



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ – ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ TPL2 ΣΤΗΝ
ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΙΔΙΟΠΑΘΟΥΣ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗΣ ΙΝΩΣΗΣ

ΘΕΟΔΩΡΑ ΓΡΗΓΟΡΑΚΑΚΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2017



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ – ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ TRL2 ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ
ΤΗΣ ΙΔΙΟΠΑΘΟΥΣ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗΣ ΙΝΩΣΗΣ

ΘΕΟΔΩΡΑ ΓΡΗΓΟΡΑΚΑΚΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2017



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ – ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ

ΚΑΙ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ, ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ (ΕΚΕΒΕ) «ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΦΛΕΜΙΝΓΚ».

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΜΕΛΟΣ ΔΕΠ: Ευρύκλεια Λιανίδου, Καθηγήτρια Αναλυτικής Χημείας-Κλινικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ).

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΚΑΘΟΔΗΓΗΣΗ: Βασίλης Αϊδίνης. Ερευνητής Α΄, Εργαστήριο Ανοσολογίας, Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών (ΕΚΕΒΕ) «ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΦΛΕΜΙΝΓΚ».

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Ευρύκλεια Λιανίδου, Καθηγήτρια Αναλυτικής Χημείας-Κλινικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ).
- Βασίλης Αϊδίνης. Ερευνητής Α΄, Εργαστήριο Ανοσολογίας, Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών (ΕΚΕΒΕ) «ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΦΛΕΜΙΝΓΚ».
- Ανδρέας Σκορίλας, Καθηγητής Κλινικής Βιοχημείας, Τμήματος Βιολογίας, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ).

ΑΘΗΝΑ 2017

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Ερευνών (ΕΚΕΒΕ) «Αλέξανδρος Φλέμινγκ» στα πλαίσια του Διατμηματικού προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Διπλώματος ειδίκευσης «Κλινική Βιοχημεία – Μοριακή Διαγνωστική» του Πανεπιστημίου Αθηνών, κατά τα έτη 2015-2016, υπό την επίβλεψη του Δρ. Βασίλη Αϊδίνη, Ερευνητή Α΄ στο Κέντρο Βιοϊατρικών Ερευνών «ΕΚΕΒΕ» Αλέξανδρος Φλέμινγκ και της Ευρύκλειας Λιανίδου, Καθηγήτριας Αναλυτικής και Κλινικής Χημείας, του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Καταρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Βασίλειο Αϊδίνη για την εμπιστοσύνη και την καθοδήγηση που μου παρείχε καθόλη την διάρκεια της συνεργασίας μας, καθώς και τις επιστημονικές γνώσεις που απλόχερα μοιράστηκε μαζί μου.

Εν συνεχεία, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια Αναλυτικής και Κλινικής Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών, Ευρύκλεια Λιανίδου, για την συνεργασία μας κατά την εκπόνηση της συγκεκριμένης εργασίας, για τις χρήσιμες συμβουλές της, όπως και για τη σημαντική της συνεισφορά στο διατμηματικό μεταπτυχιακό πρόγραμμα - παράγοντας καθοριστικός στην ολοκλήρωση των σπουδών μου.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου με τα οποία συνεργάστηκα όλο αυτό το χρονικό διάστημα. Πιο συγκεκριμένα, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την μεταδιδακτορική ερευνήτρια Μαρκέλλα Ζαννίκου, η οποία με εκπαιδευσε, με καθοδήγησε και με στήριξε καθόλη τη διάρκεια των πειραμάτων. Όλο αυτό το χρονικό διάστημα ήταν πάντα διαθέσιμη, να ακούσει, να λύσει, αλλά κυρίως να συζητήσει μαζί μου όλα τα εμπόδια και προβλήματα που συνάντησα στον ερευνητικό χώρο.

Κλείνοντας, ευχαριστώ τους γονείς μου και τον σύζυγό μου, που με στήριξαν στην όλη αυτή πορεία μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Η TPL2 (TUMOR PROGRESSION LOCUS-2) ΚΙΝΑΣΗ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΣΤΗ ΦΛΕΓΜΟΝΗ.....	7
1.1. TPL2.....	8
1.2. ΙΔΙΟΠΑΘΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΙΝΩΣΗ (IPF).....	18
1.3. ΔΙΑΜΕΣΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΠΝΕΥΜΟΝΑ.....	19
1.4. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΔΙΑΜΕΣΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ ΠΝΕΥΜΟΝΑ.....	20
1.4.1. Συνήθης διάμεση πνευμονία (Usual Interstitial Pneumonia- UIP).....	21
1.4.2. Οξεία Διάμεση Πνευμονία (Acute Interstitial Pneumonia-AIP).....	22
1.4.3. Κρυπτογενής Οργανούμενη Πνευμονία (Cryptogenic Organizing Pneumonia-)	22
1.4.4. Μη ειδική Πνευμονία (Nonspecific Interstitial Pneumonia- NSIP).....	22
1.4.5. Λεμφοειδική διάμεση πνευμονία (Lymphoid Interstitial Pneumonia- LIP).....	23
1.4.6. Κοκκιωματώδεις διάμεσοι νόσοι και σαρκοείδωση.....	23
1.4.7. Πνευμονίτιδα εξ υπερευαισθησίας/ Εξωγενής Αλλεργική Κυψελίτιδα (Hypersensitivity Pneumonitis/Extrinsic Allergic Alveolitis- HP/EAA).....	24
1.4.8. Αποφολιδωτική Διάμεση Πνευμονία (Desquamative Interstitial Pneumonia-DIP).....	24
1.4.9. Πνευμονική Ιστιοκυττάρωση Langerhans (Pulmonary Langerhans cell histiocytosis- PLCH).....	24
1.4.10 Άλλες Διάμεσοι νόσοι πνεύμονα.....	25
1.5. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗΣ ΊΝΩΣΗΣ	26
1.6 ΦΥΛΟ ΚΑΙ ΗΛΙΚΙΑ.....	26
1.7. ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΚΑΙ ΦΥΛΕΤΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ.....	27
1.8 ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ.....	27
1.9 ΦΛΕΓΜΟΝΗ ΚΑΙ ΊΝΩΣΗ.....	27
ΣΚΟΠΟΣ.....	32
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	34
2.1 ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ- ΌΡΓΑΝΑ.....	35
2.2 ΥΛΙΚΑ.....	36
2.3 ΔΕΙΓΜΑΤΑ.....	38
2.3.1 Πειραματόζωα- μοντέλο της μπλεομυκίνης.....	38
2.3.2. Πειραματικά ζωικά μοντέλα - Μοντέλο μεταμόσχευσης.....	38
2.3.3. Πειραματικά ζωικά μοντέλα με γενετική απαλοιφή της TPL2 από μακροφάγα.....	39
2.3.4. Πειραματικά ζωικά μοντέλα με εξωγενή χορήγηση PGE2.....	39
2.3.5. Συλλογή αίματος (πλάσματος).....	40
2.3.6. Συλλογή BALF.....	40
2.3.7. Συλλογή ιστού.....	40
2.3.8. Ιστολογία του πνεύμονα.....	41
2.4 ΜΕΘΟΔΟΙ	42

2.4.1 Μπλεομυκίνη και μοντέλο πνευμονικής ίνωσης	42
2.4.2 Απομόνωση DNA.....	42
2.4.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	44
2.4.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time-PCR)	51
2.4.5. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης 2% σε TBE.....	55
2.4.6. Απομόνωση RNA από ιστούς πνευμόνων ποντικού.....	58
2.4.7. Κατεργασία καθαρισμού του απομονωμένου ολικού RNA.....	59
2.4.8. Μετατροπή του RNA σε cDNA με χρήση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση.....	60
2.4.9 Μηχανικός Αναπνευστήρας -Flexivent	61
2.10. Καταμέτρηση βιώσιμων κυττάρων χρησιμοποιώντας αιματοκυτταρόμετρο.....	63
2.4.11. Κυτταρομετρία ροής (FACS Staining).....	65
2.4.12. Προσδιορισμός Πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford.....	66
2.4.13. Μέτρηση διαλυτού κολλαγόνου σε BALF.....	67
2.4.14 Χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης.....	68
2.4.15 Τρίχρωμη χρώση Masson (Masson's Trichrome stain).....	69
2.4.16. Modified Ashcroft score.....	73
2.4.17. Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blot).....	75
2.4.18. Φασματομετρία μάζας.....	78
2.4.19. Στατιστική ανάλυση.....	80
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	81
3.1. Έκφραση του γονιδίου TPL2 στους ασθενείς με IPPS.....	81
3.2. Εφαρμογή του μοντέλου της μπλεομυκίνης σε C57BL/6 (wt) και TPL2-/- ποντίκια.....	83
3.2.1 Εφαρμογή του μοντέλου της μπλεομυκίνης σε C57BL/6 (Wt) ποντίκια.....	84
3.2.2 Εφαρμογή του μοντέλου της μπλεομυκίνης σε ποντίκια.....	90
3.3 Απαραίτητη η έκφραση της TPL2 στα αιμοποιητικά κύτταρα στον περιορισμό της IPF.....	97
3.4. Η γενετική απαλοιφή της TPL2 από βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα και μακροφάγα αυξάνει την επιδείνωση της Πνευμονικής Ίνωσης.....	106
3.5.Εξωγενής χορήγηση PGE2 έχει προστατευτική δράση στα ποντίκια έναντι της IPF (ΙΠΙ).....	113
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	123
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	131
ABSTRACT.....	135
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	137

Εισαγωγή

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η TPL2 (TUMOR PROGRESSION LOCUS-2) ΚΙΝΑΣΗ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΣΤΗ ΦΛΕΓΜΟΝΗ

1.1.TPL2

Το πρωτο-ογκογονίδιο TPL2 (tumor progression locus) ανακαλύφθηκε το 1991 και είναι γνωστό σαν COT (Cancer Osaka Thyroid oncogene) ή MAP3K8. Κλωνοποιήθηκε αρχικά από εστίες μεταμορφωμένων κυττάρων, σε πειράματα έκτοπης έκφρασης ανθρώπινου γενωμικού DNA από κυτταρική σειρά καρκίνου του θυρεοειδούς στην κυτταρική σειρά εμβρυονικών κυττάρων SHOCK (Syrian Hamster Osaka Kanazawa) [1]. Η μορφή αυτή δεν ήταν η φυσική μορφή του γονιδίου αλλά μία αναδιάταξη, ένας ελλιπής (truncated) τύπος που προέκυψε στην κλωνοποίηση. Εντοπίζεται στην περιοχή 10p11.23 και αποτελείται από 9 εξώνια (8 στην αρχική δημοσίευση) [2,3] (Σχήμα 1.1). Το ανάλογό του στον αρουραίο (χρωμόσωμα 17) ανακαλύφθηκε το 1993 ως θέση ενσωμάτωσης προϊόντων σε MoMuLV (Moloney Murine Leukemia Virus) - επαγόμενα λεμφώματα τρωκτικών [4]. Η ενσωμάτωση των προϊόντων συμβαίνει στο τελευταίο ιντρόνιο του γονιδίου TPL2 οδηγώντας στην παραγωγή πρωτεΐνης βραχύτερης από τη φυσιολογική με αντικατάσταση των τελευταίων 43 αμινοξέων από αλληλουχία 7 διαφορετικών αμινοξέων. Το ομόλογό του στο ποντίκι εδράζεται στο χρωμόσωμα 18 [5,6].



Σχήμα 1.1. Σχηματική απεικόνιση του γονιδίου TPL2. Προβλεπόμενη αλληλουχία εξωνίων-ιντρονίων [7]. Το πρώτο από τα μη- μεταφραζόμενα εξώνια του 5' άκρου δεν είχε συμπεριληφθεί στην αρχική ταυτοποίηση.

Πρωτεϊνική δομή

Όπως προέκυψε από την προβλεπόμενη αλληλουχία αμινοξέων που κωδικοποιείται από το cDNA των γονιδίων TPL2 σε τρωκτικά και στον άνθρωπο, το πρωτεϊνικό προϊόν των γονιδίων αυτών είναι μια κινάση σερίνης/θρεονίνης ομόλογη κατά περίπου 95% ανάμεσα στα 2 είδη [2,6]. Η ανθρώπινης προέλευσης TPL2 κινάση αποτελείται από 467 αμινοξέα. Η περιοχή με δραστηριότητα κινάσης της πρωτεΐνης είναι ομόλογη με την αντίστοιχη της πρωτεΐνης STE11 του *S.cerevisiae* που είναι MAP3K κινάση σερίνης/θρεονίνης. Τόσο η φυσική κινάση Cot, όσο και η TPL2 φάνηκε πως συμμετέχουν στην ενεργοποίηση σχεδόν όλων των MAPK οδών, όπως της ERK- 1/2 [8,9], των JNK/SAPK και p38 [9] και της ERK5 [10].

Πλούσιοι στο μετάγραφο αυτό βρέθηκαν ο σπλήνας, ο θύμος αδένας, το ήπαρ και οι πνεύμονες φυσιολογικών ποντικών [11], καθώς και οι σιελογόνοι, γαστρικοί και εντερικοί αδένες ποντικών [12], ενώ σε χαμηλά επίπεδα υπάρχει σε όλους τους ιστούς. Εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα. Υπάρχουν 2 ισόμορφες πρωτεΐνες διαφορετικού μήκους (58- και 52-kDa) οι οποίες διαφέρουν στο αμινοτελικό τους άκρο και προέρχονται από το ίδιο μητρικό RNA, κατόπιν μετάφρασης που ξεκινά από δύο διαφορετικά κωδικόνια έναρξης (AUG). Η 58-kDa πρωτεΐνη έχει βραχύτερο χρόνο ημιζωής και είναι κινάση σερίνης, ενώ η 52-kDa είναι κινάση σερίνης/θρεονίνης και είναι το κυριότερο προϊόν σε ηρεμία· έχει δε χαμηλότερη ικανότητα να επάγει κυτταρική μεταμόρφωση [2]. Στο αμινοτελικό άκρο, δηλαδή, εντοπίζεται περιοχή απαραίτητη για την επαγωγή κυτταρικής μεταμόρφωσης. Στο καρβοξυτελικό άκρο της φαίνεται ότι υπάρχει περιοχή που ρυθμίζει τη σταθερότητα και την καταλυτική δραστηριότητα. Έτσι, η περικομμένη (truncated protein) πρωτεΐνη των αρχικών πειραμάτων εκφραζόταν σε υψηλότερο βασικό επίπεδο, αλλά και παρουσίαζε αυτόματη ενεργοποίηση αυτοφωσφορύλωσης [4] και υψηλότερη δραστηριότητα κινάσης [13]. Αυτό δείχθηκε ότι οφείλεται σε σταθεροποίηση του RNA, αφού απαλείφονται αποσταθεροποιητικές αλληλουχίες [4,13], καθώς και σε χαμηλότερο ρυθμό καταβολισμού της πρωτεΐνης, αφού με την απαλοιφή των αμινοξέων 435-457 προστατεύεται μέσω του πρωτεασώματος από την αποικοδόμηση [15]. Η υψηλότερη καταλυτική ικανότητα της περικομμένης TPL2 κινάσης οφείλεται, αφενός στα υψηλότερα φυσιολογικά επίπεδα αυτής και αφετέρου στην απαλοιφή

περιοχής του καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης (43 τελευταία αμινοξέα), η οποία ασκεί πιθανώς ρόλο ανασταλτικού ρυθμιστή με ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις που περιορίζουν την διαθεσιμότητα της καταλυτικής περιοχής για σύνδεση με υπόστρωμα και ATP [15] ή με διαμοριακές αλληλεπιδράσεις, όπως η δέσμευση και αναστολή του TPL2, μέσω της COOH-ουράς του από την p105 πρόδρομο πρωτεΐνη του NF-κB1 [16].

Λειτουργία

Ενεργοποίηση και πολλαπλασιασμός λεμφοκυττάρων. Η έκφραση της κινάσης Cot σε σπληνικά κύτταρα αυξάνεται μέσα σε 1 ώρα μετά την έκθεση τους σε κονκαβαλαμίνη A κατά τη μετάβαση των κυττάρων από τη φάση ηρεμίας G0 στη φάση G1 [4]. Έχειδειχθεί, σε κύτταρα CTLL-2, τα οποία δεν παράγουν IL-2 (ιντερλευκίνη 2) και εξαρτώνται από την προσθήκη της για τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωσή τους, ο ευοδωτικός ρόλος της Cot κινάσης στη μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S με την επίδραση IL-2. Αυτή η δράση ασκείται μέσω ελάττωσης του αναστολέα p27kip (ή CDKN1B) της CDK2 κυκλινο-εξαρτώμενης κινάσης και συνακόλουθης διέγερσης του μεταγραφικού παράγοντα E2F, ο οποίος επάγει την έκφραση γονιδίων που ρυθμίζουν τη G1/S μετάβαση. Η δράση αυτή είναι, τουλάχιστον εν μέρει, MEK/ERK εξαρτώμενη [17].

Παραγωγή IL-2. Έχειδειχθεί η επαγωγή της σύνθεσης της IL-2 μέσω της επίδρασης του αντι-CD3 (το οποίο φυσιολογικά δεν επάγει μόνο του την παραγωγή IL-2) σε κύτταρα Jurkat (human T cell leukemia), που εξέφραζαν TPL2 αναδιαταγμένο στο 3'-άκρο, μέσω αύξησης της μεταγραφής του επαγωγέα της [18]. Για την επαγωγή της IL-2 στη διάρκεια της ενεργοποίησης των λεμφοκυττάρων απαιτείται συνεργασία αρκετών μεταγραφικών παραγόντων. Συγκεκριμένα, ο επαγωγέας της IL-2 περιλαμβάνει 5 θέσεις σύνδεσης για τον NFAT (nuclear factor of activated T cells), μια για τον NF-κB και δυο για τον OCT-1. Από αυτούς ο NFAT σε συνεργασία με τον AP1 (μεταγραφικός παράγοντας), καθώς και ο NF-κB είναι υποχρεωτικοί για την μεταγραφή. Ο AP1 αποτελείται από τις υποομάδες JUN και FOS και συνδέεται με τον ενεργοποιημένο NFAT παράγοντα μέσα στον πυρήνα. Ο NFAT είναι απαραίτητος για την έναρξη της μεταγραφής πολλών κυτταροκινών, όπως IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, TNF-α, IFN-γ και ενεργοποιείται από την καλσινευρίνη [19].

Σε διάφορες κυτταρικές σειρές με σταθερή έκφραση του TPL2, είτε φυσιολογικού ή αναδιαταγμένου στο 3'-άκρο και οι δύο μορφές ενεργοποιούν τον NFAT σε πολλά είδη κυττάρων (με μετακίνηση του NFATp στον πυρήνα), καθώς και τον NF-κB. Το μοντέλο που προτάθηκε για την παραγωγή IL-2, ήταν η συμμετοχή της κινάσης τόσο στην, μέσω καλσινευρίνης, ενεργοποίηση του NFAT, όσο και στην ενεργοποίηση του AP1, μέσω της οδού Raf1/MEK σε ανώτερο επίπεδο ή ανεξάρτητα από το Ras [20,21].

NFκB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells).

Μελετήθηκε η περαιτέρω συμβολή της Cot κινάσης στην ενεργοποίηση του NF-κB σε T-λεμφοκύτταρα [22]. Συγκεκριμένα, έδειξαν ότι μετά από ενεργοποίηση του συμπλέγματος CD3/CD28 η Cot ενεργοποιεί την κινάση NIK (NF-κB inducing kinase, MAP3K), η οποία συμμετέχει μέσω των IKK στην φωσφορυλίωση και αποδόμηση από το πρωτεάσωμα του αναστολέα IκBα, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του NF-κB. Επιπλέον, έδειξαν ότι για την ενεργοποίηση του NF-κB με μηχανισμούς διαφορετικούς της TCR/CD3 διέγερσης σε T-λεμφοκύτταρα, πχ. με επίδραση TNF-α δεν είναι απαραίτητο το TPL2. Αντίθετα, σε άλλα κύτταρα, όπως οι εμβρυικοί ινοβλάστες, το TPL2 είναι απαραίτητο για την ενεργοποίηση του NF-κB από τον TNF-α [23]. Αργότερα, δείχθηκε ότι για την επαγόμενη από TPL2 ενεργοποίηση του NF-κB σε T-λεμφοκύτταρα απαραίτητη είναι η φωσφορυλίωση του TPL2 από τη Akt, μια κινάση σερίνης/θρεονίνης που δρα σε ανώτερο επίπεδο και έχει γνωστή επαγωγική δράση στον NF-κB [24].

Ένας πιθανός διαφορετικός τρόπος ενεργοποίησης του NF-κB είναι η, μέσω σύνδεσης με TPL2, επιτάχυνση της αποδόμησης της p105 προδρόμου πρωτεΐνης (η οποία δρα σαν αναστολέας της μεταφοράς της ενεργού υπομονάδας p50 στον πυρήνα, IκB-like activity) από το πρωτεοσωμάτιο [25]. Σε B-λεμφοκύτταρα, συμμετέχει στην ενεργοποίηση του NF-κB που επάγεται από την πρωτεΐνη LMP1(latent membrane protein) του EBV (Epstein-Barr virus) ή από τη διέγερση του CD40 δρώντας σε κατώτερο επίπεδο από τους TRAF2 και TRAF6 αντίστοιχα και χρησιμοποιώντας μάλλον και τους δύο προαναφερθέντα μονοπάτια [26,27]. Επιπλέον, η p105 υποομάδα του NF-κB1 αποτελεί αναστολέα του TPL2, αφού συνδέεται στοιχειομετρικά με το COOH άκρο του TPL2 στο κυτταρόπλασμα και αναστέλλει την καταλυτική του δράση [28], ενώ για απελευθέρωση και δράση του TPL2 απαιτείται η πρωτεοσωματική διάσπαση της p105 με την επίδραση της

IκB (ρυθμιστικός ρόλος IκB σε ενεργοποίηση TPL2) [29,30]. Μάλιστα θεωρείται πλέον ότι η φυσική μορφή του TPL2 στο κυτταρόπλασμα διατηρείται μόνο σε σύμπλεγμα με την p105 [31].

Περαιτέρω ανάλυση της φυσιολογίας του TPL2 έγινε από τους Ballester και τους συνεργάτες του, όπως και από τους Dumitru CD και τους συνεργάτες του, όπου μελέτησαν τη σημασία του γονιδίου στην παραγωγή TNF-α από ενεργοποιημένα κύτταρα Jurkat οι πρώτοι, και από μακροφάγα ή σπληνοκύτταρα διεγερμένα με βακτηριακό λιποπολυσακχαρίτη LPS, οι δεύτεροι [32,33]. Αποδείχθηκε ότι διαγονιδιακά ποντίκια με εξουδετερωμένο το γονίδιο TPL2 είναι ανθεκτικά στο σηπτικό σοκ που επάγουν οι LPS λόγω μη παραγωγής TNF-α, ενώ παράγουν TNF-α ως απάντηση σε άλλα ερεθίσματα πχ. anti-CD3/anti-CD28. Ο ρόλος του γονιδίου τοποθετείται κατά πάσα πιθανότητα στη μετα-μεταγραφική ρύθμιση του TNF-α με μεταφορά του mRNA από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, την οποία ευοδώνει μέσω του ERK δρόμου.

Αποδείχθηκε ότι το TPL2 είναι αναγκαίο για την ενεργοποίηση του ERK1/2 δρόμου από LPS, αλλά όχι και των JNK και p38 οδών. Παράλληλα, έδειξαν ότι η ενεργοποίηση του NF-κB από LPS δεν απαιτεί TPL2. Άλλες μελέτες έδειξαν ότι το TPL2 είναι απαραίτητο στην, μέσω TNFα/TNFR1/TRAF2, ενεργοποίηση της ERK οδού σε μακροφάγα και των ERK, JNK οδών σε εμβρυικούς ινοβλάστες [23,27], πράγμα που εξηγεί γιατί σε διπλά διαγονιδιακά ποντίκια $Tnf^{\Delta ARE}Tpl2^{-/-}$ δεν αναπτύσσεται το TNFα-επαγόμενο σύνδρομο φλεγμονώδους νόσου του εντέρου, όπως συμβαίνει στα $Tnf^{\Delta ARE}$ ποντίκια [34].

Προ-αποπτωτική δράση.

Πειράματα έκτοπης έκφρασης του TPL2 σε μη μεταμορφωμένα κύτταρα HEK293 και REF52 έδειξαν ότι μπορεί να διεγείρει την απόπτωση προάγοντας τη δημιουργία προαποπτωτικού συμπλέγματος με προκασπάση 9 και Tvl-1. Για τη λειτουργία αυτή απαραίτητη είναι η περιοχή της πρωτεΐνης με δραστικότητα κινάσης [35].

COX-2 (Cyclooxygenase-2)

Το γονίδιο TPL2 μεσολαβεί στην έκφραση της COX-2 (κυκλοοξυγενάση 2) σε ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα μέσω NFAT, στην επαγόμενη από LPS έκφραση COX-2 και παραγωγή PGE2 σε μακροφάγα, πιθανώς μέσω ERK1/2

ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα CREB [27], καθώς και στην επαγόμενη από LPM1 έκφραση COX-2 πιθανώς μέσω του NF-κΒ [26], συμβάλλοντας έτσι στην ογκογόνο δράση του EBV.

Η COX-2 διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην πορεία της φλεγμονής καταλύοντας την παραγωγή προσταγλανδινών από το αραχιδονικό οξύ. Το ελεύθερο αραχιδονικό οξύ βρίσκεται στην πυρηνική μεμβράνη και το κυτταρόπλασμα και ξεκινάει την παραγωγή προσταγλανδινών, μέσω της καταλυτικής δράσης της COX και των δύο ισομορφών της, COX-1 και COX-2, που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη, ευθύς αμέσως ενεργοποιηθεί από κάποιο φλεγμονώδη παράγοντα [36]. Η COX-1 εκφράζεται στο σύνολο των ιστών του σώματος και στην πλειοψηφία των εμπύρηνων κυττάρων, εμπλέκεται στη ρύθμιση της ομοιόστασης και σχετίζεται με την παραγωγή προσταγλανδινών κατά τη φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού, ενώ η έκφραση της COX-2 είναι πιο ισχυρή σε συνθήκες φλεγμονώδους αντίδρασης και ευθύνεται για την παραγωγή προσταγλανδινών (PG2) σε παθολογικές καταστάσεις.

Η αντιφλεγμονώδης και προφλεγμονώδης απάντηση των PG2 επάγεται από μεγάλο αριθμό επιφανειακών και ενδοκυττάρων υποδοχέων που πυροδοτούν διάφορα κυτταρικά φαινόμενα. Η πολυπλοκότητα αυτού του συστήματος μπόρεσε να γίνει μερικώς μόνο κατανοητή με τη χρήση ειδικών βιολογικών εργαλείων, που περιλαμβάνουν από ειδικά κλωνοποιημένα ένζυμα COX και τους αντίστοιχους υποδοχείς τους, μέχρι τα τελικά κυτταρικά προϊόντα του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος [27]. Έχει αναφερθεί ότι η COX-2 εκφράζεται, επίσης, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, στο γαστρικό βλεννογόνο και στο κεντρικό νευρικό σύστημα αλλά και το αναπνευστικό επιθήλιο.

Η έκφραση της COX-2, αλλά και η παραγωγή προσταγλανδινών μέσω της δράσης της συγκεκριμένης ισομορφής, αυξάνεται σημαντικά υπό την επίδραση διαφόρων φλεγμονωδών παραγόντων. Τέτοιοι παράγοντες είναι: διάφορες κυτταροκίνες (IL-1, IL-13, TNF-α, κ.ά), ορμόνες, 176 ενδοτοξίνες (λιποπολυσακχαρίδιο/LPS), αυξητικοί παράγοντες, υψηλά επίπεδα του NO, μεταγραφικοί παράγοντες (P38 Mitogen-activated protein kinase -MAPK, NF-κβ, κ.ά) [37].

Οι οδοί μεταφοράς σημάτων που σχετίζονται με τις MAP κινάσες, μπορεί να συμμετέχουν στη ρύθμιση της έκφρασης της COX-2, όπως αυτή εμφανίζεται μετά

από την επίδραση διαφόρων παραγόντων, όπως είναι οι ενδοτοξίνες και οι κυτταροκίνες. Πιο συγκεκριμένα, έχει στοιχειοθετηθεί η υπόθεση, ότι η ενεργοποίηση των μηχανισμών μεταφοράς σημάτων των MAPKs, είναι απαραίτητη για τη θετική ρύθμιση της έκφρασης της COX-2 υπό τη δράση κυτταροκινών.

Στους φυσιολογικούς πνεύμονες οι προσταγλανδίνες που εκκρίνονται από τους ίδιους τους ινοβλάστες είναι υπεύθυνες για τη διατήρηση του αριθμού και της δομής των τελευταίων μέσα σε φυσιολογικά όρια. Υπάρχει δηλαδή ένας ανατροφοδοτικός μηχανισμός (feedback), ο οποίος όμως μπορεί να είναι και ανεξάρτητος της δραστηριότητας της COX-2 σε καταστάσεις φλεγμονής και ίνωσης, όπως καταλήγουν οι ερευνητές. Σε μία άλλη μελέτη, επίσης αποδεικνύεται ότι τα επίπεδα προσταγλανδίνης E2 είναι χαμηλά στους πνεύμονες ασθενών με πνευμονική ίνωση, πράγμα που αποδίδεται, κατά τους συγγραφείς στην περιορισμένη έκφραση της COX-2. Μελετώντας την ίνωση σε πνεύμονες επίμυων που στερούνταν κυκλοοξυγενάσης γενετικά, συμπέραναν ότι η έλλειψη της COX-2 επιδείνωσε την ινωτική εξεργασία και επιβάρυνε την αναπνευστική λειτουργία των επίμυων ακόμα περισσότερο.

Έτσι, κατέληξαν ότι η COX-2 παίζει ένα σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της δομής και λειτουργίας του πνεύμονα, σε περίπτωση ίνωσης, σε όσο το δυνατό φυσιολογικά επίπεδα. Σε παρόμοια συμπεράσματα καταλήγουν και οι Wilborn και συν., οι οποίοι διατύπωσαν την άποψη ότι η κυκλοοξυγενάση εκφράζεται ελάχιστα και η παραγωγή προσταγλανδίνης E2 είναι μικρή σε ασθενείς με πνευμονική ίνωση.

Συγκεκριμένα, η ελαττωμένη έκφραση της COX-2 δημιουργεί προϋποθέσεις για την έναρξη μιας προφλεγμονώδους κατάστασης στον πνεύμονα, ενώ η αυξημένη έκφρασή της συνηγορεί υπέρ μιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας. Όλα τα παραπάνω συμπεράσματα έρχονται σε πλήρη αντίθεση με τα συμπεράσματα πολλών μελετών της διεθνούς βιβλιογραφίας, οι οποίες υποστηρίζουν την αυξημένη έκφραση της κυκλοοξυγενάσης στην ίνωση και τον επαγωγικό ρόλο της σε αυτήν, αλλά και σε αντίθεση με τα ευρήματα στην παρούσα μελέτη, που συμφωνούν απόλυτα με τα τελευταία, δεδομένου ότι παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση της COX-2 στους ινωτικούς πνευμονικούς ιστούς των πειραματοζώων της ομάδας της μπλεομυκίνης [38].

Σε μελέτες πρόκλησης πνευμονικής ίνωσης όχι μόνο με μπλεομυκίνη, αλλά και με άλλες ουσίες, όπως η σιλικόνη, επιβεβαιώθηκε η αυξημένη έκφραση της COX-2 στην ίνωση και τη φλεγμονή. Θεωρήθηκε ότι αρχικά ενεργοποιήθηκε η μεταγραφή του γονιδίου της κυκλοοξυγενάσης από τον NF-κΒ, ο οποίος με τη σειρά του ενεργοποίησε τις κινάσες NIK-1 και TAK-1, που εμπλέκονται στο μηχανισμό έκφρασης της COX-2. Πολύ σημαντικό είναι να τονιστεί η μελέτη στην οποία δοκιμάστηκε ένας γνωστός αντιφλεγμονώδης παράγοντας και επιλεκτικός αναστολέας της COX-2, η μελοξικάμη (meloxicam), προκειμένου να διαπιστωθεί αν έχει και αντι-ινωτικές ιδιότητες και αν αναστέλλει την πνευμονική ίνωση σε επίμυες που έλαβαν μπλεομυκίνη. Διαπιστώθηκε ότι αυξάνεται πολύ η έκφραση της κυκλοοξυγενάσης στην ίνωση και ότι η μελοξικάμη αναστέλλει την παραγωγή υδροξυπρολίνης, που είναι το βασικό συστατικό της εξωκυττάριας ουσίας και τελικά μειώνει εντυπωσιακά την έκφραση της COX-2 [27].

Από τη διεθνή βιβλιογραφία προκύπτει ότι ο ρόλος της κυκλοοξυγενάσης δεν είναι απόλυτα κατανοητός. Τα αποτελέσματα των ερευνών είναι αντικρουόμενα και αυτό οφείλεται μάλλον στο ότι η έκφρασή της εξετάζεται με έμμεσο τρόπο μέσω της μελέτης των μεταβολιτών και των παραγώγων της, που αντιδρούν όμως κάθε φορά και με διαφορετικό τρόπο ανάλογα με το βιοχημικό περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται, τις ουσίες που τα ενεργοποιούν και τη λειτουργία που καλούνται να επιτελέσουν.

Προσταγλανδίνη E2 (PGE2)

Η PGE2 είναι ένα εικοσανοειδές παράγωγο του αραχιδονικού οξέος που συντίθεται από τις κυκλοοξυγονάσες COX-1 και COX-2. Εμφανίζει ποικίλες δράσεις τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις, όπως η περιοδοντίτιδα και η ρευματοειδής αρθρίτιδα. Οι διαφορετικές δράσεις της PGE2 μπορούν να αποδοθούν στους τέσσερις υποδοχείς της, EP1-4. Οι EP3 και EP4 εμφανίζουν τη μεγαλύτερη συγγένεια για την PGE2 (Kd10 nM).

Η PGE2, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο, εμφανίζει τόσο αντιφλεγμονώδεις όσο και προφλεγμονώδεις δράσεις. Για παράδειγμα, έχει διαπιστωθεί ότι ανταγωνίζεται ή δρα σε συνέργεια στην επαγόμενη από IL-1 και TNF-α παραγωγή των MMP-1 και TIMP-1, αντίστοιχα. Επίσης, διεγείρει την παραγωγή οστεοκλαστών αυξάνοντας τον RANKL, ενώ καταστέλλει την παραγωγή τους μειώνοντας την έκφραση του M-CSF. Οι RANKL και M-CSF, όπως θα αναφερθεί,

συμβάλλουν στην ανάπτυξη των οστεοκλαστών. Ωστόσο, είναι γενικά αποδεκτό πως η PGE2 δρα με ένα cAMP-εξαρτώμενο μηχανισμό. Αλληλεπιδρά με τους δεσμευμένους με πρωτεΐνες G υποδοχείς 7TM, ενεργοποιώντας έτσι τον καταρράκτη της αδενυλικής κυκλάσης. Το τελικό αποτέλεσμα της PGE2 στην RA φαίνεται να οδηγεί στη μείωση της φλεγμονής και την ανακατασκευή του οστού.

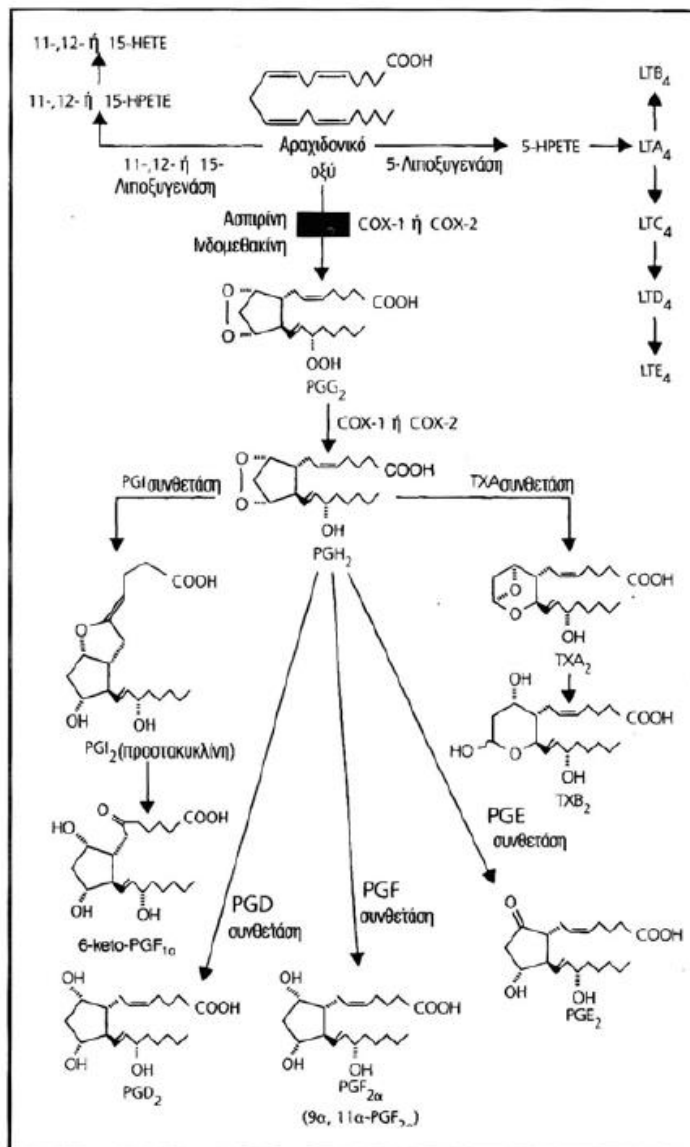
Μελέτες δείχνουν ότι η PGE2 αναστέλλει την παραγωγή των προφλεγμονωδών κυτταροκινών TNF-α, IL-6 και IL-8 από ενεργοποιημένα μακροφάγα αλλά και την έκφραση του TNF-α από ώριμα δένδριτικά κύτταρα. Η τελευταία δράση πραγματοποιείται μέσω αναστολής της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα c-Jun. Επιπλέον, αναστέλλει την επαγόμενη από IL-1 και TNF-α παραγωγή της MMP-1 σε αρθρικά κύτταρα τύπου ινοβλάστη μέσω αναστολής του μονοπατιού ERK. Την ίδια δράση εμφανίζει και σε ινοβλάστες ούλων μέσω άγνωστου όμως μονοπατιού. Είναι πιθανό επίσης να μειώνει την επαγόμενη από κυτταροκίνες φλεγμονή ρυθμίζοντας το μονοπάτι του NF-κΒ. Μελέτες έχουν δείξει ότι παρουσία PGE2 επιτεύχθηκε αναστολή της μετανάστευσης του p65, μέσω αναστολής των ERK κινασών και αναστολή της έκφρασης του IκΒα ανεξάρτητα του μονοπατιού ERK. Είναι γνωστό ότι η IL-1β επάγει τη παραγωγή PGE2, μέσω COX-2, σε ινοβλάστες αρθρικού υμένα πνεύμονα και άλλων, όπως δέρματος.

Δομή και σύνθεση

Η οικογένεια των προσταγλανδινών, τα λευκοτριένια και οι σχετικές ενώσεις καλούνται εικοσανοειδή, γιατί προέρχονται από λιπαρά οξέα με 20 άτομα άνθρακα στο μόριο τους. Αυτά τα οξέα περιέχουν τρεις, τέσσερις ή πέντε διπλούς δεσμούς: εικοσατριενοϊκό οξύ (γ-λινολενικό οξύ), εικοσατετραενοϊκό οξύ (αραχιδονικό οξύ) και εικοσαπενταενοϊκό οξύ (EPA). Τα ιχθυέλαια περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις EPA και γι'αυτό συνιστώνται στη θεραπεία των θρομβωτικών νόσων.

Στον άνθρωπο, το αραχιδονικό οξύ αποτελεί την πλέον άφθονη πρόδρομη ουσία. Προέρχεται είτε από το λινολεϊκό οξύ των λαχανικών είτε αποτελεί συστατικό του κρέατος. Η βιοσύνθεση των εικοσανοειδών, η οποία αποτελεί απάντηση σε φυσικά, χημικά ή ορμονικά ερεθίσματα εμπλέκει δραστηριότητα ενζύμων, όπως οι ακυλ-υδρολάσες ή οι φωσφολιπάσες, τα οποία

απελευθερώνουν το αραχιδονικό οξύ από την κυτταρική μεμβράνη. Στη συνέχεια, το αραχιδονικό οξύ μεταβολίζεται ταχέως σε PGS, θρομβοξάνια ή PGI₂ ή μέσω της οδού της λιποξυγενάσης σε λευκοτριένια



Σχήμα 1.2. Μεταβολισμός του αραχιδονικού οξέος- Σύνθεση προσταγλανδινών.

Ρύθμιση

Η έκφραση του γονιδίου TPL2 αυξάνεται με την επίδραση σημάτων που ενεργοποιούν τα T-λεμφοκύτταρα. Αυτό γίνεται πιθανώς με διέγερση του μεταγραφικού παράγοντα AP1 μέσω της οδού JNK/SAPK163. Η δραστηριότητά της κινάσης αλλά και τα επίπεδά της στο κυτταρόπλασμα καθορίζονται από τη δέσμευσή της από την p105 μέσω τμήματος της καρβοξυτελικής ουράς της, όπως

αναφέρθηκε [28]. Έτσι, για την ενεργοποίησή της είναι απαραίτητη η δράση της ΙΚΚβ που οδηγεί σε αποδόμηση της p105 ανασταλτικής πρωτεΐνης [29].

1.2. ΙΔΙΟΠΑΘΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΙΝΩΣΗ (IPF)

Η πνευμονική ίνωση αποτελεί ετερογενή ομάδα νοσημάτων που αφορούν το κυψελιδικό τοίχωμα και τον περικυψελιδικό ιστό με τελικό αποτέλεσμα την δημιουργία διάχυτης ίνωσης. Περισσότερα από 100 γνωστά αίτια πνευμονικής ίνωσης έχουν αναγνωρισθεί. Η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση (IPF) είναι ένα διάμεσο πνευμονικό νόσημα αγνώστου αιτιολογίας που μέχρι πρόσφατα θεωρούνταν ότι χαρακτηρίζεται από υποτροπιάζουσα ή χρόνια φλεγμονή των κυψελιδικών χώρων. Είναι θανατηφόρα νόσος και χαρακτηρίζεται από σταδιακή επιδείνωση της πνευμονικής λειτουργίας. Η κυψελιδίτιδα, η χρόνια φλεγμονή, ο ιστικός τραυματισμός και η ίνωση είναι παθολογικά χαρακτηριστικά της πνευμονικής ίνωσης.

Με την αρωγή των βιολογικών επιστημών, η πνευμονική ίνωση αναλύεται από την πλευρά της κυτταρικής βιολογίας και της βιοχημείας. Το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα έχει παράσχει πληροφορίες σχετικά με τα βιοχημικά και ανοσολογικά συμβάντα στον κυψελιδικό χώρο. Θεωρείται ότι τα κυψελιδικά μακροφάγα, τα λεμφοκύτταρα, τα ουδετερόφιλα, τα μαστοκύτταρα, τα ηωσινόφιλα, τα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα και τα μεσεγχυματικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των ινοβλαστών, εμπλέκονται στην παθογένεια του νοσήματος. Οι τελευταίοι, μάλιστα, διαδραματίζουν το σημαντικότερο, ίσως, ρόλο στην παθογένεια της IPF. Επιπλέον, αυξητικοί παράγοντες, κυτταροκίνες, χημικοί μεσολαβητές, πρωτεάσες και εξωκυττάρια πρωτεΐνες συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις με τα ανωτέρω κύτταρα. Πρόσφατα, οι μοριακές βιολογικές τεχνικές εισήχθησαν στην περαιτέρω ανάλυση της ρύθμισης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της παραγωγής πρωτεϊνών. Αναλύοντας τα βιολογικά συμβάντα της πνευμονικής ίνωσης, έγινε σαφές ότι οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα σε κύτταρα αλλά και ανάμεσα σε κύτταρα και μακρομόρια παίζουν κρίσιμο ρόλο στην παθογένεια της πνευμονικής ίνωσης [40].

1.3. ΔΙΑΜΕΣΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

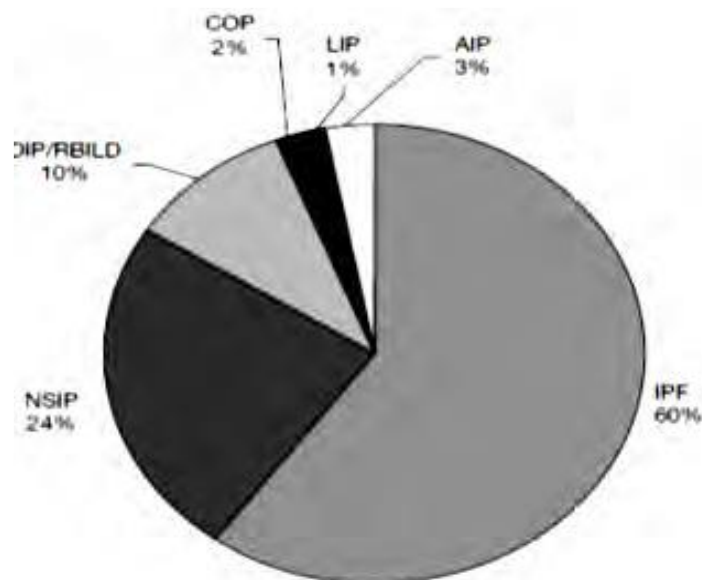
Η ίνωση είναι μια μη ειδική αντίδραση στον τραυματισμό που κλασικά συμβαίνει σε συσχέτιση με, ή μετά από μια σημαντική φλεγμονώδη διαδικασία. Η ίνωση στον πνεύμονα μπορεί να αποτελεί μέρος της φυσιολογικής διαδικασίας επούλωσης και ο μηχανισμός της ίνωσης είναι σχετικά καλά κατανοητός. Η διάμεση πνευμονική νόσος ή διάμεση πνευμονία αναφέρεται σε καταστάσεις στις οποίες η κυρίαρχη ιστική βλάβη εντοπίζεται στο κυψελιδικό τοίχωμα. Οι ιδιοπαθείς διάμεσες πνευμονίες είναι μια υποομάδα διάχυτων διαμέσων νοσημάτων του πνεύμονα που χαρακτηρίζονται από επέκταση του διαμέσου διαμερίσματος (δηλαδή του τμήματος εκείνου του πνευμονικού παρεγχύματος που βρίσκεται ανάμεσα στις επιθηλιακές και ενδοθηλιακές βασικές μεμβράνες) και από διήθηση από φλεγμονώδη κύτταρα. Η φλεγμονώδης διήθηση μερικές φορές συνοδεύεται από ίνωση, είτε με τη μορφή μη φυσιολογικής εναπόθεσης του κολλαγόνου, είτε με τη μορφή του πολλαπλασιασμού ινοβλαστών που είναι ικανοί για σύνθεση κολλαγόνου.

Περισσότερες από 100 γνωστές αιτίες διάμεσης πνευμονικής νόσου έχουν αναγνωριστεί, και οι περισσότερες σχετίζονται με ένα βαθμό πνευμονικής ίνωσης. Στο ένα τρίτο περίπου των περιπτώσεων, η αιτιολογία είναι άγνωστη και η παθογένεια είναι ανεπαρκώς κατανοητή. Ορισμένες περιπτώσεις διάμεσης πνευμονικής νόσου είναι οξείες, αλλά οι περισσότερες έχουν ύπουλη έναρξη μηνών ή ετών, δεν έχουν προφανή αίτια και καταλήγουν σε διάχυτη πνευμονική ίνωση. Όταν τα νοσήματα αυτά καταλήγουν σε διάχυτη πνευμονική ίνωση αυτή περιλαμβάνει βρογχιολική, αγγειακή, ενδο-κυψελιδική και υπεζωκοτική ίνωση επιπροσθέτως της διάμεσης πνευμονικής νόσου. Τα διάχυτα παρεγχυματικά πνευμονικά νοσήματα, τα οποία συχνά αναφέρονται με τον συγκεντρωτικό όρο διάμεσα πνευμονικά νοσήματα (ILD), είναι μια ετερογενής ομάδα νοσημάτων που ταξινομούνται μαζί λόγω ομοιοτήτων στα κλινικά, ακτινογραφικά, φυσιολογικά και παθολογικά χαρακτηριστικά τους. Εντούτοις, ο όρος διάμεσα είναι συχνά παραπλανητικός, αφού οι περισσότερες από αυτές τις διαταραχές σχετίζονται επίσης με εκτεταμένη αλλαγή της αρχιτεκτονικής των κυψελίδων και των αεραγωγών.

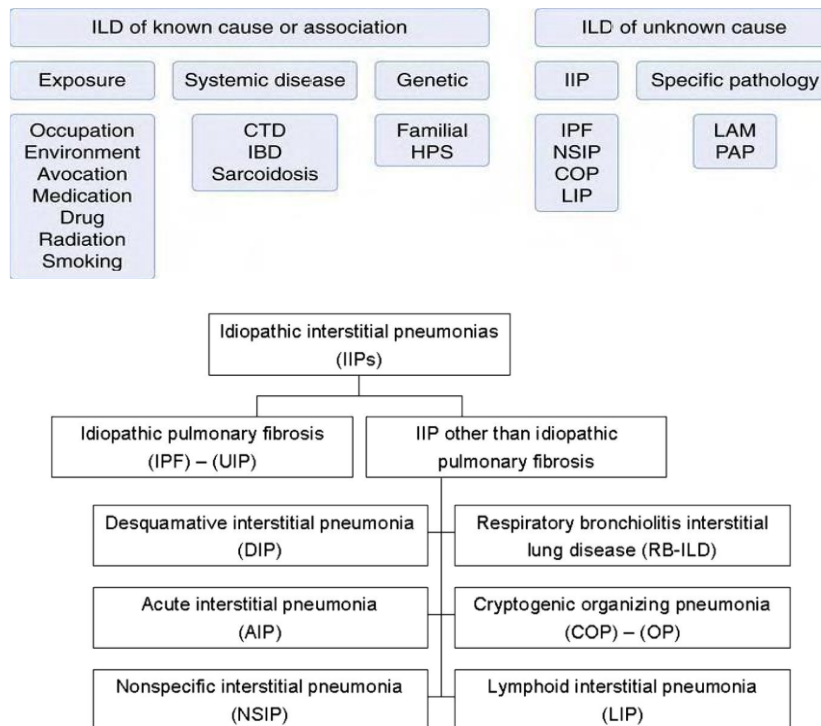
Οι πιο κοινές αναγνωρίσιμες μορφές ILD σχετίζονται με περιβαλλοντική και επαγγελματική έκθεση, ειδικά σε ανόργανη και οργανική σκόνη. Υπάρχει ακόμη μια ποικιλία ILD αγνώστου αιτιολογίας όπως η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση και η σαρκοείδωση, αλλά και η πνευμονική ίνωση που σχετίζεται με νόσους του συνδετικού ιστού (π.χ. συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, ρευματοειδής αρθρίτις, σκληρόδερμα) [40].

1.4. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΔΙΑΜΕΣΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Στα σχήματα 1.2 και 1.3 απεικονίζεται η συχνότητα των ιδιοπαθών διάμεσων πνευμονιών (Idiopathic Interstitial Pneumonias: IIPs) και η ταξινόμηση των διάμεσων νοσημάτων θώρακα με βάση το αίτιο, όπως προτείνεται από την Αμερικανική και Ευρωπαϊκή Εταιρεία Θώρακα (American Thoracic Society/European Respiratory Society: ATS/ERS) [41].



Σχήμα 1.3: Σχετική συχνότητα των IIPs [42].



Σχήμα 1.4. Πάνω: Πρόσφατη αιτιολογική οργάνωση των διάμεσων νόσων πνεύμονα σε δύο βασικές κατηγορίες: με γνωστό αίτιο και αγνώστου αιτιολογίας. **Κάτω:** Πιο αναλυτικά η ταξινόμηση IIPs (βέλος) [42,43]. **ILD:** Διάμεση νόσος πνεύμονα, **CTD:** Κολλαγονικά νοσήματα, **IBD:** Φλεγμονώδεις νόσοι εντέρου, **HPS:** Hermansky-Pudlak syndrome, **IIP:** Ιδιοπαθής διάμεση πνευμονία, **IPF:** Ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση, **NSIP:** Μη ειδική διάμεση πνευμονία, **COP:** Κρυπτογενής οργανούμενη πνευμονία, **LIP:** Λεμφαγγειακή διάμεση πνευμονία, **LAM:** Λεμφαγγειολυωμάτωση **PAP:** Πνευμονική κυψελιδική πρωτεΐνωση.

1.4.1. Συνήθης διάμεση πνευμονία (Usual Interstitial Pneumonia –UIP)

Αποτελεί το χαρακτηριστικό πρότυπο της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης (IPF), της πιο συχνής-IIPs. Το πρότυπο αυτό απαντάται και σε άλλα νοσήματα εκτός της IPF, όπως τα κολλαγονικά νοσήματα, πνευμονία εξ υπερευαισθησίας, τοξικότητα από φάρμακα, ασβέστωση, ιστιοκυττάρωση Langerhans και άλλα. Χαρακτηριστικό γνώρισμα του UIP αποτελεί το πρότυπο μελικηρύθρας, αν και δεν είναι παθογνωμονικό για τη νόσο. Κύριο χαρακτηριστικό είναι η διάχυτη διάμεση ίνωση με εικόνα ‘λιθόστρωτου’ και κατεχοχήν υποϋπεζωκοτικές βλάβες. Πρώιμη βλάβη αποτελεί η ακατάσχετη υπερπλασία των ινοβλαστών (fibroblast foci). Άλλα μορφολογικά χαρακτηριστικά της νόσου είναι: (1) η εστιακή και κατά τόπους

παρουσία παθολογικών περιοχών (πυκνή ίνωση πλησίον περιοχών με φυσιολογικό πνευμονικό παρέγχυμα, (2) η υποϋπεζωκοτική, παραδιαφραγματική και περιβρογχιολοδική κατανομή, (3) η παρουσία ινωτικών στοιχείων (ινοβλαστών, ουλώδους ιστού) και (4) το μειωμένο ή κατεστραμμένο κυψελιδικό στοιχείο πλησίον των περιοχών τελικού σταδίου ίνωσης.

1.4.2. Οξεία Διάμεση Πνευμονία (Acute Interstitial Pneumonia–AIP)

Χαρακτηριστικό γνώρισμα της AIP αποτελούν η διάχυτη συμμετοχή του πνευμονικού παρεγχύματος, η ίνωση με συσώρευση μυοϊνοβλαστών στους κυψελιδικούς χώρους, καθώς και η κυψελιδική βλάβη με παρουσία πνευμονοκυττάρων τύπου II, ατυπίας και υάλινων μεμβρανών

1.4.3. Κρυπτογενής Οργανούμενη Πνευμονία (Cryptogenic Organizing Pneumonia-COP)

Είναι η τρέχουσα ορολογία για την αποφρακτική βρογχιολίτιδα. Περιλαμβάνει ασθενείς νεότερους από αυτούς με IPF και συνήθως η διάγνωση τίθεται λόγω αποτυχίας ανταπόκρισης στα αντιβιοτικά. Κάποιες φορές η διάγνωση τίθεται με βιοψία πνεύμονα. Η θεραπεία είναι με κορτικοστεροειδή. Συχνά υπάρχουν υποτροπές και απαιτείται χρόνια ανοσοκατασταλτική αγωγή. Συχνά συνδέεται με κολλαγονική νόσο. Χαρακτηριστικό γνώρισμα της COP (που παλαιότερα ονομαζόταν BOOP ή Αποφρακτική Βρογχιολίτιδα) αποτελεί η παρουσία οργανούμενων στοιχείων στις κυψελίδες, τους κυψελιδικούς πόρους, με ή χωρίς συμμετοχή των βρογχιολίων. Άλλα μορφολογικά χαρακτηριστικά είναι η παρουσία οργανούμενου ιστού με πολυποειδή μορφή εντός των κυψελίδων και των κυψελιδικών πόρων, η παρουσία φλεγμονωδών αφοκυττάρων, η παρουσία κυττάρων τύπου II. Δεν υπάρχουν στοιχεία διάμμεσης ίνωσης.

1.4.4. Μη ειδική Πνευμονία (Nonspecific Interstitial Pneumonia- NSIP)

Αφορά σε ασθενείς 7 με 10 χρόνια νεότερους από αυτούς με IPF και η διάγνωση τίθεται με βιοψία πνεύμονα. Η πρόγνωση είναι καλύτερη από την IPF και οι περισσότεροι ασθενείς επιβιώνουν 7 με 10 χρόνια. Η θεραπεία περιλαμβάνει κορτικοστεροειδή και κυταροτοξικά ανοσοκατασταλτικά φάρμακα. Η NSIP αρχικά χρησιμοποιήθηκε ώστε να καταταγούν πνευμονίες που δεν ανήκαν σε άλλες

ιδιοπαθείς πνευμονίες, όπως UIP, COP, DIP, AIP. Το πιο χαρακτηριστικό ιστοπαθολογικό εύρημα είναι φλεγμονώδεις ή ινωτικές αλλοιώσεις. Τυπικά, οι πνεύμονες παρουσιάζουν ομοιόμορφη προσβολή αλλά η κατανομή και η βαρύτητα είναι διάσπαρτη. Αποτελείται από κυτταρικό και ινωτικό στοιχείο. Το κυτταρικό στοιχείο περιλαμβάνει χρόνια φλεγμονώδη στοιχεία διάμεσου ιστού (λεμφοκύτταρα, πλασματοκύτταρα), πνευμονοκύτταρα τύπου II και στοιχεία οργανούμενης πνευμονίας. Το ινωτικό στοιχείο περιλαμβάνει πυκνή ίνωση με ομοιογενή συμμετοχή του πνεύμονα, ήπια φλεγμονώδη διηθήματα, χωρίς ευρήματα μελικηρύθρας ή ινοβλαστών.

1.4.5. Λεμφοειδική διάμεση πνευμονία (Lymphoid Interstitial Pneumonia-LIP)

Είναι μια σπάνια οντότητα που οφείλεται σε συσώρευση λεμφοκυττάρων διάχυτα στον διάμεσο ιστό. Η διάγνωση τίθεται με βιοψία πνεύμονα. Η θεραπεία είναι κορτικοστεροειδή και σπανιότερα ανοσοκατασταλτική αγωγή. Συνδέεται συχνά με κολλαγονική νόσο και ιδιαίτερα το σύνδρομο Sjögren και με ασθενείς με ανοσοκαταστολή. Ιστοπαθολογικά χαρακτηρίζεται από χρόνια συσώρευση λεμφοκυττάρων στις κυψελίδες, συνοδευόμενης από διαφορετικού βαθμού ίνωση.

1.4.6. Κοκκιωματώδεις διάμεσοι νόσοι και σαρκοείδωση

Η σαρκοείδωση είναι μια πολυσυστηματική νόσος φλεγμονώδους αιτιολογίας, που κυρίως προσβάλλει τους πνεύμονες. Είναι συχνή μεταξύ νεαρών ενηλίκων και προκαλεί περιοριστική πνευμονοπάθεια. Για την διάγνωσή της είναι απαραίτητη η ιστοπαθολογική τεκμηρίωση από πνευμονικές βιοψίες των κοκκιωμάτων. Θεραπευτικά χορηγείται κορτιζόνη. Βασικά ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά της σαρκοείδωσης αποτελούν τα επιθηλιοειδή κοκκιώματα με παρουσία CD4 T-λεμφοκυττάρων και μονοκυττάρων, τα κοκκιώματα κατά μήκος λεμφαγγειακών οδών (ενδολοβιακών διαφραγματίων, βρογχοπνευμονικών δεματίων και πλευρών) και σπανιότερα τα νεκρωτικά κοκκιώματα με αρνητικές δοκιμασίες για μικρόβια. Άλλα ιστολογικά ευρήματα των πολυπύρηνων γιγαντοκυττάρων είναι τα σωμάτια Schauman και τα αστεροειδή σωμάτια.

1.4.7. Πνευμονίτιδα εξ υπερευαισθησίας/ Εξωγενής Αλλεργική Κυψελίτιδα (Hypersensitivity Pneumonitis/Extrinsic Allergic Alveolitis-HP/EAA)

Αποτελεί μια ομάδα διάμεσων νοσημάτων που προκαλούνται από εισπνοή εξωγενών αλλεργιογόνων όπως οργανικές σκόνες ή οργανικών χημικών και κάποιων φαρμακευτικών ουσιών. Η διάγνωση είναι εξαιρετικά δύσκολη, γιατί ο εκλυτικός παράγοντας δεν είναι εύκολο να ανακληθεί. Τα κλινικά και απεικονιστικά χαρακτηριστικά συμπίπτουν με τις υπόλοιπες διάμεσες νόσους όπως λοίμωξη ή IPF. Βασικά μορφολογικά χαρακτηριστικά της HP/EAA είναι η παρουσία χρόνιων φλεγμονωδών κυττάρων διάμεσου ιστού με κεντρολοβιακή κατανομή (λεμφοκύτταρα CD8, πλασματοκυττάρων και ηωσινοφίλων), μικρών επιθηλιοειδών κοκκιωμάτων χωρίς τυροειδική νέκρωση στα 2/3 των ασθενών και πολυπύρηνων γιγαντοκυττάρων. Επίσης, παρατηρούνται σημεία βρογχιολιδικής βλάβης και αναγέννησης καθώς και κυψελιδικής βλάβης και αναγέννησης, διάμεσης ινώσης, εικόνα μελικηρύθρας.

1.4.8. Αποφολιδωτική Διάμεση Πνευμονία (Desquamative Interstitial Pneumonia-DIP)

Κατατάσσεται στην κατηγορία διάμεσων νόσων που απαντώνται σε καπνιστές, ωστόσο περιστασιακά απαντάται και σε μη καπνιστές. Είναι η πιο συχνή διάμεση νόσος στα παιδιά. Βασικά ιστολογικά χαρακτηριστικά της DIP αποτελούν η συσσώρευση μακροφάγων στις κυψελίδες, με παρουσία κοκκίων σιδήρου, κυττάρων κονιορτού (smokers macrophages), η εκσεσημασμένη υπερπλασία πνευμονοκυττάρων τύπου II, η ήπια και μέτρια ίνωση και πάχυνση των μεσοκυψελιδικών διαφραγματίων, η ήπια διάμεση φλεγμονή και η ομοιόμορφη κατανομή των βλαβών στο πνευμονικό παρέγχυμα.

1.4.9. Πνευμονική Ιστιοκυττάρωση Langerhans (Pulmonary Langerhans cell histiocytosis-PLCH)

Χαρακτηρίζεται από ανώμαλη συσσώρευση κυττάρων Langerhans. Βασικά ιστολογικά χαρακτηριστικά της PLCH αποτελούν η παρουσία των χαρακτηριστικών κεντρολοβιακών οζιδίων Langerhans σε συνδυασμό με ηωσινόφιλα, κυστικές

βρογχιοιδικές βλάβες, αστεροειδείς ινωτικές ουλές (εικόνα μέδουσας) και αλλαγές λόγω καπνίσματος (συσσώρευση μακροφάγων) και διάμεση ίνωση χρονίου τύπου.

1.4.10 Άλλες Διάμεσοι νόσοι πνεύμονα

Με βάση την ταξινόμηση ATS/ERS στην κατηγορία αυτή ταξινομούνται διάφορα νοσήματα όπως η λεμφαγγειωμάτωση, η νόσος Erdheim-Chester και η νόσος Rosai-Dorfman, που χαρακτηρίζεται από συσσώρευση διαφορετικών κυττάρων στον πνευμονικό ιστό, προκαλώντας πνευμονική δυσλειτουργία. Στον πίνακα 1.1 συνοψίζεται η ιστοπαθολογική και απεικονιστική συσχέτιση των IIPs.

Πίνακας 1.1: Ιστοπαθολογικά και απεικονιστικά χαρακτηριστικά των IIPs από την ταξινόμηση ATS/ERS [43].

Morphologic Pattern	Histopathologic Features	Distribution at CT	High-Resolution CT Features
UIP	Spatial and temporal heterogeneity, architectural distortion, fibroblastic foci	Apicobasal gradient, subpleural	Macrocystic honeycombing, reticular opacities, traction bronchiectasis, architectural distortion, focal ground-glass opacity
NSIP	Spatial and temporal homogeneity; cellular pattern shows mild to moderate interstitial chronic inflammation; fibrosing pattern shows dense or loose interstitial fibrosis	No obvious gradient, subpleural, symmetric	Ground-glass opacities, irregular linear or reticular opacities, micronodules, consolidation, microcystic honeycombing
COP	Patchy distribution of intraluminal organizing fibrosis in distal airspaces, preservation of lung architecture, uniform temporal appearance	Patchy, peripheral or peribronchial, basal predominance, sometimes sparing of subpleural space, migration tendency	Airspace consolidation, mild bronchial dilatation, ground-glass opacities, large nodules (rare)
RB-ILD	Bronchiolocentric accumulation of alveolar macrophages containing brown particles, mild bronchiolar fibrosis	Diffuse or upper lung predominance	Centrilobular nodules, patchy ground-glass opacities, bronchial wall thickening
DIP	Diffuse accumulation of macrophages in distal airspaces, mild interstitial fibrosis, mild chronic inflammation	Apicobasal gradient, peripheral predominance	Ground-glass opacities, irregular linear or reticular opacities, sometimes cysts
LIP	Diffuse infiltration of alveolar septa by lymphoid cells, lymphoid hyperplasia frequent	Basilar predominance or diffuse	Ground-glass opacities, perivascular cysts, septal thickening, centrilobular nodules
AIP	Diffuse alveolar damage; exudative phase shows hyaline membranes, diffuse alveolar infiltration by lymphocytes; organizing phase shows alveolar wall thickening due to fibrosis, pneumocyte hyperplasia	Lower lung predominance, symmetric, bilateral	Exudative phase shows ground-glass opacities, airspace consolidation; organizing phase shows bronchial dilatation, architectural distortion

1.5. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗΣ ΪΝΩΣΗΣ

Επιπολασμός και επίπτωση

Ο επιπολασμός της IPF υπολογίστηκε το 1984 σε 3 με 5 περιπτώσεις ανά 100.000 [44], ενώ άλλες μελέτες το 1994 υπολογίζουν 6 περιπτώσεις ανά 100.000 [45]. Τέλος, σε μία μελέτη για το σύνολο των ιδιοπαθών διάμεσων πνευμονοπαθειών στο New Mexico των ΗΠΑ, ο επιπολασμός της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης ανέρχεται σε 20,2 περιπτώσεις ανά 100.000 για τους άντρες και 13,2 περιπτώσεις για τις γυναίκες, ενώ η επίπτωση σε 10,7 και 7,4/100.000/έτος, αντίστοιχα [46]. Παράλληλα, μία μελέτη του 2002 στην Φινλανδία υπολογίζει τον επιπολασμό της νόσου σε 16 με 18 περιπτώσεις ανά 100.000. Παρατηρείται, δηλαδή, μια αυξητική τάση που δεν μπορεί εύκολα να εξηγηθεί και αν προσπαθήσει κάποιος να ερευνήσει περαιτέρω θα πρέπει να λάβει σοβαρά υπόψη του τόσο τη γήρανση του πληθυσμού και τη βελτίωση των απεικονιστικών μεθόδων, όσο και τις διαφορές στα κριτήρια που χρησιμοποιούνται στις διάφορες μελέτες, που είναι αρκετά σημαντικές [47].

1.6 ΦΥΛΟ ΚΑΙ ΗΛΙΚΙΑ

Συνήθως αναφέρεται ότι η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση είναι συχνότερη στους άνδρες απ' ό,τι στις γυναίκες [46,48]. Αυτό φαίνεται να αναιρείται στην παραπάνω μελέτη της Φινλανδίας, κατά την οποία δεν παρατηρείται διαφορά στον επιπολασμό της νόσου μεταξύ των δύο φύλων. Οι ασθενείς με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση είναι συνήθως ηλικίας 40-70 ετών, με μέση ηλικία κατά τη διάγνωση τα 66 χρόνια [45], αν και σε μία πολύ πρόσφατη μελέτη σε σύνολο 86 ασθενών αναφέρεται πολύ μεγαλύτερη μέση ηλικία κατά τη διάγνωση (80 έτη) [49]. Είναι αξιοσημείωτο ότι τόσο ο επιπολασμός όσο και η επίπτωση αυξάνουν με την ηλικία. Χαρακτηριστικά, ενώ στην ηλικία των 45-54 ο επιπολασμός στους άντρες είναι 8,7/100.000 και στις γυναίκες 8,1/100.000, σε ηλικίες άνω των 75 ανέρχεται σε 174,7/100.000 για τους άντρες και 73,2/100.000 για τις γυναίκες. Όσον αφορά την επίπτωση, στην ηλικία των 45-54 είναι 2,2/100.000/έτος για τους άντρες και 4/100.000/έτος για τις γυναίκες, ενώ σε ηλικίες άνω των 75 ανέρχεται σε 101,9/100.000/έτος για τους άντρες και 57/100.000/έτος για τις γυναίκες [46,47].

1.7. ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΚΑΙ ΦΥΛΕΤΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ

Η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση δεν παρουσιάζει κάποια συγκεκριμένη παγκόσμια κατανομή. Μια μελέτη, όμως, λαμβάνοντας υπόψη την ηλικία, έκανε τη διαπίστωση ότι προσβάλλονται περισσότερο οι δυτικές και νοτιοανατολικές πολιτείες των ΗΠΑ από ό,τι οι μεσοδυτικές και βορειοανατολικές πολιτείες [49]. Άλλη μελέτη στη Βρετανία, απέδειξε ότι η πνευμονική ίνωση είναι συχνότερη στις βιομηχανικές περιοχές απ' ό,τι στην υπόλοιπη χώρα [51]. Όσον αφορά τις φυλές, η συχνότητα της νόσου, λαμβάνοντας υπόψη την ηλικία, ήταν μεγαλύτερη στους λευκούς [50].

1.8 ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ

Η θνησιμότητα από την ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση ανά 100.000 πληθυσμού υπολογίζεται σε 3,3 για τους άντρες και σε 2,5 για τις γυναίκες [48]. Σύμφωνα με μια άλλη μελέτη η θνησιμότητα λαμβάνοντας υπόψη την ηλικία αυξήθηκε για τους άντρες από το 4,8/100.000 το 1979 στο 5,09/100.000 το 1991, ενώ οι αντίστοιχοι δείκτες για τις γυναίκες ήταν 2,14 και 2,72 [49]. Θεωρείται βέβαιο ότι η θνησιμότητα από τη νόσο αυξάνεται με την ηλικία, ενώ για ορισμένους ερευνητές είναι υψηλότερη στο ανδρικό φύλο [51]. Η μέση επιβίωση από τη στιγμή της διάγνωσης κυμαίνεται από 28 μήνες ως 5 χρόνια [52,53], ενώ σύμφωνα με μία μελέτη, που αφορούσε 86 περιπτώσεις ιστολογικά επιβεβαιωμένης ιδιοπαθούς διάμεσης ίνωσης, είναι 3,5 έτη. Σύμφωνα με αυτή τη μελέτη, 20% των ασθενών κατέληξαν από σοβαρή αναπνευστική ανεπάρκεια, 10,5% από την εξέλιξη της νόσου, 23,3% από βακτηριακή πνευμονία και 17,4% από καρκίνο του πνεύμονα [54]. Πρέπει να διευκρινιστεί ότι η χρήση των πιστοποιητικών θανάτου δεν μπορεί να αποτελέσει ασφαλές κριτήριο για την εκτίμηση της θνησιμότητας από τη νόσο, διότι παρέχουν ανακριβή και αμφίβολα, μιας και δεν αποδίδονται στην ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση παρά μόνο οι μισοί θάνατοι που οφείλονται σε αυτήν [46,50,55].

1.9 ΦΛΕΓΜΟΝΗ ΚΑΙ ΊΝΩΣΗ

Διάφορες μελέτες θεωρούν ότι όλες οι πνευμονικές ινώσεις έχουν έναν κοινό παθογενετικό μηχανισμό, ανεξάρτητα από το αίτιό τους [56]. Η θεωρία που κυριάρχησε για την παθογένεια της πνευμονικής ίνωσης κατά τις δεκαετίες 1970-

1980 ήταν αυτή της φλεγμονώδους ίνωσης (inflammatory fibrosis), σύμφωνα με την οποία ένα άγνωστο αίτιο επιδρά στον πνεύμονα και ξεκινά μία χρόνια φλεγμονώδη διαδικασία. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση κυττάρων φλεγμονής και την απελευθέρωση μεσολαβητικών ουσιών που οδηγούν με τη σειρά τους στην ενεργοποίηση μεσεγχυματικών κυττάρων και την αυξημένη παραγωγή και εναπόθεση εξωκυττάριας ουσίας [57,58]. Το τελικό αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός ουλής και η ίνωση του παρεγχύματος. Σημαντικό ρόλο για τη στήριξη αυτής της θεωρίας έπαιξε το γεγονός ότι στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα των ασθενών με IPF υπάρχει μεγάλος αριθμός φλεγμονωδών κυττάρων (δηλαδή ηωσινόφιλων και ουδετερόφιλων) σε σχέση με τα φυσιολογικά άτομα [59,60].

Έτσι λοιπόν, αξιολογώντας το βασικό ρόλο της φλεγμονής στην παθογένεια της ίνωσης, άρχισε να ενδιαφέρει τους ερευνητές η ανακάλυψη και ο προσδιορισμός ενός παράγοντα, ο οποίος θα σταματούσε τη φλεγμονή και άρα θα οδηγούσε και στην απάλειψη της ίνωσης [58]. Η παρουσία και η πρώιμη απάντηση προφλεγμονωδών παραγόντων και η επίμονη παρουσία τους μπορεί να λειτουργήσει ως μεσολαβητής στην ίνωση. Η ιντερλευκίνη-1 (IL-1), είναι η πιο σημαντική φλεγμονογόνος κυτταροκίνη. Αρχικά γνωστή ως ενεργοποιητικός παράγοντας των λεμφοκυττάρων, διαφοροποιητικός παράγοντας των B κυττάρων ή ενδογενές πυρετογόνο [61], η ομάδα μορίων της IL-1 συμμετέχει σε αρκετές βιολογικές διεργασίες του οργανισμού, όπως: καρδιαγγειακές, νευροενδοκρινικές, πυρετός, γονιδιακή έκφραση, απελευθέρωση αυξητικών παραγόντων, απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών (γλουταμικού, γ-αμινοβουτυρικού), μεταβολές στην ευαισθησία των υποδοχέων NMDA (N-μεθυλο-D-ασπαρτικό), κυρίως έναντι αυτών των νευροδιαβιβαστών, καθώς και παραγωγή i-NOS, κυτταροκινών, προσταγλανδινών, νευροπεπτιδίων και του β-αμυλοειδούς [62].

Αποτελείται από δύο αγωνιστές (IL-1 α και IL-1 β), τρία εναλασσομένα ενωμένα m-RNA που κωδικοποιούν τρεις ανταγωνιστές των υποδοχέων ιντερλευκίνης-1 (IL-1Ra) και δύο υποδοχείς (τύπου I και τύπου II). Ένας από τους IL-1Ra εκκρίνεται, ενώ οι άλλοι δύο είναι ενδοκυττάριοι και φαίνεται να απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια κυτταρικής βλάβης ή απόπτωσης. Επιπλέον, η παρουσία των δύο υποδοχέων δηλώνει ακόμα μεγαλύτερη πολυπλοκότητα καθώς ο τύπου-I υποδοχέας σχετίζεται με σύζευξη μηνυμάτων, ενώ ο τύπου-II δεν κάνει σύζευξη αλλά λειτουργεί κυρίως ως υποδοχέας «δόλωμα» [63]. Η ισορροπία

έκφρασης των αγωνιστών, ανταγωνιστών και υποδοχέων τελικά προσδιορίζει τη βιολογία και δράση της ιντερλευκίνης-1 και επηρεάζει τον τρόπο με τον οποίο κατανοούμε το ρόλο της στην πνευμονική ίνωση [63,64]. Τα δύο ισομερή της IL-1 (IL-1α και IL-1β) και ο ενδογενής ανταγωνιστής του υποδοχέα της (receptor antagonist IL-1Ra) είναι μαζί με τον TNF-α από τις πιο μελετημένες κυταροκίνες σε μοντέλα πνευμονικής ίνωσης. Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός μελετών που δείχνει τον τρόπο με τον οποίο η ιντερλευκίνη-1 προάγει την πνευμονική ίνωση [63-65], όπως:

- Προάγει τη φλεγμονή μέσω συσσώρευσης λευκοκυττάρων (παράδειγμα η προσκόλληση μορίων και χημειοκινών)
- Προκαλεί την έναρξη έκφρασης ινοβλαστών προκολλαγόνου τύπου I και III, γλυκοζαμινογλυκανών και ινικής.
- Προκαλεί την έκφραση ινοβλαστών μέσω του εξ αιμοπεταλίων προερχόμενου αναπτυξιακού παράγοντα (PDGF).
- Εμμέσως μεσολαβεί στην ινοβλάστωση.

Υπάρχουν, όμως, και μελέτες, οι οποίες αμφισβητούν τη θεωρία της ίνωσης μετά από φλεγμονή. Στηρίζονται σε δεδομένα, που προκύπτουν από πειραματική έρευνα, ότι η ιντερλευκίνη-1 εμποδίζει την ίνωση, μέσω των ανταγωνιστών που μεσολαβούν στην παραγωγή ιστικών κολλαγενασών και προσταγλανδίνης E2 (PGE2) [66]. Αυτό σημαίνει ότι η IL-1 μπορεί να συμμετέχει στην αναστολή της αύξησης του εξωκυττάριου υποστρώματος. Εδώ θα πρέπει να αναφερθεί ότι η IL-1α, που προέρχεται από τα κυψελιδικά πνευμονοκύτταρα τύπου II εμποδίζει την ινοβλάστωση μέσω ενός μηχανισμού που σχετίζεται με την παραγωγή προσταγλανδίνης E2 από τους ινοβλάστες.

Επιπλέον, ένας μεγάλος αριθμός χρόνιων ινοβλαστικών δυσλειτουργιών, συμπεριλαμβανομένης και της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης, έχει αποδειχθεί ότι έχουν αυξημένη έκφραση IL-1Ra σε τέτοια επίπεδα που εμποδίζουν τη δράση των αγωνιστών ιντερλευκίνης-1 [66]. Η έλλειψη ιντερλευκίνης-1 στο εξωκυττάριο υπόστρωμα κατά την παρουσία υψηλού TGF-β θα οδηγούσε σε αυξημένη εναπόθεση εξωκυττάριου υποστρώματος [67]. Επίσης, φαίνεται πως η φλεγμονή δεν αποτελεί βασικό ιστοπαθολογικό εύρημα της συνήθους διάμεσης πνευμονίας

(usual interstitial pneumonia, UIP) και υπάρχουν ελάχιστες ενδείξεις ότι είναι περισσότερο έντονη στα αρχικά στάδια της νόσου. Μελετώντας πολλούς ασθενείς με UIP έγινε αντιληπτό ότι φλεγμονή παρατηρείται συνήθως στις περιοχές εναπόθεσης κολλαγόνου και αλλοιώσεων τύπου μελισσοκηρήθρας, αλλά σπάνια προσβάλλει μόνη της τα μεσοκυψελιδικά διαφράγματα [68]. Επίσης, αρκετές διάμεσες πνευμονοπάθειες, στις οποίες η φλεγμονή αποτελεί κυρίαρχο στοιχείο κατά τα αρχικά στάδια, όπως η πνευμονοπάθεια από υπερευαισθησία, συχνά δεν καταλήγουν σε ίνωση [56]. Επιπλέον, σύμφωνα με μελέτες που έγιναν σε ζώα, η αναδόμηση (remodeling) του πνευμονικού παρεγχύματος μπορεί να συμβεί είτε ως επακόλουθο φλεγμονής [69], είτε ανεξάρτητα από αυτή [70].

Εδώ επισημαίνεται ο ρόλος του αυξητικού παράγοντα-β (transforming growth factor-β/TGF-β), ο οποίος φυσιολογικά συμμετέχει στο σχηματισμό των κυψελίδων, τη ρύθμιση των διαδικασιών επούλωσης και την ανοσιακή απάντηση [71]. Συγχρόνως αποτελεί σημαντικό συστατικό του ινώδους ιστού στην IPF, καθώς σχετίζεται με τη διαφοροποίηση των μυοϊνοβλαστών [72,73.]. Η ενεργοποίηση του TGF-β δημιουργεί συνθήκες ίνωσης ανεξάρτητα από την παρουσία φλεγμονής.

Ένα άλλο στοιχείο, το οποίο θέτει σε αμφισβήτηση τη θεωρία της φλεγμονώδους ίνωσης είναι η απουσία συσχέτισης διαφόρων δεικτών φλεγμονής του πνεύμονα με το στάδιο και την πρόγνωση της νόσου. Αν θεωρηθεί ότι η κυψελιδίτιδα οδηγεί σε ίνωση, τότε θα έπρεπε οι μέθοδοι εκτίμησης της φλεγμονής να μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για την εκτίμηση της βαρύτητας της νόσου. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι η αναλογία και ο αριθμός των κυττάρων του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος, το σπινθηρογράφημα με γάλλιο και τα κυκλοφορούντα ανοσοσυμπλέγματα έχουν μικρή αξία στην εκτίμηση της πρόγνωσης της IPF [71-73, 75]. Επίσης, διαπιστώνεται ότι, σε αντίθεση με άλλες διάμεσες πνευμονοπάθειες, στην IPF η απεικόνιση θολής υάλου σε αξονική τομογραφία υψηλής ευκρίνειας (HRCT), όταν συνδέεται με δικτυωτές σκιάσεις και βρογχεκτασίες εξ' έλξεως, αντιστοιχεί συνήθως σε ίνωση [76-78]. Η μη ανταπόκριση των ασθενών με IPF στα αντιφλεγμονώδη φάρμακα έρχεται σε αντίθεση με τη θεωρία της ίνωσης μετά από φλεγμονή [78,79]. Η πορεία της IPF είναι προοδευτική και ο ασθενής καταλήγει παρά την αντιφλεγμονώδη θεραπεία. Η χορήγηση κορτικοστεροειδών ήταν το επόμενο θεραπευτικό βήμα και ορισμένες

μελέτες έδειξαν ευνοϊκή ανταπόκριση ασθενών με IPF σε αυτά. Ωστόσο, στις περισσότερες μελέτες η διάγνωση της IPF δεν έχει γίνει με βιοψία πνεύμονα και σε αρκετές περιπτώσεις συμπεριλαμβάνονται στις μελέτες και άλλες διάμεσες πνευμονοπάθειες, όπως NSIP ή COP [80].

Έτσι λοιπόν, με βάση όσα αναφέρθηκαν η ανάπτυξη διάχυτης πνευμονικής ίνωσης μπορεί να προκύψει με δύο τρόπους: 1) ακολουθώντας τη φλεγμονώδη οδό, που απαντάται σχεδόν σε όλες τις ιδιοπαθείς διάμεσες πνευμονοπάθειες, πλην της IPF, και κατά την οποία υπάρχει μία αρχική φάση κυψελιδίτιδας η οποία ακολουθείται από την ανάπτυξη ίνωσης και 2) με την οδό των επιθηλιακών κυττάρων και των ινοβλαστών (epithelial/fibroblast route) που απαντάται στην IPF. [56].

ΣΚΟΠΟΣ

Η TPL2 είναι μία MAP3K κινάση σερίνης/θρεονίνη, στο σταυροδρόμι πολλών και διαφορετικών μονοπατιών σηματοδότησης, που ελέγχουν πολλές κυτταρικές διεργασίες, όπως η κυτταρική αύξηση, πολλαπλασιασμός διαφοροποίηση, μετανάστευση και απόπτωση. Η πρωτεΐνη TPL2 χαρακτηρίζεται για τον εδραιωμένο ρόλο της στην μεταγωγή σημάτων στον άξονα MEK/ERK καθοδικά των υποδοχέων που εμπλέκονται στη φυσική και επίκτητη ανοσία, συμπεριλαμβανομένων των υποδοχέων Toll-like, την οικογένεια των υποδοχέων του παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF), την ιντερλευκίνη-1β (IL-1β) και των υποδοχέων συζευγμένων με G-πρωτεΐνες (GPCRs).

Παρά τις μελέτες που οδήγησαν στην ταυτοποίηση της TPL2 ως πρωτο-ογκογονίδιο, που ενεργοποιείται μετά από καρβοξυτελική αποκοπή σε ποντικούς και αρουραίους, μία λεπτομερής εκτίμηση της έκφρασης και της λειτουργίας της TPL2/COT στην ανθρώπινη κακοήθεια λείπει ακόμη από τη βιβλιογραφία. Ο φυσιολογικός ρόλος της TPL2 στην καρκινογένεση παραμένει άγνωστος.

Ένα από τα 3 κυριότερα όργανα όπου εμφανίζονται τα υψηλότερα επίπεδα της TPL2 είναι οι πνεύμονες. Μέχρι σήμερα έχει αναφερθεί ότι οι ποντικοί με έλλειψη TPL2 ή η αναστολή της ERK προστατεύουν ποντίκια από πνευμονική ίνωση τύπου 1/TH17 και μέσω TGF-β, μετά από χορήγηση με μπλεομυκίνη και από ηπατική ίνωση μετά από χορήγηση τετραχλωράνθρακα. Ωστόσο, αυτή η μελέτη έθεσε την πιθανότητα ότι η στόχευση της TPL2 μπορεί να αποτρέψει την εξέλιξη της ηπατικής ίνωσης. Πράγματι, έχουν αναπτυχθεί πολλοί αναστολείς μικρών μορίων που μπλοκάρουν τη σηματοδότηση TPL2 *in vitro*, αλλά κανένας δεν το έχει περάσει σε κλινικές μελέτες. Ωστόσο, δεν είναι γνωστό εάν η TPL2 συμβάλλει στη χρόνια φλεγμονή τύπου 2 και στην ίνωση που προκαλείται από IL-4R.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η *μελέτη του ρόλου του γονιδίου TPL2 στην παθογένεια της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης*.

Η εξαγωγή συμπερασμάτων παρουσιάζει υψηλής σημασίας ενδιαφέρον για την αντιμετώπιση της IPF με νέες στρατηγικές που έχουν ως στόχο να αμβλύνουν τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις, να προώθησουν την επούλωση των πληγών και της ίνωσης και να προσδιορίσουν τις ακριβείς γενετικές παραλλαγές των παραπάνω για την εξατομικευμένη θεραπεία με βάση το χαρακτηρισμό των ασθενών.

Υλικά και Μέθοδοι

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ- ΌΡΓΑΝΑ

- ❖ Πιπέτες
- ❖ Σωληνάρια (0,5/1,5/2ml eppendorfs, Greiner bio-one # 616201)
- ❖ Σωληνάρια 0.2 ml eppendorfs PCR tubes thick wall (Sarstedt #72.699)
- ❖ Πλαστικά ακρορύχια (tips) της εταιρείας Costar.
- ❖ Δοκιμαστικοί σωλήνες των 15ml και 50ml της εταιρείας Falcon.
- ❖ PCR Plates, 96-well, thin-wall (Biorad # 6474523)
- ❖ Petri dishes
- ❖ Γυάλινη ράβδος
- ❖ Αντικειμενοφόρες πλάκες (VWR # 09184)
- ❖ Καλυπτρίδες (Knittel Glass # KN00010029628)
- ❖ Parafilm
- ❖ Ενδροτραχειακοί καθετήρες
- ❖ Ράμματα
- ❖ Σύριγγες του 1ml και των 10 ml
- ❖ Βάζο χρώσης
- ❖ Σωληνάρια BIJOUX
- ❖ Κασέτες σκίνωσης
- ❖ Επωαστήρας
- ❖ Ανακινούμενοι επωαστήρες
- ❖ Αναλυτικός ζυγός
- ❖ Μαγνητικός αναδευτήρας
- ❖ Επιτραπέζια ψυχόμενη φυγόκεντρος Heraeus Fresco 17 (Thermo scientific)
- ❖ Επιτραπέζια φυγόκεντρος (Thermo scientific # 41775276)
- ❖ Συσκευή Vortex
- ❖ Συσκευή Υδατόλουτρου Memert TYP:WB 10
- ❖ Συσκευή απιονισμού ύδατος
- ❖ Θερμικοί κυκλοποιητές-Thermal cyclers, (Peqlab peQSTAR 2x και Biorad #582BR016459)
- ❖ Ψηφιακή κάμερα
- ❖ Συσκευή ηλεκτροφόρησης (Biorad #283BR15412)

- ❖ Συσκευή Real-time PCR (Biorad CFX96 Optics Module)
- ❖ Φασματοφωτόμετρο Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific)
- ❖ Μετασχηματιστής- Τροφοδοτικό Power supply , (Biorad # 164-5050)
- ❖ Συσκευή παροχής ηλεκτρικού ρεύματος
- ❖ Συσκευή με λάμπα UV
- ❖ pHμετρο
- ❖ Φούρνος μικροκυμάτων
- ❖ Φωτόμετρα πχ nanodrop?
- ❖ Εκμαγείο συσκευής ηλεκτροφόρησης
- ❖ Ομογενοποιητής ULTRA TURRAX T25 basic (IKA-Werke)
- ❖ Κυτταρομετρητής ροής FACS Calibur εξοπλισμένος με Argon laser 488 nm και κόκκινο laser 635 nm.

Σημείωση: Όλα τα υαλικά και πλαστικά είδη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αποστειρωμένα.

2.2 ΥΛΙΚΑ

- ❖ Αγαρόζη, Agarose (Invitrogen # 16500500)
- ❖ Χρωστική Orange G (DNA loading buffer)
- ❖ Διάλυμα λύσης (Tail Buffer) 1L
- ❖ Πρωτεΐνάση K, Proteinase K (10 mg/ml) (Roche #3115879)
- ❖ Ρυθμιστικό διάλυμα 10x TBE (Tris/Borate/EDTA)
- ❖ Tris-(hydroxymethyl)-methylamine, Tris base (Fisher Scientific #142829)
- ❖ Βορικό οξύ-Boric acid (Fisher Scientific #BP168-1)
- ❖ Αιθύλενο διαμινικό οξύ - EDTA (Applichm #A2937 1000)
- ❖ Βρωμιούχο αιθίδιο - EtBr (ethidium bromide) (Sigma, #E1510)
- ❖ H₂O PCR, Gibco distilled water DNase/RNase Free (Invitrogen #05686)
- ❖ Εκκινητές με συγκέντρωση 5 pmol/μL, Macrogen
- ❖ Taq πολυμεράση 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)
- ❖ Δεοξυριβονουκλεοτίδια – dNTPs (Invitrogen#18427-088 και Fermentas#R0181)

- ❖ Μονοφασικό διάλυμα φαινόλης και ισοθειοκυανικής γουανιδίνης -TRIzol Reagent Invitrogen (TR118)
- ❖ DEPC-H₂O (RNase free)
- ❖ Χλωροφόρμιο (Fisher scientific #1173671)
- ❖ Ισοπροπανόλη (AppliChem #DS-22,0005)
- ❖ Διάλυμα αλάτων (0.8M C₆H₅Na₃O₇·2H₂O και 1,2M NaCl)
- ❖ Ένζυμο: RQ1 and RNase-free DNase (Promega - M6101)
- ❖ RQ1 DNase 10x Reaction Buffer (Promega #0006112322)
- ❖ Σκόνη Φαινόλης (VWR chemicals #20599.297)
- ❖ Μίγμα φαινόλης/χλωροφορμίου (1:1) (vol/vol)
- ❖ Διάλυμα γλυκογόνου 10 μg/μL (Roche)
- ❖ Διάλυμα οξικού νατρίου 3M
- ❖ Ένζυμο αντίστροφης μεταγραφάσης, M-MLV RT (Promega #0000172807)
- ❖ M-MLV RT 5x buffer (Promega #0000201700)
- ❖ Oligo d(T)₁₈ , mRNA Primer # S1316S (Biolabs #0091408)
- ❖ Διμεθυλοσουλφοξείδιο (Dimethyl sulfoxide DMSO)
- ❖ Ξυλένιο
- ❖ Αιθανόλη 100%
- ❖ Αιθανόλη 96%
- ❖ Αιθανόλη 75%
- ❖ Αιθανόλη 50%
- ❖ Υδροχλωρικό οξύ
- ❖ DPX (Dibutyl phthalate), (Sigma, #80100)
- ❖ Milli Q
- ❖ PBS pH 7.4
- ❖ Αιματοξυλίνη
- ❖ Διάλυμα Scott's
- ❖ Διάλυμα Ηωσίνης
- ❖ Ξηρός πάγος
- ❖ Υγρό άζωτο

2.3 ΔΕΙΓΜΑΤΑ

2.3.1 Πειραματόζωα- μοντέλο της μπλεομυκίνης

Ως πειραματόζωα χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί και θηλυκοί C57BL/6 επίμυες, τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως στην εργαστηριακή πράξη, κυρίως επειδή πολλαπλασιάζονται επιτυχώς, ζουν για αρκετό χρονικό διάστημα και έχουν μικρή ευαισθησία στην ανάπτυξη όγκων. Η ανάπτυξη και διατήρηση των ποντικών πραγματοποιήθηκε στις ειδικές εγκαταστάσεις της μονάδας πειραματόζωων του Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Αλέξανδρος Φλέμινγκ», σύμφωνα με τους κανονισμούς της μονάδας. Στα πειραματόζωα χορηγήθηκε τροφή και ύδωρ *ad libitum*. Τοποθετήθηκαν σε διαφανείς κλωβούς με οροφή από μεταλλικό πλέγμα και παρέμειναν σε ειδικά εξοπλισμένο για φωτοπερίοδο χώρο, όπου εξασφαλιζόταν η εναλλαγή φωτός-σκοτούς με αυτόματο χρονοδιακόπτη (συνθήκες φωτοπεριόδου: 14 ώρες φως και 10 ώρες σκοτάδι) και όπου η θερμοκρασία περιβάλλοντος διατηρούνταν στους 22 ± 2 °C, χωρίς αλλαγές στην περιβαλλοντική υγρασία ($55 \pm 5\%$). Η περίοδος του φωτός άρχιζε και τελείωνε στο διάστημα από τις 6πμ ως τις 8μμ.

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.

Για την περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου του γονιδίου TPL2 στην παθογένεια της πνευμονικής ίνωσης εφαρμόστηκε το μοντέλο της μπλεομυκίνης (για 14 ημέρες) και ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία, στις πειραματικές ομάδες ελέγχου (wt) TPL2^{+/+} (D+) και TPL2^{-/-} (DD).

2.3.2. Πειραματικά ζωικά μοντέλα - Μοντέλο μεταμόσχευσης

Τα C57BL/6 ποντίκια ακτινοβολήθηκαν με θανατηφόρο δόση ακτινοβολίας 900 rad, ώστε να καταστραφεί ολοσχερώς το αιμοποιητικό τους σύστημα. Στη συνέχεια, μεταμοσχεύθηκαν ενδοφλέβια, μέσω της ουραίας φλέβας, 1×10^7 κύτταρα, τα οποία

απομονωθήκαν από το μυελό των οστών των αρσενικών C57BL/6 δοτών, προκειμένου να μπορεί να ιχνηλατηθεί η πορεία των στελεχιαίων κυττάρων. Συγκεκριμένα, οι δότες του μυελού των οστών θυσιάστηκαν και απομονώθηκαν τα μηριαία οστά και οι κνήμες τους, κάτω από στείρες συνθήκες. Τα κύτταρα του μυελού των οστών συλλέχθηκαν με έγχυση HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution 1X, Gibco) στα οστά και τα συσσωματώματα των κυττάρων (single cell suspension) εναιωρήθηκαν με τη βοήθεια σύριγγας. Ακολούθησε διήθηση των κυττάρων (70 μ m filter, BD Falcon, Cell Strainer, 70 μ m Nylon) και συλλογή τους μετά από φυγοκέντρηση (1800 rpm). Το ίζημα των κυττάρων που προέκυψε επαναιωρήθηκε σε 1ml HBSS/λήπτη και χορηγήθηκε. Προφυλακτικά χορηγήθηκε, μετά την ακτινοβολήση και μεταμόσχευση, αντιβιοτική θεραπεία με προσθήκη CIPROXIN (1%) στο πόσιμο νερό των πειραματοζώων για τέσσερις περίπου εβδομάδες, προκειμένου να περιοριστεί η θνησιμότητα κατά την περίοδο της παροδικής ουδετεροπενίας μέχρι την αιμοποιητική αποκατάσταση. Εφαρμόστηκε το μοντέλο της μπλεομυκίνης (για 14 ημέρες).

2.3.3. Πειραματικά ζωικά μοντέλα με γενετική απαλοιφή της TPL2 από μακροφάγα

Παράλληλα, για να εξεταστεί η λειτουργικότητα των ποντικών που φέρουν στοχευμένο δυνητικά απενεργοποιημένο *TPL2* γονίδιο, ποντικοί *TPL2^{FL/FL}* διασταυρώθηκαν με *LysMCre* διαγονιδιακούς ποντικούς, οι οποίοι εκφράζουν την Cre ανασυνδυάση σε εξειδικευμένα στα κύτταρα της μυελώδους σειράς. Η έκφραση της Cre, κατευθυνόμενη από τον υποκινητή της λυσοζύμης-M στους *LysMCre* ποντικούς, έχει περιγραφεί ότι οδηγεί σε υψηλό ποσοστό γενετικού ανασυνδυασμού σε πολυμορφοπύρρηνα και σε ώριμα μακροφάγα. Για την περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου της *TPL2* στην παθογένεια της πνευμονικής ίνωσης εφαρμόστηκε το μοντέλο της μπλεομυκίνης και ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία, όπως και παραπάνω στα *LysMCre*+/- *TPL2^{FL/FL}* ποντίκια.

2.3.4. Πειραματικά ζωικά μοντέλα με εξωγενής χορήγηση PGE2

Το μονοπάτι της PGE2 έχει ιδιαίτερη σημασία. Η προσταγλανδίνη E2 (PGE2) είναι ένας ενδογενής μεσολαβητής λιπιδίων με ευρεία αντι-ινωτική δράση, της οποίας η σύνθεση απορρυθμίζεται στην πνευμονική ίνωση. Για να εκτιμηθεί *in vivo* η σημασία της ενεργοποίησης Cox-2-PGE2 μέσω της TPL2, χορηγήθηκε εξωγενώς 16,16-

διμεθυλο PGE₂ (dmPGE₂), ένα σταθερό ανάλογο της ενδογενούς PGE₂, ταυτόχρονα με την BLM και, ή με φυσιολογικό ορό ως μάρτυρας σε TPL2^{-/-} και WT ποντίκια.

2.3.5. 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 με σύριγγα του 1 ml και βελόνα 26G (0,5-1 ml αίμα) και προστίθεται 10% του όγκου 5mM EDTA ως αντιπηκτικό. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 2000 g για 20 min στους 4 °C, και λαμβάνεται το υπερκείμενο (πλάσμα). Το πλάσμα αποθηκεύεται σε ειδικά σωληνάκια (0,5ml και siliconised erpendorf) στους -20°C για περαιτέρω μελέτη.

2.3.6. 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 10 min στις 1200 rpm στους 4°C, μεταφέρεται το υπερκείμενο υγρό σε siliconized erpendorf και αποθηκεύεται στους - 80°C για να χρησιμοποιηθούν στις μετρήσεις Bradford και Direct Red, που περιγράφονται παρακάτω. 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.

2.3.7. Συλλογή ιστού

Μετά την ευθανασία του ζώου, με χρήση ξηρού πάγου, γίνεται έγχυση 5-10 ml PBS στην δεξιά πλευρά της καρδιάς για τον καθαρισμό των οργάνων 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 περαιτέρω 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 σωληνάρια (5ml) με φορμαλίνη (4%) για 24 ώρες. Μετά, αντικαθίσταται 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 παραφιντοποιούνται σε ένα ειδικό μηχάνημα και στη συνέχεια ακολουθεί η σκίνωση με υγρή παραφίνη, που κάτω από τους 62°C στερεοποιείται. Έτσι, οι παραφιντοποιημένοι ιστοί βρίσκονται στις κασέτες, για την ιστολογική μελέτη.

2.3.8. Ιστολογία του πνεύμονα

Σε μικροτόμο παραφίνης γίνονται τομές 5-7 μm και προσκολλώνται σε αντικειμενοφόρες πλάκες. Οι τομές στεγνώνουν για 1-4 ώρες σε θερμοκρασία 37°C. Η αποπαραφίνωση γίνεται με εμβάπτιση σε διάλυμα ξυλένιου, δύο φορές για 10 min και σταδιακή ενυδάτωση με εμβάπτισεις σε διαδοχικά μειωμένες συγκεντρώσεις αιθανόλης (από 100% προς 50%). Ακολουθεί χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης. Οι χρωματισμένες τομές αφυδατώνονται με αυξανόμενες συγκεντρώσεις αιθανόλης, εμβάπτιζονται σε ξυλένιο, καλύπτονται με καλυπτρίδα και μονιμοποιούνται με DPX, που περιγράφονται παρακάτω.

2.4 ΜΕΘΟΔΟΙ

2.4.1 Μπλεομυκίνη και μοντέλο πνευμονικής ίνωσης

Με σκοπό να μελετήσουμε την έκφραση του γονιδίου TPL2 τη διάρκεια της πνευμονικής ίνωσης ακολουθήσαμε το μοντέλο της μπλεομυκίνης. Το σκεύασμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν υδροχλωρικό διάλυμα μπλεομυκίνης 0.08 U της εταιρίας Nippon Kayaku, Tokyo, Japan. Ο προσδιορισμός της χορηγούμενης δόσης μπλεομυκίνης, προκειμένου να προκληθεί πνευμονική ίνωση στους υπό εξέταση επίμυες, έγινε με βάση τα δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας. Σε μεγάλο αριθμό εργασιών, εφάρμοσαν το πειραματικό μοντέλο μπλεομυκίνης για την πρόκληση πνευμονικής βλάβης. Στην μία ομάδα (ομάδα ελέγχου) συμπεριλήφθησαν φυσιολογικά πειραματόζωα, στα οποία δεν έγινε ενδοτραχειακή (I.T.) έγχυση μπλεομυκίνης, αλλά έγινε χορήγηση φυσιολογικού ορού ενδοτραχειακά, ενώ σε μία δεύτερη ομάδα πειραματοζώων χορηγήθηκε ενδοτραχειακά μόνο μπλεομυκίνη. Μετά το πέρας των χειρισμών αυτών όλα τα πειραματόζωα τοποθετήθηκαν στα ατομικά κλουβιά τους, όπου παρέμειναν για 14 ημέρες, παρακολουθούμενα καθημερινά για τυχόν αλλαγή στη συμπεριφορά και τη δραστηριότητά τους.

Συγκεκριμένα, την ημέρα 0 χορηγείται 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 14^η ημέρα γίνεται λήψη βρογχοκυψελιδικού υγρού (BALF), αίματος και η συλλογή του ιστού για περεταίρω μελέτη.

2.4.2 Απομόνωση DNA

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος της φαινόλης βασίζεται στην ισχυρή πρωτεολυτική δράση της πρωτεΐνάσης K συνδυασμένης με την ικανότητα αποδιάταξης του ιονικού αντιδραστηρίου SDS (δωδεκυλοσουλφονικού νατρίου). Σύμφωνα με το βασικό πρωτόκολλο, στο τμήμα του ιστού προστίθεται διάλυμα πρωτεΐνάσης K και SDS, αφήνεται προς επώαση έως ότου το μεγαλύτερο ποσοστό της κυτταρικής πρωτεΐνης

να αποσυντεθεί. Κατόπιν, το δείγμα υφίσταται αποπρωτεϊνωση με την προσθήκη φαινόλης και εν συνεχεία ισοπροπανόλη για την εξαγωγή και καταβύθιση του DNA.

Μέθοδος

- ✚ Ονοματίζεται το ποντίκι.
- ✚ Κόβεται όχι περισσότερο από 5 mm ουράς και τοποθετείται σε σωληνάρια (erpendorf) 1,5ml.
- ✚ Προστίθενται 400 μ l διάλυμα λύσης, με 4 μ l πρωτεϊνάσης (proteinase) K σε κάθε σωληνάριο.
- ✚ Επωάζεται 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 προτεϊνάση K και καταψύχεται στους -20°C.
- ✚ Προστίθενται 400 μ l φαινόλη σε κάθε σωληνάριο.
- ✚ Αναδεύεται πολύ ισχυρά για 5 min.
- ✚ Φυγοκεντρείται για 10 min στις 13.000 rpm.
- ✚ Με ιδιαίτερη προσοχή μεταφέρονται 300-350 μ l από την πάνω φάση σε καθαρά σωληνάρια του 1,5ml.
- ✚ Προστίθεται ισοπροπανόλη σε ποσότητα ίση με 0.9 του όγκου της πάνω φάσης.
- ✚ Φυγοκεντρείται για 10 min στις 13.000 rpm στους 4°C, ώστε να γίνει η καταβύθιση του DNA.
- ✚ Απομακρύνεται το υπερκείμενο και στο ίζημα προστίθενται 500 μ l 70% αιθανόλης. Ακολουθεί φυγοκέντρηση, όπως παραπάνω και απόρριψη εκ νέου του υπερκείμενου.
- ✚ Αφήνεται σε ξηρό αέρα.
- ✚ Τέλος, επαναδιαλύεται το DNA σε σωληνάρια 1,5 ml που περιέχουν 50 μ l (ο όγκος επαναδιάλυσης εξαρτάται από την μάζα του DNA) ddH₂O, για 15 min.
- ✚ 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)
ddH ₂ O 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

2.4.3 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, 2^n 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:

1. *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.
2. *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.

3. *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 αλυσίδας DNA. Ο χρόνος επώασης στους 72°C ποικίλει ανάλογα με το μήκος του τμήματος στόχου που θέλουμε να ενισχύσουμε.
4. 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 (~5 min), έτσι ώστε να δοθεί χρόνος στην πολυμεράση για την ολοκλήρωση της προέκτασης όλων των προϊόντων.

Μέθοδος

- ✚ Το αρχικό υλικό για μία αντίδραση PCR είναι δείγμα DNA, που 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 1 μl (80 ng) του προτύπου DNA στο κατάλληλο σωλήνα.
- ✚ 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 erppendorf 1.5 mL, προστέθηκαν 5 μL του αντίστοιχου εκκινητή και 95 μL H₂O.
- ✚ Στη συνέχεια προστίθενται τα συστατικά με την ακόλουθη σειρά: αποστειρωμένο mqH₂O, 10x Buffer PCR, MgCl₂, dNTPs, εκκινητές και στο τέλος προστίθεται η Taq πολυμεράση. Ανακίνηση του διαλύματος και διανομή 19 μl σε κάθε σωλήνα. Ένα γενικό πρωτόκολλο εργασίας περιγράφεται στον πίνακα 2.1.

Πίνακας 2.1. Ενδεικτική σύσταση μίγματος αντίδρασης PCR.

Αντιδραστήριο	Όγκος
Εκμαγείο DNA	1 μ l
Taq πολυμεράση	0.4 μ l
10x buffer	2 μ l
dNTPs	2 μ l
MgCl ₂	1.2 μ l
Εκκινητής 1	1 μ l
Εκκινητής 2	1 μ l
dsH ₂ O	11.4 μ l
Συνολικός όγκος	20 μ l

✚ 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 (T_m) 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. Η θερμοκρασία 55°C είναι καλή για αρχή, όσον αφορά ένα τυπικό ολιγονουκλεοτιδικό εκκινητή 20 νουκλεοτιδικών 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 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

Ταq πολυμεράση

Το *Thermus aquaticus*, ένα θερμοφίλο βακτήριο, απομονώθηκε στο Yellowstone National Park και περιγράφηκε 20 χρόνια πριν την ανακάλυψη της Ταq πολυμεράσης. Η Ταq πολυμεράση είναι το πιο δημοφιλές ένζυμο για χρήση στην PCR. Η βέλτιστη θερμοκρασία για την ενζυμική δράση της Ταq 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. Οι εκκινητές είναι αυτοί που θα οδηγήσουν στην επιτυχία ή αποτυχία της αντίδρασης. 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 2.2. παρουσιάζονται οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 2.2. Αλληλουχίες των χρησιμοποιούμενων εκκινητών.

loxp3s	5'-GTT TTC ACC TGA CTG CTC CC-3
loxp3a	5'-AGC ATT TCC AGA CCA TCA CC-3'
M3Fb2	5'-ATG GCT TTG TGG GAT TGT TGT TCC-3'

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 50-200 μ M. Υψηλότερες συγκεντρώσεις μπορεί να προκαλέσουν την παραγωγή παραπροϊόντων από την πολυμεράση και πρέπει να αποφευχθούν. Η τελική συγκέντρωση που χρησιμοποιείται είναι 2.5mM.

Για 500 μ l	Gibco H ₂ O: 450 μ l
	dATP: 12.5 μ l
	dCTP: 12.5 μ l
	dGTP: 12.5 μ l
	dTTP: 12.5 μ l

10x PCR Buffer:

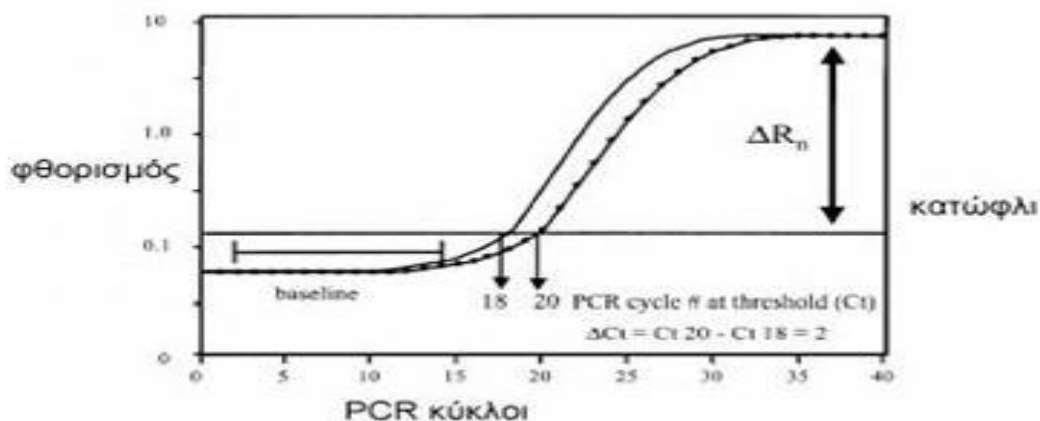
Για 5ml :	KCl 1M: 2.5ml
	1M Tris HCl pH 9.0: 0.5ml
	Gibco H ₂ O: 1.95ml
	Filter 0.2 μ m or autoclave
	1% Triton X-100: 5

2.4.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR)

Αρχή της Μεθόδου

Η real-time PCR βασίζεται στην επαναστατική μεθοδολογία της ποσοτικής PCR και πρωτοεμφανίστηκε το 1993 από τον Higuchi και τους συνεργάτες του. Η real-time PCR, απλά αναφέρεται στη μεγέθυνση DNA με PCR που ελέγχεται, ενώ συμβαίνει η μεγέθυνση. Το πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι καθορίζει με ακρίβεια το ποσό του αρχικού DNA στο δείγμα πριν τη μεγέθυνση με PCR. Πρόκειται για 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 real-time PCR μετράει τα προϊόντα PCR καθώς συσσωρεύονται ή μετράει σε πραγματικό χρόνο το ποσό των PCR προϊόντων σε σημείο όπου η αντίδραση βρίσκεται ακόμη στην εκθετική φάση χρησιμοποιώντας την τεχνολογία των φθορίζουσών χρωστικών. 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 (Σχήμα 2.1).



Σχήμα 2.1. Υποθετική γραφική παράσταση πολλαπλασιασμού σε πειράματα *real-time PCR*.

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.

Σήμα χρωστικής, το οποίο ανιχνεύεται πάνω από το κατώφλι θεωρείται πραγματικό και χρησιμοποιείται για το καθορισμό του κατώφλι κύκλου (C_t) για ένα δείγμα. Οι τιμές του C_t 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 C_t των διαφόρων δειγμάτων χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της σχετικής ποσότητας του κάθε δείγματος.

Στην υποθετική γραφική παράσταση του Σχήματος 2.1, η ενιαία γραμμή τέμνει το κατώφλι στον PCR κύκλο 18, ενώ η κηλιδωτή καμπύλη στον κύκλο 20, υπάρχει δηλαδή μία διαφορά 2 κύκλων μεταξύ αυτών των δύο δειγμάτων ή διαφορά $C_t = 2$. Εξαιτίας της εκθετικής φύσης της μεθόδου PCR, η τιμή C_t μετατρέπεται σε μία γραμμική μορφή του 2 ή σε τετραπλάσια διαφορά. Αυτός ο υπολογισμός χρησιμοποιείται κατά τη σχετική ποσοτική αναλυτική μέθοδο [83].

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 και χαρακτηριστικό για κάθε αλληλουχία. Η ικανότητα ελέγχου της προόδου του πολλαπλασιασμού του DNA σε πραγματικό χρόνο, η οποία επιτυγχάνεται κατά τη μεθοδολογία της real-time PCR, πραγματοποιείται με τη βοήθεια ειδικών χημικών αντιδράσεων και ανιχνευτών (probes). Σε γενικές γραμμές, χρησιμοποιούνται σημασμένοι ανιχνευτές διαφόρων τύπων, όπου ο καθένας έχει μοναδικά χαρακτηριστικά, αλλά η στρατηγική είναι απλή για όλους, δηλαδή πρέπει να προκαλέσουν μια αλλαγή κατά τον πολλαπλασιασμό του DNA. Σήμερα, η χρωστική που χρησιμοποιείται ευρέως είναι η SYBR® Green.

Ένα βασικό πλεονέκτημα της SYBR® Green είναι η ευαισθησία της σε παραπάνω από 10 αντίγραφα, επειδή η χρωστική αναφοράς προσδένεται σε οποιοδήποτε δίκλωνο DNA που υπάρχει στην αντίδραση, με αποτέλεσμα να ανιχνεύεται το προϊόν PCR σε προηγούμενους κύκλους και αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό στην περίπτωση των μεταγράφων χαμηλής αφθονίας (> 10 αντίγραφα). Από την άλλη, βασικό μειονέκτημα της χρωστικής αυτής είναι τα μη-ειδικά προϊόντα και mRNAs με υψηλή ταυτότητα αλληλουχίας που μπορεί να ανιχνεύονται λόγω της ιδιότητας δέσμευσης στο δίκλωνο DNA.

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 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 PCR είναι η επιλογή και η επικύρωση των ακολουθιών ολιγονουκλεοτιδίων εκκινήτων. 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. Ένα γενικό πρωτόκολλο εργασίας περιγράφεται στον πίνακα 2.3.

Πίνακας 2.3. Ενδεικτική σύσταση μίγματος αντίδρασης Real-time PCR.

Αντιδραστήριο	Όγκος
Εκμαγείο cDNA	1 μ l
Εκκινητής 1	1 μ l
Εκκινητής 2	1 μ l
dsH ₂ O	7 μ l
Eva Green	10 μ l
Συνολικός όγκος	20 μ l

Πίνακας 2.4. Αλληλουχίες των χρησιμοποιούμενων εκκινητών.

Γονίδιο	Εκκινητής	Αλληλουχία βάσεων
b2m	forward	5' - ATT ACC GGT CGA TGC AAC GAG T-3'
b2m	reverse	5' - CAG GTA TCT CTG ACC AGA GTC A-3'
Tp12	forward	5' - TTAGCCCAAGACATGAAGAC-3'
Tp12	reverse	5' - ACTCAGCAATGTTCTCATGC- 3'
Cox2	forward	5' -AAC CGC ATT GCC TCT GAA T- 3'
Cox2	reverse	5' -CAT GTT CCA GGA GGA TGG AG- 3'
Col1a1	forward	5' GCA CGG AAA CTC CAG CTG AT 3'
Col1a1	reverse	5' CAT CCC TGG ACA GCC TGGA CT 3'

2.4.5. 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%

- ✚ Ζυγίζονται 5g αγαρόζης, τοποθετούνται σε κωνική φιάλη των 500 mL και προστίθενται 250ml 1x TBE.
- ✚ Η φιάλη, το στόμιο της οποίας καλύπτεται με μεμβράνη στην οποία δημιουργούνται μικρές τρύπες, τοποθετείται σε θερμαινόμενο μαγνητικό αναδευτήρα ή σε μικροκύματα και την αφήνουμε μέχρι να λιώσει η αγαρόζη και να δημιουργηθεί ένα διαφανές διάλυμα.
- ✚ Αφήνεται το διάλυμα να κρυώσει μέχρι τους 60°C και προσθέτουμε 8μL βρωμιούχο αιθίδιο.

- ✚ 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.
- ✚ Τοποθετούμε την πλαστική χτένα 0.5-1.0mm πάνω από τον πλαστικό δίσκο, ώστε όταν προστεθεί το διάλυμα της αγαρόζης να σχηματιστούν πηγαδάκια.
- ✚ Το διάλυμα της αγαρόζης τοποθετείται προσεκτικά μέσα στο δίσκο ώστε να μην δημιουργούνται φουσαλίδες.
- ✚ Όταν η πηκτή είναι έτοιμη (χρειάζεται 55-60 min σε θερμοκρασία δωματίου), αφαιρούμε την χτένα και τοποθετούμε τον δίσκο μέσα στη συσκευή της ηλεκτροφόρησης.
- ✚ Προσθέτουμε ρυθμιστικό διάλυμα TBE ώστε να βυθιστεί το πήκτωμα κατά 1 mm περίπου.
- ✚ Αναμιγνύουμε τα δείγματα του DNA με το gel-loading buffer 20μl DNA με 4μl χρωστικής (Orange G: DNA- 1:5 αναλογία). 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.
- ✚ 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.
- ✚ Κλείνουμε το ρεύμα, βγάζουμε την πηκτή και το εξετάζουμε κάτω από U.V. φως στα 312 nm.
- ✚ 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:	20μl DNA
	4μl χρωστικής - Orange G

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.

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

Προσθήκη 0.25gr Orange G και καλή ανάμιξη

Μοιράζονται σε eppendorfs και διατηρούνται στους -20°C.

Βρωμιούχο αιθίδιο

10 mg/ml

2.4.6. Απομόνωση RNA από ιστούς πνευμόνων ποντικού

Μέθοδος

- ✚ Τα δείγματα των ιστών μεταφέρθηκαν από δοχείο υγρού αζώτου όπου βρίσκονταν σε σωληνάρια “BIJOUX”, κατάλληλα για χρήση με τον ομογενοποιητή.
- ✚ Μετά την μεταφορά, ομογενοποιήθηκαν με χρήση της συσκευής ομογενοποίησης σε 1 mL αντιδραστήριο TRIzol Reagent και αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.
- ✚ Στη συνέχεια, τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε αριθμημένα σωληνάρια 1.5 mL Eppendorf και φυγοκεντρήθηκαν σε επιτραπέζια φυγόκεντρο στα 12.000 g για 10 min στους 4°C. Το μίγμα διαχωρίστηκε σε τρεις φάσεις: μια χαμηλότερη, φαινόλο-χλωροφορμική 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.
- ✚ Προστέθηκε σε κάθε σωληνάριο 200 μ L χλωροφόρμιο στον απαγωγό. Τα σωληνάρια με τα δείγματα πωματίστηκαν και ακολούθησε ανάδευση με συσκευή Vortex για 15 sec.
- ✚ Ακολούθησε εκ νέου φυγοκέντρηση 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.
- ✚ Προστέθηκαν 0.25 mL ισοπροπανόλης και 0.25 mL διαλύματος αλάτων (κιτρικό νάτριο 0.8M και χλωριούχο νάτριο 1.2M) και τα δείγματα αφέθηκαν για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- ✚ Φυγοκεντρήθηκαν τα δείγματα στα 12.000 g για 8 min 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.
- ✚ Για πλύση του ιζήματος σε κάθε δείγμα προστέθηκε 1 mL αιθανόλη 75% και ακολούθησε βίαιη ανάδευση με Vortex.
- ✚ Τα παραπάνω στάδια φυγοκέντρησης και πλύσης επαναλήφθηκαν άλλη μια φορά.
- ✚ Τα δείγματα RNA αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

2.4.7. Κατεργασία καθαρισμού του απομονωμένου ολικού RNA

Μέθοδος

Σκοπός ήταν ο καθαρισμός του RNA από επιμολύνσεις DNA ώστε να πραγματοποιηθεί απομόνωση με υψηλή καθαρότητα.

- ✚ 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.
- ✚ Στη συνέχεια, στα δείγματα όπου το ίζημα ήταν μη ορατό (αραιό) προστέθηκαν 20 μ L Diethyl pyrocarbonate (DEPC-H₂O) (απενεργοποιεί τις RNAses στο H₂O), ενώ στα υπόλοιπα 100 μ L DEPC-H₂O και επωάστηκαν 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.
- ✚ Προσδιορίστηκε η συγκέντρωση και μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στο φασματοφωτόμετρο Nanodrop ND-1000, φασματοφωτόμετρο του εργαστηρίου.
- ✚ 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 μ L, ενώ παράλληλα οι ποσότητες του ενζύμου και του RQ1 DNase (RNAase free DNAase) 10X Reaction Buffer ήταν σταθερές στα 2 μ L. Η δεύτερη ήταν η ύπαρξη 10 μ g RNA στα δείγματα. Επομένως, στους υπολογισμούς αυξομειώθηκαν οι ποσότητες του RNA και του DEPC-H₂O. Τα περισσότερα δείγματα ικανοποιούσαν και τις δύο συνθήκες, ενώ σε κάποιες μεμονωμένες εξαιρέσεις χρησιμοποιήθηκε αναγκαστικά λιγότερη αρχική ποσότητα RNA.
- ✚ Ακολούθησε η προσθήκη των υπολογισμένων όγκων DEPC-H₂O, RNA σε νέα αντιστοίχως αριθμημένα σωληνάρια τύπου Eppendorf 1.5 mL και ακολούθησε η προσθήκη 2 μ L RQ1 DNase 10X Reaction Buffer και 2 μ L του ενζύμου. Όλη η εργασία πραγματοποιήθηκε στον πάγο, ενώ τα παλιά σωληνάρια με το

ακαθάριστο απομονωμένο RNA φυλάχθηκαν για μελλοντική χρήση στους -20°C .

- ✚ Τα δείγματα επωάστηκαν στους 37°C για 60 min 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.
- ✚ Φυγοκεντρήθηκαν 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
- ✚ Προστέθηκαν 200 μL χλωροφόρμιο στο κάθε δείγμα. Ακολούθησε έντονη ανάδευση με συσκευή Vortex για δέκα sec και φυγοκέντρωση σε επιτραπέζια φυγόκεντρο στα 12.000 g για δέκα min σε θερμοκρασία δωματίου.
- ✚ Συλλέχθηκαν οι υδατικές φάσεις (V') έως ορίου $V'_{\text{max}}=180$ μL σε νέα σωληνάρια τύπου Eppendorf των 0.5 mL και προστέθηκε στο καθένα από αυτά 2 μL γλυκογόνο, ως συμπαραγοντας 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 $2.5 \times$ του όγκου παγωμένη αιθανόλη 100%, συνοδευόμενα από καλή ανάμειξη των δειγμάτων με χρήση της συσκευής Vortex κάθε φορά.
- ✚ Ακολούθησε αποθήκευση δειγμάτων στους -20°C . Εναλλακτικά αποθηκεύονται στους -80°C για είκοσι min για άμεση χρήση.

2.4.8. Μετατροπή του RNA σε cDNA με χρήση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφή

Μέθοδος

- ✚ 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 .
- ✚ Τα δείγματα θερμάνθηκαν για πέντε min 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.

- ✚ Ακολούθησε ένα στιγμιαία φυγοκέντρωση σε επιτραπέζια φυγόκεντρο, ώστε να συλλεχθεί ο όγκος κάθε δείγματος στο κάτω μέρος των σωληνάρων.
- ✚ Προστέθηκαν κατά σειρά 4 μL διάλυμα αντίστροφης μεταγραφάσης M-MLV (Reverse Transcriptase Buffer 5x), 2 μL δεοξυνουκλεοτίδια (10mM) και τέλος 2 μL του ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης M-MLV (*Moloney Leukaemia Reverse Transcriptase-Promega*) RT του ρετροϊού *Moloney Leukemia Virus*. Ο συνολικός όγκος όλων των δειγμάτων με βάση και τις οδηγίες του πρωτοκόλλου αντίστροφης μεταγραφής της Promega ήταν 20 μL .
- ✚ Τα δείγματα επωάστηκαν για 60 min σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 42°C.
- ✚ Στο τέλος της αντίδρασης τα δείγματα επωάστηκαν για δέκα min σε θερμοκρασία 70°C.
- ✚ Μετά το πέρας της επώασης τα δείγματα τοποθετήθηκαν στον πάγο για δέκα min 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.

2.4.9 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 μετρήσεων της μηχανικής του αναπνευστικού.

Ένα βασικό σύστημα flexiVent περιλαμβάνει τα ακόλουθα:

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

Flexivent λογισμικό, το οποίο 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 συναρτήσει 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 300cm H₂O 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 την ελαστική 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 αντανakλά την διάχυση της ενέργειας στις κυψελίδες.

Ελαστικότητα ιστού (H): ελαστικότητα ιστού που αντανakλά 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 2.3: Σχηματική αναπαράσταση του μηχανικού αναπνευστήρα-Flexivent.

2.10. Καταμέτρηση βιώσιμων κυττάρων χρησιμοποιώντας αιματοκυτταρόμετρο

Μέθοδος

✚ Προετοιμασία αιμοκυτταρομέτρου

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

✚ Προετοιμασία αιωρήματος κυττάρων

Ανακινείται απαλά το errendorf 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 erpendorf, προστίθεται 10 μL 0,4% Trypan Blue (τελική συγκέντρωση 0,08%). Ανακατεύονται απαλά.

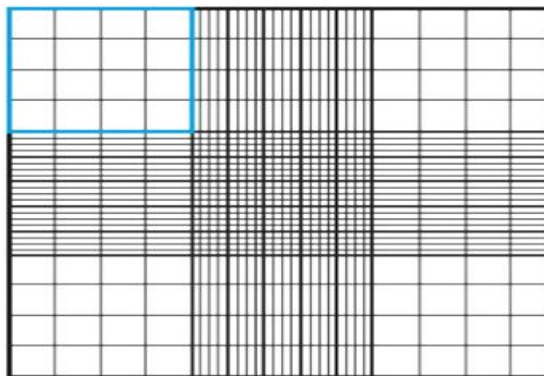
Καταμέτρηση

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 (Σχήμα 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 2.4.: Διάγραμμα αιματοκυτταρομέτρου.

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) και 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.

Ο τύπος υπολογισμού είναι ο εξής:

$$\frac{\text{κύτταρα}}{\text{mL}} = (N \times T \times A) \div (10^{-4} \times 25)$$

Όπου: N, ο αριθμός κυττάρων που μετρήθηκαν

T, ο αριθμός τετραγώνων που μετρήθηκαν

A, η αραιώση του δείγματος

10^{-4} , ο όγκος σε ml ενός τετραγώνου

25, ο συνολικός αριθμός τετραγώνων

2.4.11. Κυτταρομετρία ροής (FACS Staining)

Αρχή της μεθόδου

Ο φθορισμός ενεργοποιημένων ζωντανών κυττάρων (FACS - Fluorescence-activated cell sorting) 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 τον ανιχνευτή που έχουν συζευχθεί. Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα για το διαχωρισμό των παρακάτω πληθυσμών: $CD4^+$, $CD8^+$, $F4/80^{high}$ και $GR1^{high}$.

Μέθοδος

Χρώση επιφάνειας

- ✚ Αναστολή των κύτταρων σε παγωμένο PBS (50 μ l για κάθε δοκιμή = 1-2 x 10⁶ 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 1200 rpm, 5 min σε 4°C. Πλένονται μία φορά με 200 μ l PBS και φυγοκεντρούνται σε 1200 rpm, 5 min σε 4 °C.
- ✚ Ανάλυση FACS.

2.4.12. Προσδιορισμός Πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Αρχή της μεθόδου

Ο ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών σε ένα διάλυμα συνήθως 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 60 min και επηρεάζεται ελάχιστα ή 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 (0-25 μ g πρωτεΐνης).

Μέθοδος

- ✚ Σε μικροπλάκα δημιουργείται η πρότυπη καμπύλη απορρόφησης με εύρος αναφοράς 15,625-2000 μ g/ml. Το εύρος αυτό προκύπτει από το διάλυμα παρακαταθήκης μέσω διαδοχικών αραιώσεων πρότυπου διαλύματος BSA.
- ✚ Δείγμα ελέγχου: προστίθεται ένα σημείο ακόμη χωρίς την παρουσία πρωτεΐνης που θα χρησιμοποιηθεί ως τυφλό.
- ✚ Δείγματα: προστίθεται σε κάθε φρεάτιο 5 μ l δείγμα και 245 μ l αντιδραστήριο Bradford.

- ✚ Φωτομετρείται στα 595nm.

Παρασκευή διαλυμάτων της μεθόδου

Το διάλυμα Bradford είναι έτοιμο για χρήση.

2.4.13. Μέτρηση διαλυτού κολλαγόνου σε BALF

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος αυτή μετρά 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

- ✚ Προστίθεται 25-50 μ l δείγματα BALF σε 1 mL 0.5 M οξικού οξέος.
- ✚ Κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς με κολλαγόνο από Rat Tail. Το εύρος αραιώσεων είναι: κολλαγόνο 0-500 μ g/ ml σε 1 ml 0.5 M οξικού οξέος. Χρησιμοποιούνται 2 ml erpendorf.
- ✚ Στα δείγματα και στην πρότυπη προστίθεται 1 ml Direct Red 80 (120 μ g/ml). Ανακατεύονται καλά.
- ✚ Επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min.
- ✚ Αναδεύονται στο vortex για 3-4 min.
- ✚ Φυγοκεντρούνται σε 10000 rpm για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- ✚ 200 mL υπερκειμένου από τα δείγματα και τα πρότυπα μεταφέρονται σε πλάκα 96-φρεατίων.
- ✚ 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 hours.
- ✓ Διαλύεται η Direct Red 80 σε 0,5 M οξικό οξύ με τελική συγκέντρωση 120 µg/ml.

2.4.14 Χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης

Αρχή της Μεθόδου

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

Τα δείγματα που χρησιμοποιούνται στη μέθοδο αυτή είναι τομές παραφινολοιμμένων ιστών στο μικροτόμο. Τοποθετούνται σε ψυχρό μέρος και ακολουθεί κόψιμο τομών στα 5 µm. Στη συνέχεια τοποθετούνται 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:

Τομές των 5µm από μονιμοποιημένους ιστούς πάνω σε πλακάκια εμβαπτίζονται για 5 min σε τρία διαδοχικά διαλύματα ξυλενίου.

- ✚ Στη συνέχεια εμβαπτίζονται σε διαδοχικά διαλύματα 100% αιθανόλης, 96% αιθανόλης (δισ), 75% αιθανόλης και 50% αιθανόλης σε καθένα από τα οποία παραμένει για 2-3 min.
- ✚ Έπειτα σε απεσταγμένο νερό για 5 min.
- ✚ Τα πλακάκια με τις τομές παραμένουν σε διάλυμα αιματοξυλίνης για 2 min και ξεπλένονται με απεσταγμένο νερό μέχρι την απομάκρυνση της χρωστικής.
- ✚ Ακολουθεί εμβάπτιση σε διάλυμα 70% αιθανόλης με 37% HCl (acid alcohol) και ξέπλυμα με απεσταγμένο νερό.
- ✚ Επόμενο βήμα είναι η παραμονή σε διάλυμα Scott's για 3-5 min και ξέπλυμα με απεσταγμένο νερό.
- ✚ Μετά τα πλακάκια υφίστανται τη χρώση με ηωσίνη για 2-3 min, ανάλογα με την παλαιότητα της χρωστικής. Ξεπλένονται με απεσταγμένο νερό.
- ✚ Στην συνέχεια 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. Έτσι, ο ιστός αφυδατώνεται.
- ✚ Τέλος, ακολουθεί η κάλυψη των τομών με διάλυμα DPX (Dibutyl phthalate, BDH), που περιέχει ξυλένιο και παρατήρησή τους στο μικροσκόπιο.

2.4.15 Τρίχρωμη χρώση Masson (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 κόκκινο 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 λεπτά και επανυδατώνονται μέσω της 100% αλκοόλης, 70% αλκοόλης και 50% αλκοόλης.

- ✚ Γίνεται πλύση σε απεσταγμένο νερό.
- ✚ Τοποθετούνται σε διάλυμα Bouin για 60 min στους 56°C για τη βελτίωση της ποιότητας της χρώσης.
- ✚ Ξεπλένονται με τρεχούμενο νερό για 5-10 min για να αφαιρεθεί το κίτρινο χρώμα.
- ✚ Σταθεροποιείται στο διάλυμα αιματοξυλίνης σιδήρου Weigert για 10 λεπτά.
- ✚ Ξεπλένουμε πολύ καλά με τρεχούμενο νερό της βρύσης (5-10 min).
- ✚ Γίνεται πλύση με οξικό οξύ 1%
- ✚ Σταθεροποιείται στο Biebrich-scarlet-acid fuchsin διάλυμα για 5 min. Τα διαλύματα μπορούν να αποθηκευτούν για μελλοντική χρήση.
- ✚ Πλένουμε σε απεσταγμένο νερό αρκετές φορές.
- ✚ Γίνεται μεταφορά στο φωσφομολυβδικό-φωσφοβολφραμικό οξύ διάλυμα 1% για 5 min ή μέχρι το κολλαγόνο να μην είναι κόκκινο.
- ✚ Ξεπλένουμε σε απεσταγμένο νερό
- ✚ Μεταφέρονται σε ανιλίνη (μπλε διάλυμα) για 5 min.
- ✚ Ξεπλένονται για λίγο σε νερό της βρύσης.
- ✚ Γίνεται μεταφορά σε διάλυμα φωσφομολυβδικού-φωσφοβολφραμικό οξέος 1% για 3 min.
- ✚ Πλένονται σε απεσταγμένο νερό
- ✚ Αφήνονται στο διάλυμα οξικού οξέος 1% για 2 min.
- ✚ Πλένονται σε απεσταγμένο νερό.
- ✚ Αφυδατώνονται γρήγορα μέσα από 95% αιθυλική αλκοόλη, απόλυτη αιθυλική αλκοόλη και σε ξυλένιο.
- ✚ 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 και παραμένει σταθερό για ένα μήνα.

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.

Weigert's Iron Hematoxylin Solution**Stock Solution A:**

Hematoxylin	1 g
95% Alcohol	100 ml

Stock Solution B:

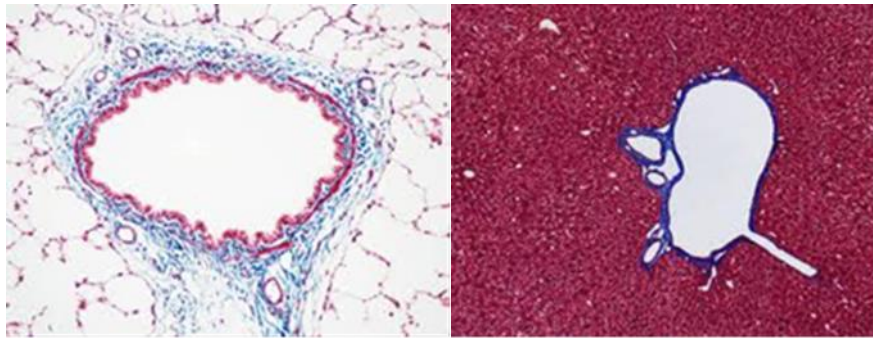
30% Ferric chloride in water	4 ml
Distilled water	95 ml
Hydrochloric acid, concentrated	1ml

Αναμιγνύω καλά τα διαλύματα A και B. .

Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Solution

1% Phosphomolybdic acid	25 ml
1% Phosphotungstic acid	25 ml
<i>Αυτό το διάλυμα παραμένει σταθερό για 3 μήνες.</i>	
Aniline Blue Solution	
Aniline blue	2.5 g
Acetic acid, glacial	2 ml
Distilled water	100 ml στο heat plate
<i>Αυτό το διάλυμα παραμένει σταθερό για 12 μήνες, προστατευμένο από το φως και την υγρασία.</i>	
1% Acetic Acid Solution	
Acetic acid, glacial	1 ml
Distilled water	99 ml

Αποτελέσματα	
Κολλαγόνο	μπλε
Πυρήνας	μαύρο
Μυϊκές ίνες, κυτταρόπλασμα, κερατίνη	κόκκινο

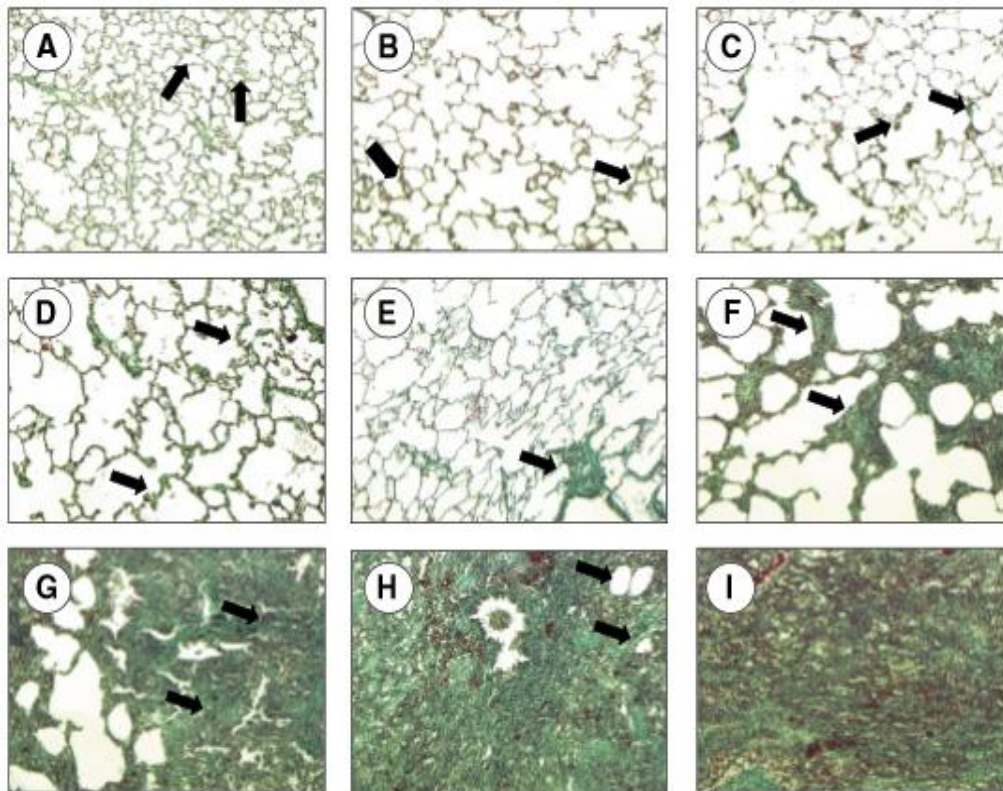


Σχήμα 2.5. Τριχρωματική χρωστική Masson του αεραγωγού αρουραίου και ήπατος.

2.4.16. 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 μεγέθυνσης 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 [84].



Σχήμα 2.6. Ορισμός της ίνωσης με τροποποιημένη κλίμακα. [84].

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 2.6. Χαρακτηρισμός της τροποποιημένης κλίμακας [84].

2.4.17. Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blot)

Αρχή της Μεθόδου

Η ανοσοαποτύπωση Western είναι μια τεχνική, η οποία χρησιμοποιείται για την ειδική ανίχνευση των πρωτεϊνών σε ένα πρωτεϊνικό εκχύλισμα ή ομογενοποίημα ιστού. Το πρώτο βήμα είναι η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, ώστε να γίνει ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό βάρος τους ή με βάση το φορτίο τους. Στη συνέχεια, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης, όπου με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει, γίνεται η ανίχνευσή της.

Ανάλυση πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες

Αρχή της μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες (Sodium Dodecyl Sulphate PolyAcrylamide Gel Elektrophoresis, SDS-PAGE) βασίζεται στην μετακίνηση των ηλεκτρικά φορτισμένων πρωτεϊνών του δείγματος στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου μετά την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου σταθερής τάσης και με βάση την ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα. Η τελευταία καθορίζεται από παράγοντες, όπως είναι το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών, η δευτεροταγής δομή τους καθώς και οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που υφίστανται. Κάθε πρωτεΐνη έχει διαφορετικό μοριακό βάρος και ισοηλεκτρικό σημείο.

Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται το απορρυπαντικό, θειικό δωδεκυλικό νάτριο (Sodyum Dodecyl Sulfate, SDS), ως ανιονικός αποδιατακτικός παράγοντας. Η χρήση του συγκεκριμένου παράγοντα έχει διπλό ρόλο. Αφενός συμβάλλει στην αποδιάταξη των πρωτεϊνικών αλυσίδων. Αφετέρου προσδίδει σε κάθε πρωτεΐνη ενιαίο αρνητικό ηλεκτρικό φορτίο, ανάλογο του μοριακού της βάρους, σχηματίζοντας ένα ηλεκτραρνητικό σύμπλοκο με την πρωτεΐνη, το οποίο μεταναστεύει μέσα από το πορώδες πήκτωμα. Πιο συγκεκριμένα, το SDS αποδιάσσει τις πρωτεΐνες με την πρόσδεσή του στην πολυπεπτιδική αλυσίδα σε αναλογία μάζας SDS προς πρωτεΐνη 1,4:1. Έτσι, όλες οι πρωτεΐνες ανεξάρτητα από την αλληλουχία τους φορτίζονται αρνητικά και όσο πιο μεγάλη είναι η πρωτεΐνη τόσο μεγαλύτερο είναι το αρνητικό φορτίο. Η επιπλέον χρήση αναγωγικών παραγόντων, όπως είναι το DTT (DiThioThreitol) ή η β-μερκαπτοαιθανόλη, έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών (S-S) των πρωτεϊνών. Η πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται με τη θέρμανση των πρωτεϊνικών δειγμάτων για 5 min στους 95°C, παρουσία των παραπάνω αποδιατακτικών παραγόντων.

Κάτω από αυτές τις συνθήκες οι πρωτεΐνες μεταναστεύουν με ταχύτητα ανάλογη του μοριακού τους βάρους. Το μοριακό βάρος μιας πρωτεΐνης υπολογίζεται σε σχέση με την ηλεκτροφορητική μετανάστευση πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους και η σχετική κινητικότητα μιας πρωτεΐνης είναι αντίστροφος ανάλογη του λογαρίθμου του μοριακού βάρους. Επομένως, οι μικρές σε μέγεθος πολυπεπτιδικές

αλυσίδες μετακινούνται εύκολα διά μέσου των πόρων του πηκτώματος, ενώ οι μεγαλύτερες μένουν στην κορυφή, κοντά στο σημείο εκκίνησης. Πολυπεπτιδικές αλυσίδες ενδιάμεσου μεγέθους μετακινούνται μέσα στο πήκτωμα με διαφορετικές ταχύτητες. Έτσι, ο διαχωρισμός πρωτεϊνών σε πολυακρυλαμίδη χρησιμοποιείται για ποσοτική και ποιοτική ανάλυση ενός διαλύματος πρωτεϊνών καθώς και για τον προσδιορισμό μοριακού βάρους μιας πρωτεΐνης.

Η πυκνότητα του πηκτώματος εξαρτάται από το μέγεθος των πρωτεϊνών που πρόκειται να διαχωριστούν

Ηλεκτροφορητική μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανοσοαποτύπωση των πρωτεϊνών

Αρχή της μεθόδου

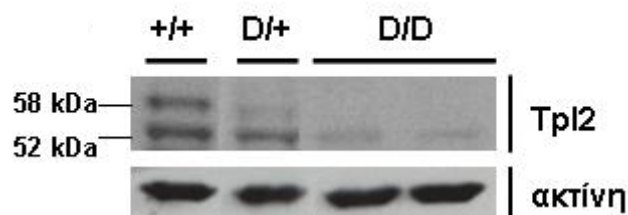
Οι πρωτεΐνες από το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος. Η ανοσοαποτύπωση είναι μέθοδος που στηρίζεται στη δημιουργία του συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος. Καθώς οι πρωτεΐνες μεταφέρονται στην μεμβράνη, δεσμεύονται μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, διατηρώντας τις αντιγονικές τους ιδιότητες κι έτσι διευκολύνεται η αναγνώρισή τους από τα αντισώματα. Έτσι, με την προσθήκη ειδικών πρωτοταγών αντισωμάτων για συγκεκριμένη πρωτεΐνη, μπορεί να ανιχνευθεί η πρωτεΐνη αυτή. Η μεμβράνη επωάζεται με ένα δευτεροταγές αντίσωμα, το οποίο αναγνωρίζει το πρώτο αντίσωμα. Στη συνέχεια με τη χρήση του παράγοντα ECL (H_2O_2 και Luminal) και λόγω του φαινομένου της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας ανιχνεύεται το εκπεμπόμενο σήμα στο σημείο που είναι εντοπισμένη η πρωτεΐνη που έχει στοχεύσει το πρωτοταγές αντίσωμα σε φωτογραφικό φιλμ. Ο χρόνος έκθεσης του φιλμ εξαρτάται από την ένταση και την ποιότητα του σήματος.

ΜΕΘΟΔΟΣ

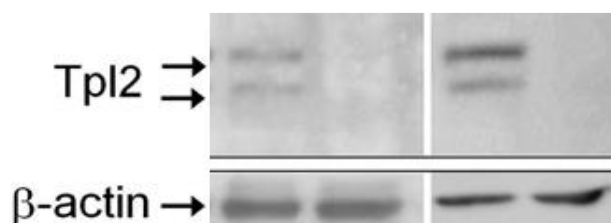
Το κυτταρικό εκχύλισμα συλλέχθηκε σε διάλυμα λύσης και 80 μ g συνολικής πρωτεΐνης αναλύθηκαν σε 8% πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE). Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν ηλεκτρικά σε φύλλο νιτροκυτταρίνης. Το φύλλο νιτροκυτταρίνης επωάστηκε σε διάλυμα PBS, 3% BSA,

0,1% Tween 20 και κατόπιν σε διάλυμα PBS, 3% BSA, 0,1% Tween 20 που περιείχε το επιθυμητό αντίσωμα. Μετά από τρεις πλύσεις σε διάλυμα πλύσης (PBS-0,1% Tween 20) ακολούθησε επώαση με το δεύτερο αντίσωμα (συνδεδεμένο με υπεροξειδάση) και τρεις πλύσεις. Το προϊόν ανιχνεύθηκε με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας (Chemiluminescence).

Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα: αντι-TPL2 πολυκλωνικά από κουνέλι (M20, Santa Cruz) και αντι-actin πολυκλωνικό (Santa Cruz).



BLM		Saline	
WT	D/D	WT	D/D



Σχήμα 2.7. *Western blot με πολυκλωνικό αντίσωμα αντι-Tpl2 σε εκλυόμενο πνευμονικό ιστό.*

2.4.18. Φασματομετρία μάζας

Η φασματομετρία μαζών (MS) χρησιμοποιείται ως ανιχνευτής για τεχνικές διαχωρισμού, όπως η Αέρια Χρωματογραφία (gas chromatography, GC), η υγρή χρωματογραφία (liquid chromatography, LC) ή η capillary ηλεκτροφόρηση, λόγω της μεγάλης ευαισθησίας και ικανότητάς της να αναγνωρίζει χημικές ενώσεις. Σε αυτό το συνδυασμό περιλαμβάνονται συνήθως και τεχνικές ιονισμού. Επίσης, χρησιμοποιείται ο συνδυασμός δύο ή περισσότερων ίδιων σταδίων ανάλυσης μαζών.

Τα δείγματα διαλύονται σε κατάλληλο διαλύτη και το διάλυμα εισάγεται στο φασματογράφο μαζών με μια κατάλληλη αντλία [π.χ. υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC)]. Το υγρό ψεκάζεται ώστε να φτιαχτούν σταγονίδια, τα οποία

περνώντας από μια σειρά διαδικασιών, θα αφαιρέσουν το διαλύτη και θα μείνουν στερεά σωματίδια (δείγμα) που θα ιονιστούν.

Η φασματομετρία μαζών είναι μια ισχυρή μέθοδος ανάλυσης που χρησιμοποιείται για τον γρήγορο προσδιορισμό άγνωστων συστατικών, τον ποσοτικό προσδιορισμό γνωστών συστατικών σε μοριακό επίπεδο και τον καθορισμό δομής και χημικών ιδιοτήτων μορίων. Η ανίχνευση των συστατικών επιτυγχάνεται με πολύ μικρές ποσότητες (10-12g, 10-15 moles συστατικού μάζας 1000 Daltons). Αυτό σημαίνει ότι μπορούν να προσδιοριστούν συστατικά με πολύ μικρές συγκεντρώσεις σε σύνθετα μίγματα.

Η μέθοδος προτιμάται και για το χαρακτηρισμό τροποποιήσεων στη δευτεροταγή δομή στη φύση και για πρωτεΐνες που έχουν ανασυνδυαστεί. Χρησιμοποιείται επίσης και για εξόρυξη πληροφοριών σε σχέση με την ακολουθία σε μελέτες πρωτεομάτων και σε συνδυασμό με άλλες τεχνικές μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μελέτες σχετικά με το δίπλωμα μιας πρωτεΐνης ή την τεταρτοταγή δομή της. Σε μια κλασσική πρωτεομική μελέτη, ένα σύνολο πρωτεϊνών απομονώνονται (π.χ., με ανοσοκατακρήμνιση) και ακολουθεί ένα βήμα διαχωρισμού (π.χ., με ηλεκτροφόρηση πηκτωμάτων μιας ή δύο 34 διαστάσεων). Σε αυτή την περίπτωση η φασματομετρία μαζών είναι η πιο αποτελεσματική μέθοδος για αναγνώριση όλων αυτών των κηλίδων.

Το σημαντικό αυτής της μεθόδου είναι ο πολύ μικρός χρόνος που απαιτείται σε σχέση με άλλες μεθόδους. Υπάρχουν, όμως, και περιορισμοί στις μελέτες που σχετίζονται με την ποιότητα προετοιμασίας της πρωτεΐνης και το βαθμό διαχωρισμού πριν τη φασματομετρία μαζών.

Η χρήση των δεδομένων από φασματομετρία μαζών έχουν πάρα πολλές εφαρμογές. Έχουν φτιαχτεί ειδικές βιβλιοθήκες που περιέχουν όλες αυτές τις πληροφορίες, οι οποίες είναι ιδιαίτερα εύχρηστες. Ακριβείς μετρήσεις μάζας μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να ταιριάξουν εμπειρικούς τύπους. Η γενετική ταυτότητα των θραυσμάτων (συγκεκριμένη για κάθε συστατικό) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό δειγμάτων συγκρίνοντας με βάσεις δεδομένων θραυσμάτων. Η σχετική αφθονία ισοτόπων δίνει πληροφορίες σχετικά με τα στοιχεία που φτιάχνουν ένα συστατικό.

Η φασματομετρία μαζών έχει εφαρμοστεί ευρέως για τον ποσοτικό προσδιορισμό ενός ή περισσότερων συστατικών σύνθετων οργανικών συστημάτων, σε μελέτες περιβαλλοντικών προβλημάτων, καθώς επίσης και σε βιομηχανίες φαρμάκων και πετρελαίου.

2.4.19. Στατιστική ανάλυση

Όλα τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσος όρος $\pm$ τυπικό σφάλμα των μέσων όρων (SE). Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ δύο ομάδων προσδιορίστηκαν με το Student's t-test. Επεξεργάστηκαν με γενικό γραμμικό μοντέλο ανάλυσης της διακύμανσης (General Linear Model, ANOVA), ακολουθούμενο από πολλαπλές συγκρίσεις των μέσων όρων ανά ζεύγη με τη δοκιμασία Tukey, για τον εντοπισμό στατιστικά σημαντικών διαφορών, με χρήση του λογισμικού Minitab 16. Τιμές $p < 0.05$ θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Έκφραση του γονιδίου TPL2 στους ασθενείς με IPPS

Στην παράλληλη μελέτη του εργαστηρίου, η έκφραση του γονιδίου TPL2 βρέθηκε μειωμένη στους πνεύμονες των ασθενών με IIP υποδεικνύοντας ένα ρόλο της στην παθογένεια της πνευμονικής φλεγμονής και ίνωσης. Οι IIPs είναι μια ετερογενής ομάδα ασθενειών που αποτελείται από επτά διαφορετικές κλινικά και παθολογικά χαρακτηριστικά. Η IPF είναι η πιο συνηθισμένη IIP, έχοντας την ίδια χειρότερη πρόγνωση με την NSIP, αφού οι ασθενείς δεν ανταποκρίνονται στα κορτικοστεροειδή. Από την άλλη πλευρά, η COP έχει μια ευνοϊκότερη πορεία και ανταπόκριση στη θεραπεία.

Το γονίδιο TPL2 βρέθηκε να είναι σταθερά μειωμένο σε ασθενείς με IPP και NSIP, UIP σε σύγκριση με υγιείς, υποδεικνύοντας ένα ρόλο για την κινάση TPL2 στην παθογένεια της νόσου. Επιπλέον, τα διακριτά προφίλ έκφρασης της TPL2 σε διάφορους τύπους IIPs μπορεί να εξηγούν διαφορές στην εξέλιξη της νόσου και στην ανταπόκριση της στη θεραπεία. Δοκιμάζοντας διάφορα μόρια στόχους μέσα σε 15 διαφορετικές βάσεις δεδομένων Gene Expression Omnibus (GEO) και EMBL-EBI Array Express διαπιστώσαμε ότι η έκφραση της MAP3K8 / TPL2 μειώθηκε σημαντικά κατά την IPF, NSIP και Σκληρόδερμα. Πιο συγκεκριμένα, η MAP3K8/TPL2 βρέθηκε σημαντικά μειωμένη στην ανάλυση της GSE24206 ολόκληρης της βιοψίας πνεύμονα από υγιείς δότες (n = 6), ασθενείς με ελεγχόμενη πρώιμη (n = 9) και προχωρημένη (n = 9) ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση (IPF). Ομοίως, διαπιστώθηκε σημαντικά μειωμένη έκφραση στην ανάλυση GSE32539 για ιδιοπαθή διάμεση πνευμονία (IIPs), όπου έλεγχθηκαν 50 υγιείς δότες (δείγματα ελέγχου) σε 136 ασθενείς με δείγματα IIP (119 IPP and 17 NSIP). Επιπροσθέτως, η MAP3K8/TPL2 βρέθηκε σταθερά μειωμένη σε:

- ανάλυση GSE2052 των ανοιχτών βιοψιών πνεύμονα από 11 υγιή δείγματα ελέγχου και 13 ιστούς ασθενών IPF,
- ανάλυση GSE15197 από 8 ασθενείς με παθολογική διάγνωση πνευμονικής υπέρτασης δευτερογενώς σε ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση σε σύγκριση με 13 υγιείς μάρτυρες,
- ανάλυση GSE35145 από 4 ασθενείς με IPF και 4 υγιείς μάρτυρες,

-ανάλυση GSE40839 ανοιχτών βιοψιών πνεύμονα από 10 υγιείς μάρτυρες και 8 ασθενών με διάμεση πνευμονοπάθεια που συσχετίζεται με συστηματική σκλήρυνση (ινωτική μη ειδική διάμεση πνευμονία σε βιοψία) μαζί με 3 ασθενείς με συνηθισμένη διάμεση πνευμονία (IPF / UIP) και

-ανάλυση GSE47460 των χρόνιων πνευμονικών παθήσεων για τη δοκιμή του Consortium Research Lung Genomics Research 17 υγιή δείγματα ελέγχου σε σύγκριση με ολόκληρα κατεψυγμένα δείγματα πνεύμονα 38 ασθενών με ενδιάμεση πνευμονική νόσο (ILD).

Τέλος, η MAP3K8/TPL2 βρέθηκε ελαφρώς μειωμένη στην ανάλυση GSE5774 των 12 δειγμάτων με Familial idiopathic Interstitial Pneumonia - UIP σε σύγκριση με 18 δείγματα ελέγχου υγιούς πνευμονικού ιστού και στην ανάλυση GSE35309 των δειγμάτων πνευμονικού ιστού από 4 ασθενείς με IPF και την αντιστοίχιση υγιούς γειτονικού ιστού ως μάρτυρα.

Για να αναλύσουμε τον πιθανό ρόλο του TPL2 στην πνευμονική φλεγμονή και την ίνωση, χρησιμοποιήσαμε το ζωικό μοντέλο της BLM, μια πειραματική προσέγγιση της ανθρώπινης ασθένειας.

3.2 Εφαρμογή του μοντέλου της μπλεομυκίνης σε C57BL/6 (wt) και TPL2^{-/-} ποντίκια

Με σκοπό τη μελέτη του ρόλου του γονιδίου TPL2 στην παθογένεια της πνευμονικής ίνωσης, εφαρμόστηκε το μοντέλο της μπλεομυκίνης σε επιμύες C57BL/6 (C57 black 6) και σε TPL2^{-/-}. Η μπλεομυκίνη χορηγήθηκε ενδοτραχειακά, όπως περιγράφεται σε προηγούμενο κεφάλαιο. Καθορίστηκε, ως ημέρα μηδέν (0), η ημέρα εισαγωγής της μπλεομυκίνης και ως τελική ημέρα του πειράματος η 14^η ημέρα, στην οποία τα ζώα θυσιάζονται.

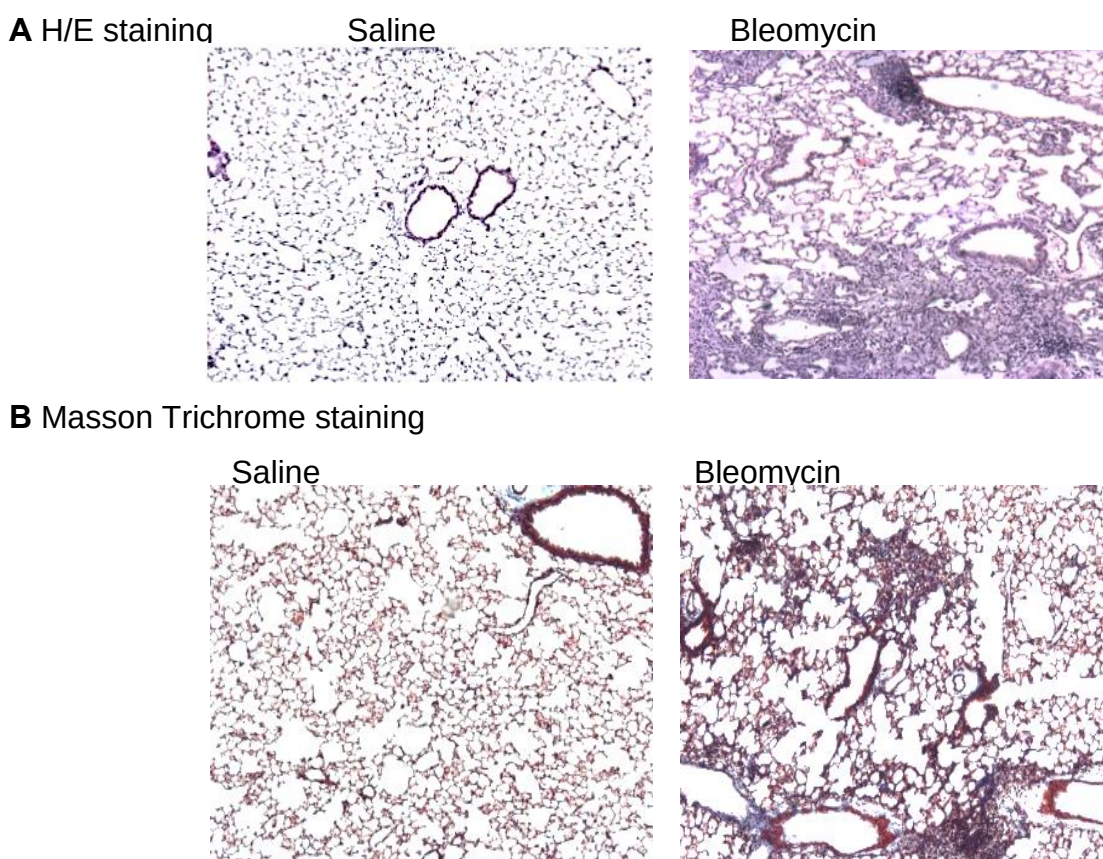
Για την αξιολόγηση της ίνωσης χρησιμοποιούνται αρκετές κοινές μέθοδοι. Οι πιο σημαντικές είναι: η ιστολογική ανάλυση των πνευμονικών ιστών, σύμφωνα με το σύστημα βαθμολόγησης Ashcroft (Ashcroft score), ο ποσοτικός προσδιορισμός του κολλαγόνου και των πρωτεϊνών από το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BALF) και ο συνολικός αριθμός των κυττάρων του BALF.

Πρόσθετες παράμετροι, όπως το βάρος κάθε ζώου και ο χρόνος επιβίωσης του 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 PCR (Real -Time PCR).

3.2.1 Εφαρμογή του μοντέλου της μπλεομυκίνης σε C57BL/6 (Wt) ποντίκια

Το πείραμα διενεργήθηκε σε ποντίκια αγρίου τύπου (C57BL/6), ηλικίας 10-12 εβδομάδων. Κάποια χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου, στα οποία χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός (saline) και τα υπόλοιπα χρησιμοποιήθηκαν ως πειραματική ομάδα, στα οποία χορηγήθηκε μπλεομυκίνη. Τα ζώα θυσιάστηκαν την 14^η ημέρα και πραγματοποιήθηκε ιστολογική παρατήρηση των πνευμονικών ιστών μετά από ειδική χρώση (χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης και τριχρωματική χρώση Masson), όπως παρουσιάζεται παρακάτω.



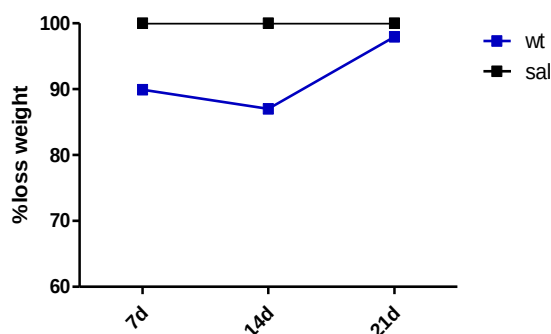
Σχήμα 3.1.A. Φωτογραφίες από τομές πνεύμονα μετά από χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης (x10 μεγέθυνση), **B.** Φωτογραφίες από τομές πνεύμονα μετά από τριχρωματική χρώση Masson (x10 μεγέθυνση).

Στο σχήμα 3.1.A παρουσιάζονται τομές παραφινोποιημένων πνευμονικών ιστών κατόπιν χρώσης αιματοξυλίνης-ηωσίνης. Λόγω της αιματοξυλίνης οι πυρήνες και τα ριβοσώματα βάφονται με σκούρο μωβ χρώμα, ενώ οι υπόλοιπες δομές του κυτταροπλάσματος χρωματίζονται κόκκινες από την ηωσίνη.

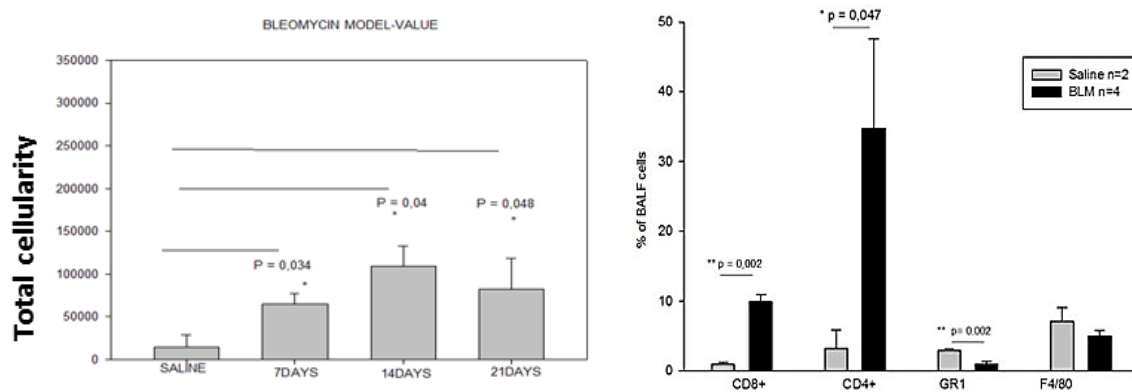
Λόγω της χρώσης αυτής, καθίσταται εφικτός ο διαχωρισμός φυσιολογικού πνευμονικού ιστού από έναν ινωτικό ιστό (σχήμα 3.1.A). Στο φυσιολογικό πνευμονικό ιστό παρατηρούνται οι βρόγχοι, το κυψελιδικό επιθήλιο και τα κυψελιδικά διαφράγματα, ενώ στον μη φυσιολογικό ινωτικό ιστό παρατηρείται εναπόθεση κολλαγόνου στο ενδιάμεσο κυψελιδικό χώρο, πάχυνση των κυψελιδικών διαφραγμάτων και πλήρης απόφραξη τους από ινωτικές μάζες, που έχουν ως αποτέλεσμα την αλλοίωση της αρχιτεκτονικής δομής του πνεύμονα.

Στο σχήμα 3.1.B απεικονίζονται τομές παραφινοποιημένων 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 ροζ. Έτσι, σε ινωτικό ιστό που φαίνεται στο σχήμα 3.1.B δεξιά με βάση τα χαρακτηριστικά της δομής του, που περιγράφηκαν παραπάνω, εμφανίζονται έντονα τα τρία διαφορετικά χρώματα και κυρίως το μπλε λόγω του κολλαγόνου. Στο σχήμα 3.1.B 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 3.2. παρακάτω, παρουσιάζεται το ποσοστό απώλειας βάρους των ζώων, στα οποία έχει γίνει έγχυση μπλεομυκίνης συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, στην οποία χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός (saline). Στην ομάδα ελέγχου δεν σημειώνεται απώλεια βάρους και φαίνεται φυσιολογική η ανάπτυξη τους· αντίθετα, στην πειραματική ομάδα σημειώνεται περίπου 10% απώλεια βάρους.



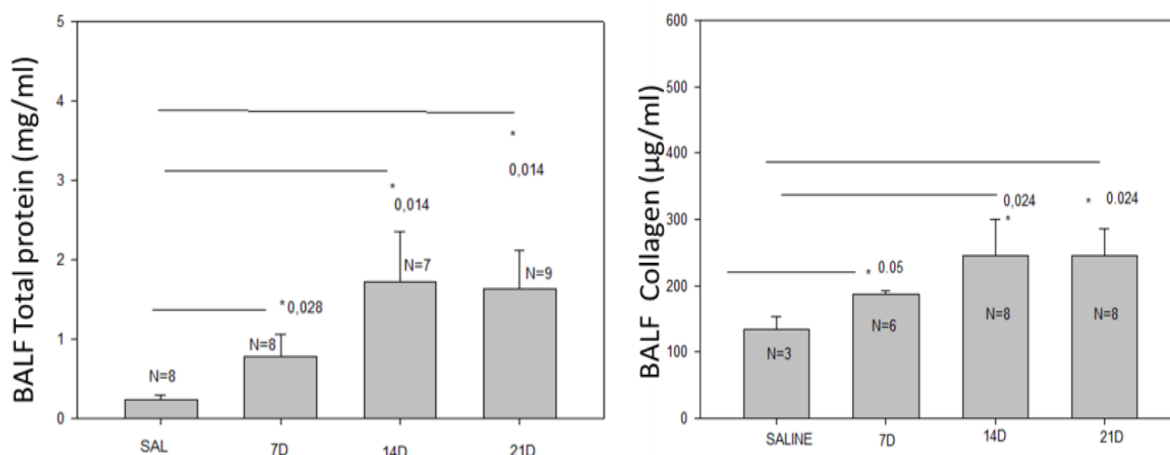
Σχήμα 3.2. Ποσοστό απώλειας βάρους την 14^η ημέρα μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης (BLM) ή φυσιολογικού ορού (saline) της πειραματικής ομάδας και της ομάδας ελέγχου (μαύρο) αντίστοιχα.



Σχήμα 3.3. Μέτρηση κυττάρων στο BALF σε συγκεκριμένες ημέρες και διαφοροποίηση των κυτταρικών πληθυσμών που απαντώνται στο BALF την 14^η ημέρα (FACs) μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης.

Στο σχήμα 3.3. 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

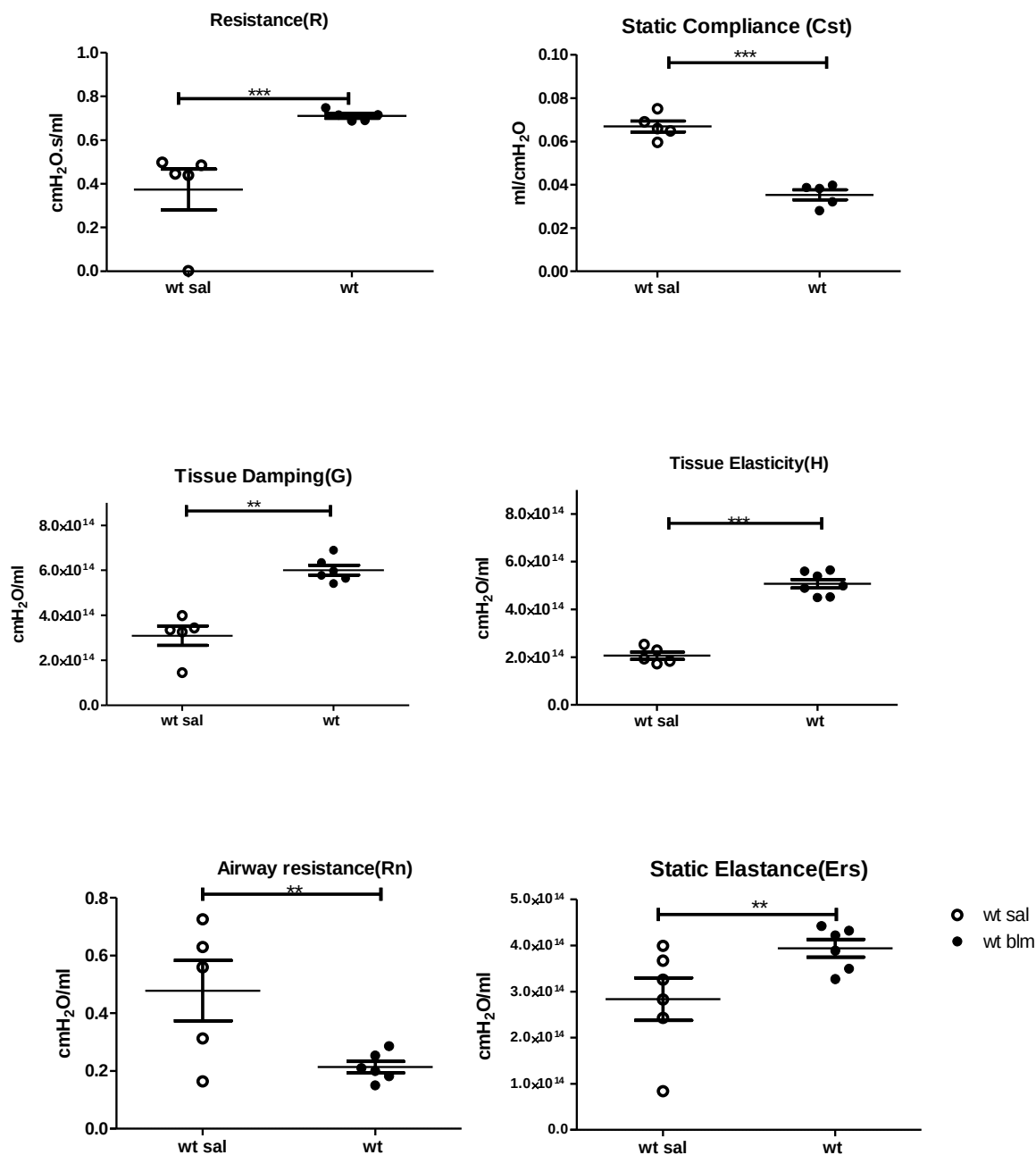
υγρό πλύσης (BALF) την 14η ημέρα, μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης εντοπίζονται σε μεγαλύτερο ποσοστό τα CD8⁺ CD4⁺ και μειωμένα ποσοστά μακροφάγων (F4/80) και των ουδετερόφιλων (GR1).



Σχήμα 3.4.A. Ποσοτικός προσδιορισμός συνολικής πρωτεΐνης στο βρογχοκυψελιδικό υγρό πλύσης (BALF), **B.** 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. Παρατηρήθηκε υψηλή ποσότητα (σχήμα 3.4. A) συνολικής πρωτεΐνης στην ομάδα των ζώων που έχει χορηγηθεί μπλεομυκίνη σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (χρήση saline). Τα αποτελέσματα αυτά συσχετίζονται με την ποσότητα του διαλυτού κολλαγόνου, όπως φαίνεται στο σχήμα 3.4.B. Η εναπόθεση κολλαγόνου από τους μυοϊνοβλάστες αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό της παθογένειας της πνευμονικής ίνωσης.

Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζονται οι μετρήσεις των διάφορων μηχανικών παραγόντων που έχουν περιγραφεί νωρίτερα σε φυσιολογικών ιστούς (ομάδα ελέγχου) και ιστούς με ίνωση, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν στο μηχάνημα flexivent (Κεφάλαιο 2-Υλικά και Μέθοδοι).



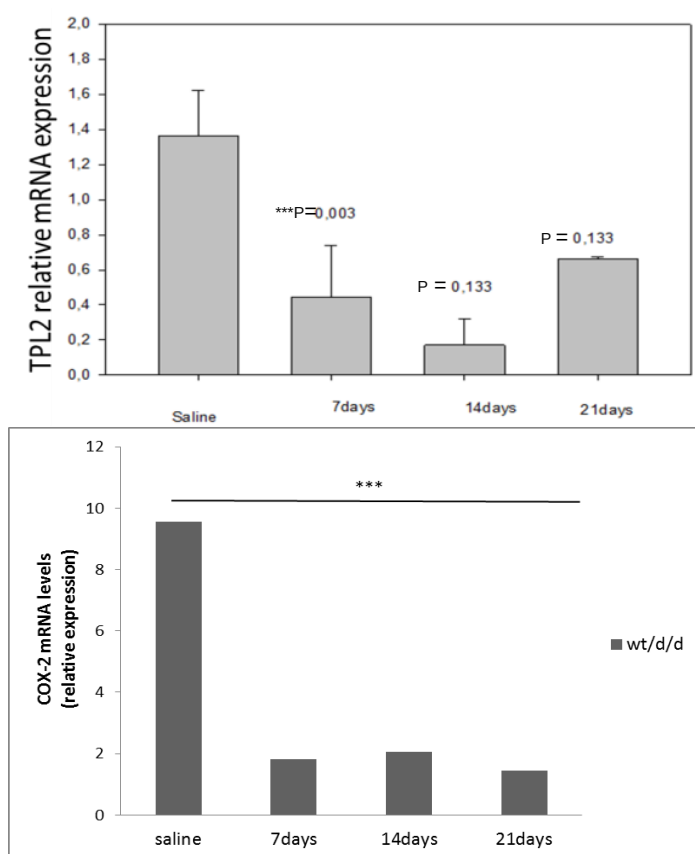
Σχήμα 3.5: Μέτρηση μηχανικών παραγόντων στα δείγματα μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης τη 14^η ημέρα.

Το σχήμα 3.5. παρουσιάζει τις μετρήσεις των μηχανικών παραγόντων φυσιολογικών ιστών (ομάδα ελέγχου) και ιστών με ίνωση, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν στο μηχάνημα flexivent. Συγκεκριμένα, 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). Η απόσβεση ιστού (G) είναι παράμετρος της αντίστασης του ιστού που αντανάκλα την διάχυση της ενέργειας στις κυψελίδες και η ελαστικότητα ιστού (H) αντανάκλα την εξοικονόμηση ενέργειας στις κυψελίδες.

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), 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 του γονιδίου TPL2 σε δείγματα cDNA (50 ng/μl) από ιστούς πνεύμονα με την μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων, η οποία έγινε με βάση τη συγκριτική μέθοδο Ct (ή ΔCt), έδειξε πως 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).



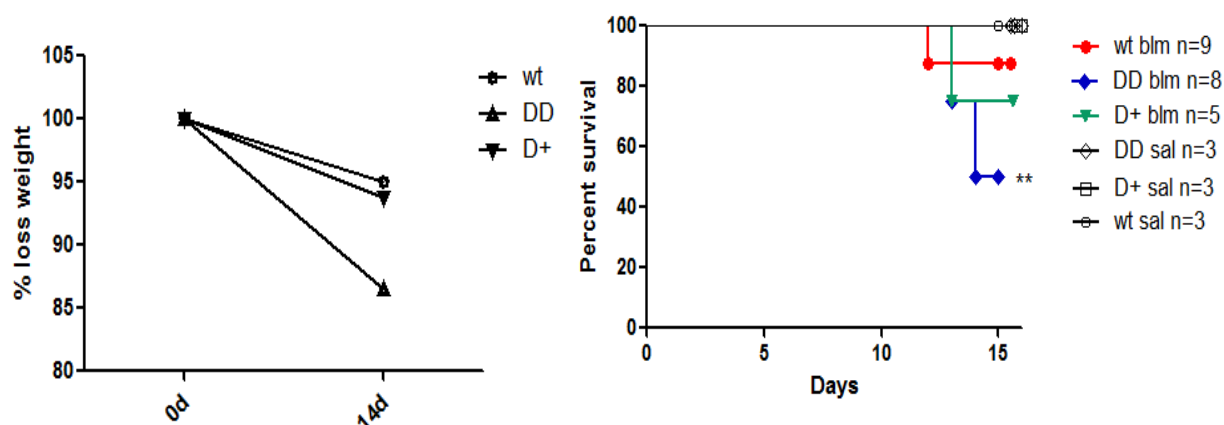
Σχήμα 3.6. Ποσοτικοποίηση έκφρασης του γονιδίου *TPL2*.

Στο σχήμα 3.6. η έκφραση του γονιδίου *TPL2* φαίνεται να μειώνεται στα ποντίκια που έχει γίνει έγχυση μπλεομυκίνης συγκριτικά με τα ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε saline και η έκφραση του γονιδίου *TPL2* να μην μεταβάλλεται στις δυο ομάδες.

3.2.2 Εφαρμογή του μοντέλου της μπλεομυκίνης σε ποντίκια.

Για την περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου του γονιδίου *TPL2* στην παθογένεια της πνευμονικής ίνωσης εφαρμόστηκε το μοντέλο της μπλεομυκίνης και ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία, όπως και παραπάνω (παράγραφο 5.2) στα *TPL2^{+/+}* (Wt) ποντίκια. Το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές και με επαρκή αριθμό ποντικίων, όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα.

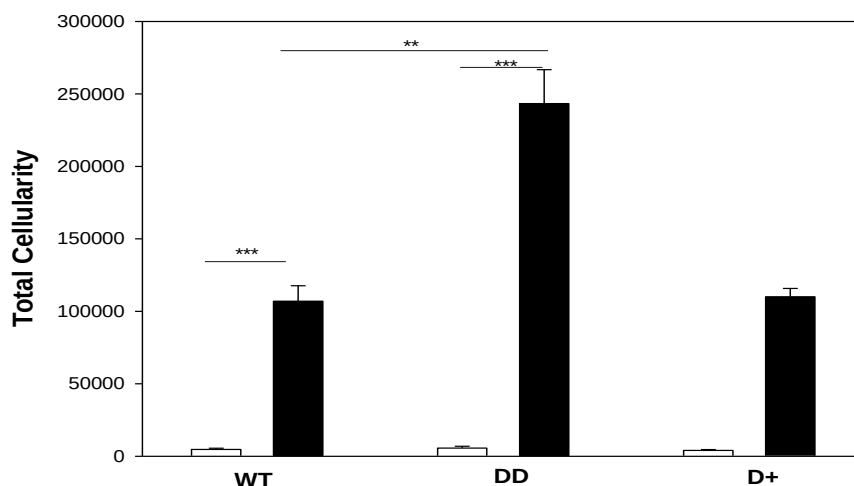
Πειραματικά ζώα	TPL2 ^{+/+} (Wt)	TPL2 ^{-/-} (DD)	TPL2 ^{+/-} (D+)
Συνολικός αριθμός ποντικών (n)	12	11	8



Σχήμα 3.6. Α. Ποσοστά απώλειας βάρους και **Β.** Ποσοστά βιωσιμότητας την 14^η ημέρα μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης.

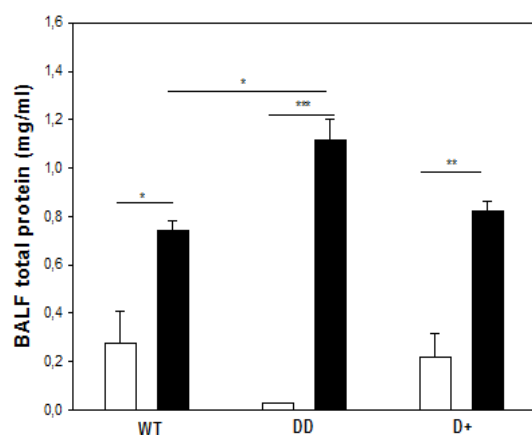
Η απώλεια βάρους είναι αποτέλεσμα της δράσης της μπλεομυκίνης, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω. Στο σχήμα 3.6 Α παρουσιάζονται τα ποσοστά απώλειας βάρους των ζώων στα οποία έχει γίνει έγχυση μπλεομυκίνης. Στην ομάδα ελέγχου (WT) παρατηρήθηκε ποσοστό απώλειας βάρους περίπου στο 5%. Παρ' όλα αυτά, η διαφορά των πειραματικών ομάδων ελέγχου (wt) και TPL2^{+/-}(D+) διαφέρει στατιστικά σημαντικά από την ομάδα TPL2^{-/-} (DD)(15%).

Στο σχήμα 3.6 Β παρουσιάζεται το ποσοστό βιωσιμότητας των ζώων, στα οποία έχει γίνει έγχυση μπλεομυκίνης. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση του ποσοστού βιωσιμότητας της ομάδα TPL2^{-/-} (DD) (50%) σε σχέση με τις άλλες δύο ομάδες ελέγχου (wt)(10%) και TPL2^{+/-}(D+)(30%).

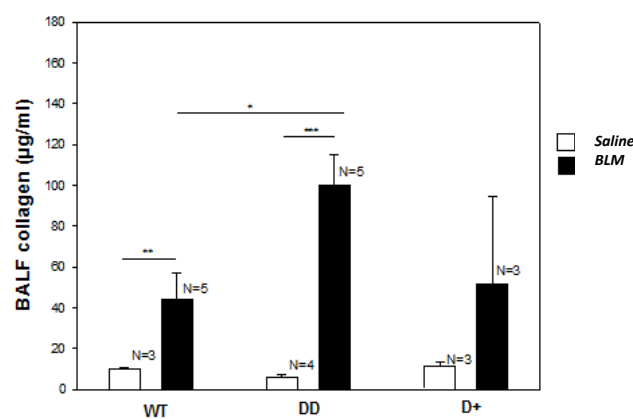


Σχήμα 3.7. Μέτρηση κυττάρων στο βρογχοκυψελιδικό υγρό πλύσης (BALF) την 14^η ημέρα μετά τη χορήγηση μπλεομυκίνης (** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$).

Στο σχήμα 3.7 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 αλλάζει η διήθηση των κυττάρων στον πνεύμονα της ομάδας TPL2^{-/-} (DD), γεγονός που αποδεικνύει την ύπαρξη φλεγμονής και επομένως και μη εμπλοκή της κινάσης TPL2 στην εμφάνιση και ύπαρξη φλεγμονής.



A.

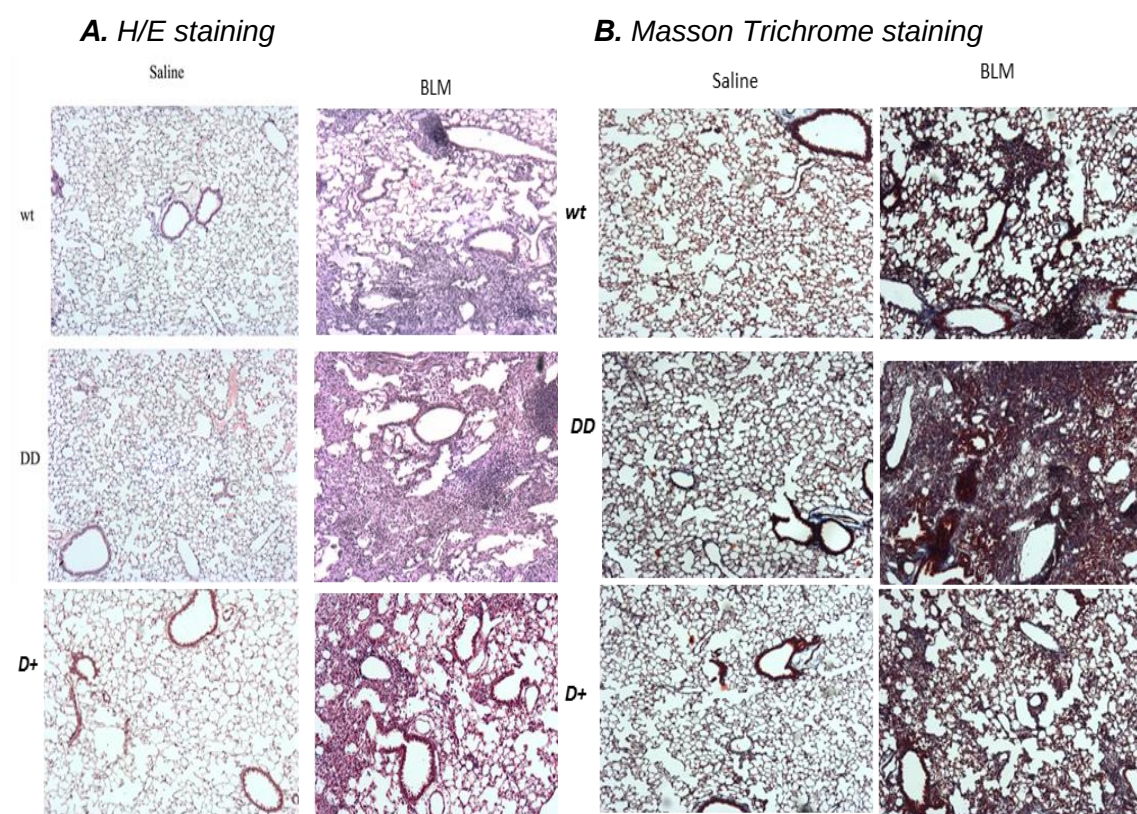


B.

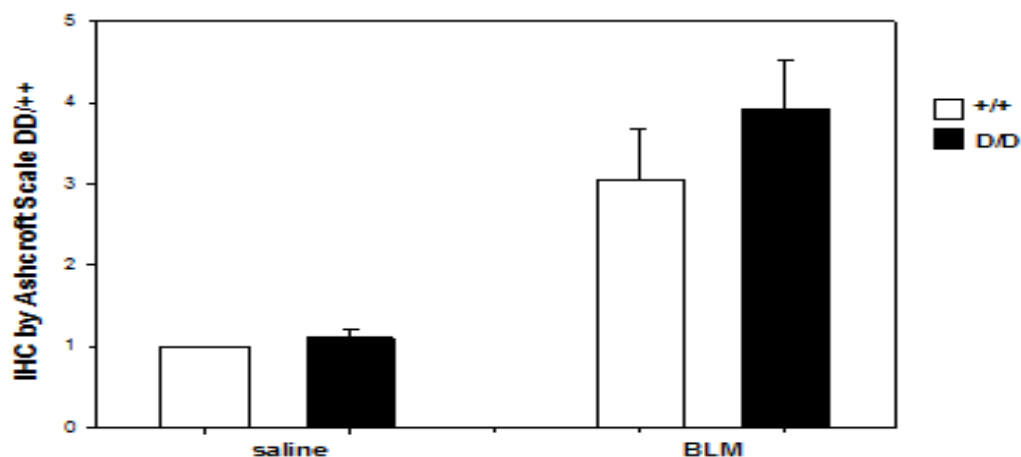
Σχήμα 3.8..A. Ποσοτικός προσδιορισμός συνολικής πρωτεΐνης στο βρογχοκυψελιδικό υγρό πλύσης (BALF), **B.** Ποσοτικός προσδιορισμός διαλυτού κολλαγόνου στο βρογχοκυψελιδικό υγρό πλύσης (BALF). (* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$)

Όπως απεικονίζεται στο σχήμα 3.8..Α, η ποσότητα της συνολικής πρωτεΐνης στις τρεις πειραματικές ομάδες μεταβάλλεται σημαντικά.

Η καταστροφή του πνευμονικού ιστού και η διαπερατότητα του πνευμονικού επιθηλίου είναι εκτεταμένη και ανεξάρτητη του γονοτύπου. Τα αποτελέσματα αυτά συσχετίζονται με την ποσότητα του διαλυτού κολλαγόνου, όπως φαίνεται στο σχήμα 3.8.Β, τα οποία παραμένουν υψηλά και στις τρεις ομάδες. Παρατηρήθηκε μια αύξηση στην ποσότητα συνολικής πρωτεΐνης και κολλαγόνου του BALF με στατιστικά σημαντική διαφορά της ομάδας TPL2^{-/-} (DD) από τις άλλες δυο ομάδες.

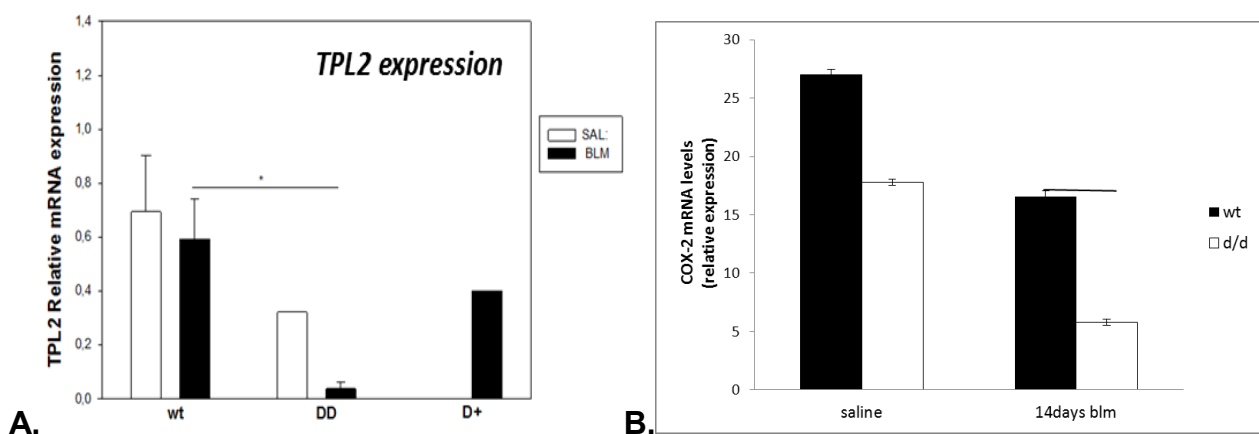


Σχήμα 3.9. Α. Φωτογραφίες από τομές πνεύμονα μετά από χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης (x10 μεγέθυνση) και **Β.** μετά από τριχρωματική χρώση Masson (x10 μεγέθυνση).



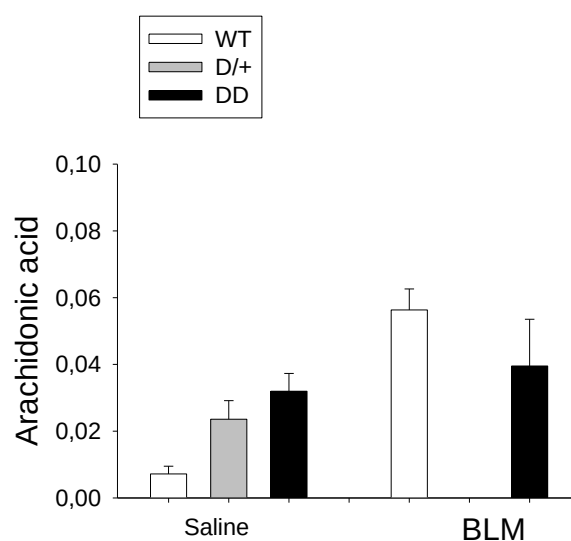
Σχήμα 3.10. Modified Ascroft score.

Στο σχήμα 3.9 φαίνονται τομές παραφιντοποιημένων ιστών πνεύμονα από WT, $TPL2^{-/-}$ (DD) και $TPL2^{+/-}$ (D+) ποντίκια μετά από χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης (Σχήμα 3.9.) και τομές ιστών μετά από τριχρωματική χρώση Masson (Σχήμα 3.9). Στο σχήμα 3.10 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 $TPL2^{-/-}$, αλλά δεν είναι στατιστικά σημαντική διαφορά.



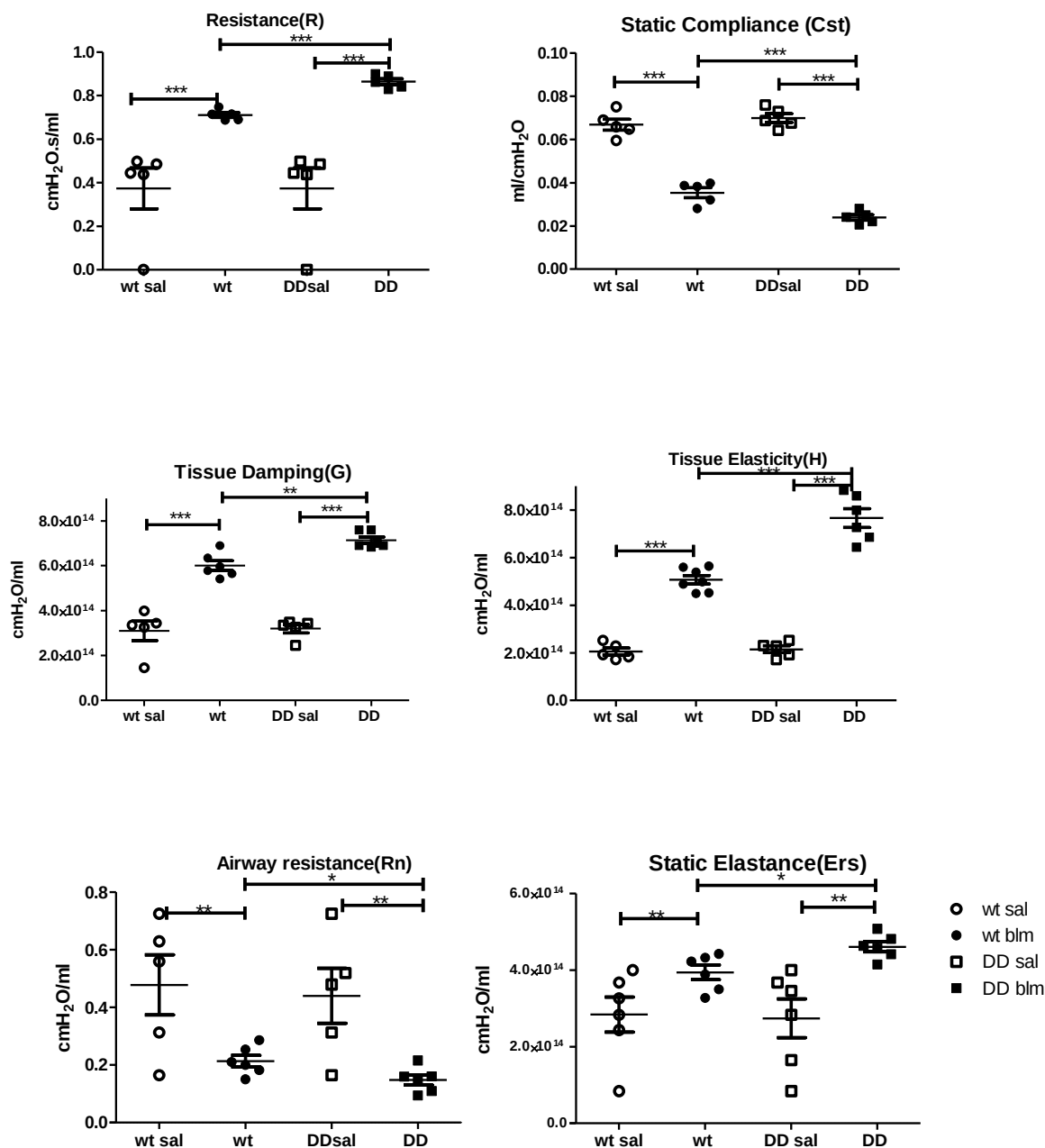
Σχήμα 3.11.A. Ποσοτικοποίηση έκφρασης γονιδίου $TPL2$. **B.** Ποσοτικοποίηση έκφρασης γονιδίου $COX-2$. (* $P < 0.05$)

Η $TPL2$ ελέγχει την έκφραση $COX-2$ και την έκκριση $PGE2$ σαν απόκριση διαφορετικών φλεγμονωδών μεσολαβητών. Όπως παρατηρούμε στο σχήμα 3.11 τα $TPL2^{-/-}$ ποντίκια φαίνεται να εκφράζουν λιγότερο την $TPL2$ κινάση και την $COX2$ (σχήμα 3.11) συγκριτικά με τα WT ποντίκια.



Σχήμα 3.12. Έκφραση υποστρώματος της COX-2 (αραχιδονικού οξέος).

Το αραχιδονικό οξύ στην ομάδα ελέγχου (saline) αντικατοπτρίζει πολύ καλά τα επίπεδα COX-2. Πιο συγκεκριμένα παρατηρείται μειωμένη έκφραση TPL2 (TPL2^{-/-} ποντίκια), μειωμένη έκφραση COX-2, αυξημένη έκφραση του υποστρώματος της COX-2 (αραχιδονικό οξύ) (σχήμα 3.12).



Σχήμα 3.13: Μέτρηση μηχανικών παραγόντων στα δείγματα μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης τη 14^η ημέρα.

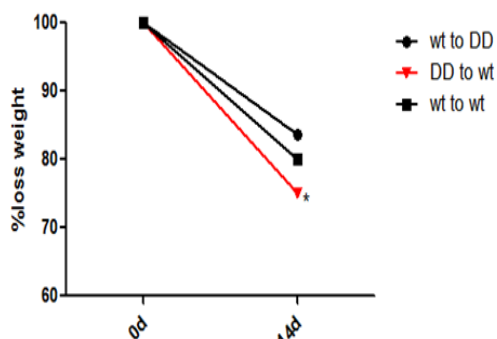
Καθώς η απουσία του γονιδίου TPL2 οδήγησε στην επιδείνωση της νόσου, αυτό υποδηλώνει ότι διαδραματίζει προστατευτικό ρόλο στην παθογένεια της πνευμονικής ίνωσης.

3.3 Απαραίτητη η έκφραση της TPL2 στα αιμοποιητικά κύτταρα στον περιορισμό της IPF

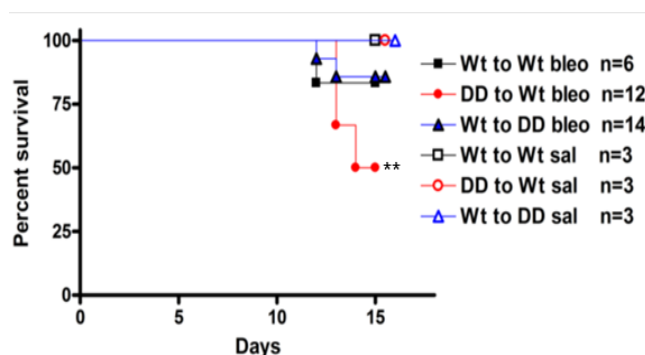
Για να διαλευκανθεί αν η έκφραση της TPL2 σε αιμοποιητικά ή μη αιμοποιητικά κύτταρα αρκεί για να περιορίσει την εξέλιξη της νόσου IPF (ΙΠΙ), αξιολογήθηκε η ίνωση, με τις μεθόδους που έχουν περιγραφεί και παραπάνω, σε χιμαιρικά ποντίκια, στα οποία κύτταρα μυελού των οστών WT ή $Tpl2^{-/-}$ μεταφέρθηκαν σε ακτινοβολημένα ποντίκια- παραλήπτες/δέκτες, είτε $Tpl2^{-/-}$ ή WT, αντίστοιχα. Το πείραμα επαναλήφθηκε με επαρκή αριθμό ποντικίων, όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα.

Πειραματικά ζώα	Wt to DD	DD to Wt	Wt to Wt
Συνολικός αριθμός ποντικών (n)	17	15	9

A.



B.



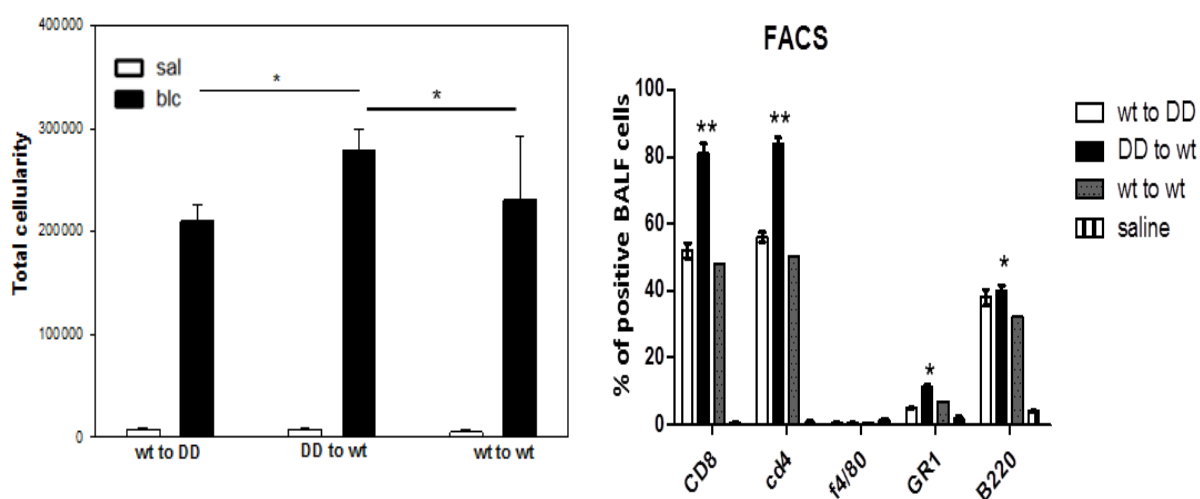
Σχήμα 3.14.A. Ποσοστά απώλειας βάρους και **B.** Ποσοστό βιωσιμότητας την 14^η ημέρα μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης.

Η απώλεια βάρους είναι αποτέλεσμα της προσβολής από την μπλεομυκίνη, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω. Στο σχήμα 3.14A παρουσιάζεται το ποσοστό απώλειας βάρους των ζώων στα οποία έχει γίνει έγχυση μπλεομυκίνης. Συγκεκριμένα:

- στην ομάδα $TPL2^{+/+}$ (DD to WT), WT τα οποία έχουν δεχτεί αιμοποιητικά κύτταρα από DD ποντίκια παρατηρήθηκε το μεγαλύτερο ποσοστό απώλειας βάρους περίπου στο 30%.

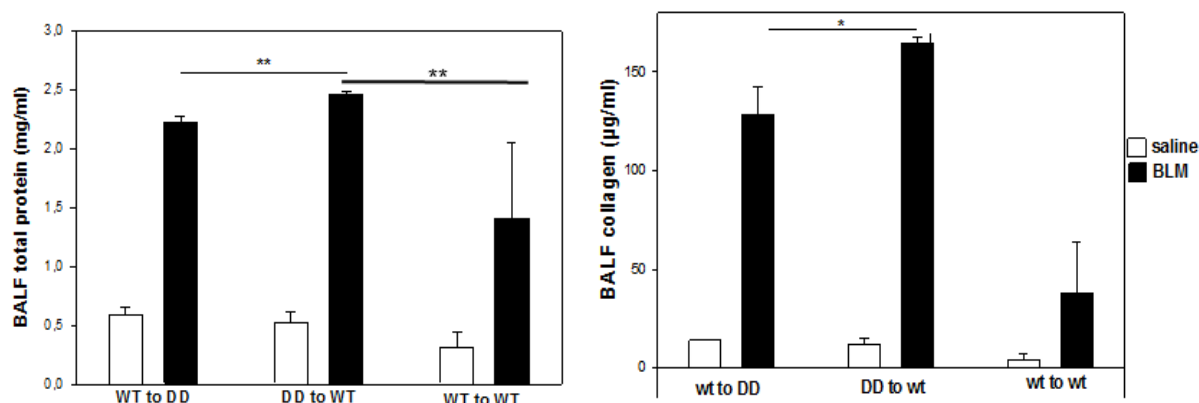
- στην ομάδα ελέγχου WT (WT to WT) τα οποία έχουν δεχτεί αιμοποιητικά κύτταρα από wt ποντίκια 18% και
- στην ομάδα TPL2^{-/-} (WT to DD) τα οποία έχουν δεχτεί αιμοποιητικά κύτταρα από WT ποντίκια (20%) ποντίκια

Στο σχήμα 3.14B παρουσιάζεται το ποσοστό βιωσιμότητας, των ζώων στα οποία έχει γίνει έγχυση μπλεομυκίνης. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση του ποσοστού βιωσιμότητας της ομάδας TPL2^{+/+} (wt τα οποία έχουν δεχτεί αιμοποιητικά κύτταρα από DD ποντίκια) (50%) σε σχέση με τις άλλες δύο ομάδες ελέγχου WT (τα οποία έχουν δεχτεί αιμοποιητικά κύτταρα από wt ποντίκια) (25%) και TPL2^{-/-} (DD τα οποία έχουν δεχτεί αιμοποιητικά κύτταρα από wt ποντίκια) (25%).



Σχήμα 3.15. Μέτρηση κυττάρων στο βρογχοκυψελιδικό υγρό πλύσης (BALF) την 14η ημέρα μετά από χορήγηση μπλεομυκίνης.

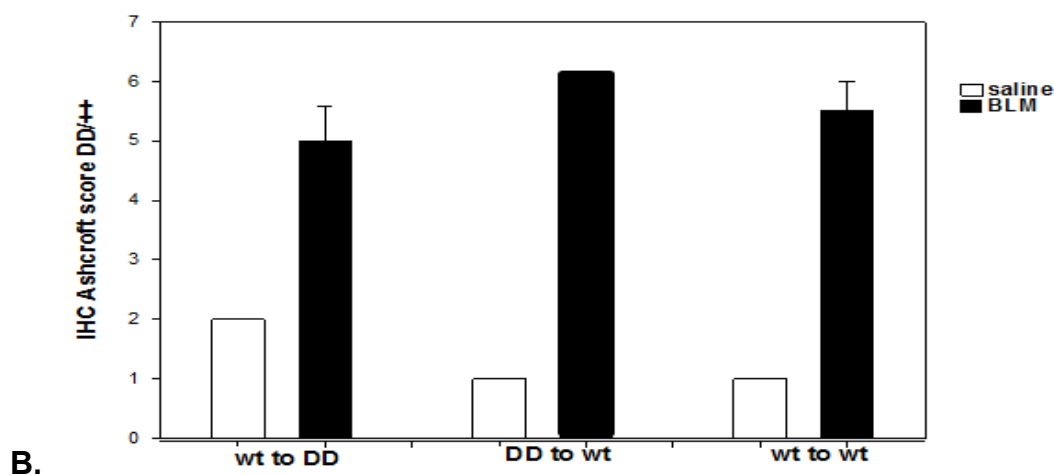
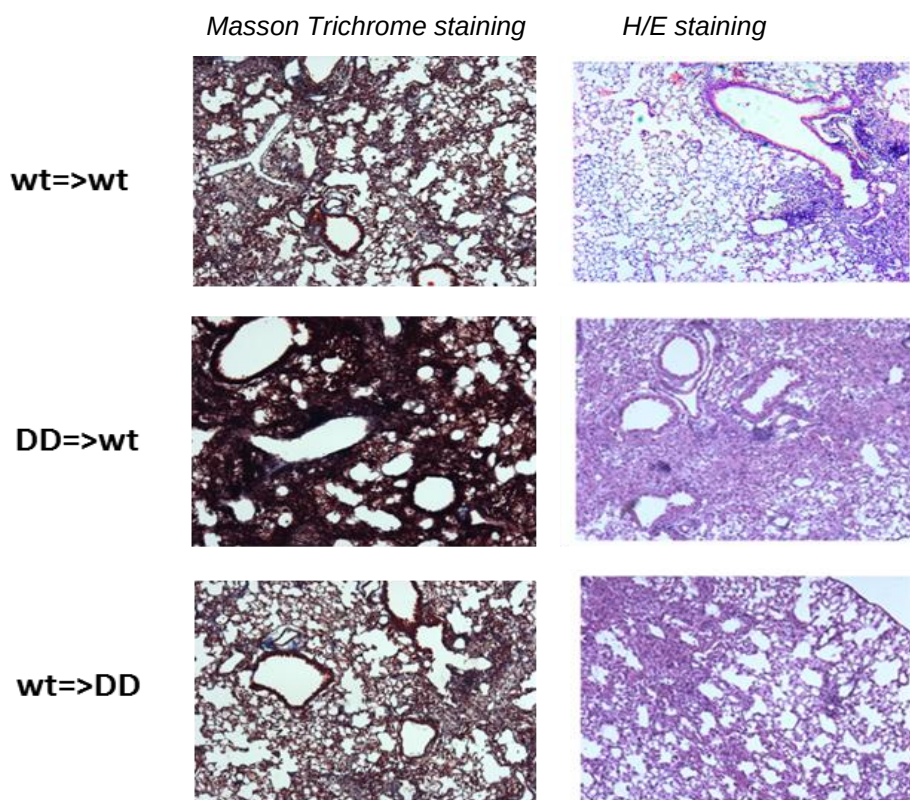
Στο σχήμα 3.15 παρουσιάζεται η μέτρηση των συνολικών κυττάρων στο συνολικό βρογχοκυψελιδικό υγρό πλύσης (BALF) των τριών πειραματικών ομάδων. Την 14η ημέρα μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης παρατηρούμε ότι αλλάζει σημαντικά η διήθηση των κυττάρων στο πνεύμονα των ποντικών στην ομάδα TPL2^{+/+} (wt τα οποία έχουν δεχτεί αιμοποιητικά κύτταρα από DD ποντίκια), γεγονός που αποδεικνύει την ύπαρξη φλεγμονής και επομένως και μη εμπλοκή της κινάσης στην εμφάνιση και ύπαρξη φλεγμονής στην .



Σχήμα 3.16. **A.** Ποσοτικός προσδιορισμός συνολικής πρωτεΐνης στο βρογχοκυψελιδικό υγρό πλύσης (BALF), **B.** Ποσοτικός προσδιορισμός διαλυτού κολλαγόνου στο βρογχοκυψελιδικό υγρό πλύσης (BALF).

Όπως απεικονίζεται στο σχήμα 3.16 A η ποσότητα της συνολικής πρωτεΐνης στις τρεις πειραματικές ομάδες μεταβάλλεται σημαντικά. Η καταστροφή του πνευμονικού ιστού και η διαπερατότητα του πνευμονικού επιθηλίου είναι εκτεταμένη και ανεξάρτητη του γονοτύπου. Τα αποτελέσματα αυτά συσχετίζονται με την ποσότητα του διαλυτού κολλαγόνου, όπως φαίνεται στο σχήμα 3.16 B, τα οποία παραμένουν υψηλά και στις τρεις ομάδες. Παρατηρήθηκε μια αύξηση στην ποσότητα συνολικής πρωτεΐνης και κολλαγόνου του BALF με στατιστικά σημαντική διαφορά της ομάδας TPL2^{+/+} (wt τα οποία έχουν δεχτεί αιμοποιητικά κύτταρα από DD ποντίκια) από τις άλλες δυο ομάδες.

Πραγματοποιήθηκε ιστολογική παρατήρηση των πνευμονικών ιστών μετά από ειδική χρώση, όπως παρουσιάζεται παρακάτω.

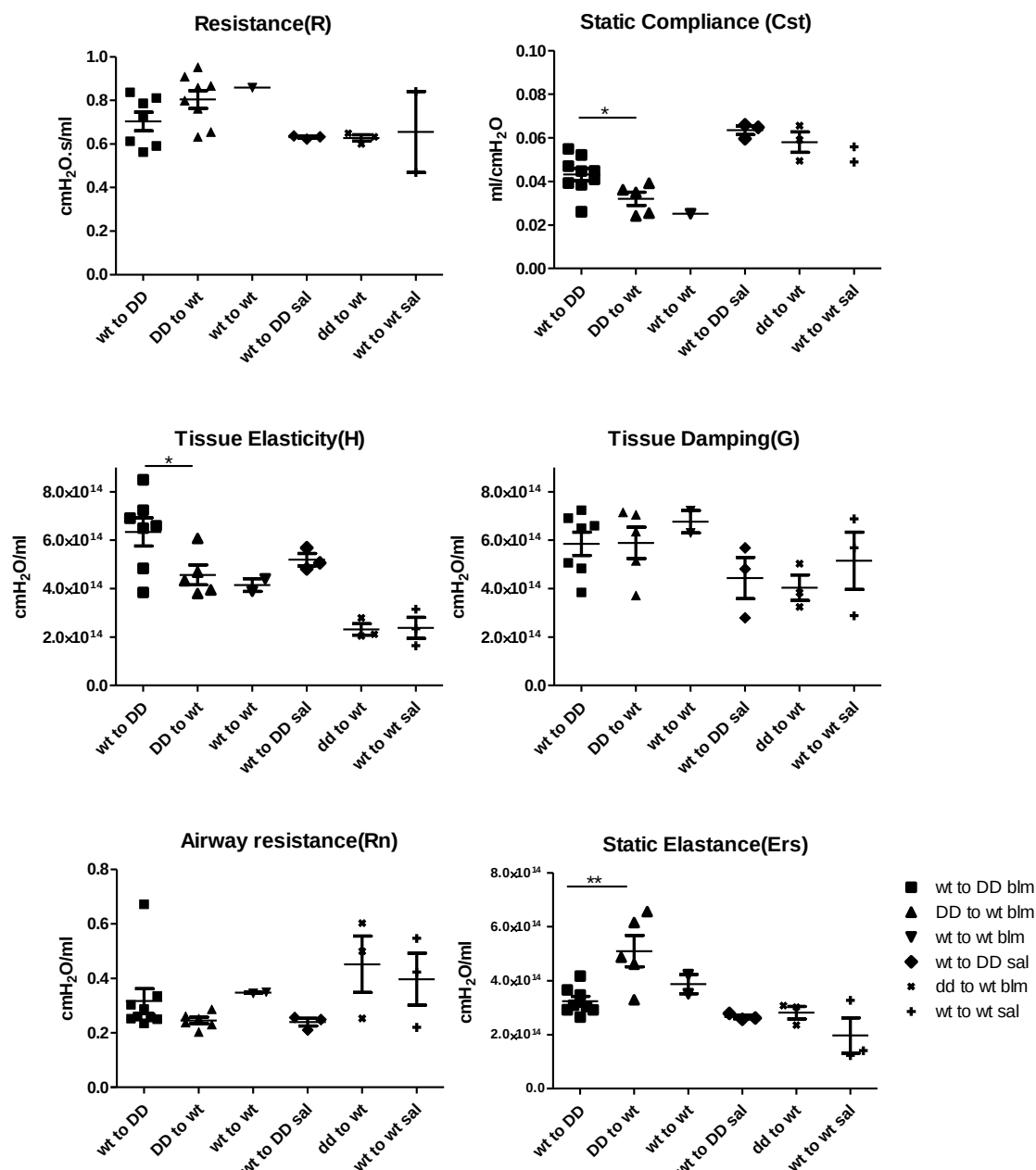


Σχήμα 3.17. A. Φωτογραφίες από τομές πνεύμονα μετά από τριχρωματική χρώση Masson ($\times 10$ μεγέθυνση) και από τομές πνεύμονα μετά από χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης ($\times 10$ μεγέθυνση), **B.** Modified Ashcroft score.

Στο σχήμα 3.17.A φαίνονται τομές παραφιντοποιημένων ιστών πνεύμονα από WT, τα οποία έχουν δεχτεί αιμοποιητικά κύτταρα από wt ποντίκια (wt to wt) , TPL2^{+/+}, τα οποία wt που έχουν δεχτεί αιμοποιητικά κύτταρα από DD ποντίκια (DD to wt) και

TPL2^{-/-}, τα οποία DD που έχουν δεχτεί αιμοποιητικά κύτταρα από wt ποντίκια (wt to DD), μετά από χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης (αριστερή σειρά) και τομές ιστών μετά από τριχρωματική χρώση Masson (δεξιά σειρά).

Στο σχήμα 3.17.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 TPL2^{+/+} (wt τα οποία έχουν δεχτεί αιμοποιητικά κύτταρα από DD ποντίκια), αλλά δεν είναι στατιστικά σημαντική διαφορά.



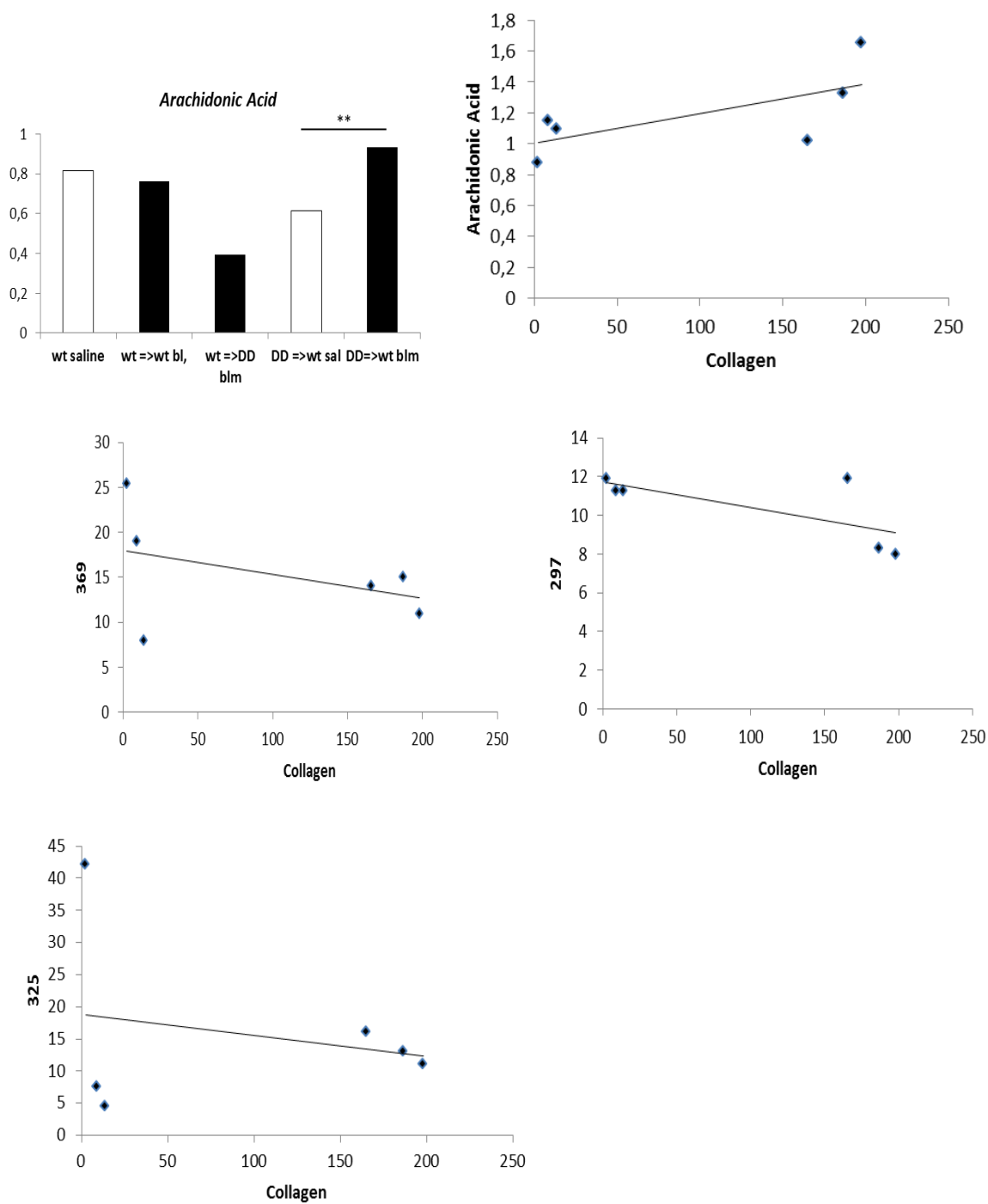
Σχήμα 3.18. Αποτελέσματα μετρήσεων μηχανικών παραγόντων πνεύμονα.

Το σχήμα 3.18 παρουσιάζουν τις μετρήσεις των μηχανικών παραγόντων φυσιολογικών ιστών (ομάδα ελέγχου) και ιστών με ίνωση, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν στο μηχάνημα flexivent. Συγκεκριμένα, στο σχήμα απεικονίζεται η νευτώνεια αντίσταση (R_n), η οποία αντιπροσωπεύει την αντίσταση των αεραγωγών. Η στατιστική συμμόρφωση (C_{st}) προκύπτει από τη μέγιστη πίεση όγκου-βρόχων (PV-βρόχους) μεταξύ της λειτουργικής υπολειπόμενης χωρητικότητας (FRC) και της συνολικής χωρητικότητας των πνευμόνων (TLC). Η απόσβεση ιστού (G) είναι

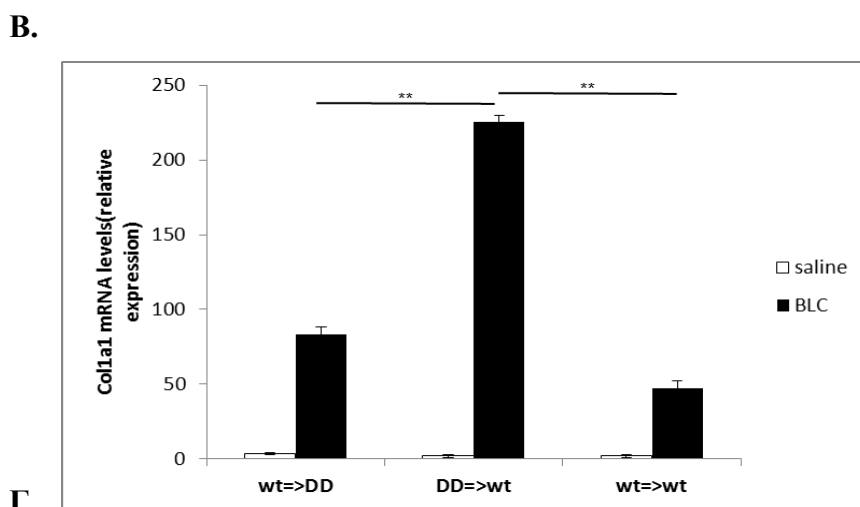
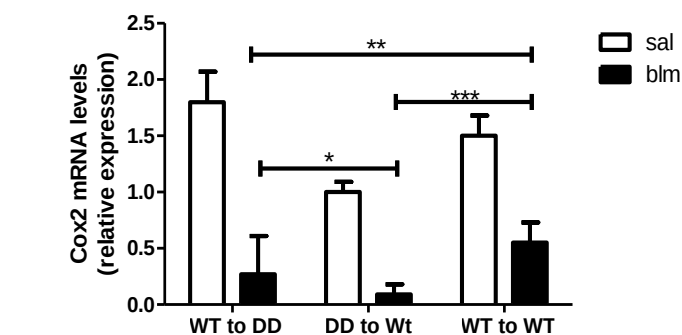
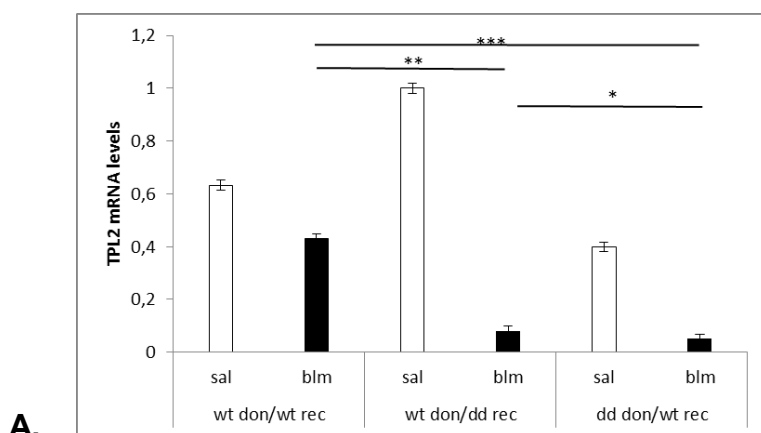
παράμετρος της αντίστασης του ιστού που αντανakλά την διάχυση της ενέργειας στις κυψελίδες και η ελαστικότητα ιστού (H) αντανakλά την εξοικονόμηση ενέργειας στις κυψελίδες. Σύμφωνα με τα ιστολογικά χαρακτηριστικά της ίνωσης, η αρχιτεκτονική του πνεύμονα αλλοιώνεται, ο αέρας είναι περιορισμένος λόγω της ύπαρξης μεγάλης ποσότητας κολλαγόνου και η ανταλλαγή αερίων στους βρόγχους πραγματοποιείται με δυσκολία. Ιδιαίτερα στα TPL2^{+/+} (wt τα οποία έχουν δεχτεί αιμοποιητικά κύτταρα από DD ποντίκια) παρατηρείται σημαντική διαφορά στις παραπάνω μηχανικές ιδιότητες σε σχέση με τις υπόλοιπες πειραματικές ομάδες.

Πολλά γονίδια εμπλέκονται στη φλεγμονή, όπως αυτά για τον TNF-α, το ICAM-1 (διακυτταρικά μόρια προσκόλλησης-1) και την COX-2 (κυκλοοξυγενάση). Το αραχιδονικό οξύ στην ομάδα στην οποία έχει χορηγηθεί φυσιολογικός ορός αντικατοπτρίζει πολύ καλά τα επίπεδα COX-2. Πιο συγκεκριμένα, μειωμένη έκφραση TPL2 (στα TPL2^{+/+} (wt τα οποία έχουν δεχτεί αιμοποιητικά κύτταρα από DD ποντίκια), μειωμένη έκφραση COX-2 και αυξημένη έκφραση του υποστρώματος της COX-2 (αραχιδονικό οξύ).

Τέλος, μετά από φασματογραφία μάζας στα BALF παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα του αραχιδονικού οξέος αυξάνονται με την αύξηση του κολλαγόνου. Όπως έχει αναφερθεί οι μεταβολίτες της PGE2 μειώνονται με την αύξηση του κολλαγόνου (σχήμα 3.19).



Σχήμα 3.19. Έκφραση υποστρώματος της COX-2 (αραχιδονικού οξέος) και άλλων μεταβολιτών της PGE2.



Σχήμα 3.20.A. Ποσοτικοποίηση έκφρασης γονιδίου *TPL2*, **B.** Ποσοτικοποίηση έκφρασης γονιδίου *COX-2*. **Γ.** ποσοτικοποίηση της εκφρασης *Col1a1*.

Η *TPL2* ελέγχει την έκφραση της *COX-2* και την έκκριση της *PGE2* σαν απόκριση διαφορετικών φλεγμονωδών μεσολαβητών. Όπως παρατηρούμε στο σχήμα 3.20, τα ποντίκια της ομάδας *TPL2*^{+/+} (wt τα οποία έχουν δεχτεί αιμοποιητικά κύτταρα από DD ποντίκια) σε σχέση με τις άλλες δύο ομάδες ελέγχου WT (τα οποία έχουν δεχτεί αιμοποιητικά κύτταρα από wt ποντίκια) και *TPL2*^{-/-} (DD τα οποία έχουν δεχτεί

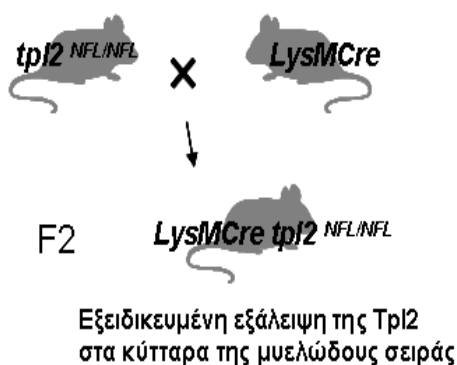
αιμοποιητικά κύτταρα από wt ποντίκια) φαίνεται να εκφράζουν στατιστικά σημαντικά μειωμένη TPL2 και COX2 (σχήμα 3.20Γ) και αυξημένο κολλαγόνο συγκριτικά με τα WT ποντίκια.

Το γεγονός ότι στα ποντίκια που έλαβαν αιμοποιητικά κύτταρα με γονότυπο DD η νόσος επιδεινώθηκε, υποδηλώνει ότι είναι απαραίτητη η έκφραση της TPL2 στα αιμοποιητικά κύτταρα για τον περιορισμό της IPF.

3.4. Η γενετική απαλοιφή της TPL2 από μακροφάγα αυξάνει την επιδείνωση της Πνευμονικής Ίνωσης

Η επιλογή για το χαρακτηρισμό των $TPL2^{FL/FL}$ ποντικών της στόχευσης των κυττάρων της μυελώδους σειράς με το *LysMCre* διαγονιδιακό σύστημα, έγινε με βάση το γεγονός ότι ο λειτουργικός ρόλος της TPL2 στα μακροφάγα είναι ήδη γνωστός σε σημαντικό βαθμό. Επομένως, μπορούν να λειτουργήσουν ως σημείο αναφοράς για την αποτελεσματικότητα της στόχευσης σε ποντικούς *LysMCre*+/- $TPL2^{FL/FL}$.

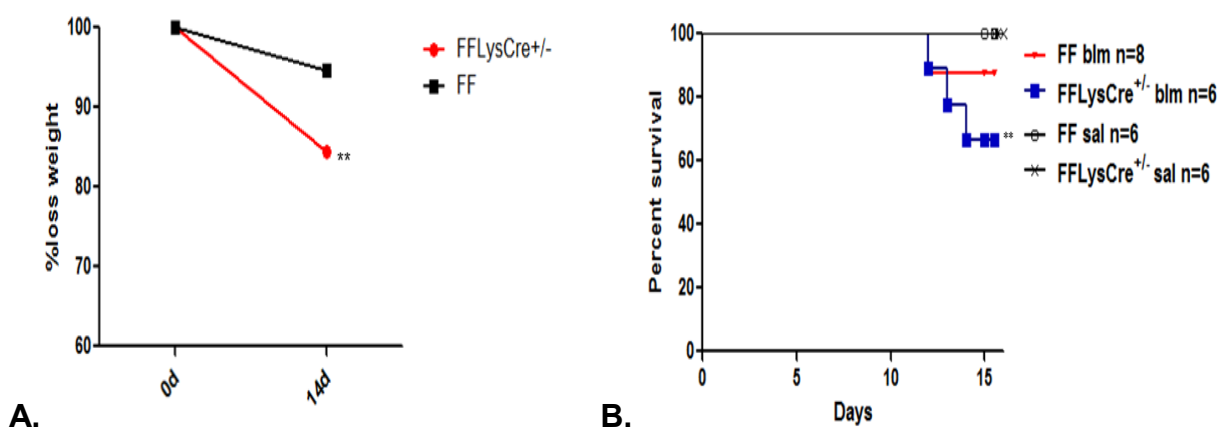
Παράλληλα, για να εξεταστεί η λειτουργικότητα των ποντικών που φέρουν στοχευμένο δυνητικά απενεργοποιημένο *TPL2* γονίδιο, ποντικοί $TPL2^{FL/FL}$ διασταυρώθηκαν με *LysMCre* διαγονιδιακούς ποντικούς, οι οποίοι εκφράζουν την Cre ανασυνδυάση σε εξειδικευμένα στα κύτταρα της μυελώδους σειράς. Η έκφραση της Cre, κατευθυνόμενη από τον υποκινητή της λυσοζύμης-M στους *LysMCre* ποντικούς, έχει περιγραφεί ότι οδηγεί σε υψηλό ποσοστό γενετικού ανασυνδυασμού σε πολυμορφοπύρνα και σε ώριμα μακροφάγα.



Για την περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου της TPL2 στην παθογένεια της πνευμονικής ίνωσης εφαρμόστηκε το μοντέλο της μπλεομυκίνης και ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία, όπως και παραπάνω στα *LysMCre*+/- $TPL2^{FL/FL}$ ποντίκια. Το

πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές και με επαρκή αριθμό ποντικών, όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα.

Πειραματικοί ποντικοί	<i>tpl2^{FL/FL}</i>	<i>LysMCre+/- tpl2^{FL/FL}</i>
Συνολικός αριθμός ποντικών (n)	14	12

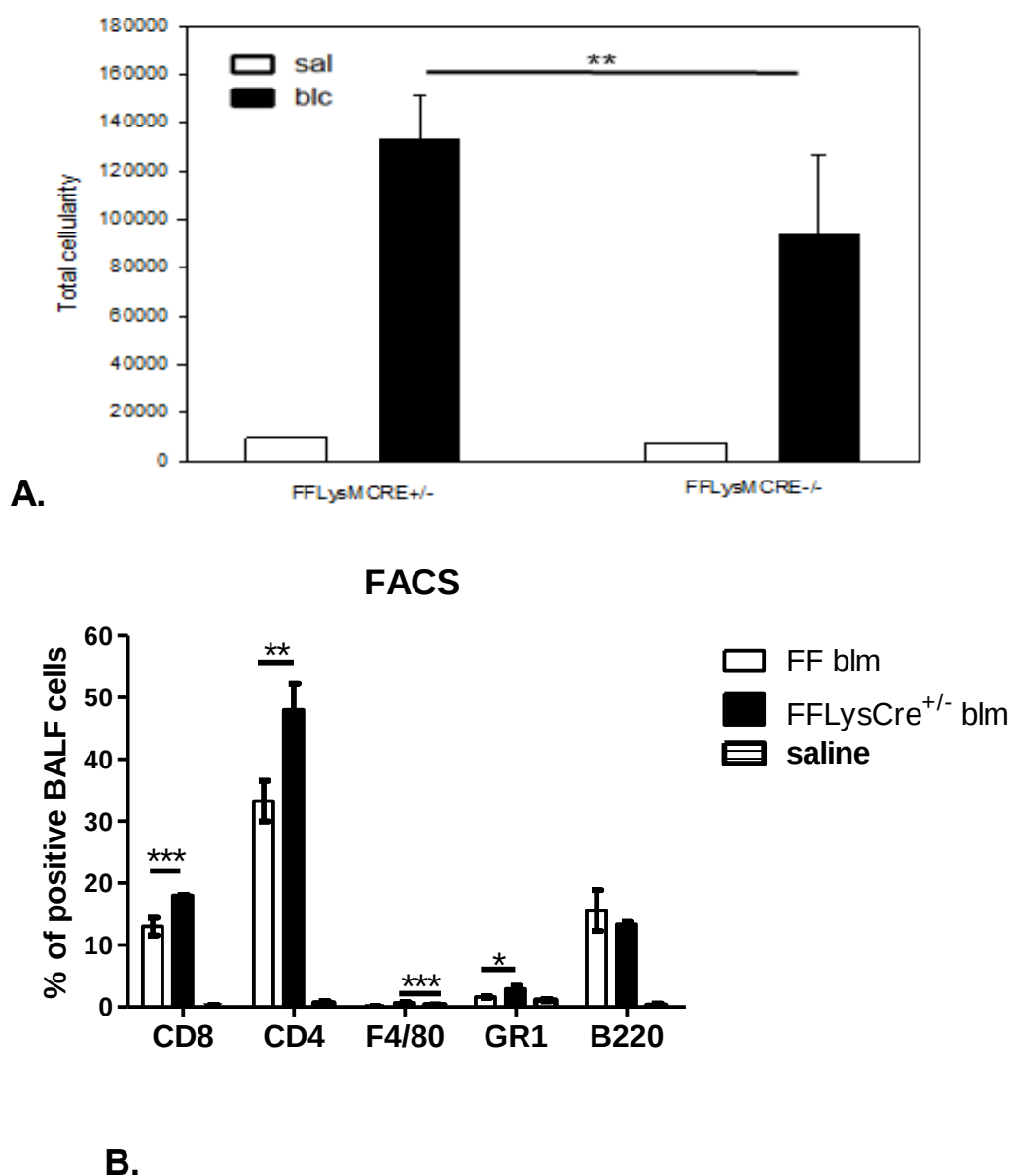


Σχήμα 21.A. Ποσοστά απώλειας βάρους και **B.** Ποσοστά βιωσιμότητας την 14^η ημέρα μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης.

Στο σχήμα 21.A. παρουσιάζεται το ποσοστό απώλειας βάρους των ζώων στα οποία έχει γίνει έγχυση μπλεομυκίνης. Στην ομάδα ελέγχου *TPL2^{FL/FL}* παρατηρήθηκε το μεγαλύτερο ποσοστό απώλειας βάρους περίπου στο 5%.

Παρ' όλα αυτά, η διαφορά των πειραματικών ομάδων ελέγχου *TPL2^{FL/FL}* διαφέρει στατιστικά σημαντικά από την ομάδα *LysMCre+/- TPL2^{FL/FL}* κατά 17% . Στο σχήμα 21.B παρουσιάζεται το ποσοστό βιωσιμότητας των ζώων, στα οποία έχει γίνει έγχυση μπλεομυκίνης.

Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση του ποσοστού βιωσιμότητας της ομάδα *LysMCre+/- TPL2^{FL/FL}* (40%) σε σχέση με τις άλλες δύο ομάδες ελέγχου *TPL2^{FL/FL}* (20%).

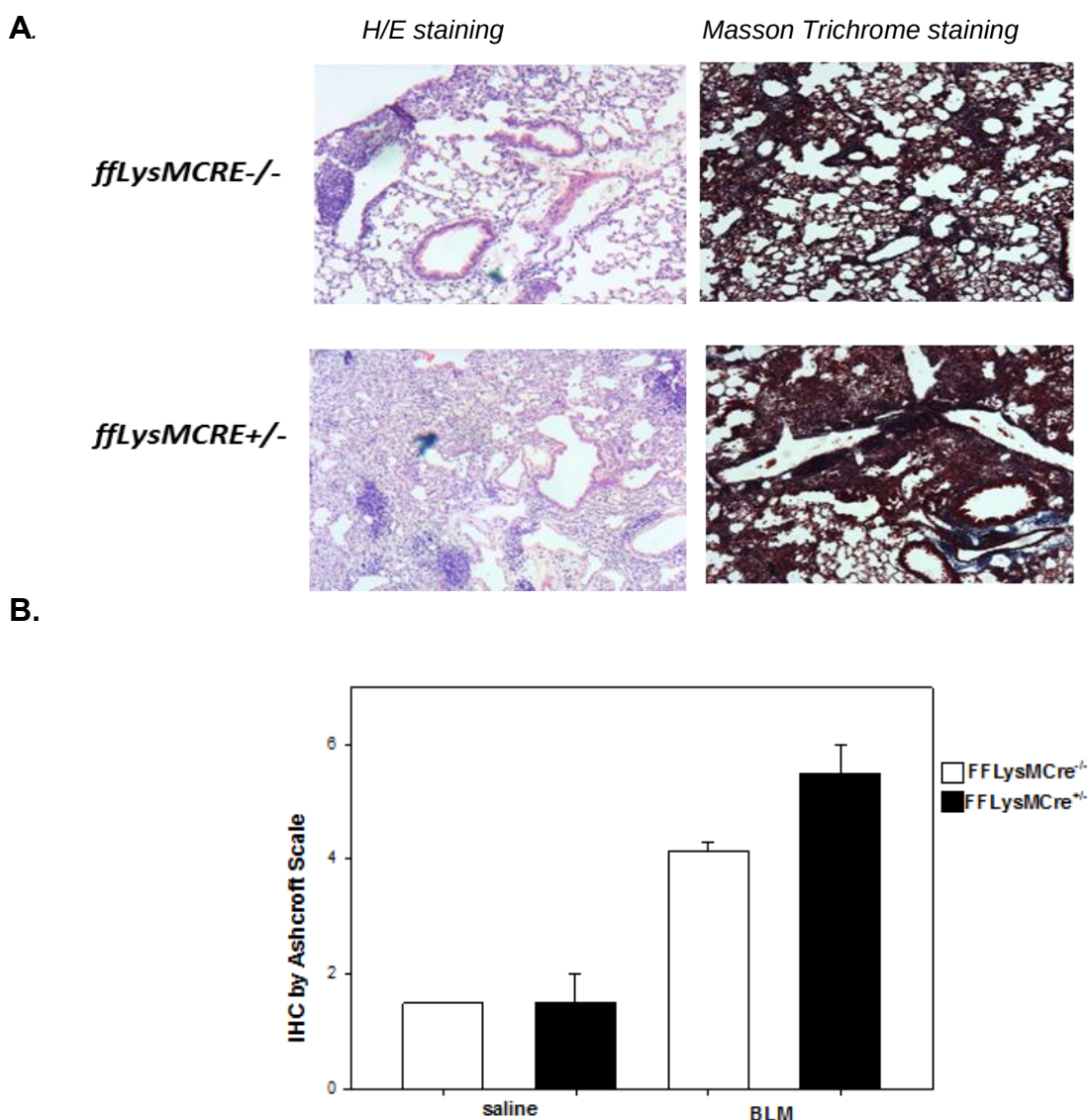


Σχήμα 3.22. Μέτρηση κυττάρων στο βρογχοκυψελιδικό υγρό πλύσης (BALF) την 14η ημέρα μετά χορήγηση την μπλεομυκίνης.

Στο σχήμα 3.22 παρουσιάζεται η μέτρηση των συνολικών κυττάρων στο συνολικό βρογχοκυψελιδικό υγρό πλύσης (BALF) των πειραματικών ομάδων. Την 14η ημέρα, μετά την χορήγηση της μπλεομυκίνης παρατηρούμε ότι αλλάζει η διήθηση των κυττάρων στο πνεύμονα, γεγονός που αποδεικνύει την ύπαρξη φλεγμονής.

Η ποσότητα των κυττάρων είναι μια αρχική ένδειξη της παθογένειας της πνευμονικής ίνωσης, ως πρώτο στάδιο της ινωτικής απόκρισης.

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 μειωμένα ποσοστά μακροφάγων (F4/80) και των ουδετερόφιλων (GR1) στην ομάδα *LysMCre^{+/-} TPL2^{FL/FL}*.

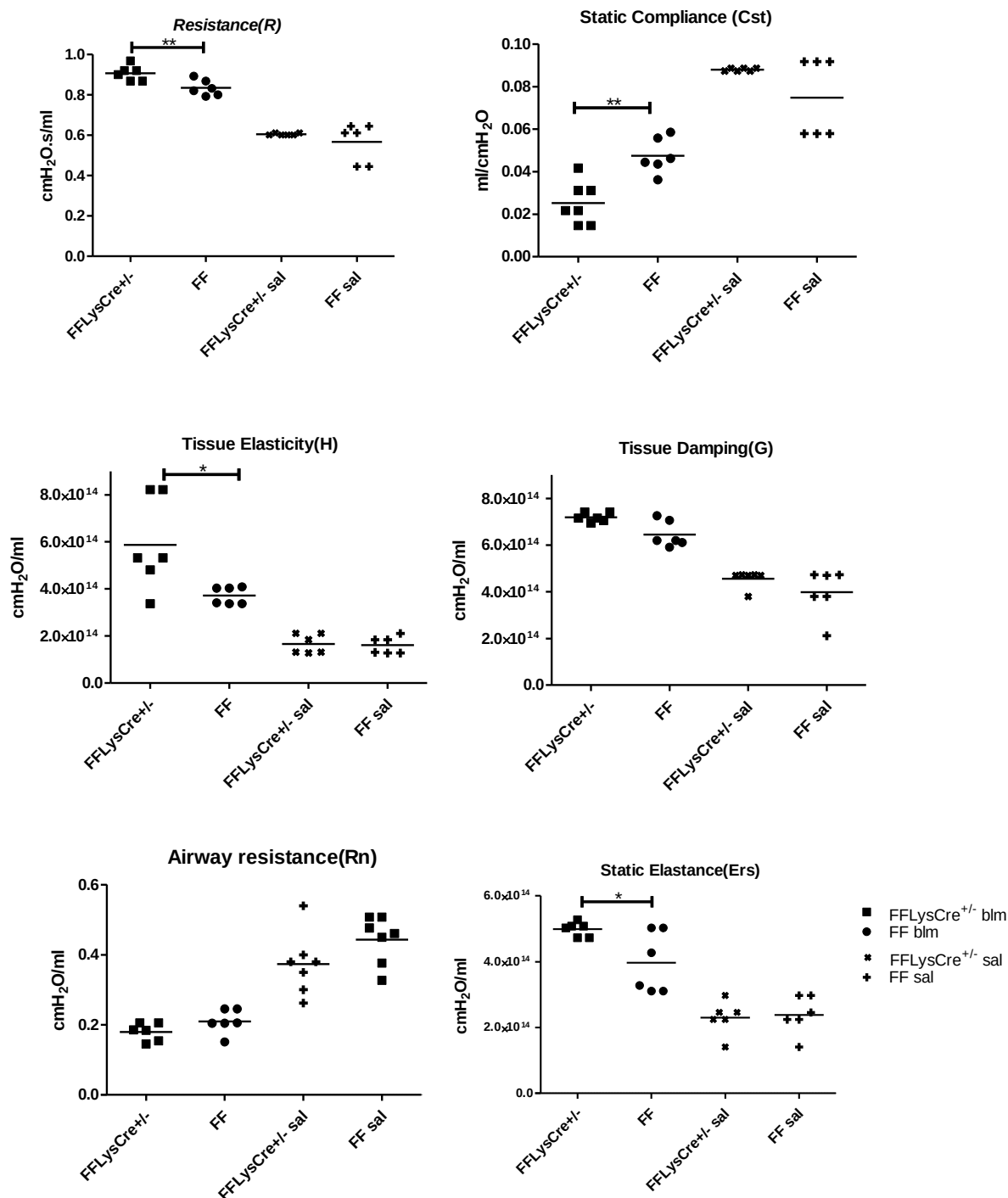


Σχήμα 3.23.A. Φωτογραφίες από τομές πνεύμονα μετά από χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης (x10 μεγέθυνση) και μετά από τριχρωματική χρώση Masson (x10 μεγέθυνση), **B.** Modified Ashcroft score.

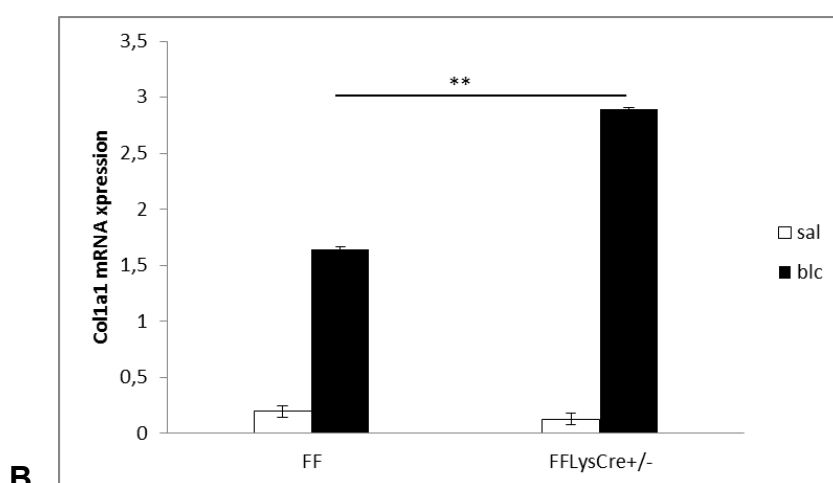
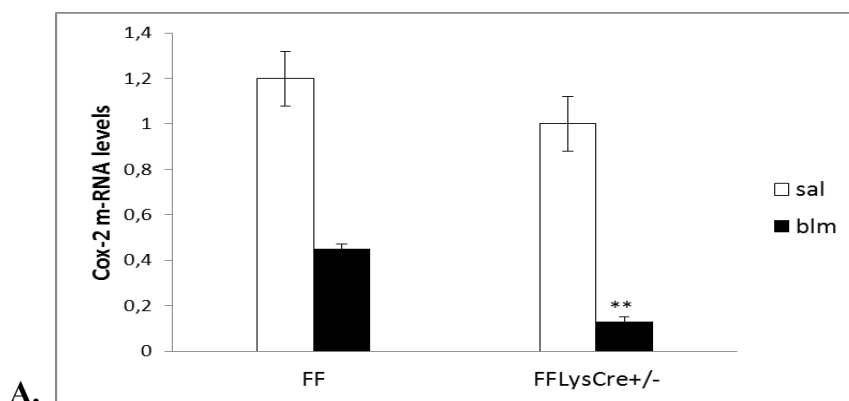
Στο σχήμα 3.23.A φαίνονται τομές παραφιντοποιημένων ιστών πνεύμονα από ποντίκια της ομάδας *LysMCre^{+/-} TPL2^{FL/FL}* και από ποντίκια της ομάδας *TPL2^{FL/FL}*, μετά από χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης (αριστερά στο σχήμα) και τομές ιστών μετά

από τριχρωματική χρώση Masson (δεξιά στο σχήμα). Στο σχήμα 3.23 Β 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 ποντίκια της ομάδας *LysMCre+/- TPL2^{FL/FL}*, αλλά δεν είναι στατιστικά σημαντική διαφορά.

Οι μηχανικές ιδιότητες των αεραγωγών και των πνευμόνων, όπως η στατιστική συμμόρφωση (Cst) και η περιοχή μεταξύ της εισπνοής και εκπνοής στην καμπύλη πίεσης-όγκου στα ποντίκια της ομάδας *LysMCre+/- TPL2FL/FL* μειώνονται σημαντικά ($p < 0.01$), 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 σημαντικά στα ποντίκια της ομάδας *LysMCre+/- TPL2FL/FL* ($p < 0.05$), λόγω της δυσλειτουργίας του πνεύμονα.



Σχήμα 3.24: Μέτρηση μηχανικών παραγόντων του πνεύμονα στα δείγματα.



Σχήμα 3.25.A. Ποσοτικοποίηση έκφρασης γονιδίου COX-2. **B.** Ποσοτικοποίηση της έκφρασης Col1a1.

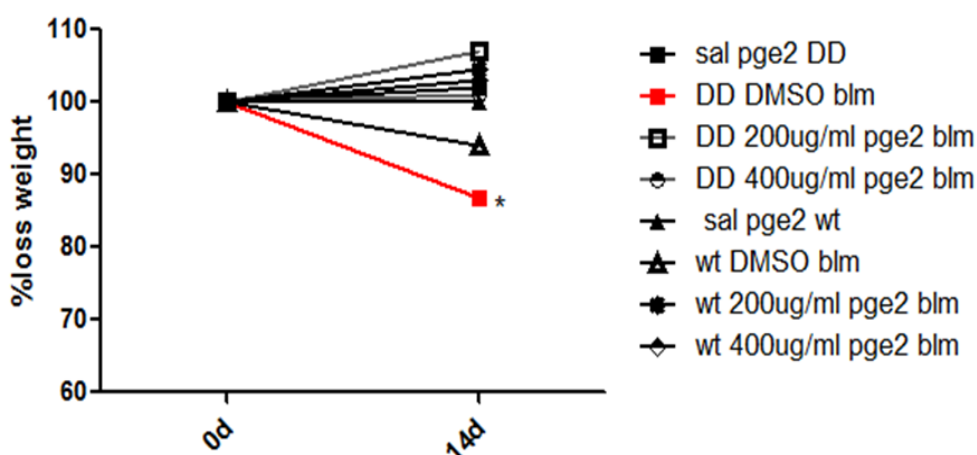
Η πρωτεϊνική αυτή ομάδα αποτελεί το 15-20% του ξηρού βάρους του πνεύμονα. Η δομική του μονάδα είναι η τριπλή έλικα του τροποκολλαγόνου. Τα μόρια του τροποκολλαγόνου συνδέονται μεταξύ τους στον εξωκυττάριο χώρο και σχηματίζουν μικροϊνίδια, τα οποία στη συνέχεια συνδέονται μεταξύ τους και δημιουργούν τους διάφορους τύπους του κολλαγόνου. Ο βασικός ρόλος του κολλαγόνου είναι η ενίσχυση της αντοχής των ιστών έναντι εκτατικών δυνάμεων.

Η γενετική απαλοιφή της TPL2 μακροφάγα αυξάνει την επιδείνωση της Πνευμονικής Ίνωσης. Αυτό υποδηλώνει έναν προστατευτικό ρόλο στη παθογένεια της πνευμονικής ίνωσης.

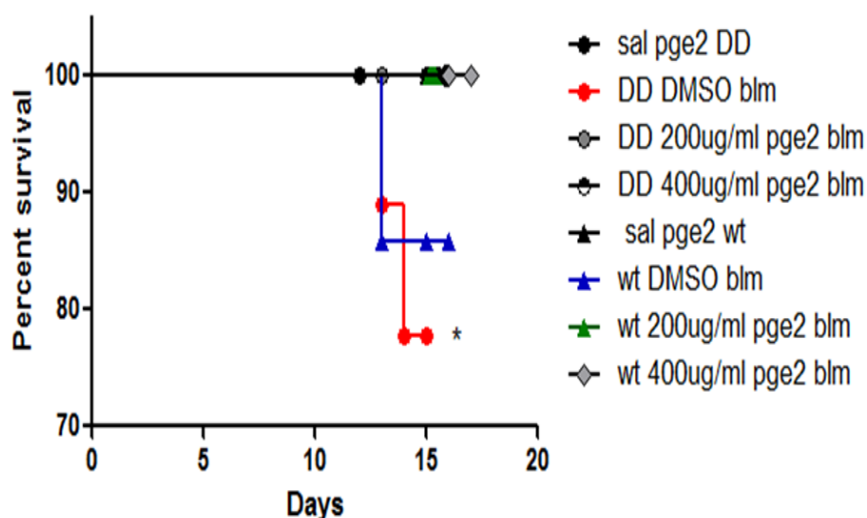
3.5.Εξωγενής χορήγηση PGE2 έχει προστατευτική δράση στα ποντίκια έναντι της IPF (ΙΠΙ)

Το μονοπάτι της PGE2 έχει ιδιαίτερη σημασία. Η προσταγλανδίνη E2 (PGE2) είναι ένας ενδογενής μεσολαβητής λιπιδίων με ευρεία αντι-ινωτική δράση της οποίας η σύνθεση απορρυθμίζεται στην πνευμονική ίνωση. Για να εκτιμηθεί *in vivo* η σημασία της ενεργοποίησης Cox-2-PGE2 μέσω της TPL2, χορηγήθηκε εξωγενώς 16,16-διμεθυλο PGE2 (dmPGE2), ένα σταθερό ανάλογο της ενδογενούς PGE2, ταυτόχρονα με την BLM και, ή με φυσιολογικό ορό ως μάρτυρας σε TPL2^{-/-} και WT ποντίκια.

Πειραματικά ζώα	DMSO BLM TPL2 ^{-/-} or Wt	200ug/ml dmPGE2 TPL2 ^{-/-} or Wt	400ug/ml dmPGE2 TPL2 ^{-/-} or Wt
Συνολικός αριθμός ποντικών (n)	12 σε κάθε ομάδα	12 σε κάθε ομάδα	12 σε κάθε ομάδα



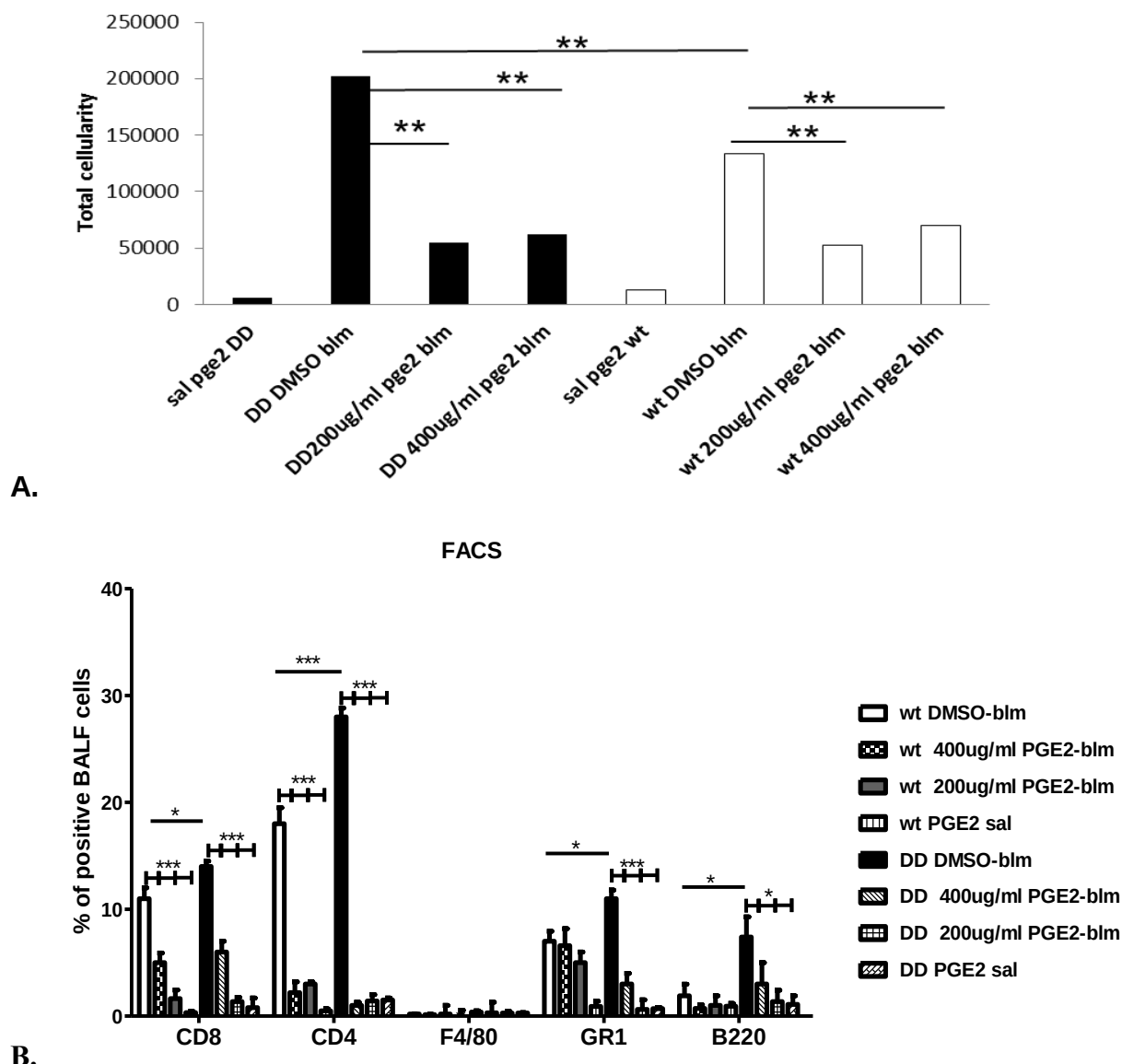
Σχήμα 3.26. Ποσοστά απώλειας βάρους την 14^η ημέρα μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης.



Σχήμα 3.27. Ποσοστά βιωσιμότητας την 14^η ημέρα μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης.

Η απώλεια βάρους είναι αποτέλεσμα της προσβολής από την μπλεομυκίνη όπως έχει ήδη αναφερθεί. Στο σχήμα 3.26 στην ομάδα ελέγχου (WT- BLM) παρατηρήθηκε το μεγαλύτερο ποσοστό απώλειας βάρους περίπου στο 10%. Παρ' όλα αυτά, η διαφορά των πειραματικών ομάδων ελέγχου από WT ποντίκια και από εκείνα στα οποία έχει χορηγηθεί PGE2 ή φυσιολογικός ορός (0%), διαφέρουν στατιστικά σημαντικά από την ομάδα TPL2^{-/-} (15%). Στο σχήμα 3.27 παρουσιάζεται το ποσοστό βιωσιμότητας των ζώων, στα οποία έχει γίνει έγχυση μπλεομυκίνης.

Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση του ποσοστού βιωσιμότητας της στην ομάδα TPL2^{-/-} (DD) (30%) και στην ομάδα TPL2^{+/+}(Wt)(15%), στις οποίες έχει χορηγηθεί μπλεομυκίνη/ DMSO, κάτι που υποδηλώνει την σημασία της εξωγενούς χορήγησης της PGE2.

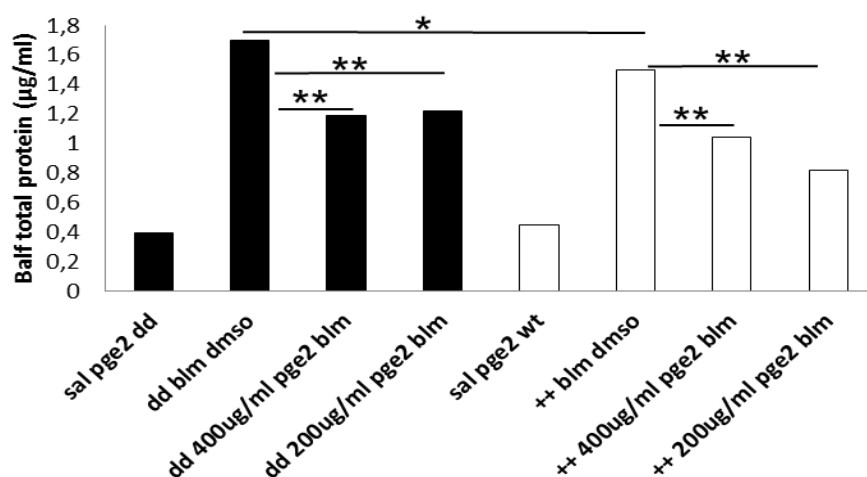


Σχήμα 3.28. Μέτρηση κυττάρων στο βρογχοκυψελιδικό υγρό πλύσης (BALF) την 14η ημέρα μετά χορήγηση την μπλεομυκίνης.

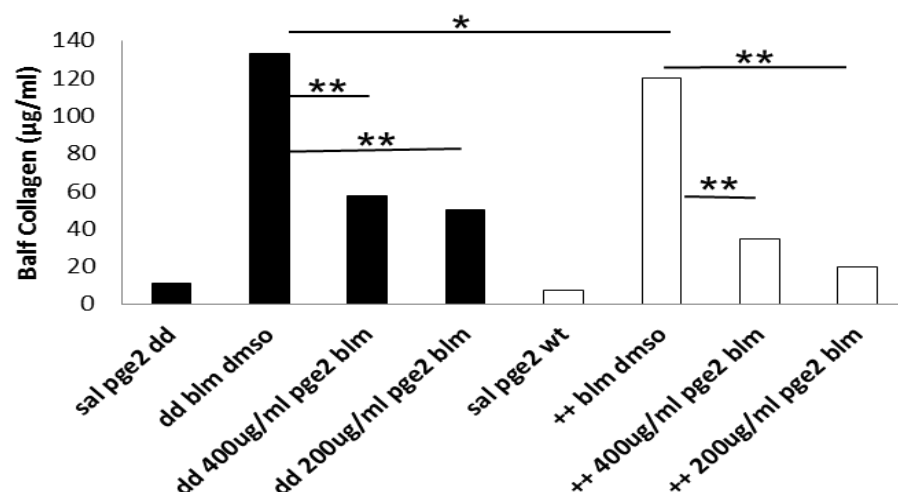
Στο σχήμα 3.28 παρουσιάζεται η μέτρηση των συνολικών κυττάρων στο συνολικό βρογχοκυψελιδικό υγρό πλύσης (BALF) των πειραματικών ομάδων. Με την κυτταρομετρία ροής (FACs) που πραγματοποιήθηκε στο συνολικό βρογχοκυψελιδικό υγρό πλύσης (BALF) την 14η ημέρα μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης, εντοπίζονται σε μεγαλύτερο ποσοστό τα CD8⁺ ($p < 0.05$), CD4⁺ ($p < 0.001$) και μειωμένα ποσοστά B κυττάρων (B220) και των ουδετερόφιλων (GR1), στατιστικά σημαντικά ($p < 0.05$) στην ομάδα TPL2^{-/-} (DD) από την ομάδα TPL2^{+/+} (Wt). Αντίθετα, στατιστικά σημαντική μείωση παρατηρήθηκε στο ποσοστό των CD8⁺ και CD4⁺ ($p < 0.001$). Μειωμένα ποσοστά των B κυττάρων (B220) ($p < 0.05$) και των ουδετερόφιλων (GR1) ($p < 0.001$)

παρατηρείται στις αντίστοιχες ομάδες, στις οποίες έχει χορηγηθεί PGE2, επίπεδα όμοια με αυτές τις ομάδες ελέγχου (στις οποίες χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός).

Παρατηρήθηκε μια αύξηση στην ποσότητα συνολικής πρωτεΐνης ($p < 0.05$) και κολλαγόνου ($p < 0.01$) του BALF, με στατιστικά σημαντική διαφορά της ομάδας TPL2^{-/-} (DD) σε σχέση με τις άλλες δύο ομάδες ελέγχου Wt (blm) και τις αντίστοιχες ομάδες στις οποίες έχει χορηγηθεί PGE2 και φυσιολογικός ορός .



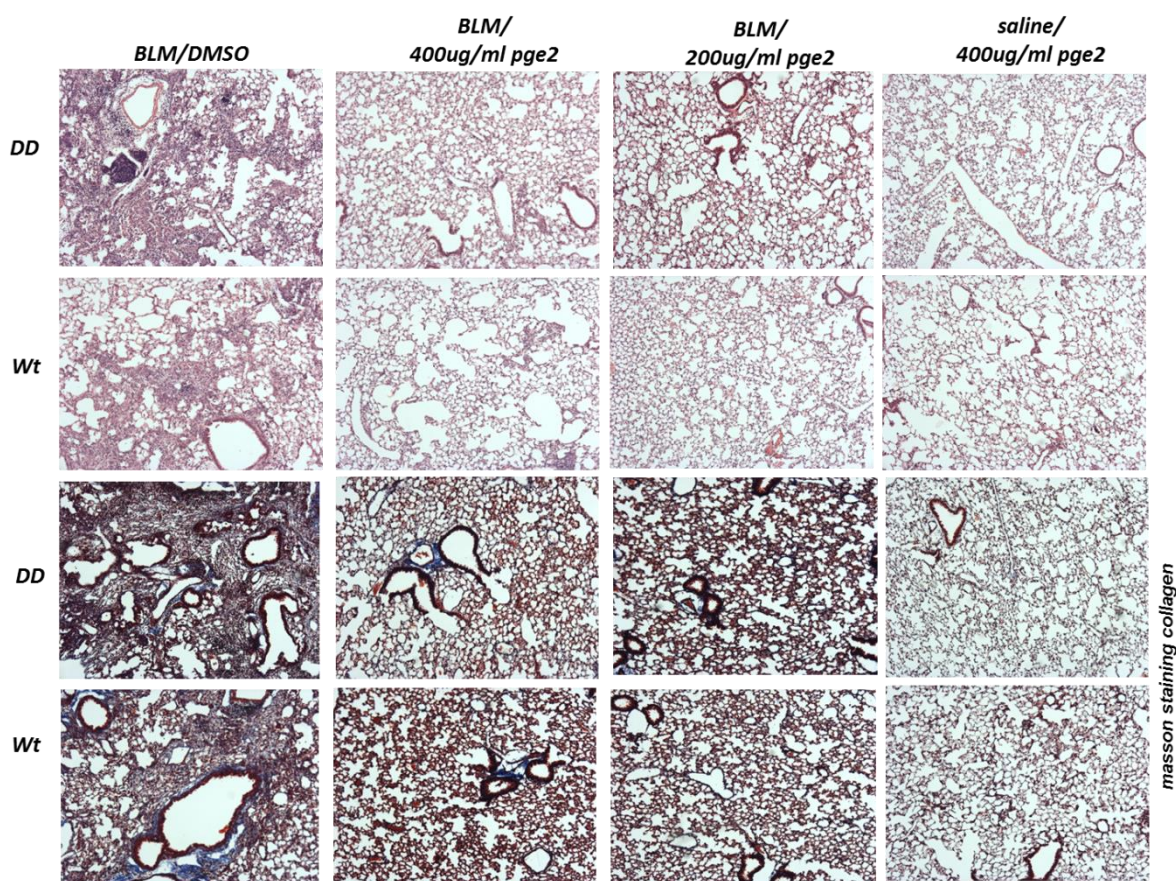
Σχήμα 3.29. Ποσοτικός προσδιορισμός συνολικής πρωτεΐνης στο βρογχοκυψελιδικό υγρό πλύσης (BALF).



Σχήμα 3.30. Ποσοτικός προσδιορισμός διαλυτού κολλαγόνου στο βρογχοκυψελιδικό υγρό πλύσης (BALF).

Όπως απεικονίζεται στο σχήμα 3.29, η ποσότητα της συνολικής πρωτεΐνης στις πειραματικές ομάδες μεταβάλλεται σημαντικά. Η καταστροφή του πνευμονικού ιστού και η διαπερατότητα του πνευμονικού επιθηλίου είναι εκτεταμένη και ανεξάρτητη του γονοτύπου. Τα αποτελέσματα αυτά συσχετίζονται με την ποσότητα του διαλυτού κολλαγόνου, όπως φαίνεται στο σχήμα 3.30, τα οποία παραμένουν υψηλά και στις ομάδες $TPL2^{-/-}$ (DD) και την ομάδα $TPL2^{+/+}$ (Wt), στις οποίες έχει χορηγηθεί μπλεομυκίνη-DMSO, ενώ στατιστικά σημαντική μείωση παρατηρείται στις αντίστοιχες ομάδες στις οποίες έχει χορηγηθεί μπλεομυκίνη-PGE2.

Παρατηρήθηκε μια αύξηση στην ποσότητα συνολικής πρωτεΐνης ($p < 0.05$) και κολλαγόνου ($p < 0.01$) του BALF, με στατιστικά σημαντική διαφορά της ομάδας $TPL2^{-/-}$ (DD) από την ομάδα $TPL2^{+/+}$ (Wt) χορηγηθεί μπλεομυκίνη-DMSO).



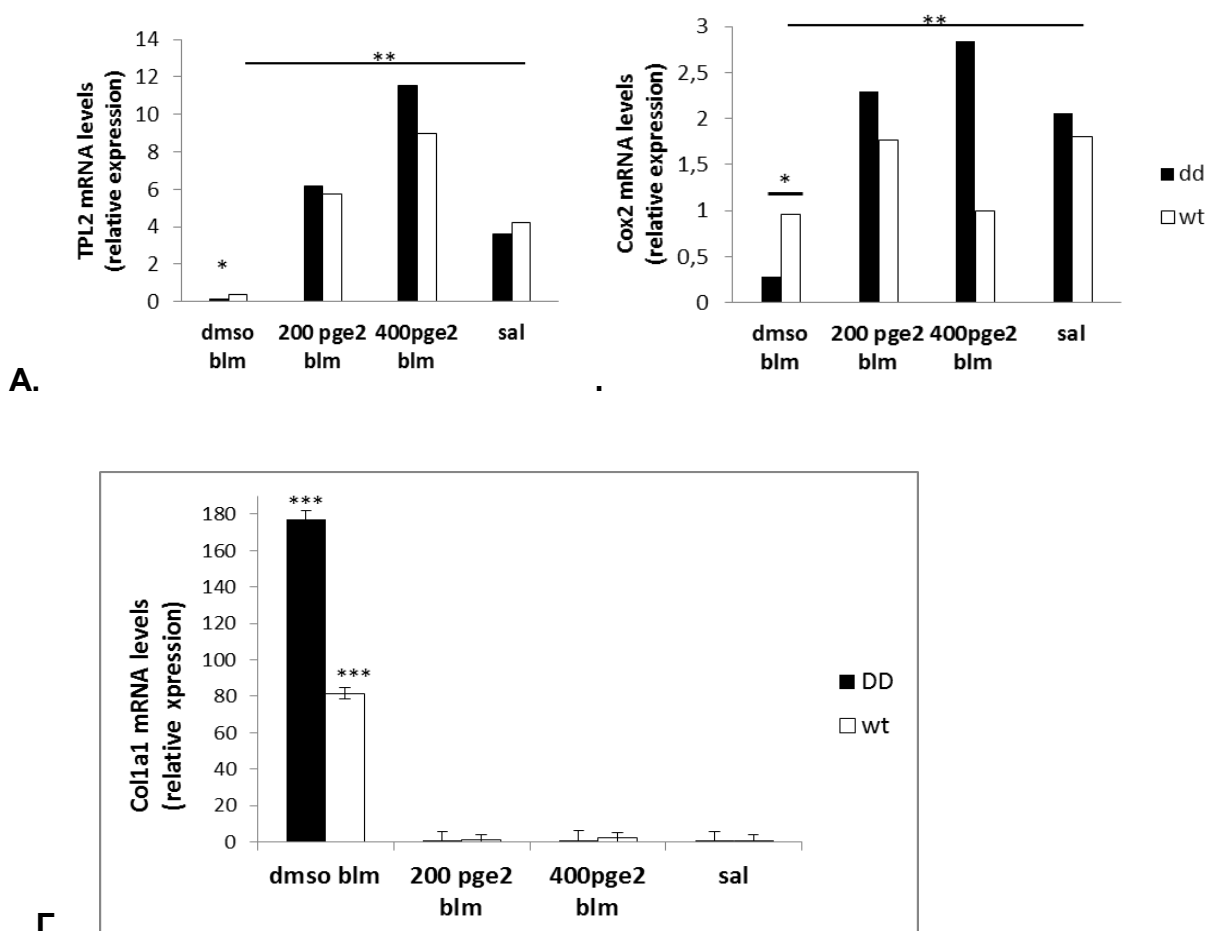
Σχήμα 3.31. Φωτογραφίες από τομές πνεύμονα μετά από χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης (x10 μεγέθυνση) και μετά από τριχρωματική χρώση Masson (x10 μεγέθυνση).

Στο σχήμα 3.31. φαίνονται τομές παραφιντοποιημένων ιστών πνεύμονα από τις ομάδες $TPL2^{-/-}$ (DD), από την ομάδα $TPL2^{+/+}$ (Wt) και τις αντίστοιχες ομάδες, στις οποίες έχει χορηγηθεί PGE2 ή φυσιολογικός ορός μετά από χρώση αιματοξυλίνης-

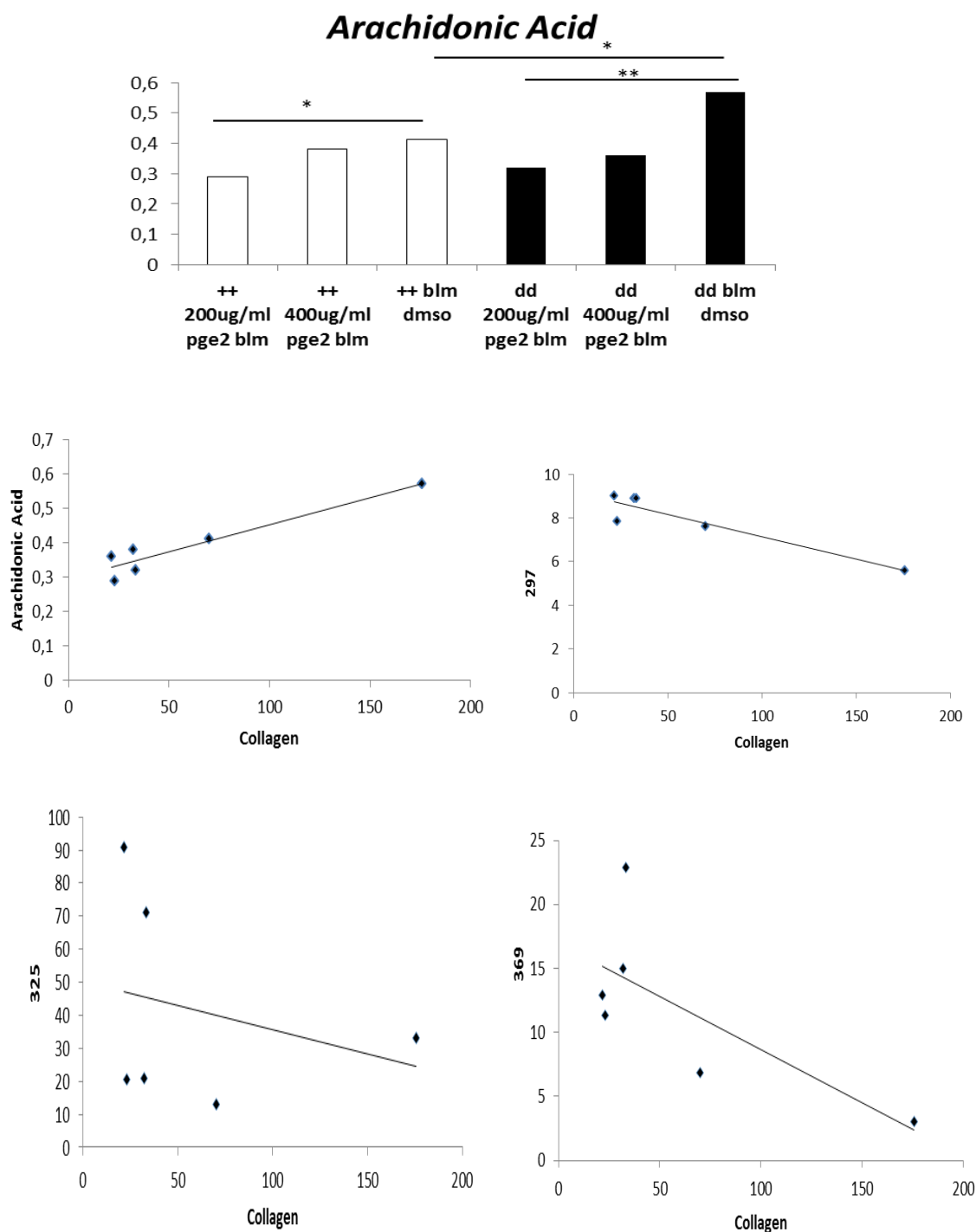
ηωσίνης (πάνω σειρά) και τομές ιστών μετά από τριχρωματική χρώση Masson (κάτω σειρά).

Παρατηρείται εικόνα μη φυσιολογικού ινωτικού ιστού, με την αλλοίωση της αρχιτεκτονικής δομής του πνεύμονα στα $TPL2^{-/-}$ περισσότερο και λιγότερο στα wt, ενώ στις αντίστοιχες ομάδες στις οποίες έχει χορηγηθεί PGE2 ή/και φυσιολογικός ορός, η αρχιτεκτονική δομή του πνεύμονα φαίνεται φυσιολογική δίχως ινωτικές μάζες.

Σε αντιστοιχία με τα παραπάνω, μετά από τριχρωματική χρώση Masson παρατηρείται 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 στα $TPL2^{-/-}$ περισσότερο και λιγότερο στα wt.



Σχήμα 3.32 **A.** Ποσοτικοποίηση έκφρασης γονιδίου *TPL2*, **B.** Ποσοτικοποίηση έκφρασης γονιδίου *COX-2*. **Γ.** Ποσοτικοποίηση έκφρασης γονιδίου *Col1a1*.



Σχήμα 3.33. Έκφραση υποστρώματος της COX-2 (αραχιδονικού οξέος) και άλλων μεταβολιτών της PGE2(297,325,369).

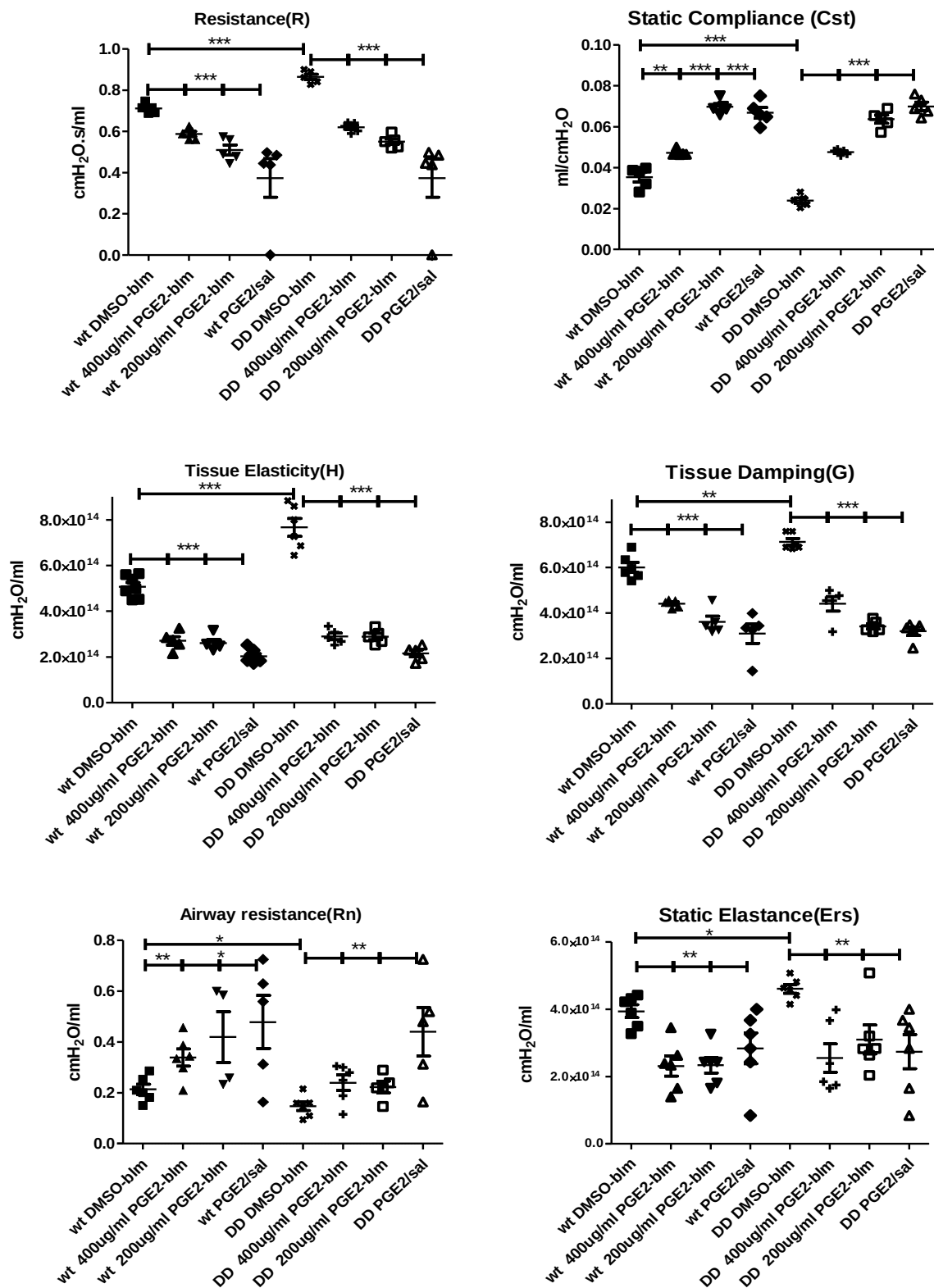
Η TPL2 ελέγχει την έκφραση COX-2 και την έκκριση PGE2 σαν απόκριση διαφορετικών φλεγμονωδών μεσολαβητών. Όπως παρατηρούμε στο παραπάνω σχήμα 3.32, τα ποντίκια των ομάδων TPL2^{-/-} (DD) από την ομάδα TPL2^{+/+}(Wt) φαίνεται

να εκφράζουν στατιστικά σημαντικά λιγότερο ($p < 0.05$) τα γονίδια TPL2 και COX2 (σχήμα 5.13C) μεταξύ τους (~4 φορές), αλλά και συγκριτικά με αντίστοιχες ομάδες στις οποίες έχει χορηγηθεί PGE2 και φυσιολογικός ορός ($p < 0.01$).

Το αραχιδονικό οξύ στην ομάδα, στην οποία έχει χορηγηθεί φυσιολογικός ορός, αντικατοπτρίζει πολύ καλά τα επίπεδα COX-2. Πιο συγκεκριμένα μετά από ανάλυση BALF με φασματογραφία μαζας, παρατηρείται μειωμένη έκφραση TPL2 στις ομάδες στις οποίες έχει χορηγηθεί BLM-DMSO (Wt) ($p < 0.05$) σε σχέση με τις ομάδες που έχει χορηγηθεί BLM-PGE2 (ή φυσιολογικός ορός ($p < 0.01$), μειωμένη έκφραση COX-2, αυξημένη έκφραση του υποστρώματος της COX-2 (αραχιδονικό οξύ).

Τέλος, παρατηρείται να αυξάνονται τα επίπεδα του αραχιδονικού οξέος με την αύξηση του κολλαγόνου. Όπως έχει αναφερθεί, οι μεταβολίτες της PGE2 μειώνονται με την αύξηση του κολλαγόνου.

Καθώς, η μη εξωγενής χορήγηση PGE2 οδηγεί σε επιδείνωση της νόσου, αυτό υποδηλώνει ότι η PGE2 διαδραματίζει προστατευτικό ρόλο στην παθογένεια της πνευμονικής ίνωσης.



Σχήμα 3.34. Αποτελέσματα μετρήσεων μηχανικών παραγόντων πνεύμονα.

Στο σχήμα 3.34 παρουσιάζονται οι μετρήσεις των μηχανικών παραγόντων φυσιολογικών ιστών (ομάδα ελέγχου) και ιστών με ίνωση, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν στο μηχάνημα flexivent. Συγκεκριμένα, αυτές οι διαφορές παρατηρούνται στα ποντίκια των ομάδων TPL2^{-/-} (DD), στις οποίες έχει χορηγηθεί BLM-DMSO συγκριτικά με τις αντίστοιχες ομάδες στις οποίες έχει χορηγηθεί BLM-DMSO (Wt) ($p < 0.05$) ή BLM-PGE2(wt /DD) ($p < 0.01$).

Εξωγενής χορήγηση PGE2 έχει προστατευτική δράση στα ποντίκια έναντι την IPF.

Συζήτηση-Συμπεράσματα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη για πρώτη φορά εμπλέκει την κινάση TPL-2 στην παθογένεια Ιδιοπαθούς Πνευμονικής ίνωσης *in vivo*. Η TPL-2 εμπλέκεται σε μια πληθώρα οδών σηματοδότησης και ενεργεί με άλλες κινάσες και μόρια σηματοδότησης. Ένας κύριος ρόλος της TPL2 είναι στην ενεργοποίηση της οδού ERK / MAPK μέσω της άμεσης φωσφορυλίωσης της MEK, μιας εξωκυτταρικής κινάσης. Αντίθετα, σε ορισμένα μοντέλα ασθενειών, η ανεπάρκεια TPL2 επιδεινώνει την φλεγμονώδη απόκριση [86]. Οι ποικίλες και συχνά αντιφατικές επιδράσεις της TPL2 μπορεί να οφείλονται στη χρήση διαφορετικών κινασών και οδών μεταγωγής σήματος σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων. Παρόμοια αντιφατικά δεδομένα, σχετικά με το ρόλο της TPL2 στην μεταγωγή ογκογόνου σήματος υπάρχουν στη βιβλιογραφία. Ο Γκιρτζιμανάκης και οι συνεργάτες του απέδειξαν μια λειτουργία καταστολής όγκου της TPL2 στον καρκίνο του πνεύμονα [87]. Ωστόσο, αντίθετα, αυξημένα επίπεδα TPL2 έχουν αναφερθεί σε διάφορους τύπους όγκων [88-90]. Στην παρούσα μελέτη, βρέθηκε ότι η έκφραση της TPL2 αυξήθηκε στους ινωτικούς πνεύμονες των ασθενών με ΙΠΙ (IPF) προτείνοντας το ρόλο στην παθογένεια της πνευμονικής φλεγμονής και ίνωσης. Η έκφραση της TPL2 δείχθηκε να είναι αναγκαία για την ανάπτυξη/εξέλιξη της νόσου στο πειραματικό μοντέλο της νόσου, όπως φάνηκε σε ποντίκια *Tpl2^{+/-}* (άγριου-τύπου), τα οποία προστατεύονται.

Η ΙΙΡ είναι μια ετερογενής ομάδα ασθενειών που συνίσταται από επτά διακριτά κλινικά και παθολογικά χαρακτηριστικά. Η ΙΠΙ αποτελεί την πιο συνηθισμένη μορφή ΙΙΡ, παρουσιάζοντας την ίδια χειρότερη πρόγνωση με την NSIP, ενώ και στις δυο οι ασθενείς δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία με κορτικοστεροειδή. Από την άλλη πλευρά, η κυτταρική NSIP και η COP παρουσιάζουν μια ευνοϊκότερη πορεία και ανταπόκριση στη θεραπεία. Η TPL2 βρέθηκε να είναι σταθερά μειωμένη σε ασθενείς με ΙΠΡ, NSIP και UIP σε σύγκριση με τα δείγματα μάρτυρες, υποδεικνύοντας ένα ρόλο για την TPL2 στην παθογένεια της νόσου. Επιπλέον, τα διακριτά προφίλ έκφρασης TPL2 σε διάφορους τύπους ΙΙΡs μπορεί να εξηγούν διαφορές στην πρόοδο της νόσου και στην ανταπόκριση της θεραπείας. Για να αναλύσουμε τον πιθανό ρόλο της TPL2 στην πνευμονική φλεγμονή και την ίνωση,

χρησιμοποιήσαμε το ζωικό μοντέλο της BLM, μια πειραματική προσέγγιση της ανθρώπινης ασθένειας.

Για να αποσαφηνιστεί κατά πόσον η TPL2 συμβάλλει στην εξέλιξη της νόσου μέσω των αιμοποιητικών ή μη αιματοποιητικών κυττάρων, αξιολογήσαμε χιμαιρικά ποντίκια στα οποία $TPL2^{+/+}$ ή $TPL2^{-/-}$ κύτταρα μυελού των οστών μεταφέρθηκαν είτε σε ακτινοβολημένους αποδέκτες $TPL2^{-/-}$ ή $TPL2^{+/+}$. Τα ποντίκια $TPL2^{+/+}$, στα οποία χορηγήθηκαν αιμοποιητικά κύτταρα $TPL2^{-/-}$ ($TPL2^{-/-}$ σε WT), εμφάνισαν σημαντικά αυξημένη, τόσο φλεγμονή όσο και ίνωση, όπως παρατηρήθηκε από την ιστολογία, τον αριθμό φλεγμονωδών κυττάρων και τα επίπεδα κολλαγόνου σε σχέση με τις υπόλοιπες πειραματικές ομάδες. Αυτά τα δεδομένα αποδεικνύουν ότι η σηματοδότηση TPL2 σε ανθεκτικά στην ακτινοβολία μη αιματοποιητικά κύτταρα είναι απαραίτητη για τον περιορισμό της πνευμονικής ίνωσης.

Η ίνωση που προκαλείται από φλεγμονή χαρακτηρίζεται ως μια συντονισμένη και συχνά απορρυθμισμένη απόκριση επούλωσης τραύματος που περιλαμβάνει μια ποικιλία μεταναστευτικών λευκοκυττάρων που ενεργοποιούν το στρώμα. Η TPL2 εκφράζεται τόσο σε λευκοκύτταρα όσο και στο στρώμα και ως εκ τούτου η ταυτοποίηση του τόπου, όπου η TPL2 ρυθμίζει την διαδικασία ίνωσης ήταν σημαντική για να προσδιορίσουμε τον τρόπο ρύθμισης της TPL2 στην ίνωση. Από παλαιότερες μελέτες έχει προταθεί ότι οι αυξημένες οξείες αντιδράσεις TH_2 στα $TPL2^{-/-}$ ποντίκια οφείλονταν στον ενδογενή ρόλο των T κυττάρων για το TPL-2, [91] που ωστόσο αυτό δεν μελετήθηκε *in vivo*.

Επιπλέον, η επιδείνωση της ηπατικής ίνωσης που παρατηρήθηκε στα $TPL2^{-/-}$ ποντίκια δεν παρατηρήθηκε σε ποντίκια με ειδική εξάλειψη της TPL2 από τα T κύτταρα και έδειξε ότι η ενδογενής TPL2 των T κυττάρων δεν είχε επίδραση στην τύπου-2-διαμεσολαβούμενη φλεγμονή ή ίνωση σε αυτά συστήματα.

Η TPL2 έχει μελετηθεί εκτεταμένα στην κλασσική ενεργοποίηση μακροφάγων (CA, M1-MΦ) μέσω του TLR. Ωστόσο, δεν ήταν σαφές εάν η TPL2 συμβάλλει στη διαφοροποίηση του M2-MΦ. Έχει φανεί ότι τα M2-MΦ είναι κεντρικοί ρυθμιστές της φλεγμονής, της επούλωσης των πληγών και της ίνωσης μετά από σχιστοσωμική μόλυνση [92]. Επίσης, τα M2-MΦ είναι γνωστό ότι παρέχουν προλίνη για τη σύνθεση του κολλαγόνου και παράγουν μια ποικιλία από προ-ινωτικούς παραγόντες για την προαγωγή της επούλωσης πληγών, εναπόθεση κολλαγόνου και αν είναι απορρυθμισμένα, προκαλούν ινωτικές ουλές [93].

Παρατηρήσαμε αυξημένη έκφραση των προ-ινωτικών γονιδίων (COL1A1) σε *LysMCre^{+/-} TPL2^{FL/FL}*, η οποία μπορεί να εξηγήσει την αυξημένη ίνωση που παρατηρήθηκε σε ποντίκια *TPL2^{-/-}*. Ο μηχανισμός της μεσολαβούμενης ρύθμισης των προ-ινωτικών γονιδίων από TPL2, δεν είναι πλήρως κατανοητός. Πρόσφατα, αναφέρθηκε ότι η TPL2 ρυθμίζει την παραγωγή αυξητικού παράγοντα ηπατοκυττάρων (HGF) σε ινοβλάστες [94], εν μέρει, μειώνοντας την ευαισθησία στον TGFβ. Στην εξαρτώμενη από IL-13 ίνωση, ο TGFβ μπορεί να αναστείλει μερικές προ-ινωτικές οδούς [95]. Από τα παραπάνω συνάγεται ότι οι αυξημένες αποκρίσεις των T_{H2} κυττάρων συνδέονται με την επιδείνωση της ηπατικής και πνευμονικής ίνωσης που παρατηρήθηκε στα ποντίκια *TPL2^{-/-}*. Πράγματι, η ειδική εξάλλιψη της TPL2 σε *LysM*-κύτταρα με φαινότυπο *TPL2^{-/-}* ποντικών, είχε ως αποτέλεσμα την αυξημένη T_{H2} φλεγμονή και ίνωση μετά από χορήγηση μπλεομυκίνης, σε σύγκριση με τα *TPL2^{+/+}* ποντίκια. Το σύστημα *LysMCre* εμφανίζεται να διαγράφει αποτελεσματικά τα floxed αλληλόμορφα σε μόνιμα μακροφάγα-ΜΦ του ιστού [96-97]. Η επιδεινούμενη ανοσοπαθολογία που παρατηρείται σε *LysMCre^{+/-} TPL2^{FL/FL}* ποντίκια υποδηλώνει ότι η TPL2 μπορεί να έχει μια σημαντική λειτουργία στα μόνιμα ΜΦ του ιστού, σε σχέση με τα νεοεμφανιζόμενα μυελοειδή κύτταρα στα οποία μπορεί να μην έχει απαλειφθεί αποτελεσματικά TPL2.

Έχει αναφερθεί, ότι η προσταγλανδίνη E2 (PGE2) είναι ένας ισχυρός αναστολέας του πολλαπλασιασμού των ινοβλαστών, της σύνθεσης κολλαγόνου και της διαφοροποίησης του ινοβλάστη σε μυοίνοβλάστη. Βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL) από ασθενείς με ΙΠΙ έχει βρεθεί να περιέχει 50% λιγότερη PGE2 από φυσιολογικά άτομα. Επιπλέον, τα κυψελιδικά μακροφάγα και ινοβλάστες παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα να παράγουν PGE2 *in vitro*. Η αποτυχία της σύνθεσης της PGE2 έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται με μια μειωμένη ικανότητα ρύθμισης της κυκλοοξυγενάσης 2 (COX-2), αντιστρέφοντας σημαντικά τη μείωση της σύνθεσης PGE2 που επάγεται από τη μπλεομυκίνη. Οι έως τώρα μελέτες υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η PGE2 έχει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της αποκατάστασης του ιστού του πνεύμονα και κατ'επέκταση την αντιμετώπιση της πνευμονικής ίνωσης. Η PGE2 αναστέλλει τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών σε απόκριση σε διάφορα μιτογόνα ερεθίσματα και καταργεί την παραγωγή κολλαγόνου που προκαλείται από τον παράγοντα

TGF-β. Επιπλέον, οι ινωτικοί ινοβλάστες εμφανίζουν μια αξιοσημείωτη μείωση στην ικανότητα τους να υπερεκφράζουν την PGE2 αποκρινόμενοι στον TGF-β, με επακόλουθη απώλεια της αντιπολλαπλασιαστικής απάντησης στον TGF-β, μέσω της PGE2. Επιπλέον, τα επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα είναι μια σημαντική πηγή της PGE2 και η ικανότητα τους να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών σχετίζεται με την ικανότητά τους να παράγουν PGE2. Φαίνεται ότι αυτές οι αλλαγές είναι σημαντικές στον μετασχηματισμό του ινοβλάστη από ένα σχετικά παθητικό κύτταρο σε ένα κρίσιμο συστατικό της παθογένειας IPP.

Η σημασία της COX-2 ως προστατευτικού διαμεσολαβητή πνευμονικής ίνωσης έχει αποδειχθεί τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*. Η COX-2 είναι η κύρια πηγή της PGE2 που συντίθεται από τα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα. Η αποτυχία της σύνθεσης της PGE2 από τους ινοβλάστες και γενικότερα από τον πνευμονικό ιστό ασθενών με IPF έχει φανεί να σχετίζεται με μειωμένη ικανότητα να υπερεκφράζουν την COX-2.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας φάνηκε ό,τι η εξωγενής χορήγηση της PGE2 μείωσε την φλεγμονή που προκαλείται από μπλεομυκίνη, όπως υποδεικνύεται από τη χαμηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη στο βρογχοκυψελιδικό υγρό BALF. Επίσης, η εναπόθεση κολλαγόνου που επάγεται από τη μπλεομυκίνη αναστέλλεται από την PGE2, όπως φαίνεται από μια δοκιμασία ανίχνευσης διαλυτού κολλαγόνου στο BALF, αλλά και από τη βελτίωση των μορφολογικών αλλαγών του πνεύμονα. Μείωση της έκφρασης της COX-2 από τη μπλεομυκίνη παρατηρήθηκε στις 15 ημέρες έπειτα από χορήγηση της PGE2.

Η εξωγενής χορήγηση της PGE2 ήταν ικανή να σώσει τους ποντικούς από πνευμονική ίνωση επαγόμενη από τη μπλεομυκίνη [98] και από παχέος εντέρου ίνωση επαγόμενη από TNBS [99]. Εικάζεται ότι υπάρχει μια τροποποιημένη ισορροπία μεταξύ του TGF-β και της PGE2 στην ίνωση, όπως έχει βρεθεί ο TGF-β να μειώνει την έκφραση της COX-2 και την παραγωγή της PGE2 [100]. Ο Ρούλης και οι συνεργάτες του δείχνουν ότι η IBD που σχετίζεται με την TPL2 εκφράζεται σε μυοϊνοβλάστες του παχέος εντέρου και μετά από εντερική βλάβη απαιτείται για έμφυτη ανοσοαπόκριση και επακόλουθη ενεργοποίηση της οδού COX-2 που αποκαθιστά την επιθηλιακή ακεραιότητα. Ενδιαφέρον, η αυξημένη ευαισθησία των ποντικών, που στερούνται TPL2 στους μυοϊνοβλάστες, σε βλάβη από κολίτιδα,

μπορεί να αντιστραφεί με εξωγενή χορήγηση ενός σταθερού αναλόγου της PGE₂. Έτσι, τα αναφερόμενα ευρήματα μπορεί να υποδηλώνουν μια απλή προσέγγιση για την αποκατάσταση της ακεραιότητας του βλεννογόνου στην IBD [101].

Μολονότι η ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των ινοβλαστών, η εναπόθεση κολλαγόνου τύπου I, η διαφοροποίηση μυοϊνοβλάστη, μπορεί να είναι η πιο σημαντική απάντηση των μεσεγχυματικών κυττάρων σε επιθηλιακά, καθώς και η σηματοδότηση του ανοσοποιητικού για την αποφυγή ίνωσης επιτρέπουν την επιτυχή αναγέννηση οργάνων, διάφορες άλλες αμοιβαίες αλληλεπιδράσεις μεταξύ μακροφάγων και ινοβλαστών έχουν βρεθεί. Στο εντερικό τοίχωμα οι ενεργοποιημένοι ινοβλάστες εκφράζουν την χημειοτακτική πρωτεΐνη μονοκυττάρων 1 για την πρόσληψη μακροφάγων και οι μυοϊνοβλάστες βοηθούν στον έλεγχο της ενεργοποίησης των μονοκυττάρων απελευθερώνοντας την προσταγλανδίνη E₂ [101]. Εκτός από τον άμεσο ρόλο στην ίνωση, τα περικοκύτταρα τόσο στο δέρμα όσο και στους πνεύμονες είναι επίσης σημαντικά στην πρόσληψη και διατήρηση μακροφάγων και άλλων φλεγμονωδών μεσολαβητών [102]. Άλλες οδοί χημειοκίνης/κυτοκίνης και μικροί παράγοντες σηματοδότησης με τους οποίους τα μεσεγχυματικά κύτταρα επηρεάζουν τις δραστηριότητες μακροφάγων και άλλων ανοσοκυττάρων έχουν αναθεωρηθεί λεπτομερώς. Ένας άλλος μηχανισμός αυτής της αμοιβαίας αλληλεπίδρασης, η τροποποίηση του κολλαγόνου τύπου I στην ECM από μια πεπτιδάση προερχόμενη από ινοβλάστες, έχει δείχθει ότι αυξάνει την προσκόλληση μακροφάγων και τη δραστηριότητα τοπικά.

Όπως συμβαίνει με πολλά μοντέλα θηλαστικών αναγέννησης οργάνων, οι μεταβαλλόμενοι φαινοτύποι και οι ρυθμιστικές δραστηριότητες/ιδιότητες τοπικών μακροφάγων και ινοβλαστών είναι πιθανόν να διαδραματίσουν διάφορους ρόλους στην επίλυση των αρχικών φλεγμονωδών διεργασιών και στη ρύθμιση των συνθηκών που απαιτούνται για τη μορφολογική αναγέννηση. Γεγονός που υπογραμμίζει την απαίτηση να ρυθμίζονται αυστηρά ο πολλαπλασιασμός και η γονιδιακή δραστηριότητα σε αυτά τα κύτταρα, τουλάχιστον εν μέρει από παράγοντες προερχόμενους από μακροφάγα, για την πρόληψη της ίνωσης και να παρέχουν κατάλληλο πλαίσιο για την ανάπτυξη και ανάπτυξη άλλων κυτταρικών γραμμών κατά την αναγέννηση.

Η TPL2-COX-2-PGE2 οδός παρουσιάζει υψηλής σημασίας φαρμακολογικό ενδιαφέρον για την IPF με στρατηγικές που στοχεύουν είτε σε αναστολή της ως μέσο για να αμβλύνουν τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις [103] ή την ενεργοποίηση της ως μέσο για την προώθηση των επούλων πληγών και της ίνωσης [104,105].

Η συσσώρευση μεταλλάξεων στον άξονα TPL2-Cox-2-PGE2 προβλέπεται να αυξήσει τον κίνδυνο για την παθογένεση της IPF και επίσης να αποτρέψει την αποτελεσματικότητα των θεραπειών που στοχεύουν αυτά τα μόρια ως φλεγμονώδεις μεσολαβητές. Ο προσδιορισμός των ακριβών γενετικών παραλλαγών που διέπουν αυτές τις ενώσεις θα είναι ουσιαστικής σημασίας για την διαστρωμάτωση/χαρακτηρισμό των ασθενών.

Ανακεφαλαιώνοντας:

- Μειωμένη έκφραση του γονιδίου TPL2 στους ασθενείς με IPF
- Αυξημένη ίνωση στα ποντίκια με ειδική απαλοιφή του γονιδίου TPL2 συγκριτικά με τα ποντίκια αγρίου τύπου έπειτα από έγχυση με μπλεομυκίνη (BLM)
- Απαραίτητη η έκφραση της TPL2 στα αιμοποιητικά κύτταρα στον περιορισμό της IPF.
- Η γενετική απαλοιφή της TPL2 μακροφάγα αυξάνει την επιδείνωση της Πνευμονικής Ίνωσης.
- Εξωγενής χορήγηση PGE2 έχει προστατευτική δράση στα ποντίκια έναντι την IPF.

Περίληψη/Summary

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι δυσλειτουργίες που προκύπτουν (πχ καρκίνος, φλεγμονή) είναι πλειοτροπικές, αλλά τα μονοπάτια των κινασών που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (Mitogen Activated Protein Kinases) φαίνεται να παίζουν εξέχοντα ρόλο. Το πρωτο-ογκογονίδιο TPL2/Cot κωδικοποιεί μια πρωτεϊνική κινάση σερίνης-θρεονίνης, η οποία ανήκει στις MAPK κινάσες. Η TPL2/COT είναι μία MAP3K8 κινάση σερίνης/θρεονίνης στο σταυροδρόμι πολλών και διαφορετικών μονοπατιών σηματοδότησης που ελέγχουν πρωτεύουσας σημασίας κυτταρικές διεργασίες, όπως η κυτταρική αύξηση, πολλαπλασιασμός διαφοροποίηση, μετανάστευση και απόπτωση. Συγκεκριμένα, η κινάση TPL2 (ή MAP3K8) όταν εκφράζεται αναδιαταγμένη (κολοβωμένη) στο καρβοξυτελικό της άκρο σε διαγονιδιακά ποντίκια προκαλεί την ανάπτυξη T-λεμφοβλαστικών λεμφωμάτων, ενώ και η υπερέκφραση της φυσικής πρωτεΐνης είναι ογκογόνος. Στον άνθρωπο έχει βρεθεί υπερέκφραση σε λέμφωμα Hodgkin's, σε ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα και σε καρκίνο του μαστού, ενώ πρόσφατα βρέθηκε μετάλλαξη που αναδιατάσσει το 3' άκρο του γονιδίου σε καρκίνο του πνεύμονα. Στις φυσιολογικές της λειτουργίες συμπεριλαμβάνεται συμμετοχή στην ενεργοποίηση T-λεμφοκυττάρων, αλλά και στην παραγωγή IL-2 από T-λεμφοκύτταρα. Αναστέλλει τη ρυθμιστική πρωτεΐνη του κυτταρικού κύκλου p27^{kip} και κινητοποιεί διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες που διεγείρουν την παραγωγή κυττοκινών, όπως η IL-2 που επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Συμμετέχει ακόμη στην παραγωγή TNF-α από μακροφάγα, καθώς και στην διαβίβαση σημάτων που προέρχονται από την επίδραση TNF-α και CD40 σε μακροφάγα και B-λεμφοκύτταρα. Η αναδιαταγμένη μορφή της φαίνεται πως είναι πολύ πιο δραστική. Παρά τις αρχικές που οδήγησαν στην ταυτοποίηση της TPL2 ως μεσολαβητή του σηματοδοτικού μονοπατιού LPS/TLR4 και τη μέχρι σήμερα βιβλιογραφία για τις λειτουργίες της ERK κινάσης στην ίνωση, προσδιορίστηκε ότι η TPL2 ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται σε διεργασίες κατά της ίνωσης στο ήπαρ. Όπως έχει φανεί, η εκφραζόμενη από το ογκογονίδιο πρωτεΐνη ενεργοποιείται μετά από αποκοπή του καρβοξυτελικού άκρου σε πειραματικά μοντέλα των ποντικών και αρουραίων. Όμως, ο λεπτομερής χαρακτηρισμός της έκφρασης και της λειτουργίας της

TPL2/COT στον καρκίνο στον άνθρωπο απουσιάζει και ο ρόλος της στην ίνωση δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένος.

Ένας από τις τρεις μεγάλους ανθρώπινους ιστούς, όπου η TPL2 εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα είναι ο πνεύμονας. Η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση (IPF) είναι μια χρόνια, προοδευτική, ινώδης μορφή διάχυτης πνευμονικής νόσου που εμφανίζεται κυρίως σε ενήλικες μεγαλύτερης ηλικίας και χαρακτηρίζεται από προοδευτική επιδείνωση της πνευμονικής λειτουργίας και κακή πρόγνωση. Μέχρι σήμερα, καμία προσέγγιση αντιμετώπισης της ασθένειας δεν έχει αποδειχθεί αποτελεσματική.

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο χαρακτηρισμός του ρόλου και των μηχανισμών που ρυθμίζουν την έκφραση της TPL2 στην ανάπτυξη της IPF. Στο πλαίσιο αυτό, δείχτηκε ο ρόλος της TPL2 ως καταστολέας της IPF στην έκφρασή της στους ινωτικών πνευμόνων στο ζωικό μοντέλο και διαπιστώθηκε η μειωμένη έκφρασή της.

Δοκιμάζοντας μια ευρεία γκάμα στόχων από 15 διαθέσιμες στη βιβλιογραφία βάσεις δεδομένων Gene Expression Omnibus (GEO) και EMBL-EBI Array Express, βρέθηκε χαμηλή έκφραση της MAP3K8/TPL2 κατά την IPF, τη NSIP και το Σκληρόδερμα. Η μετα-ανάλυση στην ευρεία έκφραση γονιδίων Genome Wide αποκάλυψε ότι η MAP3K8 παρουσιάζει συστηματικά χαμηλή έκφραση σε ασθενείς με Ιδιοπαθή διάμεση πνευμονία (IPs). Αυτό υποστηρίζεται και από τα *in vivo* πειραματικά δεδομένα της παρούσας μελέτης που δείχνουν ότι η απαλοιφή του γονιδίου TPL2 σε ποντικούς επιταχύνει δραματικά την έναρξη και την πρόοδο της πνευμονικής ίνωσης, έπειτα από χορήγηση της μπλεομυκίνης (BLM) σε σχέση με ποντικούς άγριου-τύπου (wild-type).

Για να διερευνηθεί κυτταρικός πληθυσμός που εμπλέκται κυρίως με τη δράση της TPL2, χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια LysM-Cre, τα οποία παρουσίασαν μεγαλύτερη ευαισθησία στην ανάπτυξη της IPF.

Για να διαλευκανθεί αν η έκφραση της Tpl2 σε αιμοποιητικά ή μη αιμοποιητικά κύτταρα αρκεί για να περιορίσει την εξέλιξη της νόσου IPF, αξιολογήθηκε η ίνωση, σε χιμαιρικά ποντίκια, στα οποία κύτταρα μυελού των οστών WT ή Tpl2^{-/-} μεταφέρθηκαν σε ακτινοβολημένα ποντίκια παραλήπτες/δέκτες είτε Tpl2^{-/-} ή WT, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η απουσία της TPL2 από τα αιμοποιητικά κύτταρα, συμβάλλει στην εξέλιξη της IPF.

Για να χαρακτηριστεί εάν αν η Tpl2 ελέγχει την ενεργοποίηση της Cox-2 , πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση της έκφρασης της COX-2 σε ιστούς πνεύμονα από TPL2 ^{+/+} και TPL2 ^{-/-} ποντικούς. Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι η έκφραση της COX-2 είναι σημαντικά μειωμένη σε Tpl2 ^{-/-} ποντίκια.

Με σκοπό να αξιολογηθεί *in vivo* η φυσιολογική σημασία της ενεργοποίησης της Cox-2-PGE2 μέσω της TPL2, χορηγήσαμε στα TPL2 ^{+/+} και TPL2 ^{-/-} ποντίκια ταυτόχρονα μπλεομυκίνη (BLM) ή φυσιολογικό ορό (saline) (ομάδα έλεγχου) και 16,16-διμεθυλο PGE2 (dmPGE2), ένα σταθερό ανάλογο της ενδογενούς PGE2. Η εξωγενής χορήγηση PGE2 έδειξε να προστατεύει τα ποντίκια με ειδική εξάλειψη της TPL-2 από την πνευμονική ίνωση.

Ανακεφαλαιώνοντας, οι παραπάνω παρατηρήσεις φανερώνουν ότι η TPL2 μπορεί να προφυλάξει από την πνευμονική ίνωση.

ABSTRACT

The aberrations are pleiotropic, but mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways feature prominently. Tpl2/COT is a serine-threonine MAPK kinase (MAP3K8) at the crossroad of various signal transduction pathways that control fundamental cellular processes such as growth, proliferation, differentiation, migration and apoptosis. Specifically, Tpl2 kinase (or MAP3K8) induces T-lymphoblastic lymphoma growth when expressed in transgenic mice rearranged (truncated) at its C-terminus, while overexpression of the wild type protein is also oncogenic. In humans it has been implicated in Hodgkin's lymphoma, in nasopharyngeal cancer and breast cancer. Recently a 3' end mutation was discovered in lung cancer. Its normal function includes participation in T lymphocyte activation and IL-2 production. It is inhibitory for the cell-cycle regulatory protein p27kip and induces various transcription factors that stimulate cytokine production like IL-2 and promote cell proliferation. Moreover it participates in TNF- α production from macrophages as well as TNF- α and CD40 signaling in macrophages and B-lymphocytes. The truncated kinase seems to be more potent. Despite early studies identifying the importance of Tpl2 as a downstream mediator of LPS/TLR4 signaling and evidence in the literature for functions of ERK in fibrosis, it was determined that Tpl2 regulates the expression of genes regulating fibrogenic processes in the liver. As a proto-oncogene activated by C-terminal truncation in mouse and rat, a detailed evaluation of its expression and function in human malignancy is missing and the physiological role of Tpl2/COT in fibrogenesis remains enigmatic. One of the three major human tissues where Tpl2 is expressed at highest levels is the lung. Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a chronic, progressive, fibrotic form of diffuse lung disease occurring mainly in older adults and characterized by a progressive worsening of lung function and a poor prognosis. To date, no management approach has proven efficacious. The aim of the present study was on the characterization of the role and of the mechanisms regulating the expression of Tpl2 in the IPF development. In this regard, we were able to reveal an unprecedented role for Tpl2 as suppressor of IPF its expression in fibrotic lungs in the animal model, and found it to be down-regulated. *Testing several target molecules within 15 available datasets available from Gene Expression Omnibus (GEO) and EMBL-EBI Array Express data repositories we*

found that MAP3K8/TPL2 specifically was downregulated upon IPF, NSIP and Scleroderma consistently in several datasets tested. or META analysis on Genome Wide expression profiles revealed MAP3K8 consistently downregulated in idiopathic interstitial pneumonias (IIPs) patient datasets. This is supported by our *in vivo* experimental data showing that ablation of the Tpl2 gene in mice dramatically accelerates the onset and multiplicity of BLM -induced lung fibrosis. Tpl2-deficient mice exhibit significant differences in following BLM administration compared with wild-type mice. To examine the cellular basis of the fibrosis-suppressive role of Tpl2, we used lysozyme-Cre (LysM-Cre) mice, conferred a similar susceptibility to IPF development. To examine whether TPL2 functions in hematopoietic cells or the radioresistant nonhematopoietic cells, we generated bone marrow–chimeric mice by adoptively transferring Tpl2^{+/+} or Tpl2^{-/-} bone marrow cells into lethal dose–irradiated Tpl2^{+/+} recipient mice. When reconstituted with either the Tpl2^{+/+} bone marrow or the Tpl2^{-/-} bone marrow, the recipient mice were competent in IPF induction. As a complementary approach, we adoptively transferred Tpl2^{+/+} bone marrow into lethal dose–irradiated Tpl2^{+/+} or Tpl2^{-/-} mice. The results showed that if Tpl2 is disrupted only in hematopoietic cells, its ablation is significant sufficient to induce the IPF enhancement phenotype. To determine whether Tpl2 controls the induction of COX-2, we measured COX-2 mRNA expression/ levels of COX-2 RNA in lungs tissue of Tpl2^{+/+} and Tpl2^{-/-} mice. The results showed that COX-2 induction is significantly lower in Tpl2^{-/-} mice. To assess *in vivo* the physiological significance of Cox-2-PGE₂ activation through Tpl2, we treated Tpl2^{-/-} and Tpl2^{+/+} mice concurrently with bleomycin and 16,16-dimethyl PGE₂(dmPGE₂), a stable analog of endogenous PGE₂, or with saline as a control. Exogenous PGE₂ administration rescues mice with complete or Tpl2 ablation from defects in lung function and susceptibility to fibrosis. Collectively, these observations provide evidence that Tpl2 has a critical prophylactic role in the susceptibility to pulmonary fibrosis.

-

Βιβλιογραφία

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Miyoshi, J., Higashi, T., Mukai, H., Ohuchi, T. and Kakunaga, T., 1991. Structure and transforming potential of the human cot oncogene encoding a putative protein kinase. *Molecular and cellular biology*, **11**(8), 4088-4096.
2. Aoki, M., Hamada, F., Sugimoto, T., Sumida, S., Akiyama, T., and Toyoshima, K., 1993. The human cot proto-oncogene encodes two protein serine/threonine kinases with different transforming activities by alternative initiation of translation. *Journal of Biological Chemistry*, **268**(30), 22723-22732. (με to 8)
3. Chan, A. M., Chedid, M., McGovern, E. S., Popescu, N. C., Miki, T., and Aaronson, S. A., 1993. Expression cDNA cloning of a serine kinase transforming gene. *Oncogene*, **8**(5), 1329-1333.
4. Patriotis, C., Makris, A., Bear, S. E., and Tsichlis, P. N., 1993. Proceedings of the National Academy of Sciences, Tumor progression locus 2 (Tpl-2) encodes a protein kinase involved in the progression of rodent T-cell lymphomas and in T-cell activation. **90**(6), 2251-2255
5. Justice, M. J., Gilbert, B. J., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Buchberg, A. M., Ceci, J. D., Matsuda Y., Chapman V. M., Patriotis C., Makris A., Tsichlis P. N., Jenkins N. A., Copeland N. G., 1992. A molecular genetic linkage map of mouse chromosome 18 reveals extensive linkage conservation with human chromosomes 5 and 18, *Genomics*, **13**, Issue 4, August 1992, Pages 1281-1288
6. Ohara, R., Miyoshi, J., Aoki, M., and Toyoshima, K., 1993. The Murine cot Proto-oncogene: Genome Structure and Tissue-specific Expression. *Cancer Science*, **84**(5), 518-525.
7. Hubbard, T., Andrews, D., Cáccamo, M., Cameron, G., Chen, Y., Clamp, M., Curwen, V., 2005. Ensembl 2005. *Nucleic acids research*, **33**(suppl_1), D447-D453.
8. Patriotis, C., Makris, A., Chernoff, J., and Tsichlis, P. N., Proceedings of the National Academy of Sciences Tpl-2 acts in concert with Ras and Raf-1 to activate mitogen-activated protein kinase., **91**(21), 9755-9759, (1994).
9. Salmeron, A., Ahmad, T. B., Carlile, G. W., Pappin, D., Narsimhan, R. P., and Ley, S. C., 1996. Activation of MEK-1 and SEK-1 by Tpl-2 proto-oncoprotein, a novel MAP kinase kinase kinase. *EMBO J*, **15**(4), 817-826.

10. Chiariello, M., Marinissen, M. J., and Gutkind, J. S., 2000. Multiple mitogen-activated protein kinase signaling pathways connect the cot oncoprotein to the c-junPromoter and to cellular transformation. *Molecular and Cellular Biology*, **20**(5), 1747-1758.
11. Makris, A., Patriotis, C., Bear, S. E., and Tsichlis, P. N., 1993. Genomic organization and expression of Tpl-2 in normal cells and Moloney murine leukemia virus-induced rat T-cell lymphomas: activation by provirus insertion. *Journal of virology*, **67**(7), 4283-4289.
12. Ohara, R., Hirota, S., Onoue, H., Nomura, S., Kitamura, Y., and Toyoshima, K., 1995. Identification of the cells expressing cot proto-oncogene mRNA. *Journal of cell science*, **108**(1), 97-103.
13. Ceci, J. D., Patriotis, C. P., Tsatsanis, C., Makris, A. M., Kovatch, R., Swing, D. A., and Copeland, N. G., 1997. Tpl-2 is an oncogenic kinase that is activated by carboxy-terminal truncation. *Genes and development*, **11**(6), 688-700.
14. Erny, K. M., Peli, J., Lambert, J. F., Muller, V., and Diggelmann, H., 1996. Involvement of the Tpl-2/cot oncogene in MMTV tumorigenesis. *Oncogene*, **13**(9), 2015-2020.
15. Gandara, M. L., Lopez, P., Hernando, R., Castano, J. G., and Alemany, S., 2003. The COOH-terminal domain of wild-type Cot regulates its stability and kinase specific activity. *Molecular and cellular biology*, **23**(20), 7377-7390.
16. Waterfield, M. R., Zhang, M., Norman, L. P., and Sun, S. C. (2003). NF-κB1/p105 regulates lipopolysaccharide-stimulated MAP kinase signaling by governing the stability and function of the Tpl2 kinase. *Molecular cell*, **11**(3), 685-694.
17. Velasco-Sampayo, A., and Alemany, S., 2001. P27kif Protein Levels and E2F Activity Are Targets of Cot Kinase During G1 Phase Progression in T Cells. *The Journal of Immunology*, **166**(10), 6084-6090.
18. Ballester, A., Tobena, R., Lisbona, C., Calvo, V., and Alemany, S., 1997. Cot kinase regulation of IL-2 production in Jurkat T cells. *The Journal of Immunology*, **159**(4), 1613-1618.
19. Rao, A., Luo, C., and Hogan, P. G., 1997. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annual review of immunology*, **15**(1), 707-747.

20. Tsatsanis, C., Patriotis, C., Bear, S. E., and Tsichlis, P. N., 1998. The Tpl-2 protooncoprotein activates the nuclear factor of activated T cells and induces interleukin 2 expression in T cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **95**(7), 3827-3832.
21. Tsatsanis, C., Patriotis, C., and Tsichlis, P. N., 1998. Tpl-2 induces IL-2 expression in T-cell lines by triggering multiple signaling pathways that activate NFAT and NF-κB. *Oncogene*, **17**(20).
22. Lin, X., Cunningham, E. T., Mu, Y., Geleziunas, R., and Greene, W. C., 1999. The proto-oncogene Cot kinase participates in CD3/CD28 induction of NF-κB acting through the NF-κB-inducing kinase and IκB kinases. *Immunity*, **10**(2), 271-280.
23. Das, S., Cho, J., Lambertz, I., Kelliher, M. A., Eliopoulos, A. G., Du, K., and Tsichlis, P. N., 2005. Tpl2/cot signals activate ERK, JNK, and NF-κB in a cell-type and stimulus-specific manner. *Journal of Biological Chemistry*, **280**(25), 23748-23757.
24. Kane, L. P., Mollenauer, M. N., Xu, Z., Turck, C. W., and Weiss, A., 2002. Akt-dependent phosphorylation specifically regulates Cot induction of NF-κB-dependent transcription. *Molecular and cellular biology*, **22**(16), 5962-5974.
25. Belich, M. P., Salmerón, A., Johnston, L. H., and Ley, S. C., 1999. TPL-2 kinase regulates the proteolysis of the NF-κB-inhibitory protein NF-κB1 p105. *Nature*, **397**(6717), 363-368.
26. Eliopoulos, A. G., Davies, C., Blake, S. S., Murray, P., Najafipour, S., Tsichlis, P. N., and Young, L. S., 2002. The oncogenic protein kinase Tpl-2/Cot contributes to Epstein-Barr virus-encoded latent infection membrane protein 1-induced NF-κB signaling downstream of TRAF2. *Journal of virology*, **76**(9), 4567-4579.
27. Eliopoulos, A. G., Wang, C. C., Dumitru, C. D., and Tsichlis, P. N., 2003. Tpl2 transduces CD40 and TNF signals that activate ERK and regulates IgE induction by CD40. *The EMBO Journal*, **22**(15), 3855-3864.
28. Beinke, S., Deka, J., Lang, V., Belich, M. P., Walker, P. A., Howell, S., and Ley, S. C., 2003. NF-κB1 p105 negatively regulates TPL-2 MEK kinase activity. *Molecular and Cellular Biology*, **23**(14), 4739-4752.
29. Beinke, S., Robinson, M. J., Hugunin, M., and Ley, S. C., 2004. Lipopolysaccharide activation of the TPL-2/MEK/extracellular signal-regulated

- kinase mitogen-activated protein kinase cascade is regulated by I κ B kinase-induced proteolysis of NF- κ B1 p105. *Molecular and Cellular Biology*, **24**(21), 9658-9667.
30. Waterfield, M., Jin, W., Reiley, W., Zhang, M., and Sun, S. C., 2004. I κ B kinase is an essential component of the Tpl2 signaling pathway. *Molecular and Cellular Biology*, **24**(13), 6040-6048.
31. Jia, Y., Quinn, C. M., Bump, N. J., Clark, K. M., Clabbers, A., Hardman, J., and Allen, H., 2005. Purification and kinetic characterization of recombinant human mitogen-activated protein kinase kinase kinase COT and the complexes with its cellular partner NF- κ B1 p105. *Archives of biochemistry and biophysics*, **441**(1), 64-74.
32. Ballester, A., Velasco, A., Tobeña, R., and Alemany, S., 1998. Cot kinase activates tumor necrosis factor- α gene expression in a cyclosporin A-resistant manner. *Journal of Biological Chemistry*, **273**(23), 14099-14106.
33. Dumitru, C. D., Ceci, J. D., Tsatsanis, C., Kontoyiannis, D., Stamatakis, K., Lin, J. H., and Tschlis, P. N., 2000. TNF- α induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway. *Cell*, **103**(7), 1071-1083.
34. Kontoyiannis, D., Boulougouris, G., Manoloukos, M., Armaka, M., Apostolaki, M., Pizarro, T., and Tschlis, P., 2002. Genetic dissection of the cellular pathways and signaling mechanisms in modeled tumor necrosis factor-induced Crohn's-like inflammatory bowel disease. *Journal of Experimental Medicine*, **196**(12), 1563-1574.
35. Patriotis, C., Russeva, M. G., Lin, J. H., Srinivasula, S. M., Markova, D. Z., Tsatsanis, C., and Tschlis, P. N., 2001. Tpl-2 induces apoptosis by promoting the assembly of protein complexes that contain caspase-9, the adapter protein Tvl-1, and procaspase-3. *Journal of cellular physiology*, **187**(2), 176-187.
36. de Gregorio, R., Iniguez, M. A., Fresno, M., and Alemany, S., 2001. Cot kinase induces cyclooxygenase-2 expression in T cells through activation of the nuclear factor of activated T cells. *Journal of Biological Chemistry*, **276**(29), 27003-27009.
37. Eliopoulos, A. G., Dumitru, C. D., Wang, C. C., Cho, J., and Tschlis, P. N., 2002. Induction of COX-2 by LPS in macrophages is regulated by Tpl2-dependent CREB activation signals. *The EMBO journal*, **21**(18), 4831-4840.

38. Channavajhala, P. L., Wu, L., Cuozzo, J. W., Hall, J. P., Liu, W., Lin, L., and Zhang, Y., 2003. Identification of a novel human kinase supporter of Ras (hKSR-2) that functions as a negative regulator of Cot (Tpl2) signaling. *Journal of Biological Chemistry*, **278**(47), 47089-47097.
39. Takishima, T., 1994. Basic and Clinical aspects of pulmonary fibrosis. CRC Press.
40. KING JR, T. E., Schwarz, M. I., Brown, K., Tooze, J. A., Colby, T. V., WALDRON JR, J. A., and Cherniack, R. M., 2001, Idiopathic pulmonary fibrosis: relationship between histopathologic features and mortality. *American journal of respiratory and critical care medicine*, **164**(6), 1025-1032.
41. Katzenstein, A. L. A., and Myers, J. L., 1998, Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical relevance of pathologic classification. *American journal of respiratory and critical care medicine*, **157**(4), 1301-1315.
42. Chapman, J. T., 2010. Interstitial lung disease.
43. Mueller-Mang, C., Grosse, C., Schmid, K., Stiebellehner, L., and Bankier, A. A. 2007, What every radiologist should know about idiopathic interstitial pneumonias. *Radiographics*, **27**(3), 595-615.
44. Crystal, R. G., Bitterman, P. B., Rennard, S. I., Hance, A. J., and Keogh, B. A., 1984. Interstitial lung diseases of unknown cause: disorders characterized by chronic inflammation of the lower respiratory tract. *New England Journal of Medicine*, **310**(4), 235-244.
45. Scott, J., Johnston, I., and Britton, J., 1990. What causes cryptogenic fibrosing alveolitis? A case-control study of environmental exposure to dust. *Bmj*, **301**(6759), 1015-1017.
46. Coultas, D. B., Zumwalt, R. E., Black, W. C., and Sobonya, R. E., 1994. The epidemiology of interstitial lung diseases. *American journal of respiratory and critical care medicine*, **150**(4), 967-972.
47. Hodgson, U., Laitinen, T., and Tukiainen, P., 2002. Nationwide prevalence of sporadic and familial idiopathic pulmonary fibrosis: evidence of founder effect among multiplex families in Finland. *Thorax*, **57**(4), 338-342.
48. Iwai, K., Mori, T., Yamada, N., Yamaguchi, M., and Hosoda, Y., 1994. Idiopathic pulmonary fibrosis. Epidemiologic approaches to occupational

- exposure. American journal of respiratory and critical care medicine, **150**(3), 670-675.
49. Mannino, D. M., Etzel, R. A., and Parrish, R. G., 1996. Pulmonary fibrosis deaths in the United States, 1979-1991. An analysis of multiple-cause mortality data. American journal of respiratory and critical care medicine, **153**(5), 1548-1552.
50. Johnston, I., Britton, J., Kinnear, W., and Logan, R., 1990. Rising mortality from cryptogenic fibrosing alveolitis. Bmj, **301**(6759), 1017-1021.
51. Hubbard, R., Lewis, S., Richards, K., Britton, J., and Johnston, I., 1996. Occupational exposure to metal or wood dust and aetiology of cryptogenic fibrosing alveolitis. The Lancet, **347**(8997), 284-289.
52. Schwartz, D. A., Helmers, R. A., Galvin, J. R., Van Fossen, D. S., Frees, K. L., Dayton, C. S., and Hunninghake, G. W., 1994. Determinants of survival in idiopathic pulmonary fibrosis. American journal of respiratory and critical care medicine, **149**(2), 450-454.
53. Panos, R. J., Mortenson, R. L., Niccoli, S. A., and King, T. E., 1990. Clinical deterioration in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: causes and assessment. The American journal of medicine, **88**(4), 396-404.
54. Araki, T., Katsura, H., Sawabe, M., and Kida, K. (2003). A clinical study of idiopathic pulmonary fibrosis based on autopsy studies in elderly patients. Internal medicine, **42**(6), 483-489.
55. Coultas, D. B., and Hughes, M. P., 1996. Accuracy of mortality data for interstitial lung diseases in New Mexico, USA. Thorax, **51**(7), 717-720.
56. Selman, M., King, T. E., and Pardo, A., 2001. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. Annals of internal medicine, **134**(2), 136-151.
57. Gauldie, J., Kolb, M., and Sime, P. J., 2001. A new direction in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis?. Respiratory research, **3**(1), 1.
58. Noble, P. W., 2003. Idiopathic pulmonary fibrosis: new insights into classification and pathogenesis usher in a new era in therapeutic approaches. American journal of respiratory cell and molecular biology, **29**(3), S27.
59. Keogh, B. A., and Crystal, R. G., 1982. Alveolitis: the key to the interstitial lung disorders. Thorax, **37**(1), 1.

60. Merrill, W. W., and Reynolds, H. Y., 1983. Bronchial lavage in inflammatory lung disease. *Clinics in chest medicine*, **4**(1), 71-84.
61. Rothwell, N. J., and Luheshi, G. N., 2000. Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. *Trends in neurosciences*, **23**(12), 618-625.
62. Lucas, S. M., Rothwell, N. J., and Gibson, R. M., 2006. The role of inflammation in CNS injury and disease. *British journal of pharmacology*, **147**(S1).
63. Strieter, R. M., Gomperts, B. N., and Keane, M. P., 2007. The role of CXC chemokines in pulmonary fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*, **117**(3), 549.
64. Antoniou, K. M., Alexandrakis, M. G., Siafakas, N. M., and Bouros, D., 2005. Cytokine network in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Sarcoidosis, vasculitis, and diffuse lung diseases: official journal of WASOG*, **22**(2), 91-104.
65. Jiang, D., Liang, J., Hodge, J., Lu, B., Zhu, Z., Yu, S and Gerard, C., 2004. Regulation of pulmonary fibrosis by chemokine receptor CXCR3. *Journal of Clinical Investigation*, **114**(2), 291.
66. Hocher, B., Schwarz, A., Fagan, K. A., Thone-Reineke, C., El-Hag, K., Kusserow, H., and Theuring, F., 2000. Pulmonary fibrosis and chronic lung inflammation in ET-1 transgenic mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, **23**(1), 19-26.
67. Marchal-Sommé, J., Uzunhan, Y., Marchand-Adam, S., Valeyre, D., Soumelis, V., Crestani, B., and Soler, P., 2006. Cutting edge: nonproliferating mature immune cells form a novel type of organized lymphoid structure in idiopathic pulmonary fibrosis. *The Journal of Immunology*, **176**(10), 5735-5739.
68. Katzenstein, A. L. A., and Myers, J. L., 1998. Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical relevance of pathologic classification. *American journal of respiratory and critical care medicine*, **157**(4), 1301-1315.
69. Kolb, M., Margetts, P. J., Anthony, D. C., Pitossi, F., and Gauldie, J., 2001. Transient expression of IL-1 β induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*, **107**(12), 1529.
70. Sime, P. J., Xing, Z., Graham, F. L., Csaky, K. G., and Gauldie, J., 1997. Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor-beta1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung. *Journal of Clinical Investigation*, **100**(4), 768.

71. Branton, M. H., and Kopp, J. B., 1999. TGF- β and fibrosis. *Microbes and infection*, **1**(15), 1349-1365.
72. Desmoulière, A., Geinoz, A., Gabbiani, F., and Gabbiani, G., 1993. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *The Journal of cell biology*, **122**(1), 103-111.
73. Goodwin, A., and Jenkins, G., 2009. Role of integrin-mediated TGF β activation in the pathogenesis of pulmonary fibrosis.
74. Desmoulière, A., Geinoz, A., Gabbiani, F., and Gabbiani, G., 1993. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *The Journal of cell biology*, **122**(1), 103-111.
75. Munger, J. S., Huang, X., Kawakatsu, H., Griffiths, M. J., Dalton, S. L., Wu, J., ... and Rifkin, D. B., 1999. A mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis: the integrin $\alpha\beta 6$ binds and activates latent TGF $\beta 1$. *Cell*, **96**(3), 319-328.
76. Schettino, I. A., Ab'Saber, A. M., Vollmer, R., Saldiva, P. H., Carvalho, C. R., Kairalla, R. A., and Capelozzi, V. L., 2002. Accuracy of High Resolution CT in Assessing Idiopathic Pulmonary Fibrosis Histology by Objective Morphometric Index¹¹ Presented as poster discussion at the 1997 American Thoracic Society International Conference, May 16-21, San Francisco, California Financial support by the following Brazilian agencies: FAPESP, CNPq, CAPES and Lim05-HCFMUSP. *Pathology-Research and Practice*, **198**(5), 347-354.
77. Gay, S. E., Kazerooni, E. A., Toews, G. B., LYNCH III, J. P., Gross, B. H., Cascade, P. N., and Popovich, J., 1998. Idiopathic pulmonary fibrosis: predicting response to therapy and survival. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **157**(4), 1063-1072.
78. Raghu, G., Nicholson, A. G., and Lynch, D., 2008. The classification, natural history and radiological/histological appearance of idiopathic pulmonary fibrosis and the other idiopathic interstitial pneumonias. *European Respiratory Review*, **17**(109), 108-115.

79. Douglas, W. W., Ryu, J. H., and Schroeder, D. R., 2000. Idiopathic pulmonary fibrosis: impact of oxygen and colchicine, prednisone, or no therapy on survival. *American journal of respiratory and critical care medicine*, **161**(4), 1172-1178.
80. Mapel, D. W., Samet, J. M., and Coultas, D. B., 1996. Corticosteroids and the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: past, present, and future. *Chest*, **110**(4), 1058-1067.
81. Douglas, W. W., Ryu, J. H., Swensen, S. J., Offord, K. P., Schroeder, D. R., Caron, G. M., and Lung Study Group*, 1998. Colchicine versus prednisone in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: a randomized prospective study. *American journal of respiratory and critical care medicine*, **158**(1), 220-225.
82. Selman, M., and Pardo, A., 2001. Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder. *Respiratory research*, **3**(1),
83. Ginzinger, D. G., 2002, Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Experimental hematology*, **30**(6), 503-512.
84. Hubner, R.H., Gitter, W., Mokhtari, N.E.E., Mathiak, M., Both, M., Bolte, H., Freitag-Wolf, S. and Bewig, B., 2008, Standardized quantification of pulmonary fibrosis in histological samples. *Biotechniques*, **44**(4), p.507.
85. Huang, S.K. and Peters-Golden, M., 2008. Eicosanoid lipid mediators in fibrotic lung diseases: ready for prime time?. *CHEST Journal*, **133**(6), pp.1442-1450.
86. Decicco-Skinner, K.L., Trovato, E.L., Simmons, J.K., Lepage, P.K. and Wiest, J.S., 2011, Loss of tumor progression locus 2 (tpl2) enhances tumorigenesis and inflammation in two-stage skin carcinogenesis. *Oncogene*, **30** (4), pp.389-397.
87. Gkirtzimanaki, K., Gkouskou, K.K., Oleksiewicz, U., Nikolaidis, G., Vyrly, D., Lontos, M., Pelekanou, V., Kanellis, D.C., Evangelou, K., Stathopoulos, E.N. and Field, J.K., 2013, TPL2 kinase is a suppressor of lung carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **110**(16), pp.E1470-E1479.
88. Christoforidou, A.V., Papadaki, H.A., Margioris, A.N., Eliopoulos, G.D. and Tsatsanis, C., 2004. Expression of the Tpl2/Cot oncogene in human T-cell neoplasias. *Molecular cancer*, **3**(1), p.34.

89. Sourvinos, G., Tsatsanis, C. and Spandidos, D.A., 1999. Overexpression of the Tpl-2/Cot oncogene in human breast cancer. *Oncogene*, **18**(35), pp.4968-4973.
90. Krcova, Z., Ehrmann, J., Krejci, V., Eliopoulos, A. and Kolar, Z., 2008. Tpl-2/Cot and COX-2 in breast cancer. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University in Olomouc*, **152**(1).
91. Watford, W.T., Wang, C.C., Tsatsanis, C., Mielke, L.A., Eliopoulos, A.G., Daskalakis, C., Charles, N., Odom, S., Rivera, J., O'Shea, J. and Tsichlis, P.N., 2010. Ablation of tumor progression locus 2 promotes a type 2 Th cell response in Ovalbumin-immunized mice. *The journal of immunology*, **184**(1), pp.105-113.
92. Barron, L. and Wynn, T.A., 2011. Macrophage activation governs schistosomiasis-induced inflammation and fibrosis. *European journal of immunology*, **41**(9), pp.2509-2514.
93. Hesse, M., Modolell, M., La Flamme, A.C., Schito, M., Fuentes, J.M., Cheever, A.W., Pearce, E.J. and Wynn, T.A., 2001. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *The Journal of Immunology*, **167**(11), pp.6533-6544.
94. Koliarakis, V., Roulis, M. and Kollias, G., 2012. Tpl2 regulates intestinal myofibroblast HGF release to suppress colitis-associated tumorigenesis. *The Journal of clinical investigation*, **122** (11), p.4231.
95. Kaviratne, M., Hesse, M., Leusink, M., Cheever, A.W., Davies, S.J., McKerrow, J.H., Wakefield, L.M., Letterio, J.J. and Wynn, T.A., 2004. IL-13 activates a mechanism of tissue fibrosis that is completely TGF- β independent. *The Journal of Immunology*, **173**(6), pp.4020-4029.
96. Vannella, K.M., Barron, L., Borthwick, L.A., Kindrachuk, K.N., Narasimhan, P.B., Hart, K.M., Thompson, R.W., White, S., Cheever, A.W., Ramalingam, T.R. and Wynn, T.A., 2014. Incomplete deletion of IL-4R α by LysMCre reveals distinct subsets of M2 macrophages controlling inflammation and fibrosis in chronic schistosomiasis. *PLoS pathogens*, **10**(9), p.e1004372.
97. Hume, D.A., 2011. Applications of myeloid-specific promoters in transgenic mice support in vivo imaging and functional genomics but do not support the

concept of distinct macrophage and dendritic cell lineages or roles in immunity. *Journal of leukocyte biology*, **89**(4), pp.525-538.

98. Dackor, R.T., Cheng, J., Voltz, J.W., Card, J.W., Ferguson, C.D., Garrett, R.C., Bradbury, J.A., DeGraff, L.M., Lih, F.B., Tomer, K.B. and Flake, G.P., 2011. Prostaglandin E₂ protects murine lungs from bleomycin-induced pulmonary fibrosis and lung dysfunction. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, **301**(5), pp.L645-L655.

99. Baird, A.C., Lloyd, F. and Lawrance, I.C., 2015. Prostaglandin E₂ and polyenylphosphatidylcholine protect against intestinal fibrosis and regulate myofibroblast function. *Digestive diseases and sciences*, **60**(6), pp.1603-1616.

100. Takai, E., Tsukimoto, M. and Kojima, S., 2013. TGF- β 1 downregulates COX-2 expression leading to decrease of PGE₂ production in human lung cancer A549 cells, which is involved in fibrotic response to TGF- β 1. *PLoS One*, **8**(10), p.e76346.

101. Roulis, M., Nikolaou, C., Kotsaki, E., Kaffe, E., Karagianni, N., Koliarakis, V., Salpea, K., Ragoussis, J., Aidinis, V., Martini, E. and Becker, C., 2014. Intestinal myofibroblast-specific Tpl2-Cox-2-PGE₂ pathway links innate sensing to epithelial homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **111**(43), pp.E4658-E4667.

102. Nowarski, R., Jackson, R. and Flavell, R.A., 2017. The Stromal Intervention: Regulation of Immunity and Inflammation at the Epithelial-Mesenchymal Barrier. *Cell*, **168**(3), pp.362-375.

103. Gantke, T., Sriskantharajah, S., Sadowski, M. and Ley, S.C., 2012. I κ B kinase regulation of the TPL-2/ERK MAPK pathway. *Immunological reviews*, **246**(1), pp.168-182.

104. Nakase, H., Fujiyama, Y., Oshitani, N., Oga, T., Nonomura, K., Matsuoka, T., Esaki, Y., Murayama, T., Teramukai, S., Chiba, T. and Narumiya, S., 2010. Effect of EP4 agonist (ONO-4819CD) for patients with mild to moderate ulcerative colitis refractory to 5-aminosalicylates: A randomized phase II, placebo-controlled trial. *Inflammatory bowel diseases*, **16**(5), pp.731-733.

105. Powell, D.W. and Saada, J.I., 2012. Mesenchymal stem cells and prostaglandins may be critical for intestinal wound repair. *Gastroenterology*, **143**(1), pp.19-22.