



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΜΟΡΦΩΤΙΚΟΥ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥ
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ-β (TGF-β) ΣΤΗΝ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΥΠΕΡΤΑΣΗ**

**ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ Ι. ΜΕΓΑΛΟΥ
ΙΑΤΡΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2013

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν.5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του ιατρικού τμήματος)»

Ημερομηνία αίτησης της κ. Μεγάλου Αικατερίνης: 22-11-2007

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 623^α/18-12-2007

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Κωλέττης Θεόφιλος Αναπληρωτής Καθηγητής Καρδιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Μαλάμου –Μήτση Βασιλική Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Κατσούρας Χρήστος Επικουρος Καθηγητής Καρδιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 15-1-2008

«Ο ρόλος του μεταμορφωτικού αυξητικού παράγοντα-β στην πνευμονική υπέρταση»

Ημερομηνία Ανασυγκρότησης Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 677^α/9-2-2010

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Κωλέττης Θεόφιλος Αναπληρωτής Καθηγητής Καρδιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Μαλάμου –Μήτση Βασιλική Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μιχάλης Λάμπρος Καθηγητής Καρδιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 750^α/12-3-2013

Κωλέττης Θεόφιλος	Καθηγητής Καρδιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κωνσταντόπουλος Σταύρος	Ομότιμος Καθηγητής Παθολογίας -Πνευμονολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μαλάμου –Μήτση Βασιλική	Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μιχάλης Λάμπρος	Καθηγητής Καρδιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Νάκος Γεώργιος	Καθηγητής Εντατικής Θεραπείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Δασκαλόπουλος Γεώργιος	Αναπληρωτής Καθηγητής Πνευμονολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κωνσταντή Μαρία	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 2-4-2013

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Μαργαρίτα Τζαφλίδου

Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσικής



Η Γραμματέας της Σχολής

Μαριόπουλου
ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

Ευχαριστώ θερμά όλους όσους με βοήθησαν να ξεκινήσω και να ολοκληρώσω την παρούσα ερευνητική εργασία και ιδιαίτερα:

Αισθάνομαι βαθιά την ανάγκη να ευχαριστήσω τον κ. Θεόφιλο Κωλέττη, Καθηγητή Καρδιολογίας και μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, ο οποίος με εμπιστεύθηκε και μου έδωσε την ευκαιρία να ανακαλύψω τον ενδιαφέροντα κόσμο της πειραματικής έρευνας και να συνεισφέρω και εγώ με την παρούσα μελέτη, έστω και στο ελάχιστο, στην εξέλιξή της. Τον ευχαριστώ θερμά για το αμέριστο και καθημερινό ενδιαφέρον του και για την πολύτιμη γνώση και εμπειρία που μου προσέφερε όλο αυτό το διάστημα.

Τα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, την κ. Βασιλική Μαλάμου-Μήτση, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας και τον κ. Λάμπρο Μιχάλη, Καθηγητή Καρδιολογίας για την πολύτιμη επιστημονική καθοδήγηση που μου προσέφεραν σε όλο το διάστημα της ερευνητικής μου πορείας. Ιδιαίτέρως ανεκτίμητη υπήρξε η συμβολή της κ. Μαλάμου-Μήτση στην παθολογοανατομική εκτίμηση των ιστολογικών παρασκευασμάτων.

Τον κ. Αντώνη Βλάχο, Επίκουρο Καθηγητή Παιδοκαρδιολογίας για την πολύτιμη συνεισφορά του στη διεξαγωγή αυτής της έρευνας με τις εύστοχες και εποικοδομητικές παρατηρήσεις του.

Τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής τον κ. Γεώργιο Νάκο, Καθηγητή Εντατικής Θεραπείας, τον κ. Σταύρο Κωνσταντόπουλο Καθηγητή Πνευμονολογίας, τον κ. Γεώργιο Δασκαλόπουλο, Αναπληρωτή Καθηγητή Πνευμονολογίας και την κ. Μαρία Κωνσταντή, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας.

Τους συναδέλφους μου κ. Γιάννη Μπαλτογιάννη και κ. Μαρία Αγγελλάκη για την υπομονή τους να με εκπαιδεύσουν πάνω στις πειραματικές τεχνικές.

Τον συνεργάτη μου κ. Δημήτρη Οικονομίδη για την πολύτιμη βοήθειά του και τις στιγμές που μοιραστήκαμε μαζί στο εργαστήριο τα τρία αυτά χρόνια.

Την συνάδελφό μου κ. Χρύσα Γλαβά, η οποία συμμετείχε στη μελέτη των ιστολογικών παρασκευασμάτων.

Τον κ. Απόστολο Παπαλόη, Διευθυντή του Ερευνητικού-Πειραματικού Κέντρου της ELPEN ΑΕ στο οποίο έλαβαν χώρα τα πειράματα, για την πολύτιμη προσφορά υλικοτεχνικής υποστήριξης, αλλά κυρίως για την φιλική συμπαράσταση. Επίσης, το προσωπικό του εργαστηρίου που ήταν πάντα πρόθυμο να μου προσφέρει τη βοήθειά του και ιδιαίτερα την κ. Ελευθερία Καράμπελα, την κ. Πόπη Τσαρέα και τον κ. Χρήστο Χαρίτο, Χημικό του Ερευνητικού Κέντρου που βοήθησε στην παρασκευή των χημικών διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στο ερευνητικό πρωτόκολλο.

Την υπεύθυνη συντονισμού και οργάνωσης των πειραμάτων κ. Ελένη Γκόγκα για την αμέριστη συμπαράσταση, αλλά κυρίως για τη πολύτιμη φιλία της.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά τους γονείς μου Ιωάννη και Ειρήνη, και την αδελφή μου Φωτεινή, όχι μόνο για την οικονομική, αλλά κυρίως για την ηθική στήριξη και την αμέριστη αγάπη τους καθ' όλη τη διάρκεια της επαγγελματικής μου σταδιοδρομίας.

Αφιερωμένη

στους γονείς μου

Ιωάννη και Ειρήνη

και στην αδερφή μου

Φωτεινή

ως ένα μικρό δείγμα της ευγνωμοσύνης μου.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η πρωτοπαθής πνευμονική υπέρταση αποτελεί μία σπάνια, αλλά σημαντική πάθηση με υψηλή νοσηρότητα και θνητότητα. Παρά τις σημαντικές προόδους που προσφέρουν οι υπάρχουσες θεραπείες με προστακυκλίνη, αναστολείς της ενδοθηλίνης-1 και αναστολείς φωσφοδιεστεράσης, η ποιότητα ζωής και η πρόγνωση των ασθενών με πνευμονική υπέρταση παραμένουν πτωχές. Συνεπώς, η ανάγκη για καλύτερη κατανόηση των παθοφυσιολογικών μηχανισμών της νόσου και ανάπτυξη νέων θεραπειών παραμένει επιτακτική.

Έχουν μελετηθεί πολλοί αιτιοπαθογενετικοί παράγοντες, αλλά ο ακριβής τους ρόλος παραμένει άγνωστος. Ανάμεσα στους υπό διερεύνηση παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς και τις πιθανές νέες θεραπευτικές προοπτικές, η αναστολή της οδού του μεταμορφωτικού αυξητικού παράγοντα-β (TGF-β) είναι η πλέον ελπιδοφόρα και αποκτά συνεχώς αυξανόμενο ερευνητικό ενδιαφέρον. Ο TGF-β συνιστά μία μεγάλη οικογένεια πλειοτροπικών κυτταροκινών που δρουν ως ρυθμιστές της κυτταρικής ανάπτυξης και της διατήρησης της κυτταρικής ομοιόστασης, μέσω ελέγχου διεργασιών όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η μετανάστευση και η απόπτωση.

Η μελέτη αυτή συμβάλλει στην περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου του TGF-β στην παθοφυσιολογία της πνευμονικής υπέρτασης και εξετάζει την θεραπευτική αξία του συνδυασμού της αναστολής της δράσης του TGF-β με τους αναστολείς της ενδοθηλίνης-1, οι οποίοι ήδη χρησιμοποιούνται στη θεραπεία ασθενών με ΠΑΥ. Η ενδοθηλίνη-1 είναι μία ισχυρή αγγειοσυσπαστική ουσία που κατέχει κεντρικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της πνευμονικής υπέρτασης.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	21
I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	23
1. ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΑΡΤΗΡΙΑΚΗ ΥΠΕΡΤΑΣΗ.....	23
1.1 Ιστορική αναδρομή.....	23
1.2 Ορισμός πνευμονικής υπέρτασης.....	24
1.3 Κλινική ταξινόμηση πνευμονικής υπέρτασης.....	25
1.4 Παθοφυσιολογία πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης.....	30
1.4.1 Μεταβολική δυσλειτουργία του ενδοθηλίου.....	32
1.4.2 Ενδοθηλιακή βλάβη.....	34
1.5 Παθολογοανατομικά ευρήματα πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης.....	36
1.6 Διαγνωστική προσέγγιση και εκτίμηση πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης.....	44
1.6.1 Κλινικές εκδηλώσεις και σημεία πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης.....	45
1.6.2 Εργαστηριακή διερεύνηση πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης.....	47
1.7 Θεραπευτική αντιμετώπιση πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης.....	50
1.7.1 Προστανοειδή.....	52
1.7.2 Ανταγωνιστές υποδοχέων ενδοθηλίνης-1.....	54
1.7.3 Αναστολείς φωσφοδιεστεράσης τύπου 5.....	55
1.7.4 Συνδυαστικές θεραπείες.....	56
1.7.5 Μειονεκτήματα υπάρχουσων θεραπειών.....	59
1.7.6 Μελλοντικοί στόχοι.....	60
2. ΜΕΤΑΜΟΡΦΩΤΙΚΟΣ ΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ-β (TGF-β).....	63
2.1 Γενικά.....	63
2.2 Υπερ-Οικογένεια μεταμορφωτικού αυξητικού παράγοντα-β.....	64
2.3 Μοριακή δομή των πρωτεϊνών της υπερ-οικογένειας TGF-β.....	65
2.4 Ενεργοποίηση των πρωτεϊνών της υπερ-οικογένειας TGF-β.....	67

2.5 Διαμεμβρανικοί υποδοχείς των TGF-βs.....	69
2.6 Ενδοκυττάρια μεταβίβαση σήματος (Smad signalling).....	74
2.7 Λειτουργικός ρόλος των TGF-βs.....	79
2.8 TGF-βs και πνευμονική αρτηριακή υπέρταση.....	82
3. ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΗ-1 ΚΑΙ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΕΣ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΤΗΣ.....	89
3.1 Γενικά.....	89
3.2 Παραγωγή ενδοθηλινών.....	91
3.3 Φυσιολογία ενδοθηλίνης-1 και υποδοχέων της.....	93
3.4 Ρύθμιση της έκφρασης ενδοθηλίνης-1 και υποδοχέων της.....	97
3.5 Δράσεις ενδοθηλίνης-1 στον οργανισμό.....	98
3.6 Ανταγωνιστές υποδοχέων ενδοθηλίνης-1 και πνευμονική υπέρταση.....	101
4. ΣΚΟΠΟΣ ΤΟΥ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ.....	103
II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	105
1. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	105
1.1 Επιλογή πειραματικού προτύπου.....	105
1.2 Σχεδιασμός ερευνητικού πρωτοκόλλου.....	106
Α) Πρώιμα στάδια.....	106
Β) Όψιμα στάδια.....	110
1.3 Πρόκληση πνευμονικής υπέρτασης.....	120
1.4 Αναισθησία.....	122
1.5 Αιμοδυναμικές μετρήσεις.....	124
1.6 Δοκιμασίες αντοχής στην άσκηση.....	129
1.7 Ιστολογική μελέτη.....	132
1.8 Στατιστική ανάλυση.....	135
III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	137
Α. Πρώτο σκέλος.....	137
Β. Δεύτερο σκέλος.....	145

IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	157
V. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	173
VI. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΕΛΛΗΝΙΚΑ.....	175
VII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΑΓΓΛΙΚΑ – SUMMARY.....	179
VIII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	183

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ-ABBREVIATIONS

ET-1 Ενδοθηλίνη-1

ΗΚΓ Ηλεκτροκαρδιογράφημα

ΠΑΥ Πνευμονική Αρτηριακή Υπέρταση

ΠΥ Πνευμονική Υπέρταση

ADH Antidiuretic Hormone

ALK-1 Activin Receptor-like kinase 1

ANP Atrial Natriuretic Peptide

bFGF basic Fibroblast Growth Factor

BMP Bone Morphogenetic Protein

BMPR Bone Morphogenetic Protein Receptor

cAMP cyclic Adenosine Monophosphate

cGMP cyclic Guanosine Monophosphate

CDKs Cyclin Dependant Kinases

CDKIs Cyclin Dependant Kinase Inhibitors

CO Cardiac Output

eNOS endothelial Nitric Oxide Synthase

GDNF Distantly related glial cell-line derived neurotrophic factor

HDL High Density Lipoprotein

IGF-1 Insulin-like Growth Factor

LAP Latency Associated Peptide

LDL Low Density Lipoprotein

LLC Large Latent Complex

LTBP Latent TGF- β -Binding Protein

MIS Müllerian Inhibiting Substance

NO Nitric Oxide

SLC Small Latent Complex

TGF- β Transforming Growth Factor- β

TGF- β R Transforming Growth Factor- β Receptor

PAP Pulmonary Artery Pressure

PDGF Platelet-derived Growth Factor

PGI₂ Prostacyclin

PVR Pulmonary Vessels Resistance

PWP Pulmonary Wedge Pressure

RHC Right Heart Catheterization

SMA Smooth Muscle Actin

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΑΡΤΗΡΙΑΚΗ ΥΠΕΡΤΑΣΗ

1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Η πνευμονική υπέρταση περιλαμβάνει ένα σύνολο παθήσεων οι οποίες χαρακτηρίζονται από προοδευτική αύξηση των πνευμονικών αγγειακών αντιστάσεων. Η αύξηση αυτή οδηγεί σε μεγάλη αύξηση της πίεσης της πνευμονικής αρτηρίας , υπερφόρτωση της δεξιάς κοιλίας και τελικά σε δεξιά καρδιακή ανεπάρκεια και θάνατο.

Η νόσος περιγράφηκε για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1950 από τον Paul Wood. Αρχικά το 1891 ο Ernst von Romberg είχε εντοπίσει βλάβες στα πνευμονικά αγγεία κατά τη διάρκεια μίας νεκροτομής και τις οποίες είχε χαρακτηρίσει ως 'πνευμονική αγγειακή σκλήρυνση'. Κατά τη διάρκεια του 1901, ο Ayerza έδινε διαλέξεις για το σύνδρομο χρόνιας κυάνωσης, δύσπνοιας και πολυκυτταραιμίας. Το 1913, ο Arrillaga αποδίδει τη νόσο σε συφιλιδική πνευμονική ενδαρτηριίτιδα, μία παρανόηση που παραμένει επί δύο δεκαετίες. Τα λειτουργικά χαρακτηριστικά των πνευμονικών αγγείων αρχίζουν να διερευνούνται τη δεκαετία του 1940. Τα πειράματα δείχνουν ότι η οξεία υποξία προκαλεί αγγειοσύσπαση των πνευμονικών αγγείων. Η παθογένεια της αγγειοσύσπασης στην πνευμονική υπέρταση μελετήθηκε από τον Wood, ο οποίος το 1959 περιέγραψε τα κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου σε μία σειρά 17 ασθενών [1]. Ο Wagenvoort δημοσιεύει ένα άρθρο το 1960 που περιγράφει ότι το πρωιμότερο παθολογοανατομικό εύρημα στην πρωτοπαθή

πνευμονική υπέρταση είναι η υπερτροφία του μέσου χιτώνα του αρτηριακού τοιχώματος, η οποία είναι ενδεικτική της ύπαρξης ενός ερεθίσματος που προκαλεί αγγειοσύσπαση και υπερπλασία των λείων μυϊκών κυττάρων[2].

Χωρίς αμφιβολία, η πνευμονική υπέρταση υπήρξε για πολλά χρόνια μία άγνωστη νόσος. Την τελευταία μόλις δεκαετία σημειώθηκε σημαντική πρόοδος στην κατανόηση του μηχανισμού της, στη διαγνωστική προσέγγιση και θεραπεία της.

1.2 ΟΡΙΣΜΟΣ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗΣ ΥΠΕΡΤΑΣΗΣ

Η πνευμονική υπέρταση ορίζεται ως η αύξηση της μέσης πίεσεως της πνευμονικής αρτηρίας (PAP) $\geq 25\text{mmHg}$ σε ηρεμία, όπως προκύπτει από μέτρηση δεξιού καρδιακού καθετηριασμού (RHC). Η φυσιολογική μέση πίεση της πνευμονικής πίεσης σε ηρεμία είναι $14\pm 3\text{mmHg}$, με ανώτερο φυσιολογικό όριο τα 20mmHg .

Η αύξηση της μέσης πίεσεως της πνευμονικής αρτηρίας (PAP) $\geq 30\text{mmHg}$ στην άσκηση, ως συμπληρωματική προσέγγιση του ορισμού της πνευμονικής υπέρτασης, δεν υποστηρίζεται από επαρκή δημοσιευμένα στοιχεία. Επιπλέον, υγιή άτομα μπορούν να φτάσουν ακόμη υψηλότερα επίπεδα κατά τη διάρκεια της άσκησης. Κατά συνέπεια, δεν χρησιμοποιείται ως ορισμός προς το παρόν.

Η πνευμονική υπέρταση έχει κατηγοριοποιηθεί όσον αφορά τον ορισμό της, στις κατηγορίες που φαίνονται στον πίνακα 1.1, σύμφωνα με τη μελέτη αιμοδυναμικών παραμέτρων, όπως η πίεση ενσφήνωσης πνευμονικών τριχοειδών (PWP), η αντίσταση των πνευμονικών αγγείων (PVR) και η καρδιακή παροχή (CO).

Ορισμοί πνευμονικής υπέρτασης σύμφωνα με αιμοδυναμικές παραμέτρους

Ορισμός	Χαρακτηριστικά	Ομάδα
Πνευμονική υπέρταση	PAP \geq 25mmHg	Όλες
Προ-τριχοειδική πνευμονική υπέρταση	PAP \geq 25mmHg PWP \leq 15mmHg CO φυσιολ. ή \uparrow	1.Πνευμονική αρτηριακή υπέρταση 3.Πνευμονική υπέρταση οφειλόμενη σε νόσο πνευμόνων 4.Θρομβοεμβολική πνευμονική υπέρταση 5.Πνευμονική υπέρταση ασαφούς μηχανισμού
Μετα-τριχοειδική πνευμονική υπέρταση	PAP \geq 25mmHg PWP $>$ 15mmHg CO φυσιολ. ή \downarrow	2.Πνευμονική υπέρταση οφειλόμενη σε νόσο αριστερών καρδιακών κοιλοτήτων

Πίνακας 1.1

PAP=pulmonary artery pressure (πίεση πνευμονικής αρτηρίας), CO=cardiac output (καρδιακή παροχή), PWP= pulmonary wedge pressure (πίεση ενσφήνωσης).

1.3 ΚΛΙΝΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗΣ ΥΠΕΡΤΑΣΗΣ

Η πνευμονική υπέρταση, με την πιο απλή έννοια, αναφέρεται σε οποιαδήποτε αύξηση της πνευμονικής αρτηριακής πίεσης πάνω από το φυσιολογικό επίπεδο. Η παρουσία της μπορεί να αντανακλά μία σοβαρή υποκείμενη πνευμονική αγγειακή νόσο ή μία επιβεβλημένη παθητική αύξηση της πνευμονικής αρτηριακής πίεσης ως απόκριση σε αυξημένες πιέσεις της αριστερής καρδιάς. Κατά συνέπεια, η ακριβής διάγνωση για την αιτία της πνευμονικής υπέρτασης σε κάποιον ασθενή είναι ουσιώδης για την εφαρμογή αποτελεσματικής θεραπευτικής αντιμετώπισης.

Πιο αναλυτικά, η αύξηση της πίεσης στην πνευμονική αρτηρία μπορεί να οφείλεται:

- Αυξημένη ροή του αίματος που διέρχεται από τις δεξιές κοιλότητες προς την πνευμονική κυκλοφορία (π.χ. συγγενείς καρδιοπάθειες με επικοινωνία καρδιακών κοιλοτήτων και ροή αίματος από αριστερά προς δεξιά).
- Αύξηση των πιέσεων στο φλεβικό σκέλος της πνευμονικής κυκλοφορίας από στάση του αίματος στον αριστερό κόλπο (π.χ. παθήσεις μιτροειδούς, καρδιακή ανεπάρκεια οποιασδήποτε αιτιολογίας).
- Αύξηση των αντιστάσεων των αγγείων της πνευμονικής κυκλοφορίας (π.χ. μικροεμβολές στα πνευμονικά αγγεία, χρόνιες παθήσεις των πνευμόνων).

Η πνευμονική υπέρταση, λοιπόν, περιλαμβάνει διάφορες μορφές, ποικίλης αιτιολογίας, αλλά με ίδια κλινική συμπτωματολογία. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) είχε ήδη αναπτύξει από το 1973 ένα σύστημα ταξινόμησης της πνευμονικής υπέρτασης στο οποίο καταγράφονται οι διάφορες κλινικές παθήσεις με σκοπό να αποτελέσει έναν οδηγό για την κλινική αξιολόγηση των ασθενών. Ακολούθησαν δύο ακόμη αναθεωρήσεις του συστήματος το 1998 και το 2003. Η πιο πρόσφατη κλινική ταξινόμηση όπως προέκυψε από τη σύνοδο του 4^{ου} Παγκόσμιου Συμποσίου για την Πνευμονική Υπέρταση το 2008 (Dana, California) φαίνεται στον πίνακα 1.2.

Η ομάδα 1 περιλαμβάνει την ιδιοπαθή, την κληρονομική ΠΑΥ και την ΠΑΥ που σχετίζεται με νοσήματα του συνδετικού ιστού, πυλαία υπέρταση, λοίμωξη από HIV, τοξίνες και φάρμακα, συγγενείς καρδιοπάθειες, σχιστοσωμίαση και χρόνιες αιμολυτικές αναιμίες. Τα παιδιά με συγγενείς καρδιοπάθειες μπορεί να αναπτύξουν ΠΥ ιδίως με διαφυγή αριστερά προς τα δεξιά, όπως συμβαίνει σε έλλειμμα μεσοκοιλιακού ή μεσοκοιλιακού διαφράγματος ή ανοιχτό αρτηριακό πόρο.

Η ομάδα 2 περιλαμβάνει ασθενείς με πνευμονική υπέρταση που οφείλεται σε αύξηση της πνευμονικής φλεβικής πίεσης εξαιτίας νόσου των αριστερών κοιλοτήτων ή βαλβίδων της καρδιάς. Έτσι, η θεραπεία της είναι η «κλασική» καρδιολογική αγωγή. Πρόκειται για τη συχνότερα απαντώμενη κατηγορία ΠΥ.

Η ομάδα 3 περιλαμβάνει νοσήματα του αναπνευστικού και αίτια υποξαιμίας που χαρακτηρίζονται από υπερτροφία των λείων μυϊκών ινών και πολλαπλασιασμό του ενδοθηλίου, καθώς και καταστροφή του αγγειακού δικτύου όπως συμβαίνει στο εμφύσημα και την ίνωση.

Η ομάδα 4 χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη οργανωμένων θρόμβων στις ελαστικές πνευμονικές αρτηρίες που μπορεί να αποφράσουν ή να προκαλούν στένωση του αυλού. Έως 50% των περιπτώσεων ανευρίσκονται σε άτομα χωρίς προηγούμενο ιστορικό πνευμονικής εμβολής ή εν τω βάθει θρομβοφλεβίτιδας.

Τέλος η ομάδα 5 περιλαμβάνει ετερογενή νοσήματα που μπορούν να προκαλέσουν πνευμονική υπέρταση με πολυπαραγοντικούς και συχνά ασαφείς μηχανισμούς.

Παράλληλα με την ταξινόμηση αυτή, έγινε αποσαφηνισμός μεταξύ των όρων Πνευμονική Υπέρταση (ΠΥ) και Πνευμονική Αρτηριακή Υπέρταση (ΠΑΥ). Στην Πνευμονική Αρτηριακή Υπέρταση περιλαμβάνονται οι κλινικές καταστάσεις αυξημένης προ-τριχοειδικής πνευμονικής υπέρτασης που δεν οφείλονται σε πνευμονοπάθειες, χρόνια θρομβοεμβολική νόσο των πνευμόνων ή άλλες σπάνιες ασθένειες και οι οποίες μοιράζονται πανομοιότυπες παθολογοανατομικές αλλοιώσεις στην πνευμονική μικροκυκλοφορία.

Η Πνευμονική Αρτηριακή Υπέρταση μπορεί να είναι πρωτοπαθής (ιδιοπαθής ή κληρονομική) και δευτεροπαθής (σχετιζόμενη με παθήσεις όπως πυλαία υπέρταση, συγγενείς καρδιοπάθειες, σκληρόδερμα, HIV λοίμωξη, σχιστοσωμίαση, χρόνια αιμολυτική αναιμία). Η φλεβοαποφρακτική νόσος των πνευμόνων και η αιμαγγειωμάτωση των πνευμονικών τριχοειδών μοιράζονται κάποια κοινά χαρακτηριστικά με την ιδιοπαθή πνευμονική αρτηριακή υπέρταση, αλλά και διαφορές, γεγονός που τις καθιστά ξεχωριστή υποκατηγορία.

Συνδυασμός επιδημιολογικών δεδομένων από διάφορες καταγραφές συνηγορούν για επιπολασμό 15 περιπτώσεων ανά εκατομμύριο πληθυσμού για την ΠΑΥ, και 5.9 περιπτώσεων ανά εκατομμύριο για την ιδιοπαθή ΠΑΥ (ΙΠΑΥ), ενώ η ετήσια επίπτωση στους ενήλικους είναι τουλάχιστον 2.4 περιστατικά ανά εκατομμύριο πληθυσμού. Η έναρξη της νόσου γίνεται συνήθως μεταξύ 20 και 40 ετών.

Στην ΠΑΥ η σχέση γυναικών-ανδρών είναι 1.7:1 και οι περισσότερες περιπτώσεις εμφανίζονται σποραδικά. Κληρονομική προδιάθεση έχει αναφερθεί σε ποσοστό 6-10% και οφείλεται κυρίως σε μετάλλαξη του γονιδίου που αφορά τον υποδοχέα τύπου 2 της μορφογενετικής πρωτεΐνης των οστών (BMPR-II) που ταυτοποιήθηκε το 2000. Άλλες μεταλλάξεις που σχετίζονται με ΠΑΥ αφορούν τα γονίδια του υποδοχέα τύπου I της προσομοιάζουσας με ακτιβίνη κινάσης (ALK-1) και της ενδογλίνης.

ΚΛΙΝΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗΣ ΥΠΕΡΤΑΣΗΣ (Dana Point, 2008)

1. Πνευμονική αρτηριακή υπέρταση

- Ιδιοπαθής
- Κληρονομική (μεταλλάξεις στα γονίδια των BMPR-II, ALK1, endoglin)
- Φάρμακα και τοξίνες
- Σχετιζόμενη με:
 - Νόσους του συνδετικού ιστού
 - HIV λοίμωξη
 - Πυλαία υπέρταση
 - Συγγενείς καρδιοπάθειες
 - Σχιστοσωμίαση
 - Χρόνια αιμολυτική αναιμία
- Επίμονη πνευμονική υπέρταση του νεογνού

1. Φλεβοαποφρακτική νόσος και/ή αιμαγγειώματωση πνευμονικών τριχοειδών

2. Πνευμονική υπέρταση οφειλόμενη σε νόσο αριστερής καρδιάς (συστολική δυσλειτουργία, αριστερή δυσλειτουργία, βαλβιδοπάθεια)

3. Πνευμονική υπέρταση οφειλόμενη σε νόσο των πνευμόνων και/ή υποξία

- Χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια
- Σύνδρομο άπνοιας ύπνου
- Διαταραχές υποαερισμού κυψελίδων
- Χρόνια έκθεση σε μεγάλο υψόμετρο
- Δυσπλασία κυψελιδικών τριχοειδών

4. Χρόνια θρομβοεμβολική πνευμονική υπέρταση
5. Πνευμονική υπέρταση με ασαφείς και/ή πολυπαραγοντικούς μηχανισμούς

- Αιματολογικές διαταραχές: μυελοϋεργπλαστικά, σπληνεκτομή
- Συστηματικές διαταραχές: σαρκοείδωση, ιστιοκύττωση Χ, λεμφαγγειώματωση
- Μτεαβολικές διαταραχές: γλυκογονώσεις, νόσος Gaucher, θυρεοειδοπάθεια
- Άλλα: απόφραξη από όγκους, ινώδης μεσοθωρακίτιδα, λεμφαδενοπάθεια

Πίνακας 1.2

1.4 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗΣ ΑΡΤΗΡΙΑΚΗΣ ΥΠΕΡΤΑΣΗΣ

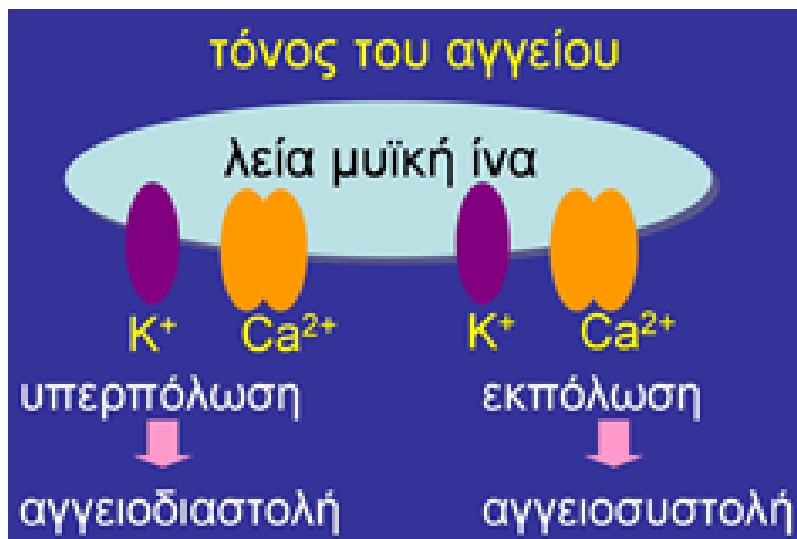
Η Πνευμονική Αρτηριακή Υπέρταση είναι μια σύνθετη πολυπαραγοντική πάθηση, στην παθογένεια της οποίας ενέχονται πολυάριθμες βιοχημικές οδοί και τύποι κυττάρων με κύρια χαρακτηριστικά τη δυσλειτουργία του πνευμονικού ενδοθηλίου και την παθολογική ανταπόκριση της λείας μυϊκής ίνας. Η αγγειοσύσπαση, η αναδιαμόρφωση του αγγειακού τοιχώματος του πνευμονικού αρτηριακού δικτύου και η θρόμβωση (Εικόνα 1.1) συμβάλλουν στην αύξηση των πνευμονικών αγγειακών αντιστάσεων με αποτέλεσμα την πρόκληση πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης. Πιο συγκεκριμένα, η αύξηση των πνευμονικών αγγειακών αντιστάσεων οδηγεί σε υπερφόρτιση πίεσης, υπερτροφία και διάταση της δεξιάς κοιλίας, με τελικό αποτέλεσμα την ανεπάρκεια αυτής και το θάνατο.

Η αγγειοσύσπαση των πνευμονικών αγγείων ως έκφραση της παθολογικής ανταπόκρισης των λείων μυϊκών ινών, αποτελεί ένα από τα πρωϊμότερα χαρακτηριστικά της ΠΑΥ. Η υπερβολική αγγειοσύσπαση σχετίζεται με ανώμαλη έκφραση των διαύλων καλίου στα λεία μυϊκά κύτταρα και με δυσλειτουργία του ενδοθηλίου. Πρώτον, η μειωμένη έκφραση των διαύλων καλίου έχει ως επακόλουθο την αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου και την προαγωγή αγγειοσύσπασης και πολλαπλασιασμού των λείων μυϊκών κυττάρων. Η δυσλειτουργία των διαύλων καλίου σχετίζεται επίσης και με μειωμένη απόπτωση των λείων μυϊκών κυττάρων των πνευμονικών αρτηριών, μία κατάσταση που συμβάλει ακόμη περισσότερο στην υπερτροφία και αγγειακή αναδιαμόρφωση [19](Εικόνα 1.1). Σε τελική ανάλυση οι διάυλοι καλίου ρυθμίζουν τον τόνο του

πνευμονικού αγγειακού δικτύου και συνιστούν πιθανό μελλοντικό θεραπευτικό στόχο.

Δεύτερον, η χρόνια δυσλειτουργία του ενδοθηλίου οδηγεί σε ελαττωματική παραγωγή αγγειοδιασταλτικών παραγόντων όπως είναι το μονοξείδιο του αζώτου (NO) και η προστακυκλίνη, καθώς επίσης και σε υπερέκφραση ουσιών με ιδιότητες αγγειοσυσπασσης και πολλαπλασιασμού (θρομβοξάνη A_2 και ενδοθηλίνη-1). Η διαταραχή στην ισορροπία έκκρισης αγγειοδιασταλτικών και αγγειοσυσταλτικών παραγόντων προκαλεί αύξηση του τόνου του αγγειακού τοιχώματος και προάγει την αναδιαμόρφωση των πνευμονικών αγγείων (vascular remodelling). Η διεργασία της αγγειακής αναδιαμόρφωσης περιλαμβάνει όλες τις στιβάδες του αγγειακού τοιχώματος και περιπλέκεται από την κυτταρική ετερογένεια μεταξύ των στιβάδων, αφού σχεδόν όλοι οι τύποι κυττάρων (ενδοθηλιακά κύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα, ινοβλάστες, μακροφάγα και αιμοπετάλια) παίζουν σημαντικό ρόλο. Παρατηρείται πολλαπλασιασμός των ενδοθηλιακών κυττάρων, των λείων μυϊκών ινών και των ινοβλαστών που καταλήγουν στην προοδευτική απόφραξη των μικρών πνευμονικών αρτηριών και τη δημιουργία των αποκαλούμενων πλεξοειδών βλαβών (plexiform lesions). Οι τελευταίες δημιουργούνται από εστιακό πολλαπλασιασμό ενδοθηλιακών κυττάρων και λείων μυϊκών ινών, με συσσώρευση μακροφάγων και πρόδρομων ενδοθηλιακών κυττάρων. Συμπερασματικά, τα παραπάνω ευρήματα υποδηλώνουν τη διαταραχή των τοπικών ομοιοστατικών μηχανισμών και της ισορροπίας μεταξύ αγγειοδιασταλτικών και αγγειοσυσπαστικών ουσιών, καθώς επίσης και τη διαταραχή στην έκλυση παραγόντων (TGF- β s, PDGFs) και κυταροκινών (IL-1, IL-6) που προάγουν την ίνωση και διαμεσολαβητών που δρουν υπέρ της

θρόμβωσης. Τα γεγονότα αυτά αποτελούν συνέπεια της δυσλειτουργίας και του τραυματισμού του πνευμονικού ενδοθηλίου. Αιτία δυσλειτουργίας και τραυματισμού μπορεί να αποτελούν η υποξία, διάφορες τοξίνες, η αυξημένη αιματική ροή (shear stress) και η φλεγμονή.



Εικόνα 1.1 Διαταραχή των διαύλων καλίου οδηγεί σε διαταραχή της ισορροπίας του τόνου των λείων μυϊκών κυττάρων των αγγείων.

1.4.1 ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗ ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ

Η διαρκώς αυξανόμενη επίγνωση του σημαντικού ρόλου των ενδοθηλιακών κυττάρων στη δημιουργία της πνευμονικής υπέρτασης έχει οδηγήσει στην αναζήτηση των ερεθισμάτων που ελέγχουν τον φαινότυπο και τη λειτουργία τους. Το πνευμονικό ενδοθήλιο παράγει και αποκαθαίρει από την κυκλοφορία

αγγειοδραστικές ουσίες (αγγειοσπαστικές και αγγειοδιασταλτικές), η εξισορροπούμενη δράση των οποίων, διατηρεί φυσιολογική την ομοιοστασία τόσο στην πνευμονική, όσο και στη συστηματική κυκλοφορία.

Κύριες αγγειοσπαστικές ουσίες είναι η θρομβοξάνη και η ενδοθηλίνη-1 (ET-1). Η ET-1 δρα μέσω δύο υποδοχέων, των ET_A και ET_B. Οι υποδοχείς ET_A βρίσκονται κυρίως στις λείες μυϊκές ίνες και επάγουν την αγγειοσύσπαση. Οι υποδοχείς ET_B βρίσκονται κυρίως στο ίδιο το ενδοθηλιακό κύτταρο και κατά μείζονα λόγο επάγουν την παροδική αγγειοδιαστολή, ενώ είναι υπεύθυνοι και για την κάθαρση της κυκλοφορούσας ET-1 από την πνευμονική κυκλοφορία. Η ET-1, πέραν της αγγειοσύσπασης, προκαλεί υπερτροφία των συστατικών του αγγειακού τοιχώματος και επάγει την ίνωση και τη φλεγμονή.

Επιπλέον, μεταξύ άλλων παράγει τις αγγειοδιασταλτικές ουσίες προστακυκλίνη (PGI₂) και μονοξείδιο του αζώτου (NO) που έχουν επίσης αντιαιμοπεταλιακή και αντιυπερπλαστική δράση. Φαίνεται ότι το ενδοθήλιο των πνευμονικών αρτηριών εκφράζει περισσότερη ενδοθηλιακή συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (eNOS) και κατά συνέπεια περισσότερο NO από το ενδοθήλιο των τριχοειδών, γεγονός που αντανακλά τη σπουδαιότητα του NO στη διατήρηση χαμηλού αγγειακού τόνου. Έχει αποδειχτεί ότι η μειωμένη παραγωγή eNOS αυξάνει την αντιδραστικότητα του αγγειακού δικτύου και τον κίνδυνο για ανάπτυξη πνευμονικής υπέρτασης, ενώ αντίθετα η υπερέκφραση της eNOS προστατεύει από την ανάπτυξη πνευμονικής υπέρτασης. Μία άλλη πολύ σημαντική μεταβολική αλλοίωση του πνευμονικού ενδοθηλίου στην πνευμονική υπέρταση είναι η μείωση των επιπέδων της συνθάσης της προστακυκλίνης με συνοδό μείωση της τελευταίας, και αυξημένη σύνθεση

θρομβοξάνης A2. Η πτώση των επιπέδων του NO και της PGI2 και η αύξηση της θρομβοξάνης και της ET-1 προάγουν την αγγειοσυσπασση και τον πολλαπλασιασμό λείων μυϊκών κυττάρων και ινοβλαστών από τον μέσο και έξω χιτώνα των αγγείων αντίστοιχα. Το γεγονός αυτό υποβοηθάται από την κατάργηση του φραγμού των ενδοθηλιακών κυττάρων που επιτρέπει την πρόσβαση των διαφόρων παραγόντων ανάπτυξης από την κυκλοφορία στο τοίχωμα του αγγείου.

1.4.2 ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΗ ΒΛΑΒΗ

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα των πνευμονικών αρτηριών και των μικρότερων κλάδων της πνευμονικής κυκλοφορίας διαθέτουν διαφορετικές ιδιότητες για τη δημιουργία φραγμού, σε σχέση με τα αντίστοιχα κύτταρα της συστηματικής κυκλοφορίας, οι οποίες εξαρτώνται κυρίως από τη μοριακή τους ανατομία και τις πρωτεΐνες σύνδεσης που διαθέτουν. Πιο αναλυτικά, τα ενδοθηλιακά κύτταρα των πνευμονικών αρτηριών έρχονται σε επαφή με μεικτό φλεβικό αίμα και υπέρκεινται μιας πεπαχυσμένης βασικής μεμβράνης που τα συνδέει με διάφορα κύτταρα του μέσου χιτώνα. Αντίθετα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών αγγείων της συστηματικής κυκλοφορίας έρχονται σε επαφή με τα αέρια του αρτηριακού αίματος και υπέρκεινται ενός πολύ λεπτού πρωτεϊνικού στρώματος που συνδέεται με τα πνευμονοκύτταρα τύπου I. Μελέτες δείχνουν ότι, σε ασθενείς με πνευμονική υπέρταση, το χημικό μικροπεριβάλλον μπορεί να αυξήσει τη διαπερατότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων των πνευμονικών αρτηριών χωρίς ταυτόχρονη αύξηση της διαπερατότητας των τριχοειδικών ενδοθηλιακών κυττάρων με αποτέλεσμα να μην προκύπτει διάμεσο και κυψελιδικό οίδημα.

Στην πνευμονική υπέρταση, λοιπόν, παρατηρείται αυξημένη ροή υγρού κατά μήκος του ενδοθηλίου χωρίς τη συνοδό ανάπτυξη παρεγχυματικού ή κυψελιδικού οιδήματος. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στη διαφορετική συμπεριφορά των ενδοθηλιακών κυττάρων των πνευμονικών αρτηριών και τριχοειδών ως προς τα κυκλοφορούντα μόρια της φλεγμονής και τους αυξητικούς παράγοντες. Πιο αναλυτικά, τα ενδοθηλιακά κύτταρα χάνουν την ιδιότητα του φραγμού και κατά συνέπεια εκθέτουν τα υποκείμενα κύτταρα του τοιχώματος των αγγείων σε μιτογόνες ουσίες της κυκλοφορίας, όπως αυξητικούς παράγοντες. Επίσης, υπό φυσιολογικές συνθήκες, το πνευμονικό ενδοθήλιο επάγει τη ρευστότητα του αίματος, ενώ υπό συνθήκες ενεργοποίησης ή βλάβης επάγει τη δημιουργία προθρομβωτικού μικροπεριβάλλοντος.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, στη σοβαρή πνευμονική υπέρταση, η βασική παθολογοανατομική βλάβη που ανιχνεύεται στα περιφερικά πνευμονικά αγγεία είναι μία αποφρακτικού και αγγειοϋπερπλαστικού τύπου αλλοίωση, η «πλεξοειδής βλάβη». Η αλλοίωση αυτή διαπιστώνεται σε προτριχοειδικά αρτηρίδια διαμέτρου <50μm και μπορεί να επεκταθεί και σε μεγαλύτερου μεγέθους αρτηρίδια. Τα κύτταρα στις βλάβες αυτές πιστεύεται ότι είναι κυρίως ενδοθηλιακής προέλευσης. Παρόλα αυτά έχουν χάσει την ιδιότητα να διατάσσονται σε ένα μονό στρώμα, διαταράσσοντας με τον τρόπο αυτό τη βατότητα του αγγείου και έχουν χαρακτηριστικά κυττάρων ανθεκτικών στην απόπτωση. Επιπλέον, τυπικά και υπό κανονικές συνθήκες, αγγεία αυτού του μεγέθους διαθέτουν φτωχό μυϊκό χιτώνα, αλλά στην πνευμονική υπέρταση αποκτούν όλο και περισσότερα μυϊκά κύτταρα.

1.5 ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗΣ ΑΡΤΗΡΙΑΚΗΣ ΥΠΕΡΤΑΣΗΣ

Στον φυσιολογικό πνεύμονα οι μικρές πνευμονικές αρτηρίες που συνοδεύουν τα περιφερικά αναπνευστικά βρογχιόλια είναι μυϊκού τύπου και έχουν διάμετρο μεταξύ 500μm και 200μm. Το τοίχωμα τους αποτελείται από έξω προς τα μέσα από: τον έξω χιτώνα, το έξω ελαστικό πέταλο, το μυϊκό χιτώνα, το έσω ελαστικό πέταλο και τον έσω χιτώνα. Το πάχος του μυϊκού χιτώνα είναι μικρότερο από το αντίστοιχο των αρτηριών της συστηματικής κυκλοφορίας. Συνέχεια των μικρών αυτών πνευμονικών αρτηριών αποτελούν τα πνευμονικά αρτηριόλια, τα οποία έχουν διάμετρο μικρότερη από 200μm. Από το μέγεθος αυτό και κάτω, αρχίζει η προοδευτική μείωση του μεγέθους και η αποδιοργάνωση της δομής του μυϊκού χιτώνα μέχρις πλήρους εξαφάνισής του σε αγγεία με διάμετρο μικρότερη από 70-50 μm. Οι αρτηρίες, λοιπόν, του πνευμονικού αρτηριακού δικτύου διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με το βαθμό μυϊκού στοιχείου του τοιχώματός τους: αρτηρίες με πλήρη μυϊκό χιτώνα, αρτηρίες με μερικώς ανεπτυγμένο μυϊκό χιτώνα και αρτηρίες δίχως μυϊκό χιτώνα (here-muscular, partially muscular, non-muscular arteries). Το ενδοθήλιο των πνευμονικών αρτηριολίων στηρίζεται στην βασική μεμβράνη και περιβάλλεται από το έσω ελαστικό πέταλο. Περικύτταρα και διάμεσα κύτταρα ανευρίσκονται μεταξύ ενδοθηλίου και έσω ελαστικού πετάλου. Τα διάμεσα κύτταρα πιθανόν αποτελούν ενδιάμεσο εξελικτικό στάδιο μεταξύ περικυττάρου και λείου μυϊκού κυττάρου.

Τα βασικά ιστοπαθολογικά ευρήματα της πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης περιλαμβάνουν:

1. την υπερτροφία του μέσου χιτώνα

2. την υπερπλασία και ίνωση του έσω χιτώνα (ενδοθήλιο)
3. την εμφάνιση μίας νέας στοιβάδας (neointima)
4. την παρουσία της πλεξοειδούς βλάβης (plexiform lesion)
5. την πάχυνση του έξω χιτώνα
6. in situ μικροθρομβώσεις

Οι παραπάνω αλλοιώσεις αφορούν τις μικρές πνευμονικές αρτηρίες διαμέτρου <500μm. Το πιο πρώιμο αποδεικτικό στοιχείο ΠΑΥ αποτελεί η πάχυνση του μέσου χιτώνα των μικρών πνευμονικών αρτηριών και η παρουσία μέσου μυϊκού χιτώνα στα πνευμονικά αρτηριόλια (<50μm), τα οποία φυσιολογικά στερούνται αυτού. Σε ήπια υπερτροφία ο μέσος όρος πάχυνσης του μέσου χιτώνα των μικρών πνευμονικών αρτηριών κυμαίνεται μεταξύ 3% και 7%. Σε μέτριου βαθμού υπερτροφία μεταξύ 10% και 15% και σε σοβαρού βαθμού υπερβαίνει το 15%. Πιο αναλυτικά, η υπερτροφία του μέσου χιτώνα έπεται της υπερτροφίας των λείων μυϊκών ινών αυτού, οδηγώντας σε προοδευτική μείωση του αυλού των αγγείων. Ακόμη, διάμεσα κύτταρα του έσω χιτώνα διαφοροποιούνται σε λεία μυϊκά κύτταρα κάτω από την επίδραση διαφόρων παραγόντων, όπως ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων (platelet derived growth factor) και ο μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας-β (TGF-β) με αποτέλεσμα την εμφάνιση μυϊκού στοιχείου σε πνευμονικά αρτηριόλια (<50μm), τα οποία φυσιολογικά στερούνται αυτού. Η πάχυνση του έξω χιτώνα οφείλεται σε φλεγμονώδεις διηθήσεις, πολλαπλασιασμό ινοβλαστών και εναπόθεση κολλαγόνου. Η τελευταία προκαλεί δυσκαμψία στο τοίχωμα του αγγείου.

Η πάχυνση του έσω χιτώνα έπεται του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων και της ίνωσης αυτού (νέκρωση του ινοκολλαγόνωδους στηρικτικού ιστού

που βρίσκεται κάτω από τη βασική μεμβράνη πάνω στην οποία επικάθονται τα ενδοθηλιακά κύτταρα). Επιπλέον, παρατηρείται μία νέα στοιβάδα μεταξύ του έσω ελαστικού πετάλου και του ενδοθηλίου η οποία σχηματίζεται από τη μετανάστευση των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων του μέσου και του έξω χιτώνα υποενδοθηλιακά. Η στοιβάδα αυτή αναφέρεται ως **neointima** και αποτελεί χαρακτηριστικό εύρημα της πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης.

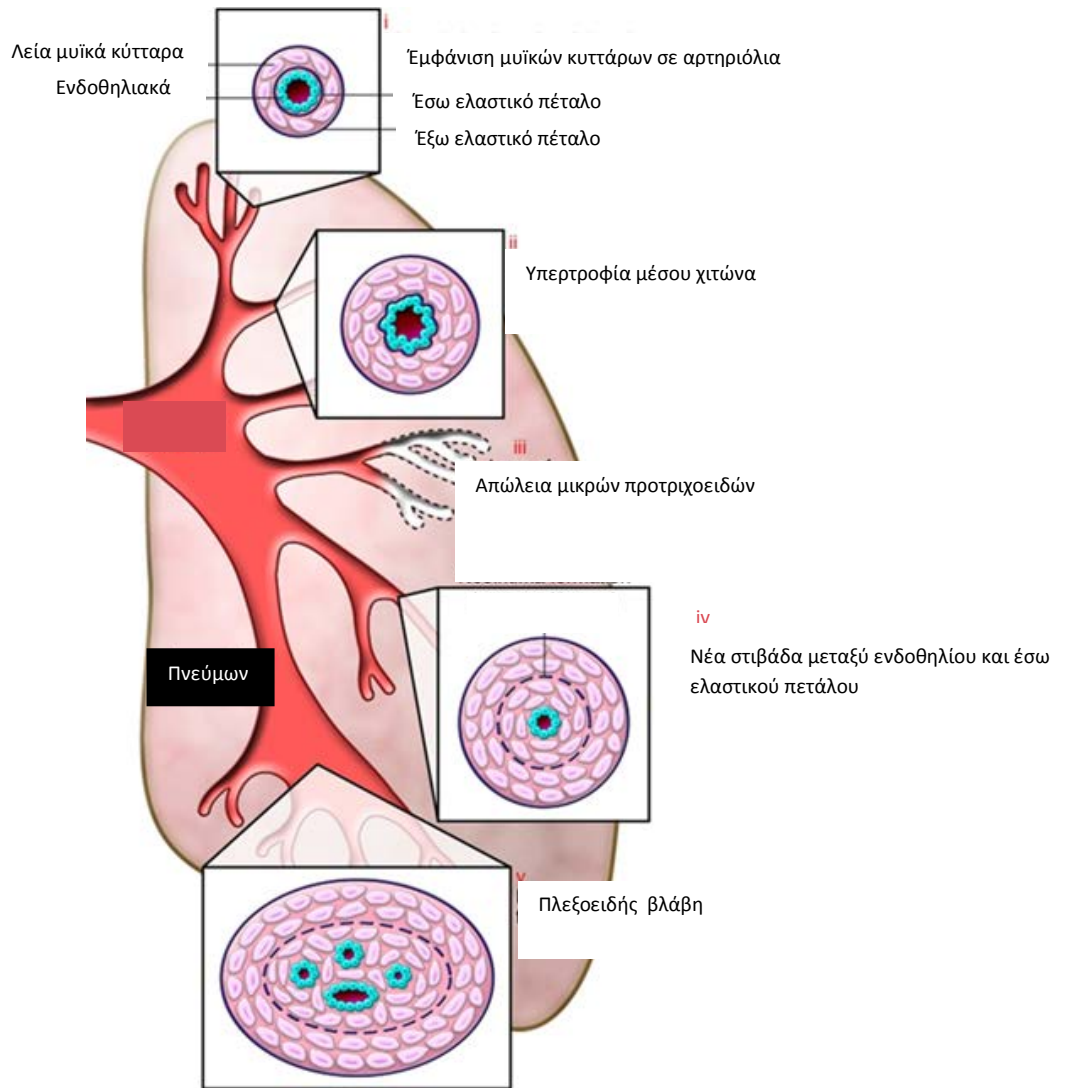
Το κύριο παθολογανατομικό εύρημα της ΠΑΥ αποτελεί η «**πλεξοειδής βλάβη**» (**plexiform lesion**). Η αλλοίωση αυτή διαπιστώνεται σε προτριχοειδικά αρτηριόλια διαμέτρου <50μm και μπορεί να επεκταθεί και σε μεγαλύτερου μεγέθους αρτηρίδια και θεωρείται αποτέλεσμα του αποδιοργανωμένου πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων). Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα στις βλάβες αυτές πιστεύεται ότι είναι κυρίως ενδοθηλιακής προέλευσης. Παρόλα αυτά έχουν χάσει την ιδιότητα να διατάσσονται σε ένα μονό στρώμα, διαταράσσοντας με τον τρόπο αυτό τη βατότητα του αγγείου και έχουν χαρακτηρίσει κυττάρων ανθεκτικών στην απόπτωση. Σημαντικό ρόλο στη δημιουργία των plexiform lesions φαίνεται να παίζει και η αύξηση της ενδοαγγειακής πίεσης, η οποία δημιουργεί μικρές ρήξεις στο ενδοθήλιο προκαλώντας κενά μέσα από τα οποία διέρχεται το αίμα και προκαλεί διάταση και σακκοειδή μικροανευρύσματα. Τα τελευταία αποτελούν υπόστρωμα για την συσσώρευση μυοϊνοβλαστών, παραγωγή ινικής και τη δημιουργία μικροθρομβώσεων.

Επιπλέον σημαντικός θεωρείται ο ρόλος των φλεγμονωδών κυττάρων και των αιμοπεταλίων. Τα πνευμονικά αρτηριόλια παρουσιάζουν διηθήσεις από φλεγμονώδη κύτταρα και αυξημένη έκφραση κυτταροκινών (π.χ. ιντερλευκίνη-1,

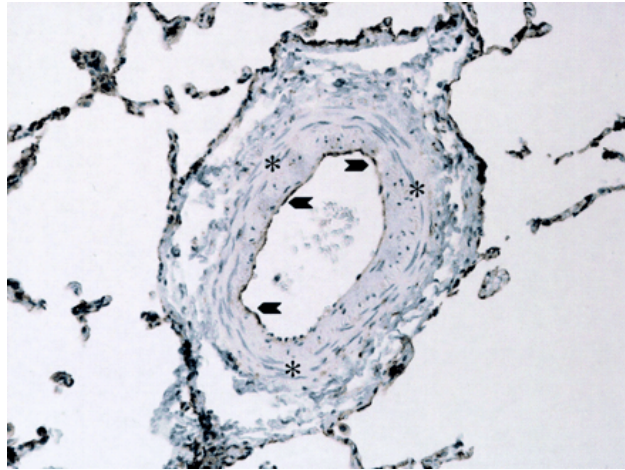
ιντερλευκίνη-6). Οι λειτουργικές και δομικές ανωμαλίες των πνευμονικών αγγείων έχουν σαν αποτέλεσμα την έκκριση από τα αιμοπετάλια θρομβωτικών, αγγειοδραστικών και μιτογενετικών παραγόντων (π.χ. PDGF, σεροτονίνη). Συνέπεια της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων είναι η παρουσία θρόμβων στην πνευμονική μικροκυκλοφορία.

Εντέλει, η πάχυνση του τοιχώματος των μικρών πνευμονικών αρτηριών και η δημιουργία των πλεγματοειδών βλαβών οδηγούν στη βαθμιαία στένωση-απόφραξη του αυλού των αγγείων και την αύξηση των πνευμονικών αντιστάσεων (Εικόνα 1.2).

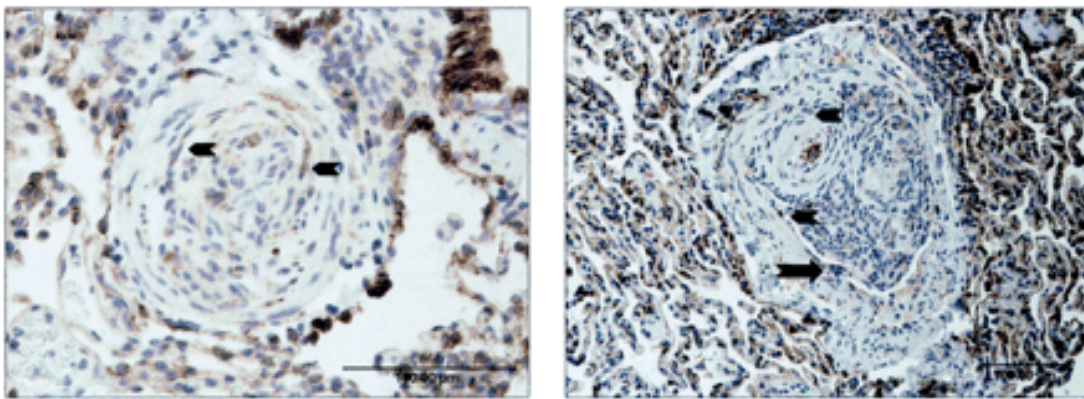
Αλλαγές σε μεγαλύτερου μεγέθους πνευμονικές αρτηρίες εμφανίζονται δευτεροπαθώς λόγω της πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης και περιλαμβάνουν διάταση και υπερτροφία. Οι πνευμονικές φλέβες δεν επηρεάζονται.



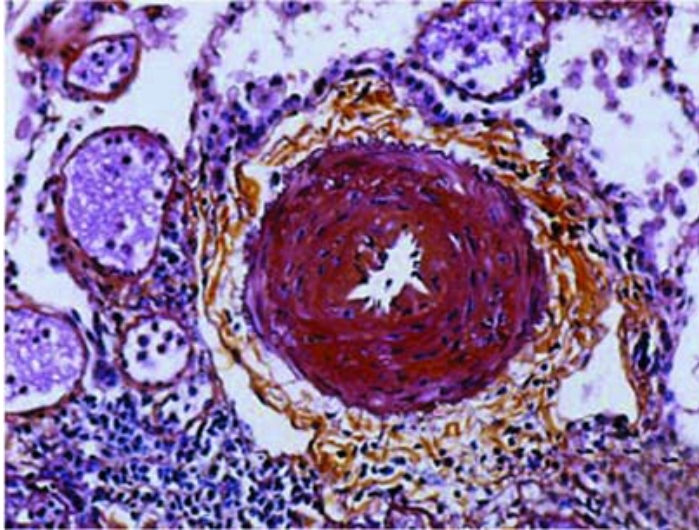
Εικόνα 1.2 Παθολογοανατομικά ευρήματα ΠΑΥ: i) εμφάνιση μυϊκών κυττάρων σε αρτηριόλια, ii) υπερτροφία μέσου χιτώνα, iii) απώλεια μικρών προτριχοειδικών αρτηριολίων, iv) σχηματισμός μίας νέας στιβάδας μεταξύ έσω ελαστικού πετάλου και ενδοθηλίου από μετανάστευση κυττάρων του μέσου χιτώνα υποενδοθηλιακά (neointima), v) σχηματισμός πλεξοειδών βλαβών (plexiform lesion).



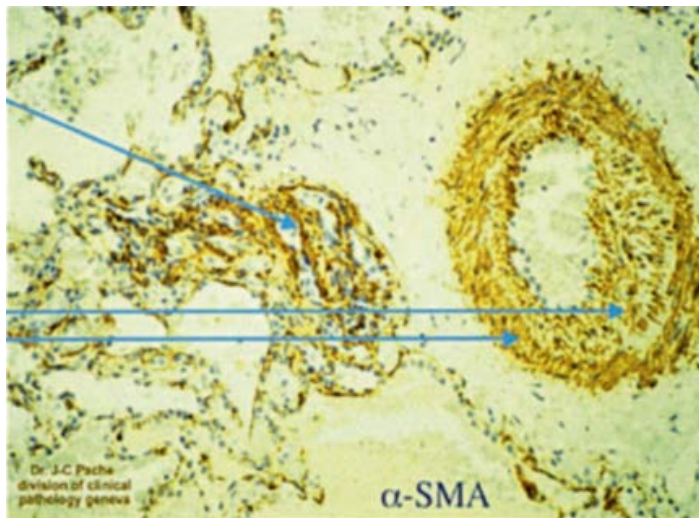
Εικόνα 1.3 Ιστολογικό παρασκεύασμα ενός πνευμονικού αρτηριολίου μεσαίου μεγέθους από ασθενή με πνευμονική υπέρταση. Τα βέλη δείχνουν το ενδοθήλιο και οι αστερίσκοι τον υπερτροφικό μέσο χιτώνα (*Chest 2005;128:558S-564S*).



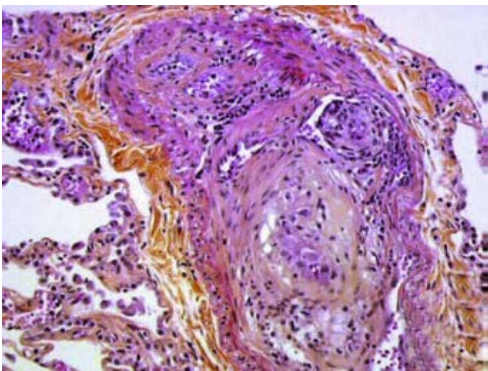
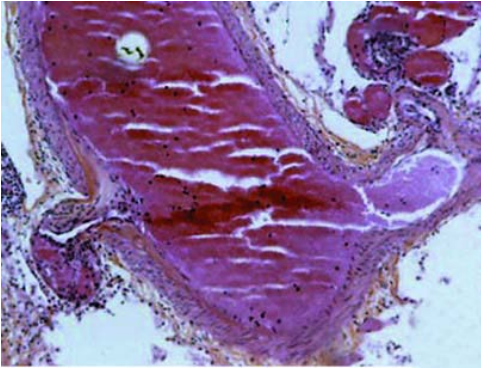
Εικόνα 1.4 Ιστολογικά παρασκευάσματα πλεξοειδών βλαβών που αποφράσσουν πλήρως τον αυλό αγγείων από ασθενείς με βαριά ΠΑΥ. Το μεγάλο βέλος δεξιά αναδεικνύει ένα σημείο στο τοίχωμα του αγγείου όπου τα ενδοθηλιακά κύτταρα φαίνεται να έχουν χάσει την επαφή με αυτό και αναπτύσσονται εντός του αυλού (*Chest 2005; 128:558S-564S*).



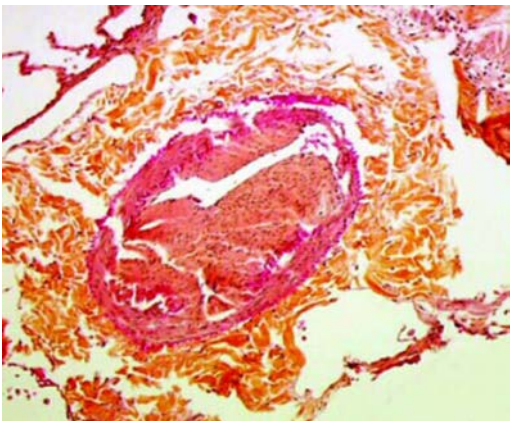
Εικόνα 1.5 Υπερτροφία μέσου και έσω χιτώννα



Εικόνα 1.6 Plexiform lesion (αριστερό βέλος), Neointima (δεξιά βέλη)



Εικόνες 1.5, 1.6 Πλεξοειδείς βλάβες (plexiform lesions)



Εικόνα 1.7 Θρομβωτική αρτηριοπάθεια

1.6 ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΚΑΙ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗΣ ΑΡΤΗΡΙΑΚΗΣ ΥΠΕΡΤΑΣΗΣ

Η πνευμονική αρτηριακή υπέρταση είναι μία σπάνια νόσος με φτωχή πρόγνωση, καθώς αν δεν διαγνωσθεί και αντιμετωπιστεί έγκαιρα, η μέση επιβίωση είναι μόλις 2,8 έτη για την ιδιοπαθή ΠΑΥ. Οι σημαντικότεροι παράγοντες που συντελούν στη γρήγορη και μη αναστρέψιμη πορεία της νόσου είναι η ταχεία εξέλιξη και κυρίως η καθυστερημένη διάγνωση της νόσου, η οποία γίνεται συνήθως 2-5 έτη μετά την έναρξη των συμπτωμάτων της νόσου. Η καθυστέρηση αυτή οφείλεται κατά κύριο λόγο στην μη ειδική φύση των συμπτωμάτων της νόσου, όπως η δύσπνοια και η κόπωση τα οποία είναι κοινά σε πολλές παθήσεις του καρδιοαναπνευστικού συστήματος. Επιπλέον, λόγω της σπανιότητας της ΠΑΥ στο γενικό πληθυσμό δεν περιλαμβάνεται στη αρχική διαγνωστική προσέγγιση του ιατρού, με αποτέλεσμα επιπλέον καθυστέρηση στη διάγνωση της νόσου. Έτσι είναι συνηθισμένο φαινόμενο στους ασθενείς αυτούς να τίθεται η λανθασμένη διάγνωση της καρδιακής ανεπάρκειας ή της αποφρακτικής πνευμονοπάθειας.

Από τα παραπάνω γίνεται κατανοητή η σημασία και η ανάγκη της έγκαιρης διάγνωσης της ΠΑΥ ιδιαίτερα στις ομάδες ατόμων υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση της νόσου, όπως οι ασθενείς που πάσχουν από σκληρόδερμα, πυλαία υπέρταση, συγγενή καρδιοπάθεια με επικοινωνία μεταξύ συστηματικής και πνευμονικής κυκλοφορίας ή αυτοί που φέρουν κάποια γενετική μετάλλαξη που σχετίζεται με ΠΑΥ ή έχουν συγγενή πρώτου βαθμού που έχει ΙΠΑΥ. Από τη στιγμή που ο κλινικός ιατρός εγείρει την υποψία της ΠΑΥ οφείλει να ακολουθήσει μία συγκεκριμένη σειρά διαγνωστικών εξετάσεων και δοκιμασιών που αποσκοπούν

στην επιβεβαίωση της διάγνωσης, στη διερεύνηση της αιτιολογίας της νόσου και στον καθορισμό της βαρύτητάς της.

1.6.1 ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΣΗΜΕΙΑ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗΣ ΑΡΤΗΡΙΑΚΗΣ ΥΠΕΡΤΑΣΗΣ

Δεν υπάρχουν παθογνωμονικές κλινικές εκδηλώσεις της πνευμονικής υπέρτασης. Πρόκειται για μία νόσο με ύπουλη πορεία και εξέλιξη, τα συμπτώματα της οποίας είναι συνήθως μη ειδικά και περιλαμβάνουν δύσπνοια, κόπωση, αδυναμία στηθάγχη, συγκοπή, κοιλιακή διάταση. Η νόσος εκδηλώνεται συνήθως με δύσπνοια κατά την άσκηση. Η δύσπνοια προσπαθείας είναι συνήθως προοδευτική και διαφεύγει της προσοχής του ασθενούς για καιρό, γεγονός που εξηγεί τη συνήθη καθυστέρηση στη διάγνωση και θεραπευτική αντιμετώπιση (περίπου δύο χρόνια από την εμφάνιση των πρώτων συμπτωμάτων). Η εύκολη κόπωση και αδυναμία είναι το δεύτερο πιο συχνό σύμπτωμα. Η στηθάγχη αποτελεί επίσης ένα κοινό σύμπτωμα, το οποίο οφείλεται σε μειωμένη στεφανιαία ροή λόγω υπερτροφίας της δεξιάς κοιλίας και συναντάται σε πιο προχωρημένα στάδια της νόσου. Με την εξέλιξη της νόσου αυξάνεται ο τελοδιαστολικός όγκος, μειώνεται το κλάσμα εξώθησης της δεξιάς κοιλίας και σταθεροποιείται η καρδιακή παροχή. Καθώς η καρδιακή παροχή σταθεροποιείται, οι ασθενείς μπορεί να έχουν προσυγκοπτικά ή συγκοπτικά επεισόδια, ιδίως κατά την άσκηση. Η συγκοπή αποτελεί σύνηθες σύμπτωμα της πνευμονικής υπέρτασης. Η αιμόπτυση είναι σχετικά ασυνήθιστη και μπορεί να σχετίζεται με υποκείμενη θρομβοεμβολή και πνευμονικό έμφρακτο. Σπάνια, το αριστερό λαρυγγικό νεύρο παραλύει εξαιτίας της συμπίεσης από μία διατεταμένη αριστερή πνευμονική αρτηρία (σύνδρομο Ortner). Συμπτώματα εμφανίζονται στην ηρεμία, σε πιο προχωρημένα στάδια της νόσου.

Τα κλινικά σημεία περιλαμβάνουν μία αριστερή παραστερνική ώση, ένα ολοσυστολικό φύσημα ανεπάρκειας της τριγλώχινας, ένα διαστολικό φύσημα ανεπάρκειας της πνευμονικής σπινίτιδας, ένα έντονο πνευμονικό στοιχείο του δεύτερου καρδιακού τόνου (S₂) , έναν τρίτο καρδιακό τόνο (S₃) προερχόμενο από την δεξιά κοιλία. Σημεία δεξιάς καρδιακής ανεπάρκειας ανευρίσκονται σε πιο προχωρημένα στάδια και περιλαμβάνουν διόγκωση σφαγίτιδων, ηπατομεγαλία, ασκίτη, περιφερικό οίδημα. Η κυάνωση αποτελεί όψιμο εύρημα και συνήθως αποδίδεται σε χαμηλή καρδιακή παροχή με συστηματική αγγειοσύσπαση και διαταραχή αερισμού-αιμάτωσης. Η ακρόαση των πνευμόνων είναι συνήθως φυσιολογική και δεν είναι ανάλογη με τη βαρύτητα της δύσπνοιας.

Τέλος, θα πρέπει να αναζητούνται και σημεία πιθανής συνυπάρχουσας νόσου η οποία προκαλεί δευτεροπαθή πνευμονική υπέρταση. Για παράδειγμα, ασθενείς με σκληροδερμία τυπικά αναφέρουν δυσφαγία, σκληροδακτυλία, φαινόμενο Raynaud , τηλεαγγειεκτασίες. Ασθενείς με πυλαία υπέρταση συνήθως εμφανίζουν σημεία ηπατικής ανεπάρκειας, όπως ερύθημα παλαμών, ευρυαγγείες, ατροφία όρχεων, λευκονυχία, υπέρχρωση δέρματος. Ασθενείς με συγγενείς καρδιοπάθειες ή φλεβοαποφρακτική νόσο των πνευμόνων μπορεί να εμφανίζουν πληκτροδακτυλία.

1.6.2 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗΣ ΑΡΤΗΡΙΑΚΗΣ ΥΠΕΡΤΑΣΗΣ

Η ακτινογραφία θώρακος αναδεικνύει συχνά μία διάταση του στελέχους της πνευμονικής αρτηρίας με εξάλειψη της περιφερικής πνευμονικής αγγείωσης, καθώς και μια αύξηση του καρδιοθωρακικού δείκτη λόγω διάτασης της δεξιάς κοιλίας και του δεξιού κόλπου. Η διάταση της δεξιάς κοιλίας δίνει μία σφαιρική εμφάνιση στην καρδιά, αλλά δεν γίνεται εύκολα διακριτή σε μια απλή ακτινογραφία θώρακος. Επιτρέπει επίσης την αναζήτηση παρεγχυματικών ανωμαλιών που υποδηλώνουν συνυπάρχουσα πνευμονική παθολογία. Το 90% των ασθενών με ιδιοπαθή πνευμονική υπέρταση εμφανίζει ανωμαλίες κατά τη στιγμή της διάγνωσης. Και πάλι όμως μία φυσιολογική ακτινογραφία δεν αποκλείει την ύπαρξη ΠΑΥ.

Το ΗΚΓ μπορεί να εμφανίζει ευρήματα υπερτροφίας δεξιού κόλπου (υψηλό δυναμικό επάρματος P στις απαγωγές II, III και V_F) ή/και υπερτροφίας δεξιάς κοιλίας (ελάττωση του βάθους του S και αύξηση του R στη V₁, ώστε το πηλίκο R/S συχνά να είναι μεγαλύτερο του 1, R<S στην V₆, δεξιά στροφή του άξονα, διαταραχές επαναπόλωσης σε δεξιές προκάρδιες V₁ και V₂). Παρουσιάζει 55% ευαισθησία και 70% ειδικότητα για την διάγνωση της πνευμονικής υπέρτασης. Ένα φυσιολογικό ΗΚΓ δεν αποκλείει την ύπαρξη πνευμονικής υπέρτασης.

Η κλινική εξέταση, η ακτινογραφία και το ΗΚΓ αν και δεν προσφέρουν σημαντικές πληροφορίες για τη διάγνωση της ΠΑΥ, συνεισφέρουν αποτελεσματικά στον αποκλεισμό άλλων παθολογικών καταστάσεων και ενισχύουν την κλινική υποψία για την ύπαρξη της νόσου. Το διαθωρακικό υπερηχογράφημα καρδιάς θεωρείται σήμερα η πιο αξιόπιστη, μη επεμβατική μέθοδος ελέγχου ασθενών με υποψία ΠΑΥ

και προτείνεται ως η κυριότερη εξέταση πρώτης γραμμής για την διαγνωστική προσέγγιση και την επιλογή ασθενών που θα υποβληθούν σε δεξιό καρδιακό καθετηριασμό.

Το υπερηχογράφημα καρδιάς, πιο αναλυτικά, είναι η εξέταση εκλογής για τη διάγνωση της πνευμονικής υπέρτασης, καθώς επιτρέπει την εκτίμηση της συστολικής πίεσης στην πνευμονική αρτηρία (PAP), μέσω της μέτρησης της ταχύτητας ροής διαμέσου της τριγλώχινας. Επίσης, μπορεί να απεικονίζει διάταση των δεξιών καρδιακών κοιλοτήτων σε συνδυασμό με παράδοξη κινητικότητα του μεσοκοιλιακού διαφράγματος. Ακόμη, επιτρέπει την αναζήτηση συγγενών καρδιοπαθειών ή διαφυγής από τα δεξιά προς τα αριστερά λόγω μεσοκοιλιακής επικοινωνίας.

Το σπινθηρογράφημα αερισμού-αιμάτωσης και η πνευμονική αγγειογραφία συμβάλλουν στον αποκλεισμό πνευμονικής υπέρτασης που οφείλεται σε χρόνια θρομβοεμβολική νόσο. Έχει υψηλή ευαισθησία (90-100%) και ειδικότητα (94-100%). Επίσης, η αξονική τομογραφία με σκιαγράφιση των πνευμονικών αγγείων αναζητά στοιχεία για πνευμονική εμβολή και παρέχει χρήσιμες λεπτομέρειες για την παρουσία διάμεσης πνευμονοπάθειας, εμφυσήματος, φλεβοαποφρακτικής νόσου ή αιμαγγειομάτωσης των πνευμονικών τριχοειδών.

Οι λειτουργικές δοκιμασίες των πνευμόνων παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για τη συμμετοχή του πνευμονικού παρεγχύματος και καταδεικνύουν την ύπαρξη ή όχι αποφρακτικού ή περιοριστικού τύπου πνευμονοπάθειας. Οι ασθενείς με ΠΑΥ παρουσιάζουν συνήθως μείωση της διάχυσης του μονοξειδίου του άνθρακα (DLCO 40-80% predicted) και μείωση των πνευμονικών χωρητικότητων.

Οι αιματολογικές εξετάσεις έχουν συμπληρωματικό ρόλο στην αναζήτηση της αιτίας που έχει προκαλέσει την πνευμονική υπέρταση. Εκτός από τον έλεγχο ρουτίνας (αιματολογικός, βιοχημικός), απαραίτητος κρίνεται και ο ανοσολογικός έλεγχος για ανίχνευση αντισωμάτων που συνδέονται με νόσους συνδετικού ιστού, (αντικεντρομεριδικά αντισώματα και αντιπυρηνικά αντισώματα, anti-dsDNA, , anti-Sm, anti-Ro, anti-La, anti-RNP, αντισώματα έναντι καρδιολιπίνης, αντισώματα έναντι φωσφολιπιδίων). Πάνω από 40% των ασθενών με ιδιοπαθή πνευμονική αρτηριακή υπέρταση έχουν αυξημένα αντιπυρηνικά αντισώματα, συνήθως σε χαμηλούς τίτλους (1:80). Τέλος, υποχρεωτικός είναι και ο έλεγχος για HIV, ηπατίτιδες και για τη λειτουργία του θυρεοειδούς.

Ο δεξιός καρδιακός καθετηριασμός αποτελεί την πιο αξιόπιστη μέθοδο για την διάγνωση, αλλά και την παρακολούθηση ΠΑΥ. Είναι απαραίτητη για την επιβεβαίωση της διάγνωσης και τον καθορισμό της σοβαρότητας της αιμοδυναμικής διαταραχής και τον έλεγχο της αγγειοδραστικότητας της πνευμονικής κυκλοφορίας. Υπολογίζονται η συστολική, η διαστολική και η μέση πίεση της πνευμονικής αρτηρίας (mPAP), η πίεση ενσφήνωσης των πνευμονικών τριχοειδών (PWP), η αντίσταση των πνευμονικών αγγείων (PVR), η πίεση του δεξιού κόλπου, η πίεση της δεξιάς κοιλίας. Πνευμονική αρτηριακή υπέρταση ορίζεται η μέση πίεση πνευμονικής αρτηρίας (mPAP) >25mmHg, με PVR>3mmHg/l/min και PWP<15mmHg.

1.7 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗΣ ΑΡΤΗΡΙΑΚΗΣ ΥΠΕΡΤΑΣΗΣ

Η ορθή αντιμετώπιση της πνευμονικής υπέρτασης από το θεράποντα ιατρό προϋποθέτει: α) τη διάγνωση της αιτίας της πνευμονικής υπέρτασης, β) την εκτίμηση της βαρύτητας και γ) τον καθορισμό της θεραπευτικής στρατηγικής αναλόγως της αιτιολογίας. Εάν δεν βρεθεί κάποια αιτία, τότε η διάγνωση της ιδιοπαθούς πνευμονικής υπέρτασης είναι η επικρατέστερη.

Τα τελευταία χρόνια έχουν πραγματοποιηθεί σημαντικά βήματα προόδου σε ό,τι αφορά τη θεραπεία της ΠΑΥ, γεγονός που σχετίζεται με την πρόοδο στην κατανόηση των παθοφυσιολογικών μηχανισμών της νόσου. Οι στόχοι στη θεραπεία της ΠΑΥ αφορούν τη βελτίωση της συμπτωματολογίας, την αύξηση της ανοχής στην άσκηση και την ομαλοποίηση των τιμών των αιμοδυναμικών παραμέτρων και κυρίως των πιέσεων των πνευμονικών αγγείων και του καρδιακού όγκου παλμού. Σημαντικός επίσης θεραπευτικός στόχος είναι η επιβράδυνση της εξέλιξης της νόσου, που μεταφράζεται σε λιγότερες νοσηλείες, μείωση της ανάγκης προσθήκης επιπλέον φαρμακευτικής αγωγής και περιορισμό των περιπτώσεων μεταμόσχευσης.

Η συμβατική θεραπεία των ασθενών με ΠΑΥ περιλαμβάνει τη χορήγηση διουρητικών, δακτυλίτιδας, αντιπηκτικών και οξυγονοθεραπείας (εάν $SO_2 < 90\%$), όπου αυτά χρειάζονται. Εάν η πνευμονική υπέρταση οφείλεται σε υποκείμενο νόσημα θα πρέπει ταυτόχρονα να αντιμετωπίζεται και αυτό. Επανεκτίμηση γίνεται μετά από τρεις μήνες θεραπείας. Εάν δεν υπάρχει βελτίωση, τότε θα πρέπει να γίνει επανεκτίμηση με δεξιό καθετηριασμό για τυχόν ύπαρξη ιδιοπαθούς πνευμονικής υπέρτασης.

Οι αιμοδυναμικές παράμετροι που μετρώνται με τον δεξιό καθετηριασμό είναι οι πιέσεις δεξιού κόλπου και δεξιάς κοιλίας, η συστολική και η μέση πίεση της δεξιάς κοιλίας, η πίεση ενσφήνωσης των πνευμονικών τριχοειδών, οι πνευμονικές αντιστάσεις, η περιεκτικότητα σε οξυγόνο του μικτού φλεβικού αίματος και κυρίως η καρδιακή παροχή. Η τελευταία αποτελεί σημαντικό δείκτη ανταπόκρισης στη θεραπευτική αγωγή, δηλαδή αξιολογείται το εάν αυξάνεται ή δεν μειώνεται καθώς μειώνεται η πνευμονική πίεση.

Ο δεξιός καθετηριασμός είναι απαραίτητος και για την εκτίμηση της ανταπόκρισης σε βραχείας δράσης αγγειοδιασταλτικούς παράγοντες όπως είναι η εποπροστενόλη, η αδενοσίνη και η εισπνοή NO (δοκιμασία οξείας αγγειοδιαστολής της πνευμονικής αρτηρίας). Εάν υπάρχει ανταπόκριση στους αγγειοδιασταλτικούς παράγοντες, δηλαδή μείωση της πνευμονικής πίεσης $\leq 40\text{mmHg}$ και πτώση της μέσης πνευμονικής πίεσης $>10\text{mmHg}$ χωρίς μείωση της καρδιακής παροχής, τότε χορηγούνται ανταγωνιστές ασβεστίου με καλά αποτελέσματα και καλή πρόγνωση. Ακολουθεί επανεκτίμηση ανά τρίμηνο. Η μακροχρόνια θεραπεία με ανταγωνιστές ασβεστίου βελτιώνει τις αιμοδυναμικές παραμέτρους και την επιβίωση σε ένα ποσοστό ασθενών.

Δυστυχώς, μόνο μικρό ποσοστό (10%) της ιδιοπαθούς ΠΑΥ εμφανίζει θετική απάντηση στους αγγειοδιασταλτικούς παράγοντες. Το υπόλοιπο 90% δεν ανταποκρίνεται. Στους ασθενείς αυτούς με αρνητική δοκιμασία οξείας αγγειοδιαστολής, εφαρμόζονται νεότερες στοχευμένες θεραπείες ή συνδυασμοί αναλόγως του σταδίου βαρύτητας, συγκεκριμένα στα στάδια III και IV. Οι θεραπείες αυτές ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες:

α) Προστανοειδή (μιμούμενα την αγγειοδιασταλτική δράση της προστακυκλίνης).

β) Αναστολείς υποδοχέων ενδοθηλίνης-1.

γ) Αναστολείς φωσφοδιεστεράσης.

Εάν δεν υπάρχει βελτίωση και με τους συνδυασμούς, ο ασθενής προωθείται για μεταμόσχευση και στο μεσοδιάστημα για μεσοκοιλιακή διαφραγματεκτομή. Η τελευταία έχει ως στόχο τη μείωση της πίεσης του δεξιού κόλπου, δημιουργώντας μια διαφυγή από τα δεξιά προς τα αριστερά.

1.7.1 ΠΡΟΣΤΑΝΟΕΙΔΗ

Η προστακυκλίνη είναι προϊόν του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος , παράγεται κυρίως από τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων και έχει αγγειοδιασταλτική δράση. Αποτελεί τον πιο ισχυρό παράγοντα αναστολής συσσώρευσης των αιμοπεταλίων και εμφανίζει αντιυπερπλαστικές ιδιότητες. Δυσλειτουργία της μεταβολικής της οδού σε ασθενείς με ΠΑΥ, οδηγεί σε μειωμένη έκφραση της συνθάσης της προστακυκλίνης στις πνευμονικές αρτηρίες.

Η εποπροστενόλη (Flolan) είναι ένα συνθετικό ανάλογο της προστακυκλίνης το οποίο έχει μικρό χρόνο ημίσειας ζωής (3-5 λεπτά) και παραμένει σταθερό σε θερμοκρασία δωματίου μόνο για 8 ώρες, γεγονός που κάνει αναγκαία τη συνεχή ενδοφλέβια χορήγηση με μόνιμο καθετήρα και φορητή αντλία έγχυσης. Βελτιώνει τα συμπτώματα , την αντοχή στην κόπωση και τις αιμοδυναμικές παραμέτρους σε ασθενείς με ΠΑΥ κατηγορίας III, IV κατά NYHA με αρνητική δοκιμασία οξείας αγγειοδιαστολής. Οι επιπλοκές από τη χορήγησή της σχετίζονται με τον καθετήρα και περιλαμβάνουν αιμορραγίες, φλεγμονή στο σημείο έγχυσης και σηπτικές

επιπλοκές, απόφραξη του καθετήρα και διακοπή της χορήγησης. Απότομη διακοπή της χορήγησης θα πρέπει να αποφεύγεται γιατί μπορεί να οδηγήσει σε αιφνίδια επιδείνωση μερικών ασθενών και θάνατο. Συστηματικές ανεπιθύμητες ενέργειες είναι η κεφαλαλγία, η διάρροια, ο πόνος στα κάτω άκρα , το flushing. Η συνεχής ενδοφλέβια χορήγηση και το υψηλό κόστος θεραπείας αποτελούν σημαντικά προβλήματα της θεραπευτικής αγωγής, γεγονός που οδήγησε στην ανακάλυψη νέων αναλόγων προστακυκλίνης με πιο εύκολους τρόπους χορήγησης.

Η ιλοπρόστη (Ventavis) είναι ένα σταθερό χημικό ανάλογο της προστακυκλίνης που χορηγείται σε εισπνεόμενη μορφή και θεωρητικά έχει εκλεκτική δράση στους πνεύμονες, με λιγότερες συστηματικές ανεπιθύμητες ενέργειες (flushing, βήχας, άλγος κάτω σιαγόνας και συγκοπτικά επεισόδια κυρίως στα μεσοδιαστήματα των εισπνοών και κατά τη διάρκεια άσκησης) και μπορεί να επιτύχει κλινική βελτίωση σε χαμηλότερες δόσεις από την ενδοφλέβια εποπροστενόλη. Λόγω μικρής διάρκειας ζωής (20-30 λεπτά) απαιτούνται συχνές εισπνοές (6-9 νεφελοποιήσεις την ημέρα) για να επιτευχθεί μόνιμο αποτέλεσμα σε μακροχρόνια θεραπεία. Επιπλέον, η αναπόφευκτη διακοπή των εισπνοών στη διάρκεια της νύχτας και η πιθανή μη σωστή χρήση της συσκευής νεφελοποίησης από τον ασθενή αποτελούν προβλήματα στην εφαρμογή της θεραπείας. Η χορήγηση της ιλοπρόστης μπορεί να γίνει και ενδοφλέβια, όπως με την εποπροστενόλη.

Η τεπροστενίλη είναι ένα τρικυκλικό βενζιδενικό παράγωγο της εποπροστενόλης με χρόνο ημίσειας ζωής 3 ώρες που είναι αρκετά σταθερό σε θερμοκρασία δωματίου και μπορεί να διατηρηθεί σε θερμοκρασία για 48 ώρες. Χορηγείται ενδοφλεβίως (σκεύασμα Remodulin) ή υποδορίως με συνεχή αντλία έγχυσης ανάλογη με την

αντλία που χρησιμοποιείται για τη χορήγηση ινσουλίνης. Μπορεί να χορηγηθεί και σε ειπνεόμενη μορφή (σκεύασμα Tyvaso). Ανεπιθύμητες ενέργειες είναι η κεφαλαλγία, η διάρροια, ο πόνος στα κάτω άκρα, το flushing. Πόνος ή ερυθρότητα στο σημείο της υποδόριας έγχυσης είναι η πιο συχνή παρενέργεια.

Η βεραπρόστη είναι το πρώτο χημικό σταθερό ανάλογο προστακυκλίνης σε μορφή δισκίου, με ταχεία απορρόφηση από το γαστρεντερικό και μέγιστη συγκέντρωση στο αίμα μετά από 30 λεπτά, το οποίο όμως βρίσκεται ακόμη υπό μελέτη. Παρατηρήθηκε βελτίωση της αντοχής δυστυχώς μόνο για 3-6 μήνες, ενώ δεν υπήρξε βελτίωση των αιμοδυναμικών παραμέτρων. Πιο συχνές παρενέργειες είναι η κεφαλαλγία, άλγος κάτω σιαγόνας, flushing και διάρροια.

1.7.2 ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΕΣ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΗΣ-1

Τα τελευταία χρόνια οι ανταγωνιστές υποδοχέων ενδοθηλίνης-1 (ET-1) έχουν ανοίξει νέες προοπτικές στη θεραπευτική αντιμετώπιση της ΠΑΥ. Η ET-1 ασκεί τη δράση της μέσω δύο ειδών υποδοχέων στα λεία μυϊκά κύτταρα, τους ET_A και ET_B προκαλώντας αγγειοσύσπαση, υπερτροφία και ίνωση, οδηγώντας τελικά σε αναδιαμόρφωση του αγγειακού τοιχώματος και στένωση του αυλού των πνευμονικών αρτηριών. Οι αγγειοσυσπαστικές και μιτογόνες ιδιότητες της ET-1 επάγονται κυρίως μέσω των ET_A υποδοχέων, ενώ οι ET_B σχετίζονται με την έκκριση αγγειοδιασταλτικών ουσιών (NO και προστακυκλίνη) και τη ρύθμιση της κάθαρσης της ET-1. Ενεργοποίηση του συστήματος της ενδοθηλίνης-1 και αυξημένα επίπεδα αυτής παρατηρούνται στο πλάσμα και τον πνευμονικό ιστό ασθενών με ΠΑΥ.

Η μποσεντάνη (Tracleer) είναι ένας μικτός ανταγωνιστής των υποδοχέων ET_A και ET_B που χορηγείται από το στόμα. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες αφορούν την αύξηση των τρανσαμινασών, τη μείωση των επιπέδων αιμοσφαιρίνης και διαταραχή της σπερματογένεσης. Μία σειρά κλινικών μελετών καταδεικνύει την αποτελεσματικότητα της μποσεντάνης στην βελτίωση της αντοχής στην κόπωση, των αιμοδυναμικών παραμέτρων και της πρόγνωσης σε ασθενείς με ιδιοπαθή ΠΑΥ και τη σχετιζόμενη με νόσο συνδετικού ιστού ή συγγενή καρδιοπάθεια. Η μποζεντάνη έχει ένδειξη σε ασθενείς με ΠΑΥ τάξης II, III ή και IV κατά NYHA με αρνητική δοκιμασία οξείας αγγειοδιαστολής. Η μποζεντάνη μπορεί να χορηγηθεί και σε συνδυασμό με ενδοφλέβια εποπροστενόλη ή υποδόρια τεπροστενίλη.

Η σιταξεντάνη (Thelin) και η αμπρισεντάνη (Letairis) αποτελούν μεταγενέστερα φάρμακα με ένδειξη σε ΠΑΥ τάξης II, III κατά NYHA. Πρόκειται για εκλεκτικούς ανταγωνιστές των υποδοχέων ET_A ,χορηγούνται επίσης από το στόμα και βελτιώνουν τις αιμοδυναμικές παραμέτρους και την πρόγνωση στην ιδιοπαθή ΠΑΥ και τη σχετιζόμενη με νόσους συνδετικού ιστού ή HIV λοίμωξη.

1.7.3 ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΦΩΣΦΟΔΙΕΣΤΕΡΑΣΗΣ ΤΥΠΟΥ 5

Το NO παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και στη συνέχεια διαχέεται στα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων όπου ενεργοποιεί τη γουανυλική κυκλάση οδηγώντας στην παραγωγή κυκλικής μονοφωσφορικής γουανοσίνης (cGMP) , η οποία επάγει την ενδοκυττάρια σηματοδότηση που επιφέρει χάλαση των λείων μυϊκών ινών του τοιχώματος των αγγείων. Η φωσφοδιεστεράση τύπου 5 υπερεκφράζεται στους

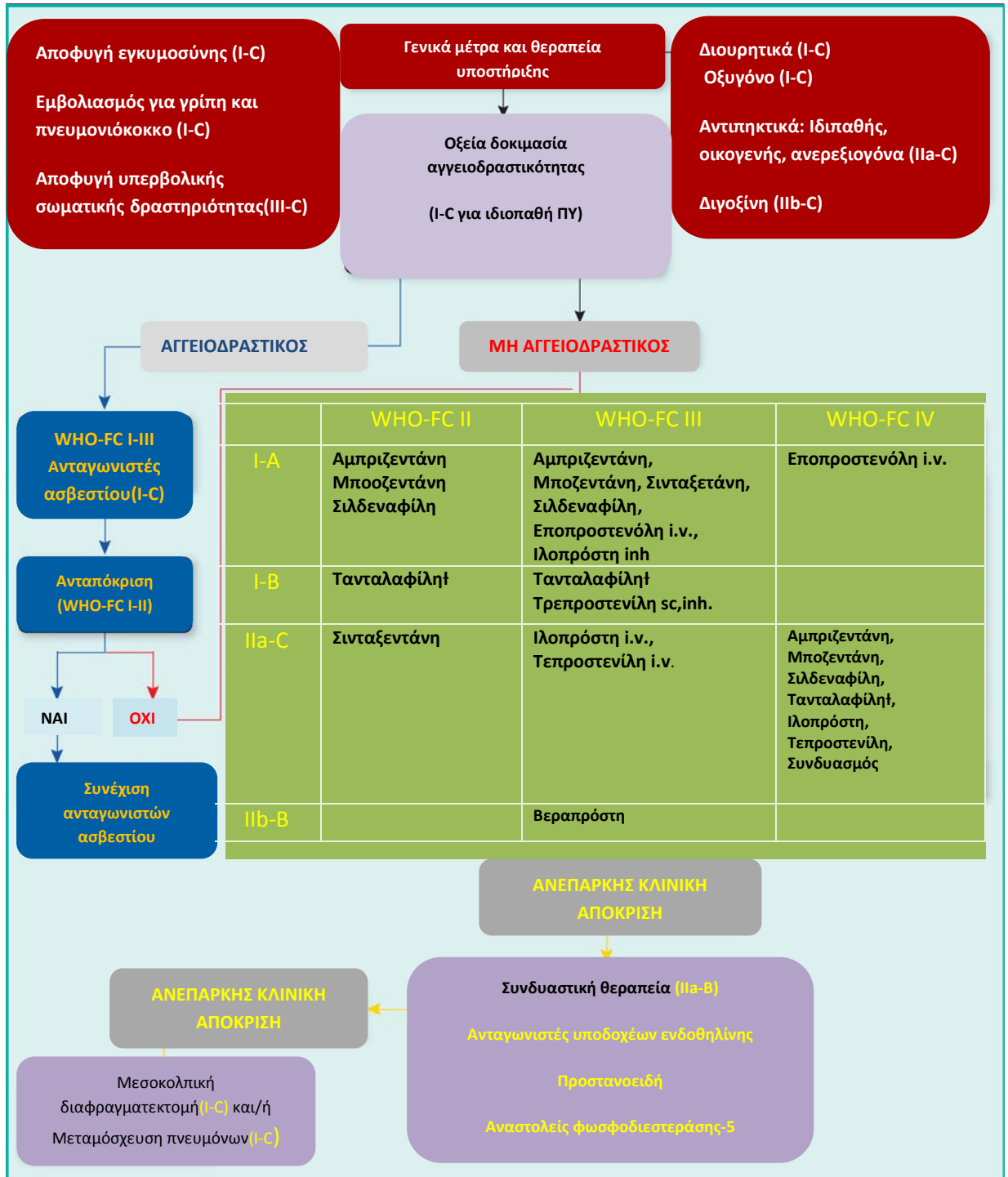
πνεύμονες ασθενών με ΠΑΥ , απενεργοποιώντας την cGMP με αποτέλεσμα αγγειοσύσπαση και αύξηση των πνευμονικών αντιστάσεων. Η χορήγηση αναστολέα φωσφοδιεστεράσης-5 αυξάνει την ενδοκυττάρια συγκέντρωση cGMP , ενισχύοντας τις αγγειοδιασταλτικές δράσεις του NO και περιορίζοντας την υπερτροφία των λείων μυϊκών ινών. Η σιλденаφίλη (Revatio, 2005) και η νεώτερη τανταλαφίλη (Adcirca, 2009) χορηγούνται από το στόμα και φαίνεται να βελτιώνουν την ανοχή στην άσκηση και τις αιμοδυναμικές παραμέτρους ασθενών με ιδιοπαθή ΠΑΥ και σχετιζόμενη με νόσο συνδετικού ιστού, συγγενή καρδιοπάθεια ή θρομβοεμβολική νόσο. Επίσης, η σιλденаφίλη ενισχύει τη δράση της προστακυκλίνης και έχει χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με εποπροστενόλη. Ανεπιθύμητες ενέργειες: κεφαλαλγία, flushing, ρινική συμφόρηση, ΓΕΣ, υπόταση, κατακράτηση υγρών, αιφνίδια απώλεια ακοής ή όρασης.

1.7.4 ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ

Οι παραπάνω κατηγορίες φαρμάκων που έχουν προστεθεί τα τελευταία χρόνια στη φαρέτρα της θεραπείας της ΠΑΥ συνέβαλαν στην βελτίωση της λειτουργικής κατάστασης και της επιβίωσης των ασθενών, χωρίς ωστόσο θεαματικά αποτελέσματα. Για αυτό το λόγο μελετώνται τα αποτελέσματα του συνδυασμού των διαφόρων κατηγοριών που εφαρμόζονται σε αρκετά πλέον θεραπευτικά κέντρα , και αφορούν κυρίως ασθενείς τελικών σταδίων κατά NYHA. Τέτοιοι συνδυασμοί είναι μποζεντάνη με εποπροστενόλη (BREATH-2 study), μποζεντάνη με ιλοπρόστη (STEP-1 study, COMBI study), μποζεντάνη με τεπροστενίλη (TRIUMPH study) ,

εποπροστενόλη με σιλденаφίλη (PACES study), μποζεντάνη με σιλденаφίλη (EARLY study), τανταλαφίλη με μποζεντάνη (PHIRST study).

Η συνδυαστική θεραπεία συνιστάται μόνο σε ασθενείς που δεν παρουσιάζουν βελτίωση με τη μονοθεραπεία και πρέπει να εφαρμόζεται μόνο σε εξειδικευμένα κέντρα που ασχολούνται με τη θεραπεία της ΠΑΥ.



Εικόνα 1.9 Αλγόριθμος θεραπευτικής στρατηγικής της ΠΑΥ σύμφωνα με τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Καρδιολογικής Εταιρείας. WHO-FC: Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας - Λειτουργική Κλάση, Τανταλαφίλη † = υπό αναθεώρηση.

1.7.5 ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΥΠΑΡΧΟΥΣΩΝ ΘΕΡΑΠΕΙΩΝ

Χωρίς αμφιβολία, η εισαγωγή των αναλόγων προστακυκλίνης, των ανταγωνιστών των υποδοχέων της ενδοθηλίνης-1 και των αναστολέων της φωσφοδιεστεράσης στη θεραπεία της ΠΑΥ, είτε ως μονοθεραπεία, είτε ως συνδυασμός, συνέβαλε στη βελτίωση της λειτουργικής κατάστασης και της επιβίωσης των ασθενών. Ωστόσο, σε ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών δεν έχουμε τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Περαιτέρω έρευνα απαιτείται για να διευκρινιστούν οι αιτίες της μη ανταπόκρισης των ασθενών αυτών στις καθιερωμένες θεραπείες.

Άλλωστε, οι παθογενετικοί μηχανισμοί της νόσου δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως. Σίγουρα πρόκειται για μια πολύπλοκη διεργασία στην οποία εμπλέκονται πλήθος ενδογενών παραγόντων. Η προστακυκλίνη, η ενδοθηλίνη-1, η φωσφοδιεστεράση-5, το μονοξείδιο του αζώτου είναι κάποιοι μόνο από αυτούς και ενώ ο ρόλος τους είναι αποδεδειγμένος, υπάρχουν ακόμη αρκετά ερωτηματικά. Χρειάζονται ακόμη αρκετές μελέτες που θα καθορίσουν σε ποιους ασθενείς είναι πιο ωφέλιμη η χορήγηση κάθε φαρμακευτικού παράγοντα, σε ποιο στάδιο είναι ωφελιμότερη η έναρξή τους, ποιες είναι οι βέλτιστες θεραπευτικές δόσεις με τις λιγότερες παρενέργειες, ποιοι είναι οι καλύτεροι θεραπευτικοί συνδυασμοί, τότε πρέπει να αλλάζει η θεραπευτική στρατηγική.

Επιπλέον, το κόστος των υπάρχουσων θεραπειών είναι πολύ υψηλό, αλλά και η χορήγησή τους μπορεί να είναι αρκετά ενοχλητική για τον ασθενή, όπως για παράδειγμα συμβαίνει με την συνεχή ενδοφλέβια χορήγηση της εποπροστενόλης μέσω ειδικής αντλίας. Στόχος πάντα είναι η ανακάλυψη θεραπειών πιο αποτελεσματικών, αλλά και πιο καλά ανεκτών από τους ασθενείς.

1.7.6 ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

Ολοκληρώνοντας θα μπορούσαμε να πούμε ότι η ΠΑΥ είναι μια νόσος με δραματικές επιπτώσεις στην υγεία και την ποιότητα ζωής των πασχόντων. Παρά την πρόοδο στη θεραπεία της ΠΑΥ, η λειτουργική κατάσταση και η επιβίωση των ασθενών παραμένουν χαμηλές. Οι παθογενετικοί της μηχανισμοί αποτελούν πεδίο συνεχούς έρευνας. Η γνώση αυτών των μηχανισμών πιστεύεται ότι θα οδηγήσει και στην ανακάλυψη της κατάλληλης φαρμακευτικής αγωγής. Πρόσφατα, αρκετός αριθμός στοιχείων έχει συγκεντρωθεί αναφορικά με το ρόλο του μεταμορφωτικού αυξητικού παράγοντα-β (Transforming Growth Factor-β) στην παθοφυσιολογία τη πνευμονικής υπέρτασης και αποτελεί αντικείμενο ενδελεχούς έρευνας. Μεταλλάξεις των γονιδίων που κωδικοποιούν τους υποδοχείς BMPR-II και ALK-1 της οικογένειας του TGF-β, έχουν αναγνωρισθεί σε ασθενείς με πρωτοπαθή πνευμονική υπέρταση (ιδιοπαθή ή κληρονομική).

Πιο συγκεκριμένα, γενετικές μελέτες έδειξαν ότι τουλάχιστον 60% των ασθενών με οικογενή ΠΑΥ και 10-20% των ασθενών με σποραδική ιδιοπαθή ΠΑΥ ήταν ετερόζυγοι για μία μετάλλαξη που επηρεάζει την έκφραση του υποδοχέα της μορφογενετικής πρωτεΐνης των οστών (BMPR-II) [28,29]. Η μορφογενετική πρωτεΐνη των οστών (BMP) ανήκει στην υπεροικογένεια του μεταμορφωτικού αυξητικού παράγοντα (TGF-β). Η επίπτωση της μετάλλαξης όσον αφορά την εκδήλωση της ΠΑΥ είναι μόνο 20%. Το 80% των μελών μίας οικογένειας που φέρει τη συγκεκριμένη μετάλλαξη, δεν θα εμφανίσει ΠΑΥ. Επιπλέον, ανεξάρτητα με την ύπαρξη της συγκεκριμένης μετάλλαξης ή όχι, σχεδόν όλοι ασθενείς με οικογενή ΠΑΥ παρουσιάζουν μείωση της έκφρασης της συγκεκριμένης πρωτεΐνης BMPR-II, καθώς

επίσης και της BMPR-I. Μειωμένη έκφραση ή δυσλειτουργία των συγκεκριμένων υποδοχέων στα λεία μυϊκά κύτταρα των πνευμονικών αρτηριών οδηγεί σε διαταραχή της έκφρασης των TGF- β s και παθολογική κυτταρική απόκριση (αυξημένη απόπτωση ενδοθηλιακών κυττάρων και απώλεια ελέγχου του πολλαπλασιασμού των λείων μυϊκών κυττάρων) [25].

Ακόμη, μεταλλάξεις άλλων παραγόντων της ίδιας οικογένειας, όπως ο υποδοχέας της κινάσης προσομοιάζουσας με ακτιβίνη (Activin like kinase receptor type -I ή ALK1) και της ενδογλίνης, οι οποίες εμφανίζονται στην κληρονομική αιμορραγική τηλεαγγειεκτασία, παρατηρούνται σποραδικά και στην ΠΑΥ. Η κληρονομική αιμορραγική τηλεαγγειεκτασία εμφανίζει κοινά παθολογοανατομικά ευρήματα με την ΠΑΥ, γεγονός που πιθανώς υποδεικνύει παρόμοιους ή και κοινούς παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς. Σε πέντε οικογένειες με κληρονομική αιμορραγική τηλεαγγειεκτασία καταγράφηκαν 10 περιπτώσεις ανάπτυξης ΠΑΥ και αναγνωρίστηκαν έξι μεταλλάξεις γονιδίων, τα οποία είναι υπεύθυνα για την έκφραση των υποδοχέων ALK1 και ενδογλίνης στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων [21]. Η πλειοψηφία αυτών των μεταλλάξεων φαίνεται πως οδηγεί στην απώλεια της λειτουργικότητας των συγκεκριμένων υποδοχέων.

2. ΜΕΤΑΜΟΡΦΩΤΙΚΟΣ ΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ-β (TGF-β)

2.1 ΓΕΝΙΚΑ

Η οικογένεια του Μεταμορφωτικού Αυξητικού Παράγοντα-β (Transforming Growth Factor-β) αποτελείται από ένα μεγάλο αριθμό πολυπεπτιδίων που ρυθμίζουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών λειτουργιών όπως πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση και απόπτωση κυττάρων, εμβρυική ανάπτυξη ιστών, ρύθμιση ανοσολογικών μηχανισμών και καρκινογένεση.

Ο Μεταμορφωτικός Αυξητικός Παράγοντας-β ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά ως μία πρωτεΐνη, εκκρινόμενη από κύτταρα ινοβλαστών επίμυος που ήταν μετασχηματισμένα με τον ιό του σαρκώματος και ήταν ικανά να επάγουν τη δημιουργία αποικιών στη δοκιμασία ρευστού άγαρ (soft agar)[32]. Ονομάστηκε Μεταμορφωτικός Αυξητικός Παράγοντας εξαιτίας της ικανότητας του να προκαλεί μεταμόρφωση κάποιων τροποποιημένων ή καρκινικών κυττάρων σε φυσιολογικά κύτταρα. Αργότερα παρατηρήθηκε ότι αυτός ο παράγοντας αναστέλλει την αύξηση πολλών τύπων κυττάρων (επιθηλιακής, ενδοθηλιακής, λεμφικής, αιμοποιητικής κ.ά. προέλευσης) και ρυθμίζει μια σειρά κυτταρικών λειτουργιών, οι οποίες δεν σχετίζονται πάντα με κυτταρική μεταμόρφωση. Παρόλα αυτά επικράτησε η ονομασία μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας.

2.2 «ΥΠΕΡ- ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ» ΜΕΤΑΜΟΡΦΩΤΙΚΟΥ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ-β

Σήμερα η οικογένεια του Μεταμορφωτικού Αυξητικού Παράγοντα-β (TGF-β) αναγνωρίζεται ως μία από τις μεγαλύτερες οικογένειες πλειοτροπικών πεπτιδίων και αναγνωρίζονται σε όλους σχεδόν τους πολυκύτταρους οργανισμούς (από σκώληκες μέχρι τον άνθρωπο) , υποδεικνύοντας τη σημασία αυτής της οικογένειας πρωτεϊνών.

Η οικογένεια περιλαμβάνει τις ακόλουθες υποομάδες:

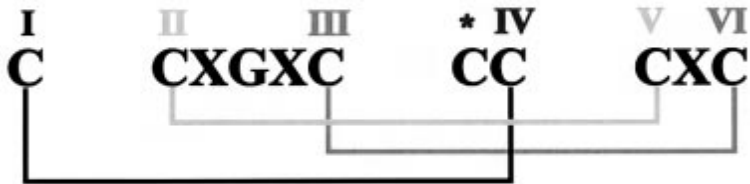
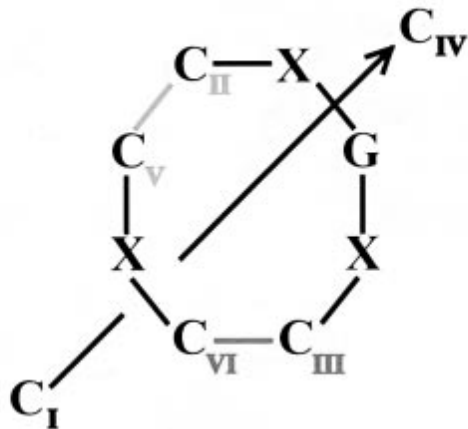
- Τρεις ισομορφές TGF-β (1,2 και3)
- Ακτιβίνες και ινχιπίνες,
- Αυξητικούς παράγοντες και παράγοντες διαφοροποίησης (growth and differentiation factors GDFs)
- Μορφογενετικές πρωτεΐνες των οστών (bone morphogenetic proteins BMPs)
- Πρωτεΐνες καθορισμού δεξιάς-αριστερής ανάπτυξης οργάνων κατά τη εμβρυογένεση (left-right determination factors Leftys)
- Nodal proteins
- Müllerian inhibiting substance (MIS)
- Distantly related glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF)

Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωρισθεί περισσότερα από 30 μέλη της οικογένειας του Μεταμορφωτικού Αυξητικού Παράγοντα-β , τα οποία παρά το γεγονός ότι παρουσιάζουν διαφορετικό αποτέλεσμα σε διάφορες λειτουργίες, μοιράζονται την ίδια μοριακή δομή με ελάχιστες διαφορές.

2.3 ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΗΣ ΥΠΕΡ-ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ TGF-β

Κάθε μόριο της οικογένειας του Μεταμορφωτικού Αυξητικού Παράγοντα-β (TGF-β) παράγεται ως μία μεγάλη πρόδρομη πρωτεΐνη σε ανενεργή μορφή, η οποία αποτελείται από ένα N-τελικό άκρο (20-30 αμινοξέων), μία κεντρική περιοχή (ονομάζεται pro-region ή latency associated peptide LAP) και ένα C-τελικό άκρο (112-114 αμινοξέων).

Το N-τελικό άκρο θεωρείται ότι παίζει ρόλο για την σύνθεση της πρωτεΐνης από το κύτταρο παραγωγής της. Το C-τελικό άκρο με μέγεθος 15-kDa αποσχίζεται με πρωτεόλυση από το πρόδρομο μόριο και αποτελεί την ώριμη μορφή η οποία σχηματίζει ένα διμερές με μέγεθος 25-kDa , το οποίο αποτελεί και την ενεργό μορφή. Πιο συγκεκριμένα, η ώριμη περιοχή (C-τελικό άκρο) αποτελείται από επτά αμινοξέα κυστεΐνης ενωμένα μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Τα 6 μόρια κυστεΐνης συνδέονται μεταξύ τους με τρεις ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς (C II-C V **C**, III-C **VI**, C I- C **IV**) σχηματίζοντας μία σταθερή τρισδιάστατη μορφή σαν δακτύλιος γνωστή ως 'cysteine knot' , η οποία χαρακτηρίζει την οικογένεια του Μεταμορφωτικού Αυξητικού Παράγοντα (McDonald and Hendrickson, 1993) και στην οποία οφείλεται η δομική ακεραιότητα του πεπτιδίου ως μονομερές. Το έβδομο μόριο κυστεΐνης συνδέεται, επίσης, με δισουλφιδικό δεσμό με ένα άλλο μόριο κυστεΐνης δεύτερου μονομερούς σχηματίζοντας τελικά ένα διμερές που αποτελεί τελικά την ενεργή μορφή. Ο τελευταίος δισουλφιδικός δεσμός προσφέρει επιπλέον σταθεροποίηση των υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων οι οποίες αποτελούν την κατευθυντήρια δύναμη για διμερισμό [36,114].

A**B**

Εικόνα 2.1

A Δισουλφιδικοί δεσμοί μεταξύ μορίων κυστεΐνης.

B Δακτύλιος 'cysteine knot'

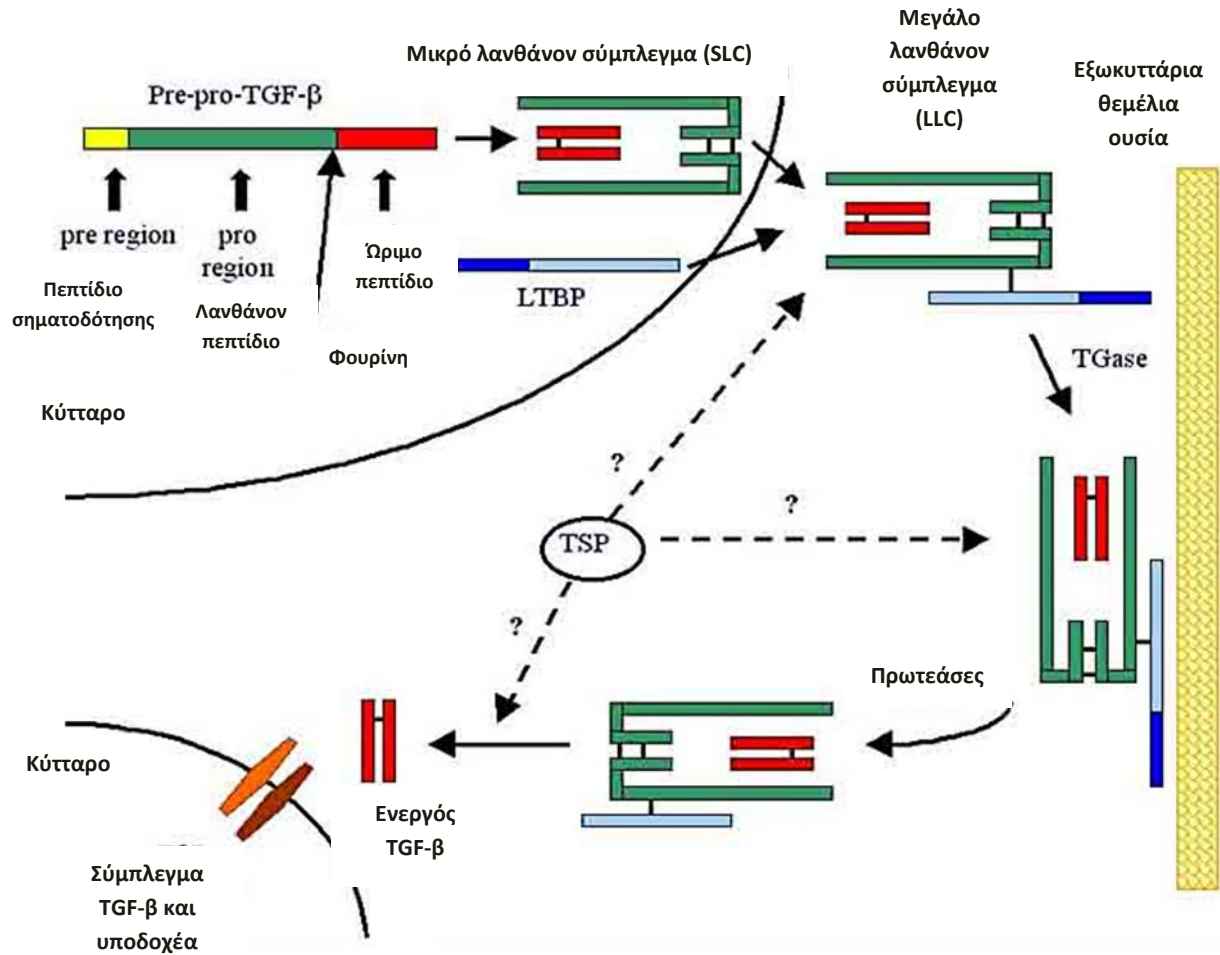
2.4 ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΗΣ ΥΠΕΡ-ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ TGF-β

Κάθε μόριο ενός Μεταμορφωτικού Αυξητικού Παράγοντα-β βρίσκεται σε ανενεργή μορφή μέσα στο κύτταρο παραγωγής του. Μετά τη σύνθεσή του το πρόδρομο μόριο συνδέεται με το πεπτίδιο Latency Associated Peptide (LAP, μεγέθους 75kDa) (λανθάνον πεπτίδιο) σχηματίζοντας το σύμπλεγμα Small Latent Complex (SLC) (μικρό λανθάνον σύμπλεγμα). Το σύμπλεγμα αυτό παραμένει μέσα στο κύτταρο έως ότου, συνδεόμενο με μία άλλη πρωτεΐνη η οποία ονομάζεται Latent TGF-β-Binding Protein (LTBP, μεγέθους 125-240kD), σχηματίζει ένα μεγαλύτερο σύμπλεγμα ονομαζόμενο Large Latent Complex (LLC) (μεγάλο λανθάνον σύμπλεγμα) και είναι αυτό που τελικά εκκρίνεται εξωκυττάρια.

Όσο το μόριο του TGF-β παραμένει ενωμένο με την LTBP, βρίσκεται σε ανενεργή μορφή και δεν μπορεί να συνδεθεί με τους υποδοχείς άλλων κυττάρων ώστε να επιτελέσει κάποια λειτουργία. Για να μπορέσει να ενεργοποιηθεί είναι απαραίτητη η αποδέσμευση της LTBP και της LAP από το μόριό του.

Διάφοροι παράγοντες φαίνεται να παίζουν ρόλο στην ενεργοποίηση του TGF-β δημιουργώντας συνθήκες αποδέσμευσης των LTBP και LAP από το σύμπλεγμα LLC.

Μερικοί από αυτούς είναι : η πλασμίνη , κάποιες μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMP-9, MMP-2), το pH, ορισμένες ιντεγκρίνες (η αVβ6 ιντεγκρίνη ήταν η πρώτη που αναγνωρίστηκε ως ενεργοποιητής του TGF-β1).



Εικόνα 2.2 Σχηματική απεικόνιση απελευθέρωσης από το κύτταρο και ενεργοποίησης TGF-β στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία. SLC (small latent complex) = μικρό λανθάνον σύμπλεγμα, LLC (large latent complex) = μεγάλο λανθάνον σύμπλεγμα, LAP (Latency Associated Peptide) = λανθάνον πεπτίδιο, LTBP (Latent TGF-β-Binding Protein) = πρωτεΐνη συνδεόμενη με το μικρό λανθάνον σύμπλεγμα.

2.5 ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΩΝ TGF-βs

Κάθε μέλος της οικογένειας TGF-βs συνδέεται με τα κύτταρα-στόχο μέσω ειδικών υποδοχέων οι οποίοι διακρίνονται σε τρεις τύπους: **τύπου I (TGFβR-I; 50-60 kDa)** , **τύπου II (TGFβR-II; 70-100 kDa)** και **τύπου III (TGFβR-III; 200-400 kDa)**. Οι υποδοχείς αυτοί είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες στην επιφάνεια των κυττάρων, οι οποίες μεσολαβούν στη μεταβίβαση του σήματος για την όποια λειτουργική ενεργοποίηση είναι υπεύθυνος ο μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας.

Πιο συγκεκριμένα, πρόκειται για γλυκοπρωτεΐνες (σερίνη/θρεονίνη κινάσες), οι οποίες αποτελούνται από έναν εξωκυττάριο τομέα πλούσιο σε κυστεΐνη και υπεύθυνο για τη σύνδεση με τον αυξητικό παράγοντα , μία διαμεμβρανική περιοχή και έναν ενδοκυττάριο τομέα με δραστηριότητα σερίνης/θρεονίνης. Ο υποδοχέας **τύπου I**, σε αντίθεση με τον υποδοχέα **τύπου II** ,περιέχει επιπλέον μία περιοχή πλούσια σε γλυκίνες και σερίνες (GS domain) ανάμεσα στη διαμεμβρανική περιοχή και την περιοχή της κινάσης.

Ο μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας συνδέεται αρχικά με έναν υποδοχέα **τύπου II** ο οποίος με τη σειρά του φωσφορυλιώνει τον GS domain ενός υποδοχέα **τύπου I** και σχηματίζεται έτσι ένα τετραμερές σύμπλεγμα το οποίο είναι απαραίτητο για την περαιτέρω μεταβίβαση του σήματος. Λόγω της διμερούς μορφής του μορίου του TGF-β το σύμπλεγμα των υποδοχέων έχει τετραμερή μορφή, αποτελούμενο από δύο υποδοχείς **τύπου I** και δύο υποδοχείς **τύπου II**.

Ο υποδοχέας **τύπου III (TGFβR-III ή betaglycan)** δεν είναι υπεύθυνος για τη μεταβίβαση του σήματος ενδοκυττάρια, αλλά φαίνεται να βοηθάει τα μόρια του TGF-β να παρουσιαστούν στον υποδοχέα **τύπου II**. Η ενδογλίνη αποτελεί μία ακόμη μορφή βοηθητικού υποδοχέα **τύπου III** που εκφράζεται κυρίως στα ενδοθηλιακά

κύτταρα και παίζει ρόλο στην ομαλή σύνδεση μεταξύ TGFβR-II (υποδοχέας τύπου II) και ALK1 ή ALK5 (υποδοχείς τύπου I)[115].

Υπάρχουν επτά υποομάδες υποδοχέων **τύπου I** και πέντε υποομάδες **τύπου II** στα θηλαστικά. Όλες διατηρούν τον ίδιο σταθερό ενδοκυττάριο τομέα της κινάσης, αλλά διαφέρουν ως προς τον εξωκυττάριο τομέα σύνδεσης με τον TGF-β.

Οι υποδοχείς **τύπου I** είναι γνωστοί ως:

1. **ALK 1**
2. **ALK 2 ή ActivinR-IA**
3. **ALK 3 ή BMPR-IA**
4. **ALK 4 ή ActivinR-IB**
5. **ALK 5 ή TGFβR-I**
6. **ALK 6 ή BMPR-IB**
7. **ALK 7 ή ActivinR-IC**

και οι **τύπου II** γνωστοί ως:

1. **TGFβR-II**
2. **ActivinR-IIB**
3. **ActivinR-IIA**
4. **BMPR-II**
5. **AMHR-II**

Υποδοχείς	Σύνδεσμοι
Τύπου II	
TGFβR-II	TGF-βs
ActR-II/ActR-IIB	Activins, BMP-2, BMP-4, BMP-7, GDF-5
BMPR-II	BMP-7, BMP-4, GDF-5
AMHR-II	MIS
Τύπου I	
TGFβR-I	TGF-βs
ActR-I	Activins, BMP-2, BMP-4, BMP-7
ActR-IB	Activins
TSR-1	?
BMPR-IA	BMP-4, BMP-7
BMPR-IB	BMP-4, BMP-7, GDF-5

Πίνακας 2.1 Τύποι υποδοχέων και μεταμορφωτικοί αυξητικοί παράγοντες με τους οποίους συνδέονται.

Η ειδικότητα στη σύνδεση για τους διάφορους αυξητικούς παράγοντες ή αλλιώς συνδέσμους, επιτυγχάνεται με διαφορετικούς συνδυασμούς υποδοχέων **τύπου I** και **τύπου II**, αν και πιο συχνά ένας συγκεκριμένος συνδυασμός υποδοχέων χρησιμοποιείται από πολλούς διαφορετικούς αυξητικούς παράγοντες. Επιπλέον, όλα τα είδη υποδοχέων δεν εκφράζονται πάντα στο ίδιο κύτταρο, με αποτέλεσμα να μειώνεται ακόμη περισσότερο ο αριθμός των πιθανών συνδυασμών υποδοχέων και συνδέσμων.

Ακόμη και αν ένας σύνδεσμος χρησιμοποιεί πολλούς διαφορετικούς συνδυασμούς υποδοχέων **τύπου I** και **τύπου II** , μπορεί να προτιμάει ένα συγκεκριμένο συνδυασμό και να αποτελεί μερικό αγωνιστή για άλλους συνδυασμούς υποδοχέων.

Για παράδειγμα, οι ισομορφές του TGF-β (1,2,3) αδυνατούν να συνδεθούν με τον υποδοχέα TGFβR-I, αν απουσιάζει ο υποδοχέας TGFβR-II. Αντίθετα οι ισομορφές του BMP μπορούν να συνδεθούν με τους υποδοχείς BMPR -Ia ή BMPR-Ib , ακόμη και αν λείπει ο BMPR-II.

Επίσης, το μόριο της Ακτιβίνης Α φαίνεται να έχει μεγαλύτερη συγγένεια για τον υποδοχέα ActivinR-IIB από τον ActivinR-IIA, παρόλο που μπορεί να χρησιμοποιήσει και τους δύο αυτούς τύπους υποδοχέα II σε συνδυασμό με τον ALK-4 (ActivinR-IB) (Attisano et al., 1992;Carcamo et al., 1994). Το μόριο της Ακτιβίνης Β μπορεί να χρησιμοποιεί τους υποδοχείς ActivinR-IIA ή ActivinR-IIB σε συνδυασμό είτε με ALK-4 (ActivinR-IB), είτε με ALK-7 (ActivinR-IC) (Tsuchida et al., 2004).

Επιπλέον, κάποιοι υποδοχείς φαίνεται να έχουν βοηθητικό ρόλο. Για παράδειγμα, ο υποδοχέας **τύπου III** ή ενδογλίνη παρουσιάζει τα μόρια TGF-β-1 στον υποδοχέα TGFβR-II, ο οποίος με τη σειρά του θα ενεργοποιήσει τον ALK-1 ή τον ALK-5 [116].

Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι ο χάρτης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ συνδέσμων και υποδοχέων στην οικογένεια TGF-β είναι πολύπλοκος και όχι πλήρως διευκρινισμένος. Δεν έχουν μελετηθεί ακόμη πολλοί συνδυασμοί υποδοχέων-συνδέσμων, ενώ παράλληλα δεν έχουν ερευνηθεί σε βάθος πολλά μόρια της οικογένειας TGF-β.

ΣΥΝΔΕΣΜΟΣ	ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΤΥΠΟΥ I	ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΤΥΠΟΥ II	ΑΝΑΦΟΡΕΣ
TGF-β 1-3	ALK-1/5	TGFβR-II	(Attisano et al.,1993;Goumans et al.,2002;Wrana et al.,1992)
Activin A	ALK-4	AcvR-IIA/AcvR-IIB	(Attisano et al.,1993;Attisano et al.,1994; Macias-Silva et al.,1998)
Nodal GDF1 GDF3	ALK-4/7	AcvR-IIA/AcvR-IIB	(Andersson et al.,2006;Chen et al.,2006;Reissmann et al.,2001; Sakuma et al.,2002)
BMP2 BMP4	ALK-3/6	BMPR-II	(Koenig et al.,1994;Nishitoh et al.,1996)
BMP7	ALK-2	AcvR-IIB	(Greenwald et al.,2003; Macias-Silva et al.,1998)
AMH	ALK-2/3	AmhR-II	(Belville et al.,2005; Clarke et al.,2001; Jamin et al.,2002)
GDF8 GDF11	ALK-4/5	AcvR-IIB	(Andersson et al.,2006; Ho et al.,2006)

Πίνακας 2.2 Συνδυασμοί υποδοχέων τύπου I και τύπου II που χρησιμοποιούνται από διάφορα μέλη της οικογένειας TGF-βs.

2.6 ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΑ ΜΕΤΑΒΙΒΑΣΗ ΣΗΜΑΤΟΣ (SMAD SIGNALLING)

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η σύνδεση του μορίου ενός παράγοντα της υπερικογένειας TGF-β με έναν διαμεμβρανικό υποδοχέα **τύπου II** οδηγεί στην φωσφορυλίωση ενός υποδοχέα **τύπου I**. Με τον τρόπο αυτό σχηματίζεται ένα σύμπλεγμα (τετραμερές) που με τη σειρά του φωσφορυλιώνει μία ενδοκυττάρια πρωτεΐνη της οικογένειας **Smad**. Οι πρωτεΐνες **Smad** είναι υπεύθυνες για την μεταβίβαση του σήματος στον πυρήνα του κυττάρου. Πρόκειται για πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση.

Η ονομασία **Smad** προέκυψε από συνδυασμό της ονομασίας των πρώτων ομόλογων πρωτεϊνών **Mad** και **Sma** που ανιχνεύθηκαν στην **Drosophila melanogaster** (μύγα) και στον **Caenorhabditis elegans** (νηματοειδής σκώληκας) αντίστοιχα. Και στα δύο είδη οργανισμών ανευρίσκονται μόρια ανάλογα της οικογένειας TGF-βs των θηλαστικών. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη **Mad** είναι γνωστό ως **Mother against Dpp**. Ο Decapentaplegic (Dpp) είναι ο αντίστοιχος μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας-β στην *Drosophila melanogaster* (Sekelsky et al., 1995). Στον *C. elegans* αναγνωρίστηκαν τρεις πρωτεΐνες (*sma2*, *sma3* και *sma4*) ομόλογες με την πρωτεΐνη **Mad** στην *Drosophila melanogaster* (Savage et al., 1996).

Οι πρωτεΐνες **Smad** διακρίνονται σε τρεις κύριες κατηγορίες: α) τις **Smad** που ενεργοποιούνται από τους υποδοχείς (Receptor-activated Smad, R-Smad). Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι *Smad2*, *Smad3*, *Smad1*, *Smad5* και *Smad8*. β) τη διαμεσολαβούσα *Smad4* (co-mediator *Smad4*, Co-Smad4), η οποία είναι κοινή για όλα τα μέλη της υπερικογένειας του TGF-β και η οποία δημιουργεί ολιγομερή με τις ενεργοποιημένες R-Smad, τα οποία εν συνεχεία μεταφέρονται στον πυρήνα για

να ενεργοποιήσουν τη μεταγραφή και γ) οι ανασταλτικές Smad6 και Smad7 (Inhibitory Smad, I-Smad), οι οποίες αναστέλλουν τη δράση των R-Smads παρεμποδίζοντας την αλληλεπίδρασή τους με τον υποδοχέα.

Πιο αναλυτικά, οι υποδοχείς TGF- β και οι υποδοχείς ακτιβίνης φωσφορυλιώνουν τις πρωτεΐνες Smad2 και Smad3, ενώ οι υποδοχείς BMP φωσφορυλιώνουν τις πρωτεΐνες Smad1, Smad5 και Smad8. Μόλις μία από τις παραπάνω πρωτεΐνες Smad φωσφορυλιωθεί, αποδεσμεύεται από τον υποδοχέα τύπου I και συνδέεται με την πρωτεΐνη Smad4 σχηματίζοντας έτσι ένα σύμπλεγμα το οποίο μεταφέρεται στον πυρήνα του κυττάρου. Στον πυρήνα το σύμπλεγμα των Smad συνδέεται σε ειδικές θέσεις του DNA και κάτω από την επίδραση άλλων ρυθμιστικών πρωτεϊνών, ενεργοποιεί συγκεκριμένα γονίδια-στόχους επάγοντας την μεταγραφή του DNA.

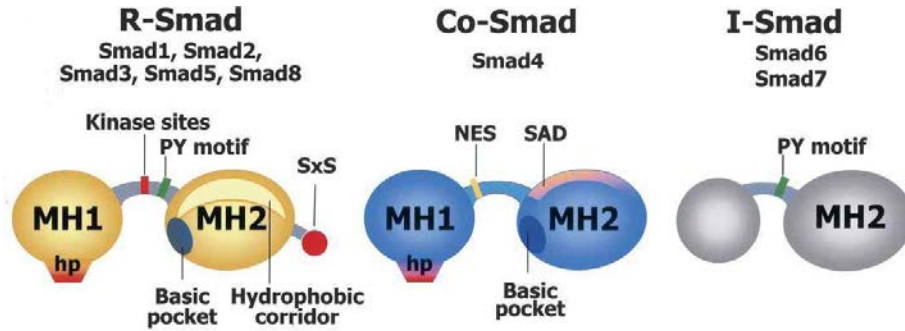
(Εικόνα 2.6)

Υπάρχουν και πρωτεΐνες Smad που δρουν ανασταλτικά. Πιο συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες Smad6 και Smad7 συνδέονται με τον υποδοχέα τύπου I χωρίς να φωσφορυλιωθούν. Με αυτό τον τρόπο εμποδίζουν τα άλλα μόρια Smad να ενωθούν μαζί του. Το αποτέλεσμα της αναστολής αυτής είναι να μπλοκάρεται η περαιτέρω μεταβίβαση σήματος στον πυρήνα. Μόλις το φωσφορυλιωμένο σύμπλεγμα των Smads μεταφερθεί στον πυρήνα αλληλεπιδρά με ένα πλήθος ποικίλων μεταγραφικών παραγόντων ρυθμίζοντας την έκφραση των γονιδίων-στόχων. Το γεγονός αυτό πιθανόν εξηγεί την πληθώρα των διαφορετικών λειτουργικών αποκρίσεων της οικογένειας TGF- β . Ο πρώτος μεταγραφικός παράγοντας που βρέθηκε να αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες Smad ήταν ο FoxH1 ή FAST-1 (Chen et al., 1996), ο οποίος αλληλεπιδρά με το σύμπλεγμα ActR-II/ALK4/Smad2. Από τότε έχουν ανιχνευθεί πολλοί άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες

που συμμετέχουν στην οδό των TGF-βs (TCF, NF-κB, Mix, Gli, AP-1, Bzip, RUNX, Sp1, IRF-7, bHLH).

Ανεξάρτητα όμως από τις Smad-εξαρτώμενες οδούς σηματοδότησης, οι TGF-βs και οι BMPs ενεργοποιούν και μία σειρά κινασών γνωστές ως MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinases). Πρόκειται για μία οικογένεια κινασών τύπου σερίνης/θρεονίνης που περιλαμβάνει τρεις ομάδες: ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase), p38 MAPK και JNK (c-Jun N-terminal Kinases) και παίζουν επίσης ρυθμιστικό ρόλο στην ενδοκυττάρια μεταβίβαση σήματος στον πυρήνα.

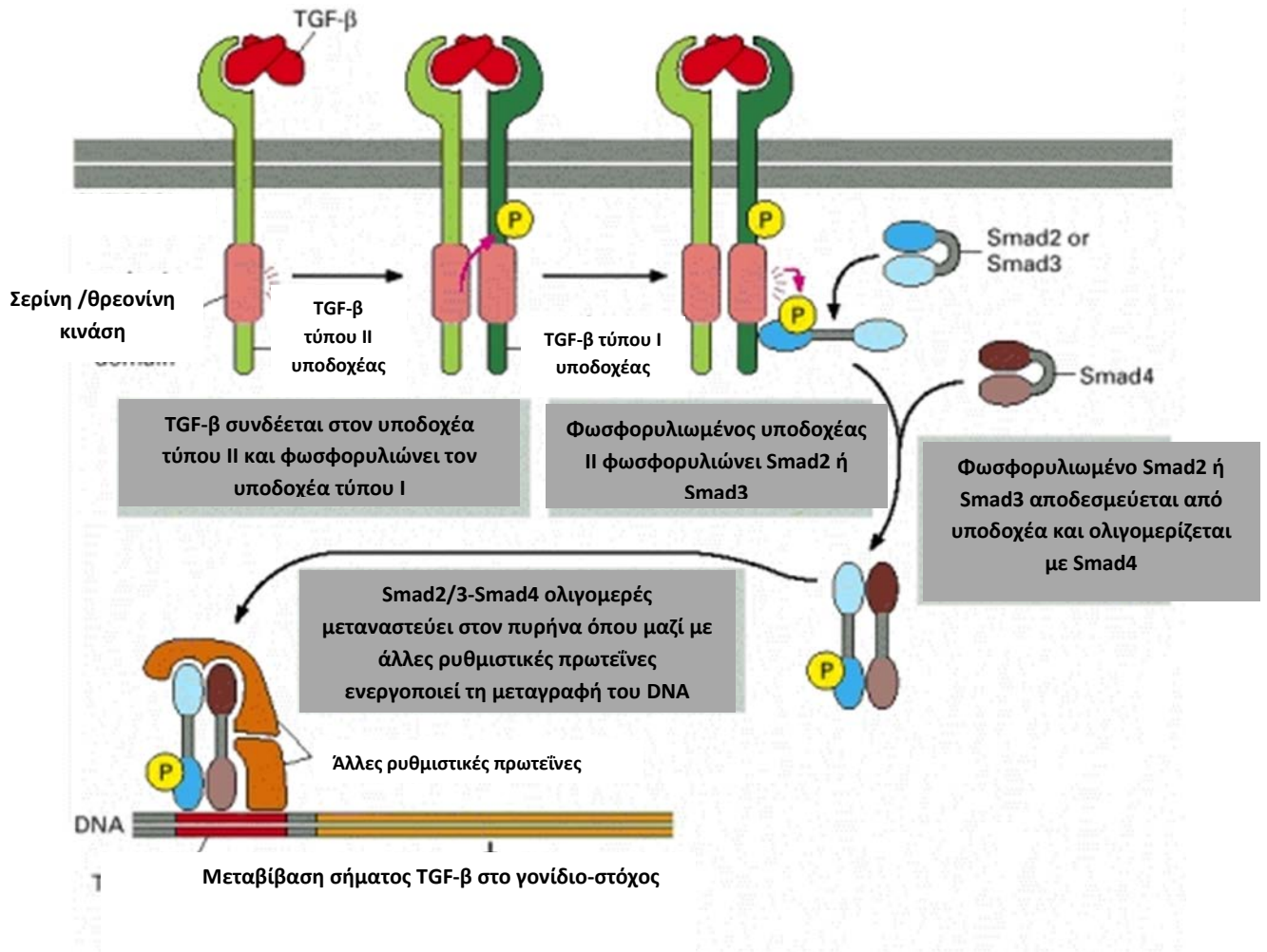
Οποιαδήποτε, λοιπόν, διαταραχή στη μεταβίβαση του σήματος διαμέσου της οδού TGF-β μέχρι τον πυρήνα, θα έχει ως αποτέλεσμα διαταραχή της μεταγραφής των γενετικών πληροφοριών και επομένως τη διαταραχή των ανάλογων κυτταρικών διεργασιών, όπως είναι για παράδειγμα ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η ανάπτυξη και η απόπτωση.



Εικόνα 2.3 Δομικά χαρακτηριστικά των SMAD πρωτεϊνών. Οι SMAD πρωτεΐνες αποτελούνται από δυο καλά συντηρημένες σφαιρικές περιοχές - τον τομέα MH1 και τον τομέα MH2 - και μια μεταβλητή συνδετική περιοχή. Όσον αφορά τις R-Smads και τη Smad4, ο MH1 τομέας περιέχει δομή φουρκέτας (*β-hairpin*) για τη σύνδεση στο DNA. Οι I-Smads δεν έχουν MH1 τομέα. Η συνδετική περιοχή των R-Smads περιέχει πολλαπλές θέσεις φωσφορυλίωσης για τις MAPKs, CDKs καθώς και άλλες κινάσες. Στην επιφάνεια του MH2 τομέα στις R-SMADs, ένα σύνολο υδροφοβικών περιοχών αποτελεί σημείο ικανό για πολλαπλές αλληλεπιδράσεις.

	Σύνδεσμος	Υποδοχέας τύπου II	Υποδοχέας τύπου I	Συνοποδοχέας	Smad
TGFβ	TGF-β1,2,3	TβR-II	TβR-I	Betaglycan	Smad2,3 with Smad4
	Activin-A,B,C	ActR-IIA,B	ALK4		
	Myostatin	ActR-IIA,B	ALK4		
	Nodal	ActR-IIA,B	ALK4,7	Cripto	
	GDF-1,3	ActR-IIA,B	ALK4,7	Cripto	
	Inhibin	ActR-IIA,B	—	Betaglycan	
	Lefty-1,2	ActR-IIA,B	—	Cripto	
BMP	BMP-2,4	BMPR-II, ActR-II	BMPR-IA,B	RMG-a,b,c	Smad1,5, 8 with Smad4
	BMP-5,6,7	BMPR-II, ActR-II	BMPR-IA, ALK2		
	BMP-9,10	BMPR-II, ActR-II	ALK1	Endoglin	
	GDF-5,6,7	BMPR-II, ActR-II	BMPR-IA,B		
	AMH/MIS	AMHR-II	BMPR-IA, ALK2		

Εικόνα 2.4 Συνοπτικό διάγραμμα αλληλεπιδράσεων συνδέτη-υποδοχέων-συνοποδοχέων-SMADs (*ligand-receptors-coreceptors-SMADs*). Ο συνδυασμός των αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στους δύο τύπους υποδοχέων καθορίζει τη μεταγωγή του σήματος.



Εικόνα 2.5 Σχηματική απεικόνιση σύνδεσης TGF-βs με υποδοχείς και μεταβίβαση σήματος ενδοκυττάρια.

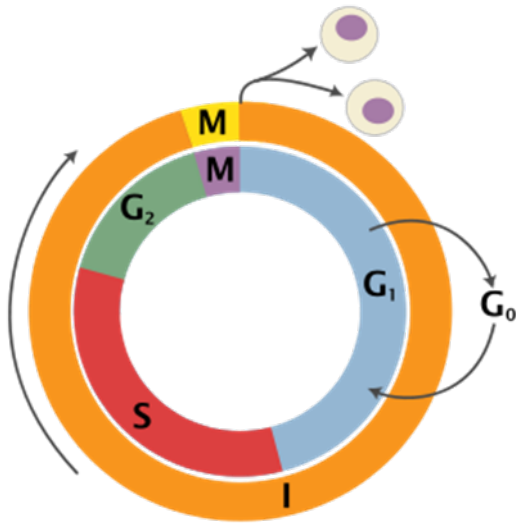
2.7 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ TGF-βs

Τα μέλη της οικογένειας των TGF-βs δρουν είτε ως ορμόνες, είτε ως τοπικοί διαμεσολαβητές σε διάφορα είδη κυττάρων και ιστών, ρυθμίζοντας μια πληθώρα λειτουργιών. Κύριες λειτουργίες τους αποτελούν ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η απόπτωση κυττάρων, η εμβρυική ανάπτυξη ιστών, η ρύθμιση ανοσολογικών μηχανισμών και η καρκινογένεση.

Ίσως μία από τις πιο σημαντικές λειτουργίες των TGF-βs είναι η ικανότητά τους να διακόπτουν τη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου.

Κατάσταση	Φάση	Γεγονότα
Ηρεμίας	G ₀	Παύση κυτταρικού κύκλου
Μεσόφαση	G ₁	Μεταβολικά ενεργής φάση, Διπλασιασμός οργανιδίων, αλλά όχι DNA. Το σημείο ελέγχου G ₁ (checkpoint) εξασφαλίζει ότι όλα είναι έτοιμα για την επόμενη φάση.
Μεσόφαση	S	Αντιγραφή DNA
Μεσόφαση	G ₂	Κυτταρική αύξηση, Συνέχιση σύνθεσης πρωτεϊνών. Το σημείο ελέγχου G ₂ (checkpoint) εξασφαλίζει ότι όλα είναι έτοιμα για την είσοδο στη φάση της μίτωσης.
Μίτωση	M	Μίτωση και διαίρεση κυττάρου

Πίνακας 2.3 Περιγραφή φάσεων κυτταρικού κύκλου.



Εικόνα 2.6 Σχηματική απεικόνιση φάσεων του κυτταρικού κύκλου. G_0 (κατάσταση ηρεμίας), G_1 - S - G_2 (μεσόφαση), M (μίτωση), S (αντιγραφή DNA).

Πιο αναλυτικά, η αλληλουχία των γεγονότων του κυτταρικού πολλαπλασιασμού αποτελεί ένα βιοχημικό λειτουργικό μονοπάτι. Το προϊόν της μίας αντίδρασης χρησιμεύει ως απαραίτητο υπόβαθρο για την επόμενη. Ο κύκλος της ρύθμισης της παραπάνω διαδικασίας περιλαμβάνει μία σειρά από σημεία ελέγχου που επιτρέπουν την προσπέλαση μόνο εφόσον πραγματοποιηθούν σημαντικά γεγονότα του κύκλου. Για μία πετυχημένη κυτταρική διαίρεση απαιτείται μία πειθαρχημένη μετάβαση από τη μία φάση του κυτταρικού κύκλου στην άλλη. Σημαντικά γεγονότα πρέπει να ολοκληρώνονται πριν αρχίσουν κάποια άλλα. Για παράδειγμα, η έναρξη της μιτωτικής διαδικασίας προ της ολοκλήρωσης της αντιγραφής του DNA θα οδηγήσει προφανώς σε βλάβη του κυττάρου.

Οι δύο πλευρές, λοιπόν, του ρυθμιστικού κύκλου είναι ο εσωτερικός και ο εξωτερικός. Το εσωτερικό μονοπάτι είναι υπεύθυνο για τον ακριβή έλεγχο των γεγονότων του κυτταρικού κύκλου. Η διάρκεια των φάσεων S και G_2 του

κυτταρικού κύκλου ελάχιστα επηρεάζεται από τις συνθήκες του περιβάλλοντος και μπορεί να θεωρηθεί ως σταθερό χαρακτηριστικό κάθε κυτταρικού τύπου αφού παραμένει σχεδόν πάντα σταθερή (6-10 ώρες για S και 2-5 ώρες για G₂). Εφόσον η διάρκεια των φάσεων S, G₂ και M είναι σχετικά αμετάβλητη, οι μετατροπές μεταξύ των φάσεων ελέγχονται κυρίως από το εσωτερικό ρυθμιστικό μονοπάτι. Το μήκος της φάσης G₁ από την άλλη πλευρά είναι μεταβλητό, επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες φυσικούς ή περιβαλλοντικούς και διαφέρει σημαντικά μεταξύ των διάφορων κυτταρικών τύπων, καθώς και μέσα στον ίδιο κυτταρικό πληθυσμό. Το εξωτερικό ρυθμιστικό μονοπάτι, λοιπόν, ενεργεί σαν απάντηση σε εξωτερικούς ή περιβαλλοντικούς παράγοντες ή σε αναδυόμενες ανωμαλίες του κυτταρικού κύκλου.

Ανάλογα με τις συνθήκες, η φάση G₁ διαρκεί ημέρες, μήνες ή και χρόνια. Η ρύθμιση της διάρκειας του κυτταρικού κύκλου επιτελείται σε κάποιο ειδικό σημείο προς το τέλος της φάσης G₁. Αν ξεπεραστεί το σημείο αυτό (σημείο περιορισμού, Restriction point), τότε το κύτταρο θα ολοκληρώσει τον κύκλο ανεξάρτητα από τις συνθήκες του περιβάλλοντος. Το πέρασμα από το σημείο ελέγχου απαιτεί την ενεργοποίηση ενδοκυτταρικών ενζύμων γνωστών ως κινάσες εξαρτώμενες από κυκλίνες (CDKs).

Επιπλέον, τουλάχιστον τρεις αυξητικοί παράγοντες απαιτούνται διαδοχικά για τη μετάβαση από το σημείο αυτό με αποτέλεσμα την έναρξη του πολλαπλασιασμού των ινοβλαστών: platelet-derived growth factor (PDGF), epidermal growth factor (EGF), insulin-like growth factor (IGF-1).

Ο εξωκυττάριος παράγων TGF-β έχει το αντίθετο αποτέλεσμα. Εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων αναστέλλοντας την ενεργοποίηση των CDKs που είναι απαραίτητες για την διέλευση από το σημείο περιορισμού (G_1R) και την έναρξη της φάσης S. Πιο συγκεκριμένα, προάγει την παραγωγή **αναστολέων των κινασών εξαρτώμενων από κυκλίνες (CDKIs)**. Οι αναστολείς αυτοί χωρίζονται σε δύο ομάδες: p21, p27, p57 και p15, p16, p18, p19 αντίστοιχα και, όταν ενεργοποιηθούν, εμποδίζουν τη μετάβαση από τη φάση G_1 στην S . Συμπερασματικά, η παραγωγή του TGF-β μπορεί να κρατήσει τα επίπεδα πολλαπλασιασμού καρκινικών, αλλά και φυσιολογικών κυττάρων σε χαμηλά επίπεδα διατηρώντας μία ισορροπία μεταξύ πολλαπλασιασμού και απόπτωσης .

2.8 TGF-βs ΚΑΙ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΑΡΤΗΡΙΑΚΗ ΥΠΕΡΤΑΣΗ

Οι παράγοντες TGF-β και BMP (κυρίως BMP-2,-4,-6,-7) ασκούν πολλαπλές επιδράσεις στους διάφορους κυτταρικούς τύπους του αγγειακού τοιχώματος (ενδοθηλιακά κύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα, μακροφάγα, λεμφοκύτταρα). Πιο συγκεκριμένα, η έκφραση των TGF-β και BMP κάτω από φυσιολογικές συνθήκες προκαλεί αναστολή του πολλαπλασιασμού των λείων μυϊκών κυττάρων και της ευαισθησίας στην απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων του τοιχώματος των μικρών πνευμονικών αρτηριών. Η δυσλειτουργία των υποδοχέων τους εμποδίζει την έκφραση αυτών των κυτταροκινών και οδηγεί σε αντίστροφα αποτελέσματα, δηλαδή αυξημένο πολλαπλασιασμό λείων μυϊκών κυττάρων και αυξημένη απόπτωση ενδοθηλιακών, προάγοντας έτσι την εμφάνιση ΠΑΥ. Γονιδιακές μεταλλάξεις μπορεί να είναι υπεύθυνες για την διαταραχή της έκφρασης αυτών

των υποδοχέων και των ποικίλων οδών σηματοδότησης στις οποίες συμμετέχουν. Για παράδειγμα, στο 80% των περιπτώσεων με οικογενή ιδιοπαθή ΠΑΥ έχουν ανιχνευθεί μεταλλάξεις του υποδοχέα BMPR-II. Επίσης, ανάλογες μεταλλάξεις έχουν παρατηρηθεί με τους υποδοχείς ALK1 και TGFβR-II. Από την άλλη, σε άλλες μελέτες παρατηρείται αύξηση της έκφρασης των τριών ισομορφών του TGF-β, των υποδοχέων τους και των οδών σηματοδότησής τους (TGF-β signaling). Προφανώς υπάρχει διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των οδών σηματοδότησης του παράγοντα και όχι απώλεια της λειτουργίας τους [39, 47].

Πιο αναλυτικά, σε φυσιολογικές συνθήκες, η σύνδεση του συνδέσμου TGF-β (1,2 ή 3) με έναν υποδοχέα τύπου II της κυτταρικής μεμβράνης (TGFR-β II) προκαλεί περαιτέρω ενεργοποίηση ενός υποδοχέα τύπου I (ALK1 ή ALK5) και φωσφορύλιωση των ενδοκυττάρων πρωτεϊνών Smad1/5/8 ή Smad2/3 αντίστοιχα, οι οποίες αποδεσμεύονται από τους υποδοχείς και συνδεόμενες με τη Smad4 σχηματίζουν σύμπλεγμα το οποίο μεταφέρεται στον πυρήνα του κυττάρου. Εκεί αλληλεπιδρούν με άλλες ρυθμιστικές πρωτεΐνες, όπως είναι η Ras, η MMK4-Jun κινάση και η MMK3-p38 και διεγείρουν συγκεκριμένα γονίδια-στόχους επάγοντας τον πολλαπλασιασμό ή την απόπτωση των λείων μυϊκών κυττάρων και των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων [10].

Ο TGF-β1 μέσω των υποδοχέων ALK-1 και ALK-5 ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό, την απόπτωση και την μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η ενεργοποίηση της οδού TGF-β1/ALK-1/ Smad1/5/8 διεγείρει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την μετανάστευση, ενώ η ενεργοποίηση της οδού TGF-β1/ALK-5/Smad2/3 αναστέλλει τις ίδιες λειτουργίες. Παρατηρείται μία πολύπλοκη αλληλεπίδραση στην ισορροπία

μεταξύ των υποδοχέων ALK-1 και ALK-5. Ανεπάρκεια ALK-5 όχι μόνο επηρεάζει την οδό TGF-β1/ALK-5, αλλά μειώνει και την απόκριση της οδού TGF-β1/ALK-1, γεγονός που καταδεικνύει ότι ο ALK-5 είναι απαραίτητος για την βέλτιστη ενεργοποίηση του ALK-1 παρόλο που ασκούν αντίθετες δράσεις [46]. Οποιαδήποτε μεταβολή της ισορροπίας μεταξύ των δύο αυτών οδών σηματοδότησης μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη ΠΑΥ λόγω μειωμένης απόπτωσης και αυξημένου πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων.

Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι ο παράγοντας BMP-4 προάγει τη διαφοροποίηση των μυοϊνοβλαστών εμβρυϊκού πνεύμονα σε λεία μυϊκά κύτταρα και αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό τους. Αδυναμία σύνδεσης του παράγοντα BMP-4 με τους υποδοχείς BMPR-II/IA προάγει τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών και μυοϊνοβλαστών με αποτέλεσμα την πάχυνση του μέσου και έσω χιτώνα του τοιχώματος των πνευμονικών αρτηριών και την ανάπτυξη ΠΑΥ.

Στην ΠΑΥ παρατηρείται μειωμένη έκφραση των καναλιών K^+ , η οποία οδηγεί σε εισροή Ca^{++} ενδοκυττάρια, προάγοντας έτσι την αγγειοσύσπαση και την υπερπλασία των λείων μυϊκών κυττάρων. Η δυσλειτουργία του υποδοχέα BMPR-II σχετίζεται άμεσα με την έκφραση των ιόντων καλίου (K^+). Η αυξημένη έκφρασή τους θεωρείται απαραίτητη για τη μεσολάβησή τους στη σχετιζόμενη με την οδό του BMP απόπτωση των λείων μυϊκών κυττάρων.

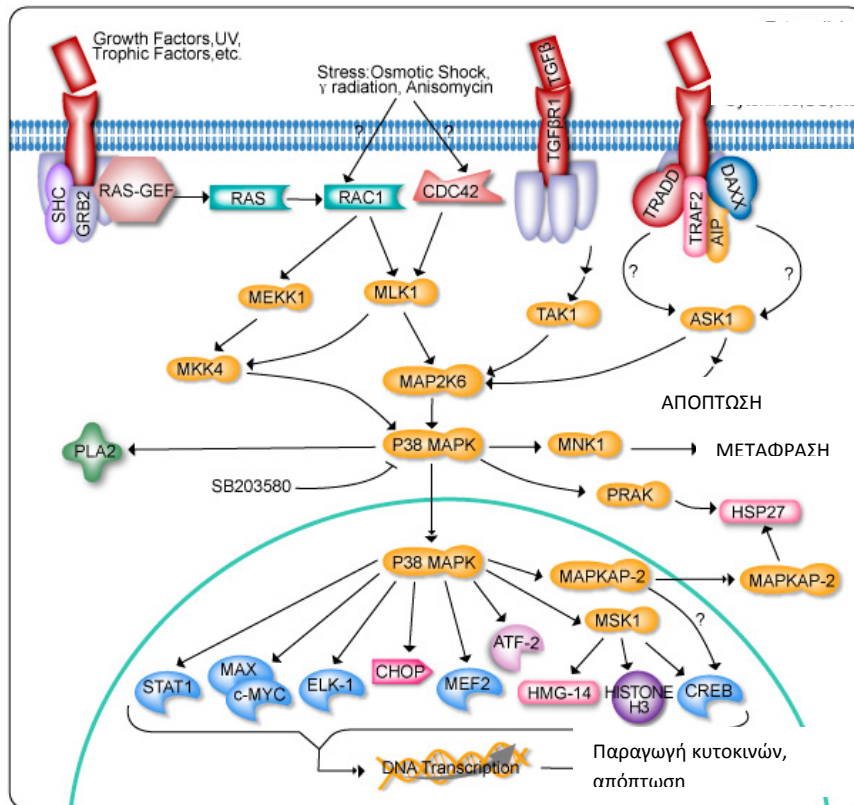
Συμπερασματικά, η αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας των συνδέσμων της οικογένειας TGF-β με παράλληλη μείωση της λειτουργικής έκφρασης των αντίστοιχων υποδοχέων τους BMPR-II/IA μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη ΠΑΥ και μπορεί να οφείλεται σε μεταλλάξεις των συγκεκριμένων υποδοχέων. Αυτές οι μεταλλάξεις

των υποδοχέων BMPRII/IA οδηγούν σε διαταραχή της έκφρασής τους στους διάφορους τύπους κυττάρων και πιο συγκεκριμένα στα λεία μυϊκά και ενδοθηλιακά κύτταρα όσον αφορά την ΠΑΥ.

Επιπλέον, οι μεταλλάξεις αυτές μπορεί να αφορούν είτε το εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα, είτε το διαμεμβρανικό τμήμα του, είτε το ενδοκυττάριο τμήμα του και να επηρεάζουν την αλληλεπίδρασή του με τον συνυποδοχέα BMPRIA. Ως γνωστόν, η αλληλεπίδραση των δύο τύπων υποδοχέων BMPRII και BMPRIA σηματοδοτεί την ενεργοποίηση περαιτέρω σηματοδοτικών οδών πιο γνωστές από τις οποίες αποτελούν οι pSmad1/5, p38(MAPKs) , pERK/JNK (Εικόνες 2.7). Οι οδοί αυτοί μεταφέρουν το σήμα στον πυρήνα του κυττάρου ενεργοποιώντας διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες. Επομένως, μεταλλάξεις των υποδοχέων επηρεάζουν και τις οδούς αυτές.

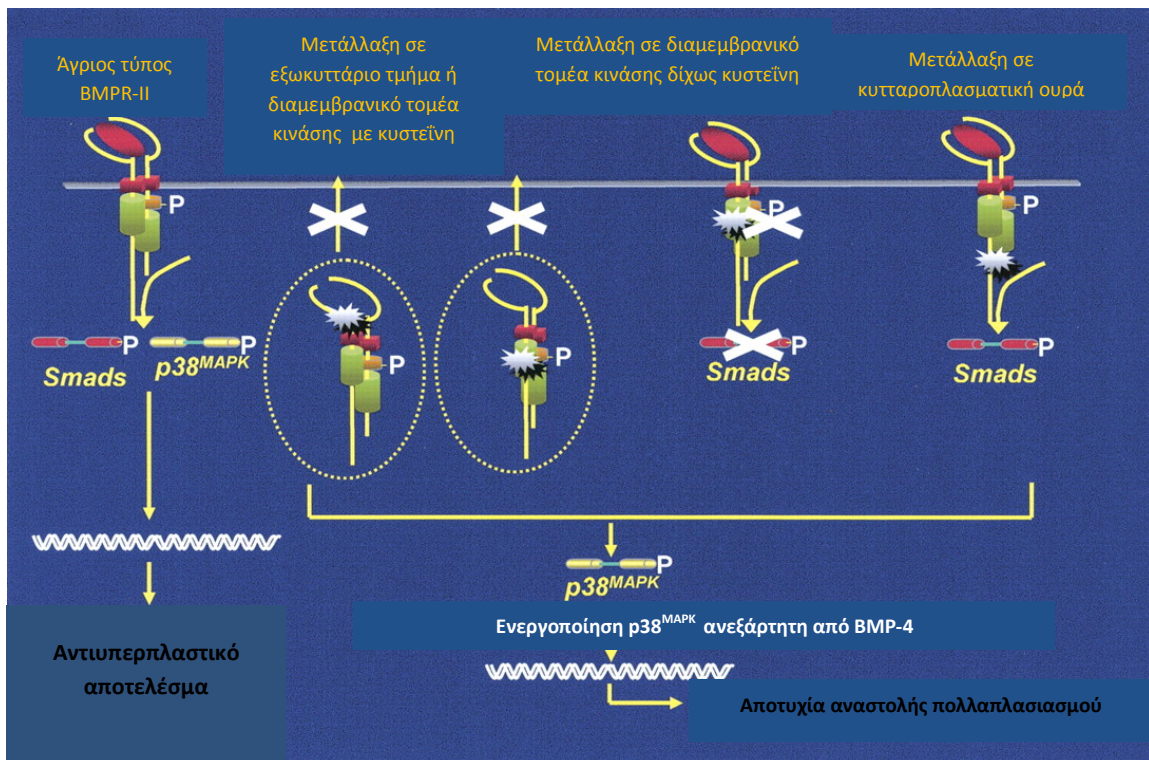
Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματα της επίδρασης των διαφόρων τύπου μεταλλάξεων του υποδοχέα BMPR-II ποικίλουν. Ένα παράδειγμα αποτελεί η αποτυχία ενεργοποίησης της οδού BMP/Smad από τον παράγοντα BMP-4 λόγω μεταλλάξεων του υποδοχέα του[41]. Μεταλλάξεις του BMPR-II που αφορούν το εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα ή τη διαμεμβρανική περιοχή (kinase domain) και οφείλονται σε υποκατάσταση αμινοξέων κυστεΐνης, αναστέλλουν την οδό BMP/Smad και εμποδίζουν τη σύνδεση του υποδοχέα στην κυτταρική επιφάνεια. Αντίθετα, μεταλλάξεις του BMPR-II που αφορούν την διαμεμβρανική περιοχή ή το ενδοκυττάριο τμήμα του (κυτταροπλασματική ουρά) και δεν έχουν σχέση με υποκατάσταση αμινοξέων κυστεΐνης, συνδέονται με την κυτταρική επιφάνεια, αλλά αποτυγχάνουν να ενεργοποιήσουν την οδό BMP/Smad. Τέλος, μεταλλάξεις που

αφορούν μόνο το ενδοκυττάριο τμήμα συνδέονται με την κυτταρική επιφάνεια, χωρίς να αναστέλλουν την οδό BMP/Smad. Αποτέλεσμα των παραπάνω μεταλλάξεων είναι η ενεργοποίηση της κινάσης p38 MAPK ανεξάρτητα από τη συμβολή του παράγοντα BMP-4 και η αποτυχία αντιυπερπλαστικής επίδρασης στα λεία μυϊκά κύτταρα (Εικόνα 2.8).



Εικόνα 2.7 Η κυτταρική απάντηση σε εξωτερικά ερεθίσματα περιλαμβάνει την ενεργοποίηση μίας σειράς κινασών γνωστές ως MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinases). Πρόκειται για μία οικογένεια κινασών τύπου σερίνης/θρεονίνης που περιλαμβάνει τρεις ομάδες: ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase), p38 MAPK και JNK (c-Jun N-terminal Kinases). Η ενεργοποίηση της ομάδας p38 MAPKs παίζει

σημαντικό ρόλο σε πλήθος λειτουργιών (παραγωγή κυτοκινών, κυτταρική διαφοροποίηση, απόπτωση, ρύθμιση μεταγραφής, ανταπόκριση σε διάφορες καταστάσεις stress). Πολλοί αυξητικοί παράγοντες, ανάμεσά τους και ο TGF- β , ενεργοποιούν τις MAPKs, αλλά και πολλές από αυτές μπορούν να αναστείλουν κάποιους αυξητικούς παράγοντες.

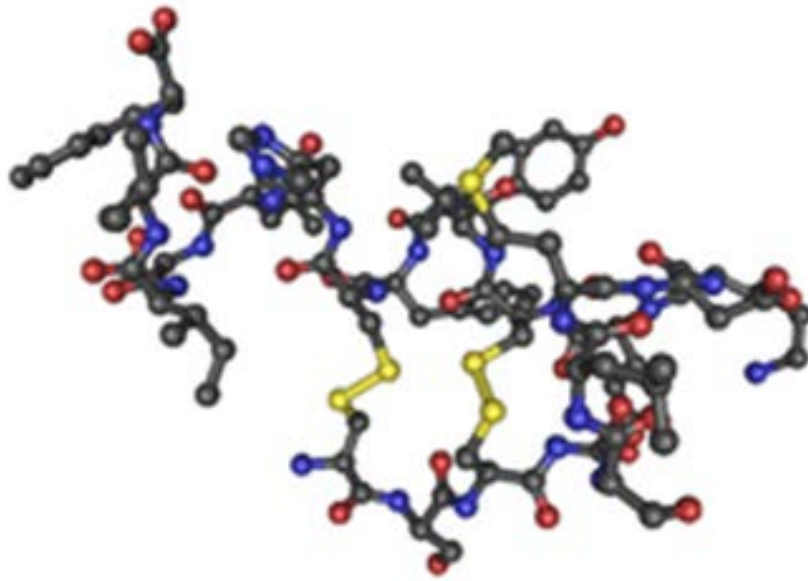


Εικόνα 2.8 Τύποι μεταλλάξεων του υποδοχέα BMPR-II ανάλογα με το τμήμα στο οποίο επιδρούν.

3. ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΗ-1 ΚΑΙ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΕΣ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΤΗΣ

3.1 ΓΕΝΙΚΑ

Το ενδοθήλιο των αγγείων αποτελεί σημαντική πηγή αγγειοδραστικών ουσιών και μείζονα ρυθμιστή του αγγειακού τόνου. Στις αγγειοσυσταλτικές ουσίες του ενδοθηλίου περιλαμβάνεται και η οικογένεια των ενδοθηλινών. Η πρώτη αναφορά για την έκκριση αγγειοσυσπαστικών ουσιών από τα ενδοθηλιακά κύτταρα έγινε από τους De Mey και Vanhoutte το 1982 και λίγα χρόνια αργότερα περιγράφηκε αρχικά το μόριο της ενδοθηλίνης από τον Hickey [59]. Η ταυτοποίηση του ισχυρότατου αυτού ενδογενούς αγγειοσυσταλτικού παράγοντα πραγματοποιήθηκε το 1988 από τον Yanagisawa ο οποίος απομόνωσε το πεπτίδιο της ενδοθηλίνης από καλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων αορτής χοίρου [62]. Στον άνθρωπο υπάρχουν τρεις ισομορφές της ενδοθηλίνης που ορίζονται ως ET-1, ET-2 και ET-3 και δύο τύποι υποδοχέων ET_A και ET_B. Τα τελευταία χρόνια έχουν παραχθεί ουσίες οι οποίες ανταγωνίζονται τη δράση της ενδοθηλίνης. Πρόκειται κυρίως για ανταγωνιστές των υποδοχέων της που δρουν αγγειοδιασταλτικά. Η μελέτη της φυσιολογίας και της παθοφυσιολογίας της ενδοθηλίνης συνεχίζεται με ταχείς ρυθμούς. Υπάρχει έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον κυρίως για τους αναστολείς των υποδοχέων της και την χρήση τους στη θεραπευτική αντιμετώπιση καρδιαγγειακών παθήσεων όπως υπέρταση και καρδιακή ανεπάρκεια. Η συμβολή τους άλλωστε στην κλινική βελτίωση ασθενών με πνευμονική αρτηριακή υπέρταση είναι αποδεδειγμένη.

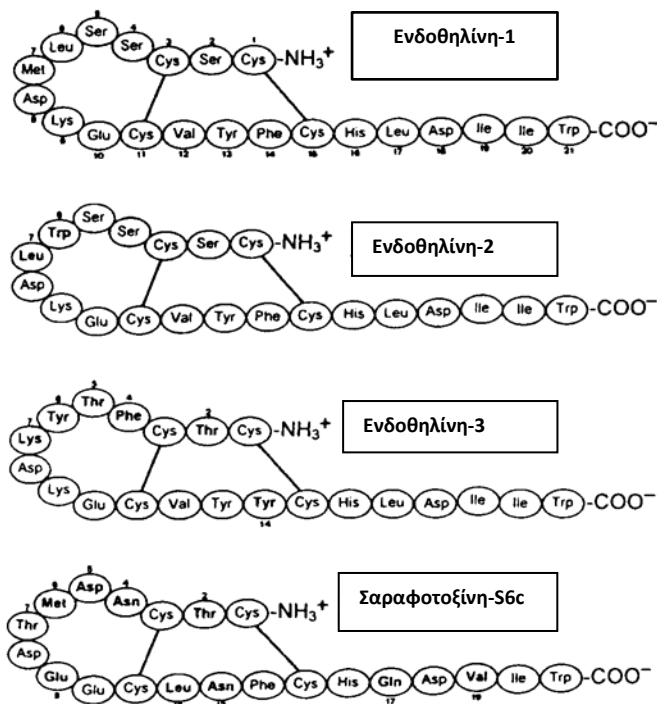


Εικόνα 3.1 Μοριακή δομή ενδοθηλίνης.

3.2 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΩΝ

Υπάρχουν τρεις ισομορφές της ενδοθηλίνης ET-1, ET-2 και ET-3 που κωδικοποιούνται από τρία ξεχωριστά γονίδια που βρίσκονται στα χρωμοσώματα 6, 1 και 20 αντίστοιχα (Bloch et al., 1989a,b,1991; Hoehe et al., 1993). Πρόκειται για πεπτίδια αποτελούμενα από 21 αμινοξέα με ισχυρή αγγειοσυσπαστική δράση. Η αλληλουχία των αμινοξέων των ισομορφών ET-1 και ET-2 είναι όμοια, ενώ της ET-3 διαφέρει σε 6 αμινοξέα. Η κατανομή των τριών ισομορφών στους διάφορους ιστούς του ανθρώπινου οργανισμού διαφέρει σημαντικά.

Σχεδόν αμέσως μετά την πρώτη δημοσίευση για την ενδοθηλίνη, απομονώθηκε από το δηλητηριώδες φίδι *Actrapsis engaddensis*, το πεπτίδιο της σαραφοτοξίνης, το οποίο αποτελείται από 21 αμινοξέα, η αλληλουχία των οποίων παρουσιάζει αξιοσημείωτη ομοιότητα με την ενδοθηλίνη (Kloog and Sokolovsky, 1989)[60] (Εικόνα 3.2).



Εικόνα 3.2 Οι αλληλουχίες των αμινοξέων σε ενδοθηλίνες και σαραφοτοξίνη.

Τα γονίδια της ενδοθηλίνης εκφράζονται σε διάφορα όργανα και ιστούς. Η ET-1 παράγεται κυρίως στο καρδιαγγειακό σύστημα, η ET-2 παράγεται κυρίως στους νεφρούς και το γαστρεντερικό σύστημα και λιγότερο στο μυοκάρδιο, στη μήτρα και τον πλακούντα, ενώ η ET-3 κυκλοφορεί στο πλάσμα και ανευρίσκεται κυρίως στο νευρικό σύστημα (Πίνακας 3.1). Η ενδοθηλίνη-1 (ET-1) είναι η μόνη που παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων και εμφανίζει τη μεγαλύτερη αγγειοσυσπαστική ισχύ.

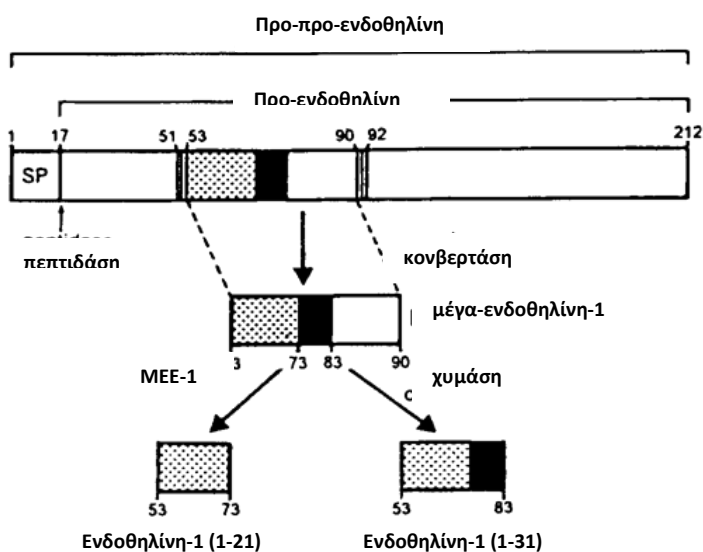
ET-1	ET-2	ET-3
Ενδοθηλιακά κύτταρα	Επιθηλιακά νεφρών	κύτταρα Νευρώνες
Λεία μυϊκά κύτταρα αγγείων	Στρωματικά κύτταρα ΓΕΣ	Αστροκύτταρα
Επιθηλιακά κύτταρα		Επιθηλιακά πνευμόνων
Ηπατοκύτταρα		Επιθηλιακά νεφρών
Νευρώνες		Στρωματικά ΓΕΣ
Αστροκύτταρα		

Πίνακας 3.1

Σημεία παραγωγής ενδοθηλινών.

3.3 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΗΣ-1 ΚΑΙ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΤΗΣ

Η ενδοθηλίνη-1 παράγεται αρχικά ως μία μεγάλη πρόδρομη πεπτιδική αλυσίδα, την προ-προ-ενδοθηλίνη (Inoue et al., 1989), αποτελούμενη από 212 αμινοξέα. Αυτή διασπάται από μία καρβόξυ-πεπτιδάση σε προ-ενδοθηλίνη, η οποία με τη σειρά της διασπάται από μία διφασική ενδοπεπτιδάση (κονβεργτάση) απελευθερώνοντας έναν ανενεργό πρόδρομο παράγοντα (39 αμινοξέων), την μέγα-ενδοθηλίνη (big-ET-1). Η τελευταία μετατρέπεται σε ένα ενεργό πεπτίδιο (21 αμινοξέων), την ενδοθηλίνη-1, κάτω από την επίδραση του μετατροπτικού ενζύμου της ενδοθηλίνης-1 (ECE-1: Endothelin Converting Enzyme-1) που ανήκει σε μία οικογένεια μεταλλοπρωτεασών εξαρτώμενων από ψευδάργυρο[71]. Υπάρχουν 7 ισομορφές του μετατροπτικού ενζύμου της ενδοθηλίνης (ECE-1a, ECE-1b, ECE-1c, ECE-1d, ECE-2a, ECE-2b, ECE-3). Οι ισομορφές ECE-1a και ECE-1c βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων, ενώ οι ισομορφές ECE-1b και ECE-1d βρίσκονται ενδοκυττάρια. Και οι τέσσερις ισομορφές συμβάλουν στην ενεργοποίηση της ενδοθηλίνης-1.



Εικόνα 3.3 Βιοσύνθεση ET-1 από προ-προ-ET-1. ΜΕΕ-1=Μετατροπτικό ένζυμο ενδοθηλίνης-1.

Η ενδοθηλίνη-1 συντίθεται κυρίως στα ενδοθηλιακά κύτταρα και μεταφέρεται στα υποκείμενα λεία μυϊκά κύτταρα ασκώντας αγγειοσυσπαστική δράση. Επειδή πρόκειται για υδρόφιλο μόριο και επομένως ανίκανο να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη, συνδέεται με ειδικές μεμβρανικές πρωτεΐνες-υποδοχείς προκειμένου να μεταφερθεί και να ασκήσει τη δράση του. Υπάρχουν δύο τύποι υποδοχέων, οι ET_A και οι ET_B. Οι υποδοχείς αυτοί είναι μέλη μίας υπεροικογένειας υποδοχέων συζευγμένων με G-πρωτεΐνες (guanine-nucleotide-binding G proteins).

Ο ET_A υποδοχέας αποτελείται από 427 αμινοξέα και συνδέεται με τις ενδοθηλίνες με την εξής συγγένεια: ET-1>ET-2>ET-3. Ανευρίσκεται κυρίως στα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων. Ο ET_B υποδοχέας αποτελείται από 442 αμινοξέα, έχει την ίδια συγγένεια και για τις τρεις ενδοθηλίνες και ανευρίσκεται κυρίως στα ενδοθηλιακά κύτταρα, αλλά και αλλού, όπως σε λεία μυϊκά κύτταρα, μακροφάγα και αιμοπετάλια. Γενικά, η κατανομή των υποδοχέων ενδοθηλίνης ποικίλλει ανάμεσα στους ιστούς.

Οι ET_A υποδοχείς μεσολαβούν για την εκδήλωση της αγγειοσυσπαστικής δράσης της

ET-1, της κυτταρικής υπερτροφίας και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ενώ οι ET_B σχετίζονται με την αγγειοδιαστολή (προάγουν την απελευθέρωση αγγειοδιασταλτικών παραγόντων) και την κάθαρση της ενδοθηλίνης-1. Πιο συγκεκριμένα, η σύνδεση της ενδοθηλίνης-1 με τους ET_A οδηγεί σε ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης-C, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό 1,4,5-τριφωσφορικής ινοσιτόλης και διακυλ-γλυκερόλης. Η πρώτη προκαλεί αύξηση του ενδοκυττάρου Ca⁺⁺ των λείων μυϊκών κυττάρων και επακόλουθη αγγειοσύσπαση. Η δεύτερη ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση C, η οποία αποτελεί μεσολαβητή της μιτογόνου

δράσης της ET-1. Η αγγειοσύσπαση επιμένει ακόμη και μετά την αποδέσμευση της ET-1 από τον υποδοχέα, ίσως γιατί η συγκέντρωση του ενδοκυττάρου Ca^{++} συνεχίζει να παραμένει αυξημένη.

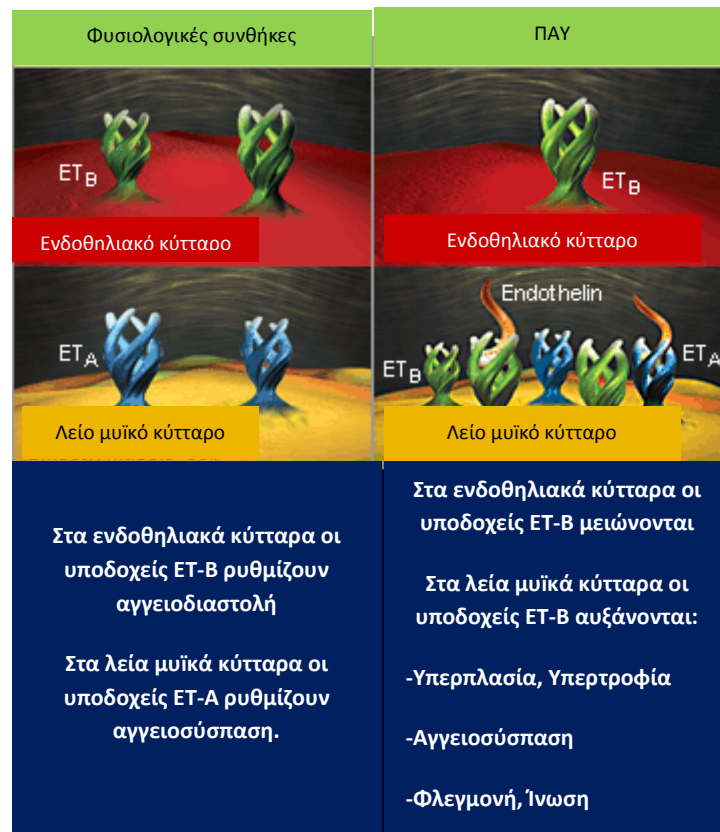
Οι υποδοχείς ET_B βρίσκονται κυρίως στα ενδοθηλιακά κύτταρα συνδεδεμένοι με ανασταλτικές G-πρωτεΐνες και η σύνδεσή τους με ET-1 προκαλεί απελευθέρωση NO και προστακυκλίνης και επακόλουθη αγγειοδιαστολή. Αυτού του τύπου οι υποδοχείς βρίσκονται σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις στα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων, όπου συμβάλουν σε αγγειοσύσπαση πάλι μέσω της οδού της φωσφολιπάσης C. Επιπλέον, διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην κάθαρση της ET-1 από το πνευμονικό και νεφρικό αγγειακό δίκτυο.

Φυσιολογικά υπάρχει μία ισορροπία μεταξύ παραγωγής και κάθαρσης της ενδοθηλίνης-1, η οποία ρυθμίζεται από τους υποδοχείς ET_B , έτσι ώστε το επίπεδο της ενδοθηλίνης-1 στην κυκλοφορία να είναι χαμηλό. Παρά το γεγονός ότι οι βιολογικές επιδράσεις της ET-1 διαρκούν για πολύ μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, ο χρόνος ημίσειας ζωής της είναι λιγότερο από δύο λεπτά. Αυτό οφείλεται στην απέκκριση της από το πνευμονικό και νεφρικό αγγειακό δίκτυο. Αυτή η απέκκριση περιλαμβάνει δέσμευση της ουσίας από B-υποδοχείς που βρίσκονται στην επιφάνεια του κυττάρου, απορρόφηση και αποδόμησή της στα λυσοσώματα. Τα μόρια της ενδοθηλίνης-1 αποδομούνται επίσης από ενδοπεπτιδάσες που βρίσκονται στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο στους νεφρούς.

- Τι συμβαίνει όμως σε πνευμονική υπέρταση;

Όπως προαναφέρθηκε, σε φυσιολογικές συνθήκες οι ET_B υποδοχείς στα ενδοθηλιακά κύτταρα προάγουν την αγγειοδιαστολή. Στα λεία μυϊκά κύτταρα οι ET_A υποδοχείς ρυθμίζουν την αγγειοσύσπαση διατηρώντας τον τόνο των αγγείων.

Σε συνθήκες, όμως, πνευμονικής υπέρτασης οι ET_B μειώνονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα και αυξάνονται στα λεία μυϊκά κύτταρα προκαλώντας πολλαπλασιασμό κυττάρων, αγγειοσύσπαση, φλεγμονή, ίνωση και υπερτροφία, όπως φαίνεται στην εικόνα 3.4.



Εικόνα 3.4 Διαφορετική συγκέντρωση και δράση ET_A και ET_B υποδοχέων σε φυσιολογικές συνθήκες και παθολογικές καταστάσεις.

3.4 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΗΣ-1 ΚΑΙ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΤΗΣ

Περίπου 80% της ενδοθηλίνης-1 (ET-1) που συντίθεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα εκκρίνεται κυρίως προς τα γειτονικά κύτταρα και λιγότερο προς το πλάσμα. Πλήθος παραγόντων διεγείρουν ή αναστέλλουν την έκκρισή της που διαφέρουν από ιστό σε ιστό. Αγγειοσυσπαστικοί παράγοντες όπως η αγγειοτενσίνη II, η βαζοπρεσίνη, η νορεπινεφρίνη, η σεροτονίνη, η ισοπροστάνη, η θρομβίνη, η συσσώρευση αιμοπεταλίων, ο TNF- α (παράγοντας νέκρωσης όγκων), η ινσουλίνη, οι ιντερλευκίνες 1 και 3, η ιντερφερόνη- γ , οι LDL λιποπρωτεΐνες, οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, η υποξία, το τοιχωματικό stress, ο μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας- β (TGF- β) και ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF) ενισχύουν τη σύνθεση και την έκκριση της ET-1. Αντίθετα, αγγειοδιασταλτικοί παράγοντες όπως το NO, η βραδυκινίνη, το νατριουρητικό πεπτίδιο των κόλπων (ANP) και οι προστακυκλίνες E₂ και I₂ μειώνουν τη σύνθεση της ενδοθηλίνης-1. Οι ρυθμιστικοί αυτοί παράγοντες επιδρούν στο γονίδιο που βρίσκεται στον πυρήνα του ενδοθηλιακού κυττάρου και είναι υπεύθυνο για την έκφραση της πρόδρομης μορφής της ET-1 (pre-proET-1).

Η ρύθμιση της παραγωγής των υποδοχέων της ενδοθηλίνης-1 συχνά παραλληλίζεται με αυτή των ενδοθηλινών. Η υποξία και η κυκλοσπορίνη ενεργοποιούν ταχέως την παραγωγή των ET_B και των ET_A στα ενδοθηλιακά και στα λεία μυϊκά κύτταρα αντίστοιχα. Ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας, ο βασικός αυξητικός παράγοντας ινοβλάστης, το cAMP και τα οιστρογόνα προκαλούν αύξηση της έκφραση των ET_A, ενώ η ADH και η αγγειοτενσίνη-II προάγουν την αύξηση των ET_B. Αντίθετα, η αγγειοτενσίνη-II, ο αυξητικός παράγοντας αιμοπεταλίων και ο

μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας-β ελαττώνουν τους ET_A, ενώ το c-AMP και οι κατεχολαμίνες ελαττώνουν τους ET_B.

3.5 ΔΡΑΣΕΙΣ ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΗΣ-1 ΣΤΟΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ

Η ενδοθηλίνη-1 αποτελεί την κυρίαρχη ισομορφή της ενδοθηλίνης στο καρδιαγγειακό σύστημα με ποικίλες επιδράσεις. Πιο αναλυτικά, η ET-1 παρουσιάζει αγγειοσυσπαστικές και μιτογόνες δράσεις, διεγείρει την παραγωγή αυξητικών παραγόντων, όπως ο αυξητικός παράγοντας του αγγειακού ενδοθηλίου (Vascular Endothelial Growth Factor/VEGF) και ο βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (basic Fibroblast Growth Factor/bFGF), ενώ ενισχύει τις επιδράσεις του μεταμορφωτικού αυξητικού παράγοντα-β (TGF-β) και του παραγόμενου από αιμοπετάλια αυξητικού παράγοντα (Platelet-derived Growth Factor/PDG).

Αυξημένες συγκεντρώσεις ενδοθηλίνης-1 ανευρίσκονται στο πλάσμα ασθενών με συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια. Προφανώς, η ET-1 συμβάλλει στην εξέλιξη της καρδιακής ανεπάρκειας, καθώς αυξάνονται οι συστηματικές αγγειακές αντιστάσεις και μειώνεται η καρδιακή παροχή. Επιπλέον, η ET-1 φαίνεται να προάγει την επιδείνωση της διατακτικής μυοκαρδιοπάθειας.

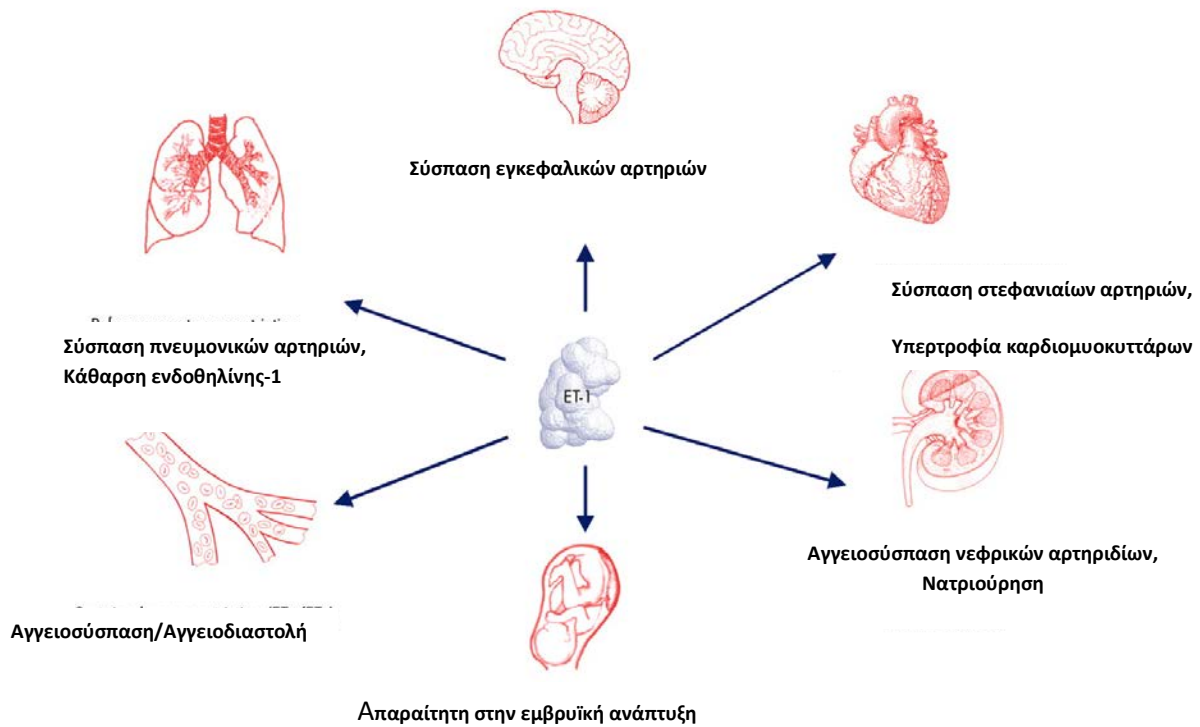
Η ενδοφλέβια έγχυση ET-1 σε επίμυες προκαλεί αρχικά μία πτώση στην αρτηριακή πίεση που ακολουθείται από παρατεταμένη υπέρταση. Η αρχική πτώση της αρτηριακής πίεσης οφείλεται πιθανώς στην ενεργοποίηση των ET_B υποδοχέων, με επακόλουθη αύξηση της απέκκρισης NO και προστακυκλίνης από το ενδοθήλιο. Η μετέπειτα αγγειοσυστολή οφείλεται στην άμεση επίδραση της ενδοθηλίνης-1 στις λείες μυϊκές ίνες μέσω των ET_A υποδοχέων και ενισχύοντας την αγγειοσυσταλτική δράση της αγγειοτενσίνης II ή των κατεχολαμινών.

Στον πνεύμονα, η ET-1 εκφράζεται σε όλο το εύρος του πνευμονικού αγγειακού δικτύου και φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του πνευμονικού αγγειακού τόνου. Παρά τον μικρό χρόνο ημίσειας ζωής (λιγότερο από δύο λεπτά), οι μικρές διαταραχές στην παραγωγή ή στην απελευθέρωση της μπορούν να οδηγήσουν σε εμμένουσα αγγειοσύσπαση. Έχουν τεκμηριωθεί αυξήσεις στα επίπεδα της ET-1 στο πνευμονικό αγγειακό σύστημα ασθενών με διάφορες μορφές πνευμονικής υπέρτασης.

Η επίδραση της ενδοθηλίνης-1 στο νεφρό σχετίζεται κυρίως με τη ρύθμιση του ισοζυγίου άλατος και ύδατος μέσω της προκαλούμενης νατριούρησης και διούρησης. Η ισορροπία μεταξύ των αγγειοσυσταλτικών (μέσω ET_A) και των αγγειοδιασταλτικών (μέσω των ET_B) δράσεων της ET-1 στο νεφρό καθορίζει τη συνολική επίδραση της ET-1 στη νεφρική λειτουργία. Οι υποδοχείς ET_A συμβάλλουν στην αύξηση των αντιστάσεων των νεφρικών αρτηριών, ενώ οι υποδοχείς ET_B μεσολαβούν στην επαναρρόφηση Na⁺ και H₂O από τα νεφρικά σωληνάκια.

Η ενδοθηλίνη-1 και κυρίως η ενδοθηλίνη-3 ανευρίσκονται και στον εγκέφαλο. Τα πεπτίδια αυτά μαζί με τους υποδοχείς τους παράγονται από τους νευρώνες και τα αστροκύτταρα σε πρώιμο στάδιο της εμβρυικής ανάπτυξης συμμετέχοντας προφανώς στην ανάπτυξη του εγκεφάλου. Επιπλέον, τα πεπτίδια αυτά ενεργοποιούν τους διαύλους Na⁺-K⁺-Cl⁻ που βρίσκονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα των εγκεφαλικών τριχοειδών, δημιουργώντας έναν αιματοεγκεφαλικό φραγμό ικανό να διατηρήσει χαμηλά τα επίπεδα K⁺ στο κεντρικό νευρικό σύστημα, συνθήκη απαραίτητη για την φυσιολογική εκπόλωση των νευρικών κυττάρων. Ακόμη, τα επίπεδα της ενδοθηλίνης-1 αυξάνονται σε εγκεφαλική ισχαιμία και υπαραχνοειδή

αιμορραγία, γεγονός που καταδεικνύει το ρόλο της ουσίας αυτής στον προκαλούμενο αγγειόσπασμο των εγκεφαλικών αγγείων.



Εικόνα 3.5 Σχηματική απεικόνιση των δράσεων της ET-1.

Στη διερεύνηση των ποικίλων επιδράσεων της ενδοθηλίνης-1 έπαιξε σημαντικό ρόλο η ανακάλυψη και χρησιμοποίηση ανταγωνιστών των υποδοχέων της, μεικτών ή εκλεκτικών. Τα τελευταία χρόνια η χρήση αυτών των ουσιών επέτρεψε στους ερευνητές να κατανοήσουν καλύτερα τον σημαντικό ρόλο της ενδοθηλίνης-1 στην φυσιολογία και παθοφυσιολογία του αγγειακού συστήματος και να προσεγγίσουν νέες θεραπευτικές στρατηγικές σε μια πληθώρα καρδιαγγειακών και μη παθήσεων και κυρίως στην πνευμονική αρτηριακή υπέρταση.

3.6 ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΕΣ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΗΣ-1 ΚΑΙ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΥΠΕΡΤΑΣΗ

Οι ανταγωνιστές των υποδοχέων της ET-1 διαχωρίζονται σε εκλεκτικούς A και εκλεκτικούς B, ανάλογα με τη συγγένειά τους προς τον αντίστοιχο τύπο υποδοχέα, ή σε μικτούς A και B ανταγωνιστές όταν δεν παρουσιάζουν κάποια ιδιαίτερη συγγένεια:

- Εκλεκτικοί για τύπου A υποδοχείς (σινταξετάνη, αμπριζεντάνη, ατραζεντάνη, BQ123, ζιμποτεντάνη)
- Μικτοί για τύπου A και B υποδοχείς (μποζεντάνη, τεζοσεντάνη)
- Εκλεκτικοί για τύπου B υποδοχείς (BQ-788 , A192621)

Η σινταξετάνη, η αμπριζεντάνη και μποζεντάνη χρησιμοποιούνται σήμερα στη θεραπεία της πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης.

Όπως προαναφέρθηκε ,η πνευμονική αρτηριακή υπέρταση σχετίζεται με δυσλειτουργία του ενδοθηλίου, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ικανότητας αγγειοδιαστολής, την παρατεταμένη αγγειοσύσπαση και την ενεργοποίηση του συστήματος της ενδοθηλίνης -1. Ο ρόλος της ET-1 στην παθοφυσιολογία της πνευμονικής υπέρτασης υποστηρίζεται από πολλές μελέτες και αυτά τα ευρήματα οδήγησαν στην εύλογη χρησιμοποίηση των ανταγωνιστών των υποδοχέων της ET-1 στη θεραπεία της [73].

Το 2001 μια πρώιμη τυχαιοποιημένη μελέτη εξέτασε τις επιδράσεις της μποσεντάνης στην ικανότητα άσκησης, στις καρδιοπνευμονικές αιμοδυναμικές παραμέτρους, καθώς και στην ασφάλεια και ανεκτικότητα του φαρμάκου σε 32 ασθενείς με πνευμονική αρτηριακή υπέρταση. Πρόκειται για ένα μικτό ανταγωνιστή των υποδοχέων ET_A/ET_B. Η μποσεντάνη βελτίωσε την ικανότητα

άσκησης, όπως φάνηκε από την αύξηση στη δοκιμασία βάρδισης (six minutes walking test). Επιπλέον, εννιά από τους 21 ασθενείς που έλαβαν το φάρμακο βελτίωσαν την WHO functional class από III σε II, ενώ στην ομάδα ελέγχου μόλις ένας από τους 11 ασθενείς κατάφερε κάτι ανάλογο.

Η διπλή τυφλή τυχαιοποιημένη μελέτη BREATHE-1 (Bosentan Randomised trial of Endothelin receptor Antagonist Therapy for pulmonary Hypertension) που ακολούθησε επιβεβαίωσε τα πρώτα ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Σε αυτή τη μελέτη συμμετείχαν 213 ασθενείς με πνευμονική υπέρταση οι οποίοι τυχαιοποιήθηκαν στη λήψη μποσεντάνης δύο φορές ημερησίως σε δόσεις των 125 ή 250 mg. Η μποσεντάνη βελτίωσε την ικανότητα άσκησης και την WHO functional class, ενώ παρέτεινε και το χρόνο μέχρι την επιδείνωση της ασθένειας[77]. Όμως παρά το γεγονός ότι ήταν καλά ανεκτό, οδήγησε σε αύξηση των ηπατικών ενζύμων κατά 5% στην ομάδα των 125 mg και κατά 14% στην ομάδα των 250mg.

Με κριτήριο τα αποτελέσματα των δύο προηγούμενων μελετών η μποσεντάνη έλαβε έγκριση για τη θεραπεία ασθενών με ΠΑΥ.

4. ΣΚΟΠΟΣ ΤΟΥ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

Σκοπός της έρευνάς μας είναι η μελέτη του παθοφυσιολογικού ρόλου του μεταμορφωτικού αυξητικού παράγοντα-β (TGF-β) στην πνευμονική αρτηριακή υπέρταση (ΠΑΥ) και την πιθανή συσχέτισή του με τους υποδοχείς A (ETA) και B (ETB) της ενδοθηλίνης-1. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε ένα ευρέως διαδεδομένο πειραματικό πρότυπο πρόκλησης ΠΑΥ σε επίμυες με τη χορήγηση μονοκροταλίνης.

Η συγκεκριμένη μελέτη έχει σχεδιαστεί έτσι ώστε να εκτιμήσει τις παρακάτω παραμέτρους:

- Την πιθανή ευεργετική επίδραση της αναστολής της οδού του TGF-β (με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων εναντίον του) στην εμφάνιση ΠΑΥ, καθώς και στην επιβράδυνση της εξέλιξης της ήδη εγκατεστημένης σοβαρής ΠΑΥ.
- Την διερεύνηση των πιθανών ευεργετικών μηχανισμών της αναστολής του TGF-β στην ανάπτυξη της ΠΑΥ.
- Την επίδραση του χρόνου έναρξης της θεραπείας και την διάρκεια της φαρμακευτικής παρέμβασης στην εξέλιξη της ΠΑΥ.
- Την σύγκριση μεταξύ δύο διαφορετικών θεραπευτικών προσεγγίσεων στην εξέλιξη της ΠΑΥ: **α.** αντισώματα εναντίον του TGF-β και **β.** αναστολείς των υποδοχέων (τύπου A και τύπου B) της ενδοθηλίνης-1.
- Την πιθανή συνεργική δράση των αντισωμάτων εναντίον του TGF-β και των αναστολέων υποδοχέων της ενδοθηλίνης-1 στην εξέλιξη της ΠΑΥ.

II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1.1 ΕΠΙΛΟΓΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ

Η πρόκληση πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης (ΠΑΥ) σε επίμυες με τη χορήγηση μονοκροταλίνης αποτελεί ένα καθιερωμένο πειραματικό πρότυπο μελέτης, τόσο της παθοφυσιολογίας της πάθησης, όσο και για την εκτίμηση θεραπευτικών παρεμβάσεων, καθώς εμφανίζει σημαντικές ομοιότητες με τα παθοφυσιολογικά και ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά που παρατηρούνται σε ασθενείς με ΠΑΥ [81,83,84,86,87]. Το πειραματόζωο που χρησιμοποιήθηκε στη δική μας μελέτη είναι ο επίμυς του γένους Wistar. Η φυσιολογία του πειραματόζωου αυτού έχει πολλές ομοιότητες με αυτή του ανθρώπου.

Τα πειραματόζωα έλαβαν την κατάλληλη φροντίδα και όλες οι επεμβατικές ενέργειες έγιναν σύμφωνα με την ελληνική (Προεδρικό Διάταγμα Αρ. 160/3/05/1991) και ευρωπαϊκή νομοθεσία (European Union directive for the protection of animals used for scientific purposes, 2010/63/EU), καθώς και τον οδηγό για τη φροντίδα και χρήση εργαστηριακών ζώων που έχει εκδοθεί από το National Institute of Health (NIH Volume 25, no 28, revised 1996). Οι εγκαταστάσεις πληρούν όλες τις σχετικές προδιαγραφές και έχουν άδεια λειτουργίας εγκεκριμένη από τις αρχές. Οι σχετικές άδειες εκτέλεσης πειραμάτων ελήφθησαν από τις τοπικές νομαρχιακές αρχές (αριθμός άδειας πειραματισμού: 9/5/2012-Αρ.Πρωτ.2984). Όλοι οι επίμυες παρέμειναν σε ένα ελεγχόμενο περιβάλλον, με σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας και δωδεκάωρη εναλλαγή φωτός-σκότους, ενώ η πρόσβασή τους σε τροφή και νερό ήταν ελεύθερη.

Πραγματοποιούνταν καθημερινός έλεγχος των πειραματόζων δύο φορές ημερησίως με σκοπό τον έλεγχο της γενικής κατάστασης και θνητότητας.

1.2 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

Η μελέτη περιλαμβάνει δύο σκέλη: Την αναστολή της οδού του Μεταμορφωτικού Αυξητικού Παράγοντα-β (TGF-β) α) σε πρώιμα στάδια και β) σε όψιμα στάδια ΠΑΥ.

A) ΠΡΩΙΜΑ ΣΤΑΔΙΑ

Στο πρώτο σκέλος της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν 40 αρσενικοί επίμυες τύπου Wistar, ηλικίας 6 εβδομάδων και μέσου βάρους ($261 \pm 5g$). Σε 30 από αυτούς χορηγήθηκε μία δόση μονοκροταλίνης (Crotaline, Sigma-Aldrich Ltd.) 60mg/kg υποδορίως.

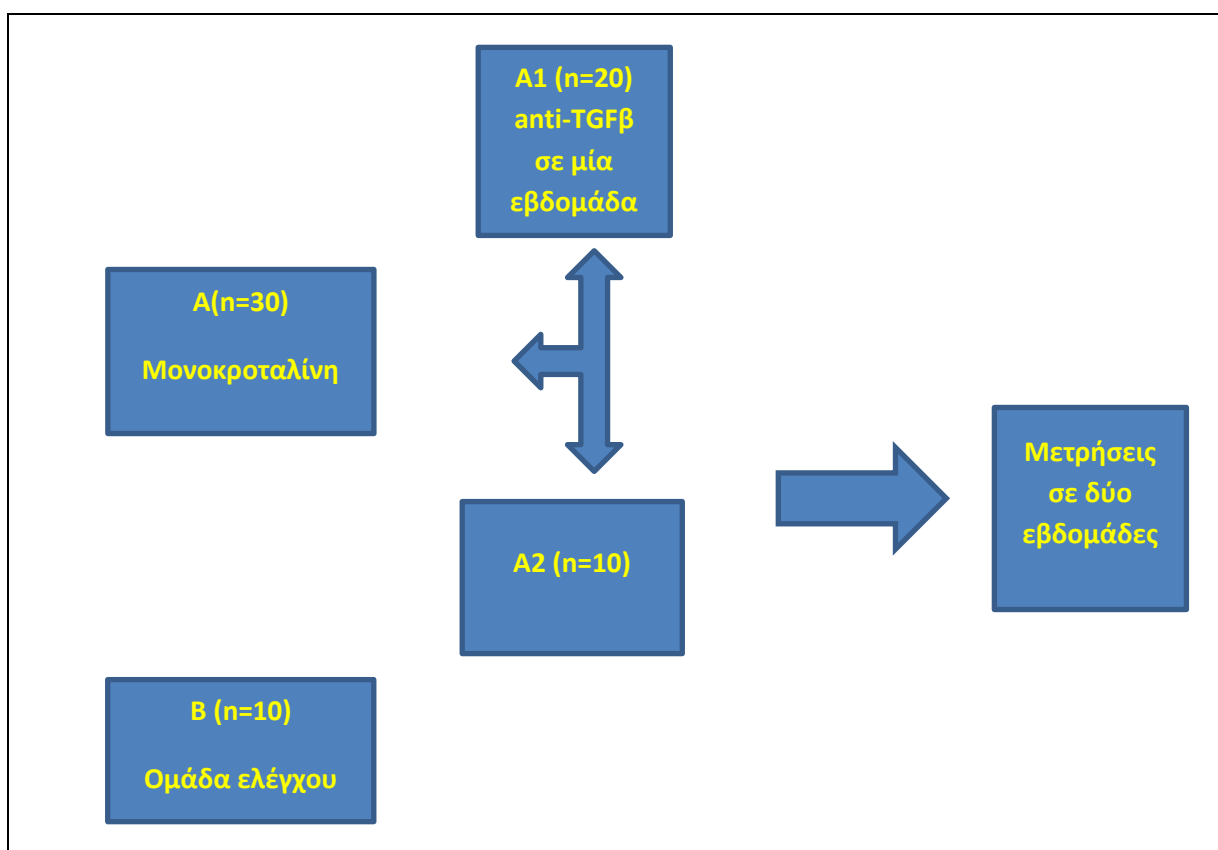
Μία εβδομάδα μετά, χορηγήθηκε στους 20 από τους 30 επίμυες (ομάδα A1) ένα αντίσωμα εναντίον του μεταμορφωτικού αυξητικού παράγοντα-β (T9429, TGF-β pan-antibody, Sigma-Aldrich Ltd.), το οποίο μπλοκάρει μη εκλεκτικά και τις τρεις ισομορφές του TGF-β, και συγκεκριμένα τους TGF-β1, TGF-β2 και TGF-β3. Πρόκειται για πολυκλωνικό αντίσωμα (IgG₁) που παράγεται σε κόνικλο και εξουδετερώνει την βιολογική ενεργότητα των παραγόντων TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3 και TGF-β5 χρησιμοποιώντας HT-2 κύτταρα [88]. Ο παράγων TGF-β5 δεν ανιχνεύεται στα θηλαστικά, παρά μόνο στα αμφίβια *Xenopus*.

Το αντίσωμα χορηγήθηκε για μία εβδομάδα σε δόση 0,1mg/kg ημερησίως, μέσω ωσμωτικής αντλίας έγχυσης (osmotic mini-pump), η οποία εμφυτεύθηκε ενδοπεριτοναϊκά (ALZET, Cupertino, CA, USA) (Εικόνες 2,3). Σκοπός του πρώτου σκέλους ήταν να εξετάσει την επίδραση της αναστολής του TGF-β σε πρώιμα

στάδια της ΠΑΥ. Για το σκοπό αυτό, η παρέμβαση έγινε την έβδομη μέρα από τη χορήγηση της μονοκροταλίνης.

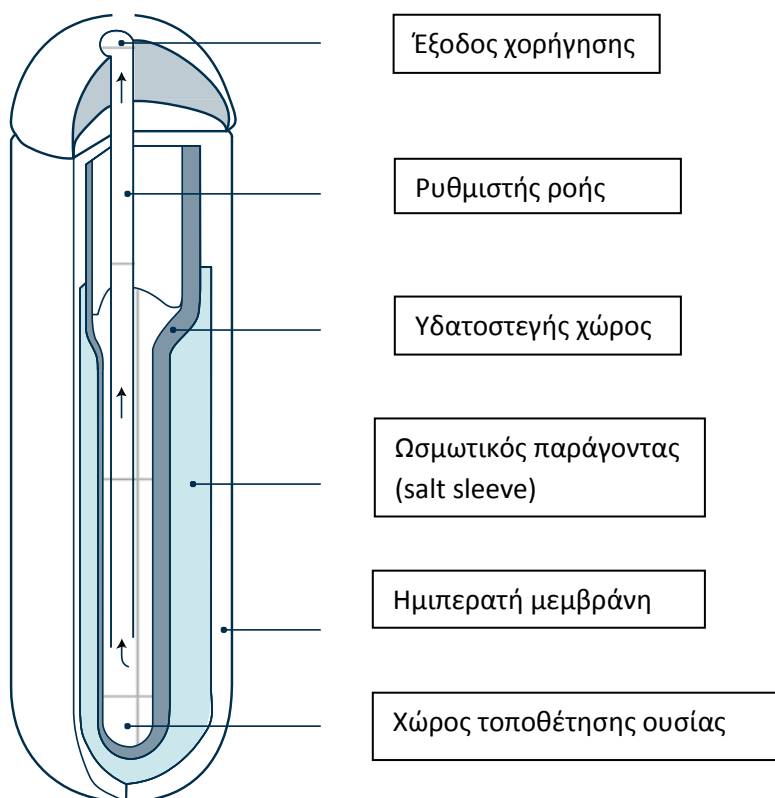
Στους υπόλοιπους 10 επίμυες (ομάδα A2) που είχαν λάβει μονοκροταλίνη δεν έγινε άλλη παρέμβαση. Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν 10 ακόμη επίμυες (ομάδα B), στους οποίους δεν χορηγήθηκε ούτε μονοκροταλίνη, ούτε αντίσωμα και οι οποίοι αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου. Στο τέλος των δύο εβδομάδων μετά τη χορήγηση μονοκροταλίνης, και οι τρεις ομάδες υποβλήθηκαν σε δοκιμασία αντοχής στην άσκηση, αναισθησία και μέτρηση της συστολικής πίεσης της δεξιάς κοιλίας, ευθανασία και λήψη παρασκευασμάτων καρδιάς και πνευμόνων για παθολογοανατομική εκτίμηση.

Εικόνα 1 Σχηματική παρουσίαση πρώτου σκέλους μελέτης σε πρώιμα στάδια ΠΑΥ.





Εικόνα 2 Αντλία ενδοπεριτοναϊκής χορήγησης (*osmotic mini-pump*), (ALZET, Cupertino, CA, USA).



Εικόνα 3 Η αντλία συνεχούς χορήγησης ουσιών με σταθερό ρυθμό έγχυσης η οποία εμφυτεύεται ενδοπεριτοναϊκά λειτουργεί βασιζόμενη στο φαινόμενο της ώσμωσης (*osmotic mini-pump*). Πιο συγκεκριμένα, η αντλία λειτουργεί χάρη στη διαφορά ωσμωτικής πίεσεως μεταξύ ενός διαμερίσματος στο εσωτερικό της με υψηλή ωσμωτικότητα (*salt sleeve*) και του περιβάλλοντος των ιστών στους οποίους είναι εμφυτευμένη η αντλία. Η υψηλή ωσμωτικότητα του διαμερίσματος αυτού (*salt sleeve*) προκαλεί τη ροή νερού στο εσωτερικό της αντλίας μέσω μιας ημιπερατής μεμβράνης, η οποία αποτελεί την εξωτερική επιφάνεια της αντλίας. Καθώς το νερό εισέρχεται στο διαμέρισμα (*salt sleeve*), πιέζει το ελαστικό τοίχωμα του ρεζερβουάρ που βρίσκεται στο κέντρο της αντλίας και μέσα στο οποίο έχει τοποθετηθεί η ουσία, με αποτέλεσμα να εγχύεται το φάρμακο από το χώρο εξόδου στους περιβάλλοντες ιστούς. Ο ρυθμός έγχυσης εξαρτάται από τη διαβατότητα της εξωτερικής μεμβράνης

της αντλίας στο νερό και όχι από τη χημική σύσταση, το μοριακό βάρος και τις φυσικές ιδιότητες της ουσίας που πρόκειται να εγχυθεί.

B) ΟΨΙΜΑ ΣΤΑΔΙΑ

Στο δεύτερο σκέλος της μελέτης χρησιμοποιήσαμε 5 ομάδες (A, B, C, D, E,F) αρσενικών επίμυων Wistar ηλικίας 6 εβδομάδων και βάρους (377±63g). Στις ομάδες B, C, D, E και F χορηγήθηκε αρχικά μία δόση μονοκροταλίνης (Crotaline, Sigma-Aldrich Ltd.) 60mg/kg υποδορίως. Κάθε ομάδα αποτελείτο από 15 επίμυες (n=15). Η ομάδα A δεν έλαβε ούτε μονοκροταλίνη, ούτε φαρμακευτική αγωγή και αποτέλεσε την ομάδα ελέγχου. Στην ομάδα B χορηγήθηκε μποσεντάνη (Ro 47-0203/029, Bosentan monohydrate, Actelion Pharmaceuticals Ltd., Allschwil, Swizerland) 4 εβδομάδες μετά τη χορήγηση μονοκροταλίνης. Πρόκειται για μικτό ανταγωνιστή των υποδοχέων A (ETA) και B (ETB) της ενδοθηλίνης-1 ο οποίος χρησιμοποιείται στη θεραπεία της πνευμονικής υπέρτασης [73,75,76,77,78], (Εικόνα 4). Η χορήγηση έγινε από του στόματος σε δόση 300mg/kg ημερησίως μέσω στοματογαστρικού σωλήνα (διαλυμένο σε gummi arabicum 5%) για 4 εβδομάδες. Στην ομάδα C χορηγήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα (IgG₁) εναντίον και των τριών ισομορφών του μεταμορφωτικού αυξητικού παράγοντα-β (1D11, pan-specific anti-TGF-β, Genzyme Corporation, Framingham, MA, USA) 4 εβδομάδες μετά τη χορήγηση της μονοκροταλίνης. Το συγκεκριμένο αντίσωμα έχει χρησιμοποιηθεί σε πλήθος μελετών για τη μελέτη της αναστολής της οδού του μεταμορφωτικού αυξητικού παράγοντα-β και ουδετεροποιεί την βιοενεργότητα των TGF-βs, όχι όμως και των BMPs ή των ακτιβινών [89,98] (Εικόνες 5B,5E). Η χορήγησή του έγινε

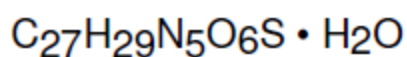
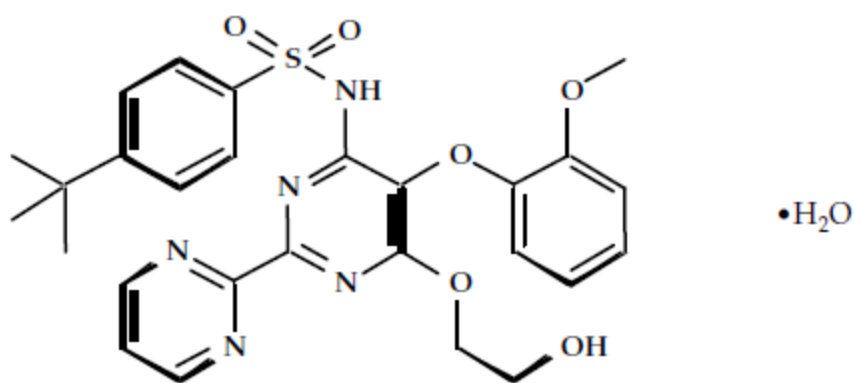
ενδοφλέβια (μέσω ραχιαίας του πέλους) σε δόση 5mg/kg κάθε τρεις μέρες για δύο εβδομάδες.

Στην ομάδα D δόθηκε διπλή φαρμακευτική αγωγή, δηλαδή αντίσωμα κατά του μεταμορφωτικού αυξητικού παράγοντα-β και μποσεντάνη με τον τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω. Στην ομάδα E χορηγήθηκε μόνο μονοκροταλίνη.

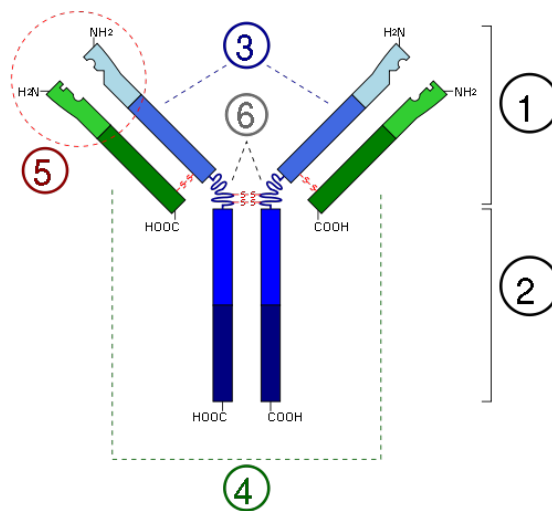
Στην ομάδα F χορηγήθηκε ουδέτερο αντίσωμα ελέγχου (13C4, IgG₁ ειδικό εναντίον της τοξίνης της *Shigella dysenteriae* τύπου 1, Genzyme Corporation, Framingham, MA, USA) 4 εβδομάδες μετά τη χορήγηση της μονοκροταλίνης. Το συγκεκριμένο μονοκλωνικό αντίσωμα αναγνωρίζει την υπομονάδα B του πενταμερούς μορίου της τοξίνης StxB1 και εξουδετερώνει την κυτταροτοξική δράση της, μπλοκάροντας τη σύνδεσή της με τον υποδοχέα της (globotriaosyl ceramide) (99) (Εικόνα 6). Η χορήγησή του έγινε επίσης ενδοφλέβια, σε δόση 5mg/kg κάθε τρεις μέρες για δύο εβδομάδες. Το αντίσωμα αυτό έχει χρησιμοποιηθεί σε πλήθος μελετών ως αντίσωμα ελέγχου και ιδίως σε μελέτες που χρησιμοποιούν το αντίσωμα 1D11.

Σκοπός του δεύτερου σκέλους ήταν να εξετάσει την επίδραση της αναστολής της δράσης του TGF-β σε όψιμα στάδια ΠΑΥ. Για το λόγο αυτό η φαρμακευτική παρέμβαση έγινε 4 εβδομάδες μετά τη χορήγηση μονοκροταλίνης, αφού όπως είναι γνωστό από προηγούμενες μελέτες (82,83,84), στο διάστημα αυτό ολοκληρώνονται οι ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις της νόσου και έχει αναπτυχθεί σημαντικού βαθμού ΠΑΥ. Επιπλέον, μελετήσαμε την αποτελεσματικότητα του συνδυασμού των αντισωμάτων εναντίον του TGF-β και των αναστολέων υποδοχέων της ενδοθηλίνης-1 (μποζεντάνης) στην εξέλιξη της ΠΑΥ.

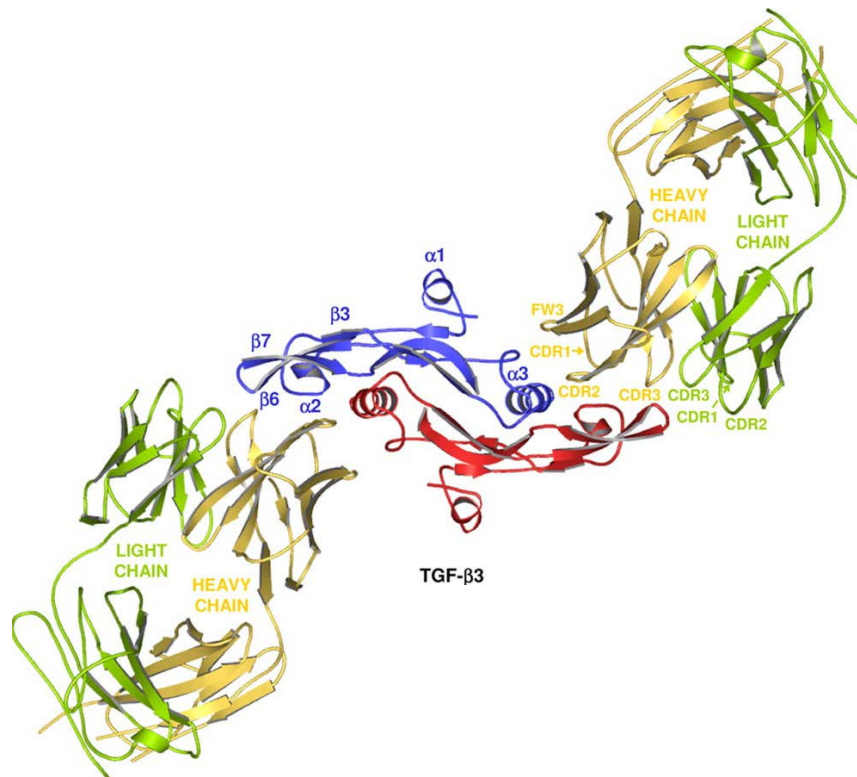
Στο τέλος των οκτώ εβδομάδων συνολικά μετά τη χορήγηση μονοκροταλίνης, όλες οι ομάδες υποβλήθηκαν σε δοκιμασία αντοχής στην άσκηση, αναισθησία και μέτρηση της συστολικής πίεσης της δεξιάς κοιλίας, ευθανασία και λήψη παρασκευασμάτων καρδιάς και πνευμόνων για παθολογοανατομική εκτίμηση.



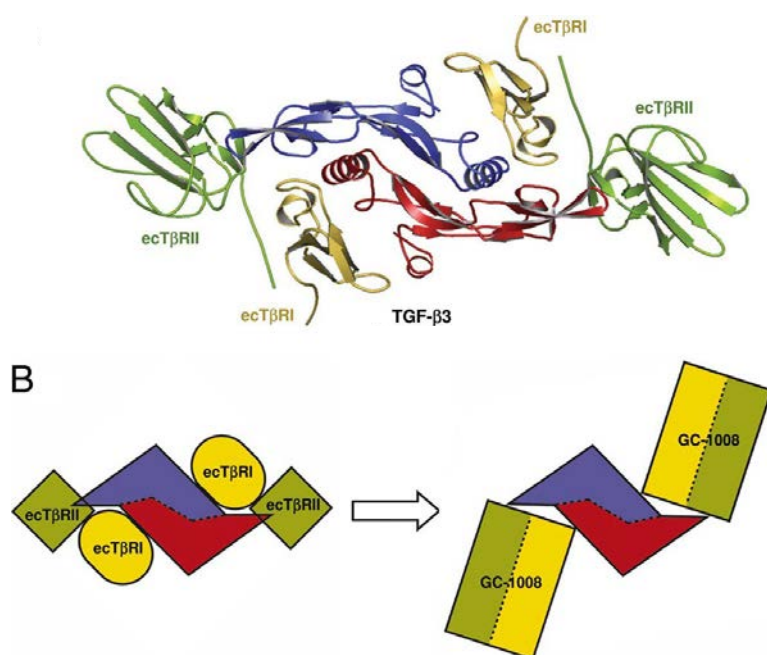
Εικόνα 4 Χημικός τύπος μοξεντάνης: μη πεπτιδικός μικτός ανταγωνιστής υποδοχέων ενδοθηλίνης-1(ETA και ETB).



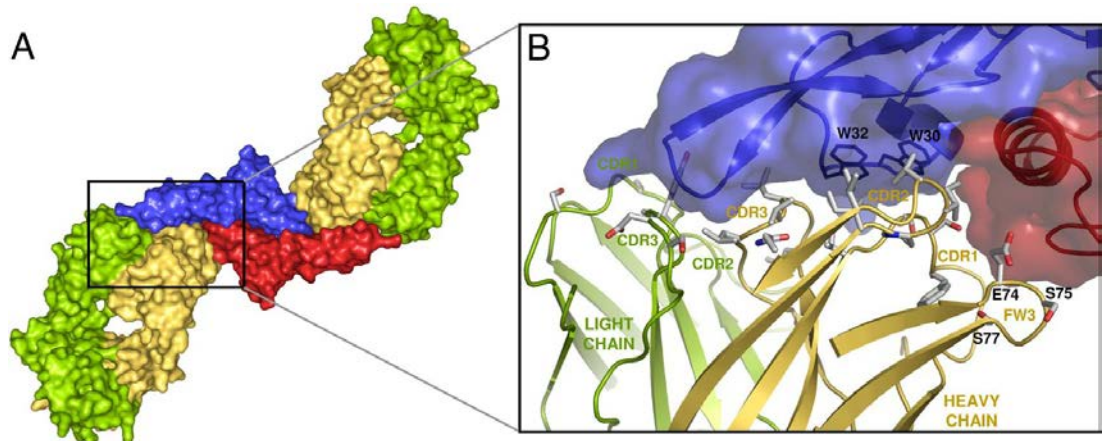
Εικόνα 5A Δομικά μέρη ενός αντισώματος. 1: Περιοχή μεταβλητότητας (Fab, *Fragment antigen binding*) με την οποία συνδέεται το αντιγόνο, 2: Περιοχή σταθερότητας (Fc, *Fragment crystallizable*), 3: Βαριές αλυσίδες, 4: Ελαφρές αλυσίδες, 5: Περιοχή σύνδεσης με το αντιγόνο (παράτοπος). Η βαριά αλυσίδα αποτελείται από ένα μεταβλητό τομέα (*variable domain, V_H*), ένα σταθερό τομέα (*constant domain, C_{H1}*), μία περιοχή σύνδεσης (*hinge region*) και δύο ακόμη σταθερούς τομείς (C_{H2}, C_{H3}). Η ελαφρά αλυσίδα αποτελείται από ένα μεταβλητό τομέα (V_L) και ένα σταθερό (C_L). Ο παράτοπος αποτελείται από τους μεταβλητούς τομείς των βαριών και ελαφρών αλυσίδων. Ειδικές περιοχές πάνω σε αυτούς τους τομείς που καλούνται μεταβλητές αγκύλες β-αλυσίδων (*variable loops of β-strands*) ή *complementarity determining regions (CDRs)* είναι υπεύθυνοι για τη σύνδεση με το αντιγόνο.



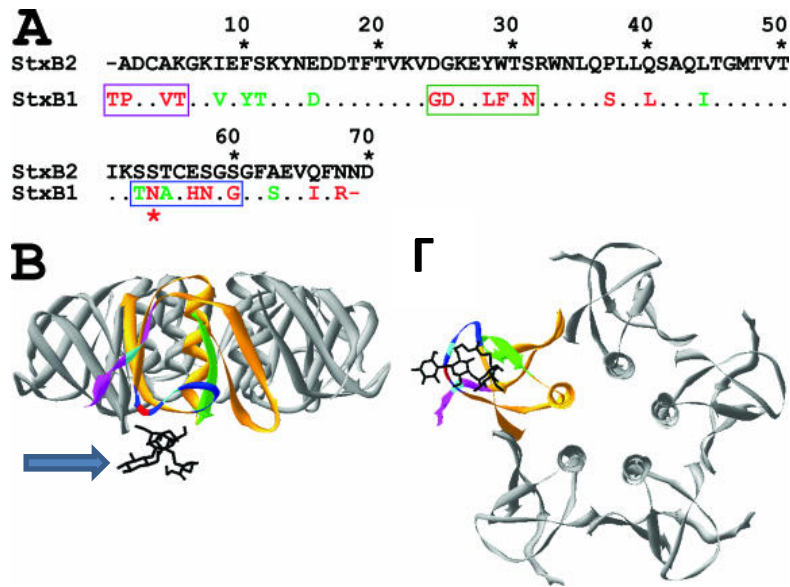
Εικόνα 5B Τρισδιάστατη απεικόνιση της κρυσταλλικής δομής του συμπλέγματος που δημιουργείται από την σύνδεση της ισομορφής TGF-β3 με το μονοκλωνικό αντίσωμα ουδετεροποίησης. Το διμερές μόριο του TGF-β3 αποτελείται από δύο πανομοιότυπα μονομερή μόρια (μπλέ και κόκκινο) τα οποία συνδέονται με τις βαριές και ελαφρές αλυσούες της περιοχής Fab (περιοχή μεταβλητότητας) του αντισώματος (κίτρινο και πράσινο χρώμα, αντίστοιχα).



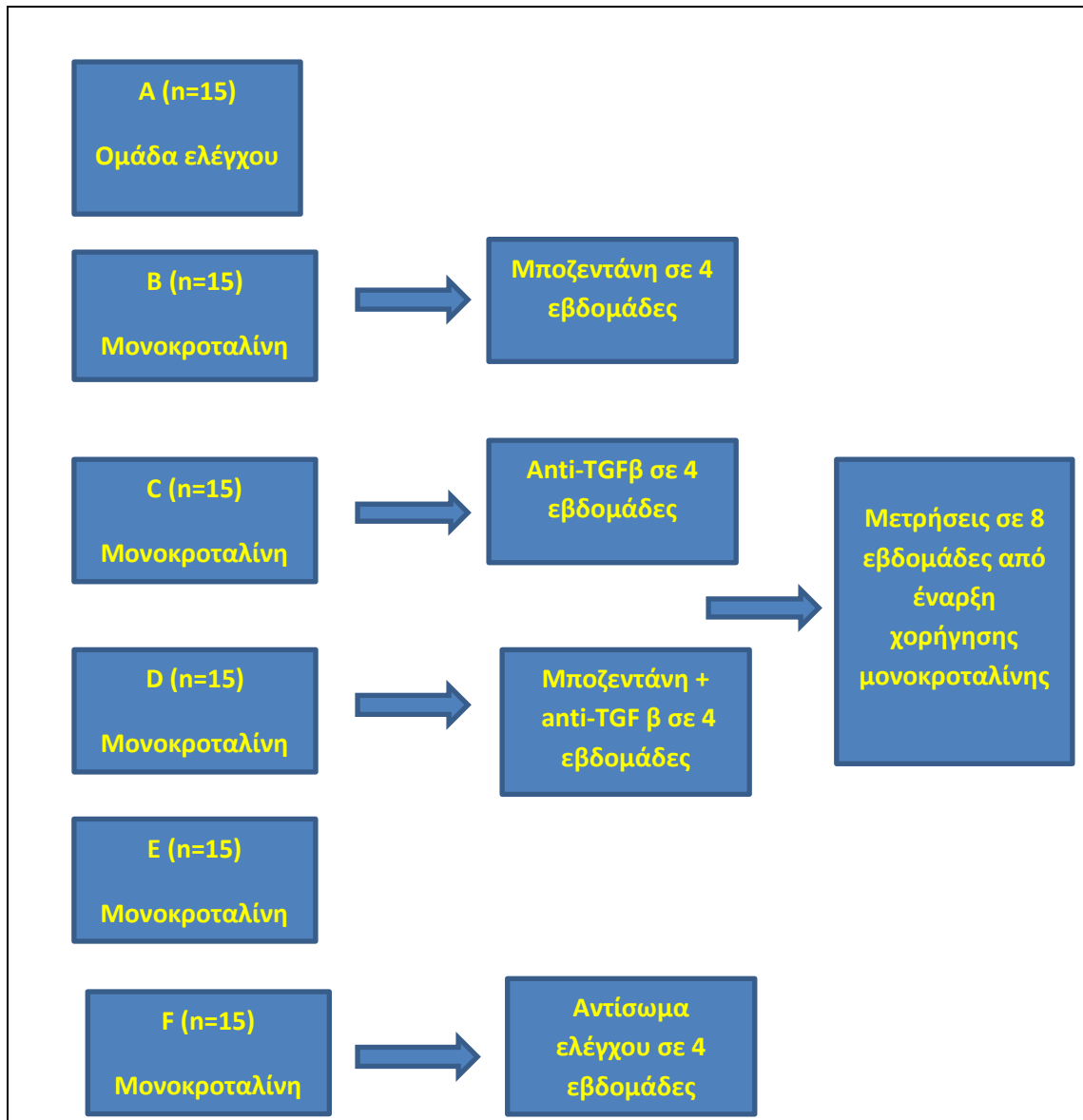
Εικόνα 5Γ Τρισδιάστατη απεικόνιση της κρυσταλλικής δομής του συμπλέγματος που δημιουργείται από την σύνδεση της ισομορφής TGF-β3 με τους υποδοχείς TGFβ3R-I και TGFβ3R-II. Ο τρόπος σύνδεσης του TGF-β3 με το αντίσωμα ουδετεροποίησης προσομοιάζει με τον τρόπο σύνδεσης TGF-β3 με τους υποδοχείς του. Το αντίσωμα δρά ανταγωνιστικά και δεσμεύεται στις θέσεις σύνδεσης του TGF-β3 με τους υποδοχείς του. Ανάλογη δράση ασκείται και στις ισομορφές TGF-β1 και TGF-β2.



Εικόνα 5Δ Όλες οι CDRs (*complementarity determining regions*) των βαριών αλύσων εμπλέκονται στις αλληλεπιδράσεις σύνδεσης αντιγόνου-αντισώματος, ενώ οι αντίστοιχες των ελαφρών αλύσων παίζουν ελάχιστο ρόλο.



Εικόνα 6 Απεικόνιση της κρυσταλλικής δομής της τοξίνης *Shigatoxin 1* (StxB1). Το αντίσωμα 13C4 Mab εναντίον της τοξίνης StxB1 (βέλος σε εικόνα Β) αναγνωρίζει και συνδέεται με τις αλληλουχίες αμινοξέων (αντιγονικοί επίτοποι) της τοξίνης (αλληλουχίες σε μωβ, πράσινο και μπλε πλαίσιο σε εικόνα Α) σχηματίζοντας δισουλφιδικό δεσμό (χρώμα γαλάζιο στις εικόνες Β και Γ) με το πενταμερές μόριό της.

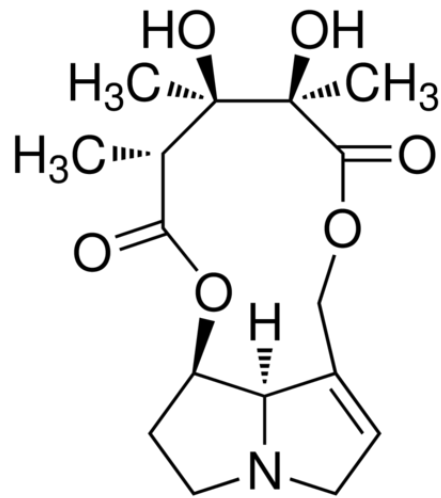


Εικόνα 7 Σχηματική παρουσίαση δεύτερου σκέλους μελέτης.

1.3 ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗΣ ΥΠΕΡΤΑΣΗΣ

Η πνευμονική υπέρταση προκλήθηκε με τη χορήγηση μονοκροταλίνης, η οποία απομονώνεται από τον κροταλία *Crotalaria spectabilis*. Σύμφωνα με προηγούμενες βιβλιογραφικές αναφορές [82,83,84], η χορήγηση μονήρους δόσης μονοκροταλίνης 60mg/kg υποδορίως, προκαλεί πνευμονική υπέρταση στους επίμυες 4 βδομάδες μετά. Ο πυρολικός δακτύλιος της μονοκροταλίνης ενεργοποιείται στο ήπαρ και οι μεταβολίτες του προκαλούν άμεση βλάβη στο αγγειακό ενδοθήλιο, ενεργοποιώντας με αυτό τον τρόπο το σύστημα ενδοθηλίνης που έχει ως επακόλουθο την πρόκληση δομικών αλλαγών των πνευμονικών αρτηριών, όπως υπερτροφίας του μέσου χιτώνα και ινομύδους υπερπλασίας του έσω χιτώνα, οι οποίες προσομοιάζουν με τις αλλαγές που παρατηρούνται σε πολλές μορφές πνευμονικής υπέρτασης στους ανθρώπους. Οι αλλαγές αυτές ξεκινούν να γίνονται εμφανείς από την έβδομη μέρα χορήγησης της μονοκροταλίνης και στις 28 μέρες υπάρχει ήδη εγκατεστημένη σοβαρού βαθμού πνευμονική υπέρταση.

Πιο αναλυτικά, η μονοκροταλίνη παρασκευάστηκε από το αρχικό σκεύασμα Crotaline (Sigma-Aldrich, Ltd) (Εικόνα 7), αφού πρώτα αραιώθηκε με HCl (0.1 mmol/L) και κατόπιν τιτλοποιήθηκε με NaOH (0.1 mmol/L) στο επιθυμητό pH 7,4. Πιο συγκεκριμένα, σε 300mg μονοκροταλίνης προστέθηκαν 1,8 ml HCl (1M) και 3 ml απεσταγμένου νερού, οπότε στη φάση αυτή μετρήθηκε η τιμή του pH ίση με 1,47. Στη συνέχεια προστέθηκε NaOH (1M) μέχρι τελικό όγκο 40 ml, ώστε η τιμή του pH να φτάσει την επιθυμητή τιμή 7,4. Η ποσότητα της χορηγούμενης μονοκροταλίνης σε κάθε πειραματόζωο είναι 60mg/kg, σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία.



Εικόνα 8 Χημικός τύπος μονοκροταλίνης (Μοριακό βάρος 325.36)

1.4 ΑΝΑΙΣΘΗΣΙΑ

Αρχικά οι επίμυες τοποθετούντο σε ειδικό κουτί εμποτισμένο με αιθέρα για δύο με τρία λεπτά. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχανόταν η αναισθητοποίηση των ζώων, προκειμένου να προβούμε σε επιτυχή διασωλήνωση (εικόνα 9). Η διασωλήνωση της τραχείας πραγματοποιείτο με τη χρήση φλεβοκαθετήρα μεγέθους 16G και με τη βοήθεια λαρυγγοσκοπίου. Ο φλεβοκαθετήρας συνδεόταν με κατάλληλο αναπνευστήρα (Harvard Apparatus, στις ακόλουθες ρυθμίσεις: εισπνεόμενος όγκος=3ml, συχνότητα=75 αναπνοές το λεπτό). Η επιτυχία της διασωλήνωσης επιβεβαιωνόταν με την καλή έκπτωση του θώρακα όσο ο επίμυς ήταν συνδεδεμένος στον αναπνευστήρα (model 7025, Ugo Basile, Comerio, Italy. Η αναισθησία διατηρείτο με τη χορήγηση μείγματος 100% οξυγόνο (1-2 L/min) και 2% ισοφλουρανίου. Η χορήγηση μείγματος ισοφλουρανίου και οξυγόνου έχει πολύ καλά αποτελέσματα με χαμηλή περιεγχειρητική θνητότητα της τάξης του 5 % και για το λόγο αυτό επιλέχθηκε για την διεξαγωγή των πειραμάτων μας.



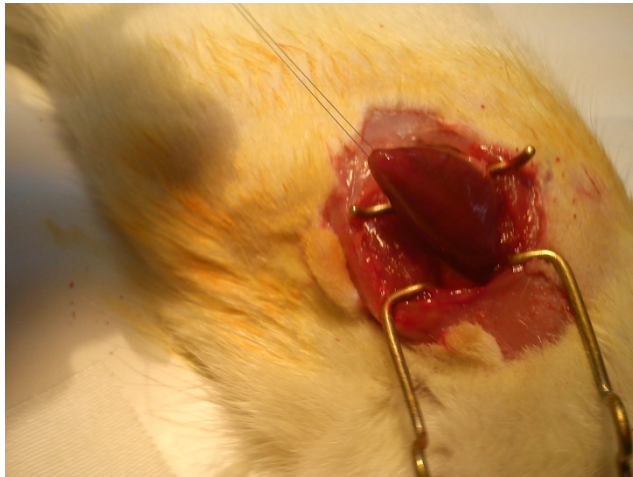
Εικόνα 9 Διασωλήνωση

1.5 ΑΙΜΟΔΥΝΑΜΙΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ

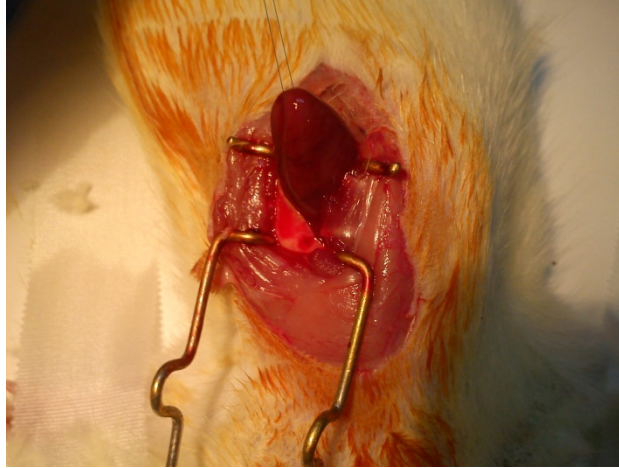
Μετά την χορήγηση αναισθησίας, πραγματοποιείται αριστερή πλάγια θωρακοτομή, διαχωρίζονταν οι στιβάδες των θωρακικών μυών και αποκαλυπτόταν ο θωρακικός κλωβός. Με τη βοήθεια μιας κυρτής λαβίδας διατέμνονταν οι μεσοπλεύριοι μύες (ανάμεσα σε 5η και 6η πλευρά, περίπου 2mm αριστερά του στέρνου) και το χάσμα που δημιουργείται διανοιγόταν με ήπιες πιεστικές κινήσεις. Η 6η πλευρά κοβόταν με ψαλίδι και τοποθετείτο ειδικός πλευρικός διαστολέας (Εικόνα 10). Εν συνεχεία, με τη βοήθεια ειδικών λαβίδων διαχωριζόταν το περικάρδιο και τοποθετείτο ένα ράμμα 6-0 (Ethicon, Johnson and Johnson, Medical Inc.) στην κορυφή της καρδιάς. Μέσω του ράμματος αυτού παρεχόταν ελαφρά τάση για την καλύτερη σταθερότητα στους χειρισμούς και αποκαλυπτόταν ο χώρος εξόδου της δεξιάς κοιλίας (Εικόνες 11,12). Ένας φλεβοκαθετήρας 21G εισαγόταν στο χώρο εξόδου της δεξιάς κοιλίας στην κύρια πνευμονική αρτηρία (Εικόνα 8). Η καρδιά επανατοποθετείτο στο θώρακα, αφαιρώντας την τάση του ράμματος και το άλλο άκρο του φλεβοκαθετήρα συνδεόταν με το σύστημα καταγραφής πίεσης (Fukuda Denshi /Datascop Model 1B5006) (Εικόνες 14,15), δια μέσω σωλήνα που είχε προετοιμαστεί κατάλληλα με φυσιολογικό ορό (Εικόνα 13). Με τη μέθοδο αυτή, πραγματοποιείται καταγραφή της πίεσης της πνευμονικής αρτηρίας διάρκειας δύο λεπτών, από την χρονική στιγμή της επίτευξης σταθερού σήματος καλής ποιότητας. Εντέλει, γινόταν ευθανασία με χορήγηση χλωριούχου καλίου, ώστε να ληφθούν παρασκευάσματα καρδιάς και πνευμόνων για ιστολογική εξέταση (Εικόνες 16,17).



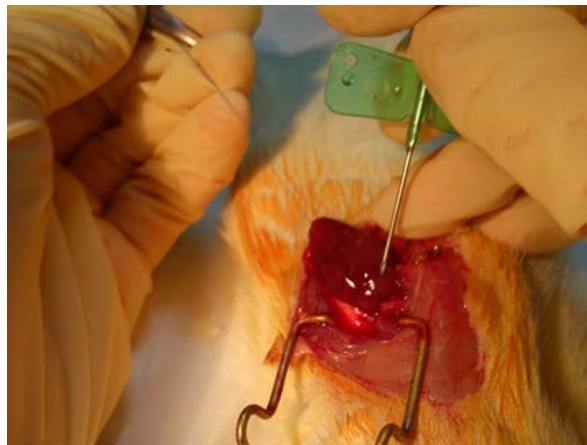
Εικόνα 10 Τοποθέτηση πλευρικού διαστολέα.



Εικόνα 11 Τοποθέτηση ράμματος 6-0 στην κορυφή της καρδιάς για άσκηση ελαφριάς τάσης και αποκάλυψη του χώρου εξόδου της δεξιάς κοιλίας.



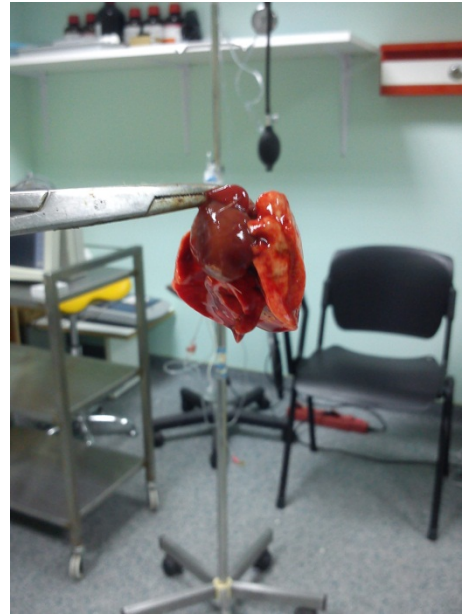
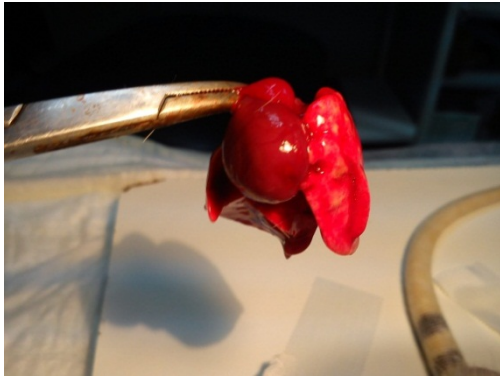
Εικόνα 12 Τοποθέτηση ράμματος 6-0 στην κορυφή της καρδιάς για άσκηση ελαφριάς τάσης και αποκάλυψη του χώρου εξόδου της δεξιάς κοιλίας.



Εικόνα 13 Εισαγωγή φλεβοκαθετήρα 21 G στο χώρο εξόδου της δεξιάς κοιλίας στην κύρια πνευμονική αρτηρία μέσω συστήματος καταγραφής πίεσης (Fukunda Denshi/Datascope Model 1B5006) διάρκειας δύο λεπτών.



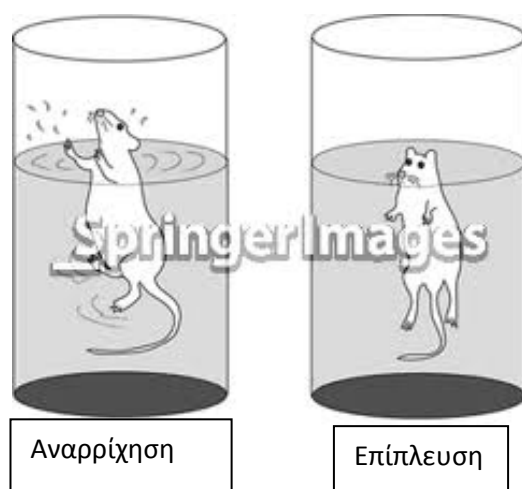
Εικόνες 14,15 Σύστημα καταγραφής πίεσης (Fukunda Denshi/Datascope Model 1B5006).



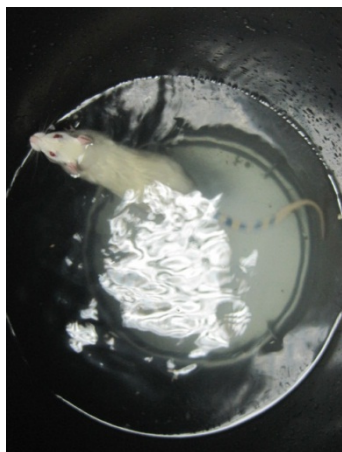
Εικόνα 16,17 Παρασκευάσματα καρδιάς και πνευμόνων για ιστολογική εξέταση.

1.6 ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΗΝ ΑΣΚΗΣΗ

Στο πρώτο σκέλος της μελέτης οι επίμυες υποβλήθηκαν σε δοκιμασία κολύμβησης (forced swim test ή Porsolt test) πριν και μετά την φαρμακευτική παρέμβαση, ώστε να διαπιστωθεί πιθανή βελτίωση ή μη της αντοχής τους στην κόπωση. Η δοκιμασία αυτή θεωρείται μία αξιόπιστη μέθοδος για την εκτίμηση αντοχής στην κόπωση στους επίμυες σύμφωνα με προηγούμενες αναφορές (Porsolt et al.,1977). Πιο συγκεκριμένα, κάθε επίμυς βυθιζόταν σε δοχείο (ύψους 50 cm και διαμέτρου 30 cm) με νερό. Η στάθμη του νερού ήταν 25cm από τον πυθμένα (ώστε να μην ακουμπά η ουρά) και η θερμοκρασία του 25°C (Εικόνες 18, 19) [93,94]. Ο χρόνος από την έναρξη της εμβύθισης μέχρι την εξάντληση του επίμυος χρησιμοποιείτο ως μέτρο εκτίμησης της αντοχής στην κόπωση. Ως εξάντληση ορίστηκε το σημείο όπου ο επίμυς δεν προσπαθούσε να παραμείνει στην επιφάνεια με ενεργητικές κινήσεις και άρχιζε να βυθίζεται. Από τον ολικό χρόνο έναρξης εμβύθισης-βύθισης κεφαλής αφαιρείτο ο χρόνος επίπλευσης. Εν συνεχεία, οι επίμυες στεγνώνονταν με πετσέτα και μεταφέρονταν στο κλουβί τους.



Εικόνα 18 Δοκιμασία κολύμβησης (Porsolt test).



Εικόνα 19 Δοκιμασία κολύμβησης (*Porsolt test*).

Στο δεύτερο σκέλος της μελέτης η αντοχή στη κόπωση εκτιμήθηκε με τη δοκιμασία κολύμβησης (*forced swim test*) και με τη δοκιμασία κοπώσεως με διάδρομο (*treadmill exercise test*). Πιο αναλυτικά, κάθε επίμυς τοποθετείτο σε ειδικά σχεδιασμένο κυλιόμενο διάδρομο κοπώσεως (*LE 8700 Series Treadmill Control Unit*) (Εικόνα 20). Στο πίσω μέρος του τάπητα υπήρχε ειδικό πλέγμα χορήγησης αυξομειούμενης έντασης ηλεκτρικών *shock*, ώστε να αναγκάζουν το πειραματόζωο να επιστρέφει στον τάπητα. Η ταχύτητα έναρξης του τάπητα ορίστηκε στα 15m/min για 2min και εν συνεχεία αυξανόταν κατά 2m/min κάθε 1min μέχρι εξαντλήσεως του επίμυος. Η κλίση του τάπητα παρέμενε 0° σε όλη τη διάρκεια της δοκιμασίας. Ως εξάντληση ορίστηκε το σημείο όπου ο επίμυς σταματούσε την προσπάθεια και

παρέμενε στο πλέγμα δεχόμενος επαναλαμβανόμενα ηλεκτρικά shock, δίχως να προσπαθεί να επιστρέψει στον τάπητα.

Θα πρέπει να σημειωθεί η διαφορετική συμπεριφορά ενός μικρού αριθμού επίμυων, οι οποίοι δεν κατόρθωναν να τρέξουν στον τάπητα. Προτιμούσαν να παραμείνουν στο πλέγμα παρά τα συνεχή ηλεκτρικά shock που δέχονταν ώστε να αναγκαστούν να το εγκαταλείψουν και να αρχίσουν το τρέξιμο στο διάδρομο. Για την μείωση της πιθανότητας εμφάνισης αυτής της συμπεριφοράς, την προηγούμενη μέρα από την εκτέλεση της δοκιμασίας κοπώσεως, αφήναμε κάθε επίμυ να τρέξει στον διάδρομο για 15 min με ταχύτητα τάπητα 15m/min, έτσι ώστε να εγκλιματιστεί στο συγκεκριμένο περιβάλλον όσο αυτό ήταν εφικτό. Το πλέγμα των ηλεκτρικών shock παρέμενε ανενεργό κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας προσαρμογής.

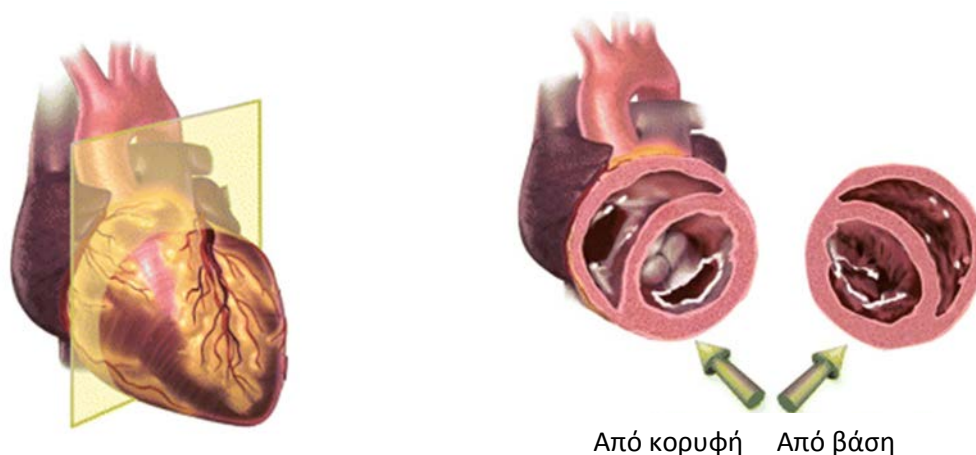


Εικόνα 20 Κυλιόμενος διάδρομος κοπώσεως (*LE 8700 Series Treadmill Control Unit*).

1.7 ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Όπως προαναφέρθηκε, μετά το πέρας των αιμοδυναμικών μετρήσεων με το σύστημα καταγραφής πίεσης (Dinamap, Johnson-Johnson Medical Inc.) πραγματοποιείτο ευθανασία με χορήγηση χλωριούχου καλίου και λήψη παρασκευασμάτων καρδιάς και πνευμόνων για ιστολογική εξέταση. Η καρδιά και οι πνεύμονες που αφαιρέθηκαν en block, μονιμοποιήθηκαν σε ουδέτερο διάλυμα φορμαλδεΐδης 10% και εν συνεχεία διαχωρίστηκε η καρδιά από τους πνεύμονες. Ελήφθησαν παράλληλες εγκάρσιες τομές από την καρδιά, οι οποίες μετά από κατάλληλη επεξεργασία εγκλείσθηκαν σε κύβους παραφίνης. Με τη χρήση μικροτόμου, έγιναν παράλληλες ιστολογικές τομές πάχους 2-3 μm στα παρασκευάσματα της καρδιάς, και χρώσεις αυτών με αιματοξυλίνη και ηωσίνη. Για τη μέτρηση του πάχους του μυοκαρδίου ελήφθησαν 5 εγκάρσιες τομές από κάθε δείγμα και η κεντρικότερη από αυτές χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της υπερτροφίας της δεξιάς κοιλίας (Εικόνα 21). Ακολούθησε μακροσκοπική μελέτη της αναδιαμόρφωσης της δεξιάς κοιλίας.

Η υπερτροφία της δεξιάς κοιλίας εκφράστηκε ως ο λόγος: ελεύθερο τοίχωμα της δεξιάς κοιλίας / (ελεύθερο τοίχωμα αριστερής κοιλίας + πάχος μεσοκοιλιακού διαφράγματος)/2.



Εικόνα 21 Εγκάρσια τομή καρδιάς.

Στο φυσιολογικό πνεύμονα οι μικρές πνευμονικές αρτηρίες που συνοδεύουν τα περιφερικά αναπνευστικά βρογχιόλια είναι μυϊκού τύπου και έχουν διάμετρο μεταξύ 500 μ m και 100 μ m. Συνέχεια των μικρών αυτών πνευμονικών αρτηριών αποτελούν τα πνευμονικά αρτηριόλια, τα οποία έχουν διάμετρο μικρότερη από 100 μ m. Από το μέγεθος αυτό και κάτω, αρχίζει η προοδευτική μείωση του μεγέθους και αποδιοργάνωση της δομής του μυϊκού χιτώνα μέχρι πλήρους εξαφάνισής του σε αγγεία με διάμετρο μικρότερη από 70-50 μ m [95].

Το πιο πρώιμο αποδεικτικό στοιχείο ΠΑΥ αποτελεί η πάχυνση του μέσου χιτώνα των μικρών πνευμονικών αρτηριών (50-200 μ m) και η παρουσία μέσου μυϊκού χιτώνα στα πνευμονικά αρτηριόλια (<50 μ m), τα οποία φυσιολογικά στερούνται αυτού. Για την εκτίμηση της αγγειακής αναδιαμόρφωσης έγιναν οι ακόλουθες μετρήσεις:

Πιο συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν τυχαία 20 κλάδοι μεσαίου μεγέθους (50-200 μ m) από τους πνεύμονες κάθε επίμυος και εκτιμήθηκε ο μέσος όρος του λόγου: πάχος μυϊκού τοιχώματος/εξωτερική διάμετρος αυτών. Επιπλέον, ο βαθμός εμφάνισης μυϊκού στοιχείου εκτιμήθηκε με βάση τον αριθμό των αγγείων διαμέτρου <50 μ m

στα οποία ανιχνεύεται η χρώση της ακτίνης των λείων μυών σε πάνω από το 75% της περιφέρειάς τους.

Από τους πνεύμονες επίσης ελήφθησαν παράλληλες τομές οι οποίες εγκλείσθηκαν σε παραφίνη. Εν συνεχεία, σε ιστολογικές τομές πάχους 2-3 μm εφαρμόστηκαν χρώσεις των τομών με αιματοξυλίνη-ηωσίνη, καθώς επίσης και ανοσοϊστοχημική χρώση για την ανίχνευση της ακτίνης των λείων μυών (smooth muscle actin, SMA) με χρήση anti-SMA αντισωμάτων (1:100, Daco, Glostrup, Denmark)(54).



Εικόνα 22 H-E : ηωσίνη-αιματοξυλίνη, SMA: ανοσοϊστοχημική ανίχνευση της ακτίνης των λείων μυών.

Ακολούθησαν μετρήσεις του πάχους του μυϊκού τοιχώματος των αρτηριακών κλάδων με διάμετρο μεταξύ 50 και 200 μm και του αριθμού των αρτηριακών κλάδων με διάμετρο μικρότερη από 50 μm που εμφάνιζαν πλήρη μυϊκό χιτώνα (> 75% της περιφέρειάς τους) (muscularisation) ανά 10 οπτικά πεδία ($\times 100$). Οι μετρήσεις αυτές αποσκοπούν στη εκτίμηση της αναδιαμόρφωσης των μικρών

πνευμονικών αρτηριών και πνευμονικών αρτηριολίων (vascular remodeling) που παρατηρείται στην πνευμονική αρτηριακή υπέρταση.

1.8 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Όλες οι τιμές αναφέρονται ως μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση. Δημιουργήθηκαν καμπύλες επιβίωσης κατά Kaplan-Meier για κάθε ομάδα και η ετερογένεια στη θνητότητα διερευνήθηκε με την δοκιμασία χ^2 . Σύμφωνα με τη δοκιμασία κανονικότητας Kolmogorov-Smirnov, οι διαφορές συνεχών μεταβλητών μεταξύ τριών ομάδων αξιολογήθηκαν με την ανάλυση μεταβλητότητας ANOVA (one-way analysis of variance) σε περίπτωση κανονικής κατανομής, ενώ σε απουσία κανονικής κατανομής με την μη παραμετρική ανάλυση μεταβλητότητας Kruskal-Wallis. Διαφορές μεταξύ δύο ομάδων αξιολογήθηκαν με τη δοκιμασία unpaired Student's t-test. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το λογισμικό 'Statistica' (release 6.0. Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA). Η στατιστική σημαντικότητα καθορίστηκε για τιμή άλφα μικρότερη του 0,05 [91,92].

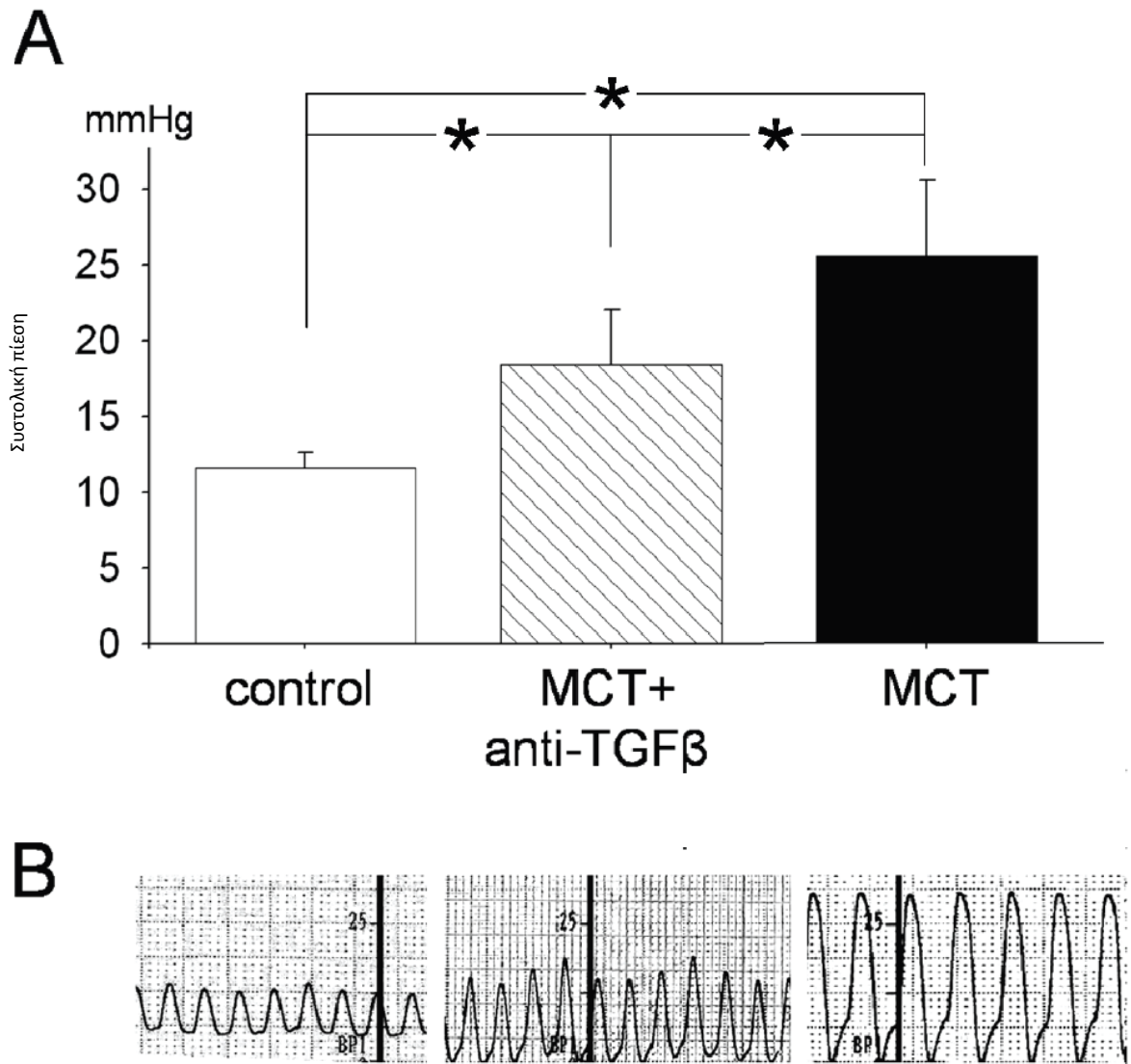
III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

A. ΠΡΩΤΟ ΣΚΕΛΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Μελετήθηκαν αρχικά 40 επίμυες τύπου Wistar (βάρους 261 ± 5 g) από τους οποίους 2 (ένας από την ομάδα μονοκροταλίνης και ένας από την ομάδα μονοκροταλίνης και anti-TGF- β) πέθαναν κατά τη διάρκεια των αιμοδυναμικών μετρήσεων και αποκλείστηκαν από τη μελέτη. Τελικά, 38 επίμυες συμμετείχαν συνολικά στο πρώτο σκέλος της μελέτης, από τους οποίους 10 δεν έλαβαν καμία φαρμακευτική παρέμβαση και αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου (ομάδα B), 9 έλαβαν μόνο μονοκροταλίνη (ομάδα A2) και 19 έλαβαν μονοκροταλίνη και αντισώματα έναντι του TGF- β (anti-TGF- β) (ομάδα A1). Το σωματικό βάρος μεταξύ των τριών ομάδων ήταν συγκρίσιμο δίχως σημαντικές διαφορές ($H=0.79$, $p=0.67$).

A1. Συστολική πίεση δεξιάς κοιλίας

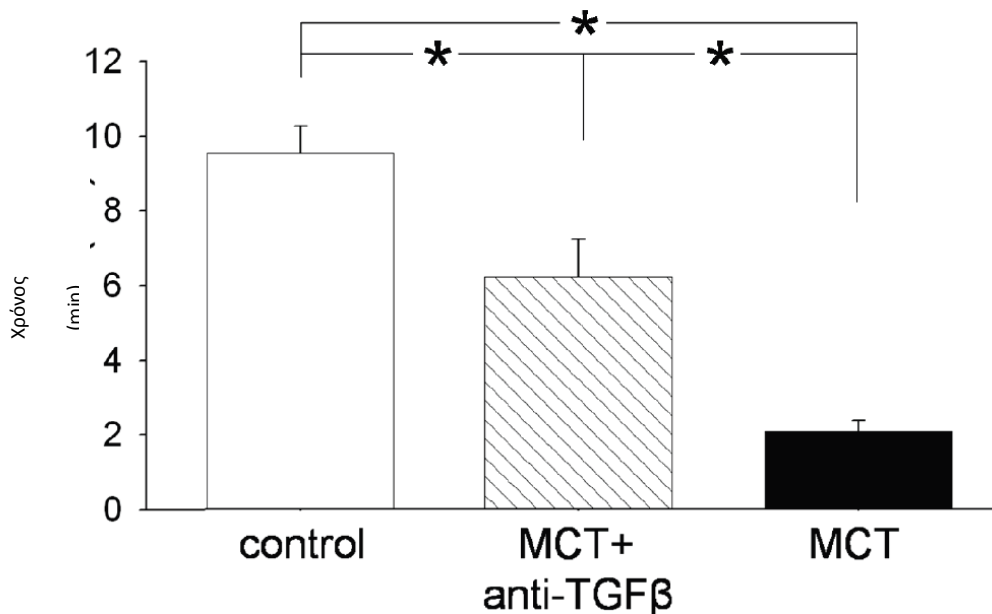
Υπήρχε σημαντική διακύμανση στη συστολική πίεση της δεξιάς κοιλίας μεταξύ των τριών ομάδων A1, A2 και B ($F=31.5$, $p<0.0001$). Αυτό οφειλόταν κυρίως στη χαμηλότερη ($p=0.0014$) συστολική πίεση της δεξιάς κοιλίας (18.4 ± 0.8 mmHg) στην ομάδα A1 (μονοκροταλίνη+anti-TGF- β) σε σύγκριση με την ομάδα A2 (μονοκροταλίνη) με πίεση (25.5 ± 1.9 mmHg). Επιπλέον, η πίεση στην ομάδα A1 (μονοκροταλίνη+anti-TGF- β) ήταν μεγαλύτερη ($p=0.0009$) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου B (11.6 ± 0.3 mmHg). Η συστολική πίεση ήταν περίπου 28% μικρότερη στην ομάδα που έλαβε αγωγή με αντισώματα συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. (Σχήμα 1)



Σχήμα 1 A. Διαγραμματική απεικόνιση σχέσης συστολικής πίεσης δεξιάς κοιλίας μεταξύ των τριών ομάδων, B. Καταγραφές σήματος συστολικής πίεσης δεξιάς κοιλίας με σύστημα Fukuda Denshi/Datascope. (*: $p < 0.05$ MCT: μονοκροταλίνη, Control: ομάδα ελέγχου)

A2. Δοκιμασία αντοχής στην κόπωση

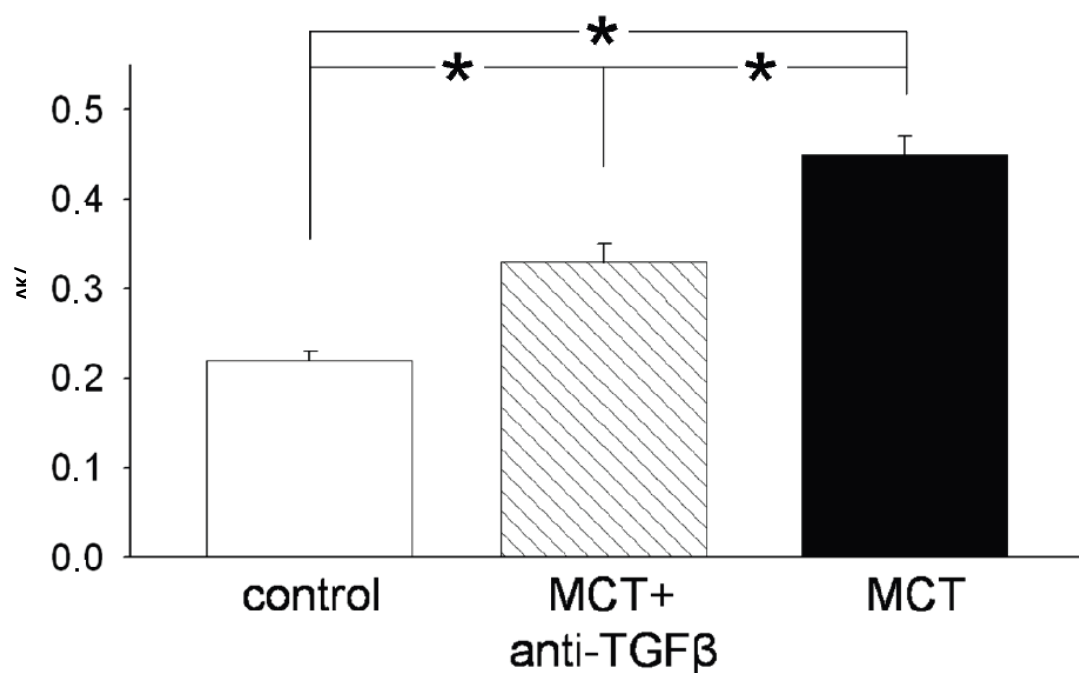
Υπήρχε σημαντική διακύμανση και στη δοκιμασία αντοχής στην κόπωση (forced swim test) μεταξύ των τριών ομάδων ($F=8.62$, $p=0.001$). Αυτό οφειλόταν στη μεγαλύτερη διάρκεια άσκησης (κολύμβησης) ($6.19 \pm 1.02 \text{ min}$) στην ομάδα A1 (μονοκροταλίνη+anti-TGF- β) σε σύγκριση με την ομάδα A2 (μονοκροταλίνη), στην οποία η διάρκεια κολύμβησης ήταν ($2.08 \pm 0.29 \text{ min}$). Όμως, η διάρκεια κολύμβησης στις ομάδες αυτές ήταν μικρότερη ($p=0.0467$) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου B (9.51 ± 0.74). Παρατηρήθηκε τριπλάσια αύξηση της αντοχής στην άσκηση μετά τη χορήγηση των αντισωμάτων συγκριτικά με την ομάδα μονοκροταλίνης στο τέλος των δύο εβδομάδων. (Σχήμα 2)



Σχήμα 2 Σχηματική απεικόνιση δοκιμασίας αντοχής στην κόπωση (*forced swim test*) μεταξύ των τριών ομάδων. (MCT: μονοκροταλίνη, Control: ομάδα ελέγχου, *: σημαντικά στατιστική διαφορά)

A3. Υπερτροφία δεξιάς κοιλίας

Υπήρχε σημαντική διακύμανση όσον αφορά την υπερτροφία της δεξιάς κοιλίας ($F=12.3$, $p<0.0001$) μεταξύ των τριών ομάδων. Η υπερτροφία της δεξιάς κοιλίας εκφράστηκε ως ο λόγος: ελεύθερο τοίχωμα της δεξιάς κοιλίας / [(ελεύθερο τοίχωμα αριστερής κοιλίας + πάχος μεσοκοιλιακού διαφράγματος)/2] ($RV/[(LV+IVS)/2]$). Η υπερτροφία ήταν μικρότερη ($p=0.0063$) στην ομάδα A1 (μονοκροταλίνη+anti-TGF β) (0.33 ± 0.02) σε σύγκριση με την ομάδα A2 (μονοκροταλίνη) (0.45 ± 0.02). Όμως, η υπερτροφία ήταν κατά πολύ μεγαλύτερη ($p=0.0171$) στην ομάδα A1 σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου B (0.22 ± 0.01). Η υπερτροφία της δεξιάς κοιλίας ήταν κατά 26.6% μειωμένη με τη χορήγηση αντισωμάτων σε σχέση με την ομάδα μονοκροταλίνης. (Σχήμα 3)



Σχήμα 3 Σχηματική απεικόνιση υπερτροφίας δεξιάς κοιλίας μεταξύ των τριών ομάδων. MCT: μονοκροταλίνη, Control: ομάδα ελέγχου, *: σημαντικά στατιστική διαφορά, $\Delta K/[(MK\Delta+AK)/2]$: Δεξιά κοιλία/[(MKΔ+ Αριστερή κοιλία)/2]

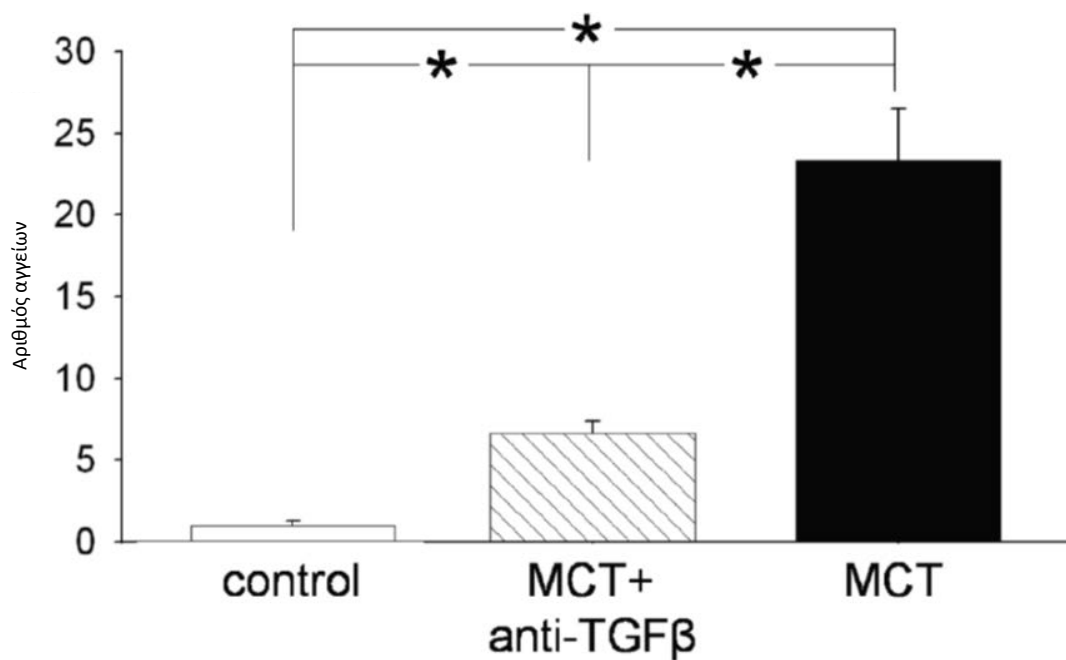
A4. Αναδιαμόρφωση τοιχώματος πνευμονικών αγγείων

A4.1. Πάχος του μυϊκού τοιχώματος των πνευμονικών αρτηριών με εξωτερική διάμετρο 50-200μm

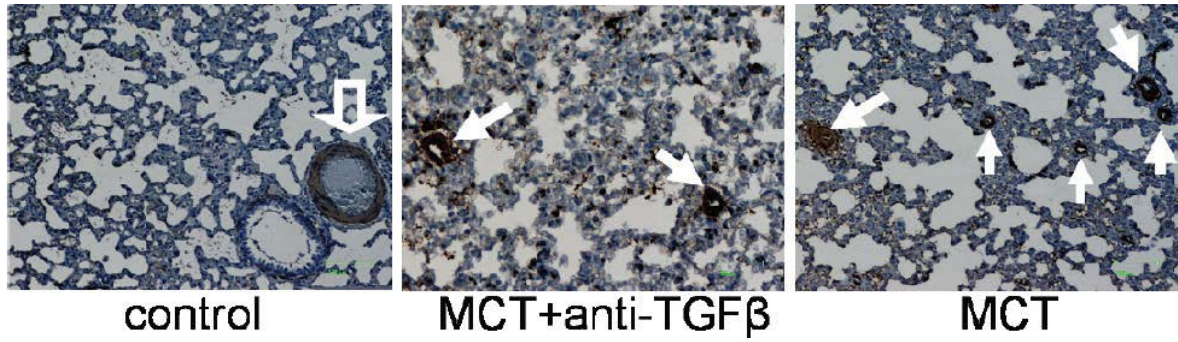
Εκτιμήσαμε το λόγο πάχος μυϊκού τοιχώματος/εξωτερική διάμετρο. Παρατηρήθηκε σημαντική διακύμανση ($F=20.3$, $p<0.0001$) μεταξύ των τριών ομάδων, εξαιτίας των χαμηλών τιμών της ομάδας ελέγχου (B) συγκριτικά με τις ομάδες μονοκροταλίνης(A2) και μονοκροταλίνης+anti-TGF-β (A1). Ο λόγος ήταν χαμηλότερος στην ομάδα ελέγχου B (0.202 ± 0.005) σε σύγκριση με τις ομάδες A2 (0.292 ± 0.01) και A1 (0.27 ± 0.009), ($p=0,0001$). Όμως, δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων A1 και A2 ($p=0.12$).

A4.2. Αριθμός των πνευμονικών αρτηριολίων με διάμετρο <math><50\mu\text{m}</math> και μυϊκό ιστό.

Εκτιμήθηκε ο αριθμός των πνευμονικών αρτηριολίων με διάμετρο <math><50\mu\text{m}</math> που παρουσίαζαν μυϊκό ιστό. Στην ομάδα ελέγχου B ο αριθμός ήταν κατά πολύ μικρότερος (1.00 ± 0.25) συγκριτικά με τις υπόλοιπες ομάδες. Στην ομάδα A1 (μονοκροταλίνη+anti-TGF- β) ήταν (6.64 ± 0.75) και στην ομάδα A2 (μονοκροταλίνη) πολύ μεγαλύτερος (23.33 ± 3.15). Υπήρχε σημαντική διακύμανση ($F=48.5$, $p<0.0001$) μεταξύ των τριών ομάδων, μεγαλύτερη μεταξύ ομάδας B και ομάδας A1 ($p=0.0145$) και χαμηλότερη μεταξύ ομάδας A1 και A2 ($p<0.0001$). (Σχήματα 4 και 5).



Σχήμα 4 Διαγραμματική απεικόνιση αριθμού πνευμονικών αρτηριολίων (<math><50\mu\text{m}</math>) με μυϊκό στοιχείο μεταξύ των τριών ομάδων. (MCT: μονοκροταλίνη, *: σημαντικά στατιστική διαφορά)



Σχήμα 5 Εικόνες από κάθε ομάδα όπου παρατηρούνται πνευμονικά προ-τριχοειδικά αρτηριόλια. Στην ομάδα ελέγχου δεν παρατηρείται ανίχνευση ακτίνης λείων μυών σε αρτηριόλια, παρά μόνο σε αγγεία με διάμετρο $>100\mu\text{m}$ (βέλος). Στις ομάδες που έλαβαν μονοκροταλίνη ανιχνεύεται ακτίνη λείων μυών σε αρτηριόλια με διάμετρο $<50\mu\text{m}$ (βέλη), λόγω της ανάπτυξης πνευμονικής υπέρτασης.

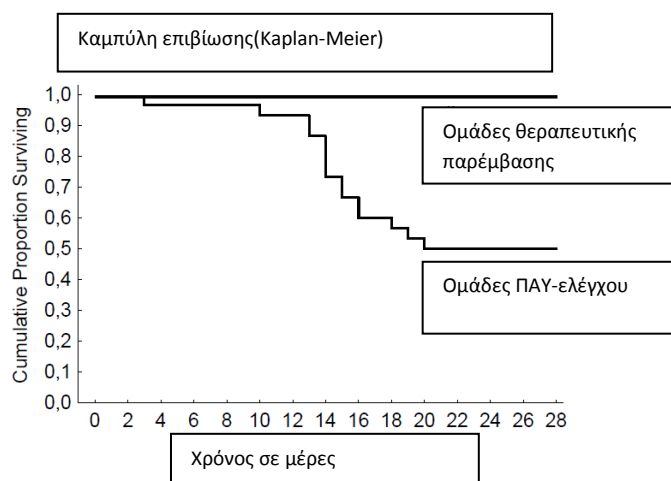
Αποτελέσματα μετρήσεων πρώτου σκέλους μελέτης

	Ομάδα ελέγχου (B)	Μονοκροταλίνη (A2)	Μονοκροταλίνη+ anti-TGFβ (A1)	Στατιστική μεταβλητότητα
Συστολική πίεση δεξιάς κοιλίας	11.6±0.3(mmHg)	25.5±1.9 (mmHg)	18.4±0.8 (mmHg)	F=31.5, p<0.0001
Υπερτροφία δεξιάς κοιλίας	0.22±0.01	0.45±0.02	0.33±0.02	F=12.3, p<0.0001
Μέσος χιτώνας/εξωτερική διάμετρος (50-200μm)	0.202±0.005	0.292±0.01	0.270±0.009	F=20.3, p<0.0001
Αριθμός κλάδων με πλήρη μυϊκό χιτώνα / 10 Ο.Π. ×100 (<50%)	1.00±0.25	23.33±3.15	6.64±0.75	F=48.5, p<0.0001
Δοκιμασία κολύμβησης	9.51±0.74 (min)	2.08±0.29 (min)	6.19±1.02 (min)	F=8.62, p=0.001

Σχήμα 6 Πίνακας με τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα των μετρήσεων του πρώτου σκέλους της μελέτης.

Β. ΔΕΥΤΕΡΟ ΣΚΕΛΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

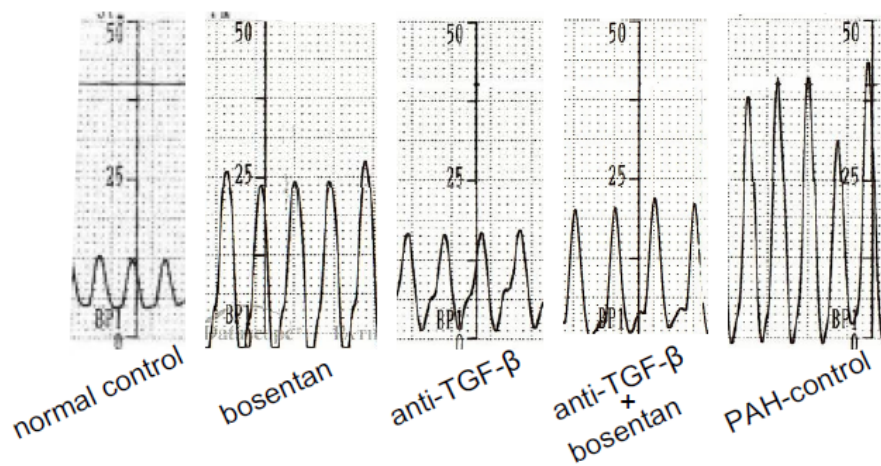
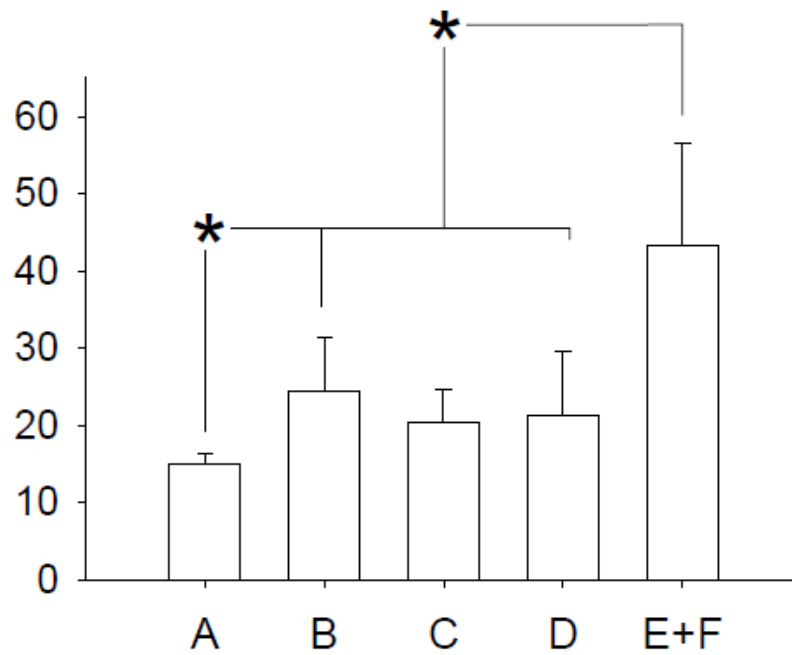
Μελετήθηκαν συνολικά 90 επίμυες τύπου Wistar (βάρους $377\pm 63\text{gr}$) από τους οποίους 8 πέθαναν κατά τη διάρκεια των αιμοδυναμικών μετρήσεων (τρεις από την ομάδα C και πέντε από την ομάδα E). Επιπλέον, ένα πειραματόζωο από την ομάδα B, ένα από την ομάδα D και 10 από την ομάδα F απεβίωσαν κατά την διάρκεια της παρακολούθησης (Σχήμα 7). Οι δύο τελευταίες ομάδες E (μονοκροταλίνη) και F (μονοκροταλίνη+ αντίσωμα ελέγχου) μελετήθηκαν εντέλει ως μία ομάδα εφόσον παρουσιάζουν κοινό αποτέλεσμα, δηλαδή την ανάπτυξη πνευμονικής υπέρτασης δίχως άλλες επιδράσεις και χωρίς σημαντικές διαφορές των μεταβλητών τους. Το σωματικό βάρος μεταξύ των πέντε τελικά ομάδων ήταν συγκρίσιμο δίχως σημαντικές διαφορές ($H=0.67$, $p=0.61$).



Σχήμα 7 Καμπύλη επιβίωσης κατά Karlan-Meier. Η θνητότητα την 28^η μέρα του πειράματος για τις ομάδες A, B, C, D, E+F ήταν 0%, 0%, 0%, 0% και 50% αντίστοιχα.

B1. Συστολική πίεση δεξιάς κοιλίας

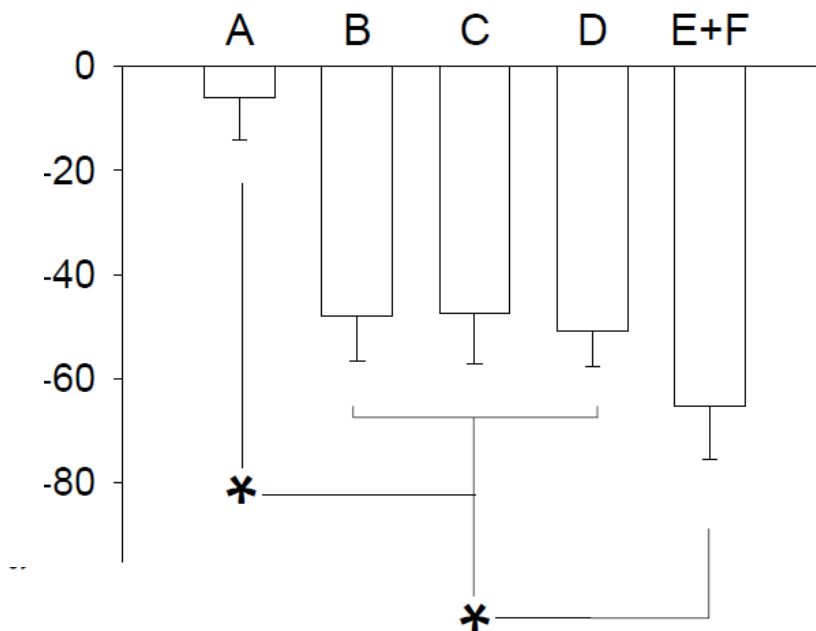
Υπήρχε σημαντική διακύμανση στη συστολική πίεση της δεξιάς κοιλίας μεταξύ των πέντε ομάδων A, B, C, D E+F ($F=25.4$, $p<0.0001$), (Σχήμα 8). Η συστολική πίεση της δεξιάς κοιλίας παρουσίαζε μείωση στις ομάδες που είχαν λάβει κάποια θεραπεία (B: μποσεντάνη, C:αντίσωμα εναντίον TGF-β, D: μποσεντάνη+ αντίσωμα εναντίον TGF-β) συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου με πνευμονική υπέρταση E+F ($p<0.001$). Οι τιμές μεταξύ των ομάδων B, C και D ήταν συγκρίσιμες χωρίς σημαντικές διαφορές. Δεν υπήρχε σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων B ($20.33\pm 4.39\text{mmHg}$), C ($21.28\pm 8.22\text{mmHg}$) και D ($24.5\pm 6.9\text{mmHg}$) που είχαν λάβει κάποια θεραπεία. Με τις θεραπευτικές παρεμβάσεις, η συστολική πίεση ήταν μειωμένη κατά περίπου 45% συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου.



Σχήμα 8 Α. Διαγραμματική απεικόνιση σχέσης συστολικής πίεσης δεξιάς κοιλίας μεταξύ των ομάδων, Β. Καταγραφές σήματος συστολικής πίεσης δεξιάς κοιλίας με σύστημα Fukuda Denshi/Datascope (*: σημαντικά στατιστική διαφορά).

B2. Δοκιμασία αντοχής στην κόπωση

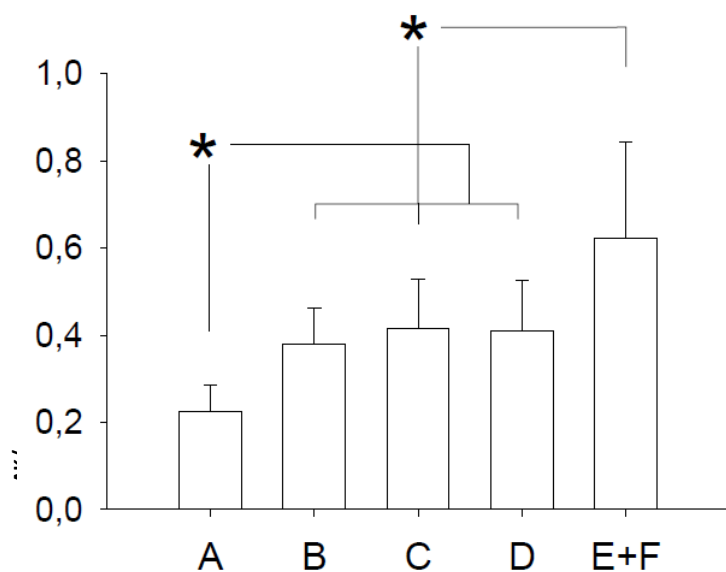
Υπήρχε σημαντική διαφορά στην διάρκεια της άσκησης (δοκιμασία κολύμβησης) μεταξύ των πέντε ομάδων ($F=93.3$, $p<0.0001$) (σχήμα 9), η οποία εκφράστηκε ως λόγος (διάρκεια κολύμβησης στις 8 εβδομάδες - διάρκεια κολύμβησης στις 4 εβδομάδες) / διάρκεια κολύμβησης στις 4 εβδομάδες. Η αντοχή στην κόπωση ήταν συγκρίσιμη μεταξύ των τριών ομάδων B, C και D που έλαβαν θεραπεία, χωρίς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους και με μεγαλύτερες, όμως, τιμές σε σχέση με τις τιμές της ομάδας πνευμονικής υπέρτασης E+F ($p<0.001$). Ωστόσο, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου A, οι τιμές όλων των ομάδων ήταν χαμηλότερες ($p<0.001$).



Σχήμα 9 Σχηματική απεικόνιση δοκιμασίας αντοχής στην κόπωση (*forced swim test*) μεταξύ των πέντε ομάδων (*: σημαντικά στατιστική διαφορά). Ομάδα A (-6.08 ± 8.0), B (-47.5 ± 9.5), C (-50.8 ± 6.8), D (-47.8 ± 8.8), E (-63.8 ± 10.8), F (-67.7 ± 10.8). Οι τιμές εκφράστηκαν με το λόγο: (τελική-αρχική τιμή) / αρχική τιμή.

B3. Υπερτροφία δεξιάς κοιλίας

Υπήρχε σημαντική διακύμανση μεταξύ των πέντε ομάδων και στην υπερτροφία της δεξιάς κοιλίας ($F=14.8$, $p<0.0001$). Η υπερτροφία της δεξιάς κοιλίας ήταν επίσης συγκρίσιμη μεταξύ των τριών ομάδων B, C και D που είχαν υποστεί θεραπευτική φαρμακευτική παρέμβαση ($p<0.01$) και χαμηλότερη από την ομάδα της πνευμονικής υπέρτασης E+F, αλλά υψηλότερη από την ομάδα ελέγχου A (χωρίς πνευμονική υπέρταση) ($p=0.022$ για ομάδα C, $p=0.023$ για ομάδα D). Η υπερτροφία στις ομάδες θεραπευτικής παρέμβασης ήταν μειωμένη κατά περίπου 30% συγκριτικά με την ομάδα E+F (σχήμα 10).



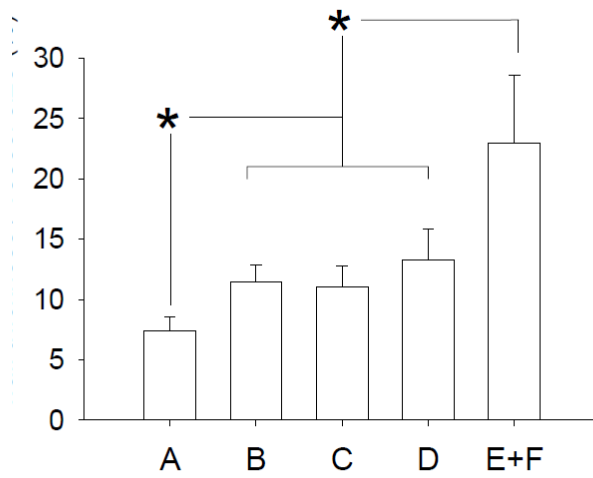
Σχήμα 10 Σχηματική απεικόνιση υπερτροφίας δεξιάς κοιλίας μεταξύ των πέντε ομάδων. *: σημαντικά στατιστική διαφορά, $\Delta K / [(MK\Delta + AK) / 2]$: Δεξιά κοιλία / [(MKΔ + Αριστερή κοιλία) / 2]

B4. Αναδιαμόρφωση τοιχώματος πνευμονικών αγγείων**B4.1. Πάχος του μυϊκού τοιχώματος των πνευμονικών αρτηριών με εξωτερική διάμετρο 50-200μm**

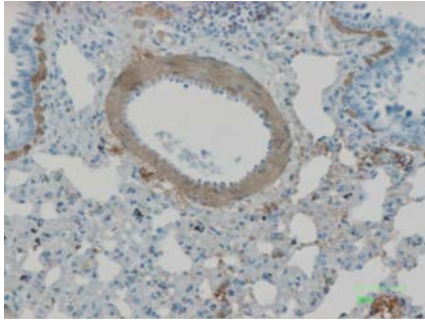
Όσον αφορά το πάχος του μυϊκού τοιχώματος των πνευμονικών αρτηριών με εξωτερική διάμετρο 50-200μm, παρατηρήθηκε σημαντική διακύμανση ($F=49.4$, $p<0.0001$) μεταξύ των πέντε ομάδων. Πιο συγκεκριμένα, ο λόγος πάχος μυϊκού τοιχώματος/εξωτερική διάμετρο βρέθηκε χαμηλότερος στις ομάδες B, C και D συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (πνευμονικής υπέρτασης) (Σχήμα 11, Εικόνα 12).

B4.2. Αριθμός των πνευμονικών αρτηριολίων με διάμετρο <50μm και μυϊκό ιστό

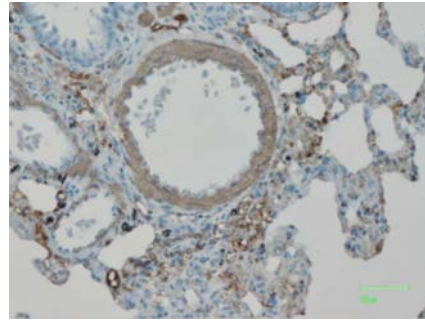
Επιπλέον, εκτιμήθηκε ο αριθμός των πνευμονικών αρτηριολίων με διάμετρο <50μm που παρουσίαζαν μυϊκό ιστό. Υπήρχε σημαντική διακύμανση ($F=56.4$, $p<0.0001$) μεταξύ των πέντε ομάδων (Σχήμα 13, Εικόνα 14). Μεταξύ των ομάδων των ομάδων B, C και D οι τιμές ήταν συγκρίσιμες μεταξύ τους. Οι τιμές αυτές ήταν χαμηλότερες από την ομάδα πνευμονικής υπέρτασης E+F ($p<0.00001$) και υψηλότερες από την ομάδα A ($p<0.025$).



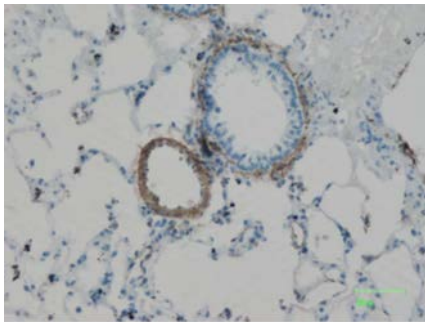
Σχήμα 11 Διαγραμματική απεικόνιση του λόγου: πάχος μυϊκού τοιχώματος προς εξωτερική διάμετρο των πνευμονικών αρτηριών με εξωτερική διάμετρο 50-200μm (*: σημαντικά στατιστική διαφορά).



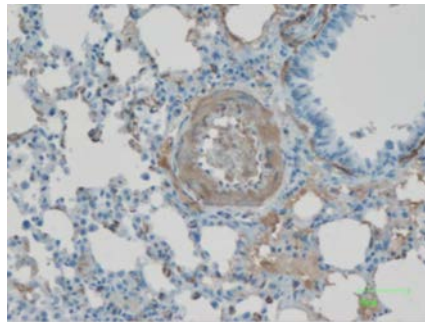
ΟΜΑΔΑ Β (μποσεντάνη)



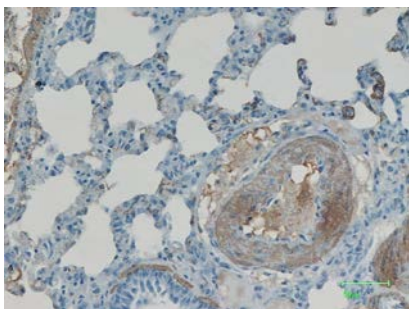
ΟΜΑΔΑ C (anti-TGF-β)



ΟΜΑΔΑ D (μποσεντάνη+anti-TGF-β)

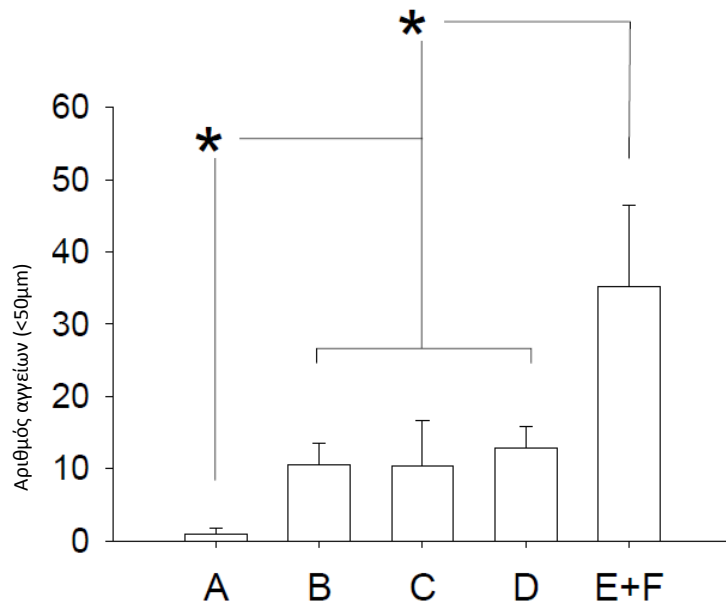


ΟΜΑΔΑ F (μονοκροταλίνη)



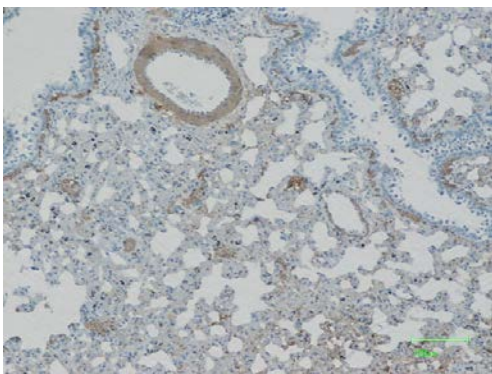
ΟΜΑΔΑ E (αντίσωμα ελέγχου)

Εικόνα 12 Εικόνες από παθολογοανατομικά παρασκευάσματα αντιπροσωπευτικές για κάθε ομάδα, όπου απεικονίζονται πνευμονικά αρτηριόλια διαμέτρου 50-200μm.

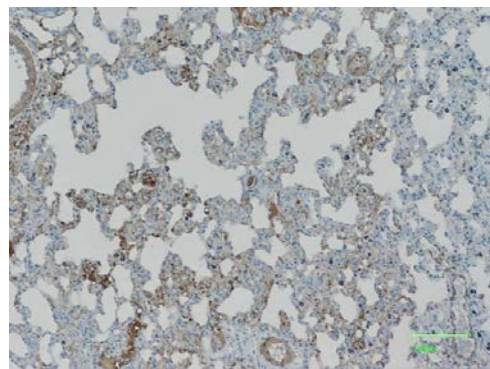


Σχήμα 13 Διαγραμματική απεικόνιση αριθμού πνευμονικών αρτηριολίων (<50μm)

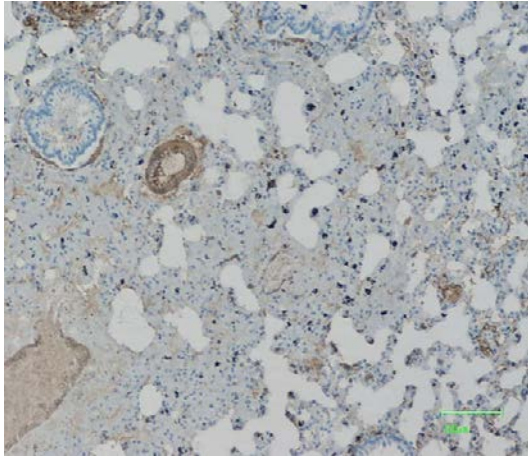
με μυϊκό χιτώνα μεταξύ των πέντε ομάδων. (*: σημαντικά στατιστική διαφορά)



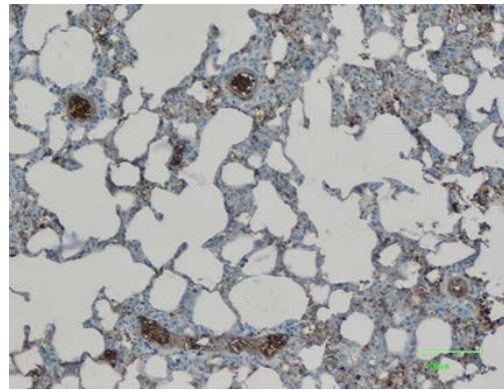
ΟΜΑΔΑ Β (μλοσεντάνη)



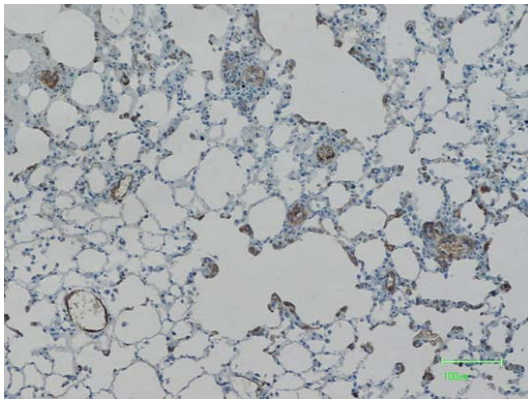
ΟΜΑΔΑ C (anti-TGF-β)



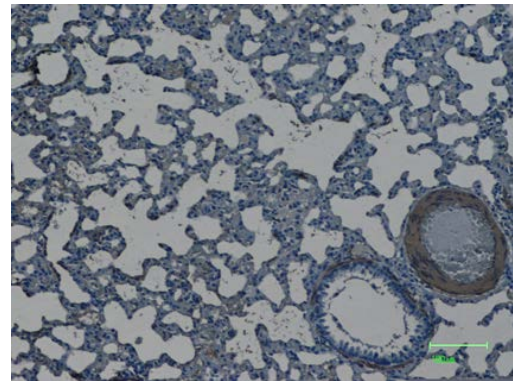
ΟΜΑΔΑ D (μποσεντάνη+anti-TGF-β)



ΟΜΑΔΑ E (μονοκροταλίνη)



ΟΜΑΔΑ F (αντίσωμα ελέγχου)



ΟΜΑΔΑ A (ελέγχου)

Σχήμα 14 Εικόνες από ιστολογικά παρασκευάσματα αντιπροσωπευτικές για κάθε ομάδα (A,B,C,D,E,F), όπου απεικονίζεται ο αριθμός των πνευμονικών προ-τριχοειδικών αρτηριολίων (διαμέτρου $<50\mu\text{m}$) με πλήρη μυϊκό χιτώνα ανά 20 οπτικά πεδία $\times 100$. Στην ομάδα ελέγχου δεν παρατηρείται ανίχνευση ακτίνης λείων μυών σε αρτηριόλια, παρά μόνο σε αγγεία με διάμετρο $>100\mu\text{m}$. Στις ομάδες που έλαβαν μονοκροταλίνη ανιχνεύεται ακτίνη λείων μυών σε αρτηριόλια με διάμετρο $<50\mu\text{m}$, λόγω της ανάπτυξης πνευμονικής υπέρτασης κάτι που δεν συμβαίνει στην ομάδα A (ομάδα ελέγχου).

	Ομάδα ελέγχου	Μονοκρο- ταλίνη	Μονοκροταλίνη + 13C4	Μονοκροταλίνη + 11D1	Μονοκροταλίνη + μποζεντάνη	Μονοκροταλίνη +1D11+μποζεντάνη	Στατιστική μεταβλητότητα
Συστολική πίεση δεξιάς κοιλίας	14.9±1.43	45.3±15.6	38.5±4.5	21.28±8.2	20.33±4.39	24.5±6.9	F=25.4 p<0.0001
Υπερτροφία δεξιάς κοιλίας	0.22±0.06	0.57±0.21	0.73±0.21	0.378±0.08	0.41±0.11	0.409±0.11	F=14.8 p<0.0001
Μέσος χιτώνας/ εξωτερική διάμετρος (50- 200μm)	7.37±1.16	23.01±6.5	22.85±2.77	13.31±2.51	11.05±1.74	11.43±1.46	F=49.4 p<0.0001
Αριθμός κλάδων με πλήρη μυϊκό χιτώνα /10 Ο.Π. ×100 (<50μm)	0.9±0.83	30±6.5	47.5±10.36	12.78±2.99	10.32±6.3	10.5±3.03	F=56.4 p<0.0001

Σχήμα 15 Πίνακας με τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα των μετρήσεων του δεύτερου σκέλους της μελέτης.

IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη εξέτασε τις επιδράσεις της αναστολής της οδού του αυξητικού μεταμορφωτικού παράγοντα-β (TGF-β) σε πειραματικό πρότυπο επίμυος. Η πρόκληση πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης στους επίμυες έγινε με την εφ'άπαξ χορήγηση μονοκροταλίνης. Το πειραματικό αυτό πρότυπο έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως, εξαιτίας των ομοιοτήτων που παρουσιάζει με την οικογενή ή ιδιοπαθή πνευμονική αρτηριακή υπέρταση (ΠΑΥ) στον άνθρωπο [10, 12].

Παρά την αναγνωρισμένη συμμετοχή του TGF-β στην παθογένεση της ΠΑΥ, ο ακριβής ρόλος του, *in vivo*, δεν είναι πλήρως κατανοητός. Στην παρούσα μελέτη, υποθέσαμε α) ότι η αναστολή της οδού του TGF-β μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη της ΠΑΥ αν εφαρμοστεί σε πρώιμα στάδια (πρώτο σκέλος) και β) ότι η ίδια αναστολή μπορεί να υποστρέψει την ήδη σοβαρή εγκατεστημένη ΠΑΥ αν εφαρμοστεί σε όψιμα στάδια (δεύτερο σκέλος). Επιπλέον, μελετήσαμε το αποτέλεσμα της συνδυαστικής θεραπείας με αντισώματα εναντίον του μεταμορφωτικού αυξητικού παράγοντα-β και αναστολείς υποδοχέων ενδοθηλίνης-1, υποθέτοντας ότι θα εμφανίζουν αθροιστική συνεργική δράση.

-Κύρια ευρήματα

Παρατηρήσαμε μείωση του βαθμού ΠΑΥ μετά τη χορήγηση αντισωμάτων που ουδετεροποιούν τη δραστικότητα και των τριών ισομορφών του TGF-β (TGF-β 1,2,3) και στα δύο σκέλη της μελέτης. Η φαρμακευτική παρέμβαση είχε ως αποτέλεσμα σημαντικά μειωμένη συστολική πίεση της δεξιάς κοιλίας, καθώς και υπερτροφία

της δεξιάς κοιλίας. Επίσης, η φαρμακευτική αυτή παρέμβαση είχε ως αποτέλεσμα μειωμένο βαθμό αναδιαμόρφωσης των πνευμονικών αγγείων (pulmonary vascular remodelling), καθώς και αυξημένη αντοχή των πειραματοζώων στην άσκηση. Στο πρώτο σκέλος, όπου η χορήγηση αντισωμάτων εναντίον TGF- β έγινε σε πρώιμα στάδια εξέλιξης ΠΑΥ (7 μέρες από τη χορήγηση μονοκροταλίνης), η συστολική πίεση της δεξιάς κοιλίας ήταν κατά 27.8% και η υπερτροφία της δεξιάς κοιλίας κατά 26.6% μειωμένες. Στο δεύτερο σκέλος, όπου η θεραπευτική παρέμβαση έγινε σε όψιμα στάδια (4 εβδομάδες μετά τη χορήγηση μονοκροταλίνης), η συστολική πίεση της δεξιάς κοιλίας ήταν κατά 45% και η υπερτροφία της δεξιάς κοιλίας κατά περίπου 30% μειωμένες, χωρίς να σημειωθούν σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών κατηγοριών αγωγής (αντισώματα εναντίον TGF- β , μποζεντάνης ή συνδυασμού).

Από τα ευρήματα αυτά μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η αναστολή της οδού του TGF- β μπορεί να εμποδίσει την περαιτέρω ανάπτυξη της ΠΑΥ. Κατά συνέπεια, ο παράγοντας αυτός, όπως προκύπτει και από προηγούμενες μελέτες, φαίνεται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της νόσου.

-Πιθανοί ευεργετικοί μηχανισμοί αναστολής του TGF- β στην ανάπτυξη ΠΑΥ

Η οικογένεια του μεταμορφωτικού αυξητικού παράγοντα- β (TGF- β) παίζει ρυθμιστικό ρόλο στην αγγειογένεση και στην κυτταρική ανάπτυξη. Σε προηγούμενες μελέτες έχει παρατηρηθεί τετραπλάσια αύξηση των επιπέδων TGF- β σε επίμυες στους οποίους προκλήθηκε ΠΑΥ με μονοκροταλίνη [45]. Οι ακριβείς μηχανισμοί της αυξημένης δραστηριότητας του TGF- β στην ΠΑΥ παραμένουν αδιευκρίνιστοι, αλλά πιθανά κύτταρα-στόχοι για την ανάπτυξη ΠΑΥ αποτελούν τα λεία μυϊκά κύτταρα των πνευμονικών αρτηριών και τα κυψελιδικά μακροφάγα, τα οποία αυξάνονται

σημαντικά στην ΠΑΥ (Kimura et al) [100]. Τα κύτταρα αυτά φέρουν υποδοχείς ειδικούς για τον μεταμορφωτικό αυξητικό παράγοντα-β, και η αυξημένη δραστηριότητα του TGF-β στην ΠΑΥ μπορεί να περιοριστεί με τη χορήγηση αναστολέων της δράσης του (αντισώματα).

Κατά την εξέλιξη της ΠΑΥ, ο TGF-β φαίνεται ότι συμμετέχει σε πολύπλοκες κυτταρικές και μοριακές διαδικασίες. Είναι γνωστό ότι σε φυσιολογικές συνθήκες, η σύνδεση του συνδέσμου TGF-β (1,2 ή 3) με έναν υποδοχέα τύπου II της κυτταρικής μεμβράνης (TGFR-β II) προκαλεί περαιτέρω ενεργοποίηση ενός υποδοχέα τύπου I (ALK1) και φωσφορυλίωση των ενδοκυττάρων πρωτεϊνών Smad2 και Smad3. Οι πρωτεΐνες αυτές αποδεσμεύονται από τους υποδοχείς και συνδεόμενες με τη Smad4 σχηματίζουν σύμπλεγμα το οποίο μεταφέρεται στον πυρήνα του κυττάρου. Εκεί αλληλεπιδρούν με άλλες ρυθμιστικές πρωτεΐνες, όπως είναι η Ras, η MMK4-Jun κινάση και η MMK3-p38 και διεγείρουν συγκεκριμένα γονίδια-στόχους επάγοντας τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων και των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων [10].

Στην οικογενή και ιδιοπαθή ΠΑΥ, έχουν παρατηρηθεί γονιδιακές μεταλλάξεις που οδηγούν σε απώλεια της λειτουργικότητας των υποδοχέων του TGF-β (ALK1, BMPRII). Επιπλέον, παρατηρείται αύξηση της έκφρασης των τριών ισομορφών του TGF-β, των υποδοχέων τους και των οδών σηματοδότησής τους (TGF-β signaling). Προφανώς υπάρχει διαταραχή της ισορροπίας των οδών σηματοδότησης του αυξητικού παράγοντα και όχι απώλεια της λειτουργίας τους, η οποία οδηγεί σε υπερπλασία των λείων μυϊκών κυττάρων και μείωση της ευαισθησίας στην απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων. [39, 47].

Στην παρούσα μελέτη, η χορήγηση αντισωμάτων εναντίον των τριών ισομορφών του TGF- β (1,2,3) σε επίμυες με ΠΑΥ, όπου υπάρχει διαταραχή της συγκεκριμένης οδού του TGF- β , οδήγησε σε μείωση της βιολογικής του δραστηριότητας, ελαττώνοντας τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των λείων μυϊκών κυττάρων.

Για την απόδειξη της συμμετοχής των λείων μυϊκών κυττάρων στην ΠΑΥ και τον ενδεχόμενο ρόλο των υποδοχέων του TGF- β , στηριχθήκαμε στα αποτελέσματα της παθολογοανατομικής ανάλυσης. Κοινό παθολογοανατομικό εύρημα σε όλες τις μορφές ΠΑΥ είναι η εμφάνιση λείων μυϊκών κυττάρων στις μικρού μεγέθους πνευμονικές αρτηρίες με αποτέλεσμα την υπερτροφία του μέσου χιτώνα. Οι μηχανισμοί αυτού του φαινομένου δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Πιθανόν, η διαφοροποίηση περικυττάρων σε λεία μυϊκά κύτταρα να διαδραματίζει κάποιο ρόλο. Στην παρούσα μελέτη, εξετάσαμε δύο σημαντικές παραμέτρους αυτής της υπερτροφίας, και συγκεκριμένα (**α**) την εμφάνιση ενός υποτυπώδους μέσου χιτώνα σε προτριχοεικά πνευμονικά αρτηριόλια (<50 μ m), τα οποία φυσιολογικά στερούνται μυϊκού ιστού και (**β**) την αύξηση του πάχους του τοιχώματος σε μεσαίου μεγέθους πνευμονικές αρτηρίες με διάμετρο 50-200 μ m.

Παρατηρήσαμε σημαντική μείωση του αριθμού των πνευμονικών αρτηριολίων (με διάμετρο <50 μ m) με μυϊκό στοιχείο μετά τη χορήγηση αναστολέων του TGF- β και στα δύο σκέλη της μελέτης, γεγονός που υποδηλώνει τον κυρίαρχο ρόλο του TGF- β στην ανάπτυξη ΠΑΥ. Επιπρόσθετα, στο πρώτο σκέλος της μελέτης δεν παρατηρήθηκε σημαντική επίδραση σε μεσαίου μεγέθους πνευμονικές αρτηρίες με την αναστολή των υποδοχέων TGF- β . Αντίθετα, στο δεύτερο σκέλος της μελέτης

παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του πάχους του τοιχώματος και σε μεσαίου μεγέθους πνευμονικές αρτηρίες (50-200 μ m).

Η παρατήρηση αυτή είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα και μπορεί να οφείλεται στους ακόλουθους λόγους.

Πρώτον, υπάρχει ετερογένεια στην ανταπόκριση των λείων μυϊκών κυττάρων στα διάφορα ερεθίσματα, μεταξύ των διαφόρων τμημάτων του πνευμονικού αγγειακού δέντρου σύμφωνα με προηγούμενες βιβλιογραφικές αναφορές [101,102].

Δεύτερον, υπάρχει πιθανότητα ύπαρξης διαφορετικών μηχανισμών υπερτροφίας του μέσου χιτώνα μεταξύ μικρού και μεσαίου μεγέθους αγγείων. Συγκεκριμένα, σε αντίθεση με τη διαφοροποίηση των περικυττάρων προς λεία μυϊκά κύτταρα που συμβαίνει στα προτριχοειδικά πνευμονικά αρτηριόλια, στα πιο εγγύς τμήματα (μεσαίου μεγέθους πνευμονικές αρτηρίες), παρατηρείται μετανάστευση και υπερπλασία λείων μυϊκών κυττάρων με τελικό αποτέλεσμα την πάχυνση του μέσου χιτώνα και τη δημιουργία ενός ενδιάμεσου μεταβατικού χιτώνα μεταξύ ενδοθηλίου και μέσου χιτώνα [103].

Τρίτον, η δυνατότητα σύνδεσης του TGF- β με διαφορετικούς τύπους κυττάρων, αλλά και διαφορετικούς τύπους υποδοχέα στο ίδιο κύτταρο, μπορεί να οδηγεί σε ποικίλουσα έκφραση του παράγοντα και ίσως και σε αλληλεπιδράσεις με αντίθετα αποτελέσματα. Για παράδειγμα, η σύνδεση του TGF- β με τον υποδοχέα ALK1 προάγει την φωσφορυλίωση του Smad1/5 προκαλώντας υπερπλασία των ενδοθηλιακών κυττάρων και μετανάστευσή τους, ενώ αντίθετα, η σύνδεση του TGF- β με τον υποδοχέα ALK5 ενεργοποιεί την φωσφορυλίωση του Smad2/3 οδηγώντας

σε αναστολή των παραπάνω λειτουργιών. Από την άλλη, ενώ ο υποδοχέας ALK1 προάγει αντίθετη δράση από τον ALK5, συγχρόνως είναι απαραίτητος για την βέλτιστη λειτουργικότητα του ALK5, διατηρώντας έτσι λεπτές ισορροπίες μεταξύ των δύο αντίθετων οδών σηματοδότησης [46].

Τέταρτον, οι διαφορές στην αναδιαμόρφωση των πνευμονικών αγγείων στις δύο φάσεις της μελέτης μπορεί να εξηγούνται από τον χρόνο έναρξης της θεραπευτικής παρέμβασης. Στα όψιμα στάδια της νόσου, δηλαδή 4 εβδομάδες μετά τη χορήγηση της μονοκροταλίνης, έχουν ολοκληρωθεί σχεδόν στο μέγιστο βαθμό οι παθολογοανατομικές αλλοιώσεις και στα πιο εγγύς τμήματα του πνευμονικού αγγειακού δικτύου (αύξηση του μέσου χιτώνα και σε μεσαίου μεγέθους αρτηρίες). Έτσι, η επίδραση της φαρμακευτικής παρέμβασης αναμένεται να είναι πολύ μεγαλύτερη. Αντίθετα, στα πιο πρώιμα στάδια, η επίδραση της φαρμακευτικής παρέμβασης είναι μικρότερη, εφ' όσον δεν υπάρχει σημαντική αύξηση του μέσου χιτώνα.

Πέμπτον, η διάρκεια θεραπείας υπήρξε διαφορετική στα δύο σκέλη της μελέτης. Στο πρώτο σκέλος, τα αντισώματα εναντίον του TGF-β χορηγήθηκαν για μία εβδομάδα ενδοπεριτοναϊκά μέσω ειδικής αντλίας έγχυσης, ενώ στο δεύτερο σκέλος χορηγήθηκαν ενδοφλεβίως για δύο εβδομάδες. Βελτίωση ωστόσο των αιμοδυναμικών και ιστολογικών παραμέτρων παρατηρήθηκαν και στις δύο περιπτώσεις, συγκριτικά με τις ομάδες ελέγχου. Πιθανότατα, απαιτείται πιο παρατεταμένη αναστολή της δράσης του TGF-β, υπεύθυνης για την πάχυνση του μέσου χιτώνα των μεσαίου μεγέθους αρτηριών του πνευμονικού δικτύου, συγκριτικά με την αναδιαμόρφωση στα μικρά πνευμονικά αρτηριόλια.

- Επίδραση του χρόνου έναρξης θεραπείας και διάρκεια φαρμακευτικής παρέμβασης στην εξέλιξη της ΠΑΥ

Σύμφωνα με το πρότυπο πρόκλησης πνευμονικής υπέρτασης σε επίμυες, παρατηρείται σημαντική αύξηση της πίεσης της πνευμονικής αρτηρίας και ανάπτυξη υπερτροφίας της δεξιάς κοιλίας ήδη από την έβδομη μέρα χορήγησης της μονοκροταλίνης υποδορίως. Η αναδιαμόρφωση του πνευμονικού αγγειακού δικτύου ολοκληρώνεται στις τέσσερις εβδομάδες με όλες τις επακόλουθες μεταβολές στις αιμοδυναμικές και ιστολογικές παραμέτρους.

Στο πρώτο σκέλος της μελέτης, η θεραπευτική φαρμακευτική παρέμβαση χορηγήθηκε σχετικά νωρίς, μόλις την έβδομη μέρα μετά τη χορήγηση της μονοκροταλίνης, αποσκοπώντας στην αναστολή της εξέλιξης της ΠΑΥ σε πιο πρώιμα στάδια της ανάπτυξής της. Τα ευρήματά μας (μειωμένη κατά 27.8% συστολική πίεση της δεξιάς κοιλίας μετά την θεραπεία με anti-TGF-β) επιβεβαιώνουν αυτήν την υπόθεση. Το ποσοστό των ασθενών στους οποίους η ΠΑΥ διαγιγνώσκεται στα αρχικά στάδιά της αυξάνεται συνεχώς, είτε λόγω μεγαλύτερου βαθμού υποψίας του κλινικού ιατρού για την πιθανότητα ΠΑΥ, είτε λόγω των βελτιωμένων διαγνωστικών τεχνικών. Έτσι, η αναζήτηση θεραπευτικών μεθόδων που επιδρούν αποτελεσματικά στους πρώιμους μηχανισμούς εξέλιξης της νόσου έχει σημαντική κλινική βαρύτητα.

Στο δεύτερο σκέλος, η θεραπεία χορηγήθηκε τέσσερις εβδομάδες μετά την χορήγηση της μονοκροταλίνης με στόχο τη βελτίωση της εξέλιξης της ΠΑΥ σε πιο

προχωρημένα στάδια. Και σε αυτή την περίπτωση παρατηρήσαμε σημαντική βελτίωση όσον αφορά την μείωση της συστολικής πίεσης της δεξιάς κοιλίας (κατά περίπου 45%), την παρεμπόδιση της υπερτροφίας της δεξιάς κοιλίας (κατά περίπου 30%) και της αναδιαμόρφωσης των πνευμονικού αρτηριακού δικτύου. Από τα ευρήματα του δεύτερου σκέλους προκύπτουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα όσον αφορά την πιθανότητα αναστροφής των ήδη εγκατεστημένων αλλοιώσεων σε ασθενείς με σοβαρού βαθμού ΠΑΥ.

-Οδοί χορήγησης αντισωμάτων εναντίον TGF-β

Στα δύο σκέλη της μελέτης χρησιμοποιήσαμε δύο διαφορετικούς τρόπους χορήγησης των αντισωμάτων εναντίον του μεταμορφωτικού αυξητικού παράγοντα-β (anti-TGF-β): α) ενδοπεριτοναϊκά μέσω ωσμωτικής αντλίας χορήγησης και β) ενδοφλεβίως. Και στις δύο περιπτώσεις παρατηρήθηκε μειωμένη συστολική πίεση της δεξιάς κοιλίας (κατά 27.85 και 45% αντίστοιχα) , καθώς και μειωμένη υπερτροφία αυτής (κατά 26.6% και 30% αντίστοιχα) , εύρημα που υποδηλώνει ότι και οι δύο τρόποι χορήγησης μπορεί να είναι αποτελεσματικοί.

Σε προηγούμενες μελέτες, έχουν χρησιμοποιηθεί ποικίλοι τρόποι χορήγησης ανάλογων αντισωμάτων αναστολής της οδού του TGF-β. Για παράδειγμα, η χορήγηση ενός αντισώματος εναντίον του υποδοχέα TGF-β τύπου-I (SD208) έγινε από του στόματος, παράλληλα με τη χορήγηση μονοκροταλίνης. Η θεραπεία αυτή είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της μέσης πίεσης της πνευμονικής αρτηρίας κατά 22% [47]. Σε άλλη μελέτη, η χορήγηση ενός αντισώματος εναντίον του υποδοχέα ακτιβίνης προσομοιάζουσας με κινάση – 5 (IN-1233) έγινε ενδοπεριτοναϊκά. Η

θεραπεία αυτή ανέστειλε την οδό TGF-β/Smad3 και είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της συστολικής πίεσης της δεξιάς κοιλίας [37].

Η αναζήτηση του πιο αποτελεσματικού τρόπου χορήγησης αποτελεί σημείο ενδιαφέροντος. Αξίζει να σημειωθεί η αυξημένη πιθανότητα της καλύτερης αποτελεσματικότητας της ενδοφλέβιας χορήγησης, πιθανόν λόγω των αυξημένων επιπέδων της χορηγούμενης ουσίας στο πλάσμα, όπως προκύπτει από αναφορές της εταιρείας παραγωγής της (Genzyme Corporation).

-Είδος αντισώματος

Εκτός από τον διαφορετικό τρόπο χορήγησης των αντισωμάτων εναντίον του TGF-β στα δύο σκέλη της μελέτης, πρέπει να σημειωθεί ότι χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα που ναι μεν ουδετεροποιούν και τις τρεις ισομορφές του TGF-β, πρόκειται όμως για διαφορετικά μόρια. Σε αντίθεση με το λιγότερο μελετημένο αντίσωμα T9429 του πρώτου σκέλους της μελέτης, το αντίσωμα 1D11 του δεύτερου σκέλους έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε διάφορες μελέτες στον τομέα της νεφρολογίας και της ογκολογίας με αποδεδειγμένη αποτελεσματικότητα *in vitro* και *in vivo* [97, 98].

-Σύγκριση αντισωμάτων εναντίον TGF-β και αναστολέα υποδοχέων ενδοθηλίνης-

1

Στο δεύτερο σκέλος της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές φαρμακευτικές παρεμβάσεις, και συγκεκριμένα η αναστολή της οδού του μεταμορφωτικού αυξητικού παράγοντα TGF-β και η αναστολή της οδού της ενδοθηλίνης-1, μόνες και σε συνδυασμό. Η θεραπεία τόσο με αντισώματα εναντίον

του TGF-β , όσο και με αναστολέα υποδοχέων A και B της ενδοθηλίνης-1 (μποσεντάνη) είχε παρόμοια αποτελέσματα όσον αφορά την μείωση της συστολικής πίεσης της δεξιάς κοιλίας, τον περιορισμό της υπερτροφίας της δεξιάς κοιλίας, τη βελτίωση της αντοχής στην κόπωση και τη βελτίωση των ιστολογικών παραμέτρων.

Έχουν προηγηθεί αρκετές μελέτες με συνδυαστικές θεραπείες. Για παράδειγμα, ο συνδυασμός μποσεντάνης και σιλденаφίλης (αναστολέας φωσφοδιεστεράσης-5) είχε καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά τη μείωση της μέσης πνευμονικής αρτηριακής πίεσης και τον περιορισμό της υπερτροφίας της δεξιάς κοιλίας, από ότι κάθε θεραπεία χωριστά [104, 105].

Στην παρούσα μελέτη ερευνήσαμε για πρώτη φορά το αποτέλεσμα της συνδυαστικής θεραπείας αντισωμάτων εναντίον του TGF-β και μικτών ανταγωνιστών ενδοθηλίνης-1, χωρίς ωστόσο διαφορά στην αποτελεσματικότητα σε σύγκριση με την κάθε θεραπεία χωριστά. Συγκεκριμένα, βρέθηκε παρόμοια ανταπόκριση στη συνδυαστική θεραπεία όσον αφορά την μείωση της συστολικής πίεσης της δεξιάς κοιλίας, τον περιορισμό της υπερτροφίας της δεξιάς κοιλίας, τη βελτίωση της αντοχής στην κόπωση και τη βελτίωση των ιστολογικών παραμέτρων, συγκριτικά με την κάθε θεραπεία ξεχωριστά.

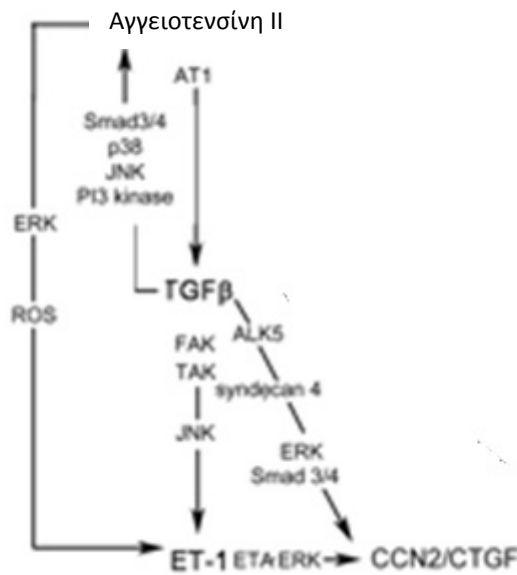
Το γεγονός αυτό θέτει την υποψία για πιθανό κοινό μηχανισμό δράσης μεταξύ TGF-β και ενδοθηλίνης-1. Προς αυτή την κατεύθυνση μας οδηγεί και μία σειρά προγενέστερων μελετών, όπου φαίνεται ότι ο TGF-β διαδραματίζει ρόλο στη ρύθμιση της σύνθεσης της ενδοθηλίνης-1, αλλά και ότι η ενδοθηλίνη-1 αποτελεί ρυθμιστικό μεσολαβητή για πολλές ενέργειες του TGF-β. Πιο συγκεκριμένα, σε

μελέτες *in vitro* παρατηρήθηκε ότι ο TGF- β αυξάνει σημαντικά την έκφραση του mRNA της pre-pro-ενδοθηλίνης-1 (pre-proET-1) και επομένως την παραγωγή της ενδοθηλίνης-1 σε λεία μυϊκά κύτταρα πνευμονικών αρτηριών επίμυων και ανθρώπων [106]. Η χορήγηση TGF- β αυξάνει την ενδοθηλίνη-1 σε ενδοθηλιακά κύτταρα ανθρώπινων πνευμονικών αρτηριδίων μέσω φωσφορυλίωσης των οδών Smad [107]. Σε πνευμονικούς ινοβλάστες, ο TGF- β αυξάνει την παραγωγή της ενδοθηλίνης-1 μέσω ενεργοποίησης των μηχανισμών εξαρτώμενων από την οδό TGF- β /ALK5, καθώς και από την οδό Jun N-terminal kinase. Επιπλέον, στους πνευμονικούς ινοβλάστες η ενδοθηλίνη-1 δρα ως μεσολαβητής της δράσης του TGF- β , αφού η χορήγηση αναστολέα της ET-1 μείωσε ινωτικούς δείκτες που σχετίζονται με τον TGF- β [110].

Ο παράγοντας BMP-9 διεγείρει την απελευθέρωση ενδοθηλίνης-1 από τα ενδοθηλιακά κύτταρα των πνευμονικών αρτηριών υπό φυσιολογικές συνθήκες. Αυτή η απελευθέρωση γίνεται μέσω μεσολάβησης Smad1 και p38MAPK, ενώ είναι ανεξάρτητη από την οδό του Smad4. Αυξημένη παραγωγή ET-1 από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, ως συνέπεια της δυσλειτουργίας του υποδοχέα BMPR-II ή του ALK1, φαίνεται ότι σχετίζεται με την παθογένεση της ΠΑΥ. Ωστόσο, η παραγωγή ET-1 εξαρτάται μόνο μερικώς από την έκφραση του συμπλέγματος BMP9- BMPRII στα ενδοθηλιακά κύτταρα [119].

Τα παραπάνω ευρήματα οδηγούν στην υπόθεση ότι ο TGF- β και η ενδοθηλίνη-1 πιθανώς να έχουν κοινούς μηχανισμούς έκφρασης. Στο παρακάτω σχήμα φαίνονται οι αλληλοεπιδράσεις μεταξύ αγγειοτενσίνης II, TGF- β , ενδοθηλίνης-1 και CTGF (αυξητικός παράγοντας συνδετικού ιστού), καθώς και των επιμέρους μεσολαβητών

τους στη διαδικασία της ίνωσης. Ο TGF- β διεγείρει την ενδοθηλίνη-1 μέσω των οδών JNK, FAK, TAK και συγχρόνως η ενδοθηλίνη-1 αποτελεί μεσολαβητή για την έκφραση των ιδιοτήτων του TGF- β που προάγουν την ίνωση.



Η συνδυαστική θεραπευτική προσέγγιση της πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης βασίζεται σε πολύπλοκους μηχανισμούς η διερεύνηση των οποίων θα αποτελέσει αντικείμενο ενδελεχούς έρευνας στο μέλλον.

-Επιδράσεις θεραπείας στην αντοχή στην άσκηση

Μελετήσαμε την αντοχή στην άσκηση με δύο ξεχωριστές δοκιμασίες, τη δοκιμασία κούμψης και τη δοκιμασία κοπώσεως με διάδρομο. Η δοκιμασία κοπώσεως αποτελεί μία σημαντική παράμετρο στην εκτίμηση του κλινικού σταδίου εξέλιξης

πολλών καρδιολογικών παθήσεων και μας παρέχει χρήσιμες πληροφορίες για τη λειτουργική κατάσταση. Κατά συνέπεια, η παράμετρος αυτή αποτελεί συχνό τελικό σημείο σε κλινικές μελέτες. Παρατηρήσαμε βελτίωση της αντοχής στην άσκηση των επιμύων που είχαν λάβει anti-TGF-β ή μποσεντάνη ή συνδυασμό τους, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Ειδικότερα, στο πρώτο σκέλος, σημειώθηκε τριπλάσια αύξηση της αντοχής στην κόπωση των επιμύων που είχαν λάβει αντισώματα σε σχέση με την ομάδα μονοκροταλίνης. Το εύρημα αυτό υποδεικνύει ότι η θετική επίδραση της αναστολής του TGF-β στις ιστολογικές και αιμοδυναμικές παραμέτρους, μπορεί να μεταφραστεί σε βελτιωμένη λειτουργική ικανότητα.

-Καινοτομίες

Η παρούσα διατριβή είχε πολλές καινοτομίες, οι οποίες συνοψίζονται παρακάτω:

α. Προκαλέσαμε εξουδετέρωση (ουδετεροποίηση) της βιολογικής δράσης και των τριών ισομορφών του μεταμορφωτικού αυξητικού παράγοντα-β (TGF-β 1,2,3) χορηγώντας αντισώματα. Σε προηγούμενες μελέτες η αναστολή αφορούσε συγκεκριμένο τύπο υποδοχέα τύπου I (ALK1 έως 7) ή τύπου II (TGFβR-II, ActR-IIB, ActR-IIA, BMPR-II).

β. Ο συνδυασμός της διπλής φαρμακευτικής παρέμβασης με αναστολείς TGF-β και αναστολείς ενδοθηλίνης-1 δεν έχει μελετηθεί.

γ. Επιχειρήθηκε σύνδεση των αποτελεσμάτων των αιμοδυναμικών μετρήσεων και των παθολογοανατομικών αναλύσεων με τα αποτελέσματα δοκιμασιών κόπωσης που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της λειτουργικής κατάστασης.

δ. Για την εκτίμηση της αντοχής στην κόπωση εφαρμόστηκε μία καθιερωμένη μέθοδος, η δοκιμασία κοπώσεως με διάδρομο, η οποία αποτελεί μία σημαντική παράμετρο στην εκτίμηση του κλινικού σταδίου εξέλιξης πολλών καρδιολογικών παθήσεων. Η δοκιμασία αυτή συμπληρώθηκε με τη δοκιμασία κολύμβησης, η οποία έχει καθιερωθεί στην έρευνα στον τομέα της νευρολογίας. Πιο συγκεκριμένα, διαταραχές της συμπεριφοράς των πειραματοζώων που μπορεί να οφείλονται σε νευρολογικές ή ψυχιατρικές παθήσεις εκδηλώνονται με αντίστοιχη συμπεριφορά στον τρόπο και τη διάρκεια κολύμβησης. Στην παρούσα μελέτη τα αποτελέσματα και από τις δύο δοκιμασίες ήταν ανάλογα, προκρίνοντας έτσι την χρήση της δοκιμασίας κολύμβησης σε πειραματοζώα για την αξιολόγηση της λειτουργικής κατάστασης.

-Περιορισμοί

Η μελέτη μας συμβάλει στην καλύτερη κατανόηση της παθοφυσιολογίας της ΠΑΥ. Η συνεκτίμηση των αιμοδυναμικών, ιστολογικών και λειτουργικών παραμέτρων προσφέρει πολύτιμες πληροφορίες. Θεωρούμε ότι επιτύχαμε τον αρχικό μας σκοπό, όμως είναι σημαντικό να επισημάνουμε κάποια σημεία στο σχεδιασμό της μελέτης που είναι πιθανό να περιορίζουν την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων μας.

Συγκεκριμένα, δεν έγινε μέτρηση των επιπέδων TGF-β στο πλάσμα ή στους πνεύμονες των επιμύων πριν και μετά τη χορήγηση μονοκροταλίνης, παρόλο που σε προηγούμενες μελέτες έχει αναφερθεί αυξημένη έκφραση του TGF-β στους πνεύμονες, τόσο πειραματοζώων, όσο και ασθενών με ΠΑΥ. Ακόμη, περιοριστήκαμε στην πιο σφαιρική διερεύνηση της αναστολής της οδού του TGF-β, χωρίς περαιτέρω εμβάθυνση στα επιμέρους πολύπλοκα μονοπάτια της συγκεκριμένης οδού. Η

επιλογή των συγκεκριμένων δοσολογικών σχημάτων έγινε με βάση προηγούμενες βιβλιογραφικές αναφορές [104, 113]. Κρίνεται σκόπιμο να γίνουν επιπλέον μελέτες προκειμένου να προσδιοριστεί το βέλτιστο δοσολογικό σχήμα χορήγησης των αντισωμάτων εναντίον του TGF-β. Τέλος, ο διαφορετικός τρόπος χορήγησης των αντισωμάτων εναντίον του TGF-β (ενδοπεριτοναϊκά και ενδοφλέβια) και η διαφορετική διάρκεια της φαρμακευτικής παρέμβασης στο κάθε σκέλος της μελέτης, ίσως περιπλέκει τη σύγκριση μεταξύ πρώιμης και πιο καθυστερημένης έναρξης της θεραπείας.

V. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Παρατηρήσαμε μείωση του βαθμού ανάπτυξης ΠΑΥ μετά τη χορήγηση αντισωμάτων που εξουδετερώνουν τις τρεις ισομορφές του Μεταμορφωτικού Αυξητικού Παράγοντα-β (TGF-β) και στα δύο σκέλη της μελέτης. Αυτή η φαρμακευτική παρέμβαση είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της συστολικής πίεσης της δεξιάς, την μείωση της υπερτροφίας της δεξιάς κοιλίας, καθώς επίσης τη μείωση του βαθμού αναδιαμόρφωσης των πνευμονικών αγγείων. Οι ευνοϊκές αυτές επιδράσεις μεταφράστηκαν σε αυξημένη αντοχή στην άσκηση.

Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ της συνδυαστικής θεραπείας (αντισώματα εναντίον του TGF-β και αναστολείς ενδοθηλίνης-1) και της κάθε θεραπείας χωριστά στο δεύτερο σκέλος της μελέτης, μη επιβεβαιώνοντας έτσι μία από τις αρχικές υποθέσεις της μελέτης.

Τα δύο διαφορετικά σκέλη της μελέτης μας έδωσαν τη δυνατότητα να συγκρίνουμε διαφορετικούς τρόπους χορήγησης (ενδοπεριτοναϊκά και ενδοφλέβια) των αντισωμάτων εναντίον του TGF-β, διαφορετικούς χρόνους έναρξης της φαρμακευτικής παρέμβασης (μία εβδομάδα και τέσσερις εβδομάδες αντίστοιχα, μετά τη χορήγηση της μονοκροταλίνης) και διαφορετική διάρκεια αυτής. Η αναστολή της αναδιαμόρφωσης του πνευμονικού αρτηριακού δικτύου υπήρξε μεγαλύτερη στο δεύτερο σκέλος, όπου εκτός από την μείωση του αριθμού των αρτηριολίων με μυϊκό στοιχείο, παρατηρήθηκε επέκταση του ευεργετικού αποτελέσματος της θεραπείας και σε αρτηρίδια μεσαίου μεγέθους. Η μεγαλύτερη διάρκεια θεραπείας και το χρονικό σημείο έναρξης της θεραπείας είναι πιθανές εξηγήσεις για το εύρημα αυτό.

Η αναστολή της οδού του μεταμορφωτικού αυξητικού παράγοντα-β συμβάλει στη μείωση του βαθμού ανάπτυξης της πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης και ανοίγει νέους δρόμους στην θεραπευτική προσέγγιση αυτής.

VI. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΕΛΛΗΝΙΚΑ

Η πρωτοπαθής πνευμονική αρτηριακή υπέρταση (ΠΑΥ) αποτελεί μία σπάνια, αλλά σημαντική πάθηση με υψηλή νοσηρότητα και θνητότητα. Συνεπώς, η ανάγκη για καλύτερη κατανόηση των παθοφυσιολογικών μηχανισμών της νόσου και ανάπτυξη νέων θεραπειών παραμένει επιτακτική. Ανάμεσα στους υπό διερεύνηση παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς και τις πιθανές νέες θεραπευτικές προοπτικές, η αναστολή της οδού του μεταμορφωτικού αυξητικού παράγοντα-β (TGF-β) είναι η πλέον ελπιδοφόρα και αποτέλεσε αντικείμενο έρευνας της παρούσας μελέτης. Ο TGF-β συνιστά μία μεγάλη οικογένεια πλειοτροπικών κυτταροκινών που δρουν ως ρυθμιστές της κυτταρικής ανάπτυξης και της διατήρησης της κυτταρικής ομοιόστασης, μέσω ελέγχου διεργασιών όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η μετανάστευση και η απόπτωση. Ο χάρτης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ συνδέσμων και υποδοχέων της οικογένειας TGF-β που οδηγεί στην ανάπτυξη ΠΑΥ είναι πολύπλοκος και όχι πλήρως διευκρινισμένος. Μεταλλάξεις των διαφόρων τύπων υποδοχέων του TGF-β έχουν ως αποτέλεσμα τη δυσλειτουργία αυτών, οδηγώντας σε αυξημένο πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων του τοιχώματος των μικρών πνευμονικών αρτηριών.

Εξετάσαμε τον ρόλο του TGF-β στην ΠΑΥ σε πειραματικό πρότυπο επίμοις, με εφ' άπαξ χορήγηση μονοκροταλίνης. Στο πρώτο σκέλος της μελέτης χορηγήσαμε αντισώματα εναντίον του TGF-β σε πρώιμα στάδια της νόσου. Στο δεύτερο σκέλος χορηγήσαμε αντισώματα εναντίον του TGF-β σε προχωρημένα στάδια της νόσου μόνα τους, αλλά και σε συνδυασμό με αναστολείς υποδοχέων ενδοθηλίνης-1.

Συγκρίναμε τις δύο θεραπείες, καθώς και την πιθανή θεραπευτική αξία του συνδυασμού τους. Η ενδοθηλίνη-1 είναι μία ισχυρή αγγειοσυσπαστική ουσία που κατέχει κεντρικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της πνευμονικής υπέρτασης προκαλώντας ενδοθηλιακή δυσλειτουργία.

Για το πρώτο σκέλος της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν 20 επίμυες. Μία εβδομάδα μετά, την πρόκληση ΠΑΥ με μία δόση (60mg/kg) μονοκροταλίνης υποδορίως, χορηγήθηκε στους 10 επίμυες ένα αντίσωμα που εξουδετερώνει και τις τρεις ισομορφές του μεταμορφωτικού αυξητικού παράγοντα-β. Η χορήγηση έγινε για μία εβδομάδα σε δόση 0,1mg/kg ημερησίως, μέσω ωσμωτικής αντλίας, η οποία εμφυτεύθηκε ενδοπεριτοναϊκά. Στους υπόλοιπους 10 επίμυες που είχαν λάβει μονοκροταλίνη δεν έγινε άλλη παρέμβαση. Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν 10 ακόμη επίμυες, στους οποίους δεν χορηγήθηκε ούτε μονοκροταλίνη, ούτε αντίσωμα και οι οποίοι αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου. Στο τέλος των δύο εβδομάδων μετά τη χορήγηση μονοκροταλίνης, και οι τρεις ομάδες υποβλήθηκαν σε δοκιμασία αντοχής στην άσκηση, αναισθησία και μέτρηση της πίεσης δεξιάς κοιλίας. Τέλος, ελήφθησαν παρασκευάσματα καρδιάς και πνευμόνων για παθολογοανατομική εκτίμηση.

Στο δεύτερο σκέλος της μελέτης χρησιμοποιήσαμε 5 ομάδες (n=15 σε κάθε ομάδα). Προκλήθηκε ΠΑΥ εκτός της ομάδας Α, η οποία αποτέλεσε την ομάδα ελέγχου. Η θεραπευτική παρέμβαση έγινε 4 εβδομάδες αργότερα. Στην ομάδα Β χορηγήθηκε μποσεντάνη (μικτός ανταγωνιστής των υποδοχέων Α (ETA) και Β (ETB) της ενδοθηλίνης-1) σε δόση 300mg/kg ημερησίως μέσω στοματογαστρικού σωλήνα για 4 εβδομάδες. Στην ομάδα C χορηγήθηκε αντίσωμα εναντίον του μεταμορφωτικού αυξητικού παράγοντα-β (1D11, pan-specific anti-TGF-β) ενδοφλεβίως (μέσω

ραχιαίας του πέους) σε δόση 5mg/kg κάθε τρεις μέρες για δύο εβδομάδες. Στην ομάδα D δόθηκε διπλή φαρμακευτική αγωγή, δηλαδή αντίσωμα κατά του μεταμορφωτικού αυξητικού παράγοντα-β και μποσεντάνη με τον τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω. Στην ομάδα F χορηγήθηκε ουδέτερο αντίσωμα ελέγχου (13C4) 4 εβδομάδες μετά τη χορήγηση της μονοκροταλίνης. Η χορήγησή του έγινε επίσης ενδοφλεβίως, σε δόση 5mg/kg κάθε τρεις μέρες για δύο εβδομάδες. Στο τέλος των οκτώ εβδομάδων συνολικά μετά τη χορήγηση μονοκροταλίνης, όλες οι ομάδες υποβλήθηκαν σε δοκιμασία αντοχής στην άσκηση και μέτρηση της πίεσης της δεξιάς κοιλίας. Τέλος, ελήφθησαν παρασκευάσματα καρδιάς και πνευμόνων για παθολογοανατομική εκτίμηση.

Παρατηρήσαμε μείωση του βαθμού ανάπτυξης ΠΑΥ μετά τη χορήγηση αντισωμάτων εναντίον των υποδοχέων του TGF-β και στα δύο σκέλη της μελέτης. Αυτή η φαρμακευτική παρέμβαση είχε σαν αποτέλεσμα την σημαντική μείωση της συστολικής πίεσης της δεξιάς κοιλίας (κατά 27.5% και 45% αντίστοιχα), μείωση της υπερτροφίας της δεξιάς κοιλίας (κατά 26.6% και 30% αντίστοιχα), καθώς επίσης την μείωση του βαθμού αναδιαμόρφωσης των πνευμονικών αγγείων και αύξηση της αντοχής στην άσκηση. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ της συνδυαστικής θεραπείας και της κάθε θεραπείας χωριστά στο δεύτερο σκέλος της μελέτης.

Τα αποτελέσματα και των δύο σκελών ήταν ενθαρυντικά όσον αφορά την θεραπεία της ΠΑΥ με την αναστολή της οδού TGF-β. Ωστόσο, η αναστολή της αναδιαμόρφωσης του πνευμονικού αρτηριακού δικτύου υπήρξε πιο έντονη στο δεύτερο σκέλος, όπου εκτός από την μείωση του αριθμού των αρτηριολίων

(<50 μ m) με μυϊκό στοιχείο, παρατηρήθηκε επέκταση του ευεργετικού αποτελέσματος της θεραπείας και σε αρτηρίδια μεσαίου μεγέθους (50-200 μ m), στα οποία μειώθηκε το πάχος του τοιχώματος. Η μεγαλύτερη διάρκεια θεραπείας και το χρονικό σημείο έναρξης της θεραπείας είναι πιθανές εξηγήσεις.

Η αναστολή της οδού του μεταμορφωτικού αυξητικού παράγοντα- β συμβάλει στη μείωση του βαθμού ανάπτυξης της πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης και ανοίγει νέους δρόμους στην θεραπευτική προσέγγιση.

VII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΑΓΓΛΙΚΑ-SUMMARY

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is an uncommon but serious disease with high morbidity and mortality. Thus, the need for deeper understanding of the pathophysiological mechanisms is imperative. The present study examined the pathophysiological role of Transforming Growth Factor- β (TGF- β).

TGF- β represents a super-family of multifunctional cytokines, which are involved in the regulation of cellular growth, proliferation, differentiation, immigration and apoptosis. Mutations in all TGF- β receptor sub-types result in increased proliferation of smooth muscle cells in the pulmonary arterial wall.

The present study examined the role of TGF- β in the rat model of pulmonary hypertension, induced by monocrotaline injection. In the first part of the study, we administered a TGF- β pan-antibody, aiming at inhibition of the progression of early-stage PAH. In the second part, we administered a TGF- β pan-antibody at advanced PAH stages. We compared this approach with endothelin receptor blockade and we examined the effects of combined treatment. Endothelin-1 is the most potent vasoconstrictor hitherto discovered and has a central role in the pathophysiology of pulmonary hypertension. As a result, endothelin-1 receptor blockers represent the mainstay of treatment of PAH.

In the first part of the study, we used 20 Wistar rats. One week after PAH induction, a TGF- β pan-antibody was administered intraperitoneally (n=10) for one week, at a dosage of 0,1mg/kg daily, via an osmotic mini-pump. In the remainder 10 animals, no other pharmaceutical intervention was made, whereas 10 additional animals

served as normal controls. Two weeks after monocrotaline injection, exercise tolerance was evaluated and right ventricle systolic pressure was measured, followed by histological assessment of heart and lungs.

In the second part of the study, we examined 4 groups (B, C, D, E+ F, n=15 rats each), in which PAH was induced as above, whereas 15 additional rats (group A) served as controls. Treatment was commenced 4 weeks after monocrotaline injection. Bosentan (a dual endothelin receptor antagonist) was administered once daily in group B at a dose of 300mg/kg by gavage for 4 weeks. In group C, TGF- β pan-antibody (1D11) was administered intravenously every three days at a dosage of 5mg/kg for 15 days. In group D, combined treatment was administered, namely TGF- β pan-antibody (1D11) and bosentan, as described above. In group F, an indifferent antibody (13C4) was administered intravenously every three days at a dosage of 5mg/kg for 15 days. At the end of treatment, exercise tolerance was evaluated and right ventricle systolic pressure was measured, followed by histological assessment of heart and lungs.

We observed attenuation of PAH development after TGF- β receptor pan-antibody administration in both parts of the study. In treated groups, right ventricular systolic pressure was reduced (by 27.8% and 45% respectively), exercise tolerance was increased, right ventricular hypertrophy was decreased (by 26.6% and 30% respectively) and pulmonary vascular remodeling was attenuated.

TGF- β inhibition improved hemodynamic and histological parameters. In the second part of the study, no differences were observed between the three treatment groups, namely TGF- β inhibition, endothelin-receptor blockade and combined

treatment. However, the attenuation of pulmonary vascular remodeling was more evident in the second part of the study; specifically, apart from decreased number of muscularized pre-capillary pulmonary arterioles (with diameter less than 50 μ m), we also observed decreased wall-thickness in intermediate-size pulmonary arteries (50-200 μ m). This is likely the result of treatment duration and the time-point of treatment initiation.

TGF- β plays an important pathophysiological role in PAH and its inhibition may emerge as an important therapeutic approach.

VIII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Wood P. *Pulmonary Hypertension with special reference to the vasoconstrictive factor* Institute of Cardiology, National Heart Hospital, and the Brompton Hospital Received July 2, 1958.
- [2]. Wagevoort C.A. *Vasoconstriction and Medial Hypertrophy in Pulmonary Hypertension. Circulation* 1960; 22: 535-546.
- [3]. Wagevoort C.A. *Primary Pulmonary Hypertension-A Pathologic Study of the Lung Vessels in 156 Clinically Diagnosed Cases. Circulation* 1970; 42: 1163-1184.
- [4]. *ESC Clinical Practice Guidelines on Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension. European Heart Journal* (2009)30, 2493-2537.
- [5]. Hoeper M.M., Rubin L.J., *Update in Pulmonary Hypertension 2005. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* Vol. 173 pp.499-505 ,2006.
- [6]. Farber H.W., Loscalzo J. *Pulmonary arterial hypertension. N Engl J Med* 2004; 351:1655-1665.
- [7]. Μάναλη Ε.Δ., Ορφανός Σ.Ε., *Πνευμονική υπέρταση: σύγχρονη φυσιοπαθολογική και θεραπευτική προσέγγιση. PNEYMON* Number 4, Vol.19, October-December 2006.
- [8]. Budhiraja R., Rubin M.T. et al. *Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. Circulation* 2004; 109:159–165.
- [9]. Del Villar C., Alonso C.J.G., Feldstein C.A., Juncos L.A., Romero C.J. *Role of Endothelin in the pathogenesis of hypertension. Mayo Clin Proc. January* 2005; 80(1):84-96.
- [10]. Humbert M., Morrell N.W., Archer S.L., Stenmark K.R., MacLean M.R., Lang I.M., Christman B.W., Weir E.K., Eickelberg O., Voelkel N.F., Rabinovitch M. *Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. J Am Coll Cardiol* 2004; 43: 13S-24S

- [11]. Tuder R.M., Marecki J.C., Richter A., Fijalkowska I., Flores S. *Pathology of pulmonary hypertension. Clin Chest Med* 2007; 28: 23-42, vii.
- [12]. Rabinovitch M. *Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. J Clin Invest* 2008; 118:2372-9.
- [13]. Chazova I., Loyd J.E., Zhdanov V.S., Newman J.H., Belenkov Y., Meyrick B. *Pulmonary artery adventitial changes and venous involvement in primary pulmonary hypertension. Am J Pathol* 1995; 146:389-97.
- [14]. Meyrick B. , Reid L. *Ultrastructural features of the distended pulmonary arteries of the normal rat. Anat Rec* 1979 ; 193: 71-97.
- [15] Archer S.L. *Diversity of phenotype and function of vascular smooth muscle cells. J Lab Clin Med* 1996; 127: 524-529.
- [16] Frid M.G., Aldashev A.A., Dempsey E.C., Stenmark K.R. *Smooth muscle cells isolated from discrete compartments of the mature vascular media exhibit unique phenotypes and distinct growth capabilities. Circ Res* 1997; 81: 940-952.
- [17]. Sastry B.K. *Pharmacologic treatment for pulmonary arterial hypertension. Curr Opin Cardiol*2006; 21: 561-568.
- [18]. Mandegar M., Yuan J.X. *Vascul Pharmacol Role of K⁺ channels in pulmonary hypertension. 2002 Jan; 38(1):25-33.*
- [19]. Moudgil R., Michelakis E.D., Archer S.L. *The role of k⁺ channels in determining pulmonary vascular tone, oxygen sensing, cell proliferation, and apoptosis: implications in hypoxic pulmonary vasoconstriction and pulmonary arterial hypertension. Microcirculation* 2006 Dec; 13(8):615-32.

- [20]. Trembath R.C., Thomson J.R., Machado R.D., Morgan N.V., Atkinson C., Winship I., Simonneau G., Galie N., Loyd J.E., Humbert M., Nichols W.C., Morrell N.W., Berg J., Manes A., McGaughran J., Pauciulo M., Wheeler L. *Clinical and molecular genetic features of pulmonary hypertension in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. N Engl J Med 2001; 345: 325-334.*
- [21]. Harrison R.E., Flanagan J.A., Sankelo M., Abdalla S.A., Rowell J., Machado R.D., Elliott C.G., Robbins I.M., Olschewski H., McLaughlin V., Gruenig E., Kermeen F., Halme M., Raisanen-Sokolowski A., Laitinen T., Morrell N.W., Trembath R.C. *Molecular and functional analysis identifies ALK-1 as the predominant cause of pulmonary hypertension related to hereditary haemorrhagic telangiectasia. J Med Genet 2003; 40: 865-871.*
- [22]. Yeager M.E., Golpon H.A., Voelkel N.F., Tuder R.M. *Microsatellite mutational analysis of endothelial cells within plexiform lesions from patients with familial, pediatric, and sporadic pulmonary hypertension. Chest 2002; 121: 615.*
- [23]. Geraci M.W., Hoshikawa Y., Yeager M., Golpon H., Gesell T., Tuder R.M., Voelkel N.F. *Gene expression profiles in pulmonary hypertension. Chest 2002; 121: 104S-105S.*
- [24]. Morrell N.W. *Pulmonary hypertension due to BMPR2 mutation: a new paradigm for tissue remodeling? Proc Am Thorac Soc. 2006 Nov; 3(8):680-6.*
- [25]. Li W., Dunmore B.J., Morrell N.W. *Bone morphogenetic protein type II receptor mutations causing protein misfolding in heritable pulmonary arterial hypertension. Proc Am Thorac Soc. 2010 Nov; 7(6):395-8.*
- [26]. Yang J., Davies R.J., Southwood M., Long L., Yang X., Sobolewski A., Upton P.D., Trembath R.C., Morrell N.W. *Mutations in bone morphogenetic protein type II receptor cause dysregulation*

of Id gene expression in pulmonary artery smooth muscle cells: implications for familial pulmonary arterial hypertension. Circ Res. 2008 May 23; 102(10):1212-21. Epub 2008 Apr 24.

[27]. Fujiwara M., Yagi H., Matsuoka R., Akimoto K., Furutani M., Imamura S., Uehara R., Nakayama T., Takao A., Nakazawa M., Saji T. Implications of mutations of activin receptor-like kinase 1 gene (ALK1) in addition to bone morphogenetic protein receptor II gene (BMP2) in children with pulmonary arterial hypertension. *Circ J. 2008 Jan; 72(1):127-33.*

[28]. Sztrymf B., Yaïci A., Jaïs X., Sitbon O., Simonneau G., Humbert M. Idiopathic pulmonary hypertension: what did we learn from genes? *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis. 2005 Dec; 22 Suppl 1:S91-100.*

[29]. Lane K.B., Machado R.D., Pauculo M.W., Thomson J.R., Phillips J.A., Loyd J.E., Nichols W.C., Trembath R.C. Heterozygous germline mutations in BMP2, encoding a TGF-beta receptor, cause familial primary pulmonary hypertension. *Nat Genet. 2000 Sep; 26(1):81-4.*

[30]. Deng Z., Morse J.H., Slager S.L., Cuervo N., Moore K.J., Venetos G., Kalachikov S., Cayanis E., Fischer S.G., Barst R.J., Hodge S.E., Knowles J.A. Familial primary pulmonary hypertension (gene PPH1) is caused by mutations in the bone morphogenetic protein receptor-II gene. *Am J Hum Genet. 2000 Sep; 67(3):737-44.*

[31]. Todaro G.J., De Larco J.E. Growth factors produced by sarcoma virus-transformed cells. *Cancer research 1978 Nov; 38(11 Pt 2):4147-54.*

[32]. Serra Rosa Transforming Growth Factor beta. *Encyclopedia Life Sciences ,2002 Macmillan Publishers Ltd.*

[33]. Roberts A.B.,Sporn M.B. Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Growth Factors 1993; 8: 1-9.*

[34]. Chen D., Zhao M., Mundy G.R. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 2004 Dec; 22(4):233-41.

[35]. Hu P., Datto M.B., Wang X. *Molecular Mechanisms of Transforming Growth Factor- β* , June 1998.

[36]. Khan R., Agrotis A., Bobik A. Understanding the role of transforming growth factor-beta1 in intimal thickening after vascular injury. *Cardiovasc Res* 2007; 74: 223-234.

[37]. Long L., Crosby A., Yang X., Southwood M., Upton P.D., Kim D.K., Morrell N.W. Altered bone morphogenetic protein and transforming growth factor-beta signaling in rat models of pulmonary hypertension: potential for activin receptor-like kinase-5 inhibition in prevention and progression of disease. *Circulation* 2009; 119: 566-576.

[38]. Perkett E.A., Lyons R.M., Moses H.L., Brigham K.L., Meyrick B. Transforming growth factor-beta activity in sheep lung lymph during the development of pulmonary hypertension. *J Clin Invest* 1990; 86: 1459-1464.

[39]. Botney M.D., Bahadori L., Gold L.I. Vascular remodeling in primary pulmonary hypertension Potential role for transforming growth factorbeta. *Am J Pathol* 1994; 144: 286-295.

[40]. Morrell N.W., Yang X., Upton P.D., Jourdan K.B., Morgan N., Sheares K.K., Trembath R.C. Altered growth responses of pulmonary artery smooth muscle cells from patients with primary pulmonary hypertension to transforming growth factor-beta(1) and bone morphogenetic proteins. *Circulation* 2001; 104: 790-795.

[41]. Rudarakanchana N., Flanagan J.A., Chen H., Upton P.D., Machado R., Patel D., Trembath R.C., Morrell N.W. Functional analysis of bone morphogenetic protein type II receptor mutations underlying primary pulmonary hypertension. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 1517-1525.

[42]. Cocolakis E., Lemay S., Ali S., Lebrun J. *The p38 MAPK Pathway Is Required for Cell Growth Inhibition of Human Breast Cancer Cells in Response to Activin* *The Journal of Biological Chemistry*. 276, 18430-18436.

[44]. Zakrzewicz A., Kouri F.M., Nejman B., Kwapiszewska G., Hecker M., Sandu R., Dony E., Seeger W., Schermuly R.T., Eickelberg O., Morty R.E. *The transforming growth factor-beta/Smad2,3 signalling axis is impaired in experimental pulmonary hypertension*. *Eur Respir J* 2007; 29: 1094-1104.

[45]. Tanaka Y., Bernstein M.L., Mecham R.P., Patterson G.A., Cooper J.D., Botney M.D. *Site-specific responses to monocrotaline-induced vascular injury: evidence for two distinct mechanisms of remodeling*. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996; 15: 390-397.

[46]. Goumans M.J., Valdimarsdottir G., Itoh S., Lebrin F., Larsson J., Mummery C., Karlsson S., Dijke P. *Activin receptor-like kinase (ALK1) is an antagonistic mediator of lateral TGFbeta/ALK5 signaling*. *Mol Cell* 2003; 12: 817-828.

[47]. Zaiman A.L., Podowski M., Medicherla S., Gordy K., Xu F., Zhen L., Shimoda L.A., Neptune E., Higgins L., Murphy A., Chakravarty S., Protter A., Sehgal P.B., Champion H.C., Tudor R.M. *Role of the TGF-beta/Alk5 signaling pathway in monocrotaline-induced pulmonary hypertension*. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177: 896-905.

[48]. Teichert-Kuliszewska K., Kutryk M.J., Kuliszewski M.A., Karoubi G., Courtman D.W., Zucco L., Granton J., Stewart D.J. *Bone morphogenetic protein receptor-2 signaling promotes pulmonary arterial endothelial cell survival: implications for loss-of-function mutations in the pathogenesis of pulmonary hypertension*. *Circ Res*. 2006 Feb 3; 98(2):209-17. Epub 2005 Dec 15.

[49]. Fantozzi I., Platoshyn O., Wong A.H., Zhang S., Remillard C.V., Furtado M.R., Petruskane O.V., Yuan J.X. *Bone morphogenetic protein-2 upregulates expression and function of voltage-*

gated K⁺ channels in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006 Nov; 291(5):L993-1004.

[50] Ramos M., Lame M., Segall H., Wilson D. Smad Signaling in the Rat Model of Monocrotaline Pulmonary Hypertension. *Toxicologic Pathology:* 36:311-320, 2008.

[51]. Sycaras N., Opperman L., BMPs: how do they function and what can they offer the clinician? *Journal of Oral Science, Vol.45, No.2, 57-73, 2003.*

[52]. Young K., Ivester C., West j., Carr M., Rodman D., BMP signaling controls PASMC K channel expression in vitro and in vivo. *Am J Physiol Lung Cell Moll Physiol* 290; L841-L848, 2006.

[53]. Yu p., Beppu H., Kawai N., Bloch K.D. BMPRII Receptor deletion reveals BMP Ligand –specific gain of signaling in pulmonary artery smooth muscle cells. *J Biol. Chem Vol.280 Issue 26, 24443-24450, 2005.*

[54]. Rory E. Morty, Nejman B., Kwapiszewska G., Hecker M., Zakrzewicz A., Kouri F.M., Peters D.M., Dumitrascu R., Seeger W., Knaus P., Schermuly R.T., Eickelberg O. Dysregulated Bone Morphogenetic Protein Signaling in Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension, *Arterioscler. Thromb.Vasc. Biol.* 2007 ; 27:1072-1078;2007.

[55]. Hansmann G., de Jesus Perez V.A., Alastalo T.P., Alvira C.M., Guignabert C., Bekker J.M., Schellong S., Urashima T., Wang L., Morrell N.W., Rabinovitch An antiproliferative BMP-2/PPARgamma/apoE axis in human and murine SMCs and its role in pulmonary hypertension. *M. J Clin Invest.* 2008 May; 118(5):1846-57.

[56]. Jeffery T.K., Upton P.D., Trembath R.C., Morrell N.W. BMP4 inhibits proliferation and promotes myocyte differentiation of lung fibroblasts via Smad1 and JNK pathways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005 Feb; 288(2):L370-8.

[57]. Laurent P. *The endothelium and genetics in pulmonary arterial hypertension. Swiss Med WKLY* 2007; 137:437-442.

[58]. YVES A. *Vascular endothelial growth factor: Crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding. Biochemistry* site Vol. 94, pp. 7192–7197, July 1997.

[59]. Hickey K.A., Rubanyi G., Paul R.J., Highsmith R.F. *Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. Am J Physiol Cell Physiol* May 1, 1985 vol. 248 no. 5 C550-C556.

[60]. Kloog Y., Ambar I., Sokolovsky M., Kochva E., Wollberg Z., Bdolah A. *Sarafotoxin, a novel vasoconstrictor peptide: phosphoinositide hydrolysis in rat heart and brain. Science* 14 October 1988: Vol. 242 no. 4876 pp. 268-270

[61]. Inoue A., Yanagisawa M., Kimura S., Kasuya Y., Miyauchi T., Goto K., Masaki T. *The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. Proc Natl Acad Sci USA* 86:2863-2867; 1989.

[62]. Yanagisawa M., Kurihara H., Kimura S. et al. *A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. Nature* 1988; 332:411–5.

[63]. Xu D., Emoto N., Giaid A., Slaughter C., Kaw S., deWit D., Yanagisawa *ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. M.Cell.* 1994 Aug 12; 78(3):473-85.

[64]. Giaid A., Yanagisawa M., Langleben D. et al. *Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. N Engl J Med* 1993; 326:1732–9.

[65]. Haynes W.G., Webb D.J. *The endothelin family of peptides: local hormones with diverse roles in health and disease? Clin Sci* 84:485-500; 1993.

- [66]. Rubanyi G.M., Polokoff M.A. *Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology*. *Pharmacol Rev* 1994; 46: 325-415.
- [67]. Fukuroda T., Fujikawa T., Ozaki S., Ishikawa K., Yano M., Nishikibe M. *Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats*. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 199: 1461-1465.
- [68] Lüscher T., Barton M. *Endothelins and Endothelin Receptor Antagonists Therapeutic Considerations for a Novel Class of Cardiovascular Drugs*. *Circulation* 2000; 102: 2434-2440.
- [69]. Haynes W.G., Webb D.J. *Endothelin as a regulator of cardiovascular function in health and disease*. *J Hypertens* 1998 ; 16:1081–98.
- [70]. Benigni A., Remuzzi G. *Endothelin antagonists*. *Lancet* 1999; 353:133–8.
- [71]. Loeffler B.D. *Endothelin-converting enzyme inhibitors: current status and perspectives*. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 35 (suppl 2):79–82.
- [72]. Zhang S., Fantozzi I., Tigno D.D., Yi E.S., Platoshyn O., Thistlethwaite P.A., Kriett J.M., Yung G., Rubin L.J., Yuan J.X. *Bone morphogenetic proteins induce apoptosis in human pulmonary vascular smooth muscle cells*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003 Sep; 285(3):L740-54.
- [73]. Galie N., Rubin L., Hoepfer M., Jansa P., Al-Hiti H., Meyer G., Chiossi E., Kusic-Pajic A., Simonneau G. *Treatment of patients with mildly symptomatic pulmonary arterial hypertension with bosentan (EARLY study): a double-blind, randomized controlled trial*. *Lancet* 2008; 371: 2093-2100.
- [74]. Spratt J.C., Goddard J. et al. *Systemic ETA receptor antagonism with BQ-123 blocks ET-1 induced forearm vasoconstriction and decreases peripheral vascular resistance in healthy men*. *Br J Pharmacol* 2001; 134:648–54.

[75]. Channick R.N., Simonneau G., Sitbon O. et al. Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomized placebo-controlled study. *Lancet* 2001; 358:1119–23.

[76]. Rubin L.J., Badesch D.B., Barst R.J. et al. Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2002; 346:896–903.

[77]. Sitbon O., Badesch D.B. et al. Effects of the dual endothelin receptor antagonist bosentan in patients with primary pulmonary hypertension: a 1-year follow-up study. *Chest* 2003;124:247–54.

[78]. Rubin L.J., Badesch D.B., Barst R.J. et al. Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 346 2002 896-903.

[79]. Barst R.J., Langleben D. et al. Sitaxsentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *Am J Resp Crit Care Med* 2004; 169:441

[80]. *Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neurosciences and Behavioral (2003).*

[81]. Todorovich-Hunter L., Johnson D.J., Ranger P., Keeley F.W., Rabinovitch M. Altered elastin and collagen synthesis associated with progressive pulmonary hypertension induced by monocrotaline. A biochemical and ultrastructural study. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* [1988, 58(2):184-195].

[82]. Tanaka Y., Bernstein M.L., Mecham R.P., Patterson G.A., Cooper J.D., Botney M.D. Site-specific responses to monocrotaline-induced vascular injury: evidence for two distinct mechanisms of remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1996 Sep; 15(3):390-7.

[83]. Kolettis T., Vlahos A.P., Louka M., Hatzistergos K.E., Baltogiannis G.G., Agelaki M.M., Mitsi A., Malamou-Mitsi V. Characterisation of a rat model of pulmonary arterial hypertension. *Hellenic J Cardiol* 2007; 48: 206-210.

[84]. Rey M., Hess P., Clozel M. *Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension in Wistar Rats*. *Current Protocols in Pharmacology*, Unit Number: 5.56.

[85]. Hessel H.M., Steendijk P., den Adel B., Schutte C., van der Laarse A. *Characterization of right ventricular function after monocrotaline-induced pulmonary hypertension in the intact rat*. *AJP - Heart* November 2006 vol. 291 no. 5 H2424-H2430.

[86]. Gomez-Arroyo J.G., Farkas L., Alhussaini A.A., Farkas D., Kraskauskas D., Voelkel N.F., Bogaard H.J. *The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* February 15, 2012 302:(4) L363-L369.

[87]. Ghodsi F., Will J.A. *Changes in pulmonary structure and function induced by monocrotaline intoxication*. *AJP - Heart* February 1, 1981 vol. 240 no. 2 H149-H155.

[88]. T9429 Datasheet (2009, <http://www.sigmaaldrich.com>)

[89]. Ling H., Li X., Jha S., Wang W., Karetskaya L., Pratt B., Ledbetter S. *Therapeutic role of TGF-beta-neutralizing antibody in mouse cyclosporine A nephropathy: morphologic improvement associated with functional preservation*. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Feb; 14(2):377-88.

[90]. Megalou A.J., Glava C., Oikonomidis D.L., Vilaeti A., Agelaki M.G., Baltogiannis G., Papaloi A., Vlahos A.P., Kolettis T.M. *Transforming growth factor- β inhibition attenuates pulmonary arterial hypertension in rats*. *Int J Clin Exp Med*. 2010; 3(4): 332–340.

[91]. Schulz K.F., Grimes D.A. *Generation of allocation sequences in randomised trials: chance, not choice*. *Lancet* 2002; 359: 515-519.

[92]. Moher D., Hopewell S., Schulz K.F., Montori V., Gotzsche P.C., Devereaux P.J., Elbourne D., Egger M., Altman D.G. *CONSORT 2010 explanation and elaboration: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials*. *BMJ* 2010; 340: c869.

- [93]. Furlani D., Klopsch C., Gabel R., Ugurlucan M., Pittermann E., Klee D., Wagner K., Li W., Wang W., Ong L.L., Nizze H., Titze U., Lutzow K., Lendlein A., Steinhoff G., Ma N. Intracardiac erythropoietin injection reveals antiinflammatory potential and improved cardiac functions detected by Forced Swim Test. *Transplant Proc* 2008; 40: 962-966.
- [94]. Can A., Dao D. T., Arad M., Terrillion C. E., Piantadosi S. C., Gould T. D. The Mouse Forced Swim Test. *J. Vis. Exp.* (59), e3638, DOI: 10.3791/3638 (2012).
- [95]. Meyrick B., Lyne Reid L. Ultrastructural features of the distended pulmonary arteries of the normal rat *The Anatomical Record Volume 193, Issue 1, pages 71–97.*
- [96]. Ma L., Jha S., Ling H., Pozzi A., Ledbetter S., Fogo A. Divergent effects of low versus high dose anti-TGF- antibody in puromycin aminonucleoside nephropathy in rats *Kidney International (2004) 65, 106–115.*
- [97]. Hong L., Xuemei L., Sharda J., Wang W., Karetskaya L., Pratt B., Ledbetter S. Therapeutic Role of TGF- β -Neutralizing Antibody in Mouse Cyclosporin A Nephropathy: Morphologic Improvement Associated with Functional Preservation. *JASN February 1, 2003 vol. 14 no. 2 377-388.*
- [98]. El Chaar M., Chen J., Seshan S., Jha S., Richardson I., Ledbetter S.R., Vaughan E.D. Jr, Poppas D.P., Felsen D. Effect of combination therapy with enalapril and the TGF-beta antagonist 1D11 in unilateral ureteral obstruction. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007 Apr; 292(4):F1291-301. Epub 2006 Dec 12.
- [99]. Smith M.J., Carvalho H.M., Melton-Celsa A.R., O'Brien A.D. The 13C4 monoclonal antibody that neutralizes Shiga toxin Type 1 (Stx1) recognizes three regions on the Stx1 B subunit and prevents Stx1 from binding to its eukaryotic receptor globotriaosylceramide. *Infect Immun.* 2006 Dec; 74(12):6992-8. Epub 2006 Oct 9.

[100]. Kimura H., Kasahara Y., Kurosu K., Sugito K., Takiguchi Y., Terai M., Mikata A., Natsume M., Mukaida N., Matsushima K., Kuriyama T. Alleviation of monocrotaline-induced pulmonary hypertension by antibodies to monocyte chemoattractant and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1. *Lab Invest.* 1998 May;78(5):571-81.

[101] Archer S.L. Diversity of phenotype and function of vascular smooth muscle cells. *J Lab Clin Med.* 1996 Jun; 127(6):524-9.

[102]. Frid M.G., Aldashev A.A., Dempsey .EC., Stenmark K.R. Smooth muscle cells isolated from discrete compartments of the mature vascular media exhibit unique phenotypes and distinct growth capabilities. *Circ Res.* 1997 Dec; 81(6):940-52.

[103]. Tuder R.M., Marecki J.C., Richter A., Fijalkowska I., Flores S. Pathology of pulmonary hypertension. *Clin Chest Med.* 2007 Mar; 28(1):23-42, vii.

[104]. Clozel M., Hess .P, Rey M., Iglarz M., Binkert C., Qiu C. Bosentan, sildenafil, and their combination in the monocrotaline model of pulmonary hypertension in rats. *Exp Biol Med* 2006 Jun; 231(6):967-73.

[105]. Mouchaers K.T. , Schalij I., Versteilen A.M., Hadi A.M., van Nieuw Amerongen G.P., van Hinsbergh V.W., Postmus P.E., van der Laarse W.J. Endothelin receptor blockade combined with phosphodiesterase-5 inhibition increases right ventricular mitochondrial capacity in pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 297:H200-H207.

[106]. Markewitz B.A., Farrukh I.S., Chen Y., Li Y., Michael J.R. Regulation of endothelin-1 synthesis in human pulmonary arterial smooth muscle cells. Effects of transforming growth factor-beta and hypoxia. *Cardiovasc Res.* 2001 Jan; 49(1):200-6.

[107]. Star G.P., Giovinazzo M., Langleben D. Effects of bone morphogenic proteins and transforming growth factor-beta on In-vitro production of endothelin-1 by human pulmonary

microvascular endothelial cells .*Vascular Pharmacology Volume 50, Issues 1–2, January–February 2009, Pages 45–50.*

[108]. Fei J., Viedt C., Soto U., Elsing C., Jahn L., Kreuzer J. *Endothelin-1 and Smooth Muscle Cells Induction of Jun Amino-Terminal Kinase Through an Oxygen Radical–Sensitive Mechanism* *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 May; 20(5):1244-9.

[109]. Rodriguez –Pascual F., Lamas S., Holmes A., Howat S., Pearson J.D., Dashwood M.R., Leask A. *Constitutive ALK5-independent c-Jun N-terminal kinase activation contributes to endothelin-1 overexpression in pulmonary fibrosis: evidence of an autocrine endothelin loop operating through the endothelin A and B receptors.* *Mol Cell Biol* 2006; 26:5518-5527.

[110]. Shi-Wen X., Kennedy L., Renzoni A.E., Bou-Gharios G., du Bois R.M., Leask A. *Endothelin is a downstream mediator of profibrotic responses to transforming growth factor beta in human lung fibroblasts.* *Arthritis Rheum* 2007; 56:4189-4194.

[111]. Papadopoulos P., Ongali B., Hamel E. *Selective in vivo antagonism of endothelin receptors in transforming growth factor-β1 transgenic mice that mimic the vascular pathology of Alzheimer’s disease.* *Can J Physiol Pharmacol* 2010; 88:652-660.

[112]. Little P.J., Bursh M.L., Getachew R., Osman N. *Endothelin-1 stimulation of proteoglycan synthesis in vascular smooth muscle is mediated by endothelin receptor transactivation of the transforming growth factor beta type-I receptor.* *J Cardiovasc Pharmacol* 2010; 56:360-368.

[113]. US Patent 5616561: TGFβ antagonists as mitigators of radiation- induced tissue damage. April 1, 2007.

[114]. Grutter C., Wilkinson T., Turner R., Podichetty S., Finch D., McCourt M., Loning S, Jermutus L., Grutter M.G. *A cytokine-neutralizing antibody as a structural mimetic of 2 receptor interactions.* *PNAS* December 23, 2008 vol. 105 no. 51 20251-20256.

[115]. Bridgette N., Nam Y. Lee, How T., Gerard C. ALK5 phosphorylation of the endoglin cytoplasmic domain regulates Smad1/5/8 signaling and endothelial cell migration. *Carcinogenesis*. 2010 March; 31(3): 435–441.

[116]. Finnon K.W., Parker W.L. , Chi Y. , Hoemann C.D. , Goldring M.B. , Antoniou J. , Philip A. Endoglin differentially regulates TGF- β -induced Smad2/3 and Smad1/5 signalling and its expression correlates with extracellular matrix production and cellular differentiation state in human chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010 Nov; 18(11):1518-27.

[117]. Yamamoto M., Meno C., Sakai Y., Shiratori H., Mochida K., Ikawa Y., Saijoh Y., Hamad H. The transcription factor FoxH1 (FAST) mediates Nodal signaling during anterior-posterior patterning and node formation in the mouse. *Genes & Dev*. 2001. 15: 1242-1256.

[118]. Scharpfenecker M., van Dinther M., Liu Z., van Bezooijen R.L., Zhao Q., Pukac L., Clemens W. Löwik G.M., ten Dijke P. BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. *J Cell Sci* 120, 964-972.

[119]. Park J.E., Shao D., Upton P.D., deSouza P., Adcock I.M., Davies R.J., Morrell N.W., Griffiths M., Wort S.J. BMP-9 Induced Endothelial Cell Tubule Formation and Inhibition of Migration Involves Smad1 Driven Endothelin-1 Production. *PLoS One*. 2012;7(1):e30075.

[120.] Star G.P., Giovinazzo M., Langleben D. Bone morphogenic protein-9 stimulates endothelin-1 release from human pulmonary microvascular endothelial cells A potential mechanism for elevated ET-1 levels in pulmonary arterial hypertension. *Microvasc Res* 80: 5.

[121]. Park J., Upton P.D., De Souza P., Davies R.J., Morrell N.W. et al. Bone Morphogenetic Protein (BMP)-9 Increases Endothelin (ET)-1 Release By Human Pulmonary Artery Endothelial Cells Via A MAPK Dependent Pathway. *Am J Respir Crit Care Med* 181: A5240.