

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ



ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*”Μελέτη της έκφρασης γονιδίων που ρυθμίζονται από miRNAs και
επιγενετικούς μηχανισμούς σε μακροφάγα από βρογχικό έκπλυμα ασθενών με
Ιδιοπαθή Πνευμονική Ύψωση”*

ΜΠΙΜΠΑΚΗ ΕΛΕΝΗ

ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΟΣ-ΦΥΜΑΤΙΟΛΟΓΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΑΝΤΩΝΙΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΙΟΥΝΙΟΣ 2018

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **ΑΝΤΩΝΙΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ:** ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΑΣ,
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ.
2. **ΣΟΥΡΒΙΝΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ:** ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ,
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ.
3. **ΚΟΥΤΣΟΠΟΥΛΟΣ ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ:** ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ.

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- 1.ΑΝΤΩΝΙΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΑΣ.
- 2.ΣΟΥΡΒΙΝΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΟΛΟΓΙΑΣ.
- 3.ΚΟΥΤΣΟΠΟΥΛΟΣ ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ
ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ.
- 4.ΤΖΑΝΑΚΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΑΣ.
- 5.ΣΧΙΖΑ ΣΟΦΙΑ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΑΣ.
- 6.ΑΓΓΕΛΑΚΗ ΣΟΦΙΑ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ.
- 7.ΖΑΦΕΙΡΟΠΟΥΛΟΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΙΟΛΟΓΙΑΣ-
ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΟΥ ΧΩΡΟΥ.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

A.ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.ΠΕΡΙΛΗΨΗ (ΣΤΑ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΚΑΙ ΣΤΑ ΑΓΓΛΙΚΑ)

2.ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

3.1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

3.2 ΙΔΙΟΠΑΘΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΙΝΩΣΗ

3.2.1 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

3.2.2 ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

3.2.3 ΠΡΟΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

3.2.4 ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

3.2.5 ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ

3.2.6 ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΑ

3.2.7 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ: Περιβαλλοντικές εκθέσεις, γήρανση, γενετική, επιγενετική, miRNAs.

3.2.8 ΣΥΝΝΟΣΗΡΟΤΗΤΕΣ

3.2.9 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

3.2.10 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΒΡΟΓΧΟΚΥΨΕΛΙΔΙΚΟΥ ΕΚΠΛΥΜΑΤΟΣ ΣΤΗΝ ΙΠΙ.

3.3 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

3.3.1 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

3.3.2 ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

3.3.3 ΟΜΟΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΙΠΙ ΚΑΙ ΚΠ

Β.ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Β.1 ΣΚΟΠΟΣ

Β.2 ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Β.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Β.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Β.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: ΜΠΙΜΠΑΚΗ ΕΛΕΝΗ του ΔΗΜΗΤΡΙΟΥ

ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΚΑΤΟΙΚΙΑΣ : Άνω Αρχάνες, Ηράκλειο, Κρήτης. ΤΚ 70100.

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ: 04/09/1984

ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ: Άγαμη

ΕΘΝΙΚΟΤΗΤΑ: ΕΛΛΗΝΙΚΗ

ΤΗΛΕΦΩΝΟ: 6976726598

E-MAIL: bibakieleni@gmail.com

ΣΠΟΥΔΕΣ:

- 07/2011-03/2017 Ειδικότητα Πνευμονολογίας-Φυματιολογίας στο Γ.Ν.Χανίων και στο Πανεπιστημιακό νοσοκομείο Ηρακλείου (Λήψη ειδικότητας 04/2016, κατόπιν σε παράταση ως ειδικευμένη πνευμονολόγος έως 03/2017).
- 06/2014-παρόν **Διδακτορική διατριβή** σε εξέλιξη με θέμα: *"Μελέτη της έκφρασης γονιδίων που ρυθμίζονται από miRNAs και επιγενετικούς μηχανισμούς σε μακροφάγα από βρογχικό έκπλυμα ασθενών με Ιδιοπαθή Πνευμονική Ίνωση"* στο εργαστήριο μοριακής και κυτταρικής πνευμονολογίας του πανεπιστημίου Κρήτης.
- 09/2017-παρόν Σεμινάριο **ΕΚΑΒ «Επείγουσα Προνοσοκομειακή Ιατρική»**. ΕΚΑΒ Ηρακλείου Κρήτης, Έτος 2017-2018.
- 09/2017-παρόν **Μεταπτυχιακό πρόγραμμα** Ελληνικού Ανοικτού Πανεπιστημίου: «Διαχείριση Γήρανσης και Χρόνιων νοσημάτων και γήρανσης.
- 10/2017 **Σεμινάριο ALS** (advanced life support) ERC.
- 10/2002-10/2008 Φοίτηση στο τμήμα Ιατρικής του πανεπιστημίου Κρήτης, τομέας επιστημών υγείας (έτη σπουδών έξι) .
- 1999-2002 Γενικό Λύκειο Αρχανών Ηρακλείου Κρήτης.

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ:

- 03/2017-παρόν Επικουρική επιμελήτρια στην πνευμονολογική κλινική του Βενιζελείου Γενικού νοσοκομείου Ηρακλείου.
- 04/2013-03/2017 Ειδικευόμενη Πνευμονολογίας-Φυματιολογίας στο Πανεπιστημιακό νοσοκομείο Ηρακλείου Κρήτης.
- 07/2011-04/2013 Ειδικευόμενη Πνευμονολογίας στην πνευμονολογική κλινική του Γενικού Νομαρχιακού Νοσοκομείου Χανίων.

04/2009-02/2011 Υπηρεσία Υπαίθρου στο **άγιο** Π.Ι Καμπανού του ΚΥ Καντάνου του δήμου Καντάνου-Σελίνου , Χανιά.

ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΩΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΗΣ

1. Διδακτική εμπειρία στους καταρτιζομένους του ΔΙΕΚ Βενιζελείου νοσοκομείου στο μάθημα της Φυσιολογίας ,κατά το Α εξάμηνο κατάρτισης 2017B, για 30 ώρες(15 εβδομάδες,2ώρες κατάρτισης/εβδομάδα).
2. Συμμετοχή στο εκπαιδευτικό πρόγραμμα της Πανεπιστημιακής πνευμονολογικής κλινικής ΠΑΓΝΗ ως προσκεκλημένη εισηγήτρια στην θεματολογία της πνευμονολογίας.
3. Συμμετοχή στο εκπαιδευτικό πρόγραμμα της Α΄ Παθολογικής κλινικής του Βενιζελείου ΓΝΗ ως προσκεκλημένη εισηγήτρια στην θεματολογία της πνευμονολογίας.
4. Συμμετοχή στο εκπαιδευτικό πρόγραμμα της Μαιευτικής-Γυναικολογικής κλινικής του Βενιζελείου ΓΝΗ ως προσκεκλημένη εισηγήτρια στην θεματολογία της πνευμονολογίας.

ΣΥΝΕΧΗΣ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ

10/2017	Advanced Life Support (ALS) Provider 2017
11/2017	Κλινικό Φροντιστήριο Διάγνωσης και σταδιοποίησης Καρκίνου Πνεύμονα. ΠΑΓΝΗ, Ηράκλειο Κρήτης.
07/2017	Interstitial Lung Diseases Course: From bench to bedside, July 2017 Crete, Greece.
12/2016	Ερευνητικό σεμινάριο "Integrating systems biology approach in IPF research", Βαρκελώνη, Ισπανία.
10/2015	12 ^ο Εκπαιδευτικό φροντιστήριο-Εκπαίδευση στην Πνευμονολογία <Συνδυάζοντας την τεκμηριωμένη θεωρία με τη σύγχρονη κλινική πρακτική>, Ναύπλιο.
10/2015	Εκπαιδευτικό σεμινάριο στο πλαίσιο της συνεχιζόμενης ιατρικής εκπαίδευσης επαγγελματιών υγείας για την οργάνωση ιατρικών διακοπής καπνίσματος, Λευκάδα Οκτώβριος 2015.
06/2015	Ημέρες ΧΑΠ 2015.Κλινική επιδημιολογία,εκπαίδευση και έρευνα στη ΧΑΠ.

	Πορταριά , Βόλος,2015.
02/2015	Ερευνητικό Σεμινάριο με τίτλο: “IPF and Cancer : wounds that do not heal”, Αθήνα.
11/2014	Φροντιστηριακό Σεμινάριο με θέμα: “Μη Επεμβατικός Μηχανικός Αερισμός”, Αθήνα.
12/2013	Κλινικό Φροντιστήριο με θέμα: “Διακοπή Καπνίσματος”, Αθήνα.
12/2013	Κλινικό Φροντιστήριο με θέμα: “ Εργοσπιρομετρία και Αποκατάσταση στη Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια”, Αθήνα.
12/2013	Κλινικό Φροντιστήριο με θέμα: “IPF and sleep: Common pathways and implications in therapy”, Αθήνα.
07/2013	Εκπαιδευτικό πρόγραμμα με τίτλο <<Διαγνωστική Νοσημάτων του Αναπνευστικού Συστήματος-Επίλυση Κλινικών Προβλημάτων>> Κέντρο Επαγγελματικής Κατάρτισης Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
06/2012	Σεμινάριο Ενδοσκόπησης Θώρακα, Ημέρες Επεμβατικής Πνευμονολογίας και Θωρακικής Ενδοσκόπησης, Νοσοκομείο Σωτηρία, Αθήνα (4 ημέρες).
03/2012	Σεμινάριο ALS (advanced life support), Ηράκλειο Κρήτης.

ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ/ΣΥΝΕΔΡΙΑ:

04/2018	6 ^ο Ετήσιο Σεμινάριο «Παλαιάς Βουλής» Διάχυτες Πνευμονοπάθειες, Αθήνα.
11/2017	26 ^ο Πανελλήνιο Πνευμονολογικό συνέδριο, Αθήνα, Ελλάδα.
06/2017	6 ^ο Σεμινάριο Συνεχιζόμενης Ιατρικής Εκπαίδευσης ΗΜΕΡΕΣ ΧΑΠ, Πόρτο Χέλι.
05/2017:	5 ^ο Ετήσιο Σεμινάριο «Παλαιάς Βουλής» Διάχυτες Πνευμονοπάθειες, Αθήνα.
02/2017:	7 ^η Διεθνής συνάντηση για τα σπάνια και ορφανά πνευμονολογικά νοσήματα, Μιλάνο, Ιταλία.
12/2016:	Συνέδριο “BTS International Congress 2016”, Λονδίνο.
06/2016:	25 th Πανελλήνιο Πνευμονολογικό συνέδριο, Αθήνα, Ελλάδα.
09/2015	ERS International Congress 2015, Amsterdam. (Διεθνές Πνευμονολογικό Συνέδριο 2015, Άμστερνταμ).
11/2014	23 ^ο Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο, Αθήνα.

03/2014	4 ^ο Σεμινάριο Συνεχιζόμενης Ιατρικής Εκπαίδευσης-Ημέρες Άσθματος 2014- <<Φαινότυποι και Ενδότυποι Ασθματος>>. Ερέτρια Μάρτιος 2014.
09/2014	Διεθνές Πνευμονολογικό Συνέδριο 2014, Μόναχο. ERS International Congress 2014, Munich.
05/2014	ATS 2014, San Diego, California. (Διεθνές πνευμονολογικό συνέδριο αμερικανικής πνευμονολογικής εταιρείας).
03/2013	Απεικόνιση Θώρακα: Μια αναμνηστική δόση, Ηράκλειο Κρήτης.
12/2013	22 ^ο Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο, Αθήνα.
10/2012	16 ^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Άγιος Νικόλαος, Κρήτη.
10/2012	21 ^ο Πανελλήνιο συνέδριο νοσημάτων Θώρακος, Αθήνα.
05/2012	9 ^ο Refreshing Course 2012 υπό την αιγίδα της Ελληνικής Πνευμονολογικής εταιρείας, Βόλος.
11/2011	20 ^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Αθήνα.
05/2010	1 ^ο Συνέδριο Ιδιωτών πνευμονολόγων Κρήτης. Μάιος 2010, Χανιά.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΕΡΓΑΣΙΩΝ/ ΑΡΘΡΩΝ:

Προφορικές ανακοινώσεις σε συνέδρια (5 σε διεθνή συνέδρια, 6 σε εγχώρια).

06/2018	«MiR-185/miR-29a similarly expressed in IPF and CA BALF-cells show disease specific DNMT1 and COL1A1 patterns».International conference on sarcoidosis and interstitial lung diseases. June 2018, Crete.
11/2017	«Διαχρονική εξέλιξη του Φυματινικού Δείκτη στις φυλακές Αλικαρνασσού Ηρακλείου τις πενταετίες 1996-200 και 2010-2014.» Ελένη Μπιμπάκη , Ειρήνη Πασπαράκη, Ιωάννης Πανταζόπουλος, Χριστούλα Πετράκη, Σεβαστή Κουμιωτάκη, Ν.Μπαχλιτζανάκης, Ε.Φερδούτσης,

	Γ.Μελέτης. 26 ^ο Πανελλήνιο Πνευμονολογικό συνέδριο, Αθήνα, Ελλάδα.
11/2017	«Μελέτη της έκφρασης των miR185 ,miR29a και μορίων στόχων τους σε δείγματα βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (BALF) ασθενών με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση(ΙΠΙ)και καρκίνο πνεύμονα(ΚΠ)» <u>Ε.Μπιμπάκη</u> , Ε.Τσιτούρα., Χ.Κουτουλάκη., Ε.Βασαρμίδα., Θ.Γεωργοπούλου., Α.Τραχαλάκη. , Ν.Τζανάκης., Κ.Αντωνίου. 26 ^ο Πανελλήνιο Πνευμονολογικό συνέδριο, Αθήνα, Ελλάδα.
07/2017	“IPF and Lung Cancer, novel pathogenetic insights.” Interstitial Lung Diseases Course: From bench to bedside, July 2017 Crete, Greece.
06/2017	«Αντιμετώπιση παρόξυνσης ΧΑΠ στο ΤΕΠ». 6 ^ο Σεμινάριο Συνεχιζόμενης Ιατρικής Εκπαίδευσης ΗΜΕΡΕΣ ΧΑΠ, Πόρτο Χέλι.
05/2017	«Παρουσίαση ενδιαφέροντος περιστατικού» 5ο Ετήσιο Σεμινάριο "Παλαιάς Βουλής", 2017.
02/2017	“A study of the expression of miR185, miR29a and their targets in IPF and lung cancer: a BALF study.” (oral presentation) (Μελέτη της έκφρασης των miR185, miR29a και των στόχων τους σε ασθενείς με ΙΠΙ και καρκίνο πνεύμονα, σε κύτταρα βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος. <u>Ε.Μπιμπάκη</u> , Θ.Γεωργοπούλου.,Χ.Κουτουλάκη., Ε.Τσιτούρα., Ε.Βασαρμίδα., Ν.Τζανάκης., Κ.Αντωνίου. 7th International Meeting on Pulmonary Rare Diseases and Orphan Drug, Milano, Italy.
06/2016	«Μελέτη της έκφρασης του πυρηνικού υποδοχέα ROR-α σε ιστό πνευμονικού παρεγχύματος ασθενών με ινωτικού τύπου διάμεσες πνευμονίες». (προφορική ανακοίνωση) 25 ^{ου} Πανελλήνιου Πνευμονολογικού Συνεδρίου, Αθήνα,2016 .
09/2015	“Expression of miR-185 targets, DNA methyltransferase 1 and Cyclin D2 in IPF and lung cancer in BALF cells: Preliminary results” (discussion poster) στο ERS 2015 , Άμστερνταμ,Ολλανδία.
09/2014	<i>RETINOIC ACID-RELATED ORPHAN RECEPTOR-α (RORA) EXPRESSION IN PATIENTS WITH FIBROTIC INTERSTITIAL PNEUMONIAS: A LUNG TISSUE STUDY. (oral presentation).</i> (Η έκφραση του πυρηνικού υποδοχέα RORα στις ινωτικού τύπου διάμεσες πνευμονίες. <u>Eleni Bibaki</u> , Anastasios Koutsopoulos, Elisa Tsitoura, Eleni Lagoudaki, Stella Sarantoulaki, Ismini Lasithiotaki, Nikolaos Siafakas, George Sourvinos, Katerina M. Antoniou. European Respiratory Society 2014 , International Congress, Munich, German.
10/2012	«Μια σπάνια περίπτωση φυματίωσης ΚΝΣ». <u>Ε.Μπιμπάκη</u> ., <u>Α.Δαμιανάκη</u> ., <u>Ο.Κότσιου</u> ., <u>Μ.Κοκόση</u> ., <u>Ε.Πασπαράκη</u> ., <u>Ε.Νταουκάκης</u> . 16 ^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο,2012, Άγιος Νικόλαος.

Δημοσιεύσεις : 12 (6 σε διεθνή και 6 σε εγχώρια περιοδικά):

<p>1. Bibaki E, Tsitoura E, Vasarmidi E, Margaritopoulos G, Trachalaki A, Koutoulaki C, Georgopoulou T, Spandidos DA, Tzanakis N, Antoniou KM. <u>«miR-185 and miR-29a are similarly expressed in the bronchoalveolar lavage cells in IPF and lung cancer but common targets DNMT1 and COL1A1 show disease specific patterns»</u>.Mol Med Rep. 2018 May;17(5):7105-7112.</p>
<p>2. Antoniou KM, Karagiannis K, Tsitoura E, Bibaki E, Lasithiotaki I, Proklou A, Spandidos DA, Tzanakis N. <u>«Clinical applications of mesenchymal stem cells in chronic lung diseases»</u>. Biomed Rep. 2018 Apr;8(4):314-318</p>
<p>3. Samara KD, Trachalaki A, Tsitoura E, Koutsopoulos AV, Lagoudaki ED, Lasithiotaki I, Margaritopoulos G, Pantelidis P, Bibaki E, Siafakas NM, Tzanakis N, Wells AU, Antoniou KM. <u>«Upregulation of citrullination pathway: From Autoimmune to Idiopathic Lung Fibrosis»</u>. Respir Res. 2017 Dec 29;18(1):218.</p>
<p>4. Nicolas Kahn, Laura Fregonese, Miriam Barrecheguren, Frits M.E. Franssen, Aleksandar Grgic, Daniela Gompelmann, Eleni Bibaki, Katerina M. Antoniou, Janwillem W.H. Kocks, Hillary Pinnock, Felix Herth "Clinical highlights from the 2016 European Respiratory Society International Congress" (Τα καλύτερα κλινικά δεδομένα από το ERS 2016) ERJ Open Res 3: 00147-2016; Published 12 April 2017.</p>
<p>5. Antoniou KM, Bibaki E, Margaritopoulos GA." <u>Controversies in Fibrosis and Emphysema</u>". (Διαφορές αναμέσα στην IPF και το εμφύσημα) Arch Bronconeumol. 2017;53:231-2 - Vol. 53 Num.5 .</p>
<p>6. Eleni Bibaki, Athina Trachalaki, Eirini Vasarmidi, Aikaterini Antoniou. " IPAF: Interstitial pneumonia with autoimmune features. A new entity? (IPAF: Διάμεση πνευμονία με χαρακτηριστικές αυτοανοσίας) "PNEUMON 2017,Vol. 30(1): 16-19.</p>
<p>7. Eirini Pasparakis, Eleni Bibaki, Yiorgos Meletis, Emmanouil Ferdoutsis <u>«Neuromuscular diseases and respiratory system»</u>. <i>Pneumon 2017, 30(3):176-187</i></p>

<p>8. Abdelfattah Touman, Maria Bolaki, Vlassis Vitsas, Eleni Bibaki, Leonidas Aggelakis, Rodoula Tringidou, Anastasia Mandilara, Nikolaos Tzanakis, Katerina M. Antoniou, Nikolaos Koulouris, Grigoris K. Stratakos. «<u>Large endotracheal tumor obstructing the central airway. The role of Interventional Pulmonology</u>». <i>Pneumon</i> 2017, 30(2):102-104</p>
<p>9. Tsitoura E, Wells AU, Karagiannis K, Lasithiotaki I, Vasarmidi E, Bibaki E, Koutoulaki C, Sato H, Spandidos DA, Siafakas NM, Sourvinos G, Antoniou KM. “<u>MiR-185/AKT and miR-29a/Collagen 1a pathways are activated in IPF BAL cells.</u>” (Τα μονοπάτια MiR-185/AKT και miR-29a/Collagen 1a είναι ενεργά στην IPF). <i>Oncotarget</i>. 2016 Oct 18.</p>
<p>10. E.Tsitoura, E. Bibaki, E. Vasarmidi, K.Antoniou. «Hot Topics» in the pathogenesis of IPF- current data from the ERS and ATS congresses” (Σημαντικά σημεία στην παθογένεια της IPF-πρόσφατα δεδομένα από τα συνέδρια ERS και ATS) <i>Pneumon</i> 2016, 29(2):120-121.</p>
<p>11. E. Bibaki, S. Michelakis, S. Hiraki, E.Lambiri “ Right to left intra-cardiac shunt with low right heart pressures” (Ενδοκαρδιακή επικοινωνία από δεξιά προς αριστερά με χαμηλές καρδιακές πιέσεις) . <i>Pneumon</i> 2015;vol 28(4);380-381.</p>
<p>12. O.Kotsiou, E. Bibaki, E. Pasparki, A. Damianaki, B. Kotsios, E.Ntaoukakis, K. Gourgoulianis: “Drowning and early-drowning events in the country of Chania”. (Περιστατικά πνιγμού και παρ’ολίγον πνιγμού στο νομό Χανίων) <i>PNEUMON</i> 2014;vol 27(3) :230-241.</p>

ΒΡΑΒΕΙΑ (3)

1^ο Βραβείο Καλύτερης Αναρτημένης Ανακοίνωσης (e-poster) που παρουσιάστηκε στο Συνέδριο για την εργασία με τίτλο “ Μελέτη της έκφρασης των DNA μεθυλτρανσφερασών καθώς και του miR-185 σε βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BALF) ασθενών με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση (ΙΠΙ) και καρκίνο πνεύμονα.”
Ε.Μπιμπάκη,Ε.Τσιτούρα,Χ.Κουτουλάκη,Ε.Βασαρμίδα,Ε.Σταματάκη,Δ.Μοραιτάκη,Ν.Τζαν άκης,Κ.Αντωνίου.24^{ου} Πανελληνίου Πνευμονολογικού Συνεδρίου, Αθήνα, 2015.

Έπαινος. NLRP3 Φλεγμονόσωμα: κοινό παθογενετικό μονοπάτι στην IPF και στην RA-UIP. (ανηρτημένη ανακοίνωση) Λασηθιωτάκη Ι., Μαργαριτόπουλος Γ.,Γιανναράκης Γ.,Σαραντουλάκη Σ.,Μπιμπάκη Ε.,Σαμαρά Κ., Σιαφάκας Ν., Αντωνίου Α. 22^ο Πανελλήνιο συνέδριο Πνευμονολογίας,2013,Αθήνα .

Έπαινος Πνιγμοί και Παρ’Ολίγον Πνιγμοί. Επιδημιολογική μελέτη. (Ανηρτημένη ανακοίνωση) Πασπαράκη Ειρήνη, Δαμιανάκη Αγγελική, Κώτσιου Ουρανία, Μπιμπάκη Ελένη, Φραγγεδάκη Ασπασία, Νταουκάκης Εμμανουήλ. , 22^ο Πανελλήνιο συνέδριο Πνευμονολογίας 12^{ος} 2013.

ΕΜΠΕΙΡΙΑ ΩΣ ΚΡΙΤΗΣ ΑΡΘΡΩΝ

Συμμετοχή στην διαδικασία κρίσης περιλήψεων εργασιών για το διεθνές πανευρωπαϊκό συνέδριο ERS 2017 International Congress.

Ανηρτημένες ανακοινώσεις (26)

11/2017	«Η ομοίωση των μιτοχονδρίων στα μακροφάγα ασθενών με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση». Ειρήνη Βασαρμίδα, Ελίζα Τσιτούρα, Γ. Μαργαριτόπουλος, Αθηνά Τραχαλάκη, <u>Ελένη Μπιμπάκη</u> , Ν.Τζανάκης, Αικ.Αντωνίου. 26 ^ο Πανελλήνιο Πνευμονολογικό συνέδριο, Αθήνα, Ελλάδα.
11/2017	«Έξι χρόνια εμπειρίας στη θεραπεία της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης με πιρφεριδόνη στην Κρήτη». Αθηνά Τραχαλάκη, Κώστας Καραγιάννης, Μιχαήλ Φαναρίδης, <u>Ελένη Μπιμπάκη</u> , Ειρήνη Βασαρμίδα, Γ.Παπαστρατηγάκης, Ε.Σταματάκη, Δ.Μωραϊτάκη, Ν.Τζανάκης, Αικ.Αντωνίου. 26 ^ο Πανελλήνιο Πνευμονολογικό συνέδριο, Αθήνα, Ελλάδα.
11/2017	«Εμπειρία Ιατρείου Διακοπής Καπνίσματος ΓΝ.Ηρακλείου ΒΕΝΙΖΕΛΕΙΟ» Ιωάννης Πανταζόπουλος, Ειρήνη Πασπαράκη, <u>Ελένη Μπιμπάκη</u> , Χριστούλα Πετράκη, Σεβαστή Κουμιωτάκη, Ν.Μπαχλιτζανάκης, Ε.Φερδούτσης, Γ.Μελέτης. 26 ^ο Πανελλήνιο Πνευμονολογικό συνέδριο, Αθήνα, Ελλάδα.
11/2017	«Περιστατικό Ασπεργιλλώματος με εκδήλωση σοβαρής υποτροπιάζουσας αιμόπτυσης σε έδαφος παλαιάς νεκρωτικής πνευμονίας.» <u>Ελένη Μπιμπάκη</u> , Ειρήνη Πασπαράκη, Ιωάννης Πανταζόπουλος, Χριστούλα Πετράκη, Σεβαστή Κουμιωτάκη, Ν.Μπαχλιτζανάκης, Ε.Φερδούτσης, Γ.Μελέτης. 26 ^ο Πανελλήνιο Πνευμονολογικό συνέδριο, Αθήνα, Ελλάδα.
12/2016	“ <i>Alveolar macrophages show elevated oxidized mitochondria levels in IPF. Autophagy, mitophagy and telomere length implications.</i> (Τα κυψελιδικά μακροφάγα παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα οξειδωμένων μιτοχονδρίων.Η συμμετοχή της αυτοφαγίας, της μιτοφαγίας και του μήκους των τελομερών.) Α.Τραχαλάκη.,Ε.Βασαρμίδα., Ε.Τσιτούρα. <u>Ε.Μπιμπάκη</u> . Χ.Κουτουλάκη.,Γ.Μαργαριτόπουλος., Κ.Αντωνίου. Research Seminar- Integrating systems biology approach in IPF research, Barcelona, Spain, 2016.
09/2015	“ <i>Expression of miR-185 targets, DNA methyltransferase 1 and Cyclin D2 in IPF and lung cancer in BALF cells: Preliminary results</i> ” (discussion poster) <u>Ελένη Μπιμπάκη</u> .,Ε.Τσιτούρα.,Χ.Κουτουλάκη.,Ε.Βασαρμίδα.,Ε.Σταματάκη.,Δ.Μοραϊτάκη.,Ν.Τζανάκης.,Κ.Αντωνίου. ERS 2015 , Amsterdam.

09/2015	“Lung cancer immune cells exhibit inhibited inflammasome”.(Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος στον καρκίνο πνεύμονα παρουσιάζουν κατεσταλμένο φλεγμονόσωμα). Α.Σαμαρά., Ι.Λασηθιωτάκη.,Ε.Τσιτουρα., Ι.Γιανναράκης.,Α.Ψαράκη., <u>Ε.Μπιμπάκη</u> .,Ε.Λαμπίρη.,Ν.Σιαφάκας.,Κ.Αντωνίου. ERS 2015 , Amsterdam.
11/2015	1^ο Βραβείο Καλύτερης Αναρτημένης Ανακοίνωσης (e-poster) που παρουσιάστηκε στο Συνέδριο για την εργασία με τίτλο “ <i>Μελέτη της έκφρασης των DNA μεθυλτρανσφερασών καθώς και του miR-185 σε βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BALF) ασθενών με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση (ΙΠΙ) και καρκίνο πνεύμονα.</i> ” 24 ^{ου} Πανελληνίου Πνευμονολογικού Συνεδρίου, 2015, Αθήνα.
09/2014	“Autophagy is not impaired in BALF alveolar macrophages in IPF: Preliminary results.” (Η αυτοφαγία δεν είναι επηρεασμένη στα κυψελιδικά μακροφάγα του BALF: αρχικά αποτελέσματα).Σ.Σαραντουλάκη.,Γ.Μαργαριτόπουλος.,Ε.Τσιτουρα.,Κ.Καραγιάννης., <u>Ε.Μπιμπάκη</u> .,Α.Wells.,Ν.Σιαφάκας.,Γ.Σουρβίνος.,Κ.Αντωνίου. European Respiratory Society 2014 , International Congress, Munich, German.
11/2014	«Περιστατικό χυλοθώρακα άμφω ως πρώτη εκδήλωση οζώδους λεμφώματος». <u>Μπιμπάκη Ε.</u> , Μιχελάκης Σ., Πιτσιδιανάκης Γ., Λαμπίρη Ε., Μητρούσκα Ι., Τζανάκης Ν. 23 ^ο Πανελλήνιο συνέδριο Πνευμονολογίας, Αθήνα.
12/2013	Έπαινος <i>NLRP3</i> Φλεγμονόσωμα: κοινό παθογενετικό μονοπάτι στην IPF και στην RA-UIP. (Ανηρτημένη ανακοίνωση) Λασηθιωτάκη Ισμήνη, Μαργαριτόπουλος Γεώργιος, Γιανναράκης Γιάννης, Σαραντουλάκη Στέλλα, <u>Μπιμπάκη Ελένη</u> , Σαμαρά Κατερίνα, Σιαφάκας Νίκος, Αντωνίου Κατερίνα. 22 ^ο Πανελλήνιο συνέδριο Πνευμονολογίας .
12/2013	Έπαινος Πνιγμοί και Παρ’Ολίγον Πνιγμοί. Επιδημιολογική μελέτη. (Ανηρτημένη ανακοίνωση) Πασπαράκη Ειρήνη, Δαμιανάκη Αγγελική, Κώτσιου Ουρανία, <u>Μπιμπάκη Ελένη</u> , Φραγγεδάκη Ασπασία, Νταουκάκης Εμμανουήλ. , 22 ^ο Πανελλήνιο συνέδριο Πνευμονολογίας 12 ^{ος} 2013.
12/2013	«Πνευμονική φυματίωση με δυσκολία στη διάγνωση». <u>Ε.Μπιμπάκη</u> ., Α.Δαμιανάκη.,Ε.Πασπαράκη.,Β.Κριετσέπη.,Α.Θυμάκη.,Μ.Νταουκάκης. 22 ^ο Πανελλήνιο συνέδριο Πνευμονολογίας 12 ^{ος} 2013.
12/2013	«Φυματιώδης πνευμονία σε σχολική κοινότητα». Α.Δαμιανάκη., Πασπαράκη Ε., <u>Μπιμπάκη Ε.</u> , Ο.Κότσιου., Κριετσέπη.Β., Μ.Νταουκάκης. 22 ^ο Πανελλήνιο συνέδριο Πνευμονολογίας 12 ^{ος} 2013.
12/2013	Λοιμώξεις του αναπνευστικού οφειλόμενες σε <i>Legionella spp</i> . (Ανηρτημένη ανακοίνωση) Πασπαράκη Ειρήνη, Δαμιανάκη Αγγελική, Χοχλάκης Δημοσθένης, <u>Μπιμπάκη Ελένη</u> , Νταουκάκης Εμμανουήλ,

	Τσελέντης Ιωάννης , Ψαρουλάκη Αννα. (e-poster) 22 ^ο Πανελλήνιο συνέδριο Πνευμονολογίας 12 ^ο ς 2013.
12/2013	«Ανάλυση της έκφρασης επιλεγμένων κυτταρικών <i>microRNA</i> στην Ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση και μελέτη της επιρροής του ιού του απλού έρπη τύπου 1 (HSV-1) στην έκφραση τους». Ε.Τσιτούρα., Α.Ψαράκη.,Ι.Λασηθιωτάκη., <u>Ε.Μπιμπάκη</u> .,Σ.Σαραντουλάκη.,Σ.Μιχελάκη ς.,Δ.Σπαντίδος.,Ν.Σιαφάκας.,Γ.Σουρβίνος.,Κ.Αντωνίου. 22 ^ο Πανελλήνιο συνέδριο Πνευμονολογίας 12 ^ο ς 2013.
11/2012	A CASE OF CHRONIC NECROTIZING PULMONARY ASPERGILLOSIS (CNPA) (Ανηρτημένη ανακοίνωση) Angeliki Damianaki, <u>Eleni Bibaki</u> , Vasiliki Krietsepi, Stavroula Patsilinakou, Eirini Pasparaki, Ourania Kotsiou, Emmanouhl Ntaoukakis, Serafim Kastanakis. 3 rd Southeast European Conference on Chemotherapy and Infection. 2012 November Dubrovnik, Croatia.
11/2012	AN INTERESTING CASE OF EXTRAPULMPONARY TUBERCULOSIS (TB) (Ανηρτημένη ανακοίνωση) Angeliki Damianaki, <u>Eleni Bibaki</u> , Vasiliki Krietsepi, Eirini Pasparaki, Stavroula Patsilinakou, Ourania Kotsiou, Emmanouhl Ntaoukakis, Serafim Kastanakis. 3 rd Southeast European Conference on Chemotherapy and Infection. 2012 November Dubrovnik, Croatia.
11/2012	A CASE OF NEGLECTED PULMONARY TUBERCULOSIS. (Ανηρτημένη ανακοίνωση) Vasiliki Krietsepi, Stavroula Patsilinakou, Angeliki Damianaki, <u>Eleni Bibaki</u> , Irini Pasparaki, Ourania Kotsiou, Emanouil Daoukakis, Serafim Kastanakis .3 rd Southeast European Conference on Chemotherapy and Infection, 2012 November Dubrovnik, Croatia.
11/2012	ASYMPTOMATIC ACTIVE CAVERNOUS TUBERCULOSIS (TBC).(Ανηρτημένη ανακοίνωση) (Vasiliki Krietsepi, Stavroula Patsilinakou, Angeliki Damianaki, <u>Eleni Bibaki</u> , Irini Pasparaki, Ourania Kotsiou, Emanouil Daoukakis, Serafim Kastanakis. 3 rd Southeast European Conference on Chemotherapy and Infection,2012 November Dubrovnik, Croatia.
10/2012	<i>Μια Ασυνήθιστη Κλινική Εμφάνιση Καρκίνου του Πνεύμονα (ΚΠ).</i> (Ανηρτημένη ανακοίνωση) Πασπαράκη Ε. , Δαμιανάκη Α. , <u>Μπιμπάκη Ε.</u> , Παστιλινάκου Σ. , Κόρακας Π. , Μοσχόπουλος Θ. , Νταουκάκης Ε. (e-poster) 21 ^ο Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο, Αθήνα.
10/2012	<i>Κυψελιδική Αιμορραγία μετά από εισπνοή δακρυγόνων.</i> (Ανηρτημένη ανακοίνωση) Πασπαράκη Ε. , Δαμιανάκη Α. , <u>Μπιμπάκη Ε.</u> , Παστιλινάκου Σ. , Κριετσέπη Β. , Κόρακας Π. , Μοσχόπουλος Θ. , Νταουκάκης Ε. (e-poster) 21 ^ο Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο,

	Αθήνα
10/2012	<i>Ασυμπτωματική Ενεργός Σηλαιώδης Φυματίωση (TBC). (Ανηρτημένη ανακοίνωση) Πατσιλινάκου Σ. , Δαμιανάκη Α. , Κριετσέπη Β. , Πασπαράκη Ε. , <u>Μπιμπάκη Ε.</u>, Χατζηκώστα Ε. , Νταουκάκης Ε. (e-poster) 21^ο Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο, Αθήνα.</i>
10/2012	<i>Μια Σπάνια Περίπτωση Εξωπνευμονικής Φυματίωσης (ΕΦ). (Ανηρτημένη ανακοίνωση) <u>Μπιμπάκη Ε.</u>, Δαμιανάκη Α. , Κοκόση Μ. , Πατσιλινάκου Σ. , Πασπαράκη Ε. Κριετσέπη Β. (e-poster) 21^ο Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο, Αθήνα.</i>
10/2012	<i>Μια Περίπτωση Παραμελημένης Φυματιώδους (TB) Πλευρίτιδας. (Ανηρτημένη ανακοίνωση) Πατσιλινάκου Σ. , Δαμιανάκη Α. , <u>Μπιμπάκη Ε.</u>, Πασπαράκη Ε. , Κόρακας Π. , Χατζηκώστα Ε. , Κριετσέπη Β. (e-poster) 21^ο Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο, Αθήνα.</i>
10/2012	<i>Το αναπνευστικό πρώτος στόχος του συστηματικού ερυθηματώδους λύκου (ΣΕΛ). Μπιμπάκη Ε., Δαμιανάκη Α., Κριετσέπη Β., Πασπαράκη Ε.,... (e-poster) 21^ο Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο, Αθήνα.</i>

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ: Αγγλικά (επίπεδο Proficiency-C2)
Γερμανικά (επίπεδο Grundstufe-C1)

ΓΝΩΣΕΙΣ Η/Υ: Δίπλωμα ECDL (2011)

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΑ:

➤ Λογοτεχνία

ΑΤΟΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ:

- Εργατικότητα
- Ομαδικό πνεύμα
- Συνέπεια
- Πρωτοβουλία

ΣΥΣΤΑΤΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΟΛΕΣ: Τρείς

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ολόψυχα θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου Αικατερίνη Αντωνίου, η οποία μου έδωσε την ευκαιρία να γνωρίσω τον κόσμο της έρευνας, να γίνω μέλος του εργαστηρίου Μοριακής και Κυτταρικής Πνευμονολογίας με την πλούσια και δημιουργική παρουσία που το διακρίνει. Με τις γνώσεις, την εμπειρία και την ενθάρρυνση της στάθηκε αρωγός σε κάθε βήμα αυτής της προσπάθειας μου. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους κυρίους Σουρβίνο Γεώργιο και Κουτσόπουλο Αναστάσιο για την άμεση βοήθεια και καθοδήγηση που μου προσέφεραν όποτε τους ζητήθηκε.

Επίσης ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Ελίζα Τσιτούρα, μεταδιδακτορική ερευνήτρια, βιολόγο και επιστημονική υπεύθυνη του εργαστηρίου Μοριακής και Κυτταρικής Πνευμονολογίας. Η αγάπη και το πάθος της για την έρευνα, η μεθοδικότητα της, οι γνώσεις της και η εργατικότητα της αποτέλεσαν έμπνευση και στήριγμα για την δική μου προσπάθεια.

Επιπλέον, δεν πρέπει να παραλείψω να ευχαριστήσω όλους τους συναδέλφους στο εργαστήριο για την καθημερινή μας συνεργασία και βοήθεια. Ιδιαίτερα ευχαριστώ την Χαρά Κουτουλάκη, την Ειρήνη Βασαρμίδα, τον Στέλιο Μιχελάκη, την Αθηνά Τραχαλάκη, τον Κωνσταντίνο Καραγιάννη, την Θεοδώρα Γεωργοπούλου, τον Γιώργο Παπαστρατηγάκη, την Ηρώ Χατζηαντωνίου, την Αθανασία Πρόκλου και τον Γιάννη Σπερελάκη.

Επίσης ευχαριστώ όλο το ιατρικό και νοσηλευτικό προσωπικό της Πανεπιστημιακής Πνευμονολογικής κλινικής του ΠΑΓΝΗ και ιδιαίτερα τον Καθηγητή κύριο Τζανάκη. Επίσης ευχαριστώ το προσωπικό του βρογχοσκοπικού εργαστηρίου και του τμήματος σπιρομετρήσεων (κυρίες Δέσποινα Μωραϊτάκη και Ειρήνη Βέρρα) καθώς και τις τεχνικούς του παθολογοανατομικού εργαστηρίου του νοσοκομείου για την βοήθεια τους στην αναζήτηση των ιστολογικών εκθέσεων.

Τέλος ευχαριστώ και αφιερώνω αυτή την εργασία στην οικογένεια μου, στους γονείς και τα αδέρφια μου, Άννα και Βαγγέλη, χωρίς την υποστήριξη των οποίων τίποτα από όλα αυτά δεν θα είχε πραγματοποιηθεί.

A.1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον εστιάζεται στον εντοπισμό συγκλινόντων και αποκλινόντων στοιχείων στην παθογένεια της ΙΠΙ και του ΚΠ με σκοπό την ανίχνευση νέων παθογενετικών μηχανισμών αλλά και την πιθανή αξιοποίηση θεραπευτικών επιλογών. Η μελέτη αυτή αποκαλύπτει πλείστες ομοιότητες και διαφορές τόσο σε επίπεδο επιδημιολογικών παραμέτρων όπως είναι η πτωχή τους πρόγνωση και οι κοινοί παράγοντες κινδύνου όσο και σε επίπεδο παθοφυσιολογικών μηχανισμών. Στο τελευταίο πεδίο αναγνωρίζονται επηρεασμένα κοινά παθογενετικά μονοπάτια και μηχανισμοί ελέγχου μειζόνων κυτταρικών λειτουργιών όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός. Ωστόσο, ο διακριτός χαρακτήρας των δύο νοσημάτων είναι δεδομένος και οι διαφοροποιήσεις σε πολλά επιμέρους στοιχεία σκιαγραφούν τις δύο αυτές κλινικές οντότητες.

Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μέσω επιγενετικής τροποποίησης αποτελεί κοινό μηχανισμό αλλά με πολλές επιμέρους διαφοροποιήσεις στα δύο νοσήματα. Είναι ενδιαφέρον ότι τα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA φαίνεται να διαφέρουν τόσο μεταξύ των δύο νοσημάτων όσο και συγκριτικά με τους υγιείς μάρτυρες. Η έρευνα στο συγκεκριμένο πεδίο έχει μέχρι τώρα χρησιμοποιήσει μεθοδολογικά δείγματα ιστών μετά από την μείζονα επεμβατική πρακτική της βιοψίας πνεύμονα. Δεδομένου του αναδυόμενου ρόλου των κυψελιδικών μακροφάγων τόσο στην ΙΠΙ όσο και στον ΚΠ αλλά και του ελάχιστα επεμβατικού χαρακτήρα της βρογχοσκόπησης, στην παρούσα μελέτη αξιοποιήθηκαν δείγματα βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος από ασθενείς με ΙΠΙ και ΚΠ προκειμένου να μελετηθεί συγκριτικά η έκφραση μορίων με κομβικό ρόλο στην επιγενετική ρύθμιση και πιο συγκεκριμένα στην μεθυλίωση του DNA και τα miRNAs.

Ορμώμενοι από την προηγούμενη γνώση της μειωμένης έκφρασης των miR-185 και miR-29a στην ΙΠΙ από δείγματα BALF αλλά και της γνωστής εμπλοκής τους στον ΚΠ, μελετήθηκε και συγκρίθηκε η έκφραση των δύο αυτών miRNAs αλλά και μορίων στόχων τους στα δύο νοσήματα. Οι στόχοι αφορούσαν σε δύο από τα σημαντικότερα ένζυμα που συμμετέχουν στην μεθυλίωση του DNA, τις DNA-μεθυλτρανσφεράσεις DNMT1 και DNMT3b καθώς και τα col1a1, AKT1 και AKT2. Αναζητήθηκαν πιθανές συσχετίσεις με στοιχεία των λειτουργικών πνευμονικών δοκιμασιών αλλά και επιδημιολογικών στοιχείων όπως φύλο, ηλικία και καπνιστική συνήθεια. Επιπρόσθετα, στην ομάδα του ΚΠ περαιτέρω αναζητήθηκαν συσχετίσεις με στοιχεία που προέκυψαν από τα ενδοβρογχικά ευρήματα κατά την βρογχοσκόπηση .

Όμοια επίπεδα των miR-185 και miR-29a παρατηρήθηκαν για την ΙΠΙ και τον ΚΠ, ενώ και οι κοινοί τους στόχοι AKT1 και DNMT3b επίσης δεν διέφεραν, υποστηρίζοντας πιθανές ομοιότητες σε επίπεδο επιγενετικής ρύθμισης. Αντιθέτως, οι στόχοι col1a1 και DNMT1 βρέθηκαν να διαφέρουν. Πιο συγκεκριμένα, τα mRNA επίπεδα του col1a1 βρέθηκαν αυξημένα στην ΙΠΙ επιβεβαιώνοντας το ειδικό για την νόσο αυτή χαρακτηριστικό. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η DNA-μεθυλτρανσφεράση DNMT1 βρέθηκε να υποεκφράζεται στα δείγματα BALF από ασθενείς με ΚΠ, ενώ περαιτέρω μείωση των επιπέδων της παρατηρήθηκε επί της παρουσίας αυξημένο «καρκινικού φορτίου» όπως αυτό αντικατοπτρίστηκε από τα ενδοβρογχικά ευρήματα της βρογχοσκόπησης.

SUMMARY

INTRODUCTION

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a form of chronic progressive interstitial pneumonia that continues to be associated with high morbidity and mortality, despite the fact that new antifibrotic drugs have recently been added to our quiver[1].

The exact cause of the disease still remains inexplicable, even though it seems to be strongly related to aging and smoking, similarly with lung cancer. Interestingly, LC is a common co morbidity among patients with idiopathic pulmonary fibrosis with major impact in their survival. Increasing data support the hypothesis that lung cancer occurs secondarily on the ground of fibrosis rather than as a preceding finding. In the majority of patients, LC arises as nodular lesions in the peripheral area of fibrosis, mainly at the lower areas of the lungs with squamous cell and adenocarcinoma being the prevalent histological types [2, 3].

A deeper view at the pathophysiology of the two diseases reveals several similarities and common pathways involved. Crucial cellular mechanisms known to be implicated in proliferation and resistance to apoptosis are activated in both lung cancer and pulmonary fibrosis, such as Fas/Fas ligand pathway, PTEN (protein phosphatase and tensin homologue), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and protein kinase B (AKT) and FAK (focal adhesion kinase). Epithelial–mesenchymal transition (EMT), is also a common event of cardinal importance both in the invasive feature of malignancies and in proliferation. Preneoplastic lesions (atypia, metaplasia, dysplasia), microsatellite instability and loss of heterozygosity in genes that underlie the tumorigenesis have been reported in lung fibrosis tissue also. Aging and the subsequent cellular senescence is a profound component of both diseases. Aggregating mutational burden, increased epigenetic gene silencing and telomere dysfunction frame the probable underline correlation[4, 5].

Common risk factors like aging, cigarette smoke and environmental effects seem to influence the activity of numerous genes by creating aberrant DNA methylation patterns and accelerating the aging of our epigenome. DNA methylation is carried out by three main DNA methyltransferases (DNMTs); DNMT1, which maintains pre-existing methylation patterns and DNMT3A and DNMT3B which yield novel methylation patterns. Genome wide hypomethylation and promoter hypermethylation affect genes involved in crucial cellular procedures in carcinogenesis. Similarly in IPF, the p53 pathway, Thy-1 and PTGER2 are suppressed by promoter hypermethylation, while

global methylation profile in IPF was found different compared to controls and partially similar to cancer. [6, 7]

MicroRNAs have also been emerged as major regulators of gene expression through epigenetic and posttranscriptional mechanisms. MicroRNA profiling studies in lung cancer have currently proposed several microRNAs as potential epigenetic biomarkers in the diagnostic procedure. Similarly, in IPF several oncomirs have been consistently found deregulated, such as miR-21, let-7d and miR-29 family. Recently our team found miR185 and miR29a to be downregulated in IPF compared to controls and data supporting important pathophysiological extensions were shown as Mir185 downregulation activated AKT signaling pathway in macrophages. MiR-29a downregulation found to be correlated with the overexpression of the collagen gene COL1A1 suggesting that the miR-29a/COL1A1 pathway is also active in IPF BAL cells, as previously demonstrated in IPF tissues. [8] [9]

Aberrant DNA methylation patterns, miRNAs profiling studies and other epigenetic mediators consist the field of intense research for both LC and IPF, not only individually but also as face to face comparison, in an effort of revealing common underlying mechanisms and sharing therapeutic targets. Tissue specimens and cell lines are the predominant material of research. However the role of BALF as a minimally invasive tool to study alveolar macrophages and their implication in pathogenesis continually recovers ground. Alveolar macrophages in IPF, acquiring alternatively activated phenotype, are actively involved in the fibrotic process. The production of soluble mediators related with myofibroblasts's survival, epithelial activation and EMT (such as CCL18, IL13, TGF- β , insulin-like growth factor) and the expression of profibrotic microRNAs are potential mechanisms through which alveolar macrophages promote fibrogenesis [10, 11]. On the other hand, there is plenty of evidence to support the altered alveolar macrophage function in patients with lung cancer. Those highly plastic cells display different phenotypes under the influence of tumor-associated polarizing events such as mediators and hypoxic tissue damage. [12, 13]

The aim of our study is to investigate possible common pathways between IPF and lung cancer at the level of key epigenetic regulators in bronchoalveolar lavage fluid. Similarities between IPF and LC were noticed at the level of miRNAs (miR-185 and miR-29a) with known implication in both diseases and their targets. However, DNMT1 and col1a1 seem to differ between the diseases, further reduced in the presence of malignant burden in BALF.

Results

Demographic data and PFTs are summarised in Table 1. IPF patients were older than the patients in the LC group by 4.3(\pm 4.6) years, while LC patients were heavier smokers as could be expected. The majority of LC was NSCLC (29/32) with the rest being SCLC. The group of LC patients was subdivided according to the endobronchial findings as described in materials and methods. 14 LC patients were assigned to the group “same side” (SS) and 9 to “opposite side” (OS) according to the site of bronchoscopy. 14 LC patients had no malignant cell detected in their BAL and were assigned to “negative cytology” (NC) group and 7 to the “positive cytology” (PC). 19 patients had obvious “endobronchial lesion” (OEL) and 7 were assigned to “no endobronchial lesion” (NOEL).

MiR-185 and Mir-29a levels are similar between IPF and LC.

MicroRNA expression levels in BAL cells were measured by qRT-PCR and normalized using small nucleolar RNA RNU19. We have previously shown that both microRNAs were significantly downregulated in IPF relative to controls [8]. The downregulation of both micro-RNAs was also noted for LC since the expression of miR-29a and miR-185 did not differ between IPF and LC patients (Figure 4A and B). miR-29a and miR-185 expression levels were remarkably correlated within the IPF group (Spearman’s R 0.81, $p=6e^{-14}$) and the LC group (Spearman’s R 0.71, $p=3.6e^{-5}$).

DNMTs/AKT/ mir-29a/mir-185 axis in IPF and LC

DNMT1 and DNMT3b are common targets of miR-185 and mir-29 in IPF and LC. mRNA expression levels in BAL cells were measured by qRT-PCR and normalized using GAPDH. DNMT1 levels previously measured in IPF relative to controls showed no differences.

Interestingly, DNMT1 levels were significantly lower in LC patients compared to IPF patients. (Figure 5A Table 3). Similar transcript levels of DNMT3b, AKT1 or AKT2 were found in IPF and LC (Table 3).

Effect of malignant burden on DNMT1 levels in BAL cells compared to IPF.

Comparing IPF patients with the LC group in detail, further reduced levels of DNMT1 were detected in the samples where the BAL procedure was performed at the side of the lesion (SS: same side) as opposed to the lesion free side (OS: opposite side). Moreover, LC patients with positive BAL cytology results (PC: positive cytology) had a more pronounced reduction in DNMT1 levels than those without the presence cells with malignant features (NC: negative cytology), when compared with IPF (Figure 5B). Regarding the histological type of LC, the more obvious reduction in DNMT1 mRNA levels compared with IPF was found in NSLC type (Table 2).

COL1a1/mir-29a/mir-185 axis in IPF and LC.

Next we analysed miR29a specific target Col1a1 by qRT-PCR and normalized using GAPDH. Our previous result showed that IPF BAL cells express significantly higher levels of Col1a1 mRNA than controls. In this study we observe that the levels of Col1a1 mRNA were significantly lower in LC patients compared with IPF patients. (Figure 6A Table 3).

Effect of malignant burden on Col1a1 levels in BAL cells compared to IPF .

The mRNA levels of COL1a1 were quite reduced in LC patients compared with IPF overall as it was noted previously. Assorting LC patients depending on the side the BAL procedure was performed and comparing them with IPF, further reduced levels of COL1a1 was detected in LC patients when the BAL procedure was done ipsilaterally of

the lesion than contralaterally. The presence of an endobronchial lesion during the bronchoscope signified more clearly reduced levels of COL1a1 (compared with IPF) than in the case of no endobronchial lesion. (Figure 6B Table 3). Patients with the histological type of SCLC had COL1a1 levels similar with IPF levels, opposing the reduced levels in the NSCLC patients subgroup.

Discussion

This is a study of expression of major epigenetic molecules with known implication both in IPF and LC in BAL cells, such as key microRNAs miR29a and miR185, previously known to be downregulated in both diseases and their common targets DNMTs (DNMT1 and DNMT3b), the enzymes been actively involved in DNA methylation procedure. The relationship between those lethal diseases which often coexist is an active field of research as common pathogenic pathways emerge, with major therapeutic implications. Our cardinal findings were: a) both miR-185 and miR-29a were comparably expressed in IPF and LC BAL samples. b) no direct correlation with miR-29a or miR-185 and their targets was observed, albeit DNMT1 downregulation was characteristic of LC and collagen 1a upregulation was representative of IPF BAL samples. c) In LC the malignant burden affected both DNMT1 and collagen 1a expression.

Similar levels of miR-29a and miR-185 were detected between IPF and lung cancer in BAL cells while our previous study showed that both miR-29a and miR-185 were downregulated in IPF relative to controls [8]. The downregulation of miR-29a and miR-185 in lung cancer tissue specimens has been previously established however, this is the first study in lung cancer BAL cells. Our results suggest that miR-185 is a novel common microRNA deregulation in IPF and LC next to previously identified microRNAs such as miR-29a. MiR-29a and miR-185 expression showed remarkable association in both IPF and LC BAL samples. A possible common regulation of the expression of the two microRNAs may be related to the increased levels of TGF β in both IPF and LC BAL [14, 15]. Activation of TGF- β signaling and excessive accumulation of ECM proteins are

observed in IPF and lung cancer, highlighting a common molecular mechanism in both diseases that is directly linked to both microRNAs[16] [17]. Interestingly, miRNA based-therapeutic strategies are already under evaluation for their use in several malignancies[18] and that imposes the need for in depth study of similarities and differences between IPD and LC, focusing on key molecules involved in the multifarious function of alveolar macrophages.

For this reason, we examined the expression of a common target of miR-29a and miR-185 induced by TGFb and central fibrosis mediator collagen 1a in LC in comparison to IPF. Our previous results supported that the downregulation of miR-29a in IPF is associated with the overexpression of col1a1 gene in BAL cells, confirming the active role of the miR-29a/col1a1 pathway also in AMs alike lung tissue while the expression profile of collagen 1a in LC has not been yet clarified. Collagen 1a could be involved in carcinogenesis as aberrant expression levels were revealed in several malignancies including hepatocellular carcinoma [19], NSCLC tissue [20] and in malignant gastric tissue also [21]. Our findings however showed significantly increased levels of collagen 1a in IPF relative to LC in BAL cells that establishes the characteristic fibrotic profile of BAL cells in IPF that appears to be lacking in LC BAL cells. The further reduced levels of col1a1 accordingly with increased malignant burden cannot so far be interpreted and further functional analysis of AMs in LC is needed.

A second pathway/axis affected by both miR-29a and miR-185 is the expression of DNA methyltransferases (DNMTs). An important concept currently put forward for the pathogenesis of IPF as in cancer is that common risk factors like aging, cigarette smoke and environmental effects induce errors in the maintenance of the methylation marks of the genome creating aberrant DNA methylation patterns and accelerating the aging of our epigenome [22, 23]. Global methylation profile in IPF lung tissue was found different compared to controls and partially similar to cancer. [6, 7] Furthermore, increased expression of the DNMTs was observed in both cancer and IPF lung tissues studies [7] [24], leading to site-specific hypermethylation and gene silencing.

We have previously reported that DNMT1 mRNA levels in the BAL cells of IPF patients were similar to controls[8]. In the current study, we observed a significant reduction in the mRNA levels of DNMT1 in LC BAL cells while, DNMT3b levels were similar in IPF and LC. DNMT1, in contrast to DNMT3's, appears to function in cooperation with DNA damage repair pathways in order to maintain genomic stability and ablation or reduction of DNMT1 promotes mutagenic events [25], microsatellite instability and chromosomal translocations[26]. Interestingly, the samples obtained near the malignant lesion or with positive malignant cell cytology results showed a more pronounced reduction of DNMT1 expression suggesting that reduced DNMT1 levels were associated with increased malignant burden.

LC is a common and prognostically determinant comorbidity among IPF patients. BAL procedure is a less invasive and harmless tool for revealing new, disease specific biomarkers regarding LC in IPF patients, for screening, risk stratification and diagnostic purposes, verging the promising concept of cancer liquid biopsy. It would be of great interest to study the expression profile of those miRNAs and their targets also in patients who simultaneously suffer from IPF and LC. MicroRNA based-therapeutic strategies are already under evaluation for their use in several malignancies[18] and IPF[27] and would greatly benefit from in depth study of similarities and differences between IPF and LC, focusing on key molecules involved in the multifarious function of alveolar macrophages.

Tissue specimens and cell lines are the predominant material of research, however the role of BAL as a minimally invasive tool to study alveolar macrophages and their implication in pathogenesis continually recovers ground. In IPF alveolar macrophages deriving from monocytes recruited to the injured lungs are actively involved in the fibrotic process[28]. Altered alveolar macrophage function in patients with lung cancer has been recorded under the influence of tumor-associated polarizing events such as mediators and hypoxic tissue damage [12]. Our study provides some insight with respect to common alveolar macrophage function in the two groups as

demonstrated by the commonly reduced expression of miR-29a and miR-185. Further research is needed in order to identify BAL biomarkers for high risk patients and more targeted therapies.

A.2. ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

FEV1: Forced Expiratory Volume at 1st second/ Όγκος εκπνεόμενου αέρα στο πρώτο δευτερόλεπτο.

FVC: Forced Vital Capacity/ Βίαια εκπνεόμενη ζωτική χωρητικότητα

EMT: Epithelial to Mesenchymal Transition/ επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετατροπή.

SCLC: Small Cell Lung Cancer /Μικροκυτταρικός Καρκίνος Πνεύμονα.

NSCLC: Non-Small Cell Lung Cancer/Μη μικροκυτταρικός Καρκίνος Πνεύμονα.

ΙΠΙ: Ιδιοπαθής Πνευμονική Ίνωση.

ΚΠ: Καρκίνος Πνεύμονα.

TLC: Total Lung Capacity/Ολική Πνευμονική Χωρητικότητα.

KCO: carbon monoxide transfer coefficient /Διαχυτική ικανότητα.

BALF: Bronchoalveolar lavage Fluid/ Βρογχοκυψελιδικό Έκπλυμα.

NC= negative cytology /αρνητική κυτταρολογική.

PC= positive cytology /θετική κυτταρολογική.

OS= opposite side /BALF αντίπλευρα από τη βλάβη.

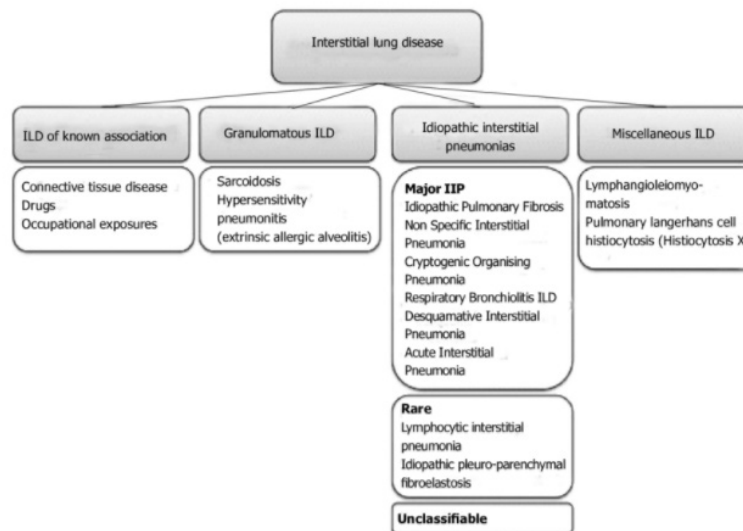
SS= same side /BALF από την πλευρά της βλάβης.

NOEL= no endobronchial lesion/χωρίς εμφανή ενδοβρογχική βλάβη.

OEL= endobronchial lesion /με εμφανή ενδοβρογχική βλάβη.

A.3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ: ΔΙΑΜΕΣΕΣ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΕΣ

Ο διάμεσος πνευμονικός ιστός περιλαμβάνει το κυψελιδικό επιθήλιο, το ενδοθήλιο των πνευμονικών τριχοειδών, τη βασική μεμβράνη και τον περιαγγειακό και περιλεμφατικό ιστό. Με τον όρο διάχυτες διάμεσες πνευμονοπάθειες αναφερόμαστε στο σύνολο των πνευμονοπαθειών που επηρεάζουν τον χώρο αυτό. Προκύπτουν όταν ένα βλαπτικό ερέθισμα κινητοποιήσει μια μη φυσιολογική διαδικασία επούλωσης με συνέπεια την αντικατάσταση του διάμεσου χώρου από ινώδη ιστό.



ΕΙΚΟΝΑ 1. Ταξινόμηση των διάμεσων πνευμονοπαθειών. (Από: Troy LK, Corte TJ. «Sleep disordered breathing in interstitial lung disease: A review.» World J Clin Cases. 2014 Dec 16;2(12):828-34. doi: 10.12998/wjcc.v2.i12.828.)

A.3.2 ΙΔΙΟΠΑΘΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΙΝΩΣΗ

Η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση αποτελεί την πλέον συχνή οντότητα ανάμεσα στις ιδιοπαθείς διάμεσες πνευμονίες. Χαρακτηριστικό της είναι η χρονιότητα και η σταδιακή και διάχυτη εναπόθεση ινώδους ιστού στο υποστηρικτικό διάμεσο δίκτυο του πνευμονικού παρεγχύματος. Οι αλλοιώσεις περιορίζονται στον πνεύμονα και τυπικά ξεκινούν στα κατώτερα και περιφερικότερα πνευμονικά πεδία ενώ σταδιακά επεκτείνονται και στο υπόλοιπο πνευμονικό παρέγχυμα. Ιστολογικά αντιστοιχούν στο πρότυπο της συνήθους διάμεσης πνευμονίας (UIP). Οι μη αναστρέψιμες αυτές δομικές βλάβες αλλοιώνουν την αρχιτεκτονική του πνεύμονα και προκαλούν τροποποιήσεις που επιβαρύνουν τόσο τη μηχανική αλλά και τη λειτουργικότητα του οργάνου.[29]

A.3.2.1 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, η νόσος εμφανίζεται σποραδικά ενώ λιγότερο συχνά ανιχνεύεται οικογενής προδιάθεση. Η ακριβής επίπτωση της νόσου δεν είναι δυνατόν να υπολογιστεί ακριβώς καθώς φαίνεται να υπάρχει μεγάλη διακύμανση ανάμεσα στα διάφορα κράτη και έθνη, ωστόσο κατά προσέγγιση η επίπτωση ποικίλει από 1-30 περιπτώσεις ανά 100.000 ανθρωπο-έτη. Ο επιπολασμός υπολογίζεται για τις ΗΠΑ στις 130.000 περιπτώσεις, στις 300.000 για την Ευρώπη, στις 640.000 για την Ασία και στις 3.000.000 παγκοσμίως. Οι δείκτες αυτοί παρατηρούνται αυξανόμενοι στην πορεία των ετών[30]. Στην Ελλάδα, η εκτιμώμενη επίπτωση της νόσου είναι 1-5 νέες περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα, και ο εκτιμώμενος επιπολασμός της νόσου είναι 4-18 περιστατικά ανά 100.000[31].

A.3.2.2 ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

Η μέση ηλικία εμφάνισης είναι τα 65 έτη και η επίπτωση αυξάνει χαρακτηριστικά στην ηλικιακή ομάδα άνω των 65 ετών υπονοώντας την αναδυόμενη σχέση της νόσου με τις βιολογικές διεργασίες της γήρανσης. Επίσης τα επιδημιολογικά στοιχεία συγκλίνουν σε «προτίμηση» εμφάνισης στο ανδρικό φύλο με λόγο ανδρών: γυναικών (Α:Γ) που προσεγγίζει το 2:1.[29], χωρίς έως τώρα να έχει διευκρινιστεί αν αυτή η παρατήρηση υποκρύπτει διαφοροποίηση σε επίπεδο βιολογικών διεργασιών ή συμπεριφοράς ανάμεσα στα δύο φύλα[32]. Η τυπική συμπτωματολογία αφορά σε δύσπνοια προσπαθείας και βήχα μη παραγωγικό που περιορίζουν σημαντικά την ποιότητα ζωής του ασθενούς.[32] Από τα ακροαστικά ευρήματα κυριαρχούν οι εισπνευστικοί μη μουσικοί στα κατώτερα πνευμονικά πεδία αμφοτερόπλευρα. Πληκτροδακτυλία

παρατηρείται στο 25-50% των περιπτώσεων, ενώ η απώλεια βάρους είναι λιγότερο συχνή. Η κυάνωση και τα σημεία δεξιάς καρδιακής ανεπάρκειας συνδέονται με προχωρημένη νόσο και συνοδεύονται από αναπνευστική ανεπάρκεια[29]. Οι δοκιμασίες πνευμονικής λειτουργίας τυπικά αναδεικνύουν περιοριστικό λειτουργικό πρότυπο με μειωμένη FVC και FEV1, ενώ η διαχυτική ικανότητα είναι χαρακτηριστικά μειωμένη ακόμα και στην ήπια νόσο. Αξίζει να σημειωθεί ότι στους ασθενείς με συνυπάρχον εμφύσημα, η FVC μπορεί να είναι ψευδώς φυσιολογική λόγω της συνύπαρξης περιοριστικής και αποφρακτικής διαταραχής. Οι εργαστηριακές εξετάσεις είναι συνήθως μη-ειδικές και αξιοποιούνται προκειμένου να αποκλειστεί άλλο νόσημα όπως υποκείμενο νόσημα του κολλαγόνου. Πρόσφατα, η ευρωπαϊκή και η αμερικάνικη πνευμονολογική εταιρεία (ERS/ATS) πρότειναν τον όρο «διάμεση πνευμονία με χαρακτηριστικές αυτοανοσίας» (IPAF-interstitial pneumonia with autoimmune features) προκειμένου να περιγράψουν ασθενείς με διάμεση πνευμονοπάθεια και κλινικά, εργαστηριακά ή/και μορφολογικά (απεικονιστικά, ιστολογικά /η λειτουργικά) χαρακτηριστικά που να υποδηλώνουν υποκείμενο αυτοάνοσο νόσημα αλλά χωρίς να πληρούνται κριτήρια που να θέτουν διάγνωση.

A.3.2.3 ΠΡΟΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

Η πρόγνωση είναι δυσμενής και η μέση επιβίωση κυμαίνεται από τρία έως και 5 έτη από τη διάγνωση. Αξιοσημείωτο ωστόσο είναι το γεγονός ότι η φυσική πορεία της νόσου ποικίλει ανάμεσα στους ασθενείς και δεν είναι προβλέψιμη εξ'αρχής. Κυμαίνεται από βραδέως εξελισσόμενη ή υποκλινική νόσο έως και ραγδαίως επιδεινούμενη ή σταθερή πορεία που διακόπτεται από σοβαρές παροξύνσεις που οδηγούν στο θάνατο. Ειδικοί κλινικοί φαινότυποι όπως αυτοί ασθενών με συνυπάρχουσα πνευμονική υπέρταση ή εμφύσημα έχουν σαφώς χειρότερη επιβίωση. Η κυρίαρχη αιτία θανάτου είναι η αναπνευστική ανεπάρκεια, ωστόσο ένα μικρότερο ποσοστό ασθενών καταλήγει λόγω καρδιαγγειακών επιπλοκών, πνευμονικής εμβολής ή και καρκίνου πνεύμονα.[33]

A.3.2.4 ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

Η διαγνωστική προσέγγιση του νοσήματος ξεκινάει αφότου έχει τεθεί από τον ιατρό η κλινική υποψία ύπαρξης διάμεσης πνευμονοπάθειας. Η κλινική συμπτωματολογία μπορεί να μην είναι τυπική και πολλές φορές αποδίδεται εσφαλμένα στην προχωρημένη ηλικία ή στις συννοσηρότητες του ασθενούς (καρδιακή ανεπάρκεια, εμφύσημα). Περιστασιακά οι ασθενείς μπορεί να παρουσιάσουν με οξεία

συμπτωματολογία που μπορεί να συνοδεύεται από αναπνευστική ανεπάρκεια, κλινική εικόνα που πιθανά αντιπροσωπεύει οξεία παρόξυνση του νοσήματος[34]. Προκειμένου να τεκμηριωθεί η διάγνωση της ΙΠΙ πρέπει να αποκλειστούν άλλες διάμεσες πνευμονοπάθειες, αναστρέψιμα αίτια (π.χ φάρμακα) ή άλλα νοσήματα που συνοδεύονται από διάμεση πνευμονοπάθεια ως συνοδή εκδήλωση. Το διεξοδικό κλινικό ιστορικό, η κλινική εξέταση, η απεικόνιση με αξονική τομογραφία υψηλής ευκρίνειας και πιθανά η ιστολογική εικόνα, είναι απαραίτητα. Στις περιπτώσεις εκείνες που στην αξονική τομογραφία υψηλής ευκρίνεια παρατηρείται άλλο πρότυπο πέρα από αυτό της συνήθους διάμεσης πνευμονίας, συστήνεται η διενέργεια βιοψίας πνεύμονα, με την προϋπόθεση ότι η καρδιοαναπνευστική κατάσταση του ασθενούς το επιτρέπει. Η τελική διάγνωση τίθεται μετά από εκτενή συζήτηση επιστημονικής ομάδας που αποτελείται από πνευμονολόγο, ακτινολόγο και παθολογοανατόμο[35]. Η διάγνωση που προκύπτει από την διεπιστημονική ομάδα έχει καλύτερη προγνωστική αξία συγκριτικά με αυτήν που προκύπτει από την κάθε ειδικότητα μεμονωμένα[36].

A.3.2.5 ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ

Η αξονική τομογραφία υψηλής ευκρίνειας κατέχει κεντρικό ρόλο στην διαγνωστική προσέγγιση της νόσου. Η τυπική απεικόνιση της ΙΠΙ, δηλαδή το πρότυπο της συνήθους διάμεσης πνευμονίας, περιλαμβάνει πάχυνση του διάμεσου δικτύου, βρογχιεκτασίες ή βρογχιολεκτασίες εξ'έλεως και περιοχές διαταραγμένης αρχιτεκτονικής του πνευμονικού παρεγχύματος, δίκην μελικυρήθρας. Επικράτηση των βλαβών παρατηρείται περιφερικά στα κατώτερα πεδία αμφοτερόπλευρα. Η παραπάνω απεικόνιση χαρακτηρίζεται ως βέβαιη UIP με βάση ακτινολογικά κριτήρια, ενώ οι εναλλακτικές διαγνώσεις αφορούν στην πιθανή UIP ή μη UIP. Η τυπική αυτή εικόνα της συνήθους διάμεσης πνευμονίας αρκεί για να θέσει τη διάγνωση σε συνδυασμό με ένα συμβατό κλινικό ιστορικό, ενώ στις δύο τελευταίες περιπτώσεις χρειάζεται ιστολογική επιβεβαίωση. Η απεικόνιση του μωσαϊκού προτύπου, οι περιοχές θαμβής υάλου, η επικράτηση των βλαβών στα άνω πνευμονικά πεδία και τα οζίδια παραπέμπουν σε εναλλακτικές διαγνώσεις όπως η πνευμονίτιδα εξ'υπερευαισθησίας ή η μη ειδική διάμεση πνευμονία (NSIP)[32].

A.3.2.6 ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΑ

Το ιστολογικό ανάλογο της ΙΠΙ είναι η συνήθης διάμεση πνευμονία η οποία χαρακτηρίζεται από διάμεση ίνωση με πολυεστιακή και ανομοιόμορφη κατανομή με χαρακτηριστική παρεμβολή περιοχών φυσιολογικού παρεγχύματος ανάμεσα σε περιοχές ίνωσης (χωρική ετερογένεια). Χαρακτηριστική επίσης είναι η κατά τόπους καταστροφή της αρχιτεκτονικής του παρεγχύματος (μελικηρύθρα), οι βρογχιολεκτασίες εξ'έλεως και οι ινοβλαστικές εστίες. Οι τελευταίες αντιπροσωπεύουν περιοχές όπου η διαδικασία της ίνωσης είναι ενεργός. Συνυπάρχουν δηλαδή στον ίδιο ασθενή περιοχές ίνωσης με διαφορετική χρονική έναρξη (χρονική ετερογένεια). Επικράτηση των βλαβών παρατηρείται στις υποϋπεζωκοτικές και παρα-διαφραγματικές περιοχές.[37]

Η βιοψία πνεύμονα, όταν είναι εφικτό να διενεργηθεί, δεν αποτελεί το κυρίαρχο κριτήριο καθώς το πρότυπο της συνήθους διάμεσης πνευμονίας απαντάται επίσης σε μια σειρά από άλλα νοσήματα όπως είναι τα νοσήματα του κολλαγόνου, η χρόνια πνευμονίτιδα εξ'υπερευαισθησίας, επαγγελματικά νοσήματα όπως η αμιάντωση και στην πνευμονική ίνωση που σχετίζεται με φάρμακα. Επιπρόσθετα, στην ΙΠΙ παρατηρείται συχνά να συνυπάρχουν στο παθολογοανατομικό δείγμα διάσπαρτες περιοχές με άλλη παθολογοανατομική εικόνα πέραν της συνήθους διάμεσης πνευμονίας η οποία επικρατεί όπως για παράδειγμα μη ειδική διάμεση πνευμονία, οργανοποιό πνευμονία ή αποφολιδωτική διάμεση πνευμονία.[38]

A.3.2.7 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

Περιβαλλοντικές εκθέσεις

Η χρόνια έκθεση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες έχουν συσχετιστεί με την παθογένεια της ΙΠΙ. Ο καπνός του τσιγάρου και οι διάφορες κόνεις μετάλλων αποτελούν χαρακτηριστικά παραδείγματα. Ακόμα και μετά από διακοπή καπνίσματος, η καπνιστική συνήθεια εξακολουθεί να αποτελεί παράγοντα κινδύνου για ανάπτυξη ΙΠΙ, ενώ ασθενείς με ήδη διεγνωσμένη νόσο που εξακολουθούν να καπνίζουν, έχουν σαφώς πτωχότερη πρόγνωση. Πέρα όμως από το κάπνισμα, συσχέτιση της νόσου έχει βρεθεί με την ενασχόληση με αγροτικές εργασίες, την κτηνοτροφία και την έκθεση σε πυρίτιο, σκόνη ξύλου, πέτρα κ.α. Μικροβιακοί παράγοντες όπως ιοί, μύκητες και βακτήρια διαδραματίζουν επίσης ρόλο στην παθογένεια της ΙΠΙ. Η μη ισορροπημένη μικροβιακή σύνθεση στους πνεύμονες των ασθενών με ΙΠΙ, έχει δειχθεί σε μελέτες που επικεντρώνονται στην ανάλυση του μικροβιώματος. Η έκφραση του MUC5b

γονιδίου σε ασθενείς με ΙΠΙ έχει συνδεθεί με χαμηλότερα επίπεδα μικροβιακού φορτίου συγκριτικά με ασθενείς που δεν εξέφραζαν το γονίδιο. Ανάλυση του μικροβιώματος στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BALF) ασθενών με ΙΠΙ, ανέδειξε ιούς, όπως EBV, CMV, HCV, HHV-8 και πλέον αυτοί μελετώνται ως πιθανοί παράγοντες κινδύνου. Είναι δε ενδιαφέρον το γεγονός ότι πλέον διεξάγονται μελέτες οι οποίες μελετούν την επίδραση αντικών, αντιμυκητιασικών και αντιβιοτικών φαρμάκων στην ΙΠΙ.[[39](#), [40](#)]

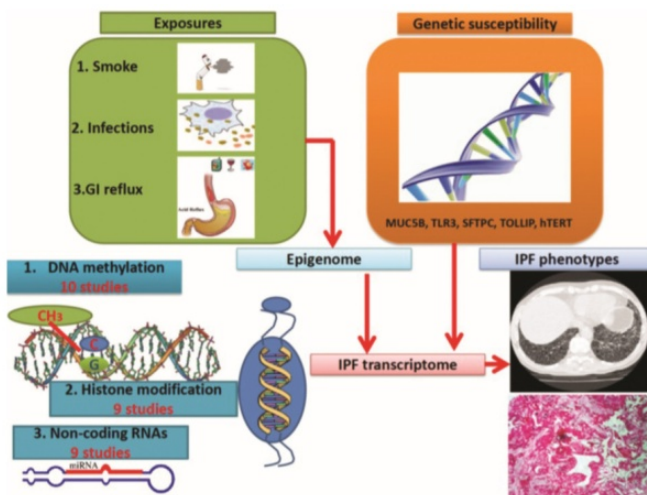
Γήρανση

Η γήρανση αποτελεί μια φυσιολογική διεργασία που οδηγεί στον θάνατο μέσω της σταδιακής απώλειας της λειτουργικότητας του οργανισμού. Στην ΙΠΙ συμβαίνουν αλλαγές σχετιζόμενες με τη γήρανση τόσο σε κυτταρικό όσο και σε κλινικό επίπεδο[[41](#)]. Οι μεταβολές αυτές πρωτίστως επιδρούν στο κυψελιδικό επιθήλιο. Οι έως σήμερα αναγνωρισμένες διεργασίες σχετιζόμενες με τη γήρανση που συμμετέχουν στην παθογένεια της ΙΠΙ είναι : η γονιδιακή αστάθεια, η απώλεια της προστατευτικής δράσης των τελομερών, οι επιγενετικές τροποποιήσεις, απώλεια της πρωτεόστασης, απορρύθμιση της θρεπτικής αναζήτησης, δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων, κυτταρική γήρανση, εξουθένωση των αρχέγονων κυττάρων και αλλαγές στην επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων. Πειράματα που έγιναν σε φυσιολογικά γηρασμένα ποντίκια έδειξαν πιο έντονη ινωτική απάντηση σε περιβαλλοντικά βλαπτικά ερεθίσματα συγκριτικά με ηλικιακά νεότερα ποντίκια[[42](#)]. Σε μια άλλη πρόσφατη μελέτη φάνηκε ότι οι ινοβλάστες γηρασμένων ποντικών εκφράζουν ινωτικό φαινότυπο που οδηγεί σε αντίσταση στην απόπτωση και μεγαλύτερη ινωτική απόκριση μετά από τραυματισμό. Αυτό το εύρημα με την αυξημένη έκφραση του PAI-1, ο οποίος συνδέεται με τον TGF-β1 που είναι μόριο κλειδί στην διαδικασία της γήρανσης μέσω της επαγωγής του p21[[43](#)].

Γενετική προδιάθεση

Η προδιάθεση κάποιων ανθρώπων να νοσήσουν από ΙΠΙ φαίνεται να σχετίζεται και με αλλαγές σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης. Αυτές οι αλλαγές συμβαίνουν είτε σε έδαφος παραλλαγών γονιδίων είτε αλλαγών σε μεταγραφικό επίπεδο και επιδρούν τελικώς στην ακεραιότητα του επιθηλίου. Η εκτεταμένη έρευνα στο πεδίο της γενετικής στην ΙΠΙ οδήγησε στην καθιέρωση του όρου οικογενής διάμεση πνευμονία η οποία αντιπροσωπεύει περιπτώσεις όπου δύο ή περισσότερα μέλη του ίδιου

γενεαλογικού δέντρου νοσούν ή νόσησαν στο παρελθόν. Η οικογενής διάμεση πνευμονία κληρονομείται με τον αυτοσωμικό επικρατή τρόπο με ποικίλη διεισδυτικότητα και έχει υπολογιστεί ότι αφορά το 2% έως και 20% των περιπτώσεων ΙΠΙ. Η παραλλαγμένη αυτή έκφραση των γονιδίων εμπλέκεται κυρίως στην διατήρηση του μήκους των τελομερών (Telomerase reverse transcriptase-TERT, Telomerase RNA component-TERC, Poly(A)-specific ribonuclease-PARN, and regulator of telomere elongation helicase-RTEL), στην λειτουργικότητα του επιφανειοδραστικού παράγοντα και στην προαγωγή της διαδικασίας κατά την οποία τα επιθηλιακά κύτταρα αποκτούν χαρακτηριστικά μεσεγχυματικών κυττάρων (Surfactant Protein C and A2-SFTPC, SFTPA2). Πολλά από αυτά τα γονίδια έχουν εντοπιστεί και σε περιπτώσεις σποραδικής εμφάνισης της νόσου. Η παραλλαγή rs35705950 στον προμότορα του γονιδίου που κωδικοποιεί την βλεννίνη 5B (MUC5B) αποτελεί τον πιο συχνό πολυμορφισμό τόσο στην οικογενή όσο και στην σποραδική μορφή της νόσου. Η βλεννίνη 5B είναι γνωστή για το ρόλο της στην αποτελεσματική βλενοκροσσωτή κάθαρση, ωστόσο ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο οδηγεί στην πνευμονική ίνωση δεν έχει γίνει γνωστός. Παραδόξως, οι ασθενείς που κατέχουν αυτή την παραλλαγή φαίνεται να έχουν καλύτερη επιβίωση. Παραλλαγές στα γονίδια TOLLIP, OBFC1, TERC και TERT έχουν επίσης εντοπιστεί σε περιπτώσεις σποραδικής μορφής της νόσου. Ο γονιδιακός έλεγχος πλέον προτείνεται σε επιλεγμένους ασθενείς με ΙΠΙ. [32, 40, 44, 45]



ΕΙΚΟΝΑ2. Ο ρόλος της επιγενετικής στην ΙΠΙ (A. Tzouvelekis and N. Kaminski. Epigenetics in idiopathic pulmonary fibrosis. Biochem. Cell Biol. Vol. 93, 2015)

Επιγενετική

Η λέξη «epigenetics» έχει την προέλευσή της στην Ελληνική επί (δηλαδή για πάνω από, ή παραπάνω) και τη γενετική, την επιστήμη της κληρονομικής μετάδοσης. Η επιγενετική μελετά κληρονομήσιμες μεταβολές στην έκφραση γονιδίων χωρίς να συνοδεύεται από αλλαγές στην αλληλουχία του DNA. Οι τρεις κύριοι επιγενετικοί μηχανισμοί είναι η μεθυλίωση του DNA, οι τροποποιήσεις των ιστονών και η δυσλειτουργία των μικρο-RNAs (miRNAs). Και οι τρεις μηχανισμοί μπορούν να ρυθμίσουν τη μεταγραφή των γονιδίων τροποποιώντας την πρόσβαση στους υποκινητές γονιδίων (gene promoters) και στις ρυθμιστικές περιοχές.

Η μεθυλίωση του DNA, ο επιγενετικός μηχανισμός που έχει μελετηθεί περισσότερο, αφορά στην προσθήκη μεθυλικών ομάδων στις κυτοσίνες με την ενέργεια ενζύμων γνωστών ως μεθυλοτρανσφεράσες. Αυτή η προσθήκη τροποποιεί την έκφραση των γονιδίων. Οι DNA μεθυλτρανσφεράσες (DNMTs) είναι ένζυμα τα οποία είναι υπεύθυνα για την μεταφορά της μεθυλ-ομάδας στην θέση 5 της κυτοσίνης του DNA. Η οικογένεια των DNA μεθυλτρανσφερασών αποτελείται από τέσσερα μέλη, τις DNMT1, DNMT3A, DNMT3B και DNMT3L. Η τελευταία δεν φαίνεται να έχει ενζυμική δραστηριότητα. Η DNMT1 είναι υπεύθυνη για τη διατήρηση των ήδη υπαρχόντων προτύπων μεθυλίωσης στο DNA, ενώ οι DNMT3A/DNMT3B δημιουργούν εξ'αρχής νέα πρότυπα[46].

Οι τροποποιήσεις των ιστονών αφορούν μετα-μεταφραστικές αλλαγές στις ιστόνες, τις σφαιρικές πρωτεΐνες που σχηματίζουν τη χρωματίνη και ταξινομούν το DNA σε νουκλεοσώματα. Αυτές οι τροποποιήσεις μπορεί να επιδρούν σε ποικίλες βιολογικές διεργασίες, όπως τη ρύθμιση των γονιδίων και την επιδιόρθωση του DNA (π.χ. η ακετυλίωση της ιστόνης συνήθως σχετίζεται με ενεργοποίηση του γονιδίου).

Τα miRNAs είναι μικρά, περίπου 22 νουκλεοτιδίων, μονόκλιωνα, μη κωδικοποιητικά RNAs, που λειτουργούν ρυθμίζοντας την έκφραση του γονιδίου- στόχου είτε την αποσιώπηση ή την υποβάθμιση.[47]

Τα ευρήματα που συσχετίζουν τις περιβαλλοντικές εκθέσεις με επιγενετικούς δείκτες αυξάνονται ταχέως. Ωστόσο, δεν είναι ακόμη γνωστό αν οι επιγενετικές αλλαγές που παρατηρούνται έπειτα από έκθεση σε τοξικές ουσίες βρίσκονται στην αιτιολογική αλυσίδα μεταξύ έκθεσης και νοσήματος. Είναι πιθανό οι αλλαγές στο επιγονιδίωμα να θέτουν τα εκτεθειμένα άτομα επιρρεπή στην ανάπτυξη του νοσήματος. Η επικρατούσα θεωρία υποστηρίζει ότι ο συνδυασμός γενετικών πολυμορφισμών και επιγενετικών τροποποιήσεων καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την ευπάθεια του ατόμου στο να αναπτύξει μια χρόνια ινωτική διεργασία. [47]

Στο χώρο των διάμεσων πνευμονοπαθειών και της ΙΠΙ ειδικότερα, υπάρχει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον για το ρόλο των μετα-μεταγραφικών τροποποιήσεων και των αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στο περιβάλλον και στα γονίδια και συνεχώς έρχονται στο φως στοιχεία που υποστηρίζουν τον κεντρικό ρόλο των επιγενετικών μεταβολών στην ΙΠΙ[47]. Πολλές μελέτες παρατήρησης έχουν αναδείξει τον υψηλό επιπολασμό διαφόρων πειβαλλοντικών ερεθισμάτων στους ασθενείς με ΙΠΙ, όπως το κάπνισμα[45], η γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση[48], οι ιογενείς λοιμώξεις[49] και η γήρανση[50], τα οποία είναι πιθανό μέσω επιγενετικών μηχανισμών να ασκούν ρυθμιστικό ρόλο στην γονιδιακή έκφραση.

Έρευνες έχουν δείξει ότι η υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου Thy-1 είναι υπεύθυνη για την μειωμένη έκφραση του Thy-1 σε ινοβλάστες στην ΙΠΙ, οδηγώντας σε ανεξέλεγκτη παραγωγή μυοϊνοβλαστών και προοδευτική ίνωση [51]. Διαφορετικά επίπεδα μεθυλίωσης τριών CpG περιοχών (CpG islands) στον υποκινητή της α-SMA σε ινοβλάστες, μυοϊνοβλάστες και κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα φάνηκε να συσχετίζεται με την έκφραση της α-SMA σε αυτές τις κυτταρικές σειρές [52]. Φαρμακολογική αναστολή της δραστηριότητας DNMT προκάλεσε αύξηση της έκφρασης του α-SMA γονιδίου [52]. Η ίδια ομάδα ερευνητών έδειξε ότι η MeCP2, μια πρωτεΐνη που κατά προτίμηση συνδέεται με περιοχές μεθυλιωμένου DNA στις 5'-CpG περιοχές, διαδραματίζει ρόλο στην διαφοροποίηση των μυοϊνοβλαστών και στην εναπόθεση κολλαγόνου μέσω ρύθμισης της έκφρασης της α-SMA[53]. Η υπερμεθυλίωση του υποκινητή πολλών γονιδίων που εμπλέκονται στην απόπτωση των ινοβλαστών, όπως το γονίδιο του υποδοχέα της προσταγλανδίνης E2 (PTGER2) και p14 (ARF), είναι υπεύθυνη για τη μειωμένη έκφραση τους στους ινοβλάστες στην ΙΠΙ [54, 55]. Η προσταγλανδίνη E2 έχει δειχθεί επίσης να αυξάνει την δραστηριότητα της DNMT3a, που οδηγεί σε υπερμεθυλίωση και αυξημένη έκφραση των γονιδίων που καταστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των πνευμονικών ινοβλαστών[56].

Σε μελέτη ανάλυσης του προτύπου μεθυλίωσης του DNA σε δείγματα πνευμονικού ιστού από 94 ασθενείς με ΙΠΙ και 67 μη πάσχοντες, καταγράφησαν 2130 περιοχές με διαφορετικό πρότυπο μεθυλίωσης, εκ των οποίων το 30% αφορούσε περιοχές που σχετίζονται με γονιδιακή έκφραση. Ανάμεσα σε αυτές τις διαφορετικά μεθυλιωμένες περιοχές του DNA βρισκόνταν γνωστά για την εμπλοκή τους στην ΙΠΙ γονίδια όπως τα TOLLIP, NOTCH1, HDAC4, PDGF, SERPINF1, κολλαγόνο. [57] Η ομάδα του ερευνητή Sanders, μελέτησε τα επίπεδα μεθυλίωσης ανάμεσα στην ΙΠΙ και σε υγιείς. Έδειξε διαφορετικά επίπεδα μεθυλίωσης στην ΙΠΙ καθώς και αυξημένα επίπεδα μεθυλτρανσφερασών. Ανάμεσα στα γονίδια που μελετήθηκαν, βρέθηκαν 16 γονίδια με αντίστροφη σχέση μεθυλίωσης του DNA και mRNA έκφρασης, υπονοώντας πιθανή ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μέσω μεθυλίωσης. Κάποια από τα οποία έχουν ήδη αναγνωρισμένο ρόλο στην ίνωση.[7] Οι Rabinovich et.al. μελετώντας το προφίλ μεθυλίωσης ανάμεσα σε υγιείς, ασθενείς με ΙΠΙ και ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα ανέδειξαν ένα ενδιάμεσο προφίλ μεθυλίωσης για την ΙΠΙ ανάμεσα στους υγιείς και

στους ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα. Είναι δε ιδιαίτερα ενδιαφέρον ότι παρατηρήθηκε αλληλεπικάλυψη σε 402 διαφορετικά μεθυλιωμένες νησίδες ανάμεσα σε ΙΠΙ και καρκίνο[58], θέτοντας ερωτήματα για πιθανά κοινά παθογενετικά μονοπάτια ή/και ρυθμιστικούς μηχανισμούς ανάμεσα στα δύο νοσήματα.

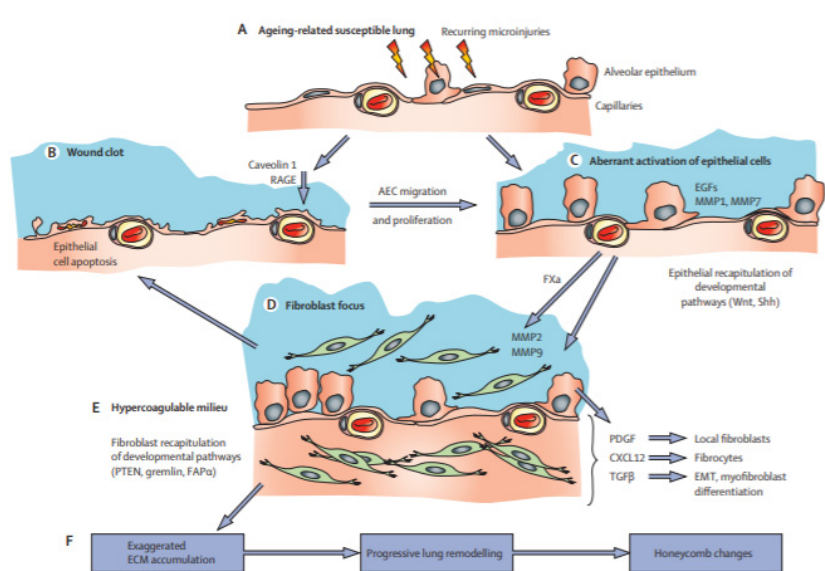
miRNAs

Αναφορικά με τα miRNAs υπάρχουν πλείστα δεδομένα που υποστηρίζουν τον ρυθμιστικό τους ρόλο στην ΙΠΙ. Σε πρόσφατες μελέτες έχει βρεθεί η έκφραση συγκεκριμένων miRNAs να διαφέρει στην ΙΠΙ. Ειδικότερα, τα miRNAs let-7d, mir-29 και mir-185 έχουν βρεθεί να υποεκφράζονται ενώ τα miR154, 155 και 21 να αυξάνονται[8, 59, 60]. Πρόσφατα δημοσιεύτηκε η μειωμένη έκφραση του Mir185 στην ΙΠΙ να ενεργοποιεί το AKT σηματοδοτικό μονοπάτι σε κυψελιδικά μακροφάγα[8]. Σε μοντέλο ποντικών το microRNA let-7d φάνηκε να κατέχει προστατευτικό ρόλο στην πνευμονική ίνωση μέσω αναστολής της διαδικασίας κατά την οποία τα επιθηλιακά κύτταρα λαμβάνουν χαρακτηρισες μεσεγχυματικών κυττάρων, μια διαδικασία που συμβάλλει στην διαδικασία της ίνωσης. Πιο συγκεκριμένα, η αναστολή του let-7d από ανταγωνιστικό micro RNA είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση των μεσεγχυματικών και την μείωση των επιθηλιακών δεικτών σε κυτταρικές σειρές κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων, ενισχύοντας έτσι την υπόθεση συμμετοχής του let-7d στην επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετατροπή. Επιπλέον, η επιμόλυνση ινοβλαστών με miR-154 προήγαγε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την μετανάστευση μέσω του WNT-μονοπατιού, θέτοντας το miR-154 ως ένα πιθανό θεραπευτικό στόχο[61]. Όμως και σε μοντέλο πνευμονικής ίνωσης με μπλεομυκίνη, ενδοφλέβια χορήγηση miR-29 φάνηκε να έχει ευεργετική επίδραση στους ινωτικούς πνεύμονες των ποντικών[59, 62]. Η οικογένεια του miR-29 έχει εκτενώς μελετηθεί καθώς έχει βρεθεί επίσης να υποεκφράζεται εκτός από την πνευμονική και στην νεφρική, την ηπατική αλλά και την ίνωση του μυοκαρδίου, ενώ είναι πολύ ενδιαφέρον το γεγονός ότι ανάμεσα στα μόρια στόχους του βρίσκονται το κολλαγόνο και ο TGF[63-66]. Αναφορικά με το miR-21, έχει φανεί να υπερεκφράζεται τόσο σε πειραματικά μοντέλα πνευμονικής ίνωσης όσο και σε πνεύμονες ασθενών με ΙΠΙ, ιδιαίτερα δε μέσα στις ινοβλαστικές εστίες. Αντίθετα, η φαρμακευτική καταστολή του οδήγησε σε εξασθένηση της ίνωσης σε μοντέλο μπλεομυκίνης μέσω καταστολής του TGF-b1.[67] Όσον αφορά στην ομάδα miR-17-92, έχει δειχθεί ότι υπόκεινται σε επιγενετική ρύθμιση. Έτσι η θεραπεία ποντικών με 5-AZA-δεοξυκυτιδίνη, έναν αντιμεθυλιωτικό παράγοντα, οδήγησε σε υπερέκφραση των miR-17-92, σε μείωση της έκφρασης της DNMT-1 και σε εξασθένηση της ίνωσης στον πνεύμονα[68]. Επιπρόσθετα, τα miRNAs έχουν μελετηθεί και σαν πιθανοί βιοδείκτες της νόσου. Ο Oak et al. εντόπισε μια ομάδα από miRNAs (miR-302c, miR-423, miR-210,

miR-376C, and miR-185) σε βιοψίες πνεύμονα ασθενών με ΙΠΙ με βάση τα οποία μπόρεσε να διακρίνει ασθενείς με βραδεία ή ταχεία εξέλιξη της νόσου τους [69].

A.3.2.8 ΣΥΝΝΟΣΗΡΟΤΗΤΕΣ

Οι συννοσηρότητες στους ασθενείς με ΙΠΙ είναι ιδιαίτερως συχνές. Είναι πιθανό να προϋπήρχαν της διάγνωσης ή μπορεί να εμφανιστούν στην πορεία του νοσήματος. Επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την ποιότητα ζωής, την συμμόρφωση στη θεραπεία και το προσδόκιμο επιβίωσης των ασθενών αν δεν γίνουν αντιληπτές και δεν αντιμετωπιστούν κατάλληλα. Οι πιο συνήθεις είναι η καρδιαγγειακή συννοσηρότητα (έως 60%), η γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση(0-94%), οι διαταραχές της αναπνοής στον ύπνο (60-90%), η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (6-67%), ο καρκίνος πνεύμονα (4,4-10%), η κατάθλιψη (11-50%) και σε ποικίλα ποσοστά ο σακχαρώδης διαβήτης, η οστεοπόρωση και η αδυναμία[70]. Επιπλέον των συννοσηροτήτων αυτών συχνά στην πορεία της νόσου εμφανίζονται επιπλοκές που σχετίζονται άμεσα ή έμμεσα με την νόσο όπως η πνευμονική υπέρταση, η πνευμονική εμβολή, οι λοιμώξεις και ο επίμονος βήχας. Κάποιες από τις επιπλοκές αυτές επιβαρύνουν την πρόγνωση και αποτελούν αιτία θανάτου για τους ασθενείς. Στο διαγνωστικό αλγόριθμο της νόσου κυρίαρχη θέση πρέπει να κατέχει η αναγνώριση και η αντιμετώπιση των συννοσηροτήτων[71].



ΕΙΚΟΝΑ 3. Παθοφυσιολογία της ΙΠΙ. (King. Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Lancet . ol 378 December 3, 2011)

A.3.2.9 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Η σύγχρονη θεώρηση για την παθογένεια της ΙΠΙ περιλαμβάνει έναν συνδυασμό γενετικής προδιάθεσης, παραγόντων που σχετίζονται με τη γήρανση (αλλαγές σε επίπεδο επιγενετικής, μη φυσιολογική βράχυνση των τελομερών και ανεπαρκή ικανότητα αναγέννησης των κυττάρων) και περιβαλλοντικών ερεθισμάτων τα οποία ενεργοποιούν την επιθηλιακή βλάβη. Αυτή οδηγεί σε έναν φαύλο κύκλο επαναλαμβανόμενου επιθηλιακού τραυματισμού, στρες, απόπτωσης και ενεργοποίησης μη φυσιολογικών διαδικασιών αποκατάστασης και εναπόθεση θεμέλιας ουσίας. Όλα τα παραπάνω προοδευτικά οδηγούν στην εγκατάσταση της ίνωσης. Πιθανά βλαπτικά ερεθίσματα αποτελούν η έκθεση στον καπνό του τσιγάρου, η γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση, οι ιογενείς λοιμώξεις, η έκθεση σε οργανικές και ανόργανες κόνεις και η περιβαλλοντική μόλυνση. Συνεπώς, η βλάβη των κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων τύπου I και η διάσπαση της επιθηλιακής στοιβάδας αποτελούν το εναρκτήριο γεγονός που θα ακολουθηθεί από την απελευθέρωση προ-ινωτικών κυτταροκινών (χυμοκίνες, πρωτεάσες, TGF-β). Μοιραία επέρχεται βλάβη και δυσλειτουργία και των κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων τύπου II, η αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας, η ενεργοποίηση πηκτικών μηχανισμών και διαδικασιών επούλωσης τραύματος. Σε μια μάταιη προσπάθεια αποκατάστασης τα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα ενεργοποιούνται κατά μη ομαλό τρόπο[29].

Μια σειρά από αυξητικούς παράγοντες, όπως ο ηπατοκυτταρικός αυξητικός παράγοντας, και μεταλλοπρωτεϊνάσες MMP1 και MMP7 συμμετέχουν σε αυτήν την διαδικασία ενεργοποίησης, πολλαπλασιασμού και μετανάστευσης των επιθηλιακών κυττάρων. Σε αυτήν τη φάση παράγονται επιπλέον αυξητικοί παράγοντες και χυμοκίνες, προσελκύνοντας ινοβλάστες και ινοκύτταρα (κύτταρα προγονικά των ινοβλαστών που προέρχονται από το μυελό των οστών) στις περιοχές που λαμβάνουν χώρα οι τραυματισμοί. Επιπρόσθετα, παράγουν TGF-β1 ο οποίος προάγει την επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετατροπή (EMT-epithelial to mesenchymal transition) και την διαφοροποίηση των ινοβλαστών σε μυοϊνοβλάστες. Όλα αυτά τα κύτταρα, δηλαδή τα ινοκύτταρα, τα τοπικά μεσεγχυματικά κύτταρα και οι μυοϊνοβλάστες συμμετέχουν στον σχηματισμό των ινοβλαστικών εστιών. Μεταλλοπρωτεϊνάσες της θεμέλιας ουσίας όπως οι MMP2 και MMP9 συνεισφέρουν στην ενεργοποίηση του TGFβ και στην καταστροφή των βασικών μεμβρανών. Η σύγχρονη ενεργοποίηση παραγόντων της πήξης δημιουργεί ένα προ-πηκτικό περιβάλλον που εμποδίζει την αποδόμηση της θεμέλιας ουσίας και προάγει την ίνωση. Στις ινοβλαστικές εστίες παράγονται μεγάλες ποσότητες πρωτεϊνών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, κυρίως κολλαγόνο ενώ μέσω παραγωγής ουσιών όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου και άλλων προάγεται η απόπτωση του επιθηλίου. Συνέπεια των παραπάνω διαδικασιών προκαλείται αναδιαμόρφωση της αρχιτεκτονικής του πνεύμονα και δημιουργούνται κύστεις δίκην μελικυρήθρας μέσω μηχανικών δυνάμεων οι οποίες ασκούνται[29, 32].

Επιθηλιακή ενεργοποίηση και βλάβη

Παρά το γεγονός ότι τα επιθηλιακά κύτταρα υφίσταται βλάβη και διαδικασίες απόπτωσης, στους πνεύμονες ασθενών με ΙΠΙ παρατηρείται αυξημένος αριθμός υπερπλαστικών και υπερτροφικών επιθηλιακών κυττάρων τύπου II. Παράλληλα, μεγάλα και επιμήκη, παραμορφωμένα επιθηλιακά κύτταρα παρατηρούνται. Στις περιοχές καταστροφής του παρεγχύματος δίκην μελικυρήθρας παρατηρείται βρογχιολιοποίηση του επιθηλίου και πλακώδη μεταπλασία. Σε αυτή τη φάση τα επιθηλιακά κύτταρα είναι ιδιαιτέρως ενεργά, γεγονός που τα οδηγεί σε μια παθολογική διαδικασία αποκατάστασης η οποία παραδόξως παραμένει ενεργή παρά την απουσία εμφανούς βλαπτικού ερεθίσματος[32, 33].

Την παράδοση αυτή συμπεριφορά των επιθηλιακών κυττάρων και των ινοβλαστών πιθανόν να ερμηνεύει η απορρύθμιση βασικών, εμβρυϊκής καταγωγής παθοφυσιολογικών μονοπατιών. Η οικογένεια των WNT γλυκοπρωτεϊνών αποτελεί κλασικό παράδειγμα. Μελέτες έχουν δείξει ότι το κυψελιδικό επιθήλιο και οι ινοβλάστες των ασθενών με ΙΠΙ υπερεκφράζουν μέλη του WNT μονοπατιού. Επιπλέον υπάρχει έντονη πυρηνική κατανομή β-κατενίνης στα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα

και στους ινοβλάστες στην ΙΠΙ, γεγονός που περαιτέρω υποστηρίζει την ενεργοποίηση του μονοπατιού WNT-b-catenin και στα δύο είδη κυττάρων[29].

Το PTEN (Phosphatase and tensin homologue) είναι το κεντρικό μόριο μονοπατιού που συμμετέχει στην ρύθμιση φυσιολογικών διεργασιών όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η πολικότητα και η απόπτωση. Στους ασθενείς με ΙΠΙ το PTEN υποεκφράζεται στους μυοϊνοβλάστες εντός των ινοβλαστικών εστιών γεγονός που σχετίζεται με την αντίσταση στην απόπτωση που τους χαρακτηρίζει. Η αλληλεπίδραση β1-ιντεγκρίνης και κολλαγόνου στους φυσιολογικούς ινοβλάστες ενεργοποιεί το PTEN, μηχανισμός όμως που στην ΙΠΙ φαίνεται να είναι ελαττωματικός. Αντίθετα, στη νόσο παρατηρείται υπερέκφραση του Sonic hedgehog (Shh) ασκώντας έτσι αντιαποπτωτική δράση. Οι πρωτεΐνες μορφοποίησης των οστών ανήκουν στην οικογένεια του TGFβ, με γνωστό ρόλο στην εμβρυική ανάπτυξη. Η γκρεμλίνη, ένας ανταγωνιστής αυτών των πρωτεϊνών είναι αυξημένη στους ινοβλάστες της ΙΠΙ μειώνοντας τα επίπεδα φωσφορυλίωσης, οδηγώντας έτσι σε ενίσχυση της επιθηλιακής προς μεσεγχυματικής μετατροπής και μείωση της απόπτωσης των μυοϊνοβλαστών. Ανακεφαλαιώνοντας, η μη φυσιολογική λειτουργία κάποιων αναπτυξιακών μονοπατιών φαίνεται να συμμετέχει ενεργά στην παθογένεια της νόσου. Η υπερέκφραση των Wnt, Shh, και γκρεμλίνης και η υποέκφραση του PTEN συνεισφέρουν στην ελαττωματική διαδικασία επούλωσης[32].

Προ-ινωτικές επιδράσεις της παθολογικής ενεργοποίησης των κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων.

Η ενεργοποίηση του καταρράκτη της πήξης στην ΙΠΙ κατέχει προ-ινωτική δράση. Το σύμπλεγμα ιστικού παράγοντα-παράγοντα VIIIa-παράγοντα X αθροίζεται στο κυψελιδικό επιθήλιο, επιτρέποντας την ενεργοποίηση του παράγοντα X, ο οποίος ενεργοποιεί ινοβλάστες. Η θρομβίνη και ο ενεργοποιημένος παράγοντας X προάγουν την ενεργοποίηση των ινοβλαστών σε μυοϊνοβλάστες. Συνεπώς, στην ΙΠΙ επικρατεί μια προ-θρομβωτική κατάσταση η οποία σε συνδυασμό με την προβληματική ινοδολυτική διαδικασία στις κυψελίδες, προάγει την ινωτική διεργασία.

Στις ινοβλαστικές εστίες οι ινοβλάστες και οι μυοϊνοβλάστες παράγουν τεράστιες ποσότητες εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας που αποτελεί το θεμέλιο λίθο της ινωτικής διαδικασίας. Η ακριβής προέλευση των ινοβλαστών και των μυοϊνοβλαστών καθώς και ο λόγος που συναθροίζονται σε εστίες δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί.

Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι τα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα αποτελούν την πηγή μεσολαβητών (PDGF, TGFβ, TNFα και ενδοθηλίνη) που δρουν χημειοτακτικά για τα μεσεγχυματικά κύτταρα. Στους πνεύμονες ασθενών με ΙΠΙ παρατηρείται είσοδος

ινοκυττάρων από την κυκλοφορία, τα οποία εκφράζουν αιμοποιητικούς και μεσεγχυματικούς δείκτες. Τα περισσότερα από τα κυκλοφορούντα ινοκύτταρα εκφράζουν τον υποδοχέα χυμοκινών CXCR4, υποδεικνύοντας ότι ο άξονας CXCR4–CXCL12 είναι σημαντικός για την μετακίνηση κυττάρων στον ινωτικό πνεύμονα. Επιπρόσθετα το ίδιο το επιθήλιο πιθανά συνεισφέρει στην επέκταση του πληθυσμού των ινοβλαστών και των μυοϊνοβλαστών μέσω της επιθηλιακής προς μεσεγχυματικής μετατροπής. Η διαδικασία αυτή παρέχει στα κύτταρα την ικανότητα να συνθέτουν θεμέλια ουσία. Η συνύπαρξη επιθηλιακών και μεσεγχυματικών δεικτών στα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα στην ΙΠΙ και η έκφραση τυπικών επιθηλιακών πρωτεϊνών σε ινοβλάστες, υποστηρίζουν την παραπάνω υπόθεση. Επιγραμματικά, τοπικά μεσεγχυματικά κύτταρα, κυκλοφορούντα ινοκύτταρα και η επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετατροπή συμμετέχουν στην συνάθροιση ινοβλαστών και μυοϊνοβλαστών. Η ακριβής συνεισφορά του κάθε πληθυσμού δεν είναι γνωστή[29, 32].

Διαφοροποίηση των ινοβλαστών σε μυοϊνοβλάστες.

Τρεις είναι οι παράγοντες που οδηγούν αυτή τη διαφοροποίηση. Το υψηλό μηχανικό στρες, η τοπική αύξηση TGF-β1(κυρίως από τα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα) και η παρουσία ειδικών πρωτεϊνών της θεμέλιας ουσίας. Οι μυοϊνοβλάστες προκαλούν υπερβολική παραγωγή εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και συμβάλλουν στην διάρρηξη της ακεραιότητας της βασικής μεμβράνης και στον θάνατο των επιθηλιακών κυττάρων. Κατά την φυσιολογική διαδικασία της επούλωσης, οι μυοϊνοβλάστες αποπίπτουν ,γεγονός που δεν συμβαίνει στην ΙΠΙ. Ο TGF-β1 και η ενδοθηλίνη προάγουν αυτή την αντίσταση στην απόπτωση κυρίως μέσω του PI3K/AKT μονοπατιού. Στο ερώτημα γιατί τα επιθηλιακά αποπίπτουν ενώ οι ινοβλάστες όχι στο ίδιο περιβάλλον, η απάντηση πιθανόν να βρίσκεται στην ανεπάρκεια της προσταγλανδίνης E2 που παρατηρείται στην ΙΠΙ και η αυξάνει την ευαισθησία στην απόπτωση για τα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα ενώ ταυτόχρονα την μειώνει για τους ινοβλάστες[29].

Ο ρόλος των κυψελιδικών μακροφάγων

Πολλά δεδομένα έρχονται στο φως τα τελευταία χρόνια που υποστηρίζουν την εμπλοκή των κυψελιδικών μακροφάγων στην ΙΠΙ. Τα κυψελιδικά μακροφάγα αποκτώντας ένα εναλλακτικά ενεργοποιημένο φαινότυπο συμμετέχουν ενεργά στην διαδικασία της ίνωσης. Παράγουν μεσολαβητές οι οποίοι σχετίζονται με την επιβίωση των μυοϊνοβλαστών, την ενεργοποίηση των επιθηλιακών και την επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετατροπή(όπως CCL18, IL13, TGF-β και ο αυξητικός παράγοντας που ομοιάζει με την ινσουλίνη). Επιπλέον εκφράζουν microRNAs με γνωστή προ-ινωτική δράση[72].

A.3.2.10 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΒΡΟΓΧΟΚΥΨΕΛΙΔΙΚΟΥ ΕΚΠΛΥΜΑΤΟΣ ΣΤΗΝ ΙΠΙ

Η βρογχοκυψελιδική έκπλυση, αναφέρεται στη λήψη και ανάλυση του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (Bronchoalveolar lavage, BAL), είναι μια ασφαλής επεμβατική μέθοδος που χρησιμοποιείται στη διαγνωστική διερεύνηση και στην έρευνα νοσημάτων του πνεύμονα. Οι κλινικές ενδείξεις για τη διενέργεια της εξέτασης αυτής είναι πολλές και συνεχώς διευρύνονται. Πιο συγκεκριμένα η βρογχοκυψελιδική έκπλυση αποτελεί μέρος της διαγνωστικής διαδικασίας σε νοσήματα όπως η σαρκοείδωση, η εξωγενής αλλεργική κυψελιδίτιδα, οι τοξικές επιδράσεις φαρμάκων, η ΙΠΙ, η κυψελιδική πρωτεϊνωση, η πνευμονική συμμετοχή νοσημάτων του συνδετικού ιστού, η ιστοκυττάρωση Langerhans, οι λοιμώξεις, η κυψελιδική αιμορραγία, η ηωσινοφιλική πνευμονία, η αποφρακτική βρογχολίτιδα με οργανούμενη πνευμονία και οι λοιμώξεις σε ανοσοκατεσταλμένους. Πάντα γίνεται συναξιολόγηση των ευρημάτων του BALF, των πληροφοριών από το ιστορικό και των κλινικο-εργαστηριακών ευρημάτων.

Η λήψη του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (BAL, Bronchoalveolar lavage) γίνεται με το εύκαμπτο βρογχοσκόπιο μετά από ενσφήνωση αυτού σε κατάλληλο υποτμηματικό βρόγχο και έγχυση ακολουθούμενη από επαναρρόφηση προκαθορισμένης ποσότητας φυσιολογικού ορού (120-200ml). Στην περίπτωση που η κατανομή των βλαβών είναι αμφοτερόπλευρη, συστήνεται η λήψη από το μέσο λοβό ή τη γλωσσίδα. Αντίστοιχα, η παρουσία εντοπισμένων βλαβών κατευθύνει τη λήψη του υλικού από την επηρεασμένη πνευμονική περιοχή. Κατά τα διάφορα στάδια της επεξεργασίας του το δείγμα διηθείται, γίνεται μέτρηση των κυττάρων και φυγοκεντρείται. Πάντα αξιολογείται η μακροσκοπική του εμφάνιση, μετράται ο αριθμός κυττάρων ανά ml υγρού και υπολογίζεται ο ολικός αριθμός κυττάρων. Μετά την επίστρωση και τη μονιμοποίηση, γίνεται επεξεργασία με ειδικές χρώσεις και προσδιορίζονται οι κυτταρικοί τύποι (κυψελιδικά μακροφάγα, λεμφοκύτταρα, ουδετερόφιλα, επιθηλιακά κύτταρα). Με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων και την κατάλληλη τεχνική υπάρχει δυνατότητα να μελετηθούν οι κυτταρικοί υποπληθυσμοί (προσδιορισμός ανοσοφαινοτύπων) του δείγματος. Ακόμη, το δείγμα προετοιμάζεται κατάλληλα όταν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν νεότερες τεχνικές, όπως η κυτταρομετρία ροής, η οποία τυγχάνει ευρύτατης εφαρμογής στη σύγχρονη διαφοροδιαγνωστική διαδικασία των νοσημάτων του διάμεσου χώρου.

Η ποσοστιαία αναλογία των κυττάρων του BALF σε υγιείς μη καπνιστές είναι κατά μέσο όρο: κυψελιδικά μακροφάγα (80–90%), λεμφοκύτταρα (5–15%), λίγα ουδετερόφιλα (3%) και ηωσινόφιλα (1%). Η παρουσία πλακωδών επιθηλιακών κυττάρων δηλώνει μη ικανοποιητική τεχνική κατά την λήψη του δείγματος. Τα δείγματα BALF από καπνιστές χαρακτηρίζονται από αυξημένη κυτταροβρίθεια και ειδικότερα από αυξημένα ποσοστά μακροφάγων και λεμφοκυττάρων. Χαρακτηριστική είναι η απεικόνιση των μακροφάγων στους καπνιστές αφού στο κυτταρόπλασμα τους παρατηρούνται χρωματισμένα κοκκία. Στο BALF ηλικιωμένων ασθενών παρατηρούνται ελαφρά αυξημένα ποσοστά λεμφοκυττάρων και ουδετεροφίλων, ενώ ο όγκος επιστροφής κατά την έκπλυση είναι μειωμένος λόγω των τροποποιημένων μηχανικών ιδιοτήτων του πνεύμονα (αυξημένη ενδοτικότητα).

Αναφορικά με την ΙΠΙ, ο ρόλος του BAL είναι προσανατολισμένος στο να μειώσει το εύρος της διαφορικής διάγνωσης ιδιαίτερα στις περιπτώσεις εκείνες που το ιστορικό του ασθενούς ή/και η HRCT δεν είναι απόλυτα διαγνωστικά για τη νόσο. Συνεπώς η διενέργεια του BAL συμβάλλει στον αποκλεισμό λοιμώξεων ή άλλων διάχυτων διάμεσων πνευμονοπαθειών και συνυπάρχουσας κακοήθειας. Τυπικά στην ΙΠΙ παρατηρούνται αυξημένα ποσοστά ουτεροφίλων ή/και ηωσινοφίλων [73].

A.3.3 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Νεόπλασμα ορίζεται ο εκτός ελέγχου πολλαπλασιασμός κυττάρων, διαδικασία η οποία αποκλίνει από την ανάπτυξη των παρακείμενων φυσιολογικών ιστών και η οποία εξακολουθεί παρά την παύση του αιτιολογικού παράγοντα που αρχικά τον προκάλεσε. Χαρακτηριστικό γνώρισμα ενός κακοήθους νεοπλασματος αποτελούν η διηθητικότητα, η μεταστατικότητα και η απώλεια της δομικής διαφοροποίησης των κυττάρων.

Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί μια από τις πλέον συνήθεις αιτίες θανάτου από κακοήθεια παγκοσμίως. Η συχνότητα θανάτου από καρκίνο πνεύμονα υπερβαίνει αυτή που οφείλεται στον καρκίνο του παχέος εντέρου, του μαστού και του παγκρέατος συνολικά. Αναφέρονται περίπου δύο εκατομμύρια νέες περιπτώσεις καρκίνου πνεύμονα και 1,7 εκατομμύρια θάνατοι σχετιζόμενοι με τον καρκίνο πνεύμονα για το 2015[74]. Για το 2018 στις ΗΠΑ τα νέα περιστατικά υπολογίζονται στα 234.000 ενώ οι αναμενόμενοι θάνατοι 154.000[75]. Η πρόγνωση είναι ιδιαιτέρως πτωχή. Περίπου το 50% των ασθενών που διαγιγνώσκονται πεθαίνει εντός ενός έτους ενώ η πενταετής επιβίωση δεν ξεπερνάει το 18%.

Ο καρκίνος του πνεύμονα παρουσίασε εκρηκτική αύξηση στην συχνότητα του στις πρώτες δεκαετίες του προηγούμενου αιώνα, κατά την βιομηχανική επανάσταση. Η αύξηση του προσδόκιμου επιβίωσης, η αλλαγή στις περιβαλλοντικές συνθήκες και η εξάπλωση της καπνιστικής συνήθειας συνετέλεσαν επίσης.

Οι προ-καρκινικές εστίες ξεκινούν από επιθηλιακά κυρίως κύτταρα του βρογχικού δέντρου ή των κυψελίδων. Ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός των κυττάρων οφείλεται σε μεταλλάξεις γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Ακολουθούν οι μορφολογικές διαφοροποιήσεις και τελικά η καρκινική εξαλλαγή. Η παραγωγή μεσολαβητών προάγει την νεοαγγειογένεση, δημιουργώντας έτσι κατάλληλες συνθήκες για την επέκταση του όγκου αρχικά τοπικά και αργότερα σε απομακρυσμένες εστίες (μετάσταση)[76].

Ιστολογικά διακρίνονται δύο μεγάλες κατηγορίες καρκίνου πνεύμονα. Ο μικροκυτταρικός (SCLC) και μη μικροκυτταρικός τύπος (NSCLC). Η παθολογοανατομική ταξινόμηση του καρκίνου πνεύμονα διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην διαγνωστική προσέγγιση αλλά κυρίως στην πρόγνωση των ασθενών με καρκίνο πνεύμονα καθώς κάθε τύπος τείνει να ανταποκρίνεται διαφορετικά στις διάφορες διαθέσιμες θεραπείες. Ο κατά το δυνατόν ακριβέστερος παθολογοανατομικός χαρακτηρισμός της βλάβης είναι ζητούμενο και προαπαιτούμενο για την έναρξη των θεραπευτικών παρεμβάσεων.

Ο μικροκυτταρικός τύπος καρκίνου πνεύμονα αφορά το 15% περίπου των περιπτώσεων. Σχεδόν κατά αποκλειστικότητα παρατηρείται σε ασθενείς με

βεβαρημένο ιστορικό καπνιστικής συνήθειας. Χαρακτηριστική είναι η έντονη τάση του να μεθίσταται νωρίς και αυτός είναι ο λόγος που συνήθως διαγιγνώσκεται ήδη σε προχωρημένο στάδιο. Ωστόσο, ανταποκρίνεται θετικά στην χημειοθεραπεία αρχικά τουλάχιστον στους περισσότερους ασθενείς.

Ο μη μικροκυτταρικός τύπος αφορά στον 90% των περιπτώσεων και περιλαμβάνει επιμέρους υπότυπους με διακριτά παθολογοανατομικά και κυτταρολογικά χαρακτηριστικά. Οι πιο συνήθεις από αυτές αναλύονται παρακάτω.

Το πλακώδες καρκίνωμα (40% όλων των καρκίνων πνεύμονα) σχετίζεται ισχυρά με το κάπνισμα και εξορμάται από τα πλακώδη κύτταρα που βρίσκονται στους βρόγχους.

Το αδenoκαρκίνωμα πνεύμονα, η άλλη μεγάλη κατηγορία (40% των συνολικών καρκίνων πνεύμονα) εξορμάται από βλεννοπαραγωγά κύτταρα. Είναι ο πλέον συνήθης τύπος σε μη καπνιστές ασθενείς και αυτός είναι ο λόγος που εμφανίζεται πιο συχνά στις γυναίκες και σε άτομα μικρότερης ηλικίας. Συνήθως εμφανίζεται στην περιφέρεια του πνεύμονα. Σχετίζεται με την ενεργοποίηση γονιδίων που ελέγχουν την κυτταρική ανάπτυξη όπως τα KRAS και EGFR. Έτσι, η θεραπευτική προσέγγιση του έχει προσανατολιστεί στην στοχευμένη αντιμετώπιση με βάση το γονιδιακό προφίλ του ασθενούς.

Το μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα αφορά το 5%-10% των περιπτώσεων ΚΠ και χαρακτηρίζεται από ταχεία εξάπλωση δυσχεραίνοντας έτσι την θεραπευτική αντιμετώπιση του.

Σε μικρότερη συχνότητα απαντώνται οι υπόλοιπες κατηγορίες. Αυτές περιλαμβάνουν τις προδιηθητικές βλάβες, το αδenoπλακώδες καρκίνωμα, το σαρκωματοειδές καρκίνωμα, τους καρκινοειδής όγκοι, και τα καρκινώματα του τύπου των σιελογόνων αδένων.

A.3.3.1 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

Κάπνισμα

Ισχυρή και επαρκώς τεκμηριωμένη είναι η συσχέτιση του ΚΠ και της καπνιστικής συνήθειας. Μετά την καθιέρωση της καπνιστικής συνήθειας, ακολούθησε η εμφάνιση του ΚΠ με απόκλιση περίπου 20 ετών. Σήμερα γνωρίζουμε ότι ευθύνεται για το 85% των

περιπτώσεων καρκίνου πνεύμονα. Ο καπνός του τσιγάρου περιέχει περίπου 60 γνωστές καρκινογόνες ουσίες όπως το ραδόνιο, η νιτροζαμίνη και το βενζοπυρένιο. Αυτά τα μεταβολικά ενεργά καρκινογόνα αλληλεπιδρούν με το DNA δημιουργώντας ομοιοπολικούς δεσμούς γεγονός που οδηγεί στην συσσώρευση σωματικών μεταλλάξεων σε κρίσιμης σημασίας γονίδια όπως ογκογονίδια, ογκοκατασταλτικά ή άλλα γονίδια που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο[77]. Ο εκτός ελέγχου πολλαπλασιασμός των κυττάρων και η σταδιακή ανάπτυξη του όγκου είναι η κατάληξη. Οι επιγενετικές τροποποιήσεις που συμβαίνουν όπως η μεθυλίωση στους προμότερες γονιδίων και η δράση των miRNAs επίσης ελέγχουν την έκφραση γονιδίων-κλειδιών και θεωρούνται σήμερα βασικοί μηχανισμοί της καρκινογένεσης σχετιζόμενοι με το κάπνισμα. Όσον αφορά στο ρόλο της νικοτίνης, σήμερα γνωρίζουμε ότι κρύβεται πίσω από τον μηχανισμό ανάπτυξης εξάρτησης στην καπνιστική συνήθεια αλλά η ίδια δεν εμπλέκεται σε μηχανισμούς καρκινογένεσης. Ενδιαφέρον είναι και το εύρημα ότι ακόμα και οι παθητικοί καπνιστές διατρέχουν σταθερά αυξημένο κίνδυνο να νοσήσουν της τάξης του 20%[77].

Γήρανση

Γήρανση είναι η αναπόφευκτη προϊόντος του χρόνου έκπτωση της φυσιολογικής λειτουργικότητας των οργάνων και θεωρείται επίσημα παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη νεοπλασιών. Σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας το προσδόκιμο ζωής υπερβαίνει τα 80 έτη παγκοσμίως και η επίπτωση των κακοήθων νοσημάτων τείνει να αυξάνεται καθώς ο πληθυσμός γηράσκει. Ο καρκίνος του πνεύμονα ακολουθεί την ίδια πορεία ενώ η σωρευτική επίδραση καρκινογόνων ερεθισμάτων όπως το κάπνισμα συνεισφέρει σε αυτό. Φαινομενικά ο καρκίνος και η γήρανση αποτελούν εκ διαμέτρου αντίθετες διαδικασίες ωστόσο μία πιο σε βάθος προσέγγιση αποκαλύπτει κοινούς υποκείμενους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς που τους συνδέουν, όπως η συσσώρευση κυτταρικών βλαβών, η γενωμική αστάθεια, η βράχυνση των τελομερών, οι επιγενετικές τροποποιήσεις, η απώλεια της πρωτεόστασης, η μειωμένη θρεπτική αναζήτηση, οι μεταβολές στον μεταβολισμό αλλά και η έκπτωση της λειτουργίας των αρχέγονων κυττάρων.

Περιβάλλον

Πέρα από τον καπνό του τσιγάρου, πλείστοι άλλοι παράγοντες που βρίσκονται στο περιβάλλον έχουν ενοχοποιηθεί για την σχέση τους με τον καρκίνου του πνεύμονα. Μερικοί από αυτούς είναι ο αμίαντος, το αρσενικό, το χρώμιο, το νικέλιο, το ραδόνιο, το ουράνιο, οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, η ατμοσφαιρική ρύπανση εσωτερικού χώρου και η ιονίζουσα ακτινοβολία. Επαγγελματικοί χώροι όπως βιομηχανίες, ναυπηγεία, ορυχεία και ακτινολογικά εργαστήρια αποτελούν σημεία με

δυναμικά αυξημένες συγκεντρώσεις και πρέπει να λαμβάνονται μέτρα εκτίμησης της επιβάρυνσης και πρόληψης[74].

A.3.3.2 ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

Αρχικά η συμπτωματολογία της νόσου μπορεί να είναι τόσο αμβληχρή και να διαλάθει της προσοχής του ασθενούς με συνέπεια την καθυστέρηση της ιατρικής παρέμβασης. Η συμπτωματολογία δύναται να είναι αποτέλεσμα της πρωτοπαθούς βλάβης, της μεταστατικής νόσου ή και συνέπεια παρανεοπλασματικών συνδρόμων. Τα συνηθέστερα συμπτώματα είναι ο επίμονος βήχας που διαρκεί πάνω από ένα μήνα, η δύσπνοια, η αυξημένη απόχρεμψη, τα αιμόφυρτα πτύελα ή η αιμόπτυση, η απώλεια βάρους, η ανορεξία, η θωρακαλγία, το βράγχος φωνής, η πληκτροδακτυλία, τα οστικά άλγη, το σύνδρομο άνω κοίλης φλέβας, το σύνδρομο Horner και η νευρολογική σημειολογία που συνήθως υποκρύπτει εγκεφαλικές μεταστάσεις[76].

Τα παρανεοπλασματικά σύνδρομα είναι ιδιαίτερα συχνά στον ιστολογικό τύπο του SCLC και πολλές φορές μπορεί να αποτελούν την πρώτη εκδήλωση της νόσου. Έχουν συσχετιστεί με έκκριση πεπτιδίων και ορμονών από τον όγκο και από την παθολογική ανοσιακή απάντηση έναντι των καρκινικών κυττάρων. Σε αυτά περιλαμβάνονται ηλεκτρολυτικές διαταραχές όπως υπερασβεστιαμία και υπονατρίαμία (λόγω του συνδρόμου απρόσφορης έκκρισης αντιδιουρητικής ορμόνης), σύνδρομο Lambert-Eaton, το σύνδρομο Cushing, κακόηθες καρκινοειδές σύνδρομο, δερματομυοσίτιδα, μελανίζουσα ακάνθωση, υπογλυκαιμία και υπερτροφική πνευμονική οστεοαρθροπάθεια[78].

A.3.3.3 ΟΜΟΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΙΠΙ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Ο καρκίνος πνεύμονα αποτελεί μια συχνή συννοσηρότητα ανάμεσα στις ιδιοπαθείς διάμεσες πνευμονοπάθειες με την μεγαλύτερη επίπτωση εμφάνισης να παρατηρείται στην ΙΠΙ. Ο καρκίνος πνεύμονα και η ΙΠΙ, δύο νοσήματα με πτωχό προσδόκιμο επιβίωσης, έχουν ακόμα πιο δυσοίωνη εξέλιξη όταν συνυπάρχουν στον ίδιο ασθενή. Περίπου ένας στους δέκα ασθενείς με ΙΠΙ εμφανίζουν καρκίνο πνεύμονα ενώ η αθροιστική επίπτωση του ΚΠ υπολογίζεται στο 82% μετά από τρία έτη παρακολούθησης ασθενών με ΙΠΙ. Παλαιότερα θεωρείτο ότι ο ΚΠ προϋπήρχε της ΙΠΙ

και συνέβαλε στην ανάπτυξη ίνωσης. Σήμερα ωστόσο η κυρίαρχη άποψη είναι ότι ο ΚΠ εμφανίζεται δεύτερος, συνήθως μετά από τρία έτη από την ανάπτυξη της ΙΠΙ[5].

Αναζητώντας κανείς τις αιτίες αυτής της φαινομενικά παράδοξης συνύπαρξης διαπιστώνει κοινούς παράγοντες κινδύνου για τα δύο νοσήματα. Ο καπνός του τσιγάρου, η περιβαλλοντική ρύπανση, οι ιογενείς λοιμώξεις, η γήρανση και οι ρύποι στο επαγγελματικό περιβάλλον είναι οι κυριότεροι.

Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων ο ΚΠ εμφανίζεται ως οζόμορφη βλάβη στις περιοχές πέριξ της ίνωσης, συνήθως στα κατώτερα πνευμονικά πεδία όπου κυριαρχούν και οι ινωτικές βλάβες. Υπάρχουν μελέτες που αμφισβητούν αυτήν την ευθεία τοπογραφική συσχέτιση της ίνωσης και του ΚΠ και προφανώς υπάρχει ανάγκη για περισσότερη έρευνα προκειμένου να αποδειχθεί αν υπάρχει όντως αιτιολογική συσχέτιση για αυτή την γειτνίαση ή είναι απλά μια στατιστική παρατήρηση[31]. Ο ιστολογικός τύπος του πλακώδους καρκινώματος φαίνεται να είναι ο πλέον συχνός ανάμεσα στους ασθενείς με ΙΠΙ ακολουθούμενος από το αδενοκαρκίνωμα με μικρή διαφορά[31].

Κοινά παθογενετικά μονοπάτια ανάμεσα στην ΙΠΙ και τον ΚΠ.

Ολοένα και περισσότερα στοιχεία έρχονται στο φως για να ισχυροποιήσουν την θεωρία των κοινών παθογενετικών χαρακτηριστικών ανάμεσα στα δύο νοσήματα. Είναι χαρακτηριστικό ότι φάρμακα με αντι-καρκινική δράση όπως το nintedanib έχουν επίσης αντι-ινωτική δράση πυροδοτώντας έτσι το ενδιαφέρον για έρευνα σε αυτό το πεδίο. Η εμφάνιση προκαρκινωματώδων αλλοιώσεων πέριξ της ίνωσης όπως η πλακώδης μεταπλασία και η κοινή ανατομική κατανομή των βλαβών επίσης υπονοούν κοινές υποβόσκουσες διεργασίες. Οι ινοβλάστες στην ΙΠΙ παρουσιάζουν ομοιότητες συγκρινόμενοι με τα καρκινικά κύτταρα όπως ο ενισχυμένος κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η απώλεια της πρωτεόστασης, η ανοσολογική αποδιοργάνωση, οι διεργασίες της γήρανσης, η βράχυνση των τελομερών και άλλα. Επιπλέον, η επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετατροπή, μια διαδικασία εκτενώς μελετημένη στην καρκινογένεση καθώς ενισχύει τον διεισδυτικό χαρακτήρα των καρκινικών κυττάρων, έχει δειχθεί να έχει κεντρικό ρόλο και στην ινογένεση αποτελώντας πηγή μυοϊνοβλαστών[2, 5, 31].

Γενετική

Πέραν από τις ομοιότητες που εύκολα γίνονται αντιληπτές σε επίπεδο επιδημιολογίας και απεικόνισης, χρειάζεται να εμβαθύνει κανείς σε επίπεδο γενετικής για να ανακαλύψει πλήθος μηχανισμών που έχουν αναφερθεί να εμπλέκονται στα δύο νοσήματα. Μερικοί από αυτούς τους μηχανισμούς είναι η μικρο-δορυφορική αστάθεια, η απώλεια της ετεροζυγωτίας, μεταλλάξεις σε γονίδια όπως τα p53, SFTPA2, SFTPC, FHIT, EGFR και KRAS, μονο-νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί, ανεπάρκεια των τελομερασών και παθολογική βράχυνση των τελομερών. Πιο συγκεκριμένα, στην ΙΠΙ παρατηρείται μειωμένη έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν δύο υποομάδες (h-TERT and h-TERC) των τελομερασών με συνέπεια την βράχυνση των τελομερών. Οι φορείς αυτών των μεταλλάξεων έχουν πιο πολλές πιθανότητες να αναπτύξουν ΙΠΙ. Επίσης το μήκος των τελομερών σε λευκά αιμοσφαίρια του περιφερικού αίματος αντιπροσωπεύει έναν ισχυρό ανεξάρτητο παράγοντα θνητότητας στη ΙΠΙ. Στον δε ΚΠ, η μεταβολή στο μήκος των τελομερών έχει συσχετιστεί με την μεταστατική ικανότητα [79].

Επιγενετική

Οι επιγενετικές τροποποιήσεις μεταβάλλουν καθοριστικά την πληροφορία που φέρουν τα γονίδια υπό την επίδραση περιβαλλοντικών ερεθισμάτων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το κάπνισμα το οποίο έχει βρεθεί να επιδρά επιγενετικά στο βρογχικό επιθήλιο. Οι μεθυλίωση του DNA, οι τροποποιήσεις των ιστονών και τα miRNAs είναι οι τρεις κύριες κατηγορίες των επιγενετικών τροποποιήσεων. Έχουν πλέον συσχετιστεί με πλειάδα ασθενειών και αποτελούν πεδίο έντονου ερευνητικού ενδιαφέροντος. Οι νεοπλασίες ήταν η πρώτη ομάδα ασθενειών στις οποίες μελετήθηκαν εκτενώς οι επιγενετικές επιδράσεις. Τα miRNAs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση καθώς ελέγχουν την έκφραση πρωτεϊνών είτε μέσω ρύθμισης της μετάφρασης των αγγελιοφόρων RNA είτε μέσω αποδόμησης τους. Το miR-21 υπερεκφράζεται στον ΚΠ και έχει βρεθεί να επιδρά προγνωστικά στην επιβίωση των ασθενών. Αναφορικά με την ΙΠΙ, τα miRNAs αποτελούν τμήμα του μοριακού προφίλ της νόσου. Είναι εντυπωσιακό το γεγονός ότι στην ΙΠΙ τα εκφραζόμενα miRNAs διαφέρουν συγκριτικά με τους υγιείς σε ποσοστό 10%. Τα miRNAs miR-21 και μέλη των οικογενειών miR-29, miR-154 και let-74 έχουν βρεθεί να εμπλέκονται σε διαδικασίες με τελική κατάληξη την εναπόθεση εξωκυττάριας θεμέλιας

ουσίας, ενώ πρόσφατα και τα miR-185 και miR-21 βρέθηκαν να υποεκφράζονται στην ΙΠΙ, ομοίως με τον καρκίνο[80].

Τα μέλη της οικογένειας του miR-29 συμμετέχουν ενεργά στην ινογένεση καθώς στοχεύουν μόρια κλειδιά όπως το κολλαγόνο και η έκφρασή τους αναστέλλεται από τον TGFβ. Και το let-7d υποεκφράζεται στους ινωτικούς πνεύμονες αυξάνοντας την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα HMGA2, ο οποίος αποτελεί ρυθμιστικό παράγοντα για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και το EMT μέσω των σηματοδοτικών μονοπατιών TGFβ-SMAD.

Ο ιός Merkel cell polyomavirus (MCPyV), σχετίζεται με υπερμεθυλίωση του RASSF1A στο SCLC. Επίσης σε ασθενείς με NSCLC, θετικοί για MCPyV, διαπιστώθηκε απορρύθμιση των BRAF και Bcl-2 γονιδίων. Τα miR-21, miR-376c και miR-145 μελετώνται σε ασθενείς με MMKP MCPyV θετικούς καθώς και η αντίστοιχη έκφραση των γονιδίων-στόχων τους, σε μια προσπάθεια να εντοπιστούν διαφοροποιήσεις μεταξύ MCPyV θετικών και αρνητικών δειγμάτων MMKP[5].

Η μεθυλίωση του DNA, θεμελιώδης επιγενετικός μηχανισμός, αποτελεί σημαντικό μηχανισμό εμπλεκόμενο στην ΙΠΙ. Σε μελέτη ανάμεσα σε ΙΠΙ, ΚΠ και υγιείς μάρτυρες ταυτοποιήθηκε για την ΙΠΙ ενδιάμεσο προφίλ DNA μεθυλίωσης ανάμεσα στον ΚΠ και τους μάρτυρες. Σε άλλη μελέτη ολικής μεθυλίωσης του DNA, συνδυασμένη με ολική γονιδιακή έκφραση από δείγματα ΙΠΙ και υγιών μαρτύρων βρέθηκε ότι η μεθυλίωση του DNA αλλά και τα προφίλ της γονιδιακής έκφρασης διαφέρουν στην ΙΠΙ, ενώ και τα επίπεδα έκφρασης των DNA μεθυλτρανσφερασών Dnmt-3a και Dnmt-3b, ήταν αυξημένα στα δείγματα με ΙΠΙ, υποστηρίζοντας επιπλέον το ρόλο της μεθυλίωσης του DNA στην ΙΠΙ[7, 58]. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα ρύθμισης μέσω τροποποιημένης μεθυλίωσης αποτελεί η υπερμεθυλίωση του Thy-1 και η ακόλουθη μείωση της έκφρασης του, η οποία σχετίζεται με περισσότερο επιθετική συμπεριφορά στον καρκίνο και με ενισχυμένη τάση διαφοροποίησης ινοβλαστών σε μυοϊνοβλάστες στην ΙΠΙ. Επίσης και τα γονίδια CDKN2A/p14ARF και SHOX2 εκπροσωπούν παραδείγματα γονιδίων οι προμότερες των οποίων έχουν βρεθεί υπερμεθυλιωμένοι τόσο στην ΙΠΙ όσο και στον ΚΠ.

Οι τροποποιήσεις των ιστονών επίσης έχουν εμπλακεί τόσο στην παθογένεια και των δύο νοσημάτων. Η υπερέκφραση των CDKN1A/ p21waf1/cip1 και Fas έχει τεκμηριωθεί τόσο στην ΙΠΙ όσο και στον ΚΠ. Επιπλέον, απομεθυλάσες και αναστολείς αποακετυλασών των ιστονών έχουν χρησιμοποιηθεί θεραπευτικά στον ΚΠ, πλέον δοκιμάζονται θεραπευτικά και στην ΙΠΙ.

Επικοινωνία ανάμεσα στα κύτταρα και σηματοδοτικά μονοπάτια.

Κεντρικό ρόλο στην παθογένεια των δύο νοσημάτων διαδραματίζουν η μηχανισμοί επικοινωνίας ανάμεσα στα κύτταρα και σημαντικά σηματοδοτικά μονοπάτια. Οι κονεξίνες, διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που μεσολαβούν στην επικοινωνία των κυττάρων και ειδικότερα η κονεξίνη 43 (Cx43) έχει βρεθεί να υποεκφράζεται τόσο στον ΚΠ όσο και στην ΙΠΙ. Το κεντρικής σημασίας στην ογκολογία σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/AKT, όπως και το PTEN, έχουν αμφότερα ισχυρά συσχετιστεί με την παθογενετική διαδικασία της πνευμονικής ίνωσης. Μια ισομορφή του PI3K βρέθηκε πρόσφατα αυξημένη τόσο σε δείγματα πνευμονικού ιστού από ΙΠΙ όσο σε ex vivo κυτταρικές σειρές ινοβλαστών, και συνεπώς η φαρμακευτική αναστολή του θα μπορούσε να αποτελέσει δυνητικό φαρμακευτικό στόχο. Το γνωστό για την εμπλοκή του στον καρκίνο μονοπάτι Wnt/ β -catenin, συμμετέχει και στην ΙΠΙ καθώς έχει βρεθεί αυξημένη πυρηνική εναπόθεση της β -κατενίνης σε πνευμονικό ιστό από ασθενείς με ΙΠΙ. Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη WNT1-inducible signaling protein-1 (WISP1) είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής της υπερπλασίας των κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων τύπου II.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

B.1 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η ανίχνευση κοινών αλλά και χαρακτηριστικών που διαφοροποιούν την ΙΠΙ και τον ΚΠ αποτελούν αντικείμενο εντατικής έρευνας. Η επιγενετική και ειδικότερα η διαφοροποίηση στην έκφραση γονιδίων που προκαλούνται από τροποποιήσεις στην μεθυλίωση του DNA και τον ρυθμιστικό ρόλο των miRNAs εμπλέκονται ενεργά στην παθογένεια και των δύο νοσημάτων.

Η μελέτη της έκφρασης μορίων με σημαντικό ρόλο στην επιγενετική ρύθμιση και γνωστή από την πρόσφατη βιβλιογραφία, συμμετοχή στους παθογενετικούς μηχανισμούς τόσο της ΙΠΙ όσο και του ΚΠ, είναι δελεαστική. Η σύγκριση της έκφρασης τους στα δύο νοσήματα σε δείγματα βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος, η ανίχνευση πιθανών συσχετίσεων μεταξύ τους αλλά και με κλινικά, λειτουργικά, παθολογοανατομικά αλλά και βρογχοσκοπικά χαρακτηριστικά αποτέλεσε τον κεντρικό σκοπό της μελέτης.

Αρχικά, μελετήθηκαν συγκριτικά τα επίπεδα των miR-29a και miR-185, τα οποία είναι γνωστό ότι υποεκφράζονται στον καρκίνο ενώ πρόσφατα βρέθηκαν μειωμένα και σε δείγματα βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος ασθενών με ΙΠΙ. Μετέπειτα σκοπός της μελέτης αποτέλεσε η μελέτη της έκφρασης μορίων-κοινών στόχων των δύο αυτών miRNAs. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η έκφραση των DNMT1 και DNMT3b, οι οποίες είναι DNA-μεθυλτρανσφεράσες, τα ένζυμα που διεξάγουν την μεθυλίωση του DNA. Επίσης μελετήθηκε η έκφραση των AKT1 και AKT2, μόρια με συμμετοχή στα μονοπάτια ρύθμισης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, καθώς και του col1a1, μόριο με κεντρικό ρόλο στην διαδικασία της ινογένεσης. Επιπλέον στόχο αποτέλεσε η ανεύρεση πιθανών συσχετίσεων μεταξύ αυτών των miRNAs αλλά και των μορίων στόχων τους. Επίσης μελετήθηκαν πιθανές συσχετίσεις με τα κλινικά, λειτουργικά (σπιρομετρικά), παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών. Επιπρόσθετα, διερευνήθηκαν πιθανές συσχετίσεις των σημαντικών αυτών μορίων με δεδομένα που προέκυψαν από την βρογχοσκοπική εκτίμηση της υποομάδας των ασθενών με ΚΠ. Ειδικότερα, αξιολογήθηκε η ύπαρξη θετικής κυτταρολογικής εξέτασης του BAL για κακοήθη κύτταρα καθώς και η διενέργεια του BAL από ομόπλευρα ή αντίπλευρα της βλάβης όπως αυτή απεικονίζεται στην αξονική θώρακος.

B.2 ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Ο πληθυσμός της μελέτης περιελάμβανε συνολικά 89 ασθενείς. Από αυτούς οι 32 ήταν ασθενείς με ΚΠ και οι 57 με ΙΠΙ. Στο σύνολο τους οι ασθενείς προέρχονταν από την πανεπιστημιακή πνευμονολογική κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης (ΠΑΓΝΗ) και τα δείγματα συγκεντρώθηκαν από τον Δεκέμβριο του 2013 έως τον Ιούλιο του 2017.

Οι ασθενείς με ΙΠΙ υποβλήθηκαν σε πλήρη λειτουργικό έλεγχο του αναπνευστικού συστήματος (σπιρομέτρηση, μέτρηση στατικών όγκων και διαχυτικής ικανότητας) σε διάστημα λιγότερο του ενός μηνός από την διενέργεια της αξονικής θώρακος. Η σπιρομέτρηση, η εκτίμηση των στατικών όγκων μέσω της τεχνικής διαλύσεως του Ηλίου (He) και της διαχυτικής ικανότητας μέσω της τεχνικής μονής αναπνοής έγιναν σε μηχανογραφημένο σύστημα (Jaeger 2.12;MasterLab, Wurzburg, Germany). Οι προβλεπόμενες τιμές καθορίστηκαν με βάση διεθνείς τυποποιημένες τιμές για τις λειτουργικές δοκιμασίες(European Coal and Steel Community, Luxembourg 1993). Οι τιμές FEV₁, FVC και DLCO (διορθωμένη για την αιμοσφαιρίνη) εκφράστηκαν σε ποσοστά των προβλεπόμενων φυσιολογικών τιμών. Η διάγνωση της ΙΠΙ βασίστηκε είτε σε ανοικτή βιοψία πνεύμονα είτε σε βιντεο-καθοδηγούμενη θωρακοσκοπική βιοψία πνεύμονα είτε με βάση τα διεθνή διαγνωστικά κριτήρια των ATS/ERS και την συνεπικουρική χρήση της αξονικής τομογραφίας υψηλής ευκρίνειας[81]. Με βάση τα παραπάνω κριτήρια, κάθε γνωστή αιτία πνευμονικής ίνωσης όπως π.χ νοσήματα του συνδετικού ιστού, αποκλείστηκαν με τη χρήση ανοσολογικού ελέγχου και κλινικής εκτίμησης από ειδικό ρευματολόγο. Όλοι οι ασθενείς με ΙΠΙ ήταν πρόσφατα διεγνωσμένοι και δεν είχαν λάβει θεραπεία σχετιζόμενη με τη νόσο.

Ομάδα ασθενών με ΚΠ: Η διάγνωση των ασθενών με ΚΠ και η εξακρίβωση του ιστολογικού προτύπου έγινε με βιοψία πνεύμονα που ελήφθη μέσω βρογχοσκόπησης, βιοψίας καθοδηγούμενης από αξονικό τομογράφο ή μέσω ανοικτής βιοψίας πνεύμονα. Όλοι οι ασθενείς αυτής της ομάδας δεν είχαν λάβει προηγουμένως χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία ή ανοσοθεραπεία. Η διαγνωστική τους διαχείριση και σταδιοποίηση έγινε με βάση τα διεθνή κριτήρια για την μελέτη του ΚΠ[82]. Η ομάδα του ΚΠ ταξινομήθηκε σε υποομάδες με βάση τα ευρήματα κατά τη διάρκεια της βρογχοσκόπησης και την επακόλουθη κυτταρολογική εξέταση του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος. Πιο συγκεκριμένα, οι ασθενείς με ΚΠ χωρίστηκαν ανάλογα με την πλευρά

του βρογχικού δέντρου στην οποία διενεργήθηκε το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα σε σχέση με την πλευρά της κακοήθους βλάβης όπως αυτή απεικονιζόταν στην αξονική θώρακος, ως υποομάδα «ίδια πλευρά» (SS=same side) και ως υποομάδα «αντίθετη πλευρά» (OS=opposite side). Ο διαχωρισμός αυτός έγινε όπου ήταν εφικτός καθώς οι ασθενείς με λεμφαδενοπάθεια μεσοθωρακίου δεν μπορούσαν να καταχωρηθούν σε κάποια από τις δύο ομάδες. Επιπλέον, οι ασθενείς διαχωρίστηκαν σε δύο ομάδες με κριτήριο την παρουσία ή όχι κακοήθων κυττάρων στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα κατά την κυτταρολογική εξέταση, ως «αρνητική κυτταρολογική» (NC=negative cytology) και «θετική κυτταρολογική» (PC=positive cytology) αντίστοιχα. Υπήρχε και τρίτη εναλλακτική για το αποτέλεσμα της κυτταρολογικής ως αποτέλεσμα «ύποπτο για κακοήθεια». Τέλος, οι ασθενείς διαχωρίστηκαν και με βάση την παρουσία ή όχι ενδοβρογχικής βλάβης όπως αυτή εκτιμήθηκε από τον επεμβατικό πνευμονολόγο που διενήργησε την βρογχοσκόπηση ως «εμφανής ενδοβρογχική βλάβη» (OEL=obvious endobronchial lesion) και «χωρίς ενδοβρογχική βλάβη» (NOEL= no obvious endobronchial lesion). Τα αποτελέσματα του λειτουργικού ελέγχου του αναπνευστικού συστήματος για τους ασθενείς με ΚΠ δεν συμπεριελήφθησαν στη μελέτη.

Απομόνωση κυττάρων του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος και καθορισμός του κυτταρικού πληθυσμού.

Η λήψη του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος έγινε μετά από ενσφήνωση στο δεξιό μέσο λοβό και αφού ακολουθήθηκε η διαδικασία με βάση τις διεθνείς οδηγίες για τη λήψη του[8]. Τα κύτταρα (1-1.5 εκατομμύριο) ομογενοποιήθηκαν σε TriReagent™ (MBL) για ανάλυση του ολικού RNA και ακολούθησε αποθήκευση σε συνθήκες -80°C. Η εκτίμηση των κυτταρικών πληθυσμών έγινε με τη χρήση της χρώσης May-Grunwald Giemsa μετά από την επεξεργασία σε φυγόκεντρο (cytospin)[8].

Ανάλυση της έκφρασης των microRNA και mRNA.

Ολικό RNA απομονώθηκε χρησιμοποιώντας την mirVana™ miRNA τεχνική (Ambion;Thermo Fischer Scientific,Inc.,Waltham ,MA, USA). Για την ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των microRNAs, χρησιμοποιήθηκαν 10ng ολικού RNA σε αντίστροφη μεταγραφάση και ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) με τη χρήση της TaqMan™ microRNA τεχνικής (Life Tecchnologies;Thermo Fischer Scientific,Inc.) και 7500 ταχείας Real-Time RCR τεχνικής (Applied Biosystems;Thermo Fischer Scientific, Inc.). Για την ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων, 500ng ολικού RNA επεξεργάστηκαν με DNFree (Ambion;Thermo Fischer Scientific,Inc.) για την απομάκρυνση γενωμικής επιμόλυνσης που ακολουθήθηκε από σύνθεση πρώτου κλώνουcDNA χρησιμοποιώντας την MaximaRT™(Fermentas;Thermo Fischer Scientific,Inc.) και Qpcr ανάλυση χρησιμοποιώντας την Maxima SYBR-Green qPCRmix

(Fermentas;Thermo Fischer Scientific,Inc.) σε Mx3005P Qpcr σύστημα (Agilent Technologiew,Inc., Santa Clara, CA, USA). Οι αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν ως «probes» και «primer» φαίνονται στην πίνακα II. Τα επίπεδα του RNU19 χρησιμοποιήθηκαν ως ενδογενής ρυθμιστές για την κανονικοποίηση της έκφρασης των επιπέδων micro RNA στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα. Τα επίπεδα του GAPDH χρησιμοποιήθηκαν σαν ενδογενείς ρυθμιστές για την κανονικοποίηση των επιπέδων mRNA στα δείγματα βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος. Οι σχετικές τιμές έκφρασης ανά δείγμα για κάθε microRNA ή mRNA υπολογίστηκαν με την $2^{-\Delta\Delta Cq}$ μέθοδο χρησιμοποιώντας ως βαθμονομητή το μέσο όρο των DCT τιμών.

Στατιστική ανάλυση.

Η ανάλυση των τιμών έκφρασης, των λειτουργικών δοκιμασιών και της εκατοστιαίας αναλογίας των κυττάρων έγινε με το Prism 6 λογισμικό. Οι συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων έγινε με την ανάλυση της διακύμανσης, του λογαριθμικού μετασχηματισμού και του Mann-Whitney τεστ. Τα Student's t-test, Wilcoxon rank-sum test, ή Chi-square τεστ χρησιμοποιήθηκαν επίσης για τις συγκρίσεις. Η τιμή $p < 0,05$ αξιολογήθηκε ως στατιστικά σημαντική.

Συγκατάθεση

Το πρωτόκολλο της μελέτης εγκρίθηκε από την επιτροπή ηθικής του πανεπιστημιακού νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης και οι ασθενείς, στο σύνολο τους έδωσαν έγγραφη συγκατάθεση για την συμμετοχή τους στη μελέτη.

B.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα επίπεδα των miR-29a και miR-185 είναι όμοια ανάμεσα στην ΙΠΙ και στον ΚΠ.

Τα επίπεδα έκφρασης των micro-RNAs σε δείγματα βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος μετρήθηκαν με την μέθοδο της RT-qPCR και για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το μικρό νουκλεοτιδικό RNA RNU19. Είναι γνωστό από προηγούμενη μελέτη ότι και τα δύο αυτά micro-RNAs υποεκφράζονται σημαντικά στην ΙΠΙ συγκριτικά με υγιείς μάρτυρες. Παρόμοια ευρήματα προέκυψαν και για τον ΚΠ καθώς η έκφραση τους δεν φάνηκε να διαφέρει ανάμεσα στα δύο νοσήματα (Εικόνα 4A και B). Τα επίπεδα έκφρασης των miR-29a και miR-185 φάνηκε να συσχετίζονται μεταξύ τους και στις δύο ομάδες ασθενών. (ΙΠΙ: Spearman's $R=0.81$, $P=6e^{-14}$ και ΚΠ: Spearman's $R=0.71$, $P=3.6e^{-5}$).

Ο άξονας DNMTs/AKT/miR-29a/miR-185 στην ΙΠΙ και στον ΚΠ.

Οι DNMT1 και DNMT3b είναι κοινοί στόχοι των miR-29a και miR-185 στην ΙΠΙ και στον ΚΠ. Τα επίπεδα του mRNA στα κύτταρα του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος εκτιμήθηκαν με την μέθοδο της RT-qPCR και η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε χρησιμοποιώντας το GAPDH. Τα επίπεδα της DNMT1 όπως αυτά είχαν παλαιότερα εκτιμηθεί στην ΙΠΙ, δεν είχαν φανεί να διαφέρουν συγκριτικά με τους υγιείς. Ωστόσο, τα επίπεδα της DNMT1 βρέθηκαν να είναι σημαντικά μειωμένα στον ΚΠ συγκριτικά με την ΙΠΙ (Εικόνα. 5A, πίνακας III). Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στα επίπεδα της DNMT3b ανάμεσα στα δύο νοσήματα (πίνακας III). Ομοίως δεν παρατηρήθηκε διαφοροποίηση στα επίπεδα των AKT1 και AKT2 ανάμεσα στην ΙΠΙ και τον ΚΠ (πίνακας III).

Η επίδραση του καρκινικού φορτίου στα επίπεδα της DNMT1 στα κύτταρα του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος συγκριτικά με την ΙΠΙ.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των ασθενών με ΙΠΙ με αυτά των ασθενών με ΚΠ αναλυτικότερα, παρατηρήθηκε περαιτέρω μείωση των επιπέδων της DNMT1 στα δείγματα στα οποία η διαδικασία του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος διενεργήθηκε στην πλευρά της βλάβης συγκριτικά με τα δείγματα όπου η διαδικασία έγινε στην αντίθετη πλευρά από τη βλάβη. Επιπλέον, τα δείγματα των ασθενών με ΚΠ που είχαν θετική κυτταρολογική εξέταση για κακοήθη κύτταρα στον βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα, είχαν πιο έντονη μείωση στα επίπεδα της DNMT1 συγκριτικά με τα δείγματα ΚΠ με

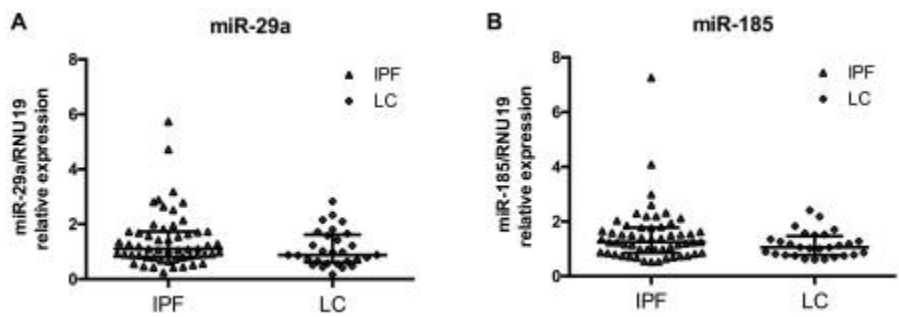
αρνητική κυτταρολογική εξέταση (εικ.5B). Αναφορικά με τον ιστολογικό τύπο των δειγμάτων του ΚΠ, η πλέον εμφανής μείωση στην DNMT1 συγκριτικά με την ΙΠΙ παρατηρήθηκε στα δείγματα με ΜΜΚΠ(μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα).

Ο άξονας COL1A1/miR-29a/miR-185 στην ΙΠΙ και στον ΚΠ.

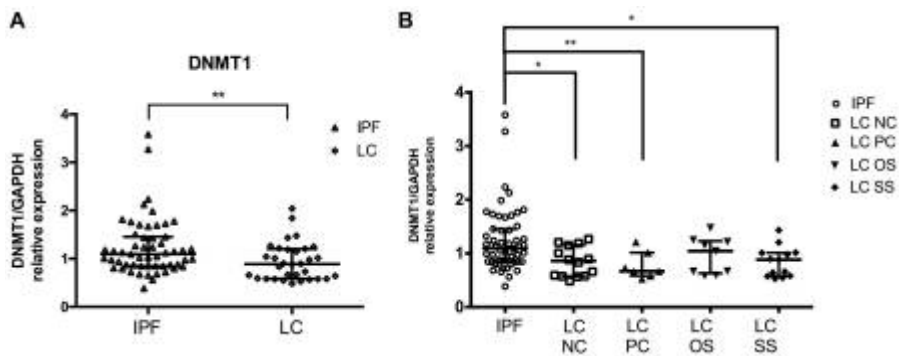
Παρακάτω μελετήθηκε το COL1A1, στόχος του miR-29a, με τη βοήθεια της RT-Qpcr μεθόδο, ενώ για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το GAPDH. Από προηγούμενα αποτελέσματα ήταν γνωστό ότι τα κύτταρα του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος στην ΙΠΙ εκφράζουν σημαντικά αυξημένα επίπεδα COL1A1 συγκριτικά με τους υγιείς. Στην παρούσα μελέτη, παρατηρήθηκαν σημαντικά μειωμένα επίπεδα COL1A1 Μγνα στον ΚΠ συγκριτικά με την ΙΠΙ (εικ.6A,πίνακας III).

Η επίδραση του καρκινικού φορτίου στα επίπεδα COL1A1 στα κύτταρα του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος συγκριτικά με την ΙΠΙ.

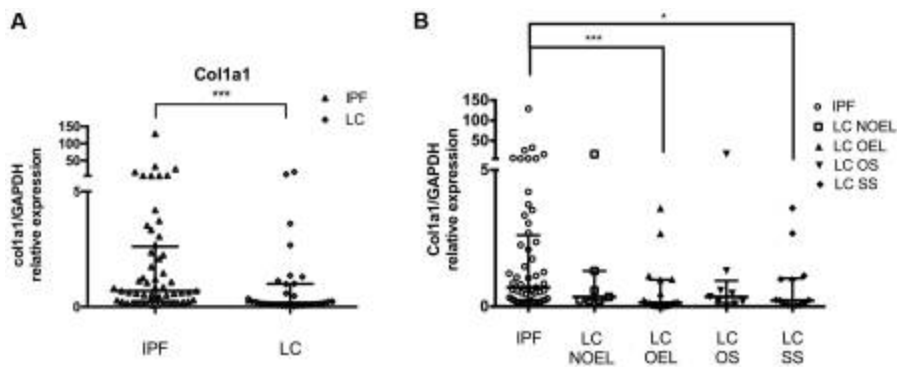
Τα Μγνα επίπεδα του COL1A1 παρατηρήθηκαν σημαντικά μειωμένα στους ασθενείς με ΚΠ συγκριτικά με την ΙΠΙ συνολικά. Ταξινομώντας τους ασθενείς με ΚΠ με βάση την πλευρά του βρογχικού δέντρου στην οποία έγινε το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα και συγκρίνοντας τους με τους ασθενείς με ΙΠΙ, παρατηρήθηκαν περαιτέρω μειωμένα επίπεδα COL1A1 στους ασθενείς με ΚΠ στις περιπτώσεις εκείνες που το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα έγινε στην ίδια πλευρά με αυτήν της βλάβης συγκριτικά με την αντίθετη πλευρά. Η παρουσία εμφανούς μακροσκοπικής βλάβης κατά τη διάρκεια της βρογχοσκόπησης συνδέθηκε με πιο έντονη μείωση των επιπέδων του COL1A1 σε σχέση με τις περιπτώσεις που δεν διαπιστώθηκε ενδοβρογχική βλάβη (εικ.6B,πίνακας III). Οι ασθενείς με ΚΠ και τον ιστολογικό τύπο ΜΚΠ (μικροκυτταρικού καρκίνου πνεύμονα)είχαν παρόμοια επίπεδα COL1A1 με τους ασθενείς με ΙΠΙ, σε αντίθεση με τους ασθενείς με ΜΜΚΠ οι οποίοι παρουσίαζαν μειωμένα επίπεδα.



ΕΙΚΟΝΑ 4. Τα επίπεδα των miR-29a(A) και miR-185(B) δεν διαφέρουν ανάμεσα στις ομάδες των ασθενών με ΙΠΙ και ΚΠ. Η κανονικοποίηση των δύο miRNAs έγινε με την χρήση του RNU19 σε κύτταρα BALF ασθενών με ΙΠΙ και ΚΠ όπως φαίνεται στο διάγραμμα σημείων από τις διάμεσες τιμές και τα διατεταρτημοριακά διαστήματα.



ΕΙΚΟΝΑ 5. Τα επίπεδα έκφρασης της DNMT1 στους ασθενείς με ΚΠ συγκριτικά με τους ασθενείς με ΙΠΙ. Τα επίπεδα mRNA της DNMT1 σε κύτταρα BALF όπως μετρήθηκαν με RT-qPCR και κανονικοποιήθηκαν με βάση το GAPDH στην ομάδα του ΚΠ (A) και στις υποομάδες του ΚΠ (B), NC, PC, OS, και SS, συγκριτικά με την ομάδα της ΙΠΙ. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Mann-Whitney τεστ). NC=αρνητική κυτταρολογική(negative cytology), PC=θετική κυτταρολογική (positive cytology), OS=BALF αντίπευρα από τη βλάβη (opposite side), SS=BALF από την πλευρά της βλάβης (same side).



ΕΙΚΟΝΑ 6. Τα επίπεδα του col1a1 στην ομάδα του ΚΠ συγκριτικά με την ομάδα της ΙΠΙ. Τα επίπεδα mRNA του col1a1 σε κύτταρα BALF όπως μετρήθηκαν με RT-qPCR και κανονικοποιήθηκαν με βάση το GAPDH στην ομάδα του ΚΠ (Α) και στις υποομάδες του ΚΠ (Β), NOEL, OEL, OS και SS συγκριτικά με την ομάδα της ΙΠΙ. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ (Mann-Whitney τεστ). NOEL=χωρίς εμφανή ενδοβρογχική βλάβη (no endobronchial lesion). OEL=με εμφανή ενδοβρογχική βλάβη (endobronchial lesion). OS=BALF αντίπλευρα από τη βλάβη (opposite side), SS=BALF από την πλευρά της βλάβης (same side).

Table I. Patient demographics.

Demographics	LC (32)	IPF (n=57)	P-value
Age	67.7 (\pm 11.9)	72 (\pm 7.3)	0.01
Sex (M/F)	26/6	46/11	NS
Pyrs	75 (47.5-100)	30 (6-45)	0.001
Non smoker/ smoker	2/26	13/43	NS
PFTs	LC	IPF	
FVC, %	ND	78.6 (\pm 17.6)	NA
FEV ₁ , %	ND	84.8 (\pm 19.3)	NA
FEV ₁ /FVC, %	ND	84.21 (79.8-89)	NA
TLC	ND	75.5 (62.1-83.4)	NA
TLCO/SB	ND	51.3 (\pm 16.8)	NA
KCO	ND	88 (\pm 23.7)	NA
BAL, %	LC	IPF	
Macrophages	86.2 (70.3-93.3)	80.38 (66-88)	NS
Lymphocytes	5.8 (3.6-11.1)	6.4 (3.5-12.7)	NS
Neutrophils	3 (1.3-6.3)	5.8 (2.4-12.9)	NS
Eosinophils	0 (0-1.5)	1.1 (0.4-2.6)	0.01

LC, lung cancer; IPF, idiopathic pulmonary fibrosis; M, male; F, female; PFTs, pulmonary function tests; FVC, forced vital capacity; FEV₁, forced expiratory volume in 1 sec; BAL, bronchoalveolar lavage; TLC, total lung capacity; KCO, transfer coefficient of carbon monoxide; NS, not significant; NA, not applicable.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ.

Table II. IDs of the TaqMan microRNA assays and primer sequences used for the quantification of microRNAs and mRNAs, respectively.

A,

MicroRNA assay name	MicroRNA assay ID
RNU19	001003
hsa-miR-185	002271
hsa-miR-29a	002112

B,

Gene name	Primer sequences
<i>GAPDH</i>	F: agccacatcgctcagaca R: ccaatacgaaccaatccgtt
<i>COL1A1</i>	F: gggattccctggacetaaag R: ggaacacctcgtctcca
<i>AKT1</i>	F: gcagcacgtgtacgagaaga R: ggtgtcagtctccgacgtg
<i>AKT2</i>	F: ctcacacagtcaccgagagc R: tgggtctggaaggcactt
<i>DNMT1</i>	F: ttctgatgaaaagacgaggat R: ttctccgttggttctttgg
<i>DNMT3b</i>	F: agaggacatctcagggttc R: gttgccccagaagtatcg

DNMT, DNA methyltransferase.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Αριθμοί αναγνώρισης των microRNAs και των εναρκτήριων αλληλουχιών που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης των microRNAs και των mRNAs αντίστοιχα.

Table III. microRNA and gene expression levels in IPIF and LC group and subgroups.

Variables	IPIF (n=56)		LC (n=32)		LC-SS (n=14)		LC-OS (n=9)		LC-NC (n=14)		LC-PC (n=7)		LC-OEL (n=19)		LC-NOEL (n=7)	
	Median (25-75%)	Median (25-75%)	Median (25-75%)	Median (25-75%)	Median (25-75%)	Median (25-75%)	Median (25-75%)	Median (25-75%)	Median (25-75%)	Median (25-75%)	Median (25-75%)	Median (25-75%)	Median (25-75%)	Median (25-75%)	Median (25-75%)	Median (25-75%)
miR-185	1.25 (0.85-1.78)	1.1 (0.77-1.47)	NS	1.05 (0.80-1.33)	NS	0.74 (0.62-1.37)	NS	1.05 (0.62-1.27)	NS	1 (0.77-1.71)	NS	1.06 (0.74-1.53)	NS	1.01 (0.62-1.17)	NS	NS
miR-29a	1.10 (0.80-1.73)	0.9 (0.61-1.62)	NS	0.93 (0.69-1.70)	NS	0.79 (0.47-1.30)	NS	0.88 (0.65-1.58)	NS	1.02 (0.72-2.16)	NS	0.87 (0.65-1.72)	NS	0.99 (0.51-1.21)	NS	NS
DNMT1	1.10 (0.85-1.45)	0.9 (0.58-1.20)	0.01	0.89 (0.58-1.06)	0.013	1.04 (0.63-1.23)	NS	0.86 (0.58-1.16)	0.009	0.67 (0.38-1.01)	0.007	1.01 (0.64-1.21)	NS	0.66 (0.59-1.25)	NS	NS
DNMT3b	1.03 (0.69-1.43)	1.0 (0.61-1.47)	NS	1.00 (0.70-1.61)	NS	0.82 (0.58-1.66)	NS	0.92 (0.62-1.61)	NS	1.15 (0.38-1.65)	NS	1.08 (0.70-1.65)	NS	0.66 (0.59-1.06)	NS	NS
AKT1	0.78 (0.53-1.22)	0.7 (0.41-1.15)	NS	0.69 (0.39-1.31)	NS	0.64 (0.47-1.22)	NS	0.72 (0.56-1.36)	NS	0.64 (0.24-0.97)	NS	0.67 (0.38-1.60)	NS	0.69 (0.56-0.88)	NS	NS
AKT2	0.96 (0.75-1.30)	0.94 (0.69-1.48)	NS	0.91 (0.60-1.37)	NS	1.11 (0.69-1.48)	NS	0.94 (0.74-1.51)	NS	0.89 (0.54-1.50)	NS	0.91 (0.65-1.50)	NS	1.11 (0.89-1.33)	NS	NS
COL1A1	0.70 (0.24-2.61)	0.19 (0.08-1.00)	0.001	0.22 (0.05-1.03)	0.017	0.35 (0.13-0.94)	NS	0.22 (0.11-0.78)	0.017	0.17 (0.04-0.98)	0.048	0.14 (0.05-0.98)	0.0005	0.35 (0.21-1.30)	NS	NS

P-value: Mann-Whitney test vs. IPIF; IPIF, idiopathic pulmonary fibrosis; LC, lung cancer; SS, same side; OS, opposite side; NC, negative cytology; PC, positive cytology; OEL, endobronchial lesion; NOEL, no endobronchial lesion; DNMT, DNA methyltransferase.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3. Επίπεδα έκφρασης των microRNAs και των γονιδίων στις ομάδες της ΙΠΙ και του ΚΠ και στις υποομάδες του ΚΠ.

B.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ΙΠΙ είναι μια χρόνια, προοδευτικά επιδεινούμενη διάμεση πνευμονία που συνεχίζει να σχετίζεται με υψηλή θνητότητα και θνησιμότητα παρά την πρόσφατη παρουσία των νέων αντι-ινωτικών θεραπευτικών παραγόντων[29].

Η ακριβής αιτία της νόσου παραμένει ακόμα άγνωστη, ωστόσο υπάρχει ισχυρή συσχέτιση με την γήρανση και το κάπνισμα, όπως συμβαίνει και στον καρκίνο πνεύμονα[45]. Το αθροιστικά αυξανόμενο φορτίο μεταλλάξεων, η επιγενετική απενεργοποίηση γονιδίων μέσω των παθολογικών προτύπων μεθυλίωσης του DNA και της δυσλειτουργίας των τελομερών, συνιστούν στοιχεία αυτού του πιθανού παθογενετικού συσχετισμού[5]. Μια πιο ενδελεχή μελέτη στην παθοφυσιολογία των δύο αυτών νοσημάτων, αποκαλύπτει αρκετές ομοιότητες και κοινά μονοπάτια να εμπλέκονται. Κυτταρικοί μηχανισμοί γνωστοί για την συμμετοχή τους στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στην αντίσταση στην απόπτωση και στην επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετατροπή, είναι ενεργοποιημένα τόσο στον καρκίνο όσο και στην πνευμονική ίνωση[2]. Προ-νεοπλασματικές βλάβες (ατυπίες, μεταπλασίες, δυσπλασίες), εστίες μικροδορυφορικής αστάθειας και απώλεια της ετεροζυγωτίας των γονιδίων που εμπλέκονται στην καρκινογένεση έχουν επίσης εντοπιστεί σε ιστούς πνευμονικής ίνωσης[83].

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ο ΚΠ είναι μια συχνή συννοσηρότητα στους ασθενείς με ΙΠΙ και παράγοντας καθοριστικός για την επιβίωση των ασθενών αυτών. Σύγχρονα δεδομένα υποστηρίζουν την υπόθεση ότι ο ΚΠ συμβαίνει δευτεροπαθώς στο έδαφος της ίνωσης. Στην πλειοψηφία των ασθενών, ο ΚΠ εμφανίζεται σαν οζόμορφη βλάβη περιφερικά των περιοχών της ίνωσης, κυρίως στα κατώτερα πνευμονικά πεδία, με το πλακώδες και το αδενοκαρκίνωμα να αποτελούν τους πλέον συχνούς ιστολογικούς τύπους[3].

Τα microRNAs έχουν αναδειχτεί ως ένας σημαντικός ρυθμιστής της γονιδιακής έκφρασης μέσω επιγενετικών και μετα-μεταφραστικών μηχανισμών. Μελέτες για το προφίλ των microRNAs στον ΚΠ προτείνουν διάφορα microRNAs σαν πιθανούς επιγενετικούς βιοδείκτες στην διαγνωστική διαδικασία. Παρομοίως, στην ΙΠΙ, αρκετά ογκο-miRNAs έχουν βρεθεί να έχουν τροποποιημένη έκφραση όπως η οικογένεια του miR-29[59]. Η συγκεκριμένη οικογένεια υποεκφράζεται στους ινωτικούς ιστούς και φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην δημιουργία της ίνωσης σε διάφορα όργανα όπως ο πνεύμονας, οι νεφροί και το ήπαρ[63]. Ανάμεσα στους στόχους του miR-29 είναι είδη κολλαγόνου, ένζυμα απαραίτητα για την σύνθεση του κολλαγόνου,

μεταλλοπρωτεΐνάσες και ένζυμα που συμμετέχουν στην μεθυλίωση του DNA όπως οι DNA-μεθυλτρανσφεράσες. Η οικογένεια του miR-29 μπορεί να αποτελέσει έναν αποτελεσματικό ρυθμιστή της καρκινογένεσης, στοχεύοντας πολλαπλά μονοπάτια που σχετίζονται με τον καρκίνο, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η απόπτωση, η ικανότητα για μετάσταση αλλά και επηρεάζοντας την επιγενετική και την ανοσολογική ρύθμιση[84].

Επιπρόσθετα, υπάρχουν δεδομένα ότι το miR-185 είναι ένα ογκο-miRNA με συχνά τροποποιημένη έκφραση τόσο στην ΙΠΙ όσο και στον ΚΠ[8]. Μειωμένη έκφραση του έχει δειχθεί σε ιστούς ασθενών με ΙΠΙ, αλλά και σε πολλές κακοήθειες όπως ο ΚΠ, το γλοιώμα, ο ηπατοκυτταρικός καρκίνος και ο καρκίνος του μαστού[80]. Η αυξημένη έκφραση του miR-185 αναστέλλει την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό στοχεύοντας απευθείας το AKT1 σε NSCLC, μέσω αναστολή της DNMT1, οδηγώντας σε αύξηση του PTEN και αναστολή της φωσφορυλίωσης του AKT[85].

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η έκφραση των miR-29 και miR-185 μειώνεται υπό την επίδραση του TGFβ και παρατηρείται αλληλεπικάλυψη στα μόρια στόχους των δύο αυτών miRNAs[8, 86, 87]. Υπάρχουν δεδομένα ότι το miR-185 ρυθμίζει είδη κολλαγόνου, ενώ το miR29a ρυθμίζει το AKT1 και το AKT2. Πρόσφατα βρέθηκε ότι και τα δύο αυτά microRNAs είναι μειωμένα σε κύτταρα βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος από ασθενείς με ΙΠΙ συγκριτικά με τους υγιείς[8].

Το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα είναι ελκυστικό, ελάχιστα επεμβατικό υλικό μελέτης των κυψελιδικών μακροφάγων και άλλων κυττάρων της ανοσίας καθώς και άλλων κυττάρων που πιθανόν να προέρχονται από παρακείμενες πνευμονικές βλάβες. Το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα μπορεί να θεωρηθεί ως ένα είδος υγρής βιοψίας για τον ΚΠ και πιθανά για την ΙΠΙ[88]

Αυτή η μελέτη εξετάζει την έκφραση των μειζόνων επιγενετικών μορίων, miR-29a και miR-185, και των κοινών τους στόχων DNMT1 και DNMT3b, οι οποίοι συμμετέχουν ενεργά στην διαδικασία της μεθυλίωσης του DNA. Η μειωμένη έκφραση των μορίων αυτών έχει ήδη συνδεθεί τόσο με την ΙΠΙ όσο και με τον ΚΠ. Οι δύο αυτές ασθένειες συχνά συνυπάρχουν και οι πιθανές συσχετίσεις ανάμεσα τους αποτελούν πεδίο εντατικής έρευνας. Κοινά παθογενετικά μονοπάτια φαίνεται ότι υπάρχουν, ενώ οι πιθανές θεραπευτικές προεκτάσεις έχουν συγκεντρώσει το ενδιαφέρον.

Τα βασικά μας ευρήματα ήταν: i) η παρόμοια έκφραση των miR-29a και miR-185 στα δείγματα βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος των ασθενών με ΙΠΙ και ΚΠ, ii) δεν βρέθηκε ευθεία συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση των miR-29a ή miR-185 και στα μόρια στόχους τους, ενώ τα μειωμένα επίπεδα DNMT1 ήταν χαρακτηριστικό της ομάδας του

ΚΠ και η αυξημένη έκφραση του col1a1 της ομάδας των ασθενών με ΙΠΙ και iii) το «φορτίο κακοήθειας» στα δείγματα βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος με βάση τα βρογχοσκοπικά και κυτταρολογικά χαρακτηριστικά, φαίνεται να επιδρά στην έκφραση τόσο της DNMT1 όσο και του col1a1, στην ομάδα του ΚΠ.

Όμοια επίπεδα των miR-29a και miR-185 ανιχνεύτηκαν ανάμεσα στην ΙΠΙ και τον ΚΠ σε δείγματα βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος, ενώ προηγούμενα ευρήματα υποστηρίζουν την μειωμένη έκφραση των miR-29a και miR-185 στους ασθενείς με ΙΠΙ συγκριτικά με υγιείς μάρτυρες[8]. Επίσης, από προηγούμενες μελέτες έχει δειχθεί η μειωμένη έκφραση των miR-29a και miR-185 σε δείγματα ιστών από ασθενείς με ΚΠ. Ωστόσο, αυτή η μελέτη είναι η πρώτη που ερευνά την έκφραση αυτών των miRNAs σε κύτταρα από δείγματα βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης υποστηρίζουν ότι το miR-185 παρουσιάζει με όμοιο τρόπο τροποποιημένο ρόλο και στα δύο νοσήματα όπως άλλωστε συμβαίνει και με άλλα miRNAs, όπως είναι το miR-29a. Επιπρόσθετα, η έκφραση των miR-29a και miR-185 παρουσίασε ισχυρή συσχέτιση μεταξύ τους και στα δύο νοσήματα, υπονοώντας έναν κοινό τρόπο ρύθμισης τους, ο οποίος πιθανόν να σχετίζεται με τα αυξημένα επίπεδα TGF-β που είναι γνωστό ότι παρατηρούνται στα κύτταρα του BALF και στα δύο νοσήματα. Η ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGF-β και η συσσώρευση πρωτεϊνών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας που παρατηρούνται στην ΙΠΙ και στον ΚΠ, επισημαίνουν έναν κοινό μοριακό μηχανισμό που σχετίζεται άμεσα και με τα miRNAs[16]. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι θεραπευτικές στρατηγικές που βασίζονται στα miRNAs είναι υπό μελέτη σε διάφορα κακοήθη νοσήματα και αυτό καθιστά επιτακτική την ανάγκη της ενδεδειγμένης μελέτης των ομοιοτήτων και των διαφορών ανάμεσα στις δύο αυτές ασθένειες με ιδιαίτερη έμφαση σε μόρια-κλειδιά που εμπλέκονται διάφορες θεμελιώδεις λειτουργίες των κυψελιδικών μακροφάγων[18].

Ορμώμενοι από τα παραπάνω δεδομένα, μελετήσαμε την έκφραση ενός κοινού μορίου στόχου των miR-29a και miR-185, του κολλαγόνου 1a (col1a1), το οποίο προάγεται από τον TGF-β και αποτελεί κεντρικό διαμεσολαβητή για την διαδικασία της ίνωσης, σε δείγματα ΚΠ συγκριτικά με την ΙΠΙ. Από προηγούμενα δεδομένα, είναι γνωστό ότι η μειωμένη έκφραση του miR-29a στην ΙΠΙ σχετίζεται με την υπερέκφραση του γονιδίου του COL1A1 σε κύτταρα BAL, επιβεβαιώνοντας τον ενεργό ρόλο του μονοπατιού miR-29a/COL1A1 στα κυψελιδικά μακροφάγα και στον ιστό, ενώ η έκφραση του COL1A1 στον ΚΠ δεν έχει επαρκώς μελετηθεί[8]. Το col1a1 πιθανά εμπλέκεται στην καρκινογένεση καθώς αυξημένη έκφραση του έχει βρεθεί σε αρκετές κακοήθειες όπως στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, σε ιστό μη μικροκυτταρικού καρκίνου πνεύμονα (NSCLC) και σε γαστρικές κακοήθειες[20]. Ωστόσο, τα αποτελέσματα μας έδειξαν σημαντικά αυξημένα επίπεδα COL1A1 στην ΙΠΙ συγκριτικά με τον ΚΠ σε κύτταρα BALF,

γεγονός που επιβεβαιώνει το χαρακτηριστικό ινωτικό προφίλ των κυττάρων του BALF στην ΙΠΙ και την απουσία αυτού στον ΚΠ. Τα περαιτέρω μειωμένα επίπεδα του COL1A1 που παρατηρήθηκαν σε σχέση με το φορτίο κακοήθειας του BALF δεν μπορούν να ερμηνευτούν με τα μέχρι τώρα δεδομένα και παρέχουν χώρο για περαιτέρω διερεύνηση του προφίλ των κυττάρων του BALF στον ΚΠ.

Ένα δεύτερο μονοπάτι που επηρεάζεται τόσο από το miR-29a αλλά και από το miR-185 είναι η έκφραση των DNA μεθυλτρανσφερασών (DNMTs). Μια σημαντική θεωρία σχετικά με την παθογένεση της ΙΠΙ αλλά και του ΚΠ που ανακτά συνεχώς έδαφος είναι ότι η παρουσία κοινών παραγόντων κινδύνου όπως η γήρανση, το κάπνισμα και περιβαλλοντικοί παράγοντες προάγουν την δημιουργία λαθών στην διαδικασία της μεθυλίωσης του DNA, δημιουργώντας παθολογικά πρότυπα μεθυλίωσης και επιταχύνοντας την διαδικασία γήρανσης του γονιδιώματος[23]. Το συνολικό προφίλ μεθυλίωσης στην ΙΠΙ, όπως αυτό έχει μελετηθεί σε πνευμονικό ιστό, φαίνεται να διαφέρει συγκριτικά με τους υγιείς ενώ περισσότερες ομοιότητες φαίνεται να έχει με δείγματα καρκίνου. Επιπλέον, αυξημένη έκφραση των DNMTs παρατηρήθηκε τόσο στον καρκίνο όσο και στην ΙΠΙ σε μελέτες που χρησιμοποιήθηκε πνευμονικός ιστός και τα ευρήματα αυτά συσχετίστηκαν με εστίες υπερμεθυλίωσης και απενεργοποίηση γονιδίων. Σε δείγματα βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος, τα mRNA επίπεδα της DNMT1 δεν διέφεραν στην ΙΠΙ συγκριτικά με τους υγιείς μάρτυρες. Στην παρούσα μελέτη, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των mRNA επιπέδων της DNMT1 σε δείγμα κυττάρων βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος από ΚΠ, ενώ για την DNMT3b τα επίπεδα δεν διέφεραν ανάμεσα στα δύο νοσήματα. Η DNMT1, σε αντίθεση με την DNMT3b, φαίνεται να δρα σε συνεργασία με μονοπάτια αποκατάστασης βλαβών του DNA, προκειμένου να διατηρηθεί η γενωμική σταθερότητα, ενώ τα μειωμένα επίπεδα DNMT1 προάγουν τη δημιουργία μεταλλάξεων, την μικροδορυφορική αστάθεια και χρωμοσωμικές μεταθέσεις[46]. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι τα δείγματα βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος που ελήφθησαν πλησίον της κακοήθους βλάβης ή είχαν θετική κυτταρολογική εξέταση για κακοήθη κύτταρα, παρουσίαζαν πιο έντονα μειωμένα επίπεδα DNMT1, υπονοώντας ότι η μείωση αυτή σχετίζεται με αυξημένο φορτίο κακοήθειας.

Ο ΚΠ είναι μια συχνή συννοσηρότητα ανάμεσα στους ασθενείς με ΙΠΙ με ρόλο καθοριστικό για την πρόγνωση των ασθενών. Η διαδικασία λήψης του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος είναι μια ελάχιστα επεμβατική μέθοδος που συμβάλλει στην ανάδειξη νέων, ειδικών για τη νόσο βιοδεικτών σχετικά με τον ΚΠ στους ασθενείς με ΙΠΙ. Τέτοιοι βιοδείκτες θα βρουν εφαρμογή για λόγους πρόληψης, πρόγνωσης, διάγνωσης και έγκυρης θεραπευτικής προσέγγισης και προσεγγίζουν την φιλόδοξη ιδέα της «υγρής» βιοψίας στον καρκίνο. Θα ήταν ιδιαίτερα ενδιαφέρον να

μελετηθεί το προφίλ έκφρασης των miR-29a και miR-185 και των στόχων τους σε ασθενείς που πάσχουν ταυτόχρονα και από τα δύο αυτά νοσήματα. Θεραπευτικά σχήματα που βασίζονται στα micro RNAs είναι ήδη υπό αξιολόγηση για την εφαρμογή τους σε διάφορα κακοήθη νοσήματα[18]. Συνεπώς, η ΙΠΙ θα μπορούσε αντίστοιχα να επωφεληθεί από την σε βάθος μελέτη των χαρακτηριστικών που μοιράζονται ή που διαφοροποιούν τα δύο αυτά νοσήματα, εστιάζοντας σε μόρια που εμπλέκονται σε ποικίλες λειτουργίες στα κυψελιδικά μακροφάγα.

B.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η έρευνα μέχρι τώρα έχει επικεντρωθεί σε δείγματα από ιστό ή από κυτταρικές σειρές, ωστόσο ο ρόλος του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος ως ένα ελάχιστα επεμβατικό εργαλείο μελέτης των κυψελιδικών μακροφάγων και της εμπλοκής τους στην παθογένεση συνεχώς ανακτά έδαφος. Στην ΙΠΙ τα κυψελιδικά μακροφάγα προερχόμενα από μονοκύτταρα που επιστρατεύονται στους «τραυματισμένους» πνεύμονες, συμμετέχουν ενεργά στην διαδικασία της ίνωσης. Η διαφοροποιημένη λειτουργία των κυψελιδικών μακροφάγων στον ΚΠ έχει τεκμηριωθεί υπό την επίδραση μεσολαβητών και προϊόντων υποξικής καταστροφής των ιστών. Η παρούσα μελέτη παρέχει δεδομένα για την παρόμοια λειτουργία των κυψελιδικών μακροφάγων στις δύο ομάδες καθώς έδειξε την ομοίως μειωμένη έκφραση των miR-29a και miR-185. Περαιτέρω μελέτη απαιτείται προκειμένου να αναδειχτούν βιοδείκτες από το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα για τους ασθενείς υψηλού κινδύνου και την ανάδειξη νέων θεραπευτικών στόχων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Richeldi, L., H.R. Collard, and M.G. Jones, *Idiopathic pulmonary fibrosis*. Lancet, 2017. **389**(10082): p. 1941-1952.
2. Vancheri, C., *Idiopathic pulmonary fibrosis and cancer: do they really look similar?* BMC Med, 2015. **13**: p. 220.
3. Tomassetti, S., et al., *The impact of lung cancer on survival of idiopathic pulmonary fibrosis*. Chest, 2015. **147**(1): p. 157-164.
4. Giopanou, I., K.A.M. Arendt, and G.T. Stathopoulos, *Lung carcinogenesis and fibrosis taken together: just coincidence?* Curr Opin Pulm Med, 2017. **23**(4): p. 290-297.
5. Antoniou, K.M., et al., *Idiopathic pulmonary fibrosis and lung cancer: a clinical and pathogenesis update*. Curr Opin Pulm Med, 2015. **21**(6): p. 626-33.
6. Duruisseaux, M. and M. Esteller, *Lung cancer epigenetics: From knowledge to applications*. Semin Cancer Biol, 2017.
7. Sanders, Y.Y., et al., *Altered DNA methylation profile in idiopathic pulmonary fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2012. **186**(6): p. 525-35.
8. Tsitoura, E., et al., *MiR-185/AKT and miR-29a/collagen 1a pathways are activated in IPF BAL cells*. Oncotarget, 2016. **7**(46): p. 74569-74581.
9. Mizuno, K., et al., *MicroRNAs in non-small cell lung cancer and idiopathic pulmonary fibrosis*. J Hum Genet, 2017. **62**(1): p. 57-65.
10. Gibbons, M.A., et al., *Ly6Chi monocytes direct alternatively activated profibrotic macrophage regulation of lung fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2011. **184**(5): p. 569-81.
11. Zhu, L., et al., *M2 macrophages induce EMT through the TGF-beta/Smad2 signaling pathway*. Cell Biol Int, 2017. **41**(9): p. 960-968.
12. Almatroodi, S.A., C.F. McDonald, and D.S. Pouniotis, *Alveolar Macrophage Polarisation in Lung Cancer*. Lung Cancer Int, 2014. **2014**: p. 721087.
13. Edin, S., et al., *The distribution of macrophages with a M1 or M2 phenotype in relation to prognosis and the molecular characteristics of colorectal cancer*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e47045.
14. Chen, Z., et al., *TGF-beta1, IL-6, and TNF-alpha in bronchoalveolar lavage fluid: useful markers for lung cancer?* Sci Rep, 2014. **4**: p. 5595.
15. Kumar, R.K., et al., *Epithelial cell-derived transforming growth factor-beta in bleomycin-induced pulmonary injury*. Int J Exp Pathol, 1996. **77**(3): p. 99-107.
16. 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.
17. Eser, P.O. and P.A. Janne, *TGFbeta pathway inhibition in the treatment of non-small cell lung cancer*. Pharmacol Ther, 2017.
18. Shah, M.Y., et al., *microRNA Therapeutics in Cancer - An Emerging Concept*. EBioMedicine, 2016. **12**: p. 34-42.

19. Hayashi, M., et al., *Identification of the collagen type 1 alpha 1 gene (COL1A1) as a candidate survival-related factor associated with hepatocellular carcinoma*. BMC Cancer, 2014. **14**: p. 108.
20. Oleksiewicz, U., et al., *COL1A1, PRPF40A, and UCP2 correlate with hypoxia markers in non-small cell lung cancer*. J Cancer Res Clin Oncol, 2017. **143**(7): p. 1133-1141.
21. Li, J., Y. Ding, and A. Li, *Identification of COL1A1 and COL1A2 as candidate prognostic factors in gastric cancer*. World J Surg Oncol, 2016. **14**(1): p. 297.
22. Selman, M. and A. Pardo, *Stochastic age-related epigenetic drift in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2014. **190**(12): p. 1328-30.
23. Langevin, S.M., et al., *Does epigenetic drift contribute to age-related increases in breast cancer risk?* Epigenomics, 2014. **6**(4): p. 367-9.
24. Lin, R.K., et al., *Alteration of DNA methyltransferases contributes to 5'CpG methylation and poor prognosis in lung cancer*. Lung Cancer, 2007. **55**(2): p. 205-13.
25. Jin, B. and K.D. Robertson, *DNA methyltransferases, DNA damage repair, and cancer*. Adv Exp Med Biol, 2013. **754**: p. 3-29.
26. Chen, R.Z., et al., *DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates*. Nature, 1998. **395**(6697): p. 89-93.
27. Cushing, L., P. Kuang, and J. Lu, *The role of miR-29 in pulmonary fibrosis*. Biochem Cell Biol, 2015. **93**(2): p. 109-18.
28. Misharin, A.V., et al., *Monocyte-derived alveolar macrophages drive lung fibrosis and persist in the lung over the life span*. J Exp Med, 2017. **214**(8): p. 2387-2404.
29. King, T.E., Jr., A. Pardo, and M. Selman, *Idiopathic pulmonary fibrosis*. Lancet, 2011. **378**(9807): p. 1949-61.
30. Sgalla, G., A. Biffi, and L. Richeldi, *Idiopathic pulmonary fibrosis: Diagnosis, epidemiology and natural history*. Respirology, 2016. **21**(3): p. 427-37.
31. Karamitsakos, T., et al., *Lung cancer in patients with idiopathic pulmonary fibrosis*. Pulm Pharmacol Ther, 2017. **45**: p. 1-10.
32. Martinez, F.J., et al., *Idiopathic pulmonary fibrosis*. Nat Rev Dis Primers, 2017. **3**: p. 17074.
33. Meyer, K.C., *Pulmonary fibrosis, part I: epidemiology, pathogenesis, and diagnosis*. Expert Rev Respir Med, 2017. **11**(5): p. 343-359.
34. Collard, H.R., et al., *Acute Exacerbation of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An International Working Group Report*. Am J Respir Crit Care Med, 2016. **194**(3): p. 265-75.
35. 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.
36. Walsh, S.L., et al., *Interobserver agreement for the ATS/ERS/JRS/ALAT criteria for a UIP pattern on CT*. Thorax, 2016. **71**(1): p. 45-51.

37. Leslie, K.O., *My approach to interstitial lung disease using clinical, radiological and histopathological patterns*. J Clin Pathol, 2009. **62**(5): p. 387-401.
38. Wolters, P.J., H.R. Collard, and K.D. Jones, *Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis*. Annu Rev Pathol, 2014. **9**: p. 157-79.
39. Molyneaux, P.L. and T.M. Maher, *The role of infection in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis*. Eur Respir Rev, 2013. **22**(129): p. 376-81.
40. Sgalla, G., et al., *Idiopathic pulmonary fibrosis: pathogenesis and management*. Respir Res, 2018. **19**(1): p. 32.
41. Fell, C.D., et al., *Clinical predictors of a diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2010. **181**(8): p. 832-7.
42. Xu, J., et al., *Use of senescence-accelerated mouse model in bleomycin-induced lung injury suggests that bone marrow-derived cells can alter the outcome of lung injury in aged mice*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2009. **64**(7): p. 731-9.
43. Huang, W.T., et al., *Plasminogen activator inhibitor 1, fibroblast apoptosis resistance, and aging-related susceptibility to lung fibrosis*. Exp Gerontol, 2015. **61**: p. 62-75.
44. Kropski, J.A., T.S. Blackwell, and J.E. Loyd, *The genetic basis of idiopathic pulmonary fibrosis*. Eur Respir J, 2015. **45**(6): p. 1717-27.
45. Antoniou, K.M., et al., *Idiopathic pulmonary fibrosis: outcome in relation to smoking status*. Am J Respir Crit Care Med, 2008. **177**(2): p. 190-4.
46. Jin, B. and K.D. Robertson, *DNA Methyltransferases (DNMTs), DNA Damage Repair, and Cancer*. Adv Exp Med Biol, 2013. **754**: p. 3-29.
47. Tzouveleakis, A. and N. Kaminski, *Epigenetics in idiopathic pulmonary fibrosis*. Biochem Cell Biol, 2015. **93**(2): p. 159-70.
48. Raghu, G. and K.C. Meyer, *Silent gastro-oesophageal reflux and microaspiration in IPF: mounting evidence for anti-reflux therapy?* Eur Respir J, 2012. **39**(2): p. 242-5.
49. Konishi, K., et al., *Gene expression profiles of acute exacerbations of idiopathic pulmonary fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2009. **180**(2): p. 167-75.
50. Selman, M., I. Buendia-Roldan, and A. Pardo, *Aging and Pulmonary Fibrosis*. Rev Invest Clin, 2016. **68**(2): p. 75-83.
51. Sanders, Y.Y., et al., *Thy-1 promoter hypermethylation: a novel epigenetic pathogenic mechanism in pulmonary fibrosis*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2008. **39**(5): p. 610-8.
52. Hu, B., et al., *Epigenetic regulation of myofibroblast differentiation by DNA methylation*. Am J Pathol, 2010. **177**(1): p. 21-8.
53. Hu, B., et al., *Essential role of MeCP2 in the regulation of myofibroblast differentiation during pulmonary fibrosis*. Am J Pathol, 2011. **178**(4): p. 1500-8.
54. Cisneros, J., et al., *Hypermethylation-mediated silencing of p14(ARF) in fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2012. **303**(4): p. L295-303.
55. Huang, S.K., et al., *Hypermethylation of PTGER2 confers prostaglandin E2 resistance in fibrotic fibroblasts from humans and mice*. Am J Pathol, 2010. **177**(5): p. 2245-55.

56. Huang, S.K., et al., *Prostaglandin E(2) increases fibroblast gene-specific and global DNA methylation via increased DNA methyltransferase expression*. *Faseb j*, 2012. **26**(9): p. 3703-14.
57. Yang, I.V., et al., *Relationship of DNA methylation and gene expression in idiopathic pulmonary fibrosis*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2014. **190**(11): p. 1263-72.
58. Rabinovich, E.I., et al., *Global methylation patterns in idiopathic pulmonary fibrosis*. *PLoS One*, 2012. **7**(4): p. e33770.
59. Cushing, L., et al., *miR-29 Is a Major Regulator of Genes Associated with Pulmonary Fibrosis*. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2011. **45**(2): p. 287-294.
60. Yang, I.V. and D.A. Schwartz, *Epigenetics of Idiopathic Pulmonary Fibrosis*. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*, 2015. **165**(1): p. 48-60.
61. Milosevic, J., et al., *Profibrotic role of miR-154 in pulmonary fibrosis*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2012. **47**(6): p. 879-87.
62. Xiao, J., et al., *miR-29 inhibits bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice*. *Mol Ther*, 2012. **20**(6): p. 1251-60.
63. Fang, Y., et al., *miR-29c is downregulated in renal interstitial fibrosis in humans and rats and restored by HIF-alpha activation*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2013. **304**(10): p. F1274-82.
64. Pandit, K.V., et al., *Inhibition and role of let-7d in idiopathic pulmonary fibrosis*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010. **182**(2): p. 220-9.
65. Roderburg, C., et al., *Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis*. *Hepatology*, 2011. **53**(1): p. 209-18.
66. van Rooij, E., et al., *Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(35): p. 13027-32.
67. Liu, G., et al., *miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis*. *J Exp Med*, 2010. **207**(8): p. 1589-97.
68. Rosas, I.O. and I.V. Yang, *The promise of epigenetic therapies in treatment of idiopathic pulmonary fibrosis*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2013. **187**(4): p. 336-8.
69. Oak, S.R., et al., *A micro RNA processing defect in rapidly progressing idiopathic pulmonary fibrosis*. *PLoS One*, 2011. **6**(6): p. e21253.
70. Margaritopoulos, G.A., K.M. Antoniou, and A.U. Wells, *Comorbidities in interstitial lung diseases*. *Eur Respir Rev*, 2017. **26**(143).
71. Raghu, G., et al., *Comorbidities in idiopathic pulmonary fibrosis patients: a systematic literature review*. *Eur Respir J*, 2015. **46**(4): p. 1113-30.
72. Byrne, A.J., T.M. Maher, and C.M. Lloyd, *Pulmonary Macrophages: A New Therapeutic Pathway in Fibrosing Lung Disease?* *Trends Mol Med*, 2016. **22**(4): p. 303-316.
73. Meyer, K.C. and G. Raghu, *Bronchoalveolar lavage for the evaluation of interstitial lung disease: is it clinically useful?* *Eur Respir J*, 2011. **38**(4): p. 761-9.

74. Wang, N., et al., *Lung cancer and particulate pollution: A critical review of spatial and temporal analysis evidence*. Environ Res, 2018. **164**: p. 585-596.
75. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2018*. CA Cancer J Clin, 2018. **68**(1): p. 7-30.
76. Basu, A.K., *DNA Damage, Mutagenesis and Cancer*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(4).
77. Hecht, S.S., *Lung Carcinogenesis by Tobacco Smoke*. International journal of cancer. Journal international du cancer, 2012. **131**(12): p. 2724-2732.
78. Kanaji, N., et al., *Paraneoplastic syndromes associated with lung cancer*. World Journal of Clinical Oncology, 2014. **5**(3): p. 197-223.
79. Fernandez-Marcelo, T., et al., *Telomere length and telomerase activity in non-small cell lung cancer prognosis: clinical usefulness of a specific telomere status*. J Exp Clin Cancer Res, 2015. **34**: p. 78.
80. Li, S., et al., *miR-185 acts as a tumor suppressor by targeting AKT1 in non-small cell lung cancer cells*. International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2015. **8**(9): p. 11854-11862.
81. 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.
82. Travis, W.D., et al., *The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification*. J Thorac Oncol, 2015. **10**(9): p. 1243-1260.
83. Vassilakis, D.A., et al., *Frequent genetic alterations at the microsatellite level in cytologic sputum samples of patients with idiopathic pulmonary fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **162**(3 Pt 1): p. 1115-9.
84. Wang, Y., et al., *The role of miRNA-29 family in cancer*. Eur J Cell Biol, 2013. **92**(3): p. 123-8.
85. Qadir, X.V., et al., *miR-185 inhibits hepatocellular carcinoma growth by targeting the DNMT1/PTEN/Akt pathway*. Am J Pathol, 2014. **184**(8): p. 2355-64.
86. Lei, G.S., et al., *Regulation of Collagen V Expression and Epithelial-Mesenchymal Transition by miR-185 and miR-186 during Idiopathic Pulmonary Fibrosis*. Am J Pathol, 2016. **186**(9): p. 2310-6.
87. Ding, X., et al., *Chronic obstructive sleep apnea accelerates pulmonary remodeling via TGF-beta/miR-185/CoLA1 signaling in a canine model*. Oncotarget, 2016. **7**(36): p. 57545-57555.
88. Park, S., et al., *Assessment of EGFR mutation status using cell-free DNA from bronchoalveolar lavage fluid*. Clin Chem Lab Med, 2017. **55**(10): p. 1489-1495.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ (2)

miR-185 and miR-29a are similarly expressed in the bronchoalveolar lavage cells in IPF and lung cancer but common targets DNMT1 and COL1A1 show disease specific patterns

ELENI BIBAKI^{1,2}, ELIZA TSITOURA¹, EIRINI VASARMIDI^{1,2}, GEORGE MARGARITOPOULOS¹,
ATHINA TRACHALAKI¹, CHARA KOUTOULAKI¹, THEODORA GEORGOPOULOU^{1,2},
DEMETRIOS A. SPANDIDOS³, NIKOS TZANAKIS² and KATERINA M. ANTONIOU^{1,2}

¹Laboratory of Molecular and Cellular Pneumology, Medical School, University of Crete; ²Department of Thoracic Medicine, Interstitial Lung Disease Unit, University Hospital, University of Crete, 71110 Heraklion;

³Laboratory of Clinical Virology, Medical School, University of Crete, 71003 Heraklion, Crete, Greece

Received February 1, 2018; Accepted March 19, 2018

DOI: 10.3892/mmr.2018.8778

Abstract. Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and lung cancer (LC) constitute two progressively devastating lung diseases with common risk factors including aging and smoking. There is an increasing interest in the investigation of common pathogenic mechanisms between IPF and LC with therapeutic implications. Several oncomirs, microRNAs associated with malignancy, are also linked with IPF. miR-29a and miR-185 downregulation is probably involved both in carcinogenesis and fibrogenesis. We have previously observed miR-29a and miR-185 downregulation in IPF cells from bronchoalveolar lavage (BAL) and in this study we investigated their expression in LC BAL cells. Common targets of miR-29a and miR-185 such as DNA methyltransferase (DNMT)1, DNMT3b, COL1A1, AKT1 and AKT2 were measured. Potential correlations with pulmonary function tests, smoking status and endobronchial findings were investigated. Similar levels of miR-29a and miR-185 were detected in IPF and LC while their common targets AKT1 and DNMT3b were not found to differ, suggesting potential pathogenetic similarities at the level of

key epigenetic regulators. By contrast, COL1A1 mRNA levels were increased in IPF suggesting a disease-specific mRNA signature. Notably, DNMT1 was downregulated in the LC group and its expression was further reduced in the presence of increasing malignant burden as it was implied by the endobronchial findings.

Introduction

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a form of chronic progressive interstitial pneumonia that continues to be associated with high morbidity and mortality, despite the fact that new anti-fibrotic drugs have recently been added to our quiver (1).

The exact cause of the disease remains unknown, however there is a strong association with aging and smoking, similarly to lung cancer (LC) (2,3). Aggregating mutational burden, increased epigenetic gene silencing through aberrant DNA methylation patterns and telomere dysfunction frame the probable underlying correlation (4-8). A deeper view of the pathophysiology of the two diseases reveals several similarities and common pathways involved (4,5,9-11). Crucial cellular mechanisms known to be involved in cell proliferation, resistance to apoptosis and epithelial-mesenchymal transition, are activated in both LC and pulmonary fibrosis (12-14). Preneoplastic lesions (atypia, metaplasia, dysplasia), microsatellite instability and loss of heterozygosity in genes that underlie the tumorigenesis have also been reported in lung fibrosis tissue (15).

Interestingly, LC is a common comorbidity among patients with IPF with major impact on their survival. Increasing data support the hypothesis that LC occurs secondarily on the ground of fibrosis rather than as a preceding finding. In the majority of patients, LC arise as nodular lesions in the peripheral area of fibrosis, mainly at the lower areas of the lungs with squamous cell and adenocarcinoma being the prevalent histological types (12,16).

MicroRNAs have emphatically emerged as major regulators of gene expression through epigenetic and post-transcriptional

Correspondence to: Dr Katerina M. Antoniou, Laboratory of Molecular and Cellular Pneumology, Medical School, University of Crete, 71110 Heraklion, Crete, Greece
E-mail: kantonou@med.uoc.gr

Abbreviations: DNMT, DNA methyltransferase; IPF, idiopathic pulmonary fibrosis; LC, lung cancer; HRCT, high resolution computed tomography; FEV₁, forced expiratory volume in 1 sec; FVC, forced vital capacity, DL_{CO}, diffusing capacity for carbon monoxide; BAL, bronchoalveolar lavage; PFTs, pulmonary function tests

Key words: idiopathic pulmonary fibrosis, lung cancer, microRNAs, DNA methyltransferase, COL1A1

mechanisms. MicroRNA profiling studies in LC have currently proposed several microRNAs as potential epigenetic biomarkers in the diagnostic procedure. Similarly, in IPF several oncomirs are consistently deregulated, such as the miR-29 family (17). The miR-29 family is usually downregulated in affected tissues and plays a crucial role in fibrogenesis in multiple organs including lung (18), liver (19) and kidney (20). Among the targets of miR-29 are collagens, enzymes required for collagen synthesis (21,22), matrix metalloproteases and DNA methylation enzymes such as DNA methyltransferase (DNMT)3A/B (23). The miR-29 family can be an effective regulator of tumorigenesis and cancer progression by targeting multiple tumor-related pathways as cell proliferation, cell cycle, apoptosis and metastasis as well as affecting the epigenetic and immune regulation (24).

Additionally, miR-185 is increasingly recognized as an oncomir commonly deregulated in IPF and LC (25). Downregulation of miR-185 has been demonstrated in IPF lung tissue (26) and in several malignancies including LC, glioma, hepatocellular and breast cancer (27). miR-185 supplementation inhibits cell growth and proliferation by directly targeting AKT1 in NSCLC28, through DNMT1 targeting, leading to the PTEN upregulation and inhibition of AKT phosphorylation (29).

Interestingly, the expression of miR-29 and miR-185 is downregulated by TGF β (18,25,30). Furthermore, there are emerging data suggesting an overlap of miR-29a and miR-185 targets; miR-185 appears to regulate collagens (26,30,31), while miR-29a seems to regulate AKT1 (32) and AKT2 (33). Recently, both miR-185 and miR-29a were downregulated in IPF bronchoalveolar lavage (BAL) cells compared to controls (25).

BAL is becoming an attractive, minimally invasive tool to study alveolar macrophages and other immune cells, as well as other lung resident cells that may derive from adjacent lesions. In essence BAL could be considered a form of liquid biopsy in LC and possibly in IPF34. In this study, the expression of miR-29a and miR-185 was compared in IPF and LC. Well-established targets of miR-29a and recently emerged miR-185 targets such as DNMTs (DNMT1 and DNMT3b), AKT1/AKT2 and COL1A1 were analyzed. Furthermore, microRNA and target gene expression was evaluated in the LC group according to LC type and endobronchial findings, including, the presence of endobronchial lesion(s), the side of the BAL procedure relative to the tumor site and the cytology findings for malignant cells.

In our study, similar levels of miR-29a, miR-185 and their targets AKT1, AKT2 and DNMT3b were found in the two diseases. By contrast, COL1A1 mRNA levels were increased in IPF suggesting a disease-specific mRNA signature. Importantly, DNMT1 was downregulated in the LC group and its expression was further reduced in the presence of increasing malignant burden as indicated by the endobronchial findings further suggesting an LC-specific signature.

Materials and methods

Human subjects. Patients were classified as ever smokers and non-smokers. Pulmonary function tests (PFTs), performed within 1 month of CT, included forced expiratory volume

in 1 sec (FEV₁), forced vital capacity (FVC), and diffusing capacity for carbon monoxide (DL_{CO}) corrected for hemoglobin concentration, expressed as percentages of the predicted normal values. A total of 89 subjects were enrolled in this study, comprising patients with IPF (n=57) and patients with LC (n=32) with the majority being diagnosed as NSCLC (n=29). All subjects were recruited from the Department of Thoracic Medicine, University Hospital of Heraklion (Crete, Greece) between December 2013 and July 2017. The study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital of Heraklion (IRB no. 17030/12-12-2013 for IPF patients and Reg. no. 140/4-2-2015 for LC patients). All the patients provided informed consent in written form.

IPF group: The IPF patients were evaluated with complete PFTs, performed within 1 month of CT, including spirometry, measurement of lung volumes and diffusion capacity. Spirometry, lung volumes using the helium-dilution technique and DL_{CO} (corrected for haemoglobin) using the single breath technique were performed using a computerized system (Jaeger 2.12; MasterLab, Würzburg, Germany). Predicted values were obtained from the standardized lung function testing of the European Coal and Steel Community, Luxembourg (1993). PFTs, FEV₁, FVC, and DL_{CO} corrected for haemoglobin concentration, and were expressed as percentages of the predicted normal values. The diagnosis of IPF was based on open or video-assisted thoracoscopic biopsy, with all the biopsies reviewed by the same two histopathologists, or using ATS/ERS clinical and high resolution computed tomography (HRCT) criteria (35). In accordance with the aforementioned criteria, any known cause of pulmonary fibrosis, such as a systemic connective tissue disorder, was excluded by immunologic screening and rheumatologic clinical evaluation (35). All the IPF patients were newly diagnosed and had not received previous treatment.

LC group: The diagnosis of LC patients and the exact histological type of malignancy were based on lung biopsy proceeded through bronchoscopy, CT-guided biopsy by invasive radiologists or open lung biopsy. The LC patients were all chemo/radio/immunotherapy naive patients and their diagnostic management and staging were based on the International Association for the Study of Lung Cancer (36). The group of LC patients was further divided into subgroups associated with endobronchial findings evaluated during bronchoscopy and following BAL cytology evaluation. Thus, LC patients were assigned into groups according to the side of the BAL procedure relative to the side of the malignant lesion as it was depicted in the CT scan with a group termed 'same side' (SS) and a group of 'opposite side' (OS), if this separation was feasible, as patients with mediastinal lymphadenopathy could not fit in any of those groups. Secondly, the patients were separated in two groups according to the presence or absence of malignant cells in the BAL following cytology evaluation, termed 'negative cytology' (NC) and 'positive cytology' (PC) respectively. A third option for the cytology test was 'suspect for malignancy'. Finally, the patients were separated according to the physician's observations during bronchoscopy for obvious endobronchial lesions with a group termed 'endobronchial lesion' (OEL) and 'no endobronchial lesion' (NOEL). PFTs for LC patients were not included in the studies.

Table I. Patient demographics.

Demographics	LC (32)	IPF (n=57)	P-value
Age	67.7 (\pm 11.9)	72 (\pm 7.3)	0.01
Sex (M/F)	26/6	46/11	NS
Pyrs	75 (47.5-100)	30 (6-45)	0.001
Non smoker/ smoker	2/26	13/43	NS
PFTs	LC	IPF	
FVC, %	ND	78.6 (\pm 17.6)	NA
FEV ₁ , %	ND	84.8 (\pm 19.3)	NA
FEV ₁ /FVC, %	ND	84.21 (79.8-89)	NA
TLC	ND	75.5 (62.1-83.4)	NA
TLCO/SB	ND	51.3 (\pm 16.8)	NA
KCO	ND	88 (\pm 23.7)	NA
BAL, %	LC	IPF	
Macrophages	86.2 (70.3-93.3)	80.38 (66-88)	NS
Lymphocytes	5.8 (3.6-11.1)	6.4 (3.5-12.7)	NS
Neutrophils	3 (1.3-6.3)	5.8 (2.4-12.9)	NS
Eosinophils	0 (0-1.5)	1.1 (0.4-2.6)	0.01

LC, lung cancer; IPF, idiopathic pulmonary fibrosis; M, male; F, female; PFTs, pulmonary function tests; FVC, forced vital capacity; FEV₁, forced expiratory volume in 1 sec; BAL, bronchoalveolar lavage; TLC, total lung capacity; KCO, transfer coefficient of carbon monoxide; NS, not significant; NA, not applicable.

BAL cell isolation and determination of cellular composition. BAL was obtained from all the patients, as previously described (25). Cells (1-1.5 million) were homogenised in TriReagent™ (MBL) for total RNA analysis, followed by storage at -80°C. Differential cell population count was analysed following May-Grünwald Giemsa staining of cell cytopins, as previously described (25).

MicroRNA and mRNA expression analyses. Total RNA was isolated as previously described (25) using the mirVana™ miRNA isolation kit (Ambion; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA). For the analysis of microRNA expression levels, 10 ng of total RNA were used in reverse transcriptase and quantitative PCR reactions using the TaqMan™ microRNA assays (Life Technologies; Thermo Fisher Scientific, Inc.) and 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.). For gene expression analyses, 500 ng of total RNA were treated with DNasefree (Ambion; Thermo Fisher Scientific, Inc.) for genomic DNA contamination removal, followed by first-strand cDNA synthesis using Maxima RT™ (Fermentas; Thermo Fisher Scientific, Inc.) and qPCR analysis using Maxima SYBR-Green qPCRmix (Fermentas; Thermo Fisher Scientific, Inc.) on Mx3005P qPCR system (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA). Probe and primer sequences are summarized in Table II. RNU19 levels were used as endogenous controls for the normalization of microRNA expression levels in BAL samples. GAPDH levels were used as endogenous control for the normalization of mRNA expression levels in BAL samples.

Table II. IDs of the TaqMan microRNA assays and primer sequences used for the quantification of microRNAs and mRNAs, respectively.

MicroRNA assay name	MicroRNA assay ID
RNU19	001003
hsa-miR-185	002271
hsa-miR-29a	002112

B,

Gene name	Primer sequences
<i>GAPDH</i>	F: agccacatcgctcagaca R: ccaatacagacaaatccggt
<i>COL1A1</i>	F: gggattccctggacctaag R: ggaacacctcgtctcca
<i>AKT1</i>	F: gcagcagctgtacgagaaga R: ggtgtcagctcccacgtg
<i>AKT2</i>	F: ctacacagtcaccgagagc R: tgggtctggaaggcactatt
<i>DNMT1</i>	F: ttctgatgaaaagacgaggat R: ttctccgttggtctttgg
<i>DNMT3b</i>	F: agaggacatctcacggttc R: ggtgccccagaagtatcg

DNMT, DNA methyltransferase.

Relative expression values per sample for each microRNA or mRNA assay were calculated by the $2^{-\Delta\Delta C_q}$ method using as calibrator sample the average of DCT values.

Statistical analysis. Analysis of expression values with lung function tests and BAL cell population percentages was performed Prism 6 software. Group comparisons were made by analysis of variance, log transformation and Mann-Whitney test. Student's t-test, Wilcoxon rank-sum test, or Chi-square test were also used for comparisons as appropriate. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Patient demographics. Demographic data and PFTs are summarised in Table I. IPF patients were older than the patients in the LC group by 4.3 (\pm 4.6) years, while LC patients were heavier smokers as could be expected. The majority of LC was NSCLC (29/32), with the rest being SCLC. The group of LC patients was subdivided according to the endobronchial findings as described in materials and methods. Fourteen LC patients were assigned to the group SS and 9 to OS according to the site of bronchoscopy. Fourteen LC patients had no malignant cells detected in their BAL and were assigned to the NC group and 7 to the PC. Nineteen patients had obvious OEL and 7 were assigned to NOEL.

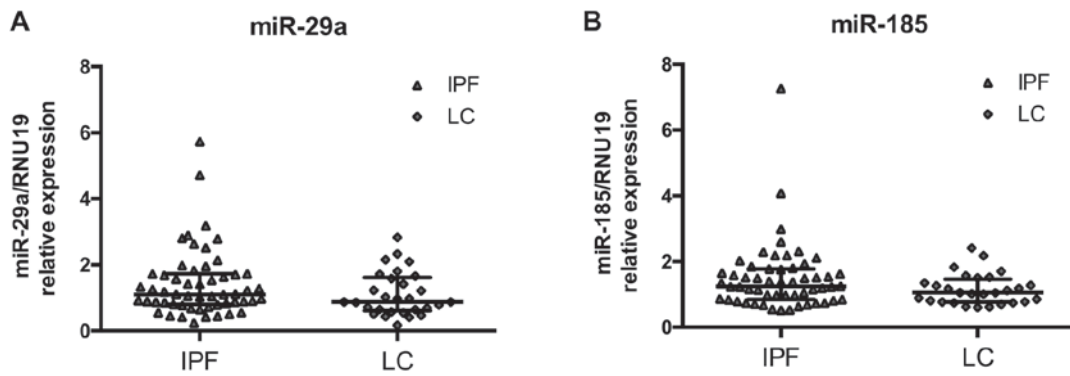


Figure 1. miR-29a and miR-185 levels are similar between IPF and lung cancer groups. (A) miR-29a and (B) miR-185 expression levels normalised by RNU19 in BAL cells from IPF and LC patients as shown by dot plots with median and interquartile range. IPF, idiopathic pulmonary fibrosis; BAL, bronchoalveolar lavage; LC, lung cancer.

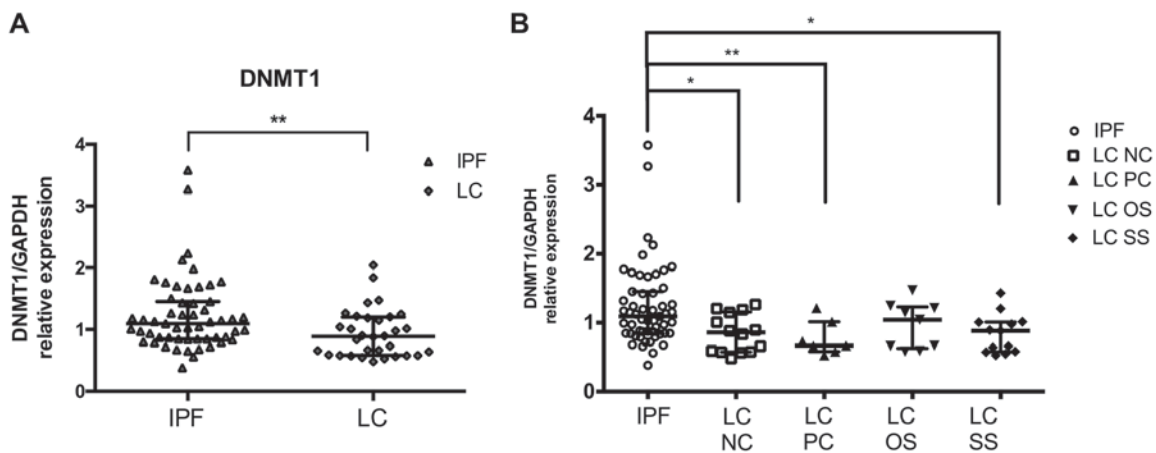


Figure 2. DNMT1 levels in LC patients compared to IPF patients. DNMT1 mRNA levels in BAL cells as measured by RT-qPCR and normalised using GAPDH (A) in LC group and (B) in LC subgroups NC, PC, OS and SS as compared to IPF. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ of Mann-Whitney test. DNMT, DNA methyltransferase; LC, lung cancer; IPF, idiopathic pulmonary fibrosis; BAL, bronchoalveolar lavage; NC, negative cytology; PC, positive cytology; OS, opposite side; SS, same side.

miR-185 and miR-29a levels are similar between IPF and LC. MicroRNA expression levels in BAL cells were measured by RT-qPCR and normalized using small nucleolar RNA RNU19. We have previously shown that both microRNAs were significantly downregulated in IPF relative to controls (25). The downregulation of the two microRNAs was also noted for LC since the expression of miR-29a and miR-185 did not differ between IPF and LC patients (Fig. 1A and B). miR-29a and miR-185 expression levels were significantly correlated within the IPF group (Spearman's $R = 0.81$, $P = 6e^{-14}$) and the LC group (Spearman's $R = 0.71$, $P = 3.6e^{-5}$).

DNMTs/AKT/miR-29a/miR-185 axis in IPF and LC. DNMT1 and DNMT3b are common targets of miR-185 and miR-29 in IPF and LC. mRNA expression levels in BAL cells were measured by RT-qPCR and normalized using GAPDH. DNMT1 levels previously measured in IPF relative to controls showed no differences. Notably, DNMT1 levels were significantly lower in LC patients compared to IPF patients. (Fig. 2A; Table III). No differences were detected in the levels of DNMT3b between the two diseases (Table III). No difference was detected in the levels of AKT1 and AKT2 between the two diseases (Table III).

Effect of malignant burden on DNMT1 levels in BAL cells compared to IPF. Comparing IPF patients with the LC group in detail, further reduced levels of DNMT1 were detected in the samples where the BAL procedure was performed at the side of the lesion (SS) as opposed to the lesion free side (OS). Moreover, LC patients with positive BAL cytology results (PC) had a more pronounced reduction in DNMT1 levels than those without the presence of cells with malignant features (NC), when compared with IPF (Fig. 2B). Regarding the histological type of LC, the more obvious reduction in DNMT1 mRNA levels compared with IPF was found in NSCLC type.

COL1A1/miR-29a/miR-185 axis in IPF and LC. Next we analysed miR-29a specific target COL1A1 by RT-qPCR and normalized using GAPDH. Our previous result showed that IPF BAL cells express significantly higher levels of COL1A1 mRNA than controls. In this study, we observed that the levels of COL1A1 mRNA were significantly lower in LC patients compared with IPF patients (Fig. 3A; Table III).

Effect of malignant burden on COL1A1 levels in BAL cells compared to IPF. The mRNA levels of COL1A1 were markedly reduced in LC patients compared with IPF overall as it

Table III. microRNA and gene expression levels in IPF and LC group and subgroups.

Variables	IPF (n=56)		LC (n=32)		LC-SS (n=14)		LC-OS (n=9)		LC-NC (n=14)		LC-PC (n=7)		LC-OEL (n=19)		LC-NOEL (n=7)	
	Median (25-75%)	P-value ^a	Median (25-75%)	P-value ^a	Median (25-75%)	P-value ^a	Median (25-75%)	P-value ^a	Median (25-75%)	P-value ^a	Median (25-75%)	P-value ^a	Median (25-75%)	P-value ^a	Median (25-75%)	P-value ^a
miR-185	1.25 (0.85-1.78)	NS	1.05 (0.80-1.33)	NS	1.05 (0.80-1.33)	NS	0.74 (0.62-1.37)	NS	1.05 (0.62-1.27)	NS	1 (0.77-1.71)	NS	1.06 (0.74-1.53)	NS	1.01 (0.62-1.17)	NS
miR-29a	1.10 (0.80-1.73)	NS	0.93 (0.69-1.70)	NS	0.93 (0.69-1.70)	NS	0.79 (0.47-1.50)	NS	0.88 (0.65-1.58)	NS	1.02 (0.72-2.16)	NS	0.87 (0.65-1.72)	NS	0.99 (0.51-1.21)	NS
DNMT1	1.10 (0.85-1.45)	0.01	0.89 (0.58-1.06)	0.013	0.89 (0.58-1.06)	0.013	1.04 (0.63-1.23)	NS	0.86 (0.58-1.16)	0.009	0.67 (0.58-1.01)	0.007	1.01 (0.64-1.21)	NS	0.66 (0.59-1.25)	NS
DNMT3b	1.03 (0.69-1.43)	NS	1.00 (0.70-1.61)	NS	1.00 (0.70-1.61)	NS	0.82 (0.58-1.66)	NS	0.92 (0.62-1.61)	NS	1.15 (0.58-1.65)	NS	1.08 (0.70-1.65)	NS	0.66 (0.59-1.06)	NS
AKT1	0.78 (0.53-1.22)	NS	0.69 (0.39-1.31)	NS	0.69 (0.39-1.31)	NS	0.64 (0.47-1.22)	NS	0.72 (0.56-1.36)	NS	0.64 (0.24-0.97)	NS	0.67 (0.38-1.60)	NS	0.69 (0.56-0.88)	NS
AKT2	0.96 (0.75-1.30)	NS	0.91 (0.60-1.37)	NS	0.91 (0.60-1.37)	NS	1.11 (0.69-1.48)	NS	0.94 (0.74-1.51)	NS	0.89 (0.54-1.50)	NS	0.91 (0.65-1.50)	NS	1.11 (0.89-1.33)	NS
COL1A1	0.70 (0.24-2.61)	0.001	0.22 (0.05-1.03)	0.017	0.22 (0.05-1.03)	0.017	0.35 (0.13-0.94)	NS	0.22 (0.11-0.78)	0.017	0.17 (0.04-0.98)	0.048	0.14 (0.05-0.98)	0.0005	0.35 (0.21-1.30)	NS

^aP-value: Mann-Whitney test vs. IPF. IPF, idiopathic pulmonary fibrosis; LC, lung cancer; SS, same side; OS, opposite side; NC, negative cytology; PC, positive cytology; OEL, endobronchial lesion; NOEL, no endobronchial lesion; DNMT, DNA methyltransferase.

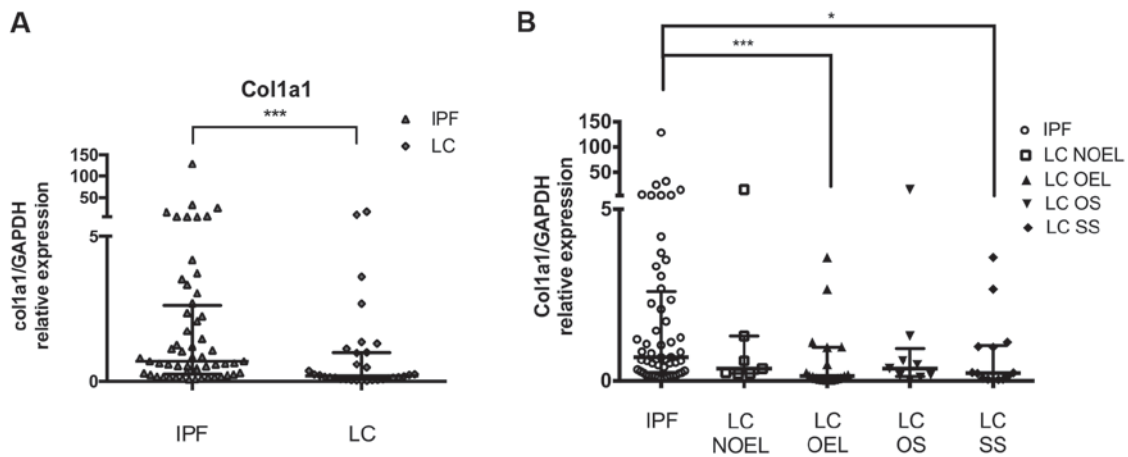


Figure 3. COL1A1 levels in LC patients compared to IPF patients. COL1A1 mRNA levels in BAL cells as measured by RT-qPCR and normalised using GAPDH (A) in the LC group and (B) in the LC subgroups NOEL, OEL, OS and SS as compared to IPF. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, Mann-Whitney test. LC, lung cancer; IPF, idiopathic pulmonary fibrosis; BAL, bronchoalveolar lavage; NOEL, no endobronchial lesion; OEL, endobronchial lesion; OS, opposite side; SS, same side.

was noted previously. Assorting LC patients depending on the side the BAL procedure was performed and comparing them with IPF, further reduced levels of COL1A1 was detected in LC patients when the BAL procedure was done ipsilaterally of the lesion than contralaterally. The presence of an OEL during the bronchoscope signified more clearly reduced levels of COL1A1 (compared with IPF) than in the case of NOEL (Fig. 3A; Table III). Patients with the histological type of SCLC had COL1A1 levels similar with IPF levels, opposing the reduced levels in the NSCLC patients subgroup.

Discussion

This is a BAL study of the expression of major epigenetic molecules, miR-29a and miR-185, and their common targets DNMT1 and DNMT3b, involved in the DNA methylation process. The downregulation of these molecules has been previously connected with IPF and LC. The relationship between the lethal diseases which often coexist is an active field of research as common pathogenic pathways emerge, with major therapeutic implications. Our cardinal findings were: i) Both miR-185 and miR-29a were comparably expressed in IPF and LC BAL samples; ii) no direct correlation with miR-29a or miR-185 and their targets was observed, albeit DNMT1 downregulation was characteristic of LC and COL1A1 upregulation was representative of IPF BAL samples; and iii) in LC the malignant burden affected both DNMT1 and COL1A1 expression.

Similar levels of miR-29a and miR-185 were detected between IPF and LC in BAL cells while our previous findings showed that both miR-29a and miR-185 were downregulated in IPF relative to controls (25). The downregulation of miR-29a and miR-185 in LC tissue specimens has been previously established; however, to the best of our knowledge, this is the first study on LC BAL cells. Our results suggest that miR-185 is a novel common microRNA deregulation in IPF and LC next to previously identified microRNAs such as miR-29a. miR-29a and miR-185 expression showed a significant association in both IPF and LC BAL samples. A possible common regulation of the expression of the two microRNAs may be related to the increased levels of TGF β in both IPF and LC

BAL (37,38). Activation of TGF- β signaling and excessive accumulation of ECM proteins are observed in IPF and LC, highlighting a common molecular mechanism in both diseases that is directly linked to both microRNAs (39,40). Of note, miRNA based-therapeutic strategies are already under evaluation for their use in several malignancies (41) and that imposes the need for in-depth study of similarities and differences between IPF and LC, focusing on key molecules involved in the multifarious function of alveolar macrophages.

For this reason, we examined the expression of a common target of miR-29a and miR-185 induced by TGF β and central fibrosis mediator collagen 1a in LC in comparison to IPF. Our previous results supported that the downregulation of miR-29a in IPF is associated with the overexpression of COL1A1 gene in BAL cells, confirming the active role of the miR-29a/COL1A1 pathway in AMs and lung tissue, while the expression profile of COL1A1 in LC has not been yet clarified. COL1A1 may be involved in carcinogenesis as aberrant expression levels were revealed in several malignancies including hepatocellular carcinoma (42), NSCLC tissue (43) and in malignant gastric tissue (44). Our findings, however, showed significantly increased levels of COL1A1 in IPF relative to LC in BAL cells that establishes the characteristic fibrotic profile of BAL cells in IPF, which appears to be lacking in LC BAL cells. The further reduced levels of COL1A1 accordingly with increased malignant burden cannot thus far be interpreted and further functional analysis of AMs in LC is needed.

A second pathway/axis affected by both miR-29a and miR-185 is the expression of DNMTs. An important concept currently put forward for the pathogenesis of IPF as in cancer is that common risk factors such as aging, cigarette smoke and environmental effects induce errors in the maintenance of the methylation marks of the genome creating aberrant DNA methylation patterns and accelerating the aging of our epigenome (45,46). Global methylation profile in IPF lung tissue was different compared to the controls and partially similar to cancer (6,7). Furthermore, an increased expression of the DNMTs was observed in both cancer and IPF lung tissue studies (7,47), leading to site-specific hypermethylation and gene silencing.

We have previously reported that DNMT1 mRNA levels in the BAL cells of IPF patients were similar to controls (25). In the current study, we observed a significant reduction in the mRNA levels of DNMT1 in LC BAL cells while, DNMT3b levels were similar in IPF and LC. DNMT1, in contrast to DNMT3, appears to function in cooperation with DNA damage repair pathways in order to maintain genomic stability and ablation or reduction of DNMT1 promotes mutagenic events (48), microsatellite instability and chromosomal translocations (49). Notably, the samples obtained near the malignant lesion or with positive malignant cell cytology results showed a more pronounced reduction of DNMT1 expression suggesting that reduced DNMT1 levels were associated with increased malignant burden.

LC is a common and prognostically determinant comorbidity among IPF patients. BAL procedure is a less invasive and harmless tool for revealing new, disease specific biomarkers regarding LC in IPF patients, for screening, risk stratification and diagnostic purposes, verging the promising concept of cancer liquid biopsy. It would be of great interest to study the expression profile of those miRNAs and their targets also in patients who simultaneously suffer from IPF and LC. MicroRNA based-therapeutic strategies are already under evaluation for their use in several malignancies (41) and IPF (50) and would greatly benefit from in depth study of similarities and differences between IPF and LC, focusing on key molecules involved in the multifarious function of alveolar macrophages.

Tissue specimens and cell lines are the predominant material of research; however, the role of BAL as a minimally invasive tool to study alveolar macrophages and their implication in pathogenesis continually recovers ground. In IPF alveolar macrophages deriving from monocytes recruited to the injured lungs are actively involved in the fibrotic process (51). Altered alveolar macrophage function in patients with LC has been recorded under the influence of tumor-associated polarizing events such as mediators and hypoxic tissue damage (52). Our study provides some insight with respect to common alveolar macrophage function in the two groups as demonstrated by the commonly reduced expression of miR-29a and miR-185. Further research is needed in order to identify BAL biomarkers for high risk patients and more targeted therapies.

Acknowledgements

The authors would like to thank the staff of the bronchoscopy unit and the members of the pathology department of the University Hospital of Heraklion.

Funding

The project was funded by a grant from the Hellenic Thoracic Society (HTS 2012).

Availability of data and materials

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Authors' contributions

EB, ET and KMA conceived and designed the study. EB, ET, CK and TG performed the experiments. EB, ET, EV, GM and AT collected patient data. EB and ET performed statistical analysis. EB, ET and KMA wrote the manuscript. DAS, NT and KMA critically reviewed and edited the manuscript. All authors read and approved the manuscript and agree to be accountable for all aspects of the research in ensuring that the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Ethics approval and consent to participate

The study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital of Heraklion (IRB no. 17030/12-12-2013 for IPF patients and Reg. no. 140/4-2-2015 for LC patients). All the patients provided informed consent in written form.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

Demetrios A. Spandidos is the Editor-in-Chief for the journal, but had no personal involvement in the reviewing process, or any influence in terms of adjudicating on the final decision, for this article.

References

- Richeldi L, Collard HR and Jones MG: Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* 389: 1941-1952, 2017.
- Antoniou KM, Hansell DM, Rubens MB, Marten K, Desai SR, Siafakas NM, Nicholson AG, du Bois RM and Wells AU: Idiopathic pulmonary fibrosis: Outcome in relation to smoking status. *Am J Respir Crit Care Med* 177: 190-194, 2008.
- Selman M and Pardo A: Revealing the pathogenic and aging-related mechanisms of the enigmatic idiopathic pulmonary fibrosis. An integral model. *Am J Respir Crit Care Med* 189: 1161-1172, 2014.
- Giopanou I, Arendt KAM and Stathopoulos GT: Lung carcinogenesis and fibrosis taken together: Just coincidence? *Curr Opin Pulm Med* 23: 290-297, 2017.
- Antoniou KM, Tomassetti S, Tsitoura E and Vancheri C: Idiopathic pulmonary fibrosis and lung cancer: A clinical and pathogenesis update. *Curr Opin Pulm Med* 21: 626-633, 2015.
- Duruissieux M and Esteller M: Lung cancer epigenetics: From knowledge to applications. *Semin Cancer Biol* S1044-579X(17)30166-9, 2017.
- Sanders YY, Ambalavanan N, Halloran B, Zhang X, Liu H, Crossman DK, Bray M, Zhang K, Thannickal VJ and Hagood JS: Altered DNA methylation profile in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 186: 525-535, 2012.
- Antoniou KM, Samara KD, Lasithiotaki I, Margaritopoulos GA, Soufla G, Lambiri I, Giannarakis I, Drositis I, Spandidos DA and Siafakas NM: Differential telomerase expression in idiopathic pulmonary fibrosis and non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 30: 2617-2624, 2013.
- Hanahan D and Weinberg RA: Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144: 646-674, 2011.
- Sarchianaki E, Derdas SP, Ntaoukakis M, Vakonaki E, Lagoudaki ED, Lasithiotaki I, Sarchianaki A, Koutsopoulos A, Symvoulakis EK, Spandidos DA, *et al*: Detection and genotype analysis of human papillomavirus in non-small cell lung cancer patients. *Tumour Biol* 35: 3203-3209, 2014.

11. Samara KD, Antoniou KM, Karagiannis K, Margaritopoulos G, Lasithiotaki I, Koutala E and Siafakas NM: Expression profiles of Toll-like receptors in non-small cell lung cancer and idiopathic pulmonary fibrosis. *Int J Oncol* 40: 1397-1404, 2012.
12. Vancheri C: Idiopathic pulmonary fibrosis and cancer: Do they really look similar? *BMC Med* 13: 220, 2015.
13. Antoniou KM, Lasithiotaki I, Symvoulakis E, Derdas SP, Psaraki A, Spandidos DA, Stathopoulos EN, Siafakas NM and Sourvinos G: Molecular pathological findings of Merkel cell polyomavirus in lung cancer: A possible etiopathogenetic link? *Int J Cancer* 133: 3016-3017, 2013.
14. Lasithiotaki I, Antoniou KM, Derdas SP, Sarchianaki E, Symvoulakis EK, Psaraki A, Spandidos DA, Stathopoulos EN, Siafakas NM and Sourvinos G: The presence of Merkel cell polyomavirus is associated with deregulated expression of BRAF and Bcl-2 genes in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 133: 604-611, 2013.
15. Vassilakis DA, Sourvinos G, Spandidos DA, Siafakas NM and Bouros D: Frequent genetic alterations at the microsatellite level in cytologic sputum samples of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 162: 1115-1119, 2000.
16. Tomassetti S, Gurioli C, Ryu JH, Decker PA, Ravaglia C, Tantalocco P, Buccioli M, Piciocchi S, Sverzellati N, Dubini A, *et al*: The impact of lung cancer on survival of idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 147: 157-164, 2015.
17. Mizuno K, Mataka H, Seki N, Kumamoto T, Kamikawaji K and Inoue H: MicroRNAs in non-small cell lung cancer and idiopathic pulmonary fibrosis. *J Hum Genet* 62: 57-65, 2017.
18. Cushing L, Kuang PP, Qian J, Shao F, Wu J, Little F, Thannickal VJ, Cardoso WV and Lü J: miR-29 is a major regulator of genes associated with pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45: 287-294, 2011.
19. Roderburg C, Urban GW, Bettermann K, Vucur M, Zimmermann H, Schmidt S, Janssen J, Koppe C, Knolle P, Castoldi M, *et al*: Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis. *Hepatology* 53: 209-218, 2011.
20. Patel V and Noureddine L: MicroRNAs and fibrosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 21: 410-416, 2012.
21. Luna C, Li G, Qiu J, Epstein DL and Gonzalez P: Role of miR-29b on the regulation of the extracellular matrix in human trabecular meshwork cells under chronic oxidative stress. *Mol Vis* 15: 2488-2497, 2009.
22. Bian EB, Li J and Zhao B: miR-29, a potential therapeutic target for liver fibrosis. *Gene* 544: 259-260, 2014.
23. Cicchini C, de Nonno V, Battistelli C, Cozzolino AM, De Santis Puzzon M, Ciafrè SA, Brocker C, Gonzalez FJ, Amicone L and Tripodi M: Epigenetic control of EMT/MET dynamics: HNF4 α impacts DNMT3s through miRs-29. *Biochim Biophys Acta* 1849: 919-929, 2015.
24. Wang Y, Zhang X, Li H, Yu J and Ren X: The role of miRNA-29 family in cancer. *Eur J Cell Biol* 92: 123-128, 2013.
25. Tsitoura E, Wells AU, Karagiannis K, Lasithiotaki I, Vasarmidi E, Bibaki E, Koutoulaki C, Sato H, Spandidos DA, Siafakas NM, *et al*: MiR-185/AKT and miR-29a/collagen 1a pathways are activated in IPF BAL cells. *Oncotarget* 7: 74569-74581, 2016.
26. Lei GS, Kline HL, Lee CH, Wilkes DS and Zhang C: Regulation of collagen V expression and epithelial-mesenchymal transition by miR-185 and miR-186 during idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 186: 2310-2316, 2016.
27. Lu ZJ, Lu LG, Tao KZ, Chen DF, Xia Q, Weng JJ, Zhu F, Wang XP and Zheng P: MicroRNA-185 suppresses growth and invasion of colon cancer cells through inhibition of the hypoxia inducible factor-2 α pathway *in vitro* and *in vivo*. *Mol Med Rep* 10: 2401-2408, 2014.
28. Li S, Ma Y, Hou X, Liu Y, Li K, Xu S and Wang J: MiR-185 acts as a tumor suppressor by targeting AKT1 in non-small cell lung cancer cells. *Int J Clin Exp Pathol* 8: 11854-11862, 2015.
29. Qadir XV, Han C, Lu D, Zhang J and Wu T: miR-185 inhibits hepatocellular carcinoma growth by targeting the DNMT1/PTEN/Akt pathway. *Am J Pathol* 184: 2355-2364, 2014.
30. Ding X, Yu C, Liu Y, Yan S, Li W, Wang D, Sun L, Han Y, Li M, Zhang S, *et al*: Chronic obstructive sleep apnea accelerates pulmonary remodeling via TGF- β /miR-185/ColA1 signaling in a canine model. *Oncotarget* 7: 57545-57555, 2016.
31. Xiao K, Luo X, Wang X and Gao Z: MicroRNA 185 regulates transforming growth factor β 1 and collagen 1 in hypertrophic scar fibroblasts. *Mol Med Rep* 15: 1489-1496, 2017.
32. Tang B, Li X, Ren Y, Wang J, Xu D, Hang Y, Zhou T, Li F and Wang L: MicroRNA-29a regulates lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory responses in murine macrophages through the Akt1/ NF- κ B pathway. *Exp Cell Res* 360: 74-80, 2017.
33. Li M, Li H, Liu X, Xu D and Wang F: MicroRNA-29b regulates TGF- β -mediated epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells by targeting AKT2. *Exp Cell Res* 345: 115-124, 2016.
34. Park S, Hur JY, Lee KY, Lee JC, Rho JK, Shin SH and Choi CM: Assessment of EGFR mutation status using cell-free DNA from bronchoalveolar lavage fluid. *Clin Chem Lab Med* 55: 1489-1495, 2017.
35. 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* 37: 743-746, 2011.
36. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, Chirieac LR, Dacic S, Duhig E, Flieder DB, *et al*: The 2015 World Health Organization Classification of lung tumors: Impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 classification. *J Thorac Oncol* 10: 1243-1260, 2015.
37. Chen Z, Xu Z, Sun S, Yu Y, Lv D, Cao C and Deng Z: TGF- β 1, IL-6, and TNF- α in bronchoalveolar lavage fluid: Useful markers for lung cancer? *Sci Rep* 4: 5595, 2014.
38. Kumar RK, O'Grady R, Maronese SE and Wilson MR: Epithelial cell-derived transforming growth factor-beta in bleomycin-induced pulmonary injury. *Int J Exp Pathol* 77: 99-107, 1996.
39. Fernandez IE and Eickelberg O: The impact of TGF- β on lung fibrosis: From targeting to biomarkers. *Proc Am Thorac Soc* 9: 111-116, 2012.
40. Eser PO and Jänne PA: TGF β pathway inhibition in the treatment of non-small cell lung cancer. *Pharmacol Ther*: Nov 10, 2017 (Epub ahead of print).
41. Shah MY, Ferrajoli A, Sood AK, Lopez-Berestein G and Calin GA: microRNA therapeutics in cancer - An emerging concept. *EBioMedicine* 12: 34-42, 2016.
42. Hayashi M, Nomoto S, Hishida M, Inokawa Y, Kanda M, Okamura Y, Nishikawa Y, Tanaka C, Kobayashi D, Yamada S, *et al*: Identification of the collagen type 1 α 1 gene (COL1A1) as a candidate survival-related factor associated with hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 14: 108, 2014.
43. Oleksiewicz U, Liloglou T, Tasopoulou KM, Daskoulidou N, Gosney JR, Field JK and Xinarianos G: COL1A1, PRPF40A, and UCP2 correlate with hypoxia markers in non-small cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 143: 1133-1141, 2017.
44. Li J, Ding Y and Li A: Identification of COL1A1 and COL1A2 as candidate prognostic factors in gastric cancer. *World J Surg Oncol* 14: 297, 2016.
45. Selman M and Pardo A: Stochastic age-related epigenetic drift in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 190: 1328-1330, 2014.
46. Langevin SM, Pinney SM, Leung YK and Ho SM: Does epigenetic drift contribute to age-related increases in breast cancer risk? *Epigenomics* 6: 367-369, 2014.
47. Lin RK, Hsu HS, Chang JW, Chen CY, Chen JT and Wang YC: Alteration of DNA methyltransferases contributes to 5'CpG methylation and poor prognosis in lung cancer. *Lung Cancer* 55: 205-213, 2007.
48. Jin B and Robertson KD: DNA methyltransferases, DNA damage repair, and cancer. *Adv Exp Med Biol* 754: 3-29, 2013.
49. Chen RZ, Pettersson U, Beard C, Jackson-Grusby L and Jaenisch R: DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature* 395: 89-93, 1998.
50. Cushing L, Kuang P and Lü J: The role of miR-29 in pulmonary fibrosis. *Biochem Cell Biol* 93: 109-118, 2015.
51. Misharin AV, Morales-Nebreda L, Reyfman PA, Cuda CM, Walter JM, McQuattie-Pimentel AC, Chen CI, Anekalla KR, Joshi N, Williams KJN, *et al*: Monocyte-derived alveolar macrophages drive lung fibrosis and persist in the lung over the life span. *J Exp Med* 214: 2387-2404, 2017.
52. Almatroodi SA, McDonald CF and Pouniotis DS: Alveolar macrophage polarisation in lung cancer. *Lung Cancer Int* 2014: 721087, 2014.

Research Paper: Immunology

MiR-185/AKT and miR-29a/Collagen 1a pathways are activated in IPF BAL cells

Eliza Tsitoura^{1,2}, Athol U. Wells³, Kostantinos Karagiannis¹, Ismini Lasithiotaki¹, Eirini Vasarmidi^{1,4}, Eleni Bibaki^{1,4}, Chara Koutoulaki¹, Hiroe Sato³, Demetrios A. Spandidos², Nikolaos M. Siafakas¹, George Sourvinos² and Katerina M. Antoniou^{1,4}

¹ Laboratory of Molecular and Cellular Pneumology, Medical School, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece

² Department of Clinical Laboratory Medicine, Laboratory of Clinical Virology, Medical School, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece

³ Interstitial Lung Disease Unit, Royal Brompton Hospital, Imperial College, SW3 6NP, London, UK

⁴ Department of Thoracic Medicine, Interstitial Lung Disease Unit, University Hospital of Heraklion, Heraklion, Crete, Greece

Correspondence to: Katerina M. Antoniou, *email:* kantonou@med.uoc.gr

Keywords: IPF, microRNA, bronchoalveolar lavage fluid, collagen, AKT, Immunology and Microbiology Section, Immune response, Immunity

Received: August 02, 2016

Accepted: October 04, 2016

Published: October 18, 2016

ABSTRACT

MicroRNA signatures of BAL cells and alveolar macrophages are currently lacking in IPF. Here we sought to investigate the expression of fibrosis-related microRNAs in the cellular component of the BAL in IPF. We thus focused on microRNAs previously associated with fibrosis (miR-29a, miR-29b, miR-29c, let-7d, and miR-21) and rapid IPF progression (miR-185, miR-210, miR-302c-3p miR-376c and miR-423-5p). Among the tested microRNAs miR-29a and miR-185 were found significantly downregulated in IPF while miR-302c-3p and miR-376c were not expressed by BAL cells. Importantly, the downregulation of miR-29a inversely correlated with the significantly increased levels of COL1A1 mRNA in IPF BAL cells. Collagen 1 a was found mainly overexpressed in alveolar macrophages and not other cell types of the BAL by immunofluorescence. In view of the downregulation of miR-185, we tested the response of THP-1 macrophages to profibrotic cytokine TGF β and observed the downregulation of miR-185. Conversely, proinflammatory stimulation lead to miR-185 upregulation. Upon examination of the mRNA levels of known miR-185 targets AKT1, DNMT1 and HMGA2, no significant correlations were observed in the BAL cells. However, increased levels of total AKT and AKT^{ser473} phosphorylation were observed in the IPF BAL cells. Furthermore, miR-185 inhibition in THP-1 macrophages resulted in significant increase of AKT^{ser473} phosphorylation. Our study highlights the importance of BAL microRNA signatures in IPF and identifies significant differences in miR-185/AKT and miR-29a/collagen axes in the BAL cells of IPF patients.

INTRODUCTION

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a severe, under diagnosed lung disease characterized by an irreversible and progressive loss of lung capacity, rapidly leading to respiratory failure and increased mortality [1]. Survival rates from the time of diagnosis are comparable to those of inoperable pulmonary malignancies and until recently, evidence of a treatment option that could modify the disease course was lacking [1]. Recent advances in the understanding of IPF pathogenesis suggest that

aberrant wound healing, defective re-epithelisation, fibroblast to myofibroblast transition, coupled to hyperplastic pneumocytes at the fibroblastic foci and excess accumulation of extracellular matrix components recapitulate the processes leading to the destruction of the lung architecture [2].

The identification of biomarkers in serum and bronchoalveolar lavage BAL is a growing field of research in pulmonary diseases [3]. BAL is a mildly invasive method, which allows the recovery of soluble and cellular components lining the alveolar epithelium. Alveolar

macrophages constitute more than 70% of the cellular component in IPF which makes BAL ideal for their study [4]. In patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), the alveolar epithelium lining fluid contains mediators that alter fibroblast activity, such as CCL18, LPA, TGF- β and PDGF [5, 6]. Alveolar macrophages are regulated by these factors and participate in the perpetuation of the fibrotic process [7]. MicroRNAs, small non-coding RNAs contributing to the epigenetic regulation of gene expression, provide expression signatures characterizing epithelial and fibroblast function in whole tissue or cell type-specific studies [8]. However, the serum microRNA signature in IPF is characterized in only one study [9], with no reported BAL data.

MicroRNAs directly involved in fibrosis, myofibroblast proliferation and excessive extracellular matrix deposition include miR-21 and members of the miR-29 and let-7 families [8]. MiR-21 expression is enhanced in IPF fibroblasts and epithelial cells, as also seen in malignant disease [10]. The miR-29 family is among the first microRNAs found downregulated in fibrotic diseases of the lungs, heart and liver. MiR-29 acts through the inhibition of ECM, including collagens, as well as enzymes that regulate collagen synthesis, crosslinking and degradation [11]. Based on previous reports, microRNAs of particular interest in IPF pathogenesis miR-210, miR-185, miR-302c-3p, miR-376c and miR423-5p are differentially expressed in slow and rapid IPF progression [12].

MicroRNA expression in IPF has been extensively studied in the context of epithelial and fibroblast function using whole tissue or cell type-specific studies. However, little is known about their expression in alveolar macrophages. In the present study, we focused on the expression of the microRNAs listed above in BAL cells from patients with IPF. We observed that the miR-29/

collagen1a axis was affected. Furthermore, we identified a significant downregulation of miR-185, shown to be biologically significant by an associated enhanced activation and expression of AKT.

RESULTS

Patient demographics

The main characteristics of the patients and lung function results for the IPF and control groups are shown in Table 1. There was no difference in gender, whereas the IPF patients were significantly older than the healthy subjects (mean age 65.4 vs. 48.2 years, respectively, $p < 10^{-3}$). Additionally, there were more current smokers in the control group, while there were more former smokers in the IPF group ($p < 10^{-3}$). Predictably, lung function tests showed impaired lung function in the patients with IPF.

MiR-29a and miR-185 expression is reduced in IPF relative to control specimens.

MicroRNA expression levels in BAL cells were measured by qRT-PCR and normalized using two endogenous controls, the small nuclear RNA RNU6B and small nucleolar RNA RNU19. There was a statistically significant downregulation of miR-29a and miR-185 in IPF, compared to controls following analyses using REST2009 software (Figure 1, Table 2). MiR-29a and miR-185 as well as miR-29c, miR-21, let-7d, and miR-423-5p showed significant downregulation according to Wilcoxon Signed Rank test (Table S2). MiR-302c-3p and miR-376c were not expressed by the BAL cells.

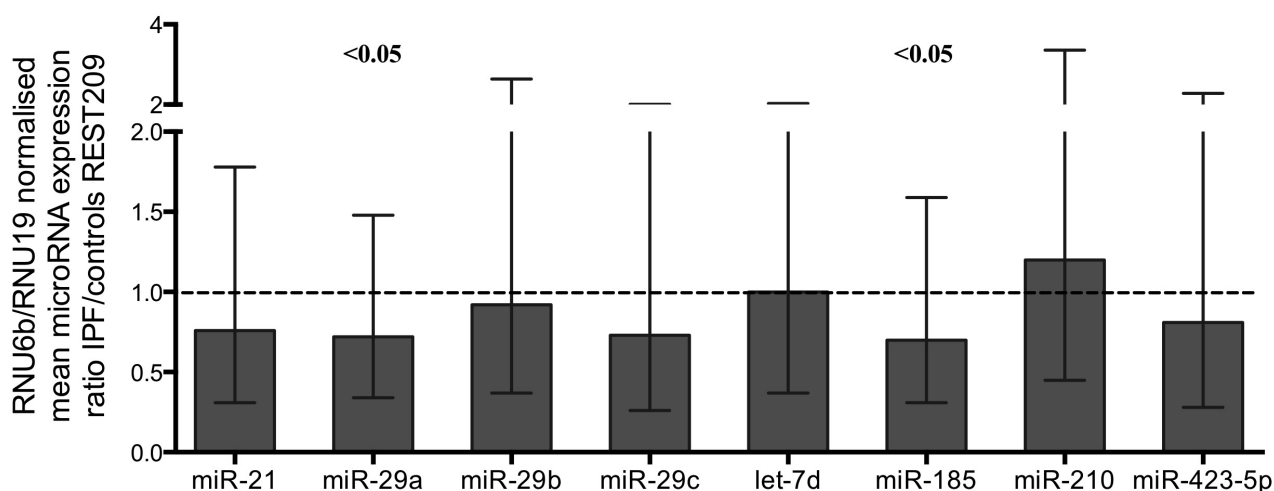


Figure 1: MicroRNA expression ratios in IPF relative to controls. Normalized by two reference assays RNU6B and RNU19. MicroRNAs miR-29a and miR-185 showed significant difference in IPF. Boxes represent mean and error bars standard error of mean. Complete REST2009 report in supplementary file 2.

Table 1: Patient characteristics

Demographics	Controls (N=17)	IPF (N=45)	p value
Age (years)	48.2 ± 3.2	65.4 ± 1.8	<10 ⁻³
Gender			
male	13	37	0.721
female	4	8	
Smoking status			
non smoker	2	16	<10 ⁻³
ex smoker	3	24	
smoker	9	2	
PY	36.0 ± 5.7	39.1 ± 7.1	0.764
Lung Function			
FEV1%	92.7 ± 6.0	73.7 ± 3.1	0.009
FVC%	94.0 ± 5.4	71.6 ± 3.3	0.003
FEV1%/FVC%	79.7 ± 2.0	79.5 ± 1.2	0.938
TLC%	101.6 ± 7.7	67.6 ± 2.5	<10 ⁻³
DLco%	79.2 ± 5.5	43.4 ± 2.3	<10 ⁻³
KCO%	103.6 ± 8.1	77.5 ± 3.2	0.014
BAL cell count			
Macrophages %	69 ± 8	73 ± 3	0.83
Lymphocytes %	24.3 ± 7.6	14.1 ± 2.7	0.17
Neutrophils %	3.7 ± 1.4	6.8 ± 1	0.12
Eosinophils %	0.8 ± 0.4	3.2 ± 0.6	0.04

footnote: Values are the means ± SEM. PY=pack years for ex and current smokers; FEV1= Forced expiratory volume in 1 second; FVC= Forced Vital Capacity; TLC= Total Lung Capacity; DLco= Transfer factor of the Lung for Carbon Monoxide; KCO= transfer coefficient.

In IPF, fibrosis and progression-related microRNAs were largely co-expressed, as demonstrated by the strong positive correlations shown in Table 3. In particular, miR-185 expression strongly positively related with the expression of let-7d, miR-29a, miR-29b, miR-29c, and miR-21.

Reduced microRNA expression correlates with disease severity and eosinophil infiltration.

Diffusing capacity of the lungs for carbon monoxide (DLco), which is impaired in IPF, positively related to the reduced levels of miR-29a levels (Rs = 0.33, p<0.05) and miR-29c levels (Rs = 0.36, p=0.03). MiR-185 expression was not significantly linked to DLco (Table S3). Additionally none of the microRNAs tested was associated with patient survival.

The presence of rare eosinophils in the BAL is

common in IPF (Table 1) and has been related to disease severity. BAL eosinophil percentages were strongly negatively related to the expression of miR-210 and were also negatively related to miR-423-5p, let7d, miR-21 and miR-29a expression but not to miR-185 (Table 4). These relationships remained significant in separate stepwise multiple linear regression model, in which each individual micro-RNA was examined in a separate model, with age, smoking status, DLco levels and BAL cellular profiles included as covariates.

BAL lymphocyte levels were positively related to miR-210 (Rs = 0.40, p<0.01) and miR-423-5P (Rs = 0.44, p<0.005) but relationships were not significant in multiple linear regression models. There were no significant relationships between microRNA expression and BAL neutrophil or macrophage levels.

BAL cells from IPF patients displayed a profibrotic profile with miR-29a downregulation and collagen 1a overexpression.

MiR-29a downregulation has been associated with increased collagen expression in IPF tissues and animal models of fibrosis however, it is not known if this also occurs in alveolar macrophages. We examined collagen expression by RT-PCR and immunofluorescence and showed that COL1A1 mRNA levels were significantly increased in IPF BAL cells, compared to controls (p=0.003) (Figure 2a). In IPF, COL1A1 mRNA levels inversely correlated with the expression of miR-29a (Rs = -0.42, p = 0.005). Collagen1a1 protein levels were measured by immunofluorescence. Alveolar macrophages were positively stained with anti-collagen1a1 antibody both in controls and IPF BAL samples. However, in IPF BAL samples alveolar macrophages showed significantly higher cytoplasmic collagen staining than the controls (Figure 2b-d).

MiR-185 inhibition results in AKT activation in macrophages.

MiR-185 was significantly downregulated in IPF BAL cells. The miR-185 reported mRNA targets, AKT1, DNMT1 and HMGA2 were not upregulated (Figure S1a-c) nor did they show any correlation with miR-185 expression. However, in IPF, AKT protein levels are strikingly elevated and activated as shown by the pAKT^{ser473} levels (Figure 3, Figure S2). It is noteworthy that in contrast to miR-185, miR-21 and let-7d inversely correlated with their reported target HMGA2 in the BAL (Rs = -0.36, p = 0.016 for miR-21 and Rs = -0.347, p=0.023 for let-7d).

A specific fluorescent miR-185 antagomir was used in order to test the effects of miR-185 inhibition on macrophages. As a macrophage cell culture model,

Table 2: microRNA expression ratios in IPF relative to controls.

	Expression Ratio ^a	SE range	P ^b
miR-21	0.76	0.31-1.78	0.11
miR-29a	0.72	0.34-1.48	0.045
miR-29b	0.92	0.37-2.64	0.74
miR-29c	0.73	0.26-2.01	0.20
let-7d	1.00	0.37-2.03	0.99
miR-185	0.70	0.31-1.59	0.040
miR-210	1.20	0.45-3.36	0.40
miR-423-5p	0.81	0.28-2.28	0.33
miR-302c-3p	NE	-	-
miR-376c	NE	-	-

^a : Expression Ratio represents the concentration of microRNA of interest divided by the geometric mean of the concentrations of the two reference assays RNU6B and RNU19. Concentration of each microRNA equals the efficiency of the PCR reaction to the power of the average Ct of controls minus the average Ct of IPF patients.

^b: Probability of alternate hypothesis that difference between sample and control groups is due to chance according to REST2009. SE standard error, NE: Not expressed.

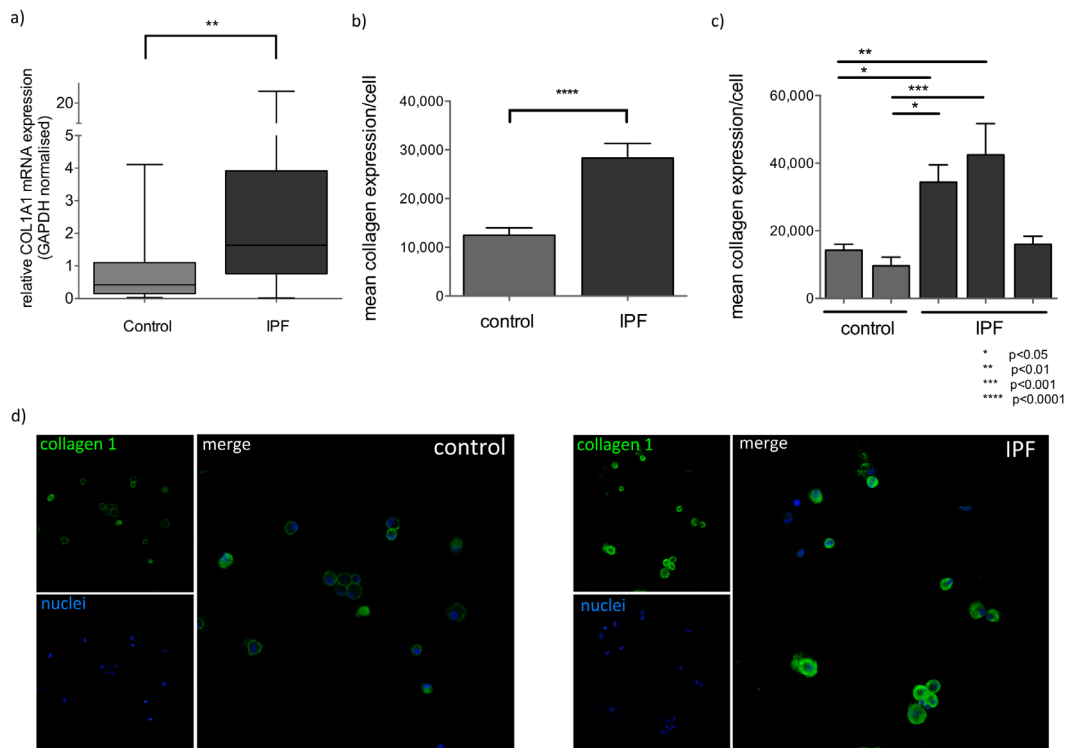


Figure 2: Collagen 1 expression is elevated in IPF BAL. a) Expression of COL1A1 mRNA, normalized by GAPDH in control and IPF samples, (**:p<0.01, p value, Mann-Whitney test). Box plots represent median, 25 and 75 percentiles and error bars correspond to minimum and maximum values. b) Quantification of mean collagen 1a1 expression per cell in alveolar macrophages expressed by mean pixel intensity multiplied by positive pixels (excluding background)/cell analyzed collectively from 3 IPF and 2 control measurements. (****:p<0.0001 unpaired t-test). c) Mean collagen 1a1 expression per cell per BAL sample (*:p<0.05, **:p<0.01, ***:p<0.001 ordinary one way ANOVA). Error bars represent standard deviations. d) Representative confocal images of Control and IPF BAL cells stained with anti-Collagen 1a1(green) and DNA specific dye (blue) at 40x magnification.

Table 3: Spearman's correlation of microRNA expression in IPF BAL.

	miR-29b	miR-29c	miR-21	let-7d	miR-185	miR-210	miR-423-5p
miR-29a	0.65 ($<10^{-5}$)	0.64 ($<10^{-5}$)	0.78 ($<10^{-9}$)	0.54 (0.0001)	0.64 ($<10^{-5}$)	0.44 (0.002)	0.59 ($<10^{-4}$)
miR-29b		0.60 ($<10^{-4}$)	0.68 ($<10^{-6}$)	0.42 (0.005)	0.66 ($<10^{-5}$)	NS	0.37 (0.01)
miR-29c			0.54 (0.0001)	0.44 (0.0001)	0.65 ($<10^{-5}$)	0.49 (0.0005)	0.57 ($<10^{-4}$)
miR-21				0.54 (0.0001)	0.63 ($<10^{-5}$)	0.40 (0.007)	0.54 (0.0001)
Let-7d					0.71 ($<10^{-7}$)	0.41 (0.005)	0.40 (0.007)
miR-185						0.42 (0.004)	0.56 ($<10^{-4}$)
miR-210							0.76 ($<10^{-8}$)

Values are Rs correlation coefficient and in parentheses are p values. NS= not statistically significant

Table 4: Correlations of microRNA expression with eosinophil % within IPF group

MicroRNA	Statistical significance in multiple linear regression models ^a		
	Spearman's r	p	p
miR-21	-0.32	0.03	<0.001
miR-29a	-0.34	0.03	0.02
miR-29b	0.12	NS	NS
miR-29c	-0.25	NS	NS
let-7d	-0.42	0.005	<0.001
miR-210	-0.66	<0.0001	<0.001
miR-185	-0.21	NS	NS
miR-423-5p	-0.55	0.0001	0.03

^aThe independent relationships between microRNA levels and BAL eosinophil percentages in stepwise multiple linear regression models, with age, smoking status, DLCO levels, BAL neutrophil levels and BAL lymphocyte levels included as covariates.

PMA activated THP1 cells were used. Two different concentrations of control-nonspecific microRNA and the specific miR-185 antagomir were used and transfection efficiency was verified using fluorescent microscopy (Figure S3). MiR-185 transient inhibition resulted in a moderate but significant increase in AKT1 mRNA levels with no significant effect on other miR-185 direct or indirect targets such as DNMT1, HMGA2 or PTEN respectively (Figure 4a). Importantly, however, miR-185 inhibition resulted in a significant increase in pAKT^{Ser473} levels (Figure 4b and c), while total AKT levels remained unchanged (Figure 4b-d).

TGFb is an inhibitor of miR-185 in macrophages.

We also examined the changes in miR-185 expression following exposure of PMA treated THP1 cells to fibrotic/anti-inflammatory TGFb1 or pro-inflammatory LPS stimuli. Our results showed that miR-185 was downregulated by TGFb1 at 1ng/ml following 16 hours of exposure (Figure 5a). MiR-185 was conversely upregulated by LPS at 0.1ng/ml concentration following 16 hours of exposure (Figure 5b).

DISCUSSION

This is the first BAL study of the expression of key microRNAs involved in fibrosis, such as miR-21, miR-29a, miR-29b, miR-29c, and let-7d, as well as miR-185, miR-210, miR-302c-3p miR-376c and miR-423-5p differentially expressed in rapid IPF progression in the BAL cells of IPF patients [8, 12-14]. Two major microRNA controlled pathways were found to be differentially regulated in IPF BAL cells; the well-documented fibrogenic miR-29a/Collagen axis and the miR-185/AKT pathway, previously unrecognized in pulmonary fibrosis.

MiR-185 was significantly downregulated in IPF BAL cells relative to controls. Mir-185 was initially reported to be upregulated in rapidly progressing IPF [12] but in later studies, miR-185 downregulation was demonstrated in IPF lungs, compared to controls [15, 16]. MiR-185 downregulation is associated with the deregulation of cell cycle and cell proliferation in non-small cell lung cancer and hepatocellular carcinoma [17, 18]. Specifically, downregulation of miR-185 results in the activation of AKT via increased DNMT1 expression, leading to promoter hypermethylation and silencing of PTEN [18]. Additionally, miR-185 directly binds and degrades the 3'UTR of AKT1 mRNA [17].

In BAL cells there was no correlation between mRNA levels of AKT1, DNMT1 or PTEN and miR-185 levels. However, we observed an overexpression of AKT protein in IPF that was coupled to increased activation demonstrated by AKT^{Ser473} phosphorylation. The observed increased AKT activation in BAL cells is in agreement

with previously reported elevated basal levels of PI3K activity [19] and consistent also with the increased anti-apoptotic profile of IPF macrophages [20]; AKT is activated by P13K phosphorylation and subsequently functions as a serine/threonine kinase involved in multiple cellular processes including cell proliferation, inflammation, survival and glucose metabolism [21]. IPF fibroblast cultures also display a hyper activation of AKT leading to increased viability in collagen-rich matrices [22, 23]. Furthermore, a very recent study implicates AKT1 activation in the production of TGF- β by alveolar macrophages in the context of pulmonary fibrosis [24].

Importantly, AKT overexpression in IPF macrophages might also participate in the deregulation of the innate defense mechanisms of alveolar macrophages such as inflammasome activation [25] and antiviral responses [26] previously proposed by our group. AKT activation dampens the response of monocytes to LPS [27] and deletion of AKT1 in animal models of *S. aureus* lung infection results in stronger pro-inflammatory responses leading to a reduced bacterial burden [27]. Thus, increased AKT activity in IPF macrophages, observed in our study, may contribute to an increased microbial burden, which, in IPF microbiome analyses, is predictive of decline in lung function and death [28].

As the role of miR185 on AKT has not been studied in macrophages, we tested the effect of miR-185 inhibition in an *in vitro* macrophage cell culture model of PMA activated THP1 cells. The transient inhibition of miR-185 resulted in a modest but statistically significant upregulation of AKT1 mRNA and the potent activation of AKT as demonstrated by the phosphorylation of AKT^{Ser473},

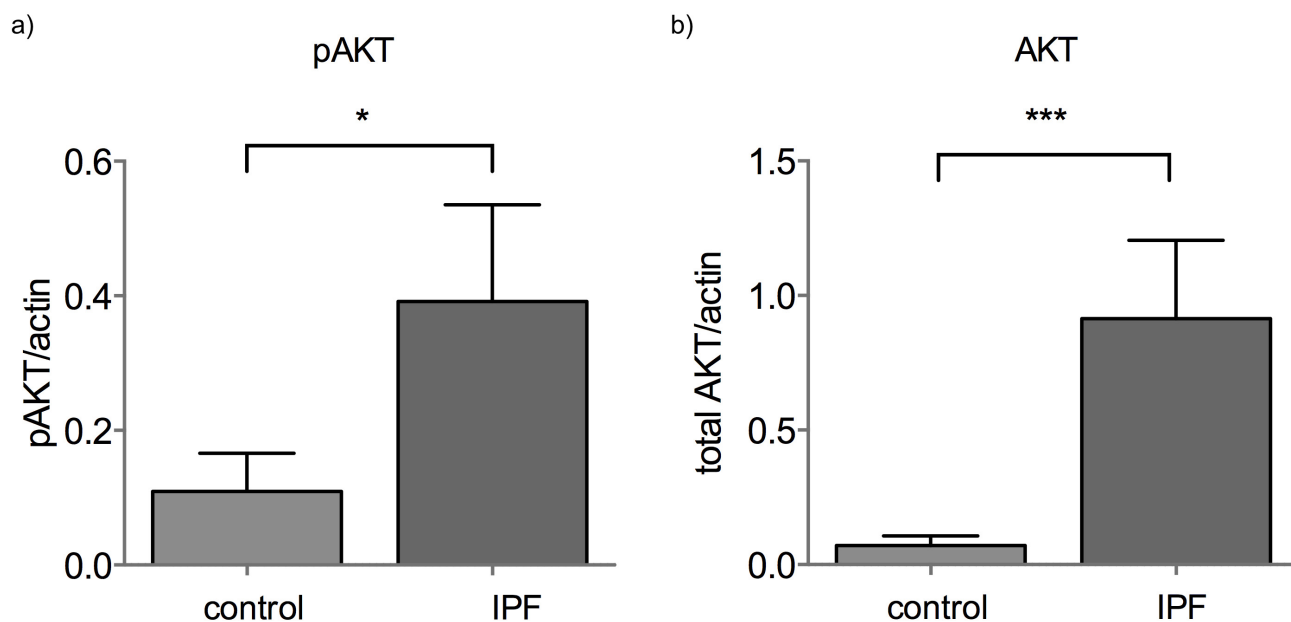


Figure 3: AKT and pAKT levels are elevated in IPF BAL. a) AKT1 and b) pAKT^{Ser473} protein levels normalized by actin in control and IPF BAL samples (*:p<0.05, ***:p<0.005 p value, Mann-Whitney test).

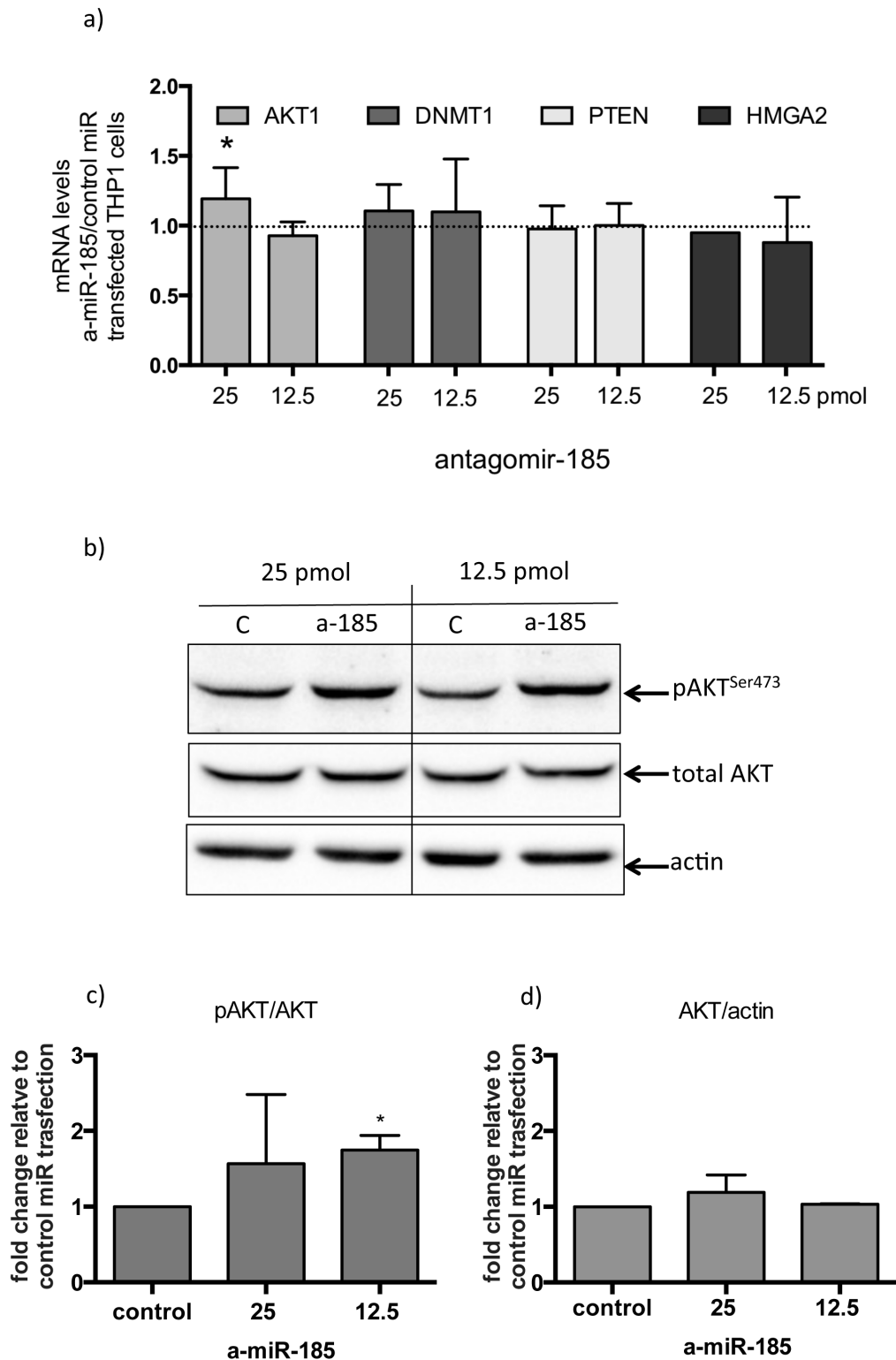


Figure 4: Inhibition of miR-185 in THP-1 cells treated with PMA, results in AKT activation. a) fold changes in expression of AKT1, DNMT1, PTEN and HMGA2 mRNA in 25 or 12.5 pico-molar concentrations of antagoniR-185 RNA transfected THP1 cells relative to control transfection. (*:p<0.05 of one sample t-test). b) pAKT^{Ser473} and total AKT1 protein levels in 25 or 12.5 pmol concentrations of control miR (c) and antagoniR-185 (a-185) transfected THP1 cells. c) and d) Densitometry analysis of three independent transfection experiments of pAKT^{Ser473} relative to total AKT1 and total AKT relative to actin respectively. (*:p<0.05 of one sample t-test). Boxes represent mean and error bars are standard deviations

while we did not observe an effect on DNMT1 and PTEN mRNA levels. This suggests that AKT phosphorylation by miR-185 downregulation is regulated by additional factors, which are currently under investigation. However, since miR-185 inhibition alone was sufficient to activate AKT in macrophages *in vitro*, we propose that miR-185 downregulation observed in the BAL cells may contribute to the activation of the AKT signaling pathway in IPF.

In BAL fluid cells, miR-29a was significantly downregulated. Additionally, the reduction in miR-29a and miR-29c expression was significantly associated with reduced DLco levels. Members of the miR-29 family are considered major regulators in pulmonary fibrosis and may have a future therapeutic role, based on evidence of anti-fibrotic effects with miR-29 administration in mice [37]. Furthermore, miR-29a downregulation correlated with the overexpression of the collagen gene COL1A1 suggesting that the miR-29a/COL1A1 pathway is also active in IPF BAL cells, as previously demonstrated in IPF tissues [11]. Mir-29a downregulation and COL1A1 upregulation is consistent with the skewing of macrophages towards a previously reported alternative-activation and pro-fibrotic phenotype [7, 19, 29, 30]. Regarding the expression of collagen by macrophages in particular, a previous study in mice showed that upon AEC II-induced apoptosis, exudate macrophages and their precursors, Ly-6c^{high} monocytes, accumulate in the affected areas, adopting an alternative activation with IL-13, TGFβ and, notably, Collagen 1 expression [30]. Therefore, provided that our results are validated in other IPF cohorts, BAL miR-29a/COL1A1 expression levels may represent an informative IPF biomarker.

Additionally, we observed strong positive correlations between levels of miR-29 family members and miR-185 expression. In IPF fibroblasts, the negative feedback signaling induced by polymerized collagen fibers on ECM production and cell proliferation is defective and concomitantly miR-29a is abnormally further downregulated coupled to collagen overexpression [22]. In alveolar macrophages from IPF patients, exogenous collagen treatment also results in the activation of PI3K activity suggesting a positive feedback loop in IPF by collagen through the PI3K/AKT pathway. It is conceivable that miR-185 downregulation participates in the perpetuation of AKT over-activation that may further enhance miR-29 family downregulation and collagen overexpression. A recent report has shown that miR185 directly targets Collagen V mRNA [16]. Our results show that miR-185 expression is also reduced by TGFb1 similarly to fibrosis related microRNAs miR-29a [31] and Let-7d [32]. Conversely pro-inflammatory stimulation of macrophages with LPS resulted in an upregulation of miR-185 expression. This is consistent with the upregulation of miR-185 in acute lung injury models [33]. Although it is not known whether miR-185 and miR-29 are transcriptionally co-regulated, there is evidence to suggest that histone deacetylation by HDAC4 regulates both molecules [33, 34], while HDAC4 is also downregulated by TGF-β [35]. Thus, the miR-185 and miR-29a pathways may converge in AKT activation following TGF-β signaling.

Our results demonstrated that in the BAL cells, in agreement with previous studies using tissue samples [12], there was an overall decrease in the transcription of

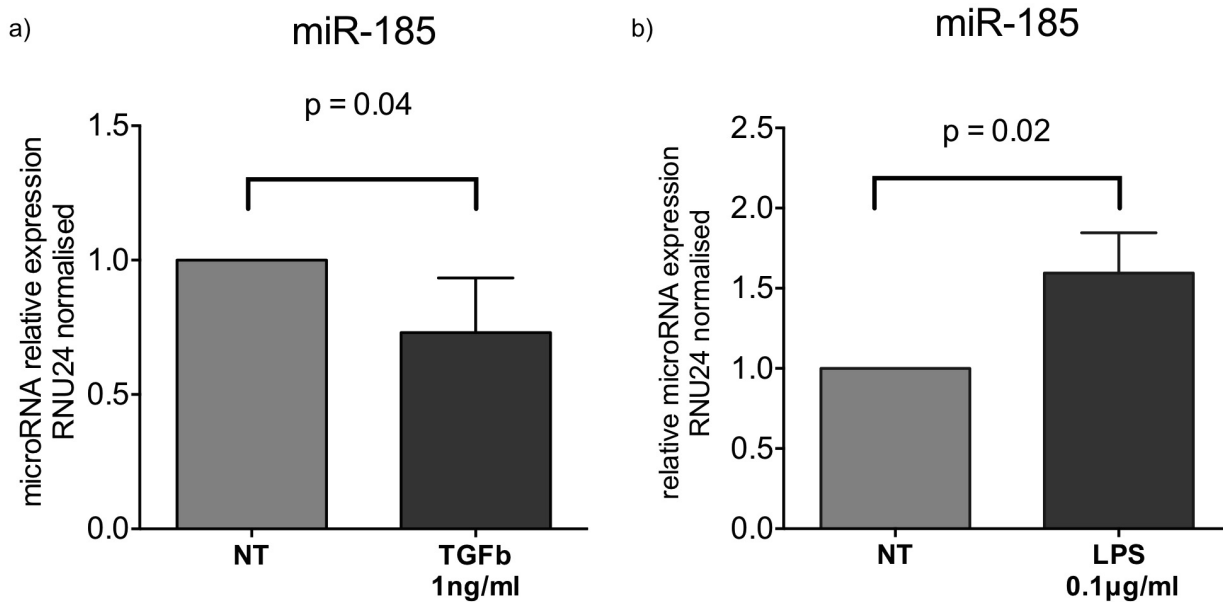


Figure 5: Fold changes in expression of miR-185 following a) TGFb1 stimulation at 1ng/ml or b) LPS at 0.1ng/ml of PMA treated THP1 cells for 16 hours. (*:p<0.05 of one sample t-test). Boxes represent mean and error bars are standard deviations.

microRNAs. Interestingly the reduction in the expression of miR-210, miR-423-5p, let7d, miR-21 and miR-29a in BALF cells correlated with the infiltration of eosinophils. In IPF, elevated bronchoalveolar lavage eosinophil counts and ECP levels are associated with more rapid progression of disease [36, 37]. The higher BAL eosinophil levels observed in fibrotic idiopathic interstitial pneumonia, when compared with scleroderma lung, a less progressive disorder, indicate that an eosinophilic influx may be linked to the pathogenesis of the disease [38].

Notably, miR-21 previously reported to increase in IPF lungs [13, 14], was actually downregulated in BAL cells. Our results therefore highlight similarities in IPF microRNA profiles between the BAL cellular component and lung tissue as demonstrated by miR-29a downregulation but also striking differences such as the reduced expression of miR-21. These results suggest that BAL microRNA signatures are unique relative to the whole tissue signatures, albeit not surprisingly as the cellular composition of the two compartments is distinct. This is probably reflected in the reduced expression of miR-21 in the BAL cells. MiR-21 upregulation in macrophages/monocytes is commonly associated with pro-inflammatory stimulation by viruses, bacteria and other “danger associated molecular patterns” and plays an important role in the orchestration and eventually containment of the innate immune process [39]. The lack of miR-21 upregulation in the BAL cells is therefore in accordance with increased pro-fibrotic as opposed to pro-inflammatory macrophages in IPF. Since miR-21 is also an indirect regulator of AKT activity through the targeting of PTEN further work is needed in order to delineate the complex cross talk between miR-21 and AKT activation in alveolar macrophages in IPF. Our results show that BAL cell transcriptional signatures merit further characterization with more high-throughput approaches, a major limitation of our study, in order to validate not only its diagnostic and prognostic value but also the putative role of alveolar macrophages in the pathogenesis of IPF.

Although current thinking in IPF pathogenesis emphasizes the role of epithelial-fibroblast cell interactions, innate immune cells, such as macrophages neutrophils and eosinophils play a paramount role in the deregulation of the wound healing process. Our study provides novel evidence of the involvement of the miR-185/AKT pathway in IPF BAL cells, and provides support for the use of miR-29a and miR-185 as BAL IPF biomarkers.

MATERIALS AND METHODS

Human Subjects

BAL samples from sixty-two subjects, consisting of patients with IPF (n=45) and healthy control subjects (n=17) were analysed. Twenty-seven IPF patients were diagnosed at the Interstitial Lung Disease Unit, Royal Brompton Hospital, Imperial College, London, UK and the remaining eighteen IPF patients and seventeen healthy control subjects were recruited from the Department of Thoracic Medicine, University Hospital of Heraklion, Crete, Greece. Patients and control subjects were classified as current smokers, former smokers (defined as having smoked a minimum of one cigarette a day for a minimum of 1 year, stopping at least 6 months before presentation) or non-smokers. All patients were evaluated with complete pulmonary function tests (PFTs), performed within 1 month of CT, including spirometry, measurement of lung volumes and diffusion capacity. Spirometry, lung volumes using the helium-dilution technique and DLco (corrected for haemoglobin) using the single breath technique were performed using a computerized system (Jaeger 2.12; MasterLab, Würzburg, Germany). Predicted values were obtained from the standardized lung function testing of the European Coal and Steel Community, Luxembourg (1993). Pulmonary function tests, FEV₁, FVC, and DLco corrected for hemoglobin concentration, expressed as percentages of the predicted normal values. The diagnosis of IPF was based on open or video-assisted thoracoscopic biopsy, with all biopsies reviewed by the same two histopathologists, or using ATS/ERS clinical and HRCT criteria [40]. In accordance with the aforementioned criteria, any known cause of pulmonary fibrosis, such as a systemic connective tissue disorder, was excluded by both immunologic screening and rheumatologic clinical evaluation [40]. All IPF patients were newly diagnosed and had not received previous treatment. The control subjects were patients undergoing bronchoscopy for the investigation of haemoptysis, without any overt pulmonary comorbidities and with normal bronchoscopic findings and cytology results. The study was approved by the Ethics Committees of the University Hospital of Heraklion (IRB number: 17030) and the Royal Brompton Hospital (REC reference 13/LO/0857).

BAL cell isolation and determination of cellular composition

BAL was obtained from all patients as previously described [25, 41]. 1-1.5 million cells were homogenised in TriReagent™ (MBL) for total RNA, or RIPA buffer (Invitrogen) containing protease and phosphatase inhibitors (Pierce) for Western blot protein analysis,

followed by storage at -80°C. Differential cell population count was analysed following May-Grunewald-Giemsa staining as described in [41].

microRNA and mRNA expression levels analyses

Total RNA was isolated using the mirVana™ miRNA isolation kit (Ambion) with minor modifications. 350µl of TriReagent (MBL) was used for cell lysis and storage of samples, followed by addition of 350µl of mirVana™ cell lysis solution and 35µl of mirVana™ microRNA additive. All further steps for the isolation of total RNA were performed as recommended by the manufacturer. Quality and quantity of isolated RNA was assessed by agarose gel electrophoresis and spectrophotometry (Nanodrop) respectively. For the analysis of microRNA expression levels, 10ng of total RNA were used in reverse transcriptase and real time qPCR reactions using the TaqMan™ microRNA assays (Life Technologies) and 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems). For gene expression analyses, 500ng of total RNA were treated with DNAfree (Ambion) for genomic DNA contamination removal, followed by 1st strand cDNA synthesis using Maxima RT™ (Fermentas) and real time qPCR analysis using Maxima SYBR Green qPCRmix (Fermentas) on Mx3005P qPCR system (Agilent Technologies). Probe and primer sequences are summarized in Supplementary Table 1. RNU6B and RNU19 levels were used as endogenous controls for the normalization of microRNA expression levels in BALF samples. GAPDH levels were used as endogenous control for the normalization of mRNA expression levels in BALF samples.

Antagomir-185 transfection of THP-1 cells

THP-1 cells were cultured in RPMI-1640 (Biosera) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Biosera) and 1% penicillin-streptomycin in a humidified incubator at 37°C containing 5% CO₂. 5 x 10⁵ THP-1 cells were treated with PMA at 50ng/ml final concentration in 2% FCS supplemented RPMI-1640 for 16 hours, followed by addition of Lipofectamine 2000 (complexes with 25 or 12.5 pmol of miR-185 specific antagomir (Exiqon) or scramble control (Exiqon) in serum free RPMI-1640 for 4 hours. Subsequently cells were supplemented with RPMI-1640 containing 2% FCS for 24 hours prior to cell lysis for total RNA extraction or total protein analysis.

SDS-PAGE and Western blot analysis

Total protein lysates (20ng) of BAL samples or THP-1 transfected cells were lysed with RIPA lysis buffer supplemented with protease and phosphatase inhibitors

for phosphoprotein and total protein analyses. Lysates were separated in 12% SDS-PAGE, transferred to 0.45nm nitrocellulose membrane (Biorad), followed by Western blot detection of pAKT^{Ser473}, total AKT and b-actin, with anti-pAKT^{Ser473} antibody #9271, (Cell Signaling), anti-AKT antibody # 9272 (Cell Signaling) and anti-b-actin monoclonal antibody (Chemicon). Appropriate HRP conjugated secondary antibodies (Chemicon) were used and immunodetection was performed with enhanced chemiluminescence reagent Luminata™ (Millipore). Bands were visualised with the ChemiDoc XRS+ system (Biorad) and densitometry analyses were performed using Image Lab™ software (Biorad).

TGFb1 and LPS treatments

2 x 10⁶ THP-1 cells cultured in RPMI-1640 (Biosera) supplemented with 2% FCS (Biosera) and 1% penicillin-streptomycin in a humidified incubator at 37°C containing 5% CO₂ were treated with PMA at 50ng/ml final concentration for 16 hours prior to the addition of TGFb1 #100-21(PeproTech) or LPS (SIGMA) for the indicated concentrations and time points. Cells were subsequently lysed in TriReagent™ (MBL) for total RNA extraction or RIPA lysis buffer supplemented with protease and phosphatase inhibitors for phosphoprotein and total protein analyses.

Collagen1a1 immunofluorescence

BAL cell cytopins obtained as previously described in [41] were fixed with 4% formaldehyde PBS and labeled with anti-collagen1a1 polyclonal antibody PA2140-1 (Boster Biological Technology) followed by anti-rabbit alexa488-conjugate (Molecular Probes). Nuclei were stained with alexa-633-ToPro (Molecular Probes). Images were acquired with Leica Confocal Microscope at 40x magnification. Quantification of collagen 1a1 expression was performed with ImageJ software. Mean pixel intensity x pixels (excluding background)/cell in 4 independent fields per sample were analysed by ordinary one way ANOVA for 3 IPF BAL samples and 2 controls. Collectively IPF and control measurements were analyzed by unpaired t-tests.

Statistical analysis of mRNA and microRNA expression

MicroRNA and mRNA expression analysis between control and IPF groups were performed using the REST 2009 (QIAGEN [42]) software following incorporation of average (duplicates) Ct values and relative efficiency values calculated using standard curves for each microRNA or mRNA assay. Furthermore,

relative expression values per sample for each microRNA or mRNA assay studied were calculated by the Pfaffl method using as calibrator sample the mean of all average Ct values [42]. Analysis of expression values with lung function tests and BAL cell population percentages was hence performed with STATA software (STATA data analysis software; Computing Resource Center) and Prism 6 software. Group comparisons were made by analysis of variance, Student *t* test, Wilcoxon rank-sum test, or chi-square testing as appropriate. *P* values lower than 0.05 were considered statistically significant.

Abbreviations

IPF Idiopathic Pulmonary Fibrosis
CPI Composite Physiologic Index
HRCT High Resolution Computed Tomography
FEV₁ forced expiratory volume in one second
FVC forced vital capacity
DLco diffusing capacity for carbon monoxide
NS not significant
BAL Bronchoalveolar Lavage
miRNA microRNA
COL1A1 collagen 1a1
LPA Lysophosphatidic acid
TGFβ transforming growth factor beta
PDGF *Platelet-derived growth factor*
DNMT1 DNA methyltransferase 1
HMGA2 High Mobility Group AT-Hook 2

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Anna Psaraki for technical assistance.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest in relation to this article.

FUNDING

Eliza Tsitoura was funded by the European Commission FP7 program “Translational Potential” (TransPOT; EC contract number 285948). This study was funded by the Annual Research Grant of the Hellenic Thoracic Society HTS-2013. This study was also supported by the NIHR Respiratory Disease Biomedical Research Unit at the Royal Brompton and Harefield NHS Foundation Trust and Imperial College London. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Author contributions

Eliza Tsitoura participated in the design of the study, performed experiments, analysed results and wrote the manuscript. Athol U. Wells provided patient samples performed statistical analyses and wrote the manuscript. Konstantinos Karagiannis, Ismini Lasithiotaki, Eirni Vasarmidi, Eleni Bibaki, Hiroe Sato collected patient RNA samples and demographic data. Chara Koutoulaki performed experiments. Demetrios A. Spandidos and Nikolaos M. Sifakas revised the manuscript. George Sourvinos designed the study and revised the manuscript. Katerina M. Antoniou designed the study, provided patients samples and revised the manuscript.

REFERENCES

1. Antoniou KM, Symvoulakis EK, Margaritopoulos GA, Lionis C and Wells AU. Early diagnosis of IPF: time for a primary-care case-finding initiative? *The Lancet Respiratory medicine*. 2014; 2(1):e1.
2. Wynn TA. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. *J Exp Med*. 2011; 208(7):1339-1350.
3. Bargagli E, Prasse A, Olivieri C, Muller-Quernheim J and Rottoli P. Macrophage-derived biomarkers of idiopathic pulmonary fibrosis. *Pulmonary medicine*. 2011; 2011:717130.
4. Wells AU. The clinical utility of bronchoalveolar lavage in diffuse parenchymal lung disease. *European respiratory review*. 2010; 19(117):237-241.
5. Cai M, Bonella F, He X, Sixt SU, Sarria R, Guzman J and Costabel U. CCL18 in serum, BAL fluid and alveolar macrophage culture supernatant in interstitial lung diseases. *Respir Med*. 2013; 107(9):1444-1452.
6. Ahluwalia N, Grasberger PE, Mugo BM, Feghali-Bostwick C, Pardo A, Selman M, Lagares D and Tager AM. Fibrogenic Lung Injury Induces Non-Cell-Autonomous Fibroblast Invasion. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2015.
7. Prasse A, Pechkovsky DV, Toews GB, Jungraithmayr W, Kollert F, Goldmann T, Vollmer E, Muller-Quernheim J and Zissel G. A vicious circle of alveolar macrophages and fibroblasts perpetuates pulmonary fibrosis via CCL18. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2006; 173(7):781-792.
8. Tzouveleki A and Kaminski N. Epigenetics in idiopathic pulmonary fibrosis. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*. 2015; 93(2):159-170.
9. Yang G, Yang L, Wang W, Wang J, Wang J and Xu Z. Discovery and validation of extracellular/circulating microRNAs during idiopathic pulmonary fibrosis disease progression. *Gene*. 2015; 562(1):138-144.
10. Liu G, Friggeri A, Yang Y, Milosevic J, Ding Q, Thannickal VJ, Kaminski N and Abraham E. miR-21

- mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis. *The Journal of experimental medicine*. 2010; 207(8):1589-1597.
11. Cushing L, Kuang P and Lu J. The role of miR-29 in pulmonary fibrosis. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*. 2014;1-10.
 12. Oak SR, Murray L, Herath A, Sleeman M, Anderson I, Joshi AD, Coelho AL, Flaherty KR, Toews GB, Knight D, Martinez FJ and Hogaboam CM. A micro RNA processing defect in rapidly progressing idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS one*. 2011; 6(6):e21253.
 13. Pandit KV, Milosevic J and Kaminski N. MicroRNAs in idiopathic pulmonary fibrosis. *Translational research*. 2011; 157(4):191-199.
 14. Pandit KV and Milosevic J. MicroRNA regulatory networks in idiopathic pulmonary fibrosis. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*. 2015; 93(2):129-137.
 15. Liang H, Gu Y, Li T, Zhang Y, Huangfu L, Hu M, Zhao D, Chen Y, Liu S, Dong Y, Li X, Lu Y, Yang B and Shan H. Integrated analyses identify the involvement of microRNA-26a in epithelial-mesenchymal transition during idiopathic pulmonary fibrosis. *Cell Death Dis*. 2014; 5:e1238.
 16. Lei GS, Kline HL, Lee CH, Wilkes DS and Zhang C. Regulation of Collagen V Expression and Epithelial-Mesenchymal Transition by miR-185 and miR-186 during Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *The American journal of pathology*. 2016.
 17. Takahashi Y, Forrest AR, Maeno E, Hashimoto T, Daub CO and Yasuda J. MiR-107 and MiR-185 can induce cell cycle arrest in human non small cell lung cancer cell lines. *PLoS one*. 2009; 4(8):e6677.
 18. Qadir XV, Han C, Lu D, Zhang J and Wu T. miR-185 inhibits hepatocellular carcinoma growth by targeting the DNMT1/PTEN/Akt pathway. *The American journal of pathology*. 2014; 184(8):2355-2364.
 19. Stahl M, Schupp J, Jager B, Schmid M, Zissel G, Muller-Quernheim J and Prasse A. Lung collagens perpetuate pulmonary fibrosis via CD204 and M2 macrophage activation. *PLoS one*. 2013; 8(11):e81382.
 20. Drakopanagiotakis F, Xifteri A, Tsiambas E, Karameris A, Tsakanika K, Karagiannidis N, Mermigkis D, Polychronopoulos V and Bouros D. Decreased apoptotic rate of alveolar macrophages of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Pulmonary medicine*. 2012; 2012:981730.
 21. Manning BD and Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*. 2007; 129(7):1261-1274.
 22. Xia H, Diebold D, Nho R, Perlman D, Kleidon J, Kahm J, Avdulov S, Peterson M, Nerva J, Bitterman P and Henke C. Pathological integrin signaling enhances proliferation of primary lung fibroblasts from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *The Journal of experimental medicine*. 2008; 205(7):1659-1672.
 23. White ES, Atrasz RG, Hu B, Phan SH, Stambolic V, Mak TW, Hogaboam CM, Flaherty KR, Martinez FJ, Kontos CD and Toews GB. Negative regulation of myofibroblast differentiation by PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog Deleted on chromosome 10). *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2006; 173(1):112-121.
 24. Larson-Casey JL, Deshane JS, Ryan AJ, Thannickal VJ and Carter AB. Macrophage Akt1 Kinase-Mediated Mitophagy Modulates Apoptosis Resistance and Pulmonary Fibrosis. *Immunity*. 2016; 44(3):582-596.
 25. Lasithiotaki I, Giannarakis I, Tsitoura E, Samara KD, Margaritopoulos GA, Choulaki C, Vasarmidi E, Tzanakis N, Voloudaki A, Sidiropoulos P, Siafakas NM and Antoniou KM. NLRP3 inflammasome expression in idiopathic pulmonary fibrosis and rheumatoid lung. *The European respiratory journal*. 2016.
 26. Lasithiotaki I, Antoniou KM, Vlahava VM, Karagiannis K, Spandidos DA, Siafakas NM and Sourvinos G. Detection of herpes simplex virus type-1 in patients with fibrotic lung diseases. *PLoS one*. 2011; 6(12):e27800.
 27. Xu F, Kang Y, Zhang H, Piao Z, Yin H, Diao R, Xia J and Shi L. Akt1-mediated regulation of macrophage polarization in a murine model of *Staphylococcus aureus* pulmonary infection. *J Infect Dis*. 2013; 208(3):528-538.
 28. Molyneaux PL, Cox MJ, Willis-Owen SA, Mallia P, Russell KE, Russell AM, Murphy E, Johnston SL, Schwartz DA, Wells AU, Cookson WO, Maher TM and Moffatt MF. The role of bacteria in the pathogenesis and progression of idiopathic pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2014; 190(8):906-913.
 29. Pechkovsky DV, Prasse A, Kollert F, Engel KM, Dentler J, Luttmann W, Friedrich K, Muller-Quernheim J and Zissel G. Alternatively activated alveolar macrophages in pulmonary fibrosis-mediator production and intracellular signal transduction. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2010; 137(1):89-101.
 30. Osterholzer JJ, Olszewski MA, Murdock BJ, Chen GH, Erb-Downward JR, Subbotina N, Browning K, Lin Y, Morey RE, Dayrit JK, Horowitz JC, Simon RH and Sisson TH. Implicating exudate macrophages and Ly-6C(high) monocytes in CCR2-dependent lung fibrosis following gene-targeted alveolar injury. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2013; 190(7):3447-3457.
 31. Yang T, Liang Y, Lin Q, Liu J, Luo F, Li X, Zhou H, Zhuang S and Zhang H. miR-29 mediates TGFbeta1-induced extracellular matrix synthesis through activation of PI3K-AKT pathway in human lung fibroblasts. *Journal of cellular biochemistry*. 2013; 114(6):1336-1342.
 32. Pandit KV, Corcoran D, Yousef H, Yarlagadda M, Tzouvelekis A, Gibson KF, Konishi K, Yousem SA, Singh M, Handley D, Richards T, Selman M, Watkins SC, et al. Inhibition and role of let-7d in idiopathic pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory and critical care*

- medicine. 2010; 182(2):220-229.
33. Zhang D, Lee H, Cao Y, Dela Cruz CS and Jin Y. MiR-185 mediates lung epithelial cell death after oxidative stress. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2016;ajplung 00392 02015.
 34. Mannaerts I, Eysackers N, Onyema OO, Van Beneden K, Valente S, Mai A, Odenthal M and van Grunsven LA. Class II HDAC inhibition hampers hepatic stellate cell activation by induction of microRNA-29. *PloS one*. 2013; 8(1):e55786.
 35. Winbanks CE, Wang B, Beyer C, Koh P, White L, Kantharidis P and Gregorevic P. TGF-beta regulates miR-206 and miR-29 to control myogenic differentiation through regulation of HDAC4. *The Journal of biological chemistry*. 2011; 286(16):13805-13814.
 36. Hallgren R, Bjermer L, Lundgren R and Venge P. The eosinophil component of the alveolitis in idiopathic pulmonary fibrosis. Signs of eosinophil activation in the lung are related to impaired lung function. *The American review of respiratory disease*. 1989; 139(2):373-377.
 37. Fujimoto K, Kubo K, Yamaguchi S, Honda T and Matsuzawa Y. Eosinophil activation in patients with pulmonary fibrosis. *Chest*. 1995; 108(1):48-54.
 38. Wells AU, Hansell DM, Haslam PL, Rubens MB, Cailles J, Black CM and du Bois RM. Bronchoalveolar lavage cellularity: lone cryptogenic fibrosing alveolitis compared with the fibrosing alveolitis of systemic sclerosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1998; 157(5 Pt 1):1474-1482.
 39. Sheedy FJ. Turning 21: Induction of miR-21 as a Key Switch in the Inflammatory Response. *Front Immunol*. 2015; 6:19.
 40. American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2000; 161(2 Pt 1):646-664.
 41. Antoniou KM, Alexandrakis M, Tzanakis N, Tsiligianni I, Tzortzaki EG, Siafakas NM and Bouros DE. Induced sputum versus bronchoalveolar lavage fluid in the evaluation of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiration; international review of thoracic diseases*. 2005; 72(1):32-38.
 42. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*. 2001; 29(9):e45.