



## **ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΑΞΟΝΑ ΤΕΛΟΜΕΡΑΣΗΣ/ΤΕΛΟΜΕΡΩΝ ΣΕ ΜΕΣΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΡΕΥΜΑΤΟΕΙΔΗ ΠΝΕΥΜΟΝΑ**

ΓΙΩΡΓΟΣ Α. ΜΑΡΓΑΡΙΤΟΠΟΥΛΟΣ<sup>1,2</sup>, ΑΘΑΝΑΣΙΑ ΠΡΟΚΛΟΥ<sup>1,2</sup>, ΚΩΣΤΑΣ  
ΚΑΡΑΓΙΑΝΝΗΣ<sup>2</sup>, ΙΣΜΗΝΙ ΛΑΣΗΘΙΩΤΑΚΗ<sup>1,2</sup>, ΓΙΑΝΝΟΥΛΑ ΣΟΥΦΛΑ<sup>3</sup>, ΜΑΡΙΑ ΧΡΙΣΤΙΝΑ  
ΚΑΣΤΡΙΝΑΚΗ<sup>4</sup>, ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Α. ΣΠΑΝΤΙΔΟΣ<sup>3</sup>, ΕΛΕΝΗ Α. ΠΑΠΑΔΑΚΗ<sup>4</sup>, ΝΙΚΟΛΑΟΣ Μ.  
ΣΙΑΦΑΚΑΣ<sup>1</sup>, ΚΑΤΕΡΙΝΑ Μ. ΑΝΤΩΝΙΟΥ<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Πανεπιστημιακή Πνευμονολογική Κλινική, Ηράκλειο, Κρήτη

<sup>2</sup>Εργαστήριο Μοριακής και Κυτταρικής Βιολογίας, Ιατρική Σχολή, Ηράκλειο, Κρήτη

<sup>3</sup>Ιολογικό εργαστήριο, Ιατρική Σχολή, Ηράκλειο, Κρήτη

<sup>4</sup>Αιματολογικό εργαστήριο, Ιατρική Σχολή, Ηράκλειο, Κρήτη

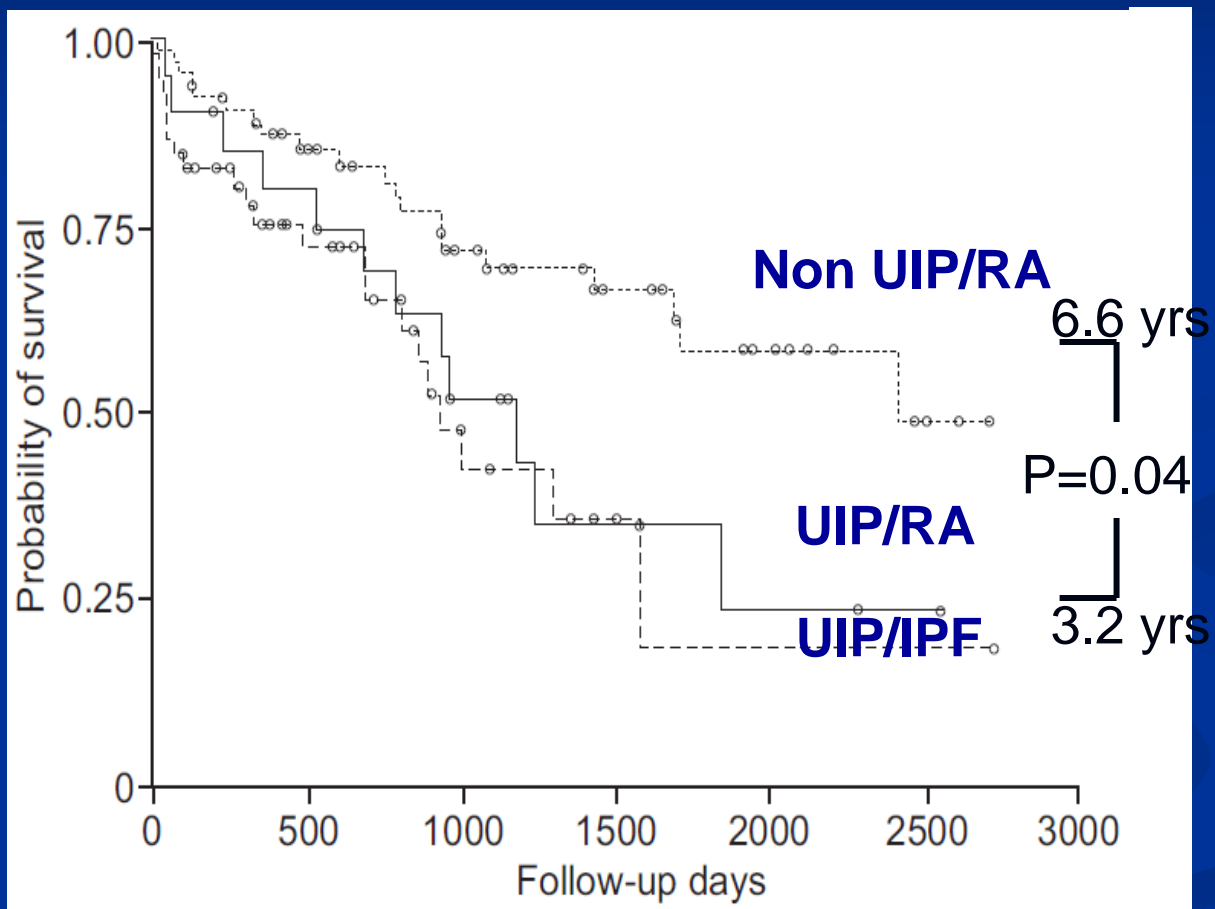
# Εισαγωγή

- Η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση (IPF) είναι μια θανατηφόρος νόσος με μέση επιβίωση μικρότερη των 5 ετών μετά τη διάγνωση
- Ανήκει στην ευρύτερη κατηγορία των διάμεσων πνευμονοπαθειών
- Δυστυχώς μέχρι σήμερα δεν υπάρχει κάποια αποτελεσματική θεραπεία για αυτή την ασθένεια
- Ιστολογική εικόνα συνήθους διάμεσης πνευμονίας (UIP)

# Εισαγωγή

- Η ρευματοειδής αρθρίτιδα (RA) αποτελεί μια αυτοάνοση νόσο στην οποία κάποιες φορές συμμετέχει και το αναπνευστικό σύστημα
- Η συνηθέστερη ιστολογική εικόνα της πνευμονικής συμμετοχής στη RA είναι η UIP όπως και στην IPF
- Όταν η RA συνδυάζεται με πνευμονική συμμετοχή με ιστολογική εικόνα UIP τότε τείνει να ομοιάζει όσον αφορά στην επιβίωση και την εξέλιξη της νόσου με την IPF.
- Βασιζόμενοι στα παραπάνω μπορούμε να υποθέσουμε ότι υφίσταται ένας κοινός παθογενετικός μηχανισμός για τις δυο αυτές νόσους

# Εισαγωγή



(Kim, ERJ 2010;35:1322-8)

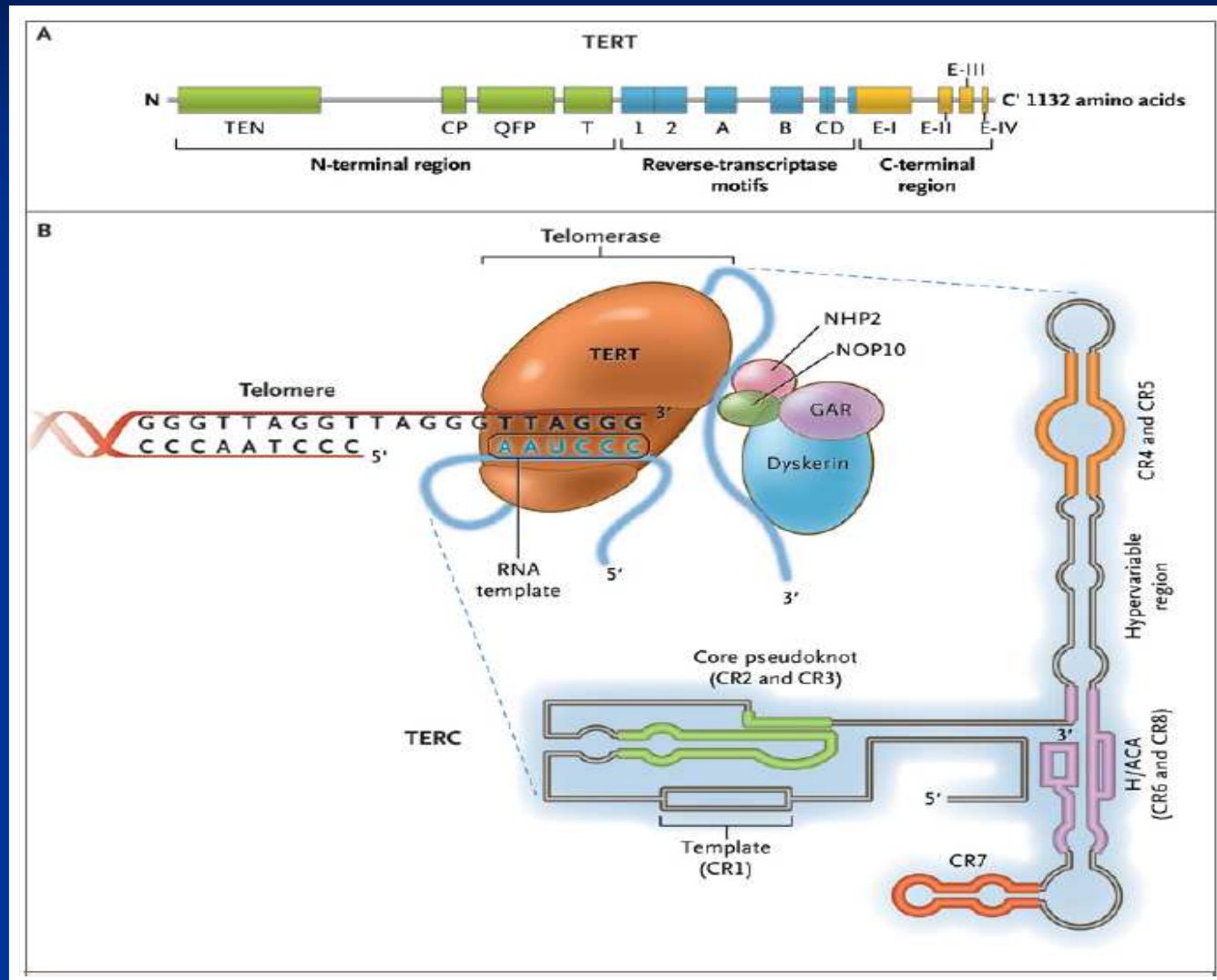
# Εισαγωγή (μεσεγχυματικά κύτταρα)

- Τα πρόδρομα μεσεγχυματικά κύτταρα μυελού των οστών αποτελούν μια υποκατηγορία των stem cells και εντοπίζονται στο στρώμα του μυελού των οστών
- Αντιπροσωπεύουν ένα από τους πιο πολλά υποσχόμενους τομείς της έρευνας των παθήσεων του αναπνευστικού λόγω της συμμετοχής τους σε διαδικασίες όπως η φλεγμονή, η ίνωση και η αναδόμηση
- Λόγω της συμβολής τους στην ίνωση και την αναδόμηση του ιστού αλλά κυρίως λόγω της ανοσοκατασταλτικής τους ικανότητας θεωρούνται πιθανοί θεραπευτικοί παράγοντες για την IPF
- Η μέχρι σήμερα βιβλιογραφία είναι διχασμένη ανάμεσα σε πιθανές θεραπευτικές δράσεις ή επιβαρυντικές των πρόδρομων μεσεγχυματικών κυττάρων

# Εισαγωγή (τελομεράση)

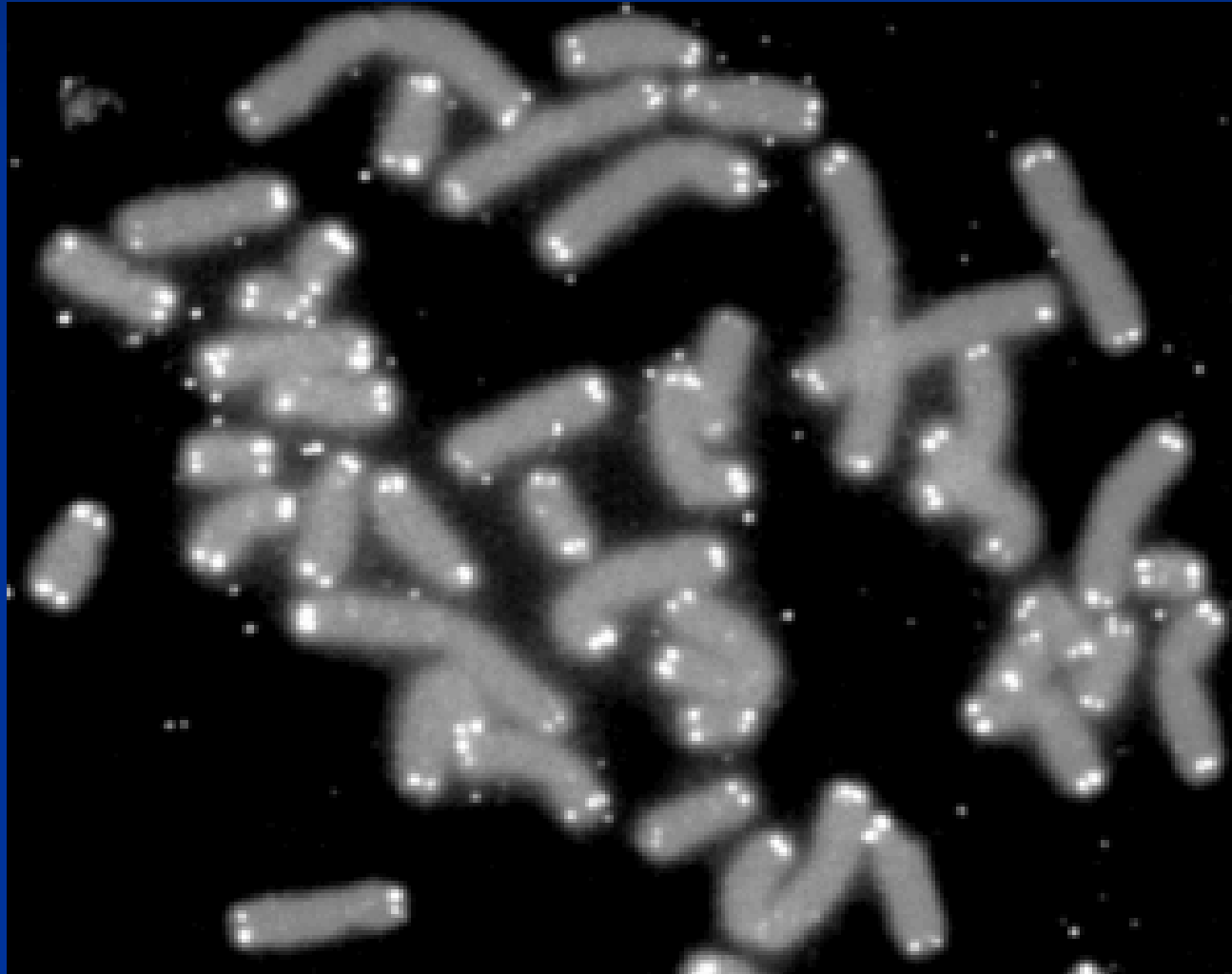
- Είναι ένα ειδικό ένζυμο το οποίο προσθέτει τμήματα τελομερούς DNA στα άκρα των χρωμοσωμάτων ώστε να μειώνεται ελάχιστα το μήκος των τελομερών του κυττάρου μετά από κάθε διπλασιασμό
- Αποτελείται από δυο υπομονάδες, μια πρωτεΐνη που είναι το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου, τον HTERT και ένα τμήμα RNA που ονομάζεται HTERC.
- Η δράση της τελομεράσης προστατεύει το κύτταρο από την απώλεια των τελομερών του και τον επακόλουθο κυτταρικό θάνατο
- Ειδικές μεταλλάξεις της τελομεράσης έχουν ανιχνευτεί σε κάποιες περιπτώσεις οικογενούς ιδιοπαθούς IPF.
- Τέλος το μικρό μήκος τελομερούς αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη IPF

# Εισαγωγή (τελομεράση)



Calado RT, Young NS. NEJM, 2009;361:2353-65.

# Εισαγωγή (τελομεράση)



# Σκοπός

Η διερεύνηση του άξονα τελομεράσης / τελομερών σε πρόδρομα μεσεγχυματικά κύτταρα μυελού των οστών ασθενών με ΙΠΙ και ΡΑ με πνευμονική συμμετοχή και η πιθανή επίδραση του στην παθογένεια αυτών των νοσημάτων

# Υλικό - Μέθοδοι

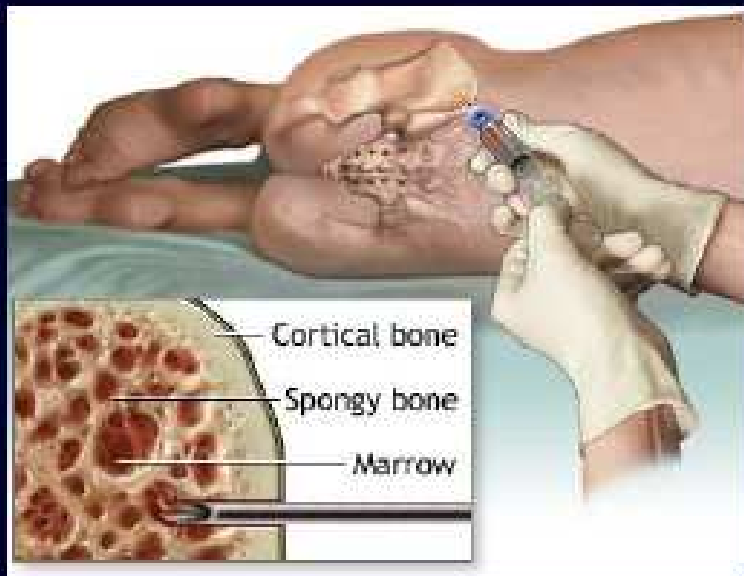
- πληθυσμός μελέτης:
  - 12 ασθενείς με IPF
  - 10 ασθενείς με RA – UIP
  - 10 ασθενείς με RA
  - 12 υγιείς μάρτυρες
  
- τόπος: τμήμα Διάμεσων Πνευμονοπαθειών Πνευμονολογικής Κλινικής Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου
  
- χρόνος: 2009-2011
  
- Έγκριση επιτροπής ηθικής Πανεπιστημίου Κρήτης

# Υλικό - Μέθοδοι

- απομόνωση, καλλιέργεια έως passage 2 και ταυτοποίηση πρόδρομων μεσεγχυματικών κυττάρων μυελού των οστών
- Real time PCR για τη μελέτη της mRNA έκφρασης του HTERT και του HTERC στα μεσεγχυματικά κύτταρα
- Εκτίμηση της δραστηριότητας της τελομεράσης στα παραπάνω κύτταρα μέσω της TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol)
- Μέτρηση του μήκους του τελομερούς
- Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη χρήση των μη παραμετρικών Kruskal-Wallis test και Mann-Whitney test και επίπεδο σημαντικότητας  $p < 0,05$

# Υλικό - Μέθοδοι

## Expansion protocol of MSCs



- 10-20 mL human BM aspirates.
- Dilute sample 1:1 in plain DMEM-LG
- Overlay on Ficoll and spin at 1700 rpm to obtain the BMMCs
- Wash and resuspend cells in MSC medium (DMEM-LG/10%FCS/1%PS )
- Count cells and plate  $0.2 \times 10^8$  cells/cm<sup>2</sup> in 25cm<sup>2</sup> flask (37°C/5%CO<sub>2</sub>)
- After 24-72h, remove NACs and wash ACs twice with plain DMEM-LG.
- Add fresh MSC medium and replace it every 3-4 days until near confluency.
- Trypsinize cells with 0.25% trypsin-1mM EDTA for 10 min at 37°C
- Wash cells, pass several times through a 19G needle to ensure cell separation.
- Count cells and replate at 2000 cells/ cm<sup>2</sup> in 75cm<sup>2</sup> flask

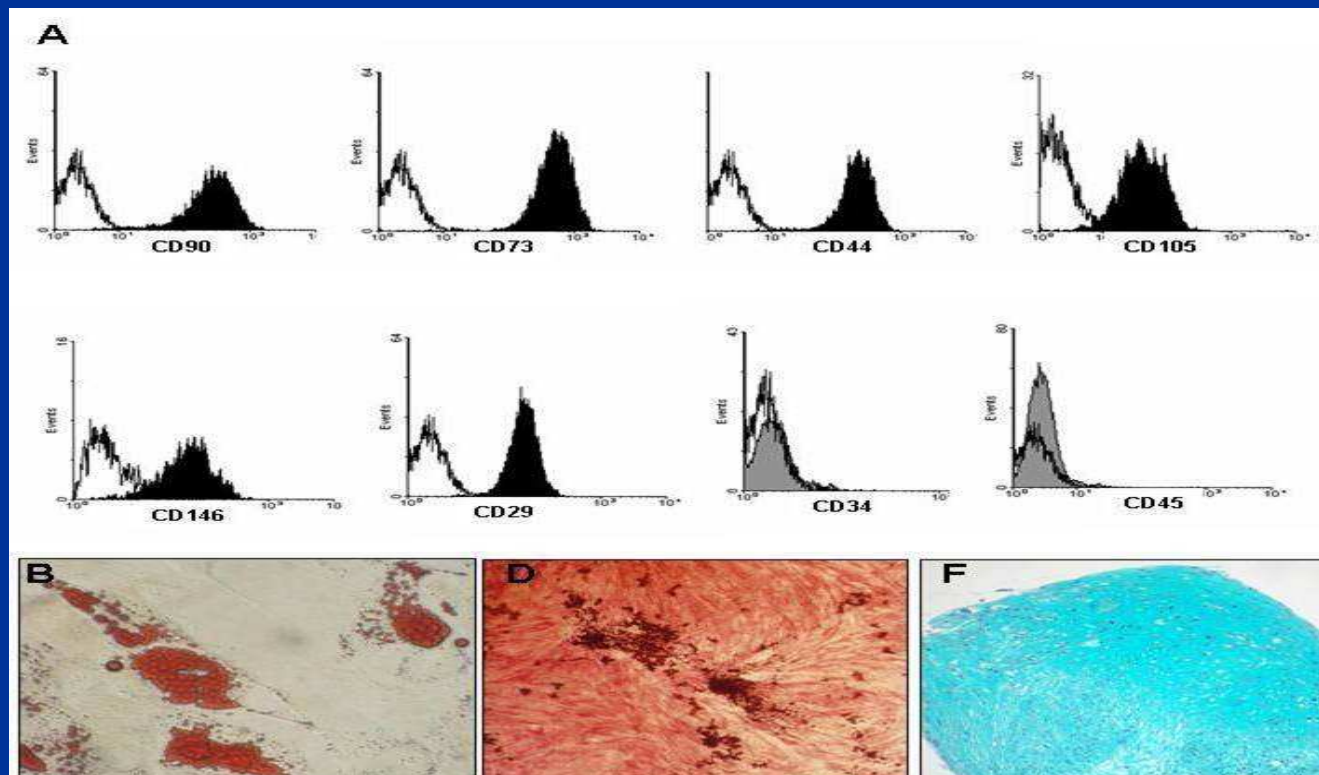
# Αποτελέσματα

## ➤ Δημογραφικά

Χαρακτηριστικά	Υγιείς μάρτυρες	IPF	RA	RA-UIP
Αριθμός	12	12	10	10
Φύλο: άνδρες/γυναίκες	6/6	8/4	2/8**	4/6
Ηλικία, διάμεσος (yr)	59 (32- 65)	65(40-75)	58(31-79)	75(50-81)
Καπνιστές/ μη καπνιστές	7/5	9/3	4/6	2/8
FVC, (% pred)	103 ± 14	77.3± 13.0*	79.7 ± 11	85.87 ± 6.5
TLC,( % pred)	101 ± 19	67.4±14.2*	75 ± 13.75	80.8 ± 7.4
TL <sub>CO</sub> , (% pred)	96 ± 6	60.3±17.8*	77.4 ± 12.58	44.42 ± 7.75

# Αποτελέσματα

- Ταυτοποίηση μεσεγχυματικών κυττάρων
  - προσκόλληση σε πλαστικές επιφάνειες
  - έκφραση των CD73, CD90, CD105
  - μη έκφραση των CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79a,
  - δυνατότητα διαφοροποίησης in vitro σε οστεοβλάστες, χονδροβλάστες και λιποκύτταρα



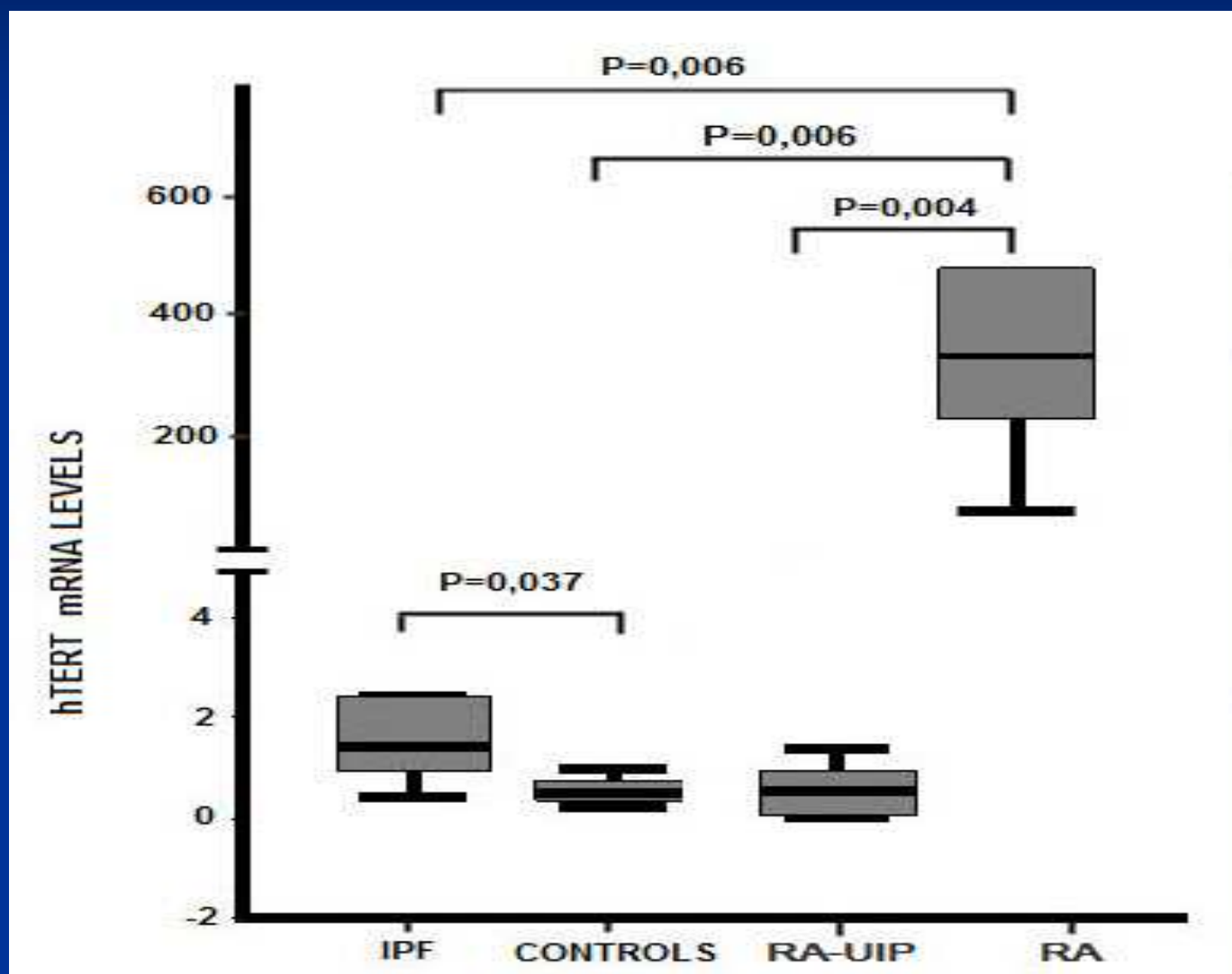
# Αποτελέσματα (HTERT)

## ➤ mRNA έκφραση του HTERT:

- Αυξημένη έκφραση του HTERT στην RA ( $519 \pm 205$ ) σε σύγκριση με τη RA UIP ( $2,7 \pm 2,3$ ), με την IPF ( $14,15 \pm 12,82$ ) και με τους υγιείς ( $0,55 \pm 0,11$ ) με στατιστική σημαντικότητα ( $p=0,004$ ,  $p=0,006$  και  $p=0,006$  αντίστοιχα)

- Αυξημένη mRNA έκφραση του HTERT στα μεσεγχυματικά κύτταρα ασθενών με IPF ( $14,15 \pm 12,82$ ) σε σύγκριση με αυτή στα μεσεγχυματικά υγιών μαρτύρων ( $0,55 \pm 0,11$ ) ( $p=0,037$ )

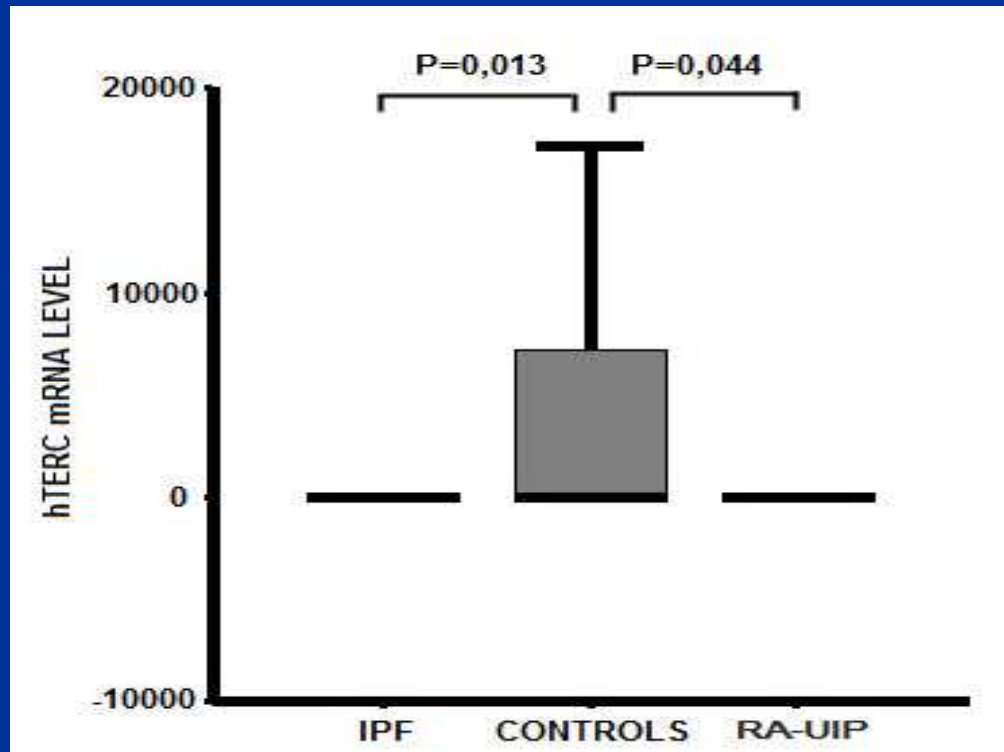
# Αποτελέσματα (hTERT)



# Αποτελέσματα (HTERC)

## ➤ mRNA έκφραση του HTERC:

- Παρατηρήθηκε μια μείωση της έκφρασης του HTERC στους ασθενείς με IPF ( $4,5 \pm 4,45$ ) και σε αυτούς με RA UIP ( $1,5 \pm 0,83$ ) συγκριτικά με τους υγιείς ( $3911,59 \pm 1734,91$ ) με ένα στατιστικά σημαντικό τρόπο ( $p=0,013$  και  $p=0,044$  αντίστοιχα).



# Αποτελέσματα (TRAP, Telomere length)

## ➤ TRAP:

Η δραστηριότητα της τελομεράσης ήταν μειωμένη στις ομάδες των ασθενών με IPF και RA UIP σε σχέση με τους υγιείς και τους ασθενείς με RA χωρίς όμως στατιστική σημαντικότητα.

## ➤ Telomere length:

Καμιά διαφορά δεν παρατηρήθηκε στα μήκη των τελομερών ανάμεσα στις ομάδες που μελετήσαμε

*Πιθανότατα ο μικρός αριθμός δειγμάτων μας να οφείλεται για τα μη στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα στις δυο αυτές ερευνητικές διαδικασίες*

# Συζήτηση - Συμπεράσματα

- Σκοπός μας ήταν η διερεύνηση του άξονα τελομεράσης / τελομερών στα πρόδρομα μεσεγχυματικά κύτταρα μυελού των οστών ασθενών με IPF και RA UIP, ασθένειες που όπως προαναφέραμε εμφανίζουν αρκετές ομοιότητες στην πρόγνωση αλλά και στην ιστολογική εικόνα
- Ανιχνεύθηκε μια μειωμένη mRNA έκφραση του HTERT στα μεσεγχυματικά κύτταρα ασθενών με IPF και RA UIP σε σύγκριση με αυτή των ασθενών με RA
- Επιπλέον, βρέθηκε μια μειωμένη mRNA έκφραση του HTERC στα μεσεγχυματικά ασθενών με IPF και RA UIP σε σχέση με αυτή των υγιών μαρτύρων
- Τα αποτελέσματα αυτά πιθανότατα μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η RA UIP και η IPF ακολουθούν το παρόμοιο παθογενετικό μονοπάτι, επιβεβαιώνοντας σε ένα βαθμό την υπόθεση μας

# Συζήτηση - Συμπεράσματα

- Παρά τη διαφορετική έκφραση της τελομεράσης στα μεσεγχυματικά κύτταρα ασθενών με IPF, RA UIP σε σχέση με αυτή των μαρτύρων και των ασθενών με RA καμιά διαφορά δεν ανιχνεύθηκε στη δραστικότητα της τελομεράσης και στο μήκος του τελομερούς ανάμεσα στις ομάδες που συγκρίναμε
- Το παραπάνω αποτέλεσμα ίσως να δικαιολογείται λόγω κάποιας μετά-μεταγραφικής ρύθμισης του mRNA της τελομεράσης και της τελικής του έκφρασης σε πρωτεΐνη
- Η διατήρηση της δραστικότητας της τελομεράσης και του μήκους του τελομερούς στο επίπεδο των μεσεγχυματικών κυττάρων προσφέρουν ένα κατάλληλο κυτταρικό πληθυσμό για θεραπευτικές παρεμβάσεις σε αυτές τις νόσους

# Συμπεράσματα

- Η μειωμένη έκφραση της τελομεράσης σε IPF, RA UIP που ανιχνεύτηκε στην παρούσα μελέτη ίσως σχετίζεται με άγνωστα μονοπάτια της παθοφυσιολογίας των ασθενειών
- Η κοινή μείωση αυτής της έκφρασης συμφωνεί με τη θεωρία ενός κοινού παθογενετικού μηχανισμού
- Το μήκος του τελομερούς και η δραστικότητα της τελομεράσης δεν διαφέρει στα μεσεγχυματικά κύτταρα ασθενών με IPF, RA UIP σε σχέση με τους υγιείς



- Πρόδρομα μεσεγχυματικά κύτταρα μυελού των οστών: κυτταρικός πληθυσμός που πιθανότατα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για θεραπευτικές παρεμβάσεις
- Απαραίτητη η μελέτη του άξονα τελομεράσης / τελομερούς σε ευρύτερο πληθυσμό και η περαιτέρω διερεύνηση των παθογενετικών μηχανισμών της πνευμονικής ίνωσης



## **ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΑΞΟΝΑ ΤΕΛΟΜΕΡΑΣΗΣ/ΤΕΛΟΜΕΡΩΝ ΣΕ ΜΕΣΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΡΕΥΜΑΤΟΕΙΔΗ ΠΝΕΥΜΟΝΑ**

ΓΙΩΡΓΟΣ Α. ΜΑΡΓΑΡΙΤΟΠΟΥΛΟΣ<sup>1,2</sup>, ΑΘΑΝΑΣΙΑ ΠΡΟΚΛΟΥ<sup>1,2</sup>, ΚΩΣΤΑΣ  
ΚΑΡΑΓΙΑΝΝΗΣ<sup>2</sup>, ΙΣΜΗΝΙ ΛΑΣΗΘΙΩΤΑΚΗ<sup>1,2</sup>, ΓΙΑΝΝΟΥΛΑ ΣΟΥΦΛΑ<sup>3</sup>, ΜΑΡΙΑ ΧΡΙΣΤΙΝΑ  
ΚΑΣΤΡΙΝΑΚΗ<sup>4</sup>, ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Α. ΣΠΑΝΤΙΔΟΣ<sup>3</sup>, ΕΛΕΝΗ Α. ΠΑΠΑΔΑΚΗ<sup>4</sup>, ΝΙΚΟΛΑΟΣ Μ.  
ΣΙΑΦΑΚΑΣ<sup>1</sup>, ΚΑΤΕΡΙΝΑ Μ. ΑΝΤΩΝΙΟΥ<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Πανεπιστημιακή Πνευμονολογική Κλινική, Ηράκλειο, Κρήτη

<sup>2</sup>Εργαστήριο Μοριακής και Κυτταρικής Βιολογίας, Ιατρική Σχολή, Ηράκλειο, Κρήτη

<sup>3</sup>Ιολογικό εργαστήριο, Ιατρική Σχολή, Ηράκλειο, Κρήτη

<sup>4</sup>Αιματολογικό εργαστήριο, Ιατρική Σχολή, Ηράκλειο, Κρήτη