:**

Η τελική συγκέντρωση που χρησιμοποιείται είναι 25mM. Η συγκέντρωση των ιόντων Mg^{2+} έχει μεγάλη επίδραση στην ειδικότητα και στη ποσότητα του προϊόντος της αντίδρασης PCR. Σε κάθε πρωτόκολλο πρέπει να γίνεται βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης ιόντων Mg^{2+} . Συγκεντρώσεις περίπου 1,5mM είναι συνήθως βέλτιστες, αλλά σε μερικές περιπτώσεις διαφορετικές συγκεντρώσεις Mg^{2+} μπορεί να αποδειχθούν απαραίτητες. Γενικά, περίσσεια Mg^{2+} θα έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση μη ειδικού προϊόντος, ενώ έλλειψη Mg^{2+} θα μειώσει την ποσότητα του προϊόντος.

Για 5ml:

$MgCl_2$ 0.5M: 0.25ml

Gibco H_2O : 4.75ml

➤ **Συγκέντρωση τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοζιτών (dNTPs):**

100mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP .

Τα dNTPs (δηλ. dATP, dCTP, dGTP και dTTP) αποτελούν τα απαραίτητα συστατικά για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας του DNA στην αντίδραση PCR. Στην αντίδραση PCR οι συγκεντρώσεις των dNTPs κυμαίνονται μεταξύ 50-200μM.

Υψηλότερες συγκεντρώσεις μπορεί να προκαλέσουν την παραγωγή παραπροϊόντων από την πολυμεράση και πρέπει ν' αποφευχθούν. Η τελική συγκέντρωση που χρησιμοποιείται είναι 2.5mM.

Για 500μL

Gibco H₂O: 450 μL

dATP: 12.5 μL

dCTP: 12.5 μL

dGTP: 12.5 μL

dTTP: 12.5 μL

➤ **10x PCR Buffer:**

Για 5ml :

KCl 1M: 2.5ml

1M Tris HCl pH 9.0: 0.5ml

Gibco H₂O: 1.95ml

Filter 0.2μm or autoclave

1% Triton X-100: 5

4.4.3 Μέθοδος Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real -time PCR)

Αρχή της Μεθόδου

Η real-time PCR ή PCR στον πραγματικό χρόνο είναι μία ποσοτική αντίδραση PCR κατά την οποία η μεγέθυνση του DNA στόχου και η ανίχνευση του προϊόντος γίνονται ταυτόχρονα στο ίδιο σωληνάριο, διότι το προϊόν που παράγεται συνδέεται με φθορίζουσα χρωστική που ανιχνεύεται από το οπτικό σύστημα του ειδικού κυκλοποιητή που χρησιμοποιείται στη real-time PCR. Με το όργανο αυτό καταγράφεται η κινητική της μεγέθυνσης του DNA από την ένταση του σήματος του φθορισμού που αντανακλά το ποσό του συντιθέμενου νέου DNA. Έτσι μπορεί να

μετρηθεί επακριβώς το ποσό του DNA. Η μέθοδος παρακολούθησης φθορισμού γίνεται με την EVAGreen η οποία αποτελεί το φθοροσμοφόρο αναφοράς. Πρόκειται για μια χρωστική δέσμευσης με το DNA το οποί αποτελεί το προϊόν της PCR. Καθώς ο κύκλος της αντίδρασης προχωρά, καταγράφεται η αύξηση του φθορισμού έναντι του χρόνου.

Συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της αντίδρασης PCR, ένα κατώφλι- σήμα φθορίζουσας χρωστικής καθορίζει σε πιο σημείο όλα τα δείγματα μπορούν να συγκριθούν. Αυτό το κατώφλι υπολογίζεται ως συνάρτηση του ποσού του υπόβαθρου της φθορίζουσας χρωστικής και τελικά ο κλασματικός αριθμός των κύκλων PCR που απαιτούνται για να παράγουν αρκετό σήμα φθορίζουσας χρωστικής που θα φθάσει σε αυτό το κατώφλι χαρακτηρίζεται ως κατώφλι κύκλου (cycle threshold, Ct). Οι τιμές Ct εξαρτώνται απόλυτα από το αρχικό ποσό του δείγματος και είναι η βάση για τον υπολογισμό των DNA αντιγράφων ή των επιπέδων έκφρασης του mRNA.

Η γραφική παράσταση πολλαπλασιασμού είναι η συνάρτηση του φθορισμού σε σχέση με τον αριθμό των κύκλων. Ως baseline ορίζονται οι κύκλοι PCR κατά τους οποίους το σήμα συσσωρεύεται μεν αλλά είναι κάτω από τα όρια ανίχνευσης από το μηχάνημα. Αυτό το σήμα χρησιμοποιείται για τη χάραξη του κατωφλιού. Το κατώφλι υπολογίζεται επί 10 φορές της κανονικής παρέκκλισης από το μέσο σήμα της χρωστικής της baseline. (The threshold is calculated as 10 times the standard deviation of the average signal of the baseline fluorescent signal.). Σήμα χρωστικής το οποίο ανιχνεύεται πάνω από το κατώφλι θεωρείται πραγματικό και χρησιμοποιείται για το καθορισμό του κατώφλι κύκλου (Ct) για ένα δείγμα. Οι τιμές του Ct καθορίζονται από τον κλασματικό αριθμό των PCR κύκλων, κατά τους οποίους το σήμα της χρωστικής είναι μεγαλύτερο από ένα ελάχιστο επίπεδο ανίχνευσης. Στη συνέχεια οι τιμές του Ct των διαφόρων δειγμάτων χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της σχετικής ποσότητας του κάθε δείγματος.

Με τη real-time PCR, εκτός από την ποσοτική ανάλυση του προϊόντος της PCR, γίνεται και ποιοτική ανάλυση με βάση τη μελέτη της καμπύλης τήξης του προϊόντος (melting curve analysis), κατά την οποία οι μεγεθυσμένες αλληλουχίες μπορούν να χαρακτηριστούν με βάση το σημείο τήξης τους (T_m), το οποίο είναι συνάρτηση του μήκους και της σύνθεσης των βάσεων του προϊόντος. Το σημείο τήξης είναι μοναδικό για κάθε αλληλουχία και χαρακτηριστικό γι αυτή

Ένας από τους πειραματικούς ελέγχους που περιλαμβάνει η δοκιμασία έκφρασης των γονιδίων είναι ο εσωτερικός έλεγχος. Χρησιμοποιείται για την εξομάλυνση της τιμής σήματος του κάθε δείγματος, έτσι ώστε οι διαφορές μεταξύ των δειγμάτων να είναι το αποτέλεσμα μιας πραγματικής βιολογικής διαφοράς και όχι λόγω της ασυνεπής φόρτωσης. Για τον εσωτερικό έλεγχο χρησιμοποιούνται τα housekeeping γονίδια, εξαιτίας κυρίως της σταθερότητας τους στα επίπεδα έκφρασης σε όλους τους τύπους κυττάρων. Ωστόσο, εξαιτίας της πολύ υψηλής έκφρασης των γονιδίων αυτών, η συγκέντρωση του προτύπου εκκίνησης σε μία Real-time PCR πρέπει να είναι χαμηλή, και η ανίχνευση του γονιδίου ενδιαφέροντος μπορεί να χαθεί στη χαμηλότερη ποσότητα του προτύπου. Η επιλογή της ενδογενούς αναφοράς, ως εκ τούτου, θα πρέπει να καθοριστεί εμπειρικά και με βάση το μοντέλο που βρίσκεται υπό μελέτη.

Ίσως ο πιο σημαντικός παράγοντας της ανάλυσης Real-time PCR είναι η επιλογή και η επικύρωση των ακολουθιών ολιγονουκλεοτιδίων εκκινητών. Θα πρέπει να είναι πολύ ειδική, η οποία μπορεί να είναι δύσκολη όταν πρόκειται για ισομορφές ή παραλλαγές ματίσματος. Ένα ζεύγος εκκινητών που έχει χρησιμοποιηθεί σε συμβατική, ανάλυση τελικού σημείου PCR μπορεί να μην επαρκούν για ποσοτικές μετρήσεις. Το ζεύγος των εκκινητών θα πρέπει να περάσει μια σειρά παραμέτρων επικύρωσης. Ένα γενικό πρωτόκολλο εργασίας περιγράφεται στον πίνακα 4.3

Πίνακας 4.3 Ενδεικτική σύσταση μίγματος αντίδρασης qPCR

Αντιδραστήριο	Όγκος
Εκμαγείο cDNA	1 µl
Εκκινητής 1	1 µl
Εκκινητής 2	1 µl
dsH₂O	7 µl
Eva Green	10 µl
Συνολικός όγκος	20 µl

Πίνακας 4.4. Αλληλουχίες των χρησιμοποιούμενων εκκινητών

	Number	Primer Length	Sequence (5'→3')	Product length	Target sequence	
Reverse primer	413	20bp	5'-TGC AGC TCA ACA AGG ATA CG- 3'	100bp	> NM_009399.3 Mus musculus tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a, NFKB activator (Tnfrsf11a), mRNA	RANK
Forward primer	414	20bp	5'-GTG CAG TTG GTC CAA GGT TT-3'			
Reverse primer	415	20bp	5'-CTT GCC TTG ATG GAG AGC CT- 3'	83bp	> NM_008764.3 Mus musculus tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegeri n) (Tnfrsf11b), mRNA	OPG
Forward primer	416	19bp	5'-TCG CTC GAT TTG CAG GTC T-3'			
Reverse primer	396	20bp	5'-TGT ACT TTC GAG CGC AGA TG- 3'	159bp	> NM_011613.3 Mus musculus tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11 (Tnfsf11), mRNA	RANKL
Forward primer	397	20bp	5'-AGG CTT GTT TCA TCC TCC TG-3'			

Ποσοτικοί Τύποι Ανάλυσης

Υπάρχουν τρεις ποσοτικές μέθοδοι: η απόλυτη, η σχετική τυπική, και οι συγκριτική [Applied Biosystems, 2003]. Στο παρόν, περιγράφουμε μεθόδους για τη σχετική πρότυπη και τη συγκριτική Ct μέθοδο (ονομάζεται επίσης ΔΔCt).

Η σχετική τυπική μέθοδος καμπύλης χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της ποσότητας ενός συγκεκριμένου μετάγραφου σε μια ομάδα δειγμάτων. Απαιτεί ότι μια σειρά αραίωσης ενός προτύπου cDNA περιλαμβάνονται για κάθε γονίδιο σε. Για τη σχετική ποσοτικοποίηση, οι τιμές συγκέντρωσης του προτύπου είναι αυθαίρετες. Οι ποσότητες παρεμβολής από την προκύπτουσα πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των σχετικών επιπέδων mRNA σε κάθε άγνωστο δείγμα.

Η συγκριτική μέθοδος Ct (ή ΔΔCt) χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση σχετικών μεταβολών στα επίπεδα mRNA μεταξύ δύο δειγμάτων, και δεν απαιτείται η χρήση σειρών αραίωσης του προτύπου. Αυτό απαιτεί την ενίσχυση των αποδόσεων των γονιδίων που συγκρίνονται να είναι ίδια. Προκειμένου να παρεμβάλλονται πρότυπες ποσότητες, χρησιμοποιούνται για τους υπολογισμούς οι χρόνοι του κάθε κύκλου.

4.4.4 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης 2% σε TBE.

Αρχή της μεθόδου

Η κυριότερη μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και την απομόνωση τμημάτων DNA είναι η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (agarose gel electrophoresis). Η τεχνική αυτή είναι απλή, γρήγορη και ικανή να διαχωρίσει μίγμα τμημάτων DNA, που δεν μπορούν να διαχωριστούν επαρκώς με άλλες μεθόδους. Στηρίζεται στο γεγονός ότι το DNA, σε ουδέτερο pH, είναι αρνητικά φορτισμένο, λόγω των φωσφορικών ομάδων του. Έτσι, τα διάφορα μόρια DNA μετακινούνται, κατά την ηλεκτροφόρηση προς το θετικό ηλεκτρόδιο, με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του λογαρίθμου του αριθμού των βάσεων τους. Τα μικρότερα μόρια DNA, λοιπόν, μετακινούνται μέσα στην πηκτή πιο γρήγορα από τα μεγαλύτερα κι έτσι επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός μορίων διαφορετικού μήκους. Επειδή η πηκτή εμποδίζει την τυχαία διάχυση των μορίων, τα μόρια διαφορετικού μήκους διαχωρίζονται σε "ζώνες". Οι ζώνες αυτές καθίστανται ορατές κατόπιν σύνδεσης του DNA με ειδικά μόρια, τα οποία είναι κυρίως χημικές ουσίες όπως το

βρωμιούχο αιθίδιο (ethidium bromide), SYBR green, SYBR gold, και που έχουν την ικανότητα να παρεμβάλλονται στην διπλή έλικα και να σχηματίζουν φθορίζοντα σύμπλοκα με το DNA. Έτσι, μπορεί να ανιχνευθεί ακόμα και ποσότητα 1 ng DNA με άμεση εξέταση του πηκτώματος κατόπιν διέγερσης με ακτινοβολία UV. Αν είναι απαραίτητο, οι ζώνες του DNA μπορούν να ανακτηθούν από το πήκτωμα και να χρησιμοποιηθούν για διάφορους σκοπούς.

Μέθοδος

Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης 2%

1. Ζυγίζονται 5g αγαρόζης τοποθετούνται σε κωνική φιάλη των 500 mL και προστίθενται 250ml 1xTBE.
2. Τοποθετούνται στην φιάλη σε θερμαινόμενο μαγνητικό αναδευτήρα ή σε μικροκύματα καλύπτεται με μεμβράνη στην οποία δημιουργούνται μικρές τρύπες και την αφήνουμε μέχρι να λειώσει η αγαρόζη και να δημιουργηθεί ένα διαφανές διάλυμα.
3. Αφήνεται το διάλυμα να κρυώσει μέχρι τους 60°C και προσθέτουμε 8μL βρωμιούχο αιθίδιο.
4. Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι ισχυρό μεταλλαξογόνο και μέτρια τοξικό. Απαραίτητη η χρήση γαντιών όταν χρησιμοποιούνται διαλύματα που περιέχουν αυτή την χρωστική. Το βρωμιούχο αιθίδιο πρέπει να φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου μακριά από το φως.
5. Τοποθετούμε την πλαστική χτένα 0.5-1.0mm πάνω από τον πλαστικό δίσκο, ώστε όταν προστεθεί το διάλυμα της αγαρόζης να σχηματιστούν πηγαδάκια.
6. Το διάλυμα της αγαρόζης τοποθετείται προσεκτικά μέσα στο δίσκο ώστε να μην δημιουργούνται φυσαλίδες.
7. Όταν η πηκτή είναι έτοιμη (χρειάζεται 55-60 min σε θερμοκρασία δωματίου) αφαιρούμε την χτένα και τοποθετούμε τον δίσκο μέσα στη συσκευή της ηλεκτροφόρησης.

8. Προσθέτουμε ρυθμιστικό διάλυμα TBE ώστε να βυθιστεί το πήκτωμα κατά 1 mm περίπου.

9. Αναμιγνύουμε τα δείγματα του DNA με το gel-loading buffer 20μl DNA με 4μl χρωστικής η αναλογία είναι 1:5 (Orange G: DNA). Με τη βοήθεια πιπέτας φορτώνουμε σε κάθε εγκοπή της πηκτής αγαρόζης 10 μL κατά σειρά από τα δείγματα. Στο πρώτο πηγαδάκι φορτώνουμε μίγμα της χρωστικής με το DNA του θετικού μαρτύρα.

10. Κλείνουμε τη συσκευή και επιλέγουμε τη φορά του πεδίου έτσι ώστε το DNA να μετακινείται προς την άνοδο (+). Η ηλεκτροφόρηση γίνεται υπό σταθερή τάση 120 V για 30 min.

11. Κλείνουμε το ρεύμα, βγάζουμε την πηκτή και το εξετάζουμε κάτω από U.V. φως στα 312 nm.

12. Βγάζουμε φωτογραφίες. Η φωτογράφιση των προϊόντων της ηλεκτροφόρησης γίνεται με χρήση ψηφιακής κάμερας, η οποία είναι συνδεδεμένη με ηλεκτρονικό υπολογιστή, οπότε είναι δυνατή η επεξεργασία της με χρήση ειδικού λογισμικού προγράμματος.

Παρασκευή διαλυμάτων μεθόδου.

➤ Δείγματα DNA (προϊόντα PCR)

➤ Ρυθμιστικό διάλυμα 10x TBE

Tris base 108 gr (0.891M τελική συγκέντρωση)

Boric acid 55 gr (0,889M τελική συγκέντρωση)

EDTA 9.3 gr /0.5 M EDTA (pH 8.0) 40 ml (31,8mM τελική συγκέντρωση)

H₂O έως το 1 lt

TBE 10X διατηρείται σε RT.

➤ Βρωμιούχο αιθίδιο (10 mg/ml)

➤ Χρωστική Orange G (DNA loading buffer)

15% ficoll, 0.25% orange

Ficoll 400 15gr (in a 500ml flask)

ddH₂O 30ml

Θέρμανση στους 55°C για 15-20 λεπτά (αναμιγνύουμε κάθε 5 λεπτά έως ότου διαλυθεί)

ddH₂O έως τα 100 ml

Προσθέτουμε 0.25gr Orange G και αναμιγνύουμε καλά

Μοιράζονται σε eppendorfs και διατηρούνται στους -20°C.

➤ **Καθαρή αγαρόζη**

5g αγαρόζης

4.4.5 Απομόνωση RNA από ιστούς πνευμόνων ποντικού

Μέθοδος

1. Τα δείγματα των ιστών μεταφέρθηκαν από δοχείο υγρού αζώτου όπου βρίσκονταν σε σωληνάρια “BIOUX”, κατάλληλα για χρήση με τον ομογενοποιητή.
2. Μετά την μεταφορά ομογενοποιήθηκαν με χρήση της συσκευής ομογενοποίησης σε 1 mL αντιδραστήριο TRIzol Reagent και αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.
3. Εν συνεχεία τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε αριθμημένα σωληνάρια 1.5 mL Eppendorf και φυγοκεντρήθηκαν σε επιτραπέζια φυγόκεντρο στα 12.000 g για 10 λεπτά στους 4°C. Το μίγμα διαχωρίστηκε σε τρεις φάσεις: μια χαμηλότερη, φαινόλο-χλωροφρμική οργανική φάση η οποία περιείχε το μόρια DNA, μια μεσόφαση η οποία περιείχε τις πρωτεΐνες, και μια άχρωμη ανώτερη υδατική φάση, η οποία περιείχε τα μόρια RNA.
4. 5. Προστέθηκαν σε κάθε σωληνάριο 200 μL χλωροφόρμιο στον απαγωγό. Τα σωληνάρια με τα δείγματα πωματίστηκαν και ακολούθησε ανάδευση με συσκευή Vortex για 15 sec.

6. Ακολούθησε εκ νέου φυγοκέντρωση στα 12.000 g για 15 min στους 4°C και μετά λήφθηκαν 500 μ L της υδατικής φάσης κάθε δείγματος, τα οποία μεταφέρθηκαν σε νέα σωληνάρια eppendorf.
7. Προστέθηκαν 0.25 mL ισοπροπανόλης και 0.25 mL διαλύματος αλάτων (κιτρικό νάτριο 0.8M και χλωριούχο νάτριο 1.2M) και μετά τα δείγματα αφέθηκαν για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Φυγοκεντρήθηκαν στα 12.000 g για 8 λεπτά στους 4°C με αποτέλεσμα το RNA να κατακάτσει ως λευκό/ημιδιαφανές ίζημα ενώ το υπερκείμενο απορρίφθηκε προσεκτικά με χρήση πλαστικού ακρορυγχίου, προσαρμοσμένου σε σωλήνα κενού αέρος.
9. Για πλύση του ιζήματος σε κάθε δείγμα προστέθηκε 1 mL αιθανόλη 75% και ακολούθησε βίαιη ανάδευση με Vortex.
10. Τα παραπάνω στάδια φυγοκέντρωσης και πλύσης επαναλήφθηκαν άλλη μια φορά.
11. Τα δείγματα RNA αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

4.4.6 Κατεργασία καθαρισμού του απομονωμένου ολικού RNA

Μέθοδος

Σκοπός ήταν ο καθαρισμός του RNA από επιμολύνσεις DNA ώστε εν συνεχεία να απομονωθεί με υψηλή καθαρότητα.

1. Τα δείγματα απομονωμένου RNA φυγοκεντρήθηκαν στα 6.000 g για 5 min στους 4°C για καταβύθιση του RNA ενώ η αιθανόλη 75% που αποτελούσε το διαλύτη, απορρίφθηκε προσεκτικά με χρήση πλαστικού ακρορυγχίου, προσαρμοσμένου σε σωλήνα κενού αέρος.
2. Εν συνεχεία στα δείγματα όπου το ίζημα ήταν μη ορατό (αραιό) προστέθηκαν 20 μ L DEPC-H₂O ενώ στα υπόλοιπα 100 μ L DEPC-H₂O και επώαστηκαν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 60°C για 10 min. Όπου το ίζημα δεν είχε διαλυτοποιηθεί έγινε χρήση πλαστικού ακρορυγχίου με ρυθμιζόμενη παλίνδρομη εισροή/εκροή μέσω της πιπέτας έως ότου να διαλυτοποιηθούν τα ιζήματα σε όλα τα δείγματα.

3. Προσδιορίστηκε η συγκέντρωση και μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στο φασματοφωτόμετρο Nanodrop ND-1000 πριν προχωρήσουμε παραπέρα στην ενζυμική κατεργασία με την RQ1 DNase RNase free DNase 1, ώστε να αποκτηθεί μια πρώτη εικόνα σχετικά με το πόση συγκέντρωση RNA έχει εκχυλιστεί από τους ιστούς και ποια είναι η υφιστάμενη μόλυνση των δειγμάτων από DNA.
4. Μετά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων του φασματοφωτομέτρου, κατασκευάστηκε πίνακας ποσοτήτων για τα υπόλοιπα αντιδραστήρια που θα προστίθεντο στη συνέχεια. Οι υπολογισμοί βασίστηκαν σε δύο προϋποθέσεις. Η πρώτη ήταν ο τελικός όγκος των δειγμάτων να μην ξεπερνά τα 20 μL ενώ παράλληλα οι ποσότητες του ενζύμου και του RQ1 DNase 10X Reaction Buffer ήταν σταθερές στα 2 μL . Η δεύτερη ήταν η ύπαρξη 10 μg RNA στα δείγματα. Επομένως στους υπολογισμούς αυξομειώθηκαν οι ποσότητες του RNA και του DEPC- H_2O . Τα περισσότερα δείγματα ικανοποιούσαν και τις δύο συνθήκες, ενώ σε κάποιες μεμονωμένες εξαιρέσεις χρησιμοποιήθηκε αναγκαστικά λιγότερη αρχική ποσότητα RNA.
5. Ακολούθησε η προσθήκη των υπολογισμένων όγκων DEPC- H_2O , RNA σε νέα αντιστοίχως αριθμημένα σωληνάρια τύπου Eppendorf 1.5 mL και μετά η προσθήκη 2 μL RQ1 DNase 10X Reaction Buffer και 2 μL του ενζύμου. Όλη η εργασία πραγματοποιήθηκε με νέα σωληνάρια τύπου Eppendorf 1.5 mL στον πάγο ενώ τα παλιά σωληνάρια με το ακαθάριστο απομονωμένο RNA φυλάχθηκαν για μελλοντική χρήση στους -20°C .
6. Τα δείγματα επώστηκαν στους 37°C για μία ώρα στο υδατόλουτρο. Με το πέρας του χρόνου ακολούθησε προσθήκη 200 μL DEPC- H_2O και 200 μL μίγματος αποτελούμενο από φαινόλη και χλωροφόρμιο σε αναλογία όγκων 1:1, ακολουθούμενη από στιγμιαία έντονη ανάδευση σε συσκευή Vortex για 30 sec.
7. Μετά τοποθετήθηκαν σε επιτραπέζια φυγόκεντρο για φυγοκέντρωση στα 12.000 g για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Οι οργανικές κάτω φάσεις απορρίφθηκαν ενώ οι υδατικές άνω φάσεις των δειγμάτων που περιείχαν το RNA συλλέχθηκαν σε νέα σωληνάρια τύπου Eppendorf των 0.5 mL

8. Προστέθηκαν 200 μL χλωροφόρμιο στο καθένα. Εν συνεχεία ακολούθησε έντονη ανάδευση με συσκευή Vortex για δέκα δευτερόλεπτα και φυγοκέντρωση σε επιτραπέζια φυγόκεντρο στα 12.000 g για δέκα λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
9. Συλλέχθηκαν οι υδατικές φάσεις (V') έως ορίου $V'_{\text{max}}=180 \mu\text{L}$ σε νέα σωληνάρια τύπου Eppendorf των 0.5 mL και προστέθηκε στο καθένα από αυτά 2 μL γλυκογόνο ως συμπάροντας κατακρήμνισης (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Αν V' ο αντίστοιχος ληφθείς όγκος RNA, προστέθηκαν στο δείγμα αντίστοιχα $1/10 \times V'$ διάλυμα οξικό νάτριο συγκέντρωσης 3M και 2.5x του όγκου παγωμένη αιθανόλη 100%, συνοδευόμενα από καλή ανάμειξη των δειγμάτων με χρήση της συσκευής Vortex κάθε φορά.
10. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C . Εναλλακτικώς θα μπορούσαν για άμεση χρήση στην επόμενη μία ώρα αποθηκεύτηκαν στους -80°C για 20 min.

4.4.7 Μετατροπή του RNA σε cDNA με χρήση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση

Μέθοδος

1. Προστέθηκε 1 μL oligo(dT) (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) προς υβριδοποίηση όλων των μεταγραφημάτων με poly-A ουρά και οι όγκοι συμπληρώθηκαν με DEPC- H_2O , έως τελικού όγκου 12 μL
2. Τα δείγματα θερμάνθηκαν για πέντε λεπτά στους 70°C , ώστε να διασπαστούν τυχόν σχηματισμένες δευτεροταγείς δομές και τοποθετήθηκαν στο πάγο για άμεση ψύξη ώστε να αποφευχθεί ο τυχόν αυθόρμητος ανασχηματισμός τους.
3. Ακολούθησε ένα στιγμιαίο spin σε επιτραπέζια φυγόκεντρο ώστε να συλλεχθεί ο όγκος κάθε δείγματος στο κάτω μέρος των σωληνάρων.
4. Προστέθηκαν κατά σειρά 4 μL M-MLV 5x buffer, 2 μL δεοξυνουκλεοτίδια (10mM) και τέλος 2 μL του ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης M-MLV RT του ρετροϊού *Moloney Leukemia Virus*. Ο συνολικός όγκος όλων των δειγμάτων με βάση τις οδηγίες του πρωτοκόλλου αντίστροφης μεταγραφής της Promega ήταν 20 μL .
5. Τα δείγματα επώαστηκαν για μία ώρα σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 42°C .

6. Στο τέλος της αντίδρασης τα δείγματα επώαστηκαν για δέκα λεπτά σε θερμοκρασία 70°C.

7. Μετά το πέρας της επώασης τα δείγματα τοποθετήθηκαν στον πάγο για δέκα λεπτά και αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

Η κατεργασία της αντιστροφής μεταγραφής σε συνδυασμό με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αποτελούν την πιο ευαίσθητη και αξιοποιήσιμη τεχνική ώστε να ανιχνευτεί το mRNA ενός γονιδίου. Το απομονωμένο και καθαρισμένο ολικό RNA χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για να συντεθεί το συμπληρωματικό DNA (cDNA) με χρήση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση.

4.4.8 Μηχανικός Αναπνευστήρας -Flexivent

Στον πυρήνα του, το flexiVent είναι ένας ελεγχόμενος υπολογιστής, με εμβολοφόρο αντλία ακριβείας που μπορεί να διασπείρει μηχανικό αερισμό με μια ποικιλία όγκων και πιέσεων για την απόκτηση ακριβών και επαναλήψιμων μέτρησεων της μηχανικής του αναπνευστικού.

Ένα βασικό σύστημα flexiVent περιλαμβάνει τα ακόλουθα:

Μονάδα βάσης: στεγάζει τον κινητήρα, αισθητήρα οπτικών θέσεων και ηλεκτρονικών.

Flexivent λογισμικό: διαχειρίζεται τη συλλογή, την ανάλυση, τα γραφικά και την αρχειοθέτηση των δεδομένων.

Το flexivent θεωρείται ευρέως ως απαραίτητο εργαλείο για τις *in vivo* μετρήσεις της πνευμονικής λειτουργίας. Επιτρέπει μια ολοκληρωμένη αξιολόγηση των διαφόρων καθοριστικών παραγόντων της νόσου (π.χ. έκταση και τον τρόπο που προκαλείται ζημιά) για την μείωση της λειτουργίας των πνευμόνων. Πηγαίνει πέρα από τις παραδοσιακές μετρήσεις αντίστασης και της συμμόρφωσης και συλλαμβάνει κρίσιμες λεπτομέρειες για τις μηχανικές ιδιότητες των αεραγωγών και του πνεύμονα. Το flexiVent επιτυγχάνει την υψηλότερη ευαισθησία, επαναληψιμότητα και ακρίβεια στον έλεγχο πειραματικών συνθηκών. Αποτελεί επεμβατική τεχνική, η οποία μετρά άμεσα τη μηχανική των πνευμόνων και των αεραγωγών, με αποτέλεσμα να οδηγήσει

σε περισσότερο ακριβείς και φυσιολογικές μεταβλητές, έχοντας όμως ένα σημαντικό μειονέκτημα, της τραχειοστομίας και την επακόλουθη θυσία των ζώων, αποτρέποντας την παρακολούθηση των ποντικών συναρτήσεων του χρόνου. Τόσο η διασωλήνωση όσο και η τραχειοστομία πραγματοποιούνται με ενδοφλέβιο καθετήρα 18G. Για να αποφευχθεί η αυθόρμητη αναπνοή, τα ζώα αναισθητοποιούνται με χαμηλή δόση αναισθητικού. Στη συνέχεια, οι ποντικοί συνδέονται με το σύστημα FlexiVent και χορηγείται αέρας σε συχνότητα 150 αναπνοές / min. Κατά τη διάρκεια της μέγιστης ζωτικής χωρητικότητας (MVC) οι πνεύμονες διογκώνονται σε σταθερή πίεση 300 cmH₂O και στη συνέχεια αποβάλλεται ο αέρας για να καθορίσει την MVC. Με αυτή τη διαδικασία διαγράφεται τρεις φορές ημιτονοειδές κύμα της εισπνοής και εκπνοής που επιβλήθηκε και είχε αποτέλεσμα στην αντίσταση (R), τη συμμόρφωση (C) και την ελαστικότητα (E) ολόκληρου του αναπνευστικού συστήματος (στους αεραγωγούς, τους πνεύμονες και στο θωρακικό τοίχωμα). Μέγιστη πίεση όγκου-βρόχων (PV-βρόχους) μεταξύ της λειτουργικής υπολειπόμενης χωρητικότητας (FRC) και της συνολικής χωρητικότητας των πνευμόνων (TLC) τελικά δημιουργείται για να ληφθεί η στατική συμμόρφωση (C_{st}) και η στατική ελαστικότητα (E_{st}) του αναπνευστικού συστήματος. Σε κάθε ζώο, κάθε ελιγμός επαναλαμβάνεται μέχρι τρεις αποδεκτές μετρήσεις (συντελεστής προσδιορισμού; 0.95). Ο μέσος όρος των τριών μετρήσεων μπορούν να υπολογιστούν.

Αντίσταση (R): δυναμική αντίσταση αξιολογεί ποσοτικά το επίπεδο της συστολής στους πνεύμονες.

Ελαστικότητα (E): δυναμική ελαστικότητα συλλαμβάνει το ελαστικό ακαμψία ή την ακαμψία των πνευμόνων.

Συμμόρφωση (C): δυναμική συμμόρφωση συλλαμβάνει την ευκολία με την οποία μπορεί να επεκταθεί και στους πνεύμονες.

Νευτώνεια αντίστασης (R_n): παράμετρος που αντιπροσωπεύει την αντίσταση των αεραγωγών.

Απόσβεση ιστού (G): παράμετρος αντίστασης του ιστού που αντανακλά την διάχυση της ενέργειας στις κυψελίδες.

Ελαστικότητα ιστού (H): ελαστικότητα ιστού που αντανακλά την εξοικονόμηση ενέργειας στις κυψελίδες

(A): εκτίμηση της εισπνεόμενης χωρητικότητας

(K): καμπυλότητα του άνω τμήματος στο άκρο της εκπνοής στην καμπύλη πίεσης-όγκου.

Area: περιοχή μεταξύ της εισπνοής και εκπνοής στο άκρο της καμπύλης πίεσης-όγκου

Συντελεστής προσδιορισμού (COD): η παράμετρος ελέγχου της ποιότητας μέτρησης της ποιότητας του ενιαίου μοντέλου διαμέρισμα ταιριάζει.



Σχήμα 4.1: Flexivent (<https://www.scireq.com/>)

4.4.9 Καταμέτρηση βιώσιμων κυττάρων χρησιμοποιώντας αιματοκυτταρόμετρο

Μέθοδος

1. Προετοιμασία αιμοκυτταρομέτρου

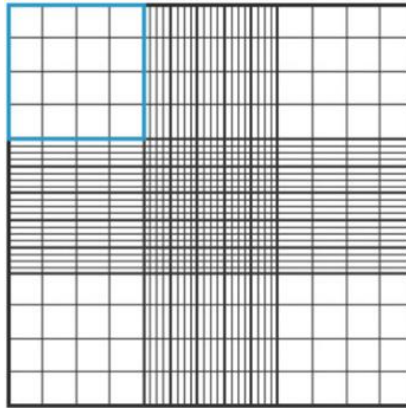
Αρχικά καθαρίζεται με αλκοόλη το αιμοκυτταρόμετρο και η καλυπτρίδα, πριν από τη χρήση. Η καλυπτρίδα τοποθετείται στο αιμοκυτταρόμετρο.

2. Προετοιμασία αιωρήματος κυττάρων

- Ανακινείται απαλά το erppendorf που βρίσκονται τα κύτταρα για να εξασφαλιστεί η ομοιόμορφη κατανομή τους.
- Πριν τα κύτταρα κατακαθίσουν, αφαιρούνται 10 μL κυττάρων και μεταφέρονται σε ένα νέο σωλήνα erppendorf, προστίθεται 10 μL 0,4% Trypan Blue (τελική συγκέντρωση 0,08%). Ανακατεύονται απαλά.

3. Καταμέτρηση

- Χρησιμοποιώντας 10 μL επεξεργασμένου κυτταρικού εναιωρήματος με Trypan Blue εφαρμόζονται στο αιμοκυτταρόμετρο. Σε γυάλινο αιμοκυτταρόμετρο, συμπληρώνονται και στους δύο θαλάμους κάτω από την καλυπτρίδα, επιτρέποντας το κυτταρικό εναιώρημα να συναχθεί από τριχοειδή φαινόμενα.
- Χρησιμοποιώντας ένα μικροσκόπιο, επικεντρώνονται στις γραμμές του πλέγματος του αιμοκυτταρομέτρου με αντικειμενικό φακό 10X.
- Ξεκινώντας από αριστερά προς τα δεξιά μετράμε τα ζωντανά, μη χρωματισμένα κύτταρα (ζωντανά κύτταρα δεν βάφονται με Trypan Blue) σε ένα σύνολο 16 τετράγωνων (Εικ.2.4). Κατά την καταμέτρηση, χρησιμοποιείται ένα σύστημα με το οποίο τα κύτταρα υπολογίζονται μόνο όταν είναι μέσα σε ένα τετράγωνο ή στο δεξί χέρι ή στο κάτω όριο της γραμμής. Ακολουθώντας τις ίδιες κατευθυντήριες γραμμές, τα νεκρά κύτταρα χρωματίζονται με Trypan Blue, μπορεί επίσης να μετρηθεί για μια εκτίμηση της βιωσιμότητας, εάν απαιτείται.
- Μετακινείται το αιματοκυτταρόμετρο στο επόμενο σύνολο των 16 τετραγώνων και συνεχίζεται η καταμέτρηση μέχρι να συνυπολογιστούν όλα τα 4 σετ των 16 τετραγώνων



Σχήμα_4.2: Διάγραμμα αιματοκυτταρομέτρου.

4. Βιωσιμότητα

- Για τον υπολογισμό του αριθμού των βιώσιμων κυττάρων /ml:
- Λαμβάνεται ο μέσος όρος αριθμός των κυττάρων από κάθε ένα από τα σύνολα των 16 τετραγώνων.
- Πολλαπλασιάζεται με 10.000 (10^4).
- Πολλαπλασιάζεται με 2 για την αραιώση 1:2 από την προσθήκη Trypan blue.
- Η τελική τιμή είναι ο αριθμός των βιώσιμων κυττάρων/mL στο αρχικό εναιώρημα κυττάρων.

4.4.10 Κυτταρομετρία ροής (FACS Staining)

Αρχή της μεθόδου

Ο φθορισμός ενεργοποιημένων ζωντανών κυττάρων [Fluorescence-activated cell sorting (FACS)] διαχωρίζει ένα πληθυσμό κυττάρων σε υποπληθυσμούς με βάση τη φθορίζουσα σήμανση. Τα κύτταρα χρωματίζονται συζευγμένα με φθορισμοφόρα αντισώματα ώστε να μπορούν να διαχωριστούν το ένα από άλλο είδος κυττάρων, ανάλογα με το φθορισμοφόρο που έχουν συζευχθεί. Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα για το διαχωρισμό των παρακάτω πλυθισμών: CD4⁺ CD8⁺ F4/80 high GR1 high

Μέθοδος

Χρώση επιφάνειας:

- Αναστολή των κυττάρων σε παγωμένο PBS (50 μ L για κάθε δοκιμή = $1-2 \times 10^6$ κύτταρα)
- Μεταφορά κυττάρων σε πλάκα 96 φρεατίων που περιέχει τα αντισώματα επιφανείας (50 μ L το καθένα).
- Φυλάσσονται για 30 min σε πάγο σε σκοτεινό μέρος.
- Προστίθεται 100 μ l PBS και φυγοκεντρούνται σε 1.500 g, 5 min σε 4°C. Πλένονται μία φορά με 200 μ l PBS και φυγοκεντρούνται σε 1.500 g, 5 min σε 4 °C.
- Ανάλυση FACS

4.4.11 Προσδιορισμός Πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Αρχή της μεθόδου

Ο ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών σε ένα διάλυμα συνήδως γίνεται φωτομετρικά. Οι πρωτεΐνες αντιδρούν με ορισμένα αντιδραστήρια παρέχοντας έγχρωμα προϊόντα. Στην ιδιότητα τους αυτή στηρίζεται και ο ποσοτικός προσδιορισμός με την μέθοδο Bradford. Η μέθοδος Bradford βασίζεται στο γεγονός ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 αλλάζει χρώμα όταν συνδέεται με πρωτεΐνες σε αραιά όξινα διαλύματα και δίνουν ένα κυανό χρώμα. Το χρώμα αυτό σχηματίζεται σχεδόν αμέσως είναι σταθερό για περίπου 1 h και

επηρεάζεται ελάχιστα η καθόλου που συνυπάρχουν σε πρωτεϊνικά διαλύματα. Το σύμπλοκο της χρωστικής-πρωτεΐνης απορροφά στα 595nm. Ο προσδιορισμός γίνεται με αναφορά σε πρότυπη καμπύλη απορρόφησης συναρτήσει της συγκέντρωσης πρότυπου διαλύματος BSA (0-25μg πρωτεΐνης).

Μέθοδος

1. Σε μικρο πλάκα δημιουργείται η πρότυπη καμπύλη απορρόφησης με εύρος αναφοράς 15,625-2000μg/ml. Το εύρος αυτό προκύπτει από το διάλυμα παρακαταθήκης μέσω διαδοχικών αραιώσεων πρότυπου διαλύματος BSA.
2. Δείγμα ελέγχου: προστίθεται ένα σημείο ακόμη χωρίς την παρουσία πρωτεΐνης που θα χρησιμοποιηθεί ως τυφλό.
3. Δείγματα: προστίθεται σε κάθε φρεάτιο 5μL δείγμα και 245μL αντιδραστήριο Bradford.
4. Φωτομετρείται στα 595nm.

Παρασκευή διαλυμάτων της μεθόδου

Το διάλυμα Bradford είναι έτοιμο για χρήση.

4.4.12 Μέτρηση διαλυτού κολλαγόνου σε BALF

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος αυτή μετά το διαλυτό κολλαγόνο σε δείγματα BALF. Είναι χρωματομετρική μέθοδος, πραγματοποιείται σε πλάκα 96-φρεατίων και βασίζεται στην καθίζηση του κολλαγόνου με Direct-Red 80, μια ανιονική βαφή με ομάδες σουλφονικού οξέος. Αυτή η χρωστική μπορεί να δεσμεύσει ομάδες πλευρικής αλυσίδας βασικών υπολειμμάτων αμινοξέων. Η χρωστική ουσία απελευθερώνεται από τα καταβυθισμένα σύμπλοκα σε υψηλό pH που ακολουθείται από χρωματομετρική ανίχνευση. Η δοκιμασία είναι βελτιστοποιημένη έτσι ώστε άλλες πρωτεΐνες (όπως αλβουμίνη) να μην παρεμβαίνουν.

Μέθοδος

1. Προστίθεται 25-50 μL δείγματα BALF σε 1 mL 0.5 M οξικού οξέος. Χρησιμοποιούνται 2 ml eppendorf.
2. Κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς με κολλαγόνο από Rat Tail. Το εύρος αραιώσεων είναι: κολλαγόνο 0-500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ σε 1 ml 0.5 M οξικού οξέος. Χρησιμοποιούνται 2 ml eppendorf.
3. Στα δείγματα και στην πρότυπη προστίθεται 1 ml Direct Red 80 (120 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Ανακατεύονται καλά.
4. Επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min.
5. Αναδεύονται στο vortex για 3-4 min.
6. Φυγοκεντρούνται σε 12.500 g για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
7. 200 mL υπερκειμένου από τα δείγματα και τα πρότυπα μεταφέρονται σε πλάκα 96-φρεατίων.
8. Η απορρόφηση στην οποία μετριοούνται οι διάφορες συγκεντρώσεις κολλαγόνου τύπου I, είναι 540 nm.

Παρασκευή διαλυμάτων μεθόδου

- Διαλύεται το κολλαγόνο από Rat Tail σε 0,5 M οξικό οξύ με τελική συγκέντρωση 1 mg/ml. Ανακινείται σε θερμοκρασία δωματίου για 1-3 h.
- Διαλύεται η Direct Red 80 σε 0,5 M οξικό οξύ με τελική συγκέντρωση 120 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

4.4.13 Χρώση Αιματοξυλίνης-Εωσίνης

Αρχή της Μεθόδου

Στην μέθοδο αυτή οι πυρήνες των κυττάρων βάφονται από την αιματοξυλίνη, ενώ το κυτταρόπλασμα χρωματίζεται από την εωσίνη. Η αιματοξυλίνη αποτελεί το άχρωμο υπόστρωμα που οξειδώνεται και δίνει το χρωμοφόρο παράγοντα και η εωσίνη αποτελεί μια όξινη χρωστική. Οι δομές που περιέχουν νουκλεϊκά οξέα (κυρίως οι πυρίνες αλλά και τα ριβοσώματα) βάφονται σκούρο μωβ ή μπλέ (από την αιματοξυλίνη), ενώ οι υπόλοιπες δομές του κυτταροπλάσματος βάφονται κόκκινες (από την εωσίνη).

Τα δείγματα που χρησιμοποιούνται στη μέθοδο αυτή είναι τομές παραφίνοποιημένων ιστών στο μικροτόμο. Πρώτα κόβεται ένα μικρό μέρος από τους παραφίνοποιημένους ιστούς για να απομακρυνθούν οι πρώτες στρώσεις παραφίνης, τοποθετούνται σε ψυχρό μέρος και ακολουθεί κόψιμο τομών στα 5 μm και τοποθέτηση σε ειδικό μπανάκι με νερό στους 42°C ώστε να «ανοίξει» καλά η τομή. Απευθείας από εκεί τοποθετούνται σε ειδικά πλακάκια τα οποία αφήνονται να στεγνώσουν στους 42°C για πολλές ώρες ώστε να εξασφαλισθεί ότι θα κολλήσει σωστά στο πλακάκι και δεν θα υπάρχει αέρας ή νερό γεγονός που θα δυσκολέψει την οπτική στο μικροσκόπιο.

Μέθοδος

Η διαδικασία της χρώσης που ακολουθείται είναι η εξής:

1. Τομές των 5 μm από μονιμοποιημένους ιστούς εμβαπτίζονται για 5 min σε τρία διαδοχικά διαλύματα ξυλενίου.
2. Εν συνεχεία σε διαδοχικά διαλύματα 100% αιθανόλης, 96% αιθανόλης (δισ), 75% αιθανόλης και 50% αιθανόλης σε καθένα από τα οποία παραμένει για 2-3 min.
3. Έπειτα σε απεσταγμένο νερό για 5 min.
4. Στη συνέχεια τα πλακάκια με τις τομές παραμένουν σε διάλυμα αιματοξυλίνης για 2 λεπτά και ξεπλένονται με απεσταγμένο νερό μέχρι την απομάκρυνση της χρωστικής.

5. Ακολουθεί εμβάπτιση σε διάλυμα 70% αιθανόλης με 37% HCl (acid alcohol) και ξέπλυμα με απεσταγμένο νερό.
6. Επόμενο βήμα είναι η παραμονή σε διάλυμα Scott's για 3-5 min και το ξέπλυμα με απεσταγμένο νερό.
7. Μετά τα πλακάκια υφίστανται τη χρώση με εωσίνη για 2-3 min , ανάλογα με την παλαιότητα της χρωστικής. Ξεπλένεται με απεσταγμένο νερό.
8. Στην συνέχεια έχουμε αφυδάτωση του ιστού όπου οι τομές εμβαπτίζονται για 8-10 φορές στα διαλύματα των αλκοολών με αντίστροφη σειρά 50% αιθανόλη, 70% αιθανόλη, 96% αιθανόλη και 100% αιθανόλη και τέλος ξυλενίου.
9. Τέλος ακολουθεί η κάλυψη των τομών με διάλυμα DPX (Dibutyl phthalate, BDH) που περιέχει ξυλένιο και παρατήρησή τους στο μικροσκόπιο.

4.4.14 Masson's Trichrome stain

Αρχή της Μεθόδου

Η τριχρωματική μέθοδος του Masson είναι ένα πρωτόκολλο χρώσης τριών χρωμάτων που χρησιμοποιούνται σε ιστολογία. Οι συνταγές έχουν εξελιχθεί από την αρχική διατύπωση του Claude L. Pierre Masson σε διαφορετικές συγκεκριμένες εφαρμογές, αλλά όλα εφαρμόζονται για τη διάκριση των κυττάρων από τον περιβάλλοντα συνδετικό ιστό. Οι περισσότερες συνταγές παράγουν ερυθρά την κερατίνη και τις μυϊκές ίνες, μπλε ή πράσινο το κολλαγόνο και τα οστά, ανοικτό κόκκινο ή ροζ το κυτταρόπλασμα, και σκούρο καφέ έως μαύρο τους πυρήνες των κυττάρων.

Μέθοδος

Για τους ιστούς που έχουν σταθεροποιηθεί με φορμαλίνη, απομακρύνεται η παραφίνη με ξυλένιο και ενυδατώνεται μέσω της 100% αλκοόλης, 70% αλκοόλης και 50% αλκοόλης. Για κατεψυγμένους ιστούς καθορίζονται σε ρυθμιστικό διάλυμα φορμαλίνης για 5 min και επανυδατώνονται μέσω της 100% αλκοόλης, 70% αλκοόλης και 50% αλκοόλης.

1. Γίνεται πλύση σε απεσταγμένο νερό.
2. Τοποθετούνται σε διάλυμα Bouin για 1 h στους 56°C για τη βελτίωση της ποιότητας της χρώσης.
3. Ξεπλένουμε με τρεχούμενο νερό για 5-10 min για να αφαιρεθεί το κίτρινο χρώμα.
4. Σταθεροποιείται στο διάλυμα αιματοξυλίνης σιδήρου Weigert για 10 min.
5. Ξεπλένουμε πολύ καλά με τρεχούμενο νερό της βρύσης (5-10 min).
6. Γίνεται πλύση με οξικό οξύ 1%
7. Σταθεροποιείται στο Biebrich- scarlet-acid fuchsin διάλυμα για 5 min. Τα διαλύματα μπορούν να αποθηκευτούν για μελλοντική χρήση.
8. Πλένουμε σε αποσταγμένο νερό αρκετές φορές.
9. Γίνεται μεταφορά στο φωσφομολυβδικό-φωσφοβολφραμικό οξύ διάλυμα 1% για 5 λεπτά ή μέχρι το κολλαγόνο να μην είναι κόκκινο.
10. Ξεπλένουμε σε απεσταγμένο νερό
11. Μεταφέρονται σε ανιλίνη (μπλε διάλυμα) για 5 min.
12. Ξεπλένουμε για λίγο σε νερό της βρύσης
13. Γίνεται μεταφορά σε διάλυμα φωσφομολυβδικού-φωσφοβολφραμικό οξέος 1% για 3 min.
14. Πλένουμε σε απεσταγμένο νερό
15. Αφήνεται στο διάλυμα οξικού οξέος 1% για 2 min.
16. Πλένουμε σε απεσταγμένο νερό.
17. Αφυδατώνετε γρήγορα μέσα από 95% αιθυλική αλκοόλη, απόλυτη αιθυλική αλκοόλη και σε ξυλένιο.
18. Τοποθετούνται στο DPX

Παρασκευή διαλυμάτων μεθόδου.

Bouin's Solution:

Picric acid (saturated) 75 ml (1 gr in 78 ml distilled water)

Formaldehyde (37-40%) 25 ml

Glacial acetic acid 5 ml

Ανακατεύουμε καλά. Το διάλυμα αυτό υποδεικνύει την ποιότητα της χρώσης Masson Trichrome. Το διάλυμα αυτό παραμένει σταθερό για ένα μήνα.

Weigert's Iron Hematoxylin Solution:

Stock Solution A:

Hematoxylin 1 g

95% Alcohol 100 ml

Stock Solution B:

30% Ferric chloride in water 4 ml

Distilled water 95 ml

Hydrochloric acid, concentrated 1ml

Αναμιγνύω καλά τα διαλύματα A και B. Αυτό το διάλυμα παραμένει σταθερό για 3 μήνες.

Biebrich Scarlet-Acid Fuchsin Solution:

Biebrich scarlet, 1% aqueous 90 ml

Acid fuchsin, 1% aqueous 10 ml

Acetic acid, glacial 1 ml

Αυτό το διάλυμα παραμένει σταθερό για 12 μήνες, προστατευμένο από το φως και την υγρασία.

Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Solution:

1% Phosphomolybdic acid 25 ml

1% Phosphotungstic acid 25 ml

Αυτό το διάλυμα παραμένει σταθερό για 3 μήνες.

Aniline Blue Solution:

Aniline blue 2.5 g

Acetic acid, glacial 2 ml

Distilled water 100 ml στο heat plate.

Αυτό το διάλυμα παραμένει σταθερό για 12 μήνες, προστατευμένο από το φως και την υγρασία.

1% Acetic Acid Solution:

Acetic acid, glacial 1 ml

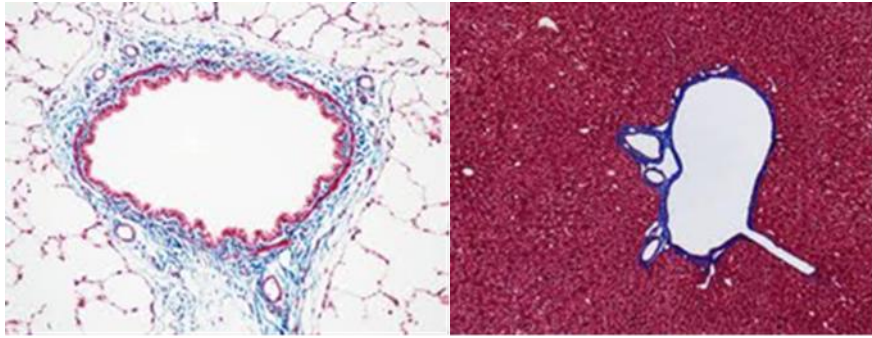
Distilled water 99 ml

Αποτελέσματα

Κολλαγόνο.....μπλε

Πυρήνας.....μαύρο

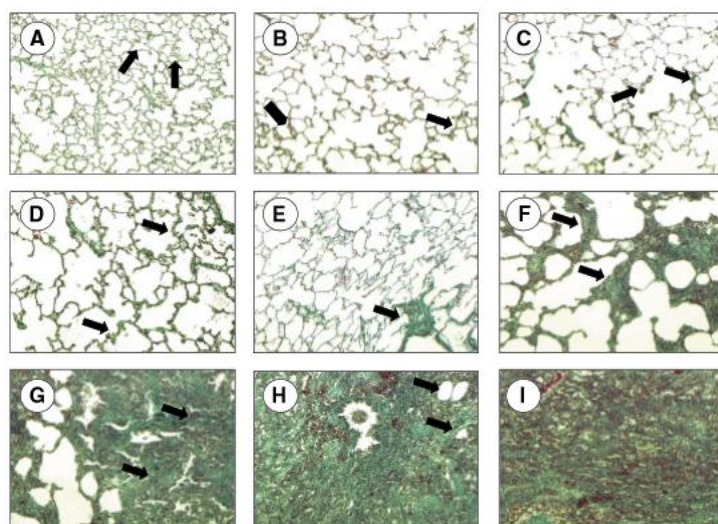
Μυϊκές ίνες, κυτταρόπλασμα, κερατίνηκόκκινο



Σχήμα 4.3: Τριχρωματική χρωστική Masson του αεραγωγού αρουραίου και ήπατος. Ο συνδετικός ιστός βάφεται μπλε, οι πυρήνες βάφονται σκούρο κόκκινο/μοβ, και το κυτταρόπλασμα χρωματίζεται κόκκινο/ροζ.

4.4.15 Modified Ashcroft score

Η ιστοπαθολογική ανάλυση ιστών του πνεύμονα με ίνωση, για τη διάγνωση και τη σταδιοποίηση της ασθένειας συναντά δυσκολίες καθώς η ανάπτυξη της ίνωσης είναι ετερογενής σε όλο τον πνεύμονα και συνεπώς ορισμένες περιοχές των πνευμόνων να μένουν ανεπηρέαστες. Το Ashcroft score είναι ένα αξιόπιστο σύστημα βαθμολόγησης για την εκτίμηση της πνευμονικής ίνωσης. Σύμφωνα με μια αριθμητική κλίμακα, με βαθμούς από 0 έως 8, μπορεί να γίνει η προσέγγιση το πόσο ινώδης είναι ο ιστός. Αυτή η κλίμακα αρχικά αξιολογήθηκε σε ανθρώπινο ιστό, αλλά έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη πνευμονική ίνωση σε πειραματόζωα. Η ενστάλαξη μπλεομυκίνης στα ζώα, μπορεί να οδηγήσει σε ακραία ανομοιογενής ίνωση και επομένως να είναι ευαίσθητη σε σφάλματα δειγματοληψίας όσον αφορά την επιλογή και τον αριθμό των πεδίων που πρέπει να αναλυθεί. Η κλίμακα Ashcroft προτείνει τη χρήση φακού μεγένθυσης 10X για μικροσκόπιο σάρωσης, η οποία καθιστά την εκτίμηση πιο δύσκολη λόγω της μεγαλύτερης ετερογένειας των ινωτικών μεταβολών σε κάθε μικροσκοπικό πεδίο. Υποβοηθούμενη από υπολογιστή αξιολόγηση ινώδων τμημάτων μπορεί να είναι μια άλλη επιλογή για την κατάταξη των δειγμάτων με επαγόμενη από μπλεομυκίνη πνευμονική ίνωση. Ως εκ τούτου, η μεγέθυνση με φακό 20X επιτρέπει την αξιολόγηση των λεπτών δομών, καθώς και την παροχή επαρκούς επισκόπησης. [49]



Σχήμα 4.4: Ορισμός της ίνωσης με τροποποιημένη κλίμακα. [49]

Grade of Fibrosis	Sample Photograph	Modified Scale
0	Figure 1A	Alveolar septa: No fibrotic burden at the most flimsy small fibers in some alveolar walls Lung structure: Normal lung
1	Figure 1B	Alveolar septa: Isolated gentle fibrotic changes (septum $\leq 3\times$ thicker than normal) Lung structure: Alveoli partly enlarged and rarefied, but no fibrotic masses present
2	Figure 1C	Alveolar septa: Clearly fibrotic changes (septum $>3\times$ thicker than normal) with knot-like formation but not connected to each other Lung structure: Alveoli partly enlarged and rarefied, but no fibrotic masses
3	Figure 1D	Alveolar septa: Contiguous fibrotic walls (septum $>3\times$ thicker than normal) predominantly in whole microscopic field Lung structure: Alveoli partly enlarged and rarefied, but no fibrotic masses
4	Figure 1E	Alveolar septa: Variable Lung structure: Single fibrotic masses ($\leq 10\%$ of microscopic field)
5	Figure 1F	Alveolar septa: Variable Lung structure: Confluent fibrotic masses ($>10\%$ and $\leq 50\%$ of microscopic field). Lung structure severely damaged but still preserved
6	Figure 1G	Alveolar septa: Variable, mostly not existent Lung structure: Large contiguous fibrotic masses ($>50\%$ of microscopic field). Lung architecture mostly not preserved
7	Figure 1H	Alveolar septa: Non-existent Lung structure: Alveoli nearly obliterated with fibrous masses but still up to five air bubbles
8	Figure 1I	Alveolar septa: Non-existent Lung structure: Microscopic field with complete obliteration with fibrotic masses

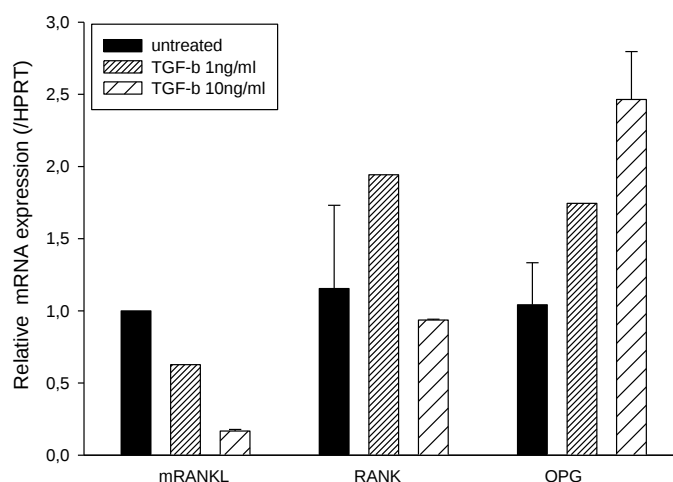
Σχήμα 4.5: Χαρακτηρισμός της τροποποιημένης κλίμακας. [49]

Κεφάλαιο 5. Αποτελέσματα

5.1 Ποσοτικοποίηση έκφρασης γονιδίων των RANKL, RANK, OPG σε πρωτογενή καλλιέργεια ινοβλαστών (fibroblasts).

Οι ινοβλάστες παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη της πνευμονικής ίνωσης. Μετά το στάδιο της φλεγμονής έχουν παραχθεί διάφορες κυτοκίνες όπως η IL-1 β και ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού- β 1 (TGF- β 1) οι οποίοι προωθούν την ενεργοποίηση, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων σε ινοβλάστες και επάγουν την παραγωγή κολλαγόνου από τους μυοϊνοβλάστες. Με αφορμή αυτά τα δεδομένα, πραγματοποιήθηκε *in vitro* πείραμα με καλλιέργεια ινοβλαστών και την προσθήκη διάφορων συγκεντρώσεων TGF- β , συνθήκες που αναπαριστούν το ινωτικό περιβάλλον. Την ομάδα ελέγχου (untreated) αποτελούν ινοβλάστες οι οποίοι επωάζονται στο μέσο καλλιέργειας (DMEM) χωρίς την προσθήκη TGF- β 1.

Ακολούθησε η ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων RANKL, RANK, OPG στα δείγματα cDNA από τα κύτταρα των ινοβλαστών με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο και η ανάλυση των αποτελεσμάτων με βάση τη συγκριτική μέθοδο Ct (ή Δ Ct). Η κανονικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων έγινε με το γονίδιο αναφοράς HPRT.



Σχήμα 5.1: Ποσοτικοποίηση έκφρασης γονιδίων RANKL,RANK,OPG σε ινοβλάστες.

Όπως παρατηρείται από την εικόνα 3.1.1 η έκφραση της RANKL μειώνεται στους ινοβλάστες που έχουν επωαστεί με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση TGF-β (10ng/ml). Η έκφραση της RANK παραμένει σταθερή ενώ φαίνεται ότι η έκφραση του OPG αυξάνεται και είναι ανάλογη της αύξησης της συγκέντρωσης του TGF-β.

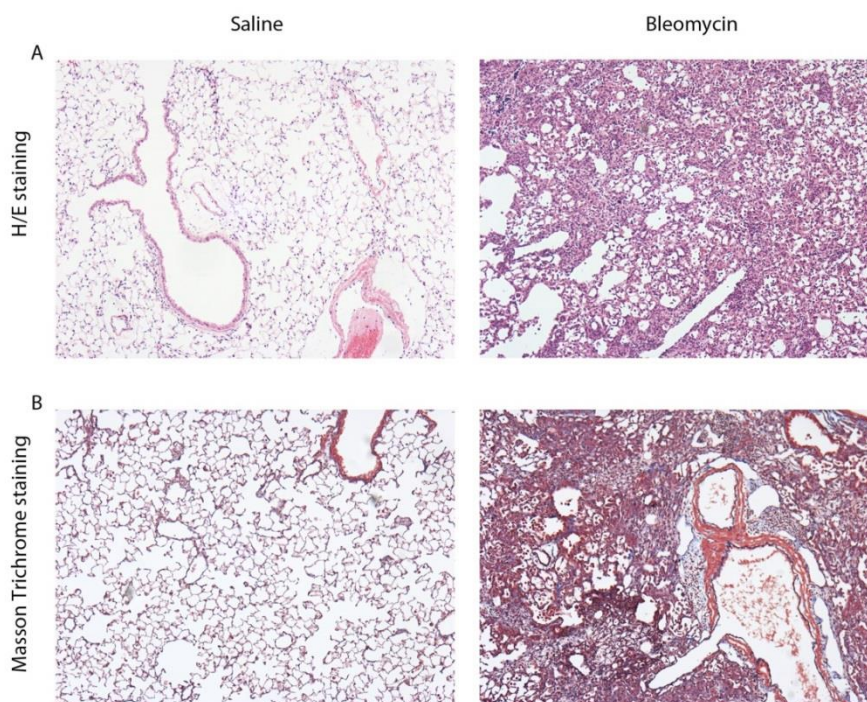
5.2 Εφαρμογή του μοντέλου της μπλεομυκίνης σε C57Bl/6 (Wt) και TghuRANKL ποντίκια.

Για την μελέτη του ρόλου του γονιδίου RANKL αλλά και των υποδοχέων της, RANK,OPG στην παθογένεση της πνευμονικής ίνωσης, εφαρμόστηκε το μοντέλο της μπλεομυκίνης σε αρσενικούς μύες C57/Bl6 και σε TghuRANKL (Tg5516 και Tg5519). Οι δύο σειρές ποντικών Tg5516, Tg5519, έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση της RANKL. Η μπλεομυκίνη δόθηκε με ενιαίο ενδοτραχειακό τρόπο, όπως περιγράφεται παραπάνω. Έχει ορισθεί ως η ημέρα 0 η ημέρα εισαγωγής της και το τελικό σημείο η ημέρα 14, στην οποία τα ζώα θυσιάζονται.

Για την αξιολόγηση της ίνωσης χρησιμοποιούνται αρκετές κοινές μέθοδοι. Οι πιο σημαντικές είναι: η ιστολογική ανάλυση, με βάση το σύστημα βαθμολόγησης Ashcroft, ο ποσοτικός προσδιορισμός του κολλαγόνου και των πρωτεϊνών από το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BALF), ο συνολικός αριθμός των κυττάρων του BALF. Πρόσθετες παράμετροι, όπως το βάρος και ο χρόνος επιβίωσης αξιολογούνται επίσης. Τέλος ο ποσοτικός προσδιορισμός γονιδίων που μελετώνται στο μοντέλο της πνευμονικής ίνωσης αλλά και γονιδίων που η έκφρασή τους μεταβάλλεται στην ίνωση είναι απαραίτητος και πραγματοποιείται με ποσοτική αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου Real-time PCR.

5.2.1 Εφαρμογή του μοντέλου της μπλεομυκίνης σε C57Bl/6 (Wt) ποντίκια.

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε συνολικά σε 18 αρσενικά ποντίκια (n=18) φυσιικού τύπου (C57Bl/6), ηλικίας 10-12 εβδομάδων στα οποία χορηγήθηκε είτε saline (ομάδα ελέγχου) είτε μπλεομυκίνη και θυσιάστηκαν την 14^η ημέρα. Πραγματοποιήθηκε ιστολογική παρατήρηση των πνευμονικών ιστών μετά από ειδική χρώση, όπως παρουσιάζεται παρακάτω.



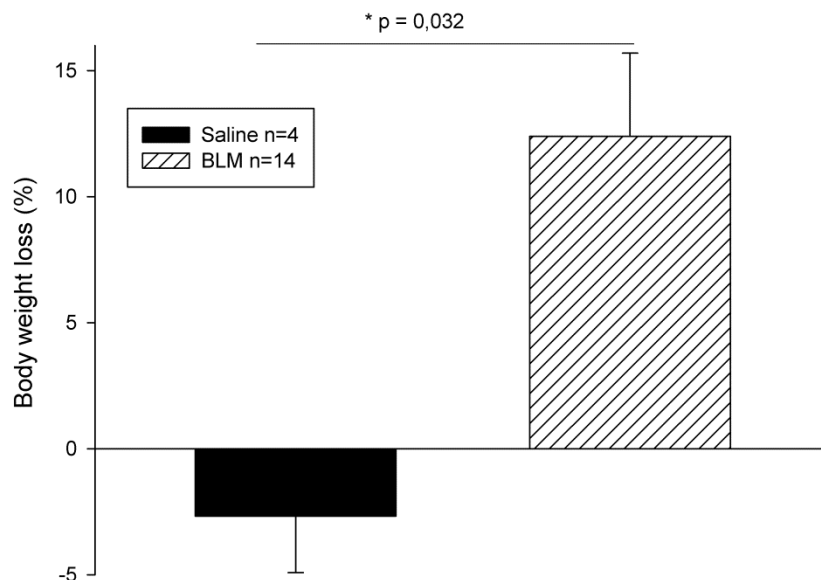
Σχήμα 5.2: Α) Φωτογραφίες από τομές πνεύμονα μετά από χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης (x10 μεγέθυνση), Β) Φωτογραφίες από τομές πνεύμονα μετά από τριχρωματική χρώση Masson (x10 μεγέθυνση).

Στο σχήμα 5.2Α) φαίνονται τομές παραφρηνοποιημένων ιστών πνεύμονα μετά από χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης. Οι πυρήνες και τα ριβοσώματα βάφονται με σκούρο μωβ χρώμα από την αιματοξυλίνη, ενώ οι υπόλοιπες δομές του κυτταροπλάσματος βάφονται κόκκινες από την εωσίνη. Με τη χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης είναι εφικτός ο διαχωρισμός φυσιολογικού πνευμονικού ιστού (εικόνα πάνω αριστερά) όπου απεικονίζονται οι βρόγχοι, το κυψελιδικό επιθήλιο και τα κυψελιδικά

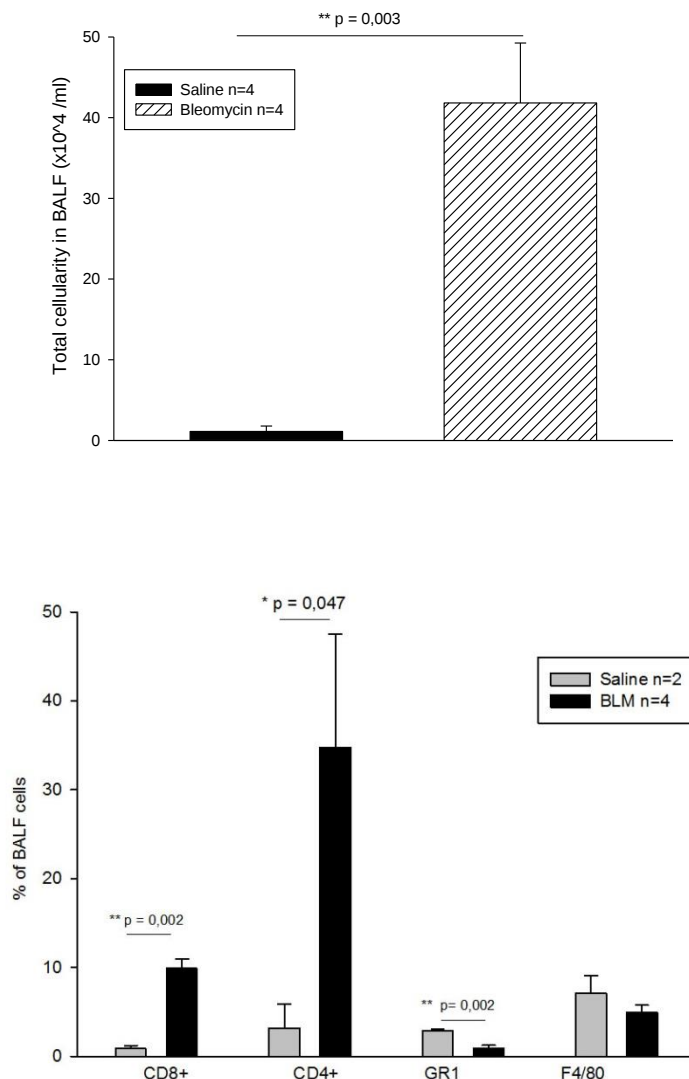
διαφράγματα, από έναν ινωτικό ιστό (εικόνα πάνω δεξιά). Χαρακτηριστική εικόνα του μη φυσιολογικού ινωτικού ιστού, είναι η εναπόθεση κολλαγόνου στο ενδιάμεσο κυψελιδικό χώρο, η πάχυνση των κυψελιδικών διαφραγμάτων και η πλήρης απόφραξη τους από ινωτικές μάζες που έχουν ως αποτέλεσμα την αλλοίωση της αρχιτεκτονικής δομής του πνεύμονα.

Στο σχήμα 5.2 Β) απεικονίζονται τομές παραφινोποιημένων ιστών πνεύμονα μετά από τριχρωματική χρώση Masson με την οποία γίνεται η διάκριση του κολλαγόνου από τον περιβάλλοντα συνδετικό ιστό. Το κολλαγόνο βάφεται μπλε ή πράσινο, η κερατίνη και οι μυϊκές ίνες κόκκινες και το κυτταρόπλασμα ρόζ. Έτσι σε ινωτικό ιστό (εικόνα κάτω δεξιά) με βάσει τα χαρακτηριστικά της δομής του που περιγράφηκαν παραπάνω, εμφανίζονται έντονα τα τρία διαφορετικά χρώματα και κυρίως το μπλε λόγω του κολλαγόνου. Στην εικόνα κάτω αριστερά, απεικονίζεται ο φυσιολογικός ιστός πνεύμονα μετά τη τριχρωματική μέθοδο Masson, στην οποία δεν υπάρχει εναπόθεση κολλαγόνου.

Η απώλεια βάρους είναι αποτέλεσμα της προσβολής από την μπλεομυκίνη και το αρχικό χαρακτηριστικό της εξέλιξης της νόσου. Στο σχήμα 5.3 παρουσιάζεται το ποσοστό απώλειας βάρους των ζώων στα οποία έχει γίνει έγχυση μπλεομυκίνης συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου στην οποία χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός (saline). Ο αριθμός των ζώων της πειραματικής ομάδας ήταν n=14, ενώ της ομάδας ελέγχου n=4. Στην ομάδα ελέγχου δεν σημειώνεται απώλεια βάρους και φαίνεται φυσιολογική η ανάπτυξη τους, αντίθετα στην πειραματική ομάδα σημειώνεται περίπου 10% απώλεια βάρους.



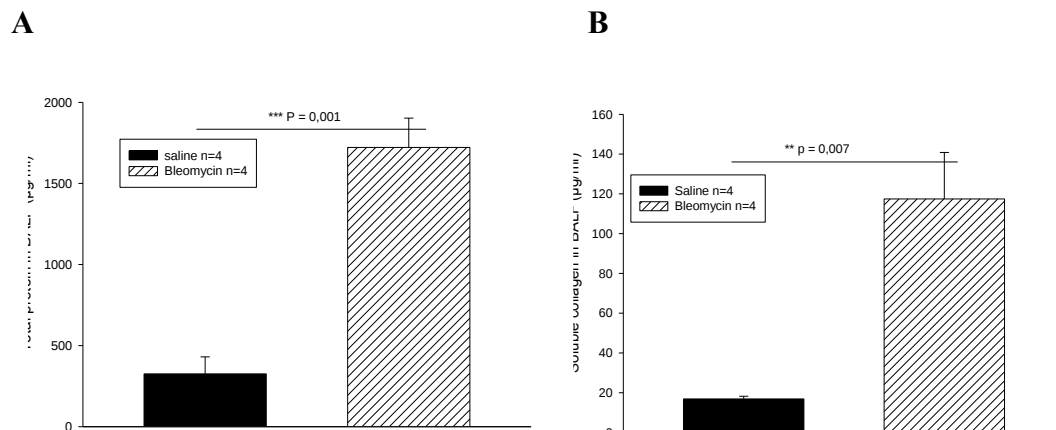
Σχήμα 5.3: Ποσοστό απώλειας βάρους την 14^η ημέρα μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης ή φυσιολογικού ορού της πειραματικής ομάδας και της ομάδας ελέγχου (μαύρο) αντίστοιχα.



Σχήμα 5.4: Μέτρηση κυττάρων στο βρογχοκυψελιδικό υγρό πλύσης (BALF) και διαφοροποίηση των κυτταρικών πληθυσμών που απαντώνται στο BALF την 14^η ημέρα μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης.

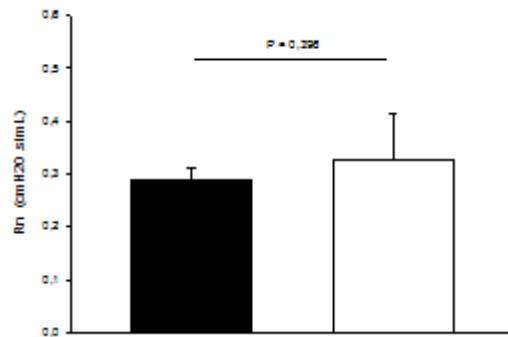
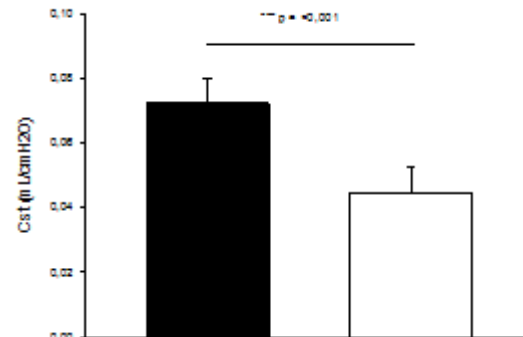
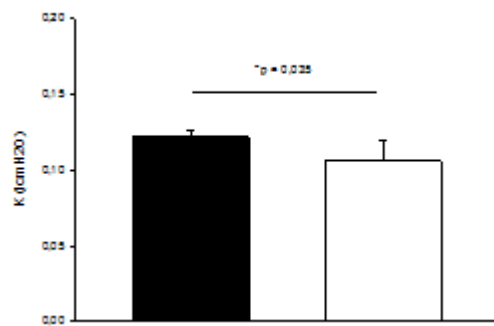
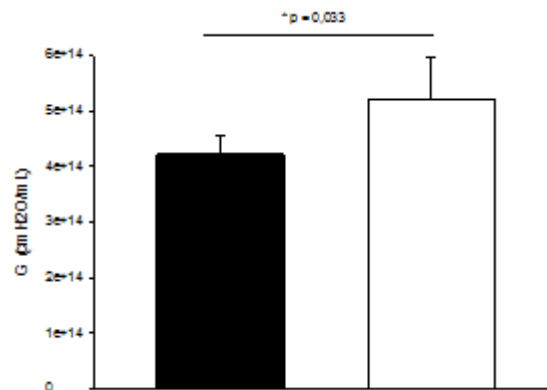
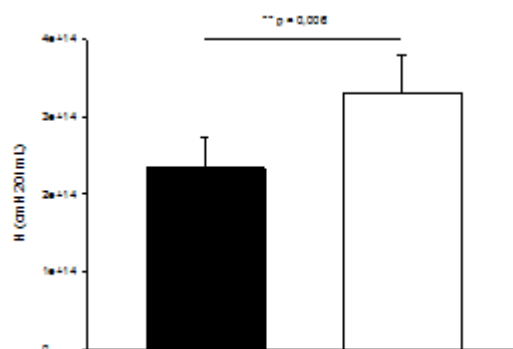
Στο σχήμα 5.4 παρουσιάζεται η μέτρηση των συνολικών κυττάρων στο συνολικό βρογχοκυψελιδικό υγρό πλύσης (BALF) των δύο ομάδων. Η ποσότητα των κυττάρων είναι μια αρχική ένδειξη της παθογένειας της πνευμονικής ίνωσης γιατί, σύμφωνα με το μηχανισμό της ασθένειας, στα πρώτα στάδια της ινωτικής απόκρισης γίνεται η πρόσληψη φλεγμονωδών κυττάρων (ουδετερόφιλα, μακροφάγα, λεμφοκύτταρα, ηωσινόφιλα) προς το σημείο της βλάβης. Σύμφωνα με την κυτταρομετρία ροής (FACs) που πραγματοποιήθηκε στο συνολικό βρογχοκυψελιδικό υγρό πλύσης (BALF) την 14η ημέρα μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης εντοπίζονται

σε μεγαλύτερο ποσοστό τα CD8⁺ CD4⁺ και μειωμένη ποσότητα μακροφάγων (F4/80) και των ουδετερόφιλων (GR1).



Σχήμα 5.5: Α) Ποσοτικός προσδιορισμός συνολικής πρωτεΐνης στο βρογχοκυψελιδικό υγρό πλύσης (BALF), Β) Ποσοτικός προσδιορισμός διαλυτού κολλαγόνου στο βρογχοκυψελιδικό υγρό πλύσης (BALF).

Με την ποσοτικοποίηση της συνολικής πρωτεΐνης στο BALF προσδιορίζεται το οίδημα που έχει δημιουργηθεί εξαιτίας της καταστροφής του πνευμονικού ιστού και της διαπερατότητας του πνευμονικού επιθηλίου. Όπως απεικονίζεται στο σχήμα 5.5 Α) η ποσότητα της συνολικής πρωτεΐνης στην ομάδα των ζώων που έχει χορηγηθεί μπλεομυκίνη είναι αρκετά μεγαλύτερη από της ομάδας ελέγχου. Τα αποτελέσματα αυτά συσχετίζονται με την ποσότητα του διαλυτού κολλαγόνου όπως φαίνεται στο σχήμα 5.5 Β). Η εναπόθεση κολλαγόνου από τους μυοϊνοβλάστες αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό της παθογένειας της πνευμονικής ίνωσης.

A**B****C****D****E**

Σχήμα 5.6: A) Μέτρηση νευτώνειας αντίστασης (Rn). B) Μέτρηση στατικής συμμόρφωσης(Cst). C) Μέτρηση της παραμέτρου K. D) Μέτρηση απόσβεσης ιστού (G). E) Μέτρηση ελαστικότητας ιστού (H). Ο αριθμός των δειγμάτων για

την πειραματική ομάδα ήταν 14 ζώα (n=14) και της ομάδας ελέγχου (μαύρο) 4 ζώα.

Πίνακας 5.1 Αποτελέσματα μετρήσεων μηχανικών παραγόντων πνεύμονα.

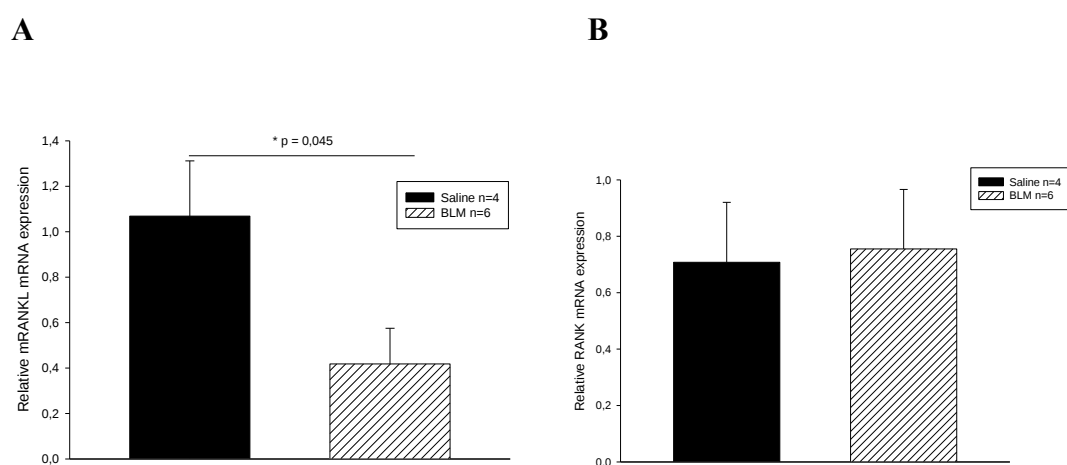
Παράμετροι	Saline	BLM	% change	
Rn (cmH ₂ O,s/mL)	0,30	0,33	9,1	↑
Cst (mL/cmH ₂ O)	0,07	0,04	36,3	↓
A (mL)	0,85	0,63	25,6	↓
K (/cmH ₂ O)	0,12	0,10	12,1	↓
G (cmH ₂ O/mL x 10 ¹⁴)	4,34	5,41	24,5	↑
H (cmH ₂ O/mL x 10 ¹⁴)	2,57	3,36	30,7	↑
Area (mL,cmH ₂ O x 10 ¹⁴)	2,37	2,19	7,6	↓

Το σχήμα 5.6 και ο πίνακας 5.1 παρουσιάζουν τις μετρήσεις των μηχανικών παραγόντων φυσιολογικών ιστών (ομάδα ελέγχου) και ιστών με ίνωση, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν στο μηχάνημα flexivent. Συγκεκριμένα, στο σχήμα 5.6 Α) απεικονίζεται η νευτώνεια αντίσταση (Rn) η οποία αντιπροσωπεύει την αντίσταση των αεραγωγών. Η στατιστική συμμόρφωση (Cst) προκύπτει από τη μέγιστη πίεση όγκου-βρόχων (PV-βρόχους) μεταξύ της λειτουργικής υπολειπόμενης χωρητικότητας (FRC) και της συνολικής χωρητικότητας των πνευμόνων (TLC). Στο σχήμα 5.6 C) δείχνει τη μέτρηση της παραμέτρου K, η οποία σχετίζεται με την καμπυλότητα του άνω τμήματος στο άκρο της εκπνοής στην καμπύλη πίεσης-όγκου. Η απόσβεση ιστού (G) είναι παράμετρος της αντίστασης του ιστού που αντανακλά την διάχυση της ενέργειας στις κυψελίδες και η ελαστικότητα ιστού (H) αντανακλά την εξοικονόμηση ενέργειας στις κυψελίδες. Επίσης στον πίνακα 5.1 η παράμετρος (A) αντιπροσωπεύει την εισπνεόμενη χωρητικότητα ενώ ο όρος (Area), αναφέρεται στην περιοχή μεταξύ της εισπνοής και εκπνοής στο άκρο της καμπύλης πίεσης-όγκου.

Σύμφωνα με τα ιστολογικά χαρακτηριστικά της ίνωσης, η αρχιτεκτονική του πνεύμονα αλλοιώνεται, ο αέρας είναι περιορισμένος λόγω της ύπαρξης μεγάλης ποσότητας κολλαγόνου και η ανταλλαγή αερίων στους βρόγχους πραγματοποιείται με

δυσκολία. Οι μηχανικές ιδιότητες των αεραγωγών και των πνευμόνων όπως η στατιστική συμμόρφωση (Cst), η εισπνεόμενη χωρητικότητα (A) η παράμετρος K και η περιοχή μεταξύ της εισπνοής και εκπνοής στην καμπύλη πίεσης-όγκου μειώνονται όπως είναι αναμενόμενο, ενώ η αντίσταση του ιστού (G) ως προς τη διάχυση της ενέργειας στις κυψελίδες, η ελαστικότητα του ιστού (H) ως προς την εξοικονόμηση ενέργειας στις κυψελίδες και η αντίσταση των αεραγωγών αυξάνονται λόγω της δυσλειτουργίας του πνεύμονα.

Στις παραπάνω πειραματικές ομάδες πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων RANKL και RANK σε δείγματα cDNA (25 ng/μl) από ιστούς πνεύμονα με την μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με βάση τη συγκριτική μέθοδο Ct (ή ΔCt). Όσο πιο χαμηλοί κύκλοι τόσο πιο υψηλή είναι η έκφραση των γονιδίων αυτών. Η κανονικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων έγινε με το γονίδιο αναφοράς B2m (β2-μικροσφαιρίνη).



Σχήμα 5.7: A) Ποσοτικοποίηση έκφρασης του γονιδίου RANKL. B) Ποσοτικοποίηση έκφρασης του γονιδίου RANK.

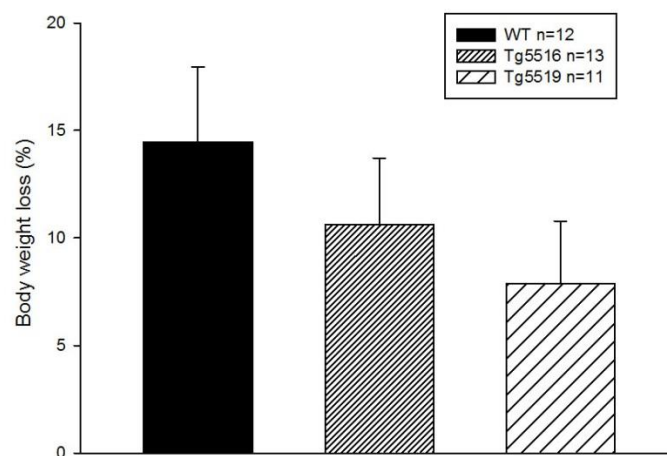
Στο σχήμα 5.7 A) η έκφραση του γονιδίου RANKL φαίνεται να μειώνεται στα ποντίκια που έχει γίνει έγχυση μπλεομυκίνης συγκριτικά με τα saline και η έκφραση του γονιδίου RANK να μην μεταβάλλεται στις δυο ομάδες. Το αποτέλεσμα αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία καθώς ο υποδοχέας RANK αναφέρεται ότι εκφράζεται στα μακροφάγα, τα οποία αποτελούν μικρό

πληθυσμό των συνολικών κυττάρων που εντοπίζονται στην ίνωση την 14^η ημέρα όπως φαίνεται και από την ανάλυση FACs (Σχήμα 5.4).

5.2.2 Εφαρμογή του μοντέλου της μπλεομυκίνης σε TghuRANKL ποντίκια.

Για την περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου του RANKL στην παθογένεια της πνευμονικής ίνωσης εφαρμόστηκε το μοντέλο της μπλεομυκίνης και ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία όπως και παραπάνω (παράγραφο 5.2) στα TghuRANKL ποντίκια. Το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές και με επαρκή αριθμό ποντικών. όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα.

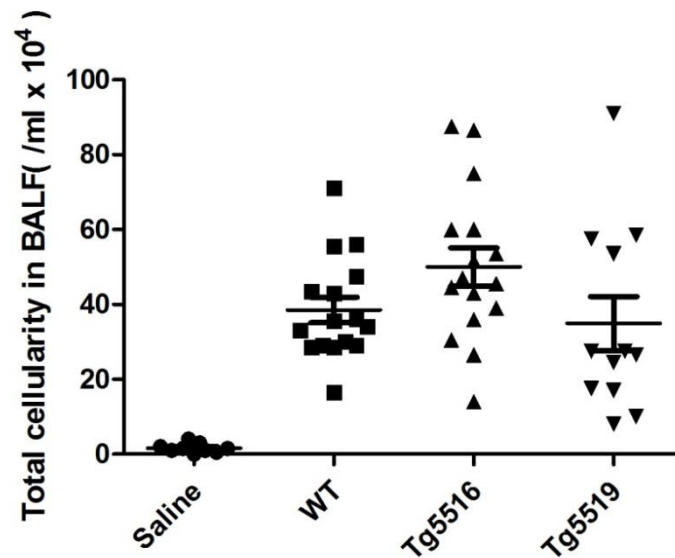
Πείραμα	Wt	Tg5516	Tg5519
Συνολικός αριθμός δειγμάτων (n)	12	13	11



Σχήμα 5.8: Ποσοστό απώλειας βάρους την 14^η ημέρα μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης στις τρεις πειραματικές ομάδες

Η απώλεια βάρους είναι αποτέλεσμα της προσβολής από την μπλεομυκίνη όπως αναφέρθηκε και παραπάνω. Στο σχήμα 5.8 Α) παρουσιάζεται το ποσοστό απώλειας βάρους των ζώων στα οποία έχει γίνει έγχυση μπλεομυκίνης. Στην ομάδα

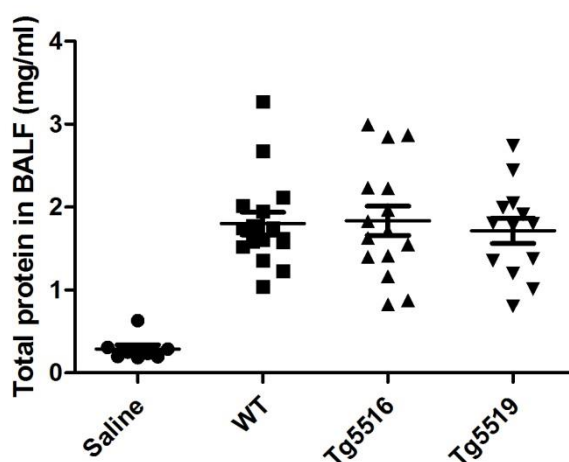
ελέγχου (WT) παρατηρήθηκε το μεγαλύτερο ποσοστό απώλειας βάρους περίπου στο 12%. Παρ' όλα αυτά η διαφορά των πειραματικών ομάδων δεν διαφέρει στατιστικά σημαντικά από την ομάδα ελέγχου.



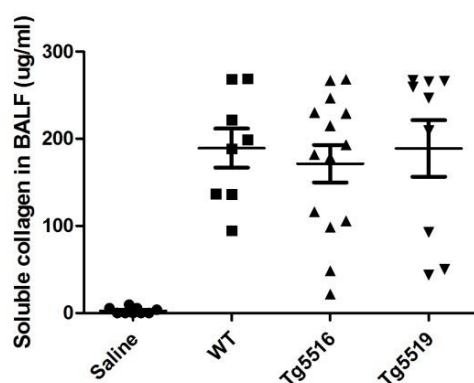
Σχήμα 5.9: Μέτρηση κυττάρων στο βρογχοκυψελιδικό υγρό πλύσης (BALF) την 14^η ημέρα μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης στις τρεις πειραματικές ομάδες

Στο σχήμα 5.9 παρουσιάζεται η μέτρηση των συνολικών κυττάρων στο συνολικό βρογχοκυψελιδικό υγρό πλύσης (BALF) των τριών πειραματικών ομάδων. Την 14^η ημέρα μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης παρατηρούμε ότι δεν αλλάζει η διήθηση των κυττάρων στο πνεύμονα γεγονός που αποδεικνύει την ύπαρξη φλεγμονής και στις τρεις πειραματικές ομάδες, επομένως και την μη εμπλοκή της πρωτεΐνης RANKL στην εμφάνιση και ύπαρξη φλεγμονής.

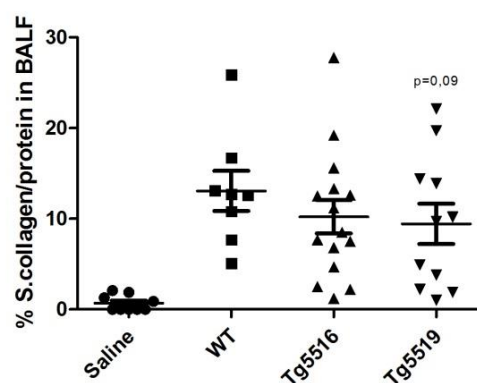
A



B



C

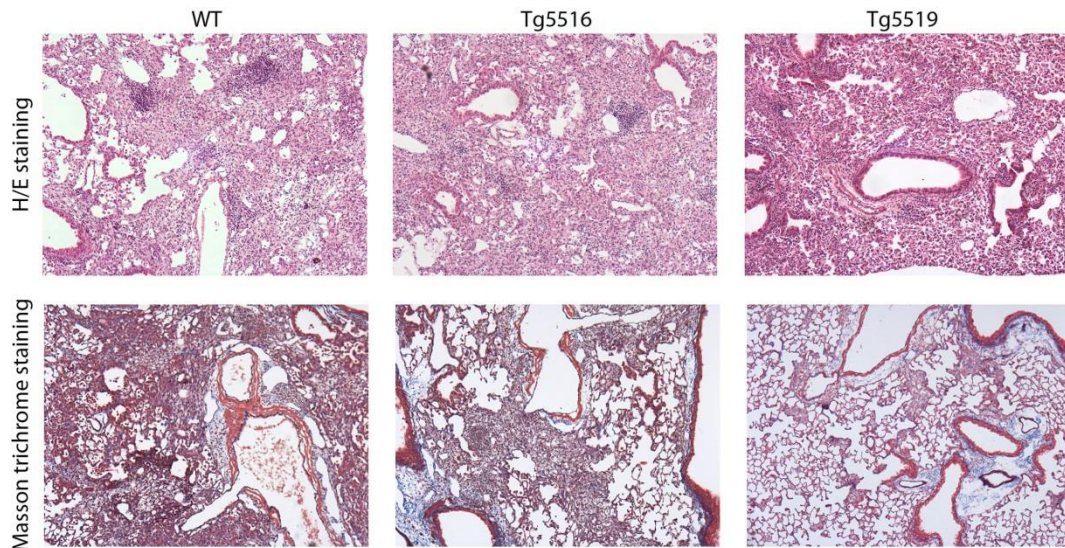


Σχήμα 5.10: A) Ποσοτικός προσδιορισμός συνολικής πρωτεΐνης στο βρογχοκυψελιδικό υγρό πλύσης (BALF), B) Ποσοτικός προσδιορισμός διαλυτού κολλαγόνου στο βρογχοκυψελιδικό υγρό πλύσης (BALF), C) Ποσοστό διαλυτού κολλαγόνου στην συνολική πρωτεΐνη του BALF.

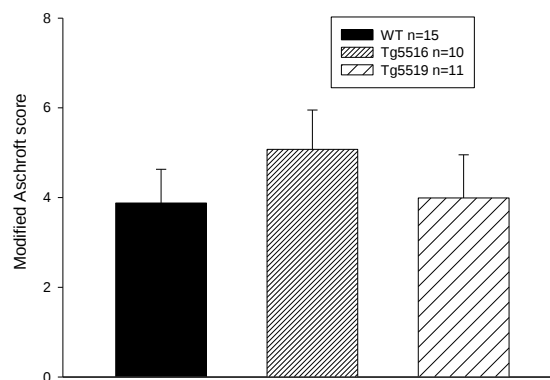
Όπως απεικονίζεται στο σχήμα 5.10 A) η ποσότητα της συνολικής πρωτεΐνης στις τρεις πειραματικές ομάδες δεν μεταβάλλεται. Η καταστροφή του πνευμονικού ιστού και η διαπερατότητα του πνευμονικού επιθηλίου είναι εκτεταμένες και ανεξάρτητη του γονοτύπου. Τα αποτελέσματα αυτά συσχετίζονται με την ποσότητα του διαλυτού κολλαγόνου όπως φαίνεται στο σχήμα 5.10 B) τα οποία παραμένουν υψηλά και στις τρεις ομάδες. Παρατηρήθηκε μια μικρή πτώση στο ποσοστό

κολλαγόνου επί της συνολικής πρωτεΐνης του BALF αλλά όχι με στατιστικά σημαντική διαφορά.

A



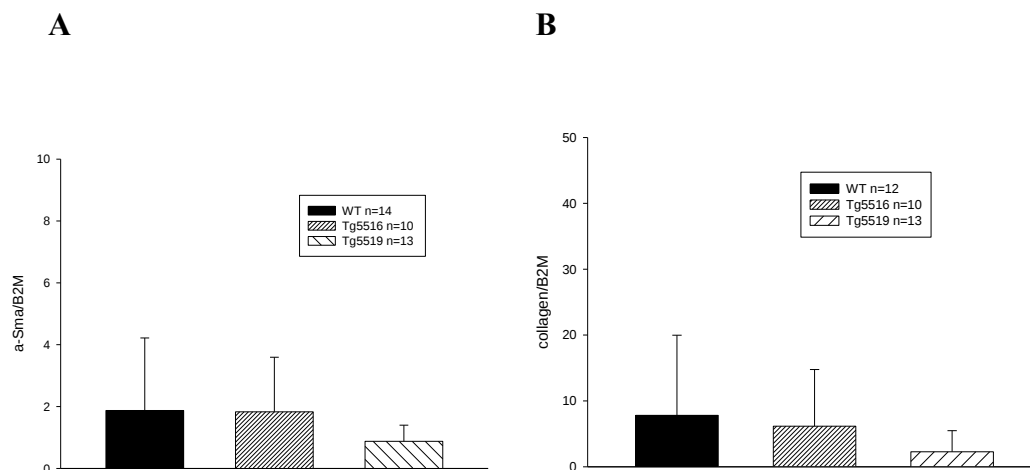
B



Σχήμα 5.11: A) Φωτογραφίες από τομές πνεύμονα μετά από χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης (x10 μεγέθυνση) και μετά από τριχρωματική χρώση Masson (x10 μεγέθυνση), B) Modified Ascroft score.

Στο σχήμα 5.11 A) φαίνονται τομές παραφρηνοποιημένων ιστών πνεύμονα από WT, Tg5516 και Tg5519 ποντίκια μετά από χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης (πάνω σειρά) και τομές ιστών μετά από τριχρωματική χρώση Masson (κάτω σειρά). Στο σχήμα 5.11 B) παρουσιάζεται γραφικά η εκτίμηση της ίνωσης με το μοντέλο Modified Ascroft score, των συνολικών δειγμάτων του κάθε γονοτύπου, στο οποίο

παρατηρείται μια μικρή αύξηση στα Tg5516 αλλά δεν είναι στατιστικά σημαντική διαφορά.



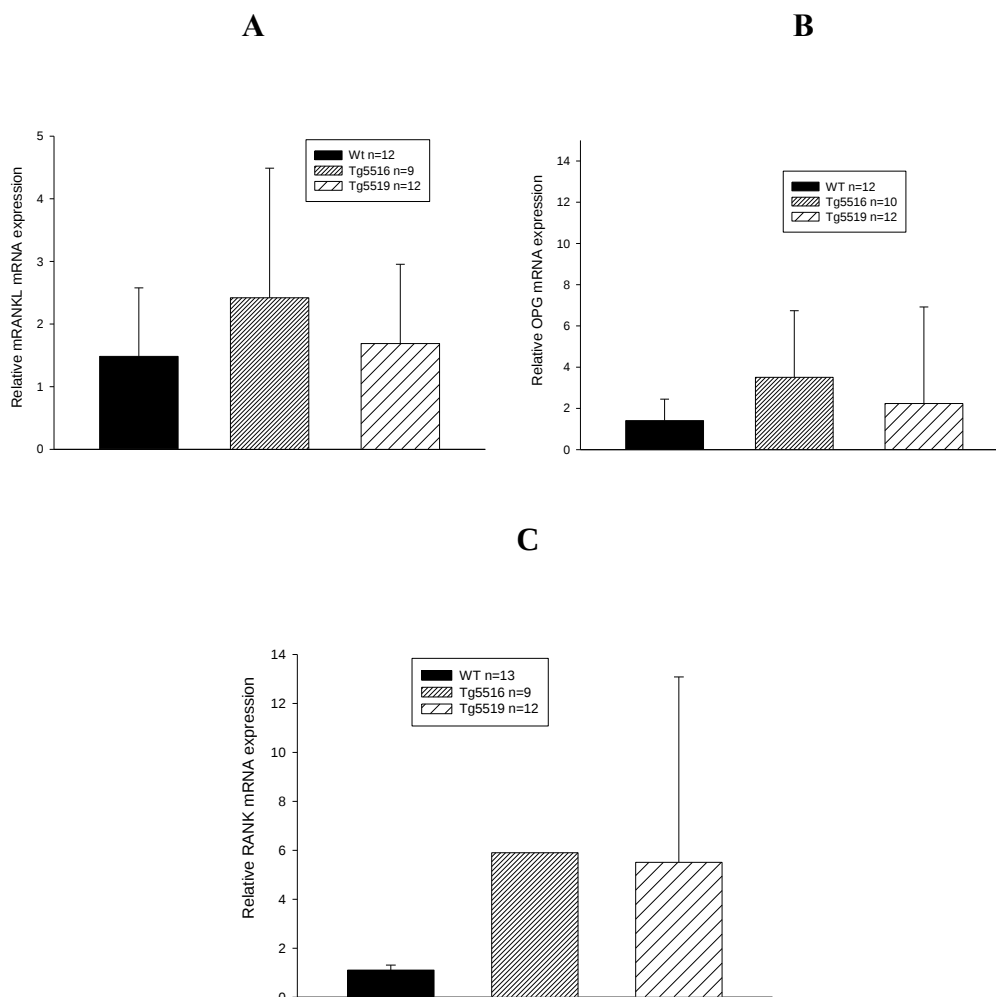
Σχήμα 5.12: Α) Ποσοτικοποίηση έκφρασης γονιδίου a-Sma Β) Ποσοτικοποίηση έκφρασης γονιδίου collagen.

Ένα ακόμη στοιχείο επιβεβαίωσης της δημιουργίας ίνωσης είναι η έκφραση πρωτεΐνης ακτίνης (a-Sma) και κολλαγόνου. Τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών αυτών θα πρέπει να είναι παρόμοια καθώς η έκφραση αυτών των γονιδίων συσχετίζονται μεταξύ τους. Όπως παρατηρούμε στο σχήμα 5.12 υπάρχει παρόμοια έκφραση των δύο παραγόντων σε κάθε γονότυπο.

Πίνακας 5.2. Αποτελέσματα μετρήσεων μηχανικών παραγόντων πνεύμονα.

Παράμετροι	WT n=9	Tg5516 n=6	Tg5519 n=6
Rn (cmH2O,s/mL)	0,33	0,32	0,43
Cst (mL/cmH2O)	0,04	0,03	0,05
A (mL)	0,63	0,55	0,68
K (/cmH2O)	0,10	0,10	0,11
G (cmH2O/mL x 10 ¹⁴)	5,41	5,72	4,99
H (cmH2O/mL x 10 ¹⁴)	3,36	3,72	3,05
Area (mL,cmH2O x 10 ¹⁴)	2,19	2,36	2,29

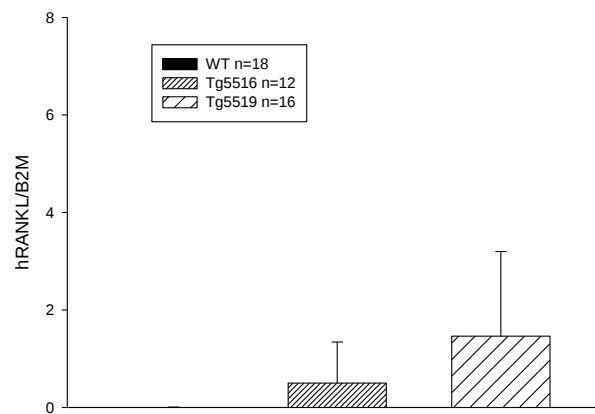
Στον πίνακα 5.2. φαίνονται οι παράμετροι των μηχανικών ιδιοτήτων της ίνωσης οι οποίοι είναι παρόμοιοι και στους τρεις γονοτύπους.



Σχήμα 5.13: A) Ποσοτικοποίηση έκφρασης του γονιδίου mRANKL, B) Ποσοτικοποίηση έκφρασης του γονιδίου OPG, C) Ποσοτικοποίηση έκφρασης του γονιδίου RANK.

Σύμφωνα με την παραπάνω εικόνα, τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων mRANKL, OPG είναι παρόμοια και στους τρεις γονοτύπους. Τα αποτελέσματα όμως δεν είναι στατιστικά σημαντικά. Τα TghuRANKL ποντίκια φαίνεται να εκφράζουν περισσότερο τον υποδοχέα του RANKL (RANK) (σχήμα 5.13C) συγκριτικά με τα WT ποντίκια.

Ο γονότυπος των ζώων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα επιβεβαιώθηκε με την ποσοτικοποίηση έκφρασης της huRANKL.



Σχήμα 5.14: Ποσοτικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου huRANKL

Κεφάλαιο 6. Συμπεράσματα-Συζήτηση

Η πρωτεΐνη RANKL εκφράζεται από τα δενδριτικά κύτταρα, τα CD4⁺ T κύτταρα, τους ινοβλάστες, τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών, κύτταρα του ενδοθηλίου και του επιθηλίου, τους οστεοβλάστες και τα οστεοκύτταρα. Η έκφραση της εντοπίζεται σε πολλούς ιστούς συμπεριλαμβανομένου και του πνεύμονα. Η έκφραση της RANK εντοπίζεται σε κύτταρα της σειράς μονοκυττάρων/μακροφάγων, συμπεριλαμβανομένου των πρόδρομων οστεοκλαστών, από T και B κύτταρα και τα δενδριτικά. Το OPG βρέθηκε να εκφράζεται σε έναν μεγάλο αριθμό ιστών, συμπεριλαμβανομένων των πνευμόνων και σε κυτταρικό επίπεδο εκκρίνεται κυρίως από τους προ-οστεοβλάστες/κύτταρα του στρώματος, τα δενδριτικά κύτταρα όσο και από τα θυλακοειδή δενδριτικά κύτταρα, στα ενδοθηλιακά κύτταρα (ECs), στα λεία μυϊκά κύτταρα της αορτή (VSMCs) και στους ινοβλάστες.

Τα μόρια RANKL/OPG/RANK ρυθμίζουν την οστική απορρόφηση και αναδόμηση του οστού μέσω της οστεοκλαστογένεσης. Η διαδικασία περιλαμβάνει την επαναρρόφηση των οστών από τους οστεοκλάστες, μία φάση αναστροφής η οποία χαρακτηρίζεται από την απόπτωση των οστεοκλαστών και τέλος μια φάση αντικατάστασης του οστού με το νεοσχηματισμένο από τους οστεοβλάστες. Η επαναρρόφηση του οστού ρυθμίζεται μέσω της φλεγμονής κυρίως με δύο μηχανισμούς. Πρώτον, προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες μεσολαβούν στη λειτουργία των οστεοκλαστών: ενεργοποιούν τον υποδοχέα του πυρηνικού παράγοντα-B (RANK) και του λειτουργικού συνδέτη αυτού (RANKL), επίσης γνωστός ως TRANCE (TNF που σχετίζεται με την ενεργοποίηση που προκαλείται από κυτοκίνη). Δεύτερον, η οστεοκλαστογένεση μπορεί να ρυθμιστεί μέσω της ρύθμισης του παράγοντα διέγερσης αποικιών μακροφάγων (M-CSF). Οι προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες που ρυθμίζουν την έκφραση των RANKL, RANK, OPG είναι: TNF α , IL-1 β (αυξάνουν την έκφραση των RANKL, OPG), IL-6 (αυξάνουν την έκφραση των RANKL, OPG, μειώνουν τη RANK) και IL-17 και CD40L (αυξάνουν την έκφραση των RANKL και OPG, αντίστοιχα). Επίσης πολλοί παράγοντες ανάπτυξης επιδρούν στην έκφραση των μορίων, όπως ο TGF- β (μειώνει την έκφραση των RANKL και RANK, αυξάνει του OPG). Η συσχέτιση μεταξύ οστεοκλαστών, του παράγοντα διέγερσης αποικίας

μακροφάγων, προ-φλεγμονωδών κυτοκινών, ειδικά του παράγοντα νέκρωσης όγκων-α και της ιντερλευκίνη-1, μπορεί να εξηγήσει τη σχέση μεταξύ φλεγμονής και οστεοπόρωσης.

Ακόμη ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της φλεγμονής είναι ότι μπορεί να οδηγήσει σε ίνωση, όπως συμβαίνει και στην πνευμονική ίνωση. Η διαδικασία της πνευμονικής ίνωσης έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση φυσιολογικών κυττάρων με ινοβλάστες και τελικά την αντικατάσταση φυσιολογικού ιστού με ουλώδη ιστό. Σύμφωνα με το μηχανισμό της ίνωσης, στο στάδιο της πήξης απελευθερώνεται ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού-β1 (TGF-β1) και προσελκύονται φλεγμονώδη κύτταρα. Στο αρχικό στάδιο της ίνωσης, στη φλεγμονή, τα επιθηλιακά κύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα απελευθερώνουν φλεγμονώδεις μεσολαβητές. Τα ουδετερόφιλα είναι φλεγμονώδη κύτταρα και εντοπίζονται άφθονα στα πρώιμα στάδια της επούλωσης του τραύματος, αλλά αντικαθίσταται από τα μακροφάγα και με τα λευκοκύτταρα καθαρίζουν την πληγή για να αποτρέψουν τη μόλυνση από οργανισμούς. Πέρα από τον TGF-β που παίζει κεντρικό ρόλο στην παθογένεια της πνευμονικής ίνωσης, ο TNF-α, η IL-1β που είναι ισχυροί προφλεγμονώδεις μεσολαβητές επάγουν την οξεία πνευμονική βλάβη και αυξάνουν την έκφραση της IL-6. Η IL-17A έχει επίσης έχει ενοχοποιηθεί για την παθογένεση της πνευμονικής ίνωσης καθώς είναι αυξημένη στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL) των ασθενών με IPF και η έκφραση της συνδέεται με τα ουδετερόφιλα.

Όλοι αυτοί οι παράγοντες που εμπλέκονται στην εξέλιξη της πνευμονικής ίνωσης και εντοπίζονται στο στάδιο της φλεγμονής, συγχρόνως αποτελούν ρυθμιστές της έκφρασης των RANKL/OPG/RANK. Η RANKL και το OPG έχουν εντοπιστεί στον πνεύμονα. Επίσης τα κύτταρα στο αρχικό στάδιο της φλεγμονής στην πνευμονική ίνωση, αποτελούν πηγές έκφρασης αυτών των μορίων, δηλαδή, τα ενδοθηλιακά κύτταρα παράγουν OPG, τα T κύτταρα παράγουν RANKL και τα μακροφάγα RANK. Τέλος από τους ινοβλάστες παράγεται RANKL και OPG. Σύμφωνα με αυτά τα δεδομένα και το μηχανισμό της πνευμονικής ίνωσης, υποθέτουμε ότι στα αρχικό στάδιο της ίνωσης παράγεται RANKL, OPG και RANK. Ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού-β1 (TGF-β1) ο οποίος παράγεται αρχικά, αυξάνει την παραγωγή OPG και μειώνει των RANKL και RANK. Στο στάδιο της φλεγμονής RANK παράγεται από τα μακροφάγα τα οποία παράγουν τον παράγοντα TNF-α και την IL-1β που με τη σειρά τους αυξάνουν την έκφραση OPG και RANKL.

Η IL-17A παράγεται από τα ουδετερόφιλα και αλληλοεξαρτάται από τον TGF-β, επάγει την έκφραση RANKL. Άρα στο στάδιο της φλεγμονής θα περιμέναμε αυξημένα επίπεδα RANKL και OPG και χαμηλή έκφραση RANK. Η IL-6 η οποία είναι αυξητικός παράγοντας για τους ινοβλάστες, αυξάνει την παραγωγή OPG και RANKL. Οι ινοβλάστες οι οποίοι θα μετατραπούν μετά την ενεργοποίηση τους σε μυοϊνοβλάστες, αποτελούν πηγή έκφρασης των OPG και RANKL, οπότε στο στάδιο της ίνωσης υποθέτουμε ότι τα επίπεδα τους θα είναι υψηλά. Η έκφραση της RANKL όμως μειώνεται από τον TGF-β ο οποίος συμμετέχει στην προώθηση της ενεργοποίησης, του πολλαπλασιασμού, και τη διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων και του κολλαγόνου που παράγεται από μυοϊνοβλάστες.

Σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα, δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην έκφραση του γονιδίου RANKL στο μοντέλο της πνευμονικής ίνωσης και στους τρεις γονοτύπους (WT, Tg5516, Tg5519). Σε *in vitro* πειράματα, σε κύτταρα ινοβλαστών με TGF-β, φάνηκε να αυξάνεται η έκφραση του ανταγωνιστή της RANKL, OPG, δεδομένο που δεν επιβεβαιώθηκε στα *in vivo* πειράματα, σε κανένα γονότυπο, στις συνθήκες ίνωσης. Ακόμη, τα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα της RANKL (RANK) ήταν ελάχιστα αυξημένα στα TghuRANKL ποντίκια. Συμπεραίνουμε, ότι υπερέκφραση της πρωτεΐνης huRANKL δεν συμμετέχει στην εξέλιξη της ασθένειας είτε θετικά είτε αρνητικά και πιθανώς να εξαρτάται με την αναλογία στην οποία βρίσκεται με την ποσότητα του OPG. Θα είχε ενδιαφέρον λοιπόν, να εξετασθούν μελλοντικά, οι κυτταρικοί πληθυσμοί που εκφράζουν την RANKL, OPG, RANK στον ιστό του πνεύμονα και τα επίπεδα έκφρασης τους σε διαφορετικές συνθήκες όταν εκτεθούν σε ινωτικούς παράγοντες, όπως πραγματοποιήθηκε στο *in vitro* πείραμα με τον TGF-β.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α΄

Συντμήσεις

Arg1	Arginase-1	Αργινάση-1
AIDS	Acquired Immune Deficiency syndrome	Σύνδρομο επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας
AIP	Acute interstitial pneumonia	Οξεία διάμεση πνευμονία
ATII	Alveolar type II	Κυψελιδικού τύπου II
aVb3	Alpha-v beta-3 integrin	Άλφα-v βήτα-3 Ιντεργκρίνη
aVb5	Alpha-v beta-5 integrin	Άλφα-v βήτα-5 Ιντεργκρίνη
aVb8	Alpha-v beta-8 integrin	Άλφα-v βήτα-8 Ιντεργκρίνη
aVb6	Alpha-v beta-6 integrin	Άλφα-v βήτα-6 Ιντεργκρίνη
BMP-2	Bone morphogenetic protein-2	Μορφογενετική πρωτεΐνη οστών-2
BALF	Bronchoalveolar lavage fluid	Βρογχοκυψελιδικό υγρό πλύσης
BMD	Bone Mineral Density	οστική πυκνότητα
BOOP	Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia	Αποφρακτική βρογχιολίτιδα-οργανωμένη πνευμονία
BIP	Bronchiolitis obliterans interstitial pneumonia	Αποφρακτική βρογχιολίτιδα-διάμεση πνευμονία
CF	Cystic fibrosis	Κυστική ίνωση
CAD	Coronary Artery	Στεφανιαία Αρτηρία
CXC	Chemokine receptors	Υποδοχέας χημειοκίνης
CXCL1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	Σύμπλοκο χημειοκίνης 1 (C-X-C μοτίβο)
CXCL2	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	Σύμπλοκο χημειοκίνης 12 (C-X-C μοτίβο)
CCL18	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	Σύμπλοκο χημειοκίνης 18 (C-X-C μοτίβο)
CXCL11	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	Σύμπλοκο χημειοκίνης 11 (C-X-C μοτίβο)
CCL6	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	Σύμπλοκο χημειοκίνης 6 (C-X-C μοτίβο)
CXCL10 (or CXCR3)	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	Σύμπλοκο χημειοκίνης 10 (C-X-C μοτίβο)
D3	Vitamin D3	Βιταμίνη D3

DIP	Desquamative interstitial pneumonia	Αποφολιδωτική διάμεση πνευμονία
Daxx	Death-associated protein 6	Απόπτωση που σχετίζεται με πρωτεΐνη 6
ECs	Endothelial cells	ενδοθηλιακά κύτταρα
ECM	Extracellular matrix	Εξωκυττάρια μήτρα
GC	Glucocorticoid	Γλυκοκορτικοειδή
GIP	Giant cell interstitial pneumonia	Κυτταρική διάμεση πνευμονία
PKB	Protein Kinase-B	Πρωτεϊνική κινάση B
IBD	Inflammatory bowel disease	Ασθένεια φλεγμονώδους εντέρου
IFN-γ	Interferon-γ	Ιντερφερόνη-γ
IGF-I	Insulin growth factor I	Ινσουλίνοεξαρτώμενος αυξητικός παράγοντας I
IKKS	I-κB Kinase	I-κB κινάσες
IL-6	Interleukin-6	Ιντερλευκίνη-6
IL-17	Interleukin-17	Ιντερλευκίνη-17
IL-1β	Interleukin-1β	Ιντερλευκίνη-1β
IL-12	Interleukin-12	Ιντερλευκίνη-12
IL-23	Interleukin-23	Ιντερλευκίνη-23
IL-1	Interleukin-1	Ιντερλευκίνη-1
INF-β	Interferon-β	ιντερφερόνης-β
JNK	c-Jun N-terminal Kinase	c-Jun N-τελική κινάση
LIP	Lymphoid interstitial pneumonia	Λεμφοκυτταρική διάμεση πνευμονία
MAPK κινασών	Mitogen-Activated Protein Kinase	Μιτογόνο Ενεργοποιημένη Πρωτεϊνική Κινάση
MASc	Mammary stem cells	Μαστικά βλαστικά κύτταρα
MMPs	Metalloproteinases	Μεταλλοπρωτεϊνάσες
MMP-7	Metalloproteinase-7	Μεταλλοπρωτεϊνάση-7
MMP-9	Metalloproteinase-9	Μεταλλοπρωτεϊνάση-9
MMP-14	Metalloproteinase-14	Μεταλλοπρωτεϊνάση-14
M-CSF	Macrophage-colony stimulating factor	Παράγοντας διέγερσης αποικιών μακροφάγων
NSCLC	Non-small cell lung cancer	Μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells	Πυρηνικός παράγοντας κάπα-ελαφριάς αλυσίδας-ενισχυτής ενεργοποιημένων B κυττάρων

NOX4	NADPH oxidase 4	NADPH οξειδάση 4
NSIP	Nonspecific interstitial pneumonia	μη ειδική διάμεση πνευμονία
NADPH	Nicotinamide-adenine dinucleotide-phosphate-oxidase	Νικοτιναμιδο- αδενινο-δινουκλεοτίδιο φωσφορική οξειδάση
NFAT γ1	Nuclear factor of activated T cells	Πυρηνικός Παράγοντας ενεργοποιημένων T κυττάρων
OCPs	Precursor mononuclear cells	Πρόδρομα μονοπύρηννα κύτταρα
ODF	Osteoclast differentiation factor	Παράγοντας διαφοροποίησης οστεοκλαστών
OPGL	osteoprotegerin ligand	Σύμπλοκο οστεπροτογερίνης
PTHrP	Parathyroid hormone-related protein	Παραθυρεοειδής ορμόνη -πρωτεΐνη απελευθέρωσης
PA-SMCs	Smooth Muscle Cell of Pulmonary Artery	Λεία Μυϊκά Κύτταρα Πνευμονικής Αρτηρίας
PDGF	Platelet-derived growth factor	Παράγοντας ανάπτυξης που προέρχεται από αιμοπετάλια
PGE2	Prostaglandin E2	Προσταγλανδίνη E
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase	Κινάση φωσφατιδυλινσιτόλης-3
PAH	Pulmonary Arterial Hypertension	Πνευμονική Αρτηριακή Υπέρταση
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1	Αναστολέας ενεργοποιητή πλασμινογόνου-1
RANKL	Receptor Activator of NF-κB ligand	Σύμπλοκο υποδοχέα ενεργοποίησης NP-κΒ
ROS	Active oxygen species	Ενεργά είδη οξυγόνου
RBILD	Respiratory bronchiolitis interstitial lung disease	Αναπνευστική βρογχιολίτιδα διάμεση πνευμονοπάθεια
RANK	Receptor Activation of Nuclear factor-B	Υποδοχέας ενεργοποίησης του πυρηνικού παράγοντα-B
RA	Rheumatoid arthritis	Ρευματοειδής αρθρίτιδα
SLE	Systemic Lupus Erythematosus	Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος
Smad3	Mothers against decapentaplegic homolog 3	
TNFα	Tumor Necrosis Factor-	Παράγοντα Νέκρωσης Όγκων-άλφα

	alpha	
TGF-β	Transforming growth factor beta	Αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού βήτα
TRAF	Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factors	Παράγοντας νέκρωσης όγκων-Υποδοχέας συναφών παραγόντων
TRAIL	επάγει απόπτωση TNF συνδετήρα που σχετίζονται	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRANCE	Tumor Necrosis Factor-Related Activation induced cytokine	Παράγοντας νέκρωσης όγκου που σχετίζεται με την ενεργοποίηση που προκαλείται από κυτοκίνη
UIP	Usual interstitial pneumonia	Συνήθης διάμεση πνευμονία
VEGFa	Vascular endothelial growth factor a	Αυξητικός παράγοντας a του αγγειακού ενδοθηλίου
VEGFb	Vascular endothelial growth factor b	Αυξητικός παράγοντας b του αγγειακού ενδοθηλίου
VEGFc	Vascular endothelial growth factor c	Αυξητικός παράγοντας c του αγγειακού ενδοθηλίου
VSMCs	Vascular smooth muscle	Λεία μυϊκά αγγειακά κύτταρα
γδ T κύτταρα	Gamma delta T cells	Γάμα δέλτα T κύτταρα
XΑΠ	Chronic Obstructive Pulmonary Disease	Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια

Βιβλιογραφία

1. Anderson, D. M., Maraskovsky, E., Billingsley, W. L., W. C. Dougall, M. E. Tometsko, E. R. Roux, M. C. Teepe, R. F. DuBose, D. Cosman and L. Galibert: A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 1997; 390: 175-179.
2. Boyce, B. F. and L. Xing: Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther* 9 Suppl 2007; 1: S1.
3. Burgess, T. L., Y. Qian, S. Kaufman, B. D. Ring, G. Van, C. Capparelli, M. Kelley, H. Hsu, W. J. Boyle, C. R. Dunstan, S. Hu and D. L. Lacey: The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol* 1999; 145: 527-538.
4. Chesneau, V., J. D. Becherer, Y. Zheng, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and C. P. Blobel: Catalytic properties of ADAM19. *J Biol Chem* 2003; 278: 22331-22340.
5. Dougall, W. C., M. Glaccum, K. Charrier, K. Rohrbach, K. Brasel, T. De Smedt, E. Daro, J. Smith, M. E. Tometsko, C. R. Maliszewski, A. Armstrong, V. Shen, S. Bain, D. Cosman, D. Anderson, P. J. Morrissey, J. J. Peschon and J. Schuh: RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev* 1999; 13: 2412-2424.
6. Hanada, R., T. Hanada and J. M. Penninger: Physiology and pathophysiology of the RANKL/RANK system. *Biol Chem* 2010; 391: 1365-1370.
7. Hsu, H., D. L. Lacey, C. R. Dunstan, I. Solovyev, A. Colombero, E. Timms, H. L. Tan, G. Elliott, M. J. Kelley, I. Sarosi, L. Wang, X. Z. Xia, R. Elliott, L. Chiu, T. Black, S. Scully, C. Capparelli, S. Morony, G. Shimamoto, M. B. Bass and W. J. Boyle: Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 3540-3545.
8. Ikeda, T., M. Kasai, M. Utsuyama and K. Hirokawa: Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and their differential expression in bone and thymus. *Endocrinology* 2001; 142: 1419-1426.
9. Josien, R., H. L. Li, E. Ingulli, S. Sarma, B. R. Wong, M. Vologodskaya, R. M. Steinman and Y. Choi: TRANCE, a tumor necrosis factor family member,

- enhances the longevity and adjuvant properties of dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 2000; 191: 495-502.
10. Khosla, S: Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 2001; 142: 5050-5055.
 11. Kong, Y. Y., H. Yoshida, I. Sarosi, H. L. Tan, E. Timms, C. Capparelli, S. Morony, A. J. Oliveira-dos-Santos, G. Van, A. Itie, W. Khoo, A. Wakeham, C. R. Dunstan, D. L. Lacey, T. W. Mak, W. J. Boyle and J. M. Penninger: OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 1999; 397: 315-323.
 12. Lam, J., C. A. Nelson, F. P. Ross, S. L. Teitelbaum and D. H. Fremont: Crystal structure of the TRANCE/RANKL cytokine reveals determinants of receptor-ligand specificity. *J Clin Invest* 2001; 108: 971-979.
 13. Lerner, U. H.: New Molecules in the Tumor Necrosis Factor Ligand and Receptor Superfamilies with Importance for Physiological and Pathological Bone Resorption. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; 15: 64-81.
 14. Wong, B. R., R. Josien, S. Y. Lee, B. Sauter, H. L. Li, R. M. Steinman and Y. W. Choi.: TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *Journal of Experimental Medicine* 1997; 186: 2075-2080.
 15. Yasuda, H., N. Shima, N. Nakagawa, S. I. Mochizuki, K. Yano, N. Fujise, Y. Sato, M. Goto, K. Yamaguchi, M. Kuriyama, T. Kanno, A. Murakami, E. Tsuda, T. Morinaga and K. Higashio.: Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): A mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 1998; 139: 1329-1337.
 16. Boyce, B. F. and L. Xing: Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys* 2009; 473: 139–146.
 17. Taa, H.M, G. T. T. Nguyena, H. M. Jinb, J. Choia, H. Parka, N. Kimb, H. Y. Hwanga, and K. K. Kima: Structure-based development of a receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) inhibitor peptide and molecular basis for osteopetrosis. *PNAS* 2010; 107: 20281–20286.
 18. Choi, Y. et al. J. R. Arron & M. J. Townsend. : Promising bone-related therapeutic targets for rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology* 2009; 5: 543-548.

19. Scaldaferri, F, C. Correale, A. Gasbarrini, S. Danese.: Mucosal biomarkers in inflammatory bowel disease: Key pathogenic players or disease predictors? *World J Gastroenterol* 2010; 16: 2616-2625.
20. Peng, X, W. Guo, T. Ren, Z. Lou, X. Lu, S. Zhang, Q. Lu, Y.: Sun Differential Expression of the RANKL/RANK/OPG System Is Associated with Bone Metastasis in Human Non-Small Cell Lung Cancer. *PLOS ONE* 2013; 8: 1-10.
21. Totsuka, T, T. Kanai, Y. Nemoto, T. Tomita, R. Okamoto, K. Tsuchiya, T. Nakamura, N. Sakamoto, H. Akiba, K. Okumura, H. Yagita, and M. Watanabe.: RANK-RANKL Signaling Pathway Is Critically Involved in the Function of CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells in Chronic Colitis. *The Journal of Immunology* 2016; 182: 6079-6087.
22. Kawai, T, T. Matsuyama, Y. Hosokawa, S. Makihiro, M. Seki, N. Y. Karimbux, R. B. Goncalves, P. Valverde, S. Dibart, Y. P. Li, L. A. Miranda, C. W.O. Ernst, Y. Izumi, and M. A. Taubman.: B and T Lymphocytes Are the Primary Sources of RANKL in the Bone Resorptive Lesion of Periodontal Disease. *The American Journal of Pathology* 2006;169: 987-998.
23. Lawrie, A, E. Waterman, M. Southwood, D. Evans, J. Suntharalingam, S. Francis, D. Crossman, P. Croucher, N. Morrell, and C. Newman. : Evidence of a Role for Osteoprotegerin in the Pathogenesis of Pulmonary Arterial Hypertension. *The American Journal of Pathology* 2008; 172: 256-264.
24. Sandberg, W. J. A, Yndestad, E. Øie, C. Smith, T. Ueland, O. Ovchinnikova, A. K. L. Robertson, F. Müller, A. G. Semb, H. Scholz, A. K. Andreassen, L. Gullestad, J. K. Damås, S. S. Frøland, G. K. Hansson, B. Halvorsen, P. Aukrust.: Enhanced T-Cell Expression of RANK Ligand in Acute Coronary Syndrome Possible Role in Plaque Destabilization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 857-863.
25. Lacativa, P. G. S, M. L. F. Farias. : Osteoporosis and inflammation. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2010; 123-132.
26. Zwerina J, S. Hayer, M. T. Akrad, H. Bergmeister, K. Redlich, U. Feige, C. Dunstan, G. Kollias, G. Steiner, J. Smolen, and G. Schett.: Single and Combined Inhibition of Tumor Necrosis Factor, Interleukin-1, and RANKL Pathways in Tumor Necrosis Factor–Induced Arthritis. *ARTHRITIS & RHEUMATISM* 2004; 50: 277–290.

27. Kajiya, M, G. Giro, M. A. Taubman, X. Han, M. P.A. Mayer and T. Kawai.:
ROLE OF PERIODONTAL PATHOGENIC BACTERIA IN RANKL-
MEDIATED BONE DESTRUCTION IN PERIODONTAL DISEASE.
Journal of Oral Microbiology 2010; 1-16.
28. LI, X, Y. LIU, B. WU, Z. DONG, Y. WANG, J. LU, P. SHI, W. BAI and
Z. WANG.: Potential role of the OPG/RANK/RANKL axis in prostate cancer
invasion and bone metastasis. ONCOLOGY REPORTS 2014; 32: 2605-2611.
29. Dougall, W. C.: Molecular Pathways: Osteoclast-Dependent and Osteoclast-
Independent Roles of the RANKL/RANK/OPG Pathway in Tumorigenesis
and Metastasis. Clinical Cancer Research 2011; 18: 326–35.
30. Dougall, W. C, I. Holen and E. G. Sua ´rez.: REVIEW Targeting RANKL in
metastasis. Nature/BoneKEy Reports_2014; 519: 1-8.
31. Yoneda, T, S. Tanaka, K. Hata.: Role of RANKL/RANK in primary and
secondary breast cancer. World Journal of Orthopedics 2013; 4: 178-185.
32. Wada, T, T. Nakashima, N. Hiroshi, J. M. Penninger.: RANKL-RANK
signaling in osteoclastogenesis and bone disease. Trends Mol Med 2006; 12:
17-25.
33. Loser, K, A. Mehling, S. Loeser, J. Apelt, A. Kuhn, S. Grabbe, T. Schwarz, J.
M. Penninger and S. Beissert.: Epidermal RANKL controls regulatory T-cell
numbers via activation of dendritic cells. Nat. Med. 2006; 12: 1372–1379.
34. Anderson, M. A, E. Maraskovsky, W. L. Billingsley, W. C. Dougall, M. E.
Tometsko, E. R. Roux, M. C. Teepe, R. F. DuBose, D. Cosman, L. Galibert.:
A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and
dendritic-cell function. Nature 1997; 390:175–179.
35. Hsu, H, D. L. Lacey, C. R. Dunstan, I. Solovyev, A. Colombero, E. Timms, H.
L. Tan, G. Elliott, M. J. Kelley, I. Sarosi, L. Wang, X. Z. Xia, R. Elliott, L.
Chiu, T. Black, S. Scully, C. Capparelli, S. Morony, G. Shimamoto, M. B.
Bass, W. J. Boyle: Tumor necrosis factor receptor family member RANK
mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin
ligand. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 3540–3545.
36. Gao, Y. H, T. Shinki, T. Yuasa, H. Kataoka-Enomoto, T. Komori, T. Suda, A.
Yamaguchi.: Potential role of cbfa1, an essential transcriptional factor for
osteoblast differentiation, in osteoclastogenesis: regulation of mRNA

- expression of osteoclast differentiation factor (ODF). *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 252: 697–702.
37. Yao, Z, P. Li, Q. Zhang, E. M. Schwarz, P. Keng, A. Arbini, B. F. Boyce, L. Xing.: Tumor necrosis factor- α increases circulating osteoclast precursor numbers by promoting their proliferation and differentiation in the bone marrow through up-regulation of c-Fms expression. *J Biol Chem* 2006; 281:11846-11855.
 38. Udagawa, N, N. Takahashi, T. Akatsu, H. Tanaka, T. Sasaki, T. Nishihara, T. Koga, T. J. Martin, T. Suda.: Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87:7260–4726.
 39. Moeller, A, K. Ask, D. Warburton, J. Gauldie, and M. Kolb.: The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 362–382.
 40. Wynn, T. A.: Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. *The Journal of Experimental Medicine* 2015; 1339-1350.
 41. Wynn, T. A & T. R. Ramalingam.: Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nature Medicine*. Number 2012; 18: 1028-1040.
 42. Nalysnyk, L, J. Cid-Ruzafa, P. Rotella and D. Esser: Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis: review of the literature. *EUROPEAN RESPIRATORY REVIEW*. 2012; 21: 355–361.
 43. Tzouveleakis, A, V. Harokopos, T. Paparountas, N. Oikonomou, A. Chatziioannou, G.Vilaras, E. Tsiambas, A. Karameris, D. Bouros, and V. Aidinis.: Comparative Expression Profiling in Pulmonary Fibrosis Suggests a Role of Hypoxia-inducible Factor-1 α in Disease Pathogenesis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2007; 176: 1108-1119.
 44. Katzenstein A.L A and J. L. Myers.: Idiopathic Pulmonary Fibrosis Clinical Relevance of Pathologic Classification. *AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY AND CRITICAL CARE MEDICINE* 1998; 157: 1301-1315.
 45. Bjoraker, J. A, J. H. Ryu, M. K. Edwin, J. L. Myers, H. D. Tazelaar, D. R. Schroeder, and K. P. Offord.: Prognostic Significance of Histopathologic

- Subsets in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY AND CRITICAL CARE MEDICINE 1998; 157: 199–203.
46. Nikolic-Paterson, D. J, S. Wang and H. Yao Lan.: Macrophages promote renal fibrosis through direct and indirect mechanisms. Kidney International Supplement 2014; 4: 34–38.
 47. Palomino, D.C.T, L. C. Marti.: Chemokines and immunity. Hospital Israelita Albert Einstein 2015; 3:469-473.
 48. Fernandez, I. E and O. Eickelberg.: The Impact of TGF- β on Lung Fibrosis From Targeting to Biomarkers. PROCEEDINGS OF THE AMERICAN THORACIC SOCIETY 2012; 9: 111-116.
 49. Hübner¹, R. H, W. Gitter¹, N. E. E. Mokhtari, M. Mathiak, M. Both, H. Bolte¹, S. Freitag-Wolf , , and B. Bewig: Standardized quantification of pulmonary fibrosis in histological samples. BioTechniques 2008; 44: 507-517.
 50. Rinotas, V., Niti, A., Dacquin, R., Bonnet, N., Stolina, M., Han, C., Kostenuik, P., Jurdic, P., Ferrari, S. and Douni, E.: Novel Genetic Models of Osteoporosis by Overexpression of Human RANKL in Transgenic Mice. J Bone Miner Res 2014; 29(5): 1158-1169.
 51. Adamson, I.Y.R & D. H. Bowden. : The Pathogenesis of Bleomycin- Induced Pulmonary Fibrosis in Mice. American Journal of Pathology 1974; p: 185-190.
 52. Liu, W and X. Zhang.: Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)/RANK/osteoprotegerin system in bone and other tissues (Review). Molecular Medicine Reports 2015; 11: 3212-3218.
 53. Colucci, S, G. Brunetti, R. Rizzi, A. Zonno, G. Mori, G. Colaianni, D. D. Prete, R. Faccio, A. Liso, et al.: T cells support osteoclastogenesis in an in vitro model derived from human multiple myeloma bone disease: the role of the OPG/TRAIL interaction. Blood 2004; 104:3722-3730.
 54. Karin Loser, K, A. Mehling, S. Loeser, J. Apelt, A. Kuhn, et al.: Epidermal RANKL controls regulatory T-cell numbers via activation of dendritic cells. Nature Medicine 2006; 12: 1372 – 1379.
 55. Fata, T. E, Y. Y Kong, J. Li, T. Sasaki, J. I. Sasaki, R. A. Moorehead, R. Elliott, S. Scully, et al.: Osteoclast Differentiation Factor Osteoprotegerin-Ligand Is Essential for Mammary Gland Development. Cell Press 2000; 103: 41–50.