



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθυντής: Καθηγητής Αθανάσιος Γ. Τζιούφας

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΗ ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΩΝ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΑΤΧ ΣΤΗ ΧΡΟΝΙΑ
ΦΛΕΓΜΟΝΗ**

ΙΩΑΝΝΑ ΝΙΝΟΥ

Βιολόγος

ΑΘΗΝΑ

2019



NATIONAL AND KAPODISTRIAN UNIVERSITY OF ATHENS
SCHOOL OF MEDICINE

DEPARTMENT OF PATHOPHYSIOLOGY

DOCTORAL DISSERTATION

PHOSPHOLIPID HOMEOSTASIS AND THE ROLE OF AUTOTAXIN IN CHRONIC
INFLAMMATION

IOANNA NINO

Biologist

ATHENS

2019

Ιπποκράτειος Όρκος

ΟΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ
ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΟΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ
ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ. ΗΓΗΣΕΣΘΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ
ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ
ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΑΥΤΟΥ ΑΔΕΛΦΕΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΕΙΝ
ΑΡΡΕΣΙ, ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ, ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΝΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ
ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΣ. ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ
ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝΤΟΣ
ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΩΡΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ ΙΗΤΡΙΚΩ ΑΛΛΩ ΔΕ
ΟΥΔΕΝΙ. ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΖΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ
ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗΝ ΕΙΡΞΕΙΝ. ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ
ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕ ΥΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝ ΔΕ ΟΜΟΙΩΣ
ΔΕ ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ. ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ
ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΟΥ ΤΕΜΕΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘΙΩΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ
ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΔΡΑΣΙΝ ΠΡΗΞΙΟΣ ΤΗΣΔΕ. ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΙΩ,
ΕΞΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ
ΦΘΟΡΙΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ
ΑΝΔΡΕΙΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ. Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ Η ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ
ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΕΙΗΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗΠΟΤΕ ΕΓΚΑΛΕΣΘΑΙ ΕΞΩ,
ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ
ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ,
ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ, ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ
ΕΠΙΟΡΚΕΟΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

Ιπποκράτειος Όρκος

(Μετάφραση)

Ορκίζομαι στον Απόλλωνα τον Ιατρό και τον Ασκληπιό και στην Υγεία και στην Πανάκεια και σε όλους τους Θεούς επικαλούμενος τη μαρτυρία τους, να τηρήσω πιστά κατά τη δύναμη και την κρίση μου αυτό τον όρκο και το συμβόλαιό μου αυτό. Να θεωρώ αυτόν που μου δίδαξε αυτήν την τέχνη ίσο με τους γονείς μου και να μοιραστώ μαζί του τα υπάρχοντά μου και τα χρήματά μου αν έχει ανάγκη φροντίδας, να θεωρώ τους απογόνους του ίσους με τα αδέρφια μου και να τους διδάξω την τέχνη αυτή αν θέλουν να τη μάθουν, χωρίς αμοιβή και συμβόλαιο και να μεταδώσω με παραγγελιές, οδηγίες και συμβουλές όλη την υπολοιπή γνώση μου και στα παιδιά μου και στα παιδιά εκείνου που με δίδαξε και στους άλλους μαθητές που έχουν κάνει γραπτή συμφωνία μαζί μου και σε αυτούς που έχουν ορκιστεί στον ιατρικό νόμο και σε κανέναν άλλο και να θεραπεύω τους πάσχοντες κατά τη δύναμή μου και κατά την κρίση μου χωρίς ποτέ, εκουσίως, να τους βλάψω ή να τους αδικήσω και να μη δώσω ποτέ σε κανένα, έστω και αν μου το ζητήσει, θανατηφόρο φάρμακο, ούτε να δώσω ποτέ τέτοια συμβουλή, ομοίως, να μη δώσω ποτέ σε γυναίκα φάρμακο για να αποβάλει. να διατηρήσω δε τη ζωή μου καθαρή και αγνή, και να μη χειρουργήσω πάσχοντες από λίθους, αλλά να αφήσω την πράξη αυτή για τους ειδικούς και σε όποια σπίτια κι αν μπω, να μπω για την ωφέλεια των πασχόντων αποφεύγοντας κάθε εκούσια αδικία και βλάβη και κάθε γενετήσια πράξη και με γυναίκες και με άνδρες, ελεύθερους και δούλους. Και ό,τι δω ή ακούσω κατά την άσκηση του επαγγέλματός μου, ή κι εκτός, για τη ζωή των ανθρώπων, που δεν πρέπει ποτέ να κοινοποιηθεί, να σιωπήσω και να το κρατήσω μυστικό. Αν τον όρκο μου αυτό τηρήσω πιστά και δεν τον αθετήσω, είθε να απολαύσω για πάντα την εκτίμηση όλων των ανθρώπων για τη ζωή μου και για την τέχνη μου, αν όμως παραβώ και αθετήσω τον όρκο μου να υποστώ τα αντίθετα από αυτά.

Στοιχεία Διδακτορικής διατριβής

Θέμα: «Ομοιόσταση φωσφολιπιδίων και ο ρόλος της αυτοταξίνης (ATX) στην χρόνια φλεγμονή».

Ημερομηνία υποβολής αίτησης στην Ιατρική Σχολή για ορισμό Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 31/08/2012

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ. της Ιατρικής Σχολής: 24/04/2013

Ημερομηνία καθορισμού θέματος της διδακτορικής διατριβής από τη Γ.Σ.Ε.Σ. της Ιατρικής Σχολής: 22/01/2014

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Παναγιώτης Γ. Βλαχογιαννόπουλος (Καθηγητής Παθολογίας-Ανοσολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ, επιβλέπων μέλος)

Ευσταθία Κ. Καψογεώργου (Επίκουρη Καθηγήτρια Ανοσολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ)

Βασίλης Αϊδίνης (Ερευνητής Α', ΕΚΕΒΕ Αλέξανδρος Φλέμινγκ)

Ημερομηνία ορισμού επταμελούς εξεταστικής επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ. της Ιατρικής Σχολής: 24/07/2018

Ημερομηνία παρουσίασης: 9/01/2019

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

1. Αθανάσιος Τζιούφας, Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
2. Παναγιώτης Βλαχογιαννόπουλος, Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
3. Βασίλειος Γοργούλης, Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
4. Μενέλαος Μανουσάκης, Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
5. Μιχαήλ Βουλγαρέλης, Καθηγητής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
6. Ευσταθία Καψογεώργου, Επίκουρη Καθηγήτρια, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
7. Βασίλειος Αϊδίνης, Ερευνητής Α', ΕΚΕΒΕ Αλέξανδρος Φλέμινγκ

Βαθμός: Άριστα

Πρόεδρος Ιατρικής σχολής Αθηνών: Πέτρος Π. Σφηκάκης

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας, αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω όλους εκείνους οι οποίοι με τη συνεργασία, την υποστήριξη και τη διάθεση του χρόνου τους με βοήθησαν στη πραγματοποίηση της.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών «Αλέξανδρος Φλέμινγκ», στο εργαστήριο του Δρ. Βασίλη Αϊδίνη, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά για την ευκαιρία που μου έδωσε αναθέτοντας μου αυτή τη διδακτορική διατριβή, καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας.

Θα ήθελα επιπλέον να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Π. Βλαχογιαννόπουλο και την επίκουρη καθηγήτρια κα Ε. Καψογεώργου για την χρόνο που αφιέρωσαν κατά την παρακολούθηση της συγκεκριμένης μελέτης, την φιλική διάθεση και βοήθεια που προσέφεραν όποτε χρειάστηκε. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της επταμελούς επιτροπής για το χρόνο που διέθεσαν.

Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους συναδέλφους του εργαστηρίου, νέους και παλιούς, για την πολλή καλή συνεργασία που αναπτύξαμε όλα αυτά τα χρόνια, την βοήθεια και υποστήριξη τους. Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ιωάννα Σεβαστού για την αρχική καθοδήγηση στο χώρο της έρευνας, τις γνώσεις και την εμπειρία που μου μετέδωσε.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά την οικογένεια μου και τους φίλους μου για την πολύτιμη υποστήριξη, ενθάρρυνση και κατανόηση που επέδειξαν όλα αυτά τα χρόνια.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	Σελίδα
1. Αυτοταξίνη και Φωσφολιπίδια	8
1.1. Αυτοταξίνη (ATX, autotaxin)	8
1.1.1. Οι ισομορφές της ATX	11
1.1.2. Η πρωτεΐνη ATX	13
1.2. Φωσφολιπίδια	16
1.2.1. Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη (LPC)	17
1.2.2. Λυσοφωσφατιδικό οξύ (LPA)	18
1.2.3. Υποδοχείς LPA και σηματοδότηση	21
1.3. Ο άξονας ATX/LPA στην παθοφυσιολογία	24
2. Φλεγμονώδεις Παθήσεις	31
2.1. Φλεγμονή	30
2.2. Αυτοάνοσες διαταραχές	34
2.3. Διάχυτες Παρεγχυματικές Πνευμονοπάθειες (ΔΔΠ)	38
2.3.1. Ιδιοπαθής Πνευμονική Ίνωση (ΙΠΙ)	40
2.3.1.1. Επιδημιολογία	41
2.3.1.2. Διαγνωστική προσέγγιση της ΙΠΙ	44
2.3.1.3. Θεραπεία	49
2.3.1.4. Μηχανισμός παθογένειας της ΙΠΙ	52
2.3.1.5. Πειραματικά μοντέλα της πνευμονικής ίνωσης	57
2.3.1.6. Φωσφολιπίδια και πνευμονική ίνωση	61
2.3.1.6.1. Ο άξονας PC/PLA2/LPC	61
2.3.1.6.2. ATX και σηματοδότηση LPA	64
2.4. Σκλήρυνση κατά πλάκας (Πολλαπλή σκλήρυνση)	69
2.4.1. Ιστορική Αναδρομή	70
2.4.2. Επιδημιολογία	74
2.4.3. Παθοφυσιολογία	79
2.4.4. Κλινική Εικόνα-Συμπτωματολογία	82
2.4.5. Πορεία της νόσου-Μορφές	84
2.4.6. Διάγνωση	88
2.4.7. Θεραπεία	91
2.4.8. Πειραματικά μοντέλα της ΣΚΠ	95
2.4.9. Φωσφολιπίδια και Σκλήρυνση κατά πλάκας	98
2.4.9.1. Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη(LPC)	98
2.4.9.2. Λυσοφωσφατιδικό οξύ (LPA)	101
Βιβλιογραφία	103

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.Σκοπός	122
2.Ο άξονας ATX/LPA στην Πνευμονική ίνωση.	124
2.1. Σύγκριση της ενδοτραχειακής και της στοματοφαρυγγικής οδού χορήγησης της μπλεομυκίνης στο πειραματόζωο <i>Mus Musculus</i> .	124
2.2. Η φαρμακολογική στόχευση του άξονα ATX/LPA εξασθενεί την επαγόμενη από μπλεομυκίνη πνευμονική ίνωση.	135
2.3. Τα υδροξαμικά οξέα αποτελούν μια νέα κατηγορία αναστολέων της αυτοταξίνης, που επιδεικνύουν <i>in vivo</i> αποτελεσματικότητα στο πειραματικό μοντέλο της πνευμονικής ίνωσης.	152
3.Ο ρόλος του άξονα ATX/LPA στην Πειραματική αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα (ΠΑΕ).	173

ΠΡΩΤΟΤΥΠΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Γενικό Μέρος

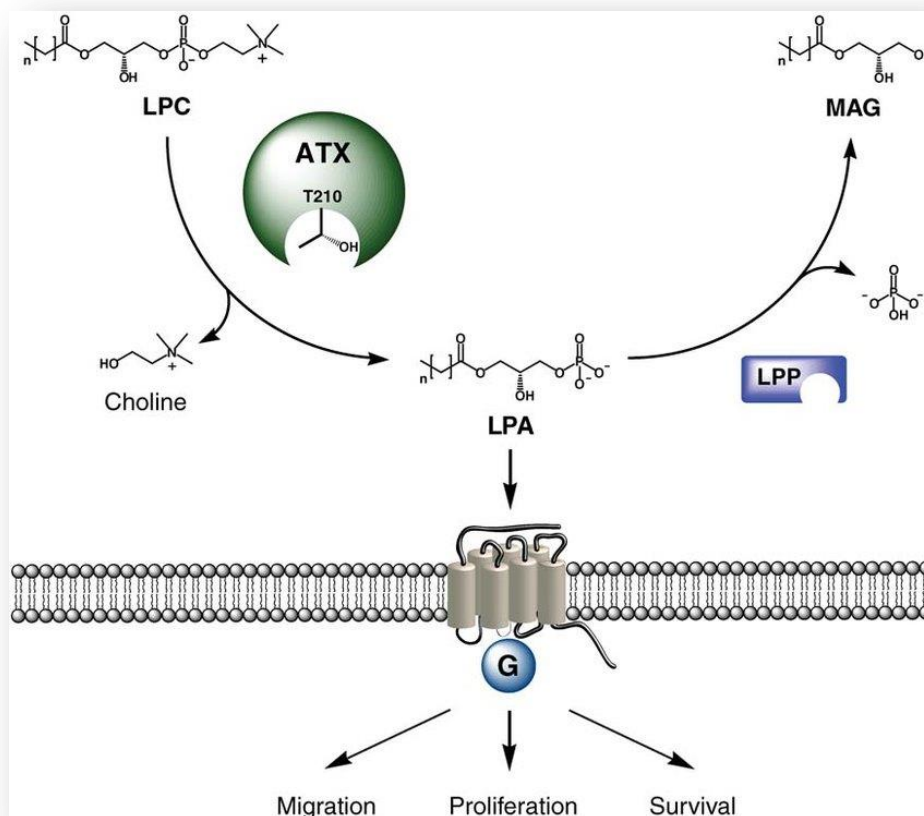
1. Αυτοταξίνη και Φωσφολιπίδια

1.1.Αυτοταξίνη (ATX, Autotaxin)

Η αυτοταξίνη (ATX), είναι γνωστή από το 1992, όταν ταυτοποιήθηκε και απομονώθηκε από την ανθρώπινη κυτταρική σειρά μελανώματος A2058 [1] ως αυτοκρινής παράγοντας κινητικότητας. Η ATX ήταν ικανή να διεγείρει την μετανάστευση κυττάρων σε συγκεντρώσεις κάτω από 1nM [2]. Τότε, πιθανολογείται η ύπαρξη ενός υποδοχέα ATX, πιθανώς συζευγμένο με G πρωτεΐνη, καθώς η μετανάστευση των κυττάρων ήταν εξαρτώμενη της τοξίνης του κοκίτη. Αργότερα ανακαλύφθηκε ότι οι υποδοχείς πράγματι υπήρχαν αλλά ήταν υποδοχείς λυσοφωσφατιδικού οξέος (LPA), του προϊόντος που καταλύεται από την ενζυμική αντίδραση της ATX.

Η πρωτεΐνη ATX, μεγέθους 125kDa, στη συνέχεια αναγνωρίστηκε σαν μέλος της οικογένειας των έκτο-νουκλεοτιδικών πυροφωσφατασών/ φωσφοδιεστερασών (ecto-nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases, NPPs) γι' αυτό και μετονομάστηκε σε ENPP2 [3, 4]. Επιπλέον, η ATX έχει δραστικότητα πυροφωσφατάσης και ATP-άσης, αν και με χαμηλή καταλυτική ικανότητα [5]. Αρκετές μελέτες περιγράφουν την PD1a και την ATX σαν προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος του ίδιου γονιδίου [6], το οποίο αργότερα επιβεβαιώθηκε όταν χαρακτηρίστηκαν οι ισομορφές της ATX [7].

Σημαντικό γεγονός στην μελέτη της ATX συντέλεσε η ταυτόχρονη απομόνωση μιας λυσοφωσφολιπάσης D από ανθρώπινο πλάσμα [8], ορό εμβρύου βοδιού [9] και λιποκύτταρα ποντικού [10], η οποία ταυτίστηκε με την ATX. Επειδή η κύρια καταλυτική δραστικότητα της ATX είναι η παραγωγή λυσοφωσφατιδικού οξέος (LPA), έγινε σαφές ότι η δράση της μεσολαβείται από αυτό το φωσφολιπίδιο μέσω της αλληλεπίδρασής του με μια οικογένεια επτά διαμεμβρανικών υποδοχέων, συζευγμένων με G πρωτεΐνες [11-13].



Εικόνα 1: Ο άξονας σηματοδότησης ATX-LPA. Η εκκρινόμενη ATX υδρολύει το εξωκυττάριο LPC σε LPA, μια αντίδραση που καταλύεται στην θέση T210 του ενεργού κέντρου της ATX. Το LPA δρα μέσω διαφορετικών υποδοχέων συζευγμένων με G πρωτεΐνες για να διεγείρει τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την επιβίωση πολλών κυτταρικών τύπων. Το LPA αποικοδομείται σε μονοακυλογλυκερόλη (MAG) από φωσφατάσες φωσφορικών λιπιδίων (lipid phosphate phosphatases, LPPs) [14].

Η αυτοταξίνη έχει αναφερθεί στα περισσότερα βιολογικά υγρά: στο πύον (blister fluid) [15], στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό [16, 17], στο πλάσμα [18], στο περιτοναϊκό υγρό [19], στον ορό διαφορετικών ειδών (κουνέλι [8], βοοειδή [9], άνθρωπο [20, 21]), σε ασπράδι αυγού [22], στα ούρα [23] και το αρθρικό υγρό [24]. Η ATX είναι ο κύριος προμηθευτής εξωκυτταρίου LPA [25], σημαντικός παράγοντας σε πολλές φυσιολογικές διεργασίες, για το λόγο αυτό η παρουσία του ενζύμου σε πολλά από τα βιολογικά υγρά δεν αποτελεί έκπληξη. Πιθανά, η κυριότερη πηγή ATX στην κυκλοφορία είναι ο λιπώδης ιστός, δεδομένου ότι η γενετική απαλοιφή της *Enpp2* σε λιποκύτταρα έχει ως αποτέλεσμα 38% μείωση στα επίπεδα LPA του πλάσματος [26].

Ευρεία έκφραση της ATX εντοπίζεται στους ιστούς, με τα υψηλότερα επίπεδα να ανιχνεύονται στον εγκέφαλο, στις ωοθήκες, στον πνεύμονα, στο έντερο και στους νεφρούς. Κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη στο ποντίκι εντοπίζεται στο νευρικό σωλήνα την εμβρυϊκή ημέρα E9.5 [27]. Στον ενήλικο εγκέφαλο, υψηλά επίπεδα της ATX ανευρίσκονται στα ολιγοδενδροκύτταρα και στα εκκριτικά επιθηλιακά κύτταρα του πλέγματος του χοριοειδή χιτώνα [28]. Επίσης η ATX εκφράζεται από τα κύτταρα της χοριοειδούς και αραχνοειδούς μήνιγγας και από κύτταρα του αγγειακού συστήματος του κεντρικού νευρικού συστήματος [29]. Πιο πρόσφατα, ανιχνεύθηκε σε εξωσώματα [30], κύτταρα που συμμετέχουν στην ενδοκυτταρική σηματοδότηση.

Η έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί την ATX βρίσκεται υπό τον έλεγχο πολλαπλών μεταγραφικών παραγόντων ανάλογα τον κυτταρικό τύπο, αυτοί είναι: Hoxa13 και Hoxd13 σε εμβρυϊκούς ινοβλάστες ποντικού [31], v-jun σε εμβρυϊκούς ινοβλάστες κοτόπουλου [32], c-jun σε σάρκωμα [33], Stat3 σε κύτταρα καρκίνου του μαστού [34], AP-1 σε κερατινοκύτταρα και κύτταρα νευροβλαστώματος [35, 36], NFAT1 σε κύτταρα μελανώματος και καρκινώματος [37, 38], NF-κB σε κερατινοκύτταρα και ηπατοκύτταρα [36, 39, 40]. Επιπρόσθετα, σε επίπεδο μετά-μεταγραφικής ρύθμισης έχει αναφερθεί ότι ελέγχεται από τις πρωτεΐνες δέσμευσης RNA, HuR και AUF1 [41].

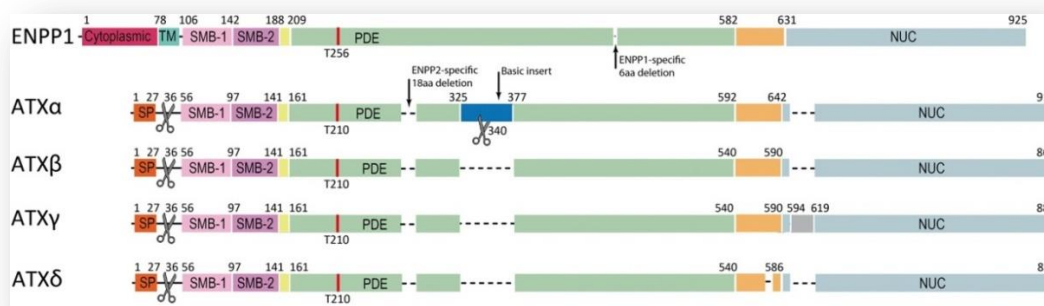
Επίσης, η έκφραση της ATX επάγεται από εξωκυττάριους, κυρίως προ-φλεγμονώδεις παράγοντες όπως είναι: ο TNF-α σε αρθρικούς ινοβλάστες, ηπατοκύτταρα, κυτταρικές σειρές ηπατώματος και καρκινικά κύτταρα θυρεοειδούς [42-45], η IL-1β σε κύτταρα καρκίνου του θυρεοειδούς [44], η γαλεκτίνη 3 σε κύτταρα μελανώματος [37]. Η έκφραση της ATX επάγεται και από κάποιους αυξητικούς παράγοντες και μόρια όπως FGF, EGF, BMP-2, Wnt-1 [46]. Το LPS, το κύριο συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων, έχει δειχθεί ότι διεγείρει την έκφραση της ENPP2 στα THP-1 κύτταρα [47]. Η λυσοφατιδυλοχολίνη (LPC), κύριο συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών είναι ένας ισχυρός επαγωγέας της έκφρασης της Enpp2 στα ηπατοκύτταρα [42]. Από την άλλη πλευρά, το ενζυμικό προϊόν της ATX, το LPA, καθώς και η φωσφορική σφιγγοσίνη 1 (S1P), εμφανίζουν αναδραστική αναστολή της Enpp2, υπό ορισμένες συνθήκες [44, 48].

1.1.1.Οι ισομορφές της ATX

Το γονίδιο της ATX βρίσκεται στο χρωμόσωμα 8 στη θέση 8q24.1 στους ανθρώπους και στο χρωμόσωμα 15 στα ποντίκια. Η δομή του γονιδίου είναι υψηλής πολυπλοκότητας, περιέχει 27 εξόνια και με εναλλακτικό τρόπο ματίσματος δημιουργούνται πέντε διαφορετικές ισομορφές, οι οποίες ονοματίζονται με τα γράμματα α-ε [7, 49]. Οι τρεις πιο γνωστές ισομορφές της ATX (α, β και γ) διαφέρουν στην παρουσία ή απουσία αλληλουχιών που κωδικοποιούνται από τα εξόνια 12 και 21 [7, 50]. Η πιο πρόσφατα χαρακτηρισμένη ισομορφή, η ATX-δ, είναι παρόμοια με την ATX-β, έχοντας μια έλλειψη τεσσάρων πεπτιδίων (έλλειψη εξονίου 19) μεταξύ της περιοχής φωσφοδιεστεράσης (catalytic phosphodiesterase domain, PDE) με την C-τερματική περιοχή (C-terminal nuclease-like, NUC). Ωστόσο, ακόμα δεν υπάρχει συσχέτιση των διαφόρων λειτουργιών της ATX με τις ισομορφές της. Οι περισσότερες γνώσεις σχετικά με την ATX έχουν προέλθει από μελέτες για την πλέον επικρατούσα ισομορφή, την ATX-β [8, 9].

Η ισομορφή α, αποτελεί τον «αυτοκρινή παράγοντα κινητικότητας» που απομονώθηκε από τα κύτταρα μελανώματος [1]. Η ATX-α παρουσιάζει τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης τόσο στο κεντρικό νευρικό σύστημα όσο και στους περιφερικούς ιστούς, ενώ σε σύγκριση με τις άλλες δύο (ATX-β και γ) είναι πολύ ασταθής επειδή περιέχει ένα επιπλέον εξόνιο (εξόνιο 12). Η έκφραση του εξονίου 12 έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία μιας αλληλουχίας στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου η οποία μπορεί να διασπαστεί από πρωτεάση (αλληλουχία KVARPKRR). Η ATX-γ, περιέχει το εξόνιο 21, χαρακτηρίζεται ως η «ειδική για τον εγκέφαλο» ισομορφή, εκφράζεται σε όλες τις περιοχές του εγκεφάλου, ενώ σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης παρατηρούνται σε περιφερικούς ιστούς. Αντίθετα, η ATX-β ανιχνεύεται σε περιφερικούς ιστούς, ενώ χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης παρατηρούνται στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) [7, 28, 51]. Όλες οι ισομορφές της ATX εμφανίζουν παρόμοια δραστικότητα LysoPLD και εξειδίκευση υποστρώματος [7, 49, 52]. Φαίνεται ότι οι δομικές αλλαγές στις ισομορφές της ATX δεν επηρεάζουν την καταλυτική ικανότητα της, ούτε διαταράσσουν την δομή των ώριμων πρωτεϊνών. Πιθανόν οι αλλαγές αυτές, να σχετίζονται με τον κυτταρικό εντοπισμό ή τα μόρια προσδέτες κάθε ισομορφής. Πρόσφατα, δείχθηκε ότι το ATX-

α, και όχι η ATX-β, δεσμεύεται ειδικά στην ηπαρίνη, πιθανότατα μέσω της πλούσιας σε Arg/Lys περιοχής [52]. Η ηπαρίνη ενίσχυσε την δραστικότητα LysoPLD της ATX-α έναντι του LPC έως και 2 φορές, αλλά δεν είχε επίδραση στη δραστικότητα της ATX-β [52].



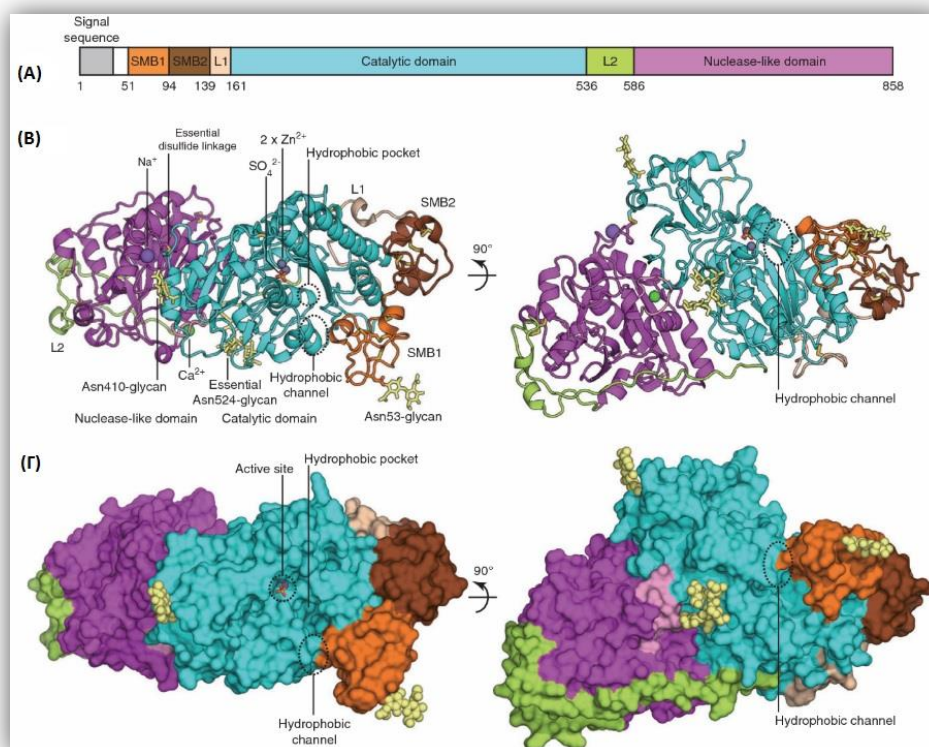
Εικόνα 2: Οι ισομορφές της ATX (α, β, γ και δ) σε σύγκριση με την ENPP1, μια έξω-νουκλεοτιδική πυροφωσφατάση. Οι ισομορφές α, β και γ διαφέρουν στην παρουσία ή την απουσία αλληλουχιών που κωδικοποιούνται από τα εξόνια 12 και 21. Η ATX-δ στερείται 12bp στο 3' άκρο του εξονίου 19, που κωδικοποιεί τέσσερα αμινοξέα στην συνδετική περιοχή L2 [49]. Η απαλοιφή (18aa) στην καταλυτική περιοχή (PDE) της ATX είναι το κλειδί της δράσης της ως φωσφολιπάση, καθώς δημιουργείται μια θέση δέσμησης λιπιδίων.

1.1.2. Η πρωτεΐνη ATX

Η αυτοταξίνη, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, αποτελεί μέλος της οικογένειας των έκτο νουκλεοτιδίων πυροφωσφατασών/πυροφωσφοδιεστερασών (ENPPs), γι' αυτό αναφέρεται ως ENPP2. Η οικογένεια των NPPs απαρτίζεται από επτά μεμβρανοσυνδεδεμένα ή εκκρινόμενα έκτο ένζυμα, NPP1-7, που σχετίζονται δομικά και παίζουν ρόλο στην ρύθμιση του μεταβολισμού εξωκυτταρικών νουκλεοτιδίων. Οι NPPs απελευθερώνουν 5'- μονοφωσφορικά νουκλεοτίδια υδρολύοντας φωσφοδιεστερικούς και πυροφωσφορικούς δεσμούς διαφόρων νουκλεοτιδίων [4]. Οι NPP1, NPP2 και NPP3 έχουν μελετηθεί στα θηλαστικά και φαίνεται να έχουν μεταξύ τους 24–60% ομοιότητα [53]. Οι NPP1-3 είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες και αποτελούνται όλες από ένα μικρό αμινοτελικό άκρο στο ενδοκυτταρικό τμήμα (10-80 αμινοξέα), μια διαμεμβρανική περιοχή (20 αμινοξέα) και ένα μεγάλο εξωκυτταρικό τμήμα (περίπου 800 αμινοξέα) [54]. Οι NPP4-7 αποτελούνται από μια μόνο καταλυτική περιοχή.

Η αυτοταξίνη εμφανίζει πιο στενή συγγένεια με τα μέλη NPP1 και NPP3, αλλά είναι η μοναδική που διαθέτει δραστικότητα λυσοφωσφολιπάσης (μετατροπή LPC σε LPA). Διαθέτει μια κεντρική καταλυτική περιοχή φωσφοδιεστεράσης, μια καρβοξυτελική περιοχή (C-άκρο) και μια υδρόφοβη αμινοτελική περιοχή (N- άκρο). Το N-τελικό άκρο αποτελείται από δυο περιοχές σωματομεδίνης B (somatomedine-B-like) και η περιοχή νουκλεάσης (nuclease-like) βρίσκεται στο C τελικό άκρο της πρωτεΐνης [55, 56]. Ο ρόλος των περιοχών αυτών δεν είναι απόλυτα σαφής. Η περιοχή σωματομεδίνης είναι πλούσια σε κατάλοιπα κυστεΐνης και περιέχει ένα τριπεπτίδιο αργινίνη/γλυκίνη/ασπαρτικό οξύ (RGD) που πιθανά να εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση του κυττάρου με την εξωκυττάρια χώρο και στη σταδιακή πρόσδεση με τα υποστρώματα [3, 57]. Θεωρείται ότι η ATX/NPP2 δεν είναι διαμεμβρανική πρωτεΐνη αλλά συντίθεται ως ένα προ-ένζυμο, με την αμινοτελική περιοχή να δρα σαν σηματοδοτικό πεπτίδιο. Το προ-ένζυμο της ATX, υφίσταται αποκοπή ενός πεπτιδίου 27 αμινοξέων, ακολουθεί πρωτεόλυση από προπρωτεϊνικές κονβερτάσες (furine-type protease) και τελικά εκκρίνεται η ώριμη γλυκοπρωτεΐνη ATX [58-60]. Πράγματι, έχει αναφερθεί ότι η ATX δεν εκφράζεται στις επιφάνειες των επιμολυσμένων με ATX κυττάρων ή κυττάρων που εκκρίνουν ATX [60]. Άλλα μέλη

της οικογένειας των NPPs μπορούν επίσης ως ένα βαθμό να εκκριθούν, οι NPP1, NPP3 και NPP7. Στην καρβοξυτελική πλευρά, βρίσκεται η περιοχή νουκλεάσης (nuclease-like). ωστόσο στερείται καταλυτικής δράσης λόγω μετάλλαξης των υπεύθυνων αμινοξέων για τη δράση νουκλεάσης [56, 61]. Η ομοιότητα με τις ενδονουκλεάσες έγκειται στην δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των καταλοίπων της κυστεΐνης.



Εικόνα 3: Αρχιτεκτονική δομή της ATX. (Α) Οργάνωση πρωτεΐνης **(Β)** Τριτοταγής δομή της ATX: περιοχές σωματομεδίνης (SMB1: πορτοκαλί, SMB2: καφέ), καταλυτική περιοχή: κυανό), περιοχή νουκλεάσης (nuclease-like domain, μωβ), συνδετικές περιοχές L1 (σωμών) και L2 (πράσινο), μοτίβο EF (ροζ). Οι N-γλυκάνες και το θειϊκό ιόν παρουσιάζονται ως κίτρινες και πορτοκαλί λεπτομέρειες. Τα δεσμευμένα ιόντα ψευδαργύρου, ασβεστίου και νατρίου εμφανίζονται ως γκρι, πράσινα και μοβ σφαιρίδια, αντίστοιχα. Οι 15 δισουλφιδικοί δεσμοί παρουσιάζονται ως ραβδιά. **(Γ)** 3D απεικόνιση της ATX [62].

Όσον αφορά τους καταλυτικούς μηχανισμούς και την ειδικότητα των υποστρωμάτων η λυσοφωσφατιδυλοχολίνη σαν υπόστρωμα των NPP υδρολύεται με δύο τρόπους: είτε σε LPA και χολίνη από την NPP2 (δράση lysophospholipase-D) ή σε μονοακυλογλυκερόλη και φωσφορική χολίνη από τις NPP6 και NPP7 (δράση lysophospholipase-C και εστεράσης χολίνης αντίστοιχα) [63]. Η ATX παρουσιάζει ειδικότητα για λυσοφωσφατιδυλοχολίνη (LPC) υψηλού μοριακού βάρους (16:0-

18:2) και για νουκλεοτίδια [7, 8]. Επίσης, μετατρέπει τη σφιγγοσυνοχολίνη σε σφιγγοσύνη (S1P) και χολίνη [64, 65]. Και τα δυο αυτά φωσφολιπίδια (LPA και S1P) είναι ισχυροί αναστολείς της ATX και έχουν χημική συγγένεια προς το ένζυμο περίπου 1000 φορές μεγαλύτερη από την αναφερόμενη για τα φυσικά του υποστρώματα [66, 67].

Οι υδρολυτικές δραστηριότητες της ATX, τόσο της φωσφολιπάσης D όσο και της φωσφοδιεστεράσης, καταλύονται από ένα μόνο σημείο, την Thr²¹⁰, η οποία όταν αντικαθίσταται από Ala καθιστά το ένζυμο ανενεργό [68]. Μια μελέτη των χαρακτηριστικών της ATX σε επίπεδο αλληλουχίας, αποκάλυψε την ύπαρξη μιας επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας G/FXGXGXG στην περιοχή του καταλυτικού κέντρου της ATX [61], σημαντική για την πρόσδεση μεταλλικών ιόντων αλλά όχι για την εξειδίκευση του υποστρώματος. Η ATX είναι γλυκοζυλιωμένη στις θέσεις Asn53, Asn410 και Asn524 [69], ωστόσο έχει δειχθεί ότι οι N-γλυκάνες δεν είναι απαραίτητες για την καταλυτική δραστηριότητα της ATX [70], καθώς η παραγωγή LPA θεωρείται υπεύθυνη για την διέγερση της κυτταρικής κινητικότητας [71].

Όσον αφορά τα ενζυμικά χαρακτηριστικά της ATX, μελέτες έχουν δείξει καλύτερη δραστηριότητα της ATX σε pH 8 και θερμοκρασία 40°C [7]. Η αυτοταξίνη ενεργοποιείται από δισθενή κατιόντα, Mg²⁺ [72] και αναστέλλεται από Zn²⁺ και υψηλές συγκεντρώσεις Ca²⁺ (25mM) [73]. Εξαίρεση αποτελεί η LysoPLD των νεφρών κουνελιού όπου απαιτεί Ca²⁺ (5mM), ενώ η παρουσία Mg²⁺ (5mM) δεν επηρεάζει την δραστηριότητα της [74]. Επιπλέον, η δραστηριότητα LysoPLD, ενισχύεται παρουσία Co²⁺ σε πλάσμα αρουραίου, ανθρώπου και ανθρώπινα λιποκύτταρα [75, 76]. Ο μηχανισμός με τον οποίον το Co²⁺ διεγείρει την δραστηριότητα της ATX δεν είναι γνωστός, ωστόσο τα κατιόντα μπορεί να ενεργήσουν είτε για τη σταθεροποίηση της δομής της είτε ως μέρος του καταλυτικού κέντρου [77]. Επιπλέον, τα κατιόντα προστατεύουν την ATX από θερμική μετουσίωση και πρωτεόλυση [72]. Η πρωτεολυτική διάσπαση μιας N-τερματικής υδρόφοβης αλληλουχίας που λειτουργεί ως σηματοδοτικό πεπτίδιο [58, 60] και η γλυκοζυλίωση των καταλοίπων ασπαραγίνης [58, 69, 70], είναι απαραίτητα για την έκκριση και τη βέλτιστη ενζυμική της δραστηριότητα.

1.2.Φωσφολιπίδια

Τα φωσφολιπίδια, μαζί με τα ουδέτερα λίπη και στεροειδή, αποτελούν τα λιπίδια. Διακρίνονται σε δύο κατηγορίες τα γλυκεροφωσφολιπίδια και τα σφιγγοφωσφολιπίδια. Στην πρώτη ανήκουν τα περισσότερα διαδεδομένα φωσφολιπίδια που αποτελούνται από ένα μόριο γλυκερόλης, δύο μόρια λιπαρών οξέων, ένα μόριο φωσφορικού οξέος και ένα ακόμα πολικό μόριο (αλκοόλη). Στην δεύτερη κατηγορία ο κορμός των φωσφολιπιδίων αποτελείται από σφιγγοσίνη, ενωμένος με ένα μόριο λιπαρού οξέος και μια φωσφορική ομάδα.

Το απλούστερο γλυκεροφωσφολιπίδιο είναι το φωσφατυδικό οξύ, το οποίο συντίθεται με την εστεροποίηση δυο λιπαρών οξέων με την 3-φωσφορική γλυκερόλη μέσω της ακυλομεταφοράς της P-γλυκερόλης. Το φωσφατυδικό οξύ αποτελεί πρόδρομη ένωση όλων των υπόλοιπων γλυκεροφωσφολιπιδίων. Οι αλκοόλες που συναντώνται συχνότερα στα γλυκεροφωσφολιπίδια είναι η χολίνη, η αιθανολαμίνη, η ινοσιτόλη και η σερίνη. Τα αντίστοιχα γλυκεροφωσφολιπίδια ονομάζονται φωσφατιδυλοχολίνη, φωσφατιδυλαιθανολαμίνη, φωσφατιδυλ-ινοσιτόλη και φωσφατιδυλοσερίνη.

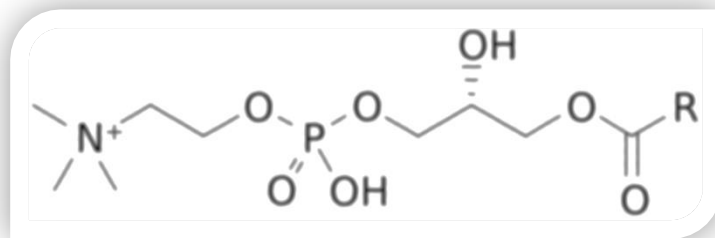
Τα γλυκεροφωσφολιπίδια μέσω της δράσης των φωσφολιπασών A1 και A2 απομακρύνουν ομάδες ακυλίου για να σχηματίσουν λυσοφωσφολιπίδια. Τα λυσοφωσφολιπίδια (lysophospholipid, LPL) είναι βιοδραστικά μόρια που διαθέτουν μια μεγάλη πολική ή φορτισμένη κεφαλή και μία απλή υδρόφοβη αλυσίδα άνθρακα. Οι περισσότερες από αυτές τις ενώσεις δρουν μέσω υποδοχέων συζευγμένων με G πρωτεΐνη (GPCR), αλλά έχει επίσης αποδειχθεί ότι είναι ικανές να ενεργοποιούν απευθείας τους διαύλους ιόντων TRP [78] ή να τροποποιούν τις μηχανικές ιδιότητες των βιολογικών μεμβρανών όπως την ελαστικότητα ή την καμπυλότητα [79]. Μεταξύ των πιο σημαντικών μορίων αυτής της ομάδας είναι το λυσοφωσφατιδικό οξύ (lysophosphatidic acid, LPA), η 1-φωσφορική σφιγγοσίνη (S1P) και η λυσοφωσφατιδυλοχολίνη (LPC). Άλλα βιοενεργά λυσοφωσφολιπίδια είναι τα: κυκλικό φωσφατυδικό οξύ (cPA) [80], σφιγγοσουλφωσφορυλοχολίνη (SPC) [81], λυσοφωσφατιδυλοσερίνη, λυσοφωσφατιδυλινοσιτόλη, λυσοφωσφατιδυλο-θρεονίνη, λυσοφωσφατιδυλαιθανολαμίνη και λυσοφωσφατιδυλογλυκερόλη (LPG) [82].

1.2.1.Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη (LPC)

Η λυσοφωσφατιδυλοχολίνη υπάρχει σε υψηλές συγκεντρώσεις στην κυκλοφορία (~190 μM) [83], όπου συνήθως βρίσκεται συνδεδεμένη με αλβουμίνη [84] και λιποπρωτεΐνες όπως η οξειδωμένη χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (oxLDL, Low Density Lipoproteins) [85]. Η λυσοφωσφατιδυλοχολίνη της κυκλοφορίας αποτελείται από ένα μείγμα διαφορετικών ειδών: 16:0 (40%), 18:2 (20%), 18:1/ 18:0 (10–15%) και 20:4 (10%) [83].

Η υπεροικογένεια των ενζύμων φωσφολιπάσης A2 (PLA2) υδρολύουν τον εστερικό sn-2 δεσμό της μεμβρανικής φωσφατιδυλοχολίνης (PC), με αποτέλεσμα την σύνθεση των διαφορετικών ειδών LPC. Ταυτόχρονα, από την υδρόλυση αυτή, ελευθερώνονται λιπαρά οξέα τα οποία στη συνέχεια μεταβολίζονται σε διάφορα προ-φλεγμονώδη εικοσανοειδή [86]. Τα εικοσανοειδή, δηλαδή τα λευκοτριένια, τα θρομβοξάνια και οι προσταγλανδίνες συμμετέχουν σε πληθώρα φυσιολογικών και παθολογικών διεργασιών του κυττάρου μεταξύ των οποίων και η φλεγμονή. Η υπεροικογένεια των φωσφολιπασών αποτελείται από πέντε κύριες ομάδες: τις εκκρινόμενες PLA2 (sPLA2s), τις κυτοσολικές (cPLA2s), τις ανεξάρτητες ιόντων ασβεστίου (iPLA2s), τις ακετυλοϋδρολάσες του PAF και τη λυσοσωμική PLA2 (Lp-PLA2s) [87]. Κάθε μια από αυτές τις κατηγορίες έχει εμπλακεί σε ποικίλα μονοπάτια του μεταβολισμού λιπιδίων και παθολογικών καταστάσεων, οπότε υπάρχει τεράστιο ενδιαφέρον στη φαρμακοβιομηχανία για την ανάπτυξη εκλεκτικών και ισχυρών αναστολέων για κάθε ένα μέλος της οικογένειας PLA2 [88].

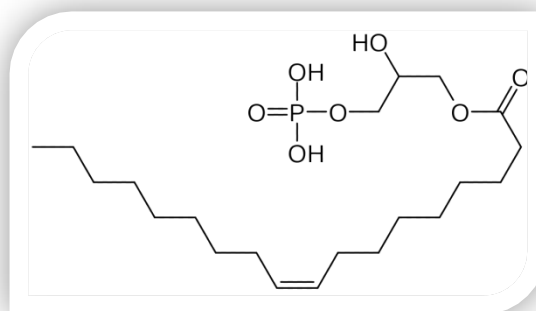
Το ενδοκυτταρικό LPC παράγεται από το PC των μεμβρανών μέσω της ενζυμικής δράσης της cPLA2 [87]. Στην κυκλοφορία, μεγάλη ποσότητα του LPC παράγεται από το PC των λιποπρωτεϊνών μέσω της sPLA2 [87] ή μέσω δράσης της ακυλοτρανσφεράσης της λεκιθίνης-χοληστερόλης (LCAT), ένα ένζυμο που εκφράζεται κυρίως από το ήπαρ και μπορεί να διασπά την φωσφατιδυλοχολίνη των λιποπρωτεϊνών χαμηλής ή υψηλής πυκνότητας (HDL, LDL) προς σχηματισμό λυσοφωσφατιδυλοχολίνης και εστέρα χοληστερόλης [89]. Οι ενδοθηλιακές λιπάσες εμφανίζουν δραστικότητα PLA1 και μπορούν να διασπάσουν το λιπαρό οξύ από τον εστερικό δεσμό sn-1 του PC των HDL για να παράγουν LPC [90].



Εικόνα 4: Γενική χημική δομή των λυσοφωσφατιδυλοχολινών, όπου το R είναι η αλυσίδα λιπαρών οξέων.

1.2.2. Λυσοφωσφατιδικό οξύ (lysophosphatidic acid, LPA)

Το LPA ανιχνεύεται *in vivo*, είτε σε κορεσμένη μορφή (16:0, 18:0) ή σε ακόρεστη (16:1, 18:1, 18:2, 20:4) [25] σε πληθώρα βιολογικών υγρών: στο σάλιο, στο σπέρματικό υγρό, στο θυλακοειδές υγρό, στο ασπράδι αυγού και στο υγρό της περιτοναϊκής κοιλότητας [91]. Ο ορός αίματος είναι η πιο γνωστή και μελετημένη πηγή LPA [92], με την συγκέντρωση του LPA σε υγιή πληθυσμό να υπολογίζεται γύρω στα 0.7 μM [93], με τα 18:2 (30%), 20:4 (39%), 18:1 (9%) είδη να βρίσκονται σε μεγαλύτερη αφθονία [94]. Τα επίπεδα LPA που ανιχνεύονται στο πλάσμα είναι πολύ χαμηλότερα από ότι στον ορό, υποδηλώνοντας ότι μέρος του LPA του ορού παράγεται από τα αιμοπετάλια [50, 91]. Ωστόσο, το LPA δεν αποθηκεύεται ούτε εκκρίνεται από τα αιμοπετάλια, αλλά είναι το προϊόν της ενζυμικής υδρόλυσης φωσφολιπιδίων που προέρχονται από αιμοπετάλια όπως το LPC [94], ενδεχομένως εμπλέκοντας την ενζυμική δράση της PLA1 της θειοεστεράσης 1 (APT1) [95]. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω η συγκέντρωση του LPC στο πλάσμα (190 μM) είναι πολύ υψηλότερη από τη συγκέντρωση του LPA, ενώ δεν παρατηρείται αντιστοιχία στα είδη που εντοπίζονται σε αφθονία: για το LPC (16:0 > 18: 1/18:0 > 20: 4), για το LPA (18: 2 > 20: 4 > 18: 1). Επιπλέον, παρόλο που τα είδη LPC στο πλάσμα μπορούν να επηρεαστούν άμεσα από τη διατροφή, κάτι τέτοιο δεν έχει αποδειχθεί για τα είδη LPA [96].

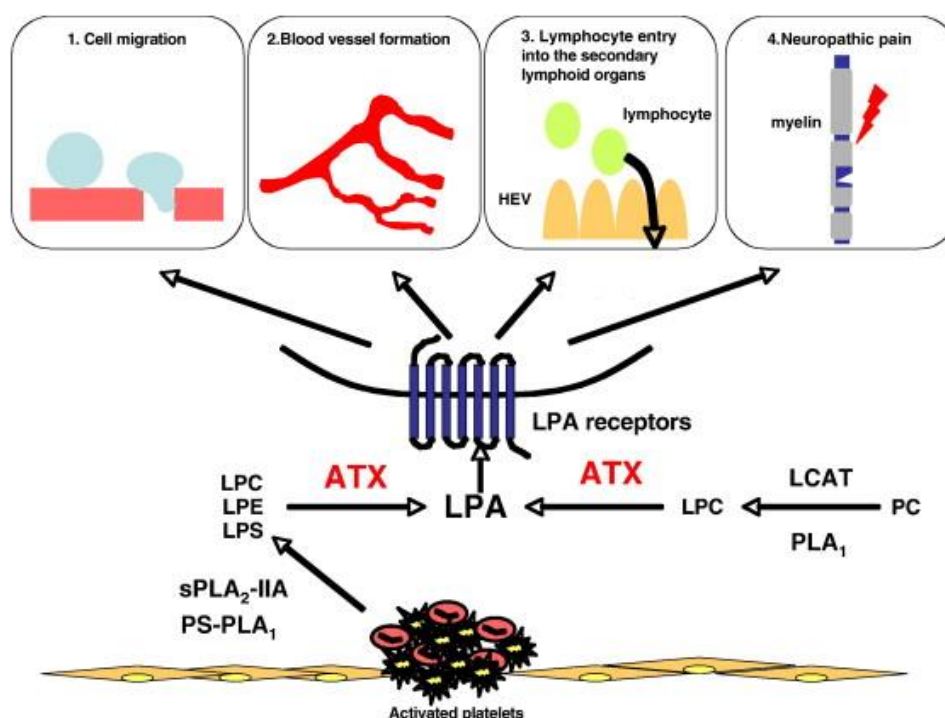


Εικόνα 5: Χημική δομή του LPA (1-O-acyl-2-hydroxy-sn-glycero- 3-phosphate) [97].

Η πλειονότητα του LPA της κυκλοφορίας πιστεύεται ότι προέρχεται από την δράση φωσφολιπάσης D της αυτοταξίνης (ATX, ENPP2), μέσω υδρόλυσης λυσοφωσφολιπιδίων (LPC, LPE, LPI) [9]. Μελέτες έχουν δείξει ότι στα ετερόζυγα knockout για την ATX ποντίκια, όπου η παραγωγή ATX έχει πέσει κατά 50%, τα επίπεδα LPA είναι επίσης μειωμένα κατά 50% [98-100]. Ανάλογα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν με φαρμακολογική αναστολή της ATX, όπου επιτεύχθηκε 95% μείωση των επιπέδων LPA [14, 101]. Η ανακάλυψη της κρυσταλλικής δομής της ATX παρείχε περαιτέρω πληροφορίες σχετικά με τον τρόπο παραγωγής και δράσης του LPA. Η δεσμευμένη με ιντεγκρίνη στην κυτταρική επιφάνεια ATX, παράγει LPA το οποίο δρα τοπικά μέσω των υποδοχέων του ενεργοποιώντας ποικίλα κυτταρικά μονοπάτια [102-104].

Ένας μηχανισμός που επίσης έχει προταθεί για την ενδοκυτταρική παραγωγή του LPA είναι μέσω της αποακετυλίωσης φωσφατυδικού οξέος από τις φωσφολιπάσες (phospholipases, PL) A1 και A2 ένζυμα [25]. Το LPA που παράγεται ενδοκυτταρικά θα μπορούσε στη συνέχεια να εκκρίνεται, ωστόσο δεν υπάρχει *in vivo* απόδειξη για την έκκριση του LPA από οποιονδήποτε κυτταρικό τύπο. Τέλος, το LPA αποικοδομείται από τις λιπιδικές φωσφατάσες (lipid-phosphate phosphatases, LPPs) σε μονοακυλογκυκερόλη, ρυθμίζοντας τον μεταβολισμό του [105]. Έχουν περιγραφεί τρεις LPPs (LPP1-3), η LPP-1 εκφράζεται ευρέως σε ιστούς όπως ο προστάτης, η ουροδόχος κύστη, η μήτρα, ο νεφρός, ο πνεύμονας, η καρδιά και το ήπαρ, ενώ η LPP-3 έχει ευρεία έκφραση [106] και η LPP-2 εκφράζεται κυρίως στον εγκέφαλο, το πάγκρεας και τον πλακούντα [107]. Οι LPPs είναι διαμεμβρανικά ένζυμα με τις ενεργές τους θέσεις στην εξωτερική επιφάνεια των μεμβρανών [108,

109] και μπορούν να αποφωσφορυλιώσουν τα LPA, PA, S1P και C1P (ceramide 1-phosphate) [110]. Σε γενετικά τροποποιημένα ζώα με έλλειψη της LPP-1 παρατηρήθηκε μειωμένη αποικοδόμηση του LPA [111]. Ωστόσο, δεν διαπιστώθηκαν διαφορές στα επίπεδα LPA σε διαγονιδιακούς ποντικούς που υπερεκφράζουν την LPP-1 [112].



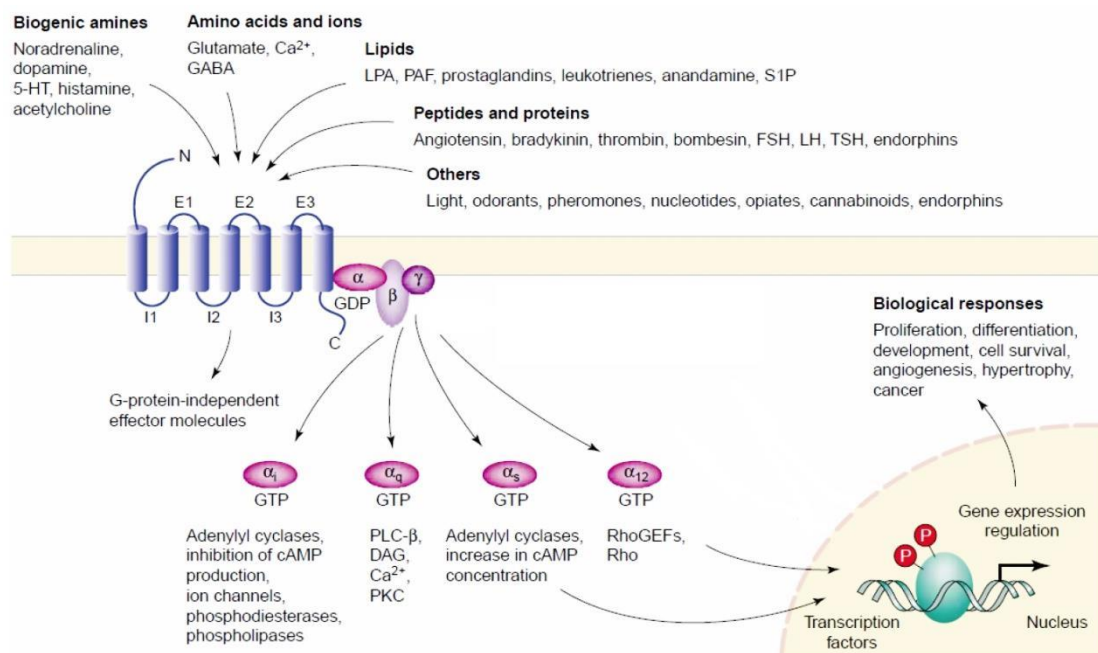
Εικόνα 6: Η δράση της ATX μέσω παραγωγής LPA. Το LPA της κυκλοφορίας μπορεί να παράγεται κυρίως μέσω δύο οδών. Στην πρώτη περίπτωση το LPA σχηματίζεται μέσω λυσοφωσfolιπιδίων (LPC, LPE και LPS) τα οποία παράγονται από την δράση των sPLA₂-IIA ή PS-PLA₁ στα μεμβρανικά φωσfolιπίδια των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων, ακολουθούμενη από την δράση της ATX. Στην δεύτερη οδό το LPA μπορεί να δημιουργηθεί με διαδοχική δράση των LCAT ή PLA₁ και της ATX. Το LPA που παράγεται από την ATX συμμετέχει σε πληθώρα κυτταρικών διεργασιών μέσω των υποδοχέων του ορισμένες από τις οποίες είναι : (1) προώθηση της μετανάστευσης κυττάρων, (2) σχηματισμός αιμοφόρων αγγείων, (3) διευκόλυνση εισόδου λεμφοκυττάρων στα δευτερογενή λεμφοειδή όργανα και (4) επαγωγή του νευροπαθητικού πόνου [25, 91].

1.2.3.Υποδοχείς LPA και σηματοδότηση

Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί επτά υποδοχείς για το LPA, οι οποίοι κατηγοριοποιούνται σε δυο ομάδες. Στην πρώτη ομάδα συμπεριλαμβάνονται οι LPA1/EDG2 [113], LPA2/EDG4 [114] και LPA3/EDG7 [115] που ανήκουν στην υποοικογένεια EDG (endothelial differentiation gene) των GPCRs. Οι υποδοχείς LPA4 (GPR23/p2y9) [116], LPA5 (GPR92) [117], GPR87 [118] και P2Y5 [119] ανήκουν στη δεύτερη ομάδα που εμφανίζουν ομοιότητα με τους P2Y νουκλεοτιδικούς υποδοχείς. Οι ποικίλες βιολογικές δράσεις του LPA συνάδουν με την ευρεία κατανομή των υποδοχέων του στους ιστούς και τη σύζευξή τους με τις διαφορετικές οικογένειες G-πρωτεϊνών [46].

Υπάρχουν δύο κύρια μονοπάτια μεταγωγής σήματος στα οποία εμπλέκονται οι υποδοχείς συζευγμένοι με πρωτεΐνες G: το σηματοδοτικό μονοπάτι της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης και αυτό της cAMP [120]. Όταν ένας προσδέτης συνδέεται με υποδοχέα GPCR, προκαλεί μία αλλαγή στην διαμόρφωση του υποδοχέα η οποία επιτρέπει να ενεργήσει ως παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (GEF). Στη συνέχεια, ο GPCR ενεργοποιεί μια ενωμένη με αυτόν πρωτεΐνη G, με την μετατροπή του GDP σε GTP. Η α-υπομονάδα της G πρωτεΐνης, μαζί με το δεσμευμένο GTP, απομακρύνεται από τις β- και γ- υπομονάδες και σηματοδοτεί περαιτέρω ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες ή στοχοποιεί λειτουργικές πρωτεΐνες, γεγονός που εξαρτάται άμεσα από τον υπότυπο της α- υπομονάδας ($G_{\alpha s}$, $G_{\alpha i/o}$, $G_{\alpha q/11}$, $G_{\alpha 12/13}$) [121].

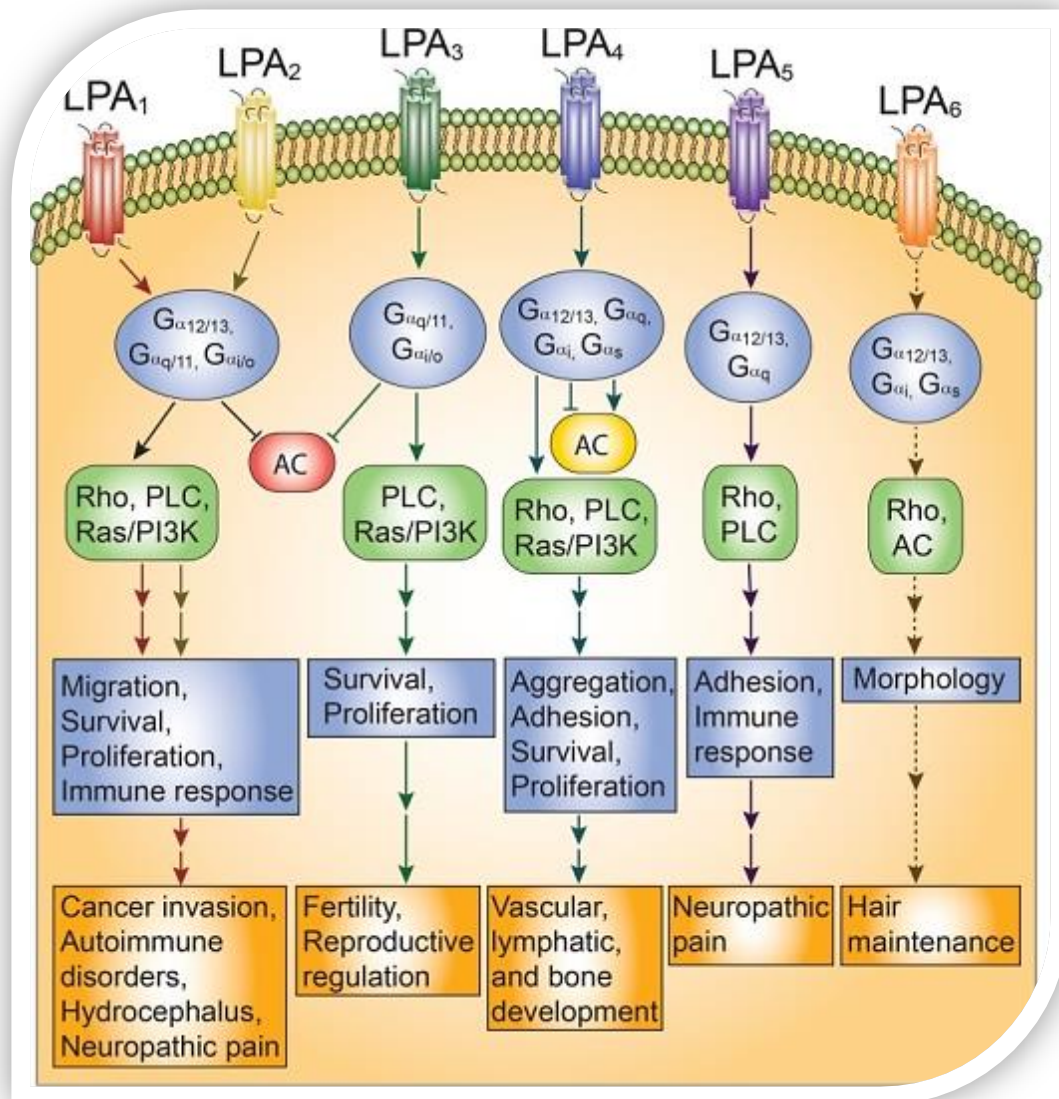
Οι LPA₁, LPA₂ και LPA₃ αλληλεπιδρούν με τις Gαi/o και Gαq/11 πρωτεΐνες, επάγοντας τα μονοπάτια των MAP, Akt και Rac κινασών. Αντίθετα με τον LPA₃ οι LPA₁ και LPA₂ ενώνονται επίσης με την G_{12/13} για την ενεργοποίηση μικρών GTPασών (Rho) και την επαγωγή μονοπατιών που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επιβίωση, στην κυτταρική μετανάστευση, στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού. Οι LPA₄ και LPA₅ αλληλεπιδρούν με την G_{12/13} συμμετέχοντας στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, ενώ αυξάνουν τα επίπεδα του ενδοκυτταρικού ασβεστίου μέσω Gαq/11. Ο LPA₆ ενώνεται με το G_{12/13}, ενώ η συγγένεια του με το LPA φαίνεται να είναι χαμηλή [122].



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση των προσδετών που συνδέονται με τους συζευγμένους με G πρωτεΐνη υποδοχείς και οι τέσσερις κύριες οδοί σηματοδότησης τους. Ένα ευρύ φάσμα συνδετών μπορεί να δεσμεύει και να ενεργοποιεί GPCRs μέσω οδών που εξαρτώνται από πρωτεΐνη G (δηλαδή πρωτεΐνες Gas, Gaq, Gα1 και Gα12) και ανεξαρτήτως πρωτεΐνης G (π.χ. β-αρρεστίνη). Αυτές οι οδοί σηματοδότησης μπορούν να ρυθμίσουν τις κυριότερες κυτταρικές λειτουργίες όπως ο πολλαπλασιασμός [123]

Ο LPA₁ είναι ένας υποδοχέας που εκφράζεται σε πολλά όργανα και η γενετική απαλοιφή του σε ποντίκια αποκάλυψε τον σημαντικό ρόλο του στην ανάπτυξη. Πολλές μελέτες εμπλέκουν τον LPA₁ στην νευρωνική ανάπτυξη και τη λειτουργία διαφόρων τύπων νευρογλοιακών κυττάρων (αστροκύτταρα, ολιγοδενδροκύτταρα, κύτταρα Schwann) [124], ενώ μπορεί να προωθήσει την κυτταρική μετανάστευση, την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό. Ο LPA₂ εμπλέκεται επίσης στη λειτουργία και ανάπτυξη του νευρικού συστήματος όπως ο LPA₁, ωστόσο οι δύο υποδοχείς φαίνεται να έχουν αντίθετες επιδράσεις στα κύτταρα του αγγειακού και του ανοσοποιητικού συστήματος [124]. Ο LPA₃ έχει συνδεθεί με την αναπαραγωγή και την εμβρυογένεση [124]. Οι LPA₄ και LPA₅ καταστέλλουν την κυτταρική κινητικότητα, αντίθετα με τους άλλους υποδοχείς LPA. Ο LPA₄ επιπλέον, φαίνεται να έχει αντίθετη λειτουργία από τον LPA₁ στην οστεογένεση [124]. Ο LPA₄ παίζει ρόλο στην ανάπτυξη του κυκλοφορικού και του

λεμφικού συστήματος. Ο LPA₅ έχει υποτιθέμενο ρόλο στην ανάπτυξη του εγκεφάλου και εμπλέκεται στην απορρόφηση του νερού στο παχύ έντερο. Ο LPA₆ είναι η τελευταία προσθήκη στους υποδοχείς LPA, με αποδεδειγμένο ρόλο στην ανάπτυξη του θύλακα της τρίχας και στην απώλεια μαλλιών [125].



Εικόνα 8: Σηματοδότηση υποδοχέων LPA και λειτουργίες. Οι κυτταρικές αποκρίσεις ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των υποδοχέων LPA και τις σύζευξης τους με διαφορετικές G πρωτεΐνες [126].

1.3.Ο άξονας ATX/LPA στην παθοφυσιολογία

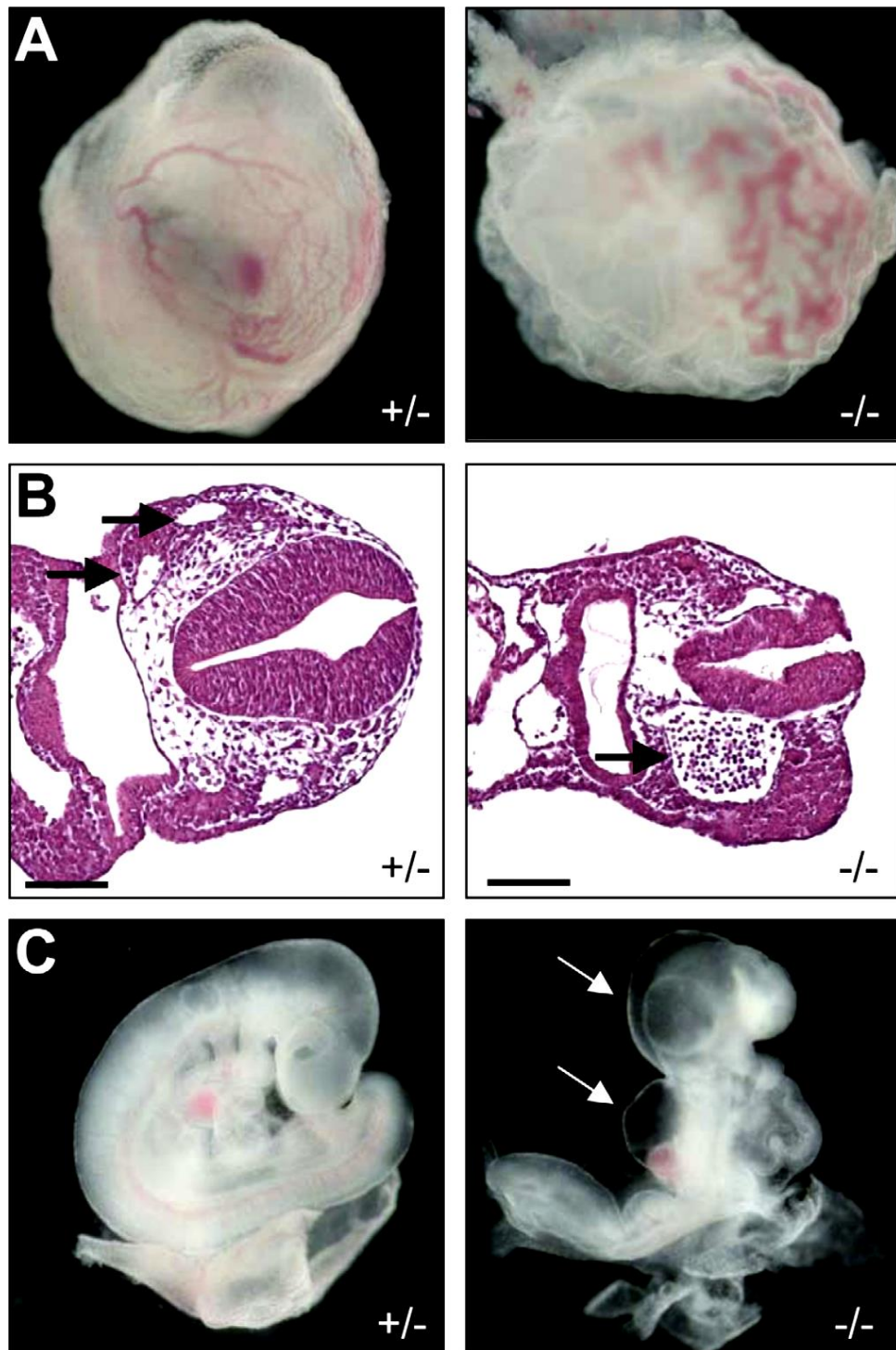
Η ATX έχει αναγνωριστεί ως δείκτης διαφόρων τύπων ασθενειών και εκφράζεται σε ένα μεγάλο αριθμό ιστών όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, τόσο στο ποντίκι όσο και στον άνθρωπο [7]. Φαίνεται ότι ο ρόλος της ATX να παρέχει στους συνδετικούς ιστούς τεράστιες ποσότητες LPA είναι κλειδί σε πολλές διαδικασίες.

Η ATX εμπλέκεται στα πρώιμα στάδια της **εμβρυϊκής ανάπτυξης** [27, 127-129]. Η γενετική απαλοιφή της ATX σε ποντίκια, η οποία καταστέλλει την παραγωγή του LPA, οδήγησε σε εμβρυϊκή θνησιμότητα λόγω δυσμορφιών του νευρικού και αγγειακού δικτύου [98-100, 130]. Αντίθετα με ότι συμβαίνει στην εμβρυϊκή ζωή, η επαγόμενη γενετική απαλοιφή ή η φαρμακολογική αναστολή της ATX σε ενήλικους ποντικούς δεν προκαλεί παθολογικό φαινότυπο [131], υποδεικνύοντας ότι η πλειονότητα της ATX και κατ' επέκταση του LPA (>80%) δεν είναι απαραίτητη για την υγιή ομοίωση του ιστού κατά την ενήλικη ζωή. Με βάση τον σημαντικό ρόλο της ATX στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, άλλα όχι στην μετέπειτα ζωή, συμπεραίνουμε ότι ο άξονας ATX/LPA αποτελεί ένα αναπτυξιακό μονοπάτι το οποίο υπερεκφράζεται σε παθολογικές καταστάσεις.

Την περίοδο της **εγκυμοσύνης** στον άνθρωπο, ανιχνεύεται αυξημένη ATX στον ορό [132], με αντίστοιχη αύξηση των επιπέδων LPA [133, 134]. Αλλαγές στα επίπεδα ATX και LPA έχουν συνδεθεί με πολυάριθμες παθολογικές καταστάσεις [133-135] της εγκυμοσύνης. Συγκεκριμένα, η ATX αποτελεί έναν εξαιρετικά ευαίσθητο, ειδικό και ισχυρό διαγνωστικό δείκτη της ενδοηπατικής χολόστασης της κύησης (Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy-IHCP), διαχωρίζοντας την από διαταραχές κνησμού ή ηπατικές παθήσεις σχετιζόμενες με εγκυμοσύνη [136]. Επίσης, η ATX μπορεί να αποτελέσει έναν ελπιδοφόρο βιοδείκτη για την ανίχνευση της προεκλαμψίας, ωστόσο απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να ενισχύσουν αυτήν την υπόθεση. Τα ως τώρα δεδομένα δείχνουν υψηλότερα επίπεδα της αυτοταξίνης σε ασθενείς με προεκλαμψία, τα οποία συσχετίζονται με τα επίπεδα της συστολικής, διαστολικής αρτηριακής πίεσης και του ουρικού οξέος της μητέρας [135, 137].

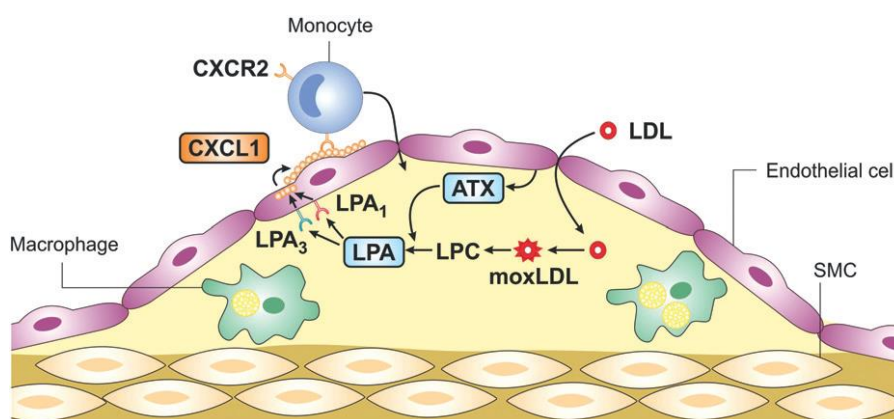
Πολυάριθμες μελέτες υποστηρίζουν ότι η ATX και το LPA διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην **ανάπτυξη και λειτουργία του αγγειακού συστήματος** [98, 99, 138]. Η αποσιώπηση της αυτοταξίνης στο πειραματόζωο zebrafish είχε ως αποτέλεσμα ανώμαλη εμβρυϊκή αγγειακή ανάπτυξη [139]. Παρόμοια, στα ATX knockout (*Enpp2^{-/-}*) ποντίκια, ο εμβρυϊκός θάνατος την ημέρα 9.5 συνδέθηκε με αγγειακές ανωμαλίες στον αμνιακό σάκο και στο έμβρυο [99]. Μολονότι, οι υποδοχείς του LPA εκφράζονται κατά την διάρκεια των εμβρυϊκών ημερών 6.5-10.5, η γενετική απαλοιφή των υποδοχέων του LPA (*LPA₁₋₃*) δεν έχει συνδεθεί με αντίστοιχα αγγειακά προβλήματα στο εμβρυικά στάδια. Αξιοσημείωτο είναι ότι τα έμβρυα *Ga₁₃^{-/-}* εμφανίζουν παρόμοιες βλάβες με τα έμβρυα *Enpp2^{-/-}* στο αγγειακό σύστημα [140], υποδηλώνοντας ότι το LPA που παράγεται από την ATX, εμπλέκεται στην ανάπτυξη του αγγειακού συστήματος μέσω της σηματοδότησης του μονοπατιού *Ga₁₃-RhoA*, επάγοντας την μετανάστευση και προσκόλληση των ενδοθηλιακών κυττάρων στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία [141]. Επιπρόσθετα, σε έμβρυα διαγονιδιακών ποντικών που υπερεκφράζουν ATX [142] και σε *LPP3^{-/-}* (knock out) έμβρυα [143, 144], τα οποία διατηρούν πολύ υψηλότερα επίπεδα LPA από τα φυσιολογικά ποντίκια, παρατηρήθηκε παρόμοιος φαινότυπος, καθιστώντας σαφές ότι τα επίπεδα του LPA πρέπει να ρυθμίζονται αυστηρά κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Στην ενήλικη ζωή, το LPA έχει προταθεί να ρυθμίζει τη φυσιολογία των ενδοθηλιακών κυττάρων, μέσω της διέγερσης της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την **αγγειογένεση** και της διαμόρφωσης της διαπερατότητάς τους [143, 145, 146].

Με βάση τα παραπάνω, θα μπορούσαμε να συμπεράνουμε ότι ο άξονας ATX/LPA πιθανότατα να διαδραματίζει βασικό ρόλο σε ασθένειες που σχετίζονται με την αγγειογένεση όπως ο καρκίνος, ο εκφυλισμός της ωχράς κηλίδας, η αθηροσκλήρωση και η αρθρίτιδα. Πράγματι, το LPA έχει πληθώρα βιολογικών δράσεων σε κύτταρα του αίματος (αιμοπετάλια, μονοκύτταρα) και κύτταρα του αγγειακού τοιχώματος (ενδοθηλιακά κύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα, μακροφάγα) που εμπλεκονται σε αθηροσκληρωτικές και αθηροθρομβωτικές διεργασίες. Πολυάριθμες *in vitro* αλλά και αρκετές *in vivo* μελέτες υποστηρίζουν τις αθηρογόνες δράσεις του LPA και το ρόλο του στην **αθηροσκλήρωση** [147, 148].



Εικόνα 9: Φαινότυπος εμβρύων με έλλειψη ATX (-/-) σε σύγκριση με ετερόζυγα έμβρυα (+/-). Τα ομόζυγα ποντίκια πεθαίνουν την εμβρυϊκή ημέρα 9.5 εξαιτίας σοβαρών ανωμαλιών που παρατηρούνται στα αγγεία του σάκου (A) και στο έμβρυο. Επιπλέον παρατηρείται ελαττωματικό κλείσιμο του νευρικού σωλήνα (B) και ραχιαίες δυσμορφίες (C) [99].

Το LPA που παράγεται κατά τη διάρκεια οξείδωσης της LDL, μέσω των υποδοχέων $LPA_{1/3}$ της Rho-κινάσης, προάγει την έκκριση ενδοθηλιακής χημειοκίνης (CXCL1) με αποτέλεσμα την στρατολόγηση μονοκυττάρων στην αθηροσκληρωτική βλάβη [149]. Ταυτόχρονα, το LPA αυξάνει την πρόσληψη της ox-LDL σε μονοκύτταρα/μακροφάγα, επάγοντας την έκφραση του υποδοχέα σαρωτή A και αναστέλλει την μετανάστευση των κυττάρων αυτών από τις πλάκες, ενισχύοντας την αθηροσκλήρωση [150, 151]. Τέλος, το LPA που συσσωρεύεται στις πλούσιες σε λιπίδια αθηροσκληρωτικές πλάκες, μέσω του υποδοχέα LPA_5 και της Rho-κινάσης, ενισχύει την συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων και τον σχηματισμό θρόμβων.



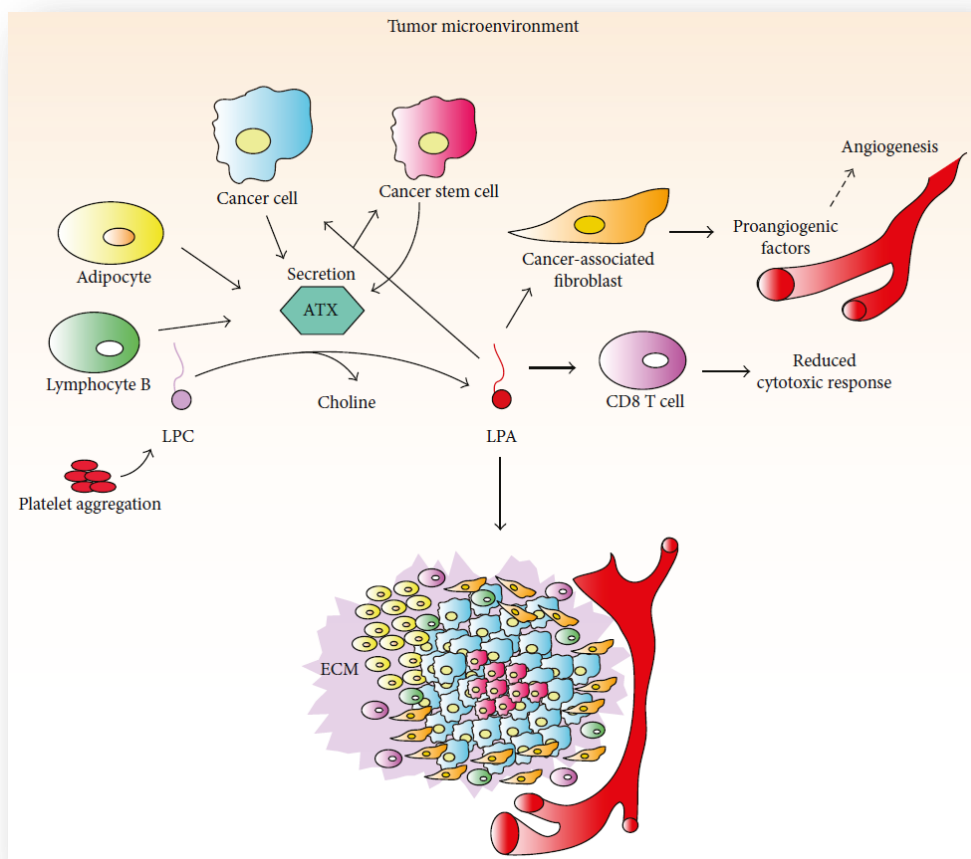
Εικόνα 10: Το LPA προάγει τη συσσώρευση μακροφάγων στις αθηροσκληρωτικές αλλοιώσεις. Το moxLDL οδηγεί σε αυξημένο σχηματισμό του LPC το οποίο, μέσω της ATX που εκκρίνεται από ενδοθηλιακά κύτταρα, μετατρέπεται σε LPA. Το LPA προάγει την απελευθέρωση της χημειοκίνης CXCL1 από ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω των υποδοχέων LPA_1 και LPA_3 . Το CXCL1 ακινητοποιείται στην ενδοθηλιακή επιφάνεια και επάγει την προσκόλληση μονοκυττάρων στο τοίχωμα του αγγείου μέσω του υποδοχέα CXCR2. Αυτά τα μονοκύτταρα μεταναστεύουν στον υποενδοθηλιακό χώρο και μετασχηματίζονται σε μακροφάγα, τα οποία είναι τα πρωτογενή κύτταρα στις πρώτες αρτηριοσκληρωτικές πλάκες [147].

Παράλληλα, οι παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου επηρεάζουν τον άξονα ATX/LPA, αυξάνοντας έτσι περαιτέρω την εξέλιξη των αθηροσκληρωτικών ασθενειών. Για παράδειγμα, η παχυσαρκία και η υπερλιπιδαιμία αυξάνουν την έκφραση και τη δραστικότητα της ATX και κατ' επέκταση την παραγωγή LPA στην κυκλοφορία [152]. Η παρατήρηση αυτή ενισχύεται περαιτέρω με τον ρόλο της ATX

ως λιποκυτοκίνη, δηλαδή η κύρια πηγή της είναι ο λιπώδης ιστός. Παρόλο που τα αποτελέσματα του άξονα ATX/LPA στη παχυσαρκία (adiposity) δεν είναι ξεκάθαρα [26, 153, 154], το μονοπάτι ATX/LPA φαίνεται να συμμετέχει στην ομοίωση της γλυκόζης και την αντίσταση σε ινσουλίνη [155], με πιθανές επιπτώσεις στην παθογένεια διαφόρων μεταβολικών διαταραχών. Ωστόσο, τα αυτοκρινή ή/και παρακρινή αποτελέσματα του άξονα ATX/LPA στον μεταβολισμό και οι επακόλουθες επιδράσεις στην παθογένεια της νόσου δεν έχουν ακόμη διερευνηθεί πλήρως.

Η ATX έχει συνδεθεί από νωρίς με τον **καρκίνο και την μετάσταση**, αφού αρχικά απομονώθηκε από ανθρώπινα κύτταρα μελανώματος λόγω της ικανότητάς της να προάγει την κινητικότητα τους [1], μέσω της σηματοδοτικής οδού του πυρηνικού παράγοντα κΒ (NFκΒ) [156]. Σε πειραματικό μοντέλο καρκίνου του πνεύμονα, η αναστολή του άξονα ATX/LPA μείωσε τη μετανάστευση και διήθηση των καρκινικών κυττάρων και την αγγειοποίηση του ιστού [157, 158]. Αυξημένη έκφραση της ATX έχει βρεθεί στα λιγότερο διαφοροποιημένα πνευμονικά καρκινώματα και σε Β λεμφοκύτταρα γειτονικά του όγκου [159]. Ο υποδοχέας LPA₅ μπορεί να διαδραματίσει βασικό ρόλο στην εξέλιξη των καρκινωμάτων [160], ενώ ο LPA₃ φαίνεται να έχει προστατευτικό ρόλο [161]. Επιπλέον, τα επίπεδα του LPA και άλλων φωσφολιπιδίων αυξάνονται ως παρενέργεια της χημειο- και ραδιοθεραπείας, δημιουργώντας ένα προμεταστατικό μικροπεριβάλλον στον καρκίνο του πνεύμονα [162], αυξάνοντας την κινητικότητα των κυττάρων και επάγοντας την έκκριση του ATP από τα κύτταρα του στρώματος, ενός άλλου ισχυρού χημειοκινητικού παράγοντα [162]. Όσον αφορά στον καρκίνο του μαστού, ο άξονας ATX-LPA προκαλεί φλεγμονή και σχηματισμό όγκων στο μαστικό αδένωμα μέσω των LPA₁₋₃ [163] και υψηλή έκφραση της ATX, η οποία παράγεται από τα γειτονικά μαστικά επιθήματα λίπους αντί για τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα [164]. Η μετάσταση στα οστά είναι συχνή στον καρκίνο του μαστού. Η ATX μέσω αλληλεπίδρασης με την ιντεγκρίνη ανβ3 σε κύτταρα όγκου, πιθανά ελέγχει την διαδικασία αυτή [165, 166]. Στο ήπαρ, η γενετική διαγραφή της Enpp2 από τα ηπατοκύτταρα εξασθένησε την ανάπτυξη του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (HCC), αποκαλύπτοντας τις αυτοκρινείς επιδράσεις ATX/LPA στον μεταβολισμό των ηπατοκυττάρων [42, 167]. Αυξημένη έκφραση της ATX έχει επίσης αναφερθεί στο

καρκίνο του θυρεοειδούς [168, 169], των ωοθηκών [168, 169], στο νευροβλάστωμα και γλοιοβλάστωμα [170]. Τέλος, η ATX έχειδειχθεί ότι επάγεται από την υπερέκφραση και/ή την ενεργοποίηση ορισμένων βασικών ογκογονιδίων όπως: *ras* [171, 172], *jun* [32, 173, 174], *rhoC* [175], πιθανώς *fyn* [176], το πρωτοογκογονίδιο *wnt-1* [177, 178] ή τις ιντεγκρίνες [38].



Εικόνα 11: ATX και LPA στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Η ATX απελευθερώνεται κυρίως στο μικροπεριβάλλον του όγκου από τα γειτονικά λιποκύτταρα, B λεμφοκύτταρα, καρκινικά κύτταρα και βλαστικά καρκινικά κύτταρα. Το LPA μέσω των υποδοχέων του επάγει πολλαπλασιασμό και εισβολή των καρκινικών κυττάρων. Η σηματοδότηση LPA επάγει αγγειογένεση μέσω της πρόσληψης CAFs. μειώνει επίσης την κυτταροτοξική ανοσοαπόκριση μέσω CD8+ T κυττάρων. ECM (εξωκυτταρική θεμέλια ουσία) [179].

Ένας άλλος σημαντικός ρόλος της ATX είναι στις ασθένειες του **κεντρικού νευρικού συστήματος** [180]. Η ATX εμπλέκεται στην έναρξη του νευροπαθητικού πόνου μέσω του μετασχηματισμού του LPC σε LPA [181-185], διαδραματίζει βασικό ρόλο στη μυελίνωση [28, 186, 187] και πιθανώς στην επούλωση πληγών [15]. Η ATX επίσης ρυθμίζει τη φυσιολογία των ολιγοδενδροκυττάρων και ελέγχει τη

διαφοροποίηση τους μέσω καταλυτικών και μη καταλυτικών λειτουργιών [170, 188]. Αυξημένα επίπεδα ATX και LPA έχουν ανιχνευθεί στους ορούς και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (CSF) ασθενών με σκλήρυνση κατά πλάκας [189-191], ενώ η φαρμακολογική αναστολή της ATX μείωσε την ανάπτυξη της **πειραματικής αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας [192] (βλ. Κεφάλαιο 2).**

Ο άξονας ATX/LPA έχει αποδεδειγμένο ρόλο στην παθογένεια πολλών χρόνιων φλεγμονωδών παθήσεων. Στην **ρευματοειδή αρθρίτιδα**, η γενετική απαλοιφή της ATX από συνοβιακούς ινοβλάστες ή η φαρμακολογική αναστολή εμπόδισε την ανάπτυξη της νόσου [43, 193-195]. Η επαγόμενη από τον TNF-α έκκριση της ATX από τους αρθρικούς ινοβλάστες. Είχε ως αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή του LPA, το οποίο με την σειρά του διεγείρει την κυτταροσκελετική αναδιοργάνωση, τον πολλαπλασιασμό και την μετανάστευση των αρθρικών ινοβλαστών [43], τον κύριο κυτταρικό τύπο που εμπλέκεται στην ρευματοειδή αρθρίτιδα.

Η **χρόνια φλεγμονή του ήπατος**, που οφείλεται σε κυτταροτοξικά, ιικά ή μεταβολικά ερεθίσματα, έχειδειχθεί ότι διεγείρει την έκκριση της ATX από ηπατοκύτταρα, ενώ το LPA έχειδειχθεί ότι ενεργοποιεί ηπατικά κύτταρα (stellate cells) και ενισχύει προ-ινωτικά μονοπάτια [42]. Η υπό όρους γενετική διαγραφή της Enpp2 από τα ηπατοκύτταρα ή η φαρμακολογική αναστολή της ATX, εξασθένησε την ανάπτυξη της ίνωσης στο πειραματικό μοντέλο [42]. Αυξημένη έκφραση της ATX έχει αναφερθεί σε ασθενείς με χρόνιες ηπατικές νόσους διαφορετικής αιτιολογίας, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ATX αποτελεί διαγνωστικό δείκτη διαφόρων μορφών ηπατικής ίνωσης [42, 202]. Η ATX και το LPA εμπλέκονται επίσης στην ίνωση άλλων ιστών, όπως η νεφρική ίνωση [203], ίνωση δέρματος [204, 205] και η **πνευμονική ίνωση (βλ κεφάλαιο 2).**

Τέλος, έχει προταθεί η πιθανή ρύθμισης της ανοσολογικής απόκρισης από το μονοπάτι ATX/LPA. Αυξημένη χρώση ATX ανιχνεύεται σε λεμφοειδή συσσωματώματα, με την ATX να αποτελεί συγκολλητικό υπόστρωμα για την προσέλκυση λεμφοκυττάρων, διευκολύνοντας τη μετανάστευσή τους διαμέσου ενδοθηλίου [196-200], ενώ πρόσφατα αποδείχθηκε ότι το LPA επάγει την μετατροπή των μονοκυττάρων σε μακροφάγα [201].

2.Φλεγμονώδεις Παθήσεις

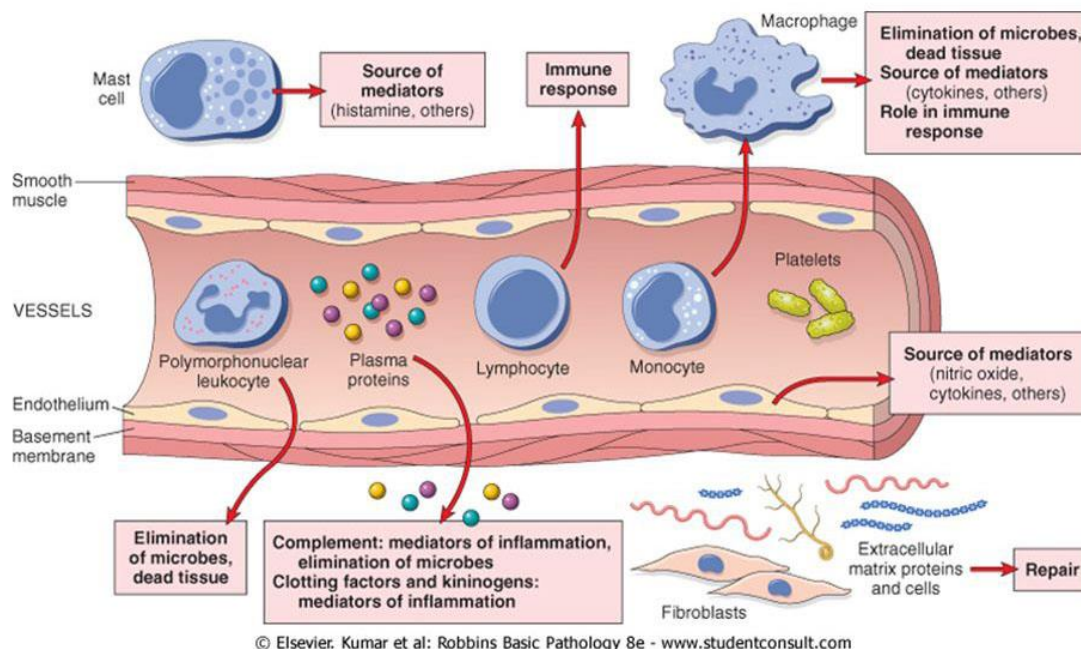
2.1.Φλεγμονή

Φυσιολογικά τα κύτταρα αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και με την εξωκυττάρια ουσία, διατηρώντας τη λειτουργική και δομική ακεραιότητα των ιστών. Μια βλάβη που προκαλείται στον ιστό λόγω τραύματος ή εισβολής διαφόρων βλαπτικών παραγόντων όπως παθογόνων μικροοργανισμών επάγει μια πολύπλοκη αλληλουχία γεγονότων που είναι γνωστή ως φλεγμονώδης απόκριση. Η φλεγμονή λοιπόν αποτελεί έναν αμυντικό μηχανισμό του ανοσοποιητικού συστήματος του οργανισμού που στοχεύει στην απομάκρυνση του βλαπτικού παράγοντα και στην επιδιόρθωση του ιστού (tissue repair).

Στο μηχανισμό της φλεγμονής εμπλέκονται ποικίλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (ουδετερόφιλα, μακροφάγα, λεμφοκύτταρα), συστατικά του πλάσματος αλλά και κυτταρικά και εξωκυτταρικά συστατικά του συνδετικού ιστού (**Εικόνα 12**). Τα φλεγμονώδη κύτταρα καταφθάνουν στη θέση της φλεγμονής μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, προσκολλώνται στο ενδοθήλιο των αγγείων και διηθούν τους ιστούς μέσω των μορίων προσκολλησης (adhesion molecules). Ταυτόχρονα, απελευθερώνονται από τα φλεγμονώδη κύτταρα πρωτεολυτικά ένζυμα, νιτρικό οξείδιο και ελεύθερες ρίζες οξυγόνου που ενισχύουν την αποδόμηση των νεκρών ιστών, οι οποίοι φαγοκυτταρώνονται από τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα. Χημικοί μεσολαβητές που προέρχονται από το πλάσμα (λ.χ. σύστημα του συμπληρώματος, το σύστημα πήξης και ινωδόλυσης) ή τα κύτταρα (λ.χ. οι προσταγλανδίνες και οι κυτταροκίνες) ενισχύουν την φλεγμονώδη αντίδραση, δρώντας μέσω ειδικών υποδοχέων στα κύτταρα στόχους. Η φλεγμονή τερματίζεται όταν εξαλειφθεί το βλαπτικό ερέθισμα και οι μεσολαβητές της φλεγμονής εξαφανισθούν ή ανασταλούν. Ωστόσο όμως, η φλεγμονή και η επιδιόρθωση μπορεί να αποβούν βλαπτικές και να οδηγήσουν σε νόσους όπως η **πνευμονική ίνωση**.

Η φλεγμονή διαχωρίζεται σε οξεία (εξίδρωση υγρού και πρωτεϊνών πλάσματος, συσσώρευση ουδετερόφιλων) και χρόνια (λεμφοκύτταρα, μακροφάγα,

πολλαπλασιασμός αγγείων, ίνωση, ιστική νέκρωση), τα χαρακτηριστικά των οποίων αναλύονται παρακάτω.



Εικόνα 12: Φλεγμονώδης απόκριση και διαδικασία επούλωσης τραύματος. Ενδαγγειακά κύτταρα, εξωκυττάρια ουσία και κύτταρα συνδετικού ιστού που συμμετέχουν στη φλεγμονώδη αντίδραση.

Η οξεία φλεγμονή είναι η άμεση και πρώιμη απόκριση του οργανισμού στο ερέθισμα, με χαρακτηριστικές αγγειακές και κυτταρικές αντιδράσεις. Οι αγγειακές αντιδράσεις περιλαμβάνουν διαδοχικά αύξηση αιματικής ροής και αυξημένη διαπερατότητα αγγείων η οποία οδηγεί σε διαρροή υγρού πλούσιου σε πρωτεΐνη (εξίδρωμα) στον διάμεσο ιστό (οίδημα). Η αγγειοδιαστολή και η επακόλουθη αυξημένη ροή αίματος προκαλεί την ερυθρότητα και την αύξηση της θερμοκρασίας, κλινικά σημάδια της φλεγμονής. Επίσης, κατά την έναρξη μιας μόλυνσης ή άλλης βλάβης, κύτταρα που υπάρχουν σε όλους τους ιστούς (μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα, κύτταρα Kupffer και μαστοκύτταρα) ενεργοποιούνται και εκκρίνουν μεσολαβητές οι οποίοι διευκολύνουν την μετανάστευση των λευκοκυττάρων (κυρίως των ουδετερόφιλων) στον ιστό. Η μετανάστευση των ουδετερόφιλων περιλαμβάνει τα εξής στάδια: μετακίνηση από τον αυλό προς το αγγειακό τοίχωμα

(margination), κύλιση-παροδική προσκόλληση στο ενδοθήλιο (rolling) και προσκόλληση (adhesion) μέσω μορίων προσκόλλησης στο ενδοθηλιακό τοίχωμα των αιμοφόρων αγγείων, την επακόλουθη μετανάστευσή τους μέσω ενδοθηλίου στους ιστούς (διαπίδυση ή εξαγγείωση) και τέλος τη μετανάστευση στο διάμεσο ιστό υπό την επίδραση χημειοτακτικών παραγόντων (χημειοταξία). Κατά την χημειοταξία και την ακόλουθη φαγοκυττάρωση τα ενεργοποιημένα λευκοκύτταρα απελευθερώνουν τοξικούς μεταβολίτες και πρωτεάσες στην εξωκυττάρια ουσία, με πιθανό αποτέλεσμα την ιστική καταστροφή. Η οξεία φλεγμονή μπορεί να εξελιχθεί σε χρόνια φλεγμονή.

Η χρόνια φλεγμονή χαρακτηρίζεται από διήθηση με μονοπύρρηνα (μακροφάγα, λεμφοκύτταρα, πλασματοκύτταρα), ιστική καταστροφή και προσπάθεια επιδιόρθωσης του κατεστραμμένου ιστού. Τα μακροφάγα προέρχονται από μονοκύτταρα του αίματος τα οποία μετακινούνται και πολλαπλασιάζονται στην περιοχή της φλεγμονής, παράγοντας πληθώρα τοξικών ουσιών που οδηγούν σε ιστική καταστροφή. Επίσης, παράγοντες που εκκρίνονται από τα μακροφάγα οδηγούν σε πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών, εναπόθεση κολλαγόνου και αγγειογένεση.

Πολλές ανθρώπινες ασθένειες χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη φλεγμονώδους απόκρισης, ορισμένα παραδείγματα αποτελούν: η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η νόσος του Crohn, η ελκώδης κολίτιδα και οι αυτοάνοσες διαταραχές κ.α.

2.2.Αυτοάνοσες διαταραχές

Το ανοσοποιητικό σύστημα είναι ένα πολύπλοκο δίκτυο από κύτταρα και χυμικές ουσίες, ο φυσιολογικός ρόλος του οποίου είναι να προστατεύει τον οργανισμό και να αντιμετωπίζει λοιμώξεις που προκαλούνται από βακτήρια, ιούς και άλλους μικροοργανισμούς που προσβάλλουν το σώμα. Λανθασμένα, το ανοσοποιητικό σύστημα επιτίθεται εναντίον του εαυτού του σε κύτταρα, ιστούς ή όργανα με αποτέλεσμα να προκαλείται χρόνια φλεγμονή και να δημιουργείται αυτοανοσία. Μια αυτοάνοση ασθένεια μπορεί να επηρεάσει έναν ή πολλούς διαφορετικούς τύπους ιστών του σώματος. Μπορεί επίσης να προκαλέσει μια μη φυσιολογική ανάπτυξη των οργάνων ή/και να επιφέρει αλλαγές στην λειτουργία τους. Τα αυτοάνοσα νοσήματα προσβάλλουν το 5% του πληθυσμού στις δυτικές χώρες και με εξαίρεση τη ρευματοειδή αρθρίτιδα και την αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα θεωρούνται σπάνια. Τα περισσότερα αυτοάνοσα νοσήματα προσβάλλουν συχνότερα τις γυναίκες από τους άντρες.

Οι παράγοντες που προδιαθέτουν για εμφάνιση αυτοάνοσου νοσήματος είναι γενετικοί, ορμονικοί, νευροψυχολογικοί και περιβαλλοντικοί. Συνήθως οι ασθενείς που εκδηλώνουν αυτοάνοσο νόσημα έχουν στην οικογένεια τους και άλλα άτομα με αυτοάνοση διαταραχή. Τουλάχιστον 25 γονίδια έχουν βρεθεί να προδιαθέτουν σε αυτοανοσία όταν απαλείφονται ή υπερεκφράζονται. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν μεταξύ άλλων κυτταροκίνες, συνυποδοχείς αντιγόνων, συστατικά των οδών σηματοδότησης κυτταροκινών ή αντιγόνων, συνδιεργετικά μόρια, μόρια που συμμετέχουν σε αποπτωτικές οδούς και ανασταλτικές της απόπτωσης οδούς και μόρια που απομακρύνουν αντιγόνα ή ανοσοσυμπλέγματα. Τα περισσότερα αυτοάνοσα νοσήματα είναι πολυγονιδιακά με πολλαπλά προδιαθεσικά γονίδια να οδηγούν στον παθολογικό φαινότυπο.

Πέρα από το γενετικό υπόβαθρο, συνήθως για την πρόκληση ιστικής φλεγμονής και εκδήλωση αυτοάνοσου νοσήματος απαιτείται κάποιος πυροδοτικός μηχανισμός. Οι λοιμώξεις πιστεύεται ότι αποτελούν ένα ισχυρό παράγοντα στον έλεγχο της ανοσολογικής απόκρισης είτε επάγοντας είτε καταστέλλοντας την εμφάνιση αυτοάνοσων διαταραχών [206-208]. Οι πιθανοί παθογενετικοί μηχανισμοί που έχουν αναγνωριστεί και συνδέουν την λοίμωξη με την αυτοανοσία περιλαμβάνουν: 1. την απελευθέρωση αυτοαντιγόνων κατά την προσβολή του

κυττάρου/οργάνου από παθογόνους μικροοργανισμούς με αποτέλεσμα την έναρξη της ανοσιακής διαδικασίας, 2. Την υπερέκκριση κυτταροκινών και την επακόλουθη διέγερση ανενεργών αυτοδραστικών λεμφοκυττάρων, τα οποία καθίστανται ενεργά καταστροφικά αυτοδραστικά κύτταρα και 3. Τον μηχανισμό μοριακής μίμησης (molecular mimicry), όπου λόγο ομοιότητας μεταξύ αντιγονικών επιτόπων μεταξύ παθογόνου μικροοργανισμού και ξενιστή, προκαλείται αυτοανοσία με παραγωγή αυτοαντισωμάτων και αυτοδραστικών T-λεμφοκυττάρων. Τα τελευταία χρόνια πειραματικές μελέτες υποστηρίζουν την κατασταλτική δράση των λοιμώξεων στην αυτοανοσία, χωρίς να έχει διευκρινιστεί ο ακριβής μηχανισμός. Μελέτες σε τροποποιημένα ποντίκια τα οποία αναπτύσσουν σακχαρώδη διαβήτη τύπου Ι (ΣΔΙ), έδειξαν καταστολή της νόσου όταν αυτά μολύνθηκαν και ανέπτυξαν λοίμωξη από διάφορους ιούς, μυκοβακτηρίδια (bovis και avium), salmonella typhimurium και παράσιτα [209-211]. Επίσης υπάρχει μικρός αριθμός κλινικών μελετών, οι οποίες υποστηρίζουν ότι οι συχνές λοιμώξεις τα δυο πρώτα χρόνια της ζωής ελαττώνουν τον κίνδυνο ανάπτυξης αυτοάνοσων νοσημάτων όπως ο ΣΔΙ, η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου, η πολλαπλή σκλήρυνση κ.α [212-214].

Πολύ συχνά, για την εμφάνιση αυτοάνοσης νόσου ενοχοποιείται το σωματικό και ψυχολογικό στρες καθώς ένα υψηλό ποσοστό (έως και 80%) των ασθενών αναφέρουν ασυνήθιστο συναισθηματικό στρες πριν από την έναρξη της νόσου. Επίσης πολυάριθμες μελέτες έχουν επισημάνει την επίδραση ορμονών που πυροδοτούνται από το άγχος στην λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Νευροενδοκρινείς ορμόνες οδηγούν σε απορρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος, μεταβάλλοντας ή ενισχύοντας την παραγωγή της κυτοκίνης και ενδεχομένως οδηγώντας σε αυτοάνοση νόσο.

Υπάρχουν περίπου 80 είδη αυτοάνοσων διαταραχών που επηρεάζουν διαφορετικά όργανα και ιστούς, συνήθως αυτά είναι: αρθρώσεις, μυς, δέρμα, ερυθρά αιμοσφαίρια, αιμοφόρα αγγεία, συνδετικός ιστός, ενδοκρινείς αδένες. Πολλά από τα αυτοάνοσα νοσήματα έχουν παρόμοια συμπτώματα, γεγονός που καθιστά δύσκολο τον διαχωρισμό τους, ή εμφανίζονται με ποικιλία συμπτωμάτων. Τα περισσότερα προκαλούν κόπωση, πυρετό και ένα γενικό αίσθημα αδιαθεσίας. Συνήθως χαρακτηρίζονται από περιόδους ύφεσης (λίγο ή καθόλου συμπτώματα) έξαρσης (επιδείνωση των συμπτωμάτων). Είναι επίσης δυνατόν, ένα άτομο να έχει

περισσότερα από ένα αυτοάνοσα νοσήματα ταυτόχρονα. Όπως προκύπτει και από την ονομασία τους, δεν υπάρχουν θεραπείες για αυτοάνοσες ασθένειες. Ως εκ τούτου, η θεραπεία επικεντρώνεται απλά στην ανακούφιση των συμπτωμάτων. Τα πιο συνήθη αυτοάνοσα νοσήματα είναι τα παρακάτω:

- Ρευματοειδής αρθρίτιδα (φλεγμονή των αρθρώσεων και των γύρω ιστών)
- Συστημικός ερυθηματώδης λύκος (επηρεάζει το δέρμα, τις αρθρώσεις, τα νεφρά, τον εγκέφαλο και άλλα όργανα)
- **Σκλήρυνση κατά πλάκας (επηρεάζει τον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό)**
- Κοιλιοκάκη (αντίδραση του οργανισμού στην γλουτένη, η οποία προκαλεί βλάβη στην εσωτερική επένδυση του λεπτού εντέρου)
- Κακοήθης αναιμία (μείωση στα ερυθρά κύτταρα του αίματος που προκαλείται από την αδυναμία του οργανισμού να απορροφήσει τη βιταμίνη B12)
- Λεύκη (άσπρα “μπαλώματα” στο δέρμα που προκαλούνται από την απώλεια επαρκούς χρωστικής ουσίας)
- Σκληροδερμία (νόσος του συνδετικού ιστού που προκαλεί αλλαγές στο δέρμα, στα αιμοφόρα αγγεία, στους μυς και στα εσωτερικά όργανα)
- Ψωρίαση (δερματική πάθηση που προκαλεί ερυθρότητα και ερεθισμό, καθώς και πιο παχύ, φολιδωτό δέρμα με λευκά μπαλώματα)
- Ασθένεια Hashimoto (φλεγμονή του θυρεοειδούς αδένος)
- Ασθένεια Addison (ανεπάρκεια των ορμονών των επινεφριδίων)
- Ασθένεια Graves (υπερδραστηριότητα του θυρεοειδούς αδένος)
- Αντιδραστική αρθρίτιδα (φλεγμονή των αρθρώσεων, της ουρήθρας και των ματιών, μπορεί να προκαλέσει πληγές στο δέρμα και τις βλεννογόνους μεμβράνες)
- Σύνδρομο Sjogren (προκαλεί ξηρότητα σε μάτια και στόμα λόγω καταστροφής του αδένος που παράγει δάκρυα και σάλιο, ενώ μπορεί να επηρεάσει τα νεφρά και τους πνεύμονες)
- Διαβήτης τύπου 1 (καταστροφή των κυττάρων που παράγουν ινσουλίνη στο πάγκρεας)

Για τη θεραπεία των αυτοάνοσων νοσημάτων, σήμερα χρησιμοποιούνται μία σειρά από φάρμακα:

- Τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη όπως η ασπιρίνη, η ναπροξένη, η δικλοφενάκη, η ινδομεθακίνη και άλλα.
- Τα βραδέως δρώντα φάρμακα (μετά από τρεις μήνες θεραπείας). Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν τα ανθελonoσιακά, τα άλατα χρυσού, η Δ-πενικιλλαμίνη και η σουλφασαλαζίνη.
- Τα ανοσοκατασταλτικά, όπως είναι τα κορτικοστεροειδή (κορτιζόνη, πρεδνιζόνη, με-θυλ-πρεδνιζολόνη), η μεθοτρεξάτη, η κυκλοσπορίνη Α, η κυκλοφωσφαμίδη, η αζαθειοπρίνη, η χλωραμβουκίλη και άλλα. Τα φάρμακα αυτά μπορεί να χρησιμοποιούνται από μόνα τους αλλά και σε συνδυασμό, όπως για παράδειγμα μεθοτρεξάτη μαζί με κυκλοσπορίνη-Α και κορτικοστεροειδή.
- Βιολογικοί παράγοντες, δηλαδή ουσίες του οργανισμού που ή λαμβάνονται αυτούσιες ή συντίθενται με μοριακή γενετική και οι οποίες τροποποιούν την ανοσολογική απόκριση.

Τέλος, σε ορισμένες περιπτώσεις (θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα, κρυοσφαιριναιμία, αγγειϊτιδες, αυτοάνοσες πολυνευροπάθειες, βαρεία μυασθένεια) χρησιμοποιείται η μέθοδος της πλασμαφαίρεσης κατά την οποία παθολογικά αντισώματα από τον ορό των ασθενών αφαιρούνται με αποτέλεσμα την παροδική πτώση των επιπέδων των παθολογικών αντισωμάτων στον ορό.

2.3.Διάχυτες Παρεγχυματικές Πνευμονοπάθειες (ΔΔΠ)

Ο όρος Διάχυτες Παρεγχυματικές Πνευμονοπάθειες (ΔΠΠ, diffuse parenchymal lung diseases, DPLD) ή Διάχυτες Διάμεσες Πνευμονοπάθειες (ΔΔΠ), (diffuse interstitial lung diseases, DILD) όπως αναφέρονταν παλαιότερα, χαρακτηρίζει τις παθήσεις του διάμεσου ιστού των πνευμόνων. Οι ΔΠΠ εκτός από τον διάμεσο ιστό προσβάλλουν συνήθως και άλλες ανατομικές δομές του πνεύμονα, όπως τους μικρούς αεραγωγούς, τις κυψελίδες ή τον υπεζωκότα. Περισσότερες από 200 παθήσεις ανήκουν στην ομάδα των ΔΠΠ, παρουσιάζοντας κοινά κλινικά ευρήματα και συμπτώματα αλλά με διαφορετική παθογένεια, ιστολογική εικόνα και εξέλιξη της νόσου [215, 216]. Οι ΔΠΠ ταξινομούνται παραδοσιακά στις Ιδιοπαθείς Διάμεσες Πνευμονίες, στις Δευτεροπαθείς Διάμεσες Πνευμονοπάθειες (από γνωστό αίτιο), στις Κοκκιωματώδεις νόσους και στα Υπόλοιπα/Ορφανά νοσήματα.

Οι **ιδιοπαθείς διάμεσες πνευμονίες (ΙΔΠ)** (Idiopathic interstitial pneumonia, IIP) συνιστούν μια μεγάλη ετερογενή ομάδα μη νεοπλασματικών πνευμονικών παθήσεων, των οποίων η συχνότητα στο γενικό πληθυσμό θεωρείται χαμηλή. Όπως υποδηλώνει ο όρος "ιδιοπαθής" είναι αγνώστου αιτιολογίας, ενώ ο όρος διάμεση πνευμονία χαρακτηρίζει την βλάβη που παρατηρείται στο διάμεσο ιστό (interstitium) που καταλαμβάνει το χώρο μεταξύ της επιθηλιακής και της ενδοθηλιακής βασικής μεμβράνης.

Οι ΙΔΠ περιλαμβάνουν ένα μεγάλο σύνολο διακριτών κλινικοπαθολογικών οντοτήτων, οι οποίες διακρίνονται από άλλες μορφές παρεγχυματικών πνευμονοπαθειών με μεθόδους που περιλαμβάνουν το ιστορικό, τη φυσική εξέταση, την ακτινογραφία και την παθολογοανατομία. Με βάση τα κριτήρια που καθορίζονται από τις ATS-ERS (American Thoracic Society-European Respiratory Society) οι ΙΔΠ ταξινομούνται στις : ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση (IPF), μη ειδική διάμεση πνευμονία (NSIP), κρυπτογενής οργανούμενη πνευμονία (COP), οξεία διάμεση πνευμονία (AIP), αναπνευστική βρογχιολίτιδα-διάμεση πνευμονική νόσος (RB-ILD), αποφολιδωτική διάμεση πνευμονία (DIP) και λεμφοκυτταρική διάμεση πνευμονία (LIP). Η ομόφωνη προσέγγιση των κλινικών, ακτινολογικών και παθολογοανατομικών χαρακτηριστικών των ΙΔΠ συντελεί στην κατανόηση των

παθήσεων αυτών καθώς και στην καλύτερη διαγνωστική και θεραπευτική προσέγγιση τους [217].



Εικόνα 13: Ταξινόμηση των Διάμεσων Πνευμονικών Νοσημάτων σύμφωνα με την κλινική τους εικόνα. Συντμήσεις. ΛΑΜ: Λεμφαγγειομυομάτωση, ΠΦΑΝ: Πνευμονική Φλεβοαποφρακτική Νόσος, ΠΚΠ: Πνευμονική Κυψελιδική Πρωτεΐνωση, ΙΠΑ: Ιδιοπαθής Πνευμονική Αιμοσιδήρωση, ΑΚ: Αγγειοπάθεια Κολλαγόνου, ΦΝΕ: Φλεγμονώδης Νόσος του Εντέρου, ΥΣ: Υπερρωσινοφιλικό Σύνδρομο, ΚΟΠ: Κρυπτογενής οργανοποιός πνευμονία, ΠΙ-Ι: Πνευμονική Ιστιοκύττωση Langerhans, ΟΔΠ: Οξεία Διάμεση Πνευμονία, ΕΑΚ: Εξωγενής Αλλεργική Κυψελιδίτιδα, ΑΔΠ: Αποφολιδωτική Διάμεση Πνευμονία, ΗΠ: Ηωσινοφιλική Πνευμονία.

2.3.1.Ιδιοπαθής Πνευμονική Ίνωση (ΙΠΙ)

Η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση (ΙΠΙ, idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) ή κρυπτογενής ινωδοποιός κυψελίτιδα (Cryptogenic Fibrosing Alveolitis, CFA), είναι η πιο συχνή νόσος της ομάδας των ιδιοπαθών διάμεσων πνευμονιών (50-60%), η οποία εντοπίζεται στον πνεύμονα και σχετίζεται με το ιστολογικό ή και το απεικονιστικό πρότυπο της συνήθους διάμεσης πνευμονίας (UIP- usual interstitial pneumonia). Πρόκειται για μια χρόνια, μη αναστρέψιμη, προοδευτικά εξελισσόμενη ινωδοποιό διάμεση πνευμονία αγνώστου αιτιολογίας. Η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση οδηγεί στο θάνατο από αναπνευστική ανεπάρκεια λόγω της προοδευτικής ουλοποίησης του πνεύμονα και αντικατάστασης του φυσιολογικού πνευμονικού παρεγχύματος με ινώδη.

Πίνακας 1: Κατηγοριοποίηση Ιδιοπαθών Διάμεσων Πνευμονοπαθειών (ΙΔΠ)

Κύριες	Σπάνιες
Ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση (IPF)	Ιδιοπαθής λεμφοειδής διάμεση πνευμονία (LIP)
Ιδιοπαθής μη-ειδική διάμεση πνευμονία (iNSIP)	Ιδιοπαθής πλευροπνευμονική ινοελάστωση (PPFE)
Διάμεση πνευμονία με αναπνευστική βρογχιολίτιδα (RB-ILD)	Διάφορες αταξινόμητες ΙΔΠ
Αποφολιδωτική διάμεση πνευμονία (DIP)	
Κρυπτογενής οργανούμενη πνευμονία (COP)	
Οξεία διάμεση πνευμονία (AIP)	

Τα συμπτώματα της ΙΠΙ είναι μη ειδικά και πολλά από αυτά κοινά για άλλα πνευμονολογικά και καρδιολογικά νοσήματα. Σε συνδυασμό με το ότι η νόσος στα αρχικά της στάδια είναι ασυμπτωματική, οδηγεί στην λανθασμένη ή μη έγκαιρη διάγνωση της (1-2 έτη μετά την εμφάνιση των συμπτωμάτων), με αποτέλεσμα η μέση επιβίωση να εκτιμάται μόλις στα 2-5 έτη μετά την διάγνωση. Οι περισσότεροι ασθενείς αρχικά παρουσιάζουν δύσπνοια στην κόπωση, η οποία προοδευτικά επιδεινώνεται και μη παραγωγικό βήχα. Άλλα συστηματικά συμπτώματα που μπορεί να συνοδεύουν την κλινική εικόνα της ΙΠΙ είναι απώλεια βάρους, δεκατική

πυρετική κίνηση, κόπωση, αρθραλγίες/μυαλγίες κ.α. Η ΙΠΙ συνηθέστερα προσβάλλει άτομα μεγαλύτερης ηλικίας (>60 χρονών) και ανδρικού φύλλου [218-220].

2.3.2.Επιδημιολογία

Η επιδημιολογική μελέτη της πνευμονικής ίνωσης αποτελεί πρόκληση για πολλούς λόγους. Η συχνότητα εμφάνισης και η επίπτωση της νόσου ποικίλλουν μεταξύ διαφορετικών μελετών, με τις πιο πρόσφατες να δείχνουν ότι η επίπτωση και η θνησιμότητα της ΙΠΙ αυξάνονται με την πάροδο των χρόνων [221, 222]. Ωστόσο, η πραγματική επίπτωση και ο επιπολασμός της ΙΠΙ δεν είναι εύκολο να εκτιμηθούν. Οι περισσότερες από τις υπάρχουσες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί πριν τη θέσπιση του ενιαίου ορισμού και των διαγνωστικών κριτηρίων για την ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση από τους ATS/ERS [223]. Επιπλέον, ο σχεδιασμός μελέτης, η μεθοδολογία και ο πληθυσμός που επιλέγεται σε κάθε μια από τις μελέτες διαφέρουν, με αποτέλεσμα η σύγκριση μεταξύ των μελετών να είναι δύσκολες ή αδύνατες. Γεωγραφικά, οι περισσότερες επιδημιολογικές μελέτες για την ΙΠΙ προέρχονται από τις χώρες της Βόρειας Αμερικής και της Ευρώπης (Ηνωμένο Βασίλειο, Τσεχική Δημοκρατία, Νορβηγία, Φινλανδία, Ελλάδα, και Τουρκία) με μόνο δυο από την Ασία (Ιαπωνία και Ταϊβάν)[224].

Στις ΗΠΑ, ο επιπολασμός της ΙΠΙ εκτιμάται από 14 έως 27.9 περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα του γενικού πληθυσμού [225], δεδομένου ότι πληρούνται τα βασικά και δευτερεύοντα κριτήρια των ATS/ERS [223] καθώς επίσης και η εμφάνιση του προτύπου της UIP σε HRCT στις περιπτώσεις που χαρακτηρίζονται ως ΙΠΙ ασθενείς. Σε άλλη μελέτη η οποία αναφέρεται επίσης στον πληθυσμό των ΗΠΑ, ο επιπολασμός της ΙΠΙ εκτιμήθηκε σε 14.0 και 42.7 ανά 100.000 κατοίκους [226]. Επιπλέον, η ΙΠΙ έχει υψηλότερη επικράτηση στα άτομα αρσενικού φύλου [227] καθώς και στους ηλικιωμένους άνδρες (65 ετών) σε σχέση με τα νεότερα άτομα [226]: 27,9 περιπτώσεις και 63,0 περιπτώσεις ανά 100.000 κατοίκους, αντίστοιχα.

Στις ευρωπαϊκές χώρες, οι υπάρχουσες μελέτες διαφέρουν στην μεθοδολογία επιλογής του πληθυσμού ή δεν γίνεται σαφές η κατηγοριοποίηση που ακολουθείται με αποτέλεσμα να υπάρχει μεγάλο εύρος μεταξύ των διαφορετικών κρατών. Ο επιπολασμός της ΙΠΙ ανά 100.000 άτομα πληθυσμού κυμαίνεται από 1.25 στο Βέλγιο [228] έως 23.4 στη Νορβηγία [229], ενώ σε άλλες χώρες έχουν

αναφερθεί και ενδιάμεσες τιμές (3.38 έως 16-18 περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα πληθυσμού) [230-232]. Στην περίοδο μελέτης μεταξύ 1981 και 1990 στην Τσεχική Δημοκρατία, διαπιστώνεται αύξηση του επιπολασμού της ΙΠΙ από 6.5 σε 12.1 περιπτώσεις ανά 100.000 κατοίκους [232]. Στη Φινλανδία, με βάση τα διεθνή κριτήρια που δημοσιεύθηκαν από το ATS/ERS το 2000 [233], ο επιπολασμός της ΙΠΙ εκτιμάται για την περίοδο 1997-1998 από 16 έως 18 περιπτώσεις ανά 100.000 κατοίκους [230]. Στην Ελλάδα, ο εκτιμώμενος επιπολασμός της ΙΠΙ το 2004 ήταν 3.38 ανά 100.000 άτομα [231]. Φαίνεται από τα παραπάνω ότι ο επιπολασμός στην Ευρώπη είναι χαμηλότερος σε σχέση με αυτό που εμφανίζεται στο πληθυσμό των ΗΠΑ. Αντίθετα, στην Ευρώπη τα άτομα γυναικείου φύλου φαίνεται να νοσούν περισσότερο [229]. Σε γενικές γραμμές, η επικράτηση της νόσου αυξάνεται με την ηλικία, με τον υψηλότερο επιπολασμό να παρατηρείται σε ασθενείς ηλικίας άνω των 75 ετών.

Όσον αφορά την συχνότητα εμφάνισης της ΙΠΙ, στις ΗΠΑ εκτιμάται στο 6.8 ανά 100.000 κατοίκους και 16.3 με βάση ευρύτερα κριτήρια κατηγοριοποίησης των ΙΠΙ ασθενών [226]. Επιπλέον, τα άτομα ανδρικού φύλου είχαν υψηλότερη επίπτωση από τα θηλυκά (10.7 έναντι 7.4 ανά 100.000 άτομα) [227]. Στην Ευρώπη, η ετήσια επίπτωση της ΙΠΙ κυμαίνεται από 0.22 ανά 100.000 πληθυσμού στο Βέλγιο [228] σε 7.94 ανά 100.000 κατοίκους στο Ηνωμένο Βασίλειο. Στην Ελλάδα, η εμφάνιση της ΙΠΙ υπολογίζεται σε 0.93 ανά 100.000 άτομα πληθυσμού [231]. Υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης παρατηρείται στον ανδρικό πληθυσμό η οποία αυξάνεται με την αύξηση της ηλικίας [221, 222, 229], εξαίρεση αποτελεί η Νορβηγία όπου οι γυναίκες νοσούν περισσότερα. Παρόμοια με τον επιπολασμό της ΙΠΙ, τα ετήσια ποσοστά εμφάνισης εμφανίζονται υψηλότερα στις ΗΠΑ σε σχέση με εκείνα που αναφέρονται σε ευρωπαϊκές χώρες. Ωστόσο, αυτά τα ευρήματα δεν μπορούν να συγκριθούν άμεσα μεταξύ των χωρών λόγω των διαφορών στη μεθοδολογία εύρεσης περιπτώσεων. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι με την πάροδο του χρόνου μελέτες από την Ευρώπη δείχνουν αύξηση της συχνότητας εμφάνισης της ΙΠΙ σε αντίθεση με τις ΗΠΑ όπου παρατηρείται μείωση της συχνότητας εμφάνισης.

Η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση είναι εξ' ορισμού μία νόσος άγνωστου αιτιολογίας, ωστόσο υπάρχουν ορισμένοι παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με την εμφάνιση της όπως το κάπνισμα (περισσότερο από το 70% των ασθενών είναι

καπνιστές ή πρώην καπνιστές) [234], η χρήση αντικαταθλιπτικών φαρμάκων, η χρόνια γαστρο-οισοφαγική παλινδρόμηση, περιβαλλοντολογικοί (έκθεση σε σκόνης από μέταλλα και ξύλο), καθώς και λοιμώδεις παράγοντες (ιοί, όπως CMV Epstein Barr, HIV, μυκόπλασμα, legionella). Επιπροσθέτως, περίπου στο 2-5% των ασθενών με ΙΠΙ, η εμφάνιση της σχετίζεται με κληρονομικούς παράγοντες και περιγράφεται ως οικογενής ΙΠΙ. Η οικογενής ΙΠΙ ορίζεται όταν η νόσος παρουσιάζεται σε τουλάχιστον 2 μέλη της ίδιας βιολογικής οικογενείας (γονείς, παιδιά, αδέρφια). Πιθανόν κληρονομείται με αυτοσωμικό τρόπο με ποικίλη διεισδυτικότητα, εκδηλώνεται σε νεότερες ηλικίες, ενώ η προσβολή ανδρών και γυναικών δεν φαίνεται να διαφέρει [235]. Τα γονίδια που συνδέονται με την οικογενή ΙΠΙ σχετίζονται με την τελομεράση (TERT και TERC) [236, 237], με τις επιφανειοδραστικές πρωτεΐνες C (SPC) [238], A2 (SPA2) [239] και το ELMOD2 [240]. Η συσχέτιση της ΙΠΙ με παράγοντες κινδύνου αποτελεί ένα σημαντικό βήμα στην στρατηγική πρόληψης, την έγκαιρη διάγνωση και την εύρεση νέων πιο αποτελεσματικών θεραπειών.

2.3.3.Διαγνωστική προσέγγιση της ΙΠΙ

Η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση (IPF, ΙΠΙ) είναι δύσκολο να διαγνωστεί επειδή τα συμπτώματά της είναι παρόμοια με άλλες πνευμονικές παθήσεις, όπως η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (COPD). Υπάρχει μια σειρά εξετάσεων που πρέπει να ακολουθηθούν ώστε να μπορέσει ο ιατρός να αποκλείσει άλλες πιθανές αιτίες εμφάνισης των συμπτωμάτων και να επιβεβαιώσει την ύπαρξη της ΙΠΙ.

Σε πρώτο στάδιο, ο ιατρός θα συλλέξει τις απαραίτητες πληροφορίες που θα τον βοηθήσουν να αποκτήσει μια ολοκληρωμένη εικόνα της υγείας του ασθενούς ώστε να τον παραπέμψει σε ειδικότερες εξετάσεις. Πέρα από τις συνήθεις ερωτήσεις για την καταγραφή του ιατρικού και οικογενειακού ιστορικού του ασθενούς, παράγοντες που ενοχοποιούνται για την εμφάνιση της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης καταγράφονται επίσης: ιστορικό καπνίσματος, έκθεση σε χημικές ουσίες ή αέρια που μπορεί να ερεθίσουν τους πνεύμονες, χρήση ναρκωτικών ουσιών. Παράλληλα, ο ιατρός πραγματοποιεί φυσική εξέταση του ασθενούς η οποία περιλαμβάνει: έλεγχο της αναπνοής με στηθοσκόπιο, έλεγχο των άκρων για ύπαρξη πληκτροδακτυλίας η οποία εμφανίζεται στο 25-50% των ασθενών

[241], ή ακόμα ολιγόλεπτη άσκηση ώστε να διαπιστωθεί η ύπαρξη δύσπνοιας. Στη συνέχεια ακολουθείται μια σειρά εξετάσεων, στις οποίες περιλαμβάνονται δοκιμές απεικόνισης του πνεύμονα, δοκιμασίες αναπνευστικής λειτουργίας, βιοψία του πνεύμονα [217].

Στις απεικονιστικές δοκιμές περιλαμβάνονται η ακτινογραφία θώρακα (chest X-ray) και η αξονική τομογραφία υψηλής ευκρίνειας (HRCT). Η μεγάλη πλειοψηφία των ασθενών με ΙΠΙ έχει παθολογική ακτινογραφία θώρακα, με κύριο χαρακτηριστικό την δικτυωτή απεικόνιση του πνευμονικού παρεγχύματος, η οποία εντοπίζεται αμφοτερόπλευρα και συχνά ασύμμετρα στις πνευμονικές βάσεις [242]. Η διάγνωση της ΙΠΙ με βάση την ακτινογραφία θώρακα είναι ακριβής στο 48-87% των περιπτώσεων [243, 244]. Η διαφοροδιάγνωση της δικτυωτής απεικόνισης των πνευμόνων περιλαμβάνει την αμιάντωση και τις νόσου του συνδετικού ιστού (πχ συστηματική σκλήρυνση, ρευματοειδής αρθρίτιδα). Ευρήματα στον κυψελιδικό χώρο του πνεύμονα είναι σπάνια, υπονοώντας την ύπαρξη άλλης νόσου, όπως BOOP ή DIP [242, 245]. Επίσης υπεζωκοτική συλλογή ή λεμφαδενοπάθεια συνήθως δεν απαντώνται στην ΙΠΙ. Δεν αποκλείεται μια φυσιολογική ακτινογραφία θώρακα να συνδεθεί με ιστολογικά ευρήματα της UIP στη βιοψία πνευμόνων [241, 246, 247]. Στις περιπτώσεις αυτές, η αξονική τομογραφία υψηλής ευκρίνειας (High Resolution Computed Tomography-HRCT) μπορεί να οδηγήσει σε έγκαιρη ανίχνευση της ΙΠΙ.

Η εισαγωγή της HRCT ως διαγνωστικό εργαλείο των διάμεσων πνευμονοπαθειών άλλαξε ουσιαστικά την διάγνωση της ΙΠΙ. Χρησιμοποιώντας τομές πάχους 1-2mm (φθάνει δηλαδή στο επίπεδο του δευτερογενούς πνευμονικού λοβού), επιτρέπει τη λεπτομερή εξέταση του πνευμονικού παρεγχύματος [217, 233]. Η HRCT συντελεί στην διάγνωση της ΙΠΙ σε πρωταρχικό στάδιο, επιτρέπει την εκτίμηση της έκτασης του συνυπάρχοντος εμφυσήματος και παράλληλα μειώνει τον αριθμό των παθήσεων για διαφορική διάγνωση. Η απεικόνιση της ΙΠΙ στην HRCT παρουσιάζει υποϋπεζωκοτικές δικτυωτές σκιάσεις, κυρίως περιφερικά αλλά μπορεί να κατανέμονται και ανομοιογενώς [217]. Συχνά εντοπίζονται βρογχιεκτασίες εξ έλξεως και η χαρακτηριστική εικόνα μελισσοκηρήθρας (honeycomb). Εικόνα θολής υάλου (ground-glass) είναι συνήθως περιορισμένη, όταν συνδέεται με δικτυωτές σκιάσεις και βρογχιεκτασίες εξ έλξεως, αντιστοιχεί σε ίνωση. Αντίθετα, η παρουσία

εικόνας θολής υάλου σε ποσοστό >30% του πνευμονικού παρεγχύματος και χωρίς άλλα ευρήματα, αποτελεί ένδειξη για φλεγμονή του διάμεσου χώρου, πλήρωση των κυψελίδων με μακροφάγα, ανομοιογενώς κατανεμημένη ίνωση ή συνδυασμό αυτών [248, 249]. Συναντάται στις περιπτώσεις DIP [250], RB-ILD [251], NSIP [252], BOOP [244] και πνευμονοπάθειας από υπερευαισθησία. Επιπλέον, όσον αφορά την διαφορική διάγνωση της ΙΠΙ, το πρότυπο της στην HRCT εμφανίζει ομοιότητες με την εικόνα των νόσων του συνδετικού ιστού και της αμιάντωσης [217, 233]. Σε πνευμονοπάθεια από υπερευαισθησία παρατηρούνται δικτυωτές σκιάσεις και εικόνα μελισσοκηρήθρας ή δικτυωτές σκιάσεις με παρουσία όζων και απουσία μελισσοκηρήθρας, με την διαφορά ότι η βλάβη του παρεγχύματος δεν εντοπίζεται μόνο περιφερικά όπως συμβαίνει στην ΙΠΙ. Εικόνα παρόμοια με αυτή της ΙΠΙ μπορεί να παρατηρηθεί επίσης σε σαρκοείδωση τελικού σταδίου [253] και σε COP [244]. Η αξονική τομογραφία υψηλής ευκρίνειας φαίνεται να έχει μεγαλύτερη διαγνωστική ικανότητα για την ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση σε σχέση με την απλή ακτινογραφία θώρακα, με ακρίβεια διάγνωσης 90% [244, 254].

Η εκτίμηση της αναπνευστικής λειτουργίας αποτελεί ένα ακόμα στάδιο της αρχικής προσέγγισης ενός ασθενή με πιθανή διάμεση πνευμονοπάθεια. Η βασική διαταραχή της μηχανικής του πνεύμονα που παρατηρείται σε ασθενείς με ΙΠΙ, είναι η ελάττωση της ενδοτικότητας σε συνδυασμό με την αύξηση των ελαστικών δυνάμεων. Ο ινώδης ιστός των κυψελιδικών τοιχωμάτων ελαττώνει τη διατασιμότητα του πνεύμονα, με αποτέλεσμα τη μείωση των πνευμονικών όγκων: της ολικής πνευμονικής χωρητικότητας (total lung capacity, TLC), της λειτουργικής υπολειπόμενης χωρητικότητας (functional residual capacity, FRC) και του υπολειπόμενου όγκου (residual volume, RV). Επιπροσθέτως, οι εκπνευστικές ροές, ο μέγιστος εκπνεόμενος όγκος στο 1^ο δευτερόλεπτο (forced expiratory volume in 1 second, FEV₁) και η δυναμική ζωτική χωρητικότητα (forced vital capacity, FVC) είναι μειωμένα στους ασθενείς με ΙΠΙ, ενώ ο λόγος FEV₁/FVC παραμένει φυσιολογικός ή αυξάνεται. Η ανταλλαγή αερίων επίσης επηρεάζεται σε ασθενείς με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση, λόγω της ελάττωσης της διαθέσιμης κυψελιδικής επιφάνειας ή της αύξησης του πάχους της, με αποτέλεσμα να παρατηρείται ελαττωμένη ικανότητα διάχυσης του μονοξειδίου του άνθρακα (diffusing capacity for carbon

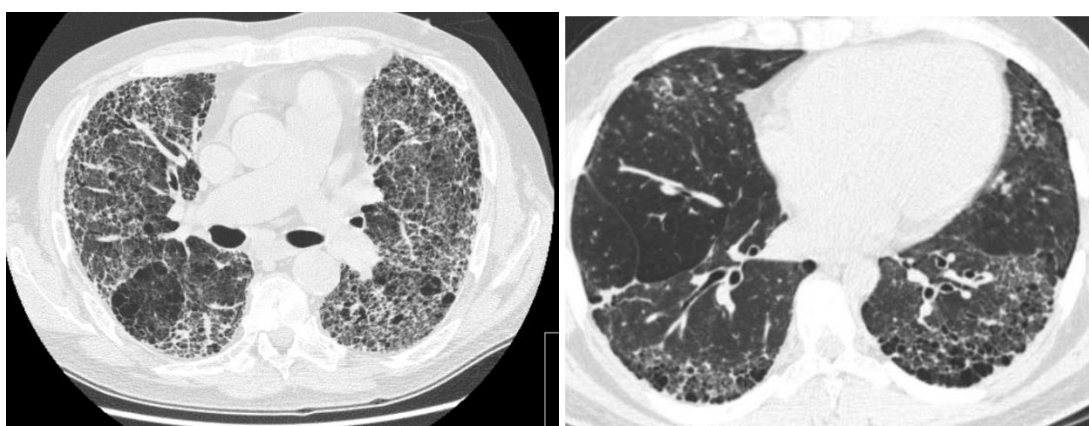
monoxide, $D_L CO$). Στην ηρεμία μπορεί να παρατηρηθεί υποξυγοναιμία και αναπνευστική αλκάλωση λόγω διαταραχών αερισμού-αιμάτωσης.

Εάν μετά τις παραπάνω δοκιμασίες δεν καταστεί δυνατή η διάγνωση, οι ιατροί μπορεί να χρειαστεί να αφαιρέσουν μια μικρή ποσότητα πνευμονικού ιστού (βιοψία) για ιστοπαθολογική ανάλυση στο εργαστήριο. Σε ασθενείς με ΙΠΙ εμφανίζεται το ιστοπαθολογικό πρότυπο της συνήθους διάμεσης πνευμονίας (Usual interstitial pneumonia, UIP). Το δείγμα ιστού μπορεί να ληφθεί είτε με βρογχοσκόπηση ή με χειρουργική βιοψία. Στην διαδικασία της βρογχοσκόπησης, ο ιατρός αφαιρεί πολύ μικρά δείγματα ιστών χρησιμοποιώντας ένα μικρό, εύκαμπτο σωλήνα (βρογχοσκόπιο) που περνάει από το στόμα ή τη μύτη στους πνεύμονες. Οι κίνδυνοι της βρογχοσκόπησης είναι γενικά ελάχιστοι και μπορεί να περιλαμβάνουν προσωρινό πονόλαιμο ή δυσφορία στη μύτη από τη διέλευση του βρογχοσκοπίου. Ωστόσο, σοβαρές επιπλοκές μπορεί να περιλαμβάνουν αιμορραγία ή δημιουργία πνευμοθώρακα. Κατά τη διάρκεια της βρογχοσκόπησης, συλλέγεται βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL, Lavage) για περαιτέρω ανάλυση. Το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα αποτελεί μια ελάχιστα επεμβατική βρογχοσκοπική τεχνική η οποία χρησιμοποιείται για απομόνωση κυττάρων, εισπνεόμενων σωματιδίων, λοιμογόνων παραγόντων και διαλυτών μη κυτταρικών συστατικών από τα τελικά βρογχιόλια και τις κυψελίδες των πνευμόνων. Στο BAL ασθενών με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση παρατηρείται αύξηση των πολυμορφοπυρηνικών λευκοκυττάρων (PMNs), των ηωσινόφιλων και των μαστοκυττάρων με σημαντική μείωση των λεμφοκυττάρων. Παρόλο που η βρογχοκυψελιδική πλύση αποτελεί δειγματοληψία από ευρύτερη περιοχή του πνεύμονα και παρέχει μια πιο αντιπροσωπευτική εικόνα των φλεγμονωδών και ανοσολογικών διεργασιών σε κυψελιδικό επίπεδο σε σχέση με άλλες διαδικασίες, αποτελεί συμπληρωματική, βοηθητική εξέταση με περιορισμένη διαγνωστική χρησιμότητα για την ΙΠΙ. Συχνά χρησιμοποιείται προκειμένου να αποκλειστεί η ύπαρξη άλλων ασθενειών.

Στην περίπτωση που η διάγνωση αποτύχει λόγω ανεπαρκούς δείγματος ακολουθείται χειρουργική επέμβαση για την λήψη μεγάλου δείγματος ιστού είτε με οπτική χειρουργική επέμβαση-θωρακοσκόπηση (VATS), ή ως ανοικτή χειρουργική επέμβαση (θωρακοτομή). Κατά τη διάρκεια του VATS, ο χειρουργός εισάγει χειρουργικά εργαλεία και μια μικρή κάμερα μέσα από δύο ή τρεις μικρές τομές

μεταξύ των πλευρών, η οποία του επιτρέπει να βλέπει τους πνεύμονές σε μια οθόνη ενώ αφαιρεί δείγματα ιστών. Κατά τη διάρκεια της ανοικτής χειρουργικής επέμβασης (θωρακοτομή), ο χειρουργός αφαιρεί ένα δείγμα πνεύμονα μέσω μιας τομής στο στήθος μεταξύ των πλευρών.

Συμπληρωματικά με όλα τα παραπάνω, ο ιατρός μπορεί επίσης να ζητήσει εξετάσεις αίματος για να αποκλείσει την ύπαρξη άλλων διάμεσων πνευμονοπαθειών, καθώς και για να αξιολογήσει τη λειτουργία του ήπατος και των νεφρών. Πολύ σπάνια σε ασθενείς με ΙΠΙ θα παρατηρηθεί πολυερυθραιμία παρά τη χρόνια υποξαιμία. Οι εργαστηριακές εξετάσεις πιθανότατα θα δείξουν αύξηση της γαλακτικής δεϋδρογενάσης (LDH), εύρημα μη ειδικό και κοινό σε πνευμονικές παθήσεις (π.χ., κυψελιδική πρωτεΐνωση, ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση), καθώς και υψηλή ταχύτητα καθίζησης των ερυθρών αιμοσφαιρίων (ΤΚΕ) που επίσης δεν αποτελεί διαγνωστικό κριτήριο. Αύξηση των επιπέδων του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγιοτενσίνης (angiotensin-converting enzyme, ACE) ή παρουσία αντιουδετερόφιλων αντισωμάτων (antineutrophilic cytoplasmic antibody, ANCA) αντισώματα, αν και μη-διαγνωστικά, μπορεί να είναι χρήσιμα για εναλλακτικές διαγνώσεις. Θετικά κυκλοφορούντα αντιπυρηνικά αντισώματα (ANAs) ή ρευματοειδής παράγοντας (RF) εμφανίζονται σε 10-20% των ασθενών με ΙΠΙ, αλλά σπάνια οι τίτλοι είναι υψηλοί. Η παρουσία υψηλών τίτλων ($> 1:160$) θα πρέπει να μας κάνει να σκεφτούμε αυτοάνοσο ρευματικό νόσημα [217].



Εικόνα 14: Αξονική τομογραφία σάρωσης από ασθενή με πνευμονική ίνωση (αριστερή εικόνα) και ασθενή με εμφύσημα (δεξιά εικόνα).

2.3.4.Θεραπεία

Η πορεία της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης είναι συνήθως ανεξέλεγκτη και προοδευτικά επιδεινούμενη, χωρίς να αναφέρονται αυτόματες υφέσεις. Ο μέσος χρόνος επιβίωσης των ασθενών κυμαίνεται μεταξύ 4 και 6 ετών από τη στιγμή της διάγνωσης. Νεότερες ωστόσο μελέτες, στις οποίες οι περιπτώσεις ΙΠΙ που συμπεριλήφθηκαν ήταν καλύτερα τεκμηριωμένες, έδειξαν ότι η επιβίωση είναι ακόμα μικρότερη (2-4 έτη) και σε ποσοστό 30-50% κυμαίνεται στα 5 χρόνια [223].

Η θεραπευτική προσέγγιση στην ΙΠΙ βασίζεται στη θεωρία ότι η φλεγμονή οδηγεί τελικά σε βλάβη του παρεγχυματικού ιστού και ίνωση, για το λόγο αυτό οι περισσότερες θεραπευτικές στρατηγικές ως σήμερα αποσκοπούν στην καταστολή της φλεγμονής [223]. Ωστόσο παρά την πληθώρα των μελετών που έχουν γίνει προς αυτή την κατεύθυνση, δεν υπάρχει φαρμακευτική θεραπεία που αποδεδειγμένα να βελτιώνει την επιβίωση ή την ποιότητα ζωής των ασθενών με ΙΠΙ. Το γεγονός ότι η παθογένεια της νόσου δεν είναι απόλυτα κατανοητή πιθανότατα να αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα στην εύρεση αποτελεσματικών θεραπευτικών προσεγγίσεων [223]. Παράλληλα, το γεγονός ότι τα αποτελέσματα μελετών που έχουν γίνει μέχρι τώρα πάνω στη θεραπεία της ΙΠΙ δεν είναι μεταξύ τους συγκρίσιμα αποτελεί εμπόδιο στην εύρεση κατάλληλων θεραπειών. Αυτό συμβαίνει λόγω ετερογένειας στο σχεδιασμό μελέτης όσον αφορά την διάγνωση και τις ομάδες ασθενών που επιλέγονται, την διάρκεια της θεραπείας και την οδό και δόση χορήγησης των φαρμάκων. Τέλος, μπορεί να διαφέρουν τα κριτήρια αξιολόγησης της θεραπείας ή η χρονική στιγμή που επιλέγεται να εξεταστεί ο ασθενής [223]. Οι βασικές θεραπευτικές επιλογές συνίσταται στη χορήγηση κορτικοειδών, ανοσοκατασταλτικών και αντί-ινωτικών φαρμάκων.

Το σκεπτικό για τη χορήγηση των κορτικοειδών είναι η καταστολή της χρόνιας κυψελίτιδας. Ο ακριβής μηχανισμός με το οποίο τα κορτικοειδή επιδρούν στα κύτταρα της φλεγμονής δεν είναι γνωστός. Φαίνεται ότι τα γλυκοκορτικοειδή καταστέλλουν τη μετανάστευση ουδετερόφιλων και λεμφοκυττάρων στον πνεύμονα, μειώνουν το επίπεδο των ανοσοσυμπλεγμάτων, διαφοροποιούν τη λειτουργία των μακροφάγων και επηρεάζουν την προσκόλληση των ουδετερόφιλων στο επιθήλιο. Σε παλαιότερες μελέτες, φαίνεται ότι περίπου το ένα τρίτο των ασθενών με διάμεσες πνευμονοπάθειες που λαμβάνουν κορτικοειδή βελτιώνονται

[255] χωρίς να είναι γνωστό γιατί ορισμένοι ασθενείς δεν ανταποκρίνονται στην θεραπεία. Νεότερες μελέτες δεν αποδεικνύουν αποτελεσματικότητα των κορτικοειδών σε ΙΠΙ ασθενείς [256, 257].

Σε ασθενείς που δεν βελτιώθηκαν μετά την χορήγηση κορτικοειδών ή εμφάνισαν παρενέργειες, η θεραπευτική προσέγγιση περιλαμβάνει την χρήση ανοσοκατασταλτικών [223], αζαθειοπρίνης ή κυκλοφωσφαμίδης. Ωστόσο, τα αποτελέσματα των μελετών είναι αντικρουόμενα και δύσκολο να αξιολογηθούν. Στην μελέτη των Raghu et al., χρησιμοποιήθηκε συνδυαστική θεραπεία κορτικοειδών και ανοσοκατασταλτικών, αζαθειοπρίνη και κορτιζόνη, με σημαντική βελτίωση της αναπνευστικής λειτουργίας και της επιβίωσης των ασθενών [258]. Στις νεότερες πιθανές εναλλακτικές θεραπείες της ΙΠΙ περιλαμβάνονται αντι-ινωτικοί και άλλοι παράγοντες, οι οποίοι αναλύονται παρακάτω [259].

Κυκλοσπορίνη A (Cs-A). Η χρήση της κυκλοσπορίνης στην ΙΠΙ είναι σπάνια λόγω μεγάλης τοξικότητας [223], ωστόσο υπάρχουν μελέτες όπου οι ασθενείς ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία. Νεότερες μελέτες υποστηρίζουν ότι η συνδυαστική χορήγηση κορτικοειδών και κυκλοσπορίνης βελτίωσε ή σταθεροποίησε την πρόγνωση στο 27% των περιπτώσεων με UIP, ενώ όταν χορηγήθηκε σε εξάρσεις της νόσου παρεμπόδισε την υποτροπή και βελτίωσε τις πιθανότητες των ασθενών για επιβίωση. Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι η κυκλοσπορίνη A (Cs-A) όπως και η ιντερφερόνη-γ αποτελούν ισχυρούς ανταγωνιστές του TGF-β₁ *in vitro* [223, 233].

Κολχικίνη. Η κολχικίνη *in vitro* αναστέλλει το σχηματισμό του κολλαγόνου και την απελευθέρωση του αυξητικού παράγοντα των μακροφάγων των κυψελίδων και της φιμπροεκτίνης. Η κολχικίνη όπως και η πιρφενιδόνη φαίνεται να επηρεάζει τη δραστηριότητα των ινοβλαστών. Προηγούμενες μελέτες, οι περισσότερες από τη Mayo Clinic είχαν δείξει ότι η αποτελεσματικότητα της είναι συγκρίσιμη με αυτή των κορτικοστεροειδών και με λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες.

Ιντερφερόνη-γ (IFN g-1b). Η ιντερφερόνη-γ έχει βρεθεί να καταστέλλει την έκφραση του TGF-β₁, ωστόσο τα αποτελέσματα της στη θεραπεία της ΙΠΙ δεν είναι ενθαρρυντικά. Σε μελέτη η οποία περιελάμβανε 330 ασθενείς ΙΠΙ, η θεραπεία με IFN γ-1b, με ταυτόχρονη χορήγηση πρεδνιζόλης, δε επηρέασε σημαντικά τον πρωταρχικό στόχο της μελέτης που ήταν η επιβίωση του ασθενούς χωρίς περαιτέρω επιδείνωση της νόσου (progression-free survival). Σε πρόσφατη μελέτη, με μεγάλο

δείγμα ασθενών (800 περιπτώσεις), η συνολική θνησιμότητα μετά από θεραπεία με ιντερφερόνη-γ ήταν 14,5% σε σύγκριση με το 12,7% της ομάδας των ασθενών που λάμβαναν εικονική θεραπεία (placebo) [223, 233]

Πιρφενιδόνη. Η πιρφενιδόνη αποτελεί ένωση πυριδόνης με αντιφλεγμονώδεις, αντι-ινωτικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Έχειδειχτεί ότι ρυθμίζει σημαντικά προ-ινωτικά και προ-φλεγμονώδη μονοπάτια *in vitro*, ενώ σε *in vivo* πειραματικά μοντέλα πνευμονικής ίνωσης έχει καταστείλει τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών και την παραγωγή κολλαγόνου. Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα από τις μέχρι τώρα κλινικές δοκιμές δείχνουν ότι η χορήγηση πιρφενιδόνης μείωσε την θνησιμότητα και βελτίωσε τον ρυθμό μείωσης της FVC (Forced vital capacity – βίαιη ζωτική χωρητικότητα, δηλαδή ο συνολικός όγκος αέρα που εκπνέεται βίαια, από τη μέγιστη εισπνευστική θέση έως την μέγιστη εκπνευστική θέση). Στις παρενέργειες της πιρφενιδόνης αναφέρονται συχνά η φωτοευαισθησία, η κόπωση, δυσφορία στο στομάχι και ανορεξία [223, 233].

Nintedanib. Η nintedanib αποτελεί έναν τριπλό αναστολέα των τυροσινικών κινασών. Τα θεραπευτικά της αποτελέσματα για την πνευμονική ίνωση προκύπτουν από δυο κλινικές μελέτες οι οποίες έδειξαν βελτίωση της ετήσια μείωση της FVC της ομάδας που λάμβανε την θεραπεία σε σχέση με την ομάδα ελέγχου[260].

Εκτός από τους παράγοντες που αναφέρθηκαν υπάρχουν πολλοί άλλοι των οποίων η χρήση και η αποτελεσματικότητα στην θεραπεία της πνευμονικής ίνωσης βρίσκεται ακόμα υπό συζήτηση, όπως για παράδειγμα οι αντιοξειδωτικοί παράγοντες (γλουταθειόνη, η ταυρίνη, η νιασίνη και οι υψηλές δόσεις N – ακετυλοκυστεΐνης), αναστολείς κυτταροκινών (anti-TNF παράγοντες), αντισώματα έναντι των μορίων προσκόλλησης των λευκοκυττάρων. Μέχρι σήμερα, η μοναδική αποτελεσματική θεραπεία της νόσου η οποία έχει αποδείξει ότι επιμηκύνει την επιβίωση των ασθενών, είναι η μεταμόσχευση πνεύμονα. Σε ποσοστό 50-60% επιτυγχάνεται πενταετής επιβίωση του ασθενούς μετά την μεταμόσχευση. Η μεταμόσχευση πνεύμονα πραγματοποιείται συνήθως σε ασθενείς ηλικίας μικρότερης των 65 ετών, με μέτρια ή σοβαρή νόσο. Μετά από μια επιτυχημένη μεταμόσχευση δεν υπάρχει ανάγκη για χορήγηση οξυγόνου και βελτιώνονται οι αναπνευστικές λειτουργίες (πνευμονικοί όγκοι, διάχυση).

2.3.5.Μηχανισμός παθογένειας της Πνευμονικής Ίνωσης

Την τελευταία δεκαετία, ο αυξανόμενος αριθμός μελετών που αφορούν την παθογένεια της ΙΠΙ, έχουν ρίξει φως στους μηχανισμούς που αποτελούν την βάση της νόσου, βελτιώνοντας σημαντικά την κατανόηση της πνευμονικής ίνωσης και συμβάλλοντας στις προσπάθειες ανάπτυξης αποτελεσματικών θεραπειών.

Κατά τις δεκαετίες 1970-1980, η πνευμονική ίνωση θεωρούνταν το αποτέλεσμα της χρόνιας πνευμονικής φλεγμονής η οποία προκαλείται από άγνωστο ερέθισμα και σταδιακά οδηγεί στην καταστροφή του πνευμονικού ιστού και ίνωση [261]. Η υπόθεση αυτή στηρίχτηκε στην παρουσία φλεγμονωδών κυττάρων στο διάμεσο και κυψελιδικό χώρο του πνεύμονα ασθενών με ΙΠΙ, καθώς και στην αύξηση τους στο βρογχοκυψελιδικό υγρό ασθενών σε σχέση με φυσιολογικά άτομα [262]. Επιπλέον, παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση προφλεγμονωδών κυτοκινών (IL-1b, TGF-b, TNF-a) στους πνεύμονες ασθενών με ΙΠΙ [263, 264]. Ωστόσο, η θεωρία της «φλεγμονώδους ίνωσης» (inflammatory fibrosis) τέθηκε υπό μεγάλη αμφισβήτηση από πολλές επιστημονικές ομάδες [265-267] οι αντιρρήσεις των οποίων βασίστηκαν στις παρακάτω παρατηρήσεις.

Αρχικά, η επανεξέταση μεγάλου αριθμού περιπτώσεων UIP οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η φλεγμονή δεν αποτελεί κύριο ιστοπαθολογικό εύρημα της UIP, καθώς εντοπίζεται κυρίως σε περιοχές με εναπόθεση κολλαγόνου και αλλοιώσεων τύπου μελισσοκηρήθρας, ενώ σπάνια εντοπίζεται στα κυψελιδικά διαφράγματα [268]. Παράλληλα, πολλές διάμεσες πνευμονοπάθειες, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη φλεγμονής στα αρχικά στάδια, όπως για παράδειγμα η πνευμονοπάθεια από υπερευαισθησία, συχνά δεν εξελίσσονται σε ίνωση [267].

Επιπλέον ενδείξεις προέρχονται από μελέτες σε πειραματόζωα, στα οποία έχει επιτευχθεί ο διαχωρισμός της φλεγμονής από την ίνωση. Συγκεκριμένα, σε knockout ποντίκια για την ιντεγκρίνη $\alpha_v\beta_6$ (έλλειψη της συγκεκριμένης ιντεγκρίνης στα επιθηλιακά κύτταρα), η οποία ενεργοποιεί τον αυξητικό παράγοντα TGF- β_1 ή σε ποντίκια με έλλειψη του διαμεμβρανικού υποδοχέα CD44 που εμπλέκεται στην στρατολόγηση των Τ-κυττάρων, παρατηρήθηκε εκδήλωση έντονης φλεγμονής χωρίς την περαιτέρω εμφάνιση ίνωσης μετά από χορήγηση μπλεομυκίνης [269, 270].

Ένα ακόμα στοιχείο υπέρ της αμφισβήτησης της φλεγμονώδους θεωρίας της ίνωσης, είναι η αδυναμία συσχέτισης διαφόρων δεικτών φλεγμονής του πνεύμονα με την πρόγνωση της νόσου. Πολλές μελέτες δείχνουν ότι η αναλογία και ο αριθμός των κυττάρων στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ή το σπινθηρογράφημα με γάλλιο έχουν περιορισμένη κλινική χρήση ως προγνωστικά εργαλεία για την παρακολούθηση της νόσου [267]. Αντίθετα, ο αριθμός των ινωτικών εστιών συσχετίζεται άμεσα με την μείωση του FVC και την θνησιμότητα [271, 272]. Με βάση τον τότε κυρίαρχο ρόλο της φλεγμονής στην ίνωση, θεωρήθηκε βέβαιο ότι η θεραπεία της ΙΠΙ θα μπορούσε να επιτευχθεί με την χρήση κορτικοειδών και ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων, τα οποία θα περιόριζαν την φλεγμονή και κατ' επέκταση την ίνωση. Ωστόσο, η αντιφλεγμονώδης θεραπεία απέτυχε προς απογοήτευση όλων [265, 267].

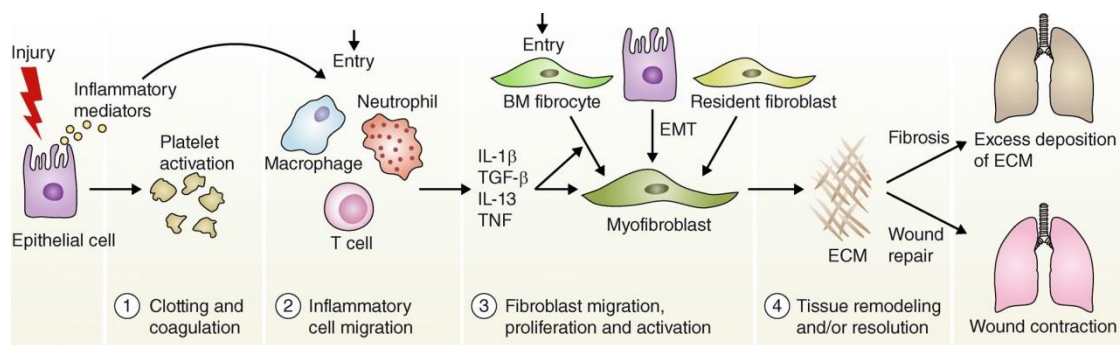
Σήμερα, η επικρατούσα υπόθεση για την παθογένεια της πνευμονικής ίνωσης υποστηρίζει ότι η ΙΠΙ είναι αποτέλεσμα της μη φυσιολογικής επούλωσης τραύματος μετά από επαναλαμβανόμενους τραυματισμούς του κυψελιδικού επιθηλίου. Χαρακτηριστικό της διαδικασίας αυτής είναι η υπερβολική εναπόθεση ουσιών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (ECM), όπως είναι το υαλουρονικό οξύ, η φιβρονεκτίνη και το κολλαγόνο, τα οποία αναδιαμορφώνουν τον πνευμονικό ιστό. Οι ινοβλάστες και μυοϊνοβλάστες αποτελούν βασικούς κυτταρικούς τύπους που εμπλέκονται στην διαδικασία αυτή [267, 273].

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, μετά τον τραυματισμό του κυψελιδικού επιθηλίου ξεκινά η φυσιολογική διαδικασία αποκατάστασης της βλάβης, η οποία περιλαμβάνει την μετανάστευση, τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων (reepithelialization). Τα τραυματισμένα κυψελιδικά κύτταρα τύπου I, αντικαθίστανται από κυψελιδικά κύτταρα τύπου II τα οποία πολλαπλασιάζονται και τελικά διαφοροποιούνται σε τύπου I αποκαθιστώντας την βλάβη. Στην πνευμονική ίνωση, η διαδικασία αυτή φαίνεται πως αργεί να ξεκινήσει ή συμβαίνει ατελώς. Οι πνεύμονες ασθενών με ΙΠΙ παρουσιάζουν αξιοσημείωτες αλλαγές στο κυψελιδικό επιθήλιο: παρουσία κυβοειδών κυττάρων (υπερπλασία κυττάρων τύπου II), μεγάλα και επιμήκη επιθηλιακά κύτταρα (μεταβατικά κύτταρα μεταξύ τύπου I και II), περιοχές απόπτωσης επιθηλιακών κυττάρων και περιοχές που καλύπτονται από βρογχικό επιθήλιο (honeycomb lesions). Φαίνεται δηλαδή, ότι στην ΙΠΙ, διαταράσσεται η ικανότητα των κυψελιδικών κυττάρων τύπου II να αποκαταστήσουν την επιθηλιακή βλάβη. Παράλληλα, τα κυψελιδικά κύτταρα τύπου II παράγουν και εκκρίνουν κυτοκίνες, μεταλλοπρωτεϊνάσες και αυξητικούς παράγοντες (αυξητικό παράγοντα αιμοπεταλίων (PDGF), αυξητικό παράγοντα β (TGF-β), παράγοντα νέκρωσης όγκων α (TNF-α), αυξητικό παράγοντα του συνδετικού ιστού (CTGF) και ενδοθελίνη-1.), τα οποία αφενός προάγουν την φλεγμονώδη απόκριση (κυψελιδικά μακροφάγα), αφετέρου συμμετέχουν στην συσσώρευση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας μέσω της ενεργοποίησης των ινοβλαστών [274]. Τέλος, πολλά δεδομένα υποστηρίζουν ότι η απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων διαδραματίζει βασικό ρόλο στην παθογένεια της ίνωσης και ίσως αποτελεί την αιτία της ανεπιτυχούς επανεπιθηλιοποίησης που χαρακτηρίζει την νόσο. Μελέτες έχουν δείξει αυξημένη απόπτωση του κυψελιδικού επιθηλίου σε ΙΠΙ ασθενείς. Η αυξημένη έκφραση του υποδοχέα Fas στα επιθηλιακά κύτταρα ασθενών με ΙΠΙ, πιθανά υποδηλώνει την συμμετοχή του συστήματος Fas-Fas ligand στην αποπτωτική διαδικασία. Η συμμετοχή της επιθηλιακής απόπτωσης στην εξέλιξη της ίνωσης έχει επίσης επιβεβαιωθεί και πειραματικά στο μοντέλο της μπλεομυκίνης[275-279].

Οι **ινοβλάστες** αποτελούν εξίσου σημαντικά κύτταρα στην παθογένεια της ΙΠΙ. Η αρχική βλάβη του κυψελιδικού επιθηλίου, επάγει τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών, οι οποίοι μεταναστεύουν στην βασική μεμβράνη και με στόχο την

αποκατάσταση της βλάβης παράγουν εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (ECM). Στις ινοβλαστικές εστίες, συναντάται ένας μοναδικός τύπος ινοβλαστών, ο οποίος χαρακτηρίζεται από παραγωγή της α -ακτίνης των λείων μυϊκών κυττάρων (α -SMA, α -smooth Muscle Actin), ο μυοϊνοβλάστης. Ο μυοϊνοβλάστης είναι το κατεξοχήν υπεύθυνο κύτταρο για την παραγωγή κολλαγόνου [280]. Πιθανά, προέρχεται από την διαφοροποίηση των ινοβλαστών του πνεύμονα, η οποία επάγεται από κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες όπως η IL-4, η IL-13 [281] και ο TGF- β_1 . Σε φυσιολογικές συνθήκες οι μυοϊνοβλάστες εμφανίζονται στις περιοχές βλάβης από όπου απομακρύνονται μόλις επιτελέσουν το έργο τους μέσω απόπτωσης. Στην περίπτωση της ΙΠΙ, η διαδικασία αυτή απορρυθμίζεται με αποτέλεσμα μια συνεχή ινωτική απάντηση και σύνθεση ECM. Οι μυοϊνοβλάστες παραμένουν στο σημείο της βλάβης καταστρέφοντας τη δομή του πνευμονικού παρεγχύματος [282] και τροποποιώντας της μηχανικές ιδιότητες του πνευμονικού ιστού, λόγω της συσταλτικής τους ικανότητας [283]. Παράλληλα, οι ινωτικοί μυοϊνοβλάστες παρουσιάζονται ανθεκτικοί στους μηχανισμούς απόπτωσης, καθώς παρουσία του TGF- β_1 καταστέλλουν τη σύνθεση του ενζύμου i-NOS και κατ' επέκταση την παραγωγή οξειδίου του αζώτου (NO) που θα οδηγούσε στην απόπτωση τους. Τέλος, έχει αναφερθεί ότι οι μυοϊνοβλάστες παράγουν κυτταροκίνες (MCP-1) και αυξητικούς παράγοντες (TGF- β_1) ενισχύοντας την φλεγμονώδη απόκριση [284], ενώ μέσω της παραγωγής πεπτιδίων της αγγειοτενσίνης (angiotensin peptides) προάγουν τον αποπτωτικό θάνατο των επιθηλιακών κυττάρων του πνεύμονα συμβάλλοντας περαιτέρω στην καταστροφή του επιθηλιακού ιστού [285, 286].

Με βάση τα παραπάνω, γίνεται αντιληπτό ότι η εμφάνιση ίνωσης είναι αποτέλεσμα συνδυαστικών γεγονότων που περιλαμβάνουν τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών και τη διαφοροποίηση τους σε μυοϊνοβλάστες και τη συμμετοχή αποπτωτικών μηχανισμών που είτε αναστέλλουν είτε επάγουν την απόπτωση, των μυοϊνοβλαστών και των επιθηλιακών κυττάρων αντίστοιχα. Παράλληλα, στην εξέλιξη της νόσου σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν και άλλοι μηχανισμοί όπως για παράδειγμα η αγγειογένεση, η φλεγμονώδης απόκριση, η έκφραση πρωτεϊνών που συνθέτουν ή αποικοδομούν τα συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (μεταλλοπρωτεάσες MMPs και οι αναστολής τους TIMPs) [287-289].



Εικόνα 15: Διαταραχές στη φυσιολογική επούλωση πληγών συμβάλλουν στην ανάπτυξη πνευμονικής ίνωσης. Η διαδικασία επούλωσης τραύματος έχει τέσσερα διαφορετικά στάδια: η φάση πήξης (1), η φάση μετανάστευσης φλεγμονωδών κυττάρων (2), φάση μετανάστευσης/πολλαπλασιασμού/ενεργοποίησης ινοβλαστών (3) και η αναδιαμόρφωση ιστού και επούλωσης (4). Μετά από τον τραυματισμό των πνευμόνων, τα επιθηλιακά κύτταρα απελευθερώνουν φλεγμονώδεις μεσολαβητές που ξεκινούν έναν καταρράκτη αντιφιβρινολυτικής πήξης, ο οποίος προκαλεί ενεργοποίηση αιμοπεταλίων και σχηματισμό θρόμβων στο αίμα. Αυτό ακολουθείται από είσοδο λευκοκυττάρων (π.χ., ουδετερόφιλων, μακροφάγων και T κυττάρων). Τα λευκοκύτταρα εκκρίνουν προϋνωτικές κυτοκίνες όπως IL-1 β , TNF, IL-13 και TGF- β . Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και ουδετερόφιλα φαγοκυτταρώνουν τα νεκρά κύτταρα και εξαλείφουν κάθε εισβάλλουσα οργανισμό. Στην επόμενη φάση, τα ινοκύτταρα από τον μυελό των οστών και οι ινοβλάστες πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται σε μυοϊνοβλάστες, που απελευθερώνουν τα στοιχεία της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (ECM). Οι ινοβλάστες και οι μυοϊνοβλάστες μπορούν επίσης να προέρχονται από επιθηλιακά κύτταρα που υποβάλλονται σε επιθηλιακές-μεσεγχυματικές τροποποιήσεις (EMT). Στην τελική αναδιαμόρφωση και τη φάση επούλωσης, οι ενεργοποιημένοι μυοϊνοβλάστες μπορούν να προάγουν την επιδιόρθωση του τραύματος, με αποτέλεσμα τη συστολή και την αποκατάσταση των αιμοφόρων αγγείων. Ωστόσο, η ίνωση αναπτύσσεται εάν κάποιο στάδιο της παραπάνω διαδικασίας απορρυθμιστεί ή όταν το ερέθισμα που καταστρέφει τα πνεύμονα επιμένει [290].

2.3.6. Πειραματικά μοντέλα της πνευμονικής ίνωσης

Η χρήση των πειραματικών μοντέλων στην μελέτη της πνευμονικής ίνωσης είναι ουσιαστική στην προσπάθεια κατανόησης των κυτταρικών και μοριακών μηχανισμών της νόσου, καθώς και στην ανάπτυξη νέων και πιο αποτελεσματικών μεθόδων για τη διάγνωση και την αντιμετώπιση της. Έχουν αναπτυχθεί πολυάριθμα πειραματικά μοντέλα πνευμονικής ίνωσης στα οποία η πρόκληση βλάβης γίνεται είτε με ακτινοβολία ή με ενστάλαξη ανόργανων μορίων (μπλεομυκίνη, FITC, σκόνη κρυσταλλικού πυριτίου ή αμιάντου) [291-293]. Κοινό χαρακτηριστικό των μοντέλων αυτών είναι η ανάπτυξη ίνωσης ως επακόλουθο της επαγόμενης φλεγμονώδους αντίδρασης. Επιπροσθέτως, έχουν αναπτυχθεί μοντέλα που βασίζονται σε συγκεκριμένους παθολογικούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στην πνευμονική ίνωση και περιλαμβάνουν την υπερέκφραση προ-ινωτικών κυτοκινών (TGF- β , IL-1 β και του παράγοντα νέκρωσης όγκων TNF- α [294-296]), διαγονιδιακή υπερέκφραση προφλεγμονωδών κυτοκινών (TGF- α , TGF- β και IL-13 [297-300]), ενδοφλέβια ενστάλαξη ανθρώπινων ινοβλαστών σε ανοσοκατεσταλμένους ποντικούς (μη-παχύσαρκους διαβητικούς (NOD) –SCID [301, 302]) και στοχευόμενο τραυματισμό κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων τύπου II [303]. Τα χαρακτηριστικά των παραπάνω πειραματικών μοντέλων παρουσιάζονται συνοπτικά στον **Πίνακα 3**.

Η μπλεομυκίνη είναι ένα χημειοθεραπευτικό αντιβιοτικό που παράγεται από το βακτήριο *Streptomyces verticillus*, η οποία δρα μέσω της χηλίωσης μεταλλικού ιόντος και της παραγωγής υπεροξειδίου προκαλώντας την καταστροφή του DNA και την παρεμπόδιση του κυτταρικού κύκλου [304]. Χρησιμοποιείται κλινικά ως θεραπεία σε διάφορους καρκίνους με την πνευμονική τοξικότητα να αποτελεί την πιο συχνή παρενέργεια, που εκδηλώνεται ως βήχας, δύσπνοια, πυρετός, κυάνωση και επιδείνωση των πνευμονικών παραμέτρων λειτουργίας. Η επίδραση της μπλεομυκίνης στο πνεύμονα είναι αποτέλεσμα των χαμηλών επιπέδων της υδρολάσης της μπλεομυκίνης, ένζυμο το οποίο είναι υπεύθυνο για την υδρόλυση της και την απομάκρυνση της από τον ιστό [291]. Πράγματι, τα μεταβλητά επίπεδα υδρολάσης της μπλεομυκίνης μεταξύ των C57Bl6 και BALB/c ποντικών έχει ως αποτέλεσμα την διαφορετική απόκριση τους στην μπλεομυκίνη, με τα πρώτα να εμφανίζουν μεγαλύτερη ευαισθησία [291].

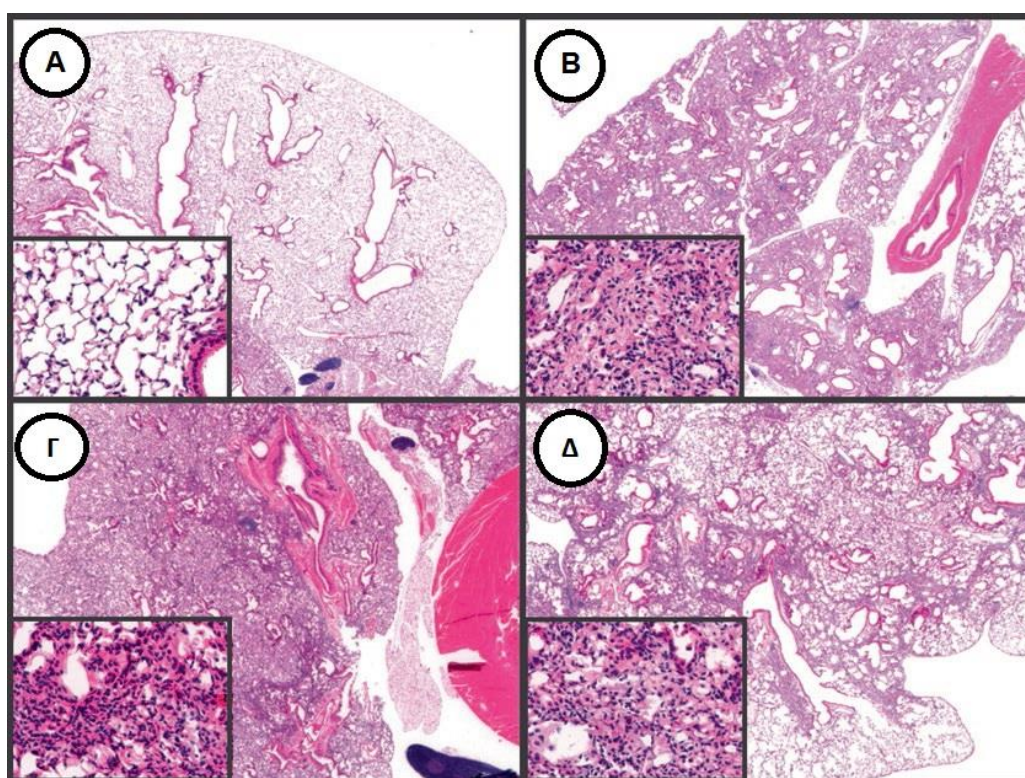
Η μπλεομυκίνη όταν χορηγείται σε ποντίκια, μέσω στοματοφαρυγγικής ή ενδοτραχειακής ενστάλαξης απευθείας στην αναπνευστική οδό, σε δόση 1-2 mg/kg (περίπου ισοδύναμη προς 0,025-0,05 U/ποντικό) [305], προκαλεί επιθηλιακή βλάβη και επακόλουθη φλεγμονή. Η φάση αυτή χαρακτηρίζεται από την διήθηση των ουδετερόφιλων, την ενεργοποίηση των μακροφάγων, την αύξηση των προ-φλεγμονωδών κυτοκινών και χημειοκινών και παράλληλα την αυξημένη αγγειακή διαρροή, με αποτέλεσμα να χρησιμοποιείται και ως χρήσιμο μοντέλο οξείας πνευμονικής βλάβης [306]. Η φάση της φλεγμονής διαρκεί 3-10 ημέρες και προηγείται της ίνωσης η οποία ξεκινάει 2-4 βδομάδες μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης. Ένα διαφορετικό μοντέλο το οποίο περιλαμβάνει πολλαπλές χορηγήσεις μπλεομυκίνης έχει σχεδιαστεί ώστε να μιμηθεί τα πολλαπλά επεισόδια επιθηλιακού τραυματισμού που πιστεύεται ότι αποτελούν τη βάση της αιτιολογίας της ΙΠΙ [277]. Η βλάβη που προκαλείται προσομοιάζει τα κλασσικά χαρακτηριστικά της UIP χωρίς να χαρακτηρίζεται από διήθηση ουδετερόφιλων.

Στο μοντέλο της μπλεομυκίνης, η ινωτική φάση χαρακτηρίζεται από αύξηση του αριθμού των μυοϊνοβλαστών, την υπερβολική παραγωγή εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (extracellular matrix, ECM) και αυξημένα επίπεδα προ-φλεγμονωδών κυτοκινών όπως ο TGF-β. Η εξέλιξη της ίνωσης συνήθως αξιολογείται με ιστολογική βαθμολόγηση, απαιτώντας εκτεταμένη ιστολογική δειγματοληψία και ανάλυση πολλαπλών πεδίων ή βιοχημική ποσοτικοποίηση του κολλαγόνου ή κατά προτίμηση της υδροξυπρολίνης, έναν ειδικό δείκτη για το κολλαγόνο που μπορεί εύκολα να ληφθεί μετά από ομογενοποίηση του πνευμονικού ιστού και όξινη υδρόλυση. Επιπλέον, με τη χρήση υψηλής ανάλυσης micro CT επιτρέπεται η παρακολούθηση της χρονικής πορείας της βλάβης που προκαλείται από μπλεομυκίνη *ex vivo* [307-311], επιτρέποντας τον καλύτερο σχεδιασμό μελετών με σκοπό την εύρεση αντί-ινωτικών θεραπειών

Στην προσπάθεια περαιτέρω ανάπτυξης και σχεδιασμού των πειραματικών μοντέλων για την μελέτη της πνευμονικής ίνωσης, θα πρέπει να ληφθούν υπόψη και οι παράγοντες κινδύνου όπως η ηλικία, το φύλο, οι λοιμώξεις. Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η λοίμωξη από τον ιό του έρπητα (γ-Herpes) επιδείνωσε την ίνωση που προκλήθηκε από μπλεομυκίνη, σε αντίθεση με άλλους μολυσματικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των *Pseudomonas aeruginosa* και H1N1, όπου δεν οδήγησαν

σε υποτροπή [312]. Αντίστοιχα, άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι τα ηλικιωμένα ποντίκια είναι πιο εύθικτα στην ίνωση σε σχέση με τα νεότερα ζώα [313] με τα αρσενικά ποντίκια να επηρεάζονται περισσότερο από τα θηλυκά ποντίκια[314].

Το μοντέλο της μπλεομυκίνης είναι ευρέως χρησιμοποιούμενο και ίσως το καλύτερα χαρακτηρισμένο μοντέλο πνευμονικής ίνωσης. Παρόλο που δεν αναπαριστά πλήρως όλα τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα που παρατηρούνται στην ανθρώπινη πνευμονική ίνωση, παραμένει ένα γρήγορο, επαναλήψιμο και ως εκ τούτου οικονομικά αποδοτικό μοντέλο για την μελέτη της παθογένειας και την αποτελεσματικότητα νέων ινωτικών θεραπειών.



Εικόνα 16: Η ιστοπαθολογία του πνεύμονα μετά από χορήγηση μπλεομυκίνης. Η μπλεομυκίνη (2 U/kg) χορηγήθηκε σε θηλυκά C57BL/6 ποντίκια ηλικίας 8 εβδομάδων με ενστάλαξη την ημέρα 0. Αντιπροσωπευτική χρώση με αιματοξυλίνη και ηωσίνη του πνευμονικού ιστού στις 3 (Α και Β), 6 (Γ) και 12 (Δ) εβδομάδες μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης. Στην εικόνα Α απεικονίζεται η φυσιολογική δομή του πνευμονικού ιστού (ομάδα ελέγχου, χορήγηση PBS) [315].

Πίνακας 3: Μοντέλα πνευμονικής ίνωσης σε μύες και επίμυες.

Μοντέλο	Κύρια χαρακτηριστικά	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Μπλεομυκίνη	Κυτταρική βλάβη λόγω κατακερματισμού του DNA. Φλεγμονώδης διήθηση και αγγειακή διαρροή, ακολουθείται από ανάπτυξη ίνωσης. Οδός χορήγησης: ενδοτραχειακά, στοματοφαρυγγικά, ενδοφλέβια κ.α	Καλά χαρακτηρισμένο μοντέλο. Γρήγορη ανάπτυξη ίνωσης, παρόμοια με ανθρώπινη παθολογία. Υπερπλασία επιθηλιακών κυττάρων (AEC)	Φλεγμονή πριν την ανάπτυξη ίνωσης. Αναστρέψιμη πνευμονική ίνωση. Ειδικότητα ανάλογα το στέλεχος (C57Bl6>SV> Balbc)
FITC	Παρόμοια με μπλεομυκίνη	Οπτικοποίησης περιοχών λόγω φθορισμού (πράσινο). Ανάπτυξη ίνωσης μεταξύ 14-28 ημ., η οποία επιμένει για > 6 μήνες.	Ακριβό αντιδραστήριο, απαιτητικός χειρισμός.
TGF-β υπερέκφραση	Αδενοϊκή χορήγηση TGF-β ή διαγονιδιακή έκφραση στο επιθήλιο (1-7 ημ.). Μονοπύρνηνη διήθηση (3-7 ημ.). Επιθηλιακή απόπτωση, συσσώρευση κολλαγόνου, καταστροφή κυψελίδων	Μιμείται την ανθρώπινη ασθένεια. Συνεχής ινωτική βλάβη	Φλεγμονή λόγω αδενοϊκού φορέα. Ειδικότητα ανάλογα το στέλεχος (C57Bl6> Balb/c)
Ακτινοβολία	Βλάβη του DNA με μεσολάβηση ελεύθερων ριζών. Επαγωγή φλεγμονής ακολουθούμενη από ίνωση. Αγγειακή αναδιαμόρφωση που θυμίζει πνευμονική υπέρταση	Μικρή θνησιμότητα	Μεγάλη διάρκεια και ακριβή μέθοδος. Ειδικότητα ανάλογα το στέλεχος C57Bl6>C3H/HeJ, CBA/J
Πυρίτιο (Silica)	Φλεγμονώδη διήθηση και ανάπτυξη ίνωσης γύρω από τις εστίες πυριτίου Πολλαπλές οδοί χορήγησης	Παρόμοιο με τον φαινότυπο που παρατηρείται σε ανθρώπους. Απεικόνιση/παρακολούθηση περιοχών που έχουν προσβληθεί από silica	Ειδικότητα ανάλογα το στέλεχος C3H/HeN> MRL/MpJ>NZB> Balb/c (εισπνεόμενο) και C57Bl/6> CBA/J με ενδοτραχειακή ένχυση
Αμίαντος (Asbestos)	Οξειδωτικό στρες, φλεγμονή και επιθηλιακός τραυματισμός. Οδοί χορήγησης: ενδοτραχειακά ή εισπνεόμενα	Επίμονη και προοδευτική ανάπτυξη ίνωσης με σχηματισμό εστιών	Μεγάλη διάρκεια (>28 ημ.) όταν χορηγείται σαν εισπνεόμενο.
Τραυματισμός κυττάρων τύπου II (ATII)	Έκφραση του υποδοχέα διφθερίτιδας υπό τον έλεγχο του υποκινητή των ATII κυττάρων, της επιφανειοδραστικής πρωτεΐνης-C. Επιλεκτική βλάβη ATII κυττάρων ATII. (Ly) 6C ^{high} μονοκύτταρα και ενεργοποιημένα μακροφάγα	Επιθηλιακός τραυματισμός στον οποίο στηρίζεται η παθογένεια της ΙΠΙ	Αυξημένη θνησιμότητα
Εξανθρωπισμένα Μοντέλα	Ενδοφλέβια χορήγηση ανθρώπινων ινοβλαστών (από ΙΠΙ ασθενείς) οδηγεί σε κυψελιδική αναδιαμόρφωση	Μελέτη επιθηλιο-μεσεγχυματικής αλληλεπίδρασης. Ταχεία έναρξη (d30-35). Δυνατότητα μελέτης θεραπευτικών στόχων για τον άνθρωπο	Ινώδεις εστίες παρατηρούνται σε αιμοφόρα αγγεία και όχι στο πνευμονικό παρέγχυμα Χρήση NOD/SCID ποντικών

2.3.7.Φωσφολιπίδα και πνευμονική ίνωση

2.3.7.1.Ο άξονας PC/PLA2/LPC

Το αναπνευστικό σύστημα διαθέτει ισχυρούς και πολύπλοκους αμυντικούς μηχανισμούς για την καίρια αντιμετώπιση βλαπτικών παραγόντων. Στους αμυντικούς μηχανισμούς των πνευμόνων περιλαμβάνονται η ικανότητα φιλτραρίσματος στο ρινοστοματοφάρυγγα, το ανακλαστικό του φτερνίσματος, ο βήχας και η βλεννοκροσσωτή κάθαρση. Στα περιφερικά τμήματα του πνεύμονα οι αμυντικές λειτουργίες περιλαμβάνουν τα ανοσολογικά κύτταρα (συμπεριλαμβανομένων των κυψελιδικών μακροφάγων και των ουδετερόφιλων), τις ανοσοσφαιρίνες και τον πνευμονικό επιφανειοδραστικό παράγοντα (pulmonary surfactant) [316]. Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας καλύπτει την κυψελιδική επιφάνεια του πνεύμονα. Η κύρια λειτουργία του είναι η διατήρηση χαμηλής επιφανειακής τάσης στο κυψελιδο-αρτηριακό φραγμό και η πρόληψη της κυψελιδικής κατάρρευσης κατά την αναπνοή [317, 318]. Επιπλέον έχει ανοσορρυθμιστικές ιδιότητες συμβάλλοντας στο σύστημα της φυσικής ανοσίας του πνεύμονα [319]. Ο επιφανειοδραστικός παράγοντας των πνευμόνων αποτελείται από ένα μοναδικό και πολύπλοκο μείγμα λιπιδίων σε ποσοστό 85-90% και ειδικών αποπρωτεϊνών (10%, κυρίως επιφανειοδραστικές πρωτεΐνες, SPs A- D). Μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες SPs B και C σχετίζονται με οξεία αναπνευστική ανεπάρκεια και διάμεσες πνευμονοπάθειες [320, 321].

Περίπου το 90% του λιπιδικού τμήματος του επιφανειοδραστικού παράγοντα αποτελείται από μείγμα φωσφολιπιδίων, με την πλειονότητα αυτών να είναι φωσφατιδυλοχολίνη (PC), η οποία σε μεγάλο ποσοστό ανευρίσκεται κορεσμένη ως διπαλμιτοϋλ-φωσφατιδυλοχολίνη (16:0-PC, DPPC). Το υπόλοιπο 10% του λιπιδικού τμήματος αποτελείται από τριγλυκερίδια και χοληστερόλη. Η φωσφατιδυλοχολίνη αποτελεί το βασικό συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών και είναι πρόδρομο μόριο για την σύνθεση του φωσφατιδικού οξέος (PA), της λυσοφωσφατιδυλοχολίνης (LPC) και του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF). Η διπαλμιτοϋλ-φωσφατιδυλοχολίνη (DPPC) είναι το κυρίως υπεύθυνο συστατικό για την διατήρηση της επιφανειακής τάσης του επιφανειοδραστικού παράγοντα. Υπάρχουν δύο τρόποι σύνθεσης του DPPC: είτε με μετατροπή του φωσφατιδικού οξέος (PA) σε 1,2- διπαλμιτοϋλ-διακυλογλυκερόλη (1,2-dipalmitoyl

diacylglycerol) και εν συνεχεία μετατροπή του σε DPPC, είτε μέσω της αναδιαμόρφωσης των ακόρεστων PC. Στην δεύτερη περίπτωση, η αποακετυλίωση των ακόρεστων PC από την PLA2, ακολουθείται από ένα στάδιο ακετυλίωσης μέσω μιας ακυλοτρανσφεράσης της λυσοφωσφατιδυλοχολίνης (LPCAT) [322]. Σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η LPCAT εκφράζεται πολύ στον πνευμονικό ιστό [323], μπορεί να υποθεθεί ότι παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην βιογένεση των κυψελιδικών κορεσμένων PC (DPPC) [324]. Σε ασθενής με πνευμονική ίνωση έχει παρατηρηθεί μείωση στην περιεκτικότητα του DPPC στο βρογχοκυψελιδικό υγρό (BALF), αντανakλώντας πιθανές λειτουργικές μεταβολές ή βλάβη στα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα τύπου II ή μεταβολική διαταραχή του επιφανειοδραστικού παράγοντα [325]. Παρόμοια μείωση έχει παρατηρηθεί στα επίπεδα των PC [326]. Επιπλέον, έχει αναφερθεί μείωση του παλμιτικού οξέος σε ασθενείς με ΙΠΙ, το οποίο παράγεται από το PC (16:0/16:0), συσχετίζοντας το με την λειτουργική βλάβη του επιφανειοδραστικού παράγοντα και τις διαταραχές των κυψελίδων που συναντώνται στην πνευμονική ίνωση [327].

Ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (Platelet-activating factor, PAF), αποτελεί ένα αιθερικό ανάλογο του PC, είναι ένας ισχυρός μεσολαβητής λιπιδίων που διαδραματίζει διάφορους φλεγμονώδεις και φυσιολογικούς ρόλους και έχει συνδεθεί με την πνευμονική ίνωση. Υπάρχουν δυο μονοπάτια βιοσύνθεσης του PAF: το ένα επάγεται σε φλεγμονώδεις καταστάσεις (LysoPFAT/LPCAT2), ενώ το άλλο (LPCAT1) έχει ενδογενή έκφραση (*de novo*) [328]. Ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων έχει βρεθεί ότι επάγει τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών και συμμετέχει στην ενεργοποίηση των μακροφάγων τα οποία με την σειρά τους παράγουν TNF και ιντερλευκίνες [329, 330]. Στο μοντέλο πνευμονικής ίνωσης που προκαλείται από μπλεομυκίνη, έχει βρεθεί αύξηση των ενεργών υποδοχέων του PAF στο πνευμονικό ιστό και τα κυψελιδικά μακροφάγα. Ωστόσο, η παρεμπόδιση του υποδοχέα PAF οδήγησε σε μερική και περιορισμένη προστασία από την νόσο [331].

Όσον αφορά τις PLA2 δεν υπάρχουν πολλά δεδομένα για την πιθανή εμπλοκή τους στους μηχανισμούς ανάπτυξης της πνευμονικής ίνωσης. Τέσσερις sPLA2s εκφράζονται στον πνεύμονα οι: IB, IIA, V και X. Η sPLA2-IIA εκφράζεται από τα αιμοπετάλια και τα κυψελιδικά μακροφάγα κατά τη διάρκεια της οξείας

φλεγμονής [332, 333]. Οι sPLA2-V και -X εκφράζονται επίσης από κυψελιδικά μακροφάγα και πιστεύεται ότι ρυθμίζουν την σύνθεση των φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης στα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα τύπου II [334]. Επιπλέον, οι sPLA2s που απελευθερώνονται από τα ιστιοκύτταρα μπορεί να ενεργοποιήσουν με παρακρινικό τρόπο αρκετές λειτουργίες των μακροφάγων διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στις φλεγμονώδεις ασθένειες των πνευμόνων [335]. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν πειράματα σε ποντίκια με έλλειψη της cPLA2, όπου έδειξαν θεραπευτική δράση έναντι της πνευμονικής ίνωσης που επάγεται με μπλεομυκίνη, ως αποτέλεσμα των μειωμένων επιπέδων σε θρομβοξανία και λευκοτριένια [331]. Η cPLA2 συνεισφέρει στην παθογένεια της ΙΠΙ λόγω της παραγωγής μεσολαβητών λιπιδίων σε ανθρώπινα μακροφάγα του πνεύμονα [336].

Το LPC έχει βρεθεί να εμπλέκεται σε ασθένειες που σχετίζονται με σοβαρή βλάβη των πνευμόνων και αναπνευστική δυσχέρεια, όπως το σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS), το οποίο είναι δυνητικά θανατηφόρο. Η λυσοφωσφατιδυλοχολίνη πιθανά αυξάνει την διαπερατότητα των αιμοφόρων αγγείων στον πνεύμονα με αποτέλεσμα την συσσώρευση υγρού σε αυτόν, προκαλώντας προοδευτική μείωση της αναπνοής του ασθενή [337]. Αξιόλογες, μεγάλες αυξήσεις στην περιεκτικότητα του LPC έχουν μετρηθεί στα BALFs ποντικών μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης [338]. Αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει σε αυξημένα επίπεδα του LPA μέσω της υδρόλυσης του LPC από την ATX, και την έναρξη πολλών σηματοδοτικών μονοπατιών. Παρόλα αυτά δεν αποκλείονται και άλλες πιθανές λειτουργίες του LPC μέσω του υποδοχέα του G2A, για παράδειγμα η χημειοταξία μακροφάγων και η φαγοκυττάρωση των αποπτωτικών προϊόντων.

2.3.7.2.ATX και σηματοδότηση LPA

Η ATX έχει ταυτοποιηθεί ως πιθανό γονίδιο που ελέγχει τις πνευμονικές λειτουργίες και εμπλέκεται στην ανάπτυξη και αναδιαμόρφωση του πνευμονικού ιστού [339]. Στον υγιή πνεύμονα, η ATX εντοπίζεται στο βρογχικό επιθήλιο, ενώ αυξημένη έκφραση της ATX έχει βρεθεί στο καρκίνο του πνεύμονα [159]. Σε δείγματα ασθενών με ΙΠΙ, η αυτοταξίνη εντοπίζεται στο κυψελιδικό επιθήλιο, σε κύτταρα που μοιάζουν με ινοβλάστες, σε περιοχές βρογχικής μεταπλασίας και στα μακροφάγα [340]. Ένα παρόμοιο προφίλ έκφρασης έχει περιγραφεί σε δείγματα από ασθενείς με μη ειδική διάμεση πνευμονία (fibrotic non-specific interstitial pneumonia, fNSIP), η οποία παρουσιάζει κοινά παθολογικά χαρακτηριστικά με την UIP. Αντίθετα, χαμηλή έκφραση της ATX βρέθηκε τόσο στα φλεγμονώδη κύτταρα του πνεύμονα από δείγματα NSIP, όσο και σε περιοχές χαλαρού συνδετικού ιστού που παρατηρούνται σε περιπτώσεις κρυπτογενούς οργανωτικής πνευμονίας (COP). Οι παραπάνω παθολογίες αντιπροσωπεύουν δύο μορφές ιδιοπαθούς διάμεσης πνευμονίας (IIPs) με εξαιρετική ανταπόκριση στην θεραπεία με κορτικοστεροειδή, υποδεικνύοντας ότι η αυξημένη έκφραση της ATX συνδέεται στενά με προοδευτικές και μη αναστρέψιμες μορφές πνευμονικής ίνωσης, όπως IPF/UIP και fNSIP [340].

Στο πειραματικό μοντέλο πνευμονικής φλεγμονής και ίνωσης που προκαλείται από μπλεομυκίνη, αυξημένα επίπεδα της ATX εντοπίζονται στο βρογχικό επιθήλιο, στα κυψελιδικά μακροφάγα και στο βρογχοκυψελιδικό υγρό [340, 341]. Ωστόσο, η αύξηση της ATX στο BALF συνοδεύεται με αύξηση των συνολικών επιπέδων πρωτεΐνης, υποδηλώνοντας ότι η ATX εισέρχεται από την κυκλοφορία. Παράλληλα, τα επίπεδα LPA στα BALF των ινωτικών πνευμόνων ποντικού και ανθρώπου αυξάνονται, [340, 341], ακόμη και στα αρχικά στάδια της νόσου [342]. Η φαρμακολογική αναστολή της ATX είχε ως αποτέλεσμα την μείωση των επιπέδων LPA, επιβεβαιώνοντας ότι η ATX είναι αποκλειστικά υπεύθυνη για την παραγωγή του LPA στον πνεύμονα [338]. Η γενετική απαλοιφή της ATX από την πλειοψηφία των βρογχικών επιθηλιακών κυττάρων ή των μακροφάγων έχει ως αποτέλεσμα την ύφεση της πνευμονικής φλεγμονής και ίνωσης, υπογραμμίζοντας τη σημασία της τοπικής παραγωγής της ATX και επαληθεύοντας τον ρόλο της στην παθογένεια της νόσου [340]. Παρόμοια, η γενετική απαλοιφή είτε του LPA₁ ή του LPA₂, οδήγησε σε εξασθένηση του φαινοτύπου στο μοντέλο της μπλεομυκίνης [341,

343], υποδηλώνοντας ότι ο άξονας ATX/LPA μπορεί να αποτελέσει θεραπευτικό στόχο για την αντιμετώπιση της πνευμονικής ίνωσης. Πράγματι, φαρμακολογική αναστολή της ATX ή του υποδοχέα LPA₁ μείωσε την έκταση της βλάβης που προκαλείται από μπλεομυκίνη [340, 344] και η φαρμακολογική αναστολή των LPA_{1/3} ελάττωσε την πνευμονική βλάβη που προκαλείται από ακτινοβολία [345].

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η επικρατούσα υπόθεση σχετικά με τον μηχανισμό παθογένειας της πνευμονικής ίνωσης κάνει λόγο για απορρύθμιση της φυσιολογικής διαδικασίας επούλωσης τραυμάτων του κυψελιδικού επιθηλίου [290], με αποτέλεσμα την καταστροφή του. Τόσο σε πνεύμονες ασθενών με ΙΠΙ όσο και στα πειραματικά μοντέλα της νόσου έχει δειχθεί ότι λαμβάνει χώρα απόπτωση κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων, η οποία σχετίζεται με αυξημένη έκφραση του TNF [346] και αποπτωτικών δεικτών [267]. Ο TNF-α προάγει την έκφραση της ATX [43, 347], η οποία με τη σειρά της αυξάνει την τοπική παραγωγή LPA, διαιωνίζοντας τη βλάβη. Επιπλέον, η επαγωγή της επιθηλιακής απόπτωσης είναι επαρκής για την έναρξη ινωτικής απόκρισης σε πειραματικά μοντέλα [267], η οποία αναστέλλεται μετά από γενετική ή φαρμακολογική παρεμπόδιση των αποπτωτικών σημάτων [348]. Στα γενετικά τροποποιημένα ποντίκια με έλλειψη των υποδοχέων LPA₁ ή LPA₂, τα οποία ανέπτυξαν λιγότερη πνευμονική ίνωση, παρατηρήθηκε σημαντικά μειωμένος αριθμός αποπτωτικών (TUNEL+) επιθηλιακών κυττάρων [341, 343], γεγονός που υποδηλώνει ότι το LPA προάγει την επιθηλιακή απόπτωση μετά από πνευμονική βλάβη. Επιπλέον, η σηματοδότηση LPA μέσω του LPA₁ έχει δειχθεί να επάγει απόπτωση σε φυσιολογικά ανθρώπινα βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα [342]. Τέλος, η εμπλοκή του κυτταροσκελετού στην επιθηλιακή απόπτωση και στην πνευμονική ίνωση [349], καθώς και η ικανότητα του LPA να αναδιατάσσει το κυτταροσκελετό των βρογχικών επιθηλιακών κυττάρων [350], υποδηλώνουν μια πρόσθετη ενδοκυτταρική οδό μέσω της οποίας το LPA δρα στα επιθηλιακά κύτταρα.

Χαρακτηριστικό της παθογένειας της ΙΠΙ αποτελεί η αυξημένη συσσώρευση των ινοβλαστών, λόγω του αυξημένου πολλαπλασιασμού και της μετανάστευσης, καθώς επίσης και της μειωμένης απόπτωσης των μυοϊνοβλαστών [351]. Το LPA προάγει *in vitro* τον πολλαπλασιασμό των πνευμονικών ινοβλαστών [345, 352], διεγείρει τη μετανάστευση τους [353, 354] μέσω σχηματισμού προεκτάσεων που λειτουργούν σαν πόδια προσκόλλησης (lamellipodia) και καταστέλλει πλήρως την

απόπτωση τους [342], προάγοντας την παθολογική συσσώρευση των ινοβλαστών στους εναέριους χώρους. Επιπλέον, το LPA δρα ως χημειοτακτικός παράγοντας σε πνευμονικούς ινοβλάστες μέσω του LPA₁ [341, 344] και έτσι θα μπορούσε να αποτελέσει καθοριστικό παράγοντα για την ανάπτυξη της ΙΠΙ. Η χρόνια ίνωση χαρακτηρίζεται από την παρουσία των μυοϊνοβλαστών. Το LPA, μέσω του LPA₂, επάγει τη διαφοροποίηση των ανθρώπινων ινοβλαστών πνεύμονα σε μυοϊνοβλάστες προκαλώντας την έκφραση πρωτεϊνών αSMA, φιβρονεκτίνης, κολλαγόνου και TGF-β1 [343]. Επομένως, ο άξονας ATX/LPA εμπλέκεται στην πνευμονική ίνωση μέσω της μετανάστευσης και πολλαπλασιασμού των ινοβλαστών, αλλά και μέσω της διαφοροποίησής τους σε μυοϊνοβλάστες.

Είναι κοινώς αποδεκτό ότι οι φλεγμονώδεις μεσολαβητές παίζουν ρόλο τόσο στην έναρξη όσο και στην εξέλιξη της πνευμονικής ίνωσης, παρά την αποτυχία των αντιφλεγμονωδών θεραπειών [290]. Έχει δειχθεί ότι το LPA στα επιθηλιακά κύτταρα επάγει την παραγωγή IL-8 [355, 356], ένα ισχυρό χημειοτακτικό παράγοντα ουδετερόφιλων, υποδηλώνοντας ότι τα αυξημένα επίπεδα LPA στην πρώιμη φάση της πνευμονικής βλάβης [342] μπορεί να οδηγούν στην έναρξη της φλεγμονώδους απόκρισης. Το LPA επίσης επάγει την έκκριση φλεγμονωδών μεσολαβητών όπως IL-1β, IL-8 and MCP-1 [357-359], καθώς επίσης και μορίων προσκόλλησης όπως τα ICAM-1, VCAM-1 και E-cadherin από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, ενισχύοντας πιθανά τις αλληλεπιδράσεις με τα λευκοκύτταρα και την εξαγγείωση [359-361]. Επιπροσθέτως, η ATX των επιθηλιακών κυττάρων αποτελεί ένα υπόστρωμα για την προσέλκυση λεμφοκυττάρων [196], ενώ το LPA διεγείρει την πόλωση, την κινητικότητα και τη δια-ενδοθηλιακή μετανάστευση των T-κυττάρων [196, 198]. Η γενετική απαλοιφή των LPA₁ ή LPA₂ είχε ως αποτέλεσμα την εξασθένηση της αγγειακής διαρροής στο μοντέλο της μπλεομυκίνης [341, 343], ενώ το LPA αύξησε τη διαπερατότητα του ενδοθηλιακού στρώματος σε ανθρώπινα πνευμονικά αρτηριακά ενδοθηλιακά κύτταρα [362]. Το LPA μπορεί επίσης να αυξήσει την IL-13 έκφραση στα T κύτταρα [363], μια κυτοκίνη Th2 που έχει συνδεθεί στην ανάπτυξη ίνωσης σε μια ποικιλία χρόνιων φλεγμονωδών ασθενειών συμπεριλαμβανομένης της πνευμονικής ίνωσης [290, 364]. Επομένως, το LPA μπορεί επίσης να επηρεάσει το φλεγμονώδες συστατικό της πνευμονικής ίνωσης μέσω της διέγερσης της

παραγωγής κυτοκίνης, καθώς και της διαμόρφωσης του ενδοθηλιακού φραγμού και της προώθησης της εξαγγείωσης των φλεγμονωδών κυττάρων.

Ο TGF- β είναι ο κύριος προ-ινωτικός παράγοντας σε πολλά όργανα. Στον πνεύμονα, παράγεται από πληθώρα κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων κυψελιδικών μακροφάγων και ουδετερόφιλων, ενεργοποιημένων επιθηλιακών και ενδοθηλιακών κυττάρων, καθώς και ινοβλαστών και μυοϊνοβλαστών [365]. Όταν ενεργοποιείται, ο TGF- β είναι ένας πλειοτροπικός αυξητικός παράγοντας με χημειοτακτικές και πολλαπλασιαστικές ιδιότητες προκαλώντας την πρόσληψη μακροφάγων και ινοβλαστών, καθώς και την έκκριση ενός αριθμού προφλεγμονωδών και προ-ινωτικών κυτοκινών [365]. Τα επίπεδα TGF- β βρέθηκαν αυξημένα στο βρογχοκυψελιδικό υγρό τόσο σε ποντίκια όσο και σε ασθενείς με ίνωση [366]. Το LPA προκαλεί έκφραση του TGF- β σε πνευμονικούς ινοβλάστες *in vitro* [343], ενώ σε βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα και κύτταρα λείου μυός έχειδειχθεί ότι η αύξηση του TGF- β , που προκαλείται από το LPA, γίνεται μέσω πρόσδεσης σε ιντεγκρίνες [350, 367]. Επομένως, το LPA μέσω ενεργοποίησης του TGF- β μπορεί έμμεσα να προάγει τις προ-ινωτικές αποκρίσεις.

Ο HGF (hepatocyte growth factor) είναι ένας αυξητικός παράγοντας για επιθηλιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα, η έκφραση του οποίου αυξάνεται μετά από πνευμονική βλάβη [368]. Σε ασθενείς με ΙΠΙ, τα επίπεδα HGF στο βρογχοκυψελιδικό υγρό είναι αυξημένα σε σύγκριση με τα υγιή άτομα, ωστόσο οι ινοβλάστες από τους ασθενείς με ΙΠΙ εκφράζουν λιγότερο HGF και παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα ενεργοποίησης του προ-HGF [368]. Η προστατευτική επίδραση του HGF [368, 369] προκαλείται μέσω του περιορισμού της πρόσληψης μυοϊνοβλαστών, της προαγωγής του πολλαπλασιασμού και της επιβίωσης των πνευμονικών επιθηλιακών και ενδοθηλιακών κυττάρων [369] καθώς και την επαγωγή της απόπτωσης των μυοϊνοβλαστών [368]. Το LPA έχει αντίθετες επιδράσεις από τον HGF [370] και πιθανά έχει προ-ινωτικές δράσεις μέσω της αναστολής της σηματοδότησης HGF.

Συμπερασματικά, ο άξονας ATX/LPA μπορεί να προάγει την πνευμονική ίνωση με διάφορους τρόπους, όπως η επαγωγή της αγγειακής διαρροής, η μετανάστευση και η διαφοροποίηση των ινοβλαστών, η απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων, η εισροή φλεγμονωδών κυττάρων, η σηματοδότηση του

TGF- β και η καταστολή της σηματοδότησης του HGF. Σήμερα, γίνονται προσπάθειες στόχευσης του άξονα ATX/LPA σε πολλαπλά επίπεδα: με μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του LPA [371], με ανταγωνισμό των LPA υποδοχέων [372, 373], μειώνοντας την σηματοδότηση του LPA μέσω ρύθμισης της δραστικότητας των LPP1 ή LPP3 [374], μειώνοντας την παραγωγή LPA μέσω αναστολής της ATX [375].

Στα πλαίσια της πνευμονικής ίνωσης, *in vivo* αναστολή της ATX με τον GWJ-A-23, έναν μικρομοριακό αναστολέα ATX με $K_i=18\text{nM}$ [376], βελτίωσε σημαντικά τον φαινότυπο της ασθένειας, μειώνοντας παράλληλα την συγκέντρωση του TGF- β και του LPA στο βρογχοκυψελιδικό υγρό [338]. Οι προσπάθειες που έγιναν για την ανακάλυψη μιας ένωσης με ισχυρότερη αναστολή της ATX, οδήγησαν στην ταυτοποίηση του Pf-8380, ο οποίος έχει χαμηλό IC_{50} (1,7-2,8nM) και καλή βιοδιαθεσιμότητα δια στόματος [101]. Έχει δειχθεί ότι η αναστολή της ATX με τον Pf-8380 μείωσε την φλεγμονώδη υπεραλγησία [101] και την ηπατική ίνωση [377]. Υποκινούμενη από το έντονο ενδιαφέρον για την ανακάλυψη νέων θεραπευτικών ενώσεων για την ΙΠΙ, η φαρμακοβιομηχανία Boehringer Ingelheim συνέθεσε έναν νέο ATX αναστολέα, τον BI-2545, ο οποίος έχει χαμηλό IC_{50} *in vitro* καθώς και δυνατότητα να μειώνει τα επίπεδα LPA *in vivo* [378]. Εντούτοις, περαιτέρω μελέτες απαιτούνται ώστε να κριθεί κατάλληλο για την θεραπεία της πνευμονικής ίνωσης. Ένας ακόμα ισχυρός αναστολέας ATX, ο οποίος όμως δεν έχει δοκιμαστεί στα πλαίσια της πνευμονικής ίνωσης, είναι ο ONO-8430506 με *in vitro* IC_{50} τιμές μεταξύ 6.4-19nM και ισχυρή αναστολή της δραστικότητας της ATX/ENPP2 *in vivo* και κατ' επέκταση της παραγωγής LPA [379]. Επιπλέον, ένας αντί-ATX αναστολέας απταμερούς εμφάνισε εξαιρετική αποτελεσματικότητα έναντι της πνευμονικής ίνωσης στο πειραματικό μοντέλο ποντικών, καταστέλλοντας τη συσσώρευση κολλαγόνου και ολικής πρωτεΐνης στο BALF [380]. Πιο πρόσφατα, ένας νέος ATX αναστολέας αναπτύχθηκε, ο GLPG1690 και αξιολογήθηκε στο μοντέλο πνευμονικής ίνωσης που προκαλείται από μπλεομυκίνη με ωφέλιμα αποτελέσματα: μείωση των επιπέδων LPA στο πλάσμα και το βρογχοκυψελιδικό υγρό, καθώς και μείωση της εναπόθεσης εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας στον πνεύμονα. Τα αποτελέσματα του GLPG1690 στην θεραπεία της πνευμονικής ίνωσης αναμένονται μετά την ολοκλήρωση της κλινικής μελέτης φάσης 2 η οποία πραγματοποιείται σε ασθενείς με ΙΠΙ [381]. Πέρα από τους γνωστούς και χαρακτηρισμένους αναστολείς ATX που

υπάρχουν ήδη, αρκετές αναφορές αποσκοπούν στην αναγνώριση της σχέσης δομής-δραστικότητας προκειμένου να δημιουργηθούν νέες ενώσεις με καλή βιοδιαθεσιμότητα και αποτελεσματικότητα για *in vivo* αξιολόγηση σε διαφορετικές παθολογικές [382, 383]. Όσον αφορά, την σηματοδότηση του LPA υπάρχουν δεκάδες γνωστοί ανταγωνιστές των υποδοχέων του LPA, αλλά λίγοι από αυτούς έχουν δείξει αποτελεσματικότητα σε *in vivo* πειράματα [372]. Ο AM966, ένας ανταγωνιστής του υποδοχέα LPA₁, μείωσε την αγγειακή διαπερατότητα, την φλεγμονή και την ίνωση στο μοντέλο της μπλεομυκίνης [341, 344], ωστόσο τα αποτελέσματα του ως αντί-ινωτικός παράγοντας αμφισβητούνται [384]. Παρόμοια, ο AM095, μείωσε την ποσότητα κολλαγόνου και πρωτεϊνών του βρογχοκυψελιδικό υγρό στα αρχικά στάδια της ασθένειας [385]. Επιπλέον, η πνευμονική ίνωση που προκαλείται από ακτινοβολία καταστέλλεται με ανταγωνισμό των LPA_{1/3} [345]. Μέχρι σήμερα, ένας ανταγωνιστής του LPA₁ (BMS-986020/BMS-986202/AM152) έχει περάσει σε κλινικές μελέτες φάσης II για ασθενείς με ΙΠΙ [386].

2.4.Σκλήρυνση κατά πλάκας (Πολλαπλή σκλήρυνση)

Η πολλαπλή σκλήρυνση (MS), επίσης γνωστή ως σκλήρυνση κατά πλάκας ή διάχυτη εγκεφαλομυελίτιδα, είναι μία χρόνια αυτοάνοση [387, 388] φλεγμονώδης και απομυελινωτική ασθένεια του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ), άγνωστης αιτιολογίας [389]. Η νόσος εμφανίζεται συχνότερα σε άτομα νεαρής ηλικίας, 20-40 ετών, γυναικείου φύλου με αναλογία 3:1 έναντι των ανδρών.

Στην ΣΚΠ η μυελίνη, η οποία περιβάλλει το νευράξονα των εμμύελων νευρικών ινών του ΚΝΣ, καταστρέφεται [390]. Φυσιολογικός ρόλος της μυελίνης είναι η μετάδοση των ηλεκτρικών ερεθισμάτων μεταξύ των νευρών, με αποτέλεσμα η καταστροφή της να διαταράσσει την ικανότητα αγωγής ερεθισμάτων στους νευρώνες, το σύστημα επικοινωνίας των κυττάρων του εγκεφάλου δυσλειτουργεί οδηγώντας σε ένα ευρύ φάσμα ενδείξεων και συμπτωμάτων [391, 392], στα οποία περιλαμβάνονται σωματικά, πνευματικά [392] και μερικές φορές ψυχιατρικά προβλήματα [393]. Η κλινική εικόνα κάθε ασθενούς διαφέρει ανάλογα με το μέρος του ΚΝΣ όπου έχει πληγεί και την φθορά της μυελίνης. Τα προσβεβλημένα άτομα εμφανίζουν τις χαρακτηριστικές της νόσου απομυελινωτικές πλάκες (ουλές) σε πολλά σημεία του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού (NM) (διασπορά στο χώρο) [394]. Στους περισσότερους ασθενείς, μετά από τις πρώτες εξάρσεις της ασθένειας, επέρχεται σχεδόν πλήρης ανάρρωση, αργότερα όμως οι νευρολογικές διαταραχές αθροίζονται σταδιακά (διασπορά στο χρόνο) [394] με αποτέλεσμα να δημιουργούνται μόνιμες βλάβες στην κινητική και αισθητική λειτουργία [395].

Το αίτιο που οδηγεί στην εμφάνιση της ασθένειας δεν είναι σαφές, πιστεύεται ότι ο υποκείμενος μηχανισμός είναι είτε η καταστροφή από το ανοσοποιητικό σύστημα είτε η αποτυχία των κυττάρων που παράγουν μυελίνη [396]. Τόσο γενετικοί όσο και περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως οι λοιμώξεις φαίνεται ότι συμβάλλουν στην εμφάνιση της ασθένειας [392, 397-401]. Η πολλαπλή σκλήρυνση συνήθως διαγιγνώσκεται βάσει των παρουσιαζόμενων ενδείξεων και συμπτωμάτων και των αποτελεσμάτων των υποστηρικτικών ιατρικών εξετάσεων.

2.4.1. Ιστορική αναδρομή

Προκαλεί εντύπωση το γεγονός ότι μια από τις πιο συχνές νευρολογικές παθήσεις, η σκλήρυνση κατά πλάκας, έχει ιστορία λίγων μόνο αιώνων με τις πρώτες αναφορές σε ιατρικά κείμενα να τοποθετούνται μόλις τον 14^ο αιώνα. Η ευρεία ποικιλία των συμπτωμάτων της νόσου σε συνδυασμό με την απρόβλεπτη εμφάνιση τους, εκδηλώνονται και υποχωρούν στα περισσότερα άτομα, έκαναν την σκλήρυνση κατά πλάκας μια δύσκολη νόσο να αναγνωριστεί και να μελετηθεί.

Η περίπτωση μιας νεαρής γυναίκας ονόματι Χαλντόρα, έζησε στην Ισλανδία γύρω στο 1200 μ.Χ., η οποία έχασε ξαφνικά την όρασή της, παρέλυσε και μετά από επτά ημέρες έγινε καλά ύστερα από προσευχή στους αγίους, πιθανότατα υποδηλώνει ΣκΠ. Ωστόσο, η πρώτη αναγνωρισμένη περίπτωση [402] ατόμου με ΣκΠ είναι αυτή της ολλανδής μοναχής, Αγίας Lidwina του Schiedam (1380–1433). Η νόσος ξεκίνησε σε ηλικία 16 ετών ενώ ήταν απολύτως υγιής ως τότε, έπειτα από πτώση στον πάγο καθώς έκανε πατινάζ. Έκτοτε υπέφερε από περιστασιακούς πόνους, αδυναμία στα κάτω άκρα και απώλεια της όρασης. Μετά από μερικά χρόνια, ο βαθμός της αναπηρίας αυξήθηκε και η φθίνουσα πορεία της υγείας της οδήγησε τελικά στον θάνατο της, 34 χρόνια αργότερα, σε ηλικία 53 ετών. Το κλινικό ιστορικό της ανταποκρινόταν εντυπωσιακά στο ιστορικό των σημερινών κλινικών κριτηρίων για τη ΣκΠ.

Ο Αύγουστος Φρειδερίκος ντ' Έστε (1794–1848) [403, 404], γιός του πρίγκιπα Αυγούστου Φρειδερίκου, δούκα του Σάσεξ και της λαίδης Αυγούστα Μάρει, εγγονός του βασιλιά Γεωργίου Γ' του Ηνωμένου Βασιλείου, είναι σχεδόν βέβαιο ότι έπασχε από πολλαπλή σκλήρυνση, όπως έγινε γνωστό μέσω του προσωπικού ημερολογίου που διατηρούσε και στο οποίο καταγράφει λεπτομερώς τα 22 χρόνια συνύπαρξής του με την ασθένεια. Τα συμπτώματά του ξεκινούν να εμφανίζονται σε ηλικία 28 ετών με παροδική απώλεια όρασης (πιθανόν αμφοτερόπλευρη οπτική νευρίτιδα), η οποία εμφανίστηκε ξαφνικά μετά από την κηδεία ενός φίλου. Κατά την εξέλιξη της νόσου του, ο ντ' Έστε ανέπτυξε αδυναμία των κάτω άκρων, αταξία των χεριών, απώλεια της αίσθησης αφής, ιλίγγους, διαταραχές της ουροδόχου κύστης, στυτική δυσλειτουργία και άλλα χαρακτηριστικά της ΣκΠ, έως την προοδευτική παράλυση του και το θάνατο του ύστερα από 26 χρόνια συμβίωσης με την άγνωστη ως τότε ασθένεια του [403, 405]. Μια ακόμη πρώιμη μαρτυρία πολλαπλής σκλήρυνσης

διασώζεται από τον βρετανό χρονικογράφο Μπρους Φρέντερικ Κάμινγκς (1889–1919), γνωστός με το ψευδώνυμο Β. Ν. Π. Μπαρμπέλιον, ο οποίος τηρούσε λεπτομερές ιστορικό της διάγνωσης και της πάλης του με την ασθένεια [405]. Το ημερολόγιό του δημοσιεύτηκε το 1919 με τον τίτλο *The Journal of a Disappointed Man* (Το ημερολόγιο ενός απογοητευμένου) [406].



Dr. Jean-Martin Charcot

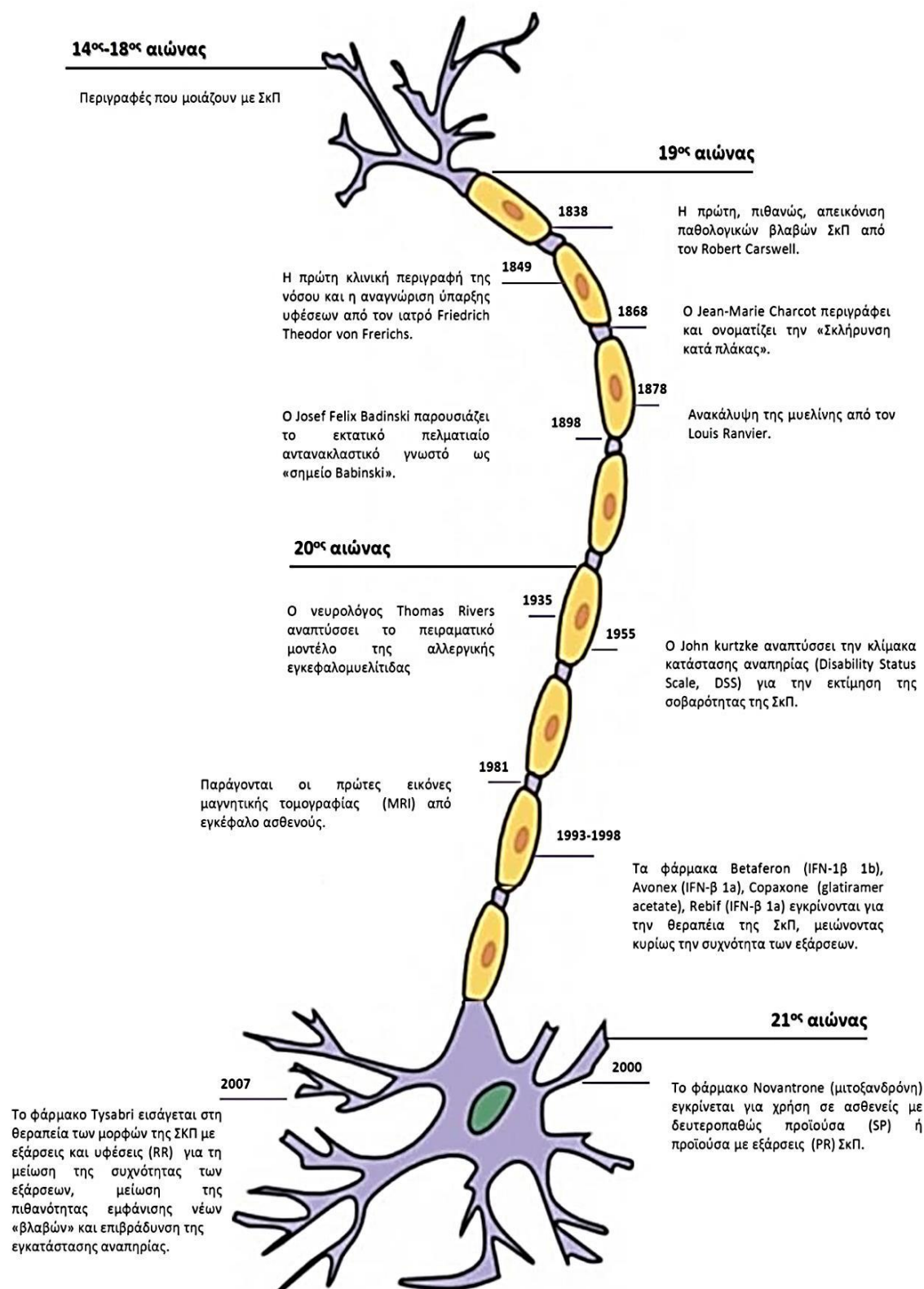
Εικόνα 17: Ο Ζαν-Μαρτέν Σαρκό (29 Νοεμβρίου 1825-16 Αυγούστου 1893), γάλλος νευρολόγος και καθηγητής ανατομικής παθολογίας, ήταν ο πρώτος που περιέγραψε την πολλαπλή σκλήρυνση.

Ο Jean Cruveilhier (1791–1873), ένας Γάλλος καθηγητής της παθολογικής ανατομίας και ο Robert Carswell (1793–1857), ένας Βρετανός καθηγητής της παθολογίας, περιέγραψαν το 1835 την παθολογική εικόνα της ΣΚΠ ως «νήσοι φαιάς εκφύλισης ή μετασχηματισμού διάσπαρτων απομυελινωτικών εστιών στο μυελό των οστών, το εγκεφαλικό στέλεχος, την παρεγκεφαλίδα και μερικές φορές τον εγκέφαλο» [407, 408]. Αργότερα, το 1863, Ο Ελβετός παθολόγος Georg Eduard Rindfleisch (1836-1908) ανέφερε ότι η μικροσκοπική ανάλυση δείχνει φλεγμονές που σχετίζονται με βλάβες, διάσπαρτες γύρω από τα αιμοφόρα αγγεία [409, 410].

Μόλις το 1868 ο Γάλλος νευρολόγος, Jean-Martin Charcot (1825–1893), συνοψίζοντας προηγούμενες εκθέσεις και προσθέτοντας τις δικές του κλινικές και παθολογικές παρατηρήσεις αναγνώρισε την νόσο ως ξεχωριστή ασθένεια δίνοντας της το όνομα «σκλήρυνση κατά πλάκας» («la sclérose en plaques») [407, 411, 412].

Συγκεκριμένα, ο Charcot έκανε την διάκριση μεταξύ της τρομώδους παράλυσης (αργότερα ονομάστηκε νόσος του Parkinson) κα της σκλήρυνσης κατά πλάκας. Τα τρία κλινικά σημάδια της ΠΣ, γνωστά ως τριάδα του Charcot, είναι νυσταγμός, τρέμουλο και τηλεγραφικός λόγος (βιαστικός λόγος), αν και αυτά τα σημάδια δεν εμφανίζονται αποκλειστικά στην ΠΣ. Ο Charcot παρατήρησε επίσης αλλαγές στην γνωστική λειτουργία, περιγράφοντας τους ασθενείς του ως άτομα με «σημαντική εξασθένηση της μνήμης» και «αντιλήψεις που σχηματίζονται με αργό ρυθμό» [412, 413]. Η κλινικό-παθολογική περιγραφή του Charcot για την ΣΚΠ κρίθηκε ότι ήταν τόσο σαφής και ακριβής που, 20 χρόνια αργότερα, ο Gowers δήλωσε ότι «ελάχιστα μπορούν να προστεθούν στην περιγραφή που έδωσε ο Charcot» [414]. Με πρωτοπόρο λοιπόν τον Charcot, στα τέλη του 19^{ου} αιώνα, η νόσος αρχίζει να αναγνωρίζεται όλο και περισσότερο και να αντιμετωπίζεται ως ξεχωριστή ασθένεια. Το 1873, αναγνωρίστηκε η πάθηση στην Αγγλία από τον Dr. Moxon, όταν δημοσίευσε τις περιπτώσεις οκτώ ασθενών από νόσο που την ονόμασε «νησιδική σκλήρυνση» (insular sclerosis) και το 1878 στις Ηνωμένες πολιτείες ο Dr. Edward Seguin που δημοσίευσε άρθρο σχετικό με τη νόσο. Την ίδια χρονιά ο Dr. Ranvier στη Γαλλία ανακάλυψε την μυελίνη. Στην πορεία, αρκετοί σημαντικοί άνθρωποι του χώρου, μεταξύ των οποίων Russell Walter Brain (1895-1966) και ο James Walker Dawson (1870-1927), παρήγαγαν έργο ερευνητικό, κλινικό και συγγραφικό και συνέβαλαν στο να γίνει η νόσος περισσότερο κατανοητή.

Τέλος, το 1935, ο Dr. Thomas Rivers στο Ινστιτούτο Rockefeller της Νέας Υόρκης, χορηγώντας μυελίνη σε πειραματόζωα προήγαγε το ανοσοποιητικό τους σύστημα να επιτεθεί στη δική τους μυελίνη, προκαλώντας μια νόσο παρόμοια με την ΣΚΠ. Αυτό το πειραματικό μοντέλο, ονομάστηκε «αλλεργική εγκεφαλομυελίτιδα» (experimental allergic encephalomyelitis, EAE) και αργότερα αποτέλεσε σημαντικό σταθμό στη μελέτη της νόσου [415], στην κατανόηση της παθογένειας και στην προσπάθεια θεραπείας της.



Εικόνα 18: Σημαντικά χρονολογικά ορόσημα στην ιστορία της Σκλήρυνσης κατά πλάκας ή Πολλαπλής σκλήρυνσης.

2.4.2.Επιδημιολογία

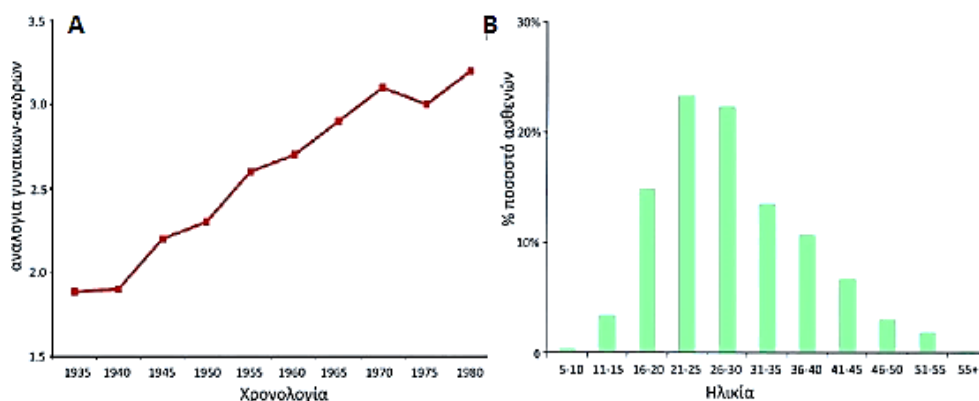
Η επιδημιολογία είναι η επιστήμη που ασχολείται με τη κατανομή και την εξέλιξη διαφόρων ασθενειών που εμφανίζονται στον ανθρώπινο πληθυσμό και την συσχέτιση τους με άλλους παράγοντες, γεωγραφικούς, δημογραφικούς ή γενετικούς με σκοπό την διερεύνηση της αιτιοπαθογένειας της νόσου. Οι επιδημιολογικές μελέτες είναι πρόκληση για διάφορους λόγους και συγκεκριμένα στην περίπτωση της ΣκΠ δυσχεραίνονται σημαντικά λόγω διαγνωστικών περιορισμών. Για την ΣκΠ δεν υπάρχει ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο διαγνωστικό τεστ, με αποτέλεσμα η διάγνωση να καθυστερήσει ή να μην είναι σωστή ή ακόμα και να χαθεί. Επιπλέον, τα δεδομένα από παλαιότερες επιδημιολογικές μελέτες ενδέχεται να μην αντιπροσωπεύουν με ακρίβεια τον τρέχοντα αριθμό ατόμων με σκλήρυνση κατά πλάκας, λόγω διαφορετικών μεθόδων που χρησιμοποιούνταν για τον εντοπισμό και την καταμέτρηση ατόμων, καθώς και διαφορετικές στρατηγικές για την ανάλυση των δεδομένων τους. Τέλος, για κάθε νόσο είναι χρήσιμο να υπάρχει μια κεντρική βάση δεδομένων η οποία να ενημερώνεται από τους ιατρούς όταν διαγιγνώσκεται σε κάποιο ασθενή. Για την ΣκΠ δεν υπάρχει αυτό το είδος κεντρικού συστήματος αναφοράς ώστε με εύκολο τρόπο να είναι δυνατή η καταμέτρηση των ατόμων που πάσχουν και η περαιτέρω ανάλυση δεδομένων.

Η επίπτωση και ο επιπολασμός μιας νόσου είναι βασικοί δείκτες από τους οποίους μπορεί να γίνει εξαγωγή χρήσιμων συμπερασμάτων για την ασθένεια και στις οποίες επικεντρώνονται οι περισσότερες επιδημιολογικές μελέτες. Ως επίπτωση ορίζεται η συχνότητα εμφάνισης μιας νόσου δηλαδή είναι ο αριθμός των νέων περιπτώσεων που συμβαίνουν σε μια δεδομένη χρονική περίοδο (συνήθως ένα χρόνο) σε ένα δεδομένο πληθυσμό (συνήθως 100.000). Επομένως, η επίπτωση είναι μέτρο κινδύνου για την ανάπτυξη της νόσου. Αντίθετα, ο επιπολασμός δεν αποτελεί μέτρο κινδύνου, παρά αντικατοπτρίζει τον αριθμό των περιστατικών που ήδη υπάρχουν στον πληθυσμό μια δεδομένη χρονική στιγμή. Οι περισσότερες επιδημιολογικές μελέτες που αφορούν την ΣκΠ, επικεντρώνονται στον επιπολασμό.

Η σκλήρυνση κατά πλάκας είναι η πιο συχνή αιτία νευρολογικής διαταραχής στην νεαρή και μέση ενήλικη ζωή και πιστεύεται ότι προσβάλλει περισσότερα από 2,3 εκατομμύρια ανθρώπους (περίπου 30 περιστατικά ανά 100.000) παγκοσμίως [416-418]. Η νόσος έχει μέση επίπτωση περίπου 7/100.000 πληθυσμού, μέσο

επιπολασμό περίπου 120/100.000 πληθυσμού και κίνδυνο εμφάνισης της νόσου σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή της ζωής ενός ανθρώπου, 1/400 ανθρώπους [392]. Τα ποσοστά της ΣκΠ φαίνεται να αυξάνονται, ωστόσο αυτό μπορεί να αποδοθεί στην καλύτερη κατανόηση της νόσου, την πρόσβαση στην ιατρική περίθαλψη και την βελτίωση των διαγνωστικών μεθόδων [416]. Εκτιμάται ότι οι συνολικοί αριθμοί ασθενών με σκλήρυνση κατά πλάκας θα αυξηθούν γύρω στις 35 χιλιάδες μέχρι το 2022, χωρίς ωστόσο να υπάρχει κάποια συγκεκριμένη αιτία που να οδηγήσει σε ασφαλές συμπέρασμα. Ενώ η ασθένεια δεν είναι μεταδοτική ή άμεσα κληρονομήσιμη, οι επιδημιολόγοι έχουν εντοπίσει ορισμένους παράγοντες που συσχετίζονται με την εμφάνιση και κατανομή της σκλήρυνσης κατά πλάκας σε όλο τον κόσμο. Αυτοί οι παράγοντες περιλαμβάνουν το φύλο, την γενετική προδιάθεση, την ηλικία, τη γεωγραφία και την εθνική προέλευση. Τέτοιες μελέτες που πραγματοποιούνται για τα πληθυσμιακά και γεωγραφικά μοτίβα της ασθένειας [419] μπορούν τελικά να οδηγήσουν σε θεωρίες σχετικά με τα αίτια εμφάνισης της [399, 401].

Η ΣκΠ εκδηλώνεται συνήθως σε ενήλικες στο τέλος της δεύτερης ή στην αρχή της τρίτης δεκαετίας της ζωής τους, σε σπάνιες όμως περιπτώσεις μπορεί να εκδηλωθεί στην παιδική ηλικία και μετά την ηλικία των 50 ετών [416, 417]. Όπως τα περισσότερα αυτοάνοσα νοσήματα, η συχνότητα της νόσου εμφανίζει υπεροχή στο γυναικείο φύλο 3,6/100.000 άτομα-έτη στις γυναίκες, έναντι 2,0/100.000 ατόμων-έτη στους άνδρες [391, 420-422], με μελέτες να δείχνουν την αυξητική τάση της νόσου στο γυναικείο πληθυσμό [423, 424]. Στα παιδιά εκδηλώνεται ακόμα πιο συχνά στα κορίτσια από ότι στα αγόρια [391], ενώ σε άτομα άνω των 50 ετών, είναι σχεδόν ισοδύναμη μεταξύ αντρών και γυναικών [425]. Εντούτοις, μελέτες ανάλυσης του γονιδιώματος δεν έδειξαν πιθανή συσχέτιση γονιδίων, που ενοχοποιούνται για την εμφάνιση ΣκΠ, με το χρωμόσωμα Χ [426]. Κατά συνέπεια, η αυξημένη συχνότητα της ΣκΠ στο γυναικείο φύλο ενδέχεται να σχετίζεται με φυσιολογικούς παράγοντες που απαντούν στο γυναικείο φύλο, πιθανώς ορμονο-εξαρτώμενους [427, 428] ή υποδηλώνει μεγαλύτερη ευαισθησία των γυναικών σε περιβαλλοντικούς παράγοντες κινδύνου [422, 424].



Εικόνα 19: (Α) Αναλογία γυναικών/ ανδρών με σκλήρυνση κατά πλάκας ανά έτος γέννησης, διάρκειας 50 ετών (n=27074) (Β) Κατανομή της ηλικίας εμφάνισης των συμπτωμάτων της ΣΚΠ. [424, 429].

Οι επιδημιολογικές μελέτες της ΣΚΠ φανερώνουν μια ιδιάζουσα γεωγραφική κατανομή κατά την οποία η συχνότητά της πάθησης αυξάνεται με την αύξηση του γεωγραφικού πλάτους, είναι συχνότερη σε περιοχές μακρύτερα από τον ισημερινό, οδηγώντας πολλούς να τη χαρακτηρίσουν ως νόσο των εύκρατων βορείων κλιμάτων. Η παραδοσιακή άποψη, στηριζόμενη σε αρχικές μελέτες, υποστηρίζει ότι η ΣΚΠ είναι συχνή σε περιοχές κατοικημένες από άτομα της λευκής φυλής βόρειας προέλευσης, με εύκρατο κλίμα και υψηλό κοινωνικο-οικονομικό επίπεδο. Αντιθέτως, η ΠΣ είναι λιγότερο συχνή σε περιοχές κατοικημένες από φυλές πέραν της λευκής, σε τροπικές περιοχές και σε περιοχές με χαμηλό επίπεδο διαβίωσης [430, 431]. Επίσης, υφίσταται σαφής επιβάρυνση της λευκής φυλής, με τις υπόλοιπες φυλές να μοιράζονται τα χαρακτηριστικά της γεωγραφικής κατανομής που αναφέρθηκε, αλλά σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με τη λευκή φυλή. Ωστόσο, τα ποσοστά επικράτησης μπορεί να διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των ομάδων που ζουν στην ίδια γεωγραφική περιοχή ανεξάρτητα από την απόσταση από τον ισημερινό. Παράδειγμα αποτελούν μερικοί πληθυσμοί (Inuit, Yakutes, Hutterites, Ουγγρικά Ρόμα, Νορβηγικά Lapps, Αυστραλοί Αβορίγες και Νέα Ζηλανδία), στους οποίους η ΣΚ είναι σχεδόν ανύπαρκτη, παρά το γεωγραφικό πλάτος στο οποίο ζουν. Επομένως, η εθνότητα και η γεωγραφία αποτελούν ανεξάρτητους παράγοντες κινδύνου για τη νόσο και αλληλεπιδρούν με έναν πολύπλοκο τρόπο επηρεάζοντας τα ποσοστά επικράτησης σε διάφορα μέρη του κόσμου [432].

Η ΣκΠ κατανέμεται ανά την υφήλιο, με κριτήριο τον επιπολασμό, σε τρεις ζώνες συχνότητας: υψηλής, μέσης και χαμηλής [433, 434]. Στην ζώνη υψηλού κινδύνου (>30/100.000 κατοίκους) περιλαμβάνονται περιοχές όπως το βόρειο και μέσο τμήμα της Ευρώπης[416], Ισραήλ, Καναδάς, Νέα Ζηλανδία, Σικελία, νότιες και ανατολικές περιοχές της Αυστραλίας, ανατολικές περιοχές της Ρωσίας και το βόρειο τμήμα των Η.Π.Α. Στην ζώνη μέσου κινδύνου (5-29/100.000 κατοίκους) περιλαμβάνεται η Αμερική με 8,3 κρούσματα ανά 100.000 άτομα και στην ζώνη χαμηλής επικινδυνότητας (<5/100.000 άτομα κατοίκους) ανήκουν η Αφρική με ποσοστό μικρότερο από 0,5 κρούσματα ανά 100.000 άτομα και η Νοτιοανατολική Ασία όπου ανέρχεται σε 2,8 κρούσματα ανά 100.000 άτομα. Οι μεσογειακές χώρες παρουσιάζουν έναν ενδιάμεσο κίνδυνο ανάπτυξης ΣκΠ (5-30 ανά 100.000 κατοίκους) [435]. Στον ελληνικό πληθυσμό ο επιπολασμός της νόσου κυμαίνεται από 10-29, ανά 100.000 κατοίκους [435]. Ωστόσο, νεότερες μελέτες που διενεργήθηκαν στη νότια Ελλάδα δείχνουν σημαντικά υψηλότερο επιπολασμό της νόσου της τάξης των 100-120 περιστατικών/100.000 κατοίκους [436]. Η βόρεια Ελλάδα ανήκει στη ζώνη μέσης συχνότητας κατά Kurtzke, με επιπολασμό ΠΣ 29.5/100.000 κατοίκους [435], ενώ η περιοχή του Έβρου θεωρείται ως ζώνη υψηλής συχνότητας με επιπολασμό 38.9/100.000 [437]. Η δυτική Ελλάδα επίσης ανήκει σε ζώνη υψηλού κινδύνου με αναφερόμενο επιπολασμό έως 119.64/100.000. Ο αριθμός των νέων περιστατικών που αναπτύσσονται ετησίως είναι περίπου 2,5 περιστατικά ανά 100.000 άτομα [417].

Η διακύμανση που παρατηρείται στις τιμές επιπολασμού της νόσου δεν έχει σαφή αίτια, δεδομένα από μελέτες ωστόσο αναδεικνύουν ότι η μετάβαση από μια γεωγραφική περιοχή στην άλλη φαίνεται να μεταβάλλει τον κίνδυνο ενός ατόμου να αναπτύξει σκλήρυνση κατά πλάκας. Μελέτες δείχνουν ότι οι μετανάστες και οι απόγονοί τους τείνουν να παίρνουν το επίπεδο κινδύνου (είτε υψηλότερο είτε κατώτερο) της περιοχής στην οποία κινούνται. Ωστόσο, η αλλαγή του κινδύνου ενδέχεται να μην εμφανιστεί αμέσως. Μελέτες δείχνουν ότι η ηλικία κατά την οποία λαμβάνει χώρα η μετανάστευση είναι καθοριστική για τη διατήρηση του κινδύνου: όσοι μεταναστεύουν σε ηλικία μεγαλύτερη των 15 ετών διατηρούν τον κίνδυνο εμφάνισης νόσου που είχαν στον τόπο γέννησης, ενώ όταν η ηλικία μετανάστευσης είναι μικρότερη των 15 ετών, το άτομο διατρέχει τον κίνδυνο της χώρας στην οποία

μετανάστευση/ κατοικεί [438, 439]. Τα δεδομένα αυτά υπογραμμίζουν τη σύνθετη σχέση μεταξύ περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων στην ανάπτυξη ΣκΠ και επιπλέον υποστηρίζουν ότι η ΣκΠ προκαλείται πιθανότατα από πρόωρη έκθεση σε κάποια περιβαλλοντική αιτία σε γενετικά ευαίσθητα άτομα, ενώ μεσολαβεί μια μακρά λανθάνουσα περίοδο επώασης μεταξύ έναρξης νόσου και συμπτωμάτων, με τα παιδιά να είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά στη νόσο [440, 441].



Εικόνα 20: Παγκόσμια κατανομή σκλήρυνσης κατά πλάκας: μεγαλύτερη επικράτηση σε υψηλότερα βόρεια και νότια γεωγραφικά πλάτη.

2.4.3. Παθοφυσιολογία

Μια Τ-λεμφοκυτταρικού τύπου ανοσοαντίδραση έναντι πρωτεϊνών του ΚΝΣ αποτελεί την βάση του παθογενετικού μηχανισμού της ΣκΠ. Τα «αυτοαντιδραστικά» $CD4^+$ και $CD8^+$ Τ-λεμφοκύτταρα, επιτίθενται στην μυελίνη των ολιγοδενδροκυττάρων και σταδιακά την καταστρέφουν, με αποτέλεσμα την εμφάνιση των χαρακτηριστικών απομυελινωτικών πλακών.

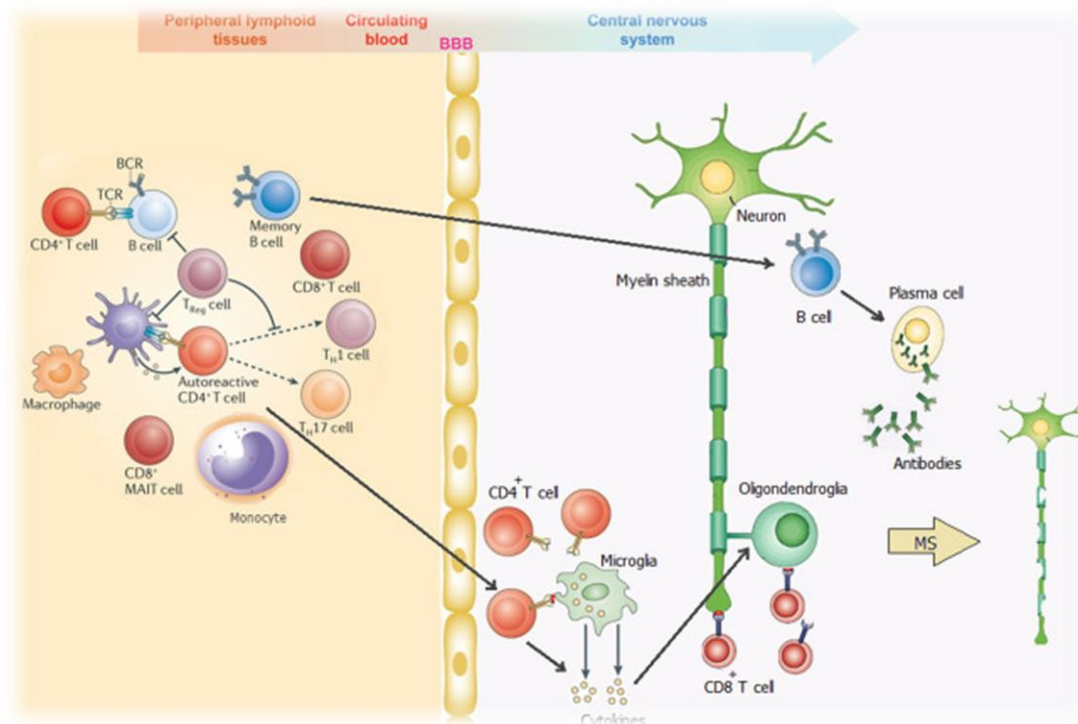
Τα ενεργοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα τα οποία έχουν μεταναστεύσει μέσω της κυκλοφορίας στο ΚΝΣ, διαφοροποιούνται σε Th1, Th2 και Th17. Η διαφοροποίηση προς Th1 λεμφοκύτταρα ρυθμίζεται από την ιντερλευκίνη 12 (IL-12) μέσω της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα T-bet. Τα Th1 εμπλέκονται στην αυτοανοσία και παθογένεια της ΣκΠ, εκκρίνοντας προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως INF- γ , TNF- α και ιντερλευκίνες (IL-12, IL-15, IL-17, IL-23) [442] και επάγοντας την έκφραση υποδοχέων χυμοκινών (CCR5 και CXCR3). Η ιντερλευκίνη-4 (IL-4) οδηγεί προς Th2 διαφοροποίηση με έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα GATA-3 [443]. Τα Th2, έχουν προστατευτικό ρόλο στην ΣκΠ, παράγοντας αντι-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες: IL-4, IL-5, IL-10 [444]. Επιπλέον, τα Th17 κύτταρα φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της ΣκΠ [445]. Τα Th17 παράγουν την ιντερλευκίνη 17 η οποία προάγει την φλεγμονή μέσω διατάραξης του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και ενισχύοντας τη μετανάστευση $CD4^+$ Τ-κυττάρων μέσω του ενδοθηλίου [446]. Η Th17 διαφοροποίηση των $CD4^+$ Τ-κυττάρων επάγεται από τον TGF- β και την ιντερλευκίνη-6, αντίθετα με την ιντερλευκίνη-4 και την ιντερφερόνη- β οι οποίες καταστέλλουν την παραγωγή ιντερλευκίνης-17 [447]. Η ιντερλευκίνη-23 φαίνεται να παίζει ρόλο στην διατήρηση του υποπληθυσμού αυτού. Τα Th1 λεμφοκύτταρα ενεργοποιούνται περαιτέρω από αντιγόνα της επιφάνειας αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (ΑΠΚ) όπως για παράδειγμα μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης II (MHC). Παράλληλα, πυροδοτείται ένας καταρράκτης γεγονότων μέσω της παραγωγής προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών η οποία οδηγεί στην ενεργοποίηση και μετανάστευση στο ΚΝΣ των περιφερικών μονοπύρηνων [448], καθώς και την ενεργοποίηση των μικρογλοιακών/μακροφάγων, με τελικό αποτέλεσμα την καταστροφή της μυελίνης [449-452]. Τα Τ-κύτταρα και μονοκύτταρα εισχωρούν στον εγκέφαλο μέσω του ενδοθηλίου των τριχοειδών αγγείων, διαταράσσοντας το φράγμα αίματος-

εγκεφάλου [453]. Η καταστροφή του ΑΕΦ πυροδοτεί περαιτέρω την φλεγμονώδη αντίδραση, την ενεργοποίηση των μακροφάγων και την παραγωγή κυτοκινών [392, 454, 455].

Τέλος, τα Β-κύτταρα διαδραματίζουν και αυτά σημαντικό ρόλο στην παθογένεια και εξέλιξη της νόσου, μαζί με άλλα αντισώματα και παράγοντες του συμπληρώματος εισβάλλουν στο ΚΝΣ, διαπερνώντας τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό ο οποίος έχει διαταραχθεί. Στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ΕΝΥ) ασθενών με ΣκΠ, παρατηρείται αυξημένη σύνθεση ολιγοκλωνικών ανοσοσφαιρινών IgM και IgG, απόδειξη ύπαρξης ενεργοποιημένων κλώνων Β-λεμφοκυττάρων στο ΕΝΥ, τα οποία παράγουν αντισώματα έναντι αντιγόνων μυελίνης [456].

Χαρακτηριστικό της ΣκΠ αποτελεί η απομυελίνωση ως αποτέλεσμα της καταστροφής των ολιγοδενδροκυττάρων. Η παρουσία προϊόντων αποικοδόμησης της μυελίνης εντός του κυτταροπλάσματος των μακροφάγων και η έκφραση πρώιμων δεικτών ενεργοποίησης των μακροφάγων/μικρογλοίας αποτελούν ισχυρές ενδείξεις για την απομυελίνωση εντός της αλλοίωσης [457]. Η καταστροφή των ολιγοδενδροκυττάρων μπορεί να είναι είτε αποτέλεσμα αποπτωτικής διαδικασίας μέσω σηματοδότησης Fas-Fas προσδέτη, είτε βλάβης που προκαλείται από προϊόντα των Τ-λεμφοκυττάρων, των ενεργοποιημένων μακροφάγων (κυτταροκίνες, ρίζες ενεργού οξυγόνου και NO), από συστατικά του ορού (αντισώματα και συστατικά του συμπληρώματος) ή από ιϊκή μόλυνση.

Η αποκατάσταση της βλάβης πραγματοποιείται μέσω της διαδικασίας της επαναμυελίνωσης, η οποία έχει στόχο την προστασία των νευραξόνων και την επαναφορά της ηλεκτρικής αγωγιμότητας. Οι περιοχές επαναμυελίνωσης μπορούν να γίνουν στόχος για νέες επιθέσεις απομυελίνωσης [458]. Κλινικά, η επαγωγή της επαναμυελίνωσης μπορεί να έχει σημαντικές επιπτώσεις στη βελτίωση της κινητικής δυσλειτουργίας που παρατηρείται στους σκληρυντικούς ασθενείς.



Εικόνα 21: Μηχανισμός ΣκΠ. Στην ΣκΠ, δύο στάδια είναι απαραίτητα για την επαγωγή ανοσοαπόκρισης στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ): βλάβη της μυελίνης και φλεγμονή. Απομυελινωτικές αλλοιώσεις στη λευκή ουσία συνοδεύονται από διήθηση μονοπύρηνων φαγοκυττάρων, Β λεμφοκυττάρων, κυττάρων πλάσματος, δενδριτικών κυττάρων, κυττάρων CD8 +, διαφοροποιημένα CD4 + Τ βοηθητικά 1 (TH1) και TH17 κύτταρα στο ΚΝΣ. Μετά την κλωνική επέκταση, τα Β κύτταρα ωριμάζουν στο πλάσμα και απελευθερώνουν μεγάλες ποσότητες αντισωμάτων. Επανεργοποίηση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών. Αυτές οι κυτοκίνες προσελκύουν άλλα ανοσοκύτταρα, όπως τα μακροφάγα, τα οποία απελευθερώνουν τους βλαβερές ανοσοδιαμεσολαβητές και κατευθύνουν φαγοκυτταρική επίθεση στη μυελίνη.

2.4.4.Κλινική εικόνα (Συμπτωματολογία)

Η ΣΚΠ μπορεί να εκδηλωθεί με πλήθος διαφορετικών συμπτωμάτων ανάλογα με το σημείο προσβολής του ΚΝΣ και το βαθμό απομυελίνωσης, γεγονός που εξηγεί την μεγάλη ετερογένεια της κλινικής εικόνας μεταξύ ασθενών. Ωστόσο, η προσβολή ορισμένων περιοχών, όπως τα οπτικά νεύρα, το εγκεφαλικό στέλεχος, η παρεγκεφαλίδα και ο νωτιαίος μυελός (ιδιαίτερα προσβολή των πυραμιδικών και αισθητικών δεματίων), είναι συχνότερη με αποτέλεσμα οπτικά κινητικά και αισθητηριακά προβλήματα να είναι τα πιο συνηθισμένα. Συμπτώματα λόγω βλάβης στους κρανιακούς πυρήνες, τον εγκεφαλικό κλοιό ή τα βασικά γάγγλια είναι σπάνια.

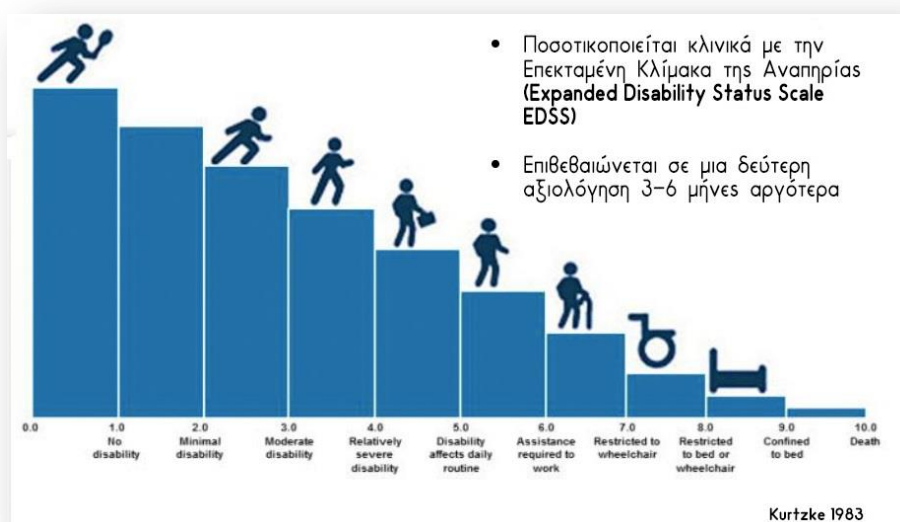
Ένα άτομο με ΣΚΠ μπορεί να εμφανίζει προβλήματα στην όραση (διπλωπία, οπτική νευρίτιδα, νυσταγμός), διαταραχές αισθητικότητας (απώλεια της αίσθησης ή παραισθήσεις όπως τσούξιμο, καρφίτσες, βελόνες ή μούδιασμα), προβλήματα στην ομιλία (δυσαρθρία) ή στην κατάποση (δυσφαγία), προβλήματα στην βάδιση ή στην ισορροπία (ίλιγγος, αταξία, πάρεση-παραπέραση, αυξημένα τενόντια αντανakλαστικά, μυϊκοί σπασμοί, σπαστικότητα, τρόμο/τρέμουλο), [459]. Διαταραχές της ουροδόχου κύστης, προβλήματα εντέρου, όπως και στυτικές δυσλειτουργίες παρατηρούνται επίσης σε ασθενείς με ΣΚΠ.

Συχνά, τα συμπτώματα της σκλήρυνσης κατά πλάκας συνδυάζονται με μυϊκή αδυναμία και αίσθημα κόπωσης. Πρόκειται για αίσθημα απώλειας της φυσικής ή και ψυχικής ενεργητικότητας με παράλληλη εξάντληση και εξουθένωση. Πιθανότατα η εκδήλωση της σχετίζεται με μειωμένο εγκεφαλικό μεταβολισμό, την αϋπνία από την οποία υποφέρουν πολλοί ασθενείς, τον πόνο ή ακόμα και την φαρμακευτική αγωγή που λαμβάνουν. Ο πόνος, είναι επίσης συχνό παράπονο των ασθενών, είτε πρόκειται για νευραλγία τριδύμου, ριζιτικό πόνο ή κάποια άλλη παροξυσμική εκδήλωση της νόσου, όπως οι επώδυνες τονικές κρίσεις, είτε για δυσαισθησίες ή δυσαισθητικούς μη παροξυσμικούς πόνους. Η νόσος επίσης δύναται να συνοδεύεται με δυσκολίες στην σκέψη και συναισθηματικά προβλήματα όπως η κατάθλιψη ή η ευμετάβλητη διάθεση. Το φαινόμενο Uhthoff, μια κλασική τάση των ασθενών με ΣΚΠ, όπου η αύξηση της θερμοκρασίας (εσωτερικά ή εξωτερικά) προκαλεί επιδείνωση των συμπτωμάτων με αποτέλεσμα το άτομο να αισθανθεί πολύ χειρότερα και η ένδειξη του Lhermitte, μια αίσθηση

ηλεκτρισμού που διατρέχει την πλάτη και τα άκρα κατά την κάμψη του αυχένα, είναι ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της ΣκΠ.

Τα διάφορα συμπτώματα που προαναφέρθηκαν μπορούν να εμφανίζονται συνδυαστικά διαμορφώνοντας την κλινική εικόνα της ΣκΠ ή μεμονωμένα. Συνήθως αυτά τα συμπτώματα είναι παροδικά και ήπια και δεν παρακινούν κάποιον να αναζητήσει ιατρική βοήθεια ή μπορεί να ερμηνευθούν ως έναρξη οποιασδήποτε πάθησης. Τα συνηθέστερα αρχικά συμπτώματα είναι: αλλαγές στην αίσθηση των χεριών, ποδιών ή του προσώπου (33%), ολική ή μερική απώλεια της όρασης (16%), αδυναμία (13%), διπλωπία (7%), αταξία στο περπάτημα (5%) και προβλήματα ισορροπίας (3%), αλλά έχουν αναφερθεί και σπάνια αρχικά συμπτώματα όπως αφασία και ψύχωση. Το 15% των ανθρώπων έχουν πολλαπλά συμπτώματα όταν αναζητούν ιατρική βοήθεια [460].

Η κύρια μέτρηση της αναπηρίας και της σοβαρότητας είναι η διευρυμένη κλίμακα κατάστασης αναπηρίας (EDSS), με άλλες μετρήσεις όπως το λειτουργικό σύνθετο της πολλαπλής σκλήρυνσης να χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο στην έρευνα.

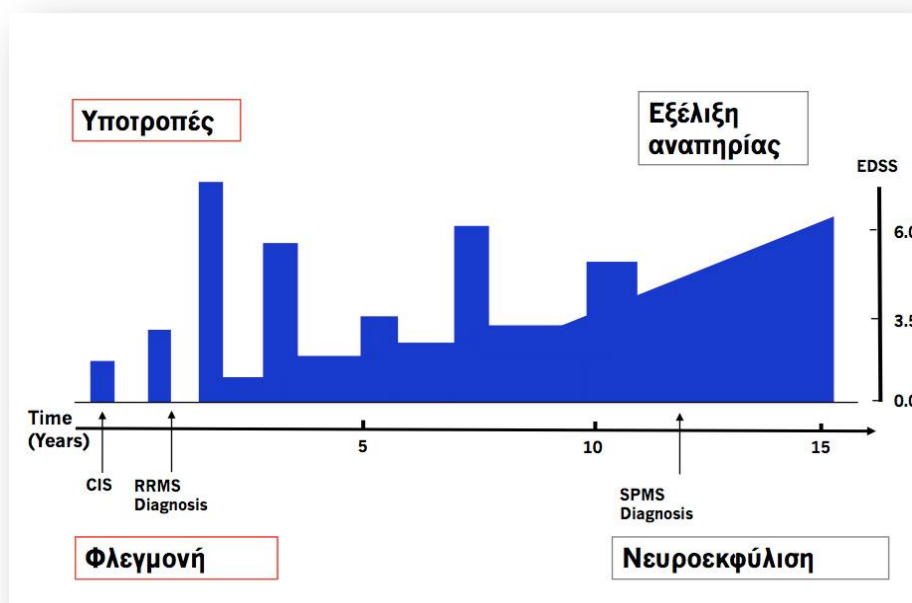


Εικόνα 22: Η διευρυμένη κλίμακα κατάστασης αναπηρίας (EDSS) για την μέτρηση της αναπηρίας και της σοβαρότητας της ΣκΠ.

2.4.5. Πορεία της νόσου-Μορφές

Η μονήρης και μονοσυμπτωματική προσβολή του ΚΝΣ κλινικά συμβατή με ΣκΠ αποτελεί το κλινικά «μεμονωμένο σύνδρομο», το πρώτο επεισόδιο νευρολογικών συμπτωμάτων που προκαλείται από φλεγμονή και απομυελίνωση του κεντρικού νευρικού συστήματος. Η έννοια του «κλινικά απομονωμένου συνδρόμου» -clinically isolated syndrome (CIS) παρουσιάστηκε την τελευταία εικοσαετία στις αγγλοσαξονικές χώρες κατά την προσπάθεια καταχώρησης και αξιολόγησης των διάφορων κλινικών συνδρόμων της σκλήρυνσης κατά πλάκας. Αυτός ο όρος χρησιμοποιείται, όταν παρουσιάζεται μία κλινική εκδήλωση του φάσματος της σκλήρυνσης κατά πλάκας για χρονικό διάστημα πέραν του εικοσιτετραώρου. Σ' αυτές τις περιπτώσεις το χαρακτηριστικό είναι ότι όταν το σύμπτωμα π.χ. μία οπτική νευρίτιδα ή μία επιληπτική κρίση με τη μορφή της μονοπάρεσης εξαφανίζεται, τότε το μόνο που απομένει είναι τυχόν παθολογικά ευρήματα όπως χαρακτηριστικές απομυελινώσεις, ύστερα από εξειδικευμένες εξετάσεις όπως είναι τα προκλητά δυναμικά ή η μαγνητική τομογραφία. Τα θετικά ευρήματα στην MRI θα καθορίσουν και την πιθανότητα μετάπτωσης σε κλινικά βεβαία ΣκΠ. Όταν το CIS συνοδεύεται από βλάβες σε μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου (MRI) που είναι παρόμοιες με εκείνες που παρατηρούνται στην ΣκΠ, το άτομο έχει υψηλή πιθανότητα για ένα δεύτερο επεισόδιο νευρολογικών συμπτωμάτων και διάγνωση υποτροπιάζουσας-διαλείπουσας ΣκΠ. Όταν το CIS δεν συνοδεύεται από βλάβες τύπου MS σε εγκεφαλική μαγνητική τομογραφία, το άτομο έχει πολύ χαμηλότερη πιθανότητα ανάπτυξης ΣκΠ. Τα διαγνωστικά κριτήρια για τη σκλήρυνση κατά πλάκας καθιστούν δυνατή τη διάγνωση της ΣΚ σε άτομο με CIS που έχει επίσης συγκεκριμένα ευρήματα στη μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου που παρέχουν ενδείξεις προηγούμενου επεισοδίου βλάβης σε διαφορετική θέση και υποδεικνύουν ενεργό φλεγμονή σε περιοχή διαφορετική από αυτή που προκαλεί τα σημερινά συμπτώματα. Καθώς βελτιώνεται η τεχνολογία μαγνητικής τομογραφίας, η διάγνωση της σκλήρυνσης κατά πλάκας γίνεται πιο γρήγορα και εύκολα. Εν τω μεταξύ, τα άτομα με CIS τα οποία θεωρούνται ότι διατρέχουν υψηλό κίνδυνο για την ανάπτυξη της σκλήρυνσης κατά πλάκας μπορούν τώρα να υποβληθούν σε θεραπεία με μια τροποποίηση της νόσου που έχει εγκριθεί από την Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) για το σκοπό αυτό. Η πρώιμη

Θεραπεία του CIS έχει αποδειχθεί ότι καθυστερεί την έναρξη της σκλήρυνσης κατά πλάκας.

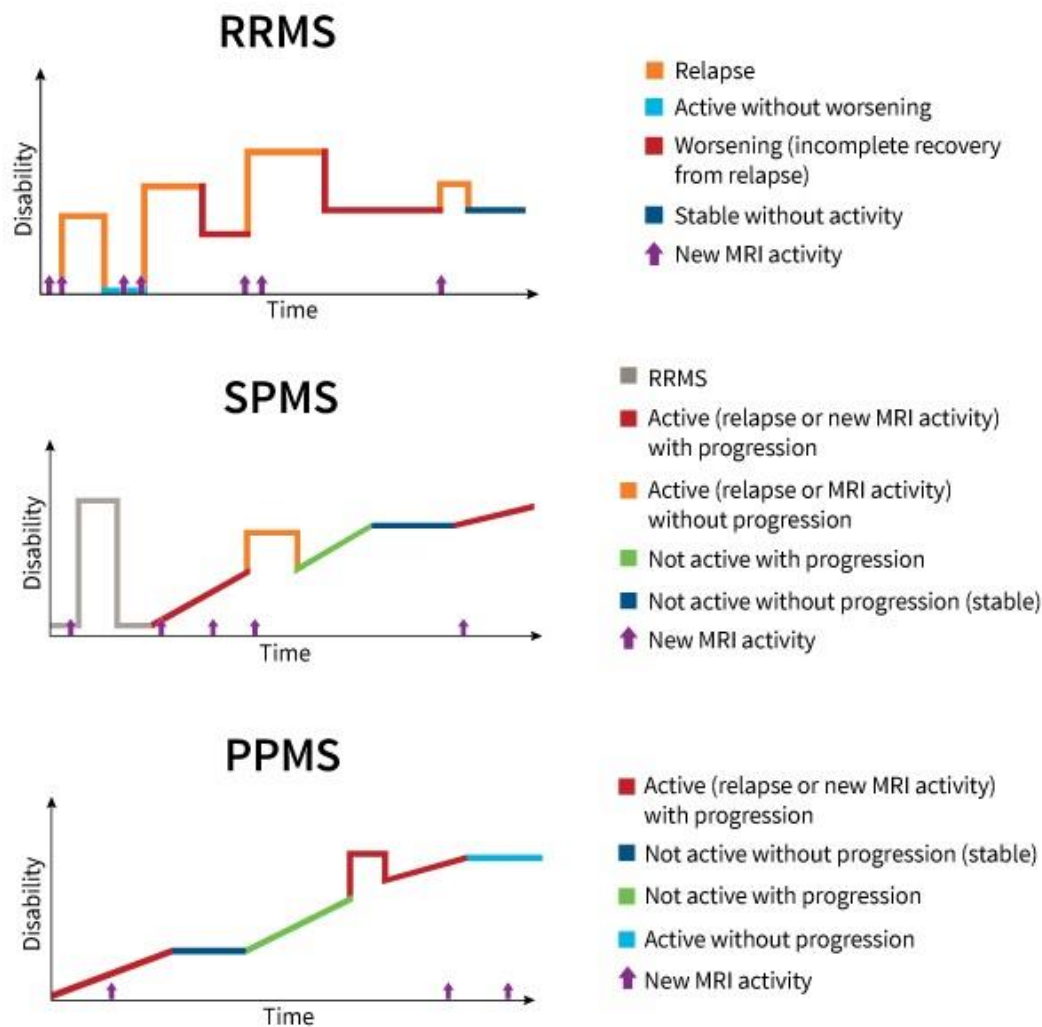


Εικόνα 23: Τυπική πορεία εξέλιξης της ΣκΠ.

Το 1996 στις Ηνωμένες Πολιτείες η Εθνική ένωση για την πολλαπλή σκλήρυνση περιέγραψε τέσσερα κλινικά στάδια της ΣκΠ [395]. Η συχνότερη μορφή εκδήλωσης της νόσου που εμφανίζεται στο 80-85% των ασθενών είναι η υποτροπιάζουσα (Relapsing- Remitting Multiple Sclerosis, RRMS) με εξάρσεις (υποτροπές ή παροξύνσεις) και υφέσεις. Αυτή χαρακτηρίζεται από αιφνίδια εκδήλωση εστιακών ή πολυεστιακών συμπτωμάτων και σημείων που εξελίσσονται μέσα σε λίγες ώρες ή ημέρες, στη συνέχεια σταθεροποιούνται, συνήθως για 4-6 εβδομάδες και ακολουθούνται είτε από πλήρη ύφεση με ανάκαμψη της νευρολογικής λειτουργίας είτε καταλείποντας κάποια συμπτωματική δυσλειτουργία μετά την ανάρρωση. Το χρονικό διάστημα από την εμφάνιση των συμπτωμάτων μέχρι την υποχώρησή τους, ονομάζεται «ώση» της νόσου, έχει απρόβλεπτη διάρκεια και ακολουθείται από διάστημα ύφεσης, το οποίο λήγει με την εμφάνιση μιας άλλης ώσης. Ένα μεγάλο ποσοστό, περίπου το 40%, των ασθενών που διαγιγνώσκονται με RRMS τελικά μεταβαίνουν στην «δευτεροπαθώς προϊούσα

μορφή» (Secondary Progressive Multiple Sclerosis, SPMS) της νόσου στην οποία υπάρχει μια σταδιακή επιδείνωση της νευρολογικής λειτουργίας (συσσώρευση της αναπηρίας) με την πάροδο του χρόνου λόγω χρόνια φλεγμονής του ΚΝΣ. Ωστόσο, οι σύγχρονες θεραπευτικές προσεγγίσεις καταφέρνουν να καθυστερούν σημαντικά την εξέλιξη της αναπηρίας με τα ποσοστά υποτροπών και τη μετάπτωση σε SPMS να μειώνονται. Για ένα ποσοστό 15% - 20% των πασχόντων, η νόσος έχει φθίνουσα πορεία εξαρχής και η μορφή αυτή περιγράφεται ως «πρωτοπαθώς προϊούσα» (Primary Progressive Multiple Sclerosis, PPMS). Οι ασθενείς με αυτή τη μορφή δεν παρουσιάζουν υποτροπές ή υφέσεις. Προοδευτικά εγκαθίστανται τετραπάρεση, νοητική έκπτωση, έκπτωση οπτικής οξύτητας, στελεχιαία σύνδρομο, ορθοκυστικές διαταραχές και παρεγκεφαλιδικές συνδρομές. Υπάρχει επίσης μια άλλη μορφή της νόσου, η οποία διαγιγνώσκεται σε έναν πολύ μικρό αριθμό ατόμων (5%) η «Προϊούσα με εξάρσεις» (Progressive Relapsing Multiple Sclerosis, PRMS). Οι ασθενείς με τη μορφή αυτή, έχουν μια προϊούσα πορεία εξαρχής, στην οποία προστίθενται αργότερα ένα ή δύο επεισόδια επιδείνωσης, με ή χωρίς επάνοδο στην προηγούμενη του επεισοδίου κατάσταση. Πιθανολογείται ότι αντιπροσωπεύει περιπτώσεις δευτεροπαθούς προϊούσας μορφής όπου όμως οι αρχικές εξάρσεις δεν αναγνωρίστηκαν ή ήταν κλινικά σιωπηλές [395].

Οι υποτροπές συνήθως δεν είναι προβλέψιμες και συμβαίνουν απροειδοποίητα [416]. Σπάνια συμβαίνουν πιο συχνά από δύο φορές ανά έτος, κάποιες ωστόσο, υποκινούνται από συνήθη ερεθίσματα και λαμβάνουν χώρα συχνότερα κατά τη διάρκεια της άνοιξης και του καλοκαιριού. Παρομοίως οι ιογενείς λοιμώξεις όπως το κοινό κρυολόγημα, η γρίπη ή η γαστρεντερίτιδα μπορεί να πυροδοτήσουν μια υποτροπή [461]. Το άγχος και η κατάθλιψη σχετίζονται με την εμφάνιση των υποτροπών [460]. Η εγκυμοσύνη μειώνει τον κίνδυνο της υποτροπής, ωστόσο κατά τους πρώτους μήνες μετά τον τοκετό ο κίνδυνος αυξάνεται. Συνολικά, η εγκυμοσύνη δεν φαίνεται να επηρεάζει την μακροπρόθεσμη αναπηρία [391].



Source: Lublin et al., 2014.

Εικόνα 24: Οι τρεις μορφές της Πολλαπλής Σκλήρυνσης. Σε ασθενής με RRMS μετά από υποτροπή, τα νέα συμπτώματα μπορεί να εξαφανιστούν χωρίς να προκαλέσουν αύξηση του επιπέδου αναπηρίας ή τα νέα συμπτώματα μπορεί να εξαφανιστούν εν μέρει, με αποτέλεσμα την αύξηση της αναπηρίας. Νέες βλάβες στη μαγνητική τομογραφία, όπως φαίνεται από τα βέλη, συχνά συμβαίνουν ως μέρος μιας υποτροπής. Η SPMS μορφή ακολουθεί μετά από υποτροπιάζουσα-παροδική σκλήρυνση κατά πλάκας. Η αναπηρία αυξάνεται σταδιακά με την πάροδο του χρόνου, με ή χωρίς ενδείξεις ασθένειας (υποτροπές ή μεταβολές στη μαγνητική τομογραφία). Στην SPMS, μπορεί να εμφανιστούν περιστασιακές υποτροπές, καθώς και περίοδοι σταθερότητας. Η PPMS μπορεί να έχει σύντομες περιόδους όταν η ασθένεια είναι σταθερή, με ή χωρίς υποτροπή ή νέα δραστηριότητα μαγνητικής τομογραφίας, καθώς και περιόδους κατά τις οποίες εμφανίζεται αύξηση της αναπηρίας με ή χωρίς νέες υποτροπές ή βλάβες στη μαγνητική τομογραφία [395].

2.4.6.Διάγνωση

Η διάγνωση της σκλήρυνσης κατά πλάκας είναι δύσκολη καθώς δεν υπάρχει ειδική διαγνωστική εξέταση και βασίζεται στα συμπτώματα που παρουσιάζονται, σε συνδυασμό με την βοήθεια ιατρικής απεικόνισης και εργαστηριακών δοκιμών [462]. Ειδικά στα πρώτα στάδια, επειδή οι ενδείξεις μπορεί να είναι παρόμοιες με εκείνες άλλων ιατρικών επιπλοκών [391, 392, 462], όπως στο εγκεφαλικό επεισόδιο, σε κάποια λοίμωξη του εγκεφάλου, στη μπορρελλίωση, σε κάποιον εγκεφαλικό όγκο και σε μερικές αυτοάνοσες ασθένειες σαν τον λύκο, μπορεί να χρειαστούν περαιτέρω εξετάσεις για να αποκλειστούν οι παραπάνω και να διαγνωστεί ο ασθενής με ΣΚΠ. Ουσιαστικά, σίγουρη διάγνωση μπορεί να γίνει μόνο από την κλινική εικόνα, όταν το άτομο έχει υποστεί ξεχωριστά επεισόδια νευρολογικών συμπτωμάτων, χαρακτηριστικών της ΠΣ, με τουλάχιστον 30 ημέρες διαφορά [463]. Στην περίπτωση ατόμων που λαμβάνουν ιατρική περίθαλψη ύστερα από μία μόνο προσβολή, χρειάζονται άλλου είδους εξετάσεις.

Τα διαγνωστικά εργαλεία που χρησιμοποιούνται συχνότερα είναι η μαγνητική τομογραφία, η ανάλυση του εγκεφαλονωτιαίου υγρού και τα προκλητά δυναμικά. Η μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου και της σπονδυλικής στήλης είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη και αναδεικνύει περιοχές απομυελίνωσης (αλλοιώσεις ή παρουσία πλακών). Κατά τη διενέργεια μαγνητικής τομογραφίας είναι δυνατή η χρήση ενδοφλέβιου παραμαγνητικού υλικού όπως είναι το γαδολίνιο προκειμένου να γίνουν καλύτερα ορατές πρόσφατες ή ενεργείς βλάβες [463, 464]. Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης είναι μια απλή και αξιόπιστη τεχνική ποσοτικού και ποιοτικού προσδιορισμού των πρωτεϊνών του εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY) το οποίο λαμβάνεται από οσφυονωτιαία παρακέντηση και με την οποία ανιχνεύονται μονοκλωνικά αντισώματα τύπου IgG, ένας δείκτης φλεγμονής που συναντάται στο 75–85% των ανθρώπων που πάσχουν από ΠΣ [464, 465]. Η λήψη εγκεφαλονωτιαίου υγρού μπορεί να συνεισφέρει στον καλύτερο χαρακτηρισμό της νόσου ή να αποκλείσει την παρουσία άλλων νοσημάτων. Το νευρικό σύστημα, λόγω της απομυελίνωσης των νευρώνων, μπορεί να ανταποκρίνεται λιγότερο ενεργά σε ερεθίσματα των οπτικών και αισθητήριων νευρώνων. Αυτές οι εγκεφαλικές απαντήσεις μπορούν να εξεταστούν μέσω οπτικών και αισθητήριων προκλητών δυναμικών [466].

Η συμπτωματολογία και η πορεία της ΣΚΠ ποικίλουν τόσο πολύ, ώστε να υπάρχει σημαντική πιθανότητα λανθασμένης διάγνωσης. Οι εργαστηριακές εξετάσεις είναι ικανές να υποστηρίξουν την κλινική διάγνωση της ασθένειας, αλλά καμία δεν είναι ειδική για τη ΣΚΠ ούτε κάποια από αυτές αποβαίνει θετική σε όλους τους ασθενείς. Αν και η ευαισθησία της MRI κυμαίνεται από 90-100%, η ειδικότητά της είναι σαφώς χαμηλότερη και ίση με 57-80%. Οι παραπάνω λόγοι υπαγορεύουν την αναγκαιότητα ενός συνόλου διαγνωστικών κριτηρίων. Τα κριτήρια ΜακΝτόναλντ, τα οποία εστιάζουν σε κλινικά, εργαστηριακά και ραδιολογικά στοιχεία της παρουσίας αλλοιώσεων σε διαφορετικούς χρόνους και περιοχές, αποτελούν την πιο συχνή μέθοδο διάγνωσης [417], ενώ τα κριτήρια Σουμάκερ και τα κριτήρια Πόσερ διατηρούν μια κυρίως ιστορική σημασία [400]. Αν και τα παραπάνω κριτήρια επιτρέπουν τη μη επεμβατική διάγνωση, δηλώνεται από ορισμένους ότι η μόνη οριστική απόδειξη είναι μια νεκροψία ή βιοψία όπου εντοπίζεται το είδος των αλλοιώσεων που εμφανίζει η ΠΣ [391, 392, 463, 467].

Η πρώτη ταξινόμηση έγινε το 1954 από τους Allison & Millar, βασιζόμενη σε κλινικά συμπτώματα που εμφάνιζε ο ασθενής, όπως παροδικές παραισθησίες, αιμωδίες, διπλωπία, συχνουρία, συνδεδεμένα με την ΣκΠ. Με βάση αυτά τα κριτήρια οι ασθενείς κατατάσσονταν στις εξής τρεις κατηγορίες:

1. πιθανή διάσπαρτη σκλήρυνση, όπου οι ασθενείς εμφάνιζαν συμπτώματα της νόσου, χωρίς όμως κάποια φυσική αναπηρία
2. πιθανή (probable) διάσπαρτη σκλήρυνση, όπου οι ασθενείς στο σύνολό τους εμφάνιζαν κάποιου είδους φυσική αναπηρία
3. πρώιμη, πιθανή και λανθάνουσα σκλήρυνση

Στη συνέχεια, το 1965 αναπτύχθηκαν τα διαγνωστικά κριτήρια των Schumacher και Rose τα οποία βασίστηκαν σε αμιγώς κλινικά κριτήρια και οριοθέτησαν τον καθορισμό μόνο της κλινικώς βέβαιης Πολλαπλής Σκλήρυνσης. Οι ασθενείς με βέβαιη ΣΚΠ πέρα από τα κλινικά συμπτώματα τα οποία εμφανίζονται μεταξύ 10ου και 50ου έτους της ηλικίας τους, έπρεπε να αποδεικνύουν αντικειμενικά την προσβολή του ΚΝΣ. Ακολούθησε ο McAlpine το 1972, ο Rose το 1976, οι McDonald και Halliday το 1977 και ο Bauer το 1980. Το 1983 προτάθηκαν νέα διαγνωστικά κριτήρια από τον Poser [468], αποδεκτά από την συντριπτική

πλειοψηφία των νευρολόγων. Ο συνδυασμός κλινικών και εργαστηριακών εξετάσεων καθορίζουν την βέβαιη ΣκΠ (Definite MS), ενώ οι παρακλινικές εξετάσεις (ουρολογικές εξετάσεις, οπτικά προκλητά δυναμικά και απεικονιστικές μέθοδοι) καταδεικνύουν μια βλάβη, η οποία δεν έχει δώσει ακόμα σημειολογία και μπορεί να μην έχει προκαλέσει ούτε συμπτώματα.¹² και καθορίζουν την πιθανή (Probable MS). Τέλος, το 2001 εισήχθησαν νέα διαγνωστικά κριτήρια, από το Mc Donald [463], ο οποίος εκμεταλλευόμενος την εξέλιξη και τις δυνατότητες της MRI (Μαγνητική Τομογραφία), συνδυάζει την τομογραφία εγκεφάλου με τις κλινικές και παρακλινικές εξετάσεις και προχωράει στον διαχωρισμό των ατόμων με ΣκΠ στις κατηγορίες: «βέβαιη» νόσος, «πιθανή» νόσος και των μη νοσούντων. Επίσης καθορίζονται οδηγίες για τη διάγνωση της πρωτοπαθώς προϊούσας ΣκΠ. Η διάγνωση τίθεται με την τεκμηρίωση, μέσω της κλινικής ανάλυσης και της εργαστηριακής διερεύνησης, της ύπαρξης δύο ή περισσότερων επεισοδίων, τα οποία επηρεάζουν διαφορετικά σημεία του ΚΝΣ και λαμβάνουν χώρα σε διαφορετικές περιόδους. Μέχρι σήμερα έχουν πραγματοποιηθεί άλλες δυο αναθεωρήσεις των διαγνωστικών κριτηρίων του McDonald μια το 2005 και μια το 2010. Στην τελευταία αναθεώρηση η διάγνωση της βέβαιας ΣκΠ τίθεται ακόμη πιο πρώιμα στην περίπτωση που η MRI του ΚΝΣ στο πρώτο κλινικό επεισόδιο έχει ενεργότητα.

Καταλήγοντας, φαίνεται από τα παραπάνω ότι η διάγνωση είναι ως επί το πλείστον κλινική , συνδυάζοντας το ιστορικό και τις εργαστηριακές εξετάσεις και βασιζόμενη κυρίως στον αποκλεισμό παραγόντων που την επιβεβαιώνουν ενάντια σε αυτούς που δεν καταφέρουν να την επιβεβαιώσουν.

2.4.7.Θεραπεία

Η θεραπευτική προσέγγιση της ΣΚΠ είναι πολύπλευρη και συνίσταται στην αντιμετώπιση των κλινικών υποτροπών (οξεία φάση), στην ανοσοτροποποιητική θεραπεία με ρόλο «προφυλακτικό» καθώς αποσκοπεί στην ελάττωση της συχνότητας, της έντασης και της διάρκειας των υποτροπών και τέλος, στην θεραπεία των συμπτωμάτων της νόσου όπως είναι η κατάθλιψη, το άλγος, η κόπωση, η σπαστικότητα, η νευρογενής σφιγκτηριακή διαταραχή και διαταραχές νοητικών λειτουργιών [469].

Στην θεραπεία της οξείας φάσης χρησιμοποιούνται στεροειδή ή κορτικοειδή. Η κορτικοτροπίνη (ACTH) ήταν το πρώτο ανοσοκατασταλτικό φάρμακο που χρησιμοποιήθηκε με θετικά αποτελέσματα, ενώ στις μέρες μας γίνεται χρήση μεθυλπρεδνιζολόνης και πρεδνιζολόνης, θεωρώντας τα ως φάρμακα εκλογής για την θεραπεία των υποτροπών στην ΣΚΠ. Τα γλυκοκορτικοειδή περιορίζουν την φλεγμονή ως αποτέλεσμα της αποκατάστασης του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και κατ' επέκταση της παρεμπόδισης εισόδου ανοσιακών κυττάρων και αντιγόνων μέσα στο ΚΝΣ [470-473].

Μεγαλύτερο ενδιαφέρον συγκεντρώνουν οι «προφυλακτικές» θεραπείες της νόσου, που μέσω ανοσοτροποποιητικών και ανοσοκατασταλτικών φαρμακευτικών αγωγών στοχεύουν είτε στην ενεργοποίηση των φυσιολογικών αυτορυθμιστικών κυκλωμάτων του οργανισμού, είτε στην πρόκληση εξειδικευμένης ανοχής ή «ανεργίας» των Τ-λεμφοκυττάρων και σε εκείνες που στοχεύουν στην αποκατάσταση της απομυελινωτικής βλάβης [474]. Στις προφυλακτικές θεραπείες τα πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενα φάρμακα είναι οι ιντερφερόνες, η οξική γλατιραμέρη, η μιτοξαντρόνη, η ναταλιζουμάμπη και η φινγκολιμόδη, τα οποία αναλύονται παρακάτω.

Ιντερφερόνες. Το 1993, εγκρίθηκε για πρώτη φορά στις ΗΠΑ και αργότερα στην Ευρώπη, η χρήση των IFN-β1a (Avonex, Rebif) και IFN-β1b (Betaferon), για την θεραπεία της ΣΚΠ [475]. Η IFN-β1a έχει εγκριθεί για την υποτροπιάζουσα μορφή της νόσου (RRMS) καθώς και σε όσους παρουσιάζουν ταχεία επιδείνωση, ενώ η IFN-β1b χορηγείται και στην περίπτωση της SPMS μορφής [476]. Οι ιντερφερόνες είναι λιποπρωτεΐνες που ανευρίσκονται φυσιολογικά στον οργανισμό, παράγονται και εκκρίνονται από ινοβλάστες, μακροφάγα και τα επιθηλιακά κύτταρα. Ανήκουν στην

κατηγορία των κυτταροκινών και προάγουν την κυτταρική διαφοροποίηση έχοντας ανοσοτροποποιητική, αντική και αντι-πολλαπλασιαστική δράση [473, 477]. Ο κύριος μηχανισμός με το οποίων δρουν οι ιντερφερόνες παραμένει άγνωστος, ωστόσο έχουν βρεθεί ότι καταστέλλουν το πολλαπλασιασμό των T-κυττάρων και εμποδίζουν τη διείσδυσή τους στο ΚΝΣ και κατ'επέκταση την ενεργοποίηση της μικρογλοίας. Επιπρόσθετα, ελαττώνουν την έκφραση των MMPs, και των μορίων προσκόλλησης επιφανείας, ενώ αυξάνουν την απελευθέρωση των διαλυτών μορίων προσκόλλησης, με αποτέλεσμα την ελάττωση της μεταναστευτικής ικανότητας των T-λεμφοκυττάρων. Μελέτες της χρήσης των ιντερφερονών, έδειξαν μείωση του αριθμού των υποτροπών κατά 35%, επιβράδυνση της αναπηρίας κατά 37%, μείωση της ατροφίας του εγκεφάλου κατά 55% και μείωση του αριθμού των απεικονιζόμενων εστιών στην MRI [478].

Glatiramer acetate (Copaxone). Το Copaxone έχει εγκριθεί για την θεραπεία της υποτροπιάζουσας με εξάρσεις και υφέσεις (RRMS) μορφής της νόσου. Η οξική γλατιραμέρη (GA) είναι το οξικό άλας ενός μίγματος πολυπεπτιδίων τα οποία συντίθενται τυχαία από τέσσερα αμινοξέα (L-γλουταμινικό οξύ, L-αλανίνη, L-λυσίνη και L-τυροσίνη). Ο μηχανισμός δράσης της βασίζεται στην ομοιότητα της με την MBP και πιθανώς άλλων μυελινικών αντιγόνων. Η GA καταστέλλει την φλεγμονώδη αντίδραση μέσω της παραγωγής αντιφλεγμονωδών κυτοκινών και ελαττώνει την έκφραση των MCH-II πρωτεϊνών περιορίζοντας έτσι την παρουσίαση αντιγόνου [479]. Αποτελέσματα από τις έως τώρα μελέτες δείχνουν μείωση του αριθμού των υποτροπών κατά 29%-32%, βελτίωση κατά 1 βαθμό στην κλίμακα αναπηρίας EDSS και μείωση της δραστηριότητας της νόσου στην MRI [480-483].

Μιτοξανδρόνη. Πρόκειται για ένα χημειοθεραπευτικό παράγοντα, ο οποίος αρχικά χρησιμοποιήθηκε στην θεραπεία της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας. Η χορήγησή της προτείνεται σε σοβαρές ενεργές μορφές της νόσου, την SPMS και την PRMS [471]. Η μιτοξαντρόνη έχει δειχθεί να έχει ανοσοτροποποιητική δράση, καταστέλλοντας τα T και τα B λεμφοκύτταρα, ενώ πειράματα in vitro, δείχνουν ότι επάγει την απόπτωση των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και τη μείωση της έκλυσης προφλεγμονωδών κυτοκινών, απενεργοποιώντας τα μακροφάγα (τα οποία παίζουν κύριο ρόλο στην απομυελίνωση) [484].

Natalizumab. Η ναταλιζουμάμπη είναι το πρώτο μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της ανθρώπινης α4 αλυσίδας της α4β1-ιντεγκρίνης που εισήχθη στη θεραπεία της Πολλαπλής Σκλήρυνσης. Η α4β1-ιντεγκρίνη ανευρίσκεται στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων και μονοκυττάρων, αποτελεί μόριο προσκόλλησης και παίζει βασικότατο ρόλο στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων. Η ναταλιζουμάμπη έχει ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση, μέσω παρεμπόδισης της σύνδεσης της α4-ιντεγκρίνης με τον ενδοθηλιακό της υποδοχέα, VCAM-1, εμποδίζει τη μετακίνηση των ενεργοποιημένων λευκοκυττάρων από το αίμα στο ΚΝΣ, μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Επιπρόσθετα, συμμετέχει στην απόπτωση των λευκοκυττάρων, παρεμποδίζοντας την σύνδεση τους με παρεγχυματικά κύτταρα [485]. Το φάρμακο σήμερα, θεωρείται θεραπεία δεύτερης γραμμής και ενδείκνυται για ασθενείς με υψηλή ενεργότητα της νόσου παρά τη θεραπεία με φάρμακα πρώτης γραμμής (β-ιντερφερόνη) και για ασθενείς με ταχέως εξελισσόμενη σοβαρή υποτροπιάζουσα διαλείπουσα ΣΚΠ (RRMS). Κλινικές δοκιμές έδειξαν σημαντική μείωση της ετήσιας συχνότητας των υποτροπών, μείωση της εξέλιξης της ανικανότητας και μείωση των ενεργών βλαβών στην MRI. Ωστόσο η θεραπεία με ναταλιζουμάμπη συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης προϊούσας πολυεστιακής εγκεφαλοπάθειας (PML) [486].

Fingolimod. Το 2010, εγκρίθηκε το πρώτο δια του στόματος σκεύασμα για την θεραπεία της ΣΚΠ, η φινγκολιμόδη (Gilenya). Η φινγκολιμόδη είναι τροποποιητής των υποδοχέων της 1-φωσφορικής σφινγοσίνης. Η φινγκολιμόδη μεταβολίζεται από την κινάση της σφινγοσίνης στο δραστικό μεταβολίτη φωσφορική φινγκολιμόδη (φωσφορυλιωμένη μορφή S1P). Όταν η φινγκολιμόδη εισέρχεται στην κυκλοφορία φωσφορυλιώνεται και διαπερνά εύκολα τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, αναστέλλοντας την ικανότητα των λεμφοκυττάρων να εξέρχονται από τους λεμφαδένες. Αυτή η ανακατανομή μειώνει τη διήθηση παθογόνων λεμφοκυττάρων στο ΚΝΣ, όπου θα συμμετείχαν στη φλεγμονή και στη βλάβη του νευρικού ιστού. Σαν δεύτερος μηχανισμός δράσης της φινγκολιμόδης αναφέρεται η απευθείας επίδραση της στο ΚΝΣ όπου η ουσία διεισδύει εύκολα και δρα στοχευμένα στη φλεγμονή, ασκώντας νευροπροστατευτικές δράσεις ανεξάρτητα από την επίδραση στο ανοσοποιητικό σύστημα. Η φινγκολιμόδη θεωρείται θεραπεία δεύτερης γραμμής και ενδείκνυται στις περιπτώσεις με RRMS

μορφής. Η αποτελεσματικότητα του φαρμάκου έχει τεκμηριωθεί σε κλινικές μελέτες όπου βρέθηκε ότι μειώνει την ετήσια συχνότητα υποτροπών κατά 54% και την εξέλιξη της αναπηρίας κατά 34%. Σημαντική ήταν επίσης η επίδραση του φαρμάκου στη μείωση της εξέλιξης της εγκεφαλικής ατροφίας κατά 35%. Γενικότερα, το φάρμακο είναι υψηλής αποτελεσματικότητας, είναι εύκολο στη χορήγηση συγκριτικά με όλα τα προηγούμενα ενέσιμα σκευάσματα, παρουσιάζει υψηλή ανοχή στους ασθενείς (87%) και ελεγχόμενες ανεπιθύμητες ενέργειες. Μέχρι σήμερα το φάρμακο λαμβάνουν περίπου 30.000 ασθενείς παγκοσμίως, με 6.000 άτομα να το λαμβάνουν για χρονικό διάστημα >5 έτη, ενώ στη χώρα μας υπολογίζεται ότι το λαμβάνουν περίπου 1.300 ασθενείς με ΣκΠ [487, 488].

2.4.8.Πειραματικά μοντέλα της ΣΚΠ

Η Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, EAE) χρησιμοποιείται ως πειραματικό μοντέλο σε ζώα με σκοπό να προκληθεί μια κατάσταση που προσομοιάζει την πολλαπλή σκλήρυνση (MS). Η EAE θεωρείται το καλύτερο πειραματικό μοντέλο που μιμείται την MS στα σημαντικά χαρακτηριστικά της και είναι διαθέσιμο για τη μελέτη ορισμένων από τους κυριότερους μηχανισμούς παθογένειας της MS καθώς και για την δοκιμή και ανάπτυξη θεραπευτικών φαρμάκων που στοχεύουν στους μηχανισμούς αυτούς [489]. Επίσης σημαντικά, θεωρούνται το μοντέλο της TMEV (Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus), στο οποίο προκαλείται ιογενή μόλυνση του ΚΝΣ με αποτέλεσμα αυτοάνοση φλεγμονώδης απομυελίνωση και το μοντέλο της IC-DTH (Intracerebral Delayed Type of Hypersensitivity) το οποίο χρησιμοποιείται σε πειραματόζωα μη ευαίσθητα στη ΠΑΕ.

Σε αντίθεση με ότι συμβαίνει στους ανθρώπους, για την πρόκληση της ΠΑΕ απαιτείται ένα στάδιο ευαισθητοποίησης στα αυτοαντιγόνα [490]. Ως αντιγόνα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ομογενοποιημένα τμήματα του κεντρικού νευρικού συστήματος και οι πρωτεΐνες MBP, PLP και MOG, ολόκληρες ή σε πεπτίδια. Η χρήση ανοσοενισχυτικού, που συνήθως περιέχει βακτηριακά συστατικά ικανά να ενεργοποιήσουν το ανοσοποιητικό σύστημα [491] και η διάνοιξη του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, αποτελούν βασικούς εναρκτήριοι παράγοντες της ΠΑΕ. Τέλος, σπουδαίο ρόλο παίζουν οι παράγοντες ηλικία, φύλο και περίοδος πρόκλησης. Υπάρχουν δύο τύποι επαγωγής της ΠΑΕ: η ενεργητική και η παθητική.

Στην ενεργητικώς προκλητή ΠΑΕ, ο μυς παράγει ειδικά για την μυελινική πρωτεΐνη T-λεμφοκύτταρα. Αρχικά, γίνεται υποδόρια έγχυση μιας εκ των προαναφερθέντων πρωτεϊνών και του ανοσοενισχυτικού παράγοντα του Freund (CFA), ώστε να ενεργοποιηθούν τα ειδικά για τον συγκεκριμένο αντιγονικό επίτοπο CD4+ T-λεμφοκύτταρα μέσω των MHC τάξης II. Παράλληλα χορηγείται τοξίνη του κοκκύτη (pertussis toxin) η οποία επιτυγχάνει την διαταραχή του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Η τοξίνη του κοκκύτη διαταράσσει την διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού μέσω της αύξησης της έκφρασης της επαγόμενης ισομορφής της συνθετάσης του NO (iNOS), προάγει την έκφραση προφλεγμονωδών κυτταροκινών (TNF- α , INF- γ , IL-12) ενώ αντίθετα καταστέλλει την

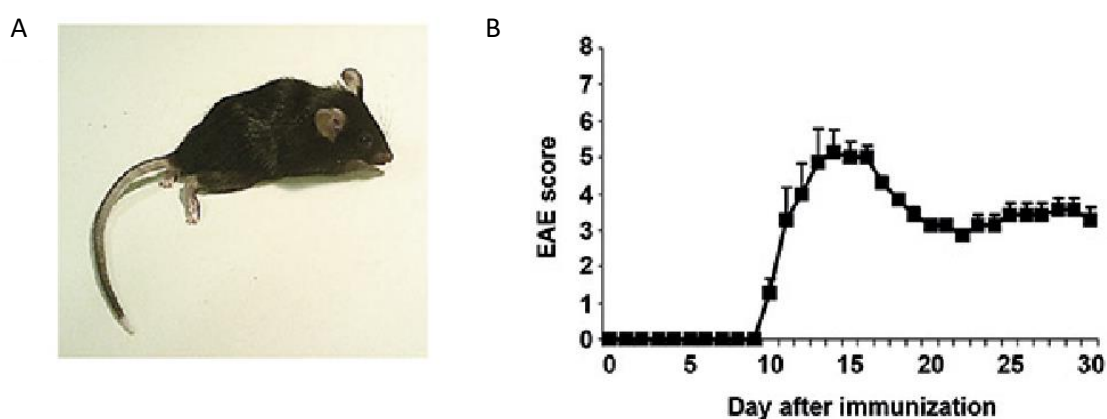
αντιφλεγμονώδη κυτταροκίνη IL-10 και αυξάνει την απόκριση των T λεμφοκυττάρων στους λεμφαδένες [492]. Τα ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα στη συνέχεια μεταναστεύουν μέσω της κυκλοφορίας και εισέρχονται στο ΚΝΣ, όπου διαφοροποιούνται σε Th1, Th2 και Th17. Η διαφοροποίηση των T-λεμφοκυττάρων ρυθμίζεται από τις κυτταροκίνες IL-12, IL-4, IL-23 (για τα Th1, Th2 και Th17 αντίστοιχα). Τα Th1 εμπλέκονται στην αυτοανοσία και παθογένεια της ΠΑΕ, εκκρίνοντας προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως INF- γ και TNF- α [442]. Τα Th2 εκκρίνουν αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες: IL-4, IL-5, IL-10 και καταστέλλουν την ΠΑΕ [444]. Τα Th17 εκκρίνουν την κυτταροκίνη IL-17 και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις υποτροπές της ΠΑΕ. Εν συνεχεία, κυτταροκίνες και χημειοκίνες που εκκρίνονται από τα T λεμφοκύτταρα προκαλούν την ενεργοποίηση των περιφερικών μονοπύρηνων και μικρογλοιακών κυττάρων τα οποία στοχεύουν τη μυελίνη και τα ολιγοδενδροκύτταρα οδηγώντας στην απομυελίνωση των νευραξόνων. Συμπερασματικά, η ενεργητικώς προκλητή ΠΑΕ συνδυάζει την επαγωγική φάση με την φάση της ανοσιακής απάντησης [493]. **Στην παθητικώς προκλητή ΠΑΕ** τα ζώα ανοσοποιούνται με το επιθυμητό αντιγόνο και η λέμφος συλλέγεται προκειμένου να απομονωθούν τα T-λεμφοκύτταρα. Τα λεμφοκύτταρα στη συνέχεια καλλιεργούνται *in vitro* παρουσία αντιγόνων και ακτινοβολημένων σπληνοκυττάρων, ως αντιγονοπαρουσιαστικά και αυξητικών παραγόντων, προκειμένου να δημιουργηθεί ένας κλώνος T λεμφοκυττάρων που χορηγείται σε υγιή ζώα για την πρόκληση ΠΑΕ. Στα πλεονεκτήματα της παθητικής μεθόδου περιλαμβάνεται η διάκριση της φάσης ενεργοποίησης των λεμφοκυττάρων και της επαγωγικής φάσης της απομυελίνωσης.

Η αξιολόγηση και ανάλυση της ΠΑΕ γίνεται σε αρκετά επίπεδα: κλινικά, ιστοπαθολογικά, με χρήση μαγνητικής τομογραφίας (MRI) και στατιστικά. Όσον αφορά την κλινική εμφάνιση της ΠΑΕ, υπάρχει μια κλίμακα βαθμολόγησης με βάση την οποία κατηγοριοποιούνται τα πειραματόζωα. Η κλίμακα αυτή ορίζεται ως εξής:

0. Το ζώο κρατά την ουρά του 90° προς τα πάνω όταν ανασηκώνεται ραχιαία.
1. Κρατάει την ουρά του σε οριζόντιο επίπεδο όταν σηκώνεται ραχιαία.
2. Το ζώο δε μπορεί να σηκώσει την ουρά του.
3. Το ζώο δε μπορεί να γυρίσει από ύπτια θέση σε ευθεία.

4. Έχουμε παράλυση πίσω άκρων.
5. Το ζώο καθίσταται τετραπληγικό
6. Θάνατος

Η μικροσκοπική εξέταση του κεντρικού νευρικού συστήματος, με ειδικές χρώσεις που αποκαλύπτουν το μέγεθος της απομυελίνωσης και της φλεγμονής, είναι αναγκαία για να αποδείξουμε τις κλινικές συνέπειες που προκαλούνται από παθολογικούς μηχανισμούς. Συχνά, χρησιμοποιείται η MRI για την παρακολούθηση της φλεγμονής *in vivo* από τα αρχικά ακόμη στάδια της νόσου. Τέλος, για μια έγκυρη στατιστική ανάλυση και αξιολόγηση του αποτελέσματος απαιτείται μεγάλος αριθμός πειραματόζων, συνήθως ομάδες των 10-15 ζώων.



Εικόνα 25: Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα ΕΑΕ. Α. Αντιπροσωπευτική εικόνα ανοσοποιημένου ποντικού C57BL/6 με συμπτώματα ΠΑΕ (βαθμολογία 4). Β. Αντιπροσωπευτική πορεία ασθένειας μετά από ανοσοποίηση για 30 ημέρες.

2.4.9.Φωσφολιπίδια και ΣΚΠ

2.4.9.1.Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη

Ο ρόλος της μεμβρανικής φωσφατιδυλοχολίνης (PC) στην παθολογία της σκλήρυνσης κατά πλάκας παραμένει άγνωστος ενώ οι διαθέσιμες πληροφορίες είναι αντικρουόμενες. Σε χρωματογραφική ανάλυση ασθενών με ΣκΠ βρέθηκαν υψηλότερα επίπεδα μεμβρανικών PC σε σχέση με τους υγιείς [494]. Παράλληλα έχουν αναφερθεί χαμηλά επίπεδα των PC (C20:4n-6, υπόστρωμα της PLA2) σε ασθενείς με ΣκΠ που δεν είχαν λάβει συμπληρώματα λιπαρού οξέος, ιντερφερόνης ή θεραπεία κορτιζόνης [495]. Αντιθέτως, υπάρχουν πολλές πληροφορίες σχετικά με το προϊόν μεταβολισμού της φωσφατιδυλοχολίνης (PC), της λυσοφωσφατιδυλοχολίνης (LPC), καθώς και για την οικογένεια των ένζυμων των φωσφολιπασών A2 (PLA2) που καταλύουν την μετατροπή του PC σε LPC.

Το 1995, συνδέεται για πρώτη φορά η PLA2 με την ΣκΠ, όπου διαπιστώνεται πάνω από 50% μείωση της κυτοσολικής PLA2 (cPLA2) [496] σε εγκεφαλικό ιστό ασθενών με ΣκΠ (7 ασθενείς και 7 υγιείς), αργότερα αποδείχθηκε ότι η cPLA2 εκφράζεται από τα μακροφάγα και τα T κύτταρα στο πειραματικό μοντέλο της αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας (ΠΑΕ) [497-499]. Η φαρμακολογική αναστολή του ενζύμου αυτού ο καθυστέρησε την έναρξη και την εξέλιξη της ΠΑΕ [497, 500]. Επιπλέον, ποντίκια με έλλειψη της cPLA2α δεν ανέπτυξαν κλινικά συμπτώματα της ΠΑΕ, λόγω μη διαφοροποίησης των T κυττάρων προς το φαινότυπο Th1 [501]. Διερεύνηση του μηχανισμού της δράσης της cPLA2 έδειξε ότι οι αναστολείς της cPLA2α δρουν στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, μειώνοντας την ικανότητά τους να επάγουν T κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών. Επιπλέον, η αναστολή της cPLA2α μπορεί να αποτρέψει την ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων του ΚΝΣ και μπορεί να αυξήσει την επιβίωση των ολιγοδενδροκυττάρων [502]. Χρησιμοποιώντας ένα εκλεκτικό αναστολέα για την cPLA2 (AX059), προτάθηκε ότι cPLA2 GIVA (cPLA2α) μπορεί να παίζει ρόλο στην έναρξη της ΠΑΕ, ενώ η iPLA2 GVIA τόσο στην έναρξη όσο και στην εξέλιξη της ΕΑΕ [503]

Η sPLA2 έχει βρεθεί αυξημένη στα ούρα ασθενών με ΣκΠ [504] και αρουραίων με ΠΑΕ, καθώς και στο μοντέλο απομυελίνωσης Cuprizone [505], ενώ η αναστολή της βελτίωσε τα συμπτώματα της ΠΑΕ [504, 506, 507]. Στην τελευταία

μελέτη οι συγγραφείς έδειξαν ότι η sPLA2-IIID παράγεται επιλεκτικά από ρυθμιστικά Τ κύτταρα (Tregs). Μια άλλη μελέτη ανέφερε ότι η έκφραση της sPLA2 αυξήθηκε μόνο στη φάση ύφεσης της ΕΑΕ και πρότεινε ότι δεν αποτελεί θεραπευτικό στόχο για τη θεραπεία της MS [503]. Η εμπλοκή των ισομορφών PLA2 στην MS θα μπορούσε να επιτευχθεί μέσω του μονοπατιού του αραχιδονικού οξέος (AA), αφενός, οδηγώντας στην παραγωγή προφλεγμονωδών εικοσανοειδών όπως οι προσταγλανδίνες [508, 509] ή μέσω της παραγωγής LPC.

Ήδη από το 1949, ήταν γνωστό ότι το LPC θα μπορούσε (όπως και η PLA2) να προκαλέσει απομυελίνωση *in vitro* [510] και ταχεία απομυελίνωση του νευρικού άξονα *in vivo* [511]. Ως αποτέλεσμα του παραπάνω, η προκαλούμενη από LPC απομυελίνωση είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο πειραματικό μοντέλο για την εξέταση των διαδικασιών επαναμυελίνωσης *in vivo* [512, 513] και *in vitro* [514-516]. Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο το LPC προκαλεί απομυελίνωση δεν είναι γνωστός, παρόλο που τα στοιχεία υποδηλώνουν ότι το LPC μπορεί να προκαλέσει μια ταχεία και εκτεταμένη διάσπαση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και μια πρώιμη παροδική απόκριση Τ κυττάρων και ουδετερόφιλων στο ΚΝΣ [517]. Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι το SRI 62-8341, ένα ανάλογο του LPC, είχε θεραπευτικό αποτέλεσμα στη θεραπεία της χρόνιας υποτροπιάζουσας ΠΑΕ και κατέστειλε περαιτέρω υποτροπές [459, 518]. Παρόλο που δεν υπάρχουν τεκμηριωμένα στοιχεία που να υποστηρίζουν την συμμετοχή του LPC στην απομυελίνωση των ΣκΠ ασθενών, σε ανάλυση λιπιδίων πλάσματος πέντε ασθενών με ΣκΠ, βρέθηκε σημαντική αύξηση του LPC σε σύγκριση με τα άτομα ελέγχου [519]. Επιπλέον, ο λόγος LPC/PC σε δείγματα ορού ΣκΠ ασθενών μειώθηκε σημαντικά [520].

Το LPC μπορεί να διεγείρει τη χημειοταξία των Τ κυττάρων [521, 522] μέσω της ενεργοποίησης του υποδοχέα του G2A [523]. Η ενεργοποίηση του G2A από το LPC θα μπορούσε να παίζει ρόλο στην πρόσληψη Τ κυττάρων σε φλεγμονώδεις αλλοιώσεις και έτσι να προάγει την έναρξη και/ή την αύξηση της σοβαρότητας των φλεγμονωδών αυτοάνοσων ασθενειών που προκαλούνται από Τ κύτταρα όπως η ΣκΠ. Ωστόσο, σε ποντίκια με έλλειψη του υποδοχέα G2A, η σοβαρότητα της νόσου δεν μειώθηκε σημαντικά, υποδηλώνοντας ότι η χημειοτακτική δράση που

προκαλείται από G2A δεν είναι διεισδυτική *in vivo* και δεν επηρεάζει την παθογένεια της ΠΑΕ [524].

Τέλος, σε δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY, CSF) ασθενών ΣκΠ εντοπίζονται οξειδωμένη φωσφατιδυλοχολίνη, φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, λυσοφωσφατιδυλοαιθανολαμίνη και σφιγγομυελίνη, υποδεικνύοντας ότι μεταβολές στα λιπίδια υπάρχουν σε άτομα με ΣκΠ και μπορεί να συμβάλουν στην παθογένεια της απομυελίνωσης [525]. Επιπροσθέτως, το LPC εκκρίνεται από νευρώνες που υπερεκφράζουν το p25 με αποτέλεσμα την αστρογλοΐωση, νευροφλεγμονή και μετέπειτα νευροεκφυλισμό τους [526]. Συμπερασματικά το LPC ενεργεί ως σηματοδοτικό μόριο που προκαλεί φλεγμονώδεις αποκρίσεις στο ΚΝΣ και αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο στόχο για τη μείωση της νευροφλεγμονής.

2.4.9.2.Λυσοφωσφατυδικό οξύ

Τα δεδομένα που εμπλέκουν την σηματοδότηση ATX/LPA στην παθολογία της σκλήρυνσης κατά πλάκας, είναι λιγοστά. Σε ανθρώπους, ποντικούς και αρουραίους η γ ισομορφή της ATX είναι υψηλή στο ΚΝΣ [7, 28, 527]. Το χοριοειδές πλέγμα εκφράζει επίσης την ATX [28, 528] που απελευθερώνεται στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (CSF) [17], ενώ η ATX εκφράζεται από τα ενεργοποιημένα αστροκύτταρα μετά από εγκεφαλική βλάβη [528], υποδηλώνοντας πιθανό ρόλο στην φλεγμονή του ΚΝΣ. Ανάλυση του ENY ασθενών με ΣκΠ, έδειξε αυξημένα επίπεδα ATX σε σύγκριση με άλλες διαταραχές του ΚΝΣ [16]. Αντίθετα, στην ΕΑΕ, τα επίπεδα ATX mRNA βρέθηκαν μειωμένα κατά 25% στην εμφάνιση των κλινικών συμπτωμάτων [28].

Όσον αφορά τους υποδοχείς LPA, εκφράζονται όλοι στο ΚΝΣ [122, 529], με πλειοτροπικά αποτελέσματα στην ανάπτυξη, τη μετανάστευση και τη σηματοδότηση. Τα ολιγοδενδροκύτταρα συγκεκριμένα, εκφράζουν τους υποδοχείς LPA₁ [530-533] και LPA₃ [533]. Κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των ολιγοδενδροκυττάρων, η έκφραση της ATX αυξάνεται [28, 534] και φαίνεται ότι εκφράζεται παροδικά σε ώριμα προ-ολιγοδενδροκύτταρα [187]. Η ATX διεγείρει την αναδιοργάνωση των εστιακών συμφύσεων στην πρόσθια άκρη των ολιγοδενδρικών προεξοχών [535]. Επίσης, αποδείχθηκε ότι το εξωγενές LPA αυξάνει τα επίπεδα mRNA της μυελίνης (myelin basic protein, MBP) στα διαφοροποιημένα ολιγοδενδροκύτταρα όταν η έκφραση της ATX είναι μειωμένη [536]. Η συμμετοχή του LPA στην επαναμυελίνωση αποδόθηκε στη σηματοδότηση μέσω υποδοχέα LPA₁ [537]. Σε αντίθεση με τα παραπάνω δεδομένα, το LPA έχει επίσης συνδεθεί με απομυελίνωση της ραχιαίας ρίζας με τη μεσολάβηση του υποδοχέα LPA₁, μετά από νευρική βλάβη [538, 539]. Τα παραπάνω δεδομένα συνεπάγονται συμμετοχή της ATX στις διαδικασίες απομυελίνωσης/ επαναμυελίνωσης, εμπλέκοντας την έτσι στην παθοφυσιολογία της ΣκΠ.

Το FTY720 (Fingolimod), το πρώτο δια στόματος φάρμακο που εγκρίθηκε για την θεραπεία της ΣκΠ, είναι ένας αγωνιστής του υποδοχέα S1P [540]. *In vivo*, το FTY720 φωσφορυλιώνεται σε FTY720-P και αποτρέπει την έξοδο των λεμφοκυττάρων από τους λεμφαδένες μέσω δέσμευσης του υποδοχέα του S1P1, μειώνοντας έτσι την είσοδο των παθογόνων λεμφοκυττάρων στο ΚΝΣ [540]. Εκτός

από το S1P, το FTY720-P αναστέλλει την ATX *in vitro* και *in vivo* [541], ενώ το (S)-FTY720, ένας S1P αναστολέας ανάλογος του FTY720 μπορεί επίσης να δρα ως αναστολέας ATX [542]. Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι το FTY720 και όχι το FTY720-P μπορεί να αναστείλει την PLA2 *in vitro* [543, 544]. Είναι πιθανό το θεραπευτικό αποτέλεσμα του FTY720 να συνδέεται με την αναστολή της ATX (ή της PLA2), μέσω διαμόρφωσης σηματοδότησης LPC και/ή LPA.

Βιβλιογραφία

- 1.Stracke, M.L., et al., Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility-stimulating protein. *J Biol Chem*, 1992. 267(4): p. 2524-9.
- 2.Liotta, L.A., R.A. Guirguis, and E. Schiffmann, Tumor autocrine motility factor. *Prog Clin Biol Res*, 1986. 212: p. 17-24.
- 3.Murata, J., et al., cDNA cloning of the human tumor motility-stimulating protein, autotaxin, reveals a homology with phosphodiesterases. *J Biol Chem*, 1994. 269(48): p. 30479-84.
- 4.Bollen, M., et al., Nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases on the move. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2000. 35(6): p. 393-432.
- 5.Lee, H.Y., et al., Stimulation of tumor cell motility linked to phosphodiesterase catalytic site of autotaxin. *J Biol Chem*, 1996. 271(40): p. 24408-12.
- 6.Kawagoe, H., et al., Expression and transcriptional regulation of the PD-lalpha/autotaxin gene in neuroblastoma. *Cancer Res*, 1997. 57(12): p. 2516-21.
- 7.Giganti, A., et al., Murine and human autotaxin alpha, beta, and gamma isoforms: gene organization, tissue distribution, and biochemical characterization. *J Biol Chem*, 2008. 283(12): p. 7776-89.
- 8.Tokumura, A., et al., Identification of human plasma lysophospholipase D, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, as autotaxin, a multifunctional phosphodiesterase. *J Biol Chem*, 2002. 277(42): p. 39436-42.
- 9.Umez-Goto, M., et al., Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. *J Cell Biol*, 2002. 158(2): p. 227-33.
- 10.Ferry, G., et al., Autotaxin is released from adipocytes, catalyzes lysophosphatidic acid synthesis, and activates preadipocyte proliferation. Up-regulated expression with adipocyte differentiation and obesity. *J Biol Chem*, 2003. 278(20): p. 18162-9.
- 11.Valentine, W.J., et al., Lysophospholipid signaling: beyond the EDGs. *Biochim Biophys Acta*, 2008. 1780(3): p. 597-605.
- 12.Noguchi, K., et al., Lysophosphatidic acid (LPA) and its receptors. *Curr Opin Pharmacol*, 2009. 9(1): p. 15-23.
- 13.Mutoh, T. and J. Chun, Lysophospholipid activation of G protein-coupled receptors. *Subcell Biochem*, 2008. 49: p. 269-97.
- 14.Albers, H.M., et al., Boronic acid-based inhibitor of autotaxin reveals rapid turnover of LPA in the circulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(16): p. 7257-62.
- 15.Mazereeuw-Hautier, J., et al., Production of lysophosphatidic acid in blister fluid: involvement of a lysophospholipase D activity. *J Invest Dermatol*, 2005. 125(3): p. 421-7.
- 16.Hammack, B.N., et al., Proteomic analysis of multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *Mult Scler*, 2004. 10(3): p. 245-60.
- 17.Sato, K., et al., Identification of autotaxin as a neurite retraction-inducing factor of PC12 cells in cerebrospinal fluid and its possible sources. *J Neurochem*, 2005. 92(4): p. 904-14.
- 18.Koh, E., et al., Novel point mutations attenuate autotaxin activity. *Lipids Health Dis*, 2009. 8: p. 4.
- 19.Tokumura, A., et al., Peritoneal fluids from patients with certain gynecologic tumor contain elevated levels of bioactive lysophospholipase D activity. *Life Sci*, 2007. 80(18): p. 1641-9.
- 20.Nakamura, K., et al., Validation of an autotaxin enzyme immunoassay in human serum samples and its application to hypoalbuminemia differentiation. *Clin Chim Acta*, 2008. 388(1-2): p. 51-8.
- 21.Masuda, A., et al., Serum autotaxin measurement in haematological malignancies: a promising marker for follicular lymphoma. *Br J Haematol*, 2008. 143(1): p. 60-70.
- 22.Morishige, J., et al., Production of bioactive lysophosphatidic acid by lysophospholipase D in hen egg white. *Biochim Biophys Acta*, 2007. 1771(4): p. 491-9.
- 23.Nakamura, K., et al., Analysis of serum and urinary lysophospholipase D/autotaxin in nephrotic syndrome. *Clin Chem Lab Med*, 2008. 46(1): p. 150-1.
- 24.Noichi, H., et al., Stimulatory role of lysophosphatidic acid in cyclooxygenase-2 induction by synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis in fibroblast-like synovial cells. *J Immunol*, 2008. 181(7): p. 5111-9.
- 25.Aoki, J., A. Inoue, and S. Okudaira, Two pathways for lysophosphatidic acid production. *Biochim Biophys Acta*, 2008. 1781(9): p. 513-8.
- 26.Dusaulcy, R., et al., Adipose-specific disruption of autotaxin enhances nutritional fattening and reduces plasma lysophosphatidic acid. *J Lipid Res*, 2011. 52(6): p. 1247-55.
- 27.Bachner, D., et al., Developmental expression analysis of murine autotaxin (ATX). *Mech Dev*, 1999. 84(1-2): p. 121-5.
- 28.Fuss, B., et al., Phosphodiesterase I, a novel adhesion molecule and/or cytokine involved in oligodendrocyte function. *J Neurosci*, 1997. 17(23): p. 9095-103.
- 29.Hoelzinger, D.B., et al., Gene expression profile of glioblastoma multiforme invasive phenotype points to new therapeutic targets. *Neoplasia*, 2005. 7(1): p. 7-16.
- 30.Jethwa, S.A., et al., Exosomes bind autotaxin and act as a physiological delivery mechanism to stimulate LPA receptor signalling in cells. *J Cell Sci*, 2016.

31. Williams, T.M., et al., Candidate downstream regulated genes of HOX group 13 transcription factors with and without monomeric DNA binding capability. *Dev Biol*, 2005. 279(2): p. 462-80.
32. Black, E.J., et al., Microarray analysis identifies Autotaxin, a tumour cell motility and angiogenic factor with lysophospholipase D activity, as a specific target of cell transformation by v-Jun. *Oncogene*, 2004. 23(13): p. 2357-66.
33. Sioletic, S., et al., c-Jun promotes cell migration and drives expression of the motility factor ENPP2 in soft tissue sarcomas. *J Pathol*, 2014. 234(2): p. 190-202.
34. Azare, J., et al., Stat3 mediates expression of autotaxin in breast cancer. *PLoS One*, 2011. 6(11): p. e27851.
35. Farina, A.R., et al., Constitutive autotaxin transcription by Nmyc-amplified and non-amplified neuroblastoma cells is regulated by a novel AP-1 and SP-mediated mechanism and abrogated by curcumin. *FEBS Lett*, 2012. 586(20): p. 3681-91.
36. Ryborg, A.K., et al., Lysophosphatidylcholine induces keratinocyte differentiation and upregulation of AP-1- and NF-kappaB DNA-binding activity. *Acta Derm Venereol*, 2004. 84(6): p. 433-8.
37. Braeuer, R.R., et al., Galectin-3 contributes to melanoma growth and metastasis via regulation of NFAT1 and autotaxin. *Cancer Res*, 2012. 72(22): p. 5757-66.
38. Chen, M. and K.L. O'Connor, Integrin alpha6beta4 promotes expression of autotaxin/ENPP2 autocrine motility factor in breast carcinoma cells. *Oncogene*, 2005. 24(32): p. 5125-30.
39. Lovas, A., et al., p100 Deficiency is insufficient for full activation of the alternative NF-kappaB pathway: TNF cooperates with p52-RelB in target gene transcription. *PLoS One*, 2012. 7(8): p. e42741.
40. Corcoran, D.L., et al., Footer: a quantitative comparative genomics method for efficient recognition of cis-regulatory elements. *Genome Res*, 2005. 15(6): p. 840-7.
41. Sun, S., et al., Autotaxin Expression Is Regulated at the Post-transcriptional Level by the RNA-binding Proteins HuR and AUF1. *The Journal of biological chemistry*, 2016. 291(50): p. 25823-25836.
42. Kaffe, E., et al., Hepatocyte Autotaxin expression promotes liver fibrosis and cancer. *Hepatology*, 2016.
43. Nikitopoulou, I., et al., Autotaxin expression from synovial fibroblasts is essential for the pathogenesis of modeled arthritis. *J Exp Med*, 2012. 209(5): p. 925-33.
44. Benesch, M.G., et al., Regulation of autotaxin expression and secretion by lysophosphatidate and sphingosine 1-phosphate. *J Lipid Res*, 2015. 56(6): p. 1134-44.
45. Wu, J.M., et al., Autotaxin expression and its connection with the TNF-alpha-NF-kappaB axis in human hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer*, 2010. 9: p. 71.
46. Moolenaar, W.H., L.A. van Meeteren, and B.N. Giepmans, The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. *Bioessays*, 2004. 26(8): p. 870-81.
47. Song, J., et al., Type I Interferons Function as Autocrine and Paracrine Factors to Induce Autotaxin in Response to TLR Activation. *PLoS One*, 2015. 10(8): p. e0136629.
48. van Meeteren, L.A., et al., Inhibition of Autotaxin by Lysophosphatidic Acid and Sphingosine 1-Phosphate. *J Biol Chem*, 2005. 280(22): p. 21155-21161.
49. Hashimoto, T., et al., Identification and biochemical characterization of a novel autotaxin isoform, ATXdelta, with a four-amino acid deletion. *J Biochem*, 2012. 151(1): p. 89-97.
50. van Meeteren, L.A. and W.H. Moolenaar, Regulation and biological activities of the autotaxin-LPA axis. *Prog Lipid Res*, 2007. 46(2): p. 145-60.
51. Kawagoe, H., et al., Molecular cloning and chromosomal assignment of the human brain-type phosphodiesterase I/nucleotide pyrophosphatase gene (PDNP2). *Genomics*, 1995. 30(2): p. 380-4.
52. Houben, A.J., et al., The polybasic insertion in autotaxin alpha confers specific binding to heparin and cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem*, 2013. 288(1): p. 510-9.
53. Gijssbers, R., et al., Structural and catalytic similarities between nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases and alkaline phosphatases. *J Biol Chem*, 2001. 276(2): p. 1361-8.
54. M, B., et al., Nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases on the move. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2000. 35(6): p. 393-432.
55. M, J., Autotaxin: its role in biology of melanoma cells and as a pharmacological target. *Enzyme Res*, 2011. 8: p. 194857.
56. K, N., H. K, and A. J., - Autotaxin--an LPA producing enzyme with diverse functions. *J Biochem*, 2010. 148(1): p. 13-24.
57. Kawamoto, T., et al., Distribution of urinary hippuric acid concentrations by ALDH2 genotype. *Occup Environ Med*, 1994. 51(12): p. 817-21.
58. Jansen, S., et al., Proteolytic maturation and activation of autotaxin (NPP2), a secreted metastasis-enhancing lysophospholipase D. *J Cell Sci*, 2005. 118(Pt 14): p. 3081-9.
59. Stracke, M.L., T. Clair, and L.A. Liotta, Autotaxin, tumor motility-stimulating exophosphodiesterase. *Adv Enzyme Regul*, 1997. 37: p. 135-44.
60. Koike, S., et al., The N-terminal hydrophobic sequence of autotaxin (ENPP2) functions as a signal peptide. *Genes Cells*, 2006. 11(2): p. 133-42.
61. Cimpean, A., et al., Substrate-specifying determinants of the nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases NPP1 and NPP2. *Biochem J*, 2004. 381(Pt 1): p. 71-7.
62. Nishimasu, H., et al., A 3D view of autotaxin. *Trends Pharmacol Sci*, 2012. 33(3): p. 138-45.

- 63.Stefan, C., S. Jansen, and M. Bollen, NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. *Trends Biochem Sci*, 2005. 30(10): p. 542-50.
- 64.AJ, H. and M. WH, - Autotaxin and LPA receptor signaling in cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 2011. 16: p. 16.
- 65.VA, B. and H. T, - Regulation of mammalian physiology, development, and disease by the sphingosine. *Chem Rev*, 2011. 111(10): p. 6299-320.
- 66.van Meeteren, L.A., et al., Inhibition of autotaxin by lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *J Biol Chem*, 2005. 280(22): p. 21155-61.
- 67.LA, v.M., et al., - Inhibition of autotaxin by lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *J Biol Chem*, 2005. 280(22): p. 21155-61.
- 68.Gijsbers, R., et al., The hydrolysis of lysophospholipids and nucleotides by autotaxin (NPP2) involves a single catalytic site. *FEBS Lett*, 2003. 538(1-3): p. 60-4.
- 69.Jansen, S., et al., An essential oligomannosidic glycan chain in the catalytic domain of autotaxin, a secreted lysophospholipase-D. *J Biol Chem*, 2007. 282(15): p. 11084-91.
- 70.Pradere, J.P., et al., Secretion and lysophospholipase D activity of autotaxin by adipocytes are controlled by N-glycosylation and signal peptidase. *Biochim Biophys Acta*, 2007. 1771(1): p. 93-102.
- 71.Stracke, M.L., et al., Autotaxin is an N-linked glycoprotein but the sugar moieties are not needed for its stimulation of cellular motility. *Melanoma Res*, 1995. 5(4): p. 203-9.
- 72.Lee, J., et al., Enzymatic activation of autotaxin by divalent cations without EF-hand loop region involvement. *Biochem Pharmacol*, 2001. 62(2): p. 219-24.
- 73.Wykle, R.L. and J.M. Schremmer, A lysophospholipase D pathway in the metabolism of ether-linked lipids in brain microsomes. *J Biol Chem*, 1974. 249(6): p. 1742-6.
- 74.Kawasaki, T. and F. Snyder, The metabolism of lyso-platelet-activating factor (1-O-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphocholine) by a calcium-dependent lysophospholipase D in rabbit kidney medulla. *Biochim Biophys Acta*, 1987. 920(1): p. 85-93.
- 75.Tokumura, A., et al., Metal-ion stimulation and inhibition of lysophospholipase D which generates bioactive lysophosphatidic acid in rat plasma. *Lipids*, 1998. 33(10): p. 1009-15.
- 76.Gesta, S., et al., Secretion of a lysophospholipase D activity by adipocytes: involvement in lysophosphatidic acid synthesis. *J Lipid Res*, 2002. 43(6): p. 904-10.
- 77.Belli, S.I., A. Sali, and J.W. Goding, Divalent cations stabilize the conformation of plasma cell membrane glycoprotein PC-1 (alkaline phosphodiesterase I). *Biochem J*, 1994. 304 (Pt 1): p. 75-80.
- 78.Nieto-Posadas, A., A. Jara-Oseguera, and T. Rosenbaum, TRP channel gating physiology. *Curr Top Med Chem*, 2011. 11(17): p. 2131-50.
- 79.Andersson, D.A., M. Nash, and S. Bevan, Modulation of the cold-activated channel TRPM8 by lysophospholipids and polyunsaturated fatty acids. *J Neurosci*, 2007. 27(12): p. 3347-55.
- 80.Fujiwara, Y., Cyclic phosphatidic acid - a unique bioactive phospholipid. *Biochim Biophys Acta*, 2008. 1781(9): p. 519-24.
- 81.Nixon, G.F., F.A. Mathieson, and I. Hunter, The multi-functional role of sphingosylphosphorylcholine. *Prog Lipid Res*, 2008. 47(1): p. 62-75.
- 82.Makide, K., et al., Emerging lysophospholipid mediators, lysophosphatidylserine, lysophosphatidylthreonine, lysophosphatidylethanolamine and lysophosphatidylglycerol. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2009. 89(3-4): p. 135-9.
- 83.Ojala, P.J., et al., Acyl chain-dependent effect of lysophosphatidylcholine on human neutrophils. *J Leukoc Biol*, 2007. 82(6): p. 1501-9.
- 84.Croset, M., et al., Characterization of plasma unsaturated lysophosphatidylcholines in human and rat. *Biochem J*, 2000. 345 Pt 1: p. 61-7.
- 85.Wiesner, P., et al., Lipid profiling of FPLC-separated lipoprotein fractions by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Lipid Res*, 2009. 50(3): p. 574-85.
- 86.Funk, C.D., Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*, 2001. 294(5548): p. 1871-5.
- 87.Burke, J.E. and E.A. Dennis, Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *J Lipid Res*, 2009. 50 Suppl: p. S237-42.
- 88.Magrioti, V. and G. Kokotos, Phospholipase A2 inhibitors for the treatment of inflammatory diseases: a patent review (2010--present). *Expert Opin Ther Pat*, 2013. 23(3): p. 333-44.
- 89.Rousset, X., et al., Lecithin: cholesterol acyltransferase--from biochemistry to role in cardiovascular disease. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2009. 16(2): p. 163-71.
- 90.Gauster, M., et al., Endothelial lipase releases saturated and unsaturated fatty acids of high density lipoprotein phosphatidylcholine. *J Lipid Res*, 2005. 46(7): p. 1517-25.
- 91.Aoki, J., Mechanisms of lysophosphatidic acid production. *Semin Cell Dev Biol*, 2004. 15(5): p. 477-89.
- 92.Baker D.L., et al., Quantitative analysis of lysophosphatidic acid in human blood fractions. *Ann N Y Acad Sci*, 2000. 905: p. 267-9.
- 93.Baker D.L., et al., Plasma lysophosphatidic acid concentration and ovarian cancer. *JAMA*, 2002. 287(23): p. 3081-2.

- 94.Sano, T., et al., Multiple mechanisms linked to platelet activation result in lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate generation in blood. *J Biol Chem*, 2002. 277(24): p. 21197-206.
- 95.Bolen, A.L., et al., The phospholipase A1 activity of lysophospholipase A-I links platelet activation to LPA production during blood coagulation. *J Lipid Res*, 2011. 52(5): p. 958-70.
- 96.Block, R.C., et al., The effects of EPA, DHA, and aspirin ingestion on plasma lysophospholipids and autotaxin. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2010. 82(2-3): p. 87-95.
- 97.Anliker, B. and J. Chun, Cell surface receptors in lysophospholipid signaling. *Semin Cell Dev Biol*, 2004. 15(5): p. 457-65.
- 98.Tanaka, M., et al., Autotaxin stabilizes blood vessels and is required for embryonic vasculature by producing lysophosphatidic acid. *J Biol Chem*, 2006. 281(35): p. 25822-30.
- 99.van Meeteren, L.A., et al., Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development. *Mol Cell Biol*, 2006. 26(13): p. 5015-22.
- 100.Fotopoulou, S., et al., ATX expression and LPA signalling are vital for the development of the nervous system. *Dev Biol*, 2010. 339(2): p. 451-64.
- 101.Gierse, J., et al., A novel autotaxin inhibitor reduces lysophosphatidic acid levels in plasma and the site of inflammation. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010. 334(1): p. 310-7.
- 102.Nishimasu, H., et al., Crystal structure of autotaxin and insight into GPCR activation by lipid mediators. *Nat Struct Mol Biol*, 2011. 18(2): p. 205-12.
- 103.Fulkerson, Z., et al., Binding of autotaxin to integrins localizes lysophosphatidic acid production to platelets and mammalian cells. *J Biol Chem*, 2011. 286(40): p. 34654-63.
- 104.Hausmann, J., et al., Structural basis of substrate discrimination and integrin binding by autotaxin. *Nat Struct Mol Biol*, 2011. 18(2): p. 198-204.
- 105.Luquain, C., V.A. Sciorra, and A.J. Morris, Lysophosphatidic acid signaling: how a small lipid does big things. *Trends Biochem Sci*, 2003. 28(7): p. 377-83.
- 106.Kai, M., et al., Cloning and characterization of two human isozymes of Mg²⁺-independent phosphatidic acid phosphatase. *J Biol Chem*, 1997. 272(39): p. 24572-8.
- 107.Hooks, S.B., S.P. Ragan, and K.R. Lynch, Identification of a novel human phosphatidic acid phosphatase type 2 isoform. *FEBS Lett*, 1998. 427(2): p. 188-92.
- 108.Zhang, Q.X., et al., Identification of structurally important domains of lipid phosphate phosphatase-1: implications for its sites of action. *Biochem J*, 2000. 345 Pt 2: p. 181-4.
- 109.Brindley, D.N. and C. Pilquill, Lipid phosphate phosphatases and signaling. *J Lipid Res*, 2009.50Suppl:p.S225-30.
- 110.Roberts, R., V.A. Sciorra, and A.J. Morris, Human type 2 phosphatidic acid phosphohydrolases. Substrate specificity of the type 2a, 2b, and 2c enzymes and cell surface activity of the 2a isoform. *J Biol Chem*, 1998. 273(34): p. 22059-67.
- 111.Tomsig, J.L., et al., Lipid phosphate phosphohydrolase type 1 (LPP1) degrades extracellular lysophosphatidic acid in vivo. *Biochem J*, 2009. 419(3): p. 611-8.
- 112.Yue, J., et al., Mice with transgenic overexpression of lipid phosphate phosphatase-1 display multiple organotypic deficits without alteration in circulating lysophosphatidate level. *Cell Signal*, 2004. 16(3): p. 385-99.
- 113.Hecht, J.H., et al., Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex. *J Cell Biol*, 1996. 135(4): p. 1071-83.
- 114.An, S., et al., Characterization of a novel subtype of human G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid. *J Biol Chem*, 1998. 273(14): p. 7906-10.
- 115.Bandoh, K., et al., Molecular cloning and characterization of a novel human G-protein-coupled receptor, EDG7, for lysophosphatidic acid. *J Biol Chem*, 1999. 274(39): p. 27776-85.
- 116.Noguchi, K., S. Ishii, and T. Shimizu, Identification of p2y9/GPR23 as a novel G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid, structurally distant from the Edg family. *J Biol Chem*, 2003. 278(28): p. 25600-6.
- 117.Lee, C.W., et al., GPR92 as a new G12/13- and Gq-coupled lysophosphatidic acid receptor that increases cAMP, LPA5. *J Biol Chem*, 2006. 281(33): p. 23589-97.
- 118.Tabata, K., et al., The orphan GPCR GPR87 was deorphanized and shown to be a lysophosphatidic acid receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. 363(3): p. 861-6.
- 119.Pasternack, S.M., et al., G protein-coupled receptor P2Y5 and its ligand LPA are involved in maintenance of human hair growth. *Nat Genet*, 2008. 40(3): p. 329-34.
- 120.Gilman, A.G., G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem*, 1987. 56: p. 615-49.
- 121.Wettschurek, N. and S. Offermanns, Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev*, 2005. 85(4): p. 1159-204.
- 122.Choi, J.W., et al., LPA receptors: subtypes and biological actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2010. 50: p. 157-86.
- 123.Marinissen, M.J. and J.S. Gutkind, G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci*, 2001. 22(7): p. 368-76.
- 124.Yung, Y.C., N.C. Stoddard, and J. Chun, LPA receptor signaling: pharmacology, physiology, and pathophysiology. *J Lipid Res*, 2014. 55(7): p. 1192-214.

- 125.Inoue, A., et al., LPA-producing enzyme PA-PLA(1) α regulates hair follicle development by modulating EGFR signalling. *Embo J*, 2011. 30(20): p. 4248-60.
- 126.Stoddard, N.C. and J. Chun, Promising pharmacological directions in the world of lysophosphatidic Acid signaling. *Biomol Ther (Seoul)*, 2015. 23(1): p. 1-11.
- 127.Ohuchi, H., et al., Diversified expression patterns of autotaxin, a gene for phospholipid-generating enzyme during mouse and chicken development. *Dev Dyn*, 2007. 236(4): p. 1134-43.
- 128.Liszewska, E., et al., Lysophosphatidic acid signaling during embryo development in sheep: involvement in prostaglandin synthesis. *Endocrinology*, 2009. 150(1): p. 422-34.
- 129.Moolenaar, W.H., et al., Autotaxin in embryonic development. *Biochimica et biophysica acta*, 2012.
- 130.Ferry, G., et al., Functional invalidation of the autotaxin gene by a single amino acid mutation in mouse is lethal. *FEBS Lett*, 2007. 581(18): p. 3572-3578.
- 131.Katsifa, A., et al., The Bulk of Autotaxin Activity Is Dispensable for Adult Mouse Life. *PLoS One*, 2015. 10(11): p. e0143083.
- 132.Masuda, A., et al., Serum autotaxin measurements in pregnant women: application for the differentiation of normal pregnancy and pregnancy-induced hypertension. *Clin Chim Acta*, 2011. 412(21-22): p. 1944-50.
- 133.Tokumura, A., et al., Increased production of bioactive lysophosphatidic acid by serum lysophospholipase D in human pregnancy. *Biol Reprod*, 2002. 67(5): p. 1386-92.
- 134.Tokumura, A., et al., Altered activity of lysophospholipase D, which produces bioactive lysophosphatidic acid and choline, in serum from women with pathological pregnancy. *Mol Hum Reprod*, 2009. 15(5): p. 301-10.
- 135.Erenel, H., et al., Maternal serum autotaxin levels in early- and late-onset preeclampsia. *Hypertension in Pregnancy*, 2017. 36(4): p. 310-314.
- 136.Kremer, A.E., et al., Autotaxin activity has a high accuracy to diagnose intrahepatic cholestasis of pregnancy. *J Hepatol*, 2015. 62(4): p. 897-904.
- 137.Sozen, I., et al., Placental autotaxin expression is diminished in women with pre-eclampsia. *Hypertens Pregnancy*, 2015. 41(9): p. 1406-11.
- 138.Rogers, M.S., et al., Genetic loci that control the angiogenic response to basic fibroblast growth factor. *FASEB J*, 2004. 18(10): p. 1050-9.
- 139.Yukiura, H., et al., Autotaxin regulates vascular development via multiple lysophosphatidic acid (LPA) receptors in zebrafish. *The Journal of biological chemistry*, 2011. 286(51): p. 43972-83.
- 140.Offermanns, S., et al., Vascular system defects and impaired cell chemokinesis as a result of Galpha13 deficiency. *Science*, 1997. 275(5299): p. 533-6.
- 141.Panetti, T.S., et al., Extracellular matrix molecules regulate endothelial cell migration stimulated by lysophosphatidic acid. *J Thromb Haemost*, 2004. 2(9): p. 1645-56.
- 142.Yukiura, H., et al., Autotaxin Overexpression Causes Embryonic Lethality and Vascular Defects. *PLOS ONE*, 2015. 10(5): p. e0126734.
- 143.Ren, H., et al., Lipid phosphate phosphatase (LPP3) and vascular development. *Biochimica et biophysica acta*, 2013. 1831(1): p. 126-32.
- 144.Escalante-Alcalde, D., et al., The lipid phosphatase LPP3 regulates extra-embryonic vasculogenesis and axis patterning. *Development*, 2003. 130(19): p. 4623-37.
- 145.Kazlauskas, A., Lysophosphatidic acid contributes to angiogenic homeostasis. *Exp Cell Res*, 2015. 333(2): p. 166-70.
- 146.Chen, Y., D.P. Ramakrishnan, and B. Ren, Regulation of angiogenesis by phospholipid lysophosphatidic Acid. *Front Biosci*, 2013. 18: p. 852-61.
- 147.Schober, A. and W. Siess, Lysophosphatidic acid in atherosclerotic diseases. *Br J Pharmacol*, 2012.
- 148.Abel-Latif, A., et al., Lysophospholipids in coronary artery and chronic ischemic heart disease. *Curr Opin Lipidol*, 2015. 26(5): p. 432-7.
- 149.Zhou, Z., et al., Lipoprotein-derived lysophosphatidic acid promotes atherosclerosis by releasing CXCL1 from the endothelium. *Cell Metab*, 2011. 13(5): p. 592-600.
- 150.Llodra, J., et al., Emigration of monocyte-derived cells from atherosclerotic lesions characterizes regressive, but not progressive, plaques. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(32): p. 11779-84.
- 151.Chang, C.L., et al., Lysophosphatidic acid-induced interleukin-1 beta expression is mediated through Gi/Rho and the generation of reactive oxygen species in macrophages. *J Biomed Sci*, 2008. 15(3): p. 357-63.
- 152.Tokumura, A., et al., Increased formation of lysophosphatidic acids by lysophospholipase D in serum of hypercholesterolemic rabbits. *J Lipid Res*, 2002. 43(2): p. 307-15.
- 153.Nishimura, S., et al., ENPP2 contributes to adipose tissue expansion in diet-induced obesity. *Diabetes*, 2014. 63(12): p. 4154-4164.
- 154.Federico, L., et al., Autotaxin and its product lysophosphatidic acid suppress brown adipose differentiation and promote diet-induced obesity in mice. *Mol Endocrinol*, 2012. 26(5): p. 786-97.
- 155.Rancoule, C., et al., Involvement of autotaxin/lysophosphatidic acid signaling in obesity and impaired glucose homeostasis. *Biochimie*, 2013.
- 156.Lee, J., et al., Autotaxin stimulates urokinase-type plasminogen activator expression through phosphoinositide 3-kinase-Akt-nuclear [corrected] factor kappa B signaling cascade in human melanoma cells. *Melanoma Res*, 2006. 16(5): p. 445-52.

157. Xu, X. and G.D. Prestwich, Inhibition of tumor growth and angiogenesis by a lysophosphatidic acid antagonist in an engineered three-dimensional lung cancer xenograft model. *Cancer*, 2010. 116(7): p. 1739-50.

158. Magkrioti, C., et al., The Autotaxin-Lysophosphatidic Acid Axis Promotes Lung Carcinogenesis. *Cancer Res*, 2018. 78(13): p. 3634-3644.

159. Yang, Y., et al., Autotaxin expression in non-small-cell lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1999. 21(2): p. 216-22.

160. Okabe, K., et al., Possible involvement of lysophosphatidic acid receptor-5 gene in the acquisition of growth advantage of rat tumor cells. *Mol Carcinog*, 2011. 50(8): p. 635-42.

161. Hayashi, M., et al., Loss of lysophosphatidic acid receptor-3 enhances cell migration in rat lung tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011. 405(3): p. 450-4.

162. Schneider, G., et al., Novel pleiotropic effects of bioactive phospholipids in human lung cancer metastasis. *Oncotarget*, 2017. 8(35): p. 58247-58263.

163. Liu, S., et al., Expression of autotaxin and lysophosphatidic acid receptors increases mammary tumorigenesis, invasion, and metastases. *Cancer Cell*, 2009. 15(6): p. 539-50.

164. Benesch, M.G., et al., Tumor-induced inflammation in mammary adipose tissue stimulates a vicious cycle of autotaxin expression and breast cancer progression. *FASEB J*, 2015.

165. Peyruchaud, O., R. Leblanc, and M. David, Pleiotropic activity of lysophosphatidic acid in bone metastasis. *Biochimica et biophysica acta*, 2013. 1831(1): p. 99-104.

166. Leblanc, R., et al., Interaction of platelet-derived autotaxin with tumor integrin $\alpha V\beta 3$ controls metastasis of breast cancer cells to bone. *Blood*, 2014.

167. Kime, C., et al., Autotaxin-mediated lipid signaling intersects with LIF and BMP signaling to promote the naive pluripotency transcription factor program. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016. 113(44): p. 12478-12483.

168. Benesch, M.G.K., et al., Lysophosphatidate Signaling: The Tumor Microenvironment's New Nemesis. *Trends Cancer*, 2017. 3(11): p. 748-752.

169. Barbayianni, E., et al., Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, as a promising therapeutic target in chronic inflammation and cancer. *Prog Lipid Res*, 2015. 58: p. 76-96.

170. Yuelling, L.M. and B. Fuss, Autotaxin (ATX): A multi-functional and multi-modular protein possessing enzymatic lysoPLD activity and matricellular properties. *Biochim Biophys Acta*, 2008. 1781(9): p. 525-30.

171. Nam, S.W., et al., Autotaxin (ATX), a potent tumor motogen, augments invasive and metastatic potential of ras-transformed cells. *Oncogene*, 2000. 19(2): p. 241-7.

172. Nam, S.W., et al., Autotaxin (NPP-2), a metastasis-enhancing motogen, is an angiogenic factor. *Cancer Res*, 2001. 61(18): p. 6938-44.

173. Wolter, S., et al., Inducible expression of a constitutively active mutant of mitogen-activated protein kinase kinase 7 specifically activates c-JUN NH2-terminal protein kinase, alters expression of at least nine genes, and inhibits cell proliferation. *J Biol Chem*, 2002. 277(5): p. 3576-84.

174. Li, S. and J. Zhang, Lipopolysaccharide induces autotaxin expression in human monocytic THP-1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. 378(2): p. 264-8.

175. Wang, W., et al., Inhibition of invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma cells via targeting RhoC in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res*, 2008. 14(21): p. 6804-12.

176. Huang, R.Y., et al., Lysophosphatidic acid induces ovarian cancer cell dispersal by activating Fyn kinase associated with p120-catenin. *Int J Cancer*, 2008. 123(4): p. 801-9.

177. Kenny, P.A., T. Enver, and A. Ashworth, Receptor and secreted targets of Wnt-1/beta-catenin signalling in mouse mammary epithelial cells. *BMC Cancer*, 2005. 5: p. 3.

178. Tice, D.A., et al., Synergistic induction of tumor antigens by Wnt-1 signaling and retinoic acid revealed by gene expression profiling. *J Biol Chem*, 2002. 277(16): p. 14329-35.

179. Valdes-Rives, S.A. and A. Gonzalez-Arenas, Autotaxin-Lysophosphatidic Acid: From Inflammation to Cancer Development. *Mediators Inflamm*, 2017. 2017: p. 9173090.

180. Dennis, J., L. Nogaroli, and B. Fuss, Phosphodiesterase-1 α /autotaxin (PD-1 α /ATX): a multifunctional protein involved in central nervous system development and disease. *J Neurosci Res*, 2005. 82(6): p. 737-42.

181. Bickelhaupt, S., et al., Effects of CTGF Blockade on Attenuation and Reversal of Radiation-Induced Pulmonary Fibrosis. *J Natl Cancer Inst*, 2017. 109(8).

182. Sakai, N., et al., Lysophosphatidic acid signaling through its receptor initiates profibrotic epithelial cell fibroblast communication mediated by epithelial cell derived connective tissue growth factor. *Kidney Int*, 2017. 91(3): p. 628-641.

183. Inoue, M., et al., Simultaneous stimulation of spinal NK1 and NMDA receptors produces LPC which undergoes ATX-mediated conversion to LPA, an initiator of neuropathic pain. *J Neurochem*, 2008. 107(6): p. 1556-65.

184. Inoue, M., et al., Lysophosphatidylcholine induces neuropathic pain through an action of autotaxin to generate lysophosphatidic acid. *Neuroscience*, 2008. 152(2): p. 296-8.

185. Inoue, M., et al., Autotaxin, a synthetic enzyme of lysophosphatidic acid (LPA), mediates the induction of nerve-injured neuropathic pain. *Mol Pain*, 2008. 4: p. 6.

186. Fox, M.A., et al., Phosphodiesterase-I α /autotaxin controls cytoskeletal organization and FAK phosphorylation during myelination. *Mol Cell Neurosci*, 2004. 27(2): p. 140-50.

- 187.Fox, M.A., et al., Phosphodiesterase-lalpha/autotaxin: a counteradhesive protein expressed by oligodendrocytes during onset of myelination. *Mol Cell Neurosci*, 2003. 23(3): p. 507-19.
- 188.Wheeler, N.A., J.A. Lister, and B. Fuss, The Autotaxin-Lysophosphatidic Acid Axis Modulates Histone Acetylation and Gene Expression during Oligodendrocyte Differentiation. *J Neurosci*, 2015. 35(32): p. 11399-414.
- 189.Kim, S.E., et al., Genome-wide analysis identifies colonic genes differentially associated with serum leptin and insulin concentrations in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *PLoS One*, 2017. 12(2): p. e0171664.
- 190.Hino, K., et al., Activin-A enhances mTOR signaling to promote aberrant chondrogenesis in fibrodysplasia ossificans progressiva. *J Clin Invest*, 2017. 127(9): p. 3339-3352.
- 191.Schmitz, K., et al., Dysregulation of lysophosphatidic acids in multiple sclerosis and autoimmune encephalomyelitis. *Acta Neuropathol Commun*, 2017. 5(1): p. 42.
- 192.Sakai, N., et al., Inhibition of CTGF ameliorates peritoneal fibrosis through suppression of fibroblast and myofibroblast accumulation and angiogenesis. *Scientific Reports*, 2017. 7(1): p. 5392.
- 193.Nikitopoulou, I., et al., A metabolically-stabilized phosphonate analog of lysophosphatidic acid attenuates collagen-induced arthritis. *PLoS One*, 2013. 8(7): p. e70941.
- 194.Bourgoin, S.G. and C. Zhao, Autotaxin and lysophospholipids in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Investig Drugs*, 2010. 11(5): p. 515-26.
- 195.Orosa, B., S. Garcia, and C. Conde, The Autotaxin-Lysophosphatidic acid pathway in pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Eur J Pharmacol*, 2015: p. EJP42091.
- 196.Kanda, H., et al., Autotaxin, an ectoenzyme that produces lysophosphatidic acid, promotes the entry of lymphocytes into secondary lymphoid organs. *Nat Immunol*, 2008. 9(4): p. 415-23.
- 197.Nakasaki, T., et al., Involvement of the lysophosphatidic acid-generating enzyme autotaxin in lymphocyte-endothelial cell interactions. *Am J Pathol*, 2008. 173(5): p. 1566-76.
- 198.Zhang, Y., et al., Autotaxin through Lysophosphatidic Acid Stimulates Polarization, Motility, and Transendothelial Migration of Naive T Cells. *J Immunol*, 2012. 189(8): p. 3914-24.
- 199.Bai, Z., et al., Constitutive lymphocyte transmigration across the basal lamina of high endothelial venules is regulated by the autotaxin/lysophosphatidic acid axis. *J Immunol*, 2013. 190(5): p. 2036-48.
- 200.Knowlden, S. and S.N. Georas, The Autotaxin-LPA Axis Emerges as a Novel Regulator of Lymphocyte Homing and Inflammation. *J Immunol*, 2014. 192(3): p. 851-7.
- 201.Sun, S., et al., Blocking gp130 signaling suppresses autotaxin expression in adipocytes and improves insulin sensitivity in diet-induced obesity. 2017. 58(11): p. 2102-2113.
- 202.Ikeda, H. and Y. Yatomi, Autotaxin in liver fibrosis. *Clin Chim Acta*, 2012. 413(23-24): p. 1817-21.
- 203.Pradere, J.P., et al., Lysophosphatidic acid and renal fibrosis. *Biochimica et biophysica acta*, 2008. 1781(9): p. 582-7.
- 204.Zheng, H., J. Högberg, and U. Stenius, ATM-activated autotaxin (ATX) propagates inflammation and DNA damage in lung epithelial cells: a new mode of action for silica-induced DNA damage? *Carcinogenesis*, 2017: p. bgx100-bgx100.
- 205.Castelino, F.V., et al., An Autotaxin/Lysophosphatidic Acid/Interleukin-6 Amplification Loop Drives Scleroderma Fibrosis. *Arthritis Rheumatol*, 2016. 68(12): p. 2964-2974.
- 206.Cooke, A., et al., Infection and autoimmunity: are we winning the war, only to lose the peace? *Trends Parasitol*, 2004. 20(7): p. 316-21.
- 207.Kamradt, T., R. Goggel, and K.J. Erb, Induction, exacerbation and inhibition of allergic and autoimmune diseases by infection. *Trends Immunol*, 2005. 26(5): p. 260-7.
- 208.Christen, U. and M.G. von Herrath, Infections and autoimmunity--good or bad? *J Immunol*, 2005. 174(12): p. 7481-6.
- 209.Qin, H.Y., et al., Complete Freund's adjuvant-induced T cells prevent the development and adoptive transfer of diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol*, 1993. 150(5): p. 2072-80.
- 210.Zaccane, P., et al., *Schistosoma mansoni* antigens modulate the activity of the innate immune response and prevent onset of type 1 diabetes. *Eur J Immunol*, 2003. 33(5): p. 1439-49.
- 211.Zaccane, P., et al., *Salmonella typhimurium* infection halts development of type 1 diabetes in NOD mice. *Eur J Immunol*, 2004. 34(11): p. 3246-56.
- 212.Bach J.F., The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med*, 2002. 347(12): p. 911-20.
- 213.Loftus, E.V., Jr., Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*, 2004. 126(6): p. 1504-17.
- 214.Ponsonby, A.L., et al., Exposure to infant siblings during early life and risk of multiple sclerosis. *JAMA*, 2005. 293(4): p. 463-9.
- 215.du Bois, R.M., Idiopathic pulmonary fibrosis: present understanding and future options. *Eur Respir Rev*, 2011. 20(121): p. 132-3.
- 216.Eickelberg, O. and M. Selman, Update in diffuse parenchymal lung disease 2009. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010. 181(9): p. 883-8.
- 217.Travis, W.D., et al., An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: Update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med*, 2013. 188(6): p. 733-48.

- 218.King, T.E., Jr., A. Pardo, and M. Selman, Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet*, 2011. 378(9807): p. 1949-61.
- 219.Raghu, G., Idiopathic pulmonary fibrosis: guidelines for diagnosis and clinical management have advanced from consensus-based in 2000 to evidence-based in 2011. *Eur Respir J*, 2011. 37(4): p. 743-6.
- 220.Wilson, M.S. and T.A. Wynn, Pulmonary fibrosis: pathogenesis, etiology and regulation. *Mucosal Immunol*, 2009. 2(2): p. 103-21.
- 221.Gribbin, J., et al., Incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis in the UK. *Thorax*, 2006. 61(11): p. 980-5.
- 222.Navaratnam, V., et al., The rising incidence of idiopathic pulmonary fibrosis in the U.K. *Thorax*, 2011. 66(6): p. 462-7.
- 223.American Thoracic, S. and S. European Respiratory, American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002. 165(2): p. 277-304.
- 224.Ley, B. and H.R. Collard, Epidemiology of idiopathic pulmonary fibrosis. *Clin Epidemiol*, 2013. 5: p. 483-92.
- 225.Fernandez Perez, E.R., et al., Incidence, prevalence, and clinical course of idiopathic pulmonary fibrosis: a population-based study. *Chest*, 2010. 137(1): p. 129-37.
- 226.Raghu, G., et al., Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006. 174(7): p. 810-6.
- 227.Coultas, D.B., et al., The epidemiology of interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med*, 1994. 150(4): p. 967-72.
- 228.Thomeer, M., et al., Registration of interstitial lung diseases by 20 centres of respiratory medicine in Flanders. *Acta Clin Belg*, 2001. 56(3): p. 163-72.
- 229.von Plessen, C., O. Grinde, and A. Gulsvik, Incidence and prevalence of cryptogenic fibrosing alveolitis in a Norwegian community. *Respir Med*, 2003. 97(4): p. 428-35.
- 230.Hodgson, U., T. Laitinen, and P. Tukiainen, Nationwide prevalence of sporadic and familial idiopathic pulmonary fibrosis: evidence of founder effect among multiplex families in Finland. *Thorax*, 2002. 57(4): p. 338-42.
- 231.Karakatsani, A., et al., Epidemiology of interstitial lung diseases in Greece. *Respir Med*, 2009. 103(8): p. 1122-9.
- 232.Kolek, V., Epidemiology of cryptogenic fibrosing alveolitis in Moravia and Silesia. *Acta Univ Palacki Olomuc Fac Med*, 1994. 137: p. 49-50.
- 233.American Thoracic, S. and S. European Respiratory, American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). *Am J Respir Crit Care Med*, 2000. 161(2 Pt 1): p. 646-64.
- 234.Baumgartner, K.B., et al., Occupational and environmental risk factors for idiopathic pulmonary fibrosis: a multicenter case-control study. Collaborating Centers. *Am J Epidemiol*, 2000. 152(4): p. 307-15.
- 235.Kim, D.S., H.R. Collard, and T.E. King, Jr., Classification and natural history of the idiopathic interstitial pneumonias. *Proc Am Thorac Soc*, 2006. 3(4): p. 285-92.
- 236.Armanios, M.Y., et al., Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*, 2007. 356(13): p. 1317-26.
- 237.Tsakiri, K.D., et al., Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(18): p. 7552-7.
- 238.van Moorsel, C.H., et al., Surfactant protein C mutations are the basis of a significant portion of adult familial pulmonary fibrosis in a dutch cohort. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010. 182(11): p. 1419-25.
- 239.Wang, Y., et al., Genetic defects in surfactant protein A2 are associated with pulmonary fibrosis and lung cancer. *Am J Hum Genet*, 2009. 84(1): p. 52-9.
- 240.Hodgson, U., et al., ELMOD2 is a candidate gene for familial idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Hum Genet*, 2006. 79(1): p. 149-54.
- 241.Johnston, I.D., et al., British Thoracic Society study of cryptogenic fibrosing alveolitis: current presentation and initial management. Fibrosing Alveolitis Subcommittee of the Research Committee of the British Thoracic Society. *Thorax*, 1997. 52(1): p. 38-44.
- 242.Guerry-Force, M.L., et al., A comparison of bronchiolitis obliterans with organizing pneumonia, usual interstitial pneumonia, and small airways disease. *Am Rev Respir Dis*, 1987. 135(3): p. 705-12.
- 243.Mathieson, J.R., et al., Chronic diffuse infiltrative lung disease: comparison of diagnostic accuracy of CT and chest radiography. *Radiology*, 1989. 171(1): p. 111-6.
- 244.Tung, K.T., et al., Accuracy of the typical computed tomographic appearances of fibrosing alveolitis. *Thorax*, 1993. 48(4): p. 334-8.
- 245.Feigin, D.S. and P.J. Friedman, Chest radiography in desquamative interstitial pneumonitis: a review of 37 patients. *AJR Am J Roentgenol*, 1980. 134(1): p. 91-9.
- 246.Epler, G.R., et al., Normal chest roentgenograms in chronic diffuse infiltrative lung disease. *N Engl J Med*, 1978. 298(17): p. 934-9.

- 247.Orens, J.B., et al., The sensitivity of high-resolution CT in detecting idiopathic pulmonary fibrosis proved by open lung biopsy. A prospective study. *Chest*, 1995. 108(1): p. 109-15.
- 248.Nishimura, K., et al., Usual interstitial pneumonia: histologic correlation with high-resolution CT. *Radiology*, 1992. 182(2): p. 337-42.
- 249.Leung, A.N., R.R. Miller, and N.L. Muller, Parenchymal opacification in chronic infiltrative lung diseases: CT-pathologic correlation. *Radiology*, 1993. 188(1): p. 209-14.
- 250.Hartman, T.E., et al., Desquamative interstitial pneumonia: thin-section CT findings in 22 patients. *Radiology*, 1993. 187(3): p. 787-90.
- 251.Holt, R.M., et al., High resolution CT in respiratory bronchiolitis-associated interstitial lung disease. *J Comput Assist Tomogr*, 1993. 17(1): p. 46-50.
- 252.Park, J.S., et al., Nonspecific interstitial pneumonia with fibrosis: radiographic and CT findings in seven patients. *Radiology*, 1995. 195(3): p. 645-8.
- 253.Padley, S.P., et al., Pulmonary sarcoidosis mimicking cryptogenic fibrosing alveolitis on CT. *Clin Radiol*, 1996. 51(11): p. 807-10.
- 254.Hunninghake, G.W., et al., Radiologic findings are strongly associated with a pathologic diagnosis of usual interstitial pneumonia. *Chest*, 2003. 124(4): p. 1215-23.
- 255.society, B.T., The diagnosis, assessment and treatment of diffuse parenchymal lung disease in adults. *Thorax*, 1999. 54 p. S15-30.
- 256.Cottin, V., [Treatment of pulmonary fibrosis]. *Presse Med*, 2002. 31(34): p. 1613-23.
- 257.Richeldi, L., et al., Corticosteroids for idiopathic pulmonary fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*, 2003(3): p. CD002880.
- 258.Raghu, G., et al., Azathioprine combined with prednisone in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: a prospective double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Am Rev Respir Dis*, 1991. 144(2): p. 291-6.
- 259.Raghu, G., et al., An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline: Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Update of the 2011 Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med*, 2015. 192(2): p. e3-19.
- 260.Richeldi, L., et al., Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*, 2014. 370(22): p. 2071-82.
- 261.Keogh, B.A. and R.G. Crystal, Alveolitis: the key to the interstitial lung disorders. *Thorax*, 1982. 37(1): p. 1-10.
- 262.Merrill, W.W. and H.Y. Reynolds, Bronchial lavage in inflammatory lung disease. *Clin Chest Med*, 1983. 4(1): p. 71-84.
- 263.Keane, M.P. and R.M. Strieter, The importance of balanced pro-inflammatory and anti-inflammatory mechanisms in diffuse lung disease. *Respir Res*, 2002. 3: p. 5.
- 264.Piguet, P.F., et al., Expression and localization of tumor necrosis factor-alpha and its mRNA in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol*, 1993. 143(3): p. 651-5.
- 265.Gross, T.J. and G.W. Hunninghake, Idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*, 2001. 345(7): p. 517-25.
- 266.Gauldie, J., Pro: Inflammatory mechanisms are a minor component of the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002. 165(9): p. 1205-6.
- 267.Selman, M., T.E. King, and A. Pardo, Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med*, 2001. 134(2): p. 136-51.
- 268.Katzenstein ALA, M.J., Idiopathic pulmonary fibrosis. Clinical relevance of pathologic classification. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998. 157: p. 1301-1315.
- 269.Munger JS, et al., The integrin $\alpha v \beta 6$ binds and activates TGF $\beta 1$. A mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell*, 1999. 96: p. 316-28.
- 270.Teder, P., et al., Resolution of lung inflammation by CD44. *Science*, 2002. 296(5565): p. 155-8.
- 271.King, T.E., Jr., et al., Idiopathic pulmonary fibrosis: relationship between histopathologic features and mortality. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001. 164(6): p. 1025-32.
- 272.Nicholson, A.G., et al., The relationship between individual histologic features and disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002. 166(2): p. 173-7.
- 273.Selman, M. and A. Pardo, Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder. *Respir Res*, 2002. 3: p. 3.
- 274.Selman, M. and A. Pardo, Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder. *Respiratory research*, 2001. 3(1): p. 1-8.
- 275.Hagimoto, N., et al., Induction of apoptosis and pulmonary fibrosis in mice in response to ligation of Fas antigen. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1997. 17(3): p. 272-8.
- 276.Hagimoto, N., et al., Apoptosis and expression of Fas/Fas ligand mRNA in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1997. 16(1): p. 91-101.
- 277.Degryse, A.L., et al., Repetitive intratracheal bleomycin models several features of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2010. 299(4): p. L442-52.
- 278.Wang, R., et al., Abrogation of bleomycin-induced epithelial apoptosis and lung fibrosis by captopril or by a caspase inhibitor. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000. 279(1): p. L143-51.
- 279.Kuwano, K., et al., Attenuation of bleomycin-induced pneumopathy in mice by a caspase inhibitor. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001. 280(2): p. L316-25.

- 280.Zhang, K., et al., Myofibroblasts and their role in lung collagen gene expression during pulmonary fibrosis: a combined immunohistochemical and in situ hybridization study. *Am. J. Pathol.*, 1994. 145: p. 114-125.
- 281.Hashimoto, et al., IL-4 and IL-13 induce myofibroblastic phenotype of human lung fibroblasts through c-Jun NH2-terminal kinase-dependent pathway. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2001. 107: p. 1001-1008.
- 282.Kuhn, C. and McDonald J.A., The roles of the myofibroblast in idiopathic pulmonary fibrosis. Ultrastructural and immunohistochemical features of sites of active extracellular matrix synthesis. *Am. J. Pathol.*, 1991. 138: p. 1257-1265.
- 283.Zhang, H., et al., Lung fibroblast contractile and -smooth muscle actin phenotypic alterations in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am. J. Pathol.*, 1996. 148: p. 527-537.
- 284.Phan SH, Fibroblast phenotypes in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2003. 29: p. S87-S92.
- 285.Wang R, et al., Human lung myofibroblast-derived inducers of epithelial apoptosis identified as angiotensin peptides. *Am j Physiol*, 1999. 277: p. L1158-1164.
- 286.Chapman HA, Disorders of lung matrix remodeling. *J.Clin. Invest.*, 2004. 113(2): p. 148-157.
- 287.Ramos C., et al., Fibroblast from IPF and normal lung differ in growth rate, apoptosis and tissue inhibitor of metalloproteinases expression. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001. 24: p. 591-598.
- 288.Ruiz V., et al., Unalanced collagenases/TOMP-1 expression and epithelial apoptosis in experimental fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003. 285: p. L1026-L1036.
- 289.Hall MC, et al., The comparative role of activator protein 1 and Smad factors in the regulation of TIMP-1 and MMP-1. Gene expression by TGF- β 1. *J Biol Chem*, 2003. 278: p. 10304-10313.
- 290.Wynn, T.A., Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. *J Exp Med*, 2011. 208(7): p. 1339-50.
- 291.Moeller, A., et al., The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? *Int J Biochem Cell Biol*, 2008. 40(3): p. 362-82.
- 292.B, B.M., et al., Animal models of fibrotic lung disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013. 49(2): p. 167-79.
- 293.Moore, B.B. and C.M. Hogaboam, Murine models of pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008. 294(2): p. L152-60.
- 294.Sime, P.J., et al., Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor-beta1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung. *J Clin Invest*, 1997. 100(4): p. 768-76.
- 295.Kolb, M., et al., Transient expression of IL-1beta induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis. *J Clin Invest*, 2001. 107(12): p. 1529-36.
- 296.Sime, P.J., et al., Transfer of tumor necrosis factor-alpha to rat lung induces severe pulmonary inflammation and patchy interstitial fibrogenesis with induction of transforming growth factor-beta1 and myofibroblasts. *Am J Pathol*, 1998. 153(3): p. 825-32.
- 297.Lee, C.G., et al., Early growth response gene 1-mediated apoptosis is essential for transforming growth factor beta1-induced pulmonary fibrosis. *J Exp Med*, 2004. 200(3): p. 377-89.
- 298.Hardie, W.D., et al., Genomic profile of matrix and vasculature remodeling in TGF-alpha induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2007. 37(3): p. 309-21.
- 299.Korfhagen, T.R., et al., Respiratory epithelial cell expression of human transforming growth factor-alpha induces lung fibrosis in transgenic mice. *J Clin Invest*, 1994. 93(4): p. 1691-9.
- 300.Lee, C.G., et al., Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1). *J Exp Med*, 2001. 194(6): p. 809-21.
- 301.Pierce, E.M., et al., Therapeutic targeting of CC ligand 21 or CC chemokine receptor 7 abrogates pulmonary fibrosis induced by the adoptive transfer of human pulmonary fibroblasts to immunodeficient mice. *Am J Pathol*, 2007. 170(4): p. 1152-64.
- 302.Trujillo, G., et al., TLR9 differentiates rapidly from slowly progressing forms of idiopathic pulmonary fibrosis. *Sci Transl Med*, 2010. 2(57): p. 57ra82.
- 303.Sisson, T.H., et al., Targeted injury of type II alveolar epithelial cells induces pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010. 181(3): p. 254-63.
- 304.Burger, R.M., J. Peisach, and S.B. Horwitz, Activated bleomycin. A transient complex of drug, iron, and oxygen that degrades DNA. *J Biol Chem*, 1981. 256(22): p. 11636-44.
- 305.Scotton, C.J. and R.C. Chambers, Bleomycin revisited: towards a more representative model of IPF? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2010. 299(4): p. L439-41.
- 306.Matute-Bello, G., C.W. Frevert, and T.R. Martin, Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008. 295(3): p. L379-99.
- 307.Ask, K., et al., Comparison between conventional and "clinical" assessment of experimental lung fibrosis. *J Transl Med*, 2008. 6: p. 16.
- 308.Babin, A.L., et al., Bleomycin-induced lung injury in mice investigated by MRI: model assessment for target analysis. *Magn Reson Med*, 2012. 67(2): p. 499-509.
- 309.Choi, E.J., et al., Serial micro-CT assessment of the therapeutic effects of rosiglitazone in a bleomycin-induced lung fibrosis mouse model. *Korean J Radiol*, 2014. 15(4): p. 448-55.
- 310.Lee, H.J., et al., Semiquantitative measurement of murine bleomycin-induced lung fibrosis in in vivo and postmortem conditions using microcomputed tomography: correlation with pathologic scores--initial results. *Invest Radiol*, 2008. 43(6): p. 453-60.

- 311.Scotton, C.J., et al., Ex vivo micro-computed tomography analysis of bleomycin-induced lung fibrosis for preclinical drug evaluation. *Eur Respir J*, 2013. 42(6): p. 1633-45.
- 312.Ashley, S.L., et al., gamma-Herpes virus-68, but not *Pseudomonas aeruginosa* or influenza A (H1N1), exacerbates established murine lung fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2014. 307(3): p. L219-30.
- 313.Redente, E.F., et al., Age and sex dimorphisms contribute to the severity of bleomycin-induced lung injury and fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2011. 301(4): p. L510-8.
- 314.Sueblinvong, V., et al., Predisposition for disrepair in the aged lung. *Am J Med Sci*, 2012. 344(1): p. 41-51.
- 315.Liu, T., F.G. De Los Santos, and S.H. Phan, The Bleomycin Model of Pulmonary Fibrosis. *Methods Mol Biol*, 2017. 1627: p. 27-42.
- 316.Wright, J.R., Immunoregulatory functions of surfactant proteins. *Nat Rev Immunol*, 2005. 5(1): p. 58-68.
- 317.Whitsett, J.A. and T.E. Weaver, Hydrophobic surfactant proteins in lung function and disease. *N Engl J Med*, 2002. 347(26): p. 2141-8.
- 318.Rooney, S.A., S.L. Young, and C.R. Mendelson, Molecular and cellular processing of lung surfactant. *FASEB J*, 1994. 8(12): p. 957-67.
- 319.Griese, M., Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art. *Eur Respir J*, 1999. 13(6): p. 1455-76.
- 320.Dunbar, A.E., 3rd, et al., Prolonged survival in hereditary surfactant protein B (SP-B) deficiency associated with a novel splicing mutation. *Pediatr Res*, 2000. 48(3): p. 275-82.
- 321.Nogee, L.M., et al., A mutation in the surfactant protein C gene associated with familial interstitial lung disease. *N Engl J Med*, 2001. 344(8): p. 573-9.
- 322.Batenburg, J.J., Surfactant phospholipids: synthesis and storage. *Am J Physiol*, 1992. 262(4 Pt 1): p. L367-85.
- 323.Nakanishi, H., et al., Cloning and characterization of mouse lung-type acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 (LPCAT1). Expression in alveolar type II cells and possible involvement in surfactant production. *J Biol Chem*, 2006. 281(29): p. 20140-7.
- 324.Harayama, T., H. Shindou, and T. Shimizu, Biosynthesis of phosphatidylcholine by human lysophosphatidylcholine acyltransferase 1. *J Lipid Res*, 2009. 50(9): p. 1824-31.
- 325.Honda, Y., et al., Changes in phospholipids in bronchoalveolar lavage fluid of patients with interstitial lung diseases. *Lung*, 1988. 166(5): p. 293-301.
- 326.Gunther, A., et al., Surfactant abnormalities in idiopathic pulmonary fibrosis, hypersensitivity pneumonitis and sarcoidosis. *Eur Respir J*, 1999. 14(3): p. 565-73.
- 327.Schmidt, R., et al., Altered fatty acid composition of lung surfactant phospholipids in interstitial lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002. 283(5): p. L1079-85.
- 328.Harayama, T., et al., Identification of a novel noninflammatory biosynthetic pathway of platelet-activating factor. *J Biol Chem*, 2008. 283(17): p. 11097-106.
- 329.Ruis, N.M., J.K. Rose, and F.H. Valone, Tumor necrosis factor release by human monocytes stimulated with platelet-activating factor. *Lipids*, 1991. 26(12): p. 1060-4.
- 330.Thivierge, M. and M. Rola-Pleszczynski, Involvement of both cyclooxygenase and lipoxygenase pathways in platelet-activating factor-induced interleukin-6 production by alveolar macrophages. *Ann N Y Acad Sci*, 1994. 725: p. 213-22.
- 331.Nagase, T., et al., A pivotal role of cytosolic phospholipase A(2) in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Nat Med*, 2002. 8(5): p. 480-4.
- 332.Arbibe, L., et al., Endotoxin induces expression of type II phospholipase A2 in macrophages during acute lung injury in guinea pigs: involvement of TNF-alpha in lipopolysaccharide-induced type II phospholipase A2 synthesis. *J Immunol*, 1997. 159(1): p. 391-400.
- 333.Koike, K., et al., Group IIA phospholipase A2 mediates lung injury in intestinal ischemia-reperfusion. *Ann Surg*, 2000. 232(1): p. 90-7.
- 334.Hanasaki, K., et al., Purified group X secretory phospholipase A(2) induced prominent release of arachidonic acid from human myeloid leukemia cells. *J Biol Chem*, 1999. 274(48): p. 34203-11.
- 335.Granata, F., et al., Secreted phospholipases A(2): A proinflammatory connection between macrophages and mast cells in the human lung. *Immunobiology*, 2009. 214(9-10): p. 811-21.
- 336.Giannattasio, G., et al., Expression of phospholipases A2 in primary human lung macrophages: role of cytosolic phospholipase A2-alpha in arachidonic acid release and platelet activating factor synthesis. *Biochim Biophys Acta*, 2009. 1791(2): p. 92-102.
- 337.Mehta, D., Lysophosphatidylcholine: an enigmatic lysolipid. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2005. 289(2): p. L174-5.
- 338.Oikonomou, N., et al., Pulmonary autotaxin expression contributes to the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2012. 47(5): p. 566-74.
- 339.Ganguly, K., et al., Candidate genes controlling pulmonary function in mice: transcript profiling and predicted protein structure. *Physiol Genomics*, 2007. 31(3): p. 410-21.
- 340.Oikonomou, N., et al., Pulmonary Autotaxin Expression Contributes to the Pathogenesis of Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2012.
- 341.Tager, A.M., et al., The lysophosphatidic acid receptor LPA1 links pulmonary fibrosis to lung injury by mediating fibroblast recruitment and vascular leak. *Nat Med*, 2008. 14(1): p. 45-54.

342.Funke, M., et al., The lysophosphatidic acid receptor LPA1 promotes epithelial cell apoptosis after lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2012. 46(3): p. 355-64.

343.Huang, L.S., et al., Lysophosphatidic Acid Receptor 2 Deficiency Confers Protection Against Bleomycin-Induced Lung Injury and Fibrosis in Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013.

344.Swaney, J.S., et al., A novel, orally active LPA(1) receptor antagonist inhibits lung fibrosis in the mouse bleomycin model. *Br J Pharmacol*, 2010. 160(7): p. 1699-713.

345.Gan, L., et al., Blockade of lysophosphatidic acid receptors LPAR1/3 ameliorates lung fibrosis induced by irradiation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011. 409(1): p. 7-13.

346.Oikonomou, N., et al., Soluble TNF Mediates the Transition from Pulmonary Inflammation to Fibrosis. *PLoS One*, 2006. 1(1): p. e108.

347.Wu, J.M., et al., Autotaxin expression and its connection with the TNF-alpha-NF-kappaB axis in human hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer*, 2010. 9(1): p. 71.

348.Kuwano K, et al., Attenuation of bleomycin-induced pneumopathy in mice by a caspase inhibitor. *Am J Physiol Cell Mol Physiol*, 2001. 280: p. L316-L325.

349.Oikonomou, N., et al., Gelsolin expression is necessary for the development of modelled pulmonary inflammation and fibrosis. *Thorax*, 2009. 64(6): p. 467-75.

350.Xu, M.Y., et al., Lysophosphatidic acid induces alphavbeta6 integrin-mediated TGF-beta activation via the LPA2 receptor and the small G protein G alpha(q). *Am J Pathol*, 2009. 174(4): p. 1264-79.

351.Shea, B.S. and A.M. Tager, Role of the lysophospholipid mediators lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate in lung fibrosis. *Proc Am Thorac Soc*, 2012. 9(3): p. 102-10.

352.Shiomi, T., et al., Lysophosphatidic acid stimulates epidermal growth factor-family ectodomain shedding and paracrine signaling from human lung fibroblasts. *Wound Repair Regen*, 2011. 19(2): p. 229-40.

353.Hama, K., et al., Lysophosphatidic acid and autotaxin stimulate cell motility of neoplastic and non-neoplastic cells through LPA1. *The Journal of biological chemistry*, 2004. 279(17): p. 17634-9.

354.Van Leeuwen, F.N., et al., Rac activation by lysophosphatidic acid LPA1 receptors through the guanine nucleotide exchange factor Tiam1. *The Journal of biological chemistry*, 2003. 278(1): p. 400-6.

355.Cummings, R., et al., Protein kinase Cdelta mediates lysophosphatidic acid-induced NF-kappaB activation and interleukin-8 secretion in human bronchial epithelial cells. *J Biol Chem*, 2004. 279(39): p. 41085-94.

356.Saatian, B., et al., Transcriptional regulation of lysophosphatidic acid-induced interleukin-8 expression and secretion by p38 MAPK and JNK in human bronchial epithelial cells. *Biochem J*, 2006. 393(Pt 3): p. 657-68.

357.Lin, C.I., et al., Lysophosphatidic acid regulates inflammation-related genes in human endothelial cells through LPA1 and LPA3. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. 363(4): p. 1001-8.

358.Lin, C.I., et al., Lysophospholipids increase IL-8 and MCP-1 expressions in human umbilical cord vein endothelial cells through an IL-1-dependent mechanism. *J Cell Biochem*, 2006. 99(4): p. 1216-32.

359.Shimada, H. and L.E. Rajagopalan, Rho-kinase mediates lysophosphatidic acid-induced IL-8 and MCP-1 production via p38 and JNK pathways in human endothelial cells. *FEBS Lett*, 2010. 584(13): p. 2827-32.

360.Lee, H., et al., Lysophospholipids increase ICAM-1 expression in HUVEC through a Gi- and NF-kappaB-dependent mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004. 287(6): p. C1657-66.

361.Rizza, C., et al., Lysophosphatidic acid as a regulator of endothelial/leukocyte interaction. *Lab Invest*, 1999. 79(10): p. 1227-35.

362.Ren, Y., et al., Comparing the differential effects of LPA on the barrier function of human pulmonary endothelial cells. *Microvasc Res*, 2013. 85: p. 59-67.

363.Rubenfeld, J., et al., Lysophosphatidic acid enhances interleukin-13 gene expression and promoter activity in T cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006. 290(1): p. L66-74.

364.Wynn, T.A., Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat Rev Immunol*, 2004. 4(8): p. 583-94.

365.Fernandez, I.E. and O. Eickelberg, The impact of TGF-beta on lung fibrosis: from targeting to biomarkers. *Proc Am Thorac Soc*, 2012. 9(3): p. 111-6.

366.Madtes, D.K., et al., Elevated transforming growth factor-alpha levels in bronchoalveolar lavage fluid of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998. 158(2): p. 424-30.

367.Tatler, A.L., et al., Integrin alphavbeta5-mediated TGF-beta activation by airway smooth muscle cells in asthma. *J Immunol*, 2011. 187(11): p. 6094-107.

368.Crestani, B., et al., Hepatocyte growth factor and lung fibrosis. *Proc Am Thorac Soc*, 2012. 9(3): p. 158-63.

369.Panganiban, R.A. and R.M. Day, Hepatocyte growth factor in lung repair and pulmonary fibrosis. *Acta Pharmacol Sin*, 2011. 32(1): p. 12-20.

370.Zhao, Y., et al., Lysophosphatidic acid modulates c-Met redistribution and hepatocyte growth factor/c-Met signaling in human bronchial epithelial cells through PKC delta and E-cadherin. *Cell Signal*, 2007. 19(11): p. 2329-38.

371.Fleming, J.K., et al., Biochemical and structural characterization of lysophosphatidic Acid binding by a humanized monoclonal antibody. *J Mol Biol*, 2011. 408(3): p. 462-76.

372.Budd, D.C. and Y. Qian, Development of lysophosphatidic acid pathway modulators as therapies for fibrosis. *Future Med Chem*, 2013. 5(16): p. 1935-52.

373.Kihara, Y., H. Mizuno, and J. Chun, Lysophospholipid receptors in drug discovery. *Exp Cell Res*, 2015. 333(2): p. 171-7.

374.Tanyi, J.L., et al., The human lipid phosphate phosphatase-3 decreases the growth, survival, and tumorigenesis of ovarian cancer cells: validation of the lysophosphatidic acid signaling cascade as a target for therapy in ovarian cancer. *Cancer Res*, 2003. 63(5): p. 1073-82.

375.Vrontaki, E., et al., Computer Aided Drug Design Approaches for Identification of Novel Autotaxin (ATX) Inhibitors. *Curr Med Chem*, 2016. 23(17): p. 1708-24.

376.Jiang, G., D. Madan, and G.D. Prestwich, Aromatic phosphonates inhibit the lysophospholipase D activity of autotaxin. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011. 21(17): p. 5098-101.

377.Kaffe, E., et al., Hepatocyte autotaxin expression promotes liver fibrosis and cancer. *Hepatology*, 2017. 65(4): p. 1369-1383.

378.Kuttruff, C.A., et al., Discovery of BI-2545: A Novel Autotaxin Inhibitor That Significantly Reduces LPA Levels in Vivo. *ACS Med Chem Lett*, 2017. 8(12): p. 1252-1257.

379.Saga, H., et al., A novel highly potent autotaxin/ENPP2 inhibitor produces prolonged decreases in plasma lysophosphatidic acid formation in vivo and regulates urethral tension. *PLoS One*, 2014. 9(4): p. e93230.

380.Kato, K., et al., Structural basis for specific inhibition of Autotaxin by a DNA aptamer. *Nat Struct Mol Biol*, 2016. 23(5): p. 395-401.

381.Desroy, N., et al., Discovery of 2-[[2-Ethyl-6-[4-[2-(3-hydroxyazetidin-1-yl)-2-oxoethyl]piperazin-1-yl]-8-methylimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl]methylamino]-4-(4-fluorophenyl)thiazole-5-carbonitrile (GLPG1690), a First-in-Class Autotaxin Inhibitor Undergoing Clinical Evaluation for the Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *J Med Chem*, 2017. 60(9): p. 3580-3590.

382.Barbayanni, E., et al., Autotaxin inhibitors: a patent review. *Expert Opin Ther Pat*, 2013. 23(9): p. 1123-32.

383.Nikolaou, A., et al., Autotaxin inhibitors: a patent review (2012-2016). *Expert Opin Ther Pat*, 2017. 27(7): p. 815-829.

384.Cai, J., et al., AM966, an Antagonist of Lysophosphatidic Acid Receptor 1, Increases Lung Microvascular Endothelial Permeability through Activation of Rho Signaling Pathway and Phosphorylation of VE-Cadherin. *Mediators Inflamm*, 2017. 2017: p. 6893560.

385.Swaney, J.S., et al., Pharmacokinetic and pharmacodynamic characterization of an oral lysophosphatidic acid type 1 receptor-selective antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*, 2011. 336(3): p. 693-700.

386.ClinicalTrials.gov, Safety and Efficacy of a Lysophosphatidic Acid Receptor Antagonist in Idiopathic Pulmonary Fibrosis[J]. 2015.

387.Brosnan, C.F. and C.S. Raine, Mechanisms of immune injury in multiple sclerosis. *Brain Pathol*, 1996. 6(3): p. 243-57.

388.Lassmann, H., W. Bruck, and C.F. Lucchinetti, The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol*, 2007. 17(2): p. 210-8.

389.Lucchinetti, C.F., et al., Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis. *Brain Pathol*, 1996. 6(3): p. 259-74.

390.Fox, R.J. and P.J. Sweeney, Multiple Sclerosis. *Cleve Clin J Med.*, 2004.

391.Compston, A. and A. Coles, Multiple sclerosis. *Lancet*, 2008. 372(9648): p. 1502-17.

392.Compston, A. and A. Coles, Multiple sclerosis. *Lancet*, 2002. 359(9313): p. 1221-31.

393.ED, M., B. EA, and P. BH, Depression and Psychosis in Neurological Practice. 2012.

394.JF, K., Clinical manifestations of MS. *Handbook of clinical neurology*, 1970. 9: p. 161-216.

395.Lublin, F.D. and S.C. Reingold, Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*, 1996. 46(4): p. 907-11.

396.Nakahara, J., et al., Current concepts in multiple sclerosis: autoimmunity versus oligodendroglialopathy. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2012. 42(1): p. 26-34.

397.Dyment, D.A., G.C. Ebers, and A.D. Sadovnick, Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol*, 2004. 3(2): p. 104-10.

398.Dyment, D.A., et al., An extended genome scan in 442 Canadian multiple sclerosis-affected sibships: a report from the Canadian Collaborative Study Group. *Hum Mol Genet*, 2004. 13(10): p. 1005-15.

399.Marrie, R.A., Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology. *Lancet Neurol*, 2004. 3(12): p. 709-18.

400.Poser, C.M., The multiple sclerosis trait and the development of multiple sclerosis: genetic vulnerability and environmental effect. *Clin Neurol Neurosurg*, 2006. 108(3): p. 227-33.

401.Ascherio, A. and K.L. Munger, Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann Neurol*, 2007. 61(4): p. 288-99.

402.Medaer, R., Does the history of multiple sclerosis go back as far as the 14th century? *Acta Neurol Scand*, 1979. 60(3): p. 189-92.

403.D., F., The case of Augustus d' Este. *Cambridge*. 1948.

404.Fredrikson, S. and S. Kam-Hansen, The 150-year anniversary of multiple sclerosis: does its early history give an etiological clue? *Perspect Biol Med*, 1989. 32(2): p. 237-43.

405.Pearce, J.M., Historical descriptions of multiple sclerosis. *Eur Neurol*, 2005. 54(1): p. 49-53.

406.Barbellion, W.N.P., The Journal of a Disappointed Man. New York: George H. Doran, 1919.

407.Compston, A., The 150th anniversary of the first depiction of the lesions of multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1988. 51(10): p. 1249-52.

- 408.Murray, T.J., The history of multiple sclerosis: the changing frame of the disease over the centuries. *J Neurol Sci*, 2009. 277 Suppl 1: p. S3-8.
- 409.Lassmann, H., The pathology of multiple sclerosis and its evolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1999. 354(1390): p. 1635-40.
- 410.Lassmann, H., Multiple sclerosis pathology: evolution of pathogenetic concepts. *Brain Pathol*, 2005. 15(3): p. 217-22.
- 411.Hafler, D.A., Multiple sclerosis. *J Clin Invest*, 2004. 113(6): p. 788-94.
- 412.Charcot, J., *Histologie de la sclerose en plaques*. Gazette des hopitaux, Paris, 1868. 41: p. 554-5.
- 413.Clanet, M., Jean-Martin Charcot. 1825 to 1893. *Int MS J*, 2008. 15(2): p. 59-61.
- 414.Flamm, E.S., The neurology of Jean Cruveilhier. *Med Hist*, 1973. 17(4): p. 343-55.
- 415.Rivers, T.M. and F.F. Schwentker, Encephalomyelitis Accompanied by Myelin Destruction Experimentally Produced in Monkeys. *J Exp Med*, 1935. 61(5): p. 689-702.
- 416.Milo, R. and E. Kahana, Multiple sclerosis: geoepidemiology, genetics and the environment. *Autoimmun Rev*, 2010. 9(5): p. A387-94.
- 417.Organization, W.H., *Atlas: Multiple Sclerosis Resources in the World 2008*. Geneva: World Health Organization, 2008: p. 15-16.
- 418.S, H. and G. D, Multiple Sclerosis. In: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL (Eds.). *Harrison's Principles of Internal Medicine* McGraw Hill. New York., 2001: p. 2452-61.
- 419.Kurtzke, J.F., Epidemiologic evidence for multiple sclerosis as an infection. *Clin Microbiol Rev*, 1993. 6(4): p. 382-427.
- 420.Alonso, A. and M.A. Hernan, Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: a systematic review. *Neurology*, 2008. 71(2): p. 129-35.
- 421.Lowis, G.W., The social epidemiology of multiple sclerosis. *Sci Total Environ*, 1990. 90: p. 163-90.
- 422.Duquette, P., et al., The increased susceptibility of women to multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci*, 1992. 19(4): p. 466-71.
- 423.Bostrom, I., L. Stawiarz, and A.M. Landtblom, Sex ratio of multiple sclerosis in the National Swedish MS Register (SMSreg). *Mult Scler*, 2013. 19(1): p. 46-52.
- 424.Orton, S.M., et al., Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study. *Lancet Neurol*, 2006. 5(11): p. 932-6.
- 425.Miller, D.H. and S.M. Leary, Primary-progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurol*, 2007. 6(10): p. 903-12.
- 426.Herrera, B.M., et al., Multiple sclerosis susceptibility and the X chromosome. *Mult Scler*, 2007. 13(7): p. 856-64.
- 427.Whitacre, C.C., Sex differences in autoimmune disease. *Nat Immunol*, 2001. 2(9): p. 777-80.
- 428.D'Hooghe M, B., T. D'Hooghe, and J. De Keyser, Female gender and reproductive factors affecting risk, relapses and progression in multiple sclerosis. *Gynecol Obstet Invest*, 2013. 75(2): p. 73-84.
- 429.Liguori, M., et al., Age at onset in multiple sclerosis. *Neurol Sci*, 2000. 21(4 Suppl 2): p. S825-9.
- 430.Koch-Henriksen, N. and P.S. Sorensen, The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet Neurol*, 2010. 9(5): p. 520-32.
- 431.Kurtzke, W.a., Multiple Sclerosis Epidemiology. *Encyclopedia of the Neurological Sciences*, 2003. Elsevier Science (USA): p. 253-261.
- 432.Kurtzke, J.F., G.W. Beebe, and J.E. Norman, Jr., Epidemiology of multiple sclerosis in U.S. veterans: 1. Race, sex, and geographic distribution. *Neurology*, 1979. 29(9 Pt 1): p. 1228-35.
- 433.Sajedi, S.A. and F. Abdollahi, Geomagnetic disturbances may be environmental risk factor for multiple sclerosis: an ecological study of 111 locations in 24 countries. *BMC Neurol*, 2012. 12: p. 100.
- 434.Buchter, B., M. Dunkel, and J. Li, Multiple sclerosis: a disease of affluence? *Neuroepidemiology*, 2012. 39(1): p. 51-6.
- 435.Milonas, I., S. Tsounis, and I. Logothetis, Epidemiology of multiple sclerosis in northern Greece. *Acta Neurol Scand*, 1990. 81(1): p. 43-7.
- 436.Papathanasopoulos, P., et al., Prevalence and incidence of multiple sclerosis in western Greece: a 23-year survey. *Neuroepidemiology*, 2008. 30(3): p. 167-73.
- 437.Piperidou, H.N., et al., Epidemiological data of multiple sclerosis in the province of Evros, Greece. *Eur Neurol*, 2003. 49(1): p. 8-12.
- 438.Kurtzke, J.F., G.W. Beebe, and J.E. Norman, Jr., Epidemiology of multiple sclerosis in US veterans: III. Migration and the risk of MS. *Neurology*, 1985. 35(5): p. 672-8.
- 439.Kurtzke, J.F., N. Delasnerie-Laupretre, and M.T. Wallin, Multiple sclerosis in North African migrants to France. *Acta Neurol Scand*, 1998. 98(5): p. 302-9.
- 440.Chitnis, T., et al., Demographics of pediatric-onset multiple sclerosis in an MS center population from the Northeastern United States. *Mult Scler*, 2009. 15(5): p. 627-31.
- 441.Sadovnick, A.D., et al., Effect of age at onset and parental disease status on sibling risks for MS. *Neurology*, 1998. 50(3): p. 719-23.
- 442.Steinman, L., et al., Multiple sclerosis: deeper understanding of its pathogenesis reveals new targets for therapy. *Annu Rev Neurosci*, 2002. 25: p. 491-505.

- 443.Afkarian, M., et al., T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells. *Nat Immunol*, 2002. 3(6): p. 549-57.
- 444.Lafaille, J.J., et al., Myelin basic protein-specific T helper 2 (Th2) cells cause experimental autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient hosts rather than protect them from the disease. *J Exp Med*, 1997. 186(2): p. 307-12.
- 445.Komiyama, Y., et al., IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 2006. 177(1): p. 566-73.
- 446.Kebir, H., et al., Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med*, 2007. 13(10): p. 1173-5.
- 447.Martin-Saavedra, F.M., et al., Beta interferon restricts the inflammatory potential of CD4+ cells through the boost of the Th2 phenotype, the inhibition of Th17 response and the prevalence of naturally occurring T regulatory cells. *Mol Immunol*, 2008. 45(15): p. 4008-19.
- 448.Grigoriadis, N., et al., Neuroinflammation in multiple sclerosis: evidence for autoimmune dysregulation, not simple autoimmune reaction. *Clin Neurol Neurosurg*, 2006. 108(3): p. 241-4.
- 449.Sobel, R.A., T-lymphocyte subsets in the multiple sclerosis lesion. *Res Immunol*, 1989. 140(2): p. 208-11; discussion 245-8.
- 450.Cuzner, M.L., et al., The nature of inflammatory components during demyelination in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 1988. 20(2-3): p. 203-9.
- 451.Boyle, E.A. and P.L. McGeer, Cellular immune response in multiple sclerosis plaques. *Am J Pathol*, 1990. 137(3): p. 575-84.
- 452.Friese, M.A. and L. Fugger, Autoreactive CD8+ T cells in multiple sclerosis: a new target for therapy? *Brain*, 2005. 128(Pt 8): p. 1747-63.
- 453.Minagar, A. and J.S. Alexander, Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. *Mult Scler*, 2003. 9(6): p. 540-9.
- 454.Raine, C.S., Multiple sclerosis: immune system molecule expression in the central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1994. 53(4): p. 328-37.
- 455.Raine, C.S., The Dale E. McFarlin Memorial Lecture: the immunology of the multiple sclerosis lesion. *Ann Neurol*, 1994. 36 Suppl: p. S61-72.
- 456.Qin, Y., et al., Clonal expansion and somatic hypermutation of V(H) genes of B cells from cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *J Clin Invest*, 1998. 102(5): p. 1045-50.
- 457.Bruck, W., et al., Monocyte/macrophage differentiation in early multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol*, 1995. 38(5): p. 788-96.
- 458.Prineas, J.W., et al., Multiple sclerosis: remyelination of nascent lesions. *Ann Neurol*, 1993. 33(2): p. 137-51.
- 459.Chabannes, D., B. Ryffel, and J.F. Borel, SRI 62-834, a cyclic ether analogue of the phospholipid ET-18-OCH₃, displays long-lasting beneficial effect in chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat. Comparison with cyclosporin and (Val2)-dihydrocyclosporin effects in clinical, functional and histological studies. *J Autoimmun*, 1992. 5(2): p. 199-211.
- 460.Koutsouraki, E. and D. Michmizos, Living with multiple sclerosis. *Mult Scler*, 2014. 20(2): p. 133-4.
- 461.Tataru, N., et al., Limited impact of the summer heat wave in France (2003) on hospital admissions and relapses for multiple sclerosis. *Neuroepidemiology*, 2006. 27(1): p. 28-32.
- 462.Tsang, B.K. and R. Macdonell, Multiple sclerosis- diagnosis, management and prognosis. *Aust Fam Physician*, 2011. 40(12): p. 948-55.
- 463.McDonald, W.I., et al., Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 2001. 50(1): p. 121-7.
- 464.Rashid, W. and D.H. Miller, Recent advances in neuroimaging of multiple sclerosis. *Semin Neurol*, 2008. 28(1): p. 46-55.
- 465.Link, H. and Y.M. Huang, Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness. *J Neuroimmunol*, 2006. 180(1-2): p. 17-28.
- 466.Gronseth, G.S. and E.J. Ashman, Practice parameter: the usefulness of evoked potentials in identifying clinically silent lesions in patients with suspected multiple sclerosis (an evidence-based review): Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*, 2000. 54(9): p. 1720-5.
- 467.Polman, C.H., et al., Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol*, 2005. 58(6): p. 840-6.
- 468.Poser, C.M., et al., New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol*, 1983. 13(3): p. 227-31.
- 469.Metz, L., Multiple sclerosis: symptomatic therapies. *Semin Neurol*, 1998. 18(3): p. 389-95.
- 470.Myers, L.W. and G.W. Ellison, The peculiar difficulties of therapeutic trials for multiple sclerosis. *Neurol Clin*, 1990. 8(1): p. 119-41.
- 471.Noseworthy, J.H., et al., Multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 2000. 343(13): p. 938-52.
- 472.Troiano, R., S.D. Cook, and P.C. Dowling, Steroid therapy in multiple sclerosis. Point of view. *Arch Neurol*, 1987. 44(8): p. 803-7.
- 473.Neuhaus, O., J.J. Archelos, and H.P. Hartung, Immunomodulation in multiple sclerosis: from immunosuppression to neuroprotection. *Trends Pharmacol Sci*, 2003. 24(3): p. 131-8.

- 474.Zhang, J. and G. Hutton, Role of magnetic resonance imaging and immunotherapy in treating multiple sclerosis. *Annu Rev Med*, 2005. 56: p. 273-302.
- 475.Rudick, R.A., et al., Interferon beta induces interleukin-10 expression: relevance to multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 1996. 40(4): p. 618-27.
- 476.Group, T.I.M.S.S. and T.U.o.B.C.M.M.A. Group, Interferon beta-1b in the treatment of multiple sclerosis: final outcome of the randomized controlled trial. *Neurology*, 1995. 45(7): p. 1277-85.
- 477.Yong, V.W., Differential mechanisms of action of interferon-beta and glatiramer acetate in MS. *Neurology*, 2002. 59(6): p. 802-8.
- 478.Kappos, L., et al., Effect of early versus delayed interferon beta-1b treatment on disability after a first clinical event suggestive of multiple sclerosis: a 3-year follow-up analysis of the BENEFIT study. *Lancet*, 2007. 370(9585): p. 389-97.
- 479.Ziemssen, T. and W. Schrempf, Glatiramer acetate: mechanisms of action in multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol*, 2007. 79: p. 537-70.
- 480.Johnson, K.P., et al., Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology*, 1995. 45(7): p. 1268-76.
- 481.Johnson, K.P., et al., Extended use of glatiramer acetate (Copaxone) is well tolerated and maintains its clinical effect on multiple sclerosis relapse rate and degree of disability. Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology*, 1998. 50(3): p. 701-8.
- 482.Mancardi, G.L., et al., Effect of copolymer-1 on serial gadolinium-enhanced MRI in relapsing remitting multiple sclerosis. *Neurology*, 1998. 50(4): p. 1127-33.
- 483.Miller, A., et al., Treatment of multiple sclerosis with copolymer-1 (Copaxone): implicating mechanisms of Th1 to Th2/Th3 immune-deviation. *J Neuroimmunol*, 1998. 92(1-2): p. 113-21.
- 484.Martinelli, V., et al., Mitoxantrone: benefits and risks in multiple sclerosis patients. *Neurol Sci*, 2009. 30 Suppl 2: p. S167-70.
- 485.Tullman, M.J., A review of current and emerging therapeutic strategies in multiple sclerosis. *Am J Manag Care*, 2013. 19(2 Suppl): p. S21-7.
- 486.Nicholas, J., et al., New and Emerging Disease-Modifying Therapies for Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis: What is New and What is to Come. *J Cent Nerv Syst Dis*, 2012. 4: p. 81-103.
- 487.Auperin, T., Oral available agents in the treatment of RRMS. *Drug Healthc Patient Saf*, 2013. 5: p. 199-201.
- 488.Gasperini, C. and S. Ruggieri, Development of oral agent in the treatment of multiple sclerosis: how the first available oral therapy, fingolimod will change therapeutic paradigm approach. *Drug Des Devel Ther*, 2012. 6: p. 175-86.
- 489.Farooqi, N., B. Gran, and C.S. Constantinescu, Are current disease-modifying therapeutics in multiple sclerosis justified on the basis of studies in experimental autoimmune encephalomyelitis? *J Neurochem*, 2010. 115(4): p. 829-44.
- 490.Gran, B., et al., Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*, 2007. A. Lajtha(Springer: Heidelberg): p. 19.
- 491.Libbey, J.E. and R.S. Fujinami, Experimental autoimmune encephalomyelitis as a testing paradigm for adjuvants and vaccines. *Vaccine*, 2011. 29(17): p. 3356-62.
- 492.Ahn, M., et al., Pertussis toxin-induced hyperacute autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats is correlated with increased expression of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor alpha. *Neurosci Lett*, 2001. 308(1): p. 41-4.
- 493.Voskuhl, R.R. and K. Palaszynski, Sex hormones in experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for multiple sclerosis. *Neuroscientist*, 2001. 7(3): p. 258-70.
- 494.Tong, X.W. and Q.M. Xue, Alterations of serum phospholipids in patients with multiple sclerosis. *Chin Med J (Engl)*, 1993. 106(9): p. 650-4.
- 495.Hon, G.M., et al., Erythrocyte membrane fatty acids in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler*, 2009. 15(6): p. 759-62.
- 496.Huterer, S.J., W.W. Tourtellotte, and J.R. Wherrett, Alterations in the activity of phospholipases A2 in postmortem white matter from patients with multiple sclerosis. *Neurochem Res*, 1995. 20(11): p. 1335-43.
- 497.Kalyvas, A. and S. David, Cytosolic phospholipase A2 plays a key role in the pathogenesis of multiple sclerosis-like disease. *Neuron*, 2004. 41(3): p. 323-35.
- 498.Kihara, Y., et al., Platelet-activating factor production in the spinal cord of experimental allergic encephalomyelitis mice via the group IVA cytosolic phospholipase A2-lyso-PAFAT axis. *J Immunol*, 2008. 181(7): p. 5008-14.
- 499.Vana, A.C., et al., Arachidonyl trifluoromethyl ketone ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis via blocking peroxynitrite formation in mouse spinal cord white matter. *Exp Neurol*, 2011. 231(1): p. 45-55.
- 500.Marusic, S., et al., Blockade of cytosolic phospholipase A2 alpha prevents experimental autoimmune encephalomyelitis and diminishes development of Th1 and Th17 responses. *J Neuroimmunol*, 2008. 204(1-2): p. 29-37.

501. Marusic, S., et al., Cytosolic phospholipase A2 alpha-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*, 2005. 202(6): p. 841-51.
502. Thakker, P., et al., Cytosolic phospholipase A2alpha blockade abrogates disease during the tissue-damage effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis by its action on APCs. *J Immunol*, 2011. 187(4): p. 1986-97.
503. Kalyvas, A., et al., Differing roles for members of the phospholipase A2 superfamily in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain*, 2009. 132(Pt 5): p. 1221-35.
504. Cunningham, T.J., et al., Secreted phospholipase A2 activity in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *J Neuroinflammation*, 2006. 3: p. 26.
505. Palumbo, S., et al., Time-dependent changes in the brain arachidonic acid cascade during cuprizone-induced demyelination and remyelination. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2011. 85(1): p. 29-35.
506. Pinto, F., et al., Extracellular phospholipase A2 inhibitors suppress central nervous system inflammation. *Glia*, 2003. 44(3): p. 275-82.
507. von Allmen, C.E., et al., Secretory phospholipase A2-IIID is an effector molecule of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(28): p. 11673-8.
508. Kihara, Y., et al., Targeted lipidomics reveals mPGES-1-PGE2 as a therapeutic target for multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(51): p. 21807-12.
509. Esaki, Y., et al., Dual roles of PGE2-EP4 signaling in mouse experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(27): p. 12233-8.
510. Morrison, L.R. and P.C. Zamecnik, Demyelination by means of enzymes. *J Nerv Ment Dis*, 1949. 109(4): p. 358-60.
511. Hall, S.M. and N.A. Gregson, The in vivo and ultrastructural effects of injection of lysophosphatidyl choline into myelinated peripheral nerve fibres of the adult mouse. *J Cell Sci*, 1971. 9(3): p. 769-89.
512. Blakemore, W.F., et al., Remyelination in the spinal cord of the cat following intraspinal injections of lysolecithin. *J Neurol Sci*, 1977. 33(1-2): p. 31-43.
513. Jeffery, N.D. and W.F. Blakemore, Remyelination of mouse spinal cord axons demyelinated by local injection of lysolecithin. *J Neurocytol*, 1995. 24(10): p. 775-81.
514. Payne, T., J. Newmark, and K.H. Reid, The focally demyelinated rat fimbria: a new in vitro model for the study of acute demyelination in the central nervous system. *Exp Neurol*, 1991. 114(1): p. 66-72.
515. Birgbauer, E., T.S. Rao, and M. Webb, Lysolecithin induces demyelination in vitro in a cerebellar slice culture system. *J Neurosci Res*, 2004. 78(2): p. 157-66.
516. Vereyken, E.J., et al., An in vitro model for de- and remyelination using lysophosphatidyl choline in rodent whole brain spheroid cultures. *Glia*, 2009. 57(12): p. 1326-40.
517. Ousman, S.S. and S. David, Lysophosphatidylcholine induces rapid recruitment and activation of macrophages in the adult mouse spinal cord. *Glia*, 2000. 30(1): p. 92-104.
518. Kovarik, J., D. Chabannes, and J.F. Borel, Immunoregulation and drug treatment in chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat. *Int J Immunopharmacol*, 1995. 17(4): p. 255-63.
519. Andreoli, V.M., et al., Significance of plasma lysolecithin in patients with multiple sclerosis: a longitudinal study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1973. 36(4): p. 661-7.
520. Del Boccio, P., et al., Lipidomic investigations for the characterization of circulating serum lipids in multiple sclerosis. *J Proteomics*, 2011. 74(12): p. 2826-36.
521. Ryborg, A.K., et al., Lysophosphatidylcholine: a chemoattractant to human T lymphocytes. *Arch Dermatol Res*, 1994. 286(8): p. 462-5.
522. Ryborg, A.K., et al., Intracutaneous injection of lysophosphatidylcholine induces skin inflammation and accumulation of leukocytes. *Acta Derm Venereol*, 2000. 80(4): p. 242-6.
523. Radu, C.G., et al., T cell chemotaxis to lysophosphatidylcholine through the G2A receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(1): p. 245-50.
524. Osmer, I., et al., Deletion of the G2A receptor fails to attenuate experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, 2009. 207(1-2): p. 18-23.
525. Kanter, J.L., et al., Lipid microarrays identify key mediators of autoimmune brain inflammation. *Nat Med*, 2006. 12(1): p. 138-43.
526. Sundaram, J.R., et al., Cdk5/p25-induced cytosolic PLA2-mediated lysophosphatidylcholine production regulates neuroinflammation and triggers neurodegeneration. *J Neurosci*, 2012. 32(3): p. 1020-34.
527. Narita, M., et al., Molecular cloning, expression, and localization of a brain-specific phosphodiesterase I/nucleotide pyrophosphatase (PD-I alpha) from rat brain. *J Biol Chem*, 1994. 269(45): p. 28235-42.
528. Savaskan, N.E., et al., Autotaxin (NPP-2) in the brain: cell type-specific expression and regulation during development and after neurotrauma. *Cell Mol Life Sci*, 2007. 64(2): p. 230-43.
529. Blaho, V.A. and T. Hla, Regulation of mammalian physiology, development, and disease by the sphingosine 1-phosphate and lysophosphatidic acid receptors. *Chem Rev*, 2011. 111(10): p. 6299-320.
530. Weiner, J.A., J.H. Hecht, and J. Chun, Lysophosphatidic acid receptor gene vzg-1/lpA1/edg-2 is expressed by mature oligodendrocytes during myelination in the postnatal murine brain. *J Comp Neurol*, 1998. 398(4): p. 587-98.

- 531.Allard, J., et al., A rat G protein-coupled receptor selectively expressed in myelin-forming cells. *Eur J Neurosci*, 1998. 10(3): p. 1045-53.
- 532.Handford, E.J., et al., Edg2 receptor distribution in adult rat brain. *Neuroreport*, 2001. 12(4): p. 757-60.
- 533.Yu, N., et al., Characterization of lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate-mediated signal transduction in rat cortical oligodendrocytes. *Glia*, 2004. 45(1): p. 17-27.
- 534.Dugas, J.C., et al., Functional genomic analysis of oligodendrocyte differentiation. *J Neurosci*, 2006. 26(43): p. 10967-83.
- 535.Dennis, J., et al., Phosphodiesterase-1alpha/autotaxin's MORFO domain regulates oligodendroglial process network formation and focal adhesion organization. *Mol Cell Neurosci*, 2008. 37(2): p. 412-24.
- 536.Nogaroli, L., et al., Lysophosphatidic acid can support the formation of membranous structures and an increase in MBP mRNA levels in differentiating oligodendrocytes. *Neurochem Res*, 2009. 34(1): p. 182-93.
- 537.Contos, J.J., I. Ishii, and J. Chun, Lysophosphatidic acid receptors. *Mol Pharmacol*, 2000. 58(6): p. 1188-96.
- 538.Inoue, M., et al., Initiation of neuropathic pain requires lysophosphatidic acid receptor signaling. *Nat Med*, 2004. 10(7): p. 712-8.
- 539.Nagai, J., et al., Autotaxin and lysophosphatidic acid1 receptor-mediated demyelination of dorsal root fibers by sciatic nerve injury and intrathecal lysophosphatidylcholine. *Mol Pain*, 2010. 6: p. 78.
- 540.Brinkmann, V., et al., Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nat Rev Drug Discov*, 2010. 9(11): p. 883-97.
- 541.van Meeteren, L.A., et al., Anticancer activity of FTY720: phosphorylated FTY720 inhibits autotaxin, a metastasis-enhancing and angiogenic lysophospholipase D. *Cancer Lett*, 2008. 266(2): p. 203-8.
- 542.Valentine, W.J., et al., (S)-FTY720-vinylphosphonate, an analogue of the immunosuppressive agent FTY720, is a pan-antagonist of sphingosine 1-phosphate GPCR signaling and inhibits autotaxin activity. *Cell Signal*, 2010. 22(10): p. 1543-53.
- 543.Payne, S.G., et al., The immunosuppressant drug FTY720 inhibits cytosolic phospholipase A2 independently of sphingosine-1-phosphate receptors. *Blood*, 2007. 109(3): p. 1077-85.
- 544.Xin, C., et al., FTY720 suppresses interleukin-1beta-induced secretory phospholipase A2 expression in renal mesangial cells by a transcriptional mechanism. *Br J Pharmacol*, 2007. 150(7): p. 943-50.

Ειδικό Μέρος

1.Σκοπός

Η λυσοφωσφατιδυλοχολίνη (LPC) και το λυσοφωσφατιδικό οξύ, αποτελούν τα πιο σημαντικά μόρια της ομάδας των λυσοφωσφολιπιδίων (lysophospholipid, LPL). Λόγω της δράσης τους συγκαταλέγονται στην ομάδα των φλεγμονωδών μεσολαβητών μαζί με τα θρομβοξάνια, τα λευκοτριένια και τις προσταγλανδίνες, όπου μοιράζονται κοινά μεταβολικά μονοπάτια. Η φωσφολιπάση A2 και η αυτοταξίνη (ATX) αποτελούν τα βασικά ένζυμα που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των LPC και LPA, ρυθμίζοντας την ομοιόσταση τους και συνεπώς τις δράσεις τους. Ο άξονας LPC/ATX/LPA έχει συνδεθεί με πολλές χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις, δυο από τις οποίες μελετώνται στην παρούσα διδακτορική διατριβή, η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση και η σκλήρυνση κατά πλάκας.

Η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση (ΙΠΙ, idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) είναι μια χρόνια, μη αναστρέψιμη, προοδευτικά εξελισσόμενη διάμεση πνευμονία αγνώστου αιτιολογίας, στην οποία το φυσιολογικό πνευμονικό παρέγχυμα αντικαθίσταται από ινώδη ιστό. Τα ποσοστά θνησιμότητας της νόσου παραμένουν υψηλά, παρά τις υπάρχουσες θεραπείες οι οποίες επιβραδύνουν την εξέλιξη της νόσου. Έτσι, υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις που θα βελτιώσουν τον χρόνο επιβίωσης και την ποιότητα ζωής των ασθενών με ΙΠΙ. Ο άξονας ATX/LPA έχει δείχθει να παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της πνευμονικής ίνωσης. Αύξηση των επιπέδων της ATX, με αντίστοιχη αύξηση των επιπέδων LPA, έχουν αναφερθεί στο βρογχοκυψελιδικό υγρό (BALF) τόσο σε ΙΠΙ ασθενείς όσο και σε πειραματικά μοντέλα της ασθένειας. Επιπλέον, η γενετική απαλοιφή της ATX από τα κύτταρα του βρογχικού επιθηλίου και τα μακροφάγα εξασθένησε την ανάπτυξη της νόσου σε πειραματικά μοντέλα, δείχνοντας το δρόμο για την θεραπεία της πνευμονικής ίνωσης. Στόχος της παρούσας εργασίας είναι να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα ενός ισχυρού αναστολέα της ATX (PF-8380) στα πλαίσια την πειραματικής πνευμονικής ίνωσης που προκαλείται από μπλεομυκίνη (BLM), αλλά και η ανάπτυξη νέων ισχυρών αναστολέων της ATX, συμβάλλοντας στην προσπάθεια εύρεσης νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων για τη πνευμονική ίνωση.

Όσον αφορά την σκλήρυνση κατά πλάκας, στόχος της παρούσας εργασίας είναι να μελετηθεί η ομοιόσταση των φωσφολιπιδίων και να αποκρυπτογραφηθεί ο ρόλος της σηματοδότησης του LPA και της αυτοταξίνης (ATX) στην παθοφυσιολογία της νόσου. Η σκλήρυνση κατά πλάκας (MS, multiple sclerosis) είναι μία από τις πιο κοινές νευρολογικές διαταραχές στους ενήλικες. Είναι μια χρόνια, υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα νευροφλεγμονώδης και νευροεκφυλιστική διαταραχή που μπορεί να εκδηλωθεί με ποικιλία νευρολογικών συμπτωμάτων. Η σκλήρυνση κατά πλάκας σχετίζεται με την καταστροφή του ελύτρου της μυελίνης. Τα ολιγοδενδροκύτταρα είναι ένας κύριος στόχος της επίθεσης του ανοσοποιητικού στην σκλήρυνση κατά πλάκας, τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος απελευθερώνουν κυτταροτοξικές κυτοκίνες και αυτοαντιδραστικά. Τα λεμφοκύτταρα που στοχεύουν τις πρωτεΐνες της μυελίνης. Η θεραπεία περιλαμβάνει συνήθως διαχείριση των συμπτωμάτων της νόσου με φάρμακα που μειώνουν τη συχνότητα υποτροπής και την αναπηρία. Σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της ΣκΠ έχει δείχθει να παίζει η PLA2, ενώ ο FTY720, το πρώτο εγκεκριμένο φάρμακο για την θεραπεία της ΣκΠ, είναι ανταγωνιστής του S1P υποδοχέα ενισχύοντας το ενδιαφέρον και την προσοχή για την εμπλοκή του μεταβολισμού των λυσοφωσφολιπιδίων στην ΣκΠ. Επιπροσθέτως, η αυτοταξίνη έχει δείχθει πως εμπλέκεται στη ανάπτυξη του νευρικού συστήματος κατά την εμβρυική ηλικία, ενώ μειωμένη έκφραση της ATX έχει αναφερθεί στα ώριμα ολιγοδενδροκύτταρα. Επιπλέον, ο άξονας ATX/LPA έχει επίσης εμπλακεί στη μυελίνωση, με το LPA να παίζει καθοριστικό ρόλο στα μεταγενέστερα στάδια ωρίμανσης των ολιγοδενδροκυττάρων. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, είναι πιθανό η απορρύθμιση του σηματοδοτικού μονοπατιού ATX/LPA να επηρεάσει τις φλεγμονώδεις, εκφυλιστικές ή και τις δυο πλευρές της ΣκΠ, ερώτημα που προσπαθεί να απαντήσει η μελέτη αυτή.

2.Ο άξονας ATX/LPA στην Πνευμονική Ίνωση

2.1.Σύγκριση της ενδοτραχειακής και της στοματοφαρυγγικής οδού χορήγησης της μπλεομυκίνης στο πειραματόζωο *Mus Musculus*.

Περίληψη

Η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση (IPF) είναι μια θανατηφόρα ασθένεια που χαρακτηρίζεται από υπερβολική εναπόθεση συστατικών εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, την καταστροφή της αρχιτεκτονικής των πνευμόνων και της υποβάθμισης των πνευμονικών λειτουργιών. Η αιτία της παθογένειας της νόσου παραμένει ανεπαρκώς κατανοητή, όπως αντικατοπτρίζεται στην έλλειψη κατάλληλης θεραπείας. Μοντελοποίηση της ανθρώπινης ασθένειας σε ποντίκια μέσω της χορήγησης μπλεομυκίνης (BLM), παρά τους εγγενείς περιορισμούς, παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για τους υποκείμενους παθογενετικούς μηχανισμούς και έχει καθοριστική σημασία για την ανάπτυξη και επικύρωση νέων φαρμακολογικών παρεμβάσεων. Στην εργασία αυτή, συγκρίνουμε άμεσα την ενδοτραχειακή (intratracheal, IT) χορήγηση με την στοματοφαρυγγική αναρρόφηση (oropharyngeal, OA). Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η στοματοφαρυγγική οδός χορήγησης της μπλεομυκίνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ασφαλής και αποτελεσματική εναλλακτική λύση, ελαχιστοποιώντας την προεγχειρητική και πειραματική θνησιμότητα, διατηρώντας ταυτόχρονα ένα ισχυρό ινωτικό φαινότυπο, όπως εκτιμήθηκε με μια πληθώρα τυποποιημένων ποσοτικών αναλύσεων.

2.1.1.Εισαγωγή

Η μοντελοποίηση ανθρώπινων ασθενειών σε ποντίκια, παρά τους εγγενείς περιορισμούς, παρέχει πολύτιμες γνώσεις για τους υποκείμενους παθογενετικούς μηχανισμούς και συμβάλλει στην ανάπτυξη και επικύρωση νέων φαρμακολογικών παρεμβάσεων. Στο πλαίσιο της Ιδιοπαθούς Πνευμονικής Ίνωσης (ΙΠΙ, IPF), μια θανατηφόρα ασθένεια που χαρακτηρίζεται από υπερβολική εναπόθεση συστατικών εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, καταστροφή της αρχιτεκτονικής των πνευμόνων και την εξασθένηση των πνευμονικών λειτουργιών [1], το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο πειραματικό μοντέλο είναι η χορήγηση μπλεομυκίνης σε ποντίκια C57Bl6/J [2-4]. Η μπλεομυκίνη (BLM), είναι ένα μείγμα γλυκοπεπτιδίων που απομονώνονται από τον *Streptomyces verticillus* και αποτελεί ένα αντινεοπλασματικό/αντιβιοτικό φάρμακο για τη θεραπεία ορισμένων μορφών καρκίνου [5]. Η έλλειψη της υδρολάσης της μπλεομυκίνης στα πνευμονικά επιθηλιακά κύτταρα θεωρείται ότι είναι ο κύριος λόγος για την παρατηρούμενη τοξικότητα της μπλεομυκίνης στον πνεύμονα, με αποτέλεσμα την εμφάνιση πνευμονικής ίνωσης ως παρενέργεια σε ασθενείς με καρκίνο. Η παρατηρούμενη τοξικότητα στους ανθρώπους σύντομα οδήγησε στην χρήση της στο πειραματικό μοντέλο [6], όπου εξυπηρετεί την επιστημονική κοινότητα από τότε. Το μοντέλο χαρακτηρίζεται από απόπτωση των κυττάρων του κυψελιδικού επιθηλίου και από έκκριση προφλεγμονωδών και προ-ινωτικών παραγόντων, που οδηγούν σε ενεργοποίηση ινοβλαστών και εναπόθεση κολλαγόνου, την αναπαραγωγή ορισμένων, αλλά όχι όλων, βασικών χαρακτηριστικών της ανθρώπινης ασθένειας [3,4]. Η επακόλουθη φλεγμονή, η έλλειψη της κυψελιδικής επιθηλιακής υπερπλασίας και η γρήγορη ανατροπή του ινωτικού φαινοτύπου, αποτελούν τις κύριες διαφορές με την ανθρώπινη ασθένεια και τα μείζονα μειονεκτήματα του μοντέλου της μπλεομυκίνης, τα οποία ωστόσο παρακάμπτονται αν πραγματοποιηθεί επαναλαμβανόμενη χορήγηση της μπλεομυκίνης [7]. Η χορήγηση μπλεομυκίνης μέσω ενδοφλέβιας ή ενδοπεριτοναϊκής ένεσης, μιμείται την ανθρώπινη πνευμονική ίνωση με ανάπτυξη αλλοιώσεων μεταξύ του υπεζωκότα και του τοιχώματος [4]. Εντούτοις, η ενδοτραχειακή (IT) χορήγηση μίας μόνο δόσης μπλεομυκίνης με αποτέλεσμα την εμφάνιση ινωτικών περιοχών γύρω από τους βρόγχους, είναι η μέθοδος που

ακολουθείται συχνότερα [8]. Επιπλέον, η χορήγηση της μπλεομυκίνης μέσω ψεκασμού [9] δίνει ομοιογενή κατανομή των ινωτικών βλαβών και επαναλήψιμα αποτελέσματα σε σχέση με την ενδοτραχειακή ενστάλαξη [10]. Ένας εναλλακτικός τρόπος χορήγησης της μπλεομυκίνης στην τραχεία, είναι η στοματοφαρυγγική αναρρόφηση (OA) [15, 16]. Όπως παρουσιάζεται παρακάτω, η στοματοφαρυγγική χορήγηση 0,8U/Kg μπλεομυκίνης έχει παρόμοιες ινωτικές αποκρίσεις όπως η ενδοτραχειακή χορήγηση 3.2U/kg. Επιπλέον, η στοματοφαρυγγική χορήγηση μείωσε την προ-εγχειρητική θνησιμότητα, λόγω της ευκολίας και της ταχύτητας των διαδικασιών, ενώ η χαμηλότερη δόση μπλεομυκίνης που χρησιμοποιήθηκε μείωσε επίσης την πειραματική θνησιμότητα.

2.1.2.Μεθοδολογία

Πειραματικό μοντέλο μπλεομυκίνης. Η πνευμονική ίνωση επάγεται σε αρσενικά και θηλυκά ποντίκια C57BL6/J, ηλικίας 8-12 εβδομάδων, με ενδοτραχειακή (IT) ή στοματοφαρυγγική (OA) χορήγηση μπλεομυκίνης (BLM HCL, Nippon Kayaku, 15mg/vial διαλυμένο σε 0.9% φυσιολογικό ορό), σύμφωνα με την εξής διαδικασία: το ποντίκι αναισθητοποιείται με ενδοπεριτοναϊκή ένεση ξυλαζίνης/ κεταμίνης/ ατροπίνης (10mg/100mg/0,05mg/kg αντίστοιχα). Στη συνέχεια, σταθεροποιείται σε ειδική βάση υπό γωνία 45-60° και με το κατάλληλο φωτισμό διακρίνεται η τραχεία ανάμεσα στις φωνητικές χορδές. Στην ενδοτραχειακή οδό χορήγησης (0.08U/ποντίκι σε όγκο 100ul), η μπλεομυκίνη εγχέεται απευθείας στο πνεύμονα μέσω ψεκασμού. Όσον αφορά την στοματοφαρυγγική οδό (0.02U/ ποντίκι σε όγκο 50ul) η μπλεομυκίνη χορηγείται ως υγρό.

***In vivo* μετρήσεις πνευμονικής λειτουργίας.** Η αξιολόγηση της πνευμονικής λειτουργίας έγινε στον μηχανικό αναπνευστήρα FlexiVent system (SCIREQ, Montreal, Canada) χρησιμοποιώντας μια τεχνική αναγκαστικής ταλάντωσης (FOT, μονής και χαμηλής συχνότητας) και μετρήσεις πίεσης-όγκου (PV), από όπου προκύπτουν δεδομένα για την ολική αναπνευστική ελαστικότητα (Ers) και συμμόρφωση (Crs), την ελαστικότητα του πνευμονικού ιστού (H) και τη στατική συμμόρφωση (Cst).

Συλλογή βρογχοκυψελιδικού υγρού (BALF) και ανάλυση. Το βρογχοκυψελιδικό υγρό συλλέχθηκε μετά από πλύση του πνεύμονα με 3ml φυσιολογικού ορού. Τα BALFs φυγοκεντρήθηκαν στα 100g για 10 λεπτά, το υπερκείμενο φυλάσσεται στους -80°C για μέτρηση πρωτεΐνης και κολλαγόνου, ενώ τα κύτταρα μετρώνται με 0.4% Trypan blue. Η συνολική συγκέντρωση πρωτεΐνης αξιολογήθηκε με τη δοκιμασία πρωτεΐνης Bradford σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Η ποσοτικοποίηση του διαλυτού κολλαγόνου πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο Sirius Red. Εν συντομία, δείγματα BALF (50 μλ.) αραιώθηκαν σε 1 mL 0,5 M οξικού οξέος και ίσος όγκος Sirius Red (120 μg/mL σε 0,5 M οξικό οξύ). Τα δείγματα επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά, και μετά από φυγοκέντρηση, μετράται η απορρόφηση του υπερκείμενου στα 540 nm. Οι τιμές που λαμβάνονται μετατρέπονται σε μg/mL σύμφωνα με τη πρότυπη καμπύλη με κολλαγόνο τύπου I από αρουραίο (0-500 μg/mL).

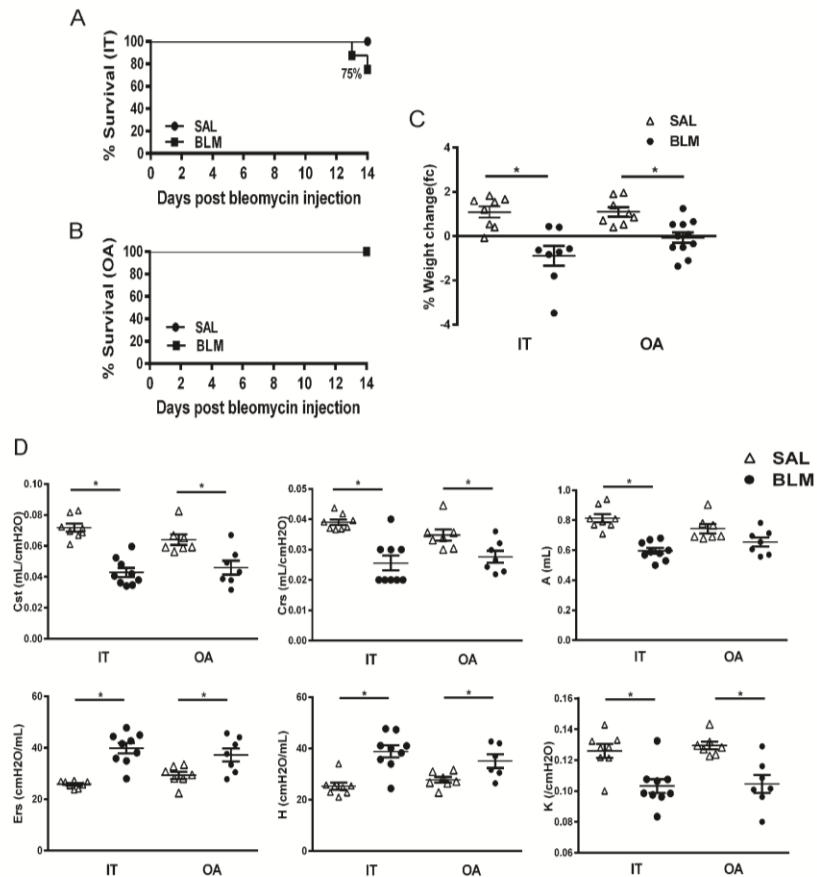
Ιστοπαθολογία πνευμονικού ιστού. Οι ιστοί των πνευμόνων βάφτηκαν με αιματοξυλίνη/ηωσίνη (H&E) ή τριχρωματική χρώση Masson. Η ιστοπαθολογική ανάλυση βασίστηκε στην τροποποιημένη κλίμακα Ashcroft [2], σε φωτογραφίες που ελήφθησαν από μικροσκόπιο Nikon Eclipse E800 (Nikon Corp., Shinagawa-ku, Japan) στο οποίο είχε προσαρτηθεί ψηφιακή φωτογραφική μηχανή (Q Imaging EXI Aqua digital camera), με χρήση του λογισμικού Q-Capture Pro 7.

Απομόνωση RNA και Real Time PCR. Το ολικό RNA απομονώθηκε από τον αριστερό λοβό του πνεύμονα χρησιμοποιώντας το διάλυμα Tri Reagent (Molecular Research Center, Inc., USA) και έπειτα από κατεργασία με DNase (RQ1 RNase-free DNase, Promega, Wis, USA), συντέθηκε cDNA από 1.5 μg RNA (M-MLV RT, Promega). Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (QRT-PCR) πραγματοποιήθηκε με SsoFast EvaGreen Supermix σε Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories Ltd, CA, USA). (21). Η αλληλουχία εκκινητών για το col1a1 ήταν : (f, 5'-CTACTACCGGGCCGATGATG-3', r, 5'-CGATCCAGTACTCTCCGCTC-3', 188bp). tgfb1 (f, 5'-CTCCCGTGGCTTCTAGTG C-3', r, 5'-GCCTTAGTTTGGACAGGATCT G-3', 133bp), B2M (f, 5'-TTCTGGTGCTTGTCTCACTGA-3', r, 5'-CAGTATGTTCCGGCTTCCCATTC3', 104bp).

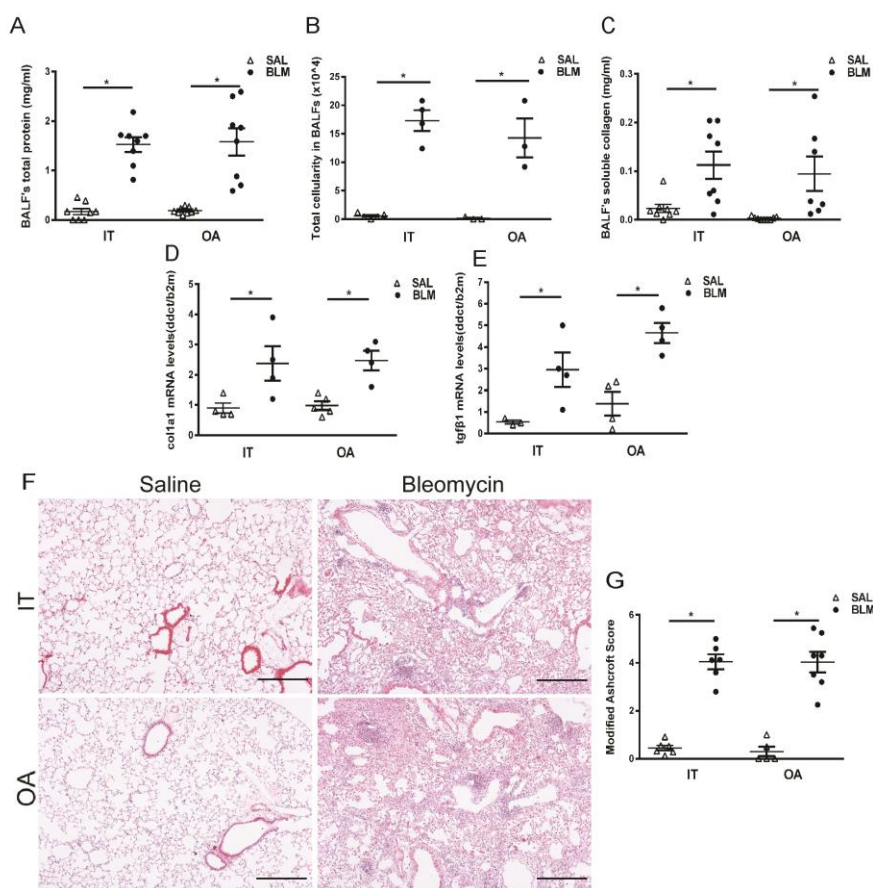
2.1.3.Αποτελέσματα-Συζήτηση

Πέρα από την οδό χορήγησης, η σοβαρότητα των επιδράσεων της μπλεομυκίνης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το γενετικό υπόβαθρο των ποντικών (δηλ. C57Bl6 J έναντι N), όπως επίσης και οι συνθήκες κάτω από τις οποίες εκτρέφονται τα πειραματόζωα. Ως αποτέλεσμα, ένα ευρύ φάσμα συγκεντρώσεων μπλεομυκίνης έχουν χρησιμοποιηθεί για την πρόκληση πνευμονικής ίνωσης σε ποντικούς [2,4]. Αρχικά, χορηγήθηκαν τέσσερις διαφορετικές δόσεις μπλεομυκίνης μέσω στοματοφαρυγγικής οδού. Η χορήγηση 3,2U/Kg μπλεομυκίνης, η δόση που χρησιμοποιείται στην ενδοτραχειακή οδό χορήγησης, καθώς και η μικρότερη δόση των 1,6U/Kg, οδήγησαν σε σημαντικά ποσοστά θνησιμότητας (**Συμπληρωματική Εικόνα 1A**). Αντίθετα, με την δόση των 0,8 U/Kg παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές αυξήσεις σε όλους τους δείκτες της ασθένειας (**Συμπληρωματική Εικόνα 1B-H**) με ελάχιστη θνησιμότητα και έτσι επιλέχθηκε για την άμεση σύγκριση των οδών IT και OA. Η πνευμονική ίνωση προκλήθηκε με χορήγηση μπλεομυκίνης μέσω της ενδοτραχειακής ή στοματοφαρυγγικής οδού (στα 3.2 και 0,8 U/kg αντιστοίχως) σε ποντίκια C57Bl6/J, αρσενικά και θηλυκά, ηλικίας 8-12 εβδομάδων. Όσον αφορά την επιβίωση, δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δυο οδών χορήγησης (**Εικόνα 1A, B**). Ωστόσο, μετά από την στοματοφαρυγγική χορήγηση δεν σημειώθηκαν θάνατοι, πιθανότατα λόγω της χαμηλότερης δόσης μπλεομυκίνης. Παρομοίως, οι δύο οδοί χορήγησης μπλεομυκίνης, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (φυσιολογικός ορός), οδήγησαν σε σημαντική απώλεια βάρους (**Εικόνα 1C**), ένας από τους βασικούς δείκτες της βλάβης που προκαλείται από μπλεομυκίνη. 14 ημέρες μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης (ή φυσιολογικού ορού) τα ποντίκια συνδέονται με έναν μηχανικό αναπνευστήρα για την αξιολόγηση των πνευμονικών λειτουργιών (**Εικόνα 1D**). Η λειτουργική βλάβη που προκαλείται από την στοματοφαρυγγική χορήγηση μπλεομυκίνης είναι εξίσου σοβαρή με την βλάβη από ενδοτραχειακή χορήγηση. Παρατηρήθηκε μείωση της στατικής συμμόρφωσης των πνευμόνων (Cst), του αναπνευστικού συστήματος (Crs) και της συνολικής χωρητικότητα πνεύμονα (A), καθώς και αύξηση στην ελαστικότητα του αναπνευστικού συστήματος (Ers) και του ιστού (H), και στην καμπυλότητα της καμπύλης πίεσης-όγκου (K) (**Εικόνα 1D**). Η οδός χορήγησης της μπλεομυκίνης δεν

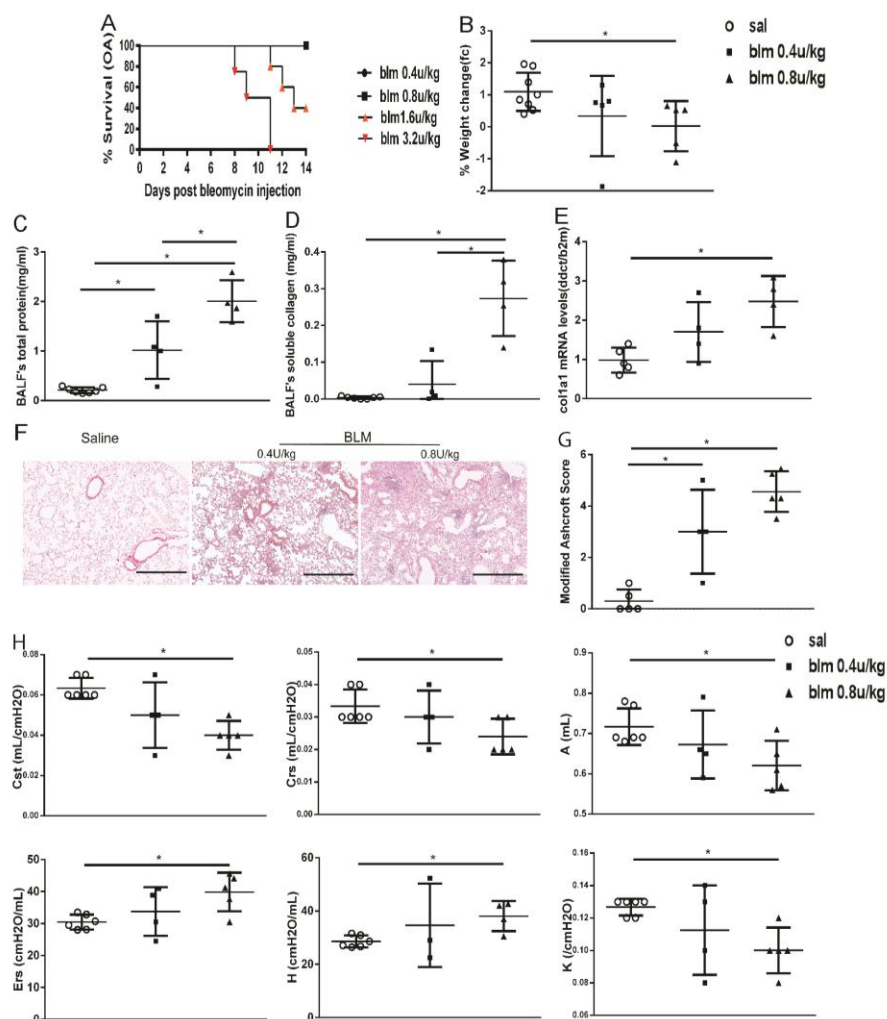
επηρέασε την αγγειακή διαρροή που προκαλείται από μπλεομυκίνη, όπως υποδεικνύεται από τα συνολικά επίπεδα πρωτεΐνης που μετρώνται στο βρογχοκυψελιδικό υγρό (BALF) **(Εικόνα 2Α)**. Ομοίως, δεν διαπιστώθηκαν διαφορές στο συνολικό αριθμό των φλεγμονωδών κυττάρων στο βρογχοκυψελιδικό υγρό **(Εικόνα 2Β)**. Επιπλέον, στο βρογχοκυψελιδικό υγρό προσδιορίστηκε η ποσότητα του διαλυτού κολλαγόνου, ως έμμεσος δείκτης της ίνωσης του ιστού. Και πάλι, δεν παρατηρήθηκε διαφορά στη διαφορετική οδό χορήγησης της μπλεομυκίνης (Εικόνα 2C). Πρέπει να σημειωθεί ότι η μέτρηση της περιεκτικότητας της υδροξυπρολίνης του πνευμονικού ιστού είναι η πλέον ακριβής μέθοδος για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας του κολλαγόνου στον πνεύμονα και, ως εκ τούτου η βέλτιστη για την αξιολόγηση της ίνωσης [8]. Ωστόσο, αυτή η τεχνική απαιτεί τουλάχιστον το μισό πνεύμονα, περιορίζοντας έτσι τον αριθμό των παράλληλων αναλύσεων που μπορούν να εκτελεστούν (είτε στο mRNA είτε στην πρωτεΐνη ή επίπεδο ενζυμικής δραστηριότητας) ή απαιτούν επιπλέον αριθμό ποντικών. Επιπροσθέτως, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα επίπεδα έκφρασης κολλαγόνου 1α1 και στα επίπεδα του TGF-β, τον κύριο προ-ινωτικό παράγοντα **(Εικόνα 2D-E)**. Παράλληλα, όπως φαίνεται σε αντιπροσωπευτικές εικόνες χρώσης πνευμονικού ιστού με H&E, η μπλεομυκίνη προκάλεσε εκτεταμένες ινωτικές αλλοιώσεις και παραμόρφωση της αρχιτεκτονικής δομής σε σύγκριση με τα ζώα της ομάδας ελέγχου, ανεξάρτητα από τη μέθοδο χορήγησης (Εικόνα 2F). Επιπλέον, ειδική χρώση για το κολλαγόνο του πνευμονικού ιστού δεν έδειξε μεγάλες διαφορές μεταξύ των δύο οδών χορήγησης (Εικόνα S2A-B), αντίστοιχα ήταν και τα αποτελέσματα βαθμολόγησης Ashcroft (Εικόνα 2G). Συνολικά, συγκρίναμε για πρώτη φορά την στοματοφαρυγγική οδό χορήγησης της μπλεομυκίνης με την ενδοτραχειακή οδό, χρησιμοποιώντας μια πληθώρα αναλύσεων συμπεριλαμβανομένων in vivo μετρήσεων της λειτουργίας των πνευμόνων που έχουν μεγάλη κλινική σημασία. Τα αποτελέσματά μας υποδηλώνουν ότι η στοματοφαρυγγική χορήγηση (OA) μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ασφαλής και αποτελεσματική εναλλακτική οδός χορήγησης της μπλεομυκίνης, χωρίς να απαιτούνται επεμβατικές χειρουργικές επεμβάσεις και ταυτόχρονα παρέχοντας ένα ισχυρό ινωτικό προφίλ που μπορεί να αναπαραχθεί με ευκολία.



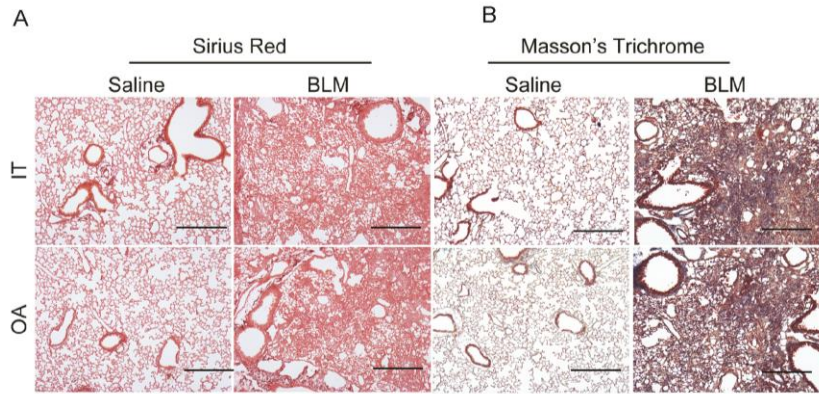
Εικόνα 1. Αποτελέσματα της χορήγησης μπλεομυκίνης με ενδοτραχειακή (intratracheal microspraying, IT) ή στοματοφαρυγγική έγχυση (oropharyngeal aspiration, OA) στην θνησιμότητα, απώλεια βάρους και πνευμονικές λειτουργίες. **(A, B)** Kaplan-Meier καμπύλες επιβίωσης **(C)** Ποσοστό μεταβολής βάρους μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης ή φυσιολογικού ορού με τις δύο οδούς χορήγησης **(D)** *In vivo* μηχανικές παράμετροι του πνεύμονα: στατική συμμόρφωση (static lung compliance, Cst), συμμόρφωση αναπνευστικού συστήματος (respirator system compliance, Crs), συνολική χωρητικότητα πνεύμονα (A), ελαστικότητα αναπνευστικού συστήματος (Ers) και ιστού (H) και η παράμετρος της καμπύλης όγκου-πίεσης (K).



Εικόνα 2. Βιοχημικές και ιστολογικές διαφορές της χορήγησης μπλεομυκίνης με ενδοτραχειακή (intratracheal microspraying, IT) ή στοματοφαρυγγική έγχυση (oropharyngeal aspiration, OA). (A) Ποσότητα κυττάρων που μετρήθηκαν στο βρογχοκυψελιδικό υγρό μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης ή φυσιολογικού ορού. **(B)** Συνολική ποσότητα πρωτεΐνης που μετρήθηκε στο βρογχοκυψελιδικό υγρό μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης ή φυσιολογικού ορού. **(C)** Ποσότητα διαλυτού κολλαγόνου που μετρήθηκε στο βρογχοκυψελιδικό υγρό μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης ή φυσιολογικού ορού. **(D,E)** qRT-PCR ανάλυση των επιπέδων του Col1a1 και Tgfb σε πνευμονικό ιστό από ποντίκια των δυο πειραματικών ομάδων και των αντίστοιχων ομάδων ελέγχου. **(F)** Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες πνευμονικού ιστού με χρώση αιματοξυλίνης/εωσίνης. **(G)** Βαθμολόγηση της πνευμονικής ίνωσης με βάση την κλίμακα Ashcroft.



Συμπληρωματική Εικόνα 1. Μελέτη δοσολογίας μπλεομυκίνης μέσω στοματοφαρυγγικής οδού (oropharyngeal aspiration, OA). (A) Kaplan-Meier καμπύλες επιβίωσης για τέσσερις συγκεντρώσεις μπλεομυκίνης (B) Ποσοστό μεταβολής βάρους μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης (0,4U/kg και 0,8U/kg) ή φυσιολογικού ορού. (C) Συνολική ποσότητα πρωτεΐνης που μετρήθηκε στο βρογχοκυψελιδικό υγρό και (D) Ποσότητα διαλυτού κολλαγόνου που μετρήθηκε στο βρογχοκυψελιδικό υγρό μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης (0,4U/kg και 0,8U/kg) ή φυσιολογικού ορού. (E) qRT-PCR ανάλυση των επιπέδων του Col1a1 σε πνευμονικό ιστό από ποντίκια των δυο πειραματικών ομάδων και της ομάδας ελέγχου (saline). (F) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες πνευμονικού ιστού με χρώση αιματοξυλίνης/εωσίνης μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης σε δυο διαφορετικές συγκεντρώσεις. (G) Βαθμολόγηση της πνευμονικής ίνωσης με βάση την κλίμακα Ashcroft. (H) *In vivo* μηχανικές παράμετροι του πνεύμονα: στατική συμμόρφωση (static lung compliance, Cst), συμμόρφωση αναπνευστικού συστήματος (respirator system compliance, Crs), συνολική χωρητικότητα πνεύμονα (A), ελαστικότητα αναπνευστικού συστήματος (Ers) και ιστού (H) και η παράμετρος της καμπύλης όγκου-πίεσης (K).



Συμπληρωματική εικόνα 2. Ιστολογικές διαφορές της χορήγησης μπλεομυκίνης με ενδοτραχειακή (intratracheal microspraying, IT) ή στοματοφαρυγγική έγχυση (oropharyngeal aspiration, OA). (A-B) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες πνευμονικού ιστού με χρώση Sirius Red ή Masson Trichrome, αποκαλύπτουν την έκταση της ίνωσης και την εναπόθεση κολλαγόνου στον πνευμονικό ιστό μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης μέσω ενδοτραχειακής ή στοματοφαρυγγικής οδού.

Βιβλιογραφία

1. Martinez FJ, Collard HR, Pardo A, Raghu G, Richeldi L, Selman M, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Nature reviews Disease primers*. 2017;3:17074.
2. Tashiro J, Rubio GA, Limper AH, Williams K, Elliot SJ, Ninou I, et al. Exploring Animal Models That Resemble Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Frontiers in medicine*. 2017;4:118.
3. Jenkins RG, Moore BB, Chambers RC, Eickelberg O, Königshoff M, Kolb M, et al. An Official American Thoracic Society Workshop Report: Use of Animal Models for the Preclinical Assessment of Potential Therapies for Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2017;56(5):667-79.
4. Mouratis MA, Aidinis V. Modeling pulmonary fibrosis with bleomycin. *Curr Opin Pulm Med*. 2011;17(5):355-61.
5. Bolzan AD, Bianchi MS. DNA and chromosome damage induced by bleomycin in mammalian cells: An update. *Mutation research*. 2018;775:51-62.
6. Adamson IY, Bowden DH. The pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Pathol*. 1974;77(2):185-97.
7. Degryse AL, Lawson WE. Progress toward improving animal models for idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Med Sci*. 2011;341(6):444-9.
8. Jenkins RG, Moore BB, Chambers RC, Eickelberg O, Königshoff M, Kolb M, et al. An Official American Thoracic Society Workshop Report: Use of Animal Models for the Preclinical Assessment of Potential Therapies for Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2017;56(5):667-79.
9. Bivas-Benita M, Zwier R, Junginger HE, Borchard G. Non-invasive pulmonary aerosol delivery in mice by the endotracheal route. *Eur J Pharm Biopharm*. 2005;61(3):214-8.
10. Robbe A, Tassin A, Carpentier J, Decl, A-E, et al. Intratracheal Bleomycin Aerosolization: The Best Route of Administration for a Scalable and Homogeneous Pulmonary Fibrosis Rat Model? *BioMed Research International*. 2015;2015:10.
11. De Vooght V, Vanoirbeek JA, Haenen S, Verbeken E, Nemery B, Hoet PH. Oropharyngeal aspiration: an alternative route for challenging in a mouse model of chemical-induced asthma. *Toxicology*. 2009;259(1-2):84-9.
12. Rao GV, Tinkle S, Weissman DN, Antonini JM, Kashon ML, Salmen R, et al. Efficacy of a technique for exposing the mouse lung to particles aspirated from the pharynx. *J Toxicol Environ Health A*. 2003;66(15):1441-52.
13. Foster WM, Walters DM, Longphre M, Macri K, Miller LM. Methodology for the measurement of mucociliary function in the mouse by scintigraphy. *J Appl Physiol* (1985). 2001;90(3):1111-7.
14. Lakatos HF, Burgess HA, Thatcher TH, Redonnet MR, Hernady E, Williams JP, et al. Oropharyngeal aspiration of a silica suspension produces a superior model of silicosis in the mouse when compared to intratracheal instillation. *Exp Lung Res*. 2006;32(5):181-99.
15. Bale S, Sunkoju M, Reddy SS, Swamy V, Godugu C. Oropharyngeal aspiration of bleomycin: An alternative experimental model of pulmonary fibrosis developed in Swiss mice. *Indian J Pharmacol*. 2016;48(6):643-8.
16. Egger C, Cannet C, Gerard C, Jarman E, Jarai G, Feige A, et al. Administration of bleomycin via the oropharyngeal aspiration route leads to sustained lung fibrosis in mice and rats as quantified by UTE-MRI and histology. *PLoS One*. 2013;8(5):e63432.
17. Oikonomou N, Mouratis MA, Tzouvelekis A, Kaffe E, Valavanis C, Vilaras G, et al. Pulmonary autotaxin expression contributes to the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2012;47(5):566-74.
18. Yu G, Tzouvelekis A, Wang R, Herazo-Maya JD, Ibarra GH, Srivastava A, et al. Thyroid hormone inhibits lung fibrosis in mice by improving epithelial mitochondrial function. *Nat Med*. 2018;24(1):39-49.

2.2. Η φαρμακολογική στόχευση του άξονα ATX/LPA εξασθενεί την ίνωση που προκαλείται από μπλεομυκίνη

Περίληψη

Η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση (ΙΠΙ) είναι μια χρόνια πνευμονική ινωτική νόσος με δυσμενή πρόγνωση και άγνωστης αιτιολογίας. Η αυτοταξίνη (ATX) είναι μια εκκρινόμενη λυσοφωσφολιπάση D, που ευθύνεται σε μεγάλο βαθμό για την εξωκυττάρια παραγωγή του λυσοφωσφατυδικού οξέος (LPA), ενός βιοδραστικού φωσφολιπιδίου. Το LPA έχει πολυάριθμες επιδράσεις στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους, με την συμμετοχή τουλάχιστον 6 υποδοχέων (LPA_R) στο μονοπάτι σηματοδότησης του, οι οποίοι εμφανίζουν ευρεία κατανομή και επικαλυπτόμενες ιδιότητες. Ο άξονας ATX/LPA έχει προταθεί ως θεραπευτικός στόχος σε διαφορετικές χρόνιες φλεγμονώδεις και ινωτικές διαταραχές, συμπεριλαμβανομένης της πνευμονικής ίνωσης. Στην παρούσα έκθεση, εξετάσαμε την αποτελεσματικότητα ενός ισχυρού αναστολέα της ATX (PF-8380) και ενός ανταγωνιστή του LPA_{R1} (AM095) στην πνευμονική ίνωση που προκαλείται από μπλεομυκίνη (BLM). Και οι δύο ενώσεις εμποδίζουν την ανάπτυξη εκτεταμένης πνευμονικής ίνωσης και την παραμόρφωση της αρχιτεκτονικής των πνευμόνων, παρουσιάζοντας ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές σε διαφορετικές εκφάνσεις της πειραματικής ασθένειας.

2.2.1. Εισαγωγή

Η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση (ΙΠΙ, IPF) είναι μια χρόνια ινώδης μορφή διάχυτης πνευμονικής νόσου με δυσμενή πρόγνωση, η οποία χαρακτηρίζεται από προοδευτική δύσπνοια και ραδιογραφικά διάχυτη διήθηση. Το σήμα κατατεθέν της ΙΠΙ είναι η παρουσία ενός υπερπλαστικού επιθηλίου που επικαλύπτει τις ινοβλαστικές εστίες και η εναπόθεση συστατικών εξωκυττάριας ουσίας, οδηγώντας σε παχύνσεις των κυψελιδικών διαφραγμάτων, παραμόρφωση της πνευμονικής αρχιτεκτονικής και επιδείνωση των φυσιολογικών πνευμονικών λειτουργιών. Αν και η αιτιολογία και η παθογένεια της ΙΠΙ παραμένουν ελάχιστα κατανοητές, το τρέχον δόγμα υποδηλώνει ότι οι μηχανισμοί που οδηγούν στην ΙΠΙ αντανakλούν την ανώμαλη, απορυθμισμένη επούλωση πληγών σε απόκριση της επίμονης επιθηλιακής βλάβης [1, 2].

Η αυτοταξίνη (ATX) είναι μια εκκρινόμενη λυσοφωσφολιπάση D που καταλύει την υδρόλυση της λυσοφωσφατιδυλοχολίνης (LPC) στο λυσοφωσφατιδικό οξύ (LPA) και θεωρείται υπεύθυνη για την πλειονότητα της εξωκυττάριας παραγωγής LPA [3]. Με τη σειρά του, το LPA προκαλεί αποκρίσεις τύπου αυξητικού παράγοντα σχεδόν σε κάθε κυτταρικό τύπο, συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής ανάπτυξης, επιβίωσης, διαφοροποίησης και κινητικότητας, μέσω δέσμευσης σε τουλάχιστον έξι συζευγμένους με G πρωτεΐνη υποδοχείς (GPCRs, LPAR1-6) που παρουσιάζουν αλληλεπικαλυπτόμενες εξειδικεύσεις και ευρεία διανομή [3]. Αυξημένη δραστηριότητα του άξονα ATX/LPA έχει αναφερθεί σε πολλές χρόνιες φλεγμονώδεις διαταραχές και σε διάφορους τύπους καρκίνου [3-5].

Αυξημένα επίπεδα ATX και LPA έχουν αναφερθεί σε ασθενείς με ΙΠΙ και πειραματικά μοντέλα, ενώ η γενετική ή φαρμακολογική στόχευση της ATX ή του υποδοχέα LPAR1 εξασθενεί την νόσο σε πειραματικές μελέτες [6-8]. Η αποτελεσματικότητα των αναστολέων της ATX μικρού μορίου ή ανταγωνιστών του LPAR1 έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία [9-13]. Συγκεκριμένα, η στόχευση της ATX έχει αποδειχθεί αποτελεσματική στο μοντέλο της πνευμονικής ίνωσης που προκαλείται από μπλεομυκίνη τόσο με μικρά μόρια αναστολείς [7, 14, 15] όσο και με απταμερή DNA [16], ωστόσο στις υπάρχουσες μελέτες έχει εφαρμοσθεί προφυλακτική θεραπεία, ενώ μια πρόσφατη αναφορά συγκεντρώνει όλα τα θεραπευτικά αποτελέσματα της στόχευσης της ATX στην ΙΠΙ [17]. Επιπλέον, η

αποτελεσματικότητα της αναστολής της ATX και του ανταγωνισμού του LPAR1 δεν έχει συγκριθεί άμεσα, ενώ δεν έχει διερευνηθεί ένα συνεργατικό θεραπευτικό όφελος των δυο στο πλαίσιο της πνευμονικής ίνωσης.

Ως εκ τούτου, στην εργασία αυτή, εξετάσαμε έναν από τους ισχυρότερους αναστολείς ATX, τον PF-8380 [18], τόσο σε προφυλακτικό όσο και σε θεραπευτικό σχήμα, επιβεβαιώνοντας ότι η αναστολή ATX είναι αποτελεσματική στην πρόληψη ή στην εξασθένηση της ανάπτυξης πνευμονικής ίνωσης που προκαλείται από BLM. Παράλληλα, ο ανταγωνισμός LPAR1 με την AM095 [19] έδειξε επίσης αποτελεσματικότητα, με ποιοτικές και ποσοτικές μετρήσεις που αφορούν διαφορετικές πτυχές της ανάπτυξης της νόσου.

2.2.2. Μεθοδολογία

Ποντίκια. Όλα τα πειραματόζωα εκτρέφονται σε ειδικές εγκαταστάσεις, υπό συγκεκριμένες και στείρες συνθήκες: η θερμοκρασία κυμαίνεται στους 20–22°C, η υγρασία στο 55±5%, υπάρχει σταθερός κύκλος φωτός-σκότους 12 ωρών και η πρόσβαση σε νερό και τροφή είναι ελεύθερη (24ώρες). Το πρωτόκολλο έρευνας έχει εγκριθεί από την επιτροπή δεοντολογίας του ΕΚΕΒΕ «Αλέξανδρος Φλέμινγκ» και την κτηνιατρική υπηρεσία.

Πειραματικό μοντέλο μπλεομυκίνης και χορήγησης αναστολέων. Η πνευμονική ίνωση προκλήθηκε σε αρσενικά ποντίκια C57BL6/J (ηλικίας 8-10 εβδομάδων, μέσου βάρους 25gr) με ενδοτραχειακή έγχυση 3.2U/Kg μπλεομυκίνης [7]. Οι αναστολείς, PF-8380 και AM095, χορηγήθηκαν δύο φορές ημερησίως για 15ημέρες (από την ημέρα -1 έως την 14η), δια στόματος. Η ομάδα ελέγχου έλαβε εικονική θεραπεία με Hydroxypropyl Cellulose 2% (w/v)/Tween 80 0.1% (v/v)), το διάλυμα στο οποίο είχαν διαλυθεί οι αναστολείς.

Συλλογή βρογχοκυψελιδικού υγρού (BALF) και ανάλυση. Το βρογχοκυψελιδικό υγρό συλλέχθηκε με την τυπική διαδικασία (πλύση με 3ml φυσιολογικού ορού) (7). Η συνολική συγκέντρωση πρωτεΐνης αξιολογήθηκε με τη δοκιμασία πρωτεΐνης Bradford σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Η

ποσοτικοποίηση του διαλυτού κολλαγόνου πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο ανάλυσης Sirius Red (7). Τα δείγματα BALF εξετάστηκαν για τα επίπεδα LPA χρησιμοποιώντας υγρή χρωματογραφία υψηλής ανάλυσης με φασματομέτρο μάζας (HPLC-MS / MS) (20).

Συλλογή ορού αίματος και ανάλυση. Το αίμα συλλέχθηκε 1, 3, 6 ώρες μετά την τελευταία χορήγηση των αναστολέων και το πλάσμα απομονώθηκε μετά από φυγοκέντρηση (2000g στους 4°C για 20 λεπτά) (21). Η δραστικότητα της ATX σε δείγματα πλάσματος μετρήθηκε με τη δοκιμασία TOOS και τα επίπεδα LPA, καθώς και οι συγκεντρώσεις PF-8380/AM095 ποσοτικοποιήθηκαν με HPLC-MS / MS (22).

Ιστοπαθολογία πνευμονικού ιστού. Οι ιστοί των πνευμόνων βάφτηκαν με αιματοξυλίνη/ηωσίνη (H&E) ή τριχρωματική χρώση Masson και πραγματοποιήθηκε ανοσοχρώση με αντίσωμα α-SMA (21). Η ιστοπαθολογική ανάλυση βασίστηκε στην τροποποιημένη κλίμακα Ashcroft (23), σε φωτογραφίες που ελήφθησαν από μικροσκόπιο Nikon Eclipse E800 (Nikon Corp., Shinagawa-ku, Japan) στο οποίο είχε προσαρτηθεί ψηφιακή φωτογραφική μηχανή (Q Imaging EXI Aqua digital camera), με χρήση του λογισμικού Q-Capture Pro 7.

Απομόνωση RNA και Real Time PCR. Το ολικό RNA απομονώθηκε από τον αριστερό λοβό του πνεύμονα (21). Η αλληλουχία εκκινητών για το col1a1 ήταν : (f, 5'-CTACTACCGGGCCGATGATG-3', r, 5'-CGATCCAGTACTCTCCGCTC-3', 188bp). Τα αποτελέσματα της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Real Time PCR) κανονικοποιούνται με τα επίπεδα της β2-μικροσφαιρίνης (21).

Στατιστική ανάλυση. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με ανάλυση ANOVA (one-way ANOVA, Bonferroni or Dunn's multiple pair test). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσος όρος (mean ± SEM). Το *υποδηλώνει στατιστική διαφορά (p<0.05).

2.2.3. Αποτελέσματα και Συζήτηση

Ο PF-8380 ([6-(3-(piperazin-1-yl) propanoyl)-benzo[d]oxazol-2(3H)-one]) (Εικόνα 1A) είναι ένας αναστολέας της ATX, χορηγούμενος δια στόματος, με χαμηλό IC₅₀ in vitro (1.7-2.8 nM) [20, 21]. Ο PF-8380 (30 mg/Kg p.o.) έχει δειχθεί ότι μειώνει τα επίπεδα LPA, τόσο συστηματικά όσο και τοπικά, με αποτέλεσμα την εξασθένηση της φλεγμονώδους υπεραλγησίας [18]. Προκειμένου να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα του PF-8380 στην πνευμονική ίνωση, εφαρμόσαμε το ευρέως χρησιμοποιούμενο πειραματικό μοντέλο, όπου η πνευμονική ίνωση επάγεται σε ποντίκια με μπλεομυκίνη [22]. Η μπλεομυκίνη (3.2 U/Kg) χορηγήθηκε σε αρσενικά ποντίκια με ενδοτραχειακή έγχυση, τα οποία θυσιάστηκαν 14 ημέρες αργότερα [7]. Η δόση της μπλεομυκίνης επιλέχθηκε μετά από εκτεταμένες δοκιμές με σκοπό την ελαχιστοποίηση της θνησιμότητας των πειραματόζων διατηρώντας παράλληλα έναν ισχυρό φαινότυπο, ο οποίος συσχετίζεται με αλλαγές στους κυριότερους δείκτες της ασθένειας. Αξίζει να σημειωθεί, ότι η σοβαρότητα των επιδράσεων της μπλεομυκίνης εξαρτάται από πολλές διαφορετικές παραμέτρους όπως το γενετικό υπόβαθρο, τη δόση, την οδό χορήγησης, το τελικό σημείο που επιλέγεται.

Ο PF-8380 (60 και 120 mg/kg), ή το έκδοχο (Hydroxypropyl Cellulose 2% (w/v)/Tween 80 0.1% (v/v)) χορηγήθηκαν δύο φορές ημερησίως για 15 ημέρες (από την ημέρα -1 έως την 14η), δια στόματος (**Εικόνα 1A**). 1, 3 και 6 ώρες μετά την τελευταία χορήγηση, τα ποντίκια θυσιάστηκαν και συλλέχθηκε αίμα, βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα και πνευμονικός ιστός. Φαρμακοκινητική (PK) ανάλυση έδειξε επαρκή βιοδιαθεσιμότητα της ένωσης (**Εικόνα 1B**), ενώ η φαρμακοδυναμική ανάλυση επιβεβαίωσε ότι ο PF-8380 μειώνει την δραστικότητα της ATX και τα επίπεδα LPA τόσο στο πλάσμα όσο και στο BALF (**Εικόνα 1 C-D και E-F αντίστοιχα**). Αξίζει να σημειωθεί ότι διαφορετικά είδη LPA αναφέρονται ότι τροποποιούνται μετά από χορήγηση διαφορετικών αναστολέων της ATX [14, 17, 18, 23, 24], πιθανότατα αντικατοπτρίζοντας διαφορές στη συλλογή πλάσματος, την εκχύλιση λιπιδίων και την μεθοδολογία MS/MS. Επιπλέον, το LPA ανακυκλώνεται πολύ γρήγορα, ενώ έχει προταθεί ότι παράγεται και δρα τοπικά, διευκολυνόμενο από μόρια της κυτταρικής επιφάνειας και της αναδιαμόρφωσης της ATX [3, 25]. Επιπροσθέτως, η χορήγηση PF-8380 είχε ως αποτέλεσμα διακυμάνσεις στα επίπεδα του LPC, τόσο στο πλάσμα όσο και στο BALF, αντικατοπτρίζοντας πιθανή

αλληλεπίδραση των PLA2/LPC και ATX/LPA μονοπατιών [5], που απαιτούν περαιτέρω διερεύνηση. Ωστόσο, δεδομένης της μεγάλης περίσσειας των επιπέδων LPC σε σύγκριση με τα επίπεδα LPA, οι διαφορετικές συγκεντρώσεις των διαφορετικών ειδών LPC στο πλάσμα και το BALF, καθώς και η ταχεία ανακύκλωση του LPA, δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα σχετικά με την πιθανή χρήση του υποστρώματος της ATX στην πνευμονική ίνωση.

Όσον αφορά την θνησιμότητα, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική βελτίωση της επιβίωσης των ποντικών μετά την χορήγηση PF-8380 (**Εικόνα 2A**). Ωστόσο, η αναστολή της ATX με PF-8380 μείωσε την απώλεια βάρους (**Εικόνα 2B, C**), έναν συστηματικό δείκτη της βλάβης που προκαλείται από μπλεομυκίνη. Από την άλλη πλευρά, δεν παρατηρήθηκαν ανεπιθύμητες ενέργειες σε υγιή ποντίκια κατά τη μακροχρόνια χορήγηση υψηλών δόσεων PF-8380 ή την επαγώγιμη πλήρη γενετική διαγραφή της ATX σε ενήλικους ποντικούς [20], γεγονός που υποδηλώνει ότι η ATX δεν είναι απαραίτητη για την ενήλικη ζωή και ότι η θεραπευτική στόχευση της δεν σχετίζεται με τοξικότητα.

Το LPA έχει πολυάριθμες επιδράσεις στα ενδοθηλιακά κύτταρα, ενώ έχει προταθεί η συμμετοχή του ενδοθηλιακού LPAR1 στη αγγειακή διαρροή που προκαλείται από μπλεομυκίνη [3, 6]. Αντίστοιχα, η αναστολή της ATX μείωσε την ολική συγκέντρωση πρωτεΐνης στα BALFs (**Εικόνα 2D**), που αποτελεί ένδειξη πνευμονικού οιδήματος. Πέρα από την ενδοθηλιακή διαπερατότητα, ο άξονας ATX/LPA μέσω διαφορετικών μηχανισμών προάγει την φλεγμονώδη απόκριση [26-30]. Η χορήγηση του PF-8380 μείωσε την εισροή φλεγμονωδών κυττάρων στους πνεύμονες (**Εικόνα 2E**). Στα ίδια BALFs, ανιχνεύθηκαν μειωμένα επίπεδα διαλυτού κολλαγόνου στην δοκιμασία Sirius red (**Εικόνα 2F**), σε συμφωνία με τα επίπεδα mRNA του κολλαγόνου 1α1 στον πνευμονικό ιστό, όπως μετρήθηκε με qPCR (**Εικόνα 2G**). Η ιστοπαθολογική ανάλυση του πνευμονικού ιστού με χρώση αιματοξυλίνης/εωσίνης (H&E) και η βαθμολόγηση της βαρύτητας της ασθένειας (Ashcroft score) έδειξαν ότι η αναστολή της ATX καταστέλλει την πάχυνση των κυψελιδικών διαφραγμάτων και την έκταση των ινωτικών περιοχών στο πνευμονικό παρέγχυμα και γύρω από τους βρόγχους (**Εικόνα 3A, B**). Επιπλέον, ο αριθμός των μυοϊνοβλαστών, όπως εκτιμήθηκε με ανοσοχρώση α-SMA, καθώς και η εναπόθεση

κολλαγόνου που προκαλείται από μπλεομυκίνη, όπως προκύπτει μετά από τριχρωματική χρώση Masson, μειώθηκαν μετά την χορήγηση PF-8380 (**Εικόνα 3A**).

Όλες οι δημοσιευμένες μελέτες σχετικά με τις επιδράσεις της φαρμακολογικής αναστολής της ATX (βλ. Πίνακα σε πρωτότυπη δημοσίευση) έχουν πραγματοποιηθεί στα πλαίσια προφυλακτικής θεραπείας. Επομένως, οι επιδράσεις του PF-8380 αξιολογήθηκαν επίσης σε θεραπευτικό σχήμα στο μοντέλο νόσου των 7 ημερών (**Εικόνα 4A-H**). Το PF-8380 χορηγήθηκε (30 και 100 mg/kg) 3 ημέρες μετά την αγωγή με BLM (2U/kg) (**Εικόνα 4A**). Όπως αναμενόταν, η αναστολή της ATX είχε ως αποτέλεσμα την μείωση των επιπέδων του LPA, σε πλάσμα και BALF (**Εικόνα 4B, C**) και κατ' επέκταση μείωση της πνευμονικής φλεγμονής (**Εικόνα 4D**) και της εναπόθεσης κολλαγόνου στον πνευμονικό ιστό (**Εικόνα 4E**). Αξίζει να σημειωθεί ότι η διαφορική ανάλυση των φλεγμονωδών κυττάρων του BALF έδειξε ότι η αναστολή της ATX μείωσε τη διείσδυση των λεμφοκυττάρων στον πνεύμονα (**Εικόνα 4F-H**), επιβεβαιώνοντας τα ως τώρα αποτελέσματα σχετικά με την εμπλοκή του άξονα ATX/LPA στη μετανάστευση των λεμφοκυττάρων [26-30] και τις προηγούμενες μελέτες που υποδηλώνουν ότι ο άξονας ATX/LPA έχει μικρή εμπλοκή στην οξεία πνευμονική φλεγμονή [20]. Ένα νέο παράγωγο του PF-8380 με βελτιωμένες ιδιότητες δημοσιεύθηκε πρόσφατα [31], ωστόσο η αποτελεσματικότητά του σε πειραματικά μοντέλα δεν έχει ακόμη αναφερθεί.

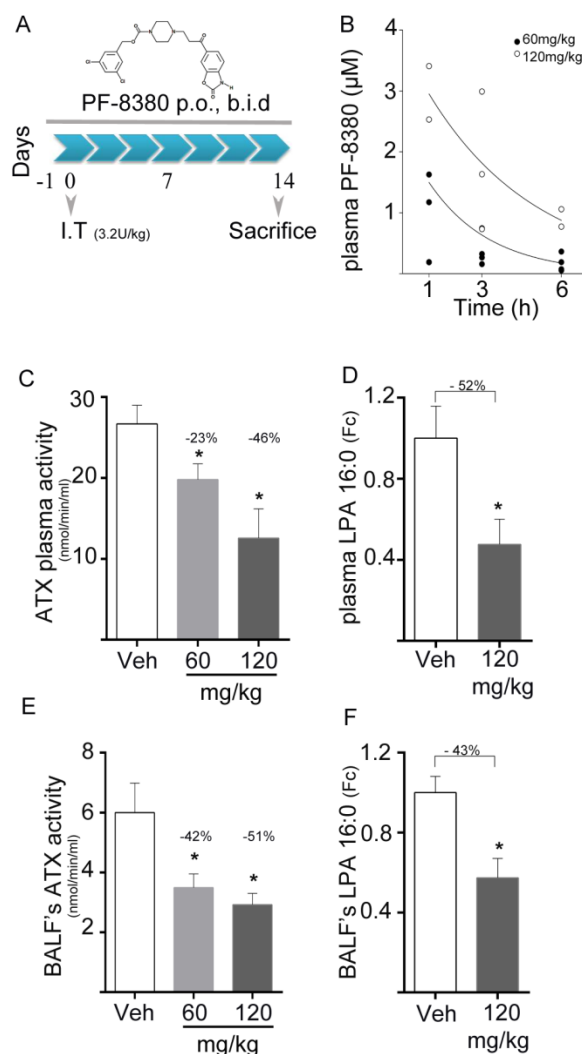
Πέρα από την αναστολή της ATX, ο ανταγωνισμός του υποδοχέα LPA1 έχει επίσης δειχθεί ότι προλαμβάνει την ανάπτυξη της επαγόμενης από μπλεομυκίνη πνευμονικής ίνωσης [8, 19]. Ο AM095 (**Εικόνα 5A**) είναι ένας εκλεκτικός, δια στόματος βιοδιαθέσιμος ανταγωνιστής του LPAR1 με μέσες τιμές IC50 0,98 και 0,73 μM για άνθρωπο και ποντικό, αντιστοίχως [19]. Προς επιβεβαίωση προηγούμενων μελετών και προκειμένου να γίνει σύγκριση με τον PF-8380, χορηγήθηκε AM095 (200 mg/Kg, **Εικόνα 5A**) όπως παραπάνω, με την φαρμακοκινητική ανάλυση (PK) να δείχνει επαρκή βιοδιαθεσιμότητα (**Εικόνα 5B**). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα στην επιβίωση ή στην απώλεια βάρους (**Εικόνα. 5C, D**), ωστόσο ο ανταγωνισμός του υποδοχέα LPA1 μείωσε την αγγειακή διαρροή (**Εικόνα 5E**) με μικρές επιδράσεις στην φλεγμονή (**Εικόνα 5F**), όπως έχει δειχθεί και σε προηγούμενες μελέτες [3, 6]. Επιπλέον, η παρεμπόδιση του LPAR1 είχε ως αποτέλεσμα την συνολική βελτίωση της πνευμονικής ίνωσης (**Εικόνα. 5G, H, 6A, B**),

παρά το ότι ο μεταβολισμός κολλαγόνου φαίνεται ανεπηρέαστος (**Εικόνα 5H**), συμφωνώντας με προαναφερθείσες μελέτες όπου δεν υπάρχει εμπλοκή του υποδοχέα LPA1 στην *de novo* έκφραση του κολλαγόνου [6, 32]. Συνολικά, τόσο η αναστολή της ATX με PF-8380, καθώς και ο ανταγωνισμός του LPAR1 με AM095, αποδείχτηκε ότι προστατεύουν ισχυρά από την ανάπτυξη πνευμονικής ίνωσης που προκαλείται από μπλεομυκίνη, ωστόσο με ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές. Η αναστολή της ATX και συνεπώς η μείωση των επιπέδων LPA, υπό αυτές τις πειραματικές συνθήκες, απεδείχθη ότι είναι πιο αποτελεσματική σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις ενώσεων, βελτιώνοντας τις περισσότερες παραμέτρους της ασθένειας. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι ίδιες ενώσεις πρόσφατα αποδείχθηκε ότι προλαμβάνουν την ίνωση που μπορεί να δημιουργηθεί μετά από μεταμόσχευση πνεύμονα [33].

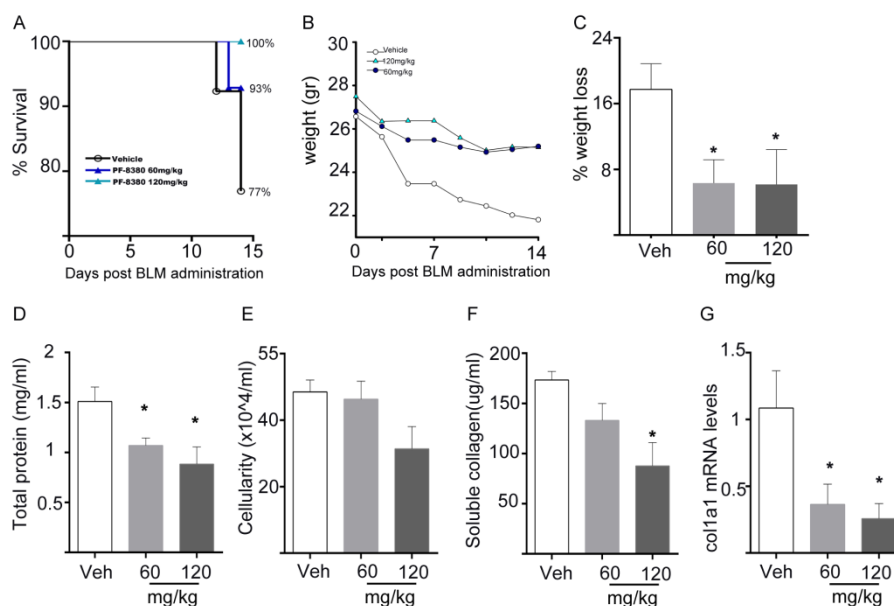
Είναι ενδιαφέρον, ότι η ταυτόχρονη αναστολή της ATX και ο ανταγωνισμός του LPAR1, με διαφορετικές ενώσεις, έχει δείξει θετικά αποτελέσματα στην αναστολή της μετάστασης του μελανώματος [34]. Δεδομένου ότι η ATX συνδέεται στις ιντεγκρίνες της μεμβράνης και προμηθεύει με LPA τους παρακείμενους ιστούς [3, 25], η ταυτόχρονη αναστολή της ATX και ο ανταγωνισμός του LPAR θα μπορούσαν να προσφέρουν βελτιωμένη αποτελεσματικότητα σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Αυτή η υπόθεση υποστηρίζεται περαιτέρω από την αναφερθείσα αποτελεσματικότητα του 1-bromo-3(S)-hydroxy-4-(palmitoyloxy)butyl-phosphonate (BrP-LPA), ενός μεταβολικά σταθερού αναστολέα της ATX και ταυτόχρονα ανταγωνιστή των υποδοχέων LPA [35]. Το BrP-LPA, παρά το φτωχό φαρμακοκινητικό και φαρμακοδυναμικό του προφίλ [36], έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως και έχει αποδειχθεί αποτελεσματικό σε πολλές παθοφυσιολογικές καταστάσεις με αποδεδειγμένη συμμετοχή του άξονα ATX/LPA [37-41]. Επιπλέον, δοκιμάστηκε στο μοντέλο της μπλεομυκίνης διπλή χορήγηση χαμηλών δόσεων PF-8380 και AM095 (60 και 100 mg/kg αντίστοιχα). Εν τούτοις, παρατηρήθηκαν μόνο ελάσσονες, αλλά υποσχόμενες, επιδράσεις με αυτές τις ενώσεις και πειραματικές συνθήκες.

Συμπερασματικά, η αναστολή της ATX με PF-8380, ενός από τους πιο ισχυρούς αναστολείς, έδειξε αποτελεσματικότητα για πρώτη φορά στο μοντέλο της επαγόμενης από μπλεομυκίνης πνευμονικής ίνωσης. Επιπλέον, τα παραπάνω

αποτελέσματα επιβεβαιώνουν και πάλι τον βασικό ρόλο της ATX στην παθογένεια της μοντελοποιημένης ασθένειας. Σε σύγκριση με τα μέχρι τώρα δεδομένα, η αναστολή της ATX έδειξε αποτελεσματικότητα και στο θεραπευτικό σχήμα χορήγησης. Επιπροσθέτως, η αναστολή της ATX, σε αυτές τις πειραματικές συνθήκες, έδειξε μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα από τον LPAR1 ανταγωνιστή, με την ταυτόχρονη χορήγηση να αποτελεί πολλά υποσχόμενη θεραπευτική προσέγγιση. Τέλος, θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα κυτταρικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από την σηματοδότηση του LPA είναι παρόμοια ή συγκλίνουν με τις οδούς που στοχεύουν τα πρόσφατα εγκεκριμένα φάρμακα για την ΙΠΙ (nintedanib και pirfenidone). Επομένως, η αναστολή της ATX θα μπορούσε επίσης να αποδειχθεί χρήσιμη ως ανοσοενισχυτική θεραπεία για την ΙΠΙ, μια ενδιαφέρουσα υπόθεση που περιμένει πειραματική επιβεβαίωση.

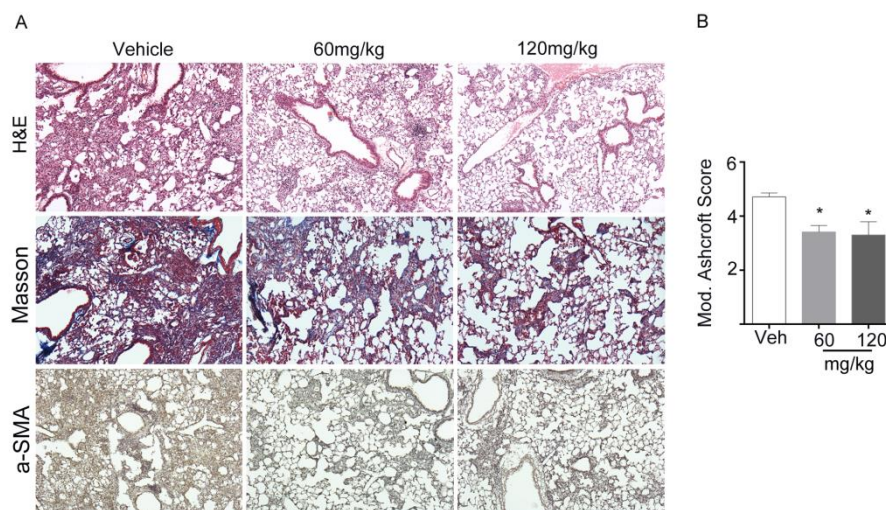


Εικόνα 1: Φαρμακοκινητική (PK) και φαρμακοδυναμική (PD) ανάλυση του PF-8380. (Α) Χημική δομή του PF-8380 και σχηματική αναπαράσταση του πειραματικού πρωτοκόλλου που ακολουθήθηκε για την χορήγηση του αναστολέα. **(Β)** Φαρμακοκινητικό προφίλ του PF-8380 στο πλάσμα. **(C και E)** Δραστηριότητα της ATX στο πλάσμα και στο βρογχοκυψελιδικό υγρό ποντικών στα οποία έχει χορηγηθεί PF-8380 (60 ή 120 mg/kg) και της ομάδας ελέγχου (vehicle). **(D και F)** Μεταβολή (Fc) στα επίπεδα του LPA 16: 0 σε πλάσμα και βρογχοκυψελιδικό υγρό (BALFs) ποντικών στα οποία έχει χορηγηθεί PF-8380 (60 ή 120 mg/kg) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (vehicle). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ($\pm$ SEM). Το * υποδηλώνει στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p < 0,05$), η οποία αξιολογήθηκε με one way ANOVA Bonferroni ή Dunn t-test. $n = 5-8$ /ομάδα, εκτός του B ($n=3-5$)

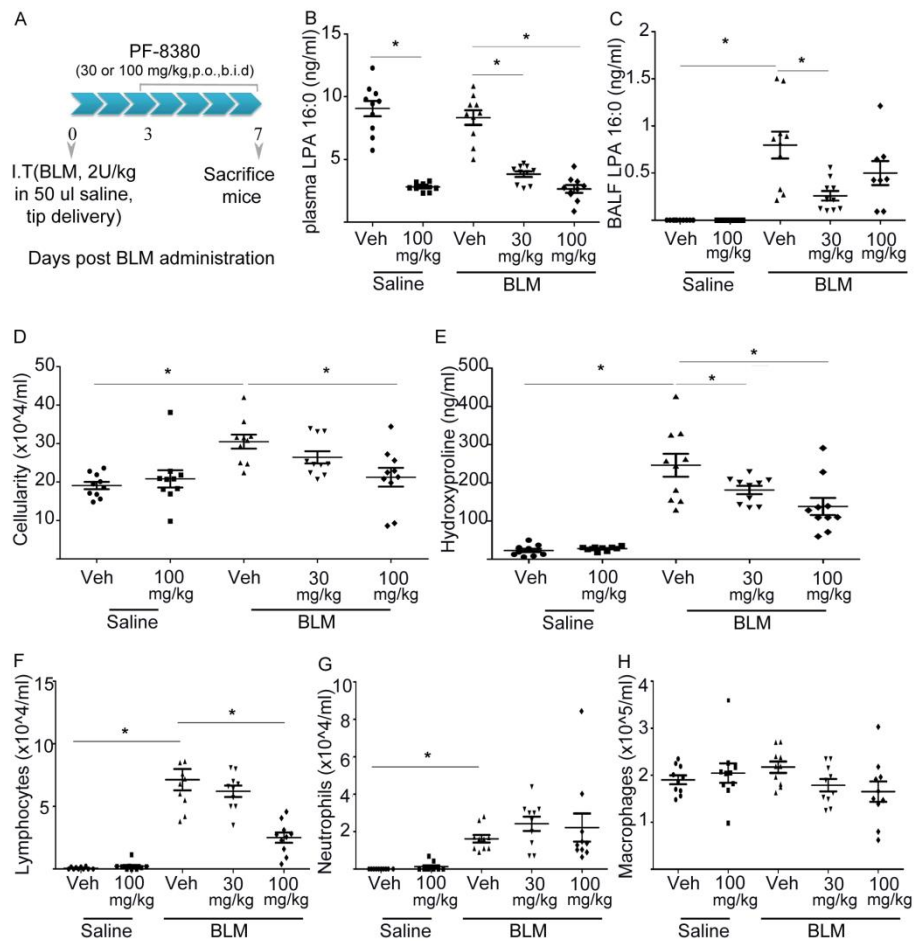


Εικόνα 2: Η φαρμακευτική στόχευση της αυτοταξίνης (ATX) με PF-8380 αποτρέπει την ανάπτυξη πνευμονικής ίνωσης που προκαλείται από μπλεομυκίνη (BLM).

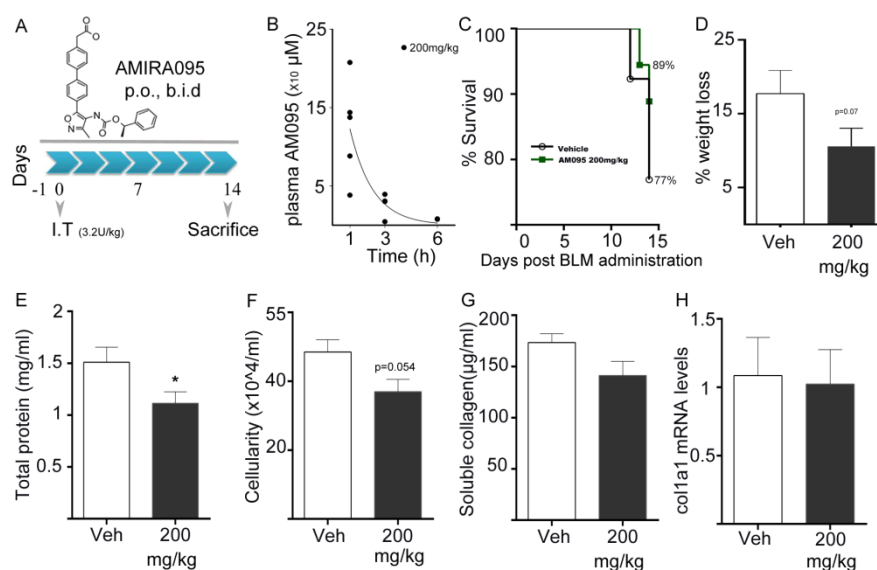
(A) Kaplan Meyer καμπύλη επιβίωσης των πειραματικών ομάδων. **(B)** Καμπύλες βάρους σώματος και **(C)** το ποσοστό (%) απώλειας βάρους μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης. **(D)** Συνολική συγκέντρωση πρωτεΐνης στο βρογχοκυψελιδικό υγρό, όπως προσδιορίστηκε με την μέθοδο Bradford. **(E)** Συνολικός αριθμός φλεγμονωδών κυττάρων στο βρογχοκυψελιδικό υγρό. **(F)** Ποσότητα διαλυτού κολλαγόνου στο βρογχοκυψελιδικό υγρό, όπως μετράται με Sirius Red. **(G)** Real time PCR ανάλυση των σχετικών επιπέδων έκφρασης του κολλαγόνου (Col1a1) σε ιστούς πνεύμονα, κανονικοποιημένο στα επίπεδα έκφρασης της β2-μικροσφαιρίνης (ddct / b2M). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ($\pm$ SEM). Το * υποδηλώνει στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p < 0,05$), η οποία αξιολογήθηκε με one way ANOVA Bonferroni ή Dunn t-test), $n = 8-12$ / ομάδα.



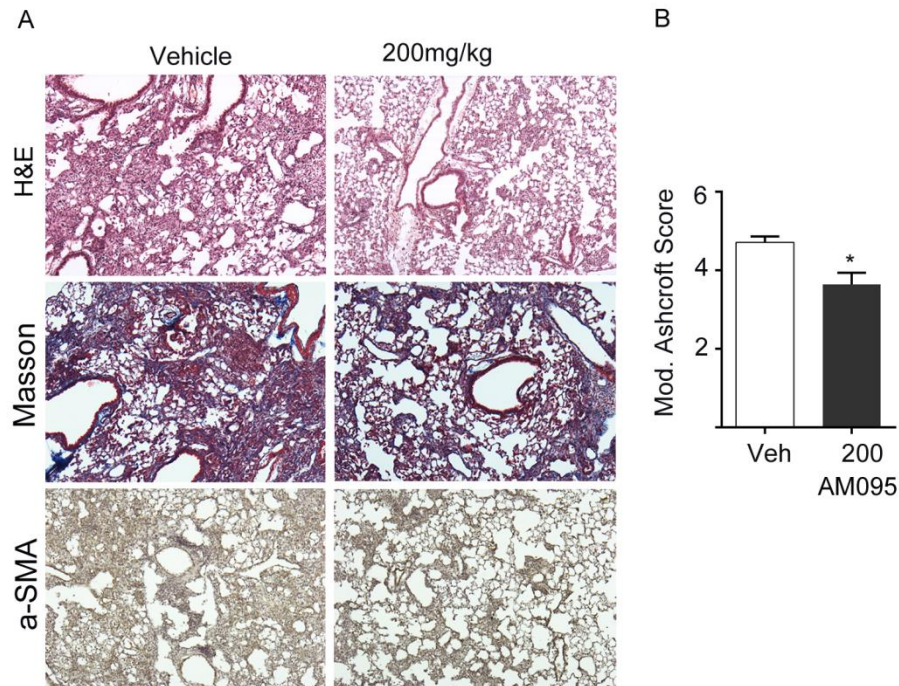
Εικόνα 3: Ο PF-8380 μειώνει την εναπόθεση κολλαγόνου και τη συσσώρευση μυοϊνοβλαστών που προκαλείται μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης και διατηρεί μια φυσιολογική αρχιτεκτονική πνεύμονα. (Α) Αντιπροσωπευτικές εικόνες πνευμονικού ιστού βαμμένου με H&E/Masson/α-SMA από ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε μπλεομυκίνη και είτε έλαβαν τον αναστολέα PF-8380 (60/120 mg/kg) είτε το vehicle (ομάδα ελέγχου). **(Β)** Η ποσοτική ιστοπαθολογική ανάλυση της ίνωσης πραγματοποιήθηκε με την τροποποιημένη κλίμακα βαθμονόμησης Ashcroft.



Εικόνα 4: Η θεραπευτική χορήγηση του PF-8380 εξασθενεί την ανάπτυξη πνευμονικής ίνωσης που προκαλείται από μπλεομυκίνη. **(Α)** Σχηματική αναπαράσταση του πειραματικού πρωτοκόλλου που ακολουθήθηκε για την χορήγηση του αναστολέα. **(Β-Ε)** Επίπεδα του LPA 16:0 στα δείγματα πλάσματος και βρογχοκυψελιδικού υγρού. **(Δ)** Συνολικός αριθμός φλεγμονωδών κυττάρων στο βρογχοκυψελιδικό υγρό. **(Ε)** Τα επίπεδα κολλαγόνου στον πνεύμονα, με μέτρηση υδροξυπρολίνης. **(F-H)** Ο διαφορικός αριθμός κυττάρων BALF μετρήθηκε ποσοτικά με χρώση Diff-Quik. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ($\pm$ SEM). Το * υποδηλώνει στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p < 0,05$), η οποία αξιολογήθηκε με one way ANOVA Bonferroni ή Dunn t-test), $n = 10$ /ομάδα.



Εικόνα 5: Ο AM095 μείωσε την αγγειακή διαρροή σε ποντίκια που έχουν υποστεί αγωγή με μπλεομυκίνη (BLM), με αποτέλεσμα την πρόληψη της πνευμονικής ίνωσης. (Α) Χημική δομή του AM095 και σχηματική αναπαράσταση του πειραματικού πρωτοκόλλου που ακολουθήθηκε για την χορήγηση του. **(Β)** Φαρμακοκινητικό προφίλ του AM095 στο πλάσμα. **(C)** Kaplan Meyer καμπύλη επιβίωσης των πειραματικών ομάδων. **(D)** το ποσοστό (%) απώλειας βάρους μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης. **(Ε)** Συνολική συγκέντρωση πρωτεΐνης στο βρογχοκυψελιδικό υγρό, όπως προσδιορίστηκε με την μέθοδο Bradford. **(F)** Συνολικός αριθμός φλεγμονωδών κυττάρων στο βρογχοκυψελιδικό υγρό. **(G)** Ποσότητα διαλυτού κολλαγόνου στο βρογχοκυψελιδικό υγρό, όπως μετράται με Sirius Red. **(H)** Real time PCR ανάλυση των σχετικών επιπέδων έκφρασης του κολλαγόνου (Col1a1) σε ιστούς πνεύμονα, κανονικοποιημένο στα επίπεδα έκφρασης της β2-μικροσφαιρίνης (ddct / b2M). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ($\pm$ SEM). Το * υποδηλώνει στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p < 0,05$), η οποία αξιολογήθηκε με one way ANOVA Bonferroni ή Dunn t-test, $n = 15$ /ομάδα εκτός του B ($n=3$ /ομάδα)



Εικόνα 6: Ο ανταγωνισμός του LPA_1 με το AM095, μειώνει την εναπόθεση κολλαγόνου και τη συσσώρευση μυοϊνοβλαστών στον πνεύμονα και διατηρεί μια φυσιολογική αρχιτεκτονική πνεύμονα. **(Α)** Αντιπροσωπευτικές εικόνες πνευμονικού ιστού βαμμένου με H&E/Masson/α-SMA από ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε μπλεομυκίνη και είτε έλαβαν τον AM095 (200 mg/kg) είτε το vehicle (ομάδα ελέγχου). **(Β)** Η ποσοτική ιστοπαθολογική ανάλυση της ίνωσης πραγματοποιήθηκε με την τροποποιημένη κλίμακα βαθμονόμησης Ashcroft.

Βιβλιογραφία

- 1.Mora, A.L., et al., Emerging therapies for idiopathic pulmonary fibrosis, a progressive age-related disease. *Nat Rev Drug Discov*, 2017. 16(11): p. 755-772.
- 2.Martinez, F.J., et al., Idiopathic pulmonary fibrosis. *Nat Rev Dis Primers*, 2017. 3: p. 17074.
- 3.Ninou, I., C. Magkrioti, and V. Aidinis, Autotaxin in Pathophysiology and Pulmonary Fibrosis. *Frontiers in Medicine*, 2018.
- 4.Barbayanni, E., et al., Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, as a promising therapeutic target in chronic inflammation and cancer. *Prog Lipid Res*, 2015. 58: p. 76-96.
- 5.Sevastou, I., et al., Lysoglycerophospholipids in chronic inflammatory disorders: The PLA(2)/LPC and ATX/LPA axes. *Biochimica et biophysica acta*, 2013. 1831(1): p. 42-60.
- 6.Tager, A.M., et al., The lysophosphatidic acid receptor LPA1 links pulmonary fibrosis to lung injury by mediating fibroblast recruitment and vascular leak. *Nat Med*, 2008. 14(1): p. 45-54.
- 7.Oikonomou, N., et al., Pulmonary autotaxin expression contributes to the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2012. 47(5): p. 566-74.
- 8.Swaney, J.S., et al., A novel, orally active LPA(1) receptor antagonist inhibits lung fibrosis in the mouse bleomycin model. *Br J Pharmacol*, 2010. 160(7): p. 1699-713.
- 9.Barbayanni, E., et al., Autotaxin inhibitors: a patent review. *Expert Opin Ther Pat*, 2013.
- 10.Nikolaou, A., et al., Autotaxin inhibitors: a patent review (2012-2016). *Expert Opin Ther Pat*, 2017. 27(7): p. 815-829.
- 11.Kihara, Y., H. Mizuno, and J. Chun, Lysophospholipid receptors in drug discovery. *Exp Cell Res*, 2015. 333(2): p. 171-7.
- 12.Rancoule, C., et al., Lysophosphatidic acid-1-receptor targeting agents for fibrosis. *Expert Opin Investig Drugs*, 2011. 20(5): p. 657-67.
- 13.Tigyi, G., Aiming drug discovery at lysophosphatidic acid targets. *Br J Pharmacol*, 2010. 161(2): p. 241-70.
- 14.Desroy, N., et al., Discovery of 2-[[2-Ethyl-6-[4-[2-(3-hydroxyazetidin-1-yl)-2-oxo-ethyl]piperazin-1-yl]-8-methyl-imidazo[1,2-a]pyridin-3-yl]-methyl-amino]-4-(4-fluorophenyl)thiazole-5-carbonitr ile (GLPG1690), a First-in-Class Autotaxin Inhibitor Undergoing Clinical Evaluation for the Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *J Med Chem*, 2017.
- 15.Nikolaou, A., et al., Hydroxamic Acids Constitute a Novel Class of Autotaxin Inhibitors that Exhibit in Vivo Efficacy in a Pulmonary Fibrosis Model. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2018. 61(8): p. 3697-3711.
- 16.Kato, K., et al., Structural basis for specific inhibition of Autotaxin by a DNA aptamer. *Nat Struct Mol Biol*, 2016. 23(5): p. 395-401.
- 17.Black, K.E., et al., Autotaxin activity increases locally following lung injury, but is not required for pulmonary lysophosphatidic acid production or fibrosis. *Faseb J*, 2016. 30(6): p. 2435-50.
- 18.Gierse, J.K., et al., A Novel Autotaxin Inhibitor Reduces Lysophosphatidic Acid Levels in Plasma and the Site of Inflammation. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010. 334(1): p. 310-7.
- 19.Swaney, J.S., et al., Pharmacokinetic and pharmacodynamic characterization of an oral lysophosphatidic Acid type 1 receptor-selective antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*, 2011. 336(3): p. 693-700.
- 20.Katsifa, A., et al., The Bulk of Autotaxin Activity Is Dispensable for Adult Mouse Life. *PLoS One*, 2015. 10(11): p. e0143083.
- 21.Gierse, J., et al., A novel autotaxin inhibitor reduces lysophosphatidic acid levels in plasma and the site of inflammation. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010. 334(1): p. 310-7.
- 22.Mouratis, M.A. and V. Aidinis, Modeling pulmonary fibrosis with bleomycin. *Curr Opin Pulm Med*, 2011. 17(5): p. 355-61.
- 23.Thirunavukkarasu, K., et al., Pharmacological characterization of a potent inhibitor of autotaxin in animal models of inflammatory bowel disease and multiple sclerosis. *J Pharmacol Exp Ther*, 2016.
- 24.Baader, M., et al., Characterisation of the properties of a selective, orally bioavailable autotaxin inhibitor in preclinical models of advanced stages of liver fibrosis. *Br J Pharmacol*, 2017.
- 25.Moolenaar, W.H. and A. Perrakis, Insights into autotaxin: how to produce and present a lipid mediator. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011. 12.
- 26.Kanda, H., et al., Autotaxin, an ectoenzyme that produces lysophosphatidic acid, promotes the entry of lymphocytes into secondary lymphoid organs. *Nat Immunol*, 2008. 9(4): p. 415-23.
- 27.Nakasaki, T., et al., Involvement of the lysophosphatidic acid-generating enzyme autotaxin in lymphocyte-endothelial cell interactions. *Am J Pathol*, 2008. 173(5): p. 1566-76.
- 28.Zhang, Y., et al., Autotaxin through Lysophosphatidic Acid Stimulates Polarization, Motility, and Transendothelial Migration of Naive T Cells. *J Immunol*, 2012. 189(8): p. 3914-24.
- 29.Bai, Z., et al., Constitutive lymphocyte transmigration across the basal lamina of high endothelial venules is regulated by the autotaxin/lysophosphatidic acid axis. *J Immunol*, 2013. 190(5): p. 2036-48.
- 30.Knowlden, S. and S.N. Georas, The Autotaxin-LPA Axis Emerges as a Novel Regulator of Lymphocyte Homing and Inflammation. *J Immunol*, 2014. 192(3): p. 851-7.
- 31.Kuttruff, C.A., et al., Discovery of BI-2545: A Novel Autotaxin Inhibitor That Significantly Reduces LPA Levels in Vivo. *ACS Med Chem Lett*, 2017. 8(12): p. 1252-1257.

- 32.Huang, L.S., et al., Lysophosphatidic Acid Receptor 2 Deficiency Confers Protection Against Bleomycin-Induced Lung Injury and Fibrosis in Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013.
- 33.Cao, P., et al., Autocrine lysophosphatidic acid signaling activates beta-catenin and promotes lung allograft fibrosis. *J Clin Invest*, 2017.
- 34.Lee, S.C., et al., Autotaxin, LPA Receptors (1 and 5) Exert Disparate Functions in Tumor Cells Versus the Host Tissue Microenvironment in Melanoma Invasion and Metastasis. *Mol Cancer Res*, 2014.
- 35.Jiang, G., et al., Alpha-substituted phosphonate analogues of lysophosphatidic acid (LPA) selectively inhibit production and action of LPA. *ChemMedChem*, 2007. 2(5): p. 679-90.
- 36.Nikitopoulou, I., et al., A metabolically-stabilized phosphonate analog of lysophosphatidic acid attenuates collagen-induced arthritis. *PLoS One*, 2013. 8(7): p. e70941.
- 37.Prestwich, G.D., et al., Phosphatase-resistant analogues of lysophosphatidic acid: Agonists promote healing, antagonists and autotaxin inhibitors treat cancer. *Biochim Biophys Acta*, 2008. 8: p. 8.
- 38.Zhang, H., et al., Dual activity lysophosphatidic acid receptor pan-antagonist/autotaxin inhibitor reduces breast cancer cell migration in vitro and causes tumor regression in vivo. *Cancer Res*, 2009. 69(13): p. 5441-9.
- 39.Xu, X. and G.D. Prestwich, Inhibition of tumor growth and angiogenesis by a lysophosphatidic acid antagonist in an engineered three-dimensional lung cancer xenograft model. *Cancer*, 2010. 116(7): p. 1739-1750.
- 40.Yang, G., H. Zhang, and G.D. Prestwich, Tissue-Engineered "Metastases": Treatment of Hepatic Colon Tumors with a Dual Action Autotaxin Inhibitor-Lysophosphatidic Acid Receptor Antagonist. *Journal of Cancer Research Updates*, 2012. 1(1): p. 69-77.
- 41.Zhao, C., et al., Regulation of lysophosphatidic acid receptor expression and function in human synoviocytes: implications for rheumatoid arthritis? *Molecular Pharmacology*, 2008. 73(2): p. 587-600.

2.3.Τα υδροξαμικά οξέα αποτελούν μια νέα κατηγορία αναστολέων της αυτοταξίνης, που επιδεικνύουν in vivo αποτελεσματικότητα στο πειραματικό μοντέλο της πνευμονικής ίνωσης

Περίληψη

Η αυτοταξίνη (ATX) καταλύει την υδρόλυση της λυσοφωσφατιδυλοχολίνης (LPC) που παράγει τον λιπιδικό μεσολαβητή λυσοφωσφατιδικό οξύ (LPA). Τόσο η ATX όσο και το LPA εμπλέκονται σε διάφορες παθολογικές φλεγμονώδεις καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένων της ίνωσης και του καρκίνου και έχουν προσελκύσει μεγάλο ενδιαφέρον ως θεραπευτικοί στόχοι κατά την τελευταία δεκαετία. Έτσι, η ανάπτυξη νέων ισχυρών αναστολέων της ATX έχει μεγάλη σημασία. Εμείς έχουμε αναπτύξει μια νέα κατηγορία αναστολέων της ATX που περιέχουν τη λειτουργικότητα δέσμευσης ψευδαργύρου υδροξαμικού οξέος. Τέτοια καινοτόμα υδροξαμικά οξέα που ενσωματώνουν ένα μη φυσικό υπόλειμμα D-αμινοξέος παρουσιάζουν υψηλή ανασταλτική δραστηριότητα in vitro έναντι της ATX (με τιμές IC_{50} 50-60 nM). Ο αναστολέας 32, με βάση την D-νορλευκίνη, δοκιμάστηκε για την αποτελεσματικότητά του στο πειραματικό μοντέλο πνευμονικής φλεγμονής και ίνωσης που προκλήθηκε από μπλεομυκίνη και εξέθεσε πολλά υποσχόμενη αποτελεσματικότητα. Οι νέοι υδροξαμικοί αναστολείς της ATX παρέχουν εξαιρετικά εργαλεία για τη μελέτη του ρόλου του ενζύμου και θα μπορούσαν να συμβάλλουν στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών παραγόντων για τη θεραπεία της ίνωσης και άλλων χρόνιων φλεγμονωδών ασθενειών.

2.3.1.Εισαγωγή

Η αυτοταξίνη (ATX) είναι ένα ένζυμο που έχει προσελκύσει μεγάλο ενδιαφέρον ως θεραπευτικός στόχος κατά την τελευταία δεκαετία [1]. Αρχικά απομονώθηκε το 1992 ως αυτοκρινής παράγοντας κινητικότητας από την κυτταρική σειρά μελανώματος A2058 και χαρακτηρίστηκε ως γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 125kDa [2]. Η ATX, επίσης γνωστή ως ENPP2, ανήκει στην επταμελή οικογένεια των εξωνουκλεοτιδικών πυροφωσφατασών / φωσφοδιεστερασών (ENPP), ένζυμα τα οποία χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να καταλύουν την υδρόλυση πυροφωσφορικών ή φωσφοδιεστερικών δεσμών σε νουκλεοτίδια [3]. Μεταξύ των ENPP, είναι το μοναδικό που παρουσιάζει δραστικότητα λυσοφωσφολιπάσης D (LysoPLD), καταλύοντας την υδρόλυση της λυσοφωσφατιδυλοχολίνης (LPC) σε λυσοφωσφατιδικό οξύ (LPA) και χολίνη (Εικόνα 1)[4, 5]. Ο βιοενεργός λιπιδικός μεσολαβητής LPA συνδέεται με συγκεκριμένους υποδοχείς συζευγμένους με G-πρωτεΐνες (LPA1-6 στα θηλαστικά) και ενεργοποιεί διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στη μετανάστευση, στον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση διαφόρων κυτταρικών τύπων [6, 7]. Η ATX παράγεται σε διάφορους ιστούς και είναι απαραίτητη για την αγγειακή ανάπτυξη, αλλά έχει επίσης εμπλακεί σε πληθώρα παθολογικών καταστάσεων και χρόνιων φλεγμονωδών παθήσεων, όπως η αρθρίτιδα και ο καρκίνος[1, 8-12]. Ως αποτέλεσμα, τόσο η ATX όσο και το LPA, αποτελούν ελκυστικούς στόχους για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων.

Η ATX αποτελείται από δύο N-τερματικά άκρα σωματομεδίνης τύπου B (SMB1 και SMB2), μια κεντρική καταλυτική φωσφοδιεστεράση (PDE), και μια περιοχή νουκλεάσης που βρίσκεται στο C-τελικό άκρο της. Ένα κατάλοιπο θρεονίνης (T210) που βρίσκεται στην ενεργό περιοχή της φωσφοδιεστεράσης, μαζί με δύο ιόντα ψευδαργύρου, είναι υπεύθυνο για τον υδρολυτικό καταλυτικό μηχανισμό [13]. Το 2011, παρουσιάστηκε η κρυσταλλική δομή της ATX του ποντικού σε συνδυασμό με τα LPA [14], αποκαλύπτοντας πώς η ATX παράγει και παρέχει διαμεσολαβητές λιπιδίων στους υποδοχείς G πρωτεϊνών. Παράλληλα η δέσμευση της ATX σε ιντεγκρίνες[15], αποκάλυψε τον τρόπο με τον οποίο η ATX προωθεί την τοπική σηματοδότηση LPA.

Έχει αναπτυχθεί μια ποικιλία συνθετικών αναστολέων της ATX τόσο στον ακαδημαϊκό χώρο όσο και στη φαρμακευτική βιομηχανία, καθώς και στη χημική βιομηχανία συνθετικών αναστολέων, οι οποίοι περιγράφονται αναλυτικά στην βιβλιογραφία [1, 16-19]. Η δομή ορισμένων εκλεκτικών αναστολέων έναντι της ATX απεικονίζεται στην Εικόνα 2. Ο PF-8380 (1, Εικόνα 2) παρουσιάζει χαμηλό IC₅₀ σε χημικές δοκιμές προσδιορισμού δραστηριότητας (1.7nM με χρήση LPC, 2.8nM σε δοκιμασία FS-3, 101nM σε ανθρώπινο αίμα) [20]. Επιπλέον, προκάλεσε μεγαλύτερη από 95% μείωση των επιπέδων του LPA σε πλάσμα αρουραίου όταν χορηγήθηκε στη δόση των 30mg/kg και μείωσε τη φλεγμονώδη υπεραλγησία με δοσοεξαρτώμενο τρόπο με την ίδια αποτελεσματικότητα όπως το naproxen (30mg/kg). Το HA155 (2, Εικόνα 2) αντιπροσωπεύει μια σημαντική κατηγορία αναστολέων της ATX, τα παράγωγα του βορονικού οξέος [21]. Η αναστολή της ATX από τον ONO-8430506 (IC₅₀ 100 nM) καθυστέρησε την ανάπτυξη όγκου του μαστού και την μετάσταση στους πνεύμονες σε ποντίκια [22]. Μέσα στο τελευταίο έτος ενδιαφέροντα αποτελέσματα με μια σειρά από νέους αναστολείς έχουν περιγραφεί. Πολύ ισχυροί αναστολείς της ATX μη καρβοξυλικού οξέους (για παράδειγμα, ένωση 3, Εικόνα 2) αναφέρθηκε ότι μειώνουν τη μετάσταση του μελανώματος και την αντίσταση των βλαστικών κυττάρων του καρκίνου του μαστού στη χημειοθεραπεία [23]. Ο Miller και συνεργάτες του, ανέφεραν αναστολείς της ATX μικρού μορίου με τρόπο διακριτικής δέσμευσης [24], ενώ η εξέλιξη ασθενών αλλοστερικών αναστολέων (χολικά άλατα) [25] οδήγησε στο σχεδιασμό ισχυρών ανταγωνιστικών αναστολέων της ATX (για παράδειγμα, ένωση 4, Εικόνα 2) που δεν αλληλεπιδρούν με την καταλυτική θέση [26]. Η Γκαλαπάγκος συνέθεσε μια σειρά αναστολέων ATX ιμιδαζο [1,2-α] πυριδίνης [27], αποδεικνύοντας ότι ο αναστολέας GLPG1690 (5, Εικόνα 2) ήταν αποτελεσματικός στο μοντέλο της πνευμονικής ίνωσης που προκαλείται από μπλεομυκίνη (BLM) σε ποντικούς, μειώνοντας την εναπόθεση εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας στον πνεύμονα [28]. Αυτός είναι ο πρώτος αναστολέας της ATX που αξιολογείται σε κλινικές μελέτες φάσης 2 σε ασθενείς με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση (ΙΠΙ).

Στόχος της εργασίας μας ήταν να αναπτύξουμε νέους αναστολείς της ATX που μπορούν να έχουν εφαρμογή *in vivo*. Θεωρήσαμε ότι η λειτουργικότητα του υδροξαμικού οξέος μπορεί να στοχεύει την ενεργό θέση της ATX, και στο παρόν

άρθρο, παρουσιάζουμε τη σύνθεση μιας σειράς από νέα υδροξαμικά οξέα, την αξιολόγηση της *in vitro* δραστηριότητάς τους έναντι της ATX και τα αποτελέσματα τους *in vivo* που αποδεικνύουν ότι ένας τέτοιος αναστολέας υδροξαμικού οξέος είναι δραστικός στο μοντέλο πνευμονικής ίνωσης.

2.3.2.Μεθοδολογία

Σύνθεση αναστολέων. Ο χρωματογραφικός καθαρισμός των προϊόντων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας Merck Silica Gel 60. Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Thin layer chromatography – TLC) πραγματοποιήθηκε σε Silica Gel 60 F254 πλάκες αλουμινίου και η ανίχνευση των συστατικών έγινε κάτω από υπεριώδες φως ή με χρήση φωσφομολυβδικού οξέος σε EtOH. Τα σημεία τήξεως προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας συσκευή Büchi 530. ¹H και ¹³C NMR φάσματα καταγράφηκαν σε ένα Varian Mercury (200 και 50 MHz, αντιστοίχως) σε CDCl₃, CD₃OD και DMSO-d₆. Οι χημικές μετατοπίσεις δίνονται σε ppm και οι σταθερές σύζευξης (J) σε Hz. Οι πολλαπλές κορυφές περιγράφονται ως εξής: s, μονό, d, διπλό, t, τριπλό και m, πολλαπλό. Φάσματα μάζας ιονισμού ψεκασμού ηλεκτρονίων (ESI) καταγράφηκαν σε φασματόμετρο Finnigan, Surveyor MSQ Plus. Τα φάσματα HRMS καταγράφηκαν σε φασματόμετρο QTOF Bruker Maxis Impact. Όλοι οι διαλύτες και οι χημικές ουσίες ήταν ≥95% καθαρότητας. Τα καρβοξυλικά οξέα 6a-c, 6m και 4-αμινοφαινυλοβορονικά οξέα πινακολεστέρα 19 είναι εμπορικά διαθέσιμα. Καρβοξυλικά οξέα 6e[29], 6f [30], 6h [31], 6i [32], 6j και 6l [33], 4-αμινοφαινυλοξικός αιθυλεστέρας-HCl [34], αιθύλο- 5-αμινοβαλερασικό-HCl [35], (S) -γλουταμικό διαιθύλιο-HCl (22) [36], και διμεθυλ (S) -2-αμινοεξανodioϊκό (26) [37] συντέθηκαν όπως περιγράφονται στην βιβλιογραφία.

Προσδιορισμός Ενζυμικής Δραστικότητας ATX *in vitro*. Η *in vitro* δραστικότητα του συνθετικού αναστολέα προσδιορίστηκε με την μέθοδο Amplex Red PLD (Molecular Probe, Interchim, Montluçon, Γαλλία) που σχεδιάστηκε αρχικά για τη μέτρηση της δραστικότητας της PLD [38, 39]. Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με 2nM καθαρής ATX (ATX-β ποντικού από την Sino Biological) και 50μM LPC (16:0 ή 18:0) στους 37°C. Οι αναστολείς (3mM) και όλες οι αραιώσεις (0,001 έως 5μmol/L) έγιναν

σε DMSO. Η ικανότητα της ATX να υδρολύει το LPC ανιχνεύθηκε χρησιμοποιώντας μια δοκιμασία που παρακολουθεί την απελευθέρωση χολίνης χρησιμοποιώντας Amplex Red (10mM), οξειδάση χολίνης (0,2 U/mL) και HRP (2U/mL). Οι τιμές φθορισμού μετρήθηκαν σε συσκευή ανάγνωσης πλακών φθορισμού (Tecan Infinite 200). Οι τιμές IC₅₀ προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας τις τιμές από δύο ανεξάρτητα πειράματα, με τη χρήση της σιγμοειδούς καμπύλης δόσης-απόκρισης (λογισμικό PrismH) από την εξίσωση $f=y_0+a/(1+\exp(-(x-x_0)/b))$ που δίνεται από το SigmaPlot 11.0.

Μελέτη σύνδεσης. Η υπολογιστική μελέτη μοριακής σύνδεσης πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Molegro. (Molegro's Molecules & Protein Preparation Wizard -Molegro Virtual Docker 5.0).

Πειραματικό μοντέλο πνευμονικής ίνωσης. Όλα τα πειραματικά ποντίκια στεγάζονται κάτω από ειδικές συνθήκες απαλλαγμένες παθογόνων, σε μια σταθερά θερμοκρασία 20-22°C, υγρασία 55%±5% και κύκλου φωτός (12 ωρών). Σε C57BL/6 αρσενικά και θηλυκά ποντίκια, ηλικίας 8-10 εβδομάδων, χορηγήθηκε οροτραχειακά την ημέρα 0 : 0,01U μπλεομυκίνης ή φυσιολογικός ορός (ομάδα ελέγχου, n= 5). Επιπλέον, έλαβαν αναστολέα 32 (30mg/kg, n= 10) ή φορέα (1X PBS με 5% Tween 80, n=10), για 15 ημέρες (από την ημέρα -1 έως το 14) με ενδοπεριτοναϊκές ενέσεις.

Συλλογή και προετοιμασία δειγμάτων. Τα ποντίκια θυσιάστηκαν την ημέρα 15 μετά την χορήγηση μπλεομυκίνης και αίμα, BALF και πνεύμονες συλλέχθηκαν. Το αίμα συλλέχθηκε σε 1, 3 και 6 ώρες μετά την τελευταία χορήγηση του αναστολέα 32, σε σωλήνες που περιέχουν EDTA, pH 8, τελικής συγκέντρωσης 50 mM. Το αίμα φυγοκεντρήθηκε στα 2000g για 20 λεπτά στους 4°C, και τα υπερκείμενα (πλάσμα) αποθηκεύτηκαν στους -80°C. Οι πνεύμονες πλύθηκαν τρεις φορές με 1mL αποστειρωμένου χλωριούχο νατρίου 0,9% (BALF). Τα BALF μετά τη φυγοκέντρωση στις 1200 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά μεταφέρθηκαν στους -80°C, ενώ τα κύτταρα μετρήθηκαν με 0,4% Διάλυμα Trypan Blue.

Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα.

Η ποσότητα ολικής πρωτεΐνης στα BALFs μετρήθηκε χρησιμοποιώντας την δοκιμασία Bradford σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Biorad, Hercules, CA, ΗΠΑ). Οι τιμές ελήφθησαν με μετατροπή των μετρήσεων OD σε mg/mL χρησιμοποιώντας μία πρότυπη καμπύλη με BSA (0-2 mg/ml)

Προσδιορισμός διαλυτού κολλαγόνου στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα.

Η συγκέντρωση διαλυτού κολλαγόνου στα BALFs μετρήθηκε χρησιμοποιώντας το Sirius Red πρωτόκολλο ανάλυσης. Εν συντομία, δείγματα BALF (100 μ L) αραιώθηκαν σε 1 mL 0,5 M οξικού οξέος και ίσος όγκος Sirius Red (120 μ g/mL σε 0,5 M οξικό οξύ). Τα δείγματα επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά, και μετά από φυγοκέντρηση, μετράται η απορρόφηση του υπερκείμενου στα 540 nm. Οι τιμές που λαμβάνονται μετατρέπονται σε μ g/mL σύμφωνα με τη πρότυπη καμπύλη με κολλαγόνο τύπου I από αρουραίο (0-500 μ g/mL).

Ιστοπαθολογική ανάλυση πνευμονικού ιστού. 4 μ m πνευμονικού ιστού βάφτηκαν με αιματοξυλίνη/ηωσίνη (H&E) σύμφωνα με την τυπική διαδικασία και απεικονίζονται χρησιμοποιώντας μικροσκόπιο Nikon Eclipse E800 (Nikon Corp., Shinagawa-ku, Japan) με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή EXI Aqua Q Imaging, χρησιμοποιώντας το Qcapture Pro 7 λογισμικό.

Προσδιορισμός ενζυμικής δραστικότητας της ATX *in vivo*. Η δραστικότητα ATX/LysoPLD μετρήθηκε στο βρογχοκυψελιδικό υγρό, χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία δραστηριότητας TOOS[40, 41].

Στατιστική ανάλυση. Η στατιστική ανάλυση έγινε με την δοκιμασία Student's t test, χρησιμοποιώντας το SigmaPlot 11.0 (Systat software Inc., IL, USA), και παρουσιάζονται οι μέσες τιμές ($\pm$ SEM). Οι τιμές $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) και $p < 0,001$ (***) θεωρήθηκαν σημαντικές.

2.3.3.Αποτελέσματα και Συζήτηση

Σχεδιασμός και σύνθεση των αναστολέων Υδροξαμικού οξέος. Τις τελευταίες δεκαετίες, η βιοχημεία των υδροξαμικών οξέων έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον λόγω των φαρμακολογικών τους ιδιοτήτων [42, 43]. Μερικοί από αυτούς έχουν προχωρήσει σε ανθρώπινες κλινικές δοκιμές για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών. Το Vorinostat, παράγωγο υδροξαμικού οξέος που αναστέλλει την ιστόνη δεακετυλάσης, είναι εγκεκριμένο φάρμακο (με την επωνυμία Zolinza) για το T-κυτταρικό λέμφωμα [44]. Στην περίπτωση του vorinostat και των σχετικών φαρμάκων με υδροξαμικό οξύ (βελινοστάτης, πανοβινοστάτης), ο μηχανισμός δράσης βασίζεται στην αναστολή των ενζύμων μέσω δέσμευσης στο ιόν Zn^{2+} . Αποφασίσαμε να χρησιμοποιήσουμε την ιδιότητα αυτή του υδροξαμικού οξέος ως ομάδα δέσμευσης ψευδαργύρου στους αναστολείς ATX, αναμένοντας αλληλεπίδραση της λειτουργικότητας του υδροξαμικού οξέος με την ενεργό θέση Zn^{2+} της ATX. Ξεκινήσαμε τις μελέτες μας συνθέτοντας έναν αριθμό υδροξαμικών οξέων που ενσωματώνουν το 4-αμινοφαινυλοξικό οξύ, επειδή τα φωσφονικά οξέα βασίζονται σε αυτή την χαρακτηριστική ομάδα και έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικοί αναστολείς της ATX [38, 45]. Η σύνθεση των παράγωγων παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3**. Τα καρβοξυλικά οξέα 6a-m μετατράπηκαν σε αντίστοιχους αιθυλεστέρες 7a-m και επακόλουθη κατεργασία με υδροξυλαμίνη και EtONa οδήγησε σε υδροξαμικά οξέα 8a-m. Η αμινομάδα του φαινυλοξικού οξέος συζεύχθηκε με μία ποικιλία καρβοξυλικών οξέων που περιείχαν μεσαία ή μακρά αλειφατική αλυσίδα ή αλυσίδες που φέρουν αρωματικό δαχτύλιο. Η σύνθεση των καρβοξυλικών οξέων 6d, 6g και 6k παρουσιάζεται στην **Εικόνα 4**. Ξεκινώντας από τις αλδεΐδες 9 και 12 και μετά από αντίδραση Wittig ή Horner-Emmons, αντίστοιχα, τα ακόρεστα παράγωγα 10 και 13 υδρογονώθηκαν οδηγώντας σε καρβοξυλικά οξέα 6d και 6g με σαπωνοποίηση. Το καρβοξυλικό οξύ 15 συζεύχθηκε με 5-αμινοβαλερικό άλας και η σαπωνοποίηση οδήγησε στο οξύ 6k. Όλα τα άλλα καρβοξυλικά οξέα ήταν είτε εμπορικά διαθέσιμα είτε συντίθεται όπως περιγράφεται στη βιβλιογραφία. Δεδομένου ότι μεταξύ αυτών εντοπίσαμε έναν μικρομοριακό αναστολέα της ATX, συνθέσαμε το παράγωγο πενταφθορομεθυλοκετόνης 18 καθώς και το παράγωγο βορονικού οξέος 21, για να συγκρίνουμε τις ανασταλτικές ικανότητές τους. Η ένωση

18 συντέθηκε με μετατροπή της 17 στο αντίστοιχο χλωρίδιο και άμεση επεξεργασία με πενταφθοροπροπιονικό ανυδρίτη παρουσία πυριδίνης (**Εικόνα 5**) [46]. Το εμπορικά διαθέσιμο παράγωγο βορονικού οξέος 19 συζεύχθηκε με την ένωση 6h χρησιμοποιώντας 1-αιθυλ-3-(3-(διμεθυλαμινο) προπυλ) καρβοδιιμίδιο (EDCI) ως συζευκτικό μέσο. Η προστατευτική ομάδα του αναστολέα 20 απομακρύνθηκε υπό όξινες συνθήκες που παράγουν την ένωση 21 (**Εικόνα 5**). Για να εισαχθεί η χειρομορφία στη δομή των δυνητικά αναστολέων του υδροξαμικού οξέος, το φυσικό αμινοξύ γλουταμικό οξύ χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη. Το (S)-γλουταμικό άλας διμεθυλίου 22 ήταν ακυλιωμένο με αριθμό καρβοξυλικών οξέων για να δώσει τις ενώσεις 23a-e (**Εικόνα 6**). Τα παράγωγα υδροξαμικού οξέος 24a-e ελήφθησαν με κατεργασία του 23a-e με MeONa, ενώ η ένωση 25a που περιέχει δύο λειτουργικές ομάδες υδροξαμικού οξέος συντέθηκε επίσης (**Εικόνα 6**). Οι ενώσεις 28a, b συντέθηκαν με παρόμοια διαδικασία, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 7**, ξεκινώντας από (S)-2-αμινοεξανοδιοϊκό διμεθύλιο (26), το οποίο συντέθηκε όπως περιγράφεται στη βιβλιογραφία [47]. Είχαμε προηγουμένως περιγράψει τη σύνθεση των μη φυσικών οπτικά καθαρά δ-αμινοξέων [48, 49]. Αρχίζοντας από Boc-protected δ-νορλευκίνη (29), συντέθηκε μεθυλεστέρας 31, ο οποίος μετατράπηκε σε υδροξαμικό οξύ 32 (**Εικόνα 7**).

***In vitro* αναστολή της ATX: Μελέτες δομής-δραστικότητας.** Όλα τα παράγωγα υδροξαμικού οξέος ελέγχθηκαν για την *in vitro* δραστικότητα τους χρησιμοποιώντας την ενζυμική δοκιμασία Amplex Red PLD (Molecular Probes, Interchim, Montluçon, Γαλλία) [38, 39] με ανασυνδυασμένη ATX ποντικού. LPC (16:0 και 18:0) χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα και τα αποτελέσματα αναστολής παρουσιάζονται στον Πίνακα 1, όπως επίσης και τα μοριακά βάρη των νέων συνθετικών ενώσεων καθώς και οι τιμές ClogP, υπολογιζόμενες με τη χρήση ChemOffice Ultra 11.00. Το μοριακό βάρος και η λιποφιλικότητα είναι σημαντικά για έναν πιθανό αναστολέα ATX, και έτσι, τέτοιου είδους φυσικοχημικές ιδιότητες πρέπει να λαμβάνονται υπόψη [19]. Αρχικά, δοκιμάστηκαν τα υδροξαμικά οξέα με βάση το 4-αμινοφαινυλοξικό οξύ. Η ένωση 8b που περιέχει μακρά ακυλο-αλυσίδα 14 ατόμων άνθρακα παρουσίασε τιμή IC₅₀ 1 μM. Η σύγκρισή του με την ένωση 8a που περιέχει μια βραχύτερη αλυσίδα ακυλίου 10 ατόμων άνθρακα (IC₅₀ υψηλότερο από 5μM)

δείχνει σαφώς ότι ο αναστολέας θα πρέπει να είναι αρκετά λιπόφιλος. Για να μειώσουμε τη λιποφιλικότητα, η μακρά αλυσίδα αντικαταστάθηκε από διάφορες αλυσίδες που ενσωματώνουν δακτύλιο βενζολίου. Καμία από τις ενώσεις 8c, 8d και 8e δεν παρουσίασε οποιοδήποτε αξιόλογη ανασταλτική δραστηριότητα. Εισαγωγή ενός ατόμου οξυγόνου στην β-θέση του καρβοξυλικού αμιδίου (ένωση 8f) οδήγησε σε ενδιαφέρουσα αναστολή (IC_{50} 1 μM), ενώ η προσάρτηση του ατόμου οξυγόνου στην άλλη πλευρά του βενζολικού δακτυλίου (ένωση 8g) οδήγησε σε μέτρια ανασταλτική δραστηριότητα (IC_{50} 4 μM). Η ένωση 8h που αποτελείται από μια βραχεία αλκυλική αλυσίδα που φέρει δακτύλιο βενζολίου συνδεδεμένο με αμιδικό δεσμό έδειξε μια πολλά υποσχόμενη IC_{50} τιμή (1,2 μM). Η χαμηλή λιποφιλικότητα ($ClogP$ 0,89) είναι ένα επιπλέον ελκυστικό στοιχείο. Αύξηση του αριθμού των ατόμων άνθρακα από 4 έως 6 (ένωση 8i) οδήγησε σε μείωση του IC_{50} (2 μM). Η αναστροφή του αμιδικού δεσμού 8h (ένωση 8j) οδήγησε σε παρόμοια αποτελέσματα (IC_{50} 1 μM). Η εισαγωγή ενός υποκαταστάτη στην παρα-θέση έδωσε τα ίδια αποτελέσματα στην περίπτωση της ομάδας μεθοξυλίου (ένωση 81), ενώ είχε αρνητική επίδραση στην περίπτωση της ομάδας φθορίου (ένωση 8k). Τέλος, η 7-φαινυλεπτανοϋλ αλυσίδα (ένωση 8m) οδήγησε και πάλι σε καλή ανασταλτική ισχύ (IC_{50} 0,7 μM). Θα πρέπει να τονίσουμε ότι χρησιμοποιώντας το 18:0 LPC ως υπόστρωμα, αντί για 16:0 LPC, παρατηρήθηκαν χαμηλότερες τιμές IC_{50} (0,2-0,3 μM) στην περίπτωση των ενώσεων 8b, 8f και 8j, αλλά υψηλότερη τιμή για τον 8m (2 μM). Το επόμενο βήμα ήταν να επιβεβαιωθεί ότι το υδροξαμικό οξύ ήταν αυτό που οδήγησε σε καλύτερη αναστολή. Αντικατάσταση της ομάδας του υδροξαμικού οξέος με απλή καρβοξυλική ομάδα (ένωση 17) καταργεί την ανασταλτική δραστηριότητα. Ένα πενταφθοροαιθύλιο κετόνης (ένωση 18) οδήγησε σε IC_{50} τιμές 3 μM και 0,5 μM για το 16:0 LPC και 18:0 LPC, αντίστοιχα. Το δομικά σχετικό παράγωγο του βορονικού οξέος 21 εμφάνισε τιμές IC_{50} 0,7 μM και 4 μM για 16:0 LPC και 18:0 LPC, αντίστοιχα. Οι παραπάνω μελέτες σχέσεων δομής-δραστηριότητας επιβεβαίωσαν ότι η λειτουργικότητα του υδροξαμικού οξέος μπορεί να χρησιμεύσει αποτελεσματικά ως νέος αναστολέας που στοχεύει την ATX. Έτσι, αποφασίσαμε να κρατήσουμε τη λειτουργική ομάδα υδροξαμικού οξέος και η 6-οξο-6- (φαινυλαμινο) εξανούλ αλυσίδα της ένωσης 8h να αντικατασταθεί η 4-αμινοφαινυλοξικού οξέος, εισάγοντας έτσι τη χειραλότητα στα μόρια μας. Το γλουταμικό οξύ επιλέχθηκε, διότι

παρέχει απόσταση τριών ατόμων άνθρακα μεταξύ της αμινομάδας και της ομάδας καρβοξυλίου της πλευρικής αλυσίδας. Η ένωση 24a με βάση α-μεθυλο γ-υδροξαμικό άλας (S)-γλουταμικό παρουσίασε τιμή IC_{50} 0,4 μ M (Πίνακας 1). Ωστόσο, η μετατροπή και των δύο καρβοξυλικών ομάδων του γλουταμικού οξέος σε ομάδες υδροξαμικού οξέος (ένωση 25a) οδήγησε σε απώλεια της ανασταλτικής δραστηριότητας. Η αναστροφή του αμιδικού δεσμού της 24a (ένωση 24b) κατέστρεψε τη δραστηριότητα, ενώ η εισαγωγή των υποκαταστατών στη θέση πάρα (ενώσεις 24c-e) είχε επίσης επιβλαβείς επιπτώσεις. Αύξηση της απόστασης μεταξύ του υδροξαμικού οξέος και της αμινομάδα του υπολείμματος αμινοξέος από ένα άτομο άνθρακα αποδείχθηκε κρίσιμο και οδήγησε σε ισχυρή αναστολή της ATX. Η ένωση 28a (GK400) παρουσίασε τιμή IC_{50} 0,05 μ M (Πίνακας 1). Αντικατάσταση του 6-οξο-6- (φαινυλαμινο) εξανούλ αλυσίδα με την 7-φαινυλεπτανοϋλ αλυσίδα (ένωση 28b) κατέστρεψε την ανασταλτική δραστηριότητα. Τελικά, η ένωση 32 (GK442) με βάση το μη φυσικό αμινοξύ δ-νορλευκίνη παρουσίασε ισχυρή ανασταλτική δραστηριότητα με IC_{50} τιμή 0,06 μ M, επιβεβαιώνοντας τη σημασία της απόστασης των 4 ατόμων άνθρακα μεταξύ των λειτουργικών ομάδων του υδροξαμικού οξέος και της αμινομάδας και ότι ο σκελετός ενός δ-αμινοξέος παρέχει τις κατάλληλες αποστάσεις μεταξύ αυτών. Μεταξύ των νέων υδροξαμικών οξέων που αναπτύχθηκαν, η ένωση 32 παρουσιάζει ισχυρή *in vitro* αναστολή της ATX (IC_{50} 0,06 μ M) και έχει ευνοϊκή λιποφιλικότητα (ClogP 1,11) γιαυτό επιλέχθηκε για *in vivo* μελέτες.

Μοντέλο πρόσδεσης του αναστολέα 32 στην ATX. Υπολογιστικές μελέτες, όπως η μοριακή σύνδεση και η εικονική προβολή, μπορεί να παρέχουν νέα δεδομένα για τις ανασταλτικές επιφάνειες της κρυσταλλικής δομής της ATX και μπορούν να συμβάλουν στην ανάπτυξη βελτιωμένων μικρομοριακών αναστολέων της ATX [50, 51]. Δεδομένου ότι τα υδροξαμικά οξέα αντιπροσωπεύουν μια νέα τάξη αναστολέων της ATX, μελέτες σύνδεσης διεξήχθησαν για να διευκρινιστεί ο τρόπος σύνδεσης και οι αλληλεπιδράσεις του πλέον ισχυρού αναστολέα 32. Για τις μελέτες σύνδεσης, χρησιμοποιήθηκε η κρυσταλλική δομή της ATX (κωδικός PDB 2XRG) [15]. Ο νανομοριακός αναστολέας ATX βορονικού τύπου HA155 αλληλεπιδρά με την ενεργό θέση και σχηματίζει έναν αναστρέψιμο ομοιοπολικό δεσμό μεταξύ του ατόμου βορίου και της ομάδα υδροξυλίου του καταλυτικού υπολείμματος Thr209

της ATX ποντικού, η οποία σταθεροποιείται περαιτέρω με δύο ιόντα ψευδάργυρου (**Εικόνα 8**) [52]. Η λειτουργικότητα του υδροξαμικού οξέος του αναστολέα 32 (GK442) αλληλεπιδρά κατά παρόμοιο τρόπο με την θέση Thr209 επιπλέον των Asn230 και Tyr306 (**Εικόνα 8**).

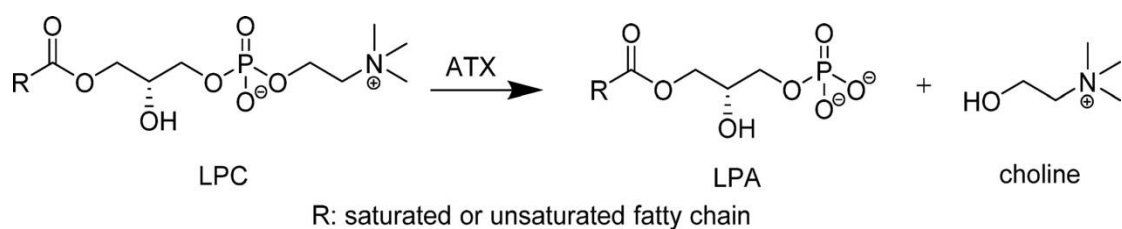
***In vivo* αποτελεσματικότητα του αναστολέα 32.** Η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση (ΙΠΙ) είναι μια ασθένεια που χαρακτηρίζεται από προοδευτική και μη αναστρέψιμη ουλοποίηση του πνεύμονα [53-55]. Η ασθένεια είναι θανατηφόρα, με διάμεσο χρόνο επιβίωσης μεταξύ 3 και 5 ετών από την διάγνωση. Η παθογένεια της ΙΠΙ δεν είναι εντελώς κατανοητή και οι θεραπευτικές επιλογές είναι περιορισμένες. Το 2014, δύο φάρμακα που επιβραδύνουν την πρόοδο της νόσου, η pirfenidone [56], ένα φάρμακο με κακώς κατανοητούς μηχανισμούς, και η nintedanib [57], ένας αναστολέας της κινάσης της τυροσίνης, έχουν επίσημα εγκριθεί. Ωστόσο, δεν είναι σαφές αν αυτά τα φάρμακα βελτιώνουν τα συμπτώματα όπως η δύσπνοια και ο βήχας ή εάν η ευεργετική τους επίδραση στη πνευμονική λειτουργικότητα έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη επιβίωση. Έτσι, νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις που να βελτιώνουν τον χρόνο επιβίωσης και την ποιότητα ζωής των ασθενών με ΙΠΙ χρειάζονται επείγοντως [55]. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν αύξηση των επιπέδων LPA στο βρογχοκυψελιδικό υγρό πλύσης (BALF) ασθενών με ΙΠΙ, καθώς και αυξημένα επίπεδα της ATX στον πνεύμονα [58]. Η Γκαλαπάγκος πρόσφατα ανέφερε ότι ένας αναστολέας της ATX, ο GLPG1690 (**5, Εικόνα 2**), υπήρξε αποτελεσματικός στο μοντέλο της επαγόμενης από μπλεομυκίνη πνευμονικής ίνωσης στα ποντίκια [28]. Το GLPG1690 εισήλθε σε κλινικές δοκιμές στη Φάσης 2α και πιο πρόσφατα ανακοινώθηκαν θετικά αποτελέσματα σε ασθενείς με ΙΠΙ [59]. Το μοντέλο πνευμονικής ίνωσης που προκαλείται από τη μπλεομυκίνη σε τρωκτικά θεωρείται το πιο συνηθισμένο πειραματικό μοντέλο για την διερεύνηση των δυνατοτήτων νέων παραγόντων ως θεραπείες της ΙΠΙ [60]. Ένα από τα πιο ισχυρά *in vitro* υδροξαμικά οξέα, ο αναστολέας 32, δοκιμάστηκε για την αποτελεσματικότητά του σε ένα μοντέλο 14 ημερών πνευμονικής φλεγμονή και ίνωσης που προκαλείται από μπλεομυκίνη. C57Bl/6 ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε μπλεομυκίνη ή φυσιολογικός ορός, έλαβαν αναστολέα 32 (30 mg/kg) με ενδοπεριτοναϊκή ένεση επί 15 ημέρες ξεκίνησε (την ημέρα -1 πριν από την χορήγηση της μπλεομυκίνης). Η χορηγούμενη δόση επιλέχθηκε με βάση την βιβλιογραφία γνωστών αναστολέων ATX. Η

αποτελεσματικότητα του αναστολέα 32 αξιολογήθηκε με βάση ιστοπαθολογικές αλλαγές στην αρχιτεκτονική του πνεύμονα, τα συνολικά φλεγμονώδη κύτταρα στο βρογχοκυψελιδικό υγρό καθώς και τα επίπεδα πρωτεΐνης και κολλαγόνου. Όπως φαίνεται στην εικόνα 9Α, η χορήγηση μπλεομυκίνης είχε σαν αποτέλεσμα την πάχυνση των κυψελιδικών διαφραγμάτων, την κυψελιδική φλεγμονή και σχηματισμό ινωτικών μαζών. Αναστολή της ΑΤΧ βελτίωσε την αρχιτεκτονική των πνευμόνων, λιγότερες ινωτικές βλάβες παρατηρήθηκαν στο πνευμονικό ιστό με χρώση HE. Επιπλέον, η χορήγηση μπλεομυκίνης προκαλεί φλεγμονώδη κυτταρική εισροή (ουδετερόφιλα, μακροφάγα και λεμφοκύτταρα, κλπ.) στο βρογχοκυψελιδικό υγρό σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Εικόνα 9Β), η οποία μειώθηκε κατά 50% μετά την αγωγή με αναστολέα 32. Επίπλέον, η μπλεομυκίνη προκάλεσε αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας, η οποία αντικατοπτρίστηκε από την αύξηση της ολικής πρωτεΐνης (8 φορές σε σύγκριση με τον έλεγχο ομάδα, Εικόνα 9C). Η συνολική συγκέντρωση πρωτεΐνης στο βρογχοκυψελιδικό υγρό των ποντικών που έλαβαν τον αναστολέα 32 ήταν σημαντικά μειωμένη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Εικόνα 9C). Ένα άλλο χαρακτηριστικό της βλάβης της μπλεομυκίνης, η αυξημένη παραγωγή κολλαγόνου και η εναπόθεση στο πνεύμονα και στο βρογχοκυψελιδικό υγρό, ήταν επίσης μειωμένη από τον αναστολέα 32 (Εικόνα 9D). Επιπλέον, η δραστηριότητα ΑΤΧ μειώθηκε κοντά στο φυσιολογικό επίπεδο μετά τη θεραπεία με αναστολέα 32 (Εικόνα 9Ε). Συγκέντρωτικά, αυτές τις παρατηρήσεις δείχνουν ότι οι αναστολείς του υδροξυαμικού οξέος έχουν ευεργετικά αποτελέσματα στην ανάπτυξη της πνευμονικής ίνωσης. Με την μέθοδο LC-MS/MS προσδιορίστηκαν τα επίπεδα του αναστολέα 32 στο πλάσμα ποντικών. Το αίμα συλλέχθηκε 1, 3 και 6 ώρες μετά τη χορήγηση της τελευταίας δόσης του αναστολέα 32 και οι συγκεντρώσεις του αναστολέα 32 φαίνονται στην Εικόνα 9F (συγκέντρωση 70 ng/mL μετά από 1 ώρα, ενώ μετά από 3 και 6 ώρες, 35 ng/mL)

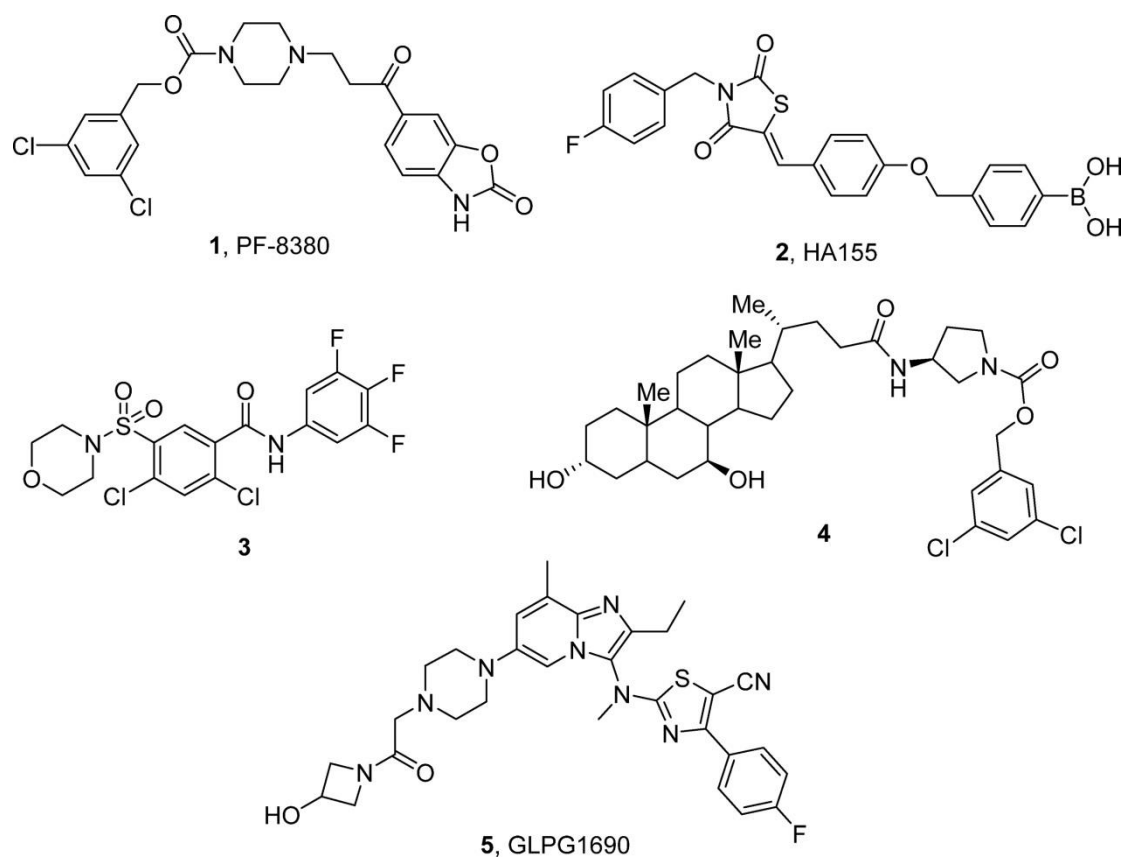
Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, περιγράφουμε μια νέα κατηγορία αναστολέων ΑΤΧ με βάση τη λειτουργικότητα του υδροξυαμικού οξέος. Μελέτες δομής-δραστηριότητας οδήγησαν στην αναγνώριση των παραγώγων υδροξυαμικού οξέος των δ-αμινοξέων τα οποία παρουσιάζουν ανασταλτική ισχύ έναντι της ΑΤΧ και υπογραμμίζεται η σημασία της

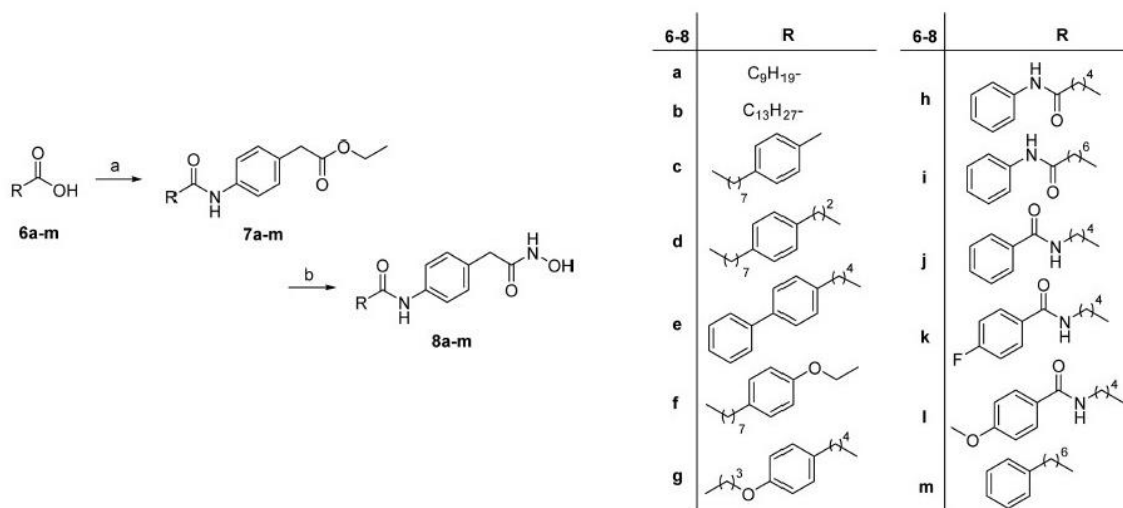
απόστασης των τεσσάρων ατόμων άνθρακα μεταξύ του υδροξαμικού οξέος και της αμινομάδας. Ο αναστολέας 32, υδροξαμικό παράγωγο οξέως που βασίζεται σε δ-νορλευκίνη, παρουσίασε τιμή IC_{50} των 60 nM και πολλά υποσχόμενη αποτελεσματικότητα σε ένα μοντέλο πνευμονικής φλεγμονής και ίνωσης που προκαλείται από μπλεομυκίνη. Η χαμηλή λιποφιλικότητα του αναστολέα 32 ($ClogP$ 1.11) μαζί με το γεγονός ότι υπάρχει η ομάδα του υδροξαμικού οξέος σε φάρμακα που κυκλοφορούν στο εμπόριο το καθιστούν ελκυστικό υποψήφιο για περαιτέρω μελέτες. Οι νέοι υδροξαμικοί αναστολείς της ATX μπορεί να είναι εξαιρετικά εργαλεία για τη μελέτη του ρόλου του ενζύμου στα κύτταρα και το ζώα και μπορεί να συμβάλει στην ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών παραγόντων για τη θεραπεία φλεγμονωδών ασθενειών.



Εικόνα 1: Η υδρόλυση της λυσοφωσφατυδιλοχολίνης (LPC) σε λυσοφωσφατυδικό οξύ (LPA) και χολίνη (choline) από την αυτοταξίνη (ATX).

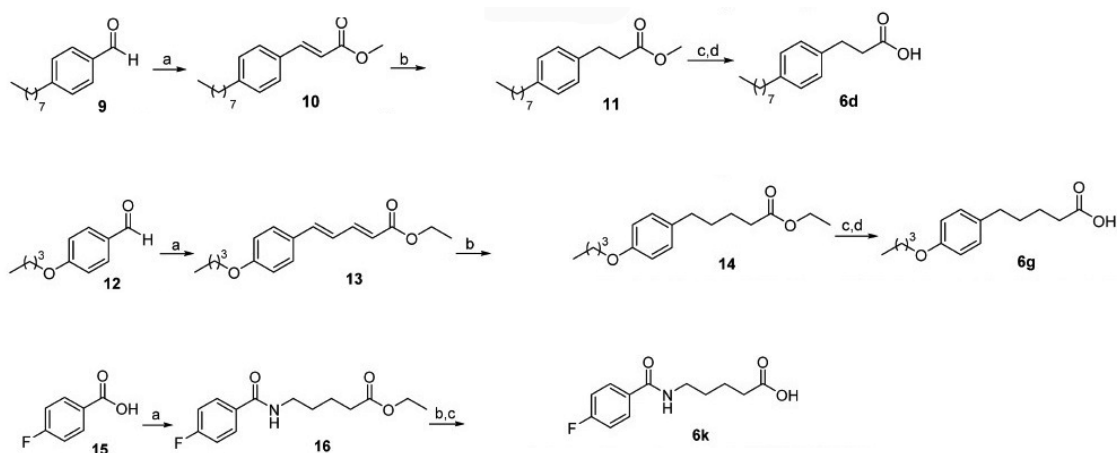


Εικόνα 2: Δομή ορισμένων γνωστών αναστολέων της ATX.



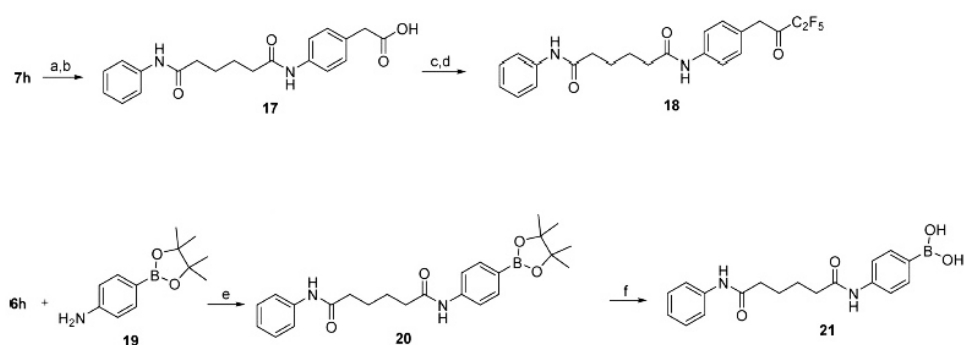
Εικόνα 3: Αντιδραστήρια και συνθήκες.

(a) Ethyl 4-aminophenylacetate·HCl, EDCI·HCl, Et₃N, CH₂Cl₂, (0°C έως θερμοκρασία δωματίου), (b) NH₂OH·HCl, EtONa, EtOH, (0°C έως θερμοκρασία δωματίου)



Εικόνα 4: Αντιδραστήρια και συνθήκες.

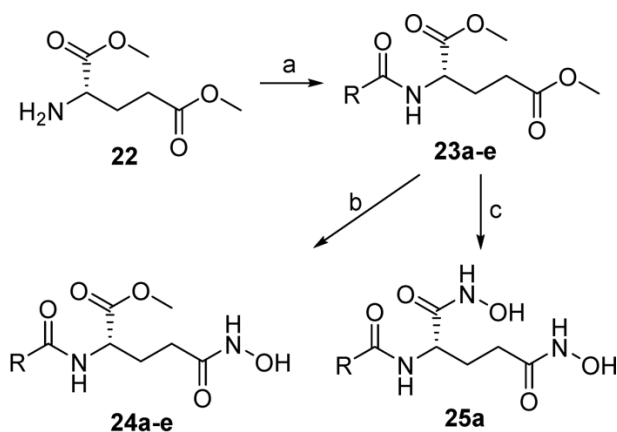
(a) Ph₃P=CHCOOCH₃, THF, (b) H₂, 10% Pd/C, MeOH, (c) NaOH 1N, 1,4-dioxane, (d) HCl 1N.
 (a) C₂H₅OOCCH=CHCH₂P(=O)(OC₂H₅)₂, LiOH·H₂O. THF, reflux, (b) H₂, 10% Pd/C, EtOH, (c) NaOH 1N, 1,4-dioxane, (d) HCl 1N.
 (a) Ethyl 5-aminovalerate·HCl, EDCI·HCl, Et₃N, CH₂Cl₂, (0°C έως θερμοκρασία δωματίου),
 (b) NaOH 1N, 1,4-dioxane, (c) HCl 1N.



Εικόνα 5: Αντιδραστήρια και συνθήκες.

(a) NaOH, 1,4-dioxane, (b) HCl 1N, (c) (COCl)₂, DMF, CH₂Cl₂, (d) pyridine, pentafluoropropionic anhydride, CH₂Cl₂, (e) EDCI·HCl, Et₃N, CH₂Cl₂, (0°C έως θερμοκρασία δωματίου), (f) HCl 1 N, THF

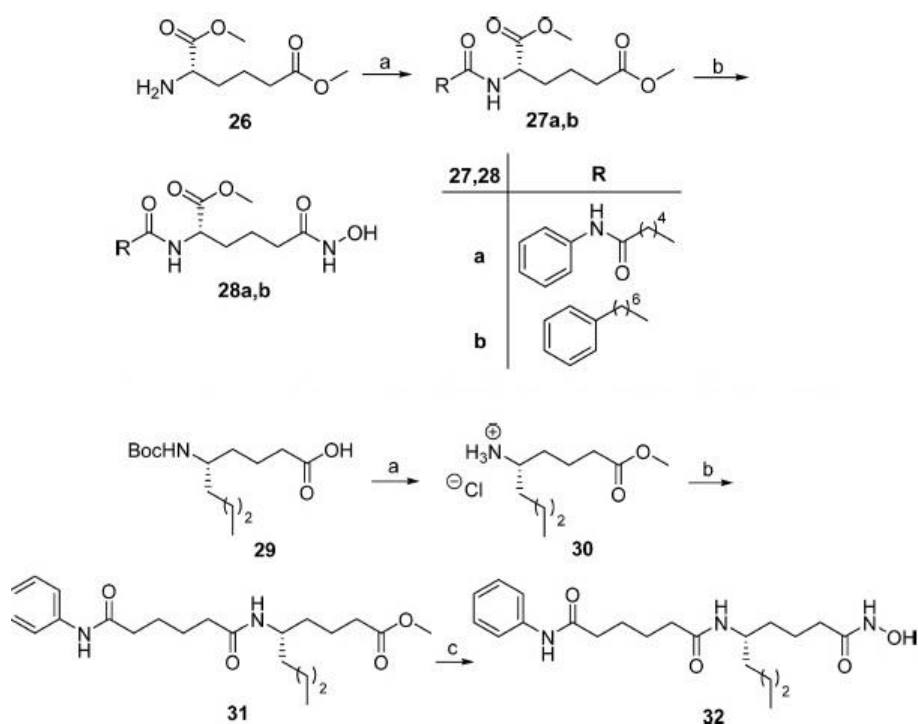
(a) RCOOH, EDCI·HCl, Et₃N, HOBT, CH₂Cl₂, (0°C έως θερμοκρασία δωματίου), (b) NH₂OH·HCl, MeONa, MeOH, (0°C έως θερμοκρασία δωματίου), (c) NH₂OH·HCl, EtONa, EtOH, (0°C έως θερμοκρασία δωματίου)



23-25	R
a	
b	
c	
d	
e	

Εικόνα 6: Αντιδραστήρια και συνθήκες.

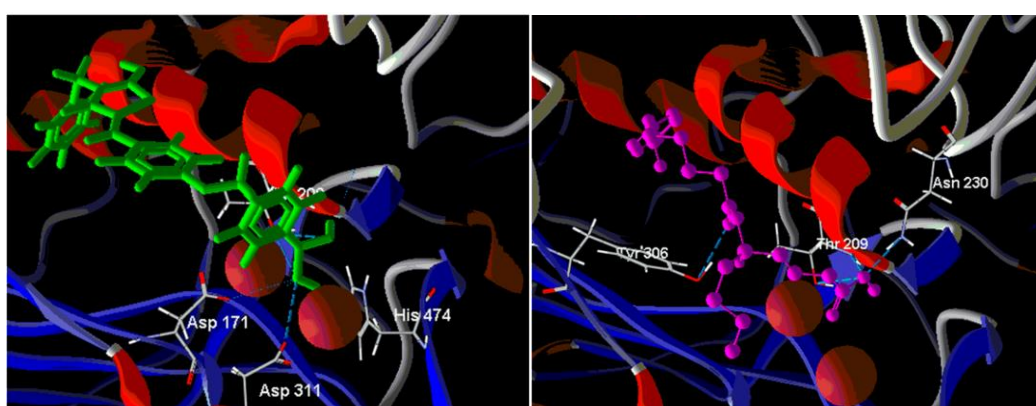
(a) RCOOH, EDCI·HCl, Et₃N, HOBT, CH₂Cl₂(0°C έως θερμοκρασία δωματίου), (b) NH₂OH·HCl, MeONa, MeOH, (0°C έως θερμοκρασία δωματίου), (c) NH₂OH·HCl, EtONa, EtOH, (0°C έως θερμοκρασία δωματίου).



Εικόνα 7: Αντιδραστήρια και συνθήκες.

(a) RCOOH , $\text{EDCI} \cdot \text{HCl}$, Et_3N , HOBT , CH_2Cl_2 (0°C έως θερμοκρασία δωματίου), (b) $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$, MeONa , MeOH , (0°C έως θερμοκρασία δωματίου).

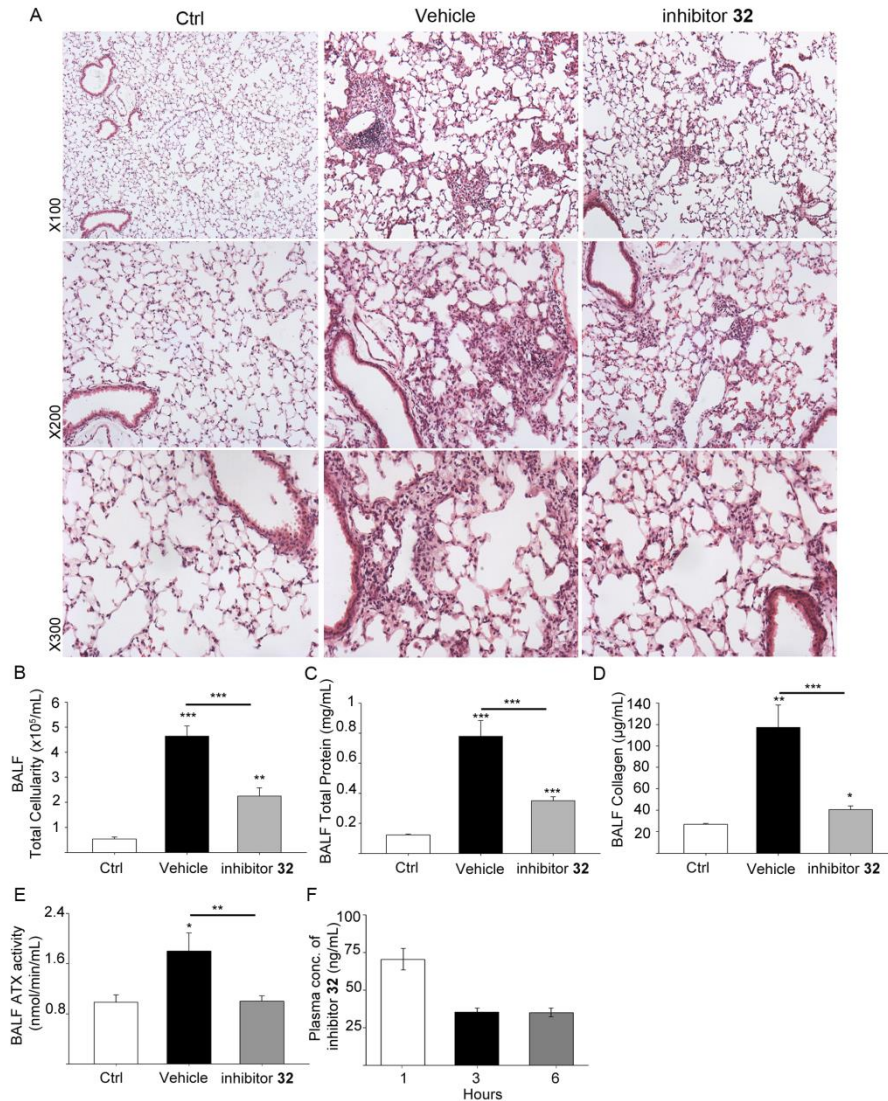
(a) SOCl_2 , MeOH , (0°C έως θερμοκρασία δωματίου), (b) 6h, $\text{EDCI} \cdot \text{HCl}$, Et_3N , HOBT , CH_2Cl_2 , (0°C έως θερμοκρασία δωματίου), (c) $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$, EtONa , EtOH , (0°C έως θερμοκρασία δωματίου).



Εικόνα 8: Αλληλεπιδράσεις δεσμού υδρογόνου μεταξύ ATX και HA155 (αριστερά) και ανιστολέα 32 (δεξιά).

Πίνακας 1: *In vitro* δραστηριότητα υδροξαμικών οξέων με βάση το Γλουταμικό οξύ και δ-αμινοξέα

Compound	Structure	IC ₅₀ (μM) 16:0 LPC	MW	ClogP ^b
24a		0.4	379.41	-1.24
25a		>5	380.40	-2.69
24b		>5	379.41	-1.54
24c		>5	397.40	-0.84
24d		4.5	409.44	-1.17
24e		>5	423.47	-0.64
28a		0.05	393.44	-0.71
28b		>5	378.47	1.82
32		0.06	391.51	1.11



Εικόνα 9: Η φαρμακολογική αναστολή της ATX με τον αναστολέα 32 μειώνει την επαγόμενη από μπλεομυκίνη πνευμονική ίνωση. (A) Χρώση αιματοξυλίνη/εωσίνη πνευμονικού ιστού από ποντίκια της ομάδας ελέγχου και ποντίκια τους χορηγήθηκε μπλεομυκίνη και έλαβαν είτε φορέα είτε αναστολέα 32 (X100, X 200, X300 μεγέθυνση). **(B)** Συνολικός αριθμός κυττάρων σε BALF ($\times 10^5$ κύτταρα/mL). **(C)** Συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης (mg/mL) και **(D)** Συγκέντρωση διαλυτού κολλαγόνου (μ g/mL) στο βρογχοκυψελιδικό υγρό. **(E)** Δραστικότητα ATX (nmol/min/mL) στο βρογχοκυψελιδικό υγρό των τριών πειραματικών ομάδων. **(F)** Συγκέντρωση του αναστολέα 32 στο πλάσμα 1, 3 και 6 ώρες μετά την τελευταία χορήγηση. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ($\pm$ SEM). Τα * υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p < 0,05$), $n = 10$ /ομάδα.

Βιβλιογραφία

1. Barbayianni, E., et al., Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, as a promising therapeutic target in chronic inflammation and cancer. *Prog Lipid Res*, 2015. 58: p. 76-96.
2. Stracke, M.L., et al., Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility-stimulating protein. *J Biol Chem*, 1992. 267(4): p. 2524-9.
3. Stefan, C., S. Jansen, and M. Bollen, NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. *Trends Biochem Sci*, 2005. 30(10): p. 542-50.
4. Tokumura, A., et al., Identification of human plasma lysophospholipase D, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, as autotaxin, a multifunctional phosphodiesterase. *J Biol Chem*, 2002. 277(42): p. 39436-42.
5. Umezū-Goto, M., et al., Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. *J Cell Biol*, 2002. 158(2): p. 227-33.
6. Okudaira, S., H. Yukiura, and J. Aoki, Biological roles of lysophosphatidic acid signaling through its production by autotaxin. *Biochimie*, 2010. 92(6): p. 698-706.
7. Yung, Y.C., N.C. Stoddard, and J. Chun, LPA receptor signaling: pharmacology, physiology, and pathophysiology. *J Lipid Res*, 2014. 55(7): p. 1192-214.
8. Sevastou, I., et al., Lysoglycerophospholipids in chronic inflammatory disorders: the PLA(2)/LPC and ATX/LPA axes. *Biochim Biophys Acta*, 2013. 1831(1): p. 42-60.
9. Perrakis, A. and W.H. Moolenaar, Autotaxin: structure-function and signaling. *J Lipid Res*, 2014. 55(6): p. 1010-8.
10. Benesch, M.G., et al., Recent advances in targeting the autotaxin-lysophosphatidate-lipid phosphate phosphatase axis in vivo. *J Biomed Res*, 2016. 30(4): p. 272-84.
11. Federico, L., et al., Autotaxin, a lysophospholipase D with pleomorphic effects in oncogenesis and cancer progression. *J Lipid Res*, 2016. 57(1): p. 25-35.
12. Benesch, M.G.K., et al., Lysophosphatidate Signaling: The Tumor Microenvironment's New Nemesis. *Trends Cancer*, 2017. 3(11): p. 748-752.
13. Gijsbers, R., et al., The hydrolysis of lysophospholipids and nucleotides by autotaxin (NPP2) involves a single catalytic site. *FEBS Lett*, 2003. 538(1-3): p. 60-4.
14. Nishimasu, H., et al., Crystal structure of autotaxin and insight into GPCR activation by lipid mediators. *Nat Struct Mol Biol*, 2011. 18(2): p. 205-12.
15. Hausmann, J., et al., Structural basis of substrate discrimination and integrin binding by autotaxin. *Nat Struct Mol Biol*, 2011. 18(2): p. 198-204.
16. Albers, H.M. and H. Ovaa, Chemical evolution of autotaxin inhibitors. *Chem Rev*, 2012. 112(5): p. 2593-603.
17. Barbayianni, E., et al., Autotaxin inhibitors: a patent review. *Expert Opin Ther Pat*, 2013. 23(9): p. 1123-32.
18. Castagna, D., et al., Development of Autotaxin Inhibitors: An Overview of the Patent and Primary Literature. *J Med Chem*, 2016. 59(12): p. 5604-21.
19. Nikolaou, A., et al., Autotaxin inhibitors: a patent review (2012-2016). *Expert Opin Ther Pat*, 2017. 27(7): p. 815-829.
20. Gierse, J., et al., A novel autotaxin inhibitor reduces lysophosphatidic acid levels in plasma and the site of inflammation. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010. 334(1): p. 310-7.
21. Albers, H.M., et al., Discovery and optimization of boronic acid based inhibitors of autotaxin. *J Med Chem*, 2010. 53(13): p. 4958-67.
22. Benesch, M.G., et al., Inhibition of autotaxin delays breast tumor growth and lung metastasis in mice. *FASEB J*, 2014. 28(6): p. 2655-66.
23. Banerjee, S., et al., Highly Potent Non-Carboxylic Acid Autotaxin Inhibitors Reduce Melanoma Metastasis and Chemotherapeutic Resistance of Breast Cancer Stem Cells. *J Med Chem*, 2017. 60(4): p. 1309-1324.
24. Miller, L.M., et al., Structure-Activity Relationships of Small Molecule Autotaxin Inhibitors with a Discrete Binding Mode. *J Med Chem*, 2017. 60(2): p. 722-748.
25. Keune, W.J., et al., Steroid binding to Autotaxin links bile salts and lysophosphatidic acid signalling. *Nat Commun*, 2016. 7: p. 11248.
26. Keune, W.J., et al., Rational Design of Autotaxin Inhibitors by Structural Evolution of Endogenous Modulators. *J Med Chem*, 2017. 60(5): p. 2006-2017.
27. Joncour, A., et al., Discovery, Structure-Activity Relationship, and Binding Mode of an Imidazo[1,2-a]pyridine Series of Autotaxin Inhibitors. *J Med Chem*, 2017. 60(17): p. 7371-7392.
28. Desroy, N., et al., Discovery of 2-[[2-Ethyl-6-[4-[2-(3-hydroxyazetidin-1-yl)-2-oxoethyl]piperazin-1-yl]-8-methylimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl]methylamino]-4-(4-fluorophenyl)thiazole-5-carbonitrile (GLPG1690), a First-in-Class Autotaxin Inhibitor Undergoing Clinical Evaluation for the Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *J Med Chem*, 2017. 60(9): p. 3580-3590.
29. Magrioti, V., et al., New potent and selective polyfluoroalkyl ketone inhibitors of GVIA calcium-independent phospholipase A2. *Bioorg Med Chem*, 2013. 21(18): p. 5823-9.
30. Ainsworth, C., et al., Cholesterol-solubilizing agents related to the gallstone problem. *J Med Chem*, 1967. 10(2): p. 158-61.

31. Suzuki, T., et al., Novel histone deacetylase inhibitors: design, synthesis, enzyme inhibition, and binding mode study of SAHA-based non-hydroxamates. *Bioorg Med Chem Lett*, 2003. 13(24): p. 4321-6.
32. Stowell, J.C., R.I. Huot, and L. Van Voast, The synthesis of N-hydroxy-N'-phenyloctanediamide and its inhibitory effect on proliferation of AXC rat prostate cancer cells. *J Med Chem*, 1995. 38(8): p. 1411-3.
33. Elaut, G., et al., A metabolic screening study of trichostatin A (TSA) and TSA-like histone deacetylase inhibitors in rat and human primary hepatocyte cultures. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007. 321(1): p. 400-8.
34. Lebedev, A.V., et al., Organosilicon synthesis of isocyanates: III. Synthesis of aliphatic, carbocyclic, aromatic, and alkylaromatic isocyanatocarboxylic acid esters. *Russ. J. Gen. Chem.*, 2006. 76: p. 1069-1080.
35. Elsinghorst, P.W., C.M. Tanarro, and M. Gutschow, Novel heterobivalent tacrine derivatives as cholinesterase inhibitors with notable selectivity toward butyrylcholinesterase. *J Med Chem*, 2006. 49(25): p. 7540-4.
36. Gu, K., et al., Toward the development of chemoprevention agents. Part II: Chemo-enzymatic synthesis and anti-inflammatory activities of a new class of 5-amino-2-substitutedphenyl-1,3-dioxacycloalkanes. *Bioorg Med Chem*, 2007. 15(18): p. 6273-90.
37. Zhang, Z.D. and R. Scheffold, Asymmetric catalysis by vitamin B12: The isomerization of achiral aziridines to optically active allylic amines. *Helv. Chim. Acta* 1993(76): p. 2602-2615.
38. Ferry, G., et al., S32826, a nanomolar inhibitor of autotaxin: discovery, synthesis and applications as a pharmacological tool. *J Pharmacol Exp Ther*, 2008. 327(3): p. 809-19.
39. Giganti, A., et al., Murine and human autotaxin alpha, beta, and gamma isoforms: gene organization, tissue distribution, and biochemical characterization. *J Biol Chem*, 2008. 283(12): p. 7776-89.
40. Mouratis, M.A., et al., Autotaxin and Endotoxin-Induced Acute Lung Injury. *PLoS One*, 2015. 10(7): p. e0133619.
41. Katsifa, A., et al., The Bulk of Autotaxin Activity Is Dispensable for Adult Mouse Life. *PLoS One*, 2015. 10(11): p. e0143083.
42. Marmion, C.J., D. Griffith, and K.B. Nolan, Hydroxamic acids - an intriguing family of enzyme inhibitors and biomedical ligands. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2004: p. 3003-3016.
43. Muri, E.M., et al., Hydroxamic acids as pharmacological agents. *Curr Med Chem*, 2002. 9(17): p. 1631-53.
44. Zagni, C., et al., The Search for Potent, Small-Molecule HDACs in Cancer Treatment: A Decade After Vorinostat. *Med Res Rev*, 2017. 37(6): p. 1373-1428.
45. Jiang, G., D. Madan, and G.D. Prestwich, Aromatic phosphonates inhibit the lysophospholipase D activity of autotaxin. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011. 21(17): p. 5098-101.
46. Baskakis, C., et al., Synthesis of polyfluoro ketones for selective inhibition of human phospholipase A2 enzymes. *J Med Chem*, 2008. 51(24): p. 8027-37.
47. Pellicciari, R., B. Natalini, and M. Marinozzi, L- α -Aminoadipic acid from L-glutamic acid. *Synth. Commun*, 1988(18): p. 1707-1714.
48. Six, D.A., et al., Structure-activity relationship of 2-oxoamide inhibition of group IVA cytosolic phospholipase A2 and group V secreted phospholipase A2. *J Med Chem*, 2007. 50(17): p. 4222-35.
49. Moutevelis-Minakakis, P., et al., Synthesis of tetrazole analogs of gamma- and delta-amino acids. *J Pept Sci*, 2006. 12(6): p. 377-82.
50. Vrontaki, E., et al., Computer Aided Drug Design Approaches for Identification of Novel Autotaxin (ATX) Inhibitors. *Curr Med Chem*, 2016. 23(17): p. 1708-24.
51. Katsamakas, S., E. Bermpoglou, and D. Hadjipavlou-Litina, Considering autotaxin inhibitors in terms of 2D-QSAR and 3D-mapping- review and evaluation. *Curr Med Chem*, 2015. 22(12): p. 1428-61.
52. Albers, H.M., et al., Structure-based design of novel boronic acid-based inhibitors of autotaxin. *J Med Chem*, 2011. 54(13): p. 4619-26.
53. Mora, A.L., et al., Emerging therapies for idiopathic pulmonary fibrosis, a progressive age-related disease. *Nat Rev Drug Discov*, 2017. 16(11): p. 810.
54. Martinez, F.J., et al., Idiopathic pulmonary fibrosis. *Nat Rev Dis Primers*, 2017. 3: p. 17074.
55. Liu, Y.M., K. Nepali, and J.P. Liou, Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Current Status, Recent Progress, and Emerging Targets. *J Med Chem*, 2017. 60(2): p. 527-553.
56. King, T.E., Jr., et al., A phase 3 trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*, 2014. 370(22): p. 2083-92.
57. Richeldi, L., et al., Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*, 2014. 370(22): p. 2071-82.
58. Oikonomou, N., et al., Pulmonary autotaxin expression contributes to the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2012. 47(5): p. 566-74.
59. Maher, T.M., et al., Safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of GLPG1690, a novel autotaxin inhibitor, to treat idiopathic pulmonary fibrosis (FLORA): a phase 2a randomised placebo-controlled trial. *Lancet Respir Med*, 2018.
60. Moeller, A., et al., The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? *Int J Biochem Cell Biol*, 2008. 40(3): p. 362-82.

3. Ο ρόλος του άξονα ATX/LPA στην Πειραματική αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα

3.1. Εισαγωγή

Η ΣκΠ είναι μία χρόνια φλεγμονώδης, αυτοάνοση και νευροεκφυλιστική ασθένεια, που χαρακτηρίζεται από καταστροφή της μυελίνης των ολιγοδενδροκυττάρων του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού, με αποτέλεσμα νευρολογικές διαταραχές, κινητικά και νοητικά προβλήματα [1]. Αποτελεί την συνηθέστερη διαταραχή του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ), με πολυάριθμες συνέπειες τόσο σε προσωπικό όσο και σε κοινωνικοοικονομικό επίπεδο [1].

Σημαντικό εργαλείο της έρευνας για την ΣκΠ, αποτελεί το μοντέλο της πειραματικής αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας (ΠΑΕ, ΕΑΕ), το οποίο προκαλείται με ανοσοποίηση των ζώων έναντι πρωτεϊνών του ΚΝΣ, όπως για παράδειγμα της μυελίνης [2]. Η φλεγμονή είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της παθογένειας της ΣκΠ: ξεκινά από τα αυτοαντιδραστικά λεμφοκύτταρα στην περιφέρεια, τα οποία μεταναστεύουν στο ΚΝΣ διευκολυνόμενα από την διάρρηξη του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, προκαλούν έναν καταρράκτη γεγονότων με την συμμετοχή των μικρογλοιακών/μακροφάγων και αστροκυττάρων με τελικό αποτέλεσμα την απομυελίνωση [3].

Την τελευταία 20ετία περίπου έχει γίνει επανάσταση στην αντιμετώπιση της νόσου. Σήμερα υπάρχουν αρκετά φάρμακα τα οποία μπορούν να τροποποιήσουν την εξέλιξη της και να επιβραδύνουν την εμφάνιση της αναπηρίας, μειώνοντας την συχνότητα των υποτροπών και την εκφυλιστική δράση της ΣκΠ. Η φινγκολιμόδη (FTY720, Gilenya) είναι το πρώτο ανοσοτροποποιητικό φάρμακο του οποίου η δράση συνίσταται στη σύνδεσή του με ειδικούς υποδοχείς στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, δηλαδή στα λεμφοκύτταρα Β και Τ. Με τον τρόπο αυτό, τα κυκλοφορούντα στο αίμα λεμφοκύτταρα παγιδεύονται στους λεμφαδένες αποτρέποντας τη μετανάστευσή τους στο κεντρικό νευρικό σύστημα και τη προσβολή της μυελίνης. Συγκεκριμένα, το FTY720, μετά την φωσφορυλίωση του

από την κινάση της σφιγγοσίνης SPHK2, προσδένεται με τον υποδοχέα S1PR1 στην επιφάνεια των Τ λεμφοκυττάρων, προκαλώντας την ενδοκύττωση και αποικοδόμηση του. Με τον τρόπο αυτό, η έξοδος των λεμφοκυττάρων από τους λεμφαδένες, η οποία επάγεται από το S1P, αναστέλλεται και κατά συνέπεια λιγότερα λεμφοκύτταρα επιτίθενται στο ΚΝΣ [4]. Η ανακάλυψη της φινγκολιμόδης (FTY720) ως το πρώτο δια του στόματος φάρμακο για τη θεραπεία ορισμένων μορφών της ΣκΠ, έστρεψε την προσοχή στα βιοδραστικά λυσοφωσφολιπίδια. Ως τρόπος δράσης του FTY720, αναφέρεται επίσης η μείωση της διαπερατότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και η παρεμπόδιση της μετανάστευσης, ενεργοποίησης των μακροφάγων και των αστροκυττάρων [4, 5]. Επιπροσθέτως, σαν αποτελέσματα της δράσης του FTY720 έχει αναφερθεί η αναστολή της ATX (ENPP2) *in vitro* και *in vivo* [6-9], όπως επίσης και η ικανότητα του να αναστέλλει την PLA2 *in vitro* [10, 11], υποδηλώνοντας πιθανή αλληλεπίδραση των μονοπατιών PLA2/LPC και ATX/LPA στην παθογένεια της ΠΑΕ και/ή σε άλλες παθοφυσιολογικές καταστάσεις του ΚΝΣ [12].

Όσον αφορά την συμμετοχή του άξονα ATX/LPA στην παθολογία της σκλήρυνσης κατά πλάκας, υπάρχουν λίγα αλλά ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Στο ΚΝΣ έχει βρεθεί υψηλή έκφραση της γ ισομορφής της ATX τόσο στους ανθρώπους όσο και σε πειραματόζωα [13-16]. Η έκφραση της ATX αυξάνεται κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των ολιγοδενδροκυττάρων [16-19], ενώ φαίνεται ότι εκφράζεται παροδικά σε ώριμα ολιγοδενδροκύτταρα [20]. Επιπλέον, έκφραση της ATX έχει βρεθεί στο χοριοειδές πλέγμα [16, 21], από όπου απελευθερώνεται στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) [22] και στις μήνιγγες. Σε ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας, έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα ATX και LPA στον ορό και το ENY [23-26] σε σύγκριση με άλλες διαταραχές του ΚΝΣ, παρόλα αυτά υπάρχουν και αντικρουόμενα αποτελέσματα [27]. Αντίθετα, στην ΠΑΕ, τα επίπεδα ATX mRNA βρέθηκαν μειωμένα κατά 25% στην εμφάνιση των κλινικών συμπτωμάτων [16]. Η ATX τέλος έχει συνδεθεί και με άλλες παθολογικές καταστάσεις του ΚΝΣ: αύξηση των επιπέδων της παρατηρείται στο νευροβλάστωμα και γλοιοβλάστωμα [18], ενώ μετά από εγκεφαλική βλάβη εκφράζεται από τα ενεργοποιημένα αστροκύτταρα [21]. Σχετικά με την σηματοδότηση του LPA, όλοι οι υποδοχείς του εκφράζονται στο ΚΝΣ [28, 29], με πλειοτροπικά αποτελέσματα στην ανάπτυξη, τη μετανάστευση και

τη σηματοδότηση. Τα ολιγοδενδροκύτταρα συγκεκριμένα, εκφράζουν τους υποδοχείς LPA1 [30-33] και LPA3 [33]. Η συμμετοχή του LPA στην επαναμυελίνωση αποδόθηκε στη σηματοδότηση μέσω υποδοχέα LPA1 [34]. Σε αντίθεση με τα παραπάνω δεδομένα, το LPA έχει επίσης συνδεθεί με απομυελίνωση με τη μεσολάβηση του υποδοχέα LPA1, μετά από νευρική βλάβη [35, 36]. Επιπλέον, πρόσφατα αποδείχθηκε ότι η σηματοδότηση LPA μέσω του υποδοχέα LPA1 συμμετέχει στην έναρξη του νευροπαθητικού πόνου [37, 38].

Τα παραπάνω δεδομένα συνεπάγονται συμμετοχή της ATX και της σηματοδότησης του LPA στις διαδικασίες απομυελίνωσης/επαναμυελίνωσης, εμπλέκοντας το μονοπάτι αυτό στην παθοφυσιολογία της ΣκΠ, χωρίς να είναι απόλυτα ξεκάθαρος ο ρόλος του. Στην εργασία αυτή, η έκφραση της ATX από τα μακροφάγα και μικρογλοιακά κύτταρα φαίνεται ότι διαδραματίζει πρωταρχικό ρόλο στην εξέλιξη της πειραματικής αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας.

3.2. Μεθοδολογία

Ποντίκια. Τα ποντίκια εκτρέφονται υπό ειδικές συνθήκες στις εγκαταστάσεις του Ερευνητικού Κέντρου Βιοϊατρικών Επιστημών "Αλέξανδρος Φλέμινγκ": θερμοκρασία 20-22°C, υγρασία 55±5% και κύκλο φωτός 12 ωρών.

Μοντέλο πειραματικής αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας. Η ΠΑΕ προκλήθηκε σε αρσενικούς ποντικούς C57BL/6 ηλικίας 10-12 εβδομάδων. Τα ποντίκια ανοσοποιήθηκαν με 100 µg γλυκοπρωτεΐνης ολιγοδενδροκυττάρων (MOG35–55, MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK, GeneCust) διαλυμένη σε ανοσοενισχυτικό Freund, μαζί με 1 mg αδρανοποιημένου *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (Difco Laboratories). Επιπλέον, έλαβαν δύο ενδοπεριτοναϊκές ενέσεις 100ng τοξίνης του κοκκύτη την στιγμή της ανοσοποίησης και 48 ώρες αργότερα. Τα ποντίκια ζυγίστηκαν και τα κλινικά συμπτώματα της ΠΑΕ καταγράφηκαν για όλη την διάρκεια του πειράματος. Τα κλινικά συμπτώματα της ΠΑΕ βαθμολογήθηκαν ως εξής:

0, κανένα σημάδι ασθένειας

1, αδυναμία ουράς

2, ατελής παράλυση 1 ή 2 οπίσθιων άκρων

3, παραπληγία (πλήρης παράλυση 1 ή 2 οπίσθιων άκρων)

4, παραπληγία με αδυναμία ή παράλυση του πρόσθιου άκρου

5, νεκρό ή ετοιμοθάνατο ζώο.

Την τελική ημέρα του πειράματος, συλλέχθηκαν αίμα και νωτιαίος μυελός.

Χρώση Luxol Fast Blue και αιματοξυλίνης/εωσίνης (HE). Τομές 7µm νωτιαίου μυελού βάφτηκαν με την χρώση Luxol fast blue για αναγνώριση των απομυελινωτικών περιοχών και με αιματοξυλίνη/εωσίνη για παρατήρηση της παθολογίας του ιστού [39].

Ανοσοϊστοχημεία. Τομές 7µm νωτιαίου μυελού κόπηκαν και τοποθετήθηκαν σε ειδικές γυάλινες αντικειμενοφόρες πλάκες (super frost). Οι τομές αφήνονται για 30 λεπτά σε επαφή με τον αέρα ώστε να στεγνώσουν και στη συνέχεια τοποθετούνται σε διάλυμα 4% παραφορμαλδεύδης (20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου). Για

ανίχνευση ενδοκυττάριου αντιγόνου ακολουθείται εμβάπτιση των πλακών σε 0.2% Triton-X για 5 λεπτά. Οι μη ειδικές θέσεις δέσμευσης του αντισώματος δεσμεύονται (διάλυμα Zytomed, 5 λεπτά) και στη συνέχεια ακολουθείται επώαση με το κατάλληλο πρωτογενές αντίσωμα, διαλυμένο σε 2% BSA στους 4°C για 16 ώρες. Οι πλάκες επωάζονται με το κατάλληλο δευτερογενές αντίσωμα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα πραγματοποιείται χρώση των πυρήνων με DAPI (Fluoroshield with DAPI histology mounting medium, Sigma). Όλες οι πλύσεις πραγματοποιούνται με PBS-Tween 0.05%. Τα ακόλουθα αντισώματα έχουν χρησιμοποιηθεί: rat anti-mouse CD68 (1:50, AbD Serotec), rat anti-mouse F4/80 (1:50, AbD Serotec), rat anti-mouse CD11b (BD Pharmingen, 1:50), mouse anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) clone G-A-5-Cy3 (sigma, 1:2000), rabbit anti-mouse ATX (1:500, Cayman), anti-rat Alexa488 (Abcam, 1:1000), anti-rabbit Alexa555 (Abcam, 1:1000). Τέλος, χρησιμοποιούνται όλοι οι κατάλληλοι ισότοποι: Rabbit IgG, Rat IgG για έλεγχο της ειδικότητας των αντισωμάτων.

Απεικόνιση ιστού. Οι εικόνες ιστολογίας αποτυπώθηκαν με μικροσκόπιο Nikon Eclipse E800 (Nikon Corp., Shinagawa-ku, Ιαπωνία) το οποίο διέθετε προσαρτημένη ψηφιακή φωτογραφική μηχανή Q Imaging EXI Aqua, χρησιμοποιώντας το λογισμικό Q-Capture Pro. Οι εικόνες ανοσοφθορισμού με μικροσκόπιο Zeiss Axiovert200 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany), ενώ οι εικόνες confocal χρησιμοποιώντας μικροσκόπιο Leica TCSSP5 σάρωσης με λέιζερ (Leica TCSSP5 laser-scanning confocal microscope). Το λογισμικό Leica LASAF και το Adobe Photoshop (για αντίθεση, φωτεινότητα και προσαρμογές χρωμάτων) χρησιμοποιήθηκαν για την επεξεργασία των εικόνων.

Κυτταρομετρία ροής. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων από το νωτιαίο μυελό ποντικών, περιγράφεται στην βιβλιογραφία [40]. Συνοπτικά, ο ιστός του νωτιαίου μυελού ομογενοποιήθηκε σε διάλυμα 1X HBSS παρουσία αναστολέα του Golgi (Golgi Plug, 1:1000, BD Biosciences, San Jose, CA) και διέρχεται μέσα από νάιλον φίλτρο 0.7μm για περαιτέρω διαχωρισμό. Τα μονοκύτταρα στη συνέχεια απομονώνονται από την ενδιάμεση στοιβάδα ενός ισοτονικού διαλύματος Percoll (30/70%, Sigma) σε

θερμοκρασία δωματίου. Τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 1X PBS με 1% FBS και τοποθετούνται σε ειδική πλάκα 96 θέσεων (U plate). Μετά από επώαση με Fc block (CD16/32-clone 93, BioLegend), επωάζονται με φθορίζοντα αντισώματα για τους παρακάτω επιφανειακούς υποδοχείς: Alexa700 anti-mouse CD45 (BioLegend), APC-Cy7 anti-mouse CD11b (BioLegend) and phycoerythrin (PE) anti-mouse F4/80 (BD Biosciences). Για την ανίχνευση της ATX, τα κύτταρα αρχικά επωάζονται για 10 λεπτά με κατάλληλο διάλυμα το οποίο διαρρηγνύει την μεμβράνη (Permeabilization wash buffer 10X, BioLegend), στη συνέχεια με το πρωτογενές αντίσωμα rabbit anti-mouse ATX (Cayman) και τέλος με το δευτερογενές αντίσωμα anti-rabbit σημασμένο με FITC. Το κατάλληλο ισότοπο (rabbit IgG) χρησιμοποιήθηκε για έλεγχο της ειδικότητας της ATX χρώσης. Το FACsCalibur μηχάνημα χρησιμοποιήθηκε για την λήψη των αποτελεσμάτων τα οποία στη συνέχεια αναλύθηκαν με το FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR).

Ανοσοαποτύπωση κατά Western. Μετά την απομάκρυνση του νωτιαίου μυελού από την σπονδυλική στήλη, τοποθετήθηκε στιγμιαία σε υγρό άζωτο και αποθηκεύτηκε στους -80°C. Στη συνέχεια, ο ιστός ομογενοποιήθηκε σε διάλυμα λύσης το οποίο περιείχε αναστολείς πρωτεασών (λευπεπτίνη, πεπστατίνη και φαινυλομεθανοσουλφονυλοφθορίδιο). Μετά από φυγοκέντρηση στα 17000g το υπερκείμενο (κυτταροπλασματικές και διαλυτές πρωτεΐνες) συλλέχθηκαν για ανάλυση με ανοσοαποτύπωμα Western. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών προσδιορίστηκε με την μέθοδο Bradford χρησιμοποιώντας πρότυπη καμπύλη BSA (0,125-2mg/ml, bovine serum albumin). Οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα 8% SDS-PAGE και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (GE Healthcare, Bucks, UK) με το σύστημα Trans-Blot SD Semi-Dry (Bio-Rad Laboratories, CA, USA). Οι μεμβράνες επωάζονται με το πρωτογενές αντίσωμα έναντι της ATX (monoclonal 4F1, 1:1000) σε 2.5% (wt/vol) γάλα στους 4°C για 16 ώρες. Μετά από τρεις πλύσεις με TBS-Tween 0.05% ακολουθεί επώαση με δευτερογενές αντίσωμα σημασμένο με HRP (anti-rat HRP-conjugated, 1:1000) για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Το σύμπλοκο αντιγόνου-αντισώματος ανιχνεύεται με λουμινόλη.

Μέθοδος ELISA. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ATX στο πλάσμα, τα δείγματα επωάζονται για 16 ώρες στους 40C, σε πιάτο 96 θέσεων. Τα δείγματα αραιώνονται 1:50 σε ρυθμιστικό διάλυμα (0,012M NaCO₃ and 0,028M NaHCO₃, pH 9.6). Για την πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιήθηκε autotaxin (ENPP2-8H, AGF06181012) (Ascent Gene, MD, USA) σε συγκεντρώσεις 3.125-100ng/ml. Μετά από επώαση με 1.5% BSA σε PBS-T, τα δείγματα επωάζονται με αντίσωμα έναντι της ATX (rabbit anti-mouse antibody 1:1000, 10005373, Cayman, Tallinn, Estonia) για 1 ώρα. Ακολουθεί επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα (α-rabbit HRP, 1:2000, 4010-05, Southern Biotech, AL, USA) και ανίχνευση με TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, A7888, Sigma, USA). Η αντίδραση σταματά με 2M H₂SO₄ και οι απορροφήσεις μετρώνται στα 450nm.

Απομόνωση RNA και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR). Το ολικό RNA απομονώθηκε από το νωτιαίο μυελό χρησιμοποιώντας Tri Reagent (Molecular Research Centre, OH, USA). Μετά από κατεργασία με DNase (RQ1 RNase-free DNase, Promega, Wis, USA), 3.5μg RNA μεταγράφονται με την M-MLV αντίστροφη μεταγραφάση (M1705, Promega, WI, USA). Η Real-time PCR πραγματοποιήθηκε σε μηχανήμα Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR (Bio-Rad Laboratories Ltd, CA, USA). Το γονίδιο αναφοράς που χρησιμοποιείται είναι η φωσφορυβοσυλοτρανσφεράση της υποξανθίνης-γουανίνης (HPRT).

Δραστικότητα ATX. Η δραστικότητα της ATX προσδιορίστηκε στα δείγματα πλάσματος με την δοκιμασία TOOS, όπως αναφέρεται στις παραγράφους 2.1 και 2.2 [41].

HPLC MS/MS. Η ανάλυση των λιπιδίων στο πλάσμα και στο νωτιαίο μυελό πραγματοποιήθηκε σε σύστημα RSLCnano system με φασματόμετρο μάζας LTQ Orbitrap XL mass [42].

Στατιστική ανάλυση. Η στατιστική επεξεργασία πραγματοποιήθηκε με τα: One-Way ANOVA ή Mann-Whitney Rank Sum Test ανάλογα την περίπτωση, με χρήση του λογισμικού Sigma Plot 11.0 (Systat Software, IL, USA). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή (±SEM). Το * δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά με p<0.05.

3.3.Αποτελέσματα-Συζήτηση

Αυξημένα επίπεδα ATX και LPA στην εξέλιξη της ΠΑΕ. Με σκοπό να διερευνηθεί η πιθανή εμπλοκή του άξονα ATX/LPA στην ανάπτυξη και εξέλιξη της ΣκΠ, εφαρμόσαμε το πειραματικό μοντέλο της αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας. Η πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, αναφερόμενη σύντομα ως ΠΑΕ) αποτελεί ένα πειραματικό μοντέλο εγκεφαλικής φλεγμονής και απομυελίνωσης, το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως στην μελέτη των ανθρώπινων απομυελινωτικών νόσων συμπεριλαμβανομένης της σκλήρυνσης κατά πλάκας (ΣκΠ). Ποντίκια C57Bl6/J (H-2b), ηλικίας 10-12 εβδομάδων και αρσενικού φύλου, ανοσοποιούνται με την πρωτεΐνη των ολιγοδενδροκυττάρων (MOG35-55) παρουσία ανοσοενισχυτικού. Ταυτόχρονα με την ανοσοποίηση και 48 ώρες αργότερα χορηγείται στα πειραματόζωα 100ng τοξίνης του κοκκύτη ώστε να σπάσει το φράγμα αίματος-εγκεφάλου και να επιτραπεί η πρόσβαση ανοσοκυττάρων στον ΚΝΣ. Τα ποντίκια παρακολουθούνται σε όλη την πειραματική διαδικασία, καταγράφεται το βάρος τους και αξιολογείται η κλινική εικόνα με βάση την κλίμακα βαθμολόγησης που περιγράφεται στην μεθοδολογία. Πλάσμα αίματος και νωτιαίος μυελός, ο ιστός του ΚΝΣ που προσβάλλεται κυρίως στο μοντέλο της ΠΑΕ [43], συλλέχθηκαν σε διαφορετικές χρονικές στιγμές: προ-συμπτωματικά (onset, d.7), στην κορυφή των συμπτωμάτων (peak, d.15) και στην ύφεση (remission, d.22) της ΠΑΕ (Εικόνα 1Α-Γ). Στα δείγματα νωτιαίου μυελού βρέθηκε αυξημένη έκφραση της ATX (α-ε) (χρησιμοποιώντας δυο διαφορετικά ζεύγη εκκινητών, Εικόνα 2) κατά την ανάπτυξη της ΠΑΕ. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα επίπεδα έκφρασης της ATX ήταν πολύ υψηλότερα στο στάδιο έναρξης και ύφεση της νόσου, σε αντίθεση με την φάση κορυφής των συμπτωμάτων. Μειωμένα επίπεδα έκφρασης της ATX έχουν αναφερθεί σε διαφορετικό (SWR / SJL F1s; H-2q, s) μοντέλο ΠΑΕ [16] καθώς και σε ορισμένες μελέτες με ασθενείς ΣκΠ. Παρόμοιο προφίλ έκφρασης βρέθηκε για την ισομορφή γ της ATX, η οποία εκφράζεται κυρίως στο ΚΝΣ [16, 44], υποδηλώνοντας ότι ένα μέρος των αυξημένων επιπέδων της ATX οφείλεται σε παραγωγή από κύτταρα του ΚΝΣ. Πέρα από το προφίλ έκφρασης της ATX στο νωτιαίο μυελό, που υποδεικνύει de novo σύνθεση από κύτταρα του ΚΝΣ και/ή φλεγμονώδη κύτταρα

κατά την διάρκεια της ΠΑΕ, τα επίπεδα της ATX πρωτεΐνης προσδιορίστηκαν με ανοσοαποτύπωμα Western (Εικόνα 2Α, Β), όπου διαπιστώθηκε παρόμοιο προφίλ έκφρασης με τα υψηλότερα επίπεδα να εμφανίζονται πριν και μετά την εμφάνιση των κλινικών συμπτωμάτων της ΠΑΕ. Όσον αφορά, τα ένζυμα που αποικοδομούν το εξωκυττάριο LPA [45], οι PLPPs, δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα στάδια της ασθένειας. Επιπλέον, μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των διαφορετικών υποδοχέων του LPA, όπου παρουσίασαν διακυμάνσεις, πιθανά λόγω επαγωγής διαφορετικών σηματοδοτικών μονοπατιών του LPA. Στα ενεργοποιημένα αστροκύτταρα, έχει βρεθεί αύξηση των LPA1-3 μετά από τραυματισμό εγκεφάλου ή νωτιαίου μυελού, ωστόσο, στις περισσότερες παθοφυσιολογικές καταστάσεις του ΚΝΣ κυρίαρχος υποδοχέας είναι ο LPA1 [46]. Επιπροσθέτως, χρώση ανοσοφθορισμού έναντι της ATX (με δυο διαφορετικά αντισώματα, Εικόνα 2 και Συμπληρωματική Εικόνα 1) σε τομές νωτιαίου μυελού επιβεβαίωσε τα αυξημένα επίπεδα της ATX στις αλλοιώσεις της λευκής ουσίας κατά την εξέλιξη της ΠΑΕ. Συγκεκριμένα, διπλή χρώση ανοσοφθορισμού αποκάλυψε ότι η ATX εκφράζεται από διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους που σχετίζονται με την παθογένεια της ΠΑΕ (Συμπληρωματικές Εικόνες 1 και 2). Σε φωτογραφίες από συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με laser (Συμπληρωματική εικόνα 2) η ATX εντοπίζεται στα ενεργοποιημένα αστροκύτταρα (GFAP+), στα μικρογλοιακά και φλεγμονώδη μακροφάγα (cd11b+, cd68+, F4/80+). Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της δραστηριότητας της ATX, με την μέθοδο προσδιορισμού ενζυμικής ενεργότητας ΤΟΟΣ, σε πλάσμα αίματος που συλλέχθηκε στις διαφορετικές χρονικές φάσεις της ασθένειας. Αυξημένα επίπεδα ATX βρέθηκαν στο πλάσμα των ΠΑΕ ποντικών, ωστόσο δεν είναι σαφές εάν τα αυξημένα επίπεδα πλάσματος συμβάλλουν σε αύξηση των επιπέδων της αυτοταξίνης στο νωτιαίο μυελό, δεδομένης της αυξημένης διαπερατότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (BBB) κατά τη διάρκεια της ΠΑΕ ή αντιστρόφως. Με σκοπό να συσχετίσουμε τα επίπεδα ATX, με το ενζυμικό της υπόστρωμα και προϊόν, πραγματοποιήσαμε λιπιδομική ανάλυση με HPLC/MS/MS σε νωτιαίο μυελό και πλάσμα ποντικών με ΠΑΕ και φυσιολογικά. Τα αυξημένα επίπεδα ATX στο νωτιαίο μυελό και το πλάσμα οδήγησαν σε ανάλογη αύξηση των συνολικών επιπέδων LPA, ενώ δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα του LPC (Εικόνα 3). Με βάση τα παραπάνω, η ανάπτυξη της ΠΑΕ

συνοδεύεται από απορρύθμιση του βασικού ενζύμου της ομοιόστασης των λυσοφωσφολιπιδίων, της ATX, με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων του LPA, το οποίο έχει συνδεθεί με απομυελίνωση των κεντρικών νευρώνων [47].

Τα επίπεδα κυκλοφορίας της ATX και του LPA δεν επηρεάζουν την παθογένεια της ΠΑΕ. Το 40% της ATX της κυκλοφορίας πιστεύεται ότι προέρχεται από το λιπώδη ιστό [48], ο οποίος εκκρίνει διάφορες κυτοκίνες και ορμόνες με σημαντικές επιδράσεις σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένου του νευροεκφυλισμού [49]. Επομένως και δεδομένης της αυξημένης διαπερατότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού στην ΠΑΕ, καθώς και των προαναφερθέντων επιδράσεων του LPA στα ενδοθηλιακά κύτταρα του εγκεφάλου [50-52], εξετάσαμε αν οι διακυμάνσεις στα επίπεδα κυκλοφορίας των ATX/LPA θα μπορούσαν να επηρεάσουν την παθογένεια της ΠΑΕ. Το μοντέλο της ΠΑΕ προκλήθηκε σε ετερόζυγα ποντίκια για την ATX (Enpp2+/-, 50% των φυσιολογικών επιπέδων ATX/LPA στον ορό) [53], καθώς και σε ομόζυγα διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν ATX στο ήπαρ (TgEnpp2+/+), υπό τον υποκινητή του αναστολέα της α1- αντιθρυψίνης (a1t1) (200% των φυσιολογικών επιπέδων ATX/LPA στον ορό) [54]. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των Enpp2+/- ή TgEnpp2+/+ ποντικών και των αντίστοιχων ομάδων ελέγχου, στην εξέλιξη της ΠΑΕ ή στην βαρύτητα των κλινικών συμπτωμάτων (Εικόνα 4), γεγονός που υποδηλώνει ότι οι συστημικές διακυμάνσεις, (50-200% στα επίπεδα ορού της ATX και LPA) δεν έχουν επίδραση στην ΠΑΕ και υπογραμμίζει τη σημασία της τοπικής ή φλεγμονώδους έκφρασης της ATX. Ωστόσο, σε διαφορετικό ετερόζυγο για την ATX ποντίκι [55], αναφέρθηκε μερική εξασθένιση του νευροπαθητικού πόνου [56].

Η έκφραση της ATX από τα αστροκύτταρα είναι απαραίτητη για την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Τα αστροκύτταρα είναι τα πιο άφθονα γλοιακά κύτταρα, υπεύθυνα για τη φυσική και μεταβολική υποστήριξη άλλων νευρικών κυττάρων. Συμμετέχουν στη ρύθμιση των ανοσολογικών αποκρίσεων στο ΚΝΣ και στην επούλωση των ιστών μετά από τραυματισμό [57]. Επιπλέον, τα αστροκύτταρα αναγνωρίζονται όλο και περισσότερο ως ενεργοί παίκτες στη μυελίνωση και την παθογένεια των MS [58, 59]. Χρώση ανοσοφθορισμού σε δείγματα νωτιαίου μυελού με ΠΑΕ, η ATX εντοπίζεται στα ενεργοποιημένα αστροκύτταρα (GFAP+) (Συμπληρωματική Εικόνα 1 και 2), αντίστοιχη αύξηση έχει βρεθεί στα ενεργοποιημένα αστροκύτταρα στο

νευροτραύμα [60]. Επομένως, με στόχο να διερευνηθεί ο πιθανός ρόλος της ATX που παράγεται από τα αστροκύτταρα στα πλαίσια της ΠΑΕ παθογένειας, πραγματοποιήθηκε γενετική απαλοιφή της ATX από αυτό τον πληθυσμό. Συγκεκριμένα, διασταυρώθηκε το υπό όρους knockout ποντίκι της ATX (Enpp2fl/fl)[53] με ένα διαγονιδιακό ποντίκι που εκφράζει την Cre ρεκομπινάση υπό τον έλεγχο του GFAP υποκινητή (TgGFAP-Cre)[61]. Ωστόσο, η γενετική απαλοιφή της ATX από τα αστροκύτταρα (GFAP+) οδήγησε σε εμβρυϊκή θνησιμότητα. Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται όλες οι διασταυρώσεις που πραγματοποιήθηκαν και η αναλογία απογόνων που προέκυψαν. Το αποτέλεσμα δεν επηρεάστηκε από την φύση του Cre ομολόγου, μητρικό ή πατρικό, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι οι δυσμορφίες που παρατηρούνται στα έμβρυα με αποτέλεσμα τον θάνατο τους, οφείλονται σε έλλειψη της ATX από τα αστροκύτταρα. Αξίζει να σημειωθεί, ότι στα λιγοστά hGFAPCre+/-Enpp2fl/fl ποντίκια που γεννήθηκαν ελέγχθηκε ο ανασυνδυασμός του γονιδίου της Enpp2, όπου διαπιστώθηκε πως είχε γίνει ατελώς. Με βάση τα παραπάνω, η έκφραση της ATX από τα αστροκύτταρα είναι απαραίτητη για την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Ο ρόλος της ATX είναι ήδη γνωστός στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, η έλλειψη της έχει συσχετιστεί με ανωμαλίες του νευρικού σωλήνα [53], η σχεδίαση του οποίου συνδέεται στενά με τις προδιαγραφές και τις λειτουργίες των αστροκυττάρων [57]. Πέραν του ρόλου της ATX στα αναπτυξιακά στάδια, στην ΠΑΕ εκφράζεται από τα ενεργοποιημένα αστροκύτταρα με πιθανό ρόλο στην παθογένεια της νόσου, ο οποίος πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω με μελλοντικές μελέτες επαγωγίμης γενετικής διαγραφής σε ενήλικους ποντικούς.

Η ATX από τα μικρογλοιακά/μακροφάγα κύτταρα ενισχύει τον ΠΑΕ φαινότυπο.

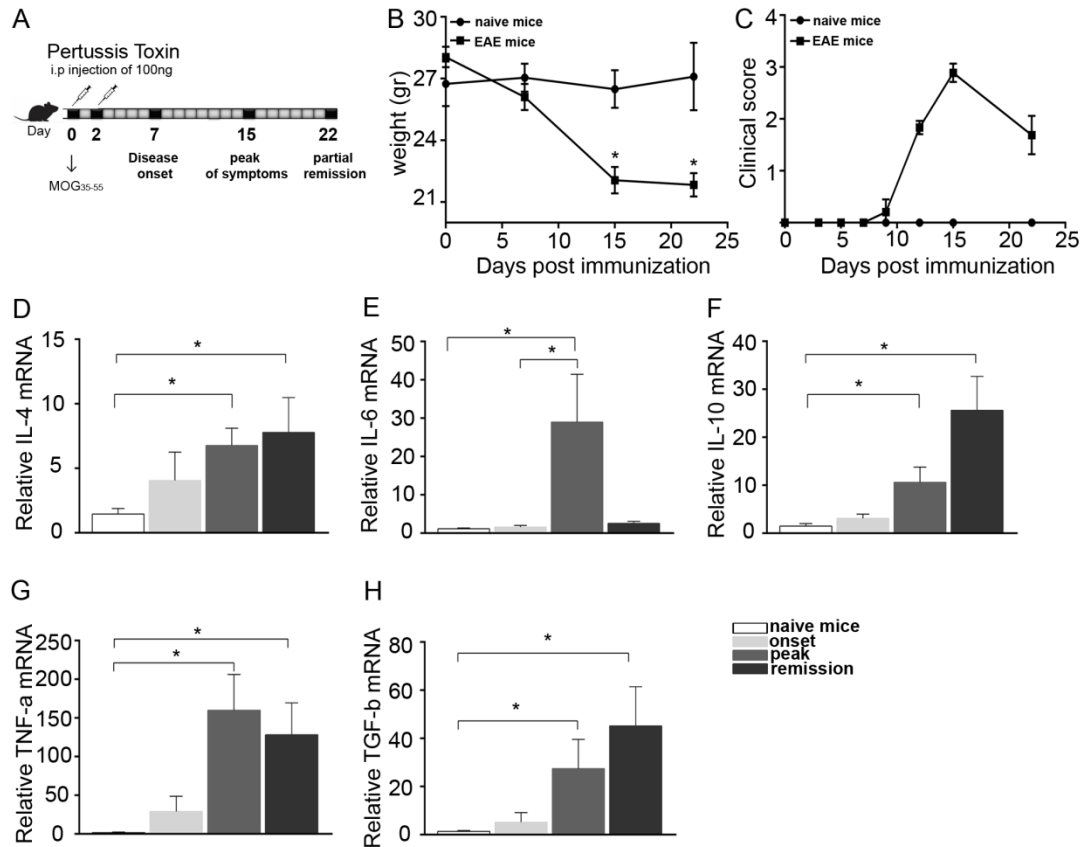
Τα μικρογλοιακά και τα φλεγμονώδη μακροφάγα αποτελούν βασικούς κυτταρικούς πληθυσμούς που εμπλέκονται στην παθογένεια της ΣκΠ [62, 63], με διακριτούς και αντίθετους ρόλους [62]. Στο ΚΝΣ, αυξημένη έκφραση της ATX εντοπίζεται σε ειδικούς τύπους μακροφάγων (perivascular, σε μήνιγγες και χοριοειδές πλέγμα) [62]. Επιπλέον, στο πειραματικό μοντέλο του νευροπαθητικού πόνου, τα ενεργοποιημένα μικρογλοιακά κύτταρα συμμετέχουν στην παραγωγή LPA[64]. Όσον αφορά την ΠΑΕ, από τις χρώσεις ανοσοφθορισμού διαπιστώθηκε ότι η ATX εκφράζεται από τα μικρογλοιακά κύτταρα και τα μακροφάγα που διηθούν τον ιστό (cd11b+, cd68+, F4/80+). Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής, επιβεβαίωσε ότι η ATX

εκφράζεται τόσο από τα μικρογλοιακά κύτταρα (CD45^{low}CD11b⁺), όσο και από τα μακροφάγα που εισέρχονται από την κυκλοφορία στο ΚΝΣ (CD45^{hi}CD11b⁺). Με σκοπό να διερευνήσουμε περαιτέρω την συνεισφορά της ATX από τα μικρογλοιακά/μακροφάγα κύτταρα στην παθογένεια της ΠΑΕ, έγινε γενετική απαλοιφή της ATX από αυτό τον κυτταρικό πληθυσμό διασταυρώνοντας το υπό όρους knockout ποντίκι της ATX (Enpp2^{n/n}) [53] με το διαγονιδιακό ποντίκι που εκφράζει την Cre ρεκομπινάση υπό τον έλεγχο του CD11b υποκινητή (TgCD11b-Cre) [65]. Σε αντίθεση με τα ποντίκια που είχαν έλλειψη της ATX από τα αστροκύτταρα, τα CD11bcre⁺/Enpp2^{-/-} γεννήθηκαν στις αναμενόμενες μεντελικές αναλογίες και χωρίς να παρατηρηθεί μη φυσιολογική ανάπτυξη, ούτε επίσης κάποια παθολογική μορφολογία του ΚΝΣ. Ο έλεγχος ανασυνδυασμού με PCR ανάλυση για το γονίδιο της Enpp2 επιβεβαίωσε την απαλοιφή της ATX από τον συγκεκριμένο κυτταρικό πληθυσμό, όπως επίσης και η χρώση ανοσοφθορισμού σε τομές νωτιαίου μυελού. Επιπλέον, μέτρηση των επιπέδων της ATX πρωτεΐνης στο πλάσμα και στο νωτιαίο μυελό, αποδεικνύουν μεγάλη συμμετοχή αυτού του κυτταρικού πληθυσμού στα συνολικά επίπεδα έκφρασης της ATX. Όσον αφορά, την εξέλιξη της ΠΑΕ, τα CD11bcre⁺/Enpp2^{-/-} ποντίκια παρουσίασαν την ίδια επίπτωση στην νόσο με την ομάδα ελέγχου. Παρόλα αυτά, τα κλινικά συμπτώματα της νόσου μειώθηκαν στα ποντίκια με έλλειψη της ATX από τα μικρογλοιακά/μακροφάγα, τα οποία παρουσιάζουν ταχύτερη ανάρρωση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η ιστολογική εξέταση των νωτιαίων μυελών έδειξε ότι η γενετική απουσία της ATX από μικρογλοιακά/μακροφάγα είχε ως αποτέλεσμα μειωμένη φλεγμονή, όπως ανιχνεύθηκε με χρώση H/E, μειωμένη απομυελίνωση, όπως ανιχνεύθηκε με χρώση Luxol, καθώς και σημαντικά λιγότερα ενεργοποιημένα αστροκύτταρα (GFAP⁺), χαρακτηριστικό της ΠΑΕ παθολογίας (Εικόνα 7, Συμπληρωματική εικόνα 3). Επομένως, η έκφραση της ATX από μακροφάγα και μικρογλοιακά κύτταρα ενισχύει την ανάπτυξη της αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας.

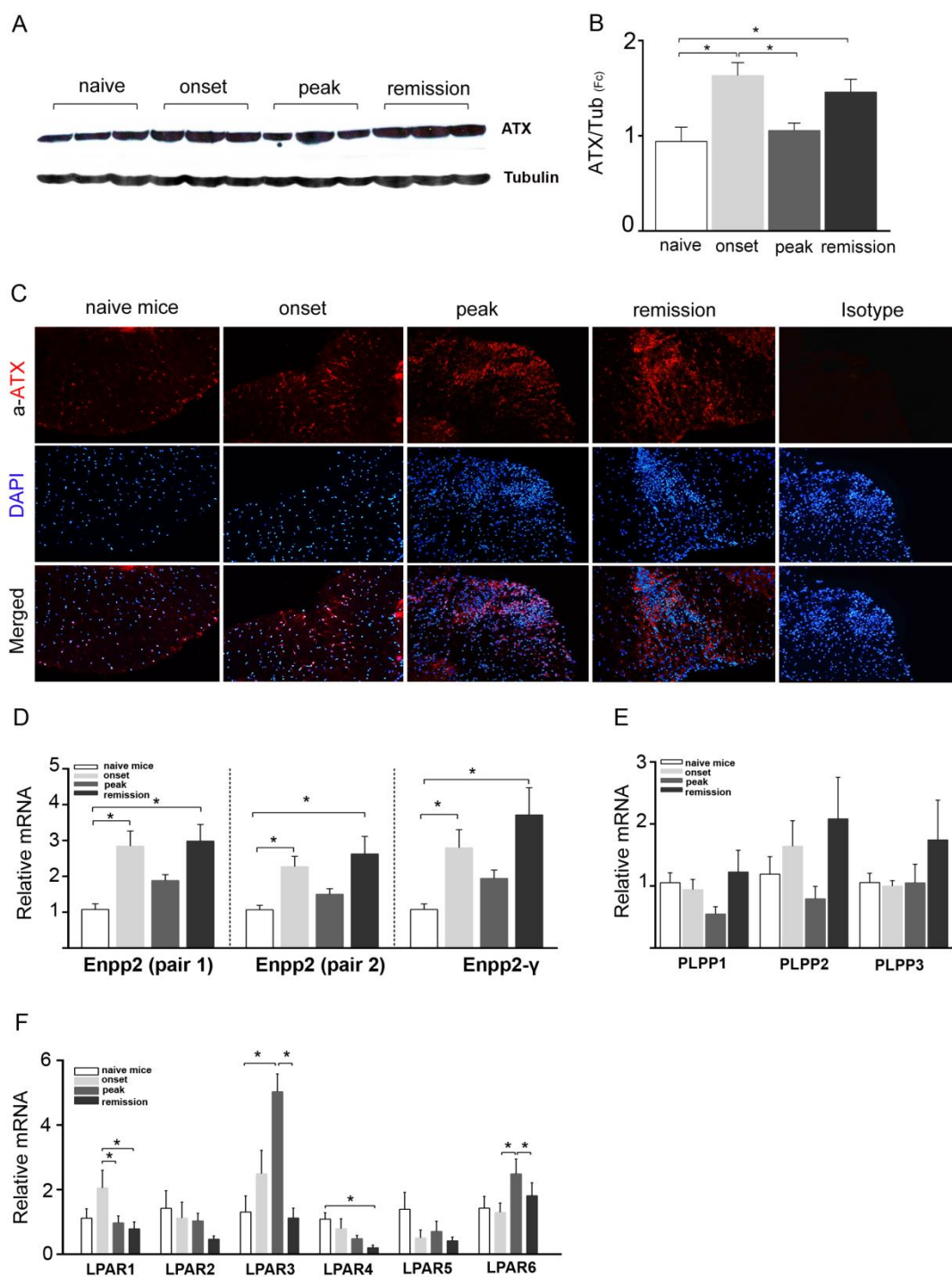
Συμπεράσματα

Στην παρούσα μελέτη, διερευνάται η εμπλοκή της ATX στην παθοφυσιολογία της ΠΑΕ. Η ανάπτυξη της ΠΑΕ συνοδεύεται από απορρύθμιση της ATX, η οποία αποτελεί το βασικό ένζυμο που ρυθμίζει την ομοιόσταση των λυσοφωσfolιπιδίων

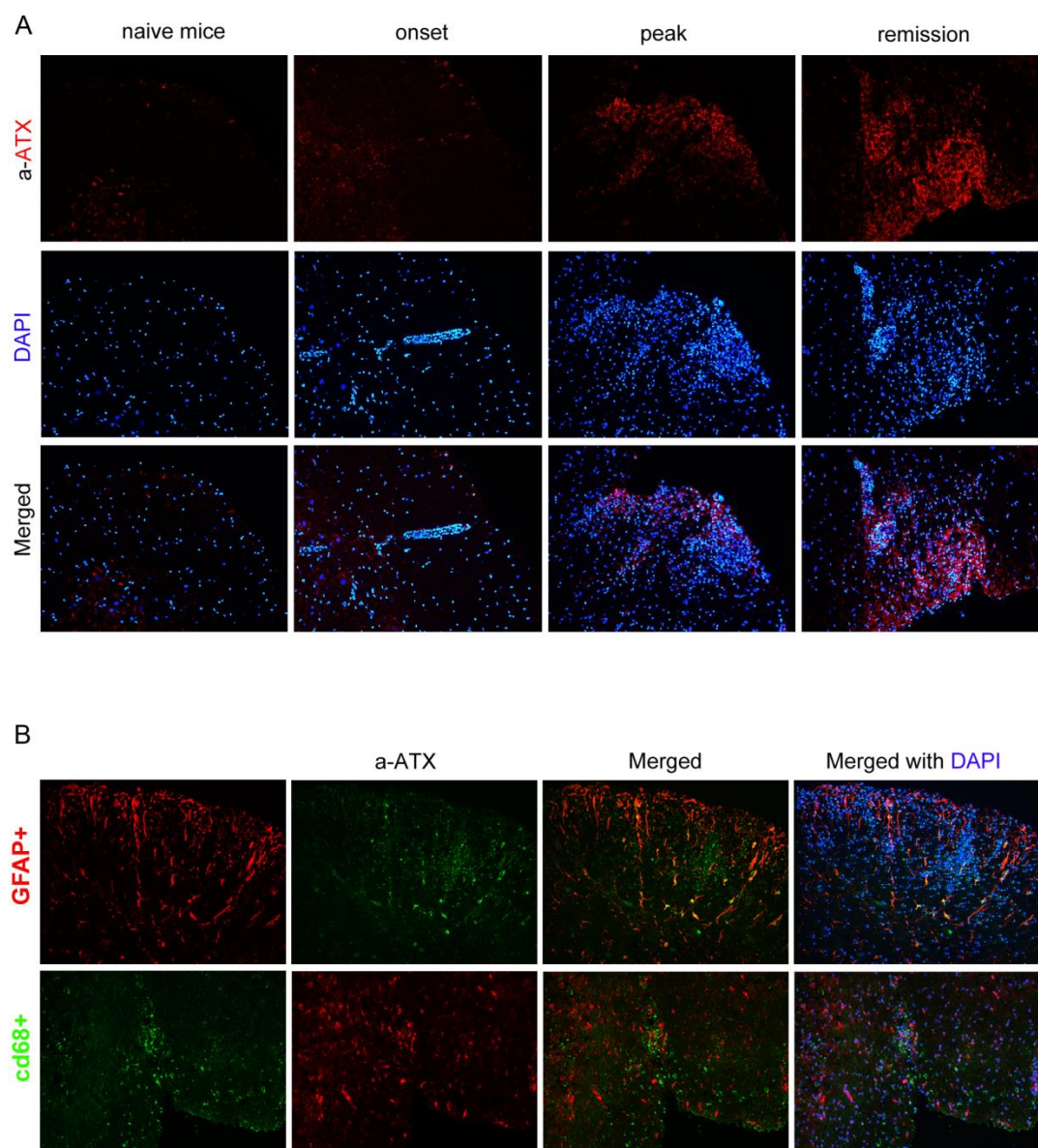
και συνεπάγεται μεταβολή των επιπέδων του LPA. Επιπλέον, υπογραμμίζεται η σημασία της τοπικής ή φλεγμονώδους παραγωγής της ATX στην εξέλιξη των κλινικών συμπτωμάτων της ΠΑΕ. Συγκεκριμένα, η ATX που εκφράζεται από τα μικρογλοικά/μακροφάγα κύτταρα φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της ΠΑΕ, πιθανά μέσω της παραγωγής του LPA και της ενεργοποίησης των αστροκυττάρων. Τέλος, ο ήδη γνωστός ρόλος της ATX στην εμβρυϊκή ανάπτυξη συνδέεται με την λειτουργία των αστροκυττάρων στον σχηματισμό των νευρικών σωλήνων.



Εικόνα 1: Πειραματικό μοντέλο της αυτοάνοσης πειραματικής εγκεφαλο-μυελίτιδας. (Α) Σχηματική αναπαράσταση του πρωτοκόλλου που ακολουθήθηκε, C57Bl/6 ποντίκια τα ανοσοποιήθηκαν με MOG₃₅₋₅₅ και θανατώθηκαν σε διαφορετικές χρονικές στιγμές κατά τη διάρκεια της ασθένειας. d.0, ομάδα ελέγχου (naïve mice), d.7: ανοσοποιημένα ποντίκια πριν από την παρουσίαση των κλινικών συμπτωμάτων της ΠΑΕ (onset), d.15: ποντίκια στην αιχμή της κλινικής εκδήλωσης συμπτωμάτων (peak) και d.22: ποντίκια κατά τη διάρκεια της ύφεσης των συμπτωμάτων (remission) Μέσος όρος της κλινικής βαθμολόγησης των συμπτωμάτων της EAE σε C57Bl6 αρσενικά ποντίκια κατά τη διάρκεια της ασθένειας. **(Β)** Καμπύλη βάρους σώματος και **(C)** κλινική βαθμολόγηση της ΠΑΕ, **(D-H)** Real time PCR ανάλυση των κυτοκινών που εμπλέκονται στον μηχανισμό παθογένειας της ΠΑΕ.



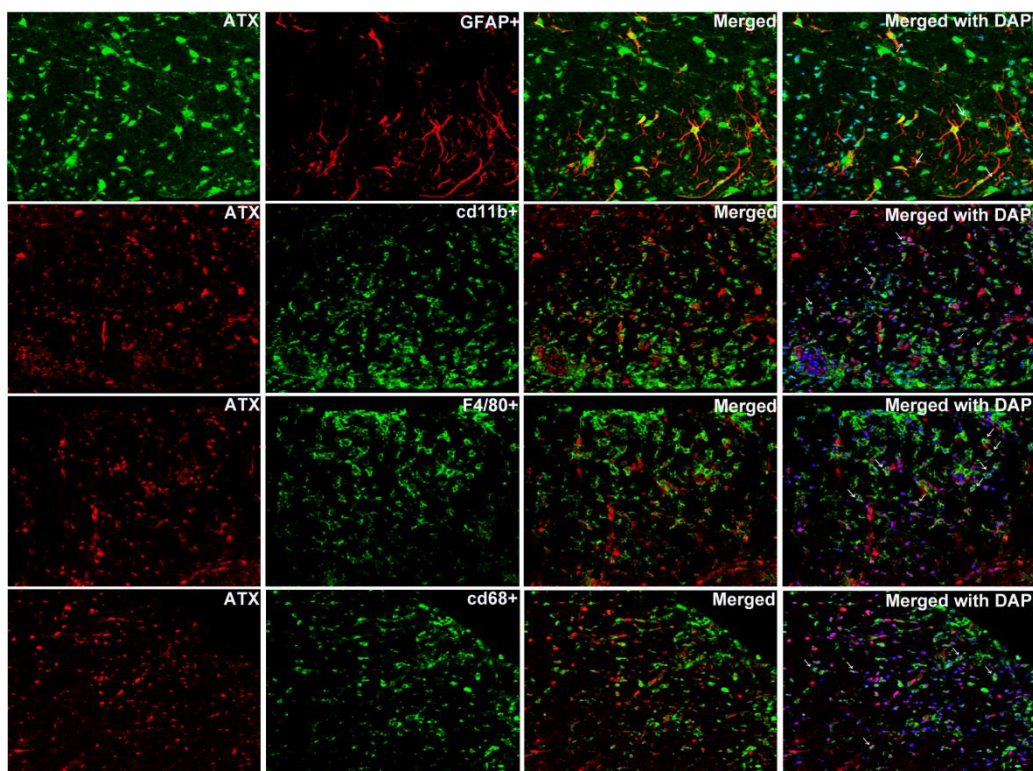
Εικόνα 2: Τα επίπεδα της ATX μεταβάλλονται κατά την εξέλιξη της ΠΑΕ. (Α) Ανοσοαποτύπωμα Western σε ομογενοποίημα νωτιαίου μυελού από φυσιολογικά (naïve) ποντίκια και με ΠΑΕ τα οποία έχουν θυσιαστεί σε τρεις διαφορετικές φάσεις της εξέλιξης του μοντέλου. **(Β)** Ανάλυση του προτύπου έκφρασης της ATX με βάση το γονίδιο αναφοράς της τουμπουλίνης (tubulin). **(C)** Ανοσοφθορισμός με ειδικό αντίσωμα έναντι της ATX (Cayman) και ειδική χρώση που βάφει τους πυρήνες μπλε (DAPI). **(D-F)** Real time PCR ανάλυση έκφρασης των γονιδίων Enpp2, Enpp2-γ, PLLPs και των υποδοχέων του LPA.



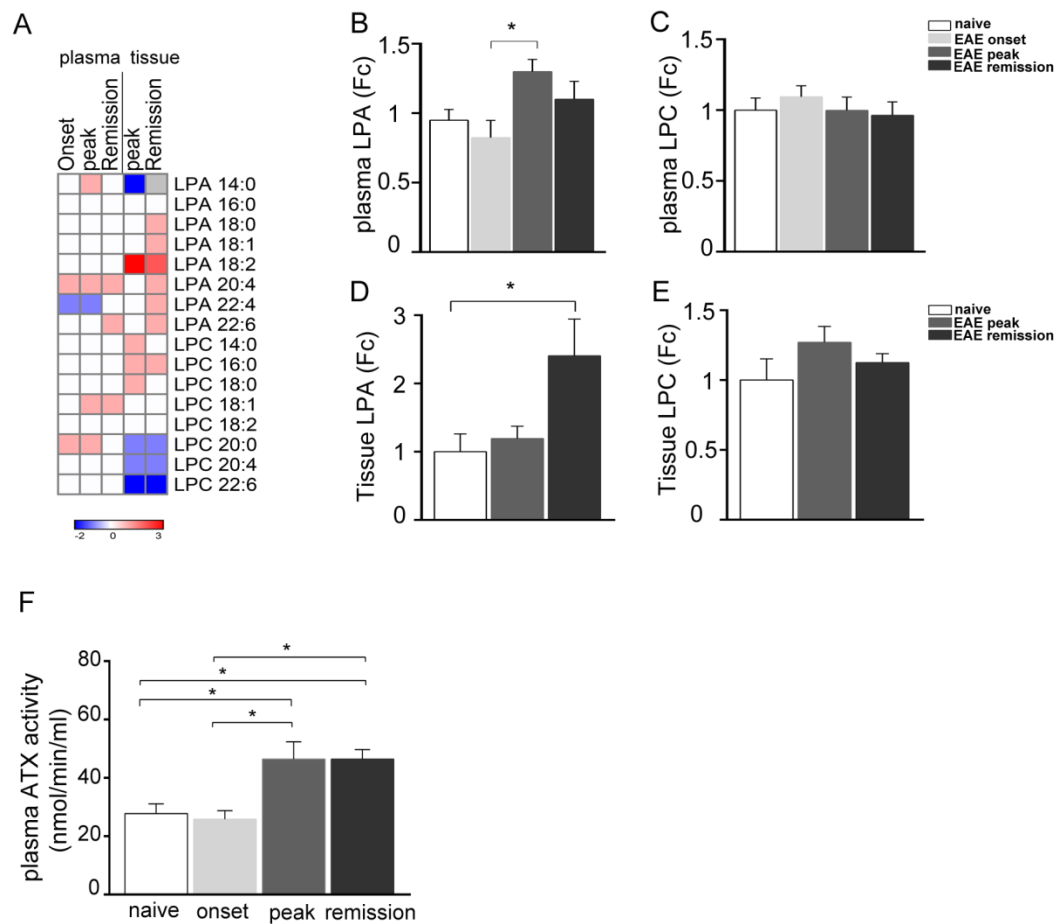
Συμπληρωματική εικόνα 1: Η έκφραση της ATX στις ΠΑΕ αλλοιώσεις.

(Α) Ανοσοφθορισμός με ειδικό αντίσωμα έναντι της ATX (Sigma) και ειδική χρώση που βάφει τους πυρήνες μπλε (DAPI). **(Β)** Διπλή χρώση ανοσοφθορισμού την χρονική στιγμή της εκδήλωσης των συμπτωμάτων (peak) με αντίσωμα ειδικό για την ATX (Cayman) και για τους πληθυσμούς αστροκυττάρων (GFAP+) και μικρογλοιακών/μακροφάγων (cd68+).

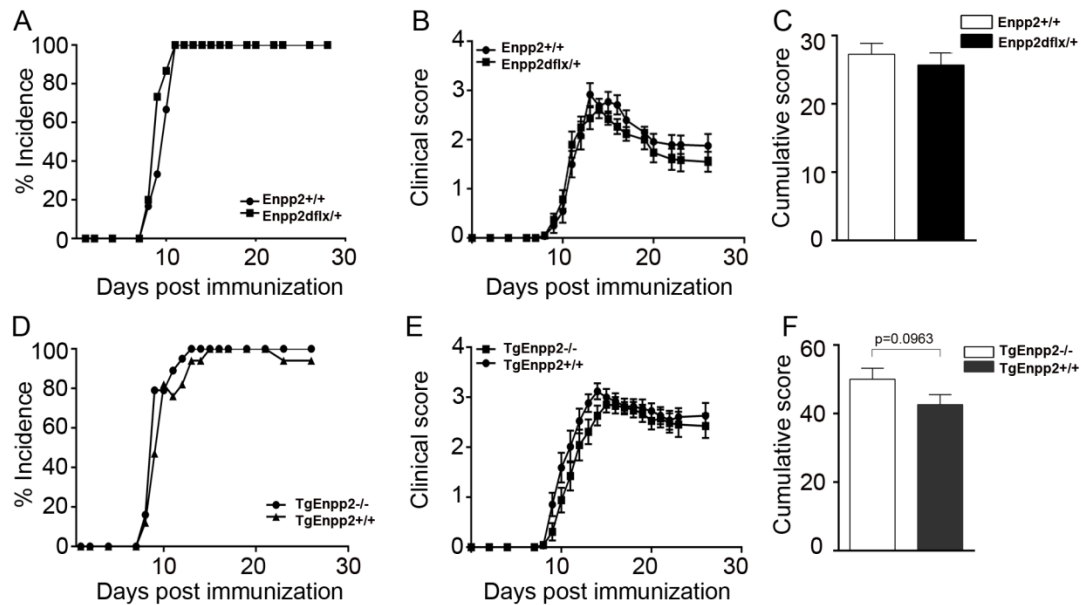
A



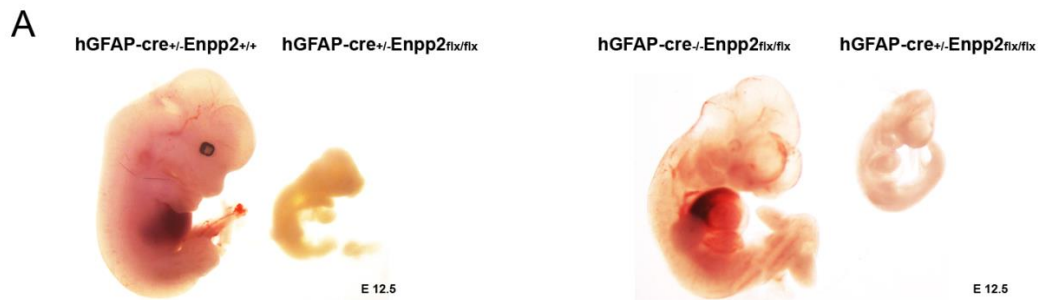
Συμπληρωματική εικόνα 2: Η έκφραση της ATX στις ΠΑΕ αλλοιώσεις από τα αστροκύτταρα και τα μικρογλοιακά/μακροφάγα. (A) Διπλή χρώση ανοσοφθορισμού την χρονική στιγμή εκδήλωσης των μέγιστων κλινικών συμπτωμάτων (peak) με αντίσωμα ειδικό για την ATX (Cayman) και για τους πληθυσμούς αστροκυττάρων (GFAP+) και μικρογλοιακών/μακροφάγων (cd11b⁺/ F4/80+/cd68⁺). Οι φωτογραφίες είναι από μικροσκόπιο Leica TCSSP5 σάρωσης με λέιζερ (Leica TCSSP5 laser-scanning confocal microscope) για μεγαλύτερη ευκρίνεια.



Εικόνα 3: Προσδιορισμός λυσοφωσfolιπιδίων στο πλάσμα και στο νωτιαίο μυελό ποντικών με ΠΑΕ. (Α) Heat map των LPA και LPC ειδών που μετρήθηκαν, στις διαφορετικές φάσεις της ΠΑΕ. **(Β-Ε)** Τα συνολικά επίπεδα των LPA και LPC σε πλάσμα και νωτιαίο μυελό φυσιολογικών και ΠΑΕ ποντικών. **(F)** Προσδιορισμός δραστηρότητας της ATX στο πλάσμα φυσιολογικών και ΠΑΕ ποντικών, με την μέθοδο TOOS.



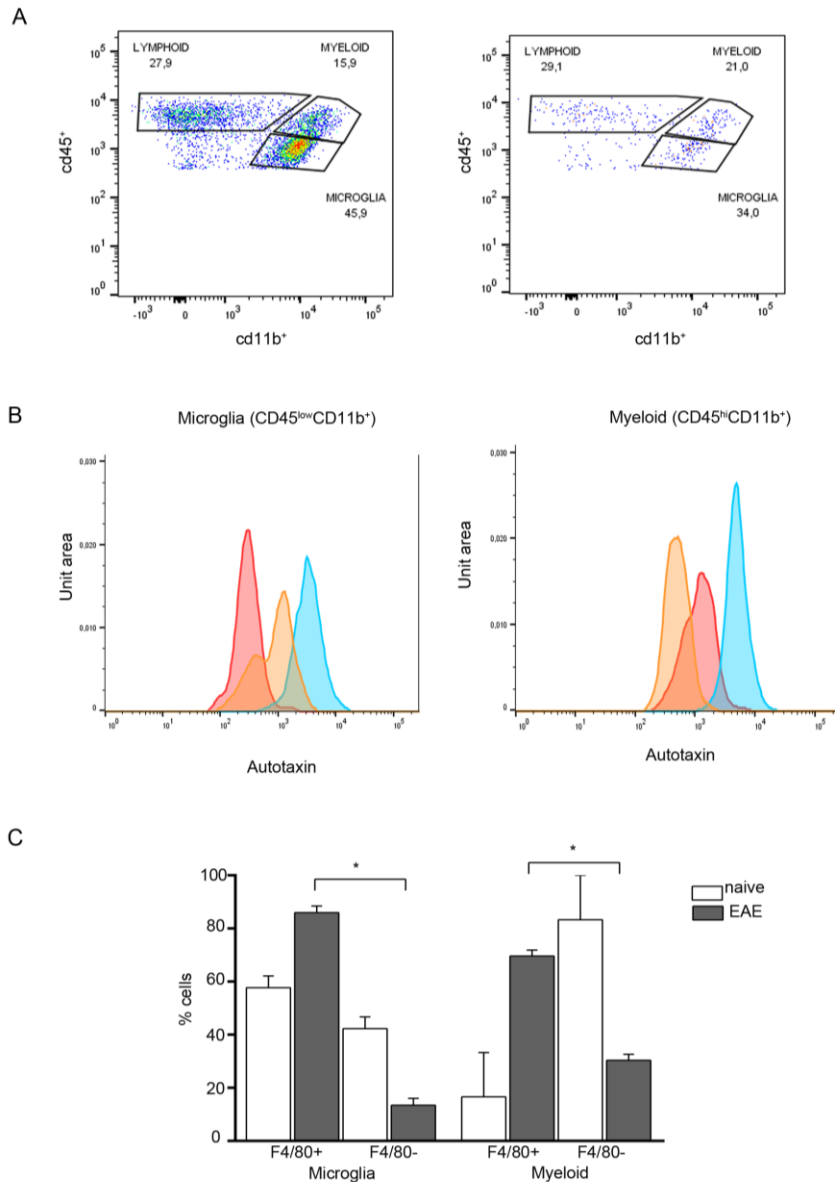
Εικόνα 4: Τα επίπεδα κυκλοφορίας της ATX και του LPA δεν επηρεάζουν την εξέλιξη της ΠΑΕ. (A-D) Ποσοστά επίπτωσης της νόσου σε Enpp2^{dflx/+}, διαγονιδιακά TgEnpp2^{+/+} και των αντίστοιχων ομάδων ελέγχου. **(B-E)** Η κλινική εικόνα της ΠΑΕ στα Enpp2^{dflx/+}, διαγονιδιακά TgEnpp2^{+/+} και των αντίστοιχων ομάδων ελέγχου. **(C-F)** Ο συνολικός βαθμός της ΠΑΕ, που προκύπτει από την κλινική βαθμολόγηση σε όλη την διάρκεια του πειράματος



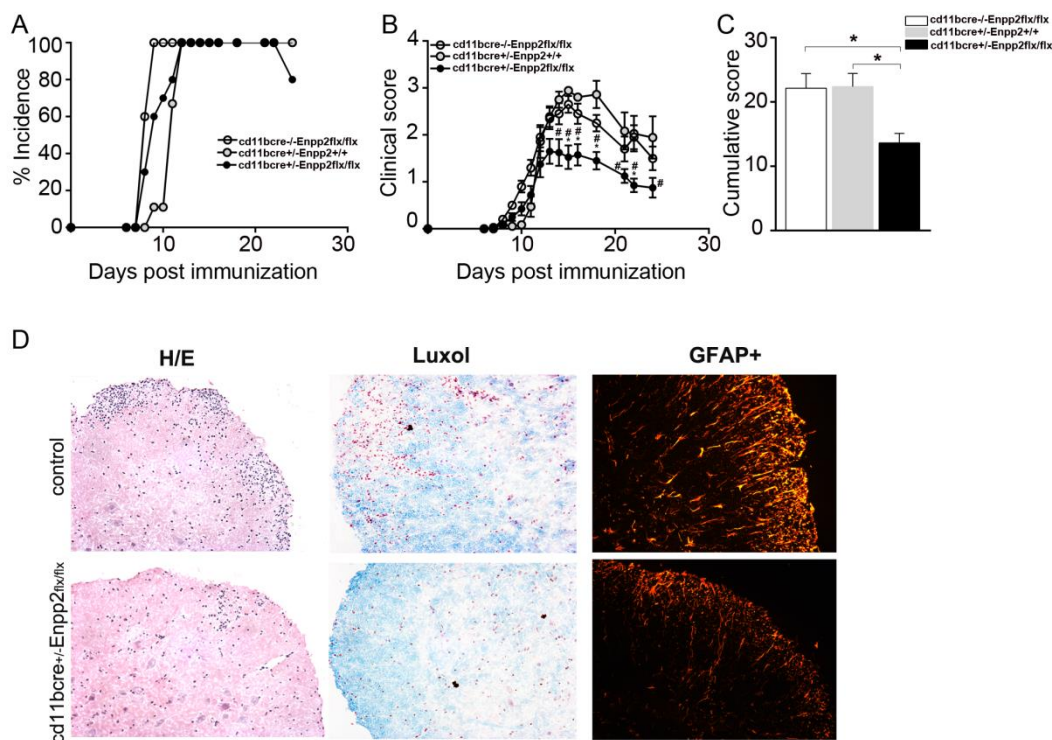
Εικόνα 5: Η έκφραση της ATX από τα αστροκύτταρα είναι απαραίτητη για την εμβρυϊκή ανάπτυξη. (A) Στερεοσκοπική φωτογραφία φυσιολογικών εμβρύων και εμβρύων στα οποία έχει γίνει απαλοιφή της ATX από τα αστροκύτταρα τις ημέρες 10.5 και 12.5

Πίνακας 1: Οι διασταυρώσεις που πραγματοποιήθηκαν με το υπό όρους knock-out ποντίκι της ATX ($Enpp2^{fl/fl}$) και το διαγονιδιακό ποντίκι που εκφράζει τη Cre ρεκομπινάση υπό τον έλεγχο του GFAP υποκινητή (TgGFAP-Cre), οι αναμενόμενες και προκύπτουσες αναλογίες απογόνων.

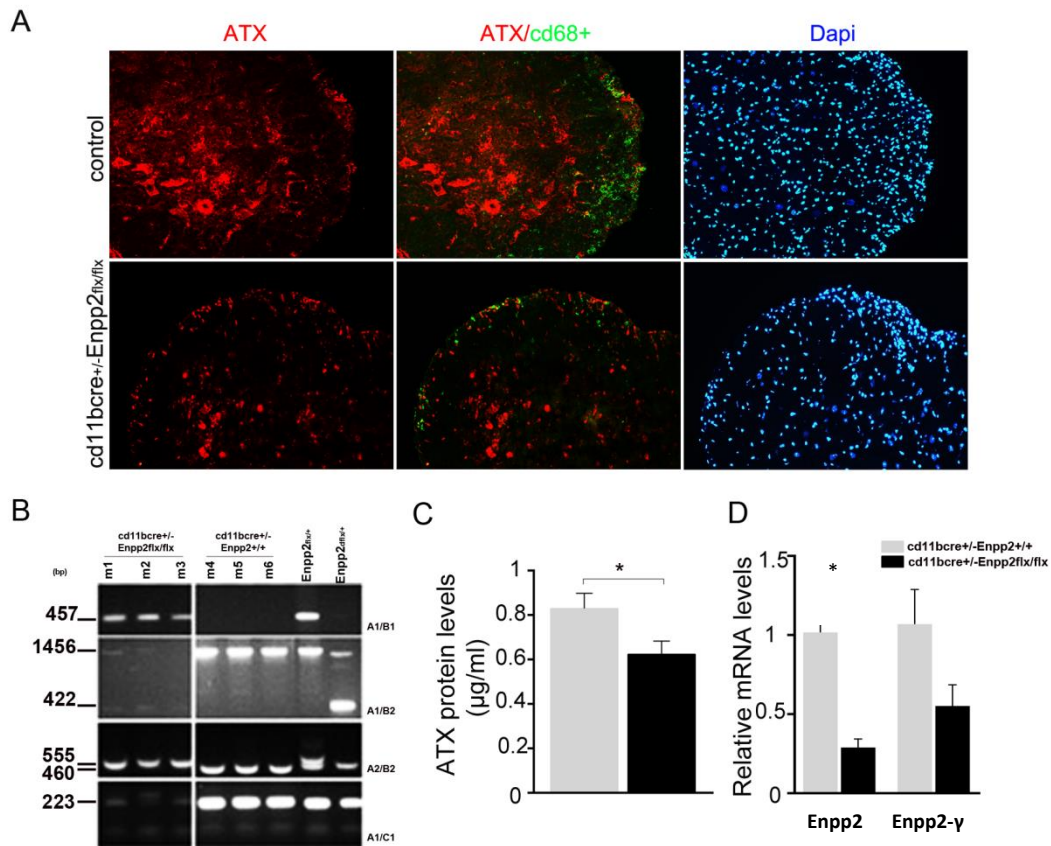
	♀ hGFAP-cre ^{+/+} Enpp2 ^{flx/+} hGFAP-cre ^{-/-} Enpp2 ^{flx/flx}					♀ hGFAP-cre ^{-/-} Enpp2 ^{flx/+} hGFAP-Cre ^{+/+} Enpp2 ^{flx/+}				
	♂ hGFAP-cre ^{-/-} Enpp2 ^{flx/flx} hGFAP-cre ^{+/+} Enpp2 ^{flx/+}					♂ hGFAP-cre ^{+/+} Enpp2 ^{flx/+} hGFAP-Cre ^{-/-} Enpp2 ^{flx/+}				
	Expected	#	%	#	%	Expected	#	%	#	%
hGFAP-cre ^{+/+} Enpp2 ^{flx/flx}	25%	10	14.9	1	1.8	12.5%	0	0	0	0
hGFAP-cre ^{+/+} Enpp2 ^{flx/+}	25%	46	68.6	26	47.3	25%	22	31.4	12	23.5
hGFAP-cre ^{+/+} Enpp2 ^{+/+}	0%	0	0	0	0	12.5%	12	17.1	18	35.3
hGFAP-cre ^{-/-} Enpp2 ^{flx/flx}	25%	12	17.9	22	40	12.5%	13	18.6	10	19.6
hGFAP-cre ^{-/-} Enpp2 ^{flx/+}	25%	0	0	6	10.1	25%	19	27.1	1	0.19
hGFAP-cre ^{-/-} Enpp2 ^{+/+}	0%	0	0	0	0	12.5%	4	5.7	10	19.6
Total		68		55			70		51	



Εικόνα 6: Η ATX εκφράζεται από τα μικρογλοιακά και μακροφάγα κύτταρα. (A) Αντιπροσωπευτική εικόνα από ανάλυση κυτταρομετρίας ροής νωτιαίου μυελού από ποντίκια με ΠΑΕ και φυσιολογικά, τα οποία διαχωρίστηκαν με βάση την έκφραση τους σε CD45 και CD11b; a= λεμφοειδή κύτταρα ($CD45^{+}CD11b^{-}$), b=μικρογλοιακά κύτταρα ($CD45^{low}CD11b^{+}$); c=μυελοειδή κύτταρα ($CD45^{hi}CD11b^{+}$). **(B)** Αντιπροσωπευτικό προφίλ έκφραση της ATX σε μικρογλοιακά και μυελοειδή κύτταρα (μπλε=EAE, πορτοκαλί = φυσιολογικά/naïve, red=isotype). **(C)** Ποσοστά των ATX⁺ κυττάρων(n=3-4/ομάδα).



Εικόνα 7: Η έκφραση της ATX από τα μικρογλοιακά/μακροφάγα κύτταρα ενισχύει τον ΠΑΕ φαινότυπο. **(Α)** Ποσοστά επίπτωσης της νόσου σε $cd11bcre+Enpp2flx/flx$, ποντίκια και των αντίστοιχων ομάδων ελέγχου. **(Β)** Η κλινική εικόνα της ΠΑΕ στα $cd11bcre^{+/-}Enpp2^{flx/flx}$, ποντίκια και των αντίστοιχων ομάδων ελέγχου. **(C)** Ο συνολικός βαθμός της ΠΑΕ στα $cd11bcre^{+/-}Enpp2^{flx/flx}$ ποντίκια και των αντίστοιχων ομάδων ελέγχου, όπως προκύπτει από την κλινική βαθμολόγηση σε όλη την διάρκεια του πειράματος. **(D)** Χρώση αιματοξυλίνης/εωσίνης και Luxol fast blue για την ιστοπαθολογική ανάλυση του ιστού και χρώση ανοσοφθορισμού με GFAP⁺ αντίσωμα για την ανίχνευση των ενεργοποιημένων αστροκυττάρων.



Συμπληρωματική εικόνα 3: Τα επίπεδα έκφραση της ATX μειώνονται στο $cd11bcre^{+/+}$ $Enpp2^{flx/flx}$ ποντίκι. (A) Διπλή χρώση ανοσοφθορισμού με αντίσωμα έναντι της ATX και των μικρογλοιακών/μακροφάγων ($cd68^{+}$) **(B)** Έλεγχος με PCR του ανασυνδυασμού του $Enpp2$ γονιδίου **(C)** προσδιορισμός επιπέδων πρωτεΐνης ATX στο πλάσμα των $cd11bcre^{+/+}$ $Enpp2^{flx/flx}$ και της ομάδας ελέγχου **(D)** Real time PCR ανάλυση έκφρασης των γονιδίων $Enpp2$, $Enpp2-\gamma$ στα $cd11bcre^{+/+}$ $Enpp2^{flx/flx}$ ποντίκια και της ομάδας ελέγχου.

Βιβλιογραφία

- 1.Reich, D.S., C.F. Lucchinetti, and P.A. Calabresi, Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*, 2018. 378(2): p. 169-180.
- 2.Baxter, A.G., The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nature Reviews Immunology*, 2007.7: p. 904.
- 3.Dendrou, C.A., L. Fugger, and M.A. Friese, Immunopathology of multiple sclerosis. *Nature Reviews Immunology*, 2015. 15: p. 545.
- 4.Brinkmann, V., et al., Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nat Rev Drug Discov*, 2010. 9(11): p. 883-97.
- 5.Rivera, J., R.L. Proia, and A. Olivera, The alliance of sphingosine-1-phosphate and its receptors in immunity. *Nat Rev Immunol*, 2008. 8(10): p. 753-63.
- 6.van Meeteren, L.A., et al., Anticancer activity of FTY720: phosphorylated FTY720 inhibits autotaxin, a metastasis-enhancing and angiogenic lysophospholipase D. *Cancer Lett*, 2008. 266(2): p. 203-8.
- 7.Szezanowski, F., et al., Fingolimod promotes peripheral nerve regeneration via modulation of lysophospholipid signaling. *J Neuroinflammation*, 2016. 13(1): p. 143.
- 8.Valentine, W.J., et al., (S)-FTY720-vinylphosphonate, an analogue of the immunosuppressive agent FTY720, is a pan-antagonist of sphingosine 1-phosphate GPCR signaling and inhibits autotaxin activity. *Cell Signal*, 2010. 22(10): p. 1543-53.
- 9.van Meeteren, L.A., et al., Anticancer activity of FTY720: Phosphorylated FTY720 inhibits autotaxin, a metastasis-enhancing and angiogenic lysophospholipase D. *Cancer Lett*, 2008.
- 10.Payne, S.G., et al., The immunosuppressant drug FTY720 inhibits cytosolic phospholipase A2 independently of sphingosine-1-phosphate receptors. *Blood*, 2007. 109(3): p. 1077-85.
- 11.Xin, C., et al., FTY720 suppresses interleukin-1beta-induced secretory phospholipase A2 expression in renal mesangial cells by a transcriptional mechanism. *Br J Pharmacol*, 2007. 150(7): p. 943-50.
- 12.Sevastou, I., et al., Lysoglycerophospholipids in chronic inflammatory disorders: The PLA(2)/LPC and ATX/LPA axes. *Biochimica et biophysica acta*, 2013. 1831(1): p. 42-60.
- 13.Giganti, A., et al., Murine and human autotaxin alpha, beta, and gamma isoforms: gene organization, tissue distribution, and biochemical characterization. *J Biol Chem*, 2008. 283(12): p. 7776-89.
- 14.Kanda, H., et al., Autotaxin, an ectoenzyme that produces lysophosphatidic acid, promotes the entry of lymphocytes into secondary lymphoid organs. *Nat Immunol*, 2008. 9(4): p. 415-23.
- 15.Narita, M., et al., Molecular cloning, expression, and localization of a brain-specific phosphodiesterase I/nucleotide pyrophosphatase (PD-I alpha) from rat brain. *J Biol Chem*, 1994. 269(45): p. 28235-42.
- 16.Fuss, B., et al., Phosphodiesterase I, a novel adhesion molecule and/or cytokine involved in oligodendrocyte function. *J Neurosci*, 1997. 17(23): p. 9095-103.
- 17.Wheeler, N.A., J.A. Lister, and B. Fuss, The Autotaxin-Lysophosphatidic Acid Axis Modulates Histone Acetylation and Gene Expression during Oligodendrocyte Differentiation. *J Neurosci*, 2015. 35(32): p. 11399-414.
- 18.Yuelling, L.M. and B. Fuss, Autotaxin (ATX): A multi-functional and multi-modular protein possessing enzymatic lysoPLD activity and matricellular properties. *Biochim Biophys Acta*, 2008. 1781(9): p. 525-30.
- 19.Dugas, J.C., et al., Functional genomic analysis of oligodendrocyte differentiation. *J Neurosci*, 2006. 26(43): p. 10967-83.
- 20.Fox, M.A., et al., Phosphodiesterase-1alpha/autotaxin: a counteradhesive protein expressed by oligodendrocytes during onset of myelination. *Mol Cell Neurosci*, 2003. 23(3): p. 507-19.
- 21.Savaskan, N.E., et al., Autotaxin (NPP-2) in the brain: cell type-specific expression and regulation during development and after neurotrauma. *Cell Mol Life Sci*, 2007. 64(2): p. 230-43.
- 22.Sato, K., et al., Identification of autotaxin as a neurite retraction-inducing factor of PC12 cells in cerebrospinal fluid and its possible sources. *J Neurochem*, 2005. 92(4): p. 904-14.
- 23.Hammack, B.N., et al., Proteomic analysis of multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *Mult Scler*, 2004. 10(3): p. 245-60.
- 24.Zahednasab, H., et al., Increased autotaxin activity in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 2014. 273(1-2): p. 120-3.
- 25.Jiang, D., et al., Elevated lysophosphatidic acid levels in the serum and cerebrospinal fluid in patients with multiple sclerosis: therapeutic response and clinical implication. *Neurological Research*, 2018: p. 1-5.
- 26.Balood, M., et al., Elevated serum levels of lysophosphatidic acid in patients with multiple sclerosis. *Hum Immunol*, 2014. 75(5): p. 411-3.
- 27.Schmitz, K., et al., Dysregulation of lysophosphatidic acids in multiple sclerosis and autoimmune encephalomyelitis. 2017. 5(1): p. 42.
- 28.Blaho, V.A. and T. Hla, Regulation of mammalian physiology, development, and disease by the sphingosine 1-phosphate and lysophosphatidic acid receptors. *Chem Rev*, 2011. 111(10): p. 6299-320.
- 29.Choi, J.W., et al., LPA receptors: subtypes and biological actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2010. 50: p. 157-86.
- 30.Weiner, J.A., J.H. Hecht, and J. Chun, Lysophosphatidic acid receptor gene vzg-1/lpA1/edg-2 is expressed by mature oligodendrocytes during myelination in the postnatal murine brain. *J Comp Neurol*, 1998. 398(4): p. 587-98.
- 31.Allard, J., et al., A rat G protein-coupled receptor selectively expressed in myelin-forming cells. *Eur J Neurosci*, 1998. 10(3): p. 1045-53.
- 32.Handford, E.J., et al., Edg2 receptor distribution in adult rat brain. *Neuroreport*, 2001. 12(4): p. 757-60.
- 33.Yu, N., et al., Characterization of lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate-mediated signal transduction in rat cortical oligodendrocytes. *Glia*, 2004. 45(1): p. 17-27.
- 34.Contos, J.J., I. Ishii, and J. Chun, Lysophosphatidic acid receptors. *Mol Pharmacol*, 2000. 58(6): p. 1188-96.
- 35.Inoue, M., et al., Initiation of neuropathic pain requires lysophosphatidic acid receptor signaling. *Nat Med*, 2004. 10(7): p. 712-8.
- 36.Nagai, J., et al., Autotaxin and lysophosphatidic acid1 receptor-mediated demyelination of dorsal root fibers by sciatic nerve injury and intrathecal lysophosphatidylcholine. *Mol Pain*, 2010. 6: p. 78.
- 37.Bickelhaupt, S., et al., Effects of CTGF Blockade on Attenuation and Reversal of Radiation-Induced Pulmonary Fibrosis. *J Natl Cancer Inst*, 2017. 109(8).

- 38.Sakai, N., et al., Lysophosphatidic acid signaling through its receptor initiates profibrotic epithelial cell fibroblast communication mediated by epithelial cell derived connective tissue growth factor. *Kidney Int*, 2017. 91(3): p. 628-641.
- 39.Margolis, G. and J.P. Pickett, New applications of the Luxol fast blue myelin stain. *Lab Invest*, 1956. 5(6): p. 459-74.
- 40.Pino, P.A. and A.E. Cardona, Isolation of brain and spinal cord mononuclear cells using percoll gradients. *J Vis Exp*, 2011(48).
- 41.Nikolaou, A., et al., Hydroxamic Acids Constitute a Novel Class of Autotaxin Inhibitors that Exhibit in Vivo Efficacy in a Pulmonary Fibrosis Model. *J Med Chem*, 2018. 61(8): p. 3697-3711.
- 42.Kaffe, E., et al., Hepatocyte autotaxin expression promotes liver fibrosis and cancer. *Hepatology*, 2017. 65(4): p. 1369-1383.
- 43.Constantinescu, C.S., et al., Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol*, 2011. 164(4): p. 1079-106.
- 44.Giganti, A., et al., Murine and human autotaxin alpha, beta, and gamma isoforms: gene organization, tissue distribution, and biochemical characterization. *The Journal of biological chemistry*, 2008. 283(12): p. 7776-89.
- 45.Benesch, M.G., et al., Recent advances in targeting the autotaxin-lysophosphatidate-lipid phosphate phosphatase axis in vivo. *J Biomed Res*, 2016. 30(4): p. 272-84.
- 46.Choi, J.W. and J. Chun, Lysophospholipids and their receptors in the central nervous system. *Biochimica et biophysica acta*, 2012.
- 47.Santos-Nogueira, E., et al., Activation of Lysophosphatidic Acid Receptor Type 1 Contributes to Pathophysiology of Spinal Cord Injury. *J Neurosci*, 2015. 35(28): p. 10224-35.
- 48.Dusauly, R., et al., Adipose-specific disruption of autotaxin enhances nutritional fattening and reduces plasma lysophosphatidic acid. *J Lipid Res*, 2011. 52(6): p. 1247-55.
- 49.Parimisetty, A., et al., Secret talk between adipose tissue and central nervous system via secreted factors-an emerging frontier in the neurodegenerative research. *J Neuroinflammation*, 2016. 13(1): p. 67.
- 50.Masago, K., et al., Lysophosphatidic acid receptor, LPA6, regulates endothelial blood-brain barrier function: Implication for hepatic encephalopathy. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018. 501(4): p. 1048-1054.
- 51.On, N.H., et al., Rapid and reversible enhancement of blood-brain barrier permeability using lysophosphatidic acid. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2013. 33(12): p. 1944-54.
- 52.Schulze, C., et al., Lysophosphatidic acid increases tight junction permeability in cultured brain endothelial cells. *J Neurochem*, 1997. 68(3): p. 991-1000.
- 53.Fotopoulou, S., et al., ATX expression and LPA signalling are vital for the development of the nervous system. *Dev Biol*, 2010. 339(2): p. 451-64.
- 54.Pamuklar, Z., et al., Autotaxin/lysopholipase D and Lysophosphatidic Acid Regulate Murine Hemostasis and Thrombosis. *J Biol Chem*, 2009. 284 (11): p. 7385-7394.
- 55.Tanaka, M., et al., Autotaxin stabilizes blood vessels and is required for embryonic vasculature by producing lysophosphatidic acid. *J Biol Chem*, 2006. 281(35): p. 25822-30.
- 56.Inoue, M., et al., Autotaxin, a synthetic enzyme of lysophosphatidic acid (LPA), mediates the induction of nerve-injured neuropathic pain. *Molecular Pain*, 2008. 4(1): p. 6.
- 57.Molofsky, A.V., et al., Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. *Genes Dev*, 2012. 26(9): p. 891-907.
- 58.Kiray, H., et al., The multifaceted role of astrocytes in regulating myelination. *Exp Neurol*, 2016. 283(Pt B): p. 541-9.
- 59.Ponath, G., C. Park, and D. Pitt, The Role of Astrocytes in Multiple Sclerosis. *Front Immunol*, 2018. 9: p. 217.
- 60.Savaskan, N.E., et al., Autotaxin (NPP-2) in the brain: cell type-specific expression and regulation during development and after neurotrauma. *Cell Mol Life Sci*, 2007. 64.
- 61.Zhuo, L., et al., hGFAP-cre transgenic mice for manipulation of glial and neuronal function in vivo. *Genesis*, 2001. 31(2): p. 85-94.
- 62.Li, Q. and B.A. Barres, Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nature Reviews Immunology*, 2017. 18: p. 225.
- 63.Chu, F., et al., The roles of macrophages and microglia in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, 2018. 318: p. 1-7.
- 64.Ma, L., J. Nagai, and H. Ueda, Microglial activation mediates de novo lysophosphatidic acid production in a model of neuropathic pain. *J Neurochem*, 2010. 115.
- 65.Boillee, S., et al., Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science*, 2006. 312(5778): p. 1389-92.

Περίληψη

Η αυτοταξίνη (ATX, ENPP-2) είναι μέλος της οικογένειας των εξωνουκλεοτιδικών πυροφωσφατασών/ φωσφοδιεστερασών. Η ATX αποτελεί μια εκκρινόμενη λυσοφωσφολιπάση D η οποία ευθύνεται σε μεγάλο βαθμό για την εξωκυττάρια παραγωγή του λυσοφωσφατιδικού οξέος (LPA), μέσω υδρόλυσης της λυσοφωσφατιδυλοχολίνης (LPC). Το LPA έχει πολυάριθμες επιδράσεις στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους, επιτελούμενες μέσω τουλάχιστον έξι υποδοχέων (LPA_R) συζευγμένων με G πρωτεΐνες, οι οποίοι εμφανίζουν ευρεία κατανομή και επικαλυπτόμενες ιδιότητες. Ο άξονας ATX/LPA έχει εμπλακεί σε διάφορες χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις και ινωτικές διαταραχές, συμπεριλαμβανομένης της πνευμονικής ίνωσης και της σκλήρυνσης κατά πλάκας που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή. Στο πρώτο μέρος της μελέτης εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα ενός ισχυρού αναστολέα της ATX (PF-8380) και ενός ανταγωνιστή του υποδοχέα LPA₁ (AM095) στην ανάπτυξη και εξέλιξη της πνευμονικής ίνωσης η οποία προκαλείται από μπλεομυκίνη. Η αξιολόγηση της ίνωσης στηρίχθηκε σε μακροσκοπικές παρατηρήσεις (βιωσιμότητα και σωματικό βάρος), βιοχημικές αναλύσεις του βρογχοκυψελιδικού υγρού και στην παθολογοανατομική εξέταση του πνευμονικού ιστού. Με βάση τα αποτελέσματα, τόσο ο αναστολέας της ATX όσο και ο ανταγωνιστής του υποδοχέα LPA₁, εμπόδισαν την ανάπτυξη της πνευμονικής ίνωσης και την παραμόρφωση της αρχιτεκτονικής των πνευμόνων, παρουσιάζοντας ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές σε διαφορετικές εκφάνσεις της πειραματικής ασθένειας, συμβάλλοντας έτσι στην προσπάθεια εύρεσης νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων για την πνευμονική ίνωση. Στο δεύτερο μέρος της εργασίας στόχος ήταν να αποκρυπτογραφηθεί ο ρόλος της σηματοδότησης του LPA και της αυτοταξίνης (ATX) στην παθοφυσιολογία της σκλήρυνσης κατά πλάκας. Η σκλήρυνση κατά πλάκας (MS, multiple sclerosis) είναι μια χρόνια, υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα νευροφλεγμονώδης και νευροεκφυλιστική διαταραχή που μπορεί να εκδηλωθεί με ποικιλία νευρολογικών συμπτωμάτων. Στην μελέτη αυτή, βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα ATX στο νωτιαίο

μυελό κατά την ανάπτυξη της πειραματικής αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας (ΠΑΕ) σε μύες, οδηγώντας σε τοπικές αυξήσεις των επιπέδων LPA, υποδηλώνοντας ότι ο άξονας ATX/LPA συμμετέχει στην παθογένεια της ΠΑΕ. Η έκφραση της ATX εντοπίστηκε σε ενεργοποιημένα αστροκύτταρα και τα μικρογλοιακά/μακροφάγα κύτταρα. Η γενετική απαλοιφή της ATX από τα αστροκύτταρα οδήγησε σε εμβρυϊκή θνησιμότητα, επεκτείνοντας έτσι προηγούμενες παρατηρήσεις σχετικά με τον βασικό ρόλο του άξονα ATX/LPA στην εμβρυϊκή ανάπτυξη και ανοίγοντας νέες ερευνητικές κατευθύνσεις. Όσον αφορά το ρόλο της ATX που παράγεται από τα μακροφάγα, η γενετική απαλοιφή της από τον συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο είχε ως αποτέλεσμα την εξασθένηση του φαινοτύπου της ΠΑΕ, επιβεβαιώνοντας το βασικό ρόλο της στην παθογένεια και εξέλιξη της ΠΑΕ, πιθανότατα μέσω της παραγωγής του LPA.

Abstract

Autotaxin (ATX) is a secreted lysophospholipase D, largely responsible for extracellular production of lysophosphatidic acid (LPA), a bioactive phospholipid. LPA has numerous effects in most cell types, signaling through at least 6 receptors (LPAR) exhibiting wide spread distribution and overlapping specificities. The ATX/LPA axis has been involved in different chronic inflammatory and fibroproliferative disorders, including pulmonary fibrosis and multiple sclerosis. In this study, we examined the efficacy of a potent inhibitor of ATX (PF-8380) and an antagonist of LPAR1 (AM095) in bleomycin (BLM)-induced pulmonary fibrosis. Both compounds abrogated the development of pulmonary fibrosis and prevented the distortion of lung architecture, exhibiting qualitative and quantitative differences in different manifestations of the modeled disease. In the second part of this study, we have demonstrated that ATX levels increase in the spinal cord upon EAE development in mice, leading to local increases of LPA levels, strongly suggesting that the ATX/LPA axis participates in the pathogenesis of EAE. ATX expression was localized in activated astrocytes and macrophages-microglia upon EAE. The conditional genetic deletion from astrocytes resulted in embryonic lethality, thus extending previous observations on the vital role of ATX/LPA in embryonic development and opening new research directions. Moreover, the effect of the genetic deletion of ATX from macrophages-microglia was the attenuation of EAE severity, proving an overall detrimental role of monocytic-derived ATX in EAE pathogenesis, likely though LPA mediated autocrine macrophage activation.

Πρωτότυπες Δημοσιεύσεις



Bleomycin Revisited: A Direct Comparison of the Intratracheal Micro-Spraying and the Oropharyngeal Aspiration Routes of Bleomycin Administration in Mice

Ilianna Barbayianni[†], Ioanna Ninou[†], Argyrios Tzouvelekis and Vassilis Aidinis*

Division of Immunology, Biomedical Sciences Research Center Alexander Fleming, Athens, Greece

OPEN ACCESS

Edited by:

Marco Confalonieri,
University of Trieste, Italy

Reviewed by:

Francesco Salton,
Azienda Sanitaria Università Integrata
di Trieste, Italy
Yvon Jule,
Biocellvia, France

*Correspondence:

Vassilis Aidinis
aidinis@fleming.gr

[†]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Pulmonary Medicine,
a section of the journal
Frontiers in Medicine

Received: 16 February 2018

Accepted: 03 September 2018

Published: 24 September 2018

Citation:

Barbayianni I, Ninou I, Tzouvelekis A
and Aidinis V (2018) Bleomycin
Revisited: A Direct Comparison of the
Intratracheal Micro-Spraying and the
Oropharyngeal Aspiration Routes of
Bleomycin Administration in Mice.
Front. Med. 5:269.
doi: 10.3389/fmed.2018.00269

Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF) is a fatal disease characterized by exuberant deposition of extracellular matrix components, deterioration of lung architecture and impairment of lung functions. Its etiopathogenesis remains incompletely understood, as reflected in the lack of an appropriate therapy. Modeling the human disease in mice via the administration of bleomycin (BLM), despite the inherent limitations, has provided valuable insights into the underlying pathogenetic mechanisms, and has been instrumental for the development and validation of new pharmacologic interventions. Here we have directly compared the, most widely used, intratracheal (IT) route of administration with oropharyngeal aspiration (OA). Our results suggest that the OA route of BLM-administration can be used as a safe and effective alternative, minimizing peri-operative and experimental mortality, while preserving a solid fibrotic profile, as assessed with a plethora of standardized readout assays.

Keywords: pulmonary fibrosis, animal model, bleomycin (BLM), intratracheal (IT), oropharyngeal (OA)

INTRODUCTION

Modeling human diseases in mice, despite the inherent limitations, has provided valuable insights into the underlying pathogenetic mechanisms, and has been instrumental for the development and validation of new pharmacologic interventions. In the context of Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF), a fatal disease characterized by exuberant deposition of extracellular matrix components, deterioration of lung architecture and impairment of lung functions (1), the most widely used experimental model is induced by the administration of bleomycin in C57Bl6/J mice (2–4).

Bleomycin (BLM), a mixture of glycopeptides isolated from *Streptomyces verticillus*, is an anti-neoplastic/antibiotic drug for the treatment of some forms of cancer (5). It acts through DNA fragmentation, an activity modulated by many factors in different cell types including chromatin structure and DNA repair machinery, as well as antioxidant and metabolic enzymes (5). The lack of BLM hydrolase in pulmonary epithelial cells is thought to be the main reason for the observed toxicity of BLM in the lung, resulting in the development of pulmonary fibrosis as a side effect in treated cancer patients. The observed toxicity in human patients was soon translated to an animal model (6), serving the scientific community ever since. The model is characterized by alveolar epithelial cell death and the secretion of pro-inflammatory and pro-fibrotic factors, leading to fibroblast activation and collagen deposition, reproducing some, but not all, of the key features of the human disease (3, 4). The ensuing inflammation, the lack of alveolar epithelial hyperplasia

and the quick resolution, the main differences with the human disease and the major drawbacks of the BLM model, can be circumvented, in part, though the repetitive administration of BLM (7).

In order to mimic the human exposure, BLM was initially administered systemically, via intravenous or intraperitoneal injections, resulting, as in humans, to the subpleural development of fibrotic lesions (4). However, intratracheal (IT) administration of a single BLM dose, resulting in bronchiolocentric fibrotic patches, has become the method of choice (3). Furthermore, the IT delivery of BLM through a microspray aerosolizer (8) has been shown to yield more reproducible results and more homogenous distribution of fibrotic lesions than IT instillation/injection (9). Following the example of other drugs and agents (10–13), an alternative way of administering BLM in the trachea, namely oropharyngeal aspiration (OA), has been recently introduced (14, 15). However, the IT and OA routes of BLM administration have not been directly compared (3). As shown here, OA of 0.8 U/Kg BLM results in similar fibrotic responses as with 3.2 U/Kg when administered IT. OA administration reduced both the peri-operative mortality, due to the ease and speed of procedures, while the lower BLM dose employed also reduced experimental mortality.

MATERIALS AND METHODS

Mice

Mice were bred under SPF conditions at the local animal facility at “20–22°C, 55 ± 5% humidity, and a 12-h light-dark cycle; water and food were given *ad libitum*” (17). All experimentation in mice was in line with the ARRIVE guidelines and has been approved by the Veterinary service and Fishery Department of the local governmental prefecture, following the approval by the Institutional Animal Ethical Committee (IAEC; #985) of BSRC Alexander Fleming.

Pulmonary fibrosis was induced through the administration of BLM (Nippon Kayaku) to anesthetized (IP ketamine/xylazine/atropine, 100/10/0.05 mg/kg, respectively) mice. The intratracheal (IT) route was applied essentially as previously published (17), and as described in the online **Supplementary Materials and Methods**. Briefly, a MicroSprayer aerosolizer attached to a high-pressure syringe was inserted from the mouth to the carina (trachea's bifurcation) and BLM (0.08 U/mouse), or saline, was sprayed directly into the lungs of mice). The oropharyngeal (OA) route was applied as follows: the tongue of the mice was carefully pulled out using blunt forceps while the mouse's neck and thorax were stabilized on a plastic wall through a rubber band in order for the neck to be minimally stretched. The latter permitted the visualization of the trachea through a laryngoscope and a fiber-optic device. BLM (in a final volume of 50 µl) was then delivered as liquid in the oropharyngeal cavity, with a blunt ended conventional pipette tip. At the same time, the nares were blocked by a tong to prevent obligate nasal breathing and force BLM inhalation. Once BLM was administered (IT or

OA), mice were placed on an electrical heating blanket to ensure speedy recovery from anesthesia and to avoid hypothermia.

Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF) collection and analysis, lung histopathological analysis and Quantitative RT-PCR analysis were performed with standardized protocols, as previously published (16) and as described in the on-line **Supplementary Materials and Methods**.

Respiratory mechanics were analyzed with the FlexiVent ventilator system (SCIREQ) following manufacturer instructions, as previously published (17) and as described in the on-line **Supplementary Materials and Methods**.

Statistical Analysis

Statistical significance was assessed with unpaired Student's *t*-test in comparison with control values (GraphPad Prism 6). Data are presented as means (±SEM); *p* < 0.05 (*) was considered significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Beyond the route of administration, the severity of BLM effects highly depends on the precise genetic background of mice (i.e., C57Bl6J vs. N, further differing between vendors), the local genetic drift of the colony and the health status of the corresponding animal house. As a result, a wide range of BLM concentrations have been employed to induce pulmonary fibrosis in mice (2, 4). As there are only a few published protocols on the OA route of BLM administration, we first tested four different BLM doses administered by OA. The starting concentration was 3.2 U/Kg, the concentration used locally for the IT route, which has been chosen after extensive testing over the years to establish a reproducible phenotype with minimal lethality. Administering 3.2 U/Kg BLM via OA, as well as to a lesser extend 1.6 U/Kg, resulted in significant mortality rates (**Figure S1A**), so these concentrations were discontinued. On the contrary, doses of 0.4 and 0.8 U/Kg were well tolerable, while the dose of 0.8 U/Kg produced statistically significant increases in all established diseases indices (**Figures S1B–H**) with minimal mortality and was thus selected for the direct comparison of IT and OA routes.

Pulmonary fibrosis was induced by IT or OA administration of BLM (at 3.2 and 0.8 U/Kg, respectively) in both male and female, 8–12 weeks old, C57Bl6/J mice. No sex effect was observed in any readout assays, so all following experimental results concern cumulative data, of randomly assigned, sex and age matched groups of littermate mice. No statistically significant difference on overall mouse survival was found between IT and OA BLM administrations (**Figures 1A,B**); however, at these doses, no mice died upon OA administration, most likely due to the lower BLM dose employed. Similarly, both routes of BLM administration, as compared to saline-treated animals, resulted in significant weight loss (**Figure 1C**), one of the traditional indicators of BLM-induced injury. However, IT administration (of BLM or saline) always resulted in peri-operative mortality (data not shown), a feature not usually reported (or even recorded), as it concerns almost exclusively handling, skill and chance. Nevertheless, OA administration is deemed

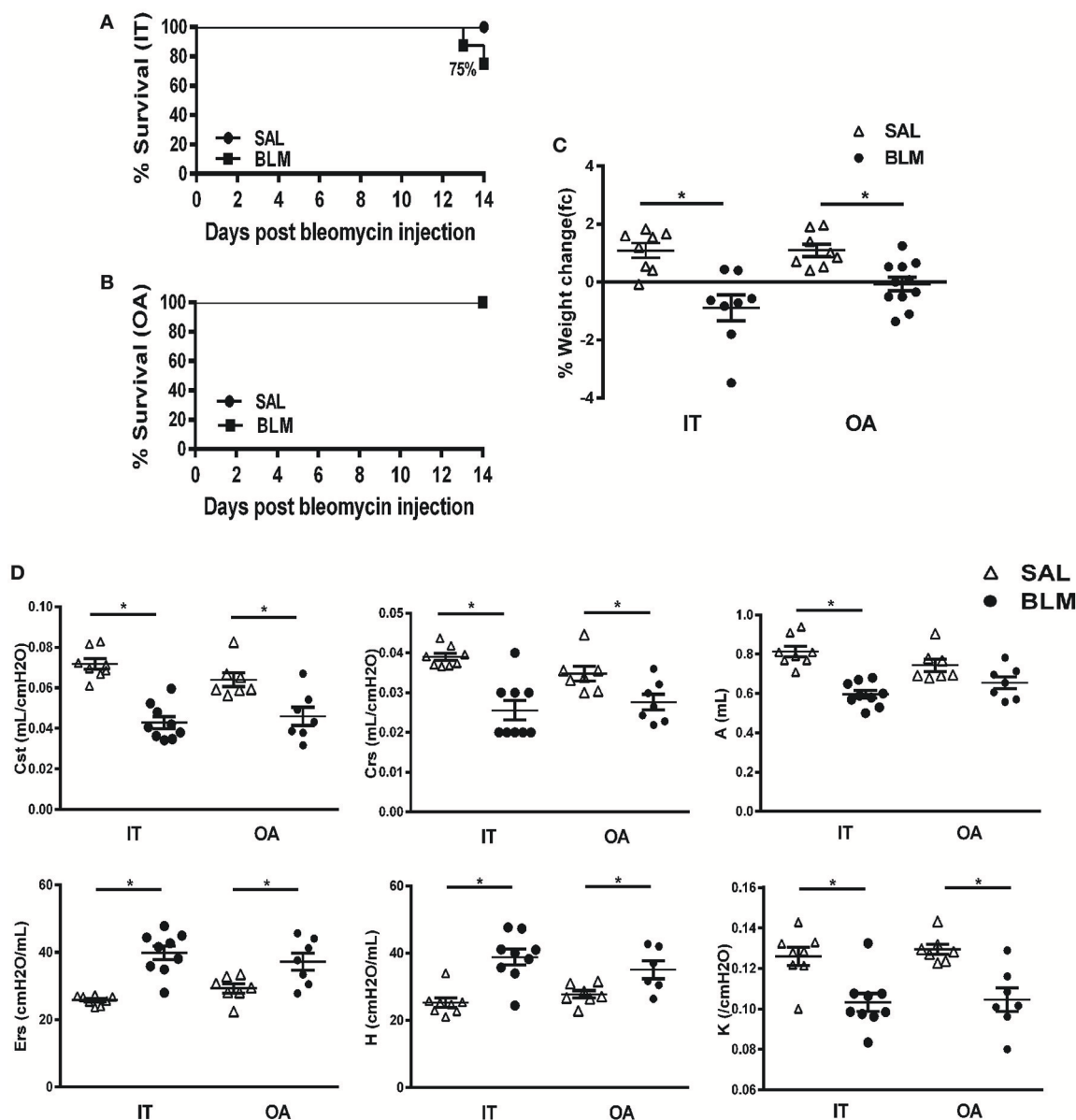


FIGURE 1 | Effects of the intratracheal microspraying (IT) or oropharyngeal aspiration (OA) routes of bleomycin (BLM) administration on mortality, weight loss and functional respiratory mechanics. 8–12 weeks-old C57BL6/J mice were challenged with BLM delivered via the IT or OA routes (at doses of 3.2 and 0.8 U/kg, respectively) and were sacrificed 14 days later. Data from two independent experiments are presented as scatter plots with horizontal bars representing mean levels ($\pm$ SEM). Statistical significance was assessed with unpaired Student's *t*-test in comparison with the relative control values; **p* < 0.05 was considered statistically significant. **(A,B)** Kaplan-Meier plot using 14-days survival data from mice treated with BLM delivered either through IT or OA route, respectively. **(C)** Both IT and OA-treated mice demonstrated marked weight loss compared to saline-treated animals 14 days following BLM-challenge. **(D)** *In-vivo* respiratory mechanics following challenge with BLM. OA administration exerted similar to IT administration significant functional impairment on respiratory mechanics compared to saline-treated controls, as assessed by: mean static lung compliance (Cst), mean respirator system compliance (Crs), mean total lung capacity (A), mean respiratory system elastance (Ers), mean tissue elastance (H) and the curvature of the upper portion of the deflation limb of the pressure volume (PV) curve (K).

advantageous on overall experimental mice survival, with both practical and ethical benefits. Moreover, the experimental OA procedure is much easier and faster, as described in detail in **Supplementary Materials and Methods**, maximizing productivity and reproducibility, while it requires much less training.

Fourteen days post BLM (or saline) administration mice were sedated, tracheotomized and connected to a mechanical ventilator to evaluate forced-oscillation lung mechanics (**Figure 1D**). OA administration exerted similar to IT administration functional impairment on respiratory mechanics compared to saline-treated controls, as assessed by significant

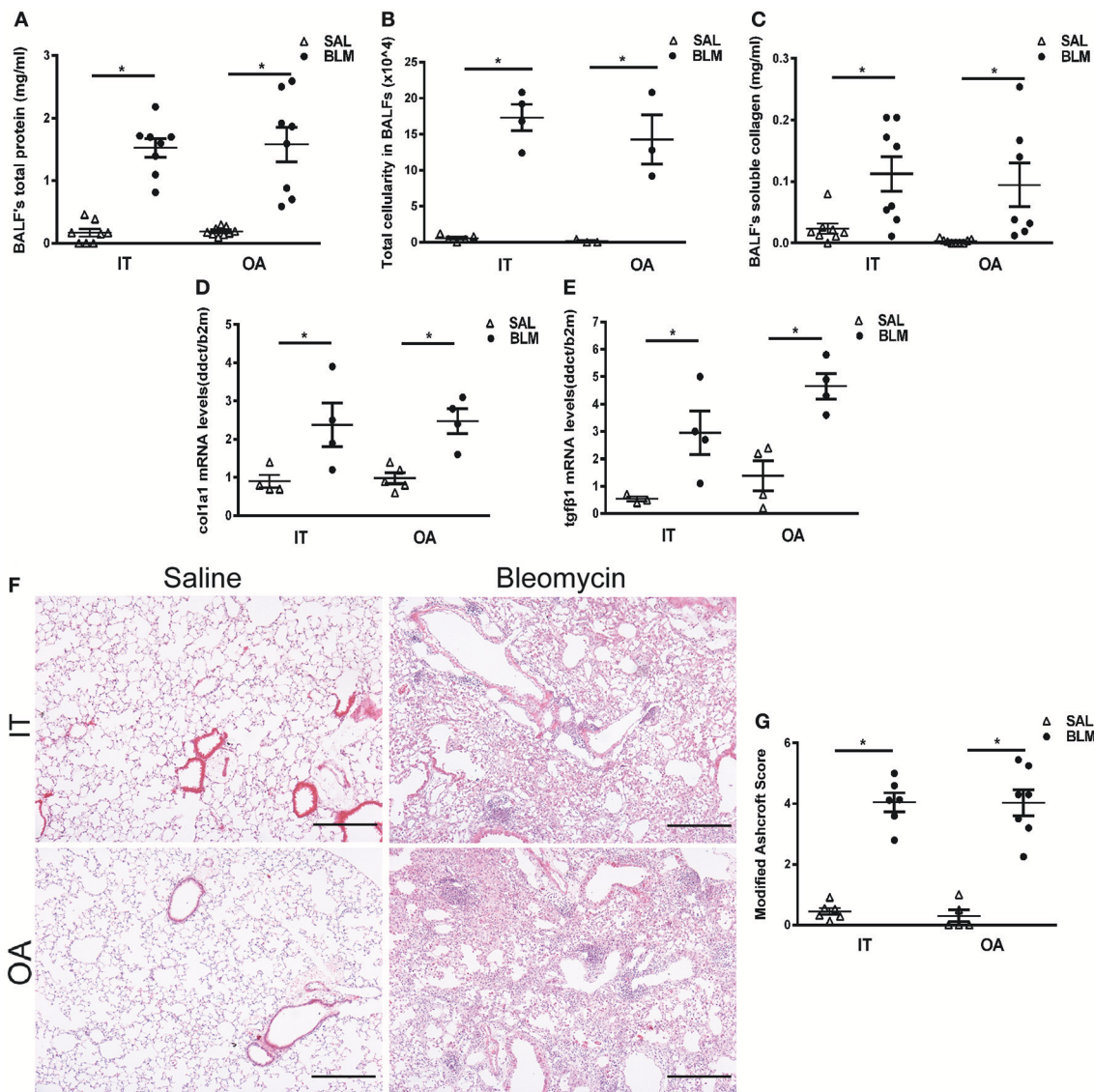


FIGURE 2 | Biochemical and histological analysis of injured lungs following intratracheal microspraying (IT) or oropharyngeal aspiration (OA) bleomycin (BLM) administration. 8–12 weeks-old C57BL/6/J mice were challenged with BLM delivered via the IT or OA routes (at doses of 3.2 and 0.8 U/kg, respectively) and were sacrificed 14 days later. Data from two independent experiments are presented as scatter plots with horizontal bars representing mean levels ($\pm$ SEM). Statistical significance was assessed with unpaired Student's *t*-test in comparison with the relative control values; * $p < 0.05$ was considered statistically significant.

(A) Increased total protein levels in BALF were observed with both routes of BLM delivery compared to saline-treated controls. **(B)** Both routes of delivery (IT and OA) produced significantly increases in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) total cellularity compared to saline-treated animals. **(C)** Lung collagen was assessed by measuring BALF soluble collagen content with sirius red. Both routes of BLM administration were associated with substantial increases in BALF soluble collagen content compared to saline-treated animals. **(D,E)** Quantitative RT-PCR analysis of the *Col1a1* and *Tgfb1* mRNA levels in whole mouse lungs challenged with BLM either through IT or OA route of delivery and saline-treated animals. Values were normalized to the expression values of *b2m*. **(F)** Representative H&E-stained lung sections. Scale bars 100 μ m. **(G)** Quantitative analysis of histological changes and extent of fibrosis was performed by the modified Ashcroft score. Data represent mean scores obtained from two independent blind reviewers.

reductions in: (1) static lung compliance (*Cst*), (2) respiratory system compliance (*Crs*), and (3) total lung capacity (*A*), as well as increases in: (4) respiratory system elastance (*Ers*), (5) tissue elastance (*H*), (6) curvature of the upper portion of the deflation limb of the PV curve (*K*), (**Figure 1D**). Both static and dynamic lung compliance as well as elastance and total (inspiratory) lung capacity were found to be reliable indices of fibrotic lung injury, as recently suggested (18), well correlating with the

Ashcroft score (**Table S1**). Therefore, and as the method is the most relevant to clinical measurements in human patients, not requiring additional mouse numbers, it is thus proposed as a valuable surrogate analysis of BLM-induced pulmonary fibrosis.

The route of BLM administration did not have an effect in BLM-induced vascular leak, as indicated by the total protein levels in the corresponding bronchoalveolar fluids (BALFs)

(Figure 2A). Similarly, no differences were detected in the total number of inflammatory cells in BALFs, upon measuring trypan blue stained cells in a hemacytometer (Figure 2B). Moreover, no qualitative differences in inflammation was detected either at this final endpoint with FACS analysis (data not shown). BALFs were also analyzed for soluble collagen content with sirius red, as an indirect indicator of tissue fibrosis. Again, no difference was noted upon the differential administration route of BLM (Figure 2C). It should be noted that measuring the hydroxyproline content of lung tissue is the most accurate method of determining lung collagen content and, as such, has been recommended as the optimal primary endpoint for fibrosis assessment (3). However, this technique requires at least half the lung, thus limiting the number of parallel analyses that can be performed (either in the mRNA or protein or enzymatic activity level accordingly) or requiring additional mouse numbers, that would still not allow for direct comparisons or correlations of collagen content with other disease indices. The estimation of collagen levels was complemented with Real Time RT-PCR assessment of Collagen 1a1 mRNA levels, again not revealing any differences between the two routes of BLM administration (Figure 2D). Similarly, no differences in TGF mRNA levels, the major profibrotic factor driving collagen expression and disease development in both mice and human, were noted (Figure 2E).

In line with the BALF assays, and as shown in representative images of H&E stained lung sections, BLM-challenge promoted extensive fibrotic changes and architectural distortion compared to saline-treated animals, irrespectively of the delivery method (Figure 2F); no major differences in the distribution and homogeneity of fibrotic lesions were observed. Moreover, collagen visualization with Sirius red and Mason trichrome staining of lung sections did not reveal any gross differences between the two methods either (Figures S2A,B); a recently reported automated histological image analysis of fibrotic lungs will further allow objective quantification of lung tissue density as a result of the

deposited collagen (18). As expected, quantification of fibrosis by two blind reviewers using the Ashcroft score did not reveal any differences upon differential BLM delivery (Figure 2G).

Overall, as prompted by the recent American Thoracic Society workshop report on the use of animal models (3), we have directly compared for the first time the IT and OA routes of BLM-delivery in mice, using a plethora of readout assays including *in vivo* lung function measurements which are highly clinically relevant. Our results suggest that the OA route can be used as a safe and effective alternative route of BLM administration, allowing researchers to easily produce reproducible and robust kinetics of fibrotic lung injury combined with a beneficial safety profile sparing invasive surgical procedures of the IT administration, as well as the systemic effects of higher BLM doses. Moreover, the low BLM concentrations employed will allow drug testing in animals of a much better shape, without compromising a solid fibrotic profile.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

VA designed the study; IB and IN performed all reported experiments; AT co-analyzed the data and wrote the paper, which was edited by VA and was critically commented by all authors.

FUNDING

Supported by the Operational Program “Competitiveness, Entrepreneurship and Innovation 2014–2020,” co-financed by Greece and the European Union (European Regional Development Fund), Action code MIS 5002562.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2018.00269/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Martinez FJ, Collard HR, Pardo A, Raghu G, Richeldi L, Selman M, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Nat Rev Dis Primers* (2017) 3:17074. doi: 10.1038/nrdp.2017.74
- Tashiro J, Rubio GA, Limper AH, Williams K, Elliot SJ, Ninou I, et al. Exploring animal models that resemble idiopathic pulmonary fibrosis. *Front Med.* (2017) 4:118. doi: 10.3389/fmed.2017.00118
- Jenkins RG, Moore BB, Chambers RC, Eickelberg O, Konigshoff M, Kolb M, et al. An official american thoracic society workshop report: use of animal models for the preclinical assessment of potential therapies for pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* (2017) 56:667–79. doi: 10.1165/rcmb.2017-0096ST
- Mouratis MA, Aidinis V. Modeling pulmonary fibrosis with bleomycin. *Curr Opin Pulm Med.* (2011) 17:355–61. doi: 10.1097/MCP.0b013e31823849ac2b
- Bolzan AD, Bianchi MS. DNA and chromosome damage induced by bleomycin in mammalian cells: an update. *Mutat Res.* (2018) 775:51–62. doi: 10.1016/j.mrrev.2018.02.003
- Adamson IY, Bowden DH. The pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Pathol.* (1974) 77:185–97.
- Degryse AL, Lawson WE. Progress toward improving animal models for idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Med Sci.* (2011) 341:444–9. doi: 10.1097/MAJ.0b013e31821aa000
- Bivas-Benita M, Zwier R, Junginger HE, Borchard G. Non-invasive pulmonary aerosol delivery in mice by the endotracheal route. *Eur J Pharm Biopharm.* (2005) 61:214–8. doi: 10.1016/j.ejpb.2005.04.009
- Robbe A, Tassin A, Carpentier J, Declèves A-E, Ngono M, Nonclercq D, et al. Intratracheal bleomycin aerosolization: the best route of administration for a scalable and homogeneous pulmonary fibrosis rat model? *BioMed Res Int.* (2015) 2015:10. doi: 10.1155/2015/198418
- De Vooght V, Vanoirbeek JA, Haenen S, Verbeken E, Nemery B, Hoet PH. Oropharyngeal aspiration: an alternative route for challenging in a mouse model of chemical-induced asthma. *Toxicology* (2009) 259:84–9. doi: 10.1016/j.tox.2009.02.007
- Rao GV, Tinkle S, Weissman DN, Antonini JM, Kashon ML, Salmen R, et al. Efficacy of a technique for exposing the mouse lung to particles aspirated from the pharynx. *J Toxicol Environ Health A* (2003) 66:1441–52. doi: 10.1080/15287390306417
- Foster WM, Walters DM, Longphre M, Macri K, Miller LM. Methodology for the measurement of mucociliary function in the mouse by scintigraphy. *J Appl Physiol.* (1985). (2001) 90:1111–7.

13. Lakatos HF, Burgess HA, Thatcher TH, Redonnet MR, Hernady E, Williams JP, et al. Oropharyngeal aspiration of a silica suspension produces a superior model of silicosis in the mouse when compared to intratracheal instillation. *Exp Lung Res.* (2006) 32:181–99. doi: 10.1080/01902140600817465
14. Bale S, Sunkoju M, Reddy SS, Swamy V, Godugu C. Oropharyngeal aspiration of bleomycin: an alternative experimental model of pulmonary fibrosis developed in Swiss mice. *Indian J Pharmacol.* (2016) 48:643–8. doi: 10.4103/0253-7613.194859
15. Egger C, Cannet C, Gerard C, Jarman E, Jarai G, Feige A, et al. Administration of bleomycin via the oropharyngeal aspiration route leads to sustained lung fibrosis in mice and rats as quantified by UTE-MRI and histology. *PLoS ONE* (2013) 8:e63432. doi: 10.1371/journal.pone.0063432
16. Oikonomou N, Mouratis MA, Tzouvelekis A, Kaffe E, Valavanis C, Vilaras G, et al. Pulmonary autotaxin expression contributes to the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* (2012) 47:566–74. doi: 10.1165/rcmb.2012-0004OC
17. Yu G, Tzouvelekis A, Wang R, Herazo-Maya JD, Ibarra GH, Srivastava A, et al. Thyroid hormone inhibits lung fibrosis in mice by improving epithelial mitochondrial function. *Nat Med.* (2018) 24:39–49. doi: 10.1038/nm.4447
18. Gilhodes J-C, Julé Y, Kreuz S, Stierstorfer B, Stiller D, Wollin L. Quantification of pulmonary fibrosis in a bleomycin mouse model using automated histological image analysis. *PLoS ONE* (2017) 12:e0170561. doi: 10.1371/journal.pone.0170561

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Barbayianni, Ninou, Tzouvelekis and Aidinis. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

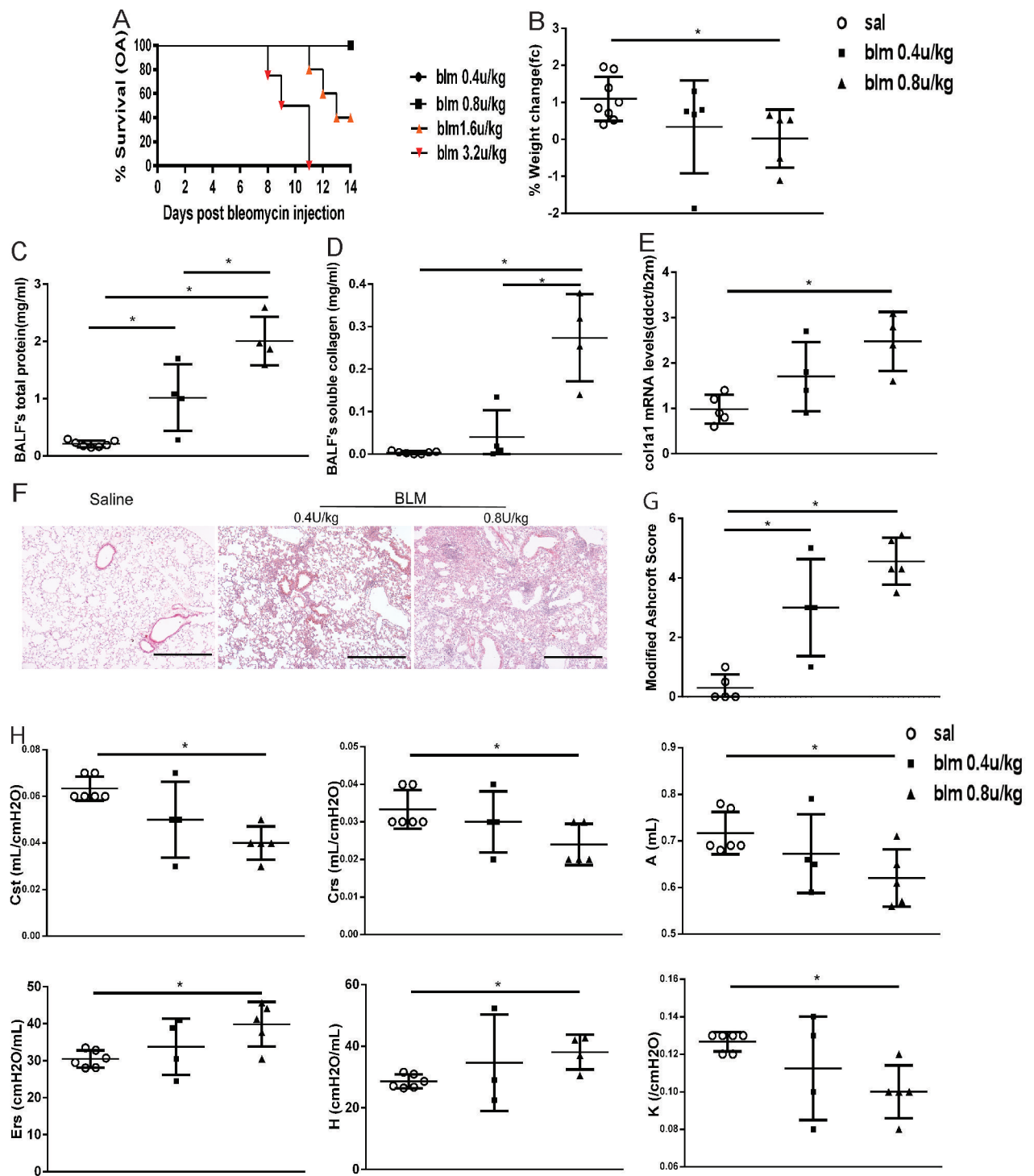


Figure S1. Dose response of bleomycin (BLM) administration via the oropharyngeal (OA) route. 8-12 weeks-old C57BL6/J mice were challenged with 3.2, 1.6, 0.8 and 0.4 U/kg BLM and were sacrificed 14 days later. Data are presented as scatter plots with horizontal bars representing mean levels ($\pm$ SEM). Statistical significance was assessed with unpaired Student's t-test in comparison with the relative control values; * $p < 0.05$ was considered statistically significant. **(A)** Kaplan-Meier plot of observed mortality with the different BLM doses. **(B)** Administration of 0.8 U/kg BLM resulted in marked weight loss compared to saline-treated animals. **(C)** Total protein in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was measured as an indication of vascular leak. **(D)** Soluble collagen in BALFs was measured with sirius red. **(E)** Quantitative RT-PCR analysis of the *Col1a1* mRNA levels in whole mouse lungs challenged with BLM. Values were normalized to the expression values of *b2m*. **(F)** Representative images of H&E-stained lung sections. Scale bars 100µm. **(G)** Quantitative analysis of histological changes and extent of fibrosis was performed by the modified Ashcroft score. Data represent mean scores obtained from two independent blind reviewers. **(H)** *In-vivo* respiratory mechanics following challenge with BLM. Administration of 0.8 U/kg BLM exerted significant functional impairment on respiratory mechanics compared to saline-treated controls, as assessed by: mean static lung compliance (*Cst*), mean respirator system compliance (*Crs*), mean total lung capacity (*A*), mean respiratory system elastance (*Ers*), mean tissue elastance (*H*) and the curvature of the upper portion of the deflation limb of the pressure volume (PV) curve (*K*).

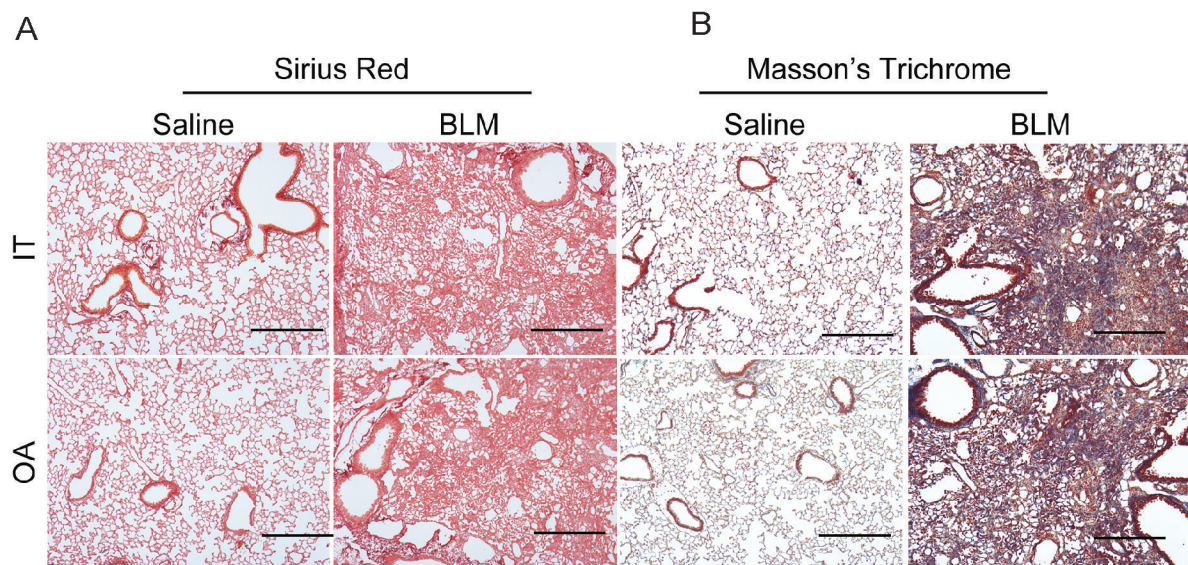
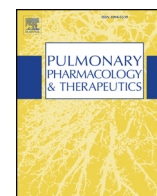


Figure S2. Histological examination of collagen deposition in lungs. Representative images from lung sections of the indicated mice upon sirius red (A) and masson's trichrome (B) staining .Scale bars 100 μ m.



Pharmacologic targeting of the ATX/LPA axis attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis

Ioanna Ninou^a, Eleanna Kaffe^a, Stefan Müller^b, David C. Budd^{c,1}, Christopher S. Stevenson^{c,2}, Christoph Ullmer^b, Vassilis Aidinis^{a,*}

^a Division of Immunology, Biomedical Sciences Research Center Alexander Fleming, Athens, Greece

^b Pharma Research and Early Development, Roche Innovation Center Basel, F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Switzerland

^c Pharma Research and Early Development, F. Hoffmann-La Roche Inc., Nutley, NJ, USA

ARTICLE INFO

Keywords:

Autotaxin (ATX)
Lysophospholipase D
Lysophosphatidic acid (LPA)
Lysophosphatidic acid receptor 1 (LPAR1)
Pulmonary fibrosis

ABSTRACT

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a chronic fibrosing lung disease with a dismal prognosis and a largely unknown etiology. Autotaxin (ATX) is a secreted lysophospholipase D, largely responsible for extracellular production of lysophosphatidic acid (LPA), a bioactive phospholipid. LPA has numerous effects in most cell types, signaling through at least 6 receptors (LPAR) exhibiting wide spread distribution and overlapping specificities. The ATX/LPA axis has been suggested as a therapeutic target in different chronic inflammatory and fibroproliferative disorders, including pulmonary fibrosis. In this report, we examined head-to-head the efficacy of a potent inhibitor of ATX (PF-8380), that has not been tested in pulmonary fibrosis models, and an antagonist of LPAR1 (AM095) in bleomycin (BLM)-induced pulmonary fibrosis. Both compounds abrogated the development of pulmonary fibrosis and prevented the distortion of lung architecture, exhibiting qualitative and quantitative differences in different manifestations of the modeled disease.

1. Introduction

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a chronic fibrotic form of diffuse lung disease with a dismal prognosis, characterized by progressive exertional dyspnea and radiographically evident interstitial infiltrates. The hallmark of IPF is the presence of a hyperplastic epithelium overlying fibroblastic foci depositing exuberant extracellular matrix components, leading to alveolar septa thickening, distortion of lung architecture and deterioration of normal lung functions. Although the etiology and pathogenesis of IPF remain poorly understood, the current dogma suggests that the mechanisms driving IPF reflect abnormal, deregulated wound healing in response to persistent epithelial damage [1,2].

Autotaxin (ATX) is a secreted lysophospholipase D catalyzing the hydrolysis of lysophosphatidylcholine (LPC) into lysophosphatidic acid (LPA) and is considered responsible for the majority of extracellular LPA production [3]. In turn, LPA evokes growth-factor like responses in almost every mammalian cell type, including cell growth, survival, differentiation and motility, through binding to at least six G-protein coupled receptors (GPCRs, LPAR1-6) that exhibit overlapping

specificities and widespread distribution [3]. Increased ATX/LPA axis activity has been reported in many chronic inflammatory disorders and several types of cancer [3–5].

Increased ATX and LPA levels have been also reported in IPF patients and animal models, while genetic or pharmacologic targeting of ATX or LPAR1 prevented disease pathogenesis in animal models [6–8]. Many small molecule ATX inhibitors and LPAR1 antagonists have been reported [9–13], exhibiting efficacy in different animal models (Table 1). In particular, ATX targeting has been shown to be efficacious in bleomycin (BLM)-induced pulmonary fibrosis both with small molecules [7,14,15] and DNA aptamers [16]; however, all reported studies were performed in a prophylactic setting, while a recent report challenged altogether the therapeutic effects of targeting ATX in IPF [17]. Moreover, the efficacy of ATX inhibition and LPAR1 antagonism has not been directly compared, while a synergistic therapeutic benefit has not been explored in the context of pulmonary fibrosis.

Therefore, in this report, we tested head-to-head one of the most potent ATX inhibitors, PF-8380 [18], which has never been tested in pulmonary fibrosis, and AM095, one of the leading LPAR1 antagonists [19]. Both compounds were found to be efficacious in preventing the

* Corresponding author.

E-mail address: V.Aidinis@Fleming.gr (V. Aidinis).

¹ Current address: Pulmonary Vascular Injury Discovery Performance Unit, GlaxoSmithKline Medicines Research Centre, Stevenage, UK.

² Current address: Janssen Research & Development, Johnson and Johnson Innovation Centre, London, UK.

Table 1
Overview of small molecules targeting the ATX/LPA axis with reported *in vivo* testing.

Function	Compound	IC ₅₀ (assay)	In vivo properties	ATX inhibition	LPA inhibition	Applications (Dose, route)	Ref
			PK				
ATX inhibitors	PharmAkea Eli Lilly Co.	≤0.5 μM (LPC assay) < 1.7 nM (LPC assay) < 2 nM (human whole blood)	C _{max} ≈ 24 mM		> 50%	Metabolic disorders (15 mg/kg) Inflammatory bowel disease (30 mg/kg, po) Paw inflammation (30 mg/kg, po) Multiple sclerosis (30 mg/kg, po)	[44] [45]
		5.1 nM (hATX, FS-3) 4.5 nM (hATX, LPC assay) 6.4–19 nM (ATX, LPC assay) 4.7–11.6 nM (plasma, LPC assay) 20–30 nM (plasma, LC-MS/MS)	T _{1/2(h)} = 2.5 ± 0.3 AUC _{C₀(qg/h/ml)} = 1.11 ± 0.27	≈ 50% > 90%	> 60% > 70%	Prostatic hyperplasia (0.3–10 mg/kg, id) Breast cancer (10 mg/kg, po) Thyroid cancer (2 mg/kg, po)	[46] [47,48] [49]
	ONO-8430506	140/450 nM (16:0/18:0 LPC assay)					
	GWJ-A-23						
	GLPG 1690	131 nM (ATX, LPC assay) 242–542 nM (plasma, LPC assay)	C _{max} = 40 μM T _{1/2(min)} = 30 C _{max} = 1–21.37 ng/ml AUC _{C₀(qg/h/ml)} = 5.5–101.2		50% ^a 84–95%	Pulmonary fibrosis (10 mg/kg, ip) Allergic inflammation (10 mg/kg, ip) Pulmonary fibrosis (10 or 30 mg/kg, in) Clinical Trials in IPF patients	[7] [50] [51] [52]
	PF-8380	1.16 ± 0.07 nM (mATX, FS-3) 2.8 ± 0.16 nM (hATX, FS-3) 1.7 ± 0.6 nM (hATX, LPC assay) 101 ± 0.036 nM (human blood) 60 nM (LPC assay) 0.17μM (FS3 assay)	C _{max} = 0.124–6.19 μM AUC _(q₀ h) = 0.48–56.6 EC ₅₀ = 51.7–84.6 nM	> 95%	> 90%	Arthritis Hyperalgesia (30 mg/kg, po) Glioblastoma (10 mg/kg, ip) Liver fibrosis (30 mg/kg, ip) Lung allograft fibrosis (30 mg/kg, po) Pulmonary fibrosis (30 mg/kg, ip) Melanoma Metastasis (0.1 mg/kg, ip)	[24] [53] [54] [55] [56] [37,57]
	GK442 BMP22		Vd = 3.9L/kg C = 8.6 ± 0.5 mL/min/kg T _{1/2(h)} = 10		50%		
	KI16425	0.34 μM (for hLPA1) 6.5 μM (for hLPA2) 0.93 μM (for hLPA3)				Rheumatoid arthritis (20 mg/kg,ip) Peritoneal Sepsis (20 mg/kg, ip) Myocardial Ischemia (10μM) Pancreatic cancer (10μM) Pulmonary fibrosis (20 mg/kg,sb) Pulmonary fibrosis (1–60 mg/kg, po)	[58] [59] [60] [61] [62] [8]
	Antalpa1 AM966	0.017 ± 0.002 μM (hLPA1, Ca flux) 1.6 ± 0.1 μM (hLPA3, Ca flux) 0.019 ± 0.002 μM(mLPA1, Ca flux) 0.17 ± 0.03 μM (mLPA3, Ca flux) 0.23 ± 0.10 μM (hLPA1/CHO, GTP-γS) 0.78 ± 0.07 μM (mLPA1/CHO, GTP-γS)	C _{max} = 41 μM AUC _{C₀(qg/ml)} = 55.9 Tl _{1/2(h)} = 1.5 C _{max} = 6200nM AUC _{C₀(qg/ml)} = 118.7				
	AM095					Pulmonary fibrosis (1–60 mg/kg, po) Kidney fibrosis (30 mg/kg, po) Scleroderma (30 mg/kg, po) Lung allograft fibrosis (30 mg/kg, po)	[19] [19] [19] [55]

^a Refers to BALFs; po: oral administration, id: intraduodenal, in: intranasal, ip: intraperitoneal, sb: subcutaneously, AUC: Area under curve.

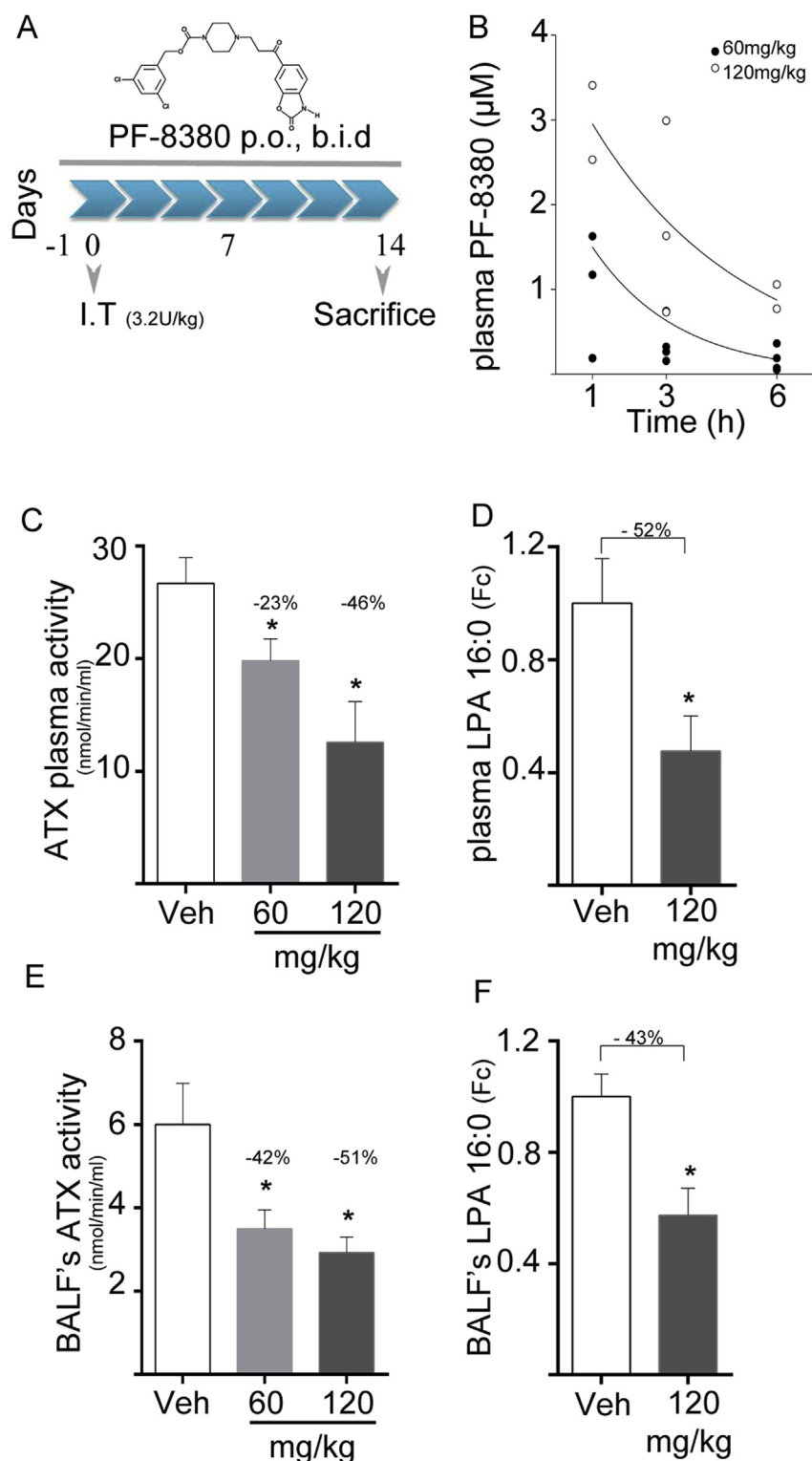


Fig. 1. Pharmacokinetic (PK) and pharmacodynamic (PD) profile of PF-8380. (A) Chemical structure of PF-8380 and schematic representation of experimental protocol. (B) PK profile of PF-8380 in plasma. (C) ATX activity in the plasmas of vehicle and PF-8380 treated mice. (D) Fold change (Fc) to vehicle values of plasma LPA 16:0 levels post PF-8380 administration. (E) ATX activity in bronchioalveolar lavage fluids (BALFs) of vehicle and PF-8380 treated mice. (F) BALF LPA 16:0 levels (Fc to vehicle values) post PF-8380 administration. In all panels, statistical significance was assessed with one-way ANOVA, complemented with Bonferroni or Dunn's multiple pair test accordingly. Values are presented as means ($\pm$ SEM); *denotes statistical significance ($p < 0.05$); $n = 5-8$ /group except A [3–5].

development of BLM-induced pulmonary fibrosis, with qualitative and quantitative differences in various aspects of disease development.

2. Materials and methods

2.1. Mice

All mice were bred at the local animal facility, under specific pathogen-free conditions. Mice were housed at a constant temperature of

20–22 °C in $55 \pm 5\%$ humidity and a 12-h light-dark cycle; water and food were given *ad libitum*. All reported experimentation was in line with the ARRIVE guidelines and had been approved by the Institutional Animal Ethical Committee (IAEC) of BSRC Alexander Fleming and the local governmental prefecture. All randomly-assigned, age-matched, experimental groups were composed of male littermate mice.

2.2. Mouse BLM model and drug administration protocol

Lung fibrosis was induced in C57BL/6J male mice (8–10 weeks old; average weight 25 g) by intratracheal (IT) administration of 3.2U/Kg bleomycin hydrogen chloride as previously described [7]. In a prophylactic setting, inhibitors were dosed twice daily (b.i.d.) for 15 days (from day –1 to 14). PF-8380 and AM095 were administered by oral gavage (p.o.) dissolved in vehicle (Hydroxypropyl Cellulose 2% (w/v)/Tween 80 0.1% (v/v)). Control mice received only the vehicle.

2.3. Bronchioalveolar lavage fluids (BALFs) collection and analysis

BALFs were collected following the previously described procedure [7]. Total protein concentration was assessed with Bradford protein assay according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Quantification of soluble collagen was performed using the Sirius Red assay protocol [7]. BALF samples were examined for LPA levels using HPLC- MS/MS [20].

2.4. Blood collection and analysis

Blood was collected 1, 3, 6 h upon last administration and plasma was prepared as previously described [21]. ATX activity in plasma samples was measured with the TOOS assay, and LPA levels, as well as PF-8380/AM095 concentrations were quantified with HPLC- MS/MS, as previously described [22].

2.5. Lung histopathological analysis

Lung tissues were stained with haematoxylin/eosin (H&E) or Masson's trichrome and immunostained with α -SMA antibody as previously described [21]. Histopathologic analysis of fibrosis was performed in a blinded fashion using the modified Ashcroft score [23]. Imaging was performed using a Nikon Eclipse E800 microscope (Nikon Corp., Shinagawa-ku, Japan) attached to a Q Imaging EXI Aqua digital camera, using the Q-Capture Pro 7 software.

2.6. RNA extraction and Real Time RT-PCR analysis

Total RNA was extracted from the left lung lobe using the reagents and the previously described procedure [21]. Primers sequence for *coll1a1* was the following: (f, 5'-CTA CTA CCG GGC CGA TGA TG-3'; r, 5'-CGA TCC AGT ACT CTC CGC TC-3', 188 bp). Real Time PCR analysis was performed as previously described [21]; expression values were normalized to the corresponding levels of β 2-microglobulin.

2.7. Statistical analysis

Unless otherwise indicated, statistical significance was assessed with one-way ANOVA, complemented with Bonferroni or Dunn's multiple pair test accordingly. Values are presented as means ($\pm$ SEM); *denotes statistical significance ($p < 0.05$).

3. Results and discussion

PF-8380 ([6-(3-(piperazin-1-yl) propanoyl)-benzo[d]oxazol-2(3H)-one]) (Fig. 1A) is an orally bioavailable small molecule ATX inhibitor with a low nanomolar IC_{50} *in vitro* (1.7–2.8 nM) [21,24]. PF-8380 (at 30 mg/kg) was shown to decrease LPA levels, both systemically and locally, resulting to the attenuation of inflammatory hyperalgesia in an rat air pouch model [18]. In order to evaluate the efficacy of PF-8380 in pulmonary fibrosis, we employed the, most widely used, BLM-induced animal model in mice [25]. An intratracheal (IT) challenge of BLM (3.2 U/Kg) was administered to littermate male mice, that were sacrificed 14 days later at the peak of the modeled disease in these settings [7]. The selected BLM dose was chosen after extensive local testing to

minimize lethality (for practical and ethical reasons) while preserving a robust phenotype that correlates with all standardized disease indices. Noteworthy, the severity of BLM effects depends on many different parameters, including the precise genetic background (i.e. C57BL6 J vs N, which might also further differ depending on vendor, country and local genetic drift), the health status of the corresponding animal facility, the dose, route and efficiency of BLM deliverance, the selected endpoints, as well as the assignment of littermate mice to sex-and-age-matched experimental groups.

PF-8380 (60 and 120 mg/kg), or the corresponding vehicle (Hydroxypropyl Cellulose 2% (w/v)/Tween 80 0.1% (v/v)) were dosed twice daily (b.i.d.) by oral gavage (p.o.) for 15 days (from day –1 to 14) (Fig. 1A). The doses were selected based on reported efficacies and preliminary local trials with this batch. 1, 3 and 6 h post the last administration mice were sacrificed and plasma, BALF and lung tissue were isolated. Pharmacokinetic (PK) analysis indicated adequate compound bioavailability (Fig. 1B), while pharmacodynamic analysis confirmed that PF-8380 decreases ATX activity and LPA levels in both plasma and BALF (Fig. 1 C-D and E-F respectively). Noteworthy, different LPA species were reported to be modulated by different ATX inhibitors in different experimental settings [14,17,18,26,27], most likely reflecting differences in plasma collection, lipid extraction and analytical MS/MS procedures. Moreover, LPA has a very rapid turnover, while the current state of art suggests that LPA forms and acts locally, facilitated by the cell surface associations and structural conformation of ATX [3,28]. Remarkable, BLM and PF-8380 administration resulted in fluctuations of plasma and BALF LPC levels (data not shown), reflecting a possible interaction of the PLA2/LPC and ATX/LPA axes [5], that requires further investigation. However, and given the large excess of LPC levels compared to the LPA levels, the different concentrations of the different LPC species in plasma and BALFs, as well as the rapid turnover of LPA, no secure conclusions can be reached on the possible substrate utilization of ATX in the context of pulmonary fibrosis.

Given the minimized lethality in the employed BLM model, no statistically significant effect on mice survival was noted following PF-8380 administration (Fig. 2A). However, ATX inhibition with PF-8380 decreased weight loss (Fig. 2B, C), a systemic indicator of BLM-induced damage and disease. On the other hand, no adverse effects to healthy mice have been observed upon the long term administration of high doses of PF-8380 or the inducible complete genetic deletion of ATX in adult mice [21], suggesting that the bulk of ATX activity is dispensable for adult healthy life and that ATX therapeutic targeting is not associated with toxicity.

LPA has several effects in endothelial physiology, while endothelial LPAR1 was suggested to mediate BLM-induced vascular leak [3,6]. Accordingly, ATX inhibition had significant effects in attenuating total protein concentration in BALFs (Fig. 2D), an indication of pulmonary edema. Beyond endothelial permeability *per se*, ATX/LPA has been suggested to promote the recruitment of inflammatory cells via different mechanisms [29–33]. In line, PF-8380 administration decreased inflammatory influx into the lungs (Fig. 2E), albeit not statistically significantly in this final endpoint. In the same BALFs, decreased soluble collagen levels were detected with Sirius red (Fig. 2F), in agreement with collagen 1 α 1 mRNA levels in lung tissue from the same mice, as detected with Real-Time RT-PCR (Fig. 2G). Histopathological analysis of pulmonary tissue by H&E staining and disease scoring (Ashcroft) indicated that ATX inhibition suppressed the BLM-induced alveolar septae thickening and the fibrous obliteration of the peribronchiolar and parenchymal regions (Fig. 3A and B). Moreover, myofibroblast numbers, as assessed with α -SMA immunostaining, as well as BLM-induced collagen deposition in the lungs, as assessed using Masson's trichrome staining, were also attenuated by PF-8380 (Fig. 3A).

All the published studies on the effects of pharmacological inhibition of ATX (Table 1), as well as the present one, have been performed in a prophylactic setting. Therefore, the effects of PF-8380 were also

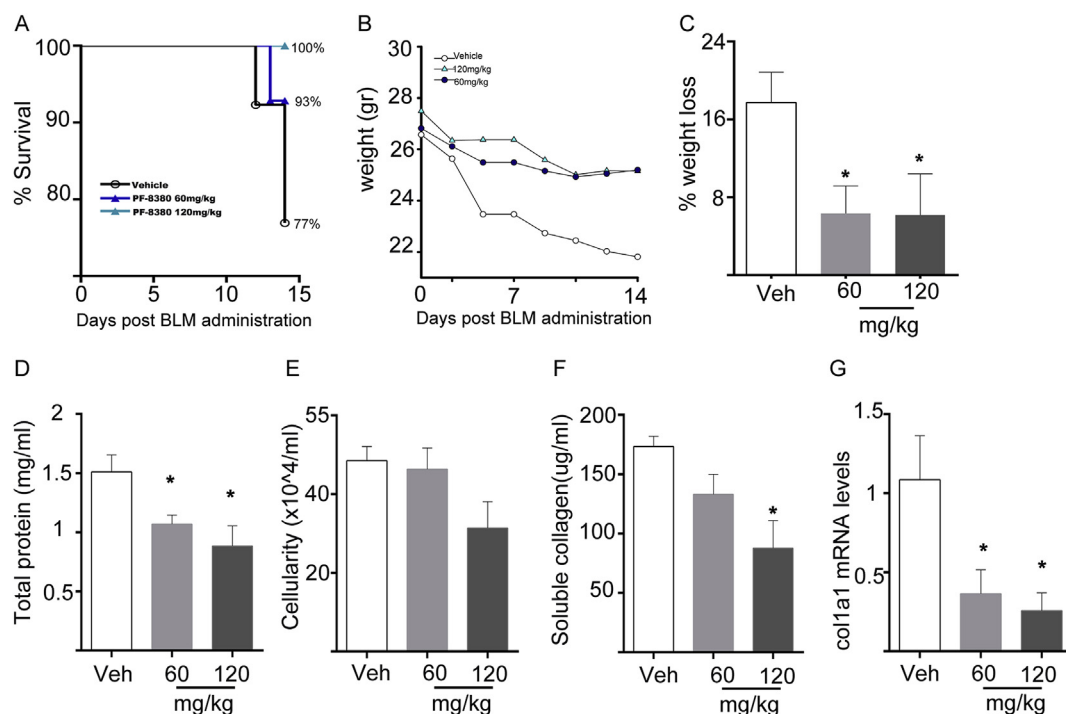


Fig. 2. Pharmaceutical targeting of autotaxin (ATX) with PF-8380 prevents the development of bleomycin (BLM)-induced pulmonary fibrosis. (A) Kaplan Meyer survival curve of experimental groups. (B) Body weight and (B) percentage (%) of weight loss upon BLM administration. (D) Total protein concentration in BALFs, as determined with the Bradford assay. (E) Total inflammatory cell count in BALFs. (F) BALFs soluble collagen content, as measured with Sirius Red. (G) Real-Time PCR analysis of relative *Col1a1* mRNA expression levels in lung tissues, normalized to the expression levels of $\beta 2$ -microglobulin (*ddct/b2M*). In all panels, statistical significance was assessed with one-way ANOVA, complemented with Bonferroni or Dunn's multiple pair test accordingly. Values are presented as means ($\pm$ SEM); *denotes statistical significance ($p < 0.05$); $n = 8$ –12/group. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

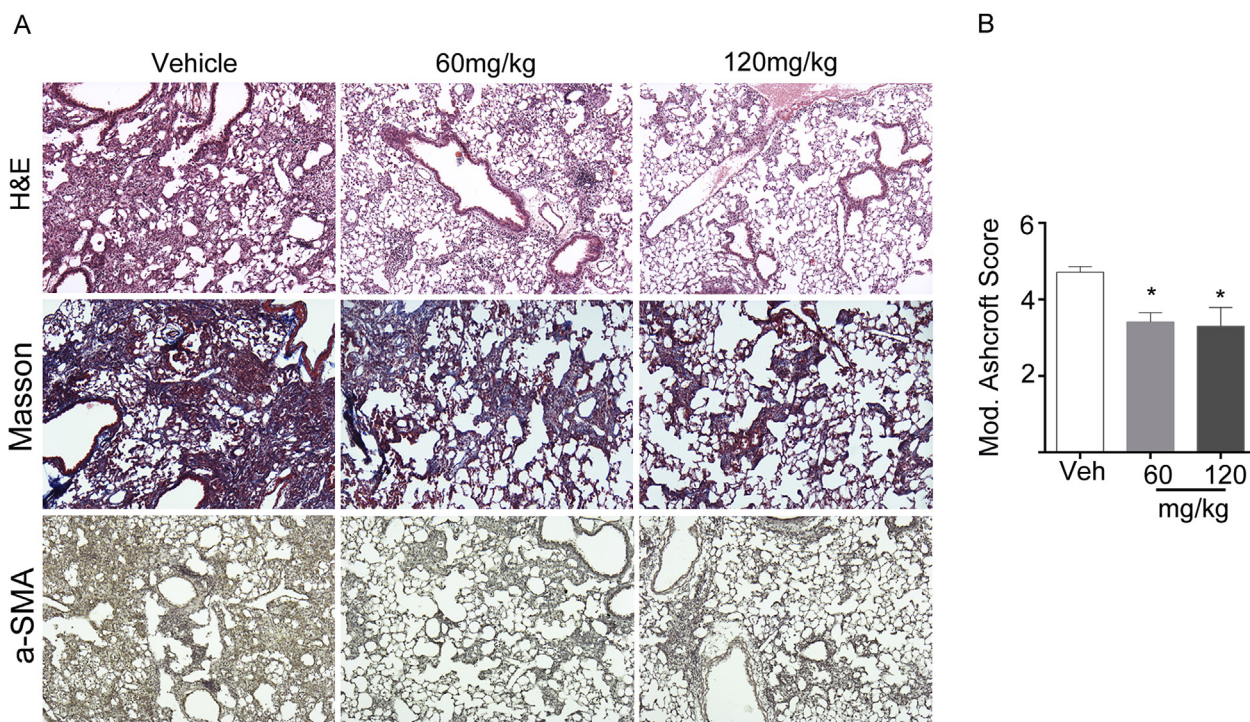


Fig. 3. PF-8380 decreases BLM-induced collagen deposition and myofibroblast accumulation in the lung and sustains a normal lung architecture. (A) Representative images of H&E/Masson/a-SMA-stained lung sections from BLM-challenged mice that either received vehicle or 60/120 mg/kg PF-8380. (B) Quantitative histopathological analysis of fibrosis was performed by the modified Ashcroft score.

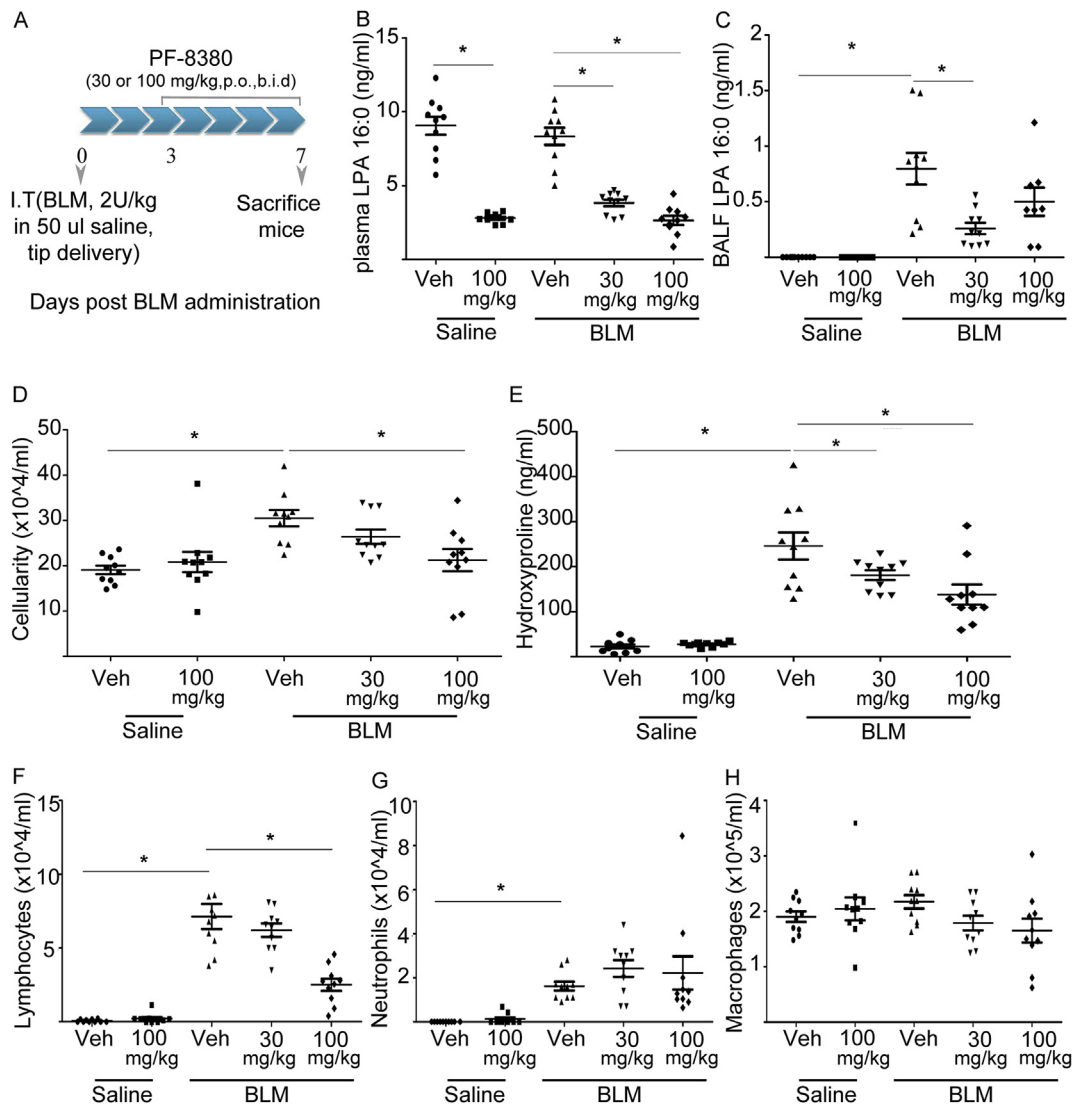


Fig. 4. Therapeutic administration of PF-8380 attenuates the development of BLM-induced pulmonary fibrosis. (A) Schematic representation of experimental protocol. (B–C) LPA 16:0 levels in plasma and BALF samples. (D) Total inflammatory cell counts in BALFs. (E) Collagen levels in lung tissue were evaluated with the hydroxyproline method. (F–H) BALFs differential cell count was quantified following Diff-Quik staining. Statistical significance was assessed with one-way ANOVA, complemented with Bonferroni multiple pair test, and are presented as means ($\pm$ SEM); *denotes statistical significance ($p < 0.05$); $n = 10$ /group.

evaluated independently (in a different animal facility) in a therapeutic setting in a 7-day disease model (Fig. 4A–H). PF-8380 was administered (30 and 100 mg/kg; p.o.; b.i.d.), 3 days post BLM treatment (2U/Kg; tip delivery) (Fig. 4A). ATX inhibition resulted, as expected, in decreases of LPA plasma and BALF levels (Fig. 4B and C) that were accompanied by decreases in pulmonary inflammation (Fig. 4D) and collagen deposition in the lung tissue, as measured with hydroxyproline content (Fig. 4E). Noteworthy, differential analysis of inflammatory BALF cells, indicated that ATX inhibition decreased only the infiltration of the lymphocytes in the BLM-challenged lung (Fig. 4F–H), in line with the suggested ATX/LPA effects on lymphocyte transmigration [29–33] and the previous reports suggesting that ATX/LPA have little effects in acute pulmonary inflammation [21]. A new PF-8380 derivative with improved properties was recently published [34], however its efficacy in animal models has not yet been reported.

Beyond ATX inhibition, LPAR1 antagonism has been also shown to prevent the development of BLM-induced fibrosis [8,19]. AM095 (sodium, {4'-[3-methyl-4-((R)-1-phenyl-ethoxycarbonylamino)-isoxazol-5-yl]-biphenyl-4-yl}-acetate) (Fig. 5A) is a selective, orally bioavailable LPAR1 antagonist with average IC_{50} values of 0.98 and 0.73 μ M for human and mouse LPAR1, respectively [19]. To confirm previous

findings and compare efficiencies, AM095 was administered (200 mg/kg; p.o.; b.i.d.; Fig. 5A) to BLM-challenged mice exactly as above; given that the vehicle used was the same as in the case of PF-8380, the experiments were performed simultaneously using the same control group for direct comparisons. PK analysis of AM095 indicated adequate compound bioavailability (Fig. 5B). No significant effects in mouse survival or weight loss were noted (Fig. 5C and D). However, LPAR1 antagonism reduced vascular leak (Fig. 5E) with minor effects in inflammation (Fig. 5F), as previously shown [3,6]. Moreover, blocking LPAR1 signaling resulted in the overall prevention of pulmonary fibrosis (Fig. 5G and H; Fig. 6A, B), despite that collagen metabolism *per se* seems unaffected (Fig. 5G and H), indicating, as previously suggested [6,35], that *de novo* collagen expression is not mediated through LPAR1. Overall, both ATX inhibition with PF-8380 as well as LPAR1 antagonism with AM095 were shown to potently protect from the development of BLM-induced pulmonary fibrosis, however with qualitative and quantitative differences. ATX inhibition and thus reduction of LPA levels was shown, in these formulations and experimental settings, to be more effective in lower compound concentrations and affecting more disease aspects while having better systemic effects. Noteworthy, the same compounds were both recently shown to also prevent lung

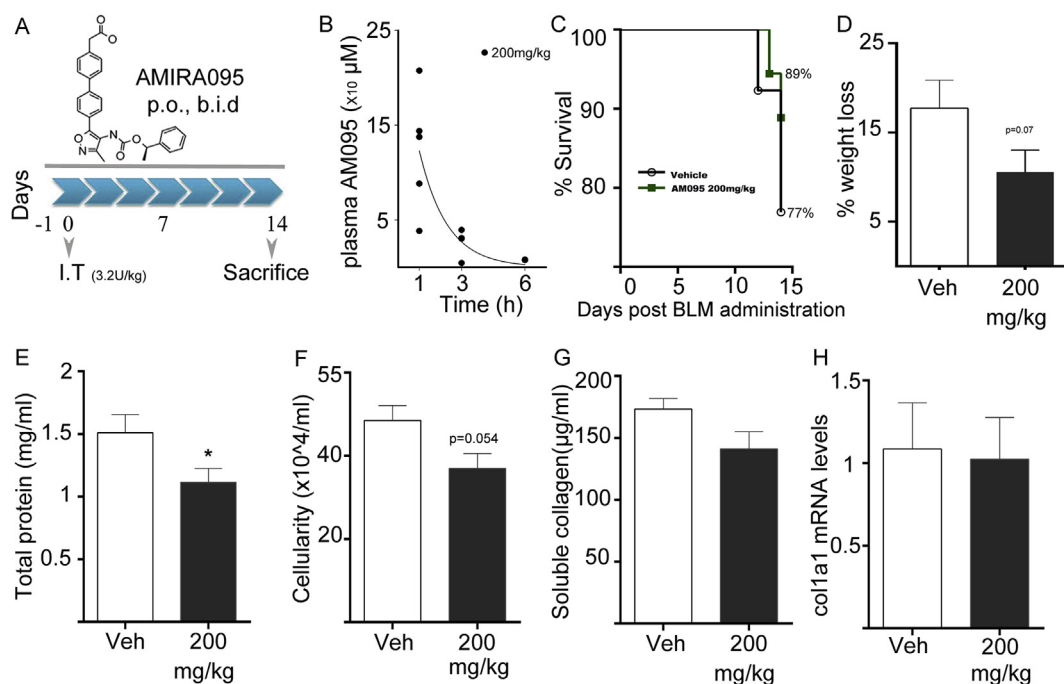


Fig. 5. AM095 reduces vascular leakage in bleomycin (BLM)-treated mice, resulting in the prevention of pulmonary fibrosis. (A) Chemical structure of AM095 and schematic representation of experimental protocol. (B) Pharmacokinetic profile of AM095 in plasma. (C) Kaplan Meyer survival curve of experimental groups. (D) Percentage (%) of weight loss upon BLM administration. (E) Total protein concentration in bronchoalveolar lavage fluids (BALFs), as determined with the Bradford assay. (F) Total inflammatory cell count in BALFs. (G) Real-Time RT-PCR analysis of relative *Col1a1* mRNA expression levels in lung tissues, normalized to the expression levels of β 2-microglobulin (ddct/b2M). (H) BALFs soluble collagen content, as measured with the Sirius Red assay. In all panels, statistical significance was assessed with unpaired Student t-test or Mann Whitney U test accordingly. Values are presented as means ($\pm$ SEM); *denotes statistical significance ($p < 0.05$). $n = 5$ –8/group except B [3–5]. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

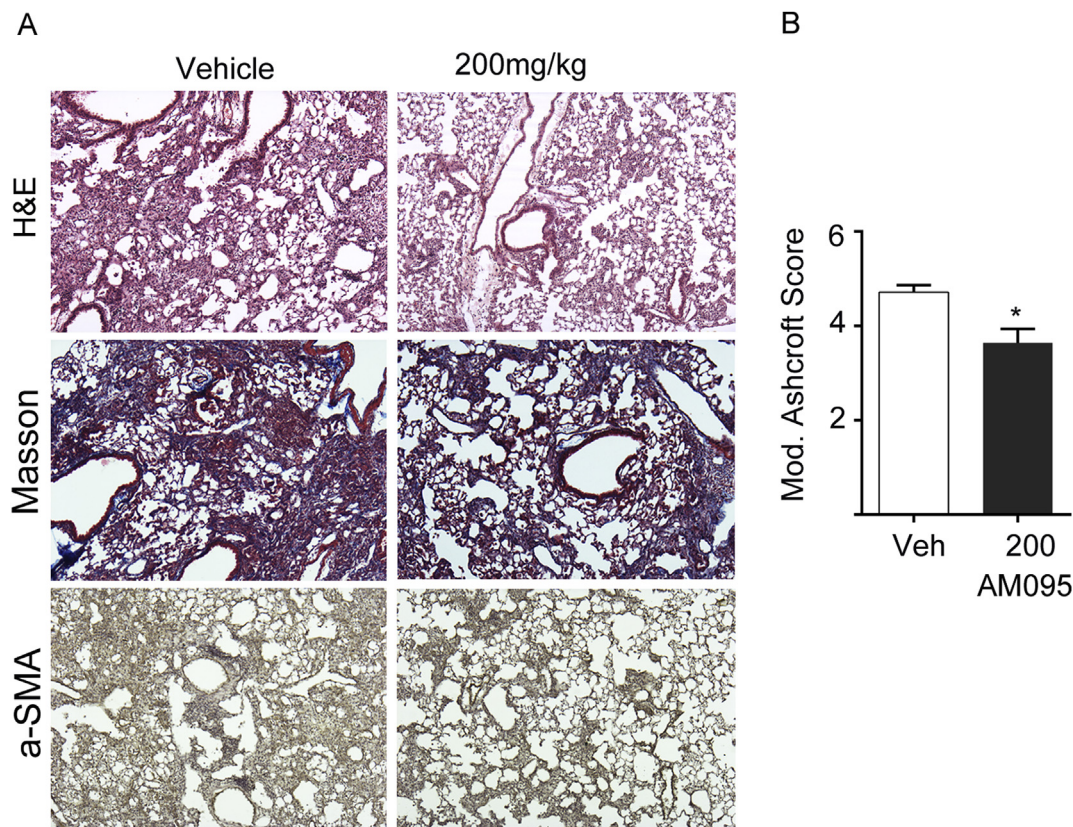


Fig. 6. LPAR1 antagonism with AM095 decreases BLM-induced collagen deposition and myofibroblast accumulation in the lung and sustains a normal lung architecture. (A) Representative images of H&E/Masson/a-SMA -stained lung sections from BLM-challenged mice that either received vehicle or 200 mg/kg AM095. (B) Quantitative histopathological analysis of fibrosis was performed by the modified Ashcroft score.

allograft fibrosis [36].

Interestingly, it has been reported that simultaneous ATX inhibition and LPAR1 antagonism, with different compounds, exhibited additive effects in inhibiting melanoma metastasis [37]. Given the current state of the art suggesting that ATX bound to membrane integrins delivers LPA to its adjacent receptors locally [3,28], simultaneous ATX inhibition and LPAR antagonism could offer improved efficacy at lower compound concentrations. This conceptual hypothesis is further supported by the reported efficacy of 1-bromo-3(S)-hydroxy-4-(palmitoyloxy)butyl-phosphonate (BrP-LPA), a metabolically stabilized LPA analog that acts as a dual function ATX inhibitor and pan-antagonist of LPA receptors [38]. BrP-LPA, despite its poor pharmacokinetic and pharmacodynamic profile [22], has been widely used and was shown effective in many pathophysiological situations with a proven involvement of the ATX/LPA axis [39–43]. The hypothesis was tested in the BLM model, by dual administration of low doses of PF-8380 and AM095 (60 and 100 mg/kg respectively; p.o.; b.i.d.). However, only minor, but promising, additive effects were observed (data not shown) with these compounds, formulations and experimental settings.

Taken together, ATX inhibition with PF-8380, one of the most potent small molecules reported, was shown for the first time to prevent BLM-induced pulmonary fibrosis. Moreover, the presented findings confirm again the key role of ATX in the pathogenesis of the modeled disease. ATX inhibition was shown for the first time that can work at a therapeutic setting, as compared with the prophylactic setting of all previous studies. In addition, ATX inhibition was shown, in these settings and with these compounds and formulations, to outperform LPAR1 antagonism in a head-to-head comparison, while suggesting that simultaneous interventions hold promise. Finally, it should be noted that LPA-stimulated cellular pathways are similar or converge to the same cellular hubs with the pathways that are targeted by the recently approved for IPF drugs (nintedanib and pirfenidone). Therefore, ATX inhibition could be also be proven useful as an adjuvant therapy for IPF, an intriguing hypothesis that awaits experimental confirmation.

Conflicts of interest

SM and CU are, and CS and DB were, Roche employees. DB is currently employed by GSK and CS by Janssen.

Acknowledgements

Supported by the Operational Program “Competitiveness, Entrepreneurship and Innovation 2014–2020”, co-financed by Greece and the European Union (European Regional Development Fund), Action code MIS 5002562.

References

- [1] A.L. Mora, M. Rojas, A. Pardo, M. Selman, Emerging therapies for idiopathic pulmonary fibrosis, a progressive age-related disease, *Nat. Rev. Drug Discov.* 16 (11) (2017) 755–772.
- [2] F.J. Martinez, H.R. Collard, A. Pardo, G. Raghu, L. Richeldi, M. Selman, et al., Idiopathic pulmonary fibrosis, *Nature reviews Disease primers* 3 (2017) 17074.
- [3] I. Ninou, C. Magkrioti, V. Aidinis, Autotaxin in pathophysiology and pulmonary fibrosis, *Front. Med.* 5 (2018 Jun 13) 180.
- [4] E. Barbayanni, E. Kaffé, V. Aidinis, G. Kokotos, Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, as a promising therapeutic target in chronic inflammation and cancer, *Prog. Lipid Res.* 58 (2015) 76–96.
- [5] I. Sevastou, E. Kaffé, M.A. Mouratis, V. Aidinis, Lysoglycerophospholipids in chronic inflammatory disorders: the PLA(2)/LPC and ATX/LPA axes, *Biochim. Biophys. Acta* 1831 (1) (2013) 42–60.
- [6] A.M. Tager, P. LaCamera, B.S. Shea, G.S. Campanella, M. Selman, Z. Zhao, et al., The lysophosphatidic acid receptor LPA1 links pulmonary fibrosis to lung injury by mediating fibroblast recruitment and vascular leak, *Nat. Med.* 14 (1) (2008) 45–54.
- [7] N. Oikonomou, M.A. Mouratis, A. Tzouveleakis, E. Kaffé, C. Valavanis, G. Vilaras, et al., Pulmonary autotaxin expression contributes to the pathogenesis of pulmonary fibrosis, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 47 (5) (2012) 566–574.
- [8] J.S. Swaney, C. Chapman, L.D. Correa, K.J. Stebbins, R.A. Bunday, P.C. Prodanovich, et al., A novel, orally active LPA(1) receptor antagonist inhibits lung fibrosis in the mouse bleomycin model, *Br. J. Pharmacol.* 160 (7) (2010) 1699–1713.
- [9] E. Barbayanni, V. Magrioti, P. Moutevelis-Minakakis, G. Kokotos, Autotaxin inhibitors: a patent review, *Expert Opin. Ther. Pat.* 23 (9) (2013 Sep) 1123–1132.
- [10] A. Nikolaou, M.G. Kokotou, D. Limnios, A. Psarra, G. Kokotos, Autotaxin inhibitors: a patent review (2012–2016), *Expert Opin. Ther. Pat.* 27 (7) (2017) 815–829.
- [11] Y. Kihara, H. Mizuno, J. Chun, Lysophospholipid receptors in drug discovery, *Exp. Cell Res.* 333 (2) (2015) 171–177.
- [12] C. Rancoule, J.P. Pradere, J. Gonzalez, J. Klein, P. Valet, J.L. Bascands, et al., Lysophosphatidic acid-1-receptor targeting agents for fibrosis, *Expert Opin. Invest. Drugs* 20 (5) (2011) 657–667.
- [13] G. Tigyi, Aiming drug discovery at lysophosphatidic acid targets, *Br. J. Pharmacol.* 161 (2) (2010) 241–270.
- [14] N. Desroy, C. Housseman, X. Bock, A. Joncour, N. Bienvenu, L. Cherel, et al., Discovery of 2-[[2-Ethyl-6-[4-[2-(3-hydroxyazetidin-1-yl)-2-oxo-ethyl]piperazin-1-yl]-8-methyl-imidazo[1,2-a]pyridin-3-yl]-methyl-amino]-4-(4-fluorophenyl)thiazole-5-carbonitrile (GLPG1690), a first-in-class autotaxin inhibitor undergoing clinical evaluation for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis, *J. Med. Chem.* 60 (9) (2017 May 11) 3580–3590.
- [15] A. Nikolaou, I. Ninou, M.G. Kokotou, E. Kaffé, A. Afantitis, V. Aidinis, et al., Hydroxamic acids constitute a novel class of autotaxin inhibitors that exhibit in vivo efficacy in a pulmonary fibrosis model, *J. Med. Chem.* 61 (8) (2018) 3697–3711.
- [16] K. Kato, H. Ikeda, S. Miyakawa, S. Futakawa, Y. Nonaka, M. Fujiwara, et al., Structural basis for specific inhibition of Autotaxin by a DNA aptamer, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 23 (5) (2016) 395–401.
- [17] K.E. Black, E. Berdyshev, G. Bain, F.V. Castellino, B.S. Shea, C.K. Probst, et al., Autotaxin activity increases locally following lung injury, but is not required for pulmonary lysophosphatidic acid production or fibrosis, *Faseb. J.* 30 (6) (2016) 2435–2450.
- [18] J.K. Gierse, A. Thorarensen, K. Beltey, E. Bradshaw-Pierce, L. Cortes-Burgos, T. Hall, et al., A novel autotaxin inhibitor reduces lysophosphatidic acid levels in plasma and the site of inflammation, *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 334 (1) (2010) 310–317.
- [19] J.S. Swaney, C. Chapman, L.D. Correa, K.J. Stebbins, A.R. Broadhead, G. Bain, et al., Pharmacokinetic and pharmacodynamic characterization of an oral lysophosphatidic acid type 1 receptor-selective antagonist, *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 336 (3) (2011) 693–700.
- [20] M.A. Mouratis, C. Magkrioti, N. Oikonomou, A. Katsifa, G.D. Prestwich, E. Kaffé, et al., Autotaxin and Endotoxin-Induced Acute Lung Injury, *PLoS One* 10 (7) (2015) e0133619.
- [21] A. Katsifa, E. Kaffé, N. Nikolaidou-Katsaridou, A.N. Economides, S. Newbigging, C. McKelvie, et al., The bulk of autotaxin activity is dispensable for adult mouse life, *PLoS One* 10 (11) (2015).
- [22] I. Nikitopoulou, E. Kaffé, I. Sevastou, I. Siriti, M. Samiotaki, D. Madan, et al., A metabolically-stabilized phosphonate analog of lysophosphatidic acid attenuates collagen-induced arthritis, *PLoS One* 8 (7) (2013) e70941.
- [23] R.H. Hubner, W. Gitter, N.E. El Mokhtari, M. Mathiak, M. Both, H. Bolte, et al., Standardized quantification of pulmonary fibrosis in histological samples, *Biotechniques* 44 (4) (2008) 14–17 507–11.
- [24] J. Gierse, A. Thorarensen, K. Beltey, E. Bradshaw-Pierce, L. Cortes-Burgos, T. Hall, et al., A novel autotaxin inhibitor reduces lysophosphatidic acid levels in plasma and the site of inflammation, *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 334 (1) (2010) 310–317.
- [25] M.A. Mouratis, V. Aidinis, Modeling pulmonary fibrosis with bleomycin, *Curr. Opin. Pulm. Med.* 17 (5) (2011) 355–361.
- [26] K. Thirunavukkarasu, B. Tan, C. Swearingen, G. Rocha, H. Bui, D. McCann, et al., Pharmacological characterization of a potent inhibitor of autotaxin in animal models of inflammatory bowel disease and multiple sclerosis, *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 359 (1) (2016 Oct) 207–214.
- [27] M. Baader, T. Bretschneider, A. Broermann, J.F. Rippmann, B. Stierstorfer, C.A. Kuttruff, et al., Characterisation of the properties of a selective, orally bioavailable autotaxin inhibitor in preclinical models of advanced stages of liver fibrosis, *Br. J. Pharmacol.* 175 (4) (2017 Feb) 693–707.
- [28] W.H. Moolenaar, A. Perrakis, Insights into autotaxin: how to produce and present a lipid mediator, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12 (2011).
- [29] H. Kanda, R. Newton, R. Klein, Y. Morita, M.D. Gunn, S.D. Rosen, Autotaxin, an ectoenzyme that produces lysophosphatidic acid, promotes the entry of lymphocytes into secondary lymphoid organs, *Nat. Immunol.* 9 (4) (2008) 415–423.
- [30] T. Nakasaki, T. Tanaka, S. Okudaira, M. Hirose, E. Umemoto, K. Otani, et al., Involvement of the lysophosphatidic acid-generating enzyme autotaxin in lymphocyte-endothelial cell interactions, *Am. J. Pathol.* 173 (5) (2008) 1566–1576.
- [31] Y. Zhang, Y.C. Chen, M.F. Krummel, S.D. Rosen, Autotaxin through lysophosphatidic acid stimulates polarization, motility, and transendothelial migration of naive T cells, *J. Immunol.* 189 (8) (2012) 3914–3924.
- [32] Z. Bai, L. Cai, E. Umamoto, A. Takeda, K. Tohya, Y. Komai, et al., Constitutive lymphocyte transmigration across the basal lamina of high endothelial venules is regulated by the autotaxin/lysophosphatidic acid axis, *J. Immunol.* 190 (5) (2013) 2036–2048.
- [33] S. Knowlden, S.N. Georas, The autotaxin-LPA axis emerges as a novel regulator of lymphocyte homing and inflammation, *J. Immunol.* 192 (3) (2014) 851–857.
- [34] C.A. Kuttruff, M. Ferrara, T. Bretschneider, S. Hoerer, S. Handschuh, B. Nosse, et al., Discovery of BI-2545: a novel autotaxin inhibitor that significantly reduces LPA levels in vivo, *ACS Med. Chem. Lett.* 8 (12) (2017) 1252–1257.
- [35] L.S. Huang, P. Fu, P. Patel, A. Harijith, T. Sun, Y. Zhao, et al., Lysophosphatidic acid receptor 2 deficiency confers protection against bleomycin-induced lung injury and fibrosis in mice, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 49 (6) (2013 Dec) 912–922.
- [36] P. Cao, Y. Aoki, L. Badri, N.M. Walker, C.M. Manning, A. Lagstein, et al., Autocrine

- lysophosphatidic acid signaling activates beta-catenin and promotes lung allograft fibrosis, *J. Clin. Invest.* 127 (4) (2017 Apr 3) 1517–1530.
- [37] S.C. Lee, Y. Fujiwara, J. Liu, J. Yue, Y. Shimizu, D.D. Norman, et al., Autotaxin, LPA receptors (1 and 5) exert disparate functions in tumor cells versus the host tissue microenvironment in melanoma invasion and metastasis, *Mol. Canc. Res.* 13 (1) (2014 Jan) 174–185.
- [38] G. Jiang, Y. Xu, Y. Fujiwara, T. Tsukahara, R. Tsukahara, J. Gajewiak, et al., Alpha-substituted phosphonate analogues of lysophosphatidic acid (LPA) selectively inhibit production and action of LPA, *ChemMedChem* 2 (5) (2007) 679–690.
- [39] G.D. Prestwich, J. Gajewiak, H. Zhang, X. Xu, G. Yang, M. Serban, Phosphatase-resistant analogues of lysophosphatidic acid: agonists promote healing, antagonists and autotaxin inhibitors treat cancer, *Biochim. Biophys. Acta* 8 (2008) 8.
- [40] H. Zhang, X. Xu, J. Gajewiak, R. Tsukahara, Y. Fujiwara, J. Liu, et al., Dual activity lysophosphatidic acid receptor pan-antagonist/autotaxin inhibitor reduces breast cancer cell migration in vitro and causes tumor regression in vivo, *Canc. Res.* 69 (13) (2009) 5441–5449.
- [41] X. Xu, G.D. Prestwich, Inhibition of tumor growth and angiogenesis by a lysophosphatidic acid antagonist in an engineered three-dimensional lung cancer xenograft model, *Cancer* 116 (7) (2010) 1739–1750.
- [42] G. Yang, H. Zhang, G.D. Prestwich, Tissue-Engineered “metastases”: treatment of hepatic colon tumors with a dual action autotaxin inhibitor-lysophosphatidic acid receptor antagonist, *J. Canc. Res. Updates* 1 (1) (2012) 69–77.
- [43] C. Zhao, M.J. Fernandes, G.D. Prestwich, M. Turgeon, J. Di Battista, T. Clair, et al., Regulation of lysophosphatidic acid receptor expression and function in human synovocytes: implications for rheumatoid arthritis? *Mol. Pharmacol.* 73 (2) (2008) 587–600.
- [44] Inc P, Methods and Compositions for the Treatment of Metabolic Disorders, (2016) WO2016028686A1.
- [45] S.B. Jones, L.A. Pfeifer, T.J. Bleisch, T.J. Beauchamp, J.D. Durbin, V.J. Klimkowski, et al., Novel autotaxin inhibitors for the treatment of osteoarthritis pain: lead optimization via structure-based drug design, *ACS Med. Chem. Lett.* 7 (9) (2016) 857–861.
- [46] H. Saga, A. Ohhata, A. Hayashi, M. Katoh, T. Maeda, H. Mizuno, et al., A Novel Highly Potent Autotaxin/ENPP2 Inhibitor Produces Prolonged Decreases in Plasma Lysophosphatidic Acid Formation In Vivo and Regulates Urethral Tension, *PLoS One* 9 (4) (2014) e93230.
- [47] M.G. Benesch, X. Tang, T. Maeda, A. Ohhata, Y.Y. Zhao, B.P. Kok, et al., Inhibition of autotaxin delays breast tumor growth and lung metastasis in mice, *Faseb. J.: Offic. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 28 (6) (2014) 2655–2666.
- [48] G. Venkatraman, M.G. Benesch, X. Tang, J. Dewald, T.P. McMullen, D.N. Brindley, Lysophosphatidate signaling stabilizes Nrf2 and increases the expression of genes involved in drug resistance and oxidative stress responses: implications for cancer treatment, *Faseb. J.: Offic. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 29 (3) (2015) 772–785.
- [49] M.G. Benesch, Y.M. Ko, X. Tang, J. Dewald, A. Lopez-Campistrous, Y.Y. Zhao, et al., Autotaxin is an inflammatory mediator and therapeutic target in thyroid cancer, *Endocr. Relat. Canc.* 22 (4) (2015) 593–607.
- [50] G.Y. Park, Y.G. Lee, E. Berdyshev, S. Nyenhuis, J. Du, P. Fu, et al., Autotaxin production of lysophosphatidic acid mediates allergic asthmatic inflammation, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 188 (8) (2013) 928–940.
- [51] N. Desroy, C. Housseman, X. Bock, A. Joncour, N. Bienvenu, L. Cherel, et al., Discovery of 2-[[2-Ethyl-6-[4-[2-(3-hydroxyazetidin-1-yl)-2-oxoethyl]piperazin-1-yl]-8-methylimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl]methylamino]-4-(4-fluorophenyl)thiazole-5-carbonitrile (GLPG1690), a first-in-class autotaxin inhibitor undergoing clinical evaluation for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis, *J. Med. Chem.* 60 (9) (2017) 3580–3590.
- [52] ClinicalTrials.gov, Study to Assess Safety, Tolerability, Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of GLPG1690, (2017) <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02738801>.
- [53] S.R. Bhawe, D.Y. Dadey, R.M. Karvas, D.J. Ferraro, R.P. Kotipatruni, J.J. Jaboin, et al., Autotaxin inhibition with PF-8380 enhances the radiosensitivity of human and murine glioblastoma cell lines, *Front Oncol* 3 (2013) 236.
- [54] E. Kaffé, A. Katsifa, N. Xylourgidis, I. Ninou, M. Zannikou, V. Harokopos, et al., Hepatocyte autotaxin expression promotes liver fibrosis and cancer, *Hepatology* 65 (4) (2017) 1369–1383.
- [55] P. Cao, Y. Aoki, L. Badri, N.M. Walker, C.M. Manning, A. Lagstein, et al., Autocrine lysophosphatidic acid signaling activates beta-catenin and promotes lung allograft fibrosis, *J. Clin. Invest.* 127 (4) (2017) 1517–1530.
- [56] A. Nikolaou, I. Ninou, M.G. Kokotou, E. Kaffé, A. Afantitis, V. Aidinis, et al., Hydroxamic acids constitute a novel class of autotaxin inhibitors that exhibit in vivo efficacy in a pulmonary fibrosis model, *J. Med. Chem.* 61 (8) (2018) 3697–3711.
- [57] R. Gupta, R. Patil, J. Liu, Y. Wang, S.C. Lee, Y. Fujiwara, et al., Benzyl and naphthalene methylphosphonic acid inhibitors of autotaxin with anti-invasive and anti-metastatic activity, *ChemMedChem* 6 (5) (2011) 922–935.
- [58] B. Orosa, S. Garcia, P. Martinez, A. Gonzalez, J.J. Gomez-Reino, C. Conde, Lysophosphatidic acid receptor inhibition as a new multipronged treatment for rheumatoid arthritis, *Ann. Rheum. Dis.* 73 (1) (2014) 298–305.
- [59] J. Zhao, J. Wei, N. Weathington, A.M. Jacko, H. Huang, A. Tsung, et al., Lysophosphatidic acid receptor 1 antagonist ki16425 blunts abdominal and systemic inflammation in a mouse model of peritoneal sepsis, *Transl. Res.* 166 (1) (2015) 80–88.
- [60] H. Chen, S. Liu, X. Liu, J. Yang, F. Wang, X. Cong, et al., Lysophosphatidic acid pretreatment attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury in the immature hearts of rats, *Front. Physiol.* 8 (2017) 153.
- [61] T. Yamada, K. Sato, M. Komachi, E. Malchinkhuu, M. Tobo, T. Kimura, et al., Lysophosphatidic acid (LPA) in malignant ascites stimulates motility of human pancreatic cancer cells through LPA1, *J. Biol. Chem.* 279 (8) (2004) 6595–6605.
- [62] N. Tang, Y. Zhao, R. Feng, Y. Liu, S. Wang, W. Wei, et al., Lysophosphatidic acid accelerates lung fibrosis by inducing differentiation of mesenchymal stem cells into myofibroblasts, *J. Cell Mol. Med.* 18 (1) (2014) 156–169.

Hydroxamic Acids Constitute a Novel Class of Autotaxin Inhibitors that Exhibit *in Vivo* Efficacy in a Pulmonary Fibrosis Model

Aikaterini Nikolaou,[†] Ioanna Ninou,[§] Maroula G. Kokotou,[†] Eleanna Kaffe,[§] Antreas Afantitis,[#] Vassilis Aidinis,[§] and George Kokotos^{*,†,‡}

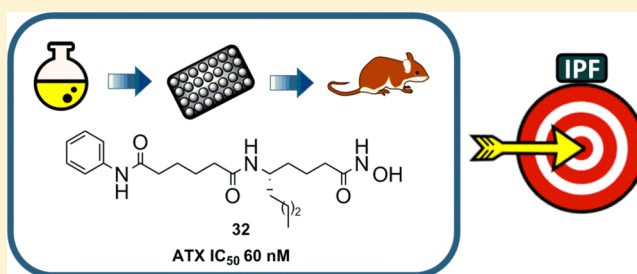
[†]Laboratory of Organic Chemistry, Department of Chemistry, National and Kapodistrian University of Athens, Panepistimiopolis, Athens 15771, Greece

[§]Division of Immunology, Biomedical Sciences Research Center “Alexander Fleming”, Athens 16672, Greece

[#]NovaMechanics Ltd, Nicosia 1065, Cyprus

S Supporting Information

ABSTRACT: Autotaxin (ATX) catalyzes the hydrolysis of lysophosphatidylcholine (LPC) generating the lipid mediator lysophosphatidic acid (LPA). Both ATX and LPA are involved in various pathological inflammatory conditions, including fibrosis and cancer, and have attracted great interest as medicinal targets over the past decade. Thus, the development of novel potent ATX inhibitors is of great importance. We have developed a novel class of ATX inhibitors containing the zinc binding functionality of hydroxamic acid. Such novel hydroxamic acids that incorporate a non-natural δ -amino acid residue exhibit high *in vitro* inhibitory potency over ATX (IC_{50} values 50–60 nM). Inhibitor 32, based on δ -norleucine, was tested for its efficacy in a mouse model of pulmonary inflammation and fibrosis induced by bleomycin and exhibited promising efficacy. The novel hydroxamic ATX inhibitors provide excellent tools for the study of the role of the enzyme and could contribute to the development of novel therapeutic agents for the treatment of fibrosis and other chronic inflammatory diseases.



INTRODUCTION

Autotaxin (ATX) is an enzyme that has attracted great interest as a medicinal target over the past decade.¹ It was originally isolated in 1992 as an autocrine motility factor from A2058 melanoma cells and characterized as a 125 kDa glycoprotein.² ATX, also known as ENPP2, belongs to the seven-membered family of ectonucleotidpyrophosphatases/phosphodiesterases (ENPPs), which are characterized by their ability to catalyze the hydrolysis of pyrophosphate or phosphodiester bonds in nucleotides.³ It is unique among the ENPPs, because it exhibits lysophospholipase D (lysoPLD) activity, catalyzing the hydrolysis of lysophosphatidylcholine (LPC) into lysophosphatidic acid (LPA) and choline (Figure 1).^{4,5} The bioactive lipid mediator LPA binds to specific G-protein-coupled receptors (LPA_{1–6} in mammals) and activates several signal transduction pathways including the migration, proliferation, and survival of various cell types.^{6,7} ATX is produced in various tissues and is essential for vascular development, but it has also been involved in a variety of chronic inflammatory conditions, such as arthritis and cancer, as summarized in various review articles.^{1,8–12} As a result, both ATX and LPA have been shown to be involved in pathological conditions, and their implications in human diseases make them attractive targets for the discovery of novel drugs.

ATX consists of two N-terminal somatomedin B-like domains (SMB1 and SMB2), a central catalytic phosphodies-

terase (PDE) domain, and a C-terminal nuclease-like domain. A threonine (T210) residue in the active site located in the phosphodiesterase domain, along with two zinc ions, is responsible for its hydrolytic catalytic mechanism.¹³ In 2011, Nishimasu et al. presented the crystal structures of mouse ATX alone and in complex with LPAs,¹⁴ which provide the first structural evidence for LPA production by ATX and reveal how ATX generates and delivers GPCR-signaling lipid mediators, while Hausmann et al. reported on the structural basis of substrate discrimination and integrin binding by ATX,¹⁵ describing how ATX promotes localized LPA signaling.

A variety of synthetic ATX inhibitors have been developed in both academia and pharmaceutical industry, and the chemical classes of synthetic inhibitors have been summarized in various review articles.^{1,16–19} The structures of selected ATX inhibitors are depicted in Figure 2. PF-8380 (1, Figure 2) exhibited low nanomolar IC_{50} in isolated enzyme assay (1.7 nM in LPC assay and 2.8 nM in FS-3 assay) and 101 nM IC_{50} in human whole blood.²⁰ It caused >95% reduction of rat plasma LPA at a dose of 30 mg/kg, and it reduced inflammatory hyperalgesia in a dose-responsive manner with the same efficacy as 30 mg/kg naproxen. HA155 (2, Figure 2) represents an important class of ATX inhibitors, the boronic acid derivatives.²¹ Inhibition of

Received: February 12, 2018

Published: April 5, 2018



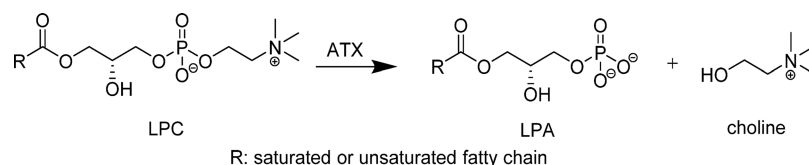


Figure 1. ATX hydrolyzes LPC to LPA and choline.

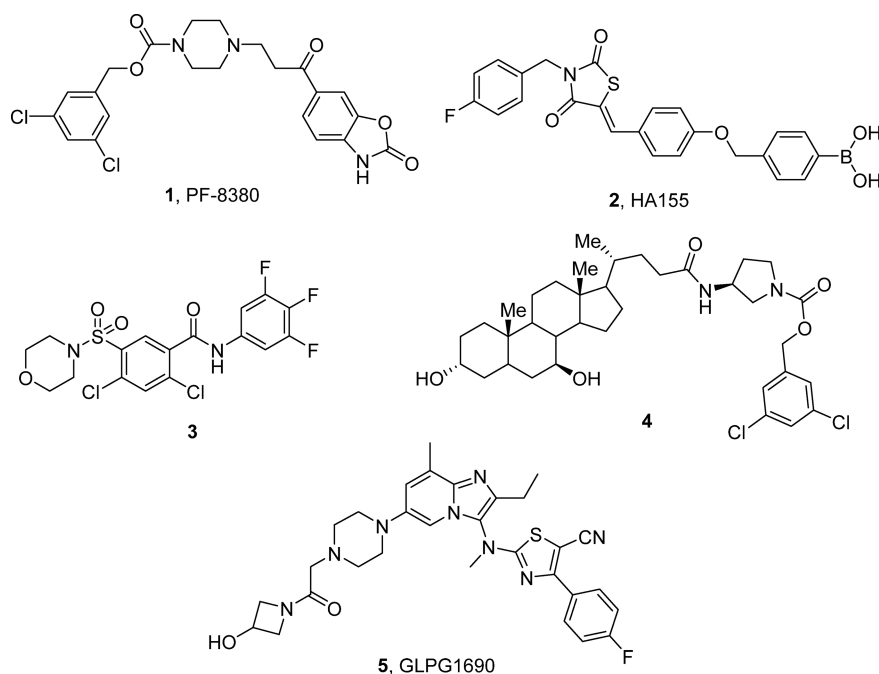


Figure 2. Structures of known ATX inhibitors.

ATX by the inhibitor ONO-8430506 (IC_{50} 100 nM) has shown to delay breast tumor growth and lung metastasis in mice.²² Within the last year exciting results on a number of novel inhibitors have been described. Highly potent non-carboxylic acid ATX inhibitors (for example, compound 3, Figure 2) were reported to reduce melanoma metastasis and chemotherapeutic resistance of breast cancer stem cells.²³ Miller et al. reported small molecule ATX inhibitors with a discrete binding mode,²⁴ while a structure-guided evolution of weak physiological allosteric inhibitors (bile salts)²⁵ led to the design of potent competitive ATX inhibitors (for example, compound 4, Figure 2) that do not interact with the catalytic site.²⁶ Galapagos reported an imidazo[1,2-*a*]pyridine series of ATX inhibitors,²⁷ demonstrating that inhibitor GLPG1690 (5, Figure 2) was efficacious in a bleomycin (BLM)-induced pulmonary fibrosis model in mice and in reducing extracellular matrix deposition in the lung.²⁸ This first-in-class ATX inhibitor is under evaluation in a phase 2 study in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) patients.

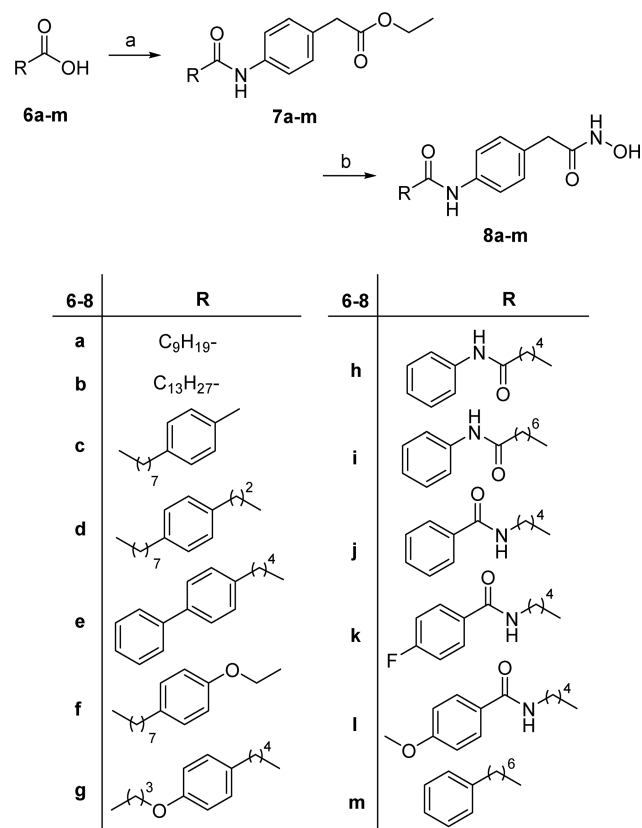
The aim of our work was to develop novel ATX inhibitors that may find applications *in vivo*. We envisaged that the hydroxamic acid functionality may target the active site of ATX, and in the present article, we present the synthesis of a series of novel hydroxamic acids, the evaluation of their *in vitro* activity against ATX and *in vivo* results demonstrating that such a novel hydroxamic acid inhibitor is active in a mouse model of pulmonary fibrosis.

RESULTS AND DISCUSSION

Design and Synthesis of Hydroxamic Acid Inhibitors.

Over the past decades, the biochemistry of hydroxamic acids has attracted considerable attention due to their pharmacological properties.^{29,30} Some of them have been advanced into human clinical trials for the treatment of several diseases. Vorinostat, a hydroxamic acid derivative that inhibits histone deacetylases, is an approved drug (under the name Zolinza) for T-cell lymphoma.³¹ In the case of vorinostat and related hydroxamic acid medicines (belinostat, panobinostat), the mechanism of action is based on enzyme inhibition through binding to Zn^{2+} ion. We decided to use the hydroxamic acid functionality as the zinc binding group in our ATX inhibitors, expecting interaction of the hydroxamic acid functionality with the active site Zn^{2+} of ATX.

We began our studies by synthesizing a number of hydroxamic acids incorporating the 4-aminophenylacetic acid residue, because phosphonic acids based on this moiety have been proven efficient inhibitors of ATX.^{32,33} The synthesis of such derivatives is presented in Scheme 1. Carboxylic acids 6a–m were converted into corresponding ethyl esters 7a–m, and subsequent treatment with hydroxylamine and EtONa led to hydroxamic acids 8a–m. The amino group of phenylacetic acid was coupled with a variety of carboxylic acids containing a medium or a long aliphatic chain or chains bearing an aromatic ring. The synthesis of carboxylic acids 6d, 6g, and 6k is presented in Scheme 2. Starting from aldehydes 9 and 12 and after a Wittig or a Horner–Emmons olefination reaction, respectively, the unsaturated derivatives 10 and 13 were

Scheme 1^a

^aReagents and conditions: (a) Ethyl 4-aminophenylacetate-HCl, EDCI-HCl, Et₃N, CH₂Cl₂, 0 °C to rt; (b) NH₂OH-HCl, EtONa, EtOH, 0 °C to rt.

hydrogenated leading to carboxylic acids **6d** and **6g** after saponification. Carboxylic acid **15** was coupled with ethyl 5-aminovalerate, and saponification led to acid **6k**. All the other carboxylic acids were either commercially available or synthesized as described in literature (see experimental part).

Since among them we identified a micromolar inhibitor of ATX, we synthesized the pentafluoromethyl ketone derivative **18** as well as the boronic acid derivative **21**, in order to compare their inhibitory abilities. Compound **18** was synthesized by conversion of **17** into the corresponding chloride and immediate treatment with pentafluoropropionic anhydride in the presence of pyridine (Scheme 3).³⁴ Commercially available boronic acid derivative **19** was coupled with **6h** using 1-ethyl-3-(3-(dimethylamino)propyl)carbodiimide (EDCI) as the coupling agent. The protecting group of **20** was removed under acidic conditions producing compound **21** (Scheme 3).

To introduce chirality in the backbone of hydroxamic acid potential inhibitors, the natural amino acid glutamic acid was used as a starting material. Dimethyl (S)-glutamate **22** was acylated by a number of carboxylic acids to afford compounds **23a–e** (Scheme 4). Hydroxamic acid derivatives **24a–e** were obtained by treatment of **23a–e** with MeONa, while compound **25a** containing two hydroxamic acid functionalities was also synthesized (Scheme 4). Compounds **28a,b** were synthesized by a similar procedure, as shown in Scheme 5, starting from dimethyl (S)-2-aminohexanedioate (**26**), which was synthesized as described in literature.³⁵

We had previously described the synthesis of non-natural optically pure δ -amino acids.^{36,37} Starting from Boc-protected

δ -norleucine (**29**), we synthesized methyl ester **31**, which was converted to hydroxamic acid **32** (Scheme 6).

In Vitro Inhibition of ATX: Structure–Activity Relationship Studies. All synthesized hydroxamic acid derivatives were tested for their *in vitro* activity on recombinant mouse ATX using the Amplex Red PLD assay kit (Molecular Probes, Interchim, Montluçon, France).^{32,38} LPC (16:0 and 18:0) was used as substrate, and the inhibition results are presented in Tables 1–3. The molecular weights of the new synthetic compounds as well as the ClogP values, calculated using ChemOffice Ultra 11.00, are included in Tables 1–3. Reasonable molecular weights and lipophilicity are important for the drug-likeness of an ATX inhibitor, and thus, such physicochemical properties should be taken into consideration.¹⁹

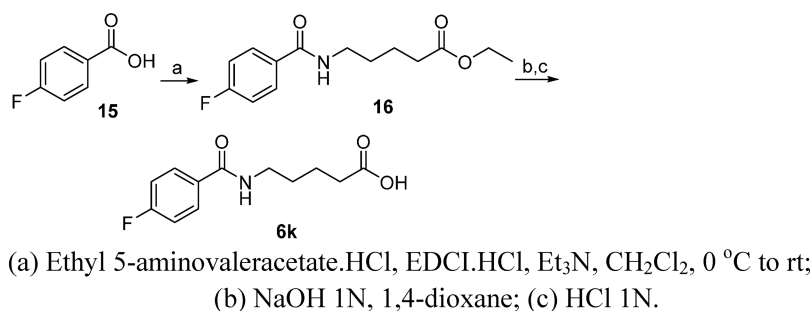
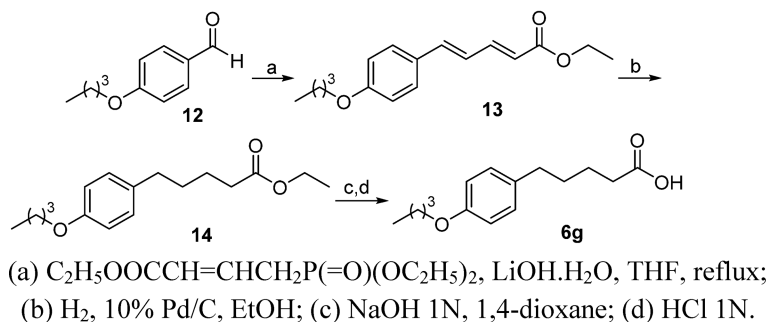
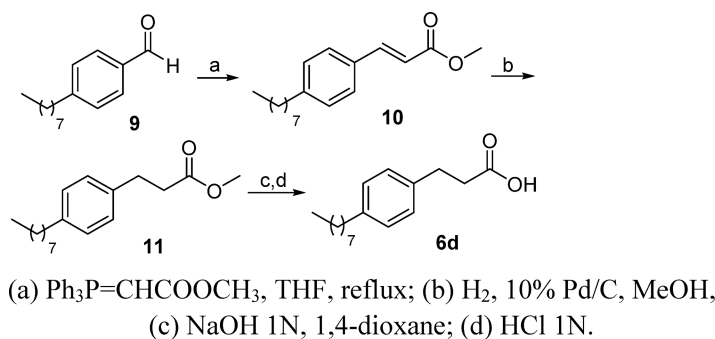
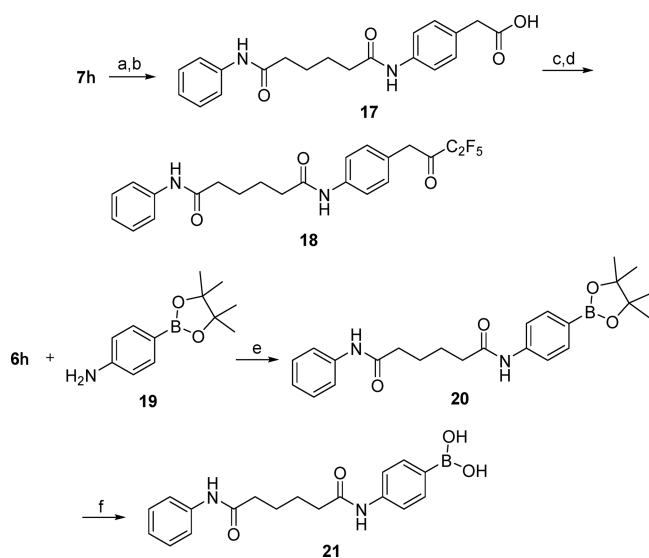
At first, hydroxamic acids based on 4-aminophenylacetic acid were tested, and the results are summarized in Table 1. Compound **8b** containing a long acyl chain of 14 carbon atoms exhibited an IC₅₀ value of 1 μ M. Its comparison with compound **8a** containing a shorter acyl chain of 10 carbon atoms (IC₅₀ higher than 5 μ M) clearly indicates that the inhibitor should be lipophilic enough. To reduce the lipophilicity and the flexibility, the long chain was replaced by various chains incorporating a benzene ring. None of the compounds **8c**, **8d**, and **8e** presented any appreciable inhibitory activity. Insertion of an oxygen atom at the β -position to the amide carbonyl (compound **8f**) led to interesting inhibition results (IC₅₀ 1 μ M), while insertion of the oxygen atom at the other side of the benzene ring (compound **8g**) led to modest inhibitory activity (IC₅₀ 4 μ M).

Compound **8h** consisting of a short acyl chain carrying a benzene ring linked by an amide bond showed a promising IC₅₀ value of 1.2 μ M (Table 1). Its low lipophilicity (ClogP 0.89) is an additional attractive property. Increase of the carbon atom number from 4 to 6 (compound **8i**) led to decrease of IC₅₀ (2 μ M). Inversion of the amide bond of **8h** (compound **8j**) led to similar results (IC₅₀ 1 μ M). The introduction of a substituent at the *para* position gave the same results in the case of a methoxy group (compound **8l**), while it had a detrimental effect in the case of a fluorine atom (compound **8k**). Finally, the 7-phenylheptanoyl chain (compound **8m**) led again to promising inhibitory potency (IC₅₀ 0.7 μ M). It should be noticed that using 18:0 LPC as a substrate, instead of 16:0 LPC, we observed lower IC₅₀ values (0.2–0.3 μ M) in the case of compounds **8b**, **8f**, and **8j**, but a higher value for **8m** (2 μ M).

The next step was to confirm that the hydroxamic acid functionality indeed led to better inhibitory activities in comparison to other functionalities (Table 2). Replacement of the hydroxamic acid functionality by a simple carboxyl group (compound **17**) abolished the inhibitory activity. A pentafluoroethyl ketone functionality (compound **18**) led to IC₅₀ values of 3 μ M and 0.5 μ M for 16:0 LPC and 18:0 LPC, respectively. The structurally related boronic acid derivative **21** exhibited IC₅₀ values of 0.7 μ M and 4 μ M for 16:0 LPC and 18:0 LPC, respectively.

The above structure–activity relationship studies confirmed that the hydroxamic acid functionality may efficiently serve as a novel functionality targeting ATX. Thus, we decided to keep the hydroxamic acid functionality and the 6-oxo-6-(phenylamino)hexanoyl chain of compound **8h** and to replace the 4-aminophenylacetic acid residue by an amino acid residue, thus introducing chirality into our molecules. Glutamic acid was selected, because it confers a distance of three carbon atoms

Scheme 2

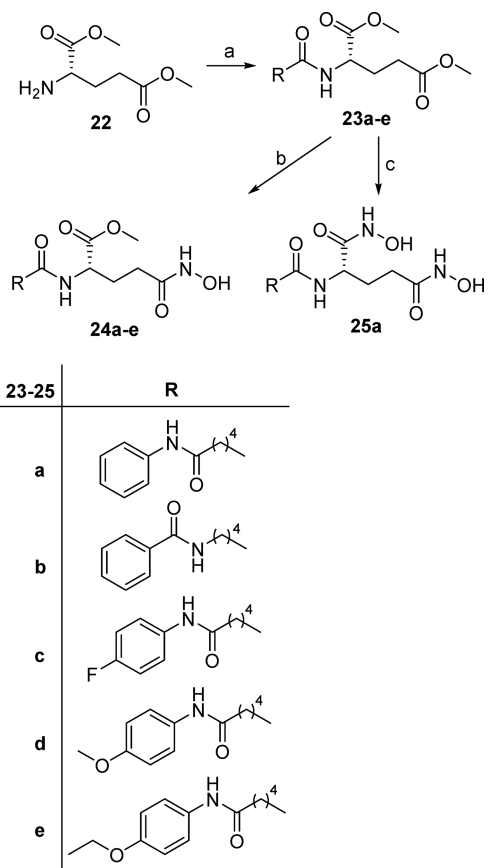
Scheme 3^a

^aReagents and conditions: (a) NaOH, 1,4-dioxane; (b) HCl 1 N; (c) (COCl)₂, DMF, CH₂Cl₂; (d) pyridine, pentafluoropropionic anhydride, CH₂Cl₂; (e) EDCI.HCl, Et₃N, CH₂Cl₂, 0 °C to rt; (f) HCl 1 N, THF.

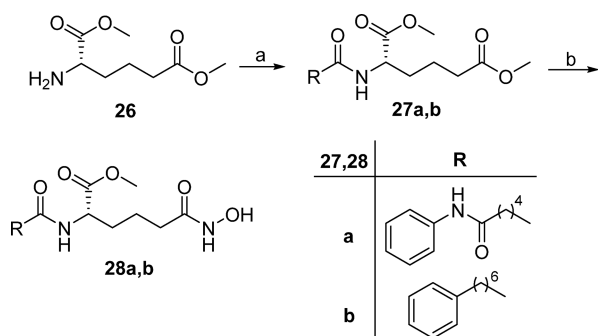
between the amino group and the side chain carboxyl group. Gratifyingly, compound **24a** based on γ -hydroxamate α -methyl (S)-glutamate exhibited an IC_{50} value of 0.4 μM (Table 3). However, conversion of both carboxylic groups of glutamic acid to hydroxamic acid groups (compound **25a**) led to loss of the inhibitory activity. The inversion of the amide bond of **24a** (compound **24b**) destroyed the activity, while the introduction of substituents at the *para*-position (compounds **24c–e**) had also detrimental effects.

Increase of the distance between the hydroxamic acid functionality and the amino group of the amino acid residue by one carbon atom proved critical and led to a potent ATX inhibitor. Compound **28a** (GK400) presented an IC_{50} value of 0.05 μM (Table 3). Replacement of the 6-oxo-6-(phenylamino)hexanoyl chain by the 7-phenylheptanoyl chain (compound **28b**) destroyed the inhibitory activity. Finally, compound **32** (GK442) based on the non-natural amino acid δ -norleucine exhibited potent inhibitory activity with an IC_{50} value of 0.06 μM , confirming the importance of the four-carbon atoms distance between the hydroxamic acid functionality and the amino group and that the backbone of a δ -amino acid confers the appropriate distances between the essential functionalities.

Among the novel hydroxamic acids developed in this work, compound **32** presents potent *in vitro* inhibition of ATX (IC_{50}

Scheme 4^a

^aReagents and conditions: (a) RCOOH, EDCI·HCl, Et₃N, HOBT, CH₂Cl₂, 0 °C to rt; (b) NH₂OH·HCl, MeONa, MeOH, 0 °C to rt; (c) NH₂OH·HCl, EtONa, EtOH, 0 °C to rt to reflux.

Scheme 5^a

^aReagents and conditions: (a) RCOOH, EDCI·HCl, Et₃N, HOBT, CH₂Cl₂, 0 °C to rt; (b) NH₂OH·HCl, MeONa, MeOH, 0 °C to rt.

0.06 μM) and possesses favorable lipophilicity (ClogP 1.11) and thus was selected for *in vivo* studies.

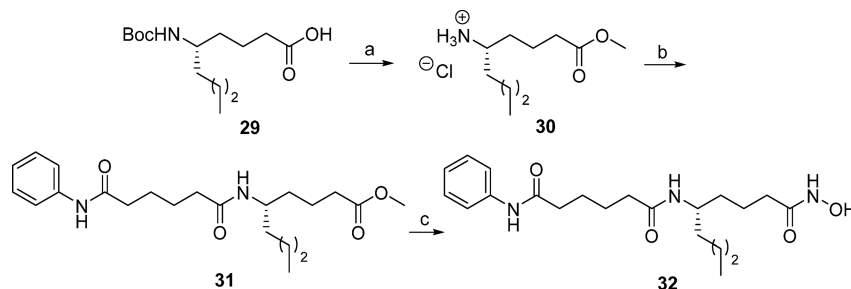
Binding Mode of Inhibitor 32 to ATX. Computational studies, such as molecular docking and virtual screening, may provide new insights into the inhibitory surfaces of crystal structure of ATX and may contribute to the development of improved small molecule ATX inhibitors.^{39,40} Since hydroxamic acids represent a novel class of ATX inhibitors, docking studies were performed to elucidate the binding mode and interactions of the most potent inhibitor 32. For the docking studies, the crystal structure of ATX (PDB code 2XRG) was employed.¹⁵

The nanomolar boronic-type ATX inhibitor HA155 interacts with the active site forming a reversible covalent bond between the boron atom and the hydroxyl group of the catalytic residue Thr209 of mouse ATX, which is further stabilized by two zinc ions (Figure 3a).⁴¹ The hydroxamic acid functionality of inhibitor 32 (GK442) similarly interacts with Thr209 in addition to Asn230 and Tyr306 (Figure 3b).

In Vivo Effect of Inhibitor 32 on a Mouse Pulmonary Fibrosis Model. IPF is a disease characterized by progressive and irreversible scarring of the lung.^{42–44} The disease is fatal, with a median survival time between 3 and 5 years from diagnosis. The pathogenesis of IPF is not completely understood, and limited therapeutic options exist. In 2014, two drugs that slow the progression of the disease, pirfenidone,⁴⁵ a drug with poorly understood mechanisms, and nintedanib,⁴⁶ a tyrosine kinase inhibitor, have been formally registered. However, it is unclear whether these drugs improve symptoms such as dyspnea and cough or whether their beneficial effect on functional decline results in increased survival. Thus, new therapeutic approaches that substantially improve the survival time and quality of life of IPF patients are urgently needed.⁴⁴

Recent studies indicate an increase in LPA levels in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of IPF patients, as well as increased ATX levels in the lung.⁴⁷ Galapagos has recently reported that a first-in-class ATX inhibitor, GLPG1690 (5, Figure 2), has been efficacious in a bleomycin-induced pulmonary fibrosis model in mice.²⁸ GLPG1690 has entered clinical trials, and most recently positive top line results with GLPG1690 in patients with IPF in the FLORA Phase 2a trial have been announced.⁴⁸

The bleomycin-induced pulmonary fibrosis model in rodents is considered the most commonly used animal model to investigate the potential of new agents as novel therapies for IPF.⁴⁹ One of our most potent *in vitro* hydroxamic acids, inhibitor 32, was tested for its efficacy in a 14-day model of pulmonary inflammation and fibrosis induced by bleomycin. C57Bl/6 BLM-challenged mice were injected intraperitoneally with 30 mg/kg of inhibitor 32 or vehicle once daily for 15 days started on day –1 prior to bleomycin installation. The administered dose was selected based on reported efficiencies of known ATX inhibitors. The efficacy of inhibitor 32 was evaluated based on histopathological changes in lung architecture, BALF total inflammatory cells as well as BALF's protein and collagen content. As shown in Figure 4A, bleomycin administration resulted in thickening of the alveolar septa, alveolar inflammation, and formation of fibrotic masses. ATX inhibition improved lung architecture; contiguous fibrotic walls and fewer fibrotic lesions were predominantly observed in microscopic field of HE lung tissues. Moreover, bleomycin administration caused inflammatory cell influx (neutrophils, macrophages, and lymphocytes, etc.) in bronchoalveolar lavage fluid as compared to control group (Figure 4B), which was decreased by 50% upon inhibitor 32 treatment. Furthermore, bleomycin lung injury induced an increase in pulmonary vascular permeability, which was reflected by an increase in BALF total protein after challenge (8-fold compared to control group, Figure 4C). The total protein concentration in BALF of BLM-challenged mice that received the inhibitor 32 was markedly reduced compared to vehicle group (Figure 4C). Another hallmark of bleomycin injury, increased collagen production and deposition in lung and BAL fluids, was also abrogated by inhibitor 32 (Figure 4D). In addition, BALF ATX

Scheme 6^a

^aReagents and conditions: (a) SOCl_2 , MeOH, 0 °C to rt; (b) **6h**, EDCI·HCl, Et_3N , HOBt, CH_2Cl_2 , 0 °C to rt; (c) $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, EtONa, EtOH, 0 °C to rt.

activity reduced back to normal level after treatment with inhibitor **32** (Figure 4E). Taken together these observations suggested that the hydroxamic acid inhibitors have beneficial effects in the development of pulmonary fibrosis.

An LC–MS/MS method for the determination of inhibitor **32** was developed and its levels in mice plasma were quantified. Blood was sampled 1, 3, and 6 h postdosing for the determination of the levels of inhibitor **32** and mean plasma concentrations of **32** are shown in Figure 4F. Following ip administration of inhibitor **32** at a dose of 30 mg/kg, a concentration of 70 ng/mL was detected after 1 h, while after 3 and 6 h, 35 ng/mL were present in plasma.

CONCLUSION

In conclusion, we describe a novel class of ATX inhibitors based on the hydroxamic acid functionality. Structure–activity relationship studies led to identification of hydroxamic acid derivatives of δ -amino acids presenting inhibitory potency over ATX at the nanomolar range and highlighting the importance of the four-carbon atoms distance between the hydroxamic acid functionality and the amino group. Inhibitor **32**, a hydroxamic acid derivative based on δ -norleucine, presented an IC_{50} value of 60 nM and exhibited promising efficacy in a mouse model of pulmonary inflammation and fibrosis induced by bleomycin. The low lipophilicity of inhibitor **32** (ClogP 1.11) together with the fact that the hydroxamic acid functionality is present in marketed drugs make it an attractive candidate for further studies. The novel hydroxamic ATX inhibitors may be excellent tools for the study of the role of the enzyme in cells and in animals and may contribute to the development of novel medicinal agents for the treatment of inflammatory diseases.

EXPERIMENTAL SECTION

General. Chromatographic purification of products was accomplished using Merck Silica Gel 60 (70–230 or 230–400 mesh). Thin-layer chromatography (TLC) was performed on Silica Gel 60 F254 aluminum plates. TLC pots were visualized with UV light or phosphomolybdic acid in EtOH. Melting points were determined using a Büchi 530 apparatus and were uncorrected. ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a Varian Mercury (200 and 50 MHz, respectively) in CDCl_3 , CD_3OD , and $\text{DMSO}-d_6$. Chemical shifts are given in ppm and coupling constants (J) in Hz. Peak multiplicities are described as follows: s, singlet, d, doublet, t, triplet, and m, multiplet. Electron spray ionization (ESI) mass spectra were recorded on a Finnigan, Surveyor MSQ Plus spectrometer. HRMS spectra were recorded on a Bruker Maxis Impact QTOF Spectrometer. Dichloromethane was dried by standard procedures and stored over molecular sieves. All other solvents and chemicals were reagent grade and used without further purification. The purity of all compounds subjected to

biological tests was determined by analytical HPLC and was found to be $\geq 95\%$. HPLC analyses were carried out on a Shimadzu LC-2010AHT system and an ODS Hypersil (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm) analytical column, using H_2O /acetonitrile 20/80 v/v at a flow rate of 1.0 mL/min.

Synthesis. Carboxylic acids **6a–c**, **6m**, and 4-aminophenylboronic acid pinacol ester **19** are commercially available. Carboxylic acids **6e**,⁵⁰ **6f**,⁵¹ **6h**,⁵² **6i**,⁵³ **6j**,⁵⁴ and **6l**,⁵⁴ ethyl 4-aminophenylacetate·HCl,⁵⁵ ethyl 5-aminovalerate·HCl,⁵⁶ diethyl (S)-glutamate·HCl (**22**),⁵⁷ and dimethyl (S)-2-aminohexanedioate (**26**)⁵⁸ were synthesized as described elsewhere, and their analytical data are in accordance with literature.

Method A. A solution of the ester (1.00 mmol) in 1,4-dioxane (2 mL) was treated with NaOH, 1 N (1.5 equiv, 1.5 mL, 1.50 mmol), at room temperature overnight. The solvent was removed in vacuo, H_2O (10 mL) was added, and the solution was extracted with Et_2O (10 mL). Then the aqueous phase was acidified with 1 N HCl and extracted with Et_2O (3 $\times$ 10 mL). The solvent was removed in vacuo to afford the acid.

Method B. To a stirred solution of the amine (1.0 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (10 mL), Et_3N (2.2 equiv, 0.31 mL, 2.2 mmol) in case of hydrochloride salt of the amine or 1.1 equiv, 0.15 mL, 1.1 mmol in case of free amine), EDCI (1.2 equiv, 230 mg, 1.2 mmol), and the appropriate acid (1.2 equiv, 1.2 mmol) were added at 0 °C. HOBt (1.0 equiv, 1.0 mmol, 140 mg) was added if an asymmetric center existed. The reaction was stirred overnight at room temperature under argon and then washed with H_2O . The product was obtained after drying the organic phase over anhydrous Na_2SO_4 , evaporation of the solvent under reduced pressure, and purification by column chromatography.

Method C. To a stirred solution of esters **7a–m** and **31** (1.0 mmol) in EtOH (4 mL), which was cooled at 0 °C, $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (10.0 equiv, 695 mg, 10.0 mmol) and a solution of 21% w/w EtONa (20.0 equiv, 1.36 g, 20.0 mmol) in EtOH (7.25 mL) were added. The solution was stirred at room temperature for 2–24 h under argon and quenched by adding HCl, 6 N. The pH was adjusted to 8 by the addition of 1 N NaOH, and the organic solvent was evaporated under reduced pressure. Chloroform was added, and the product, which remained insoluble, was collected on a filter and washed consecutively with chloroform, methanol, and diethyl ether.

Method D. A mixture of the unsaturated ester **10** or **13** (1.00 mmol) in MeOH (10 mL) and 10% palladium on activated carbon (27 mg) was hydrogenated for 12 h. After filtration through a pad of Celite, the solvent was removed in vacuo to give the saturated compound.

Method E. To a stirred solution of esters **23a–e**, and **27a,b** (1.0 mmol) in MeOH (4 mL), which was cooled at 0 °C, $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (10.0 equiv, 695 mg, 10.0 mmol) and a solution of 25% w/v MeONa (20.0 equiv, 1.08 g, 20.0 mmol) in MeOH (4.2 mL) were added. The solution was stirred at room temperature for 48–72 h under argon and quenched by adding HCl, 6 N. The pH was adjusted to 8 by the addition of 1 N NaOH, and the organic solvent was evaporated in vacuo. The residue was extracted with CHCl_3 (3 $\times$ 10 mL), and the

Table 1. *In Vitro* Potency of Hydroxamic Acids Based on 4-Aminophenylacetic Acid^a

Compound	Structure	IC ₅₀ (μM) 16:0 LPC	IC ₅₀ (μM) 18:0 LPC	MW	ClogP ^b
8a		>5		320.43	3.60
8b		1	0.2	376.54	5.71
8c		>5		382.50	5.05
8d		5		410.56	5.66
8e		>5		402.49	4.27
8f		1	0.3	412.53	5.08
8g		4		398.50	3.87
8h		1.2		369.42	0.89
8i		2		397.47	1.95
8j		1	0.2	369.42	0.59
8k		>5		387.41	0.93
8l		1		399.45	0.79
8m		0.7	2	354.45	3.43

^aAmplex Red PLD assay. ^bCalculated using ChemDraw.

organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄. The solvent was evaporated, and the crude product was purified by flash column chromatography on silica gel eluting with methanol/chloroform, 1:9.

Compounds **6d**, **6g**, and **6k** were synthesized from compounds **11**, **14**, and **16** by method A.

3-(4-Octylphenyl)propanoic Acid (6d). Yield 99%; white solid; mp 44–46 °C. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 7.30–7.00 (m, 4H), 2.93 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 2.80–2.50 (m, 4H), 1.80–1.50 (m, 2H), 1.50–1.10 (m, 10H), 0.88 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H). ¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 179.4, 141.0, 137.2, 128.5, 128.1, 35.7, 35.5, 31.9, 31.5, 30.2, 29.5, 29.4, 29.3, 22.7, 14.1. MS (ESI) *m/z* (%): 261.22 [(*M* – H)[–], 100].

Table 2. Comparison of Hydroxamic Acid **8h** with Pentafluoroethyl Ketone **18** and Boronic Acid **21**^a

Compound	Structure	16:0 LPC IC ₅₀ (μM)	18:0 LPC IC ₅₀ (μM)	MW	ClogP ^b
8h		1.2	0.2	369.42	0.89
17		>5		354.41	1.96
18		3	0.5	456.41	3.15
21		0.7	4	340.19	2.14

^aAmplex Red PLD assay. ^bCalculated using ChemDraw.Table 3. *In Vitro* Potency of Hydroxamic Acids Based on Glutamic Acid and δ-Amino Acids^a

Compound	Structure	IC ₅₀ (μM) 16:0 LPC	MW	ClogP ^b
24a		0.4	379.41	-1.24
25a		>5	380.40	-2.69
24b		>5	379.41	-1.54
24c		>5	397.40	-0.84
24d		4.5	409.44	-1.17
24e		>5	423.47	-0.64
28a		0.05	393.44	-0.71
28b		>5	378.47	1.82
32		0.06	391.51	1.11

^aAmplex Red PLD assay. ^bCalculated using ChemDraw.

5-(4-Butoxyphenyl)pentanoic Acid (6g). Yield 78%; white solid; mp 74–76 °C. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 7.06 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.80 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 3.92 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.55 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 2.35 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 2.00–1.40 (m, 8H), 0.95 (t, *J* = 8.0 Hz, 3H). ¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 179.3, 157.3, 133.9, 129.2, 114.3, 67.7, 34.6, 33.8, 31.4, 31.0, 24.2, 19.3, 13.9. MS (ESI) *m/z* (%): 249.22 [(*M* – H)[–], 100].

6-((4-Fluorophenyl)amino)-6-oxohexanoic Acid (6k). Yield 85%; pink solid; mp 110–112 °C. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 7.90–

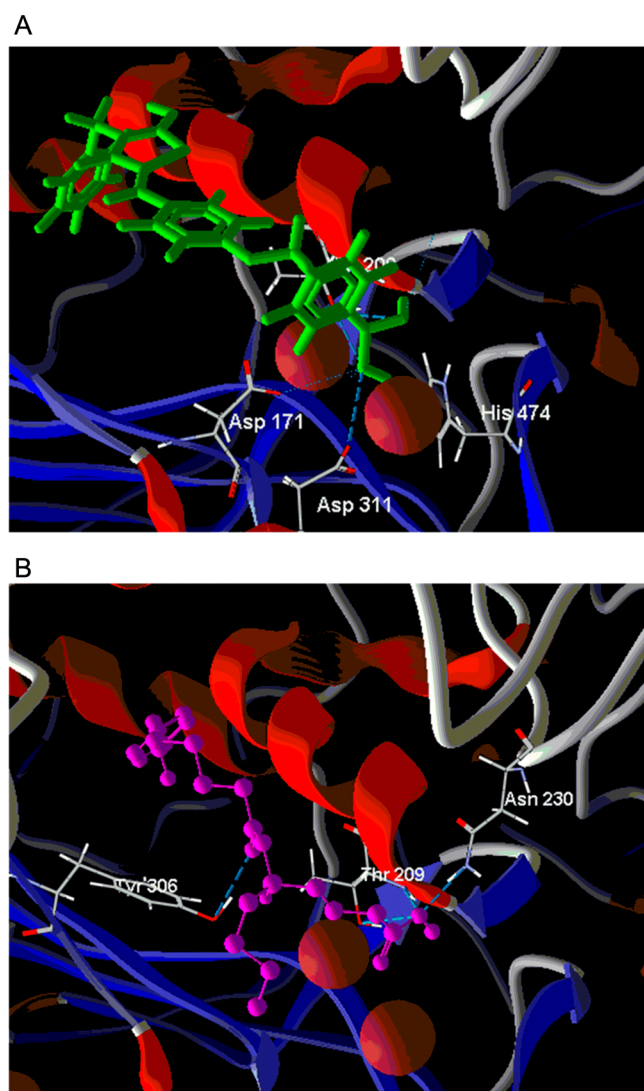


Figure 3. Hydrogen bond interactions between ATX and (A) HA155 and (B) inhibitor 32.

7.60 (m, 2H), 7.37 (br s, 1H), 7.10–6.80 (m, 2H), 3.50–3.10 (m, 2H), 2.40–2.00 (m, 2H), 1.80–1.40 (m, 4H). ^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 176.5, 167.3, 164.4 (d, J = 249.5 Hz, C–F), 130.2 (d, J = 3.0 Hz), 129.2 (d, J = 10.0 Hz), 115.2 (d, J = 21.5 Hz), 39.4, 33.3, 28.4, 21.8. ^{19}F NMR (200 MHz, CDCl_3) δ –108.9 (F). MS (ESI) m/z (%) 238.19 [(M – H) $^-$, 100].

Compounds **7a–m** were synthesized from compounds **6a–m** by method B.

Ethyl 2-(4-Decanamidophenyl)acetate (7a). Eluent ethyl acetate/petroleum ether (40–60 °C) 30:70. Yield 85%; white solid; mp 81–83 °C. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 7.45 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.36 (s, 1H), 7.20 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 4.13 (q, J = 7.0 Hz, 2H), 3.55 (s, 2H), 2.32 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 1.80–1.50 (m, 2H), 1.50–1.10 (m, 15H), 0.86 (t, J = 7.0 Hz, 3H). ^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 171.7, 171.6, 137.0, 129.7, 119.9, 60.9, 40.8, 37.7, 31.8, 29.4, 29.3, 29.2, 25.6, 22.6, 14.1. MS (ESI) m/z (%): 332.35 [(M – H) $^-$, 100].

Ethyl 2-(4-Tetradecanamidophenyl)acetate (7b). Eluent ethyl acetate/petroleum ether (40–60 °C) 30:70. Yield 55%; white solid; mp 88–90 °C. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 7.46 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.24 (s, 1H), 7.19 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 4.13 (q, J = 6.0 Hz, 2H), 3.56 (s, 2H), 2.33 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 1.80–1.50 (m, 2H), 1.40–1.10 (m, 23H), 0.87 (t, J = 6.0 Hz, 3H). ^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 171.7, 171.4, 138.0, 136.9, 129.8, 119.8, 60.9, 40.8, 37.8, 31.9, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 25.6, 22.7, 14.1. MS (ESI) m/z (%): 390.40 [(M + H) $^+$, 100].

Ethyl 2-(4-(4-Octylbenzamido)phenyl)acetate (7c). Eluent ethyl acetate/petroleum ether (40–60 °C) 40:60. Yield 41%; white solid; mp 114–116 °C. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 7.85 (s, 1H), 7.76 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.58 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.26 (m, 4H), 4.13 (d, J = 7.0 Hz, 2H), 3.58 (s, 2H), 2.65 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 1.80–1.50 (m, 2H), 1.40–1.00 (m, 10H), 1.23 (t, J = 7.0 Hz, 3H), 0.83 (t, J = 8.0 Hz, 3H). ^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 171.6, 165.7, 147.3, 137.0, 132.2, 130.1, 129.8, 128.8, 127.0, 120.2, 60.9, 40.8, 35.8, 32.8, 31.8, 31.2, 29.4, 29.2, 22.6, 14.2, 14.1. MS (ESI) m/z (%): 394.28 [(M – H) $^-$, 100].

Ethyl 2-(4-(3-(4-Octylphenyl)propanamido)phenyl)acetate (7d). Eluent ethyl acetate/petroleum ether (40–60 °C) 40:60. Yield 61%; white solid; mp 99–101 °C. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 8.00 (s, 1H), 7.38 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.20–7.00 (m, 6H), 4.12 (q, J = 8.0 Hz, 2H), 3.54 (s, 2H), 2.97 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 2.58 (q, J = 8.0 Hz, 4H), 1.70–1.40 (m, 2H), 1.40–1.20 (m, 10H), 1.23 (t, J = 8.0 Hz, 3H), 0.89 (t, J = 8.0 Hz, 3H). ^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 171.8, 170.8, 140.7, 137.7, 136.9, 129.5, 128.4, 128.1, 120.1, 60.8, 40.6, 39.1, 35.4, 31.8, 31.5, 31.0, 29.4, 29.3, 29.1, 22.5, 14.0. MS (ESI) m/z (%): 422.36 [(M – H) $^-$, 100].

Ethyl 2-(4-(5-([1,1'-Biphenyl]-4-yl)pentanamido)phenyl)acetate (7e). Eluent ethyl acetate/petroleum ether (40–60 °C) 40:60. Yield 85%; white solid; mp 136–138 °C. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 7.70 (s, 1H), 7.69–7.10 (m, 13H), 4.13 (q, J = 8.0 Hz, 2H), 3.55 (s, 2H), 2.66 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 2.34 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 1.90–1.50 (m, 4H), 1.24 (t, J = 8.0 Hz, 3H). ^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 171.7, 171.3, 141.1, 140.9, 138.6, 136.9, 129.6, 128.7, 128.6, 126.9, 126.8, 119.9, 60.8, 40.7, 37.3, 35.2, 30.9, 25.2, 14.1. MS (ESI) m/z (%): 416.15 [(M + H) $^+$, 100].

Ethyl 2-(4-(2-(4-Octylphenoxy)acetamido)phenyl)acetate (7f). Eluent ethyl acetate/petroleum ether (40–60 °C) 40:60. Yield 40%; white solid; mp 80–82 °C. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 8.27 (s, 1H), 7.53 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.36 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.13 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 6.88 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 4.56 (s, 2H), 4.13 (q, J = 8.0 Hz, 2H), 3.57 (s, 2H), 2.55 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 1.70–1.50 (m, 2H), 1.50–1.10 (m, 10H), 1.23 (t, J = 8.0 Hz, 3H), 0.86 (t, J = 8.0 Hz, 3H). ^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 171.5, 166.4, 155.0, 137.0, 135.8, 130.6, 129.9, 129.6, 120.2, 114.6, 67.8, 60.9, 40.8, 35.0, 31.8, 31.6, 29.4, 29.2, 22.6, 14.2, 14.1. MS (ESI) m/z (%): 424.35 [(M – H) $^-$, 100].

Ethyl 2-(4-(5-(4-Butoxyphenyl)pentanamido)phenyl)acetate (7g). Eluent ethyl acetate/petroleum ether (40–60 °C) 20:80. Yield 49%; white solid; mp 132–134 °C. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 7.43 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.40–7.10 (m, 2H), 7.06 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 6.80 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 6.69 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.12 (q, J = 8.0 Hz, 2H), 3.91 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 3.55 (s, 2H), 2.57 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 2.33 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 1.90–1.30 (m, 8H), 1.23 (t, J = 8.0 Hz, 3H), 0.95 (t, J = 8.0 Hz, 3H). ^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 171.6, 171.1, 157.3, 136.8, 133.9, 129.8, 129.2, 119.8, 114.3, 67.6, 60.9, 40.8, 37.6, 34.7, 31.2, 29.7, 25.2, 19.3, 14.2, 13.9. MS (ESI) m/z (%): 429.25 [(M + NH $_4$) $^+$, 90].

Ethyl 2-(4-(6-Oxo-6-(phenylamino)hexanamido)phenyl)acetate (7h). Eluent ethyl acetate/petroleum ether (40–60 °C) 40:60. Yield 99%; white solid; mp 160–162 °C. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 7.91 (s, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.70–7.40 (m, 4H), 7.40–7.00 (m, 5H), 4.12 (q, J = 6.0 Hz, 2H), 3.55 (s, 2H), 2.60–2.20 (m, 4H), 1.90–1.50 (m, 4H), 1.22 (t, J = 6.0 Hz, 3H). ^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 172.4, 171.0, 166.4, 138.0, 133.3, 129.6, 128.7, 124.0, 119.9, 119.8, 114.8, 60.9, 49.7, 48.9, 40.7, 36.6, 24.9, 14.0. MS (ESI) m/z (%): 383.07 [(M + H) $^+$, 100].

Ethyl 2-(4-(8-Oxo-8-(phenylamino)octanamido)phenyl)acetate (7i). Eluent ethyl acetate/petroleum ether (40–60 °C) 30:70. Yield 71%; white solid; mp 140–142 °C. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 8.00–7.80 (m, 2H), 7.60–7.40 (m, 4H), 7.40–7.00 (m, 5H), 4.12 (q, J = 8.0 Hz, 2H), 3.55 (s, 2H), 2.31 (m, 4H), 1.90–1.50 (m, 4H), 1.50–1.30 (m, 4H), 1.23 (t, J = 8.0 Hz, 3H). ^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 172.6, 172.1, 168.8, 138.1, 137.2, 129.5, 128.6, 123.9, 119.9, 119.8, 117.3, 60.9, 49.8, 48.1, 40.6, 36.8, 35.6, 28.2, 25.1, 13.9. MS (ESI) m/z (%): 411.31 [(M + H) $^+$, 100].

Ethyl 2-(4-(5-Benzamidopentanamido)phenyl)acetate (7j). Eluent ethyl acetate/petroleum ether (40–60 °C) 40:60. Yield 52%;

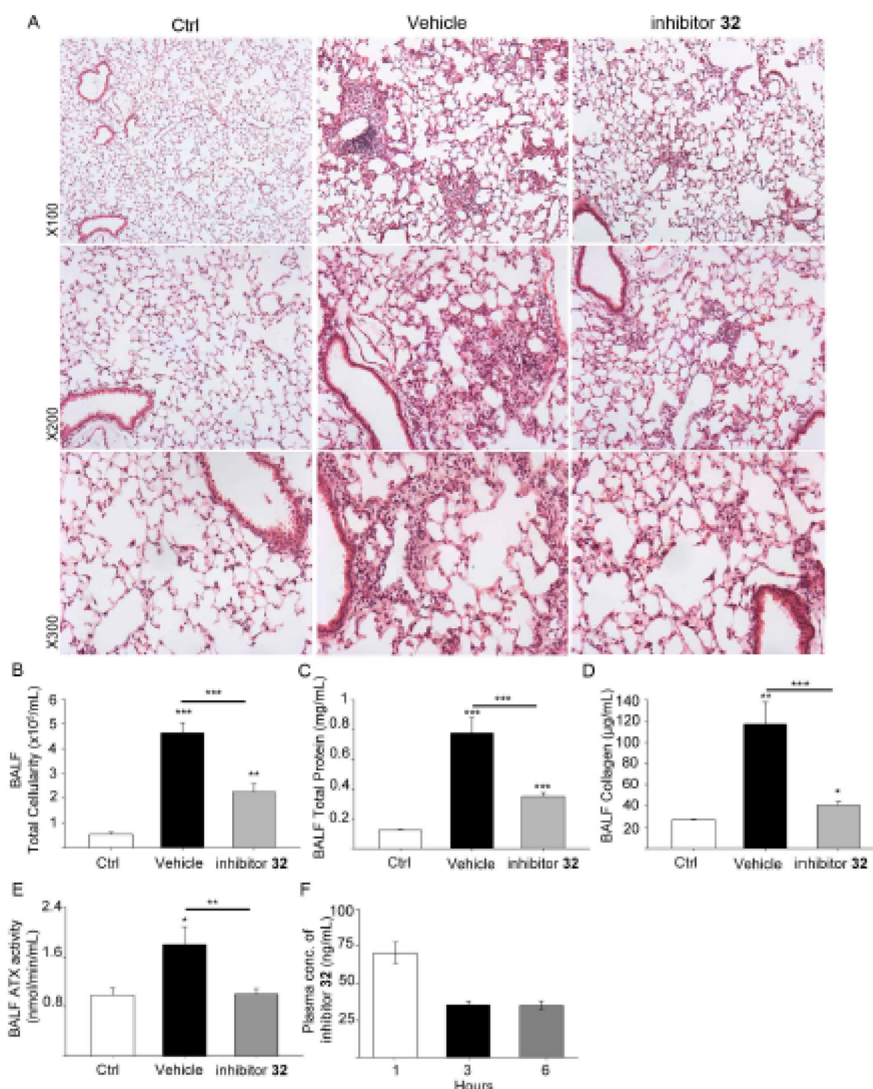


Figure 4. Pharmacologic inhibition of ATX with inhibitor 32 diminishes BLM-induced pulmonary fibrosis. (A) Representative hematoxylin/eosin-stained sections from control mice and BLM-challenged mice that received either vehicle or inhibitor 32 ($\times 100$, $\times 200$, $\times 300$ magnification). (B) Total cell counts in BALFs ($\times 10^5$ cells/mL). (C) Total protein concentrations in BALFs (mg/mL). (D) BALF soluble collagen concentrations ($\mu\text{g/mL}$). (E) ATX activity in BALFs (nmol/min/mL), from control mice (white bar) and BLM-challenged mice that received either vehicle (black bar) or inhibitor 32 (gray bar). (F) Plasma concentrations of inhibitor 32 1, 3, and 6 h after last administration.

yellowish solid; mp 148–150 °C. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 8.43 (s, 1H), 7.78 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.60–7.30 (m, 5H), 7.16 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 6.92 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 4.11 (q, J = 8.0 Hz, 2H), 3.54 (s, 2H), 3.43 (q, J = 6.0 Hz, 2H), 2.37 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 1.80–1.40 (m, 4H), 1.22 (t, J = 8.0 Hz, 3H). ^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 171.8, 171.8, 168.0, 137.3, 134.3, 131.4, 129.6, 129.5, 128.5, 126.9, 119.8, 60.9, 40.7, 39.0, 36.5, 28.8, 22.5, 14.1. MS (ESI) m/z (%): 383.19 [(M + H)⁺, 100].

Ethyl 2-(4-(5-(4-Fluorobenzamido)pentanamido)phenyl)acetate (7k). Eluent ethyl acetate/petroleum ether (40–60 °C) 40:60. Yield 53%; white solid; mp 146–148 °C. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 8.74 (s, 1H), 7.90–7.70 (m, 2H), 7.47 (d, J = 10.0 Hz, 2H), 7.32 (t, J = 5.0 Hz, 1H), 7.12 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 6.98 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 4.09 (q, J = 8.0 Hz, 2H), 3.52 (s, 2H), 3.34 (q, J = 7.0 Hz, 2H), 2.31 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 1.80–1.40 (m, 4H), 1.20 (t, J = 8.0 Hz, 3H). ^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 171.9, 166.9, 164.7, 164.5 (d, J = 250.5 Hz, C–F), 137.3, 130.8 (d, J = 3 Hz, arom), 129.6, 129.5, 129.3 (d, J = 10 Hz, arom), 119.9, 115.3 (d, J = 22 Hz, arom), 60.9, 40.6, 39.3, 36.4, 28.7, 22.5, 14.0. ^{19}F NMR (200 MHz, CDCl_3): δ –108.8 (F). MS (ESI) m/z (%): 401.21 [(M + H)⁺, 100].

Ethyl 2-(4-(5-(4-Methoxybenzamido)pentanamido)phenyl)acetate (7l). Eluent ethyl acetate/petroleum ether (40–60 °C)

40:60. Yield 45%; white solid; mp 167–169 °C. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 8.62 (s, 1H), 7.90–7.60 (m, 2H), 7.60–7.40 (m, 2H), 7.20–7.00 (m, 2H), 6.95–6.90 (m, 1H), 6.90–6.70 (m, 2H), 4.10 (q, J = 8.0 Hz, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.53 (s, 2H), 3.50–3.20 (m, 2H), 2.50–2.20 (m, 2H), 1.80–1.30 (m, 4H), 1.21 (t, J = 8.0 Hz, 3H). ^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 171.9, 167.5, 162.1, 155.2, 137.4, 129.6, 129.4, 128.8, 126.6, 119.9, 113.6, 60.9, 55.3, 40.7, 39.0, 36.5, 28.9, 22.6, 14.1. MS (ESI) m/z (%): 413.12 [(M + H)⁺, 100].

Ethyl 2-(4-(7-Phenylheptanamido)phenyl)acetate (7m). Eluent ethyl acetate/petroleum ether (40–60 °C) 40:60. Yield 64%; White solid; mp 80–82 °C. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 8.30 (s, 1H), 7.48 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.40–7.00 (m, 7H), 4.14 (q, J = 6.0 Hz, 2H), 3.55 (s, 2H), 2.58 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 2.30 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 1.90–1.50 (m, 4H), 1.50–1.20 (m, 4H), 1.24 (t, J = 6.0 Hz, 3H). ^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 171.8, 171.7, 142.4, 137.1, 129.4, 129.3, 128.1, 128.0, 125.4, 119.9, 60.7, 40.5, 37.2, 35.6, 31.1, 28.9, 28.8, 25.4, 14.0. MS (ESI) m/z (%): 366.26 [(M + H)⁺, 100].

Compounds **8a–m** were synthesized from compounds **7a–m** by method C.

N-(4-(2-(Hydroxyamino)-2-oxoethyl)phenyl)decanamide (8a). Yield 75%; white solid; mp 187–189 °C. ^1H NMR (200 MHz, DMSO): δ 10.63 (s, 1H), 9.83 (s, 1H), 8.83 (s, 1H), 7.49 (d, J = 8.0

H₂, 2H), 7.15 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 3.20 (s, 2H), 2.27 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 1.80–1.40 (m, 2H), 1.40–1.00 (m, 12H), 0.85 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H). ¹³C NMR (200 MHz, DMSO): δ 171.2, 167.1, 137.8, 130.5, 129.1, 119.0, 38.8, 36.4, 31.4, 29.0, 28.9, 28.8, 25.2, 22.2, 14.0. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₁₈H₂₈N₂O₃ – H⁺ [M – H]⁺: 319.2027. Found: 319.2029.

N-(4-(2-(Hydroxyamino)-2-oxoethyl)phenyl)tetradecanamide (8b). Yield 67%; off-white solid; mp 112–114 °C. ¹H NMR (200 MHz, DMSO): δ 10.74 (s, 1H), 9.90 (s, 1H), 8.94 (s, 1H), 7.47 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.14 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 3.20 (s, 2H), 2.25 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 1.70–1.40 (m, 2H), 1.40–1.00 (m, 20H), 0.82 (t, *J* = 6.0 Hz, 3H). ¹³C NMR (200 MHz, CD₃OD): δ 169.3, 159.6, 132.4, 130.7, 129.9, 121.2, 41.4, 40.2, 37.8, 34.8, 33.7, 33.1, 30.8, 30.7, 30.5, 27.0, 24.1, 23.8, 22.7, 14.5. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₂₂H₃₆N₂O₃ – H⁺ [M – H]⁺: 375.2653. Found: 375.2675.

N-(4-(2-(Hydroxyamino)-2-oxoethyl)phenyl)-4-octylbenzamide (8c). Yield 66%; white solid; mp 240–242 °C. ¹H NMR (200 MHz, DMSO): δ 10.67 (s, 1H), 10.13 (s, 1H), 8.86 (s, 1H), 7.84 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.66 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.31 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.21 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 3.24 (s, 2H), 2.62 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 1.80–1.40 (m, 2H), 1.40–1.00 (m, 10H), 0.83 (t, *J* = 8.0 Hz, 3H). ¹³C NMR (200 MHz, DMSO): δ 167.4, 165.5, 146.4, 137.8, 132.4, 131.3, 129.2, 128.4, 127.8, 120.4, 35.1, 31.4, 30.9, 28.9, 28.8, 22.2, 14.1. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₂₃H₃₀N₂O₃ – H⁺ [M – H]⁺: 381.2184. Found: 381.2185.

N-(4-(2-(Hydroxyamino)-2-oxoethyl)phenyl)-3-(4-octylphenyl)propanamide (8d). Yield 73%; white solid; mp 195–197 °C. ¹H NMR (200 MHz, DMSO): δ 10.67 (s, 1H), 9.90 (s, 1H), 8.88 (s, 1H), 7.48 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.30–6.90 (m, 6H), 3.21 (s, 2H), 2.85 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.57 (t, *J* = 6.0 Hz, 4H), 1.70–1.40 (m, 2H), 1.40–1.00 (m, 10H), 0.84 (t, *J* = 6.0 Hz, 3H). ¹³C NMR (200 MHz, DMSO): δ 170.6, 167.5, 140.1, 138.5, 137.8, 130.8, 129.3, 128.4, 128.3, 119.2, 35.0, 31.5, 31.2, 30.7, 29.0, 28.9, 22.3, 14.2. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₂₅H₃₄N₂O₃ – H⁺ [M – H]⁺: 409.2497. Found: 409.2497.

5-([1,1'-Biphenyl]-4-yl)-N-(4-(2-(hydroxyamino)-2-oxoethyl)phenyl)pentanamide (8e). Yield 52%; off-white solid; mp 181–183 °C. ¹H NMR (200 MHz, DMSO): δ 10.67 (s, 1H), 9.87 (s, 1H), 8.83 (s, 1H), 7.80–7.20 (m, 8H), 7.20–7.00 (m, 5H), 3.55 (s, 2H), 2.64 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 2.32 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 1.70–1.40 (m, 4H). ¹³C NMR (200 MHz, DMSO): δ 170.9, 169.5, 156.2, 154.3, 139.4, 135.8, 128.6, 126.9, 125.1, 124.5, 117.0, 34.3, 34.2, 32.6, 28.7, 25.3. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₂₅H₂₆N₂O₃ – H⁺ [M – H]⁺: 401.1871. Found: 401.1870.

N-Hydroxy-2-(4-(2-(4-octylphenoxy)acetamido)phenyl)acetamide (8f). Yield 55%; white solid; mp 182–184 °C. ¹H NMR (200 MHz, DMSO): δ 10.68 (s, 1H), 9.97 (s, 1H), 8.81 (s, 1H), 7.70–7.40 (m, 2H), 7.40–7.00 (m, 4H), 7.00–6.80 (m, 2H), 4.63 (s, 2H), 3.25 (s, 2H), 2.50 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 1.70–1.40 (m, 2H), 1.40–1.00 (m, 10H), 0.85 (t, *J* = 6.0 Hz, 3H). ¹³C NMR (200 MHz, DMSO): δ 167.4, 166.8, 156.0, 136.9, 135.2, 131.5, 129.3, 119.8, 114.6, 67.4, 34.4, 31.4, 29.0, 28.8, 22.3, 14.0. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₂₄H₃₂N₂O₄ – H⁺ [M – H]⁺: 411.2289. Found: 411.2289.

5-(4-Butoxyphenyl)-N-(4-(2-(hydroxyamino)-2-oxoethyl)phenyl)pentanamide (8g). Yield 46%; off-white solid; mp 198–200 °C. ¹H NMR (200 MHz, DMSO): δ 10.62 (s, 1H), 9.83 (s, 1H), 8.81 (s, 1H), 7.48 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.30–6.90 (m, 4H), 6.81 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.90 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.20 (s, 2H), 2.29 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 1.80–1.20 (m, 10H), 0.91 (t, *J* = 8.0 Hz, 3H). ¹³C NMR (200 MHz, DMSO): δ 171.1, 167.2, 156.8, 137.8, 133.8, 130.5, 129.1, 119.0, 114.2, 67.0, 36.3, 34.1, 30.9, 24.8, 18.8, 13.7. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₂₃H₃₀N₂O₄ – H⁺ [M – H]⁺: 397.2133. Found: 397.2126.

N¹-(4-(2-(Hydroxyamino)-2-oxoethyl)phenyl)-N⁶-phenyladipamide (8h). Yield 70%; off-white solid; mp 253–255 °C. ¹H NMR (200 MHz, DMSO): δ 10.20 (s, 1H), 10.16 (s, 1H), 8.49 (s, 1H), 7.80–7.40 (m, 4H), 7.40–7.10 (m, 5H), 7.10–6.90 (m, 1H), 3.23 (s, 2H), 2.40–2.20 (m, 4H), 1.80–1.30 (m, 4H). ¹³C NMR (200 MHz, DMSO): δ 171.4, 171.2, 167.1, 139.5, 137.9, 130.7, 129.2, 128.7, 123.0, 119.1, 119.0, 36.2, 30.8, 24.9. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₂₀H₂₃N₃O₄ – H⁺ [M – H]⁺: 368.1616. Found: 368.1615.

**N¹-(4-(2-(Hydroxyamino)-2-oxoethyl)phenyl)-N⁶-phenyloctanedi-
amide (8i).** Yield 96%; white solid; mp 195–197 °C. ¹H NMR (200 MHz, DMSO): δ 10.64 (s, 1H), 9.84 (s, 2H), 8.83 (s, 1H), 7.70–7.40 (m, 4H), 7.40–7.10 (m, 4H), 7.10–6.90 (m, 1H), 3.22 (s, 2H), 2.40–2.10 (m, 4H), 1.80–1.40 (m, 4H), 1.40–1.10 (m, 4H). ¹³C NMR (200 MHz, DMSO): δ 171.3, 171.1, 167.2, 139.4, 137.8, 130.5, 129.1, 128.7, 123.0, 119.1, 119.0, 38.8, 36.4, 28.6, 25.1. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₂₂H₂₇N₃O₄ – H⁺ [M – H]⁺: 396.1929. Found: 396.1932.

N-(5-((4-(2-(Hydroxyamino)-2-oxoethyl)phenyl)amino)-5-oxopentyl)benzamide (8j). Yield 59%; off-white solid; mp 179–181 °C. ¹H NMR (200 MHz, DMSO): δ 10.68 (s, 1H), 9.90 (s, 1H), 8.87 (s, 1H), 8.51 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.82 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.60–7.30 (m, 5H), 7.14 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 3.27 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.20 (s, 2H), 2.31 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 1.80–1.40 (m, 4H). ¹³C NMR (200 MHz, DMSO): δ 171.4, 167.5, 166.4, 137.9, 134.8, 131.3, 130.7, 129.3, 128.5, 127.3, 119.2, 40.2, 39.8, 36.7, 29.4, 23.4. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₂₀H₂₃N₃O₄ – H⁺ [M – H]⁺: 368.1616. Found: 368.1615.

4-Fluoro-N-(5-((4-(2-(hydroxyamino)-2-oxoethyl)phenyl)amino)-5-oxopentyl)benzamide (8k). Yield 88%; white solid; mp 269–271 °C. ¹H NMR (200 MHz, DMSO): δ 9.89 (s, 2H), 8.56 (s, 2H), 7.91 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.47 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.40–7.20 (m, 2H), 7.14 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 3.40–3.20 (m, 2H), 3.14 (s, 2H), 2.40–2.10 (m, 2H), 1.80–1.40 (m, 4H). ¹³C NMR (200 MHz, DMSO): δ 171.0, 166.3, 165.1, 164.8 (d, *J* = 240.0 Hz, C–F), 137.5, 131.1 (d, *J* = 3.0 Hz, arom), 129.9, 129.2 (d, *J* = 8.0 Hz, arom), 129.1, 118.8, 115.2 (d, *J* = 21.0 Hz, arom), 39.2, 38.9, 36.1, 28.9, 22.8. ¹⁹F NMR (200 MHz, DMSO): δ –110.3 (F). HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₂₀H₂₂FN₃O₄ – H⁺ [M – H]⁺: 386.1522. Found: 386.1522.

N-(5-((4-(2-(Hydroxyamino)-2-oxoethyl)phenyl)amino)-5-oxopentyl)-4-methoxybenzamide (8l). Yield 99%; white solid; mp 216–218 °C. ¹H NMR (200 MHz, DMSO): δ 10.60 (s, 1H), 9.85 (s, 1H), 8.81 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 7.81 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.50 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.14 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.97 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.50–3.30 (m, 2H), 3.20 (s, 2H), 2.40–2.10 (m, 2H), 1.80–1.30 (m, 4H). ¹³C NMR (200 MHz, DMSO): δ 171.1, 167.2, 165.6, 161.5, 137.8, 130.6, 129.2, 129.0, 126.9, 119.0, 113.5, 55.4, 38.9, 38.3, 36.1, 29.0, 22.8. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₂₁H₂₅N₃O₅ – H⁺ [M – H]⁺: 398.1721. Found: 398.1724.

N-(4-(2-(Hydroxyamino)-2-oxoethyl)phenyl)-7-phenylheptanamide (8m). Yield 67%; off-white solid; mp 176–178 °C. ¹H NMR (200 MHz, DMSO): δ 10.64 (s, 1H), 9.85 (s, 1H), 8.84 (s, 1H), 7.51 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.40–6.90 (m, 7H), 3.22 (s, 2H), 2.56 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 2.27 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 1.70–1.50 (m, 4H), 1.40–1.00 (m, 4H). ¹³C NMR (200 MHz, DMSO): δ 171.2, 167.1, 142.3, 137.9, 130.6, 129.2, 128.3, 125.7, 119.0, 36.4, 35.2, 31.0, 28.5, 25.2. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₂₁H₂₆N₂O₃ – H⁺ [M – H]⁺: 353.1871. Found: 353.1872.

Methyl (E)-3-(4-Octylphenyl)acrylate (10). A solution of aldehyde **9** (800 mg, 3.66 mmol) and Ph₃P=CHCOOCH₃ (1.5 equiv, 1.84 g, 5.50 mmol) in dry THF (5 mL) was refluxed under argon overnight. The reaction mixture was then cooled to room temperature, and the solvent was evaporated under reduced pressure. Then Et₂O (5 mL) was added, the mixture was filtered through a pad of silica, and the solvent was removed in vacuo to afford the pure product. Yield 69% (0.69 g, 2.51 mmol); colorless oil. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 7.68 (d, *J* = 17.0 Hz, 1H), 7.43 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.18 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.40 (d, *J* = 17.0 Hz, 1H), 3.79 (s, 3H), 2.61 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 1.80–1.50 (m, 2H), 1.50–1.00 (m, 10H), 0.87 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H). ¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 167.6, 145.7, 144.9, 131.8, 128.9, 128.0, 116.6, 51.6, 35.8, 31.8, 31.2, 29.4, 29.2, 22.6, 21.6, 14.1. MS (ESI) *m/z* (%): 292.16 [(M + NH₄)⁺, 10].

Methyl 3-(4-Octylphenyl)propanoate (11). Compound **11** was synthesized from compound **10** by method D. Yield 88%; white solid; mp 97–99 °C. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 7.30–7.00 (m, 4H), 3.67 (s, 3H), 2.93 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 2.70–2.50 (m, 4H), 1.80–1.50 (m, 2H), 1.50–1.10 (m, 10H), 0.89 (t, *J* = 8.0 Hz, 3H). ¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 173.4, 140.8, 137.5, 128.4, 128.0, 51.5, 35.7,

35.5, 31.8, 31.5, 30.5, 29.4, 29.3, 29.2, 22.6, 14.1. MS (ESI) m/z (%): 294.41 [(M + NH₄)⁺, 100].

Ethyl (2E,4E)-5-(4-Butoxyphenyl)penta-2,4-dienoate (13). A suspension of aldehyde **12** (1.00 g, 5.61 mmol), triethyl 4-phosphonocrotonate (1.5 equiv, 1.91 g, 8.42 mmol), lithium hydroxide (1.5 equiv, 0.35 g, 8.42 mmol), and molecular sieves (beads, 4–8 mesh, 8.40 g, 1.50 g/mmol aldehyde) in dry tetrahydrofuran (56 mL) was refluxed under argon for 24 h. The reaction mixture was then cooled to room temperature and filtered through a thin pad of Celite, and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residual oil was purified by column chromatography on silica gel eluting with ether/petroleum ether (40–60 °C) 20:80. Yield 68% (1.57 g, 5.71 mmol); white solid; mp 98–100 °C. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.50–7.30 (m, 3H), 6.96–6.60 (m, 4H), 5.92 (d, J = 17.0 Hz, 1H), 4.22 (q, J = 8.0 Hz, 2H), 3.97 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 1.90–1.60 (m, 2H), 1.60–1.40 (m, 2H), 1.30 (t, J = 8.0 Hz, 3H), 0.97 (t, J = 8.0 Hz, 3H). ¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 167.3, 160.0, 145.0, 140.2, 132.0, 128.6, 123.9, 119.9, 114.7, 67.7, 60.2, 31.2, 19.2, 14.3, 13.8. MS (ESI) m/z (%) 275.25 [(M + H)⁺, 100].

Ethyl 5-(4-Butoxyphenyl)pentanoate (14). Compound **14** was synthesized from compound **13** by method D. Yield 84%; colorless oil. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.07 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 6.81 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 4.12 (q, J = 8.0 Hz, 2H), 3.93 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 2.56 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 2.31 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 1.90–1.40 (m, 8H), 1.24 (t, J = 8.0 Hz, 3H), 0.97 (t, J = 8.0 Hz, 3H). ¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 173.7, 157.2, 134.0, 129.1, 128.6, 114.5, 114.3, 67.6, 60.2, 34.6, 34.2, 31.3, 31.1, 24.5, 19.2, 14.2, 13.8. MS (ESI) m/z (%) 296.24 [(M + NH₄)⁺, 100].

Ethyl 5-(4-Fluorobenzamido)pentanoate (16). Compound **16** was synthesized from compound **15** by method B. Eluent ethyl acetate/petroleum ether (40–60 °C) 40:60. Yield 89%; off-white solid; mp 74–76 °C. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.90–7.40 (m, 3H), 6.90–6.50 (m, 2H), 3.75 (q, J = 8.0 Hz, 2H), 3.30–2.90 (m, 2H), 2.10–1.80 (m, 2H), 1.80–1.60 (m, 2H), 1.50–1.20 (m, 2H), 1.22 (t, J = 6.0 Hz, 3H). ¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 172.6, 166.3, 163.8 (d, J = 249.5 Hz, C–F), 130.3 (d, J = 3.0 Hz), 128.9 (d, J = 10.0 Hz), 114.4 (d, J = 21.5 Hz), 59.5, 38.9, 33.0, 28.2, 21.6, 13.4. ¹⁹F NMR (200 MHz, CDCl₃) δ –109.9 (F). MS (ESI) m/z (%) 268.11 [(M + H)⁺, 100].

2-(4-(6-Oxo-6-(phenylamino)hexanamido)phenyl)acetic Acid (17). Compound **17** was synthesized from compound **7h** by method A. Yield 98%; white solid; mp 215–217 °C. ¹H NMR (200 MHz, CD₃OD): δ 7.47 (m, 4H), 7.40–7.10 (m, 4H), 7.10–6.90 (m, 1H), 3.51 (s, 2H), 2.50–2.10 (m, 4H), 1.90–1.60 (m, 4H). ¹³C NMR (200 MHz, CD₃OD): δ 177.0, 174.3, 164.9, 138.4, 132.0, 130.7, 129.7, 125.1, 121.2, 119.8, 113.1, 41.1, 37.6, 30.9, 26.5, 22.1. HRMS (ESI) m/z calculated for C₂₀H₂₂N₂O₄ – H⁺ [M – H]⁺: 353.1507. Found: 353.1508.

N¹-(4-(3,3,4,4,4-Pentafluoro-2-oxobutyl)phenyl)-N⁶-phenyladipamide (18). Oxalyl chloride (3.0 equiv, 0.93 mL 2 M solution, 1.86 mmol) and N,N-dimethylformamide (25 μ L) were added to a solution of carboxylic acid **17** (220 mg, 0.62 mmol) in dry CH₂Cl₂ (25 mL). After 2 h stirring, the solvent and excess reagent were evaporated under reduced pressure, and the residue was dissolved in dry CH₂Cl₂ (6 mL). Pyridine (8.0 equiv, 0.4 mL, 4.96 mmol) and pentafluoropropionic anhydride (6.0 equiv, 0.73 mL, 3.72 mmol) were added dropwise to this solution at 0 °C consecutively. After 2.5 h at 0 °C, ice was added, and the mixture was stirred for 30 min. The two phases were separated, and the organic phase was washed with brine and dried (Na₂SO₄). The solvent was evaporated under reduced pressure, and the residual oil was purified by flash column chromatography on silica gel eluting with methanol/chloroform 5:95. Yield 21% (32 mg, 0.07 mmol); yellow solid; mp 184–186 °C. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 8.00–7.00 (m, 9H), 3.47 (s, 2H), 2.80–2.10 (m, 4H), 2.10–1.50 (m, 4H). ¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 196.2 (t, J = 26.1 Hz, COC₂F₅), 172.6, 171.6, 130.7, 129.4, 128.6, 128.3, 123.9, 119.8, 119.6, 117.8 (qt, J_1 = 284.9 Hz, J_2 = 34.1 Hz, CF₃), 113.3, 106.9 (tq, J_1 = 265.6 Hz, J_2 = 37.9 Hz, CF₂), 36.4, 30.6, 29.5, 24.9, 22.5. ¹⁹F NMR (CDCl₃) δ –83.4 (CF₃), –121.9 (CF₂). HRMS (ESI) m/z calculated for C₂₂H₂₁F₅N₂O₃ – H⁺ [M – H]⁺: 455.1400. Found: 455.1406.

N¹-Phenyl-N⁶-(4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-phenyl)adipamide (20). Compound **20** was synthesized from compounds **6h** and **19** by method B. Eluent ethyl acetate/petroleum ether (40–60 °C) 40:60. Yield 60%; off-white solid; mp 211–213 °C. ¹H NMR (200 MHz, DMSO): δ 10.05 (s, 1H), 9.91 (s, 1H), 7.70–7.50 (m, 6H), 7.28 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 7.02 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 2.40–2.10 (m, 4H), 1.80–1.40 (m, 4H), 1.27 (s, 12H). ¹³C NMR (200 MHz, DMSO): δ 171.6, 171.3, 142.3, 139.4, 135.5, 128.8, 119.2, 118.2, 83.6, 38.3, 36.4, 25.1, 24.8, 14.4. MS (ESI) m/z (%): 423.31 [(M + H)⁺, 100].

(4-(6-Oxo-6-(phenylamino)hexanamido)phenyl)boronic Acid (21). To a stirred solution of the ester **20** (35 mg, 0.08 mmol) in THF (2.5 mL) an aqueous solution of HCl, 1 N (2.5 mL), was added, and the mixture was left under stirring for 24 h. After evaporation of the solvent under reduced pressure, CH₂Cl₂ (10 mL) was added and washed with H₂O (10 mL) and brine (10 mL). The product remained insoluble and was obtained after filtration and washing with CH₂Cl₂. Yield 71% (20 mg, 0.06 mmol); white solid; mp 218–220 °C. ¹H NMR (200 MHz, DMSO): δ 9.92 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.93 (s, 2H), 7.69 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.65–7.40 (m, 4H), 7.40–7.10 (m, 2H), 7.10–6.90 (m, 1H), 2.50–2.20 (m, 4H), 1.80–1.50 (m, 4H). ¹³C NMR (200 MHz, DMSO): δ 171.3, 171.2, 140.9, 139.3, 134.8, 128.6, 123.0, 119.2, 117.9, 36.4, 25.0. HRMS (ESI) m/z calculated for C₁₈H₂₁BN₂O₄ – H⁺ [M – H]⁺: 339.1522. Found: 339.1518.

Compounds **23a–e** were synthesized from compound **22** by method B.

Dimethyl (S)-(6-Oxo-6-(phenylamino)hexanoyl)glutamate (23a). Eluent ethyl acetate/petroleum ether (40–60 °C) 40:60. Yield 99%; white solid; mp 116–118 °C; [α]_D²⁰ = +11.1 (c 1, CHCl₃). ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 8.41 (s, 1H), 7.53 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 7.26 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 7.04 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 6.83 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.56 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 3.69 (s, 3H), 3.63 (s, 3H), 2.80–2.00 (m, 8H), 1.80–1.50 (m, 4H). ¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 173.3, 173.2, 172.4, 171.5, 138.2, 128.8, 123.9, 119.7, 52.5, 51.9, 51.6, 36.8, 35.5, 30.1, 26.7, 24.8, 24.5. MS (ESI) m/z (%): 379.21 [(M + H)⁺, 100].

Dimethyl (S)-(5-Benzamidopentanoyl)glutamate (23b). Eluent ethyl acetate/petroleum ether (40–60 °C) 40:60. Yield 99%; off-white solid; mp 38–40 °C; [α]_D²⁰ = +9.8 (c 1, CHCl₃). ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.75 (d, J = 7.0 Hz, 2H), 7.50–7.30 (m, 3H), 7.02 (s, 1H), 6.81 (s, 1H), 4.60–4.40 (m, 1H), 3.64 (s, 3H), 3.58 (s, 3H), 2.60–1.80 (m, 8H), 1.80–1.40 (m, 4H). ¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 173.2, 172.3, 170.5, 167.6, 134.4, 131.2, 128.3, 126.9, 52.3, 51.7, 51.5, 39.0, 35.2, 30.0, 28.5, 26.8, 22.3. MS (ESI) m/z (%): 379.31 [(M + H)⁺, 100].

Dimethyl (S)-(6-((4-Fluorophenyl)amino)-6-oxohexanoyl)-glutamate (23c). Eluent ethyl acetate/petroleum ether (40–60 °C) 40:60. Yield 94%; pink solid; mp 99–101 °C; [α]_D²⁰ = +9.6 (c 1, CHCl₃). ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 8.49 (s, 1H), 7.60–7.30 (m, 2H), 7.10–6.80 (m, 2H), 6.98 (s, 1H), 4.70–4.40 (m, 1H), 3.65 (s, 3H), 3.60 (s, 3H), 2.70–1.80 (m, 8H), 1.80–1.40 (m, 4H). ¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 173.3, 173.2, 172.3, 171.5, 165.6 (d, J = 257.0 Hz, C–F), 134.6 (d, J = 3.0 Hz, arom), 121.9 (d, J = 8.0 Hz, arom), 115.5 (d, J = 22.5 Hz, arom), 52.4, 51.8, 51.7, 36.6, 35.5, 30.0, 26.7, 24.8, 24.5. ¹⁹F NMR (200 MHz, CDCl₃) δ –119.0 (F). MS (ESI) m/z (%): 395.13 [(M – H)⁺, 100].

Dimethyl (S)-(6-((4-Methoxyphenyl)amino)-6-oxohexanoyl)-glutamate (23d). Eluent ethyl acetate/petroleum ether (40–60 °C) 40:60. Yield 70%; pink solid; mp 127–129 °C; [α]_D²⁰ = +9.5 (c 1, CHCl₃). ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 8.74 (s, 1H), 7.30 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.22 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.65 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 4.50–4.30 (m, 1H), 3.60 (s, 3H), 3.55 (s, 3H), 3.50 (s, 3H), 2.50–1.80 (m, 8H), 1.70–1.40 (m, 4H). ¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 173.2, 172.9, 172.1, 171.3, 155.6, 131.2, 121.5, 113.5, 55.0, 52.0, 51.4, 51.3, 36.2, 35.2, 29.8, 26.3, 24.7, 24.6. MS (ESI) m/z (%): 431.21 [(M + Na)⁺, 100].

Dimethyl (S)-(6-((4-Ethoxyphenyl)amino)-6-oxohexanoyl)-glutamate (23e). Eluent ethyl acetate/petroleum ether (40–60 °C) 40:60. Yield 99%; pink solid; mp 122–124 °C; [α]_D²⁰ = +9.6 (c 1, CHCl₃). ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 8.48 (s, 1H), 7.39 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.14 (s, 1H), 6.77 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 4.60–4.40 (m, 1H),

3.94 (q, $J = 8.0$ Hz, 2H), 3.67 (s, 3H), 3.61 (s, 3H), 2.50–1.80 (m, 8H), 1.80–1.50 (m, 4H), 1.33 (t, $J = 8.0$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 173.8, 173.4, 172.4, 171.8, 155.3, 131.3, 121.6, 114.5, 63.6, 52.4, 51.6, 50.3, 36.6, 35.4, 30.0, 26.7, 24.9, 24.6, 14.7. MS (ESI) m/z (%): 423.27 [$(\text{M} + \text{H})^+$, 100].

Compounds **24a–e** were synthesized from compounds **23a–e** by method E.

Methyl (S)-N⁵-Hydroxy-N²-(6-oxo-6-(phenylamino)hexanoyl)-glutamate (24a). Yield 20%; off-white solid; mp 118–120 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -13.0$ (c 0.6, MeOH). ^1H NMR (200 MHz, CD_3OD): δ 7.43 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.17 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 6.97 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.30–4.00 (m, 1H), 3.52 (s, 3H), 2.50–1.70 (m, 8H), 1.70–1.40 (m, 4H). ^{13}C NMR (200 MHz, CD_3OD): δ 175.8, 174.7, 174.2, 170.6, 139.9, 129.8, 125.1, 121.1, 52.2, 51.5, 37.6, 36.4, 30.9, 28.3, 27.3, 26.4. HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_6 - \text{H}^-$ [$\text{M} - \text{H}^-$]: 378.1671. Found: 378.1677.

Methyl (S)-N²-(5-Benzamidopentanoyl)-N⁵-hydroxyglutamate (24b). Yield 18%; off-white solid; mp 139–141 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -14.0$ (c 0.5, MeOH). ^1H NMR (200 MHz, CD_3OD): δ 7.77 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.60–7.30 (m, 3H), 4.30–4.10 (m, 1H), 3.60 (s, 3H), 2.50–1.80 (m, 8H), 1.80–1.40 (m, 4H). ^{13}C NMR (200 MHz, CD_3OD): δ 175.9, 174.7, 170.6, 170.3, 135.8, 132.6, 129.5, 128.3, 52.2, 51.5, 40.5, 36.2, 31.0, 29.9, 28.3, 24.2. HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_6 - \text{H}^-$ [$\text{M} - \text{H}^-$]: 378.1671. Found: 378.1670.

Methyl (S)-N²-(6-((4-Fluorophenyl)amino)-6-oxohexanoyl)-N⁵-hydroxyglutamate (24c). Yield 19%; off-white solid; mp 147–149 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -18.0$ (c 1, MeOH). ^1H NMR (200 MHz, CD_3OD): δ 7.60–7.40 (m, 2H), 6.99 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 4.26 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.61 (s, 3H), 2.60–1.80 (m, 8H), 1.80–1.40 (m, 4H). ^{13}C NMR (200 MHz, CD_3OD): δ 175.8, 174.7, 174.1, 170.6, 169.7 (d, $J = 241.5$ Hz, C–F), 136.1 (d, $J = 3.0$ Hz, arom), 123.0 (d, $J = 8.0$ Hz, arom), 116.2 (d, $J = 22.5$ Hz, arom), 52.2, 51.5, 37.5, 36.4, 31.0, 28.3, 26.5, 26.3. ^{19}F NMR (200 MHz, CD_3OD): δ -121.1 (F). HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{FN}_3\text{O}_6 - \text{H}^-$ [$\text{M} - \text{H}^-$]: 396.1576. Found: 396.1573.

Methyl (S)-N⁵-Hydroxy-N²-(6-((4-methoxyphenyl)amino)-6-oxohexanoyl)glutamate (24d). Yield 16%; off-white solid; mp 157–159 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -17.6$ (c 0.5, MeOH). ^1H NMR (200 MHz, CD_3OD): δ 7.40 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 6.82 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 4.30–4.10 (m, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.61 (s, 3H), 2.50–1.80 (m, 8H), 1.80–1.50 (m, 4H). ^{13}C NMR (200 MHz, CD_3OD): δ 175.8, 174.7, 174.0, 170.6, 157.8, 132.8, 123.1, 114.9, 55.8, 52.2, 51.5, 37.4, 36.4, 31.0, 28.3, 26.5, 26.4. HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_7 - \text{H}^-$ [$\text{M} - \text{H}^-$]: 408.1776. Found: 408.1789.

Methyl (S)-N²-(6-((4-Ethoxyphenyl)amino)-6-oxohexanoyl)-N⁵-hydroxyglutamate (24e). Yield 17%; white solid; mp 146–148 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -17.8$ (c 0.4, MeOH). ^1H NMR (200 MHz, CD_3OD): δ 7.38 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 6.80 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 4.30–4.10 (m, 1H), 3.96 (q, $J = 8.0$ Hz, 2H), 3.61 (s, 3H), 2.50–1.80 (m, 8H), 1.80–1.50 (m, 4H), 1.32 (t, $J = 8.0$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (200 MHz, CD_3OD): δ 175.9, 174.7, 174.0, 170.6, 157.1, 132.7, 123.0, 115.5, 64.6, 52.2, 51.5, 37.4, 36.4, 31.0, 28.3, 26.5, 26.4, 15.2. HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_7 - \text{H}^-$ [$\text{M} - \text{H}^-$]: 422.1933. Found: 422.1908.

(S)-N¹-(1,5-Bis(hydroxyamino)-1,5-dioxopentan-2-yl)-N⁶-phenyladipamide (25a). To a stirred solution of ester **23a** (168 mg, 0.44 mmol) in EtOH (1.78 mL), which was cooled at 0 °C, $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ (617 mg, 8.88 mmol) and a solution of 21% w/w EtONa (1.21 g, 17.76 mmol) in EtOH (6.63 mL) (commercially available) were added. The solution was refluxed for 3 h under argon and quenched by adding HCl, 1 N. The pH was adjusted to 8 by the addition of 1 N NaOH, and the organic solvent was evaporated under reduced pressure. The aqueous residue was extracted with $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9/1, the two layers were separated, and the organic phase was dried over anhydrous Na_2SO_4 . After evaporation, the product was collected on a filter and washed with Et₂O. Yield 53% (87 mg, 0.23 mmol); yellowish solid; mp >250 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -10.0$ (c 0.1, MeOH). ^1H NMR (200 MHz, CD_3OD): δ 7.49 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.22 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.00 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.30–4.10 (m, 1H), 2.40–2.00 (m, 8H), 1.80–1.50 (m, 4H). ^{13}C NMR (200 MHz, CD_3OD): δ 174.3, 171.4, 170.7, 169.4, 144.7, 134.8, 128.7, 119.1, 50.8, 39.8, 39.3, 36.4, 35.0,

28.6, 18.1. HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_6 - \text{H}^-$ [$\text{M} - \text{H}^-$]: 379.1623. Found: 379.1621.

Compounds **27a,b** were synthesized from compound **26** by method B.

Dimethyl (S)-2-(6-Oxo-6-(phenylamino)hexanamido)-hexanedioate (27a). Eluent ethyl acetate/petroleum ether (40–60 °C) 40:60. Yield 67%; yellowish oil; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +6.8$ (c 1, CHCl_3). ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 8.47 (s, 1H), 7.53 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.24 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.01 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.92 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.70–4.40 (m, 1H), 3.68 (s, 3H), 3.60 (s, 3H), 2.80–2.00 (m, 8H), 2.00–1.50 (m, 6H). ^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 173.3, 173.2, 172.5, 171.6, 138.4, 128.7, 123.7, 119.7, 52.6, 51.8, 51.6, 36.7, 35.4, 30.9, 30.1, 26.8, 25.2, 24.8. MS (ESI) m/z (%): 393.14 [$(\text{M} + \text{H})^+$, 98].

Dimethyl (S)-2-(7-Phenylheptanamido)hexanedioate (27b). Eluent ethyl acetate/petroleum ether (40–60 °C) 40:60. Yield 65%; colorless oil; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +19.3$ (c 0.8, CHCl_3). ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 7.20–6.90 (m, 5H), 6.81 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.60–4.30 (m, 1H), 3.57 (s, 3H), 3.50 (s, 3H), 2.46 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 2.30–2.00 (m, 6H), 1.70–1.40 (m, 6H), 1.40–1.10 (m, 4H). ^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 173.0, 172.7, 172.4, 142.1, 127.8, 127.7, 125.1, 51.8, 51.2, 51.0, 35.6, 35.3, 32.7, 30.8, 29.6, 28.6, 28.5, 26.5, 25.1. MS (ESI) m/z (%): 378.36 [$(\text{M} + \text{H})^+$, 100].

Compounds **28a,b** were synthesized from compounds **27a,b** by method E.

Methyl (S)-6-(Hydroxyamino)-6-oxo-2-(6-oxo-6-(phenylamino)-hexanamido)hexanoate (28a). Yield 20%; white solid; mp 118–120 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -15.6$ (c 0.4, MeOH). ^1H NMR (200 MHz, CD_3OD): δ 7.53 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.27 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.06 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.40–4.10 (m, 1H), 3.62 (s, 3H), 2.60–2.20 (m, 8H), 1.90–1.50 (m, 6H). ^{13}C NMR (200 MHz, CD_3OD): δ 175.8, 175.4, 174.2, 170.9, 139.8, 129.7, 125.1, 121.2, 53.3, 52.0, 37.5, 36.4, 34.0, 32.4, 31.7, 26.4, 22.2. HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_6 - \text{H}^-$ [$\text{M} - \text{H}^-$]: 392.1827. Found: 392.1814.

Methyl (S)-6-(Hydroxyamino)-6-oxo-2-(7-phenylheptanamido)-hexanoate (28b). Yield 19%; white solid; mp 60–62 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -17.7$ (c 1, MeOH). ^1H NMR (200 MHz, CD_3OD): δ 7.30–7.00 (m, 5H), 4.30–4.10 (m, 1H), 3.58 (s, 3H), 2.54 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 2.30 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 2.17 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 1.80–1.40 (m, 8H), 1.40–1.20 (m, 4H). ^{13}C NMR (200 MHz, CD_3OD): δ 176.2, 175.3, 171.0, 143.9, 129.4, 129.2, 126.6, 52.1, 51.9, 36.8, 36.7, 34.1, 32.6, 32.5, 30.1, 30.0, 26.9, 22.2. HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_5 - \text{H}^-$ [$\text{M} - \text{H}^-$]: 377.2082. Found: 377.2078.

(S)-1-Methoxy-1-oxononan-5-aminium Chloride (30). To a stirred solution of **29** (360 mg, 1.31 mmol) in MeOH (1.5 mL), cooled at 0 °C, SOCl_2 (1.2 equiv, 0.11 mL, 1.57 mmol) was added dropwise, and the solution was stirred at room temperature for 4 h equipped with a CaCl_2 drying tube. The solvent was evaporated in vacuo, and the product was obtained after recrystallization ($\text{MeOH}/\text{Et}_2\text{O}$). Yield 99% (290 mg, 1.30 mmol); white solid; mp 43–45 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -4.0$ (c 1, MeOH). ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 8.35 (br, 3H), 3.65 (s, 3H), 3.40–3.00 (m, 1H), 2.50–2.20 (m, 2H), 1.90–1.60 (m, 6H), 1.60–1.10 (m, 4H), 0.90 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 173.5, 52.2, 51.7, 33.3, 32.2, 31.9, 27.2, 22.3, 20.6, 13.8. MS (ESI) m/z (%): 188.16 [$(\text{M} - \text{Cl})^+$, 100].

Methyl (S)-5-(6-Oxo-6-(phenylamino)hexanamido)nonanoate (31). Compound **31** was synthesized from compound **30** by method B. Eluent ethyl acetate/petroleum ether (40–60 °C) 40:60. Yield 66%; white solid; mp 120–122 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +1.5$ (c 1, CHCl_3). ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 9.20 (s, 1H), 7.50 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.15 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 6.94 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.40 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.90–3.60 (m, 1H), 3.53 (s, 3H), 2.50–2.00 (m, 8H), 1.90–1.40 (m, 6H), 1.40–1.00 (m, 6H), 0.80 (t, $J = 8.0$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 174.2, 173.1, 172.1, 138.5, 128.4, 123.4, 119.7, 52.8, 51.2, 36.2, 34.1, 33.4, 31.1, 27.9, 27.1, 25.0, 22.3, 21.1, 19.4, 13.8. MS (ESI) m/z (%): 389.24 [$(\text{M} - \text{H})^+$, 100].

(S)-N¹-(1-(Hydroxyamino)-1-oxononan-5-yl)-N⁶-phenyladipamide (32). Compound **32** was synthesized from compound **31** by method C. Yield 81%; yellowish solid; mp 161–163 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -1.9$ (c 1, MeOH). ^1H NMR (200 MHz, CD_3OD): δ 7.53 (d, $J = 7.0$ Hz,

2H), 7.28 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 7.06 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H), 3.80–3.60 (m, 1H), 2.39 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 2.23 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 2.08 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 1.80–1.50 (m, 6H), 1.50–1.10 (m, 8H), 0.87 (t, $J = 6.0$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (200 MHz, CD_3OD): δ 175.3, 174.0, 172.5, 139.7, 129.6, 125.0, 121.2, 121.1, 49.7, 37.5, 36.9, 35.6, 35.3, 33.3, 29.2, 26.7, 26.4, 23.5, 23.1, 14.4. HRMS (ESI) m/z calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_4 - \text{H}^-$ [M – H] $^-$: 390.2398. Found: 390.2392.

In Vitro ATX Activity Assay. The *in vitro* activity of the synthetic inhibitors was tested with the Amplex Red PLD assay kit (Molecular Probes, Interchim, Montluçon, France) originally designed for the measurement of PLD activity.^{32,38} All reactions were performed with 2 nM purified ATX (mouse ATX- β from Sino Biological) and 50 μM LPC (16:0 or 18:0) at 37 °C. Inhibitors, stock (3 mM), and working solutions (0.001 to 5 $\mu\text{mol/L}$) were dissolved in DMSO. The ability of ATX to cleave LPC was detected using a coupled assay that monitors the release of choline using Amplex Red (10 mM), choline oxidase (0.2 units/mL), and horseradish peroxidase (2 units/mL). The rate of fluorescence increase was measured in a fluorescence plate reader (Tecan Infinite 200 microplate reader from Tecan Trading AG, Switzerland). The IC_{50} values were determined using the mean values obtained from two independent experiments. The IC_{50} values were determined graphically using the sigmoid dose–response fitting method (PrismH software) by the equation $f = y_0 + a/(1 + \exp(-(x - x_0)/b))$ given by SigmaPlot 11.0.

Docking Studies. The crystal structure of ATX (PDB code 2XRG) in complex with boronic acid inhibitor HA155 has been used as the molecular model for our investigation, and the compounds were docked into the enzyme active site. The computational molecular docking studies were performed using Molegro. All structures were prepared using Molegro's Molecules & Protein Preparation Wizard (Molegro Virtual Docker 5.0). Proper bond assignments, bond orders, hybridization, and charges were calculated by Molegro Virtual Docker software (MVD version 5.0). Explicit hydrogens were added, and their hydrogen bonding patterns were also determined by MVD. The “simplex evolution” algorithm performs a combined local/global search on the poses generated by the pose generator. The number of the maximum iterations of the simplex evolution algorithm (Nelder–Mead simplex minimization) was set to 300, while the neighbor distance factor, the factor that determines how close the point of the initial simplex will be to the other randomly selected individuals in the population, was set to 1.0 (causing the initial simplex to span the neighbor points exactly).

Mouse Model of Pulmonary Fibrosis and Inhibitor Administration Protocol. All reported experimentation in mice, in line with the ARRIVE guidelines, was approved by the Institutional Animal Ethical Committee (IAEC) of BSRC Alexander Fleming and the Veterinary service and Fishery Department of the local governmental prefecture. All randomly assigned experimental controls were littermate sex- and age-matched mice. All experimental mice were housed under specific pathogen-free conditions, at a constant temperature of 20–22 °C in 55% $\pm$ 5% humidity and a 12 h light–dark cycle; water and food were given *ad libitum*. C57BL/6 male and female mice, 8–10 weeks old, were administered at day 0 with 0.01 U of bleomycin sulfate diluted in 50 μL saline 0.9% orotracheally or equal volume of saline 0.9% (control group, $n = 5$). Animals were blindly randomized to receive inhibitor 32 (30 mg/kg, $n = 10$) or vehicle (1 $\times$ PBS with 5% Tween 80, $n = 10$), once daily for 15 days (from day –1 to 14) by intraperitoneal injections.

Sample Collection and Preparation. Mice from each experimental group were sacrificed at day 15 after initial BLM administration and blood, BALF, and lung were collected. Blood was collected at 1, 3, and 6 h after the last administration, in tubes containing EDTA, pH 8, at a final concentration of 50 mM. For plasma preparation, whole blood was centrifuged at 2000g for 20 min at 4 °C, and the supernatants were stored in siliconized tubes at –80 °C. Lungs were lavaged three times with 1 mL of 0.9% sterile sodium chloride. BALF after centrifugation at 1200 rpm for 10 min was kept at –80 °C, while cell pellets were used for total cell counts with 0.4% Trypan Blue solution.

Total Protein Content Determination in BALF. Total protein concentration in BALF was measured using the Bradford protein assay according to the manufacturer's instructions (Biorad, Hercules, CA, USA). Values were obtained by converting the OD readings in mg/mL using a standard curve with BSA (0–2 mg·mL $^{-1}$).

Soluble Collagen Content Determination in BALF. Soluble collagen concentration in BALF was measured using the Sirius Red assay protocol. Briefly, BALF samples (100 μL) were diluted in 1 mL of 0.5 M acetic acid, and an equal volume of Sirius Red (direct red 80; 120 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in 0.5 M acetic acid) was added. Samples were incubated at room temperature for 30 min, and after centrifugation, the absorbance of sample supernatant was read at 540 nm. Values were obtained by converting the OD readings in $\mu\text{g/mL}$ according to a standard curve with collagen type I from rat tail (0–500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Lung Histopathology. Lung tissues were fixed in 10% v/v neutral buffered formalin and embedded in paraffin. Paraffin-embedded lung tissues were sectioned in 4 μm slices, stained with hematoxylin/eosin (H&E) according to standard procedure, and imaged using a Nikon Eclipse E800 microscope (Nikon Corp., Shinagawa-ku, Japan) attached to a Q Imaging EXI Aqua digital camera, using the Q-Capture Pro 7 software.

ATX Activity Assay. ATX/LysoPLD activity was measured in BAL fluid samples, using the TOOS activity assay as previously reported.^{59,60}

Statistical Analysis. Statistical significance was assessed in pairwise comparisons with control values using a paired Student's *t* test, using SigmaPlot 11.0 (Systat software Inc., IL, USA), and presented as means $\pm$ SE. Values $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), and $p < 0.001$ (***) were considered significant.

■ ASSOCIATED CONTENT

● Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jmedchem.8b00232.

Code numbers of tested compounds and elemental analyses of synthesized compounds (PDF)

Molecular-formula strings of the compounds (CSV)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: +30 210 7274462. Fax: +30 210 7274761. E-mail: gkokotos@chem.uoa.gr.

ORCID

Antreas Afantitis: 0000-0002-0977-8180

George Kokotos: 0000-0003-3753-7082

Author Contributions

G.K. and V.A. conceived and designed the experiments; A.N., I.N., M.G.K., and E.K. performed the experiments; A.A. performed the docking studies; G.K., A.N., and V.A. wrote the paper.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This research has been cofinanced by the European Union (European Regional Development Fund - ERDF) and Greek national funds through the Operational Program “Competitiveness and Entrepreneurship” of the National Strategic Reference Framework (NSRF)- Research Funding Program: “Autotaxin (ATX): A novel therapeutic target in lung cancer”.

■ ABBREVIATIONS

ATX, autotaxin; BALF, bronchoalveolar lavage fluid; BLM, bleomycin; ENPP, ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase; EDCI, 1-ethyl-3-(3-(dimethylamino)propyl)-carbodiimide; FS-3, fluorogenic substrate 3; H&E stain, hematoxylin/eosin stain; IPF, idiopathic pulmonary fibrosis; LPA, lysophosphatidic acid; LPC, lysophosphatidylcholine; PLD, phospholipase D; PDE, phosphodiesterase; SMB, somatomedin B; TOOS, sodium 3-(N-ethyl-3-methylanilino)-2-hydroxypropanesulfonate.

■ REFERENCES

- (1) Barbayianni, E.; Kaffe, E.; Aidinis, V.; Kokotos, G. Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, as a promising therapeutic target in chronic inflammation and cancer. *Prog. Lipid Res.* **2015**, *58*, 76–96.
- (2) Stracke, M. L.; Krutzsch, H. C.; Unsworth, E. J.; Arestad, A.; Cioce, V.; Schiffmann, E.; Liotta, L. A. Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility-stimulating protein. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 2524–2529.
- (3) Stefan, C.; Jansen, S.; Bollen, M. NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. *Trends Biochem. Sci.* **2005**, *30*, 542–550.
- (4) Tokumura, A.; Majima, E.; Kariya, Y.; Tominaga, K.; Kogure, K.; Yasuda, K.; Fukuzawa, K. Identification of human plasma lysophospholipase D, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, as autotaxin, a multifunctional phosphodiesterase. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 39436–39442.
- (5) Umez-Goto, M.; Kishi, Y.; Taira, A.; Hama, K.; Dohmae, N.; Takio, K.; Yamori, T.; Mills, G. B.; Inoue, K.; Aoki, J.; Arai, H. Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. *J. Cell Biol.* **2002**, *158*, 227–233.
- (6) Okudaira, S.; Yukiura, H.; Aoki, J. Biological roles of lysophosphatidic acid signaling through its production by autotaxin. *Biochimie* **2010**, *92*, 698–706.
- (7) Yung, Y. C.; Stoddard, N. C.; Chun, J. LPA receptor signaling: pharmacology, physiology, and pathophysiology. *J. Lipid Res.* **2014**, *55*, 1192–1214.
- (8) Sevastou, I.; Kaffe, E.; Mouratis, M. A.; Aidinis, V. Lysoglycerophospholipids in chronic inflammatory disorders: the PLA₂/LPC and ATX/LPA axes. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids* **2013**, *1831*, 42–60.
- (9) Perrakis, A.; Moolenaar, W. H. Autotaxin: structure-function and signaling. *J. Lipid Res.* **2014**, *55*, 1010–1018.
- (10) Benesch, M. G.; Tang, X.; Venkatraman, G.; Bekele, R. T.; Brindley, D. N. Recent advances in targeting the autotaxin-lysophosphatidate-lipid phosphate phosphatase axis in vivo. *J. Biomed. Res.* **2016**, *30*, 272–284.
- (11) Federico, L.; Jeong, K. J.; Vellano, C. P.; Mills, G. B. Autotaxin, a lysophospholipase D with pleomorphic effects in oncogenesis and cancer progression. *J. Lipid Res.* **2016**, *57*, 25–35.
- (12) Benesch, M. G. K.; Yang, Z.; Tang, X.; Meng, G.; Brindley, D. N. Lysophosphatidate signaling: the tumor microenvironment's new nemesis. *Trends Cancer* **2017**, *3*, 748–752.
- (13) Gijsbers, R.; Aoki, J.; Arai, H.; Bollen, M. The hydrolysis of lysophospholipids and nucleotides by autotaxin (NPP2) involves a single catalytic site. *FEBS Lett.* **2003**, *538*, 60–64.
- (14) Nishimasu, H.; Okudaira, S.; Hama, K.; Mihara, E.; Dohmae, N.; Inoue, A.; Ishitani, R.; Takagi, J.; Aoki, J.; Nureki, O. Crystal structure of autotaxin and insight into GPCR activation by lipid mediators. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2011**, *18*, 205–212.
- (15) Hausmann, J.; Kamtekar, S.; Christodoulou, E.; Day, J. E.; Wu, T.; Fulkerson, Z.; Albers, H. M. H. G.; van Meeteren, L. A.; Houben, A. J.; van Zeijl, L.; Jansen, S.; Andries, M.; Hall, T.; Pegg, L. E.; Benson, T. E.; Kasiem, M.; Harlos, K.; Kooi, C. W.; Smyth, S. S.; Ovaa, H.; Bollen, M.; Morris, A. J.; Moolenaar, W. H.; Perrakis, A. Structural basis of substrate discrimination and integrin binding by autotaxin. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2011**, *18*, 198–204.
- (16) Albers, H. M. H. G.; Ovaa, H. Chemical evolution of autotaxin inhibitors. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 2593–2603.
- (17) Barbayianni, E.; Magrioti, V.; Moutevelis-Minakakis, P.; Kokotos, G. Autotaxin inhibitors: a patent review. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2013**, *23*, 1123–1132.
- (18) Castagna, D.; Budd, D. C.; Macdonald, S. J. F.; Jamieson, C.; Watson, A. J. Development of autotaxin inhibitors: an overview of the patent and primary literature. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 5604–5621.
- (19) Nikolaou, A.; Kokotou, M. G.; Limnios, D.; Psarra, A.; Kokotos, G. Autotaxin inhibitors: a patent review (2012–2016). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2017**, *27*, 815–829.
- (20) Gierse, J.; Thorarensen, A.; Beltey, K.; Bradshaw-Pierce, E.; Cortes-Burgos, L.; Hall, T.; Johnston, A.; Murphy, M.; Nemirovskiy, O.; Ogawa, S.; Pegg, L.; Pelc, M.; Prinsen, M.; Schnute, M.; Wendling, J.; Wene, S.; Weinberg, R.; Wittwer, A.; Zweifel, B.; Masferrer, J. A novel autotaxin inhibitor reduces lysophosphatidic acid levels in plasma and the site of inflammation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2010**, *334*, 310–317.
- (21) Albers, H. M. H. G.; van Meeteren, L. A.; Egan, D. A.; van Tilburg, E. W.; Moolenaar, W. H.; Ovaa, H. Discovery and optimization of boronic acid based inhibitors of autotaxin. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 4958–4967.
- (22) Benesch, M. G.; Tang, X.; Maeda, T.; Ohhata, A.; Zhao, Y. Y.; Kok, B. P.; Dewald, J.; Hitt, M.; Curtis, J. M.; McMullen, T. P.; Brindley, D. N. Inhibition of autotaxin delays breast tumor growth and lung metastasis in mice. *FASEB J.* **2014**, *28*, 2655–2666.
- (23) Banerjee, S.; Norman, D. D.; Lee, S. C.; Parrill, A. L.; Pham, T. C.; Baker, D. L.; Tigyi, G. J.; Miller, D. D. Highly potent non-carboxylic acid autotaxin inhibitors reduce melanoma metastasis and chemotherapeutic resistance of breast cancer stem cells. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 1309–1324.
- (24) Miller, L. M.; Keune, W.-J.; Castagna, D.; Young, L. C.; Duffy, E. L.; Potjewyd, F.; Salgado-Polo, F.; García, P. E.; Semaan, D.; Pritchard, J. M.; Perrakis, A.; Macdonald, S. J. F.; Jamieson, C.; Watson, A. J. B. Structure–activity relationships of small molecule autotaxin inhibitors with a discrete binding mode. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 722–748.
- (25) Keune, W. J.; Hausmann, J.; Bolier, R.; Tolenaars, D.; Kremer, A.; Heidebrecht, T.; Joosten, R. P.; Sunkara, M.; Morris, A. J.; Matas-Rico, E.; Moolenaar, W. H.; Oude Elferink, R. P.; Perrakis, A. Steroid binding to autotaxin links bile salts and lysophosphatidic acid signaling. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 11248.
- (26) Keune, W. J.; Potjewyd, F.; Heidebrecht, T.; Salgado-Polo, F.; Macdonald, S. J.; Chelvarajan, L.; Abdel Latif, A.; Soman, S.; Morris, A. J.; Watson, A. J.; Jamieson, C.; Perrakis, A. Rational design of autotaxin inhibitors by structural evolution of endogenous modulators. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 2006–2017.
- (27) Joncour, A.; Desroy, N.; Housseman, C.; Bock, X.; Bienvenu, N.; Cherel, L.; Labeguerre, V.; Peixoto, C.; Annoot, D.; Lepissier, L.; Heiermann, J.; Hengeveld, W. J.; Pilzak, G.; Monjardet, A.; Wakselman, E.; Roncoroni, V.; Le Tallec, S.; Galien, R.; David, C.; Vandervoort, N.; Christophe, T.; Conrath, K.; Jans, M.; Wohlkonig, A.; Soror, S.; Steyaert, J.; Touitou, R.; Fleury, D.; Vercheval, L.; Mollat, P.; Triballeau, N.; van der Aar, E.; Brys, R.; Heckmann, B. Discovery, structure-activity relationship, and binding mode of an imidazo[1,2-a]pyridine series of autotaxin inhibitors. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 7371–7392.
- (28) Desroy, N.; Housseman, C.; Bock, X.; Joncour, A.; Bienvenu, N.; Cherel, L.; Labeguerre, V.; Rondet, E.; Peixoto, C.; Grassot, J. M.; Picolet, O.; Annoot, D.; Triballeau, N.; Monjardet, A.; Wakselman, E.; Roncoroni, V.; Le Tallec, S.; Blanque, R.; Cottreaux, C.; Vandervoort, N.; Christophe, T.; Mollat, P.; Lamers, M.; Auberval, M.; Hrvacic, B.; Ralic, J.; Oste, L.; van der Aar, E.; Brys, R.; Heckmann, B. Discovery of 2-[[2-ethyl-6-[4-[2-(3-hydroxyazetidin-1-yl)-2-oxoethyl]piperazin-1-yl]-8-methylimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl]methylamino]-4-(4-fluorophenyl)thiazole-5-carbonitrile (GLPG1690), a first-in-class autotaxin inhibitor undergoing clinical evaluation for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 3580–3590.

- (29) Marmion, C. J.; Griffith, D.; Nolan, K. B. Hydroxamic acids - an intriguing family of enzyme inhibitors and biomedical ligands. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2004**, 2004, 3003–3016.
- (30) Muri, E. M. F.; Nieto, M. J.; Sindelar, R. D.; Williamson, J. S. Hydroxamic acids as pharmacological agents. *Curr. Med. Chem.* **2002**, 9, 1631–1653.
- (31) Zagni, C.; Floresta, G.; Monciino, G.; Rescifina, A. The search for potent, small-molecule HDACIs in cancer treatment: a decade after Vorinostat. *Med. Res. Rev.* **2017**, 37, 1373–1428.
- (32) Ferry, G.; Moulharat, N.; Pradère, J. P.; Desos, P.; Try, A.; Genton, A.; Giganti, A.; Beucher-Gaudin, M.; Lonchamp, M.; Bertrand, M.; Saulnier-Blache, J. S.; Tucker, G. C.; Cordi, A.; Boutin, J. A. S32826, A nanomolar inhibitor of autotaxin: Discovery, synthesis and applications as a pharmacological tool. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2008**, 327, 809–819.
- (33) Jiang, G.; Madan, D.; Prestwich, G. D. Aromatic phosphonates inhibit the lysophospholipase activity of autotaxin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21, 5098–5101.
- (34) Baskakis, C.; Magrioti, V.; Cotton, N.; Stephens, D.; Constantinou-Kokotou, V.; Dennis, E. A.; Kokotos, G. Synthesis of polyfluoro ketones for selective inhibition of human phospholipase A₂ enzymes. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 8027–8037.
- (35) Pellicciari, R.; Natalini, B.; Marinozzi, M. L- α -Aminoadipic acid from L-glutamic acid. *Synth. Commun.* **1988**, 18, 1707–1714.
- (36) Six, D. A.; Barbayanni, E.; Loukas, V.; Constantinou-Kokotou, V.; Hadjipavlou-Litina, D.; Stephens, D.; Wong, A. C.; Magrioti, V.; Moutevelis-Minakakis, P.; Baker, S. F.; Dennis, E. A.; Kokotos, G. Structure–activity relationship of 2-oxoamide inhibition of group IVA cytosolic phospholipase A₂ and group V secreted phospholipase A₂. *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 4222–4235.
- (37) Moutevelis-Minakakis, P.; Filippakou, M.; Sinanoglou, C.; Kokotos, G. Synthesis of tetrazole analogs of γ - and δ -amino acids. *J. Pept. Sci.* **2006**, 12, 377–382.
- (38) Giganti, A.; Rodriguez, M.; Fould, B.; Moulharat, N.; Cogé, F.; Chomarat, P.; Galizzi, J. P.; Valet, P.; Saulnier-Blache, J. S.; Boutin, J. A.; Ferry, G. Murine and human autotaxin α , β , and γ isoforms: gene organization, tissue distribution, and biochemical characterization. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 7776–7789.
- (39) Vrontaki, E.; Melagraki, G.; Kaffé, E.; Mavromoustakos, T.; Kokotos, G.; Aidinis, V.; Afantitis, A. Computer aided drug design approaches for identification of novel autotaxin (ATX) inhibitors. *Curr. Med. Chem.* **2016**, 23, 1708–1724.
- (40) Katsamakas, S.; Bermpereoglou, E.; Hadjipavlou-Litina, D. Considering autotaxin inhibitors in terms of 2D-QSAR and 3D mapping-review and evaluation. *Curr. Med. Chem.* **2015**, 22, 1428–1461.
- (41) Albers, H. M. H. G.; Hendrickx, L. J.; van Tol, R. J.; Hausmann, J.; Perrakis, A.; Ova, H. Structure-based design of novel boronic acid-based inhibitors of autotaxin. *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 4619–4626.
- (42) Mora, A. L.; Rojas, M.; Pardo, A.; Selman, M. Emerging therapies for idiopathic pulmonary fibrosis, a progressive age-related disease. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2017**, 16, 755–772.
- (43) Martinez, F. J.; Collard, H. R.; Pardo, A.; Raghu, G.; Richeldi, L.; Selman, M.; Swigris, J. J.; Taniguchi, H.; Wells, A. U. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2017**, 3, 17074.
- (44) Liu, Y. M.; Nepali, K.; Liou, J. P. Idiopathic pulmonary fibrosis: current status, recent progress, and emerging targets. *J. Med. Chem.* **2017**, 60, 527–553.
- (45) King, T. E., Jr.; Bradford, W. Z.; Castro-Bernardini, S.; Fagan, E. A.; Glaspole, I.; Glassberg, M. K.; Gorina, E.; Hopkins, P. M.; Kardatzke, D.; Lancaster, L.; Lederer, D. J.; Nathan, S. D.; Pereira, C. A.; Sahn, S. A.; Sussman, R.; Swigris, J. J.; Noble, P. W. for the ASCEND Study Group. A phase 3 trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N. Engl. J. Med.* **2014**, 370, 2083–2092.
- (46) Richeldi, L.; du Bois, R. M.; Raghu, G.; Azuma, A.; Brown, K. K.; Costabel, U.; Cottin, V.; Flaherty, K. R.; Hansell, D. M.; Inoue, Y.; Kim, D. S.; Kolb, M.; Nicholson, A. G.; Noble, P. W.; Selman, M.; Taniguchi, H.; Brun, M.; Le Maulf, F.; Girard, M.; Stowasser, S.; Schlenker-Herzeg, R.; Disse, B.; Collard, H. R. for the INPULSIS Trial Investigators. Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *N. Engl. J. Med.* **2014**, 370, 2071–2082.
- (47) Oikonomou, N.; Mouratis, M. A.; Tzouveleakis, A.; Kaffé, E.; Valavanis, C.; Vilaras, G.; Karameris, A.; Prestwich, G. D.; Bouros, D.; Aidinis, V. Pulmonary autotaxin expression contributes to the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2012**, 47, S66–S74.
- (48) www.glp.com/glp-1690, Accessed Feb 4, 2018.
- (49) Moeller, A.; Ask, K.; Warburton, D.; Gauldie, J.; Kolb, M. The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2008**, 40, 362–382.
- (50) Magrioti, V.; Nikolaou, A.; Smyrniotou, A.; Shah, I.; Constantinou-Kokotou, V.; Dennis, E. A.; Kokotos, G. New potent and selective polyfluoroalkyl ketone inhibitors of GVIA calcium-independent phospholipase A₂. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, 21, S823–S829.
- (51) Ainsworth, C.; Benslay, D. N.; Davenport, J.; Hudson, J. L.; Kau, D.; Lin, T. M.; Pfeiffer, R. R. Cholesterol-solubilizing agents related to the gallstone problem. *J. Med. Chem.* **1967**, 10, 158–161.
- (52) Suzuki, T.; Nagano, Y.; Matsuura, A.; Kohara, A.; Ninomiya, S.; Kohda, K.; Miyata, N. Novel histone deacetylase inhibitors: design, synthesis, enzyme inhibition, and binding mode study of SAHA-based non-hydroxamates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 4321–4326.
- (53) Stowell, J. C.; Huot, R. I.; Van Voast, L. The synthesis of N-hydroxy-N'-phenyloctanediamide and its inhibitory effect on proliferation of AXC rat prostate cancer cells. *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 1411–1413.
- (54) Elaut, G.; Laus, G.; Alexandre, E.; Richert, L.; Bachellier, P.; Tourwé, D.; Rogiers, V.; Vanhaecke, T. A metabolic screening study of trichostatin A (TSA) and TSA-like histone deacetylase inhibitors in rat and human primary hepatocyte cultures. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2007**, 321, 400–408.
- (55) Lebedev, A. V.; Lebedeva, A. B.; Sheludiyakov, V. D.; Ovcharuk, S. N.; Kovaleva, E. A.; Ustinova, O. L. Organosilicon synthesis of isocyanates. III. Synthesis of aliphatic, carbocyclic, aromatic, and alkylaromatic isocyanatocarboxylic acid esters. *Russ. J. Gen. Chem.* **2006**, 76, 1069–1080.
- (56) Elsinghorst, P. W.; Tanarro, C. M.; Gütschow, M. Novel heterobivalent tacrine derivatives as cholinesterase inhibitors with notable selectivity towards butyrylcholinesterase. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 7540–7544.
- (57) Gu, K.; Bi, L.; Zhao, M.; Wang, C.; Ju, J.; Peng, S. Toward the development of chemoprevention agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, 15, 6273–6290.
- (58) Zhang, Z. D.; Scheffold, R. Asymmetric catalysis by vitamin B₁₂: The isomerization of achiral aziridines to optically active allylic amines. *Helv. Chim. Acta* **1993**, 76, 2602–2615.
- (59) Katsifa, A.; Kaffé, E.; Nikolaidou-Katsaridou, N.; Economides, A. N.; Newbigging, S.; McKerlie, C.; Aidinis, V. The bulk of autotaxin activity is dispensable for adult mouse life. *PLoS One* **2015**, 10, No. e0143083.
- (60) Mouratis, M. A.; Magkrioti, C.; Oikonomou, N.; Katsifa, A.; Prestwich, G. D.; Kaffé, E.; Aidinis, V. Autotaxin and endotoxin-induced acute lung injury. *PLoS One* **2015**, 10, No. e0133619.

Autotaxin expression from macrophages amplifies experimental autoimmune encephalomyelitis

Ioanna Ninou^{1,†}, Ioanna Sevastou^{1,2,†}, Eleanna Kaffe¹, George Stamatakis¹, Spyros Thivaos¹, George Panayotou¹, Junken Aoki³, George Kollias¹ and Vassilis Aidinis^{1,*}

¹Biomedical Sciences Research Center “Alexander Fleming”, 16672 Athens, Greece.

²Present address: Institute of Neurology, University College London, London WC1N 1 PJ, United Kingdom.

³Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Sendai, Miyagi, 980-8578 Japan.

Abstract

Autotaxin (ATX) is a secreted lysophospholipase D catalyzing the production of lysophosphatidic acid (LPA), a growth factor-like signaling lysophospholipid. ATX and LPA signaling have been incriminated in the pathogenesis of different chronic inflammatory diseases and various types of cancer. In this report, increased ATX levels and disturbed lipid homeostasis have been discovered during the development of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) suggesting that the ATX/LPA axis participate in its pathogenesis. ATX expression from astrocytes is shown necessary for embryonic development, suggesting astrocytic ATX expression upon EAE as an aberrantly re-activated developmental program. ATX expression from oligodendrocytes, or systemic levels of ATX, are shown not to have a major effect in the same settings. More importantly, ATX genetic deletion from infiltrating macrophages and resident microglia are shown to attenuate EAE pathogenesis, likely through LPA-mediated autocrine macrophage activation, thus providing the genetic proof of principle for pharmaceutical interventions.

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is the most common debilitating disorder of the central nervous system (CNS), imposing a substantial personal, and socioeconomic

burden¹. MS is a chronic inflammatory, autoimmune and neurodegenerative disease, characterized by loss of myelin sheaths and oligodendrocytes in the brain and spinal cord, resulting in aberrant axonal conduction leading to neurologic disabilities and, eventually, impaired mobility and cognition¹.

Despite the inherent limitations of modeling a human disease in experimental animals, valuable insights into MS pathophysiology were provided by the model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), that can be induced by immunizing animals against myelin antigens². In this context, current research suggests that inflammation is a prominent feature of MS pathogenesis, initiated by autoreactive lymphocytes in the periphery, substantiated by leakage of the blood-brain barrier (BBB) and dominated by macrophages³. Chronic neuroinflammation leads to microglial and astrocyte activation and eventually demyelination, axonal or neuronal loss and astrogliosis³.

No existing treatment can reverse the progressive neurologic deterioration in MS; however, the discovery of fingolimod (FTY720), the first oral drug to treat some forms of MS, has introduced a new paradigm and has attracted attention to the biology of bioactive lysophospholipids, such as sphingosine 1 phosphate (S1P). S1P expression levels are controlled by a multi-controlled enzymatic metabolic system regulating S1P effects, imposed

through its five cognate G-protein coupled receptors (GPCRs; S1PR₁₋₅)⁴. FTY720, after *in vivo* phosphorylation, inhibits S1P-mediated lymphocyte egress from lymph nodes and attenuates the pathogenic autoreactive lymphocyte attack to the CNS⁵. Additionally, it has been suggested to decrease BBB permeability, macrophage recruitment and polarization, astrocyte activation and migration, as well as oligodendrocyte process extension and retraction^{4,5}.

FTY720 has also been reported to inhibit cytosolic phospholipase A2 (cPLA2 α)⁶, which controls the rate limiting step in eicosanoid formation. Increased eicosanoid levels have been reported in EAE and cPLA2 α deficient mice have been shown to be resistant to EAE^{7,8}. Non-withstanding the central role of cPLA2 in eicosanoid metabolism, cPLA2 is also centrally involved in the production of lysophosphatidylcholine (LPC)^{9,10}, a well-known demyelinating agent whose effects in the CNS can be blocked by FTY720¹¹. Moreover, FTY720 has been reported¹²⁻¹⁴ to inhibit autotaxin (ATX, ENPP2), a secreted lysophospholipase D catalyzing the hydrolysis of LPC and the production of lysophosphatidic acid (LPA), while several reports have suggested an intersection and interplay of the PLA₂/LPC and ATX/LPA axes in pathophysiology⁹. Although ATX can also hydrolyze sphingosylphosphorylcholine (SPC, the precursor of S1P) *in vitro*¹⁵, the main enzymatic activity of ATX *in vivo* has been shown to be the production of extracellular LPA¹⁶.

The enzymatic product of ATX, LPA, is a bioactive growth factor-like lysophospholipid that can be found in most biological fluids correlating with ATX levels^{9,17}. LPA, which is negatively regulated by a group of membrane-associated lipid-phosphate phosphatases (PLPPs)¹⁸, signals through at least six

GPCR receptors (LPAR1-6) that exhibit widespread tissue distribution and overlapping specificities¹⁹; LPAR1-3 belong to the endothelial differentiation gene (EDG) family together with the S1P receptors^{4,19}. LPARs, as well as S1PRs, couple with G-proteins, crucial molecular switches that activate many signal transduction pathways, leading in pleiotropic effects in almost cell types^{4,19,20}.

ATX/LPA have been shown to be essential for embryonic development; ATX deficient mice exhibited severe neural tube defects and impaired neurite outgrowth, indicating a major role in CNS development²¹. In adult life, the bulk of ATX activity has been shown to be dispensable in healthy conditions²², but increased ATX expression has been detected in many chronic inflammatory disorders and cancer¹⁶, suggesting the ATX/LPA axis as a developmental program aberrantly re-activated in pathophysiological situations.

The adult healthy CNS is one of the highest ATX expressing tissues predominately expressing the CNS specific ATX γ isoform which, in comparison to the most abundant β isoform, contains a 25 aa insert of unknown function^{23,24}. In the CNS, ATX is expressed by oligodendrocyte precursors at the onset of myelination, choroid plexus epithelial cells and leptomeningeal cells, while increased ATX staining has been detected in activated astrocytes following neurotrauma²⁵; increased ATX levels have been also reported in neuroblastomas and glioblastomas²⁶. Moreover, it was recently shown that PLA2/ATX-dependent LPA/LPAR1 signaling is crucial for the initiation of neuropathic pain^{27,28}. In the same context, increased ATX and LPA levels have been reported in the sera and CSF of MS patients²⁹⁻³², however opposing results have also been reported³³.

In this report, we show that upon EAE development ATX/LPA levels increase, while ATX staining was detected high on activated astrocytes, as well as on some macrophages and microglia. Genetic deletion of ATX from astrocytes resulted in embryonic lethality, while its genetic deletion from monocytic cells attenuated EAE development, thus establishing a pathologic role for ATX/LPA in MS/EAE.

Results and Discussion

Increased ATX and LPA levels in EAE.

To explore a possible involvement of the ATX/LPA axis in the pathophysiology of relapsing-remitting MS, we first examined the levels of ATX/LPA and related molecules during the development of EAE. Towards this end, C57Bl6/J (H-2^b) 10-12-week old male mice were immunized with myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG₃₅₋₅₅ in CFA), following a widely used EAE protocol (Fig. 1A)³⁴, as previously reported^{35,36}. Immunized mice were weighted (Fig. 1B) and monitored macroscopically for clinical signs of EAE for 22 days (Fig. 1C), in comparison with naïve littermate mice. Blood plasma, as well as spinal cord tissue, where EAE predominately manifests in this model³⁴, were collected at the onset (d.7), peak (d.15) and remission (d.22) of EAE (Fig.1 A,C).

Increased ATX (α - ϵ) mRNA levels were detected with Q-RT-PCR (using two different sets of primers amplifying different parts of the mRNA) in the spinal cords of mice throughout the development of EAE (Fig. 1D). ATX mRNA levels were significantly higher at the onset and the remitting phase of the disease, rather than its peak, possibly consolidating an early report that indicated reduced ATX mRNA levels at the peak of the disease in a different (SWR/SJL F1s; H-2^{q,s}) EAE model³⁷, as well as the conflicting reports on the ATX expression levels of human

patients. A similar expression profile was also found for the ATX γ isoform (Fig 1 D), which is predominantly expressed in the CNS^{37,38}, suggesting that at least one part of the increased levels of ATX is derived locally from resident CNS cells. On the contrary, no significant changes in the mRNA profile of PLPPs, largely responsible for extracellular LPA degradation¹⁸, was noted (Fig. S1A). Moreover, the mRNA levels for the different receptors of LPA were found to fluctuate during EAE development (Fig. S1B), possibly implying exacerbated LPA signaling in the spinal cord³⁹. In the same context and given the likely involvement of PLA₂/LPC axis in MS/EAE, as well as the suggested interplay of the PLA₂/LPC and ATX/LPA axes in pathophysiology⁹, the mRNA levels of different PLA₂ isoforms were interrogated, revealing, as expected, an upregulation of various isoforms (Fig. S 1C); the mRNA levels of COX-1/2, guiding the synthesis of eicosanoids, were also found increased in EAE (Fig. S 1D). Of interest, a search for putative functional partners of ATX at [STRING](#) returns mostly PLA₂ isoforms, suggesting possible physical association of ATX and PLA₂s and intriguing possibilities in the regulation of local LPC and LPA production during EAE pathogenesis.

TNF and IL-6, intricately linked with EAE development^{35,36}, have been reported to stimulate ATX mRNA expression in different, non-CNS, cell types⁴⁰⁻⁴²; however, possibly hampered by tissue heterogeneity, no apparent association of ATX mRNA expression with TNF/IL-6 mRNA levels was observed in EAE spinal cords (Fig. S1 E-F). Concerning other possible inducers of ATX expression in the CNS, it is important to note that galectin-3 (Gal-3) has been shown to modulate ATX expression in melanoma cells⁴³. Gal-3 is a β -galactoside-binding lectin which recognize N-

acetyllactosamine and form multivalent complexes with certain glycoconjugates in the cell surface⁴⁴. Different CNS and inflammatory cell types have been proposed to express Gal-3 during MS/EAE⁴⁴, while its deficiency reduced the severity of EAE⁴⁵ although its role is complex and remains controversial. However, both Gal-3 and ATX are secreted proteins, also detected in exosomes, are involved in oligodendrocyte differentiation and have been suggested as matricellular proteins mediating cell adhesion and ECM interactions^{9,44,46}. Therefore, a possible interplay of Gal-3 and ATX in the pathophysiology of MS/EAE seems very likely, urging further dissection. Moreover and beyond neuroinflammation, both Gal-3 and ATX are well established pro-fibrotic factors^{40,41,47-49}; however, no obvious association of ATX mRNA expression with fibrotic or anti-inflammatory gene expression was detected (Fig. S1 G-L). It is worth noting that the increased expression of different collagens, likely driven by TGF β , indicates that typical wound healing responses also characterize EAE development and resolution that warrants further investigation.

Beyond the ATX mRNA expression profile in spinal cords, indicating *de novo* synthesis by CNS resident and/or inflammatory cells during EAE, a similar ATX protein expression profile was obtained upon western blot analysis of spinal cord homogenates (Fig. 1E and S2A), confirming an upregulation of ATX levels in the spinal cord during EAE. Moreover, immunofluorescent staining of ATX (with two different antibodies) in 7 μ m transverse spinal cord cryo-sections confirmed elevated ATX protein levels and localized staining in white matter lesions during EAE progression (Fig. 1F and Fig. S2B). More specifically, double immunolabelling suggested that in the diseased spinal cord ATX is likely

expressed from different cell types, as previously suggested for other pathophysiological settings and tissues: mostly activated astrocytes (GFAP⁺; Fig. S2C)⁵⁰, as well as from a subset of macrophages/microglia (CD68⁺; Fig. S2C)^{47,51,52}. Limited staining was detected in oligodendrocytes (MBP⁺; Fig. S2C), as expected⁵³. The observed staining does not exclude the possibility that some ATX may be bound on cell surfaces via integrins⁵⁴⁻⁵⁶, or other cell surface molecules, implicating ATX modulation by ECM components^{24,26,57,58}.

No statistically significant changes of ATX levels were detected in the CSF during the development of EAE (Fig. 1G), suggesting that choroid plexus and leptomeningeal cells constitutive expression of ATX is not severely affected in EAE. However, due to study limitations (very low volume of mouse CSF, 1-2 μ l), definite proof will be provided only by a future conditional genetic deletion of ATX in these cells. On the contrary, increased levels of ATX were detected in the plasma of EAE mice (Fig. 2H). However, it is not clear if the increased plasma levels contribute to the spinal cord ATX levels, given the increased permeability of the blood brain barrier (BBB) during EAE, or *vice versa*. It should be noted that the development of EAE relies on the administration, at the initial stages of disease induction (Fig. 1A), of pertussis toxin (PTx), a known inhibitor of G α_i protein-coupled signaling pathways, such as LPA. On the other hand, LPA has been suggested to feedback regulate ATX levels under certain conditions^{59,60}; however, no significant changes of ATX spinal cord mRNA or plasma activity levels were observed upon PTx administration in mice in the absence of immunization (Fig. 1 I-K).

To correlate ATX expression levels with its enzymatic template and product, we then performed HPLC/MS/MS

lipidomic analysis of spinal cord homogenates and plasmas isolated from mice undergoing EAE development. The increased ATX levels in the spinal cord and plasma resulted in an analogous increase of total LPA levels (Fig. 2 A-C), while no major changes were observed in LPC levels (Fig. 2 A, D-E). Accordingly, intraspinal injection of LPA or contusive spinal cord injury has been shown to trigger demyelination of central neurons⁶¹. It should be noted that beyond the LPC/LPA species, a deregulation of various lipids was detected in the spinal cords of EAE mice, such as sphingomyelins and ceramides (Fig. S3A), while a striking increase of unsaturated fatty acids was also observed (Fig. S3B). ATX/LPA were recently shown to modulate fatty acid synthesis in the liver⁴¹, while a same effect was also suggested in lung cancer⁶², warranting further investigation. The expression of ATX from astrocytes that provide metabolic support to other neural cells, favors the hypothesis.

Therefore, EAE development is accompanied with a deregulation of various enzymes involved in lysophospholipid homeostasis, including ATX, that results in local increases of LPA levels, suggesting that the ATX/LPA axis is involved in MS/EAE pathogenesis.

Systemic ATX/LPA levels do not affect EAE pathogenesis. 40% of serum ATX is thought to derive from the adipose tissue⁶³, known to secrete various hormones and cytokines (i.e. adipokines) that exert significant effects on various distant pathophysiological processes, including neurodegeneration⁶⁴. Therefore and given the increased BBB permeability in EAE, the increased plasma levels of ATX (Fig. 1H), as well as the reported effects of LPA in brain endothelial cells⁶⁵⁻⁶⁷, we examined if systemic fluctuations of ATX/LPA levels could affect EAE pathogenesis.

Towards this end, EAE was induced in the heterozygous complete knock out mouse for ATX (*Enpp2*^{+/-}; 50% of normal serum ATX/LPA levels)²¹, as well in homozygous transgenic mice overexpressing ATX in the liver (*TgEnpp2*^{+/+}), driven by the human α 1-antitrypsin inhibitor (*a1t1*) promoter (200% of normal serum ATX/LPA levels)⁶⁸. No differences were observed between *Enpp2*^{+/-} mice (Fig. 3 A-C) or *TgEnpp2*^{+/+} mice (Fig. 3 D-F) and their littermate controls in EAE incidence, onset or severity, suggesting that systemic fluctuations of 50-200% in ATX/LPA serum levels have no effect in EAE in this mouse model. Similarly, no effect of systemic ATX/LPA has been observed, using the same genetically modified mice, in other chronic inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis⁴² or pulmonary fibrosis⁴⁷, highlighting the importance of local or inflammatory ATX expression.

ATX expression from astrocytes is necessary for embryonic development.

Astrocytes are the most abundant glial cells, responsible for physical and metabolic support of other neural cells. They participate in the regulation of immune responses in the CNS, and orchestrate tissue repair following injury⁶⁹. Moreover, astrocytes are increasingly recognized as active players in myelination and MS pathogenesis^{70,71}. Increased ATX staining of reactive astrocytes has been observed following neurotrauma⁵⁰, as well as upon EAE induction (Fig. S2C), completely absent in physiological conditions⁵⁰. The expression of ATX from reactive astrocytes (GFAP⁺ cells) during EAE was further confirmed by confocal microscopy (Fig. 4 A).

Therefore, and in order to examine a possible role of ATX expression from reactive astrocytes in MS pathogenesis, ATX was genetically deleted from

astrocytes by mating the conditional knockout mouse for ATX (*Enpp2*^{fl/fl})²¹ with a transgenic mouse line expressing the Cre recombinase under the control of the hGFAP promoter (*TghGFAP-Cre*)⁷². However, genetic deletion of ATX from astrocytes (GFAP⁺) resulted in embryonic lethality (Table 1, Fig. 4 B), irrespective of the origin (paternal or maternal) of the Cre transgene. Noteworthy, the very few *hGFAPCre*^{+/+} *Enpp2*^{fl/fl} mice that were born had not recombined the *Enpp2* gene, unlike the malformed and growth retarded embryos. Therefore, ATX expression from astrocytes is necessary for embryonic development, extending previous studies indicating aberrant neural tube formation in ATX deficient embryos²¹, whereas neural tube patterning is closely linked with specification and functions of astrocytes⁶⁹.

Beyond the vital role of astrocytic ATX expression in development that needs to be further dissected, its re-expression in reactive astrocytes upon EAE and its likely role in its pathogenesis can be only deciphered in future studies by employing inducible genetic deletion in adult mice. Astrocytic ATX expression could have different roles in EAE pathogenesis via the production of LPA. As the current dogma/hypothesis suggests, LPA forms and acts locally while different effects of LPA in astrocyte physiology have been suggested via well-established signal transduction pathways⁷³. In brief, LPA can induce several of the hallmarks of reactive astrogliosis such as cytoskeletal re-organization⁷⁴⁻⁷⁶, proliferation⁷⁷ and axonal outgrowth^{78,79}. Moreover, LPA has been reported to modulate astrocytic glucose uptake⁸⁰ and glycogenolysis⁸¹, suggesting that LPA is involved in metabolic regulation of astrocytes and hence to the overall CNS energy metabolism, due to the central role of astrocytes in it. Other possible secondary,

indirect effects of astrocytic ATX/LPA include neuronal differentiation⁸² and possibly synaptic transmission⁸³ that require further exploration.

ATX expression from oligodendrocytes has a limited role in EAE pathogenesis.

Oligodendrocytes (OLs), which arise during development from oligodendrocyte precursor cells (OPCs), are responsible for axon myelination, i.e. the electrical lipid insulation necessary for neurotransmission. The characteristic demyelination in MS is mediated by OL dysfunction and apoptosis, as well as by the reduced generation of OLs from OPCs, resulting in insufficient remyelination, axonal damage and neuronal loss³.

ATX mRNA levels were found upregulated during OPCs differentiation^{37,53,84}, where was suggested to regulate process network formation and focal adhesion organization, independent of LPA, via its matricellular properties⁸⁵. Moreover, ATX/LPA have been shown to modulate MBP mRNA levels in differentiating LPAR-expressing OPCs⁸⁶, suggesting an additional layer of ATX effects in OL maturation and axon myelination.

Given the developmental expression of ATX from OPCs, we next ablated ATX in OLs by mating the conditional knockout mouse for ATX (*Enpp2*^{n/n})²¹ with a transgenic mouse line expressing the Cre recombinase under the control of the MOG promoter (*TgMOG-Cre*)⁸⁷. *MOGEnpp2*^{-/-} mice were born with mendelian ratios, did not exhibit any behavioral phenotype, nor any appreciable effect in CNS gross morphology under healthy conditions; no major effect in EAE incidence (Fig. 5A), onset (Fig. 5B) or cumulative score (Fig. 5C) was observed, suggesting that ATX expression from OLs does not have a dominant role in EAE pathogenesis.

ATX expression from macrophages/microglia amplifies EAE severity. Microglia and macrophages are well recognized as essential players in CNS diseases including MS, while macrophage infiltration dominate the CNS inflammatory response in EAE^{88,89}. Differential and even opposing contributions of infiltrating vs resident monocytic cells has been reported in MS/EAE pathogenesis⁸⁸, although a consensus has not been reached. Both resident and inflammatory monocytic cells are highly heterogeneous and at a constant dynamic equilibrium with regard to activation or polarization status⁹⁰.

Lung macrophages (LysM⁺) post bleomycin-mediated epithelial damage have been shown to produce ATX leading to LPA production in the bronchoalveolar space⁴⁷, while LPS-mediated TLR activation of monocytic THP-1 cells also led to ATX production⁵¹. In the CNS, microglial activation has been shown to mediate *de novo* LPA production in a model of neuropathic pain⁹¹. As shown here (Fig. S2B), a subpopulation of monocytic (CD68⁺) cells stained for ATX. To verify ATX expression from macrophages/microglia upon EAE induction we performed FACS analysis of spinal cord homogenates upon EAE induction^{92,93}, that indicated that both microglial cells (CD45^{low}CD11b⁺), as well as infiltrating blood derived myeloid cells (CD45^{hi}CD11b⁺) express ATX (Fig. S6 A-B).

Therefore, and in order to access a possible role of ATX expression from macrophages/microglia in MS/EAE pathogenesis, ATX was genetically deleted in these lineages by mating the conditional knockout mouse for ATX (*Enpp2*^{fl/f})²¹ with a transgenic mouse line expressing the Cre recombinase under the control of the CD11b promoter (*TgCD11b-Cre*)⁹⁴. *CD11bEnpp2*^{-/-} mice were born with a mendelian ratio and had

properly recombined the *Enpp2* gene as qualitatively shown with PCR of DNA extracted from spinal cord sections (Fig. 6A). Genetic deletion of ATX from monocytic cells, decreased mRNA levels in the spinal cord (Fig. 6B), as well as ATX activity levels in the plasma (Fig. 6C). *CD11bEnpp2*^{-/-} mice did not exhibit any behavioral phenotype, nor any appreciable effect in CNS gross morphology under healthy conditions; no major effect in EAE incidence (Fig. 6D) or onset (Fig. 6E) was observed either. However, EAE progression in *CD11bEnpp2*^{-/-} mice was significantly attenuated, with mice presenting with less disability at the peak of disease (Fig. 6E), resulting in a decreased cumulative score (Fig. 6F). Histological analysis of diseased spinal cords indicated that the genetic absence of ATX from macrophages/microglia resulted in decreased inflammation, as detected with H/E staining, decreased demyelination, as detected with luxol staining, as well as significantly less activated astrocytes (GFAP⁺), a hallmark of EAE (Fig. 6G). Therefore, ATX expression from macrophages and microglia have a major role in disease pathogenesis, amplifying the intensity of clinical symptoms.

Notwithstanding the LPA effects in most neural types⁷³ and focusing on the likely autocrine effects of ATX/LPA in monocytic cells, it was recently reported that LPA stimulated the expression of F4/80, a well-known macrophage activation marker⁸⁸, in bone marrow-derived and splenic monocytic (CD11b⁺) cells⁵². Accordingly, most macrophages and microglia expressing ATX upon EAE were positive for F4/80 expression (Fig. 7C), suggesting that the pathogenetic effect of ATX expression from monocytic cells in the context of EAE includes their activation.

Macrophage biology in the CNS remains understudied and controversial,

however, it is generally accepted that macrophages and microglia can have differential roles in the pathogenesis of CNS disorders⁸⁸. In EAE, myeloid cells are thought to have a greater role, promoting disease onset and progression. By contrast, microglia have been suggested to have a beneficial role, especially in the remitting phase, by aiding in tissue repair, as well as by inducing the differentiation of OPCs to OLs, thus promoting remyelination⁸⁸. Therefore, the observed EAE attenuation upon genetic deletion ATX in CD11b⁺ cells (Fig. 6), can likely be attributed to the abolishment of its expression from inflammatory macrophages. However, further studies are required, especially since there other types of CNS resident macrophages, namely perivascular, meningeal and choroid plexus macrophages⁸⁸, that are localized at sites of high ATX expression.

Conclusions

In this report, we have demonstrated that ATX levels increase in the spinal cord upon EAE development in mice, leading to local increases of LPA levels, strongly suggesting that the ATX/LPA axis participates in the pathogenesis of EAE. In the diseased spinal cord, ATX expression was localized in activated astrocytes and its conditional genetic deletion resulted in embryonic lethality, thus extending previous observations on the vital role of ATX/LPA in embryonic development and opening new research directions. In the context of EAE, astrocytic ATX-mediated LPA stimulation is likely to have autocrine effects in their metabolism, cytoskeletal organization and proliferation, as well as in axonal outgrowth, thus likely promoting disease development.

More importantly, both macrophages-microglia upon EAE were shown to stain for ATX, whereas the majority of ATX stained monocytic cells also stained for

F4/80, suggesting that ATX/LPA mediate their activation. Although macrophages and microglia likely have opposing roles in EAE development, the overall effect of the genetic deletion of ATX from macrophages-microglia was the attenuation of EAE severity, proving an overall detrimental role of monocytic-derived ATX in EAE pathogenesis, likely though LPA mediated autocrine macrophage activation, and providing the proof of principle for pharmaceutical interventions in MS. Indeed, pharmacologic potent ATX inhibition was recently reported to attenuate the development of EAE⁹⁵, while the discovery of novel ATX inhibitors is booming⁹⁶.

Besides the autocrine ATX/LPA effects on macrophages and astrocytes and the possible secondary effects in other neural cells⁷³, LPA can also affect BBB permeability^{65-67,97,98}, thus additionally modulating the entry of inflammatory mediators in the CNS. Beyond LPA signaling and effects, ATX has been reported to have matricellular properties regulating process network formation and focal adhesion organization in oligodendrocytes, thus affecting their maturation⁴⁶. Moreover, ATX has been shown to be an adhesive substrate for homing lymphocytes²⁴, thus extending the possible ATX effects in MS/EAE pathogenesis.

Materials and Methods

Mice

“All mice were bred under specific pathogen-free conditions in their respective genetic backgrounds (C57Bl6/J) for over 10 generations at the animal facilities of the Alexander Fleming Biomedical Sciences Research Center. Mice were housed at 20–22°C, 55±5% humidity, and a 12-h light-dark

cycle; water and food were given *ad libitum*. All reported experimentation in mice for this project, in line with the ARRIVE guidelines, was approved by the Institutional Animal Ethical Committee (IAEC) of BSRC Alexander Fleming (#449) and the Veterinary service and Fishery Department of the local governmental prefecture (#1369/3283/3204). All randomly-assigned experimental groups consisted of littermate sex- and age-matched mice.” The generation and genotyping protocols for *Enpp2*^{f/f}²¹, *Enpp2*^{f/-}²¹, *TgEnpp2*^{+/+}⁶⁸, *TgMOG-Cre*⁸⁷, *TgGFAP-Cre*⁷², *TgCD11b-Cre*⁹⁴ genetically modified mice have been described previously.

Induction of EAE and Clinical Evaluation. EAE was induced in 10-12-week-old male mice. Mice were subcutaneously immunized with 100 µg of 35-55 myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG₃₅₋₅₅, MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK, GeneCust), emulsified in Freund’s Adjuvant supplemented with 1mg of heat-inactivated *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (Difco Laboratories) to the side flanks. In addition, mice received two intraperitoneal injections of 100 ng pertussis toxin at the time of immunization and 48h later. Mice were weighed and monitored for clinical signs of EAE throughout the experiment. EAE symptoms were scored as follows: 0, no clinical disease; 1, tail weakness; 2, paraparesis (incomplete paralysis of 1 or 2 hind limbs); 3, paraplegia (complete paralysis of 1 or 2 hind limbs); 4, paraplegia with forelimb weakness or paralysis; 5, dead or moribund animal. At the day of sacrifice, blood plasma and spinal cord tissue were harvested.

Pathology and Immunohistochemistry. Mouse spinal cords were embedded in

OCT and cryopreserved at -80°C. 7 µm sections were sliced transversely into super frost glass slides. Sections were prepared and rehydrated for Luxol fast blue staining of myelin and counterstained with hematoxylin/eosin (H&E) according to standard protocols⁹⁹. For immunocytochemistry, sections were left to dry and then were fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min at room temperature. Sections were then permeabilized with 0.2% Triton-X for 5 min for intracellular antigen detection wherever it was necessary. Non-specific antigen sites were blocked with blocking solution (Zytomed) for 5 min, followed by addition of appropriate primary antibodies in 2% BSA at 4°C overnight. All washes were performed using PBS-Tween 0.05%. The following day the appropriate secondary antibody was applied to the sections for 1h at room temperature, followed by counter-staining with DAPI (Fluoroshield with DAPI histology mounting medium, Sigma). The following antibodies were used: rat anti-mouse CD68 (1:50, AbD Serotec), rat anti-mouse F4/80 (1:50, AbD Serotec), rat anti-mouse CD11b (BD Pharmingen, 1:50), mouse anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) clone G-A-5-Cy3 (sigma, 1:2000), rabbit anti-mouse ATX (1:500, Cayman or Sigma), anti-rat Alexa488 (Abcam, 1:1000), anti-rabbit Alexa555 (Abcam, 1:1000). All the appropriate isotype controls were used: Rabbit IgG, Rat IgG.

Imaging. Histology images were obtained using a Nikon Eclipse E800 microscope (Nikon Corp., Shinagawa-ku, Japan) attached to a Q Imaging EXI Aqua digital camera, using the Q-Capture Pro software. Immunofluorescence images were captured under a Zeiss Axiovert200 microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany), while confocal images were captured using a Leica TCSSP5 laser-scanning confocal microscope. The Leica

LASAF software and Adobe Photoshop (for contrast, brightness, and color simultaneous adjustments) were used to create figures and process images.

Flow cytometry. Mononuclear cell suspensions of spinal cords were prepared according to the standard protocol⁹². Briefly, spinal cord tissue was homogenized with 1X HBSS in the presence of Golgi Plug (1:1000, BD Biosciences, San Jose, CA) and passed through nylon mesh filter for further dissociation. Monocytes from SCs were isolated from the interphase of a gradient isotonic Percoll (30/70%, Sigma) at room temperature. Single-cell suspensions from spinal cord were incubated with Fc block (CD16/32-clone 93, BioLegend) and then stained with fluorescent-conjugated antibodies for surface markers: Alexa700 anti-mouse CD45 (BioLegend), APC-Cy7 anti-mouse CD11b (BioLegend) and phycoerythrin (PE) anti-mouse F4/80 (BD Biosciences). For intracellular staining, cells were permeabilized (Permeabilization wash buffer 10X, BioLegend) and stained with rabbit anti-mouse ATX (Cayman), followed by incubation with a FITC-conjugated anti-rabbit antibody. The appropriate isotype control (rabbit IgG) was used. Data was collected on a FACScalibur and analyzed by FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR).

Immunoblotting. Mouse spinal cords were flushed from the spinal column, snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C thereafter. Tissue was homogenised with a glass-glass homogeniser in lysis buffer containing leupeptin, pepstatin and phenylmethanesulfonylfluoride. Following centrifugation at 17000 g the supernatant (cytoplasmic and soluble proteins) was collected for analysis with western blotting. Protein concentration was determined with the Bradford assay using

a standard curve of BSA (0,125-2mg/ml). Proteins were separated by 8% SDS-PAGE and transferred to Protran nitrocellulose membranes (GE Healthcare, Bucks, UK) using the Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer system (Bio-Rad Laboratories, CA, USA). Primary anti-ATX Ab incubation (monoclonal 4F1, 1:1000, unless otherwise specified) was performed overnight in 2.5% (wt/vol) non-fat milk at 4°C. The membranes were then washed three times with TBS-Tween 0.05% and incubated with an anti-rat HRP-conjugated secondary Ab (1:1000) for 1 h at room temperature. Membranes were washed three times with TBS-Tween 0.05%, and antibody-antigen complexes were revealed using luminol as a chemiluminescent reagent.

ELISA. To quantify ATX in CSF, duplicate samples and standards in coating buffer (0,012M NaCO₃ and 0,028M NaHCO₃, pH 9,6) were incubated overnight at 4°C. Samples were diluted 1:100 after titration was performed. Custom made autotaxin (ENPP2-8H, AGF06181012) (Ascent Gene, MD, USA) at concentrations (100-3.125) ng/ml was used to construct a linear standard curve. After blocking for 1.5 hours with 1.5% BSA in PBS-T, samples were incubated with a-ATX rabbit anti-mouse antibody 1:1000 (10005373, Cayman, Tallinn, Estonia) for 1 hour. The a-ATX antibody was detected with an a-rabbit HRP conjugated antibody 1:2000 (4010-05, Southern Biotech, AL, USA). Colour was developed using TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, A7888, Sigma, USA). The reaction was stopped with 2M H₂SO₄ and readings were obtained at 450nm.

RNA extraction and Q-RT-PCR analysis. Mouse spinal cords were flushed from the spinal column, snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C thereafter. RNA was extracted from SC

tissue with Tri Reagent (Molecular Research Center, OH, USA) and treated with DNase (RQ1 RNase-free DNase, Promega, WI, USA) in accordance to the manufacturer's instructions. Reverse transcription of 3.5µg isolated RNA was achieved with M-MLV reverse transcriptase (M1705, Promega, WI, USA) following the manufacturer's instructions. Real-time PCR was performed on a BioRad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories Ltd, CA, USA). Values were normalized to the expression values of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT). The sequences and product lengths of Q-RT-PCR primers can be found at Appendix Table S1.

ATX activity (TOOS) and HPLC MS/MS. ATX activity in plasma samples was measured with the TOOS assay as previously described¹⁰⁰. Lipidomics in plasma and spinal cord tissue samples was performed in a RSLCnano system coupled with an LTQ Orbitrap XL mass spectrometer as previously described¹⁰¹.

Statistical analysis. In EAE, statistical significance at specific timepoints between experimental groups was assessed with Mann-Whitney Rank Sum Test using SigmaPlot 11.0 (Systat Software, IL, USA). Otherwise, one-way ANOVA or student t-test were used. Values are presented as means (±SEM). * indicates a statistical significance difference between groups ($p < 0.05$).

Acknowledgments

The transgenic *TgEnpp2*^{+/+} mouse was kindly provided by G. Mills. We are thankful to M. Denis for initial training on EAE and valuable advice. This research has been co-financed by the European Union and Greek national funds through the Operational Program Competitiveness,

Entrepreneurship and Innovation, under the call Research – Create – Innovate (project code: T1EDK-0049).

Author Contributions

IN and IS performed most of the presented experiments. EK, GS and GP performed the MS/MS analyses. ST performed the Q-RT-PCR analysis for PLA2 mRNAs. JA and GK provided expertise, antibodies and genetically modified mice. VA designed the study and wrote the manuscript. All authors critically read and edited the manuscript.

References

1. Reich, D. S., Lucchinetti, C. F. & Calabresi, P. A. Multiple Sclerosis. *The New England journal of medicine* 378, 169-180, doi:10.1056/NEJMra1401483 (2018).
2. Baxter, A. G. The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nature Reviews Immunology* 7, 904, doi:10.1038/nri2190 (2007).
3. Dendrou, C. A., Fugger, L. & Friesen, M. A. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nature Reviews Immunology* 15, 545, doi:10.1038/nri3871 (2015).
4. Rivera, J., Proia, R. L. & Olivera, A. The alliance of sphingosine-1-phosphate and its receptors in immunity. *Nat Rev Immunol* 8, 753-763, doi:10.1038/nri2400 (2008).
5. Brinkmann, V. *et al.* Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nat Rev Drug Discov* 9, 883-897, doi:10.1038/nrd3248 (2010).
6. Payne, S. G. *et al.* The immunosuppressant drug FTY720 inhibits cytosolic phospholipase A2 independently of sphingosine-1-phosphate receptors. *Blood* 109, 1077-1085, doi:10.1182/blood-2006-03-011437 (2007).
7. Marusic, S. *et al.* Cytosolic phospholipase A2 alpha-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 202, 841-851, doi:10.1084/jem.20050665 (2005).
8. Kalyvas, A. & David, S. Cytosolic phospholipase A2 plays a key role in the pathogenesis of multiple sclerosis-like disease. *Neuron* 41, 323-335 (2004).
9. Sevastou, I., Kaffé, E., Mouratis, M. A. & Aidinis, V. Lysoglycerophospholipids in chronic inflammatory disorders: The PLA(2)/LPC and ATX/LPA axes. *Biochim Biophys Acta* 1831, 42-60, doi:10.1016/j.bbalip.2012.07.019 [pii] 10.1016/j.bbalip.2012.07.019 [doi] (2013).
10. Dennis, E. A., Cao, J., Hsu, Y. H., Magrioti, V. & Kokotos, G. Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem Rev* 111, 6130-6185, doi:10.1021/cr200085w [doi] (2011).
11. Yazdi, A., Baharvand, H. & Javan, M. Enhanced remyelination following lysolecithin-induced demyelination in mice under treatment with

- fingolimod (FTY720). *Neuroscience* 311, 34-44, doi:10.1016/j.neuroscience.2015.10.013 (2015).
12. Szepanowski, F. *et al.* Fingolimod promotes peripheral nerve regeneration via modulation of lysophospholipid signaling. *J Neuroinflammation* 13, 143, doi:10.1186/s12974-016-0612-9 (2016).
 13. Valentine, W. J. *et al.* (S)-FTY720-vinylphosphonate, an analogue of the immunosuppressive agent FTY720, is a pan-antagonist of sphingosine 1-phosphate GPCR signaling and inhibits autotaxin activity. *Cellular signalling* 22, 1543-1553, doi:10.1016/j.cellsig.2010.05.023 (2010).
 14. van Meeteren, L. A., Brinkmann, V., Saulnier-Blache, J. S., Lynch, K. R. & Moolenaar, W. H. Anticancer activity of FTY720: Phosphorylated FTY720 inhibits autotaxin, a metastasis-enhancing and angiogenic lysophospholipase D. *Cancer letters* (2008).
 15. Clair, T. *et al.* Autotaxin hydrolyzes sphingosylphosphorylcholine to produce the regulator of migration, sphingosine-1-phosphate. *Cancer research* 63, 5446-5453 (2003).
 16. Barbayianni, E., Kaffé, E., Aidinis, V. & Kokotos, G. Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, as a promising therapeutic target in chronic inflammation and cancer. *Progress in lipid research* 58, 76-96, doi:10.1016/j.plipres.2015.02.001 (2015).
 17. Aikawa, S., Hashimoto, T., Kano, K. & Aoki, J. Lysophosphatidic acid as a lipid mediator with multiple biological actions. *J Biochem* 157, 81-89, doi:10.1093/jb/mvu077 (2015).
 18. Benesch, M. G., Tang, X., Venkatraman, G., Bekele, R. T. & Brindley, D. N. Recent advances in targeting the autotaxin-lysophosphatidate-lipid phosphate phosphatase axis in vivo. *J Biomed Res* 30, 272-284, doi:10.7555/jbr.30.20150058 (2016).
 19. Yung, Y. C., Stoddard, N. C. & Chun, J. LPA receptor signaling: pharmacology, physiology, and pathophysiology. *J Lipid Res* 55, 1192-1214, doi:10.1194/jlr.R046458 (2014).
 20. Oldham, W. M. & Hamm, H. E. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 60-71 (2008).
 21. Fotopoulou, S. *et al.* ATX expression and LPA signalling are vital for the development of the nervous system. *Dev Biol* 339, 451-464 (2010).
 22. Katsifa, A. *et al.* The Bulk of Autotaxin Activity Is Dispensable for Adult Mouse Life. *PLoS One* 10, e0143083, doi:10.1371/journal.pone.0143083 (2015).
 23. Giganti, A. *et al.* Murine and human autotaxin alpha, beta, and gamma isoforms: gene organization, tissue distribution, and biochemical characterization. *J Biol Chem* 283, 7776-7789 (2008).
 24. Kanda, H. *et al.* Autotaxin, an ectoenzyme that produces lysophosphatidic acid, promotes the entry of lymphocytes into secondary lymphoid organs. *Nat Immunol* 9, 415-423 (2008).
 25. Savaskan, N. E. *et al.* Autotaxin (NPP-2) in the brain: cell type-specific expression and regulation during development and after neurotrauma. *Cell Mol Life Sci* 64, 230-243, doi:10.1007/s00018-006-6412-0 (2007).
 26. Yuelling, L. M. & Fuss, B. Autotaxin (ATX): A multi-functional and multi-modular protein possessing enzymatic lysoPLD activity and matricellular properties. *Biochim Biophys Acta* 1781, 525-530 (2008).
 27. Bickelhaupt, S. *et al.* Effects of CTGF Blockade on Attenuation and Reversal of Radiation-Induced Pulmonary Fibrosis. *J Natl Cancer Inst* 109, doi:10.1093/jnci/djw339 (2017).
 28. Sakai, N. *et al.* Lysophosphatidic acid signaling through its receptor initiates profibrotic epithelial cell fibroblast communication mediated by epithelial cell derived connective tissue growth factor. *Kidney international* 91, 628-641, doi:10.1016/j.kint.2016.09.030 (2017).
 29. Hammack, B. N. *et al.* Proteomic analysis of multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *Mult Scler* 10, 245-260, doi:10.1191/1352458504ms10230a (2004).
 30. Zahednasab, H. *et al.* Increased autotaxin activity in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 273, 120-123, doi:10.1016/j.jneuroim.2014.06.006 (2014).
 31. Jiang, D., Ju, W., Wu, X. & Zhan, X. Elevated lysophosphatidic acid levels in the serum and cerebrospinal fluid in patients with multiple sclerosis: therapeutic response and clinical implication. *Neurological Research*, 1-5, doi:10.1080/01616412.2018.1446256 (2018).
 32. Balood, M. *et al.* Elevated serum levels of lysophosphatidic acid in patients with multiple sclerosis. *Human immunology* 75, 411-413, doi:10.1016/j.humimm.2014.02.021 (2014).
 33. Schmitz, K. *et al.* Dysregulation of lysophosphatidic acids in multiple sclerosis and autoimmune encephalomyelitis. 5, 42, doi:10.1186/s40478-017-0446-4 (2017).
 34. Constantinescu, C. S., Farooqi, N., O'Brien, K. & Gran, B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *British journal of pharmacology* 164, 1079-1106, doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01302.x (2011).
 35. Kassiotis, G. & Kollias, G. Uncoupling the proinflammatory from the immunosuppressive properties of tumor necrosis factor (TNF) at the p55 TNF receptor level: implications for pathogenesis and therapy of autoimmune demyelination. *J Exp Med* 193, 427-434 (2001).
 36. Tsakiri, N., Papadopoulos, D., Denis, M. C., Mitsikostas, D. D. & Kollias, G. TNFR2 on non-haematopoietic cells is required for Foxp3+ Treg-cell function and disease suppression in EAE. *European journal of immunology* 42, 403-412, doi:10.1002/eji.201141659 (2012).
 37. Fuss, B., Baba, H., Phan, T., Tuohy, V. K. & Macklin, W. B. Phosphodiesterase I, a novel adhesion molecule and/or cytokine involved in oligodendrocyte function. *J Neurosci* 17, 9095-9103 (1997).
 38. Giganti, A. *et al.* Murine and human autotaxin alpha, beta, and gamma isoforms: gene organization, tissue distribution, and biochemical characterization. *The Journal of biological chemistry* 283, 7776-7789 (2008).
 39. Choi, J. W. & Chun, J. Lysophospholipids and their receptors in the central nervous system. *Biochim Biophys Acta*, doi:10.1016/j.bbalip.2012.07.015 (2012).
 40. Ninou, I., Magkrioti, C. & Aidinis, V. Autotaxin in Pathophysiology and Pulmonary Fibrosis. *Frontiers in Medicine* (2018).
 41. Kaffé, E. *et al.* Hepatocyte Autotaxin expression promotes liver fibrosis and cancer. *Hepatology*, doi:10.1002/hep.28973 (2016).
 42. Nikitopoulou, I. *et al.* Autotaxin expression from synovial fibroblasts is essential for the pathogenesis of modeled arthritis. *J Exp Med* 209, 925-933, doi:jem.20112012 [pii]10.1084/jem.20112012 [doi] (2012).
 43. Braeuer, R. R. *et al.* Galectin-3 contributes to melanoma growth and metastasis via regulation of NFAT1 and autotaxin. *Cancer research* 72, 5757-5766, doi:10.1158/0008-5472.can-12-2424 (2012).
 44. Thomas, L. & Pasquini, L. A. Galectin-3-Mediated Glial Crosstalk Drives Oligodendrocyte Differentiation and (Re)myelination. *Frontiers in cellular neuroscience* 12, 297, doi:10.3389/fncel.2018.00297 (2018).

45. Jiang, H. R. *et al.* Galectin-3 deficiency reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 182, 1167-1173 (2009).
46. Dennis, J., Nogaroli, L. & Fuss, B. Phosphodiesterase- α /autotaxin (PD- α /ATX): a multifunctional protein involved in central nervous system development and disease. *J Neurosci Res* 82, 737-742, doi:10.1002/jnr.20686 (2005).
47. Oikonomou, N. *et al.* Pulmonary autotaxin expression contributes to the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 47, 566-574, doi:10.1165/rcmb.2012-0004OC [doi] (2012).
48. Mackinnon, A. C. *et al.* Regulation of transforming growth factor- β 1-driven lung fibrosis by galectin-3. *Am J Respir Crit Care Med* 185, 537-546, doi:10.1164/rccm.201106-0965OC (2012).
49. Ho, J. E. *et al.* Galectin-3 Is Associated with Restrictive Lung Disease and Interstitial Lung Abnormalities. *Am J Respir Crit Care Med* 194, 77-83, doi:10.1164/rccm.201509-1753OC (2016).
50. Savaskan, N. E. *et al.* Autotaxin (NPP-2) in the brain: cell type-specific expression and regulation during development and after neurotrauma. *Cell Mol Life Sci* 64, doi:10.1007/s00018-006-6412-0 (2007).
51. Song, J., Guan, M., Zhao, Z. & Zhang, J. Type I Interferons Function as Autocrine and Paracrine Factors to Induce Autotaxin in Response to TLR Activation. *PLoS One* 10, e0136629, doi:10.1371/journal.pone.0136629 (2015).
52. Ray, R. & Rai, V. Lysophosphatidic acid converts monocytes into macrophages in both mice and humans. *Blood*, doi:10.1182/blood-2016-10-743757 (2017).
53. Fox, M. A., Colello, R. J., Macklin, W. B. & Fuss, B. Phosphodiesterase- α /autotaxin: a counteradhesive protein expressed by oligodendrocytes during onset of myelination. *Molecular and cellular neurosciences* 23, 507-519 (2003).
54. Fulkerson, Z. *et al.* Binding of autotaxin to integrins localizes lysophosphatidic acid production to platelets and mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* 286, 34654-34663 (2011).
55. Hausmann, J. *et al.* Structural basis of substrate discrimination and integrin binding by autotaxin. *Nat Struct Mol Biol* 18, 198-204 (2011).
56. Leblanc, R. *et al.* Interaction of platelet-derived autotaxin with tumor integrin α V β 3 controls metastasis of breast cancer cells to bone. *Blood*, doi:10.1182/blood-2014-04-568683 (2014).
57. Houben, A. J. *et al.* The polybasic insertion in autotaxin α confers specific binding to heparin and cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 288, 510-519, doi:10.1074/jbc.M112.358416 (2013).
58. Leblanc, R., Sahay, D., Houssin, A., Machuca-Gayet, I. & Peyruchaud, O. Autotaxin- β interaction with the cell surface via syndecan-4 impacts on cancer cell proliferation and metastasis. *Oncotarget* 9, 33170-33185, doi:10.18632/oncotarget.26039 (2018).
59. van Meeteren, L. A. *et al.* Inhibition of Autotaxin by Lysophosphatidic Acid and Sphingosine 1-Phosphate. *J Biol Chem* 280, 21155-21161, doi:10.1074/jbc.M413183200 (2005).
60. Benesch, M. G., Zhao, Y. Y., Curtis, J. M., McMullen, T. P. & Brindley, D. N. Regulation of autotaxin expression and secretion by lysophosphatidate and sphingosine 1-phosphate. *J Lipid Res* 56, 1134-1144, doi:10.1194/jlr.M057661 (2015).
61. Santos-Nogueira, E. *et al.* Activation of Lysophosphatidic Acid Receptor Type 1 Contributes to Pathophysiology of Spinal Cord Injury. *J Neurosci* 35, 10224-10235, doi:10.1523/jneurosci.4703-14.2015 (2015).
62. Magkrioti, C. *et al.* The Autotaxin—Lysophosphatidic Acid Axis Promotes Lung Carcinogenesis. *Cancer research* 78, 3634-3644, doi:10.1158/0008-5472.can-17-3797 (2018).
63. Dusaucy, R. *et al.* Adipose-specific disruption of autotaxin enhances nutritional fattening and reduces plasma lysophosphatidic acid. *J Lipid Res* 52, 1247-1255, doi:10.1194/jlr.M014985 (2011).
64. Parimisetty, A. *et al.* Secret talk between adipose tissue and central nervous system via secreted factors—an emerging frontier in the neurodegenerative research. *J Neuroinflammation* 13, 67, doi:10.1186/s12974-016-0530-x (2016).
65. Masago, K. *et al.* Lysophosphatidic acid receptor, LPA6, regulates endothelial blood-brain barrier function: Implication for hepatic encephalopathy. *Biochemical and biophysical research communications* 501, 1048-1054, doi:10.1016/j.bbrc.2018.05.106 (2018).
66. On, N. H., Savant, S., Toews, M. & Miller, D. W. Rapid and reversible enhancement of blood-brain barrier permeability using lysophosphatidic acid. *J Cereb Blood Flow Metab* 33, 1944-1954, doi:10.1038/jcbfm.2013.154 (2013).
67. Schulze, C., Smales, C., Rubin, L. L. & Staddon, J. M. Lysophosphatidic acid increases tight junction permeability in cultured brain endothelial cells. *J Neurochem* 68, 991-1000 (1997).
68. Pamuklar, Z. *et al.* Autotaxin/lysopholipase D and Lysophosphatidic Acid Regulate Murine Hemostasis and Thrombosis. *J Biol Chem* 284 7385-7394 (2009).
69. Molofsky, A. V. *et al.* Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. *Genes & development* 26, 891-907, doi:10.1101/gad.188326.112 (2012).
70. Kiray, H., Lindsay, S. L., Hosseinzadeh, S. & Barnett, S. C. The multifaceted role of astrocytes in regulating myelination. *Experimental neurology* 283, 541-549, doi:10.1016/j.expneurol.2016.03.009 (2016).
71. Ponath, G., Park, C. & Pitt, D. The Role of Astrocytes in Multiple Sclerosis. *Front Immunol* 9, 217, doi:10.3389/fimmu.2018.00217 (2018).
72. Zhuo, L. *et al.* hGFAP-cre transgenic mice for manipulation of glial and neuronal function in vivo. *Genesis* 31, 85-94, doi:10.1002/gene.10008 [pii] (2001).
73. Yung, Y. C., Stoddard, N. C., Mirendil, H. & Chun, J. Lysophosphatidic Acid signaling in the nervous system. *Neuron* 85, 669-682, doi:10.1016/j.neuron.2015.01.009 (2015).
74. Guasch, R. M. *et al.* RhoA and lysophosphatidic acid are involved in the actin cytoskeleton reorganization of astrocytes exposed to ethanol. *J Neurosci Res* 72, 487-502, doi:10.1002/jnr.10594 (2003).
75. Manning, T. J., Jr., Rosenfeld, S. S. & Sontheimer, H. Lysophosphatidic acid stimulates actomyosin contraction in astrocytes. *J Neurosci Res* 53, 343-352, doi:10.1002/(sici)1097-4547(19980801)53:3<343::Aid-jnr8>3.0.Co;2-a (1998).
76. Ramakers, G. J. & Moolenaar, W. H. Regulation of astrocyte morphology by RhoA and lysophosphatidic acid. *Exp Cell Res* 245, 252-262, doi:10.1006/excr.1998.4224 (1998).
77. Shano, S., Moriyama, R., Chun, J. & Fukushima, N. Lysophosphatidic acid stimulates astrocyte proliferation through LPA1. *Neurochemistry international* 52, 216-220, doi:10.1016/j.neuint.2007.07.004 (2008).
78. Spohr, T. C., Dezone, R. S., Rehen, S. K. & Gomes, F. C. LPA-primed astrocytes induce axonal outgrowth of cortical progenitors by activating PKA

- signaling pathways and modulating extracellular matrix proteins. *Frontiers in cellular neuroscience* 8, 296, doi:10.3389/fncel.2014.00296 (2014).
79. Spohr, T. C., Dezonne, R. S., Rehen, S. K. & Gomes, F. C. Astrocytes treated by lysophosphatidic acid induce axonal outgrowth of cortical progenitors through extracellular matrix protein and epidermal growth factor signaling pathway. *J Neurochem* 119, 113-123, doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07421.x (2011).
80. Tomas, M. *et al.* Protective effects of lysophosphatidic acid (LPA) on chronic ethanol-induced injuries to the cytoskeleton and on glucose uptake in rat astrocytes. *J Neurochem* 87, 220-229 (2003).
81. Choi, S. H. *et al.* Gintonin, a Ginseng-Derived Exogenous Lysophosphatidic Acid Receptor Ligand, Protects Astrocytes from Hypoxic and Re-oxygenation Stresses Through Stimulation of Astrocytic Glycogenolysis. *Molecular neurobiology*, doi:10.1007/s12035-018-1308-1 (2018).
82. Spohr, T. C. *et al.* Lysophosphatidic acid receptor-dependent secondary effects via astrocytes promote neuronal differentiation. *J Biol Chem* 283, 7470-7479, doi:10.1074/jbc.M707758200 (2008).
83. Thalman, C. *et al.* Astrocytic ATX fuels synaptic phospholipid signaling involved in psychiatric disorders. *Molecular Psychiatry* 23, 1685-1686, doi:10.1038/s41380-018-0238-7 (2018).
84. Dugas, J. C., Tai, Y. C., Speed, T. P., Ngai, J. & Barres, B. A. Functional genomic analysis of oligodendrocyte differentiation. *J Neurosci* 26, 10967-10983 (2006).
85. Dennis, J. *et al.* Phosphodiesterase-1 α /autotaxin's MORFO domain regulates oligodendroglial process network formation and focal adhesion organization. *Molecular and cellular neurosciences* 37, 412-424 (2008).
86. Nogaroli, L. *et al.* Lysophosphatidic acid can support the formation of membranous structures and an increase in MBP mRNA levels in differentiating oligodendrocytes. *Neurochem Res* 34, 182-193, doi:10.1007/s11064-008-9772-z (2009).
87. Hovelmeyer, N. *et al.* Apoptosis of oligodendrocytes via Fas and TNF-R1 is a key event in the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 175, 5875-5884 (2005).
88. Li, Q. & Barres, B. A. Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nature Reviews Immunology* 18, 225, doi:10.1038/nri.2017.125 (2017).
89. Chu, F. *et al.* The roles of macrophages and microglia in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology* 318, 1-7, doi:10.1016/j.jneuroim.2018.02.015 (2018).
90. Murray, P. J. & Wynn, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 11, 723-737, doi:10.1038/nri3073 (2011).
91. Ma, L., Nagai, J. & Ueda, H. Microglial activation mediates de novo lysophosphatidic acid production in a model of neuropathic pain. *J Neurochem* 115, doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06955.x (2010).
92. Pino, P. A. & Cardona, A. E. Isolation of brain and spinal cord mononuclear cells using percoll gradients. *Journal of visualized experiments : JoVE*, doi:10.3791/2348 (2011).
93. Casella, G. *et al.* IL-27, but not IL-35, inhibits neuroinflammation through modulating GM-CSF expression. *Sci Rep* 7, 16547, doi:10.1038/s41598-017-16702-w (2017).
94. Boillee, S. *et al.* Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* 312, 1389-1392 (2006).
95. Thirunavukkarasu, K. *et al.* Pharmacological characterization of a potent inhibitor of autotaxin in animal models of inflammatory bowel disease and multiple sclerosis. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, doi:10.1124/jpet.116.234013 (2016).
96. Matralis, A. N., Afantitis, A. & Aidinis, V. Development and therapeutic potential of autotaxin small molecule inhibitors: From bench to advanced clinical trials. *Medicinal research reviews*, doi:10.1002/med.21551 (2018).
97. Eino, D. *et al.* LPA4-mediated vascular network formation increases the efficacy of anti-PD-1 therapy against brain tumors. *Cancer research*, doi:10.1158/0008-5472.can-18-0498 (2018).
98. Teo, S. T., Yung, Y. C., Herr, D. R. & Chun, J. Lysophosphatidic acid in vascular development and disease. *IUBMB Life* 61, 791-799, doi:10.1002/iub.220 (2009).
99. Margolis, G. & Pickett, J. P. New applications of the Luxol fast blue myelin stain. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 5, 459-474 (1956).
100. Nikolaou, A. *et al.* Hydroxamic Acids Constitute a Novel Class of Autotaxin Inhibitors that Exhibit in Vivo Efficacy in a Pulmonary Fibrosis Model. *Journal of medicinal chemistry* 61, 3697-3711, doi:10.1021/acs.jmedchem.8b00232 (2018).
101. Kaffe, E. *et al.* Hepatocyte autotaxin expression promotes liver fibrosis and cancer. *Hepatology* 65, 1369-1383, doi:10.1002/hep.28973 (2017).

Table 1. ATX (*Enpp2*) deletion from astrocytes (GFAP⁺ cells) results in embryonic lethality. The expected and observed genotypes from mating the conditional knockout mouse for ATX (*Enpp2*^{fl/f}) with a transgenic mouse line expressing the Cre recombinase under the control of the GFAP promoter (Tg*hGFAP-Cre*).

	♀ <i>Cre</i> ^{+/-} <i>Enpp2</i> ^{fl/+} ♂ <i>Cre</i> ^{-/-} <i>Enpp2</i> ^{fl/f}		♀ <i>Cre</i> ^{-/-} <i>Enpp2</i> ^{fl/f} ♂ <i>Cre</i> ^{+/-} <i>Enpp2</i> ^{fl/+}		♀ <i>Cre</i> ^{-/-} <i>Enpp2</i> ^{fl/+} ♂ <i>Cre</i> ^{+/-} <i>Enpp2</i> ^{fl/+}		♀ <i>Cre</i> ^{+/-} <i>Enpp2</i> ^{fl/+} ♂ <i>Cre</i> ^{-/-} <i>Enpp2</i> ^{fl/+}	
genotype	No	%*	No	%*	No	%*	No	%*
<i>Cre</i> ^{+/-} <i>Enpp2</i> ^{fl/f}	10	14.71 (25)	1	1.82 (25)	0	0 (12.5)	0	0 (12.5)
<i>Cre</i> ^{+/-} <i>Enpp2</i> ^{fl/+}	46	67.65 (25)	26	47.27 (25)	22	31.43 (25)	12	23.53 (25)
<i>Cre</i> ^{+/-} <i>Enpp2</i> ^{+/+}	0	0 (0)	0	0 (0)	12	17.14 (12.5)	18	35.29 (12.5)
<i>Cre</i> ^{-/-} <i>Enpp2</i> ^{fl/f}	12	17.65 (25)	22	40.00 (25)	13	18.60 (12.5)	10	19.61 (12.5)
<i>Cre</i> ^{-/-} <i>Enpp2</i> ^{fl/+}	0	0 (25)	6	10.91 (25)	19	27.14 (25)	1	1.96 (25)
<i>Cre</i> ^{-/-} <i>Enpp2</i> ^{+/+}	0	0 (25)	0	0 (0)	4	5.71 (12.5)	10	19.61 (12.5)
Total	68	100 (100)	55	100 (100)	70	100 (100)	51	100 (100)

%*: observed (expected); Cre: hGFAP-Cre

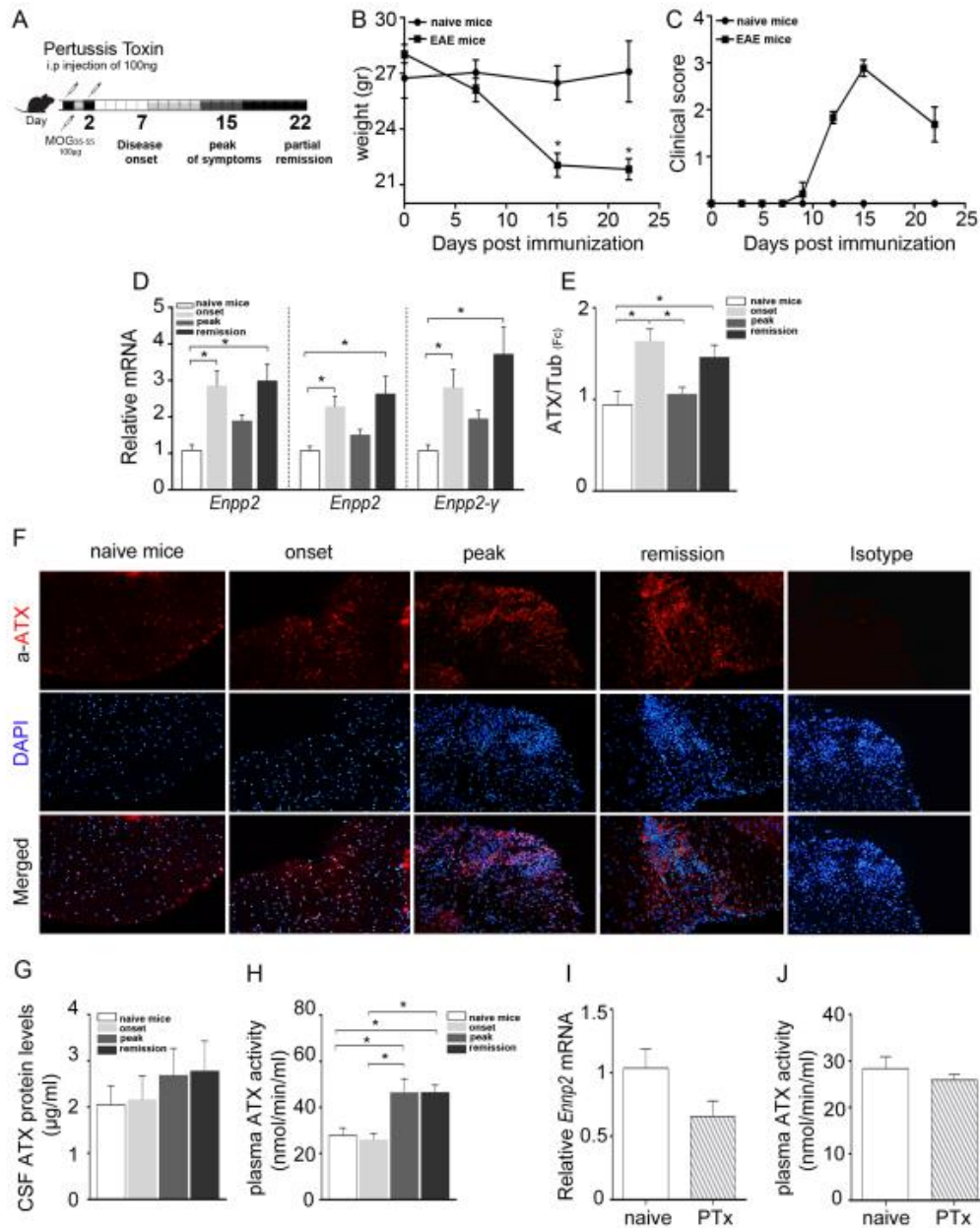


Figure 1. Increased ATX levels during EAE pathogenesis. (A) Schematic representation of the EAE protocol. Mice were weighted (B) and monitored for clinical signs of EAE (C) throughout the experiment. (D) Q-RT-PCR analysis of total ATX (*Enpp2*) mRNA levels (with two different set of primers), as well as of the ATX brain-specific γ isoform in whole spinal cord lysates (n=7/group). (E) Densitometry analysis of ATX protein levels as detected with western blot in spinal cord homogenates (Fig. S2A). Expression was normalized to the levels of β -tubulin. (F) Representative immunofluorescent staining of spinal cords from mice sacrificed at different time points post immunization with an anti-ATX ab. (G) CSF ATX protein levels (n=4-5/group) and (H) plasma ATX activity (nmol/min/ml) as measured with the TOOS assay (n=7/group). (I) Q-RT-PCR analysis of total ATX mRNA levels and (J) plasma ATX activity (nmol/min/ml) in mice treated with saline or PTx (n=4/group). All values are presented as mean ($\pm$ SEM); Statistical significance between experimental groups was assessed with one-way ANOVA complemented with Bonferroni or Dunn's multiple pair test or Student t-test accordingly (I and J); *p<0.05.

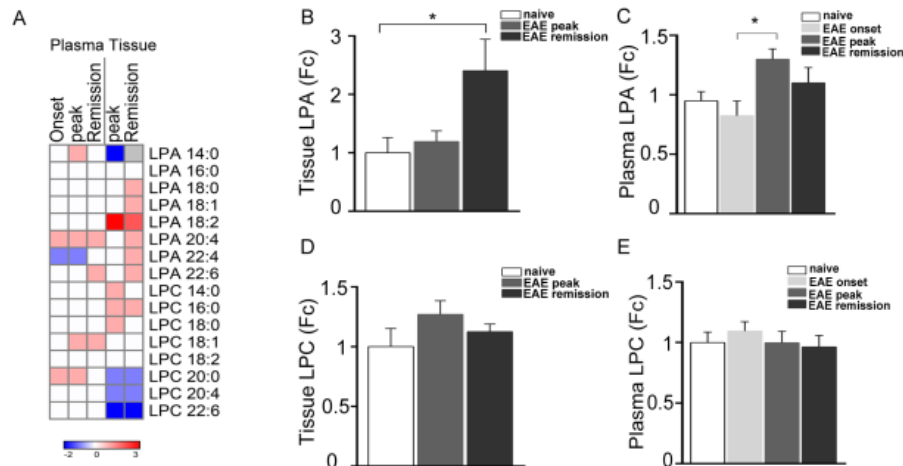


Figure 2. Increased LPA levels during EAE pathogenesis. (A) Heat map of LPA and LPC species levels as measured with HPLC/MS/MS in plasma (n=10-12) and tissue (n=5) of mice upon EAE pathogenesis. Total LPA (B-C) and LPC (D-E) levels in spinal cords and plasma respectively. All values are presented as mean ($\pm$ SEM), normalized to the corresponding values of naïve mice. Statistical significance between experimental groups was assessed with one-way ANOVA complemented with Bonferroni or Dunn's multiple pair test accordingly; *p<0.05

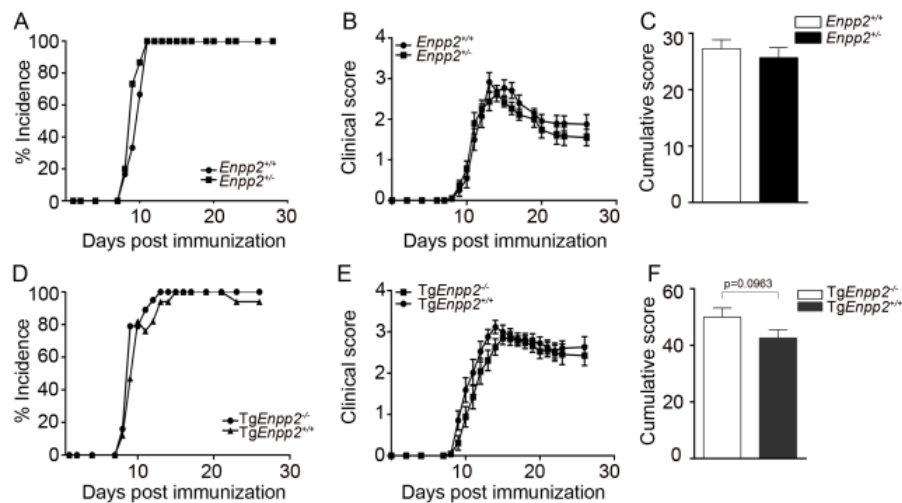


Figure 3. Systemic fluctuations of ATX/LPA levels do not affect EAE development. (A) EAE incidence in *Enpp2*^{+/-} mice (50% of normal serum ATX/LPA levels) and littermate controls (*Enpp2*^{+/+}, n=13/group). (B) Clinical score of *Enpp2*^{+/-} and *Enpp2*^{+/+} mice. (C) Cumulative score of EAE progression in *Enpp2*^{+/-} mice and littermate controls. (D) Incidence of EAE development in *TgEnpp2*^{+/-} mice (200% of normal serum ATX/LPA levels) and *TgEnpp2*^{-/-} littermate controls (n=16/group). (E) Clinical score and (F) Cumulative score of *TgEnpp2*^{+/-} and *TgEnpp2*^{-/-}. Values are presented as mean ($\pm$ SEM). Statistical significance between experimental groups was assessed with Mann-Whitney Rank Sum Test (B and E) or Student t-test (C and F); *p<0.05.

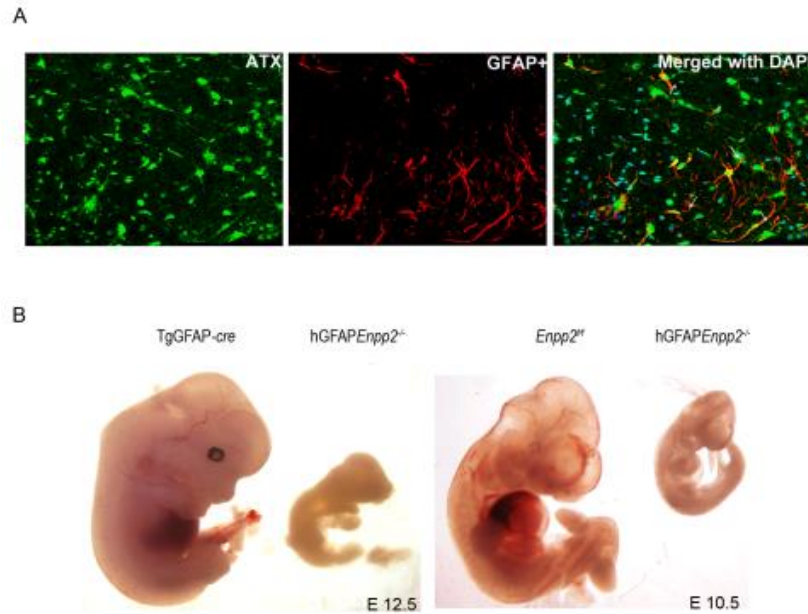


Figure 4. ATX and astrocytes (GFAP⁺). (A) Confocal images of double immunofluorescent staining for ATX and GFAP⁺ at EAE lesions reveal colocalization. (B) Genetic deletion of ATX from astrocytes (GFAP⁺) results in embryonic lethality. *hGFAPEnpp2^{-/-}* and control embryos at E12.5 and E10.5.

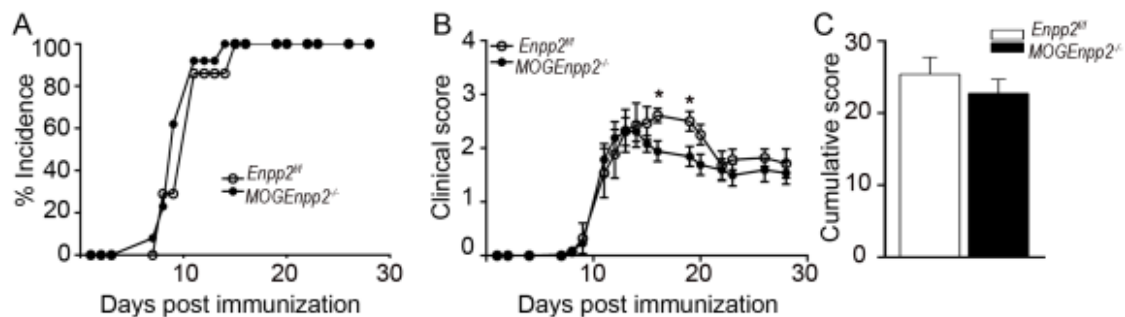


Figure 5. ATX expression from oligodendrocytes (MOG⁺) has a limited role in EAE pathogenesis. (A) EAE incidence in *MOGEnpp2^{-/-}* mice and littermate controls. (B) Clinical score in *MOGEnpp2^{-/-}* and littermate controls. (C) Cumulative score of EAE progression in *MOGEnpp2^{-/-}* mice and littermate controls. Values are presented as mean ($\pm$ SEM); (n=18/group). Statistical significance between experimental groups was assessed with Mann-Whitney Rank Sum Test (B) or Student t-test (C); *p<0.05.

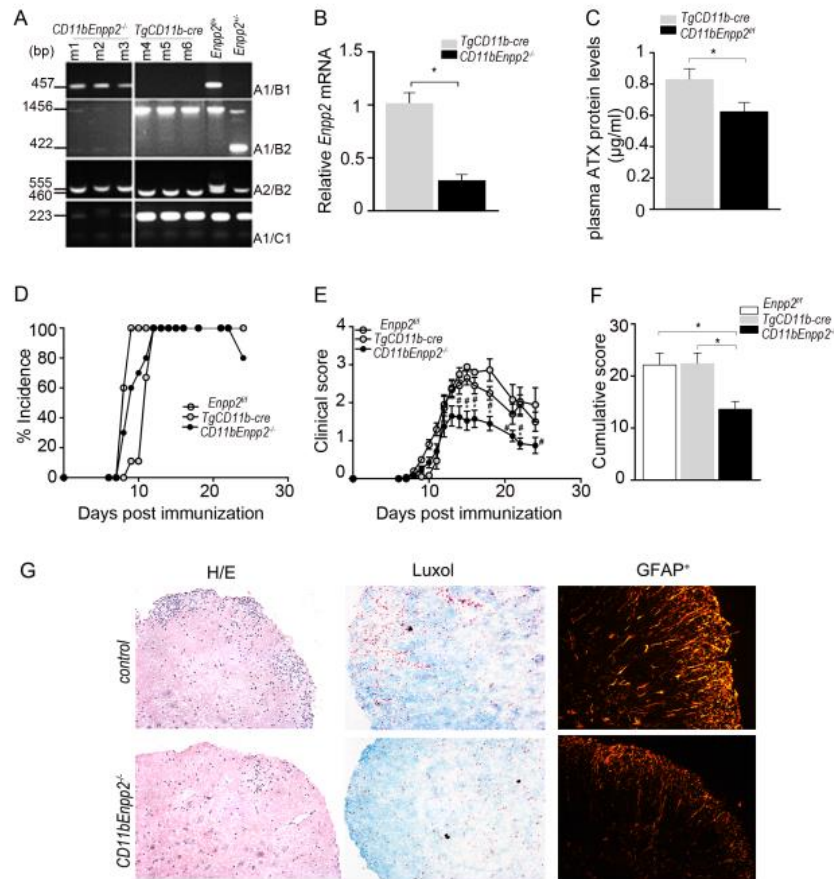


Figure 6. ATX expression from macrophages/microglia amplifies EAE pathogenesis. (A) PCR analysis indicates accurate recombination in *CD11bEnpp2*^{-/-} mice. (B) Q-RT-PCR analysis of *Enpp2* mRNA levels in the spinal cords of *CD11bEnpp2*^{-/-} mice and control littermates (n=4/group). (C) plasma ATX protein levels (n=7/group). (D) EAE incidence in *CD11bEnpp2*^{-/-} mice and control littermates (n=5-10). (E) Clinical scores of the same mice. (F) Cumulative scores of EAE progression of the experimental groups. (G) Representative H/E and Luxol fast blue stained spinal cord sections and immunofluorescent staining for GFAP⁺ cells. Values are presented as mean (± SEM). Statistical significance between experimental groups was assessed with Mann-Whitney Rank Sum Test (E), one-way ANOVA complemented with Bonferroni multiple pair test (F) or Student t-test (B and C); * p<0.05.

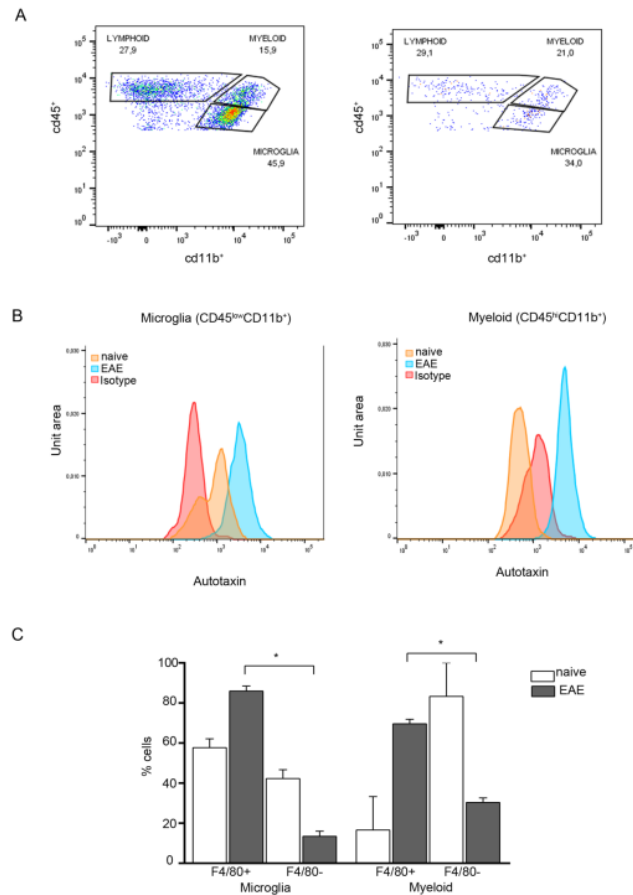


Figure 7: ATX is expressed by activated macrophages and microglia. Representative flow cytometry profile from spinal cord suspension prepared from EAE (d15) and naive mice. **(A)** CD45/CD11b FACs plot of EAE and naïve mice following forward scatter and side scatter gating and doublets exclusion from CD45⁺ cells. lymphoid cells: CD45⁺CD11b⁻; microglia: CD45^{low}CD11b⁺; myeloid cells: CD45^{hi}CD11b⁺. **(B)** Representative ATX expression in microglia and macrophages in EAE and naïve mice and isotype staining control. **(C)** F4/80 expression in ATX⁺ cells (n=3-4/group). Statistical significance between experimental groups was assessed with one-way ANOVA complemented with Bonferroni multiple pair test. * p<0.05.

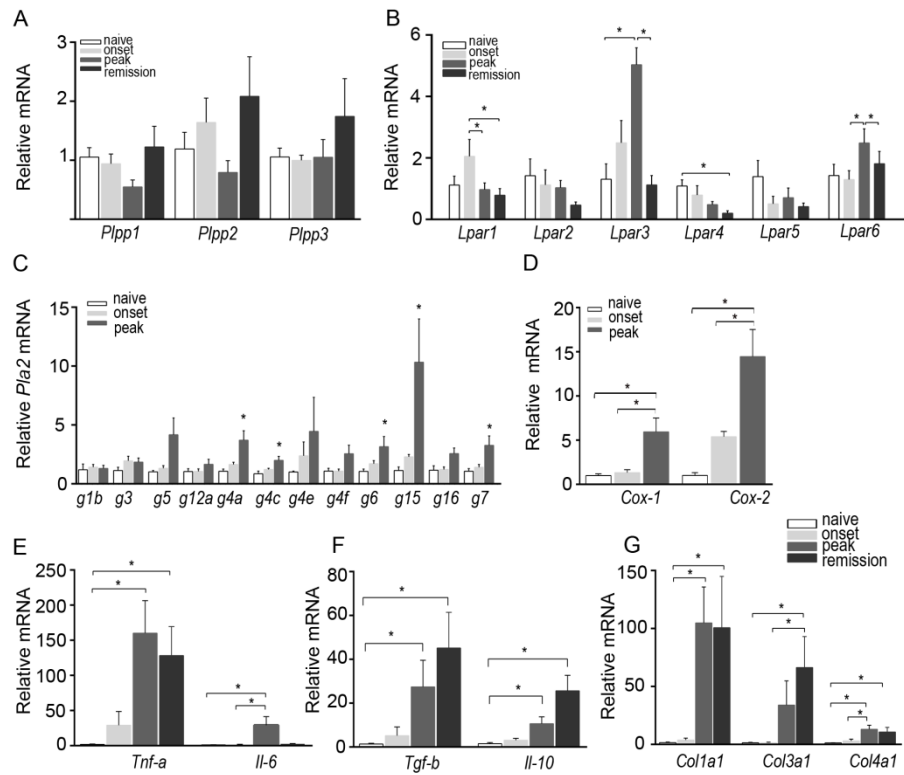


Figure S1. Deregulated expression of genes involved in phospholipid homeostasis. Q-RT-PCR analysis of (A) lipid phosphatases, (B) LPA receptors, (C) PLA2 isoforms, (D) *Cox-1/2*, (E) *Tnf-a* and *Il-6*, (F) *Tgf-b* and *Il-10* and (G) collagens (*col1a1*, *col3a1*, *col4a1*). Values are presented as mean ($\pm$ SEM); n=7/group. Statistical significance between experimental groups was assessed with one-way ANOVA complemented with Bonferroni or Dunn's multiple pair test; *p<0.05.

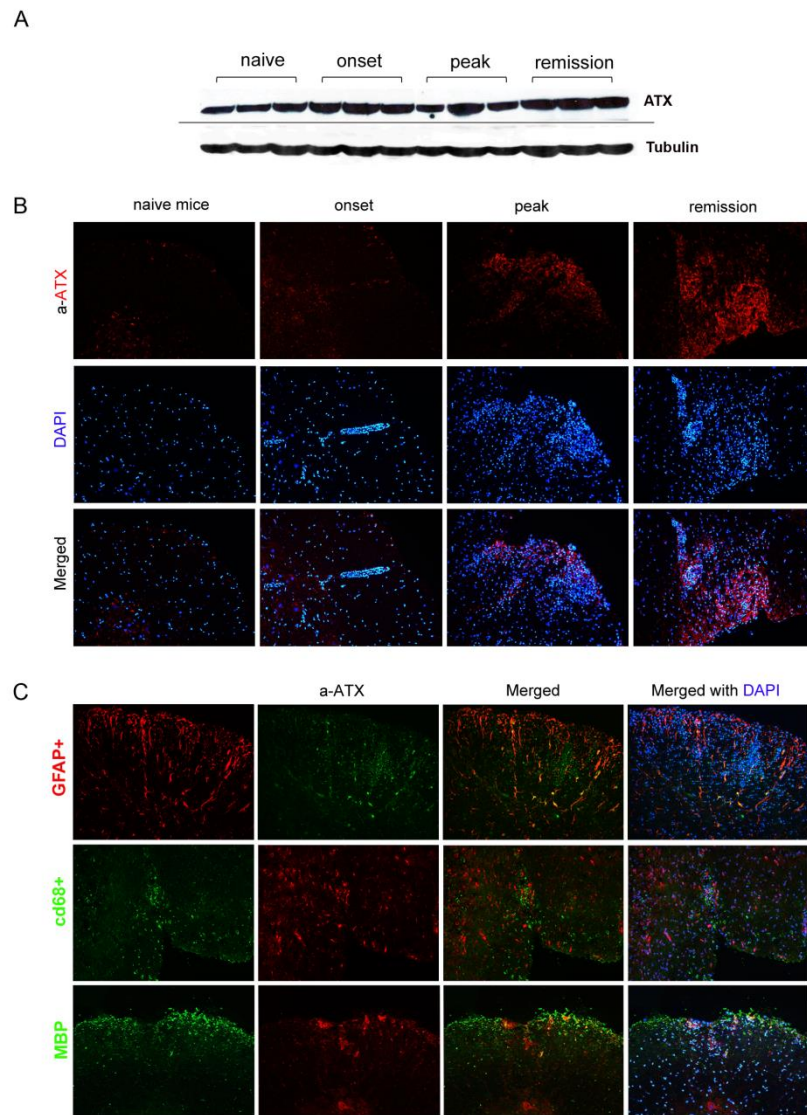


Figure S2. Increased ATX levels during EAE pathogenesis. (A). Representative western blot (out of three) of ATX expression in whole spinal cord lysates from mice upon EAE pathogenesis. Cumulative densitometry results are shown in Fig. 1E. **(B)** Representative immunofluorescent staining of spinal cords from mice sacrificed at different time points post immunization. 7 μ m sections were stained with an anti-ATX ab (sigma) and the nuclei were counter-stained with DAPI. **(C)** Double immunofluorescent staining for ATX and GFAP⁺ or CD68⁺ at EAE lesions.

A

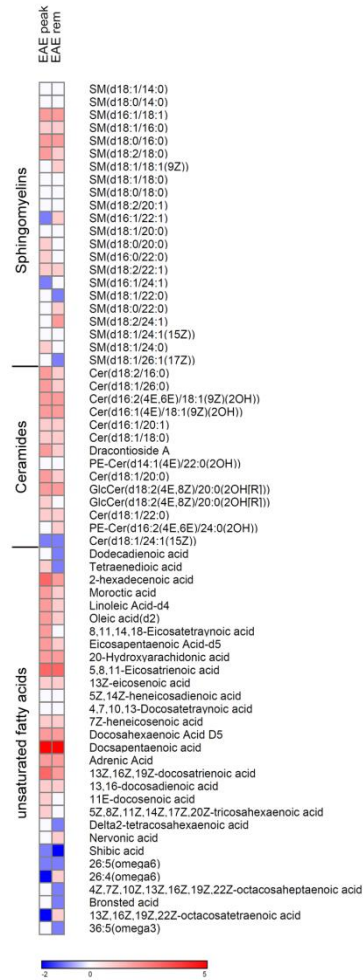


Figure S3. Increased levels of sphingomyelins, ceramides and unsaturated fatty acids during EAE pathogenesis. (A) Heat map of **sphingomyelins, ceramides and unsaturated fatty acids** species measured with HPLC MS/MS in spinal cord tissue (n=5) of EAE mice compared with naïve. Values are the mean of each group.