ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

Τμήμα ιατρικής

Διδακτορική διατριβή του Γιανναράκη Ιωάννη

Διερεύνηση του ρόλου των φλεγμονοσωμάτων στην παθογένεια της πνευμονικής ίνωσης

2016

<u>Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή</u>

Σιαφάκας Νικόλαος : Καθηγητής πνευμονολογίας, Τμήμα ιατρικής,

Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Σιδηρόπουλος Πρόδρομος : Αναπληρωτής Καθηγητής, ρευματολογίας Τμήμα Ιατρικής

Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Αντωνίου Αικατερίνη : Επίκουρη Καθηγήτρια, Πνευμολογία, Τμήμα Ιατρικής,

Πανεπιστήμιο Κρήτης.

<u>Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή</u>

1. Σιαφάκας Νικόλαος
2. Σιδηρόπουλος Πρόδρομος
3. Αντωνίου αικατερίνη
4. Σουρβίνος Γεώργιος
5.Τζανακης Νικόλαος
6. Σαμώνης Γεώργιος
7. Κουτσόπουλος Αναστάσιος

<u>Υποψήφιος Διδάκτορας</u>: Γιανναράκης Ιωάννης

Θέμα διδακτορικής διατριβής: «Διερεύνηση του ρόλου των φλεγμονοσωμάτων στην παθογένεια της πνευμονικής ίνωσης»

Υποψήφιος διδάκτορας: Γιανναράκης Ιωάννης

Έτος ολοκλήρωσης διδακτορικής διατριβής: 2016

Διερεύνηση του ρόλου των φλεγμονοσωμάτων στην παθογένεια της πνευμονικής ίνωσης, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Αριθμός προκαταρκτικών σελίδων: 9

Συνολικός αριθμός σελίδων: 70

Αριθμός Πινάκων: 2

Αριθμός εικόνων: 10

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ίνωση είναι μια παθολογική κατάσταση που χαρακτηρίζεται από την αυξημένη παραγωγή και τη μειωμένη αποικοδόμηση συστατικών του εξωκυττάριου στρώματος, κυρίως κολλαγόνου. Τα κύτταρα που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή του κολλαγόνου, και επομένως έχουν κεντρικό ρόλο στη διαδικασία της ινωγένεσης, είναι οι μυοϊνοβλάστες. Από άποψη μοριακού μηχανισμού, η ίνωση παρουσιάζει μεγάλες ομοιότητες με το μηχανισμό επούλωσης τραυμάτων. Ο μηχανισμός επούλωσης περιλαμβάνει μια αρχική φάση φλεγμονής, μια φάση πολλαπλασιασμού των μυοϊνοβλαστών και αύξησης της παραγωγής κολλαγόνου και τέλος την αναγέννηση του ιστού που συνοδεύεται από την απόπτωση των μυοϊνοβλαστών και την αποικοδόμηση της περίσσειας του κολλαγόνου. Στην ίνωση, οι μυοϊνοβλάστες παραμένουν ενεργοί και η παραγωγή κολλαγόνου συνεχίζεται με αποτέλεσμα την καταστροφή της δομής και τελικά την απώλεια της λειτουργικότητας του ιστού. Ίνωση μπορεί πρακτικά να εκδηλωθεί σε όλους τους ανθρώπινους ιστούς. Κατά συνέπεια, αν και υπάρχουν ινωτικοί μηχανισμοί που είναι κοινοί για όλους τους ιστούς, υπάρχουν ταυτόχρονα σημαντικά χαρακτηριστικά που παρουσιάζουν ιστοεξειδίκευση. Τα τελευταία χρόνια, η προέλευση των μυοϊνοβλαστών είναι ένα από τα χαρακτηριστικά που έχει αρχίσει να θεωρείται ότι παρουσιάζει ιστοεξειδίκευση αφού πιθανές πηγές των μυοϊνοβλαστών έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να είναι διάφοροι κυτταρικοί πληθυσμοί όπως το

επιθήλιο, το ενδοθήλιο, κύτταρα του μυελού των οστών, προϋπάρχοντες ινοβλάστες και μυοϊνοβλάστες, λιποαποταμιευτικά κύτταρα κλπ. Η παρούσα μελέτη επικεντρώνεται στην ίνωση του πνευμονικού ιστού αφού η ίνωση του πνεύμονα αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό μιας μεγάλης οικογένειας ασθενειών, των νόσων του διάμεσου πνευμονικού χώρου. Η συνηθέστερη από τις ασθένειες αυτές είναι η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση ενώ οι μοριακοί μηχανισμοί που ρυθμίζουν την εκδήλωση και την εξέλιξη της νόσου παραμένουν άγνωστοι.

Η παθογένεια της ιδιοπαθούς και αυτοάνοσης πνευμονικής ίνωσης παραμένει αινιγματική. Επαναλαμβανόμενοι κύκλοι επιθηλιακού τραυματισμού, ινοβλαστική δραστηριότητα και ανώμαλη επούλωση αποτελούν τα κύρια γεγονότα. Αρκετοί παράγοντες όπως γενετικές και επιγενετικές ανωμαλίες, λοιμώξεις, κυτταροκίνες και αυξητικοί παράγοντες, αυξημένο οξειδωτικό στρες, αυτοαντισώματα, περιβαλλοντική έκθεση, γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση έχουν ενοχοποιηθεί για την έναρξη και εξέλιξη των διάχυτων διάμεσων πνευμονοπαθειών- interstitial lung diseases ILDs. Το πιο συχνό ιστολογικό πρότυπο της πνευμονικής ίνωσης είναι η συνήθης διάμεση πνευμονία και η μη ειδική διάμεση πνευμονία με την πρώτη να υπερτερεί στις ιδιοπαθείς διάμεσες πνευμονίες (με κύριο εκπρόσωπο την Ιδιοπαθή Πνευμονική ίνωση, IPF) και την δεύτερη να υπερτερεί στις διάμεσες πνευμονίες που σχετίζονται με νοσήματα του συνδετικού ιστού, εκτός από τη ρευματοειδή αρθρίτιδα στην οποία το όποιο το πρότυπο της συνήθους διάμεσης πνευμονίας (UIP) υπερέχει. Πρόσφατα δεδομένα έδειξαν ένα σημαντικό ρόλο που έχουν τα φλεγμονοσώματα στην ανάπτυξη της πνευμονικής ίνωσης.

Τα φλεγμονοσώματα είναι πολυμοριακά συμπλέγματα πρωτεϊνών υπεύθυνα για την ενεργοποίηση της κασπάσης 1, μιας πρωτεάσης που απαιτείται για την ενεργοποίηση και παραγωγή της προφλεγμονώδους κυτταροκίνης ιντερλευκίνης-1β (IL-1β). Αποτελούνται από ένα αισθητήρα, ο οποίος είναι

ένας κυτταροπλασματικός υποδοχέας, μια πρωτεΐνη προσαρμογής και μια δραστική πρωτεΐνη που είναι η κασπάση-1. Μελέτες, κυρίως σε πειραματόζωα, έδειξαν πως τα φλεγμονοσώματα μπορούν να συνεισφέρουν στην παθογένεια της πνευμονικής ίνωσης και των αυτοάνοσων νοσημάτων. Εν τούτοις, ο ρόλος τους δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί.

Ο ρόλος της φλεγμονής στην παθογένεια της πνευμονικής ίνωσης είναι αμφιλεγόμενος. Για το σκοπό αυτό, υποθέτουμε πως διαφορές στα φλεγμονώδη προφίλ μεταξύ συνήθους διάμεσης πνευμονίας-usual interstitial pneumonia (UIP) και μη ειδικής διάμεσης πνευμονίας-non specific interstitial pneumonia (NSIP) θα μπορούσαν να εξηγήσουν διαφορές στην παθογένεση, πρόγνωση και ανταπόκριση στη θεραπεία. Εκτιμήσαμε την έκφραση διαφόρων συστατικών των φλεγμονοσωμάτων καθώς και της IL-1β, μιας φλεγμονώδους κυτταροκίνης της οποίας η παραγωγή ελέγχεται από τα φλεγμονοσώματα, στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα Bronchoalveolar lavage (BALF) ασθενών με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση-Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF), ρευματοειδή αρθρίτιδα-rheumatoid arthritis (RA)/(UIP). Αν και έχει παρατηρηθεί πως οι διάμεσες πνευμονίες που σχετίζονται με νοσήματα του συνδετικού ιστού-collagen tissue disorders (CTDs) έχουν καλύτερη πρόγνωση από αυτή των ιδιοπαθών τους μορφών πρόσφατα έχει φανεί πως ασθενείς με RA-UIP έχουν παρόμοια πρόγνωση με την ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση, το κλινικό πρότυπο της ιδιοπαθούς συνήθους διάμεσης πνευμονίας που αποτελεί τον πιο καταστροφικό τύπο των ιδιοπαθών διάμεσων νοσημάτων με μια μέση επιβίωση τα τρία έτη. Η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση έχει επίσης χειρότερη πρόγνωση από την ιδιοπαθή μη ειδική διάμεση πνευμονία, ενώ καμία διαφορά στην πρόγνωση δεν παρατηρείται ανάμεσα στην non CTD-UIP και CTD-NSIP.

Στις μέχρι τώρα γνώσεις μας αυτή είναι η πρώτη προσπάθεια να εκτιμήσουμε τον ρόλο των φλεγμονοσωμάτων στην παθογένεια της ίνωσης χρησιμοποιώντας το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ασθενών με ιδιοπαθή και

αυτοάνοση ίνωση.

Η ενεργοποίηση των φλεγμονοσωμάτων οδηγεί, μέσω ενεργοποίησης της κασπάσης-1, την έκκριση ώριμης μορφής της IL-1β. Τα φλεγμονοσώματα συνθέτονται μέσω ενεργοποίησης των συστατικών των κυτταροπλασματικών υποδοχέων τους. Τρία από αυτά ανήκουν στην οικογένεια των NOD Like υποδοχέων-NOD Like Receptors (NLRs) και ονομάζονται NLRP1, NLRP3 και NLRC4, όπου μαζί με τους Toll Like υποδοχείς-Toll Like Receptors (TLRs) και τους RIG-I-like υποδοχείς RIG-I-like receptors (RLRs) αποτελούν συστατικά κλειδιά για την αρχική ανοσία αποτελώντας την πρώτη γραμμή άμυνας του ξενιστή ενάντια σε εξωγενή και ενδογενή ερεθίσματα. Εάν ο μηχανισμός αυτός αποτύχει να εξαλείψει τα τραυματικά ερεθίσματα, αυτά επιμένουν και οδηγούν σε χρόνια φλεγμονή που μπορεί να εξελιχθεί σε ίνωση.

Η παραγωγή της IL-1β, σε αντίθεση με τις άλλες κυτταροκίνες, ελέγχεται από δύο σήματα. Το πρώτο προέρχεται από τους TLRs, οι οποίοι ενεργοποιούν μια NF-kB–εξαρτώμενη pro–IL-1b έκφραση και το δεύτερο προέρχεται από τα φλεγμονοσώματα. Η IL-1β συμμετέχει σε οξείες και χρόνιες φλεγμονώδεις διαταραχές. Αρκετές μελέτες κυρίως σε πειραματόζωα, έχουν προσπαθήσει να ερμηνεύσουν τη συμμετοχή των φλεγμονοσωμάτων στην παθογένεια της ίνωσης. Πρόσφατα παρατηρήθηκε πως κρύσταλλοι πυριτίου και αμιάντου, που ενοχοποιούνται για την πρόκληση ίνωσης, περιβάλλονται από μακροφάγα, ενεργοποιούν τα NLRP3 φλεγμονοσώματα προκαλώντας την παραγωγή IL-1b ενώ η έλλειψη σε NLRP3 στα ποντίκια οδήγησε στη δημιουργία εκτεταμένης φλεγμονής, σχηματισμό κοκκιώματος και ίνωση μετά από έκθεση σε πυρίτιο και αμίαντο.

Η παραγωγή της NLRP3-dependent IL-1β ενοχοποιείται επίσης για την πνευμονική ίνωση οφειλόμενη στην μπλεομυκίνη. Η θεραπεία με μπλεομυκίνη στα ποντίκια οδηγεί σε έκκριση ουρικού οξέως μέσω των νεκρών κυττάρων που διεγείρουν την ενεργοποίηση των NLRP3 φλεγμονοσωμάτων, και η

πνευμονική ίνωση μειώνεται δραματικά μετά τη θεραπεία των ποντικών με τον ανταγωνιστή υποδοχέα της IL-1, το ανακίνρα σε συνδυασμό με αλοπουρινόλη. Η IL-1β ενοχοποιείται επίσης για την παθογένεια αυτοάνοσων νοσημάτων όπως η RA. Στις αρθρικές βιοψίες ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα, η IL-1β βρέθηκε σε περιοχές με μακροφάγα και ινοβλάστες. Επιπλέον, πολυμορφισμοί της IL-1 μπορεί να ενοχοποιούνται για προδιάθεση στην συστηματική σκλήρυνση systemic sclerosis (SSc).

Συμπερασματικά τα αποτελέσματα μας δείχνουν ενεργοποίηση του NLRP3 δια μέσω της αυξημένης έκφρασης της IL-1β στη RA-UIP. Αντιθέτως παρατηρήθηκε διαταραχή στη λειτουργία του φλεγμονοσώματος στην IPF. Το φλεγμονόσωμα NLRP3 μπορεί να συμμετέχει στην παθογένεια της RA-UIP και της IPF δια μέσω όμως διαφορετικών μηχανισμών.

Πίνακας περιεχομένων

1. **Εισαγωγή**.....1-35

Α.**Ίνωση** 13-19

Ορισμός της ίνωσης

Ίνωση και διαδικασία επούλωσης τραυμάτων

Κοινοί και εξειδικευμένοι μηχανισμοί ίνωσης

Η προέλευση των μυοϊνοβλαστών

Β. **Πνευμονική ίνωση** 19-35

Παθογένεση της πνευμονικής ίνωσης

Γ. Φλεγμονοσώματα

Πηγές μυοϊνοβλαστών στην πνευμονική ίνωση

IL1β , IL18

Η IL1β και η IL 18 μπορούν να προκαλέσουν ίνωση

2. **Σκοπός** 35

3. **Υλικά και μέθοδοι**.....36-41

Α. Υλικά

Βιολογικά υλικά και διαδικασία

Β. Μέθοδοι

Ασθενείς

Λειτουργικός πνευμονολογικός έλεγχος

Έκταση της νόσου στην Αξονική τομογραφία

Βιολογικά δείγματα και διαδικασία που ακολουθήθηκε

Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής

Ενεργοποιηση φλεγμονοσώματος
Στατιστική ανάλυση
Χαρακτηρηστικά ασθενών
4. **Αποτελέσματα** 42-52

5.**Συζητηση**.....52-58

6. Βιβλιογραφία.....59-70

7. **Παράρτημα**

Κατάλογος πινάκων

Πίνακας 1: κλινικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού έρευνας

Πίνακας 2: Αντιγόνα και αντισώματα του πλάσματος και χαρακτηριστικά κυτταρικού πληθυσμού του BAL όλων των δειγμάτων που μελετήθηκαν.

Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1: Επιθήλιο και ο υποκείμενος συνδετικός ιστός. Διακρίνονται ινοβλάστες, κύτταρα του ανοσοποιητικού και τα μακρομόρια του εξωκυττάριου στρώματος (*Alberts et al., 2002*).

Εικόνα 2: Φυσιολογική επούλωση τραύματος και ινωτική διαδικασία. Η έκθεση σε παθογόνο ερέθισμα πυροδοτεί τη διαδικασία επούλωσης που αποτελείται από τρεις φάσεις: φλεγμονή, φάση πολλαπλασιασμού και αναγέννηση του ιστού. Σε περίπτωση χρόνιας έκθεσης σε παθογόνο παράγοντα ενεργοποιείται η ινωτική διαδικασία (*Wynn, 2007*).

Εικόνα 3: Η οικογένεια των ασθενειών του διάμεσου πνευμονικού χώρου αριθμεί πάνω από 200 μέλη. Έχουν καταγραφεί μέχρι τώρα διάφορα αίτια όπως η σαρκοείδωση, αυτοάνοσα νοσήματα, λοιμώξεις του αναπνευστικού, η

ανοσοκαταστολή, διαταραχές του μεταβολισμού του κολλαγόνου, φάρμακα και ακτινοβολία, περιβαλλοντικοί παράγοντες, αγγειακές νόσοι. Ένα μεγάλο ποσοστό των ILDsέχει άγνωστα αίτια. Οι περιπτώσεις αυτές χαρακτηρίζονται ως ιδιοπαθείς (*Green, 2002*).

Εικόνα 4: Το αυτοκρινές σήμα της IL-1a η IL-18 που προκαλείται από ένα ενεργοποιημένο φλεγμονόσωμα μπορεί να προκαλέσει διαφοροποίηση των μυοινοβλαστών

Εικόνα 5. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης της IL-1β , IL-6, TNF-a στο BAL όπου παρατηρήθηκε: α) αύξηση των επιπέδων της IL-1β στους πνεύμονες των ασθενών με RA-UIP συγκριτικά με τους μάρτυρες και τους ασθενείς με IPF, β) αύξηση των επιπέδων της IL-6 στους πνεύμονες ασθενών με IPF και γ) RA-UIP και αύξηση της έκφρασης του TNF-α στους πνεύμονες ασθενών με RA-UIP.

Εικόνα 6. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης των συστατικών του NLRP3 φλεγμονοσώματος α) NLRP3 και β) Caspase-1 και των κυτταροκινών γ) IL-1β δ) IL-6 και ε) IL-18 σε καλλιέργειες μη διεγερμένων κυττάρων του BAL σε ασθενείς με IPF, RA-UIP και υγιείς μάρτυρες όπου φαίνονται αυξημένα τα επίπεδα τόσο του NLRP3 και της Caspase-1 όσο και των IL-6 και IL-18 επιπέδων στους ινωτικούς ασθενείς, ενώ παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων της IL-1β στους πνεύμονες των ασθενών με RA-UIP συγκριτικά με τους μάρτυρες και τους ασθενείς με IPF.

Εικόνα 7: Ποσοτικοποίηση της έκφρασης των α) IL-1β και β) IL-18 σε καλλιεργημένα κύτταρα του BAL ασθενών με IPF, RA-UIP και CONTROLS μετά τη ενεργοποίησή τους με LPS και ATP όπου παρατηρήθηκε αύξηση της έκκρισης των IL-1β και IL-18 στα δείγματα των μαρτύρων μετά την χορήγηση LPS και ATP τα οποία οφείλονται στην ενεργοποίηση της Caspase-1 σε μεγάλο βαθμό. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων της IL-1β στους ασθενείς με IPF μετά την χορήγηση LPS και ATP αλλά ούτε και με τη χορήγηση μόνο LPS. Αύξηση της έκκρισης της IL-1β στους ασθενείς με RA-UIP μετά τη χορήγηση LPS ωστόσο χωρίς περαιτέρω αύξηση της μετά τη χορήγηση ATP.

Εικόνα 8. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης της α) IL-6 και του β) TNF-a στους ασθενείς με IPF , RA-UIP, CONTROLS μετά τη χορήγηση LPS και ATP όπου δεν

παρατηρήθηκε περαιτέρω σημαντική αύξηση των επιπέδων της IL6 και του TNF-α από την LPS μόνο του.

Εικόνα 9. Ποσοτικοποίηση των επιπέδων ενδοκυττάριας ώριμης IL-1β με τη μέθοδο western-blot στους ασθενείς με IPF , RA-UIP, CONTROLS μετά τη χορήγηση LPS και ATP και την παρουσία του αναστολέα της κασπάσης 1 όπου παρατηρήσαμε ότι τα ενδοκυττάρια επίπεδα της IL-1β των μαρτύρων ήταν υψηλότερα από αυτά της ομάδας των IPF και RA-UIP .

Εικόνα 10. Τα επίπεδα της IL-1β σε μή διεγερμένα κύτταρα BAL από ασθενείς με IPF συσχετίζονται σημαντικά με το composite physiologic index.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Α. ΙΝΩΣΗ

Ορισμός της ίνωσης

Η ίνωση στην οποία οφείλεται το 45% όλων των θανάτων του δυτικού κόσμου είναι μια παθολογική διαδικασία πού ευθύνεται για την εναπόθεση κολλαγόνου και συστατικών του εξωκυττάριου στρώματος, στα εσωτερικά όργανα και στους ιστούς και οδηγεί στην καταστροφή της φυσιολογικής αρχιτεκτονικής του ιστού και στην υπονόμευση της λειτουργίας του (*Mutsaers et al.,1997*). Αυτό γίνεται γιατί το φυσιολογικό παρέγχυμα αντικαθίσταται από συνδετικό ιστό που συγκροτείται από τα μόρια του στρώματος και λοιπές δομές καθώς και μόρια που βρίσκονται στον εξωκυττάριο χώρο.

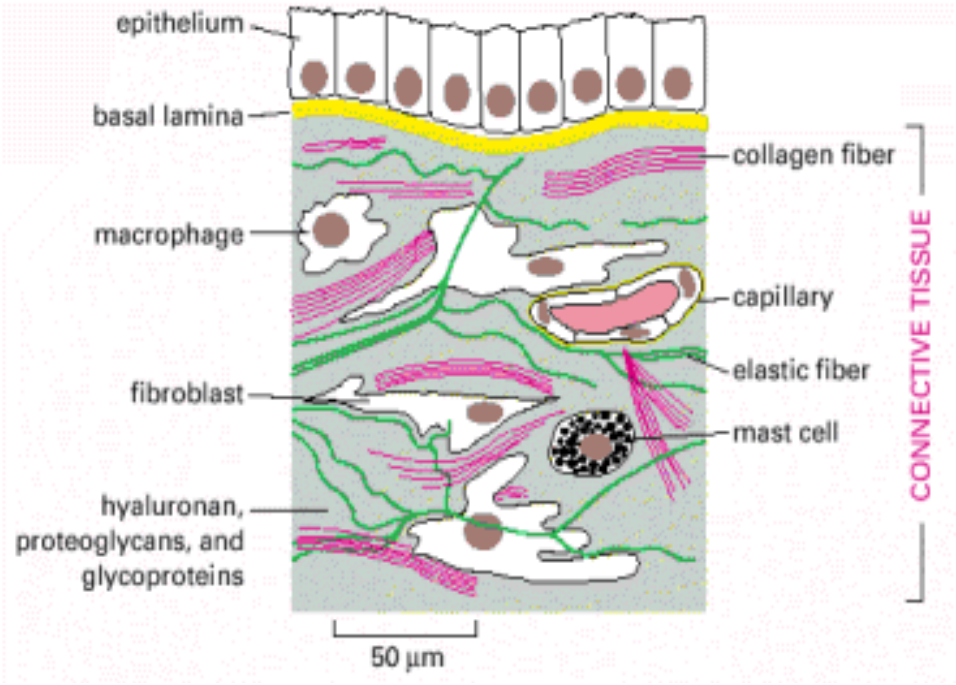
Το εξωκυττάριο στρώμα (Extracellular Matrix, ECM) είναι ένα περίπλοκο δίκτυο μακρομορίων που καταλαμβάνει μεγάλο μέρος των ιστών γεμίζοντας το χώρο που δεν υπάρχουν κύτταρα, βρισκόμενο πάντα σε στενή επαφή με τις

κυτταρικές επιφάνειες. Ισχυροποιεί τους στηρικτικούς ιστούς και ταυτόχρονα βοηθά στην επικοινωνία του κυττάρου με το περιβάλλον του ρυθμίζοντας τη μεταγωγή σημάτων προς και από το κύτταρο. Τα μακρομόρια που αποτελούν το εξωκυττάριο στρώμα διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: τις ινώδεις πρωτεΐνες, που περιλαμβάνουν το κολλαγόνο, την ελαστίνη, τη λαμινίνη και την ινωδονεκτίνη (fibronectin) καθώς και τις πρωτεογλυκάνες που είναι πρωτεΐνες συνδεδεμένες με αρνητικά φορτισμένους πολυσακχαρίτες, τις γλυκοζαμινογλυκάνες (glycoaminoglycans, GAGs). Το κολλαγόνο θεωρείται η σημαντικότερη από αυτές τις πρωτεΐνες καθώς βρίσκεται σε όλα τα ζώα ενώ στα θηλαστικά αντιπροσωπεύει το 25% της συνολικής μάζας των πρωτεϊνών τους.

Τα μόρια του εξωκυττάριου στρώματος παράγονται σε τοπικό επίπεδο, κατά κύριο λόγο από κύτταρα μέσα στο στρώμα, που ονομάζονται ινοβλάστες (*Alberts et al., 2002*). Οι ινοβλάστες είναι τα πρωταρχικά κύτταρα που εκκρίνουν εξωκυττάριο στρώμα και τα όργανα που περιέχουν τέτοια κύτταρα μπορεί να αναπτύξουν ίνωση όπως οι πνεύμονες, οι νεφροί, το ήπαρ, το δέρμα και η καρδιά. Η παραγωγή αυτή είναι συνεχής γιατί ταυτόχρονα τα μακρομόρια του εξωκυττάριου στρώματος αποικοδομούνται από ειδικά ένζυμα που ονομάζονται Matrix Metalloproteinases (MMPs) και από κολλαγενάσες. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τόσο η σύνθεση όσο και η αποικοδόμηση είναι διαδικασίες που γίνονται με πολύ αργούς ρυθμούς. Προφανώς, οι ινοβλάστες είναι κεντρικά μόρια στην ινωτική διαδικασία και η προέλευση καθώς και οι μηχανισμοί ενεργοποίησής τους αποτελούν πρωτεύοντα ζητούμενα στην έρευνα σχετικά με την ίνωση. Η ίνωση μπορεί να προσβάλλει ένα όργανο ή μπορεί να είναι συστηματική προσβάλλοντας περισσότερα όργανα. Το αίτιο που την προκαλεί είναι τις περισσότερες φορές άγνωστο, ωστόσο κάποιες φορές μπορεί να αποδοθεί σε διάφορα παθογόνα ή αδρανείς ουσίες όπως η ακτινοβολία, το πυρίτιο, ο αμίαντος, ο καπνός του τσιγάρου και διάφορα άλλα

χημικά.

Φαίνεται ότι η ίνωση συμβαίνει λόγω απορρύθμισης της διαδικασίας επούλωσης καθώς επίσης και όταν ο ερεθιστικός παράγοντας που την πυροδοτεί συνεχίζει να υπάρχει για αρκετό χρονικό διάστημα. Μπορεί να συμβεί με ή χωρίς την παρουσία φλεγμονής και συνήθως ανθίσταται στην οποιαδήποτε αγωγή ενώ παρουσιάζει υψηλή θνητότητα.



<u>Εικόνα 1</u>: Επιθήλιο και ο υποκείμενος συνδετικός ιστός. Διακρίνονται ινοβλάστες, κύτταρα του ανοσοποιητικού και τα μακρομόρια του εξωκυττάριου στρώματος (*Alberts et al., 2002*).

Ίνωση και διαδικασία επούλωσης τραυμάτων

Για να κατανοήσει κανείς το πότε, γιατί και μέσω ποιων μηχανισμών πυροδοτείται η ινωτική διαδικασία, θα πρέπει να ανατρέξει στη διαδικασία επούλωσης τραύματος αφού η ίνωση μπορεί να χαρακτηριστεί ως μια διαδικασία επούλωσης τραύματος που έχει ξεφύγει από τον έλεγχο του οργανισμού. Η καταστροφή τμήματος του ιστού, οφειλόμενη σε οποιοδήποτε

χρόνιο ή οξύ παθογόνο ερέθισμα, συμπεριλαμβανομένων μολύνσεων, αυτοάνοσων αντιδράσεων και μηχανικών τραυμάτων, πυροδοτεί τη διαδικασία επούλωσης του τραύματος που είναι μια θεμελιώδης βιολογική διαδικασία απαραίτητη για την επιβίωση του οργανισμού.

Η διαδικασία χωρίζεται σε τρία στάδια: 1) **φλεγμονή και αιμόσταση**, 2) **φάση, πολλαπλασιασμού**, 3) **αναγέννηση** (*Wynn, 2007*). Η αρχική απόκριση προέρχεται από τα κατεστραμμένα επιθηλιακά ή/και ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία απελευθερώνουν μόρια (κυτταροκίνες, αυξητικούς παράγοντες) που ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα και το σχηματισμό θρόμβου. Η ενεργοποίηση της θρομβοποίησης οδηγεί, μεταξύ άλλων, στη δημιουργία μιας λεπτής αθηρωματικής πλάκας που μαζί με την ινωδονεκτίνη σχηματίζουν μια προσωρινή επιφάνεια που λειτουργεί ως βάση πάνω στην οποία προσελκύονται κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος που φθάνουν στο σημείο του τραύματος μέσω της κυκλοφορίας (φάση φλεγμονής).

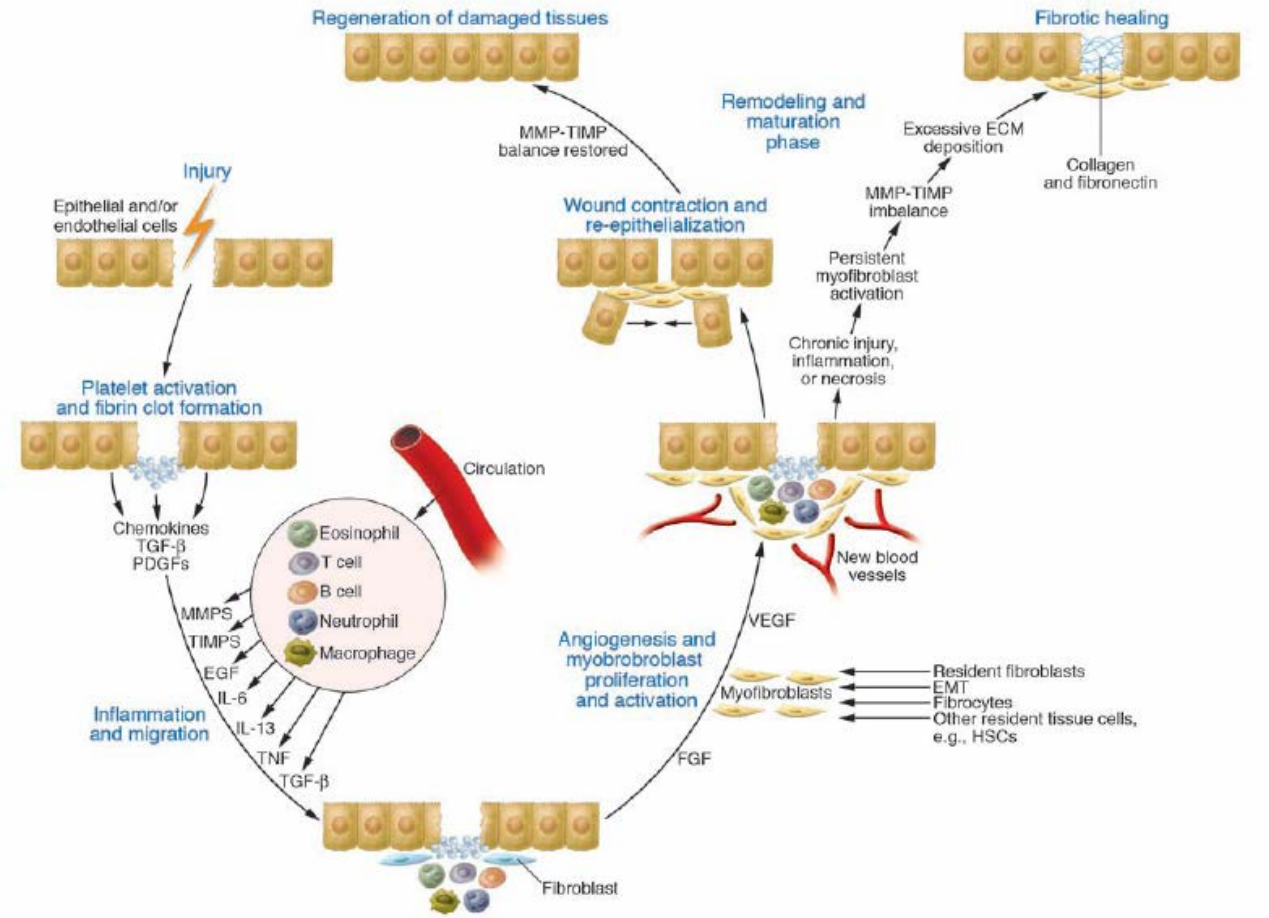
Το φλεγμονώδες στάδιο ξεκινά λίγα μόλις λεπτά μετά την αρχική προσβολή, πυροδοτείται από την ιστική βλάβη, τον κυτταρικό θάνατο, τις αλλαγές στην μηχανική πίεση και την απελευθέρωση ενδογενών αντιγόνων και σημάτων συναγερμού όπως το ADP και ATP. Το στάδιο αυτό μπορεί να διαρκέσει για πάνω από 4 ημέρες μετά το τραύμα. Στα αρχικά στάδια της φάσης της φλεγμονής ο κυρίαρχος κυτταρικός πληθυσμός είναι τα ουδετερόφιλα αλλά στη συνέχεια δίνουν τη θέση στους στα μακροφάγα. Μεταξύ των άλλων λειτουργιών τους, που περιλαμβάνουν την καταστροφή βακτηρίων, την απομάκρυνση των κατεστραμμένων κυττάρων κλπ, τα κύτταρα του ανοσοποιητικού εκκρίνουν με τη σειρά τους κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες (Transforming Growth Factor β (TGF-β), ιντερλευκίνες, κλπ). Με αυτό τον τρόπο δημιουργείται ένας μηχανισμός θετικής ανατροφοδότησης με τελικό αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης και τη συνεχή παρουσία αυτών των μορίων που αποτελούν βασικούς μεσολαβητές τόσο της

φυσιολογικής, όσο και της ινωτικής διαδικασίας. Ένα από τα αποτελέσματα της δράσης του TGF-beta, του PDGF αλλά και της ιντερλευκίνης 1 είναι η προσέλκυση ινοβλαστών στο σημείο του τραύματος και ο πολλαπλασιασμός τους. Συνήθως, η διαδικασία αυτή συνοδεύεται από τη μετατροπή των ινοβλαστών σε ένα άλλο, αλλά αρκετά συγγενές κυτταρικό είδος, τους **μυοϊνοβλάστες.** Κατά τη διάρκεια του πολλαπλασιαστικού σταδίου, αρχίζει η διαδικασία κοκκιωμάτωσης του ιστού και ο αρχικός θρόμβος ινικής αντικαθίσταται από ένα στρώμα κολλαγόνου, ινονεκτίνης και υαλουρονικού οξέως. Αυτό αντικαθίσταται στα τελικά στάδια στη φάση αναγέννησης, από ένα ισχυρότερο εξωκυττάριο στρώμα. Κερατινοκύτταρα πολλαπλασιάζονται και μεταναστεύουν κατά μήκος του προσωρινού κοκκιώδους ιστού, κλείνουν την επιφάνεια του τραύματος προστατεύοντας το και καλύπτοντας το με λαμινίνη και τύπου 4 κολλαγόνο. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα προάγουν την αγγειογένεση και επανοξυγόνωση της περιοχής του τραύματος.

Το τελικό στάδιο της φυσιολογικής διαδικασίας περιλαμβάνει την αναγέννηση του ιστού, δηλαδή την αντικατάσταση των κατεστραμμένων κυττάρων από νέα που θα προκύψουν από τον πολλαπλασιασμό γειτονικών, φυσιολογικών κυττάρων. Η διαδικασία αυτή συνοδεύεται από την αποικοδόμηση της περίσσειας των μορίων του στρώματος από MMPs και κολλαγενάσες και τη μείωση του αριθμού των ινοβλαστών με απόπτωση ώστε να επανέλθει η δυναμική ισορροπία μεταξύ παραγωγής και αποικοδόμησης του εξωκυττάριου στρώματος. Μπορεί να διαρκέσει από μερικές μέρες έως και άνω του ενός έτους ανάλογα με το μέγεθος του τραύματος. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αυτής οι μυοϊνοβλάστες αρχικά εκκρίνουν κολλαγόνο τύπου 3 ωστόσο καθώς η επούλωση του τραύματος εξελίσσεται παράγουν περισσότερο κολλαγόνο τύπου 1 για να το ενισχύσουν και να εξασφαλίσουν ένα ισχυρότερο εξωκυττάριο στρώμα. Οι ίνες κολλαγόνου οργανώνονται και διασταυρώνονται θωρακίζοντας έτσι καλύτερα το τραύμα.

Είναι προφανές ότι ο μηχανισμός επούλωσης τραυμάτων είναι ένας εξαιρετικά πολύπλοκος μηχανισμός, με τη συμμετοχή πολλών μορίων που προϋποθέτει την αυστηρή ρύθμιση της ενεργοποίησης και της απενεργοποίησης διάφορων κυτταρικών πληθυσμών με προεξέχοντα αυτόν των ινοβλαστών.

Στην περίπτωση της ίνωσης, που κατά κανόνα είναι αποτέλεσμα χρόνιας έκθεσης σε παθογόνο παράγοντα, ο αυστηρά ελεγχόμενος μηχανισμός επούλωσης τραύματος ουσιαστικά χαλαρώνει αφού η χρόνια φλεγμονή οδηγεί σε επαναλαμβανόμενους κύκλους της διαδικασίας επούλωσης. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, σε κάθε κύκλο, να συσσωρεύονται ποσότητες κολλαγόνου που δεν μπορούν να αποικοδομηθούν. Η τελική κατάληξη είναι μια παθολογική κατάσταση όπου οι μυοϊνοβλάστες είναι συνεχώς ενεργοί, παράγοντας κολλαγόνο με αποτέλεσμα την καταστροφή, αρχικά της δομής και τελικά της



λειτουργικότητας του ιστού λόγω της αντικατάστασης του παρεγχύματος από συνδετικό ιστό.

<u>Εικόνα 2</u>: Φυσιολογική επούλωση τραύματος και ινωτική διαδικασία. Η έκθεση σε παθογόνο ερέθισμα πυροδοτεί τη διαδικασία επούλωσης που αποτελείται από τρεις φάσεις: φλεγμονή, φάση πολλαπλασιασμού και αναγέννηση του ιστού. Σε περίπτωση χρόνιας έκθεσης σε παθογόνο παράγοντα ενεργοποιείται η ινωτική διαδικασία (*Wynn, 2007*).

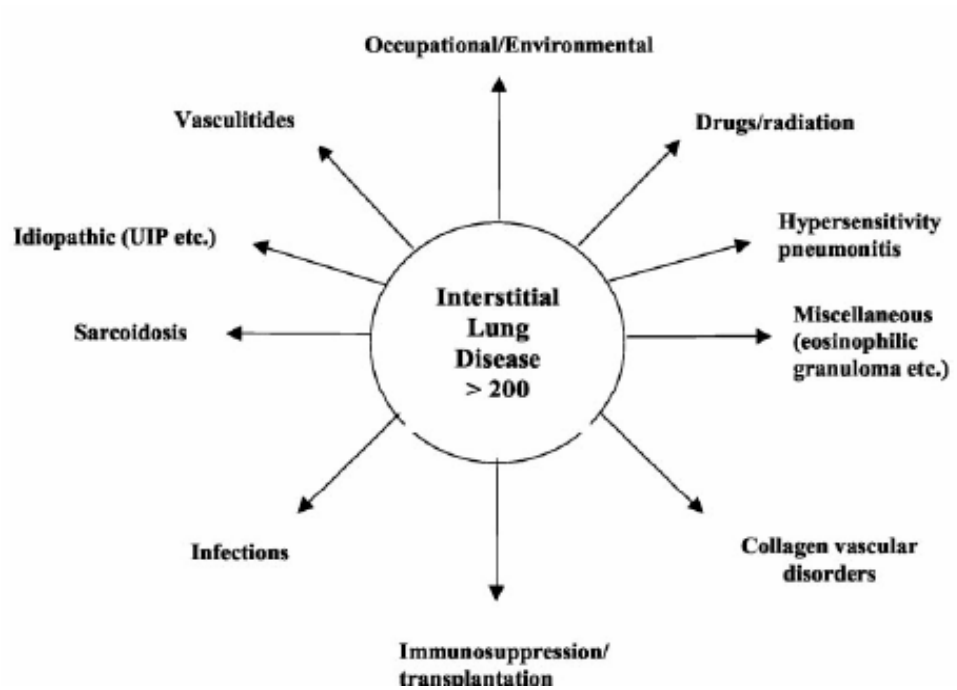
Β. ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΙΝΩΣΗ

Η πνευμονική ίνωση δεν θεωρείται ασθένεια αλλά ένα σύνολο ετερογενών χαρακτηριστικών που αποτελούν καθυστερημένα συμπτώματα μιας μεγάλης οικογένειας ασθενειών του διάμεσου πνευμονικού χώρου, των **Interstitial Lung Diseases**, ILDs (*Green, 2002*).

Αυτό που συμβαίνει στην πνευμονική ίνωση στο επίπεδο των κυψελίδων είναι ότι η υπερπαραγωγή μακρομορίων του εξωκυττάριου στρώματος και η εναπόθεσή τους στον ενδιάμεσο χώρο οδηγεί στην πάχυνση και τη σκλήρυνση του χώρου αυτού. Με τη σειρά του, ο φραγμός αίματος-αέρα γίνεται πιο παχύς δυσχεραίνοντας την ανταλλαγή αερίων κάτι που οδηγεί στην προοδευτική μείωση και τελικά στην απώλεια της πνευμονικής λειτουργίας.

Μέχρι σήμερα έχουν καταγραφεί πάνω από διακόσιες ILDs οι οποίες χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, στις **ILDs με γνωστό αίτιο** και στις **ιδιοπαθείς ILDs**, δηλαδή ασθένειες με άγνωστο αίτιο, που ονομάζονται εναλλακτικά Idiopathic interstitial pneumonias (IIPs). Τα αίτια των ILDs περιλαμβάνουν διάφορους παράγοντες όπως περιβαλλοντικοί, φάρμακα και ακτινοβολίες. Γενετικοί παράγοντες, αγγειακές παθήσεις και διαταραχές του μεταβολισμού του κολλαγόνου έχουν επίσης εμπλακεί στην παθογένεση των ILDs τα τελευταία χρόνια. Η μέση επιβίωση της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης κυμαίνεται στα τρία χρόνια από τη στιγμή της διάγνωσης γεγονός που την καθιστά περισσότερο θανατηφόρα και από κάποιους καρκίνους. Το

ακτινολογικό και ιστοπαθολογικό της πρότυπο είναι αυτό της συνήθους διάμεσης πνευμονίας. (UIP). Η UIP σε αντίθεση με τα υπόλοιπα νοσήματα του συνδετικού ιστού (collagen tissue diseases-CTDs), αποτελεί και το συχνότερο πρότυπο σε περίπτωση συμμετοχής του διάμεσου ιστού σε ασθενείς με ρευματοειδη αρθρίτιδα (RA). Η RA-UIP και η IPF μοιράζονται κάποιες ενδιαφέρουσες ομοιότητες σε κλινικό και μοριακό επίπεδο. Είναι επομένως σημαντικό να αναγνωρίσουμε τους μηχανισμούς εκείνους που συμμετέχουν στην παθογένεια της πνευμονικής ίνωσης τόσο της ιδιοπαθούς όσο και της αυτοάνοσης και που σχετίζονται με το UIP πρότυπο ακτινολογικά και ιστολογικά, ιδιαίτερα στις μέρες μας όπου επίσημα πλέον έχουμε εισάγει στην θεραπευτική μας προσέγγιση δύο νέα φάρμακα που καθυστερούν την εξέλιξη της IPF.



<u>Εικόνα 3</u>: Η οικογένεια των ασθενειών του διάμεσου πνευμονικού χώρου αριθμεί πάνω από 200 μέλη. Έχουν καταγραφεί μέχρι τώρα διάφορα αίτια όπως η σαρκοείδωση, αυτοάνοσα νοσήματα, λοιμώξεις του αναπνευστικού, η ανοσοκαταστολή, διαταραχές του μεταβολισμού του κολλαγόνου, φάρμακα και ακτινοβολία, περιβαλλοντικοί παράγοντες, αγγειακές νόσοι. Ένα μεγάλο ποσοστό των ILDs έχει άγνωστα αίτια. Οι περιπτώσεις αυτές χαρακτηρίζονται ως ιδιοπαθείς (*Green, 2002*).

Παθογένεση της πνευμονικής ίνωσης

Ο κύριος παθογενετικός μηχανισμός της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης (IPF) παραμένει άγνωστος παρά την εκτεταμένη κλινική και επιστημονική έρευνα τα τελευταία χρόνια. Όπως και στους υπόλοιπους ιστούς, η ίνωση στον πνεύμονα θεωρείται μια διαδικασία επούλωσης τραύματος που έχει ξεφύγει από τον έλεγχο του οργανισμού. Αυτό σημαίνει ότι ενώ σε περιπτώσεις περιορισμένου τραυματισμού, ο οργανισμός μπορεί να ανταπεξέλθει και να αποκαταστήσει τη φυσιολογική δομή των κυψελιδικών τοιχωμάτων κυρίως μέσω του πολλαπλασιασμού των κυττάρων τύπου ΙΙ που στη συνέχεια θα διαφοροποιηθούν σε κύτταρα τύπου Ι, σε περιπτώσεις χρόνιας έκθεσης στο παθογόνο ερέθισμα, η συνεχής καταστροφή του κυψελιδικού επιθηλίου ή/και του αγγειακού ενδοθηλίου οδηγεί στην απορρύθμιση των μηχανισμών επιδιόρθωσης με τελικό αποτέλεσμα την ίνωση και την καταστροφή της φυσιολογικής δομής και λειτουργίας του ιστού.

Οι κύριοι μεσολαβητές της πνευμονικής ίνωσης είναι μια σειρά αυξητικών παραγόντων και κυτταροκίνων με προεξέχοντες τον TGF-β, την ιντερλευκίνη 1β και τον Tumor Necrosis Factor α (TNFα). Ο TGF-β μπορεί να επάγει μια σειρά από προϊνωτικές διαδικασίες όπως η προσέλκυση και ο

πολλαπλασιασμός ινοβλαστών/μυοϊνοβλαστών, η αύξηση της παραγωγής κολλαγόνου και των υπολοίπων συστατικών του στρώματος, η επαγωγή των αναστολέων των μεταλλοπρωτεϊνασών και η μείωση της αποικοδόμησης του κολλαγόνου. Οι περισσότερες από αυτές τις διαδικασίες ενεργοποιούνται μέσω ενός SMAD3 ελεγχόμενου μηχανισμού. Ο TNFα συνδέεται κυρίως με τη φλεγμονή που συνήθως προηγείται της ίνωσης αλλά από μόνος του δεν μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή της αρχιτεκτονικής του πνεύμονα ή σε εκτεταμένη εναπόθεση κολλαγόνου. Αντίθετα, υπερέκφραση της ιντερλευκίνης 1β προκαλεί εκτεταμένη καταστροφή των κυψελίδων, έντονη φλεγμονή ενώ προσελκύει μυοϊνοβλάστες οδηγώντας σε μεγάλη αύξηση παραγωγής κολλαγόνου (*Gauldie et al., 2007*). Σε κάθε περίπτωση, το τελικό αποτέλεσμα της έκθεση στους παράγοντες αυτούς είναι ο υπερπολλαπλασιασμός των κυττάρων τύπου ΙΙ, η προσέλκυση ινοβλαστών και ο σχηματισμός ινωτικών εστιών. Η σταδιακή αύξηση των ινωτικών εστιών οδηγεί στην επιδείνωση της πνευμονικής λειτουργίας (*King et al., 2001*). Εκτός από τους βασικούς μεσολαβητές που προαναφέραμε, υπάρχουν διάφορα άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια που τα τελευταία χρόνια έχουν αρχίσει και θεωρούνται εξίσου σημαντικά στην παθογένεση της πνευμονικής ίνωσης. Τα βασικότερα θεωρούνται αυτά της απόπτωσης, του στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (Endoplasmic Reticulum, ER stress) και **των φλεγμονοσωμάτων**.

Απόπτωση: Η απόπτωση θεωρείται ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες της παθογένεσης της πνευμονικής ίνωσης. Τόσο το εσωτερικό αποπτωτικό μονοπάτι των Bcl-2 πρωτεϊνών, που πυροδοτείται από ενδοκυττάρια στρεσογόνα ερεθίσματα όπως η καταστροφή του DNA, όσο και το εξωτερικό μονοπάτι του Tumor necrosis factor υποδοχέα (TNF-receptor) ενεργοποιούνται κατά την ίνωση (*Drakopanagiotakis et al., 2008*). Το αν η απόπτωση έχει προ ή αντι-ινωτικό ρόλο εξαρτάται από το είδος των κυττάρων που επηρεάζει. Για παράδειγμα, η αυξημένη απόπτωση επιθηλιακών

κυψελιδικών κυττάρων που παρατηρείται κατά τα αρχικά στάδια της ίνωσης επιδεινώνει την κατάσταση του πνεύμονα ενώ η μειωμένη απόπτωση των μυοϊνοβλαστών σχετίζεται άμεσα με τη δημιουργία ινωτικών εστιών. Σε κάθε περίπτωση πάντως, η απόπτωση θεωρείται ο μηχανισμός που πυροδοτεί τη διαδικασία επούλωσης τραυμάτων αφού το αρχικό συμβάν είναι η καταστροφή επιθηλιακών και ενδοθηλιακών κυττάρων (*Scotton and Chambers, 2007).*

ER stress: Το ενδοπλασματικό δίκτυο είναι ένα ενδοκυτταρικό οργανίδιο όπου επιτελούνται σημαντικές κυτταρικές διεργασίες όπως η σύνθεση ορισμένων πρωτεϊνών, η αναδίπλωση και τελική τροποποίησή τους καθώς και η αποθήκευση και ο έλεγχος της ομοιόστασης του ασβεστίου. Το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου είναι ένα φαινόμενο που έκδηλώνεται όταν κάποια από τις λειτουργίες του οργανιδίου διαταράσσεται π.χ. όταν στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου συσσωρεύονται μη αναδιπλωμένες (unfolded) ή μη σωστά αναδιπλωμένες (misfolded) πρωτεΐνες. Η διατάραξη της φυσιολογικής λειτουργίας του ενδοπλασματικού δικτύου μπορεί να διαταράξει τη φυσιολογική λειτουργία και την ομοιόσταση του κυττάρου (*Shroder, 2008*). Τα τελευταία δύο χρόνια, πολλές μελέτες υποστηρίζουν ότι το ER stress συμβάλλει στην πνευμονική ίνωση. Τα μέχρι τώρα στοιχεία δείχνουν αυξημένη έκφραση των δεικτών ER stress σε ασθενείς με πνευμονική ίνωση και εντοπισμό των δεικτών αυτών στα κύτταρα τύπου ΙΙ. Έχει προταθεί ότι μία έντονη αντίδραση ER stress στα κύτταρα τύπου ΙΙ θα μπορούσε να είναι τα αίτιο της απόπτωσης των κυττάρων αυτών και επομένως της πυροδότησης της ινωτικής διαδικασίας (*Korfei et al., 2008*).

Γ. ΦΛΕΓΜΟΝΟΣΩΜΑΤΑ.

Η πρόσφατη ανακάλυψη των φλεγμονοσωμάτων οδήγησε σε διάφορες μελέτες πού ερευνούν το φλεγμονώδες αυτό μονοπάτι σε μια σειρά παθήσεων. Αρκετές από τις μελέτες αυτές έχουν επικεντρωθεί στο φλεγμονόσωμα NLRP3 το οποίο

ενεργοποιείται από μία σειρά κυτταρικών σημάτων συναγερμού. Ωστόσο, καθώς η γνώση για τα φλεγμονοσώματα αυξάνεται, βλέπουμε πως αυτά μπορούν άμεσα να ελέγξουν την σύνθεση κολλαγόνου, οδηγώντας έτσι στην αυξημένη εναποθεσή του στούς ιστούς διαφόρων οργάνων όπως τού πνεύμονα, ήπατος, καρδιάς και δέρματος. Τα φλεγμονοσώματα είναι πολυμοριακά συμπλέγματα πρωτεϊνών και αποτελούν υποδοχείς αναγνώρισης, φάνηκε δε ότι μπορούν να αναγνωρίσουν ένα ευρύ φάσμα μοριακών χαρακτηριστικών, μοναδικών για κάθε μικροοργανισμό (*Martinon, F., 2002*) . Επιπλέον συμμετέχουν στην πρωτογενή ανοσία όπου μπορούν να σημάνουν συναγερμό μέσω χημικών σημάτων με τη βοήθεια ενεργοποιημένων κυττάρων που δραστηριοποιούνται σε περιπτώσεις λοιμώξεων του ξενιστή (βακτήρια, ιούς και μύκητες) και σε ιστική βλάβη. Η κύρια λειτουργία τους είναι μέσω της κασπάσης-1 να ρυθμίσουν και να ενεργοποιήσουν το ανοσοποιητικό σύστημα ώστε να εκκρίνει την ιντερλευκίνη 1β (IL-1β). (*Gross, O.et 2012*).

Μετά την ενεργοποίηση της, η κασπάση-1 πυροδοτεί μια ανεξέλεγκτη έκκριση πρόδρομων πρωτεϊνών μέσω ενός ER/Golgi -ανεξάρτητου μονοπατιού. Πολλές από τις πρωτεΐνες αυτές επιδρούν στον κυτταροσκελετό των κυττάρων, στην γλυκόλυση, στην λειτουργία των μιτοχονδρίων και στη φλεγμονή. Υπάρχουν διάφορες κατηγορίες υποδοχέων αναγνώρισης όπως οι Toll like υποδοχείς, οι υποδοχείς λευκίνης και οι NOD-like υποδοχείς (NLRs). Οι υποδοχείς αυτοί με το ανάλογο ερέθισμα συμμετέχουν στην αύξηση της έκφρασης, την ενεργοποίηση και έκκριση της IL-1β και της IL-18 (*Kawai, T.2010*).. Το ερώτημα που τίθεται είναι γιατί ενώ το φλεγμονόσωμα συμμετέχει σε πολλές πρωτογενείς ανοσολογικές απαντήσεις σε διάφορα παθογόνα ή κυτταρικά σήματα συναγερμού ωστόσο δεν προκαλείται ίνωση σε όλες αυτές τις καταστάσεις. Μάλιστα η εμφάνιση ίνωσης φαίνεται να αποτελεί την εξαίρεση παρά τον κανόνα. Αυτό δείχνει ότι η ίνωση που προκύπτει από το ενεργοποιημένο φλεγμονόσωμα μπορεί να οφείλεται σε αρκετούς παράγοντες.

Αυτοί οι παράγοντες μπορεί να είναι ο συγκεκριμένος τύπος του φλεγμονοσώματος που ενεργοποιείται, η γενετική προδιάθεση που επηρεάζει την αυτοκρινή η παρακρινή απάντηση των κυττάρων στα σήματα που στέλνονται από το φλεγμονόσωμα, ο τύπος των κυττάρων μέσα στα οποία ενεργοποιείται το φλεγμονόσωμα, ή συνδυασμός όλων αυτών των παραγόντων. Οι ενεργοποιημένοι ινοβλάστες (μυοϊνοβλάστες) όχι μόνο παράγουν υπερβολικές ποσότητες κολλαγόνου όταν υπάρξει τραύμα αλλά μπορούν να παρουσιάσουν και διάφορα αντιγόνα. Για την ιστορία, οι ινοβλάστες δεν θεωρούνται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανοσολογική απάντηση, ωστόσο οι μυοϊνοβλάστες που προέρχονται από διάφορα όργανα έχουν αντιγονοπαρουσιαστικές ικανότητες. Αυτό που πλέον γίνεται εμφανές είναι ότι οι ινοβλάστες μπορούν να λειτουργήσουν ως κύτταρα φρουροί, τα οποία μπορούν να ενεργοποιηθούν από βακτήρια (η άλλα σήματα κινδύνου) ενώ αμέσως μετά την ενεργοποίηση τους εκκρίνουν κυτταροκίνες και χημειοκίνες (*Janeway, C. 2002*). Υπό φυσιολογικές συνθήκες επούλωσης, η διαφοροποίηση και ενεργοποίηση των μυοϊνοβλαστών προκαλεί την σύνθεση μεγάλων ποσοτήτων κολλαγόνου. Μόλις το τραύμα κλείσει οι μυοϊνοβλάστες οδηγούνται σε απόπτωση. Ωστόσο όταν ο μηχανισμός αυτός απορυθμιστεί, οι ενεργοποιημένοι για μεγάλο χρονικό διάστημα μυοϊνοβλάστες μπορούν να προκαλέσουν ίνωση. Στο εργαστήριο τα ποντίκια στα οποία έλλειπε η προσαρμοστική πρωτεΐνη του φλεγμονοσώματος ASC δεν ανέπτυξαν ίνωση κατά την έκθεσή τούς στην προϊνωτική χημική ουσία μπλεομυκίνη (*Izbicki G., 2002*) . Μετά την ενεργοποίηση της κασπάσης-1 απελευθερώνονται IL-1β και IL-18 που στοχεύουν στην κάθαρση των εισβολέων οργανισμών. Αναστολή της δράσης της κασπάσης-1 σε ασθενείς με ινωτική συστηματική σκλήρυνση μείωσε τη σύνθεση κολλαγόνου καθώς και την έκφραση της ακτίνης των α-λείων μυών στους μύοϊνοβλάστες. Σε μια μελέτη που διερεύνησε τη γονιδιακή έκφραση των φλεγμονοσωμάτων και τα προϊόντα που παράγονται από την

ενεργοποίηση τους βρέθηκαν 40 γονίδια που είχαν τουλάχιστο διπλασιαστεί. Αρκετά από τα γονίδια αυτά βρέθηκαν να αποτελούν πλατφόρμες φλεγμονοσωμάτων όπως πχ ο AIM2 και ο NLRP3. Ο AIM2 είναι ένας αισθητήρας του κυτταρικού μικροβιακού dsDNA και ο NLRP3 είναι ένας γενικός αισθητήρας κυτταρικού στρες. Επιπλέον, η δραστηριότητα της κασπάσης-1 είχε περίπου διπλάσια αύξηση στους ινοβλάστες της συστηματικής σκλήρυνσης ενώ βρέθηκε ότι οι ινοβλάστες που απομονώθηκαν από ινωτικές βλάβες εκκρίνουν περισσότερες πρωτεΐνες IL-1β και IL18 κάτι που μπορούσε να εμποδιστεί με τη χημική καταστολή ή την καταστολή του siRNA της κασπάσης-1. Αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι η απελευθέρωση της IL-1β και της IL-18 προκαλείται από την ενεργοποίηση ενός μηχανισμού των φλεγμονοσωμάτων που οδηγεί στη ίνωση. Για τον έλεγχο της υπόθεσης αυτής έγινε αναστολή της έκκρισης της κασπάσης-1 και παρατηρήθηκε μια σημαντική μείωση στην έκκριση της υδροξυπρολίνης (ολικού κολλαγόνου) από τους ινοβλάστες της Ssc. Τα παθολογικά κύτταρα που προκαλούν την αυξημένη σύνθεση κολλαγόνου στο δέρμα και στα διάφορα όργανα είναι οι μυοϊνοβλάστες. Η αναστολή έκκρισης της κασπάσης-1 (χημικά η και με το siRNA) μείωσε την έκφραση της ακτίνης στους α-λείους μύες. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι οι ίνες ακτίνης των α-λείων μυών περιείχαν λιγότερες πρωτεΐνες και ήταν λεπτότερες σε διάμετρο στους μυοϊνοβλάστες που έλαβαν αναστολέα της κασπάσης-1, ενώ στην f-ακτίνη δεν παρουσιάστηκαν αλλαγές. Επίσης, τα ενδογενή επίπεδα α-λείων μυών και f-ακτίνης σε αδρανείς ινοβλάστες παρέμειναν αναλλοίωτα. Στην Ssc, η ίνωση σχετίζεται άμεσα με την θνησιμότητα και θνητότητα. Όπως φαίνεται η δράση της κασπασης-1 σχετίζεται άμεσα με την ίνωση στην Ssc και μπορεί να υπάρχουν αυτοκρινή σήματα προκαλούμενα απο την IL-1β και IL-18 που δημιουργούν έναν ινωτικό φαινότυπο στους ασθενείς αυτούς. Η αιτιολογία της Ssc δεν έχει διευκρινιστεί ωστόσο έχουν ενοχοποιηθεί διάφορα χημικά και διάφορα παθογόνα για την

παθογένεια της νόσου αυτής. Μια υπόθεση που επικρατεί είναι ότι το οξειδωτικό στρες προεξάρχει της ίνωσης στους ιστούς της Ssc, γεγονός που ενισχύει τη συμμετοχή του φλεγμονοσώματος στην παθογένεια της νόσου .

Γίνεται πλέον προφανές ότι και άλλα ινωτικά νοσήματα μπορεί να πυροδοτούνται από το NLRP3 φλεγμονόσωμα.

Η πυριτίαση φάνηκε επίσης ότι προκαλείται από το NLRP3 φλεγμονόσωμα με αποτέλεσμα την υπερβολική εναπόθεση κολλαγόνου και την επιστράτευση φλεγμονωδών κυττάρων στους βλαμμένους ιστούς. Οι Cassel et al., βρήκαν ότι οι κρύσταλλοι πυριτίου αύξησαν τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου στα μακροφάγα. Σε μελέτες που πραγματοποίησαν βρήκαν ότι μπλοκάροντας τη δημιουργία ελεύθερων ριζών οξυγόνου ανέστειλαν την ενεργοποίηση της κασπάσης-1 και έτσι την απελευθέρωση IL-1β και τη σύνθεση κολλαγόνου. Αυτές οι μελέτες επιβεβαιώνουν το ρόλο που έχουν οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου στα σήματα που εκπέμπει το NLRP3 φλεγμονόσωμα και τονίζουν τον ινωτικό φαινότυπο που δημιουργούν.

Γίνεται πλέον προφανές ότι και άλλα ινωτικά νοσήματα μπορεί να πυροδοτούνται από το NLRP3 φλεγμονόσωμα. Το ήπαρ μπορεί εύκολα να τραυματιστεί από ιούς και χημικές ουσίες και η απάντηση του σε αυτούς τους τραυματισμούς είναι η δημιουργία φλεγμονής που μπορεί να οδηγήσει στην ίνωση. Όπως και στους άλλους ιστούς η ίνωση στο ήπαρ είναι αποτέλεσμα υπερβολικής εναπόθεσης κολλαγόνου η οποία συνοδεύεται από μειωμένη εξωκυττάρια αποδόμηση (*Gkretsi V. 2007*) Κατά την ενεργοποίηση τους, τα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα διαφοροποιούνται σε μυοϊνοβλάστες και αυξάνουν την έκκριση κολλαγόνου. Τα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα έχουν πολλές ομοιότητες με τους μυοϊοβλάστες που βρίσκονται στο τραυματισμένο δέρμα και είναι ικανά να φαγοκυτταρώσουν, να παρουσιάσουν αντιγόνα, να περιέχουν ίνες ακτίνης των α-λείων μυών καθώς επίσης μπορούν να μεταναστεύουν. Επομένως, τα ευρήματα αυτά δείχνουν ότι οι κρύσταλλοι

ουρικού μονονατρίου μπορούν επίσης να ενεργοποιήσουν το φλεγμονόσωμα στα αστεροειδή ηπατικά κύτταρα με αποτέλεσμα την αύξηση της εναπόθεσης κολλαγόνου στο ήπαρ, κάτι που δείχνει τη μεγάλη σημασία του μονοπατιού αυτού στην ινωτική νόσο (*Halle, A.et al. 2006*)

Περαιτέρω στοιχεία που συνηγορούν στο ότι το φλεγμονόσωμα μπορεί να προκαλέσει ίνωση δόθηκαν από μια μελέτη για τους καρδιακούς ινοβλάστες. Αυτή η μελέτη υποστηρίζει ότι η υποξία που ακολουθείται από αποκατάσταση της οξυγόνωσης και προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και από τη ροή του καλίου, διέγειρε το φλεγμονόσωμα στους καρδιακούς ινοβλάστες αλλά όχι στα καρδιομυοκύτταρα. Λόγω του ότι οι καρδιακοί ινοβλάστες μπορούν να πολλαπλασιαστούν στην καρδιά και να παράγουν εξωκυττάριες πρωτείνες, κυταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες η έρευνα αυτή τονίζει το γεγονός ότι αυτά τα κύτταρα μπορούν να ανιχνεύσουν σήματα κινδύνου που προκύπτουν από διάφορες καταστάσεις όπως ισχαιμία/επαναιμάτωση και να επιτείνουν την φλεγμονώδη απάντηση στην καρδιά με αποτέλεσμα την εναπόθεση κολλαγόνου (*Friedman S.L. 2000*).

Με την ανακάλυψη των φλεγμονοσωμάτων είδαμε ότι οι υποδοχείς λευκίνης που εμπεριέχονται στους NLRs αποτελούν μια νέα κατηγορία υποδοχέων αναγνώρισης. Ένα φλεγμονόσωμα αποτελείται από ένα NLR υποδοχέα που είναι ο αισθητήρας. Ο NLR αισθητήρας εντοπίζει τα σήματα κινδύνου. Ο μηχανισμός αυτός αναγνώρισης των σημάτων κινδύνου δεν έχει ακόμη πλήρως διευκρινιστεί ωστόσο μετά την ενεργοποίηση του οδηγεί στη δημιουργία αυτού του σύνθετου σχηματισμού που ονομάζεται φλεγμονόσωμα. Το φλεγμονόσωμα συνδέεται με μια προσαρμοστική πρωτεΐνη και την προ-κασπάση-1. Η σύνδεση που προκύπτει από τις πρωτεΐνες αυτές οδηγεί στη διάσπαση της κασπάσης-1 και επακόλουθη ενεργοποίηση της (*Bryan, N. B., 2009*). .

Το NLRP3 φλεγμονόσωμα είναι ένα από τα ευρέως μελετημένα

φλεγμονοσώματα και είναι ικανό να αναγνωρίσει αρκετά σήματα κινδύνου. Προσφάτως έχει φανεί ότι για τη σύνθεση τους τα φλεγμονοσώματα χρειάζονται την παρουσία ελεύθερων ριζών οξυγόνου. Η άμεση συμμετοχή του ενδοπλασματικού δικτύου endoplasmic reticulum (ER) και των μιτοχονδρίων φάνηκε να είναι εξίσου σημαντική στην αναγνώριση των σημάτων αυτών. Ο ρόλος των μιτοχονδρίων στην πρωτογενή ανοσολογική απάντηση έχει καθοριστεί και ανασκοπηθεί από τους West et al. Το αθόρυβο NLRP3 βρίσκεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Ωστόσο μόλις το φλεγμονόσωμα ενεργοποιηθεί τόσο το NLRP3 όσο και η ASC ανακατανέμονται γύρω από τον πυρήνα του κυττάρου όπου συνυπάρχουν με το ενδοπλασματικό δίκτυο και με οργανίδια των μιτοχονδρίων. Αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και τα σήματα των μιτοχονδρίων παίζουν σημαντικό ρόλο στην σύνθεση και ενεργοποίηση του NLRP3 φλεγμονοσώματος (*Cruz, C. M. et al. 2007*). . Ωστόσο δεν είναι γνωστό εάν οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου ενεργοποιούν και άλλες πλατφόρμες φλεγμονοσωμάτων.

Οι πρωτεΐνες των φλεγμονοσωμάτων μπορεί να εκφραστούν σε διάφορα ανοσολογικά ή μη ανοσολογικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των μονοκυττάρων/ μακροφάγων, των Τ κυττάρων, των μυοϊνοβλαστών/ ινοβλαστών, των κερατινοκυττάρων, των επιθηλιακών κυττάρων, των ηπατικών αστεροειδών κυττάρων τονίζοντας έτσι την σημασία του φλεγμονώδους αυτού μονοπατιού στην ανοσολογική απάντηση (*Ciraci, C., 2012*). . Επιπλέον, η ενεργοποίηση του NLRP3 φλεγμονοσώματος συνδέεται και με το ουδετεροφιλικό άσθμα ενώ οι ρυθμιζόμενες από το φλεγμονόσωμα κυτταροκίνες αποτελούν σημαντικούς μεσολαβητές στην οξεία πνευμονική βλάβη.

Ωστόσο, μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι το μονοπάτι του NLRP3 φλεγμονοσώματος δεν συνδέεται με τη σοβαρότητα της σταθερούς ΧΑΠ όπως

φάνηκε μετά από ανάλυση του BAL και κυτταρικών στοιχείων στους ασθενείς αυτούς.

Πρόσφατα δεδομένα έδειξαν μια πιθανή ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος από το κάπνισμα του τσιγάρου που αποτελεί ένα περιβαλλοντικό παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη της IPF αλλά και της ρευματοειδούς αρθρίτιδας γεγονός που ενισχύει την υποψία συμμετοχής του φλεγμονοσώματος στην πνευμονική ίνωση. Έχει φανεί ακόμη ότι η IL-1β συμμετέχει στην παθογένεια του εμφυσήματος που προκαλείται από το κάπνισμα και στην αναδιαμόρφωση των αεραγωγών.

Λαμβάνοντας αυτά υπ' όψιν, όλες αυτές οι μελέτες που αφορούν τους ινοβλάστες και τα διάφορα όργανα (πνεύμονες, δέρμα, καρδιά, ήπαρ) έδειξαν ότι το NLRP3 φλεγμονόσωμα μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη ίνωσης τόσο σε στείρες συνθήκες όσο και σε παθολογικές καταστάσεις. Σε μια ινωτική διαδικασία, το χρόνια ενεργοποιημένο φλεγμονόσωμα προκαλεί τη συνεχή έκκριση της IL-1β και της IL-18 που διεγείρουν τους ινοβλάστες και συντηρούν ένα ινωτικό φαινότυπο. Το εάν οι ινοβλάστες χρειάζονται μόνο την ενεργοποίηση του NLRP3 φλεγμονοσώματος η και άλλων φλεγμονοσωμάτων δεν έχει ακόμη ξεκαθαριστεί.

Κυττοκίνες IL-1β και IL -18

Οι δύο περισσότερο μελετημένες πρωτεΐνες που εκκρίνονται από τα κύτταρα μέσω της διάσπασης της κασπάσης-1 και που περιέχουν ένα ενεργοποιημένο φλεγμονόσωμα είναι οι ιντερλευκίνες IL-1β και IL-18. Η IL-1β είναι μια αδρανής 30,7 kDa μοριακού βάρους πρωτεΐνη η οποία διασπάται από τη κασπάση-1 σε μια ενεργό 17,5 kDa μοριακού βάρους πρωτεΐνη. Παρομοίως, η IL18 στην αρχική της μορφή αποτελεί μια μεγάλη 22,3 kDa μοριακού βάρους αδρανής πρωτεΐνη η οποία διασπάται μέσω της κασπάσης-1 σε μια μικρότερου 17,3 kDa μοριακού βάρους ενεργό πρωτεΐνη 9 . . Μετά τη διάσπαση τους τόσο

η IL-1β όσο και η IL18 εκκρίνονται από το κύτταρο και συμμετέχουν στο αυτοκρινές και παρακρινές σύστημα. Η IL-1β και η IL18 είναι δομικά παρόμοιες (*Dinarello, C. A. 2009*).

Η IL-1β είναι μια πλειοτροπική κυταροκίνη που στοχεύει την εντοπισμένη φλεγμονή όπως πχ παρασιτικές, βακτηριακές, η ιογενείς λοιμώξεις. Μπορεί επίσης να συμμετέχει συστηματικά στη φλεγμονή σε έδαφος χρόνιας νόσου. Η IL-1β παράγεται από πολλά κύτταρα όπως επιθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες, Τ κύτταρα κτλ. ως απάντηση σε διάφορα παθογόνα ή ιστική βλάβη. Η IL-1β μπορεί να ρυθμίσει την έκφραση του δικού της mRNA μέσω σημάτων που δημιουργούνται από τον υποδοχέα της IL-1 (*Lasiglie, 2011*) . Η IL-1β χρειάζεται δύο σήματα για την έκκριση των πρωτεϊνών. Το πρώτο σήμα παρέχεται από τους toll-like υποδοχείς και το δεύτερο σήμα παρέχεται από την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος, τη διάσπαση της κασπάσης-1 που οδηγεί στην ωρίμανση και έκκριση της IL-1β. Η οξεία απελευθέρωση της IL-1β στο περιφερικό αίμα ως αποτέλεσμα κυτταρικής διέγερσης αυξάνει την έκφραση άλλων προφλεγμονωδών κυτταροκίνων όπως η IL-6. Επίσης αυξάνει τα επίπεδα κορτιζόλης και δρα στον υποθάλαμο προκαλώντας πυρετό (*Horai, R.et al.1998*). Ωστόσο σε μερικά χρόνια νοσήματα η ποσότητα της IL-1β που εκκρίνεται μπορεί να μην είναι αρκετή να διεγείρει τον υποθάλαμο και μπορεί να δρα μόνο τοπικά, ενισχύοντας έτσι τη φλεγμονώδη γονιδιακή έκφραση και οδηγώντας σε χρόνια νόσο.

Η IL-18 συμμετέχει επίσης στη μείωση των σημάτων του φλεγμονοσώματος, η δράση της ωστόσο δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Σε αντίθεση με την IL-1β η IL-18 εκφράζεται αρχικά στην πρόδρομη μορφή της σε πολλά κύτταρα ενώ για τη διάσπαση και έκκριση της χρειάζεται την κασπάση-1. Όπως η IL-1β έτσι και η IL-18 μπορεί να διαμορφώσει την έκφραση του δικού της RNA ενώ η μεταγωγή του σήματος της είναι παρόμοια με αυτή της IL-1β μέσω της δράσης του NfkB. Η IL-18 μπορεί να ενεργοποιήσει τα Τ κύτταρα με αποτέλεσμα την

αυξημένη σύνθεση του TNF-a, της IL-2 και του GM-CSF.

Η IL-1β και Η IL-18 μπορούν μα προκαλέσουν ίνωση

Οι πρωταρχικοί μοριακοί μηχανισμοί που συμμετέχουν στην εμφάνιση οξείας ή χρόνιας νόσου δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί. Ωστόσο η IL-1β και η IL-18 φαίνεται να παίζουν κεντρικό ρόλο προς την κατεύθυνση αυτή. Το τι καθορίζει εάν μια οξεία εμφάνιση ενός νοσήματος θα οδηγηθεί σε λύση η θα εξελιχθεί σε χρονιότητα και ίνωση είναι ακόμη άγνωστο. Ωστόσο από πρόσφατες μελέτες φάνηκε ένας αμφιλεγόμενος ρόλος της IL-1β και της δράσης της στην έκφραση του TGF-β1. Μελέτες του Luo et al., έδειξαν ότι μια σύντομη διέγερση (μερικών λεπτών) με την IL-1β και τον TGF-β1 οδήγησε σε καταστολή της φωσφορηλίωσης του Smad3 ενώ περαιτέρω καταστολή οδήγησε σε μείωση των σημάτων των μονοπατιών του TGF-β1. Εντούτοις, μακροχρόνια διέγερση (24 ώρες) με την IL-1β και τον TGF-β1 αύξησε την φωσφορηλίωση του Smad3 και αύξησε την έκφραση του TGF-β1. Επιπλέον, έχει φανεί ότι μακροπρόθεσμη έκθεση των μικροαγγειακών επιθηλιακών κυττάρων στην IL-1β μπορεί να οδηγήσει σε μόνιμη μεταμόρφωση των κυττάρων αυτών σε μυοϊνοβλάστες οι οποίοι μετά την διαφοροποίηση τους συνθέτουν μεγάλες ποσότητες κολλαγόνου (*Kuida, K.et al. 1995*).

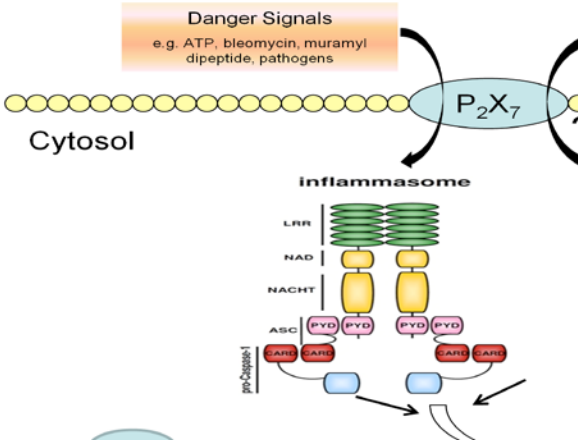
Ο ρόλος της IL-1β στην ίνωση και στην επούλωση τραυμάτων αρχίζει να γίνεται εμφανής. Μελέτες σε εργαστήρια έδειξαν ότι η IL -1β (και η IL-α) μπορούν να διεγείρουν την έκκριση κολλαγόνου με δοσοεξαρτόμενο τρόπο. Παροδική υπερέκφραση της IL-1β στα επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών οδήγησε στην απελευθέρωση του TNF-α και της IL-6 και στη συνέχεια ακολούθησε σημαντική αύξηση του TGF-β1 και του αυξητικού παράγοντα των αιμοπεταλίων που οδηγεί στην εναπόθεση κολλαγόνου στον πνεύμονα (*Helmby, H. & Grencis 2004*). Λόγω του ότι η IL-1β έχει τη δική της γονιδιακή έκφραση, η χρόνια ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος, που οδηγεί στη

συνεχή διάσπαση της IL-1β, μπορεί να συντηρήσει αυξημένα τα επίπεδα της ενεργού TGF-β1 πρωτεΐνης με αποτέλεσμα την εμφάνιση ίνωσης.

Για την περαιτέρω διευκρίνιση του ρόλου της IL-1β στην ανάπτυξη της ίνωσης, διενεργήθηκε μια έρευνα σε ποντίκια τα οποία είχαν έλλειψη του υποδοχέα της IL-1β και στα οποία έγινε βαθειά τομή και τραύμα με παρακολούθηση της επούλωσης του. Οι Thomay, et al ανέφεραν λιγότερη ίνωση, περισσότερη κολλαγονολυτική δραστηριότητα χωρίς μείωση στα φλεγμονώδη κυτταρικά διηθήματα και καλύτερη επούλωση. Επιπλέον τα υγρά της πληγής περιείχαν μικρότερη ποσότητα IL-6, TGF-β1 καθώς και αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα. Επιπρόσθετα, η χορήγηση ανακίνρα (ανταγωνιστής του υποδοχέα της IL-1) στα τραύματα με βάθος απέτρεψε την ίνωση του τραύματος γεγονός που ενισχύει την άποψη ότι η IL-1 έχει προϊνωτική δράση.

Η IL-18 έχει επίσης φανεί ότι έχει προϊνωτική δράση. Η χορήγηση ανασχεδιασμένης IL-18 προκάλεσε αναδιαμόρφωση του μυοκαρδίου και αυξημένη διάμεση μυοκαρδιακή ίνωση, ενώ η άμεση στόχευση της IL-18 από τη χημική ένωση φελοδιπίνη μείωσε την περιαγγειακή ίνωση. Η φελοδιπίνη δρα μπλοκάροντας τα κανάλια ασβεστίου. Τα κανάλια ασβεστίου φάνηκε ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος οπότε η μείωση της έκκρισης της IL-18 μπορεί να οφείλεται στην καταστολή του φλεγμονοσώματος παρά στην άμεση δράση της φελοδιπίνης στην IL-18.

Μελέτες σε εργαστήρια έδειξαν μια δοσοεξαρτόμενη αύξηση των τύπου I και III κολλαγονικών πρωτεϊνών με την ανασυνδιασμένη IL-18. Η IL-18 φάνηκε επίσης να προκαλεί πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών και της επαγόμενης από την IL-18, α2β1 ιντεγκρίνης. Η ιντεγκρίνη αυτή αποτελεί έναν από τους κύριους υποδοχείς που ενώνονται με το κολλαγόνο. Επιπλέον υπάρχουν και άλλα προϊνωτικά μόρια που αυξήθηκαν με την χορήγηση ανασυνδιασμένης IL-18 π.χ. Η IL-18 προκάλεσε αυξημένη έκκριση της οστεοποντίνης και αυτό φάνηκε να συνυπάρχει με την αύξηση του καρδιακού κολλαγόνου.



<u>Εικόνα 4</u>: Το αυτοκρινές σήμα της IL-1a η IL-18 που προκαλείται από ένα ενεργοποιημένο φλεγμονόσωμα μπορεί να προκαλέσει διαφοροποίηση των μυοινοβλαστών. (Carol M. Artlett)

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν να μελετήσουμε τις διαφορές στην έκφραση των φλεγμονοσωμάτων στο BALF σε δείγματα μεταξύ ασθενών με ιδιοπαθή και αυτοάνοση διάμεση πνευμονική ίνωση. Αυτό μπορεί να συσχετισθεί με διαφορές στην παθογένεια, πρόγνωση και ανταπόκριση στη θεραπεία των ασθενών αυτών. Ειδικότερα, η μελέτη μας παρέχει πληροφορίες για τη συμμετοχή της πρωτογενούς ανοσίας στην παθογένεια των ινωτικών πνευμονοπαθειών η οποία ακόμη παραμένει ένα αίνιγμα, πληροφορίες σχετικά με το ρόλο της φλεγμονής στην παθογένεια των διαταραχών αυτών, ένα πιθανό θεραπευτικό στόχο ειδικά για τον πιο καταστροφικό τύπο της ίνωσης την IPF, ένα βιολογικό δείκτη ικανό να διαφοροποιήσει την ιδιοπαθή και αυτοάνοση UIP και να προσφέρει χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με την πρόγνωση της νόσου. Στην παρούσα μελέτη, επίσης προσπαθήσαμε να διερευνήσουμε κατά πόσο το NLRP3 φλεγμονόσωμα εμπλέκεται στην παθογένεια της ίνωσης στις ιδιοπαθείς (ΙΠΙ) αλλά και αυτοάνοσες (RA-UIP) διάμεσες πνευμονοπάθειες. Χρησιμοποιήσαμε την έκφραση της IL-1β και της IL-18 στο βρογχοκυψελιδικό έκλπυμα και στα μακροφάγα του βρογχοκυελιδικού εκπλύματος ως δείκτες ενεργοποίησης του NLRP3 φλεγμονοσώματος όπου τα ευρήματά μας έδειξαν παρόμοιο προφίλ ενεργοποίησης του φλεγμονοσώματος στην αυτοάνοση και ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Βιολογικά υλικά και διαδικασία

Ασθενείς

Οι ασθενείς ταξινομήθηκαν ως νυν καπνιστές, πρώην καπνιστές (οριζόμενοι ως άτομα με καπνιστική συνήθεια τουλάχιστο ένα τσιγάρο την ημέρα για τουλάχιστο ένα έτος και διακοπή του καπνίσματος για διάστημα μεγαλύτερο των έξι μηνών) η μη καπνιστές.

Στη μελέτη συμμετείχαν τριάντα τρείς ασθενείς.

Δεκαέξι με IPF (n=16) : Η διάγνωση της IPF καθορίστηκε με βάση τα πρόσφατα κριτήρια ATS/ERS. Όλοι οι ασθενείς ήταν πρόσφατα διαγνωσμένοι και δεν είχαν λάβει προηγούμενη θεραπεία.

Οκτώ ασθενείς με RA-UIP (n=8) : Η διάγνωση τους έγινε με βάση τα κριτήρια του Αμερικάνικου κολεγίου ρευματολογίας (American College of Rheumatology -ACR) και τα αναθεωρημένα κριτήρια του 1987 για την ταξινόμηση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Οι ασθενείς με RA-UIP είχαν απεικονιστικά κριτήρια ενδεικτικά εγκατεστημένης διάμεσης πνευμονοπάθειας.

Εννέα υγιείς μάρτυρες (n=9): Ασθενείς οι οποίοι υποβλήθηκαν σε βρογχοσκοπικό έλεγχο για τη διερεύνηση αιμόπτυσης και οι οποίοι δεν είχαν άλλα εμφανή συνοδά πνευμονικά νοσήματα και με φυσιολογικά βρογχοσκοπικά ευρήματα και κυτταρολογικές εξετάσεις. Δεν συμπεριλήφθησαν τα άτομα που αναφέραν λοιμώξεις του αναπνευστικού τις τελευταίες έξι εβδομάδες. Κανένας ασθενής δεν είχε λάβει ανοσοκατασταλτική αγωγή πριν τη βρογχοσκόπηση.

Όλοι οι ασθενείς έδωσαν γραπτή συγκατάθεση. Η μελέτη εγκρίθηκε από την εθνική επιτροπή του πανεπιστημιακού νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης Ελλάδος.

Λειτουργικός πνευμονολογικός έλεγχος

Ο σπιρομετρικός λειτουργικός έλεγχος πραγματοποιήθηκε εντός περιόδου ενός μηνός από την αξονική τομογραφία και συμπεριέλαβε τις τιμές, FEV1, FVC, Dlco (διορθωμένη ως προς την συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης) οι οποίες εκφράστηκαν ως ποσοστό στις προβλεπόμενες φυσιολογικές τιμές. Ο CPI υπολογίστηκε ως εξής : 91.0 - (0.65 * ποσοστό της προβλεπόμενης Dlco) - (0.53 * ποσοστό της προβλεπόμενης FVC) + (0.34 * ποσοστό της προβλεπώμενης FEV1).

Όλοι οι ασθενείς εκτιμήθηκαν με τη διενέργεια πλήρη λειτουργικού σπιρομετρικού ελέγχου (PFTs): σπιρομέτρηση, πνευμονικοί όγκοι με τη βοήθεια της μεθόδου αραίωσης ηλίου, DLCo (διορθωμένη ως προς την αιμοσφαιρίνη) χρησιμοποιώντας την μέθοδο μιας αναπνοής με τη βοήθεια υπολογιστή (Jaeger 2.12; MasterLab, Würzburg, Γερμανία). Οι προβλεπόμενες τιμές καθορίστηκαν από τον καθιερωμένο λειτουργικό πνευμονικό έλεγχο της ευρωπαϊκής κοινότητας άνθρακα και ατσαλιού, Λουξεμβούργο (1993).

Έκταση της νόσου στην αξονική τομογραφία.

Η αξονική τομογραφία ήταν υψηλής ευκρίνειας με τομές των δέκα χιλιοστών και ευθυγράμμιση στα 1,5-3 χιλιοστά, κατάλληλες να απεικονίζουν το πνευμονικό παρέγχυμα. Τα χαρακτηριστικά αυτά ποσοτικοποιήθηκαν σε κάθε επίπεδο. Η έκταση της νόσου εκτιμήθηκε κοντά στο 5%. Η συνολική έκταση της νόσου επίσης εκτιμήθηκε (ο μέσος όρος από τα πέντε τμηματικά σκορ).

Ηλικία

Οι ηλικίες των ασθενών ήταν παρόμοιες σε όλες τις ομάδες ώστε αποφευχθούν λανθασμένα συμπεράσματα τα οποία να οφείλονται στην μεγάλη απόκλιση μεταξύ ηλικιών .

Βιολογικά δείγματα και διαδικασία που ακολουθήθηκε

Έγινε λήψη του BAL από όλους τους ασθενείς και τους μάρτυρες. Συνοπτικά, ένα εύκαμπτο βρογχοσκόπιο ενσφηνώθηκε σε ένα υποτμηματικό βρόγχο μιας προκαθορισμένης περιοχής που καθορίστηκε βάση ακτινολογικών ευρημάτων. Η τεχνική λήψης του BAL προϋπόθετε την έγχυση και αναρρόφηση ποσότητας 240 ml φυσιολογικού ορού σε δόσεις 60 ml κάθε φορά. Η ποσότητα που λήφθηκε ήταν η ίδια για όλα τα δείγματα. Το υλικό του BAL που πήραμε χωρίστηκε σε δύο ισόποσα τμήματα. Το ένα δείγμα στάλθηκε στο μικροβιολογικό και κυτταρολογικό εργαστήριο και το άλλο συντηρήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου και χρησιμοποιήθηκε για την έρευνα μας αυτή. Στη συνέχεια προχωρήσαμε στην απομόνωση του πληθυσμού των μακροφάγων.

Εν συντομία, φιλτράραμε το BALF με φίλτρο Millipore για να απομονώσουμε τα κύτταρα στο εναιώρημα μας από διάφορα κατάλοιπα και βλέννη. Για να λάβουμε το ίζημα τα δείγματα μας φυγοκεντρήθηκαν στις 1500 στροφές το λεπτό για πέντε λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν με τη χορήγηση 4 ml RPMI, 20% FBS 10* πενικιλλίνη / στρεπτομυκίνη ενώ στη συνέχεια τα κύτταρα καταμετρήθηκαν με την αντικειμενοφόρο πλάκα Neubauer.

Η απομόνωση του RNA διεξήχθη με τη χορήγηση Tri Reagent παράγοντα, έπειτα χορηγήθηκε MBL και στη συνέχεια NucleoSpin RNA II κιτ , Macherey Nagel. Η σύνθεση του cDNA πραγματοποιήθηκε με το σετ συνθέσεως Maxima Strand cDNA, Thermo Scientific (qPCR Master Mix, Thermo Scientific), χρησιμοποιώντας το MxPro 3000P, Agilent Technologies για την αξιολόγηση των: NLRP3, IL-6, TNFa, κασπάση-1. Το GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως

γονίδιο αναφοράς. Το qRTPCR χρησιμοποιήθηκε για να προσδιοριστούν τα επίπεδα ——έκφρασης από τα ακόλουθα γονίδια: NLRP3 (F5'GATCTTCGCTGCGATCAACAG-3', R5'CGTGCATTATCTGAACCCCAC3'), IL-6(F5'-CAGAGCTGTGCAGATGAGT-3', R5'CTGCAGCCACTGGTTCTGT-3'), TNFa(F5'-AGCCCATGTTGTAGCAAACC-3',5'-R TCTCAGCTCCACGCCATT-3'), κασπάση-1 (F5'-CAGAGCTGTGCAGATGAGT-3', 5'-R CTGCAGCCACTGGTTCTGT-3'). GAPDH (F5'-GGAAGGTGAAGGTCGGAGTCA-3', R5'-GTCATTGATGGCAACAATATCCACT-3').

Όλες οι αντιδράσεις έτρεξαν εις διπλούν και τα επίπεδα μεταγραφής υπολογίστηκαν και ρυθμίστηκαν ως προς το GAPDH, με τους κατάλληλους βαθμονομητές, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Pfaffl για τη σχετική ποσοτικοποίηση.

Τα ενδοκυττάρια επίπεδα της πρωτεΐνης IL-1β εκτιμήθηκαν με την μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης. Συγκεκριμένα, τα μακροφάγα του BAL από 16 ασθενείς με IPF και RA-UIP και 12 από μάρτυρες ομογενοποιήθηκαν με σκοπό την απομόνωση των αντίστοιχων πρωτεϊνών. Τα λύματα πρωτεΐνης προστέθηκαν στο 1/3 του όγκου ρυθμιστικού διαλύματος SDS (NuPAGE LDS LDS 4X Ρυθμιστικού Διαλύματος Δείγματος, Invitrogen Corp., USA). Κατά την προετοιμασία των δειγμάτων, τα πρωτεϊνικά δείγματα του BALF (50 ng) διαχωρίστηκαν με τη βοήθεια ηλεκτροφόρησης γέλης SDS-πολυακρυλαμιδίου 12,5%. Οι πρωτεΐνες στη συνέχεια μεταφέρθηκαν με ηλεκροφόρηση από τις γέλες σε μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Οι μεμβράνες επωάστηκαν με τη βοήθεια πολυκλωνικού αντισώματος κουνελιού της IL-1β (πρωτεΐνη 17kDa, κυτταρική τεχνολογία σηματοδότησης cat # 2022). Μετά την χορήγηση ενός δεύτερου αντισώματος, η ανοσοανίχνευση πραγματοποιήθηκε με ενισχυμένη χημειοφωταύγεια, που φάνηκε σε λήψη ακτινογραφίας. (φιλμ Fuji).

Χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα Ποντικού αντι-ακτίνης (MAB 1501, Chemicon, Temecula, CA) για να ομαλοποιήσει την έκφραση της IL-1β. Τα φίλμ σαρώθηκαν και οι λωρίδες πρωτεΐνης ποσοτικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό ανάλυσης εικόνας Photoshop CS2 (Adobe Systems Inc., CA).

Ενεργοποίηση του Φλεγμονοσώματος

Η διέγερση του TLR4 με τη χορήγηση LPS (MERCK, Λίποπολυσακχαρίτης, *E. coli* O111, cat#437627-5MG) (50 pg/ml, 2 ώρες επώαση 37°C/5%) ακολουθήθηκε από τη ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος με τη χορήγηση 5mM ATP και επώαση του για 20 λεπτά στους 37°C/5% CO2 με την χορήγηση η όχι αναστολέα της κασπάσης-1. Τα κύτταρα επωάστηκαν στη φυγόκεντρο στις 1000 στροφές/λεπτό στους 4˚C. Το υπερκείμενο υλικό συλλέχθηκε και τα κύτταρα του διασπάστηκαν με τη χορήγηση RIPA ρυθμιστικού διαλύματος σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα υπερκείμενα διαλύματα και τα κύτταρα αποθηκεύτηκαν στους – 80^{0}C.

Η ολική μέτρηση του RNA και η RT-PCR πραγματοποιήθηκαν όπως προηγουμένως αναφέραμε.

Η έκκρισή της IL-1β και της IL-6 σε όλα τα υπερκείμενα μετρήθηκε με τη μέθοδο ELISA με τη χρήση εμπορικών Kits (σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα αποτελέσματα μετατράπηκαν σε pg/ml ανά ένα εκατομμύριο (10^6) κύτταρα.)

Τα ενδοκυττάρια επίπεδα της πρωτεΐνης IL-1β μετρήθηκαν με την μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης όπως προαναφέρθηκε.

Στατιστική ανάλυση

Οι εκκρινόμενες IL-1β και IL-6, καθώς και τα κυτοσολικά επίπεδα της IL-1β και η σχετική έκφραση των μελετώμενων γονιδίων αξιολογήθηκαν με τα one-

sample Kolmogorov-Smirnov goodness of fit test, Friedman one way analysis of variance (ANOVA) και Mann-Whitney U test, ανάλογα με την περίπτωση. Οι τιμές αναφέρονται ως mean ± SD (τυπική απόκλιση – standard deviation). Οι συσχετίσεις πραγματοποιήθηκαν με το Linear Regression - Pearson's test. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα SPSS 17.0 Chicago IL, USA. Στατιστική σημαντικότητα ορίστηκε στο 95% level (P-value < 0.05).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Χαρακτηριστικά ασθενών

Τα δημογραφικά στοιχεία και ο πλήρης λειτουργικός σπιρομετρικός έλεγχος των ασθενών φαίνονται στον πίνακα-1. Τα κλινικά χαρακτηρηστικά και η σπιρομέτρηση των ασθενών με IPF και RA-UIP δεν παρουσίαζαν αξιόλογες διαφορές. Η διαφορές τους ήταν στο φύλο (περισσότερες γυναίκες στην ομάδα των RA-UIP p=0.003) και στην FVC που ήταν υψηλότερη επίσης στην ομάδα των RA-UIP (p=0.03). Οι ασθενείς με IPF και RA-UIP δεν είχαν ηλικιακές διαφορές ενώ οι μάρτυρες είχαν μικρότερη ηλικία και από τις άλλες δύο ομάδες. Επιπλέον η διαχυτική ικανότητα των ασθενών με IPF και RA-UIP ήταν σαφώς χαμηλότερη από αυτή των μαρτύρων (πίνακας 1). Οι κυτταρικοί πληθυσμοί στο BAL των ασθενών με IPF και RA-UIP δεν παρουσίαζαν διαφορές (πίνακας 2).

Πίνακας 1. Κλινικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού έρευνας.

Χαρακτηριστικά	**Μάρτυρες**	**IPF**	**RA-UIP**	**p τιμή**
Αριθμός	9	16	8	
Ηλικία	60.3 ± 9.7	69.3 ± 5.2	69.1 ± 13.2	p1=0.0001, p2=0.0110, p3=NS*
Φύλο Άρρεν/Θήλυ)	06/03/16	12/4	1/7	p1, p2 NS, p3 =0.049**
Καπνιστική συνήθεια (Όχι/ Πρώην/Νύν)	1/ 0/8	3/ 7/6	6/1/1	p1, p2, = NS**,p3=0.0087

Πακέτα έτη	38.24 ± 24.7	39.3 ± 30.2	15.0 ± 27.9	p1, p2, p3 = NS*
FVC	95.5 ± 11.25	72.1 ± 16.6	94.1 ± 30.5	p1, p2 NS, p3 = 0.03*
FEV_1	99.05± 33.6	77.4 ± 14.7	96.2 ± 31.7	p1, p2, p3 = NS*
DLco	90.33 ± 0.5	44.8 ±15.9	55.1 ± 21.6	p1,p2 = 0.003, p3 NS*
CPI (units)	-	41.1 ± 21.2	-	-

Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος ± σταθερές αποκλείσεις.

**t*-test; $P < 0.05$ θεωρείται στατιστικά σημαντικό.

**χ^2 test; $P < 0.05$ θεωρείται στατιστικά σημαντικό .

p1: IPF vs Μάρτυρες, p2: RA-UIP vs Μάρτυρες, p3: IPF vs RA-UIP.

Συντομογραφίες : FEV_1: Δυναμικός εκπνευστικός όγκος στο 1 δευτερόλεπτο, FVC: Δυναμική ζωτική χωρητικότητα, DL_{CO}, Διαχυτική ικανότητα μονοξειδίου του άνθρακα.

Πίνακας 2. Αντιγόνα και αντισώματα του πλάσματος και χαρακτηριστικά κυτταρικού πληθυσμού του BAL όλων των δειγμάτων που μελετήθηκαν.

	Μάρτυρες	**IPF**	**RA-UIP**	**Φυσιολογικές τιμές**	**p value**
N	12	16	8		
Ειδικά ευρήματα στο πλάσμα					
CRP	0.5±24	1.47±1.76	0.68±0.57	0.08-0.8	NS
RF	10.60±0.00	14.69±14.69	18.60±18.73	0-35	NS
Anti-CCP	-	3.92±2.21	5.68±3.21	<20 negative	NS
ENAs	0.53±0.21	0.29±0.10	0.31±0.00	<20 negative	0.0402
ANA	1/80	1/80	1/80	1/80	NS

				negative	
Balf κυτταρικός πληθυσμός					
Μακροφάγα	67.00±4.35	78.82±10.10	63.60±17.44	-	NS
Ουδετερόφιλα	9.50±2.12	15.00±10.00	16.40±15.39	-	NS
Λεμφοκύτταρα	20.25±6.95	7.63±3.39	18.00±12.02	-	NS
Ηωσινόφιλα	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	-	-

Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος ± σταθερές αποκλείσεις.

Η μονόδρομη ανάλυση της διακύμανσης του Friedman (ANOVA) εφαρμόστηκε σε όλες τις αναλύσεις.

IPF vs RA-UIP όλες οι p τιμές NS.

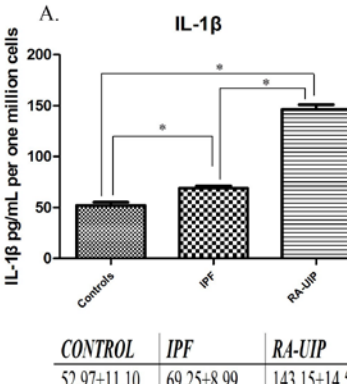
NS; not significant-όχι σημαντικό.

Οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες και οι πρωτεΐνες που σχετίζονται με το NLRP3 φλεγμονόσωμα παρουσιάζουν αύξηση στο BAL των ασθενών με IPF και RA-UIP.

Αρχικά εστιάσαμε στα επίπεδα της IL-1β στα δείγματα του BAL των ασθενών με IPF και RA-UIP σε σύγκριση με αυτά των μαρτύρων, ως δείκτες ενεργοποίησης του NLRP3 φλεγμονοσώματος.

Παρατηρήσαμε σημαντική αύξηση των επιπέδων της IL-1β στους πνεύμονες των ασθενών με RA-UIP συγκριτικά με τους μάρτυρες και τους ασθενείς με IPF (εικόνα 5a) κάτι που δείχνει την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος στην RA-UIP. Επιπλέον παρατηρήσαμε αυξημένα επίπεδα της IL-6 στους πνεύμονες ασθενών τόσο με IPF όσο και RA-UIP γεγονός που δείχνει ότι υπάρχουν και άλλα ενεργά φλεγμονώδη μονοπάτια στην IPF (εικόνα 1b και c). Σημειώνουμε ότι η έκφραση του TNF-α αυξήθηκε αρκετά στους πνεύμονες ασθενών με RA-UIP.

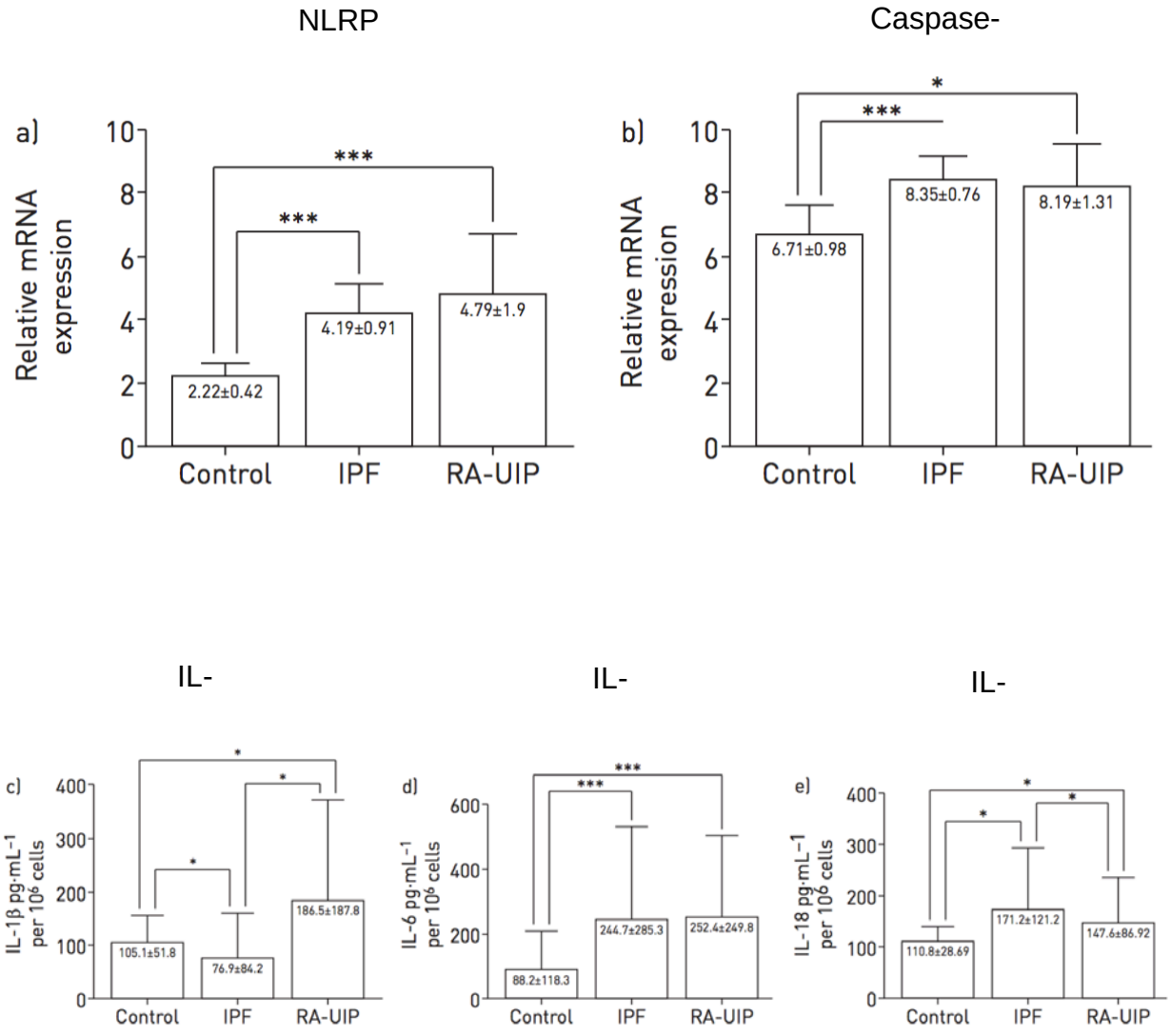
Figure 1.



Εικόνα 5. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης της IL-1β , IL-6, TNF-a στο BAL όπου παρατηρήθηκε: α) αύξηση των επιπέδων της IL-1β στους πνεύμονες των ασθενών με RA-UIP συγκριτικά με τους μάρτυρες και τους ασθενείς με IPF, β) αύξηση των επιπέδων της IL-6 στους πνεύμονες ασθενών με IPF και γ) RA-UIP και αύξηση της έκφρασης του TNF-α στους πνεύμονες ασθενών με RA-UIP.

Στη συνέχεια μελετήσαμε το ρόλο των πρωτογενών ανοσολογικών κυττάρων όπως των μακροφάγων του κυψελιδικού επιθηλίου, σε ότι αφορά στην έκκριση της IL-1β στους ασθενείς με IPF και RA-UIP. Εκτιμήθηκε η έκφραση των συστατικών του NLRP3 φλεγμονοσώματος σε καλλιέργειες μη διεγερμένων μακροφάγων του BALF καθώς και η παραγωγή της IL-1β και IL-18 (εικόνα 6). Τα βασικά επίπεδα της mRNA έκφρασης του NLRP3 φλεγμονοσώματος και διαφόρων στοιχείων του καθώς και η κασπάση-1 , αυξήθηκαν στους ασθενείς με IPF και RA-UIP σε σύγκριση με τους μάρτυρες (εικόνα 6a και b). Ωστόσο παρατηρήσαμε ότι τα μακροφάγα του BAL των ασθενών με RA-UIP έκκριναν

υψηλότερα ποσοστά της IL-1β από ότι των ασθενών με IPF και των μαρτύρων (εικόνα 6c). Ωστόσο η IL-18 παρουσίασε υψηλότερες τιμές και στις δύο ομάδες ασθενών με ακόμη υψηλότερα επίπεδα στους ασθενείς με IPF. Επιπλέον η IL-6 παρουσίασε αύξηση στα μακροφάγα των ασθενών με RA-UIP και IPF (εικόνα 6d) όμως τα επίπεδα του TNF-α αυξήθηκαν μόνο στους ασθενείς με RA-UIP.

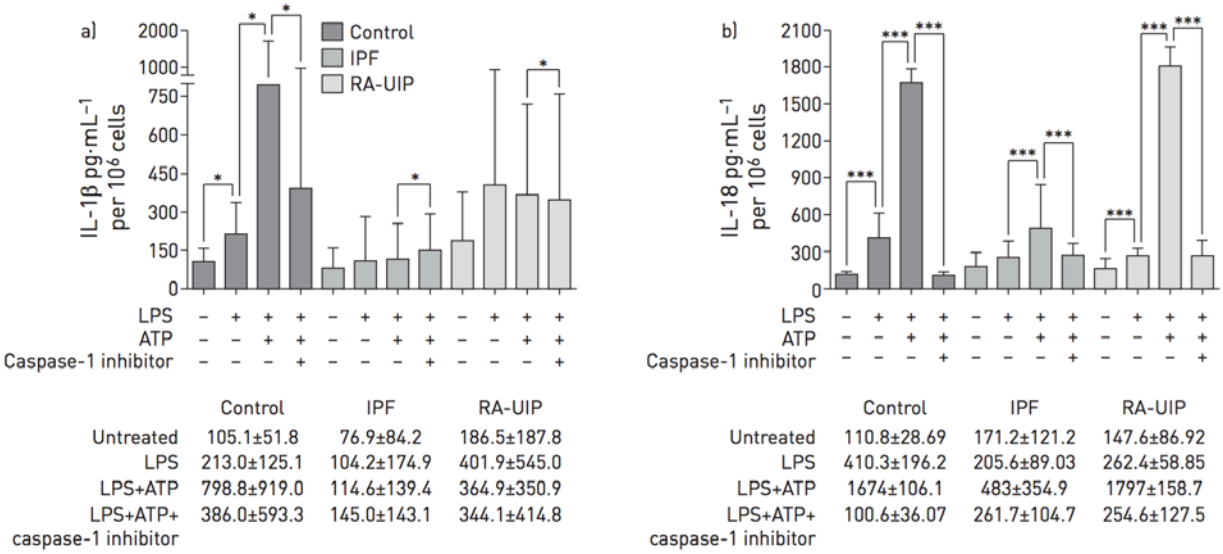


Εικόνα 6. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης των συστατικών του NLRP3 φλεγμονοσώματος α) NLRP3 και β) Caspase-1 και των κυτταροκινών γ) IL-1β δ) IL-6 και ε) IL-18 σε καλλιέργειες μη διεγερμένων κυττάρων του BAL σε ασθενείς με IPF, RA-UIP και υγιείς μάρτυρες όπου φαίνονται αυξημένα τα επίπεδα τόσο του NLRP3 και της Caspase-1 όσο και των IL-6 και IL-18

επιπέδων στους ινωτικούς ασθενείς, ενώ παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων της IL-1β στους πνεύμονες των ασθενών με RA-UIP συγκριτικά με τους μάρτυρες και τους ασθενείς με IPF.

Η ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος μειώνεται στα κυψελιδικά μακροφάγα στην IPF

Τα κυψελιδικά μακροφάγα χρειάζονται δύο σήματα για να ενεργοποιήσουν την εξαρτώμενη από το φλεγμονόσωμα κασπάση-1 γεγονός που οδηγεί στην απελευθέρωση της ώριμης IL-1b και IL-18, ένα αγωνιστή του TLR όπως είναι το LPS και μικρές ώσεις ATP. Προχωρήσαμε σε χορήγηση LPS και ATP στα μακροφάγα του BAL για να διεγείρουμε το μονοπάτι του NLRP3 φλεγμονοσώματος στα κύτταρα αυτά. Επιπλέον επειδή η διάσπαση της προ-IL-1β γίνεται κυρίως από την κασπάση-1 με αποτέλεσμα την παραγωγή της IL-1β, ενεργοποιήσαμε το NLRP3 φλεγμονόσωμα με την παρουσία αναστολέα της κασπάσης-1.



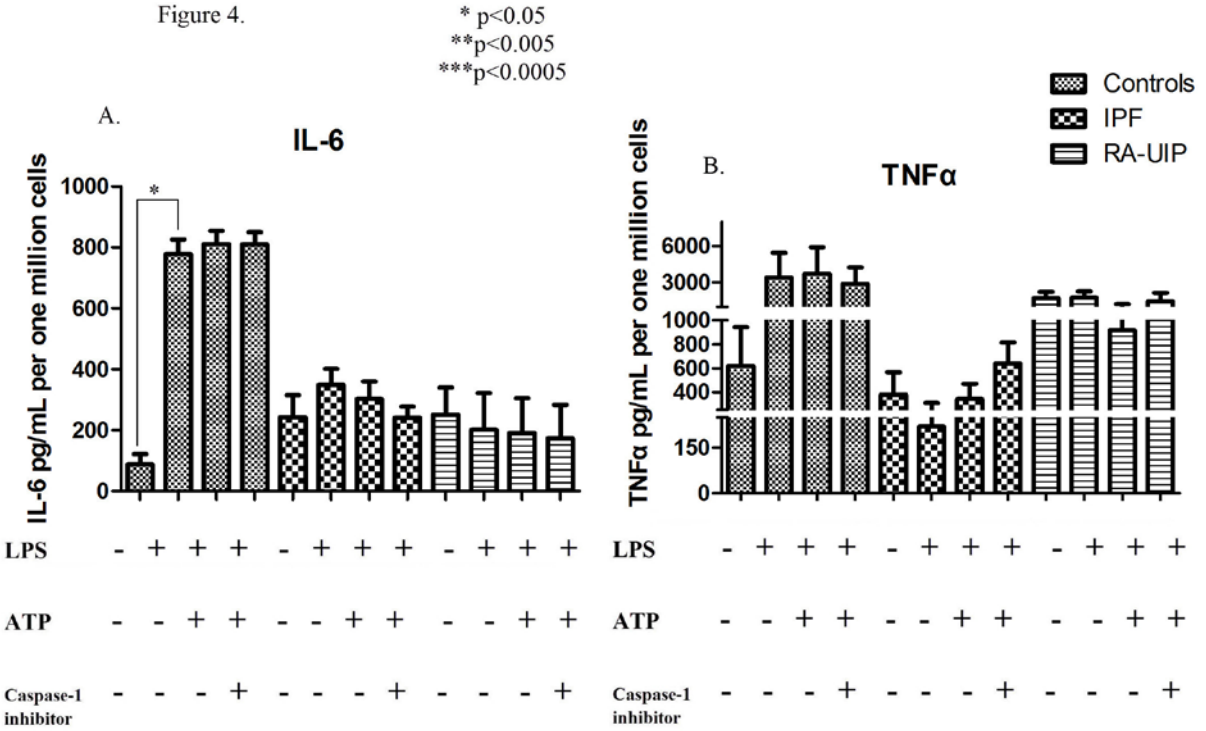
Εικόνα 7: Ποσοτικοποίηση της έκφρασης των α) IL-1β και β) IL-18 σε

καλλιεργημένα κύτταρα του BAL ασθενών με IPF, RA-UIP και CONTROLS μετά τη ενεργοποίησή τους με LPS και ATP όπου παρατηρήθηκε αύξηση της έκκρισης των IL-1β και IL-18 στα δείγματα των μαρτύρων μετά την χορήγηση LPS και ATP τα οποία οφείλονται στην ενεργοποίηση της Caspase-1 σε μεγάλο βαθμό. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων της IL-1β στους ασθενείς με IPF μετά την χορήγηση LPS και ATP αλλά ούτε και με τη χορήγηση μόνο LPS. Αύξηση της έκκρισης της IL-1β στους ασθενείς με RA-UIP μετά τη χορήγηση LPS ωστόσο χωρίς περαιτέρω αύξηση της μετά τη χορήγηση ATP.

Στα δείγματα των μαρτύρων, η θεραπεία με LPS οδήγησε σε διπλάσια και 3,7 φορές αύξηση της έκκρισης της IL-1β και της IL-18 εικόνα 7α και b). η προσθήκη ATP στα προ θεραπευμένα με LPS κύτταρα οδήγησε σε περαιτέρω μεγαλύτερη 3,7 φορές και 4 φορές αύξηση της έκκρισης της IL-1b και IL-18 από ότι στη θεραπεία με LPS μόνο. Αντιθέτως, τα επίπεδα της IL-1β και IL-18 μειώθηκαν μετά τη χορήγηση αναστολέα της κασπάσης-1 κάτι που μας έδειξε μια ενεργοποίηση του NLRP3 φλεγμονοσώματος στα κυψελιδικά μακροφάγα μετά τη θεραπεία με LPS και ATP (εικόνα 7α και b). Σε αντίθεση με τις IL-1β και IL-18, η θεραπεία με LPS και ATP δεν οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επιπέδων της IL6 και τουTNF-α όπως έγινε μετά τη θεραπεία με LPS μόνο του (εικόνα 8).

Στη συνέχεια, ακολουθήσαμε την ίδια θεραπεία που κάναμε στους μάρτυρες και στα κυψελιδικά μακροφάγα του BAL των ασθενών με IPF και RA-UIP και παρατηρήσαμε ότι τα επίπεδα της IL-1β δεν αυξήθηκαν στους ασθενείς με IPF μετά την χορήγηση LPS και ATP αλλά ούτε και με τη χορήγηση μόνο LPS (εικόνα 7α) ενώ τα επίπεδα της IL-18 αυξήθηκαν όταν ώσεις ATP προστέθηκαν στη θεραπεία με LPS (εικόνα 7β) αν και η επαγωγή της IL-18 στην IPF ήταν πολύ λιγότερο έντονη από ό, τι εκείνη που παρατηρήθηκε στους μάρτυρες (εικόνα 7β). Στις καλλιέργειες των μακροφάγων των ασθενών με RA-UIP παρατηρήσαμε ότι η χορήγηση LPS αύξησε την έκκριση της IL-1β.

Ωστόσο η περαιτέρω χορήγηση ATP δεν αύξησε περισσότερο τα επίπεδα της IL-1β όπως είχε παρατηρηθεί στα δείγματα των μαρτύρων (εικόνα 7α). Η IL-18 ωστόσο αυξήθηκε σημαντικά μετά τη θεραπεία με LPS και ATP στις καλλιέργειες μακροφάγων ασθενών με RA-UIP όπως έγινε και με τους μάρτυρες (εικόνα 7β). Επίσης τα επίπεδα της IL6 και του TNF-α δεν μεταβλήθηκαν μετά τη διέγερση με LPS στα δείγματα των ασθενών με IPF και RA-UIP (εικόνα 8 α και β).

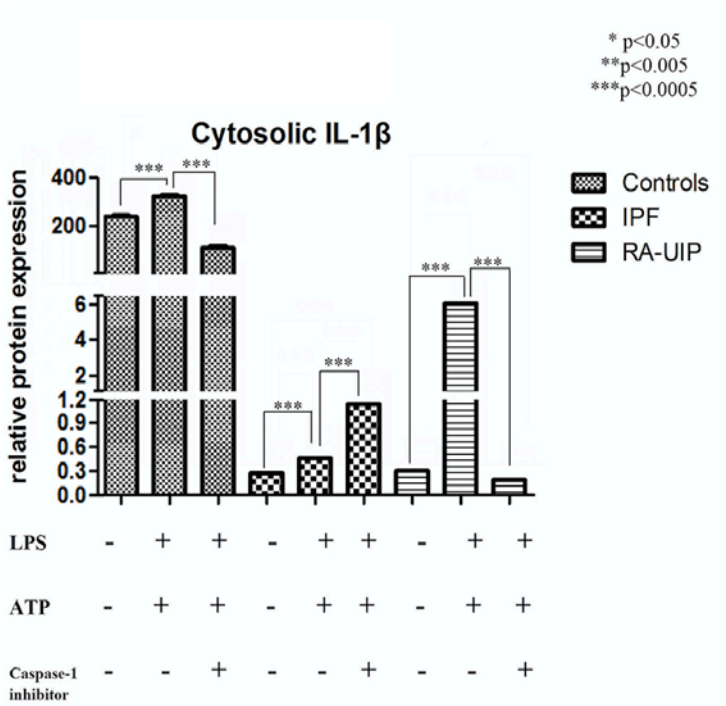


	Control	*IPF*	*RA-UIP*
Untreated	88.2±118.3	244.7±285.3	252.4±249.8
LPS	779.6±163.2	349.5±211.4	202.8±337.2
LPS+ATP	811.1±152.4	303.3±230.9	191.5±323.3
LPS+ATP+ Caspase-1 inhibitor	810.1±140.2	241.6±147.1	174.1±311.3

	Control	*IPF*	*RA-UIP*
Untreated	620.6±323	379.6±188.6	1718±518
LPS	3429±2017	220.7±88.9	1750±524
LPS+ATP	3714±2194	342.5±125.7	919.2±291
LPS+ATP+ Caspase-1 inhibitor	2880±1361	641.8±174.8	1450±701

Εικόνα 8. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης της α) IL-6 και του β) TNF-a στους ασθενείς με IPF , RA-UIP, CONTROLS μετά τη χορήγηση LPS και ATP όπου δεν παρατηρήθηκε περαιτέρω σημαντική αύξηση των επιπέδων της IL6 και του TNF-α από την LPS μόνο του.

Επιπλέον αναλύσαμε τα ενδοκυττάρια επίπεδα της διασπασμένης IL-1β με τη μέθοδο western-blot και παρατηρήσαμε ότι τα ενδοκυττάρια επίπεδα της IL-1β των μαρτύρων ήταν υψηλότερα από αυτά της ομάδας των IPF και RA-UIP (εικόνα 9) κάτι που μας έδειξε ότι υψηλά επίπεδα IL-1β κατακρατούνται στο κυτταρόπλασμα των μακροφάγων του BAL στην ομάδα των μαρτύρων. Στους μάρτυρες επίσης με την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος τα επίπεδα της IL-1β παρουσίασαν αύξηση ,ενώ η παρουσία του αναστολέα της κασπάσης-1 τα μείωσε στα βασικά τους επίπεδα. Αυτό το πρότυπο συμπεριφοράς της IL-1β παρατηρήθηκε και στα δείγματα της RA-UIP, ωστόσο στην ομάδα της IPF δεν υπήρξε παρόμοια αύξηση στα ενδοκυττάρια επίπεδα της IL-1β στα μακροφάγα του BAL.

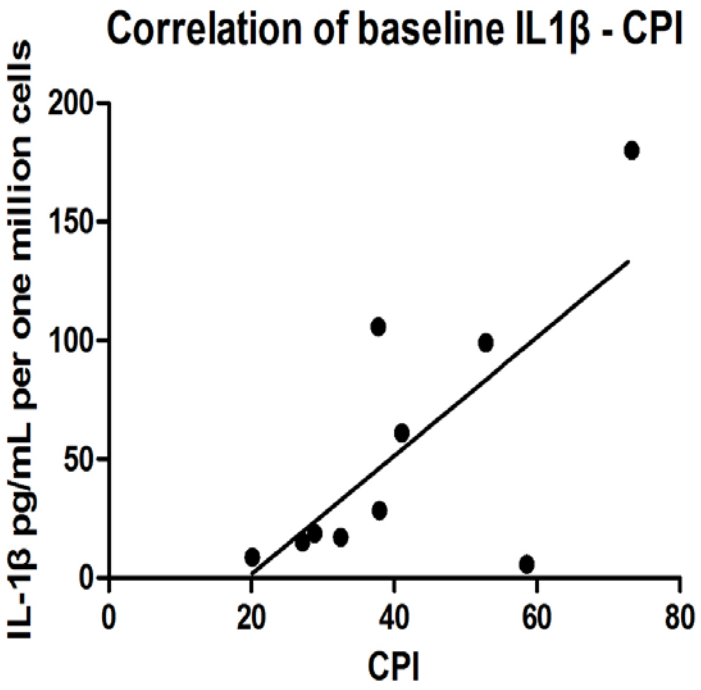


Εικόνα 9. Ποσοτικοποίηση των επιπέδων ενδοκυττάριας ώριμης IL-1β με τη μέθοδο western-blot στους ασθενείς με IPF , RA-UIP, CONTROLS μετά τη χορήγηση LPS και ATP και την παρουσία του αναστολέα της κασπάσης 1 όπου παρατηρήσαμε ότι τα ενδοκυττάρια επίπεδα της IL-1β των μαρτύρων ήταν υψηλότερα από αυτά της ομάδας των IPF και RA-UIP .

Συνολικά τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι στα μακροφάγα του BAL στους ασθενείς με IPF υπήρξε σημαντική μείωση της ενεργοποίησης του φλεγμονοσώματος. Επίσης το προφίλ ενεργοποίησης του φλεγμονοσώματος στην ομάδα των RA-UIP είναι πιο ξεκάθαρο διότι τα βασικά επίπεδα της IL-1β σε αυτούς είναι ήδη υψηλά ωστόσο παρουσιάζουν περαιτέρω ενδοκυττάρια αύξηση μετά τη θεραπεία με LPS και ATP.

Συσχετίση IPF και προσδόκιμο με την IL-1β

Η παράταση της ζωής στους ασθενείς με IPF όπως αξιολογήθηκε με το σκορ της HRCT συσχετίστηκε με τα επίπεδα έκκρισης της IL-1β και η συσχέτιση αυτή ήταν γραμμική (εικόνα 10).



Εικόνα 10. Τα επίπεδα της IL-1β σε μή διεγερμένα κύτταρα BAL από ασθενείς με IPF συσχετίζονται σημαντικά με το composite physiologic index.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη ερεύνησε την ενεργοποίηση του μονοπατιού του NLRP3 φλεγμονοσώματος στο BAL ασθενών με ινωτική διάμεση πνευμονοπάθεια όπως την IPF και την RA-UIP, όπως ήταν πριν αλλά και μετά την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος.

Τα ευρήματα μας δείχνουν ξεχωριστά προφίλ ενεργοποίησης του φλεγμονοσώματος στην ιδιοπαθή και αυτοάνοση πνευμονική ίνωση. Συνολικά τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι στα μακροφάγα του BALF ασθενών με IPF η ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος είναι αρκετά μειωμένη. Επιπλέον το προφίλ ενεργοποίησης του φλεγμονοσώματος διαφέρει στους ασθενείς με RA-UIP, εφόσον τα επίπεδα της IL-1β και IL-18 είναι ήδη αυξημένα στις βασικές τους τιμές, αν και η αύξηση τους είναι πιθανή όπως φαίνεται από την περαιτέρω αύξηση τους στη νεοπαραγώμενη ενδοκυττάρια ώριμη IL-1β μετά τη θεραπεία με LPS και ATP

Όπως παρατηρήσαμε :

Το φλεγμονόσωμα είναι ενεργοποιημένο στους πνεύμονες ασθενών με RA-UIP.

Παρατηρήσαμε ότι τα επίπεδα της IL-1β και της IL-18 στο BAL ασθενών με RA-UIP ήταν αυξημένα και αυτό μας δείχνει ξεκάθαρα την έκκριση της ενεργού IL-1β και IL-18 στον βρογχοκυψελιδικό χώρο στους ασθενείς αυτούς. Ένα μέρος της IL-1β αυτής εκκρίνεται από τα κυψελιδικά μακροφάγα όπως είδαμε μετά από αναστολή διέγερσης τους που έγινε σε μικρές καλλιέργειες και

έπειτα απομόνωσή τους από το BAL, με αποτέλεσμα την παραγωγή υψηλότερων επιπέδων των κυτταροκινών αυτών συγκριτικά με τους μάρτυρες. Επιπλέον τα επίπεδα mRNA άλλων στοιχείων του μονοπατιού του NLRP3 όπως το NLRP3 φλεγμονόσωμα και η κασπάση-1 επίσης αυξήθηκαν στα κύτταρα του BAL των ασθενών με RA-UIP. Οι ασθενείς με RA-UIP ήταν μη καπνιστές οπότε και η ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος δεν μπορούσε να αποδοθεί στο κάπνισμα το οποίο όπως είναι γνωστό μπορεί να ενεργοποιήσει το φλεγμονόσωμα. Τα υψηλά επίπεδα των IL-1b και IL-18 στους RA-UIP ασθενείς μπορεί να οφείλονται σε άλλους ανεξάρτητους μηχανισμούς του φλεγμονοσώματος. Σημειώνεται ότι τα ουδετερόφιλα αποτελούν τις κυριότερες μηχανές παραγωγής της ανεξάρτητης ώριμης IL-1β του φλεγμονοσώματος. Στην ομάδα των RA-UIP ασθενών τα ουδετερόφιλα ήταν ως αναμενόταν αυξημένα στα δείγματα του BAL όπως επίσης ήταν αυξημένα και τα επίπεδα της IL-1β.

Τα επίπεδα της IL-6 και αυτά παρουσίασαν αύξηση στο BAL και στο υπερκείμενο των κυττάρων των καλλιεργειών του BAL στους ασθενείς με RA-UIP. Η οξεία απελευθέρωση της IL-1β στο περιφερικό αίμα ως αποτέλεσμα κυτταρικής διέγερσης προκαλεί αύξηση της έκφρασης διαφόρων προφλεγμονωδών κυτταροκίνων όπως η IL-6 και μπορούμε να υποθέσουμε ότι αυτό συμβαίνει και στους βρογχοκυψελιδικούς χώρους των ασθενών με RA-UIP.

Από την in vitro διέγερση των κυττάρων του BAL στους ασθενείς με RA-UIP με τη χορήγηση LPS, παρατηρήσαμε μια τάση αύξησης της IL-1β ενώ μετά την επιπλέον χορήγηση ATP ενεργοποιήθηκε η ενδοκυττάρια παραγωγή της IL-1β. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα επίπεδα της ενδοκυττάριας IL-1β ήταν πολύ υψηλά στα μη διεγερμένα κύτταρα των μαρτύρων, σε αντίθεση με τα κύτταρα των ασθενών με RA-UIP. Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε την συσσώρευση μεγάλης ποσότητας μη εκκρινόμενης IL1β η οποία είχε κατακρατηθεί ενδοκυττάρια στα

διεγερμένα από LPS κύτταρα του BAL. Μια πιθανή εξήγηση για την ενδιαφέρουσα αυτή διαφορά είναι ότι τα ενδοκυττάρια επίπεδα της IL-1β μειώθηκαν λόγω ενεργοποίησης του NLRP3 φλεγμονοσώματος στους ασθενείς με RA-UIP. Πρόσφατα επικρατεί η άποψη ότι τα ανθρώπινα ουδετερόφιλα αποτελούν συστατικά κλειδιά για τον μηχανισμό του φλεγμονοσώματος σε διάφορα ενδοκυττάρια τμήματα κάτι που θα μπορούσε να εξηγήσει τα υψηλά επίπεδα της ώριμης IL-1β στους μάρτυρες. Μετά την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος αυτά τα ενδοκυττάρια αποθέματα απελευθερώνονται με γρήγορο ρυθμό από τα κύτταρα των μαρτύρων, όπως αυτό φαίνεται από τα υψηλά επίπεδα της IL-1β που υπάρχει στο υπερκείμενο των καλλιεργειών αυτών. Στους ασθενείς με RA-UIP ωστόσο υπάρχει αμφιβολία για το κατά πόσο τα ενδοκυττάρια αποθέματα της IL-1β μειώνονται και επομένως κατά πόσο υπάρχει αδυναμία αύξησης της IL-1β μετά την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος. Ωστόσο από τη στιγμή που παρατηρούμε σημαντική αύξηση της ενδοκυττάριας έκφρασης της IL-1β μετά την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος στα κυψελιδικά μακροφάγα των ασθενών με RA-UIP, η οποία καταστέλλεται πλήρως με την παρουσία αναστολέων της κασπάσης-1, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι το μονοπάτι του φλεγμονοσώματος μπορεί να ενεργοποιηθεί περαιτέρω στους ασθενείς αυτούς.

Μειωμένη ενεργοποίηση του NLRP3 φλεγμονοσώματος στην IPF

Στην IPF σε αντίθεση με την RA-UIP παρατηρήσαμε μικρή αύξηση των επιπέδων της IL-1β στο BAL συγκριτικά με τους μάρτυρες, ωστόσο τα καλλιεργημένα κύτταρα του BAL έκκριναν παρόμοιες ποσότητες IL-1β όπως και αυτά των μαρτύρων. Και στις δύο αυτές περιπτώσεις όμως τα επίπεδα της IL-1β ήταν σημαντικά λιγότερα από αυτά στα δείγματα της RA-UIP. Αξιοπερίεργο είναι το γεγονός ότι στην IPF όπως και στην RA-UIP τα βασικά επίπεδα έκφρασης του NLRP3 φλεγμονοσώματος και της κασπάσης-1 στα

κύτταρα του BAL καθώς και τα επίπεδα της IL-6 και της IL-18 ήταν υψηλότερα από αυτά των μαρτύρων. Επίσης εντύπωση κάνει το ότι η τροποποίηση του σήματος της IL -6 στις καλλιέργειες των ινοβλαστών στην IPF μπορεί να ενισχύσει την αντίσταση αυτών των κυττάρων στην απόπτωση και να συνεισφέρει σε μια προϊνωτική δράση της IL-6 στην IPF . Επιπλέον τα επίπεδα της IL-6 στον ορό αποτελούν πρώιμους προγνωστικούς δείκτες προόδου της νόσου στις διάμεσες πνευμονοπάθειες που προκαλεί η συστηματική σκλήρυνση .

Στην μελέτη μας, τα κυψελιδικά μακροφάγα των ασθενών με IPF δεν ανταποκρίθηκαν στη διέγερση τους με LPS αλλά ούτε και στην συνχορήγηση LPS και ATP γεγονός που μας δείχνει ότι τα μονοπάτια του TLR4 και του NLRP3 φλεγμονοσώματος είναι ανενεργά. Ειδικότερα δεν παρατηρήσαμε καμία παραγωγή ενδοκυττάριας η εκκρινόμενης IL-1β από το NLRP3 φλεγμονόσωμα στις καλλιέργειες των κυψελιδικών μακροφάγων στην IPF ενώ η επαγωγή της IL-18 ήταν σημαντικά χαμηλότερη στους ασθενείς με IPF σε σχέση με τους RA-UIP ασθενείς και τους μάρτυρες. Τα επίπεδα επίσης της ώριμης IL-1β στα κύτταρα που δεν έλαβαν θεραπεία ήταν χαμηλότερα στην IPF και την RA-UIP σε σύγκριση με τους μάρτυρες και μπορούμε να υποθέσουμε ότι τα αποθέματα της ενδοκυττάριας IL-1β έχουν εξαντληθεί λόγω έκκρισης τους στα ιδιοπαθή όπως και στα αυτοάνοσα ινωτικά νοσήματα. Ωστόσο η υπόθεση αυτή δεν μπορεί να στηριχτεί αν ληφθούν υπ' όψιν τα κατώτερα βασικά επίπεδα έκκρισης της IL-1β . Επιπλέον η θεραπεία με LPS δεν αύξησε τα επίπεδα της IL-6 η του TNF-α κάτι που δείχνει μια απορρύθμιση άλλων μονοπατιών πρωτογενούς ανοσολογικής απάντησης στην IPF.

Οι παρατηρήσεις μας συμφωνούν με τα στοιχεία που έχουμε ότι η πρωτογενής ανοσολογική απάντηση είναι διαταραγμένη σε ασθενείς με IPF όπως φαίνεται από την μειωμένη ικανότητα των μακροφάγων να σκοτώνουν τα μικρόβια και

αυτός είναι ο λόγος που προτείνεται η αντιμικροβιακή κάλυψη για πνευμονοκύστη καθώς αυτό μειώνει την θνητότητα στην φαινομενικά σταθερή IPF. Επιπλέον πρόσφατα δεδομένα από την ομάδα μας και από άλλες δείχνουν ότι οι ιοί είναι βασικοί συνένοχοι στην έναρξη και την πρόοδο της IPF . Τα τωρινά μας ευρήματα δείχνουν ότι η απορρύθμιση στην ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος στους ινωτικούς ασθενείς είναι πολύ σημαντική για την πρόοδο της νόσου ιδιαίτερα σε ότι αφορά στις παροξύνσεις της. Ένας πιθανός μηχανισμός για την μειωμένη ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος μπορεί να είναι η μειωμένη αυτοφαγία που επηρεάζει τον κύκλο εργασιών των μιτοχονδρίων, διεγείρει την ενεργοποίηση του NLRP3 και προδιαθέτει για υπερέκκριση της IL-1β μέσω των ελεύθερων ριζών του οξυγόνου (ROS) που παράγονται από τα μιτοχόνδρια (*Nakahira, K. et al..2011*) Η αυτοφαγία και η μιτοφαγία φαίνεται να είναι ελαττωματικές στους πνεύμονες των ασθενών με IPF κάτι που δικαιολογεί την εξάντληση του μηχανισμού των φλεγμονοσωματων στην πνευμονική ίνωση.

Ανοσολογικοί μηχανισμοί επίσης έχουν εμπλακεί στην ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση και θεωρούνται βασικοί για την ανάπτυξη του ρευματοειδούς πνεύμονα. Ωστόσο η αυτοανοσία στην IPF πρέπει να αξιολογείται με προσοχή καθώς θα μπορούσε να συμβάλει σε πιθανούς θεραπευτικούς στόχους. Με βάση πρόσφατα δεδομένα έχει φανεί ένα πιθανό θεραπευτικό αποτέλεσμα με τη θεραπεία με Rituximab στις CVD-ILD. Η έρευνά μας παρέχει περαιτέρω πληροφορίες για την πρωτογενή ανοσία που συμμετέχει στην IPF. Ωστόσο η επίδραση της αυτή είναι πιό έντονη στον ρευματοειδή πνεύμονα. Επιπλέον είδαμε ότι στη σοβαρή νόσο όπως αυτή ορίζεται από τον CPI παρατηρούμε μειωμένα επίπεδα εκκρινόμενης IL-1β στο BAL. Το εύρημα αυτό είναι συμβατό και με σύγχρονα μοριακά δεδομένα που συσχετίζουν ανοσολογικά μόρια όπως τον CD28 με τη φτωχή έκβαση στην IPF . Καθώς το φλεγμονόσωμα παίζει σημαντικό ρόλο στην άμυνα του ξενιστή απέναντι σε

διάφορους λοιμώδεις και μη λοιμώδεις παράγοντες, τα ευρήματα αυτά ενισχύουν την άποψη για απορρύθμιση της πρωτογενούς ανοσολογικής απάντησης στους ασθενείς με IPF. Η απάντηση αυτή σχετίζεται με την παθογένεια της IPF και ιδιαίτερα με την αδυναμία των ασθενών αυτών να αποδράμουν στις πνευμονικές λοιμώξεις που σχετίζονται με οξείες παροξύνσεις.

Έχει ήδη καθιερωθεί η σημασία της φλεγμονής στην έναρξη και πρόοδο της πνευμονικής ίνωσης ενώ η αρχική προφλεγμονώδης κατάσταση με την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος μπορεί γρήγορα να οδηγήσει σε ίνωση. Τα ευρήματά μας έδειξαν μια σημαντική μείωση της ενεργοποίησης του NLRP3 φλεγμονοσώματος στα κυψελιδικά μακροφάγα ασθενών με πνευμονική ίνωση ενώ δείχνουν επίσης μειωμένη ενεργοποίηση του και στην αυτοάνοση ίνωση συγκριτικά με τα μακροφάγα των υγειών μαρτύρων. Υποθέσαμε ότι τα εξωτερικά ερεθίσματα του πνεύμονα που ενεργοποιούν το NLRP3 φλεγμονόσωμα επηρεάζουν λιγότερο τα μακροφάγα στην IPF από ότι αυτά στην RA-UIP αν και χρειάζεται περισσότερη έρευνα για να καθοριστεί η αιτιοπαθογένεια μεταξύ της διαδικασίας ενεργοποίησης του φλεγμονοσώματος και της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης. Είναι λοιπόν απαραίτητο να διερευνηθεί λεπτομερώς οποιαδήποτε συμμετοχή παθολογική ή θεραπευτική του φλεγμονοσώματος στον ινωτικό πνεύμονα.

Τα ευρήματα λοιπόν μας έδειξαν διαφορετικά προφίλ ενεργοποίησης του φλεγμονοσώματος στην ιδιοπαθή και στην αυτοάνοση πνευμονική ίνωση. Παρατηρήσαμε σημαντική αύξηση της έκφρασης της IL-1β στα μακροφάγα των ασθενών με RA-UIP συγκριτικά με τους ασθενείς με IPF και τους μάρτυρες γεγονός που μας δείχνει ότι το NLRP3 φλεγμονόσωμα μπορεί να ενεργοποιηθεί στους πνεύμονες και ειδικά στα κυψελιδικά μακροφάγα των ασθενών αυτών. Επιπλέον παρατηρήσαμε ότι τα κυψελιδικά μακροφάγα των

ασθενών με IPF ήταν ανθεκτικά σε ερεθίσματα που διεγείρουν τα μονοπάτια του TLR και του NLRP3 φλεγμονοσώματος κάτι που δείχνει ότι η ενεργοποίηση των μονοπατιών αυτών είναι αρκετά μειωμένη στα κύτταρα αυτά στην IPF.

Στο ινωτικό έδαφος λοιπόν ένα χρόνια ενεργοποιημένο φλεγμονόσωμα οδηγεί σε συνεχή απελευθέρωση IL-1β και IL-18 και συντηρεί τον ινωτικό αυτό φαινότυπο ενώ η παροδική έκκριση των ιντερλευκίνων αυτών περιορίζει την έκφραση και σύνθεση κολλαγόνου. Το εάν για την ανάπτυξη ίνωσης απαιτείται η ενεργοποίηση ενός μόνο φλεγμονοσώματος (του NLRP3 φλεγμομοσώματος) ή απαιτείται και η συμμετοχή και άλλων φλεγμονοσωμάτων, δεν έχει ακόμη διευκρινηστεί. Η αναστολή του NLRP3 φλεγμονοσώματος ωστόσο μπορεί να εμποδίσει την ανάπτυξη ίνωσης. Επίσης η διέγερση του φλεγμονοσώματος μπορεί να αποδειχθεί ικανή για την επίτευξη καλύτερης επούλωσης. Επομένως είναι πολύ σημαντική η κατανόηση του ρόλου του φλεγμονοσώματος στα χρόνια φλεγμονώδη νοσήματα που προκαλούνται από διάφορα παθογόνα καθώς και στα νοσήματα που προάγουν την σύνθεση κολλαγόνου ή που εμποδίζουν την φυσιολογική επούλωση ώστε να βρεθούν νέες αποτελεσματικές θεραπείες που ως και τώρα δεν υπάρχουν.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Adamson I.Y. , Bowden D.H. The type 2 cell as progenitor of alveolar epithelial regeneration. 1974. A cytodynamic study in mice after exposure to oxygen. *Lab. Invest.* 30:
2. Alberts B. , Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2002. Molecular biology of the cell. *Garland Science*.
3. American Thoracic Society ERS. 2000. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 161: 646-64
4. Andersson-Sjoland A., Garcia de Alba C., Nihlberg K., Becerril C., Ramirez 175. R., Pardo A., Westergren-Thorsson G., Selman M. 2008. Fibrocytes are a potential source of lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis.
5. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology.* 40:

Aplin A.E., Howe A., Alahari S.K., Juliano R.L. 1998. Signal Transduction and Signal Modulation by Cell Adhesion Receptors: The Role of Integrins,Cadherins, Immunoglobulin-Cell Adhesion Molecules and Selectins. *TheAmerican Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 50 (2):.

6. Attwell S., Roskelley C., Dedhar S. 2000. The integrin-linked kinase (ILK)suppresses anoikis. *Oncogene.*19:

Avizienyte E. and Frame M.C. 2005. Src and FAK signaling controls adhesion fate and the epithelial-to-mesenchymal transition. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17:

7. Barrallo-Gimeno A. and Nieto M.A. 2005. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development.* 132:
8. Baum B., Settleman J., Quinlan M.P. 2008. Transitions between epithelial and mesenchymal states in development and disease. *Seminars in Cell and Developmental Biology.* 19:
9. Bauernfeind, F. G.et al Cutting edge: NF-κB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. J. Immunol.183, 787-791, (2009).
10. Ben-Sasson, S. Z.et al.IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A106, 7119-7124, (2009).
11. Bettelli, E.et al.Reciprocal developmental pathways for the

generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. Nature441, 235-238, (2006).

12. Bryan, N. B., Dorfleutner, A., Rojanasakul, Y. & Stehlik, C. Activation of inflammasomes requires intracellular redistribution of the apoptotic speck-like protein containing a caspase recruitment domain. J Immunol182, 3173-3182, (2009).

13. Bryan, N. B., Dorfleutner, A., Rojanasakul, Y., Stehlik, C. Activation of inflammasomes requires intracellular redistrabution of the Apoptotic Speck-like Protein Containing a Capsase Recruitment Domain. The Journal of Immunology 182, 3173-3182, (2009).

14. Boudeau J., Saaverda D.M., Barton G.J., Alessi D.R. 2006. Emerging roles of pseudokinases. *TRENDS in Cell Biology.* 16 (9):

15. Bowden D.H. 1981. Alveolar response to injury. *Thorax.* 36: 801-4

16. Cassel, S. L.et al. The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. PNAS 105, 9035-9040, (2008).

17. Chan, P. L. & Sinclair, N. R. Regulation of the immune response. V. An analysis of the function of the Fc portion of antibody in suppression of an immune response with respect to interaction with components of the lymphoid system. Mmunology 21, 967-981, (1971). 109109

18. Chaudhary N.I., Schnapp A., Park J.E. 2005. Pharmacologic differentiation of inflammation and fibrosis in the rat bleomycin model. *Am. J. Respir* Crit. *Care Med.* 173:

19. Chilosi M., Poletti V., Zamo A., Lestani M., Montagna L., Piccoli P., Pedron S., Bertaso M., Scarpa A., Muler B., Cancellieri A., Maestro R., Semenzato G., Doglioni C. 2003. Aberrant Wnt/β-catenin pathway activation in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Pathol.* 162: 1495-502

20. Ciraci, C., Janczy, J. R., Sutterwala, F. S. & Cassel, S. L. Control of innate and adaptive immunity by the inflammasome. Microbes Infect (2012).

21. Conforti-Andreoni, C.et al.Uric acid-driven Th17 differentiation requires inflammasome-derived IL-1 and IL-18. The Journal of Immunology187, 5842-5850, (2011).

22. Cruz, C. M. et al. ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. J. Biol. Chem.282 , 2871-2879, (2007).

23. Corvol H., Flamein F., Epaud R., Clement A., Guillot L. 2009. Lung alveolar epithelium and interstitial lung disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 41: 1643-51

24. Coultas D.B., Zumwalt R.E., Black W.C., Sobonya R.E. 1994. Theepidemiology of interstitial lung diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 150: 967-72. Crouch E. 1990. Pathobiology of pulmonary fibrosis.

Am. J. Physiol. 259 (4): 159-84
25. Darby I.A., Hewitson T.D. 2007. Fibroblast Differentiation in Wound Healing and Fibrosis. *International Review of Cytology*. 257: 143-72
26. Deveraux, Q. L. & Reed, J. C. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. Genes Dev13, 239-252, (1999).
27. Delcommenne M., Tan C., Gray V., Rue L., Woodgett J., Dedhar S. 1998.Phosphoinositide-3-OH- kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 95: 11211-16
28. Derynck R. and Feng X.H. 1997. TGF-β receptor signaling. *Biochim. Biophys. Acta.* 1333 (2): F105-50
29. Derunck R. and Zhang Y.E. 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-β family signaling. *Nature.* 425: 577-84
30. Dinarello, C. A. Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. Annu. Rev. Immunol. 27 519-550, (2009).
31. Dostert, C.et al.Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. Science 320, 674-677, (2008).
32. Drakopanagiotakis F., Xifteri A., Polychronopoulos V., Bouros D 2008. Apoptosis in lung injury and fibrosis. *Eur. Respir. J.* 32 (6): 1631-38
33. Franchi, L., Eigenbrod, T. & Nunez, G. Cutting Edge: TNF-α Mediates Sensitization to ATP and Silica via the NLRP3 Inflammasome in the Absence of Microbial Stimulation. The Journal of Immunology183, 792-796, (2009).
34. Friedman S.L. 2000. Molecular Regulation of Hepatic Fibrosis, an Integrated Cellular Response to Tissue Injury. *The Journal of Biological Chemistry*. 275 (4): 2247-50
35. Friedrich E.B., Liu E., Sinha S., Cook S., Milstone D.S., MacRae C.A.,Mariotti M., Kuhlencordt P.J., Force T., Rosenzweig A., St-Arnaud R.,Dedhar S., Gerszten R.E. 2004. Integrin-linked kinase regulates endothelial cell survival and vascular development. *Mol. Cell Biol.* 24: 8134-44
36. Friedrich E.B., Sinha S., Li L., Dedhar S., Force T., Rosenzweig A., Gerszten R.E. 2002. Role of integrin-linked kinase in leukocyte recruitment. *J. Biol. Chem.* 277: 16371-75
37. Gabbiani G., Ryan G.B., Majno G. 1971. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia.* 27: 549-50
38. Gauldie J., Bonniaud P., Sime P., Ask K., Kolb M. 2007. TGF-beta, Smad3 and the process of progressive fibrosis. *Biochem. Soc. Trans.* 35

(4): 661-4
39. Ghonime, M. G.et al.Inflammasome Priming by Lipopolysaccharide Is Dependent upon ERK Signaling and Proteasome Function. J Immunol, (2014).
40. Green, D. R. & Reed, J. C. Mitochondria and apoptosis. Science 281, 1309-1312, (1998).
41. Gross, O.et al.Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defense. Nature 459, 433-436, (2009).
42. Gross, O.et al.Inflammasome activators induce interleukin-1alpha secretion via distinct pathways with differential requirement for the protease function of caspase-1. Immunity 36, 388-400, (2012).
43. Gilles C. Polette M., Piette J., Delvigne A.C., Thompson E.W., Foidart J.M., Birembaut P. 1996. Vimentin expression in cervical carcinomas: association with invasive and migratory potential. *J. PAthol.* 180 (2): 175-80
44. Gkretsi V., Mars W.M., Bowen W.C., Barua L., Yang Y., Guo L., St-Arnaud R., Dedhar S., Wu C., Michalopoulos G.K. 2007. Loss of Integrin linked Kinase from mouse hepatocytes in vitro and in vivo results in apoptosis and hepatitis. *Hepatology.* 45 (4): 1025-34
45. Grande N.R., Peao M.N.D., de Sa C.M., Aguas A.P. 1998. Lung fibrosisinduced bybleomycin: structural changes and overview of recent advances. *Scanning Microscopy.* 12 (3): 487-94
46. Green F. 2002. Overview of pulmonary fibrosis. *Chest*. 122: 334-39
Guarda, G.et al.Type I Interferon Inhibits Interleukin-1 Production and Inflammasome Activation. Immunity34, 213-223, (2011).
47. Guarda, G.et al.T cells dampen innate immune responses through inhibition of NLRP1 and NLRP3 inflammasomes. Nature460, 269-273, (2009).
48. Hannigan G.E., Leung-Hagesteijn C., Fitz-Gibbon L., Coppolino M.G.,Radeva G., Filmus J., Bell., Dedhar S. 1996. Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature.* 379: 91-96
49. Halle, A.et al. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyliod-β. Nat. Immunol.9, 857-865, (2008). Martinon, F., Petrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A., Tschopp, J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. Nature440, 237-241, (2006).
50. Hara, H.et al. Phosphorylation of the adaptor ASC acts as molecular switch that controls the formation of speck-like aggregates and inflammasome activity.Nat Immunol14, 1247-1255, (2013).
51. Helmby, H. & Grencis, R. K. Interleukin 1 plays a major role in the development of Th2-mediated immunity. Eur J Immunol 34, 3674-3681,

(2004).
52. Heit, B., Yeung, T. & Grinstein, S. Changes in mitochondrial surface charge mediate recruitment of signaling molecules during apoptosis. Am J Physiol Cell Physiol 300, C33-41, (2011).
53. Horai, R.et al.Production of mice deficient in genes for interleukin (IL)-1alpha, IL-1beta, IL-1alpha/beta, and IL-1 receptor antagonist shows that IL-1beta is crucial in turpentine-induced fever development and glucocorticoid secretion. Exp Med187, 1463-1475, (1998).
54. Hornung, V.et al.Silica crystals and aluminum salts activate the
55. NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. Nat. Immunol.9, 847-856, (2008).
56. Hornung, V.et al. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1 activating inflammasome with ASC. Nature 458 , 514-518, (2009).
57. Iyer, S. S.et al.Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the NLRP3 inflammasome. PNAS106, 20388-20393, (2009).
58. Iyer, S. S.et al. Mitochondrial cardiolipin is required for nlrp3 inflammasome activation. Immunity39, 311-323, (2013)
59. Iwano M., Plieth D., Danoff T.M., Xue C., Okada H., Neilson E.G. 2002. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J. Clin. Invest.* 110 (3): 341-50
60. Izbicki G., Segel M.J., Christensen T.G., Conner M.W., Breuer R. 2002. Time course of bleomycin-induced lung fibrosis. *Int. J. Exp. Path*. 83: 111-19
61. Janeway, C. A., Jr. & Medzhitov, R. Innate immune recognition. AnnuRev Immunol 20 , 197-216, (2002).
62. JeJaneway, C. A. Approaching the asymtote? Evolution and revolution in immunology. Cold Spring Harb. Symp Quant. Biol. 54 , 1-13, (1989).
63. Jiang, D.et al.Regulation of lung injury and repair by Toll-likereceptors and hyaluronan. Nat Med 11, 1173-1179, (2005).
64. Juliana, C.et al.Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3 inflammasome activation. J Biol Chem287, 36617-36622,(2012).
65. Junqueira L.G., Carneiro J., Kelley R.O. 1989. Basic Histology
66. Kalluri R., Weinberg R.A. 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation*. 119 (6): 1420-28
67. Takeuchi, O. & Akira, S. Pattern recognition receptors and inflammation.ster J.V., Huang J., Petroll W.M., Cavanagh H.D. 2002. TGFβ inducedmyofibroblast differentiation of rabbit keratinocytes requires synergistic TGFβ, PDGF and integrin signaling. *Exp. Eye Res*.

75: 645-57
68. Kanneganti, T. D.et al.Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. Nature 440, 233-236,(2006).
69. Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors.Nat. Immunol. 11 , 373-384, (2010).
70. Kim J.W., Ko S.H., Cho J.H., Sun C., Hong O.K., Lee S.H., Kim J.H., Lee K.W., Kwon H.S., Lee J.M., Song H.Y., Yoon K.H. 2008. Loss of beta-cells 127 with fibrotic islet destruction in type 2 diabetes mellitus. *Front Biosci.* 1 (13): 6022-33
71. Kim K.K., Kugler M.C., Wolters P.J., Robillard L., Galvez M.G., Brumwell A.N., Sheppard D., Chapman H.A. 2006. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *PNAS*. 103 (35): 13180-85
72. King T.E., Schwarz M.I., Brown K. 2001. Idiopathic pulmonary fibrosis: relationship between histopathologic features and mortality. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164: 1025-32
73. Kisseleva T., Brenner D.A. 2008. Mechanisms of Fibrogenesis. *Exp. Biol. Med*. 233: 109-22
74. Klahr S. and Morissey J. 2002. Obstructive nephropathy and renal fibrosis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 283: F861-F875
75. Kolb M., Bonniaud P., Galt T., Sime P.J., Kelly M.M., Margetts P.J., Gauldie J. 2002. Differences in the fibrogenic response after transfer of active transforming growth factor-β1 gene to lungs of fibrosis-prone and fibrosisresistant mouse strains. *Am. J. respi. Cell Mol. Biol.* 27: 141-50
76. Korfei M, Ruppert C., Mahavadi P., Henneke I., Markart P., Koch M., Lang G., Fink L., Bohle R.M., Seeger W., Weaver T.E., Guenther A. 2008. Epithelial endoplasmic reticulum stress and apoptosis in sporadic idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 178: 273-89
77. Kohno, K.et al. IFN-gamma-inducing factor (IGIF) is a costimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12. J Immunol158, 1541-1550, (1997).
78. Kool, M.et al.Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome. J. Immunol.181, 3755-3759, (2008).
79. Kovarova, M.et al.NLRP1-dependent pyroptosis leads to acute lung injury and morbidity in mice. J Immunol189, 2006-2016, (2012).
80. Kuida, K.et al. Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1β converting enzyme. Science 267, 2000-2003, (1995). 227

81. Kuida, K., Lippke, J. A., Ku, G., Harding, M. W., Livingston, D. J., Su, M. S.-S., Flavell, R. A. Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1β converting enzyme. Science267, 2000-2003, (1995).
82. Labbe, K., McIntire, C. R., Doiron, K., Leblanc, P. M. & Saleh, M. Cellular inhibitors of apoptosis proteins cIAP1 and cIAP2 are required for efficient caspase-1 activation by the inflammasome. Immunity 35, 897-907, (2011).
83. Labow, M.et al. Absence of IL-1 signaling and reduced inflammatory response in IL-1 type I receptor-deficient mice. J Immunol159, 2452-2461, (1997).
84. Lasiglie, D.et al.Role of IL-1 beta in the development of human T(H)17 cells: lesson from NLPR3 mutated patients. PLoS One6, e20014,(2011).
85. Lee, G. S. et al.The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca2+ and cAMP. Nature 492, 123-127, (2012).
86. Li, P. et al. Mice deficient in IL-1β -converting enzyme are defective in production of mature IL-1βand resistant to endotoxic shock. Cell 80, 401-411, (1995).
87. Lu, A.et al.Unified Polymerization Mechanism for the Assembly of ASC-Dependent Inflammasomes. Cell 156, 1193-1206, (2014).
88. Li S., Guan J., Chien S. 2005. Biochemistry and biomechanics of cell motility. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 7: 105-50
89. Li Y., Dai C., Wu C., Liu Y. 2007. PINCH-1 promotes tubular epithelial-tomesenchymal transition by interacting with Integrin-linked Kinase. *J. Am. Soc. N Nephrol.* 18: 2534-43
90. Lin S.L., Kisseleva T., Brenner D.A., Duffield J.S. 2008. Pericytes and Perivascular Fibroblasts Are the Primary Source of Collagen-Producing Cells in Obstructive Fibrosis of the Kidney. *The American journal of Pathology*. 173 (6): 1617-27
91. Maher T.M., Wells A.U., Laurent G.J. 2007. Idiopathic pulmonary fibrosis: multiple causes and multiple mechanisms? *Eur. Respir. J.* 30: 835-39
92. Martinon, F., Burns, K. & Tschopp, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. Mol Cell10, 417-426, (2002).
93. Mariathasan, S.et al.Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. Nature 440, 228-232, (2006).
94. Mangan, P. R.et al.Transforming growth factor-β induces development of the Th17 lineage. Nature441, 231-234, (2006).
95. Manning G., Whyte D.B., Martinez R., Hunter T., Sudarsanam S. 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science.*

298: 1912-34
96. Masters, S. L.et al.Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1b in type 2 diabetes. Nat. Immunol.11 , 897-904, (2010).
97. McKee, A. S.et al.Alum induces innate immune responses through macrophage and mast cell sensors, but these sensors are not required for alum to act as an adjuvant for specific immunity. J Immunol183, 4403-4414, (2009).
98. Meissner, F., Molawi, K. & Zychlinsky, A. Superoxide dismutase 1 regulates caspase-1 and endotoxic shock. Nat Immunol 9, 866-872, (2008).
99.
100. Meissner, F. et al.Inflammasome activation in NADPH oxidase defective mononuclear phagocytes from patients with chronic granulomatous disease. Blood 116,1570-1573, (2010).
101. Medzhitov, R. Toll-like receptors and innate immunity. Nature Reviews Immunology 1, 135-145, (2001).
102. Medzhitov, R. & Janeway, C. A., Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. Cell 91, 295-298, (1997).
103. Misawa, T.et al.Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation ofthe NLRP3 inflammasome. Nat Immunol, (2013).
104. Miao, E. A.et al. Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin-1β via Ipaf. Nat. Immunol. 7, 569-575, (2006). 101 101
105. Moore B.B. and Hogaboam C.M. 2008. Murine models of pulmonary fibrosis. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 294: L152-L160
106. Moustakas A., Heldin C.H. 2005. Non-Smad TGF-β Signals. *Journal of Cell Science.* 118: 3573-84
107. Muruve, D. A. et al. The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. Nature 452, 103-107, (2008).
108. Munoz-Planillo, R.et al.K(+) efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. Immunity 38, 1142-1153, (2013).
109. Muggia F.M., Louie A.C., Sikic B.I. 1983. Pulmonary toxicity of antitumor agents. *Cancer Treat Rev.* 10: 221-43 129
110. Mutsaers S.E., Bishop J.E., McGrouther G., Laurent G.J. 1997. Mechanisms of Tissue Repair: from Wound Healing to Fibrosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29: 5-17
111. Nakahira, K. et al.Autophagy proteins regulate innate immune

responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. Nat. Immunol.8, 222-231, (2011).

112. Nikolopoulos S.N., Turner C.E. 2000. Actopaxin, a new focal adhesion protein that binds paxillin LD motifs and actin and regulates cell adhesion. *J. Cell Biol.* 151: 1435-48

113. Park, H. H. & Bae, J. Y. Crystal structure of NALP3 protein Pyrin Domain (PYD) and its implications in inflammasome assembly. J. Biol. Chem. 286, 39528-39536, (2011). van Bruggen, R. et al. Human NLRP3 inflammasome activation is Nox1-4 independent. Blood 115 , 5398-5400, (2010).

114. Petrilli, V.et al.Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. Cell Death Differ.14, 1583-1589, (2007).

115. Petrov V.V., Fagard R.H., Lijnen P. 2000. Transforming growth factor-β1 induces angiotensin converting enzyme synthesis in rat cardiac fibroblastsduring their differentiation to myofibroblasts. *JRAAS.*1: 342-52

116. Pinzani M., Marra F., Carloni V. 1998. Signal transduction in hepatic stellate cells. *Liver.* 18 (1): 2-13

117. Qu, Y.et al. Phosphorylation of NLRC4 is critical for inflammasome activation. Nature 490, 539-542, (2012).

118. Rathinam, V. A.et al.The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. Nat Immunol 11, 395-402, (2010).

119. Redecke, V., et. al. Cutting edge: activation of Toll-Like Receptor 2 induces a Th2 immune response and promootes experimental asthma The Journal of Immunology 172, 2739-2743, (2004).

120. Remuzzi G. and Bertani T. 1998. Pathophysiology of progressive nephropathies. *N. Engl. J. Med.* 339: 1448-56

121. Rennard S.I., Bitterman P.B., Crystal R.G. 2008. Response of the lower respiratory track to injury. Mechanisms of repair of the parenchymal cells of the alveolar wall. *Chest.* 1983 (84): 735-9 130

122. Robertson R.P., Harmon J., Tran P.O., Poitout V. 2004. β-cell glucose toxicity, lipotoxicity and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes.* 53: 119-24

123. Roberts, T. L. et al. HIN-200 proteins regulate caspase activation in response to foreign cytoplasmic DNA. Science 323, 1057-1060, (2009).

124. Schroder, K.et al.Acute lipopolysaccharide priming boosts inflammasome activation independently of inflammasome sensor induction. Immunobiology, (2012).

125. Schurch W., Seemayer T.A., Gabbiani G. 1998. The myofibroblasts: a quarter century after its discovery. *Am. J. Surg. Pathol.* 22 (2): 141-7

126. Scotton C.J. and Chambers R.C. 2007. Molecular targets in pulmonary fibrosis. The myofibroblast in focus. *Chest.* 132: 1311-21
127. Selman M., Pardo A. 2003. The epithelial/fibroblastic pathway in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 29: S93-S96
128. Selman M., Pardo A., Kaminski N. 2008. Idiopathic pulmonary fibrosis: aberrant recapitulation of developmental programs. *PLOS Med.* 5 (3): 0373-80
129. Shroder M. 2008. Endoplasmic reticulum stress responses. *Cell Mol. Life Sci.* 65 (6): 862-94
130. Sime P.J., Xing Z., Graham F.L., Csaky K.G., Gauldie J. 1997. Adenovectormediated gene transfer of active transforming growth factor-β1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung. *The Journal of Clinical Investigation* 100 (4): 768-77
131. Simon R.H., Scott M.J., Reza M.M., Killen P.D. 1993. Type IV collagen production by rat pulmonary alveolar epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell mol. Biol*. 8 (6): 640-46
132. Shimada, K.et al.Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. Immunity 36, 401-414, (2012). 220
133. Sim on, H. U., Haj-Yehia, A. & Levi-Schaffer, F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. Apoptosis 5, 415-418, (2000). Feldmeyer, L.et al.The inflammasome mediates UVB-induced activation and secretion of interleukin-1beta by keratinocytes. Curr Biol17, 1140-1145, (2007).
134. Stockinger, B., Veldhoen, M. & B., M. Th17 cells: Linking innate and adaptive immunity. Seminars in Immunology19, 353-361, (2007).
135. Sutterwala, F. S.et al.Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. Immunity 24, 317-327, (2006).
136. Sutton, C., Brereton, C., Keogh, B., Mills, K. H. G. & Lavelle, E. C. A crucial role for interleukin(IL)-1 in the induction of IL-17 producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. Journal of Experimental Medicine 203, 1685-1691, (2006).
137. Tanjore H., Xu X.C., Polosukhin V.V., Degryse A.L., Li B., Han W., Sherill T.P., Plieth D., Neilson E.G., Blackwell T.S., Lawson W.E. 2009.
138. Takeda, K., Akira, S. Toll-like receptors in innate immunity. International Immunology17, 1-14, (2005). 106106
139. Contribution of epithelial derived fibroblasts to bleomycin induced lung fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 180 (7): 657-65
140. Thiery J.P. and Sleeman J.P. 2006. Complex networks orchestrate epithelialmesenchymal transitions. *Nature*. 7: 131-42

141. Umezawa H. 1974. Chemistry and mechanism of action of bleomycin. *Fed Proc.* 33: 2296-302
142. Wu S., Platteau A., Chen S., McNamara G., Whitsett J., Bancalari E. 2009. Conditional over-expression of connective tissue growth factor disrupts postnatal lung development. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* In press.
143. Wu Y., Huang Y., Herring B.P., Gunst S.J. 2008. Integrin-linked kinase regulates smooth muscle differentiation marker gene expression in airway tissue. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 295 (6): L988-97
144. Wu Z., Yang L., Cai L., Zhang M., Cheng X., Yang X., Xu J. 2007. Detection of epithelial to mesenchymal transition in airways of a bleomycin induced pulmonary fibrosis model derived from an α-smooth muscle actin-Cre transgenic mouse. *Respiratory Research*. 8: 1-11
145. Wynn T.A. 2007. Common and unique mechanisms regulate fibrosis invarious fibroproliferative diseases. *Journal of Clinical Investigation*. 117 (3): 524-29
146. Wynn T.A. 2008. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *Journal of Pathology*. 214: 199-210
147. Yamada M., Kuwano K., Maeyama T., Hamada N., Yoshimi M., Nakanishi Y., Kasper M. 2008. Dual-immunohistochemistry provides little evidence for epithelial-mesenchymal transition in pulmonary fibrosis. *Histochem Cell Biol*. 129: 453-62
148. Yamagi S., Suzuki A., Kanamori H., Mishima W., Yoshimi R., Takasaki H., Takabayashi M., Fujimaki K., Fujisawa S., Inshigatsubo Y. 2004. Affixin interacts with α-actinin and mediates integrin signaling for reorganization of F-actin induced by initial cell-substrate interaction. *J. Cell. Biol.* 165: 539-51
149. Yang J., Liu Y. 2001. Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. *American Journal of Pathology*. 159 (4): 1465-75
150. Yoshimi R., Yamaji S., Suzuki A., Mishima W., Okamura M., Obana T.,Matsuda C., Miwa Y., Ohno S., Ishigatsubo Y. 2006. The gamma-parvin 132
151. Zavadil J., Germak L., Soto-Nieves N., Bottinger E.P. 2004. Integration of TGF-beta/SMAD and Jagged1/Notch signaling in epithelial-to-mesenchymal transition. *EMBO J.* 23 (5): 1155-65
152. Zeisberg E.M., Potenta S., Xie L., Zeisberg M., Kalluri R. 2007. Discovery of Endothelial to Mesenchymal Transition as a Source for Carcinoma-Associated Fibroblasts. *Cancer Res.* 67 (21): 10123-28
153. Zeisberg M., Strutz F., Muller G.A. 2001. Renal fibrosis: an update. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 10: 315-20
154. Zervas C.G., Gregory S.L., Brown N.H. 2001. *Drosophilo* integrin-

linked kinase is required at sites of integrin adhesion to link the cytoskeleton to the plasma membrane. *J. Cell Biol.* 152: 1007-18

155. Zhou, R., Tardivel, A., Thorens, B., Choi, I. & Tschopp, J. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. Nature Immunology 11, 136-140, (2010).

156. Zhou, R., Yazdi, A. S., Menu, P. & Tschopp, J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. Nature 469 221-225, (2010).

157. Zoltan-Jones A., Huang L., Chatak S., Toole B.P. 2003. Elevated hyaluronan production induces mesenchymal and transformed properties in epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 278: 45801-10

158. Zhong, Z.et al. TRPM2 links oxidative stress to NLRP3

inflammasome activation. Nat Commun 4, 1611, (2013).