

ΕΠΙΠΕΔΑ ΑΓΓΕΙΟΠΟΙΗΤΙΝΩΝ 1 ΚΑΙ 2 ΣΤΟ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΟ ΠΤΥΕΛΩΝ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΑΠ

Β. Μπέσσα¹, Σ. Λουκίδης¹, Γ. Χειλάς², Β. Δελημπούρα¹, D Simoes³, Κ. Κοντογιάννη⁴, Σ. Παπίρης¹, Κ. Κωστίκας¹, Μ. Αλχανάτης⁴, και Π. Μπακάκος⁴

¹ Β' Πανεπιστημιακή Πνευμονολογική Κλινική, Αττικών Νοσοκομείο

² Κέντρο Αναπνευστικής Ανεπάρκειας, Ερευνητικό Εργαστήριο, ΝΝΘΑ Σωτηρία

³ Εργαστήριο «Γ.Π Λιβανός και Μ. Σίμου» Νοσοκομείο Ευαγγελισμός

⁴ Α' Πανεπιστημιακή Πνευμονολογική Κλινική, ΝΝΘΑ Σωτηρία

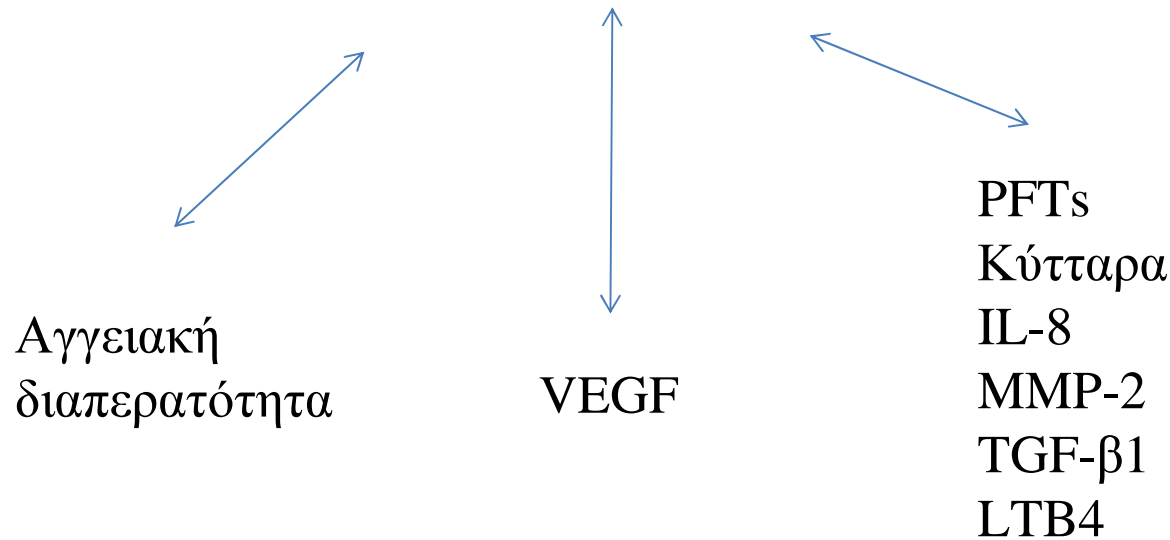


ΕΙΣΑΓΩΓΗ

- Τα παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά της ΧΑΠ περιλαμβάνουν τη φλεγμονή των αεραγωγών, τις διαταραχές αναδιαμόρφωσης στο βλεννογόνο, την αναδιαμόρφωση του πνευμονικού αγγειακού δικτύου και την αγγειογένεση.
- Οι αγγειοποιητίνες 1 (Ang-1) και 2 (Ang-2) είναι αγωνιστές του υποδοχέα της τυροσινικής κινάσης Tie-2 και δρουν συνεργικά με τον VEGF στη διεργασία της αγγειογένεσης.
- Η αγγειοποιητίνη-1 είναι γνωστό ότι σταθεροποιεί τα νεοδημιουργηθέντα αγγεία και τα καθιστά ανθεκτικά στη διαρροή επάγοντας τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενδοθηλιακών και γειτονικών υποστηρικτικών κυττάρων, ενώ επίσης προστατεύει το αγγειακό δίκτυο από την επαγόμενη από τον VEGF διαρροή πλάσματος. Αντίθετα, η αγγειοποιητίνη-2 είναι ανταγωνιστής της αγγειοποιητίνης-1 για τον υποδοχέα Tie-2 και επακόλουθα μειώνει την αγγειακή ακεραιότητα.

ΥΠΟΘΕΣΗ-ΣΚΟΠΟΣ

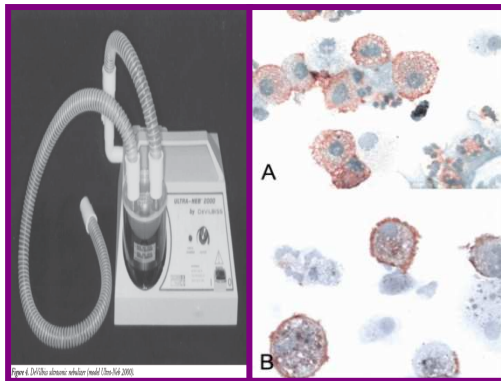
Υποθέσαμε ότι τα επίπεδα της Ang-2 θα είναι αυξημένα στο υπερκείμενο των προκλητών πτυέλων των ασθενών με ΧΑΠ, με πιθανές συσχετίσεις με μεσολαβητές που σχετίζονται με την αγγειακή διαπερατότητα, ενώ τα επίπεδα της Ang-1 δεν θα ήταν αυξημένα, αναδεικνύοντας ένα έλλειμμα στον προστατευτικό ρόλο της Ang-1 στη διαρροή πλάσματος.



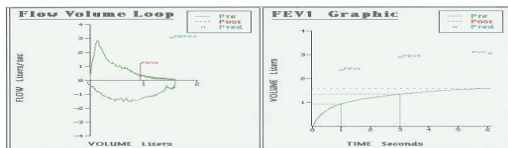
Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να προσδιοριστούν τα επίπεδα των αγγειοποιητινών στο υπερκείμενο προκλητών πτυέλων σε ασθενείς με ΧΑΠ καθώς και να διερευνηθούν πιθανές συσχετίσεις των αγγειοποιητινών με φλεγμονώδη κύτταρα και μεσολαβητές που εμπλέκονται στη διεργασία της φλεγμονής και της αναδιαμόρφωσης των αεραγωγών σε αυτούς τους ασθενείς.

Ασθενείς - Μέθοδοι

ΧΑΠ n=59	Υγιείς καπνιστές n=25	Υγιείς μη καπνιστές n=20
---------------------------	--	---



Κύτταρα, % κυτταρικοί πληθυσμοί, υπερκείμενο [Angio-1& 2-IL-8, MMP-2, VEGF, TGF-β1, LTB4] . AVP: Λόγος αλβουμίνης πτυέλων/ορού



F/V, FRC, DLCO

Άλλες παράμετροι

BMI, Φαρμακοθεραπεία, διάρκεια νόσου, συνοσηρότητες, καπνιστική συνήθεια

Στατιστική ανάλυση

Τα δεδομένα με κανονική κατανομή παρουσιάζονται ως μέση τιμή±σταθερή απόκλιση (SD), ενώ εκείνα χωρίς κανονική κατανομή παρουσιάζονται ως διάμεση τιμή (εύρος 25%-75%). Η κανονικότητα της κατανομής εκτιμήθηκε με το τεστ Kolmogorov-Smirnov.

Συγκρίσεις μεταξύ ομάδων έγιναν με ANOVA για κανονικής κατανομής δεδομένα και με Kruskal-Wallis για εκείνα χωρίς κανονική κατανομή με τις απαραίτητες post-hoc δοκιμασίες για πολλαπλές συγκρίσεις (Bonferroni και Dunn's, αντίστοιχα). Οι διαφορές σε αριθμητικές μεταβλητές μεταξύ δύο ομάδων εκτιμήθηκαν με unpaired t-tests ή Mann-Whitney U-tests για κανονικής και μη κατανομής αντίστοιχα, ενώ συγκρίσεις αναλογιών έγιναν με χ^2 .

Συσχετίσεις των Ang-1, Ang-2 με φλεγμονώδεις μεσολαβητές (IL-8, VEGF, TGF- β 1, MMP-2, LTB4), κυτταρικούς πληθυσμούς στα πτύελα και παραμέτρους αναπνευστικής λειτουργίας έγιναν με ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης (linear regression analysis) χρησιμοποιώντας την Ang-1 και την Ang-2 ως εξαρτημένες μεταβλητές. Οι αναλύσεις γραμμικής παλινδρόμησης έγιναν μετά τις απαραίτητες διορθώσεις για την ηλικία, το φύλο, το δείκτη μάζας-σώματος (BMI), την καπνιστική συνήθεια (ενεργός ή πρώην καπνιστής και πακέτα-έτη), τον δείκτη συνοσηροτήτων Charlson, τη διάρκεια της νόσου και τα θεραπευτικά σχήματα. Τα δεδομένα αναλύθηκαν ως σταθμισμένοι συντελεστές (standardized coefficients) με 95% διαστήματα αξιοπιστίας (confidence intervals, CI). Τιμές $p < 0.05$ (2-sided) θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές. Η στατιστική ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα SPSS 16.0 (SPSS Inc, Chicago, IL) και το πρόγραμμα GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA).

Δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών και υγείων μαρτύρων

Μεταβλητές	ΧΑΠ n=59	Υγιείς καπνιστές n=25	Υγιείς μη καπνιστές n=20	p value
Ηλικία	60±10	60±6	52±10	0.815
Φύλο Γ/Α	15/44	7/18	15/5	0.765
Καπνιστική συνήθεια νυν/πρώην	36/23	16/9	0	0.540 *
Διάρκεια νόσου [έτη]	9 [5-14]	NA	NA	NA
Κάπνισμα [ργ]	60 [50-80]	54 [45-70]	0	0.101*
BMI Kg/m ²	27.5±4	26.5 ±4	26 ±4	0.420
FeNO ppb	12 (9-17)	12 (10-13)	14 (11-17)	0.450
Προ βρογχοδιαστολή FEV1 % pred	56 ±17	90 ±5	95 [88-99]	<0.001
Προ βρογχοδιαστολή FVC % pred	79 ±17	92 ±3	96 ±10	<0.001
Προ βρογχοδιαστολή FEV1/FVC %	57 ±9	88 ±8	87 ±6	<0.001
DLCO % pred	62 ±15	83 ±7	95 ±6	<0.001
FRC % pred	110 ±20	85 ±5	89 ±12	<0.001
Charlson index	5 (3-7)	3 (2-4)	0	0.002*

Φλεγμονώδη κύτταρα και μεσολαβητές

Μεταβλητές	ΧΑΠ n=59	Υγιείς καπνιστές n=25	Υγιείς μη καπνιστές n=20	p value
Κύτταρα × 10 ⁶ /ml	3.4 [1.5-5.4]	1.3 [0.9-1.6]	0.8 [0.6-1.1]	<0.001
Ηωσινόφιλα %	1 [0.5-4]	0 [0-0.5]	1 [0-2]	0.031
Ουδετερόφιλα %	64 [58-74]	37 [32-44]	23 [17-25]	<0.001
Μακροφάγα %	32 [22-40]	61 [55-67]	64 [56-70]	<0.001
Λεμφοκύτταρα %	1 [0.5-2]	1 [0-1]	0.25 [0-1]	0.400
Angio-2[pg/ml]	267 [147-367]	112 [67-171]	98 [95-107]	<0.001
Angio-1[pg/ml] x10 ³	4.8 [4-9.5]	4.5 [3.4-6.2]	5.4 [3.7-6.5]	0.304
AVP index	0.023 [0.018-0.03]	0.016 [0.01-0.024]	0.015 [0.011-0.023]	0.005
VEGF [pg/ml]	909 [634-1056]	442 [391-491]	213 [192-236]	<0.001
TGF-β1 [pg/ml]	1202 [750-1910]	764 [643-902]	850 [645-1005]	0.001
IL-8 [pg/ml]	4589 [3456-5632]	899 [823-1104]	432 [314-556]	<0.001
MMP-2 [pg/ml]	555 [403-704]	171 [142-241]	84 [68-102]	<0.001
LTB4 [pg/ml]	189 ±18	123 [112-156]	96 ±22	0.003

Figure 1

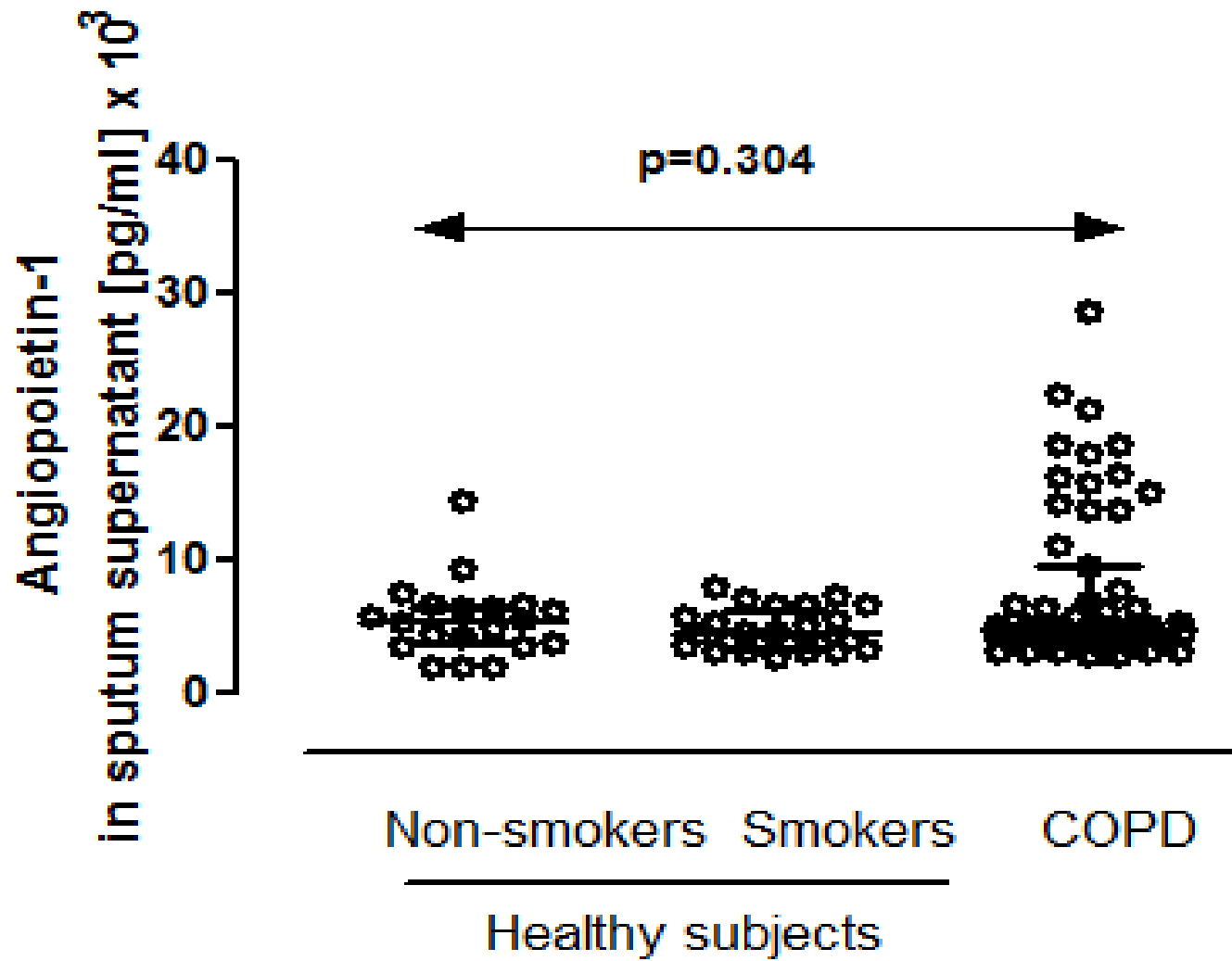
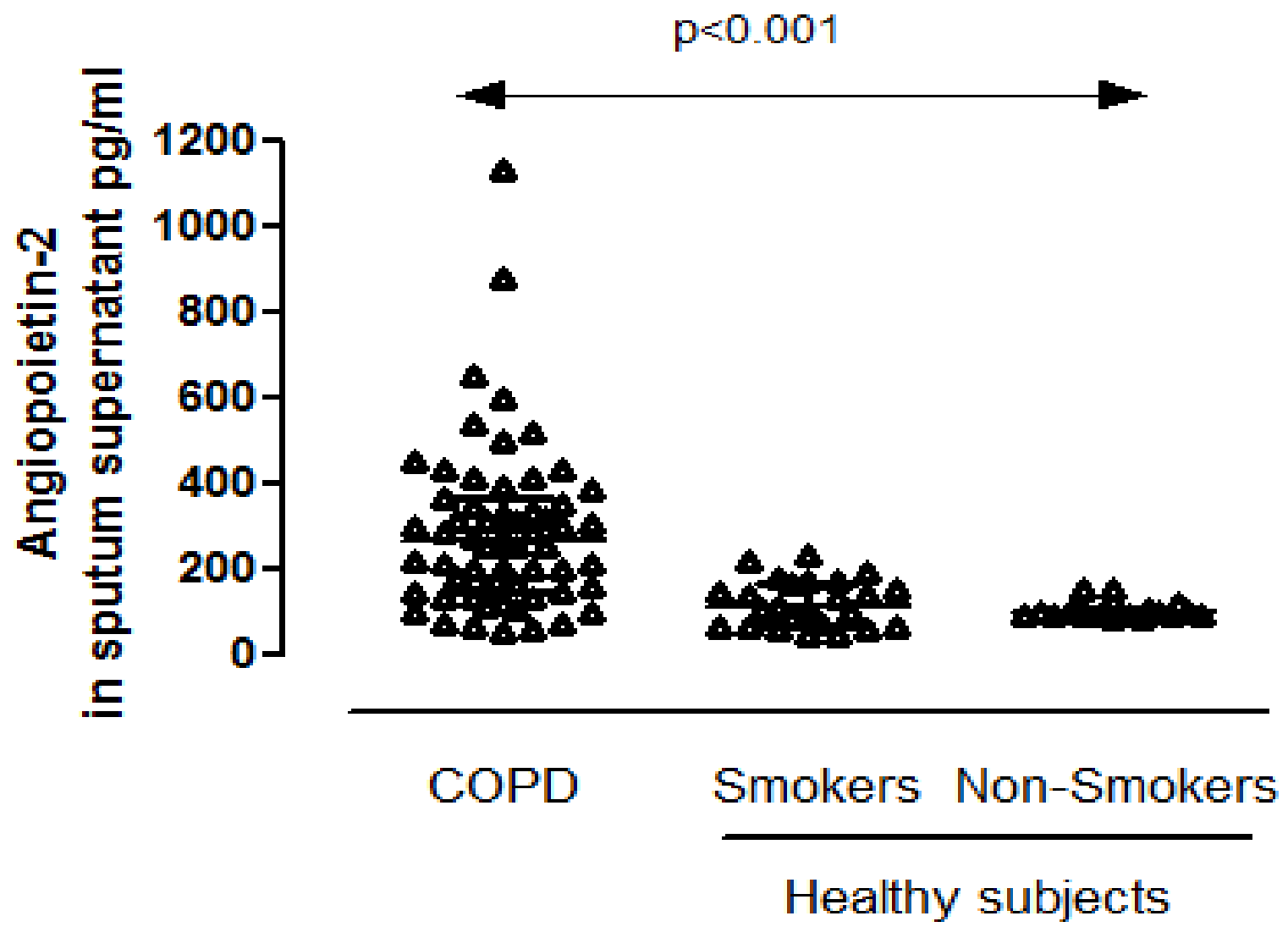


Figure 2



Ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης για την Angio-1 με τα φλεγμονώδη κύτταρα, τους φλεγμονώδεις μεσολαβητές και τις παραμέτρους του λειτουργικού ελέγχου σε ασθενείς με ΧΑΠ

Μεταβλητές	Beta standardized coefficient [95% CI]	Adjusted R ²	p value
Κύτταρα ×10 ⁶ /ml	0.011 [-5.8, 7.2]	0.004	0.824
Ηωσινόφιλα %	0.244 [20.7, 787.1]	0.330	0.039
Ουδετερόφιλα %	0.995 [-344, 763.3]	0.001	0.554
Μακροφάγα %	1.052 [-345, 563.6]	0.001	0.552
Λεμφοκύτταρα %	0.009 [-466.8, 493.4]	0.004	0.956
AVP	-0.127 [-22.6, 1.1]	-0.080	0.075
Angio-2	0.077 [-0.04, 0.1]	0.003	0.190
MMP-2 pg/ml	-0.137 [-24.5, 2.35]	-0.090	0.087
IL-8 [pg/ml]	0.875 [-325, 781,2]	-0.008	0.487
TGF-β1 [pg/ml]	0.363 [-342.7, 699.5]	-0.001	0.354
VEGF [pg/ml]	0.267 [-278.1, 730.3]	-0.002	0.370
LTB4 [pg/ml]	0.341 [-267, 643.5]	-0.004	0.216
FEV1 % pred	0.075 [-90.1, 369.1]	-0.044	0.226
FEV1/FVC % pred	0.022 [-38.3, 57.6]	-0.031	0.683
FRC % pred	-0.032 [-201.5, 129.3]	0.004	0.661
DLCO % pred	-0.114 [-216.1, 4.5]	-0.090	0.059

Ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης για την Angio-2 με τα φλεγμονώδη κύτταρα, τους φλεγμονώδεις μεσολαβητές και τις παραμέτρους του λειτουργικού ελέγχου σε ασθενείς με ΧΑΠ

Μεταβλητές	Beta standardized coefficient [95% CI]	Adjusted R ²	p value
Κύτταρα ×10 ⁶ /ml	0.14 [-60.6, 269.0]	0.014	0.209
Ηωσινόφιλα %	-0.58 [-1033.2, 324.5]	0.001	0.600
Ουδετερόφιλα %	-0.73 [-5494, 3212.4]	0.001	0.789
Μακροφάγα %	-0.87 [-5659.3, 105.1]	0.005	0.560
Λεμφοκύτταρα %	0.20 [-56.7, 312.6]	0.070	0.121
AVP	0.37 [105.4, 548.6]	0.780	<0.001
Angio-1	0.077 [-0.04, 0.1]	0.003	0.190
MMP-2 pg/ml	-0.62 [-10266.1, 1132.5]	0.190	0.022
IL-8 [pg/ml]	-0.58 [-10331, 324]	0.160	0.036
TGF-β1 [pg/ml]	-0.56 [-1274, 1009.3]	0.004	0.683
VEGF [pg/ml]	0.29 [108.4, 367.4]	0.850	<0.001
LTB4 [pg/ml]	-0.22 [-56.3, 7.4]	0.002	0.129
FEV1 % pred	0.100 [-426.4, 864.5]	-0.009	0.539
FEV1/FVC % pred	0.027 [-148.1, 139.4]	-0.007	0.847
FRC % pred	-0.186 [-666.5, 252.2]	0.020	0.324
DLCO % pred	-0.166 [-164.7, 491.2]	-0.001	0.322

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Στην παρούσα μελέτη βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα Ang-2 στα προκλητά πτύελα ασθενών με ΧΑΠ, με πιθανό συμπληρωματικό ρόλο στον VEGF ως προς την αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας.
- Επιπρόσθετα, τα επίπεδα της Ang-2 συσχετίζονταν θετικά με το δείκτη AVP και τα επίπεδα των VEGF, IL-8 και MMP-2
- Επίσης η Ang-1 βρέθηκε να συσχετίζεται ασθενώς με τον αριθμό των ηωσινοφίλων στα προκλητά πτύελα των ασθενών με ΧΑΠ.
- Τα αποτελέσματά μας παρέχουν in vivo ενδείξεις για πιθανό ρόλο της αγγειοποιητίνης-2 στην παθογένεια της ΧΑΠ.