



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΑΚΑΔΗΜΙΑ



ΑΘΗΝΩΝ

ΙΔΡΥΜΑ ΙΑΤΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ

## **Διπλωματική Εργασία**

**Μελέτη της δυσλειτουργίας της καρδιάς και συνοδών  
παθολογιών στον πνεύμονα και άλλα όργανα σε ζωικό  
μοντέλο καρδιακής ανεπάρκειας**

**ΝΤΑΤΣΟΥΛΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ**

*Μελέτη της δυσλειτουργίας της καρδιάς και συνοδών παθολογιών στον πνεύμονα και άλλα  
όργανα σε ζωικό μοντέλο καρδιακής ανεπάρκειας*

Μελέτη της δυσλειτουργίας της καρδιάς και συνοδών παθολογιών στον πνεύμονα  
και άλλα όργανα σε ζωικό μοντέλο καρδιακής ανεπάρκειας

Study of cardiac dysfunction and associated pathologies in the lung and other organs  
in an animal model of heart failure

## **Τριμελής Επιτροπή**

### **Δρ. ANNA ΜΑΡΙΑ ΨΑΡΡΑ (ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ)**

ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ (ΤΒΒ)

### **Δρ. ΣΤΕΛΙΟΣ ΨΑΡΡΑΣ (ΣΥΝΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)**

ΕΙΔΙΚΟΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΑΣ (ΕΛΕ) ΒΑΘΜΙΔΑ Β΄, ΙΔΡΥΜΑ  
ΙΑΤΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ ΤΗΣ ΑΚΑΔΗΜΙΑΣ ΑΘΗΝΩΝ (ΙΙΒΕΑΑ)

### **Δρ. ΓΙΑΣΕΜΗ ΚΑΠΕΤΑΝΑΚΗ**

ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ ΚΕΝΤΡΟΥ ΒΑΣΙΚΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ (ΚΒΕ),  
ΕΡΕΥΝΗΤΡΙΑ Α΄ ΙΙΒΕΑΑ

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ) το Σεπτέμβριο του 2017 έως τον Ιούνιο του 2018.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ. Στέλιο Ψαρρά για την ανάθεση του θέματος αυτής της εργασίας, για την εμπιστοσύνη, την ενθάρρυνση και την πολύτιμη βοήθεια κατά τη διεξαγωγή της.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια Άννα Μαρία Ψαρρά και την Καθηγήτρια Γιασεμή Καπετανάκη που δέχτηκαν να συμμετέχουν στην τριμελή επιτροπή.

Επιπλέον, εκτός από τα μέλη της επιτροπής, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ευγενία Συνολάκη και τον Δρ. Πασχάλη Σιδερά (ΙΙΒΕΑΑ) για τις μετρήσεις λειτουργίας του πνεύμονα και την εκμάθηση της τεχνικής απομόνωσης του πνεύμονα, τον Δρ. Σταμάτη Παγκάκη (ΙΙΒΕΑΑ) για το σύστημα αποτίμησης των κυψελιδικών διαστάσεων και τον Δρ. Α. Χαρώνη (ΙΙΒΕΑΑ) για συμβουλές στην παθοφυσιολογία των νεφρών.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Κωνσταντίνα Σταθοπούλου και την Δρ. Ιωάννα Κωσταβασίλη για την πολύτιμη βοήθειά τους στον χώρο του εργαστηρίου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, Τάσο και Ειρήνη, και τον αδερφό μου, Άγγελο, για την οικονομική, αλλά κυρίως για την πνευματική υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

## Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ .....	4
Abstract .....	7
Περίληψη .....	8
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....</b>	<b>10</b>
<b>1.1 Καρδιακή Ανεπάρκεια .....</b>	<b>11</b>
<b>1.2 Αλληλεπιδράσεις Καρδιάς- Πνεύμονα- Νεφρών .....</b>	<b>12</b>
1.2.1 Παθολογία Πνεύμονα .....	12
1.2.2 Παθολογία Νεφρών .....	16
<b>1.3 Γενετικό Μοντέλο Καρδιακής Ανεπάρκειας desmin-null .....</b>	<b>19</b>
<b>1.4 Γαλεκτίνη-3 .....</b>	<b>28</b>
1.4.1 Ρόλος της Γαλεκτίνης-3 στην Φλεγμονή και στην Ίνωση: Καρδιά .....	30
1.4.2 Ρόλος της Γαλεκτίνης-3 στην Φλεγμονή και στην Ίνωση: Πνεύμονες και Νεφρά .....	31
<b>1.5 Σκοπός της Εργασίας .....</b>	<b>32</b>
<b>2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....</b>	<b>33</b>
2.1 Πειραματόζωα .....	33
2.2 Απομόνωση Γενωμικού DNA και Γενοτυπικός Έλεγχος .....	34
2.3 Απομόνωση Πνεύμονα .....	35
2.4 Μέτρηση Λειτουργίας του Πνεύμονα .....	37
2.5 Ιστολογικές Μελέτες .....	38
Έγκλειση Ιστών και Λήψη Τομών .....	38
Λήψη, Αποπαραφινποίηση και Χρώση των Τομών .....	38
Ανοσοφθορισμός .....	41
2.6 Ανάλυση της Δομής των Κυψελίδων .....	43
2.7 Ποσοτικοποίηση της Πνευμονικής Ίνωσης .....	44
2.8 Απομόνωση RNA απο Καρδιά, Νεφρά και Πνεύμονα Ποντικού και Ανάλυση Γονιδιακής Έκφρασης με Real Time PCR .....	46
<b>3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>49</b>
3.1 Μελέτη της Λειτουργίας του Πνεύμονα .....	52
3.2 Μελέτες Έκφρασης σε Πνεύμονες Ηλικίας Τεσσάρων Μηνών .....	56
3.3 Μελέτη Εντοπισμού της MMP12 στον des <sup>-/-</sup> Πνεύμονα Τεσσάρων Μηνών .....	58
3.4 Ιστολογικές Μελέτες στον Πνεύμονα των des <sup>-/-</sup> Ποντικών .....	59
3.5 Μελέτη της Ίνωσης σε Πνεύμονες des <sup>-/-</sup> και des <sup>-/-</sup> Lgals3 <sup>-/-</sup> Ποντικών .....	62
3.6 Ιστολογικές Μελέτες των Νεφρών .....	64
3.7 Μελέτες Έκφρασης σε Νεφρά Ηλικίας Δέκα Μηνών .....	65

<b>4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>67</b>
<b>4.1 Η Έλλειψη της Δεσμίνης Προκαλεί Πρόβλημα στη Λειτουργία του Πνεύμονα που Φαίνεται να Βελτιώνεται Απουσία της Γαλεκτίνης-3 .....</b>	<b>68</b>
<b>4.2 Πιθανή Εμπλοκή της Matrix Metalloproteinase-12 (MMP12) στην Παθολογία του Πνεύμονα του desmin null Μοντέλου .....</b>	<b>70</b>
<b>4.3 Η Έλλειψη της Δεσμίνης Φαίνεται να Προκαλεί Εστίες Φλεγμονής και Ίνωσης στα Νεφρά Ποντικών .....</b>	<b>71</b>
<b>Βιβλιογραφία.....</b>	<b>74</b>

## Abstract

Over the last decade, the understanding of the interaction mechanisms between the heart, the lungs and the kidneys has progressed. Pathological conditions in one of these three organs can lead to functional and structural abnormalities in another organ. It has been shown that mice suffering from heart failure can develop pulmonary hypertension and extensive fibrosis. Furthermore, chronic abnormalities in cardiac function progressively result in a potential occurrence of permanent chronic renal disease.

In previous studies in desmin-null ( $des^{-/-}$ ) model, which combines characteristics of diverse cardiomyopathies and progressive cardiac failure, an increased LW/BW ratio was found, suggesting pathologic lung hypertrophy. This ratio was reduced when Galectin-3, a protein shown to regulate inflammation and fibrosis, was also missing from this model (in double  $des^{-/-}Lgals3^{-/-}$  knock-out mice)

For this study, functional, histological and molecular parameters of lung and kidney pathology were studied in 4, 10 and 12 month-old  $des^{-/-}$  and  $des^{-/-}Lgals3^{-/-}$  animals.

The results of the functional studies indicated that in the 4 moth-old  $des^{-/-}$  group the resistance of the lung was reduced and the compliance was increased, indicating an emphysema-like phenotype. When Galectin-3 was absent from this model this phenotype was improved, particularly in static compliance. In the 12 month-old group despite a reinstatement of the lung resistance and static compliance, an emphysema-like increase in  $des^{-/-}$  dynamic compliance tended to be restored in  $des^{-/-}Lgals3^{-/-}$ . These results were confirmed by histological as well as expression experiments showing alveolar dilation and a 4- fold increase in the expression of the *Mmp12* gene, an emphysema biomarker and mediator. Increased fibrosis was also observed, that could affect the  $des^{-/-}$  lung function and was reduced in  $des^{-/-}Lgals3^{-/-}$  lungs. On the other hand, the histology of the kidneys indicated increased fibrosis and cell infiltration in the tissue, as well as elevated expression of the *Postn* (Periostin) gene, a Chronic Kidney Disease biomarker and mediator.

In summary, lung and kidney comorbidities occur in the desmin-null cardiomyopathy and heart failure model that may be regulated by galectin-3 and other tissue inflammation and remodeling mediators.

## Περίληψη

Κατά την τελευταία δεκαετία, έχει προοδεύσει σημαντικά η κατανόηση των μηχανισμών αλληλεπίδρασης μεταξύ της καρδιάς, του πνεύμονα και των νεφρών. Παθολογικές καταστάσεις σε ένα όργανο μπορούν να οδηγήσουν σε λειτουργικές και δομικές ανωμαλίες σε άλλο όργανο. Έχει δειχθεί ότι σε ποντίκια που πάσχουν από καρδιακή ανεπάρκεια προκαλείται υπέρταση στον πνεύμονα και εκτεταμένη ίνωση, όπως επίσης και ότι χρόνιες ανωμαλίες στην καρδιακή λειτουργία προκαλούν προοδευτικά μια δυνητική εμφάνιση μόνιμης χρόνιας νεφρικής νόσου.

Σε προηγούμενες μελέτες πάνω στο μοντέλο desmin null ( $des^{-/-}$ ), το οποίο περιλαμβάνει χαρακτηριστικά πολλών μυοκαρδιοπαθειών και είναι ένα μοντέλο προοδευτικής καρδιακής ανεπάρκειας, βρέθηκε αυξημένος λόγος LW/BW, κάτι το οποίο υποδεικνύει παθολογική υπερτροφία του πνεύμονα. Ο λόγος αυτός μειωνόταν όταν από το μοντέλο αυτό έλειπε και η Γαλεκτίνη-3 (Galectin-3) (μοντέλο  $des^{-/-}Lgals3^{-/-}$ ), μια πρωτεΐνη που έχει δειχθεί ότι μπορεί να ρυθμίζει την φλεγμονή και την ίνωση.

Στη συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκαν λειτουργικοί, ιστολογικοί και μοριακοί παράμετροι της παθολογίας του πνεύμονα και των νεφρών στο μοντέλο καρδιακής ανεπάρκειας  $des^{-/-}$  και στο μοντέλο  $des^{-/-}Lgals3^{-/-}$  σε ζώα ηλικίας 4, 10 και 12 μηνών.

Τα αποτελέσματα των λειτουργικών μελετών έδειξαν ότι στο  $des^{-/-}$  ποντίκι στην ηλικιακή ομάδα των τεσσάρων μηνών μειώθηκε η αντίσταση ενώ αυξήθηκε η ελαστικότητα του πνεύμονα, το οποίο υποδεικνύει ένα πιθανώς εμφυσηματικό φαινότυπο. Η απουσία της γαλεκτίνης-3 από το μοντέλο αυτό όμως βελτίωσε τον



φαινότυπο, ιδιαίτερα στην στατική ελαστικότητα. Οι μετρήσεις της ομάδας των δώδεκα μηνών υπέδειξαν επαναφορά της αντίστασης και της στατικής ελαστικότητας στα φυσιολογικά επίπεδα, αλλά και αύξηση στην δυναμική ελαστικότητα του  $des^{-/-}$  που φάνηκε να αποκαθίσταται στο  $des^{-/-}Lgals3^{-/-}$ . Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και με ιστολογικές μελέτες, όπως και με πειράματα RT-qPCR, όπου βρέθηκε αυξημένη έκφραση του γονιδίου *Mmp12*, ενός δείκτη και μεσολαβητή του εμφυσήματος, κατά 4 περίπου φορές σε σύγκριση με τα αγρίου τύπου ζώα. Παρατηρήθηκε επίσης και αυξημένη ίνωση, η οποία θα μπορούσε να επηρεάζει την λειτουργία του  $des^{-/-}$  πνεύμονα, και μειώθηκε στα  $des^{-/-}Lgals^{-/-}$  ζώα. Στην ιστολογία των νεφρών φάνηκε αυξημένη διείσδυση κυττάρων στον ιστό όπως και αυξημένα επίπεδα ίνωσης, όπως επίσης αυξημένα ήταν και τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της Periostin (*Postn*), ενός δείκτη και μεσολαβητή Χρόνιας Νεφρικής Ανεπάρκειας.

Συνοπτικά, οι συννοσηρότητες στον πνεύμονα και στα νεφρά που λαμβάνουν χώρα στην *desmin-null* καρδιομυοπάθεια και καρδιακή ανεπάρκεια μπορεί να ρυθμίζονται από την Γαλεκτίνη-3 και άλλους διαμεσολαβητές ιστικής φλεγμονής και αναδόμησης.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι καρδιαγγειακές παθήσεις εξακολουθούν ως σήμερα να αποτελούν την κυριότερη αιτία θνησιμότητας. Χαρακτηριστικά, περίπου 1 στους 3 θανάτους στις ΗΠΑ αποδίδεται σε καρδιαγγειακά νοσήματα [2]. Η απώλεια καρδιομυοκυττάρων από την καρδιά ως αποτέλεσμα εμφράγματος του μυοκαρδίου ή ως μέρος της προχωρημένης καρδιακής ανεπάρκειας αποτελεί κύρια αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας. Τόσο μετά το έμφραγμα όσο και σε άλλες καρδιαγγειακές παθολογίες που προκαλούν τραυματισμό ή προσβολή του καρδιακού ιστού, η ανθρώπινη καρδιά έχει πολύ περιορισμένη αναγεννητική ικανότητα, και έτσι οι προσβεβλημένες περιοχές του μυοκαρδίου φαίνεται να παραμένουν προβληματικές επ' αόριστον [3]. Αυτή η αδυναμία οδηγεί σε μόνιμη απώλεια καρδιακού ιστού και αντικατάστασή του από ινώδη ιστό με κύριο συστατικό το κολλαγόνο τύπου 1, με περιορισμένη ικανότητα σύσπασης, οδηγώντας σε ανακατανομή των πιέσεων στο καρδιακό τοίχωμα και δυσμενή αναδόμηση (adverse remodeling) [4]. Η εκτεταμένη καρδιακή ίνωση συσχετίζεται και πιθανότατα συνεισφέρει, όπως και σε πολλά άλλα όργανα [130], στη μείωση της λειτουργικότητας του μυοκαρδίου, σε τέτοιο μάλιστα βαθμό που ο ασθενής μπορεί να οδηγηθεί σε καρδιακή ανεπάρκεια και στο θάνατο.

Εκτός από τις επιπτώσεις στην καρδιακή λειτουργία και ομοίωση, η ανάπτυξη καρδιακής ανεπάρκειας έχει σειρά συστημικών επιπτώσεων, όπως φλεγμονή, νευρορμονική ενεργοποίηση, όπως πχ του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης, μεταβολικές τροποποιήσεις κ.α. [102]. Οι μεταβολές αυτές δεν αφήνουν ανεπηρέαστα άλλα σημαντικά όργανα όπως οι πνεύμονες και τα νεφρά. Συγκεκριμένα, οι συννοσηρότητες (comorbidities) που προκαλεί η καρδιακή ανεπάρκεια στον πνεύμονα και στα νεφρά είναι ένα αναδυόμενο σοβαρό πρόβλημα: η πνευμονική ή/και η νεφρική δυσλειτουργία εμφανίζεται σε περισσότερο από το ένα τέταρτο των ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια και αυξάνει σημαντικά τα ποσοστά νοσηρότητας και θνησιμότητας [5]. Σχεδόν το 30% των ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια αναπτύσσουν επίσης χρόνια αποφρακτική

πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) και αντίστροφα [6]. Η δυσλειτουργία των νεφρών είναι επίσης συνηθισμένη στην καρδιακή ανεπάρκεια και ένας ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης θνησιμότητας και νοσηρότητας του νοσήματος αυτού, που περιλαμβάνει τόσο την κοιλιακή συστολική, όσο και τη διαστολική δυσλειτουργία [7]. Γενικότερα, φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση και συννοσηρότητα των τριών αυτών οργάνων κατά τη δυσλειτουργία ενός εξ αυτών [10]. Αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία, ιδιαίτερα στην περίπτωση της καρδιακής ανεπάρκειας, όπου η συστηματική φλεγμονή και η νευροορμονική ενεργοποίηση θα μπορούσαν να ενέχονται σε φλεγμονώδεις, ινωτικές και άλλες αποκρίσεις στα άλλα δύο όργανα.

## **1.1 Καρδιακή Ανεπάρκεια**

Η καρδιακή ανεπάρκεια είναι ένα σημαντικό πρόβλημα για τη δημόσια υγεία, με σημαντικό βάρος για τους ασθενείς, την υγειονομική περίθαλψη και την κοινωνία. Στην καρδιακή ανεπάρκεια, η καρδιά δεν μπορεί να λειτουργήσει σωστά ως αντλία ώστε να καλύψει τις ανάγκες του σώματος ως προς την κυκλοφορία του αίματος. Τα συμπτώματα συνήθως περιλαμβάνουν δυσκολία στην αναπνοή, υπερβολική κόπωση, μειωμένη αντοχή στην άσκηση και οίδημα [102]. Στις κύριες αιτίες της καρδιακής ανεπάρκειας περιλαμβάνονται η στεφανιαία νόσος, συμπεριλαμβανομένου προηγούμενου εμφράγματος του μυοκαρδίου (καρδιακή προσβολή), η υψηλή αρτηριακή πίεση, η καρδιακή νόσος βαλβίδων, η ιδιοπαθής διατακτική μυοκαρδιοπάθεια, η μυοκαρδίτιδα, μυοκαρδιοπάθειες που οφείλονται σε γενετικές μεταλλάξεις δομικών ή άλλων λειτουργικών πρωτεϊνών, όπως η διατακτική και η υπερτροφική μυοκαρδιοπάθεια κ.α., 17 συνολικά αιτιολογίες [9, 102, 103]. Ανεξάρτητα της αιτιολογίας της, η καρδιακή ανεπάρκεια μπορεί να χωρισθεί σε δύο τύπους: 1) Καρδιακή ανεπάρκεια μειωμένου κλάσματος εξώθησης (HF<sub>r</sub>EF), που οφείλεται σε δυσλειτουργία της αριστερής κοιλιακής συστολής, γνωστή και ως συστολική καρδιακή ανεπάρκεια (κλάσμα εξώθησης < 40%) και 2) Καρδιακή ανεπάρκεια με διατηρημένο κλάσμα εξώθησης (HF<sub>p</sub>EF). Αυτός ο τύπος είναι επίσης γνωστός ως διαστολική καρδιακή ανεπάρκεια ή καρδιακή ανεπάρκεια με φυσιολογικό κλάσμα εξώθησης (>50%) [8]. Αυτό το είδος της καρδιακής

ανεπάρκειας εμφανίζεται όταν ο καρδιακός μυς συστέλλεται καλά, αλλά η κοιλία δεν γεμίζει πλήρως με αίμα κατά την φάση χαλάρωσης.

Η καρδιακή ανεπάρκεια είναι μία κοινή, δαπανηρή, και δυνητικά θανατηφόρος κατάσταση. Στις ανεπτυγμένες χώρες, περίπου το 2% των ενηλίκων έχουν καρδιακή ανεπάρκεια και σε όσους είναι άνω των 65 ετών το ποσοστό αυξάνει σε 6-10%. Ένα χρόνο μετά τη διάγνωση ο κίνδυνος θανάτου είναι περίπου 35%, μετά την παρέλευσή του πάντως μειώνεται κάτω από το 10% [9]. Πιο πρόσφατες αποτιμήσεις ανεβάζουν τον αριθμό των νοσούντων σε πάνω από 37 εκατόμμυρια ανθρώπους [102, 109].

## **1.2 Αλληλεπιδράσεις Καρδιάς- Πνεύμονα- Νεφρών**

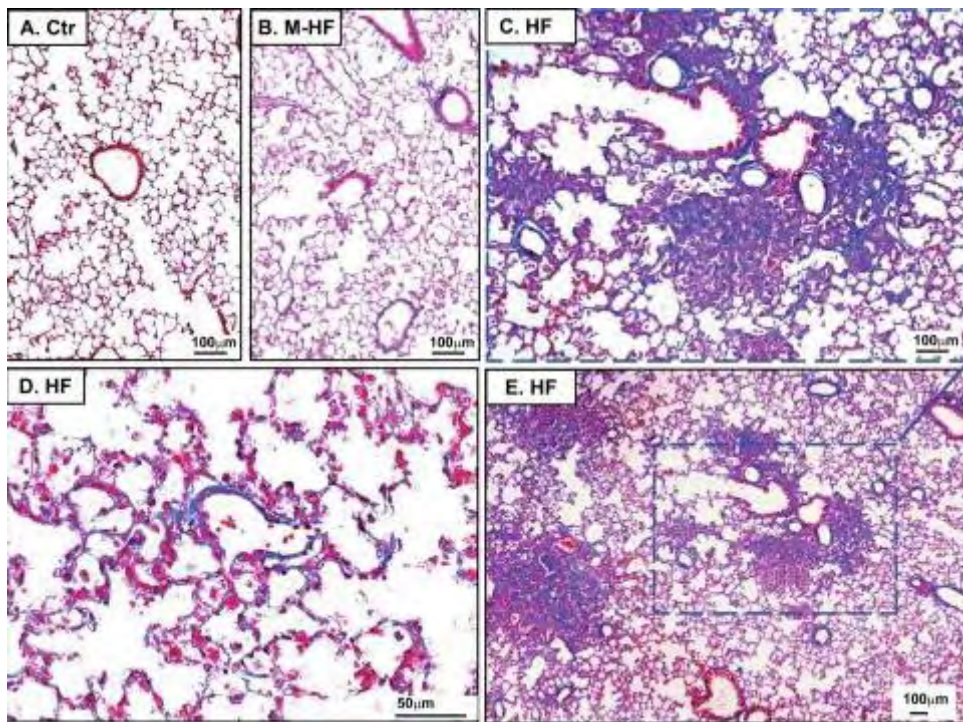
Κατά την τελευταία δεκαετία, έχει προοδεύσει σημαντικά η κατανόηση των μηχανισμών αλληλεπίδρασης μεταξύ της καρδιάς, του πνεύμονα και των νεφρών. Η επικοινωνία μεταξύ των οργάνων είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της ομοιόστασης του σώματος. Παθολογικές καταστάσεις σε ένα ή περισσότερα όργανα μπορούν να οδηγήσουν σε λειτουργικές και δομικές δυσλειτουργίες σε ένα άλλο όργανο [10].

### **1.2.1 Παθολογία Πνεύμονα**

Στο ποντίκι, ο αριστερός πνεύμονας αποτελείται από έναν λοβό (monolobe), ενώ ο δεξιός από 5 (polylobe) που συνδέονται μέσω των κεντρικών βρόγχων με την τραχεία. Οι διακλαδώσεις των βρόγχων, καταλήγουν στα βρογχιόλια και τα τερματικά βρογχιόλια (στοιβάδες βρογχικών επιθηλιακών κυττάρων που περιβάλλονται από κύτταρα λείου μυός και σχηματίζουν κοιλότητα) και τελικά στις κυψελίδες. Οι τελευταίες αποτελούνται από 2 τύπους πνευμοκυττάρων, εκ των οποίων η πλειοψηφία (πνευμοκύτταρα τύπου II) έχουν τη δομή πλακώδους (squamous) επιθηλίου και είναι υπεύθυνα για την διάχυση, ενώ τα τύπου I για την ισορροπία της εμφύσησης και τη διάταση του πνεύμονα. Ιστολογικά, σημαντικό στοιχείο της παθολογίας του πνεύμονα αποτελεί η εναπόθεση κολλαγόνου (ίνωση)

που συχνά παρατηρείται γύρω από τα βρογχιόλια (περιβρογχιακή ίνωση), καθώς και η καταστροφή (διάταση) των κυψελιδικών δομών. Οι επιπτώσεις τους στη λειτουργία του οργάνου είναι μετρήσιμες με παραμέτρους όπως η ελαστικότητα και η αντίσταση κατά την εμφύσηση του αέρα. Τέλος, αλλοιώσεις, συμπεριλαμβανόμενης της φλεγμονής και της ίνωσης, μπορούν να παρατηρηθούν στο εκτεταμένο σύστημα των αγγειακών δομών (φλέβες, αρτηρίες και τριχοειδή αγγεία) που εμπλουτίζει τον πνεύμονα, ιδιαίτερα στις αρτηρίες που βρίσκονται συνήθως κοντά στα βρογχιόλια.

Ο πνεύμονας αποτελεί μια πύλη επικοινωνίας με το εξωτερικό περιβάλλον και έχει κρίσιμες παθοφυσιολογικές συνδέσεις με την καρδιά και τα νεφρά. Το όργανο αυτό πραγματοποιεί την ανταλλαγή των αερίων μέσω τριών μηχανισμών: εξαερισμό, διάχυση αερίων και διάχυση υγρών. Οποιαδήποτε ανισορροπία αυτών μπορεί να προκαλέσει αναπνευστική διαταραχή, η οποία αντισταθμίζεται σε κάποιο βαθμό με υπεραερισμό, μεγαλύτερη εξαγωγή οξυγόνου από το αίμα στους ιστούς και αυξημένη καρδιακή παροχή. Επιπροσθέτως παθολογικές αλλαγές στο φράγμα μεταξύ κυψελίδων και τριχοειδών αγγείων, είναι ικανές να ξεκινήσουν φλεγμονώδεις αποκρίσεις και αυξημένο οξειδωτικό στρες στην μικροκυκλοφορία του πνεύμονα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον “τραυματισμό” των τοιχωμάτων των κυψελίδων και την επιβάρυνση της λειτουργίας του πνεύμονα [11]. Από την άλλη πλευρά ο περιορισμός της ανταλλαγής των αερίων μπορεί να επηρεάσει την μηχανική λειτουργία των πνευμόνων, ειδικά στο πνευμονικό εμφύσημα που χαρακτηρίζεται από την καταστροφή των κυψελιδικών τοιχωμάτων, η οποία μπορεί με την σειρά της να επηρεάσει την καρδιακή απόδοση [131]. Αντιστρόφως, έχειδειχθεί ότι σε ποντίκια που πάσχουν από καρδιακή ανεπάρκεια μπορεί να προκαλείται υπέρταση στον πνεύμονα και εκτεταμένη ίνωση [12]. Για παράδειγμα στο Σχήμα 1 φαίνονται πνεύμονες ποντικών τα οποία σε ηλικία 10 – 14 βδομάδων υποβλήθηκαν σε εγκάρσια αορτική στένωση (TAC, Transverse Aortic Constriction), ένα μοντέλο το οποίο αντιπροσωπεύει εξαιρετικά καλά την καρδιακή ανεπάρκεια λόγω αυξημένης αρτηριακής πίεσης. Στο μοντέλο αυτό παρατηρήθηκε πνευμονική ίνωση, αύξηση του βάρους των πνευμόνων, όπως επίσης και πνευμονική υπέρταση τύπου 2.



Σχήμα 1 Χρώση κατά Masson ιστολογικών τομών πνευμόνων ποντικών 4 εβδομάδες μετά από επέμβαση TAC, η οποία προκαλεί εκτεταμένη ίνωση στον πνεύμονα. Α) πνεύμονας από φυσιολογικό ποντίκι, Β) πνεύμονας από ποντίκι που δεν ανέπτυξε καρδιακή ανεπάρκεια μετά από επέμβαση TAC, C, D και E) πνεύμονες από ποντίκια με καρδιακή ανεπάρκεια, όπου παρατηρείται εκτεταμένη ίνωση. Από [12].

### Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ)

Η Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) αποτελεί ένα σύνολο φλεγμονωδών πνευμονικών νόσων που συμπεριλαμβάνουν τη χρόνια βρογχίτιδα, τη βρογχιολίτιδα και το εμφύσημα. Η παθοφυσιολογία μπορεί να περιλαμβάνει βήχα, παραγωγή πτυέλου και σοβαρή δύσπνοια, χρόνια φλεγμονή των αεραγωγών, καθώς και αυξημένο οξειδωτικό στρες με ανισορροπία πρωτεασών-αντι-πρωτεασών και οξειδωτικών-αντιοξειδωτικών παραγόντων [104, 105]. Αποτελεί σημαντικό πρόβλημα της δημόσιας υγείας με καμία αποτελεσματική θεραπεία μέχρι σήμερα. Ένας από τους κύριους παράγοντες εμφάνισης ΧΑΠ είναι το κάπνισμα και η έκθεση σε καπνό τσιγάρου [59], ενώ παράλληλα υπάρχουν έντονες ενδείξεις ότι η ευαισθησία στην ανάπτυξη της νόσου μπορεί να έχει και γενετική βάση [60]. Στους πνεύμονες, αλλά και στο πλάσμα ασθενών με ΧΑΠ, έχουν βρεθεί αυξημένοι δείκτες

του οξειδωτικού στρες, το οποίο οδηγεί σε αυξημένη φλεγμονή και απόπτωση των κυψελιδικών κυττάρων [59].

Η εκτεταμένη καταστροφή των κυψελιδικών κυττάρων μπορεί να οδηγήσει σε εμφάνιση εμφυσήματος. Το εμφύσημα ορίζεται ως η μη αντιστρεπτή καταστροφή των κυψελίδων, συνοδεύεται από απώλεια της ελαστικότητας των πνευμόνων, καταστροφή της εξωκυττάριας μήτρας και μόνιμη διόγκωση/διεύρυνση των πνευμονικών εναέριων χώρων, και σχετίζεται με φλεγμονή των αεραγωγών και του πνευμονικού παρεγχύματος. Το εμφύσημα μπορεί επίσης να σχετίζεται με την πνευμονική υπέρταση, η οποία προκαλείται από την καταστροφή του δικτύου τριχοειδών αγγείων που βρίσκονται στις κυψελίδες. Αξίζει να σημειωθεί εδώ, ότι η πνευμονική υπέρταση μπορεί να οδηγήσει σε ανεπάρκεια της δεξιάς καρδιακής κοιλίας, μια σημαντική αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας μεταξύ ασθενών με ΧΑΠ [59]. Επιπλέον, αυτή καθεαυτή η ΧΑΠ αναφέρεται και ως μια από τις πολλαπλές αιτιολογίες της καρδιακής ανεπάρκειας [102].

Οι μεταλλοπρωτεάσες (Matrix Metalloproteases, MMPs) μπορούν να διασπάσουν στοιχεία της εξωκυττάριας μήτρας (ECM) και αυξημένη ενεργοποίησή τους μπορεί να προκαλέσει βλάβες στην ιστική ομοιοστάση. Μελέτες δείχνουν αυξημένη ενεργότητα των μεταλλοπρωτεασών στο εμφύσημα. Οι παρατηρήσεις αυτές, μαζί με το γεγονός ότι οι καπνιστές έχουν αυξημένο αριθμό φλεγμονωδών κυττάρων στον πνεύμονα, οδήγησε στην ιδέα ότι το εμφύσημα αναπτύσσεται ως αποτέλεσμα της ανισορροπίας μεταξύ των MMPs και των αναστολέων τους (TIMPs) [61]. Έχει επίσηςδειχθεί ότι κάποιες MMPs μπορούν να διασπάσουν την ελαστίνη [62], βασικό δομικό στοιχείο του πνεύμονα. Αναλύσεις σε ιστολογικές τομές υποδεικνύουν ότι ο αριθμός των μακροφάγων, που αποτελούν την κύρια πηγή των MMPs, συσχετίζεται με τη δριμύτητα του εμφυσήματος. Η παρουσία των ενζύμων αυτών όμως δεν είναι αποτέλεσμα μόνο της ενεργοποίησης των μακροφάγων, αφού μπορεί να εκφράζονται και από κύτταρα του παρεγχύματος όπως τα λεία μυϊκά [97]. Τα ένζυμα αυτά έχουν μεγάλο αριθμό λειτουργιών [64] όπως η απελευθέρωση (και ενεργοποίηση) αυξητικών παραγόντων, π.χ. FGF-2 (fibroblast growth factor-2), IGF-I (insulin-like growth factor I) και TGF-β (transforming growth factor-β), μέσω της πρωτεόλυσης πρωτεϊνών που τους αγκυροβολούν δεσμεύοντας



τους σε στοιχεία της ECM ή στην επιφάνεια των κυττάρων. Επίσης ένζυμα της οικογένειας των MMPs συμμετέχουν στην επαγωγή της απόπτωσης, όπως η MMP7 [64], και την ενεργοποίηση της φλεγμονώδους κυτταροκίνης TNF-α, όπως η MMP12 [66].

Ειδικά η MMP-12 φαίνεται να παίζει πρωταρχικό ρόλο στην ανάπτυξη και στην εξέλιξη της νόσου, καθώς τα MMP-12 knock-out ποντίκια φάνηκε να είναι πλήρως προστατευμένα από την ανάπτυξη εμφυσήματος και είχαν μειωμένο αριθμό μονοκυττάρων/μακροφάγων στον τραυματισμένο πνεύμονα [67]. Επιπλέον, το εμφύσημα σχετίζεται επίσης με την έλλειψη της α1- αντιθρυψίνης, η οποία είναι αναστολέας της απελευθέρωσης της προμορφής της pro-MMP12 από τα μακροφάγα [63].

### **1.2.2 Παθολογία Νεφρών**

Σε αρκετές μελέτες τα τελευταία χρόνια επισημαίνεται η μειωμένη νεφρική λειτουργία και η συμμετοχή της στην καρδιακή ανεπάρκεια [74, 75, 76]. Η μειωμένη νεφρική λειτουργία έχει βρεθεί να είναι ένας ανεξάρτητος παράγοντας σε ασθενείς με χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια και αυξάνει τον κίνδυνο νοσηρότητας και θνησιμότητας με ασθενείς με συστολική αλλά και διαστολική δυσλειτουργία [76].

Οι νεφροί έχουν διακριτές περιοχές, με τον φλοιό (cortex) που είναι πλούσιος σε νεφρικά σπειράματα (glomeruli) να καταλαμβάνει την περιφέρεια και περιβάλλει τον μυελό (medulla) που είναι πλούσιος σε σωληνοειδείς δομές που διατάσσονται στο σχήμα της πυραμίδας (medullary pyramid). Εξειδικευμένα κύτταρα στα επιμέρους διαμερίσματα όπως πχ τα ποδοκύτταρα, σε συνδυασμό με εκτατεμένο αγγειακό σύστημα φιλτράρουν καθημερινά υπέρογκες ποσότητες αίματος μέσα στα νεφρά και παράγουν μικρότερες ποσότητες ούρων, οδηγούμενες από την περιοχή του φλοιού στην ουρήθρα με εξειδικευμένες δομές. Όπως σε όλα τα όργανα, χρόνια ή οξεία έκθεση των νεφρών σε στρες, τραυματισμό ή άλλου είδους προσβολή (πχ λοίμωξη) μπορεί να συνοδεύεται από φλεγμονή και ίνωση, απόρροια κυτταρικού



στρες ή θανάτου, και ενδεχομένως αντίστοιχη δυσλειτουργία που μπορεί να μετρηθεί με παραμέτρους όπως η GFR (glomerular filtration rate) και τα αυξημένα επίπεδα πρωτεΐνης στα ούρα (πρωτεϊνουρία).

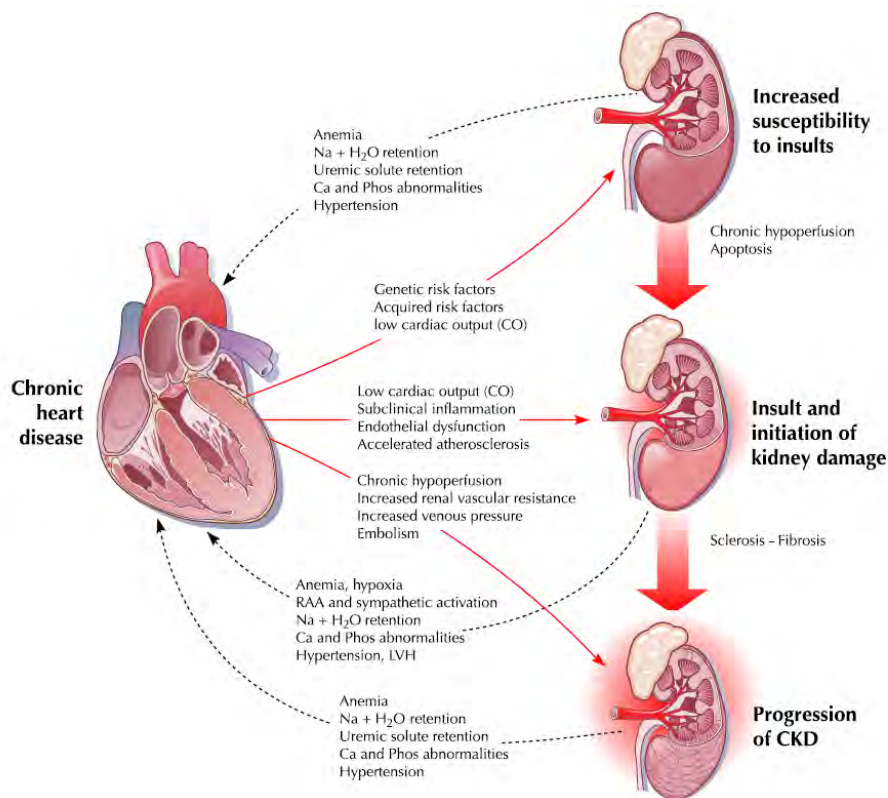
Το καρδιονεφρικό σύνδρομο είναι μια παθοφυσιολογική διαταραχή στην οποία η χρόνια ή η οξεία δυσλειτουργία του ενός οργάνου μπορεί να προκαλεί οξεία ή χρόνια δυσλειτουργία του άλλου. Έχουν χαρακτηριστεί πέντε διαφορετικοί τύποι καρδιονεφρικού συνδρόμου [13].

- **Τύπος I:** οξύ καρδιονεφρικό σύνδρομο. Απότομη επιδείνωση της καρδιακής λειτουργίας (π.χ. οξεία καρδιογενή καταπληξία), η οποία οδηγεί σε οξεία νεφρική βλάβη.
- **Τύπος II:** χρόνια καρδιονεφρικό σύνδρομο. Χρόνιες ανωμαλίες στην καρδιακή λειτουργία προκαλούν προοδευτικά μια δυνητική εμφάνιση μόνιμης χρόνιας νεφρικής νόσου.
- **Τύπος III:** οξύ νεφροκαρδιακό σύνδρομο. Απότομη επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας (π.χ. οξεία νεφρική ισχαιμία), προκαλεί οξεία καρδιακή διαταραχή.
- **Τύπος IV:** χρόνια νεφροκαρδιακό σύνδρομο. Χρόνια νόσος των νεφρών συμμετέχει στην μειωμένη καρδιακή λειτουργία, στην καρδιακή υπερτροφία ή και στον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιακών επεισοδίων.
- **Τύπος V:** δευτερογενές καρδιονεφρικό σύνδρομο. Κάποια συστημική κατάσταση (π.χ. διαβήτης, σήψη) προκαλεί δυσλειτουργία και στην καρδιά και στα νεφρά.

Ο τύπος II καρδιονεφρικού συνδρόμου (Σχήμα 2) χαρακτηρίζεται από χρόνιες ανωμαλίες στην καρδιακή λειτουργία προκαλώντας προοδευτική χρόνια νεφρική ανεπάρκεια και σχετίζεται με αρνητικά αποτελέσματα και παρατεταμένες νοσηλείες των ασθενών [77]. Στο σύνδρομο αυτό οι νευροορμονικές ανωμαλίες είναι και αυτές παρούσες με την υπερβολική παραγωγή αγγειοσυσταλτικών διαμεσολαβητών (επινεφρίνη, αγγειοτενσίνη, ενδοθηλίνη) ή την απελευθέρωση ενδογενών αγγειοδιασταλτικών παραγόντων (νατριουρητικά πεπτίδια, οξείδιο του αζώτου). Παρόλα αυτά, υπάρχει πολύ περιορισμένη κατανόηση της

παθοφυσιολογίας της νεφρικής δυσλειτουργίας στην ρύθμιση της προχωρημένης καρδιακής ανεπάρκειας [13].

Ένας πρόσφατα προσδιορισμένος βιοδείκτης της Χρόνιας Νεφρικής Ανεπάρκειας είναι η περιοστίνη (Periostin, Postn, OSF-2), μια εκκρινόμενη πρωτεΐνη 90 kDa. Η έκφρασή της έχει βρεθεί να αυξάνεται μετά από τον τραυματισμό του ιστού, ενώ αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες της εξωκυττάριας μήτρας όπως το κολλαγόνο τύπου I, η ινωδονεκτίνη (Fibronectin), και η μορφογενετική πρωτεΐνη των οστών-1 (BMP-1). Γενικότερα, η Periostin φαίνεται να προάγει την φλεγμονή και την ίνωση σε διαφορετικές παθολογίες και όργανα [116], συμπεριλαμβανόμενων των νεφρών, της καρδιάς και του πνεύμονα. Στον παθολογικό νεφρικό ιστό έχει εντοπιστεί σε περιοχές με περισπειραματική, αγγειακή ή ενδιάμεση ίνωση [117].

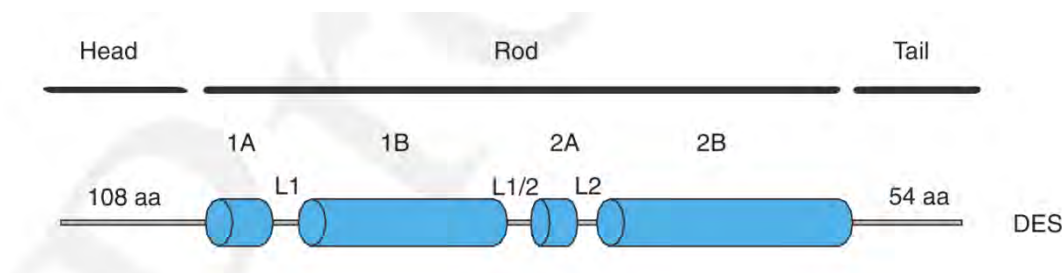


Σχήμα 2 Τυπος II καρδιονεφρικού συνδρόμου. Από [7].

### 1.3 Γενετικό Μοντέλο Καρδιακής Ανεπάρκειας *desmin-null*

Από τα παραπάνω είναι σαφές ότι χρειάζεται αναλυτική μελέτη των συννοσηροτήτων της καρδιακής ανεπάρκειας και των επιπτώσεων τους. Το καταλληλότερο εργαλείο είναι βέβαια τα ζωικά μοντέλα καρδιακής ανεπάρκειας. Για τη μελέτη συννοσηροτήτων του πνεύμονα και των νεφρών στην καρδιακή ανεπάρκεια επιλέχθηκε το μοντέλο μυοκαρδιοπάθειας και καρδιακής ανεπάρκειας που προκαλείται στο ποντίκι με έλλειψη δεσμίνης (*desmin-null*).

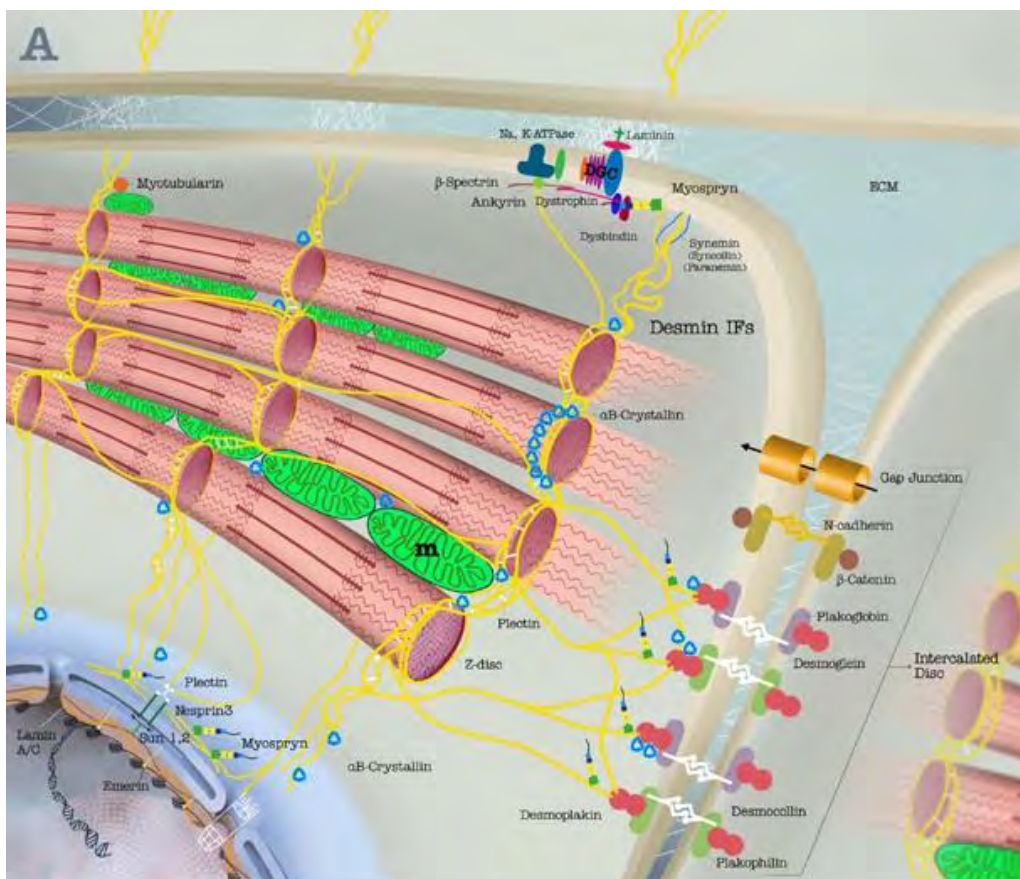
Η μυοειδική πρωτεΐνη δεσμίνη (*desmin*, MW 53 kDa), εκφράζεται στα μυϊκά κύτταρα και σχηματίζει ενδιάμεσα ινίδια διαμέτρου 10-12nm. Εκφράζεται σε αφθονία στον καρδιακό μυ, καθώς και τους σκελετικούς και λείους μυς [14-15]. Απομονώθηκε το 1976 και πήρε το όνομά της από την ιδιότητα της να συνδέει τα σαρκομερή [16]. Το γονίδιο της ταυτοποιήθηκε από την Δρ. Καπετανάκη το 1984 [14].



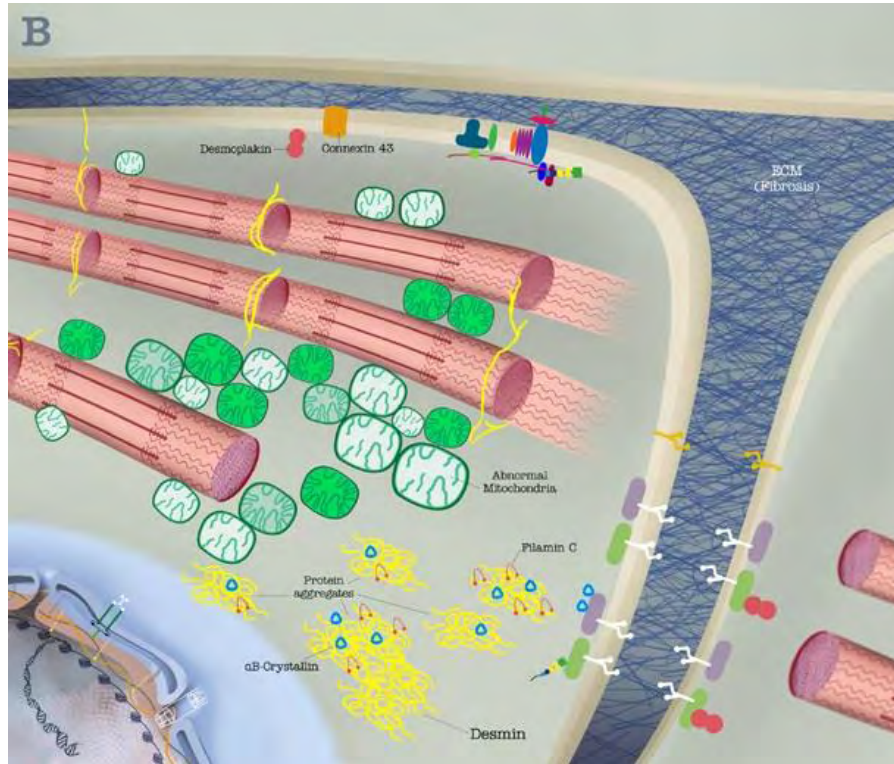
**Σχήμα 3** Οργάνωση του ανθρώπινου μορίου της δεσμίνης. Η κεντρική επικράτεια α-έλικας διακόπτεται από τρεις μη ελικοειδείς περιοχές σύνδεσης L1, L1/2 και L2 με αποτέλεσμα τον σχηματισμό τεσσάρων τμημάτων με σχηματισμό α-έλικας (1A, 1B, 2A και 2B). Η αμινοτελική κεφαλή και η καρβοξυτελική ουρά δεν έχουν δομή α-έλικας. (Τροποποίηση από [17]).

Τα ινίδια της δεσμίνης βρίσκονται κυρίως στην περιφέρεια των Z δίσκων και στα πυκνά σωμάτια των λείων μυϊκών κυττάρων. Η δεσμίνη ανήκει στην κατηγορία των ενδιάμεσων ινιδίων τύπου III και είναι σημαντική στο μυ για στην σωστή οργάνωση των κοσταμερών (*costameres*), την σύντηξη και διαφοροποίηση βλαστικών κυττάρων, το σχήμα και την τοποθέτηση του πυρήνα, καθώς και για το σχήμα, την δομή και την λειτουργία των μιτοχονδρίων. [18-21, 29]. Η έκφραση της έχει περιγραφεί και σε άλλους κυτταρικούς τύπους, όπως τα περικύτταρα [22], τα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα [23], τα μυοειδή στρωματικά κύτταρα του πλακούντα

[24], τα κύτταρα Sertolli [25], τα τραυματισμένα πειραματικά ποδοκύτταρα [26] και τα κύτταρα του μεσοθελιώματος [27]. Μεταλλάξεις του γονιδίου της δεσμίνης οδηγούν σε παθολογία, είτε στην καρδιά (μυοκαρδιοπάθειες σχετιζόμενες με τη δεσμίνη), είτε στους σκελετικούς μύες (μυοπάθειες σχετιζόμενες με τη δεσμίνη), είτε και συνδυασμό των δύο [17, 28-30]. Για τη διερεύνηση βασικών ερωτημάτων σχετικά με το ρόλο της δεσμίνης στην μυϊκή ανάπτυξη και ομοιόσταση, οι ερευνητικές ομάδες των Paulin [32] και Caretanaki [30] δημιούργησαν ποντίκια με γενετική απαλοιφή της δεσμίνης.



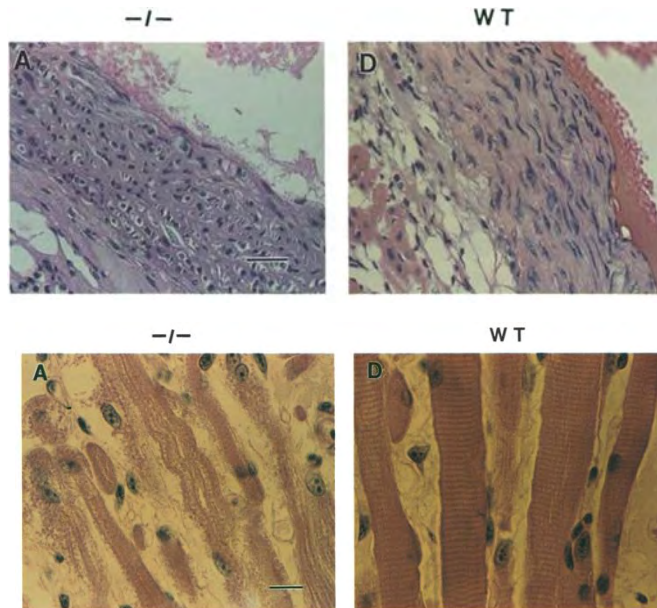
Σχήμα 4 Η δεσμίνη, το ενδιάμεσο ινίδιο (κίτρινο) μαζί με τα μη καρδιο-μυοειδικά ενδιάμεσα ινίδια (synemin, syncoilin, paranemin με μπλε), σχηματίζουν ένα συνεχές δίκτυο το οποίο ενώνει τους Z δισκούς με διαφορετικά μεμβρανικά διαμερίσματα (εμβόλιμους δίσκους και τα costameres) και οργανίδια (πυρήνα, μιτοχόνδρια, σαρκοπλασματικό δίκτυο και λυσοσώματα). Διακρίνονται πρωτεΐνες (desmoplakin, myospryn, ankyrin, plectin) που διαμεσολαβούν την συσχέτιση της δεσμίνης με κυτταρικά συστατικά. Από [31].



Σχήμα 5 Απεικόνιση δυσμενών αποτελεσμάτων της απαλοιφής της δεσμίνης ή της καταστροφής του δικτύου της λόγω μεταλλάξεων, ή της επαγόμενης, μέσω του TNF- $\alpha$ , διάσπασης της. Κατακερματισμένα και εκφυλισμένα μιτοχόνδρια είναι από τις πρώτες μορφολογικές ανωμαλίες που παρατηρούνται. Επίσης παρουσιάζεται αποδιοργάνωση της συσχέτισης του δικτύου ινιδίων της δεσμίνης με τον πυρήνα (παραμόρφωση πυρήνα) καθώς και ελαττώματα των εμβόλιμων δίσκων [31].

Τα ποντίκια με γενετική απαλοιφή της δεσμίνης ( $des^{-/-}$ ) [30, 32], παρουσιάζουν συστημική διαταραχή, που περιλαμβάνει τον καρδιακό, τους σκελετικούς και τους λείους μύες. Η σοβαρή αποδιοργάνωση και εκφυλισμός της αρχιτεκτονικής του μυ [30, 34] (Σχήμα 6), τονίζει τη σημασία της δεσμίνης στη μυϊκή ομοιοστάση. Η μορφολογία των εμβόλιμων δίσκων παρουσιάζει επίσης τροποποιήσεις [35].





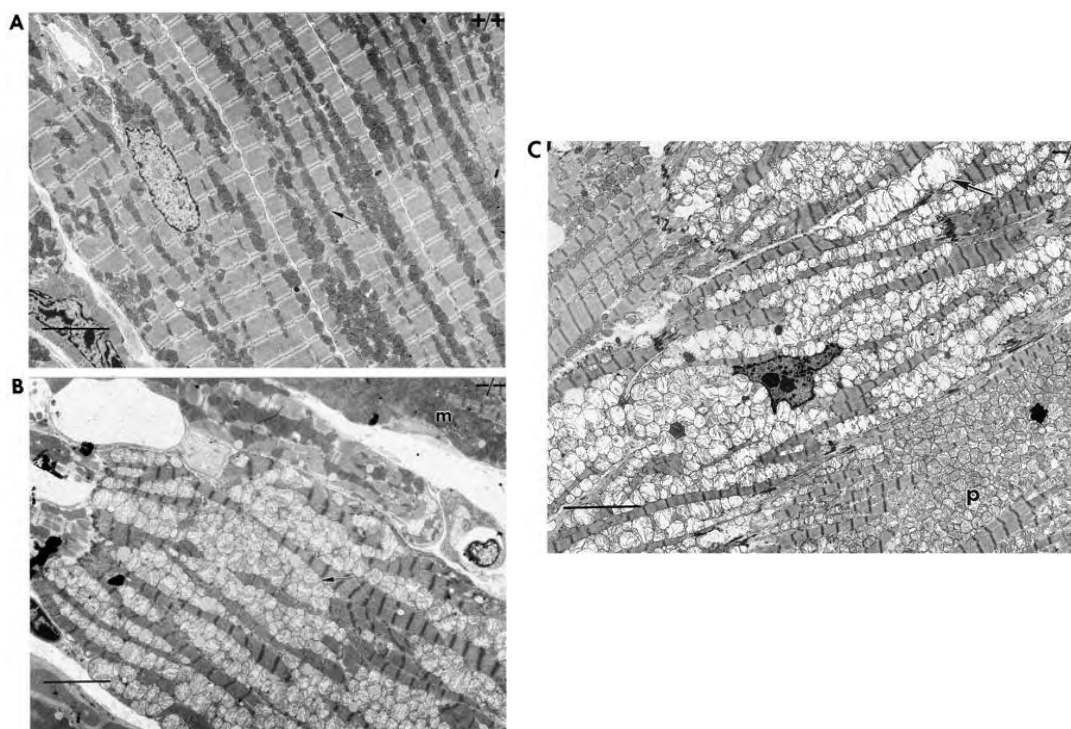
Σχήμα 6 Πάνω, διαταραχές μυοϊνδιακής οργάνωσης στον  $des^{-/-}$  λείο μυ (αορτή). Κάτω, διαταραχές μυοϊνδιακής οργάνωσης στον  $des^{-/-}$  σκελετικό μυ (γλώσσα) (τροποποίηση από [30]).

Πάντως, τα  $des^{-/-}$  ποντίκια είναι βιώσιμα και γόνιμα και ο καρδιακός, ο σκελετικός και ο λείος μυς τους φαίνονται να αναπτύσσονται φυσιολογικά [33].

Η σημαντικότερη και δριμύτερη παθολογία στο  $des^{-/-}$  ζώο εμφανίζεται στο μυοκάρδιο. Έτσι, οι  $des^{-/-}$  καρδιές αναπτύσσουν μυοκαρδιοπάθεια, η οποία εκδηλώνεται με θάνατο των καρδιομυοκυττάρων, φλεγμονή, εναπόθεση αλάτων ασβεστίου και τελικά εκτεταμένη ίνωση και καρδιακή ανεπάρκεια (Σχήμα 8) [1, 30, 32, 35, 44].

Ένα από τα βασικά παθολογικά χαρακτηριστικά της  $des^{-/-}$  καρδιάς, οι μιτοχονδριακές ανωμαλίες, μπορούν να παρατηρηθούν πολύ νωρίς, πριν εμφανισθούν τα άλλα δομικά ελαττώματα, ενώ μετά από έντονη άσκηση παρατηρείται εκτεταμένος μιτοχονδριακός πολλαπλασιασμός [36]. Έτσι, τα μιτοχόνδρια εμφανίζονται οιδηματικά, με διαταραγμένες ραβδώσεις και έντονο πολλαπλασιασμό (Σχήμα 7) [21,36]. Οι ανωμαλίες αυτές, όπως προαναφέρθηκε, σχετίζονται με την ιδιότητα της δεσμίνης να συνδέεται στα σημεία επαφής των

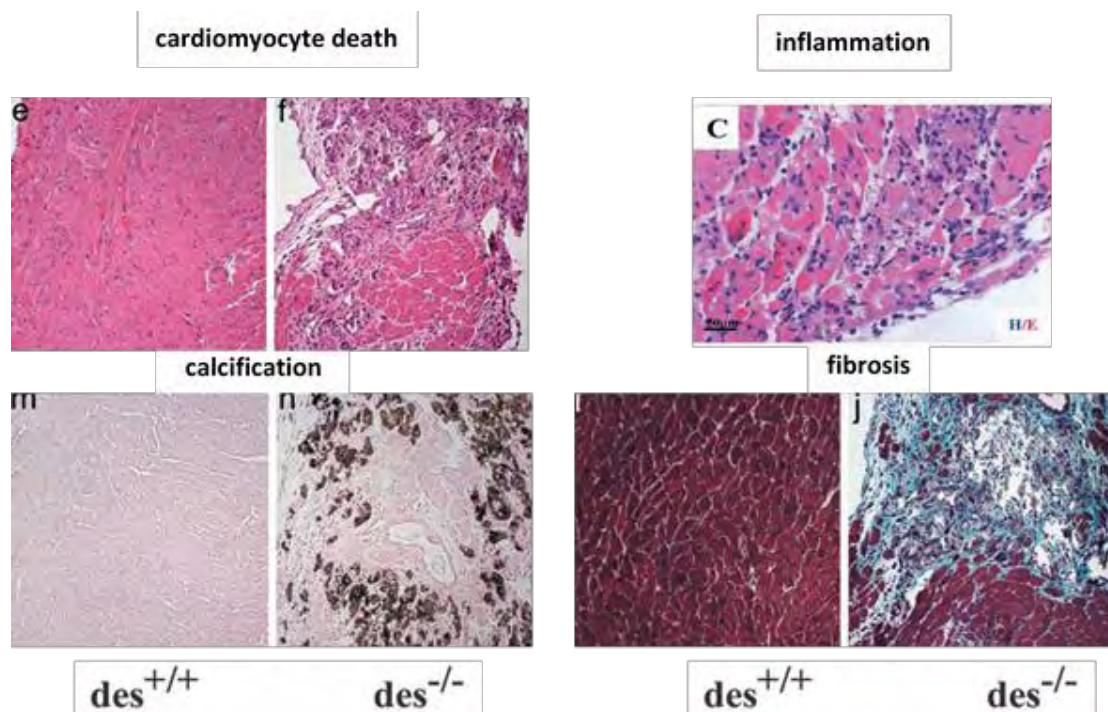
μιτοχονδρίων [118] και συμπεριλαμβάνουν μορφολογικές και πρωτεομικές αλλοιώσεις, προβλήματα στην αναπνευστική τους λειτουργία κ.α. [31].



Σχήμα 7 A) wt B)  $des^{-/-}$  C) exercised  $des^{-/-}$  Μιτοχονδριακά προβλήματα στο  $des^{-/-}$  μυοκάρδιο, που επιδεινώνονται ύστερα από άσκηση (τροποποιημένο από [36]).

Αντίστοιχες μιτοχονδριακές ανωμαλίες εμφανίζονται και στον  $des^{-/-}$  σκελετικό μυ. Έτσι, *in situ* ανάλυση της μιτοχονδριακής λειτουργίας αποκάλυψε μείωση στο ρυθμό κατανάλωσης οξυγόνου, έπειτα από διέγερση με ADP [36] σε μυϊκές ίνες του υποκνημίδιου μυ. Στα  $des^{-/-}$  ποντίκια υπάρχει σημαντικά μικρότερη ποσότητα κυτοχρώματος c στα μιτοχόνδρια της καρδιάς και προβληματική κατανομή της Bcl-2, που μπορεί να υποδεικνύει αποπτωτική κατάσταση [37]. Η υπερέκφραση του bcl-2 στην καρδιά του desmin-null έχει ως αποτέλεσμα την διόρθωση των μιτοχονδριακών ελαττωμάτων και την σημαντική βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας [38]. Αντίστοιχα, υπερέκφραση της heat shock πρωτεΐνης  $\alpha$ -κρυσταλλίνης, που συνεντοπίζεται με τη δεσμίνη στις μεμβράνες συσχέτισης σαρκοπλασματικού δικτύου και μιτοχονδρίων (SR-mitochondria associated membranes, MAMs), διορθώνει τα μιτοχονδριακά προβλήματα (δυναμικό μιτοχονδριακής μεμβράνης  $\Delta\psi$ , λειτουργία MPTP, επίπεδα πρωτεϊνών). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την προστασία των καρδιομυοκυττάρων και την αποκατάσταση των

προβλημάτων στο  $des^{-/-}$  μυοκάρδιο [118]. Συνεπώς, η ομοιότητα των μιτοχονδρίων αποτελεί κομβικό σημείο της παθολογίας λόγω έλλειψης δεσμίνης.

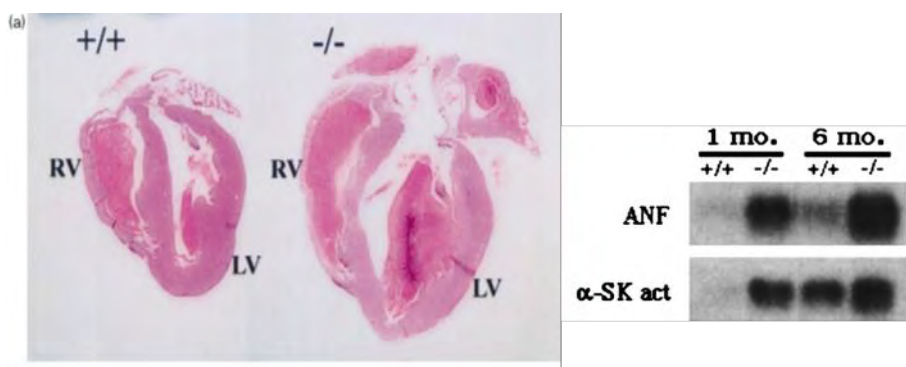


Σχήμα 8 Τα βασικά χαρακτηριστικά της παθολογίας του  $des^{-/-}$  μυοκαρδίου, το οποίο χαρακτηρίζεται από θάνατο καρδιομυοκυττάρων, φλεγμονώδη διήθηση, εναπόθεση ασβεστίου και ίνωση (τροποποίηση από [38, 44]).

Η παθοφυσιολογία του  $des^{-/-}$  μυοκαρδίου περιλαμβάνει χαρακτηριστικά πολλών μυοκαρδιοπαθειών και, το σημαντικότερο, είναι ένα μοντέλο προοδευτικής καρδιακής ανεπάρκειας. Πιο συγκεκριμένα, προσβάλλεται σε μεγάλο βαθμό η δεξιά κοιλία, αλλά και η αριστερή, αναπτύσσεται διατακτική μυοκαρδιοπάθεια και εμφανίζεται καρδιακή, τόσο συστολική όσο και διαστολική, δυσλειτουργία που είναι ιδιαίτερα δυσμενής σε ζώα μεγάλης ηλικίας, τα οποία εμφανίζουν χαρακτηριστικές παραμέτρους της καρδιακής ανεπάρκειας, ενώ παρατηρείται και αρρυθμογόνος καρδιακή ανεπάρκεια της δεξιάς κοιλίας [1, 45, 46]. Οι παράμετροι της καρδιακής δυσλειτουργίας εμφανίζονται ανάγλυφα σε μελέτες με τη χρήση υπερήχων, ηλεκροφυσιολογίας και MRI [47, 48]. Η παθολογία του μοντέλου  $des^{-/-}$  περιλαμβάνει και άλλα χαρακτηριστικά όπως η αταξία στην διεύθυνση και η πρόσκαιρη υπερτροφία των μυοκυττάρων. Η τελευταία εκφράζεται με αύξηση του



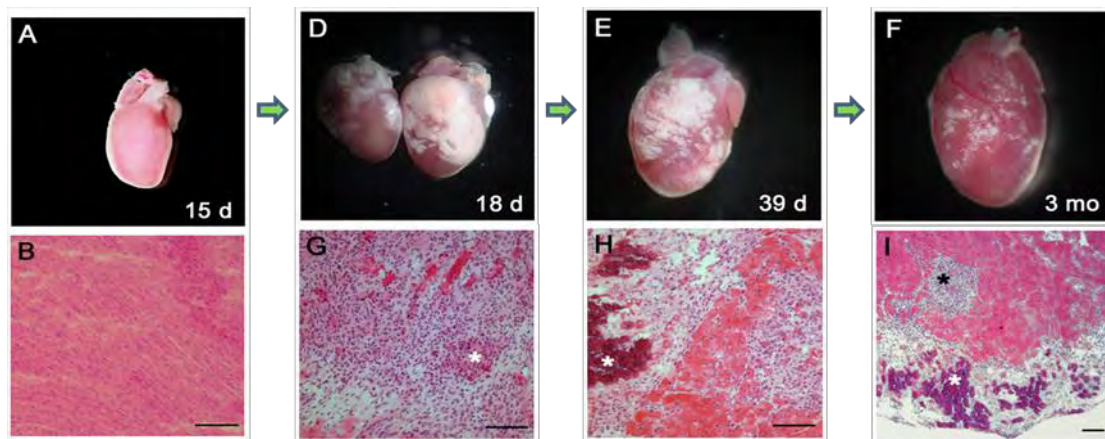
λόγου βάρους καρδιάς/βάρους σώματος (HW/BW) κυρίως σε ζώα 3 μηνών, η οποία συνοδεύεται από αύξηση έκφρασης γονιδίων όπως του ANF (atrial natriuretic factor) και της  $\alpha$ -ακτίνης του σκελετικού μυός ( $\alpha$ -skeletal actin) (Σχήμα 9) [45].



Σχήμα 9 Διατακτική μυοκαρδιοπάθεια (DCM) και υπερτροφία με αυξημένους τους υπερτροφικούς δείκτες ANF και  $\alpha$ -SK act στο  $des^{-/-}$  μυοκάρδιο (τροποποίηση από [45]).

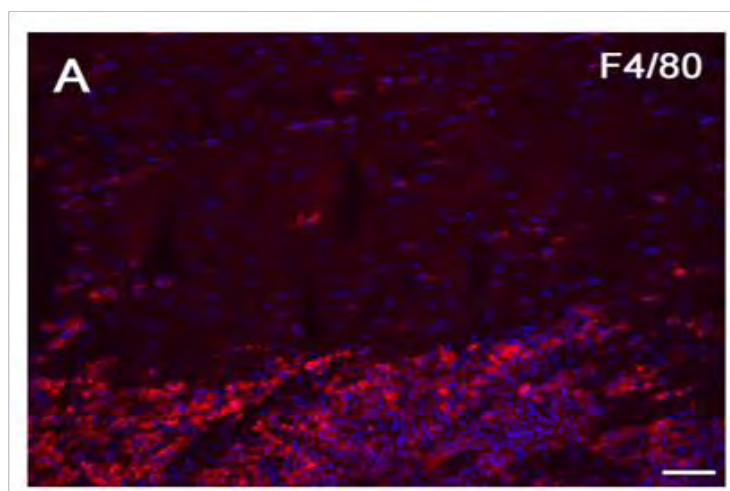
### Ο ρόλος της φλεγμονής και της ίνωσης

Μελέτες πάνω στην  $des^{-/-}$  μυοκαρδιοπάθεια έχουν αποκαλύψει μεταβολές σε μονοπάτια που σχετίζονται με την απόπτωση και την αυτοφαγία, μεταβολικά μονοπάτια, την ομοιόσταση του ασβεστίου, καθώς επίσης την ίνωση και την φλεγμονή [1, 21, 44, 45, 46, 49, 50]. Ο ρόλος της φλεγμονής θεωρείται κομβικός στην καρδιακή ανεπάρκεια, που είναι άλλη μια χρόνια φλεγμονώδης νόσος. Έτσι και στο  $des^{-/-}$  μυοκάρδιο υπάρχει φλεγμονή, για τη δημιουργία της οποίας έγινε η υπόθεση [1] ότι νεκρωτικά  $des^{-/-}$  καρδιομυοκύτταρα επάγουν μέσω απελευθερούμενων σημάτων κινδύνου τις διεργασίες της στείρας φλεγμονής. Η απαρχή της φλεγμονής παρατηρείται σε 15/16 ημερών ποντίκια, ενώ η κορύφωσή της παρουσιάζεται την δεύτερη με τρίτη εβδομάδα ζωής των  $des^{-/-}$  ζώων [1]. Την οξεία φλεγμονή διαδέχεται μία χρόνια φλεγμονώδης κατάσταση (Σχήμα 10).



Σχήμα 10 Αυθόρμητη φλεγμονή και η σταδιακή της αποδρομή στο  $des^{-/-}$  μυοκάρδιο. Αντιπροσωπευτικές εικόνες από ολόκληρη καρδιά και τομές μυοκαρδίου με χρώση H&E (τροποποίηση από [1]).

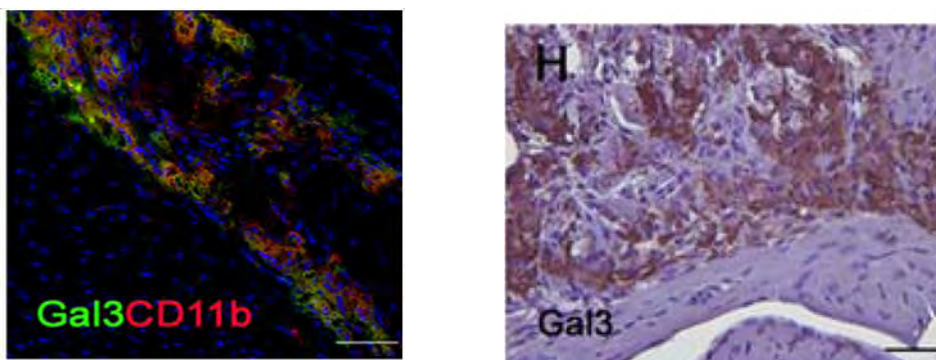
Ανάλυση γονιδιακής έκφρασης με μικροσυστοιχίες έδειξε ότι ακόμα και στην λιγότερο δυναμική φάση που ακολουθεί την οξεία φλεγμονή, η πλειοψηφία ( $n=64$ ) των επαγόμενων γονιδίων στην  $des^{-/-}$  καρδιά σχετίζονται με την φλεγμονώδη και/ή την ανοσολογική απάντηση, ενώ ένας σημαντικός αριθμός γονιδίων ( $n=27$ ) σχετίζεται με την ιστική αναδόμηση και την αγγειογένεση [1]. Τα φλεγμονώδη κύτταρα που διηθούν την  $des^{-/-}$  καρδιά – στην πλειοψηφία τους μακροφάγα (Σχήμα 13) – φαίνεται να είναι υπεύθυνα για την εντονότερη υπερέκφραση ( $>25$ -φορές σε σχέση με φυσιολογική καρδιά) μορίων που σχετίζονται με τη φλεγμονή: της οστεοποντίνης (OPN, *Spp1*), της γαλεκτίνης-3 (Gal3, *Lgals3*), της οστεοακτιβίνης (OA, *Gprmb*) και της μεταλλοπρωτεάσης-12 (MMP12, *Mmp12*)



**Σχήμα 11** Το  $des^{-/-}$  μυοκάρδιο διηθείται από μεγάλο αριθμό F4/80<sup>+</sup> μακροφάγων όπως φαίνεται ύστερα από ανοσοφθορισμό [1].

Δύο τουλάχιστον από αυτά τα μόρια, η οστεοποντίνη και η γαλεκτίνη-3, φαίνεται να παίζουν ρόλο στη διαμόρφωση της φλεγμονής, τη εγκαθίδρυση της ίνωσης και την παθοφυσιολογία του  $des^{-/-}$  μυοκαρδίου.

Πιο συγκεκριμένα, η απουσία οστεοποντίνης (ποντίκια με διπλή απαλοιφή δεσμίνης και οστεοποντίνης,  $des^{-/-}OPN^{-/-}$ ) οδήγησε σε μείωση της ίνωσης και βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας (σε σύγκριση με το  $des^{-/-}$ ). Οι βελτιώσεις αυτές συνδέθηκαν με σημαντική μείωση των επιπέδων της γαλεκτίνης-3 στο  $des^{-/-}OPN^{-/-}$  μυοκάρδιο. Από την άλλη μεριά, τα φλεγμονώδη κύτταρα (κυρίως μακροφάγα) που διηθούν το  $des^{-/-}$  μυοκάρδιο υπερεκφράζουν γαλεκτίνη-3 (Σχήμα 12), ενώ η γαλεκτίνη-3 φαίνεται να εκκρίνεται από τα μακροφάγα με τρόπο που εξαρτάται από την οστεοποντίνη [1].



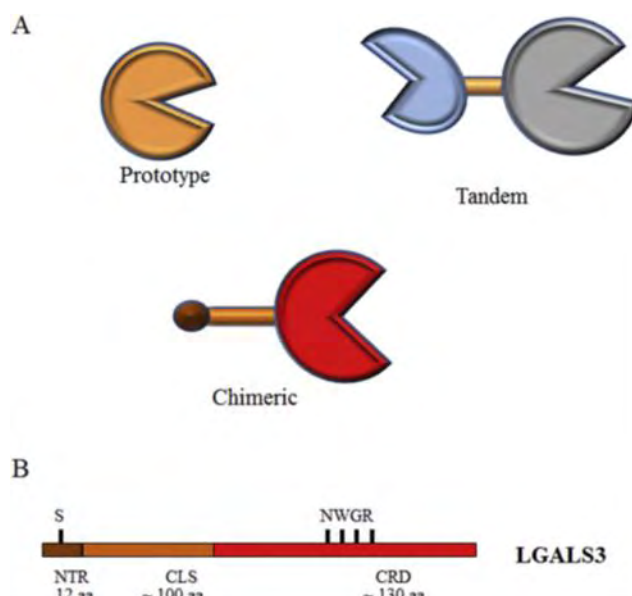
**Σχήμα 12** Δεξιά, η γαλεκτίνη-3 υπερεκφράζεται στο  $des^{-/-}$  μυοκάρδιο, όπως φαίνεται σε πείραμα ανοσοιστοχημείας. Αριστερά, η γαλεκτίνη-3 συνεντοπίζεται με τα CD11b<sup>+</sup> μακροφάγα που διηθούν το  $des^{-/-}$  μυοκάρδιο [1].

Με βάση τα παραπάνω, αλλά και δημοσιευμένες ιδιότητες της γαλεκτίνης-3 που φαίνεται να ρυθμίζει φλεγμονή ή/και ίνωση τουλάχιστον σε ορισμένα ζωικά μοντέλα (βλέπε παρακάτω), σε συνδυασμό και με την πρόσφατη ανάδειξη της ως βιοδείκτη στην καρδιακή ανεπάρκεια [124, 125], έγινε η υπόθεση ότι η εκκρινόμενη από τα μακροφάγα γαλεκτίνη-3 μπορεί να ρυθμίζει την ίνωση και την πορεία της καρδιακής ανεπάρκειας στο  $des^{-/-}$  μυοκάρδιο.

## 1.4 Γαλεκτίνη-3

Η γαλεκτίνη-3 (γνωστή και ως Mac-2, CBP-35, εBP, RL-29, HL-29, L-34, ή LBP, MW: 31 kDa) είναι μέλος της ευρύτερης οικογένειας των λεκτινών που προσδέονται σε β-γαλακτοσιδάσες. Στα σπονδυλωτά, έχουν περιγραφεί 15 μέλη της οικογένειας των γαλεκτινών. Όλες οι γαλεκτίνες διαθέτουν επικράτειες αναγνώρισης υδατανθράκων (Carbohydrate recognition domains: CRDs) μεγέθους περίπου 130 αμινοξέων. Δεν έχουν όλες οι γαλεκτίνες τον ίδιο αριθμό CRDs. Ορισμένες περιέχουν μόνο ένα CRD (γαλεκτίνες 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 και 15), άλλες γαλεκτίνες περιέχουν δύο ομόλογα CRDs σε μία πολυπεπτιδική αλυσίδα, που χωρίζονται από έναν συνδέτη, αποτελούμενο το πολύ μέχρι 70 αμινοξέα (γαλεκτίνες 4, 6, 8, 9 και 12), ενώ η γαλεκτίνη-3 είναι το μοναδικό μέλος που περιέχει μια μη λεκτινική αμινοτελική περιοχή που συνδέεται με ένα CRD και συχνά αναφέρεται ως χιμαιρικού τύπου γαλεκτίνη (Σχήμα 13). Κάθε γαλεκτίνη έχει ξεχωριστή συγγένεια στην σύνδεσή της με υδατάνθρακες. Οι περισσότερες γαλεκτίνες είναι δισθενείς ή πολυσθενείς σε σχέση με τα χαρακτηριστικά αυτά.

Οι πρωτεΐνες αυτές εντοπίζονται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, όπως επίσης και στον πυρήνα κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Μπορούν να εκκριθούν και εκτός κυττάρου και να δράσουν εκεί [55, 56]. Στοιχεία δείχνουν ότι οι γαλεκτίνες ρυθμίζουν και την μεταγωγή σήματος, με την ιδιότητα τους να δένουν σε ενδοκυττάρους προσδέτες.



Σχήμα 13 Δομή της γαλεκτίνης-3. Α. Οι γαλεκτίνες αποτελούνται από συνδυασμούς πρωτοτυπικών και χιμαιρικών ομάδων. Η γαλεκτίνη-3 είναι το μοναδικό μέλος που αποτελεί χίμαιρα περιέχοντας μη λεκτινική αλληλουχία στο αμινοτελικό της άκρο. Β. Η πρωτεϊνική της δομή (LGALS3) αποτελείται από μία αμινοτελική (NTR) περιοχή 12 αμινοξέων που περιέχει θέση φωσφορυλίωσης στη σερίνη 6 (S), καθώς και μία όμοια με του κολλαγόνου αλληλουχία (CLS) μήκους περίπου 100 αμινοξέων. Η περιοχή αναγνώρισης υδατανθράκων (CRD) περιλαμβάνει το καρβοξυτελικό άκρο περίπου 130 αμινοξέων και περιέχει το μοτίβο NWGR που έχει βρεθεί και στην οικογένεια των BCL2 πρωτεϊνών [78].

Η γαλεκτίνη-3 εντοπίζεται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και τον πυρήνα. Ενδοκυτταρικά είναι μια σημαντική πρωτεΐνη για την επιβίωση του κυττάρου λόγω της ιδιότητας της να παρεμποδίζει το μονοπάτι της απόπτωσης, ενώ όταν βρίσκεται στον πυρήνα προάγει τον πολλαπλασιασμό [111]. Όπως και άλλες γαλεκτίνες, η γαλεκτίνη-3 δεν φέρει την απαιτούμενη αλληλουχία για την έκκρισή της από το κύτταρο μέσω του κλασσικού εκκριτικού μονοπατιού, αλλά εκκρίνεται στον εξωκυττάριο χώρο μέσω μη κανονικών μηχανισμών [79, 108].

Η γαλεκτίνη-3 εκτός από τα μακροφάγα εκφράζεται και από άλλα φλεγμονώδη κύτταρα συμπεριλαμβανομένων των μαστοκυττάρων, τα ηωσινοφίλων, των ουδετεροφίλων, αλλά και από ορισμένα είδη επιθηλιακών και ενδοθηλιακών κυττάρων [81, 82]. Πρέπει πάντως να σημειωθεί ότι τα μακροφάγα έχουν χαρακτηριστικά την ικανότητα να απελευθερώνουν υψηλά επίπεδα γαλεκτίνης-3 στο περιβάλλον τους, ιδιαίτερα κατά τη διέγερσή τους [1].

Σε επίπεδο ιστού, η γαλεκτίνη-3 κατά κύριο λόγο εκφράζεται σε πνεύμονα, σπλήνα, στομάχι, παχύ έντερο, επινεφρίδια, μήτρα και ωοθήκη, ενώ σε χαμηλότερα επίπεδα

εκφράζεται επίσης σε νεφρό, καρδιά, εγκέφαλο, πάγκρεας και ήπαρ [84]. Ωστόσο, σε παθολογικές συνθήκες (π.χ προσβολή του ιστού, λοίμωξη), τα επίπεδα της έκφρασης της γαλεκτίνης-3 μπορεί να αλλάξουν δραματικά.

#### **1.4.1 Ρόλος της Γαλεκτίνης-3 στην Φλεγμονή και στην Ίνωση: Καρδιά**

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η γαλεκτίνη-3 μπορεί να ρυθμίζει τη φλεγμονή μέσα από διάφορους μηχανισμούς. Αν η βλάβη του ιστού γίνει επαναλαμβανόμενη, η γαλεκτίνη-3 φαίνεται να εμπλέκεται στην μετάβαση στην χρόνια φλεγμονή [85]. Όσον αφορά την συμμετοχή της γαλεκτίνης-3 στην ίνωση και στην ιστική αναδόμηση, φαίνεται να εμπλέκεται στην καρδιά αλλά και σε άλλα όργανα. Στα περισσότερα μοντέλα ή σε παθολογίες ίνωσης παρατηρείται επαγωγή της γαλεκτίνης-3. Σε κάποια από αυτά η αποσιώπηση, φαρμακολογική στόχευση ή μερική εξάλειψή της οδήγησε σε βελτίωση της παθολογίας, ενώ σε άλλα είχε το αντίθετο αποτέλεσμα [89, 91, 128, 129].

Ένας άλλος σημαντικός ρόλος της γαλεκτίνης-3 πάντως είναι η χρήση της ως βιοδείκτη στην καρδιακή ανεπάρκεια. Αυτό αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 2004 από τους Sharma et al. [119] με μετέπειτα μελέτες να ενισχύουν τον πιθανό της ρόλο ως βιοδείκτη στο πλάσμα ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια [120]. Πληθώρα μεταγενέστερων μελετών υποδεικνύουν ότι τα επίπεδα γαλεκτίνης-3 στην κυκλοφορία αποτελούν ένα καλό δείκτη πρόγνωσης της θνησιμότητας, αλλά και δείκτη ιστικής αναδόμησης στην καρδιακή ανεπάρκεια [124, 125].

Όσον αφορά το  $des^{-/-}$  μοντέλο, φάνηκε ότι η γαλεκτίνη-3 προάγει την καρδιακή δυσλειτουργία και ίνωση. Συγκεκριμένα, σε μελέτες σε διπλό knock-out μοντέλο δεσμίνης και γαλεκτίνης-3 ( $des^{-/-}Lgals3^{-/-}$ ), σε ηλικιακές ομάδες των 4 και 12 μηνών φάνηκε βελτίωση στην καρδιακή λειτουργία, όπως επίσης και μείωση της ίνωσης στην αριστερή κοιλία, πιθανότατα μέσω της μεταβολής χαρακτηριστικών αποκρίσεων των μακροφάγων και των ινοβλαστών [126, 127].



### **1.4.2 Ρόλος της Γαλεκτίνης-3 στην Φλεγμονή και στην Ίνωση: Πνεύμονες και Νεφρά**

Σε μελέτες πειραματικών μοντέλων στον πνεύμονα η γαλεκτίνη-3 έχει φανεί να έχει διαφορετικό ρόλο στην φλεγμονή, ανάλογα με το είδος της προσβολής του ιστού. Σε πειραματικό μοντέλο άσθματος ποντικού, μια ασθένεια που χαρακτηρίζεται από χρόνια φλεγμονή των αεραγωγών, μετά την ευαισθητοποίηση με ωαλβουμίνη φάνηκε ότι η γαλεκτίνη-3 ήταν αυξημένη στους αεραγωγούς. Τα *Lgals3<sup>-/-</sup>* ποντίκια όμως ανέπτυξαν λιγότερα ηωσινόφιλα και μικρότερη υπερευαισθησία των αεραγωγών, υποδεικνύοντας ότι η γαλεκτίνη-3 προάγει την ασθματική φλεγμονή [89]. Αντίθετα, σε παρόμοιο μοντέλο, η γαλεκτίνη-3 φάνηκε να έχει αντιφλεγμονώδη δράση μετά από εξωγενή χορήγησή της με πλασμίδιο [129].

Ο αμφιλεγόμενος ρόλος της γαλεκτίνης-3 έχει φανεί και σε πειράματα μελέτης της ίνωσης στα νεφρά, σε μοντέλο ουρητικής απόφραξης (UUO). Η μελέτη μιας ερευνητικής ομάδας έδειξε ότι η γαλεκτίνη-3 εκκρίνεται από τα μακροφάγα και προάγει την νεφρική ίνωση [91], ενώ μια μεταγενέστερη έρευνα στο ίδιο μοντέλο έδειξε ότι η γαλεκτίνη-3 προστατεύει τα επιθηλιακά κύτταρα των νεφρών από την απόπτωση και ότι σε ποντίκια με έλλειψη γαλεκτίνης-3 (*Gal-3<sup>-/-</sup>*) υπήρχε περισσότερος θάνατος επιθηλιακών κυττάρων και τελικά μεγαλύτερη ίνωση [128].

Έτσι, η γαλεκτίνη-3 έχει ρόλο σε φλεγμονή, αναδόμηση και ίνωση κατά τον τραυματισμό-προσβολή του πνεύμονα και των νεφρών, χωρίς όμως ο ρόλος αυτός να έχει αποσαφηνισθεί.

## 1.5 Σκοπός της Εργασίας

Ο σκοπός της παρούσας ερευνητικής μελέτης ήταν η διερεύνηση των συννοσηροτήτων του πνεύμονα, των νεφρών και της καρδιάς σε μοντέλο καρδιακής ανεπάρκειας. Για την διερεύνηση αυτή χρησιμοποιήθηκε το ζωικό μοντέλο μυοκαρδιοπάθειας και καρδιακής ανεπάρκειας  $des^{-/-}$ . Οι μύες με έλλειψη δεσμίνης ( $des^{-/-}$ ) αποτελούν εξαιρετικό πειραματικό μοντέλο, καθώς η παθοφυσιολογία του περιλαμβάνει χαρακτηριστικά πολλών μυοκαρδιοπαθειών. Πιο συγκεκριμένα, προσβάλλεται σε μεγάλο βαθμό η δεξιά κοιλία, αλλά και η αριστερή, αναπτύσσεται διατακτική μυοκαρδιοπάθεια και εμφανίζεται καρδιακή τόσο συστολική όσο και διαστολική δυσλειτουργία, ενώ παρατηρείται και αρρυθμογόνος καρδιακή ανεπάρκεια της δεξιάς κοιλίας [1, 45, 46]. Ο δεύτερος σκοπός της εργασίας ήταν να διερευνηθεί αν η επιπλέον έλλειψη της γαλεκτίνης-3 βελτιώνει τον φαινότυπο αυτών των συννοσηροτήτων. Για τον σκοπό αυτόν χρησιμοποιήθηκε διπλό knock-out μοντέλο με έλλειψη δεσμίνης και γαλεκτίνης-3 ( $des^{-/-}Lgals3^{-/-}$ ). Με δεδομένο ότι η απουσία γαλεκτίνης-3 έχει αυξανόμενη προστατευτική επίδραση κατά την πρόοδο της παθολογίας του  $des^{-/-}$  [126, 127] κρίθηκε ενδιαφέρον να διαπιστωθεί αν η βελτίωση αυτή συμβαδίζει με αντίστοιχη βελτίωση των συννοσηροτήτων.

Πιο συγκεκριμένα, στόχος ήταν να απαντηθούν τα ακόλουθα ερωτήματα:

1. Υπάρχουν συννοσηρότητες πνεύμονα και νεφρών στο μοντέλο  $des^{-/-}$ ;
2. Πως θα μπορούσαν να ταυτοποιηθούν και να μετρηθούν και ποια μόρια εμπλέκονται πιθανόν σε αυτές;
3. Η έλλειψη της γαλεκτίνης-3 βελτιώνει τον φαινότυπο αυτό; Αν ναι, με ποιούς τρόπους το επιτυγχάνει;

Για την απάντηση των παραπάνω κύριο εργαλείο ήταν η ανάλυση των παθοφυσιολογιών στο  $des^{-/-}$  μοντέλο και η σύγκρισή του με αυτές του  $des^{-/-}Lgals3^{-/-}$  μοντέλου.



## 2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Πειραματόζωα

Τα ποντίκια με έλλειψη δεσμίνης ( $des^{-/-}$ ) του εργαστηρίου της Δρ. Καπετανάκη [30] προέρχονται από 129/Sv γενετικό υπόβαθρο. Τα ποντίκια  $Lgals3^{-/-}$  προέκυψαν μετά από τροποποίηση στο εργαστήριο του R. Cummings, (University of Oklahoma) για την απαλλαγή της έλλειψης και της γαλεκτίνης-1 του αρχικού σχεδιασμού [58], αποκτήθηκαν το 2010 από τον Σ. Ψαρρά από το Jackson Laboratory (006338, B6.Cg- $Lgals3^{tm1Poi}$ ) και είναι σε C57BL/6 γενετικό υπόβαθρο. Για την δημιουργία ποντικών με διπλή απαλοιφή για τα γονίδια της δεσμίνης και γαλεκτίνης-3 ( $des^{-/-} Lgals3^{-/-}$ ), απόγονοι  $des^{-/-} Lgals3^{+/+}$  από την αρχική διασταύρωση  $des^{-/-}$  x  $Lgals3^{-/-}$  διασταυρώθηκαν μεταξύ τους ώστε να προκύψουν  $des^{-/-} Lgals3^{-/-}$  και  $des^{-/-}$  σε μεικτό υπόβαθρο C57BL/6x129/Sv.

Στην παρούσα μελέτη: α) για τα πειράματα απομόνωσης και ιστολογίας της καρδιάς χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια  $des^{-/-}$ , wt και  $des^{-/-} Lgals3^{-/-}$  ηλικίας 4, 10 και 12 μηνών β) για τα πειράματα μέτρησης λειτουργίας και ιστολογίας του πνεύμονα χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια  $des^{-/-}$ , wt και  $des^{-/-} Lgals3^{-/-}$  ηλικίας 4 και 12 μηνών και γ) για τα πειράματα απομόνωσης και ιστολογίας των νεφρών χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια  $des^{-/-}$ , wt και  $des^{-/-} Lgals3^{-/-}$  ηλικίας 10 και 12 μηνών. Όλα τα πειραματόζωα φυλάσσονταν σε συνθήκες ελεύθερες παθογόνων στην Πρότυπη Μονάδα Πειραματοζώων του ΙΙΒΕΑΑ. Οι διαδικασίες χειρισμού και φροντίδας των ζώων βρίσκονται σε συμφωνία με σύγχρονα διεθνή πρότυπα [Association for the Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC) και Federation of European Laboratory Animal Science Association (FELASA)]. Η αδειοδότηση των πειραμάτων των παρόντων αποτελεσμάτων ήταν στον Σ. Ψαρρά (Αρ. Αδ. 7920 από 14-12-16).

## 2.2 Απομόνωση Γενομικού DNA και Γενοτυπικός Έλεγχος

Προκειμένου να προσδιοριστεί ο γενότυπος των ζώων που προέκυψαν από τις διασταυρώσεις, πραγματοποιήθηκε απομόνωση γονιδιωματικού DNA από τμήμα ουράς. Πριν την διαδικασία της απομόνωσης, το τμήμα της ουράς του ζώου επωάστηκε για 12-16 ώρες σε 55°C σε 500μl διαλύματος πρωτεϊνολυσης K [50 mM Tris- pH 7.5, 0.1M EDTA pH 8.0, 0.5% (v/v/) SDS και 0.68 mg/ml proteinase K].

Το 1/200 (1 μl) του απομονωμένου γενομικού DNA χρησιμοποιήθηκε για τη γενοτύπηση των ποντικών με τη βοήθεια PCR όγκου 25 μl. Για τα δύο διαγονιδιακά ποντίκια που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ρυθμιστικά διαλύματα, dNTPs και Taq πολυμεράση των εταιρειών Quiagen και Invitrogen. Το μίγμα για την γενοτύπηση και ταυτοποίηση του *Lgals3<sup>-/-</sup>* περιείχε 1 mM Mg<sup>+2</sup>, 0.2 mM dNTPs και 1 μM από τον κάθε primer, ενώ αντίστοιχα για το *des<sup>-/-</sup>* 1.75 mM Mg<sup>+2</sup>, 0.2 mM dNTPs και 0.2- 0.4 μM από τον κάθε primer.

Παρατίθενται οι primers και τα προγράμματα που ακολουθήθηκαν:

### PCR για την γενοτύπηση και ταυτοποίηση μυών *Lgals3<sup>-/-</sup>*.

#### Primers:

IMR7107: GAG GAG GGT CAA AGG GAA AG

IMR7399: GAC TGG AAT TGC CCA TGA AC

IMR8436: TCG CCT TCT TGA CGA GTT CT

Πρόγραμμα : 94°C 3' ακολουθούμενο από 35 κύκλους 94°C 30'' / 65°C 30'' / 72°C 30'' και 1 κύκλο 72°C 5'

Μεγέθη των PCR amplicons: Ενδογενές: 220 bp; ανασυνδυασμένο: 150 bp

### PCR για την γενοτύπηση και ταυτοποίηση μυών *des<sup>-/-</sup>*

**Primers:**

Des null F      TGATGTCAGGAGGGCTACA

Des null R      CGTCTATCAGGTTGTCACG

Neo3 (=neoPLB)    TCCTCGTGCTTTACGGTATC

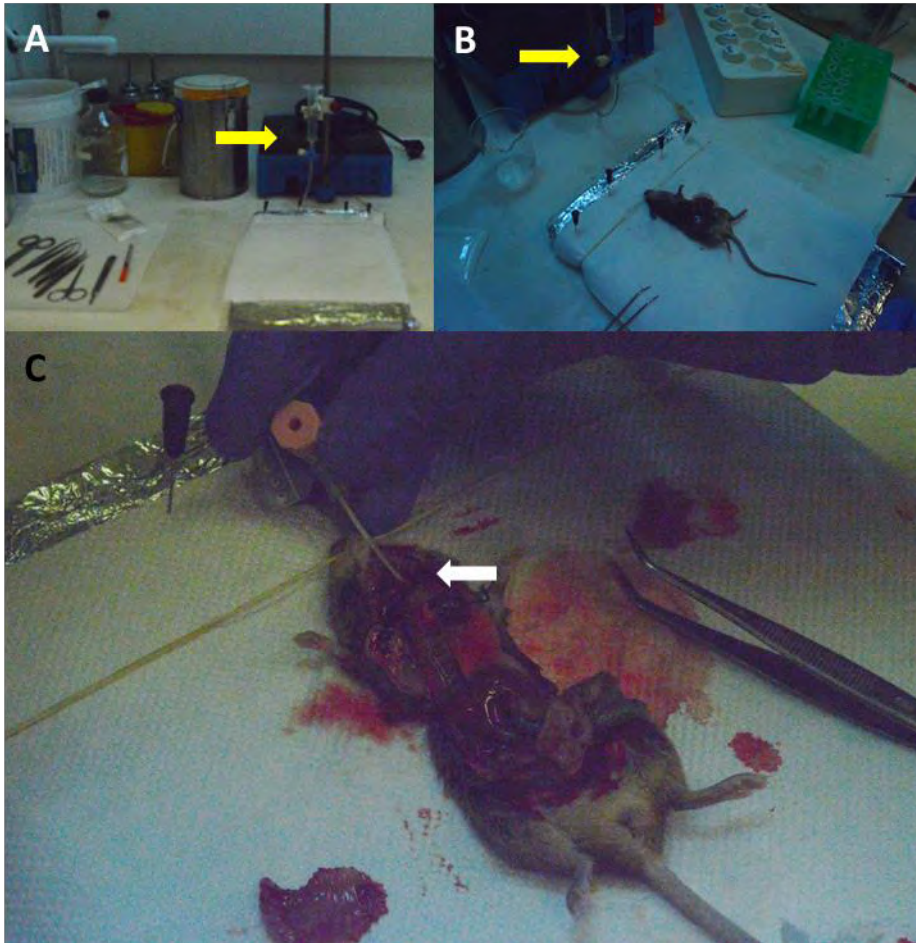
Πρόγραμμα: 96°C 5', ακολουθούμενο από 35 κύκλους 94°C 1' / 60°C 2' / 72°C 3' και 1 κύκλο 72°C 7'

Μεγέθη των PCR amplicons: Ενδογενές: 700 bp; ανασυνδυασμένο: 400 bp

## 2.3 Απομόνωση Πνεύμονα

Για την απομόνωση του πνεύμονα από ζωικό μοντέλο ποντικίου, αρχικά χρειάζεται να γίνει αναισθητοποίηση του ζώου. Ως αναισθητικό χρησιμοποιείται διάλυμα: Ketamine 0.3 ml, Xylazine 0.1ml, Water 1.1ml (ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση 0.15 ml / 20g βάρους σώματος). Ο πολύλοβος πνεύμονας ψυχόταν σε υγρό άζωτο για ανάλυση έκφρασης σε επίπεδο RNA κ.λ.π, ενώ ο μονόλοβος πνεύμονας φυλάσσονταν στο κατάλληλο μονιμοποιητικό υγρό (φορμαλίνη ή μίγμα PFA και OCT) και χρησιμοποιήθηκε για ιστολογικές μελέτες.

Λόγω της ιδιομορφίας του οργάνου απαιτείται ειδική διάταξη για τη λήψη πνευμονικών ιστών για ιστολογία, υπό συνθήκες που υποκαθιστούν την ατμοσφαιρική πίεση. Διαφορετικά, η δομή του οργάνου καταρρέει και δεν μπορούν να πραγματοποιηθούν δομικές και ιστολογικές μελέτες. Ξεκινώντας, στήνεται μια βάση πάνω στην οποία είναι προσαρτημένη σύριγγα των 10ml γεμισμένη με φορμαλίνη μέχρι τα 10ml. Η κορυφή του υγρού θα πρέπει να έχει απόσταση από την βάση που θα βρίσκεται το ζώο (και ο πνεύμονας) 17.5 cm. Σε περίπτωση που το δείγμα προορίζεται για επεξεργασία σε κρυστάτη, οπότε και χρησιμοποιείται το παχύρρευστο O.C.T., δεν χρειάζεται η βάση και η σύριγγα των 10ml, αλλά μια σύριγγα του 1ml η οποία πρέπει να περιέχει 2 μέρη 4% PFA: 1 μέρος O.C.T.



Σχήμα 14. Διάταξη για την απομόνωση πνευμονικού ιστού προς ιστολογική ανάλυση. Α. Η σύριγγα (κίτρινο βέλος) συμπληρώνεται με μονιμοποιητικό υγρό μέχρι ύψους που απέχει 17.5 cm από τη βάση. Β. Τοποθέτηση και ακινητοποίηση του ποντικίου στη βάση. C. Μετά την περίδεση και απομάκρυνση του πολύλοβου, ακολουθεί τομή της τραχείας, είσοδος της προσαρτημένης βελόνας (λευκό βέλος) και εισροή του μονιμοποιητικού υγρού μέχρι ο πνεύμονας να «φουσκώσει» και να μπορεί να υποστεί περαιτέρω κατεργασία για ιστολογικά μπλοκ (παραφίνη ή cryoblocks), νέα περίδεση και απομάκρυνση του μονόλοβου.

Μετά την αναισθητοποίηση του, το ζώο ακινητοποιείται με ένα λάστιχο στο στόμα ώστε να παραμένει σταθερό. Πραγματοποιείται μια τομή στην κοιλιά και κόβεται η κοιλιακή αορτή, σταματώντας την αιμορραγία με διηθητικό χαρτί. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται μια ευθεία τομή από την βάση του στέρνου έως το σαγόι ώστε να αποκαλυφθεί η τραχεία. Ύστερα, με την λαβίδα γίνεται προσεκτικά μια τρύπα στο διάφραγμα και κόβονται τα πλευρά δίπλα στο στέρνο. Συνεχίζοντας, αφαιρούνται τα πλευρά και από την δεξιά και από την αριστερή πλευρά.

Εφόσον πλέον υπάρχει εύκολη πρόσβαση στους πνεύμονες και στην τραχεία, αρχικά απομονώνεται ο πολύλοβος πνεύμονας, κάνοντας ένα ράμμα ψηλά στην

“ρίζα” του βρογχικού δέντρου. Αφού βεβαιωθούμε ότι το ράμμα είναι σταθερό, χρησιμοποιώντας δύο λαβίδες -και όχι ψαλίδι- απομονώνουμε τον πολύλοβο πνεύμονα ο οποίος μεταφέρεται άμεσα σε σωληνάριο, παγώνει σε υγρό άζωτο και φυλάσσεται στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για μελλοντική απομόνωση RNA ή πρωτεΐνης και μοριακή ανάλυση.

Στην συνέχεια περνώντας την μια λαβίδα κάτω από την τραχεία κάνουμε ένα ράμμα χωρίς όμως να το δέσουμε, και κόβουμε μέχρι την μέση της διαμέτρου της τραχείας, και πάνω από το ράμμα, μια εγκάρσια τομή με προσοχή, ώστε να μην κοπεί ολοσχερώς η τραχεία. Περνώντας προσεκτικά την βελόνα που έχουμε προσαρτήσει στην σύριγγα μέσα στην τραχεία, αφήνουμε να τρέξει περίπου 0.5 με 1ml φορμαλίνη μέχρις ότου φουσκώσει ο πνεύμονας. Τέλος κλείνουμε το ράμμα ενώ παράλληλα βγάζουμε την βελόνα από την τραχεία. Αφαιρούμε τον πνεύμονα προσεκτικά και τον τοποθετούμε σε φιάλη με φορμαλίνη.

## **2.4 Μέτρηση Λειτουργίας του Πνεύμονα**

Τα ποντίκια αναισθητοποιήθηκαν με ενδοπεριτοναϊκή ένεση 0.052 ml/10g βάρους σώματος, μείγματος κεταμίνης (20mg/ml, Merial SAS) και ξυλαζίνης (1.3mg/ml, Bayer AG). Μόλις εγκαταστάθηκε η χειρουργική αναισθησία, εκτέθηκε η τραχεία, η οποία σωληνώθηκε με μια αμβλεία μεταλλική βελόνα 18G, και συνδέθηκε με έναν ελεγχόμενο από υπολογιστή αναπνευστήρα μικρών ζώων (FlexiVent, SCIREQ). Τα ζώα αερίζονταν με έναν αναπνεόμενο όγκο 8ml/kg, με φυσιολογικό αναπνευστικό ρυθμό (150 αναπνοές/λεπτό). Μία θετική τελική εκπνευστική πίεση (PEEP) 0.2 kPa δημιουργήθηκε τοποθετώντας τη γραμμή εκπνοής σε μια παγίδα νερού. Κάθε ζώο παραλύθηκε με ενδοπεριτοναϊκή ένεση 0.05ml/10g σωματικού βάρους βρωμιούχου ροκουρονίου (0.01mg/ml, N.V. Organon) για την καταστολή της αυθόρμητης αναπνοής και αφέθηκε να εξισορροπηθεί στον αναπνευστήρα. Το ιστορικό του όγκου των πνευμόνων των ποντικών ήταν τυποποιημένο πριν από τη μέτρηση της πνευμονικής μηχανικής, χρησιμοποιώντας τρεις βαθιές εμφυσήσεις στη συνολική χωρητικότητα του πνεύμονα (TLC). Η παρεμβολή των μηχανικών μερών του αναπνευστήρα ή του καθετήρα της τραχείας στις μετρήσεις εξαλείφθηκε

χρησιμοποιώντας δυναμική βαθμονόμηση, όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Αναλύθηκε η στατική ελαστικότητα (Cst), η οποία αντανακλά την ακαμψία των πνευμόνων, η δυναμική ελαστικότητα, η ολική πνευμονική αντίσταση (RL) και η κεντρική αντίσταση των αεραγωγών (Rn), η οποία αξιολογεί το επίπεδο στένωσης στους πνεύμονες. Κάθε μεμονωμένη τιμή αντιπροσωπεύει το μέσο όρο τριών επαναληπτικών μετρήσεων.

## **2.5 Ιστολογικές Μελέτες**

### **Έγκλειση Ιστών και Λήψη Τομών**

Τα πειραματόζωα αναισθητοποιήθηκαν, θυσιάστηκαν και τοποθετήθηκαν στην επιφάνεια ανατομίας όπου και παρελήφθη η καρδιά και τα νεφρά. Συνοπτικά, οι καρδιές αποκόπηκαν από τα αγγειακά στοιχεία και με την βοήθεια σύριγγας 22-25G ξεπλύθηκαν, με διάλυμα PBS, από το αίμα. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκαν σε διάλυμα φορμαλίνης για 18 ώρες και παρέμειναν στους 4°C. Μετά το πέρας των 18 ωρών τοποθετήθηκαν σε διάλυμα 70% αιθανόλης στους 4°C μέχρι την έγκλεισή τους σε παραφίνη. Τέλος οι ιστοί αφυδατώθηκαν και παραφινοποιήθηκαν στην Μονάδα Ιστολογίας-Ιστοπαθολογίας του ΙΙΒΕΑΑ.

### **Λήψη, Αποπαραφινοποίηση και Χρώση των Τομών**

Η λήψη των τομών έγινε σε μικροτόμο και οι τομές είχαν πάχος 5μm και τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες πολυλυσίνης. Για την αποπαραφινοποίηση των ιστών, οι αντικειμενοφόρες πλάκες με τις τομές τοποθετήθηκαν σε θερμαινόμενη πλάκα στους 60°C για 3 min και στην συνέχεια εμβαπτίστηκαν διαδοχικά σε 2 διαλύματα ξυλενίου και σε 4 διαδοχικά μειούμενες συγκεντρώσεις αιθανόλης.

### **Ιστολογική Χρώση Αιματοξυλίνης- Ηωσίνης (H&E)**

Η αιματοξυλίνη βάφει βασεόφιλες δομές με ένα μπλε-μωβ χρώμα και η ηωσίνη βάφει ηωσινοφιλικές δομές με έντονο ροζ. Οι βασεόφιλες δομές είναι συνήθως αυτές που περιέχουν νουκλεϊκά οξέα, όπως τα ριβοσώματα και ο πλούσιος σε χρωματίνη πυρήνας του κυττάρου. Οι ηωσινοφιλικές δομές απαρτίζονται από ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια πρωτεΐνες, το μεγαλύτερο μέρος του κυτταροπλάσματος είναι ηωσινοφιλικό. Μετά την διαδικασία της αποπαραφίνωσης οι ενυδατωμένες τομές εμβαπτίστηκαν σε αιματοξυλίνη Mayer's. Λόγω των διαφορών στην ιστική οργάνωση και σύσταση των πνευμόνων και των νεφρών, για τη χρώση των αντίστοιχων τομών χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικοί χρόνοι εμβάπτισης: 20 sec (νεφροί) και 60 sec (πνεύμονες). Ακολούθησαν πλύσεις με νερό βρύσης και στην συνέχεια εμβάπτιση σε ηωσίνη και τρία πλυσίματα σε νερό βρύσης. Στη συνέχεια οι ιστοί εμβαπτίστηκαν σε διαλύματα αυξανόμενης κλίσης συγκέντρωσης αιθανόλης και τέλος σε ξυλένιο. Οι αντικειμενοφόροι καλύφθηκαν με Coverquick 2000 της QPath και καλυπτρίδες και αφέθηκαν να στεγνώσουν.

### **Ιστολογική Χρώση Masson's**

Για την ανίχνευση εναπόθεσης κολλαγόνου στους ιστούς, εφαρμόστηκε η χρώση κατά Masson. Με αυτή την χρώση, οι πυρήνες βάφονται σκούρο καφέ προς μαύρο, το κυτταρόπλασμα ροζ/κόκκινο και οι ίνες κολλαγόνου μπλε. Μετά την διαδικασία της αποπαραφίνωσης οι τομές εμβαπτίστηκαν σε αιματοξυλίνη Harris και έπειτα σε 0.5% Ερυθρό Mallory. Ακολούθησαν τρεις πλύσεις με ddH<sub>2</sub>O και στην συνέχεια εμβάπτιση σε 1% Φωσφορομολυβδικό οξύ. Ακολούθησε επώαση σε 2% Μπλε του Μεθυλενίου και μια πλύση σε τρεχούμενο νερό. Οι αντικειμενοφόροι βυθίστηκαν σε απόλυτη EtOH και στην συνέχεια σε 1% όξινη EtOH. Ακολούθησε εμβάπτιση των αντικειμενοφόρων σε 2 διαλύματα ξυλενίου. Τέλος, τοποθετήθηκαν καλυπτρίδες με Coverquick 2000 της QPath. Για τις χρώσεις πνευμόνων και νεφρών χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικοί χρόνοι επώασης, ανάλογα με τον ιστό.



Οι αντίστοιχοι χρόνοι επώασης για κάθε όργανο παρουσιάζονται παρακάτω:

	Πνεύμονες (χρόνος)	Νεφρά (χρόνος)
<b>Hematoxyline Harris</b>	5 sec	5 sec
<b>Ερυθρό Mallory</b>	1 min 30 sec	1 εμβάπτιση
<b>Φωσφορομολυβδικό οξύ 1%</b>	2 min	2 min
<b>Methyl blue</b>	2 min 20 sec	30 sec
<b>Οξυνισμένο οινόπνευμα</b>	1 εμβάπτιση	1 εμβάπτιση

#### **Διαλύματα:**

##### **Haematoxylin Harris**

##### **Mallory Red**

0.5g όξινη φουξίνη (Fuchsin acid) + 0.5ml παγόμορφο οξεικό οξύ ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) σε 100ml  $\text{dH}_2\text{O}$

##### **Methyl blue**

2g Methyl Blue + 2.5ml  $\text{CH}_3\text{COOH}$  σε 100ml  $\text{dH}_2\text{O}$

##### **1% Molybdophosphoric acid (Φωσφορομολυβδικό οξύ)**

1g Molybdophosphoric acid σε 100ml  $\text{dH}_2\text{O}$

##### **Acidic Ethanol**

1%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  σε 100ml EtOH

#### **Cryoblocks**

Για ορισμένα πειράματα ανοσοϊστοχημείας προτιμήθηκε η διατήρηση του ιστού σε cryoblocks, χωρίς προηγούμενη μονιμοποίηση για να προστατευθούν ευαίσθητοι επίτοποι που καταστρέφονται (cross-linking) κατά την μονιμοποίηση με φορμαλδεΰδες. Η μήτρα ιστού-OCT κόβεται στον κρυοστάτη σε τομές 7-10  $\mu\text{m}$ , οι οποίες τοποθετούνται σε ειδικές αντικειμενοφόρους πλάκες (Superfrost).



Αφήνονται για 45min σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια φυλάσσονται στους -20°C. Πριν την εφαρμογή των αντισωμάτων αφέθηκαν να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 2 ώρες. Οι τομές μονιμοποιήθηκαν αφού εμβαπτίσθηκαν σε κρύα ακετόνη (-20°C) για 3min, στέγνωσαν σε θερμοκρασία δωματίου 5-10min και ύστερα έγιναν πλύσεις σε PBS και PBS-T (0.05% Tween-20 σε PBS) 5 και 10min, αντίστοιχα, σε θερμοκρασία δωματίου.

## Ανοσοφθορισμός

Για τον ανοσοφθορισμό χρησιμοποιήθηκαν είτε τομές παραφίνης, ύστερα από διαδικασία αποπαραφινποίησης και ενυδάτωσης, είτε OCT-τομές. Ακολούθησαν τα εξής στάδια:

### 1. Επώαση των τομών με πρωτοταγή αντισώματα

Αρχικά έγινε επώαση των τομών με διάλυμα 10% φυσιολογικού βόειου ορού (FBS) και 2% αλβουμίνης από βόειο ορό (BSA, bovine serum albumin-fraction V) σε PBS-T (blocking buffer) για 45min σε θερμοκρασία δωματίου. Η επώαση αυτή έγινε προκειμένου να δεσμευτούν οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης των πρωτοταγών αντισωμάτων πάνω στις τομές. Παράλληλα, στην ίδια σύσταση blocking buffer διαλύθηκε το πρωτοταγές αντίσωμα στην καταλληλή αραιώση και αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου. Εν συνεχεία έγινε επώαση με το διάλυμα του πρωτοταγούς αντισώματος και στους 4°C, 14-16 ώρες (overnight). Όλα τα πρωτοταγή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν αναγνωρίζουν ειδικά την αντίστοιχη πρωτεΐνη στο ποντίκι.

Ανοσοφθορισμός - πρωτοταγή					
Αντίσωμα	IgG	Εταιρία	Κλώνος	Αρ. Καταλόγου	Αραίωση
anti-MMP12	Goat	R&D Systems		AF3467	1:20-1:40
anti- $\alpha$ -SMA	mouse	Sigma-Aldrich	1A4	A5228	1:200-1:300
anti-Gal3	Goat	R&D Systems		AF1197	1:40-1:50

## 2. Επώαση των τομών με σημασμένα δευτεροταγή αντισώματα

Ακολούθησαν τρία πλυσίματα με PBS 1X-Tween 0.05% για 5min, υπό ελαφρά ανακίνηση. Οι τομές επώαστηκαν με το ανάλογο αντι-αντίσωμα (δεύτερο αντίσωμα) το οποίο είναι συνδεδεμένο με κατάλληλη φθορίζουσα ουσία διαλυμένο σε PBS 1X-Tween 0.05%. Η επώαση αυτού του σταδίου διαρκεί 1.5-2 ώρες σε RT σε σκοτάδι. Ακολούθησαν 3 πλυσίματα με διάλυμα PBS 1X-Tween 0.05% 5min RT υπό ελαφρά ανακίνηση. Έπειτα έγινε επώαση με πυρηνική χρώση DAPI, διαλυμένη σε PBS-T 1:10000, για 5min στο σκοτάδι. Ακολούθησε γρήγορο ξέπλυμα με PBS-T. Για να καλυφθούν οι τομές προστέθηκε fluo mounting (Dako S3023) και εν συνεχεία τοποθετήθηκε καλυπτρίδα.

Ανοσοφθορισμός - Δευτεροταγή			
Αντίσωμα	Εταιρία	Αρ. Καταλόγου	Αραίωση
Chicken-a-goat IgG(H+L)-Alexa 488	Molecular Probes/Invitrogen	A21467	1:750-1:1250
donkey-a-mouse IgG(H+L)-Alexa 594	Molecular Probes/Invitrogen	A21203	1:750-1:1000

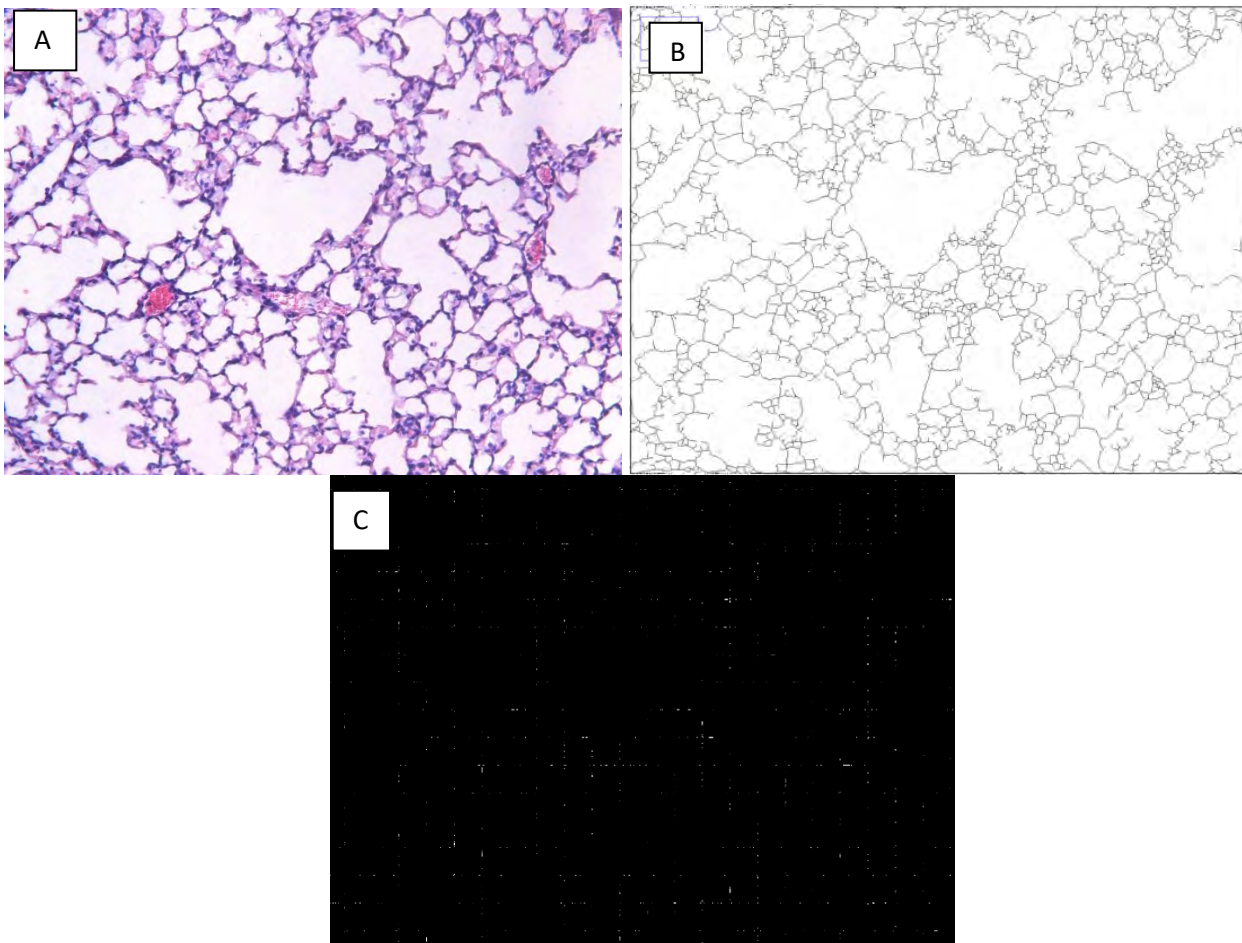
Για να αποκλειστεί η πιθανότητα η ανοσοϊστοχημική χρώση να οφείλεται σε μη ειδική δέσμευση του δεύτερου αντισώματος σε άλλες πρωτεΐνες του ιστού ή στην αλληλεπίδραση των διαφόρων αντισωμάτων μεταξύ τους (όταν πρόκειται για διπλές χρώσεις), χρησιμοποιήσαμε τη μία από τις τομές της αντικειμενοφόρου πλάκας για αρνητικό μάρτυρα. Η τομή-αρνητικός μάρτυρας υπόκειται σε ολόκληρη τη διαδικασία χρώσης εκτός από αυτή της επώασης με το/τα πρωτοταγές/ή αντισώματα.

Στη συνέχεια ακολούθησε ανάλυση συνεστιακής μικροσκοπίας, όπως στο [1] σε ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού (DM-RA2, Leica) στη Μονάδα Βιοαπεικόνισης του ΙΙΒΕΑΑ.

## **2.6 Ανάλυση της Δομής των Κυψελίδων**

Για την ανάλυση της των κυψελιδικών δομών χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα ImageJ. Από κάθε δείγμα πνεύμονα, τομές παραφίνης βαμμένες με χρώση H&E όπως περιγράφηκε παραπάνω, φωτογραφήθηκαν σε μικροσκόπιο με έγχρωμη κάμερα και φακό μεγέθυνσης 20x στο μικροσκόπιο Leica DM LS2 στη Μονάδα Βιοαπεικόνισης του ΙΙΒΕΑΑ. Για κάθε δείγμα λήφθηκαν και αναλύθηκαν 6 εικόνες που απεικόνιζαν περιοχές του πνεύμονα που είχαν μόνο δομές κυψελίδων.

Μετά την φόρτωση των εικόνων στο πρόγραμμα, για κάθε εικόνα έτρεξε το ειδικά σχεδιασμένο Macro από τον Δρ. Σταμάτη Παγκάκη, το οποίο αρχικά σχηματίζει ένα δίκτυο από τα τοιχώματα των κυψελίδων. Στην συνέχεια ένα πλέγμα (grid) εφαρμόζεται πάνω στο δίκτυο και τέλος μετράει τα σημεία επαφής (interception) του δικτύου με το πλέγμα. Με αυτόν το τρόπο βρίσκεται το ποσοστό της συνολικής επιφάνειας της εικόνας που καλύπτουν τα σημεία επαφής. Συνεπώς, το αποτέλεσμα μιας κατεστραμμένης και συνεπώς διατεταμένης κυψελιδικής δομής, όπως πχ συμβαίνει στο εμφύσημα, θα αποτυπώνεται σε μείωση των σημείων επαφής σε έναν καθορισμένο ιστολογικό χώρο. Χαρακτηριστικές εικόνες της ανάλυσης παρουσιάζονται στο Σχήμα 15.



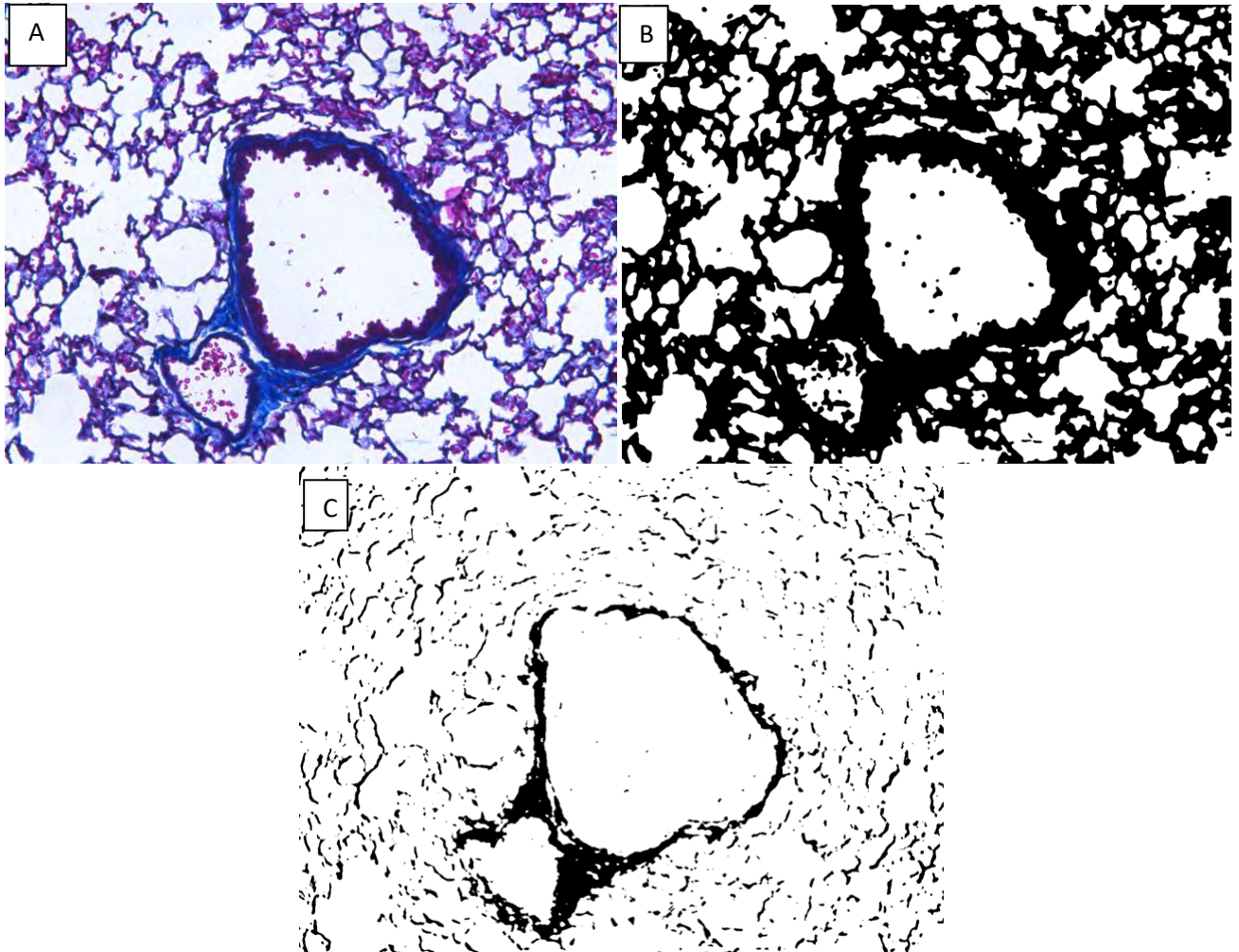
Σχήμα 15 Χαρακτηριστικές εικόνες της ανάλυσης της δομής των κυψελίδων με το πρόγραμμα ImageJ. A) Εικόνα τομής πνεύμονα βαμμένη με χρώση H&E B) Απεικόνιση του δικτύου των κυψελίδων όπως προέκυψε μετά την εφαρμογή της Macro-εντολής C) Αποτύπωση των σημείων επαφής (λευκό χρώμα) του δικτύου με το πλέγμα.

## 2.7 Ποσοτικοποίηση της Πνευμονικής Ίνωσης

Για την ποσοτικοποίηση της περιβρογχικής ίνωσης του πνεύμονα χρησιμοποιήθηκε επίσης το πρόγραμμα ImageJ. Μετά την χρώση κατά Masson πνευμονικών τομών παραφίνης, όπως περιγράφηκε παραπάνω, από κάθε δείγμα πάρθηκαν 4 φωτογραφίες από μικροσκόπιο με έγχρωμη κάμερα και φακό μεγέθυνσης 20x. Όλες οι εικόνες απεικονίζουν βρόγχους και μικρά αγγεία.

Αρχικά μετράται η συνολική επιφάνεια (σε pixels) την οποία καταλαμβάνει ο ιστός σε μια εικόνα. Η μέτρηση αυτή γίνεται μέσω μιας ειδικά σχεδιασμένης Macro-εντολής [1]. Στην συνέχεια με την χρήση του ίδιου προγραμματισμού μετράται μόνο η έκταση (σε pixels) που καταλαμβάνει το μπλε χρώμα, το οποίο αντιπροσωπεύει την ίνωση. Τέλος, χρησιμοποιείται ο λόγος  $\frac{\text{επιφάνεια κολλαγόνου}}{\text{συνολική επιφάνεια ιστού}}$  ώστε να βρεθεί το

ποσοστό της ίνωσης για κάθε εικόνα. Χαρακτηριστικές εικόνες της ανάλυσης παρουσιάζονται στο Σχήμα 16.



Σχήμα 16 Χαρακτηριστικές εικόνες της ποσοτικοποίησης της ίνωσης του πνεύμονα. Α) Εικόνα τομής πνεύμονα μεγέθυνσης 20x, βαμμένη με χρώση Masson Β) Εικόνα μετά την πρώτη ανάλυση, απεικονίζει με μαύρο την συνολική επιφάνεια που καταλαμβάνει ο ιστός C) Εικόνα μετά την δεύτερη ανάλυση, απεικονίζει την συνολική επιφάνεια που καλύπτει το μπλε χρώμα (ίνωση).



## **2.8 Απομόνωση RNA από Καρδιά, Νεφρά και Πνεύμονα Ποντικού και Ανάλυση Γονιδιακής Έκφρασης με Real Time PCR**

Για την ανάλυση γονιδιακής έκφρασης απομονώθηκε ολικό RNA από τον ιστό και αποτιμήθηκε η έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (real time PCR), όπως στο [1].

### **Απομόνωση ολικού RNA**

Στον εκάστοτε ιστό προστέθηκε 1ml TRI Reagent (Sigma) και έγινε ομογενοποίηση με ομογενοποιητή. Στη συνέχεια προστέθηκαν 200μl χλωροφορμίου και τα δείγματα αφού αναδεύθηκαν και αφέθηκαν για 2-3min σε RT, φυγοκεντρήθηκαν σε 12000xg (11500rpm) για 15min στους 4°C. Η υδατική φάση μεταφέρθηκε σε νέα σωληνάρια. Προστέθηκε 2-προπανόλη (0.5ml/ml TRI Reagent), 1μl γλυκογόνο για την υποβοήθηση της καταβύθισης και ανάκτησης του RNA και τα δείγματα ανακινήθηκαν. Τα δείγματα αφέθηκαν 10min σε RT, φυγοκεντρήθηκαν σε 12000xg (11500rpm) για 10min στους 4°C, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκε 1ml αιθανόλης 75% στο ίζημα. Ακολούθησε ανακίνηση και φυγοκέντρηση σε 7500xg (8900 rpm) για 5min στους 4°C. Αφαιρέθηκε η αιθανόλη και το ίζημα διαλυτοποιήθηκε σε 20μl νερού.

### **Κατεργασία με DNase**

Στο διαλυτοποιημένο ίζημα προστέθηκαν 5μl DNase I buffer 10x, 1μl DNase [Cat. No. 04 716 728 001 Roche Dnase I (10 U/μl)] και 24μl νερό και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 15-20min. Προστέθηκε ίσος όγκος χλωροφόρμιου, έγινε ανακίνηση και φυγοκέντρηση στα 13000 rpm για 5min στους 4°C. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέα σωληνάρια και προστέθηκε ίσος όγκος χλωροφορμίου. Έγινε φυγοκέντρηση στα 13000 rpm για 5min στους 4°C. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέα σωληνάρια. Προστέθηκε 1/10 του όγκου του υπερκειμένου 3M οξικό νάτριο pH 5.2 και διπλάσιος όγκος απόλυτης αιθανόλης. Τα δείγματα αφέθηκαν για 30min στους -20°C. Έγινε φυγοκέντρηση στα 12000xg (11500rpm) για 20min στους 4°C. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και προστέθηκαν 500μl 70% αιθανόλης. Τα δείγματα

φυγοκεντρήθηκαν στις 12000xg για 10min στους 4°C. Η αιθανόλη αφαιρέθηκε και το RNA επαναδιαλύθηκε σε 10μl ddH<sub>2</sub>O και φυλάχθηκε στους -80°C.

### Σύνθεση cDNA

Σε ένα σωληνάριο τύπου eppendorf 2μg RNA επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε 10μl H<sub>2</sub>O. Προστέθηκαν 0.09 μl random primers (Invitrogen), 0.5μl dNTP mix 10mM και 1.4μl H<sub>2</sub>O. Ακολούθησε επώαση στους 65°C για 5min. Στην συνέχεια, τα δείγματα τοποθετήθηκαν προσωρινά σε πάγο και προστέθηκε το cDNA synthesis mix (4μl 5x First Strand Buffer, 2 μl 0.1 M DTT, 1μl RNAase Inhibitor-2 U/μl τελική συγκέντρωση). Ακολούθησε επώαση στους 37°C για 2min όπου και προστέθηκε 1 μl διαλύματος αντίστροφης μεταγραφάσης από MMLV (Invitrogen, 20U/μl τελική συγκέντρωση) και συνεχίστηκε η επώαση για 50min. Τα δείγματα διατηρήθηκαν στους -20°C μέχρι την ανάλυση τους με real time PCR.

### Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο

Αρχικά προετοιμάστηκε το primer mix για κάθε ζεύγος εκκινητών. Η τελική συγκέντρωση των εκκινητών ήταν 0.5 pmol/μl. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε ειδικές μικροπλακέτες (LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, Roche). Σε κάθε θέση προστέθηκαν 8μl δείγματος cDNA (50-200 ng) αραιωμένου με H<sub>2</sub>O, 2μl primer mix και 10μl διαλύματος της πολυμεράσης (LightCycler® 480 SYBR Green I Master, Roche). Κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε δύο φορές. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου, δείγματα στα οποία αντί cDNA προστέθηκε H<sub>2</sub>O. Στη συνέχεια ενεργοποιήθηκε η έναρξη των αντιδράσεων. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 40 κύκλοι ενίσχυσης. Οι primers που στοχεύουν τα επιμέρους γονίδια έχουν τις εξής ακολουθίες:

pro-Collagen Ia	F 5'-TGTCCCAACCCCAAAGAC-3'
	R 5'-CCCTCGACTCCTACATCTTCTGA-3'
<i>Lgals3</i> (Galectin-3)	F 5'-GTGCCCTATGACCTGCCCTT-3'
	R 5'-GGCAACATCATTCCCTCTCC-3'

<i>Acta2</i> (α-SMA)	F 5'-GCACCACTCTTTCTATAACGA-3'
	R 5'-GTCTCAAACATAATCTGGGTC-3'
<i>Tgfb1</i>	F 5'-TGACGTCACTGGAGTTGTACGG-3'
	R 5'-GGTTCATGTCATGGATGGTGC-3'
<i>Emr1</i> (F4/80)	F 5'-CCTTGGCTATGGGCTTCCAGT-3
	R 5'-GCAAGGAGGACAGAGTTTATCGTG-3
<i>Tnfa</i>	F 5'-AAGTCCCAAATGGCCTCCC-3'
	R 5'-ACGACGTGGGCTACAGGCTT-3'
<i>Fn1</i> (Fibronectin)	F 5'-GAAGTCGCAAGGAAACAAGC-3'
	R 5'-GTTGTAGGTGAACGGGAGGA-3'
<i>Il6</i>	F 5'-TGAGATCTACTCGGCAAACCTAGTG-3'
	R 5'-CTTCGTAGAGAACAACATAAGTCAGATACC-3'
<i>Il1a</i>	F 5'-GCAACGGGAAGATTCTGAAG-3'
	R 5'-TGACAAACTTCTGCCTGACG-3'
<i>Prtpc</i> (CD45)	F 5'-GACAGAGTTAGTGAATGGAGAC-3'
	R 5'-AAGTTCGGAGAGTGTAGGC-3'
<i>Mmp12</i>	F 5'-CTGGCAATAATGCACATCCC-3'
	R 5'-CGCTTCATGTCCGGAGTGTA-3'
<i>Postn</i> (periostin)	F 5'-ACGGAGCTCAGGGCTGAAGATG-3'
	R 5'-GTTTGGGCCCTGATCCCGAC-3'

Η real time PCR πραγματοποιήθηκε στο μηχάνημα LightCycler 480 της Roche. Ακολούθησε κανονικοποίηση των τιμών C<sub>T</sub> εναντι του housekeeping gene (β2-μικρογλοβουλίνη) με τη μέθοδο ΔΔC<sub>T</sub> (Pfaffl 2001 , όπως και στο [1]), για τη σχετική ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

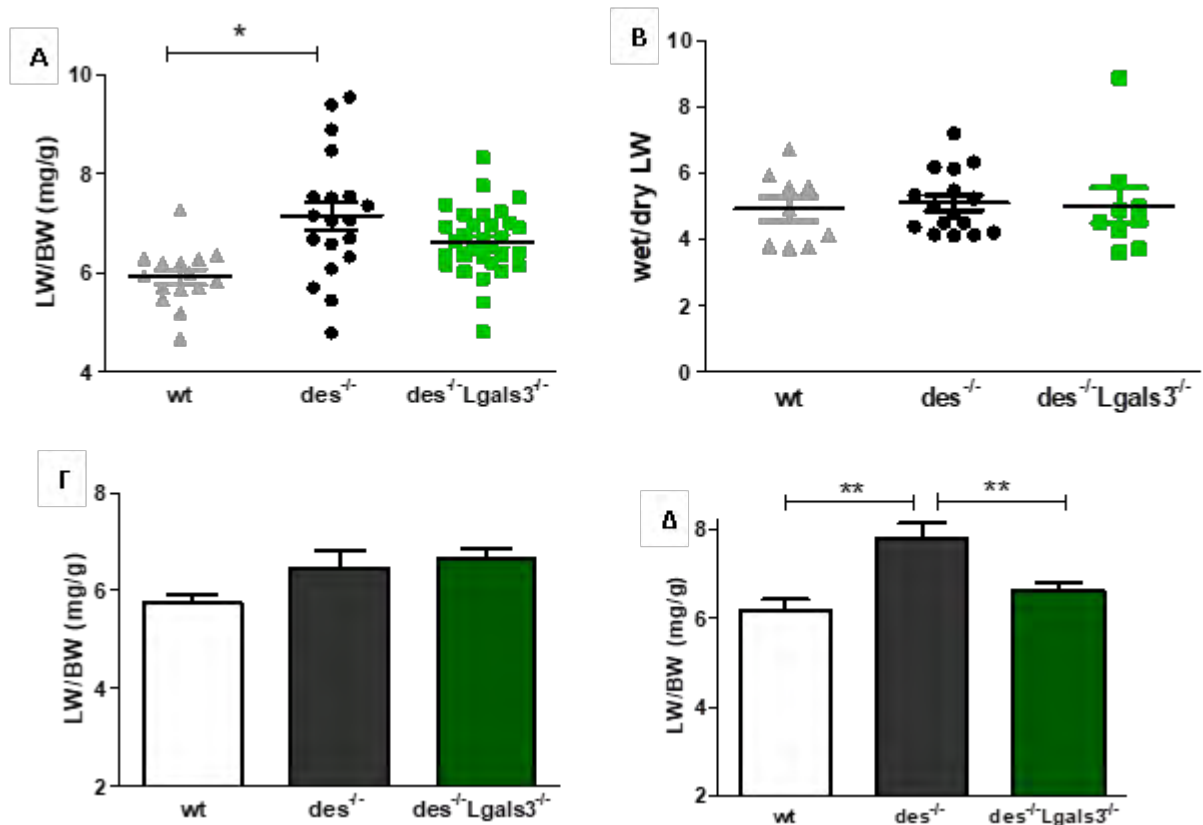
β2-microglobulin	F	5'-TTC TGG TGC TTG TCT CAC TGA-3'
	R	5'-CAG TAT GTT CGG CTT CCC ATT C-3'



**Στατιστική ανάλυση:** Τα δεδομένα παρουσιάζονται στα διαγράμματα ως μέσος όρος  $\pm$  SE. Η στατιστική ανάλυση (unpaired t-test για σύγκριση 2 μεταβλητών και one-way ANOVA για σύγκριση 3) έγινε με το λογισμικό GraphPad Prism 5. Η στατιστική σημαντικότητα σημαίνεται ως: \* $p < 0,05$ , \*\* $< 0,01$  και \*\*\* $< 0,001$

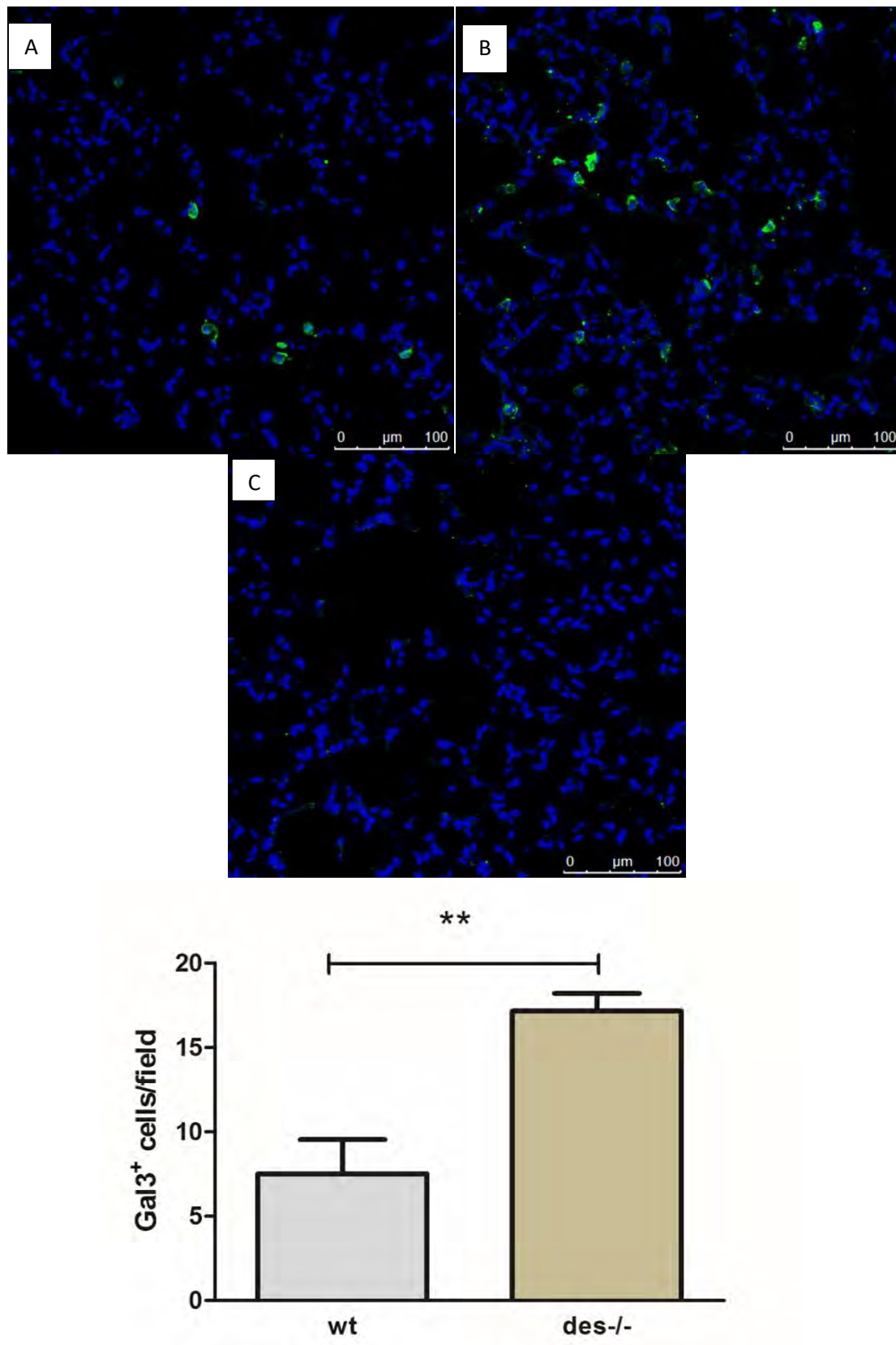
### 3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Σε προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου [127] αξιολογήθηκε η υπερτροφία του πνεύμονα σε ποντίκια 4 μηνών: οι  $des^{-/-}$  πνεύμονες εμφανίζουν αυξημένο λόγο βάρους πνεύμονα προς βάρος σώματος (LW/BW) κατά 21% σε σύγκριση με τα wt (Σχήμα 21). Επειδή δεν παρατηρούνται διαφορές στο λόγο του πλήρους βάρους του πνεύμονα προς το βάρος του επί ξηρού (Σχήμα 21B, wet/dry LW), οι μεταβολές αυτές δεν μπορούν να αποδοθούν σε κατακράτηση υγρού ή οίδημα, αλλά μάλλον σε αύξηση της ιστικής μάζας. Για να εξετασθεί τυχόν εμπλοκή της γαλεκτίνης-3 στο φαινόμενο, αξιολογήθηκε η υπερτροφία και απουσία γαλεκτίνης-3: Στους  $des^{-/-}$   $Lgals3^{-/-}$  πνεύμονες παρατηρείται μείωση σε σύγκριση με τους  $des^{-/-}$ , που είναι πιο έντονη και στατιστικά σημαντική στα θηλυκά ζώα (Σχήμα 21Δ).



Σχήμα 17 Από [127]. Εκτίμηση της υπερτροφίας του πνεύμονα σε 4 μηνών ποντίκια. Ο λόγος βάρος πνεύμονα προς βάρος σώματος -LW/BW (A) και υγρό βάρος πνεύμονα προς ξηρό βάρος πνεύμονα-wetLW/dryLW (B) σε 4 μηνών des<sup>-/-</sup> (n=19, 9 αρσενικά), des<sup>-/-</sup>Lgals3<sup>-/-</sup> (n=31, 16 αρσενικά) και wt (n=15, 9 αρσενικά), Γ σε αρσενικά και Δ σε θηλυκά, Mean ± SEM \*p<0,05 \*\*p<0,01.

Εφόσον φαίνεται να υπάρχει εμπλοκή της γαλεκτίνης-3 στην υπερτροφία των des<sup>-/-</sup> πνευμόνων, πραγματοποιήθηκαν πειράματα αποτίμησης της παρουσίας της γαλεκτίνης-3 σε πνεύμονες 4 μηνών, με ανοσοϊστοχημεία (Psarras unpublished). Τα πειράματα αυτά έδειξαν κατ' αρχάς ότι η γαλεκτίνη-3 εκφράζεται στους wt πνεύμονες από κύτταρα που μορφολογικά θα μπορούσαν να ταυτισθούν με μακροφάγα. Στους des<sup>-/-</sup> πνεύμονες παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της γαλεκτίνης-3 και των κυττάρων που την εκφράζουν (Σχήμα 18).

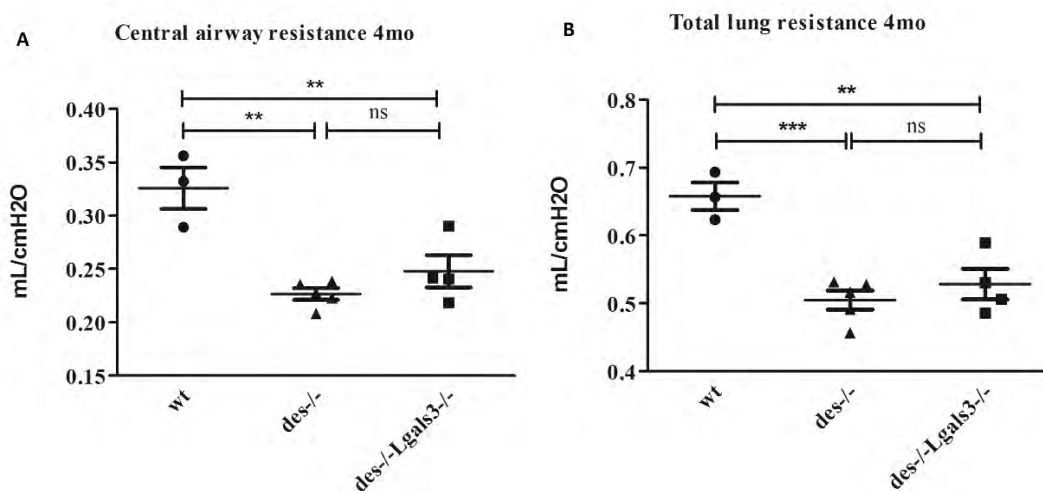


Σχήμα 18 Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός γαλεκτίνης-3 σε πνεύμονες A) wt και B) *des*<sup>-/-</sup>. C) Πνεύμονες *des*<sup>-/-</sup>*Lgals3*<sup>-/-</sup> χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικό control. Παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα γαλεκτίνης-3 στους πνεύμονες των *des*<sup>-/-</sup> ζώων σε σύγκριση με αυτούς των wt. Κάτω,

διαγραμματική απεικόνιση της μέτρησης θετικών κυττάρων για γαλεκτίνη-3 ανά μικροσκοπικό πεδίο (\*\*P<0.01) (n=6, φακός 40x).

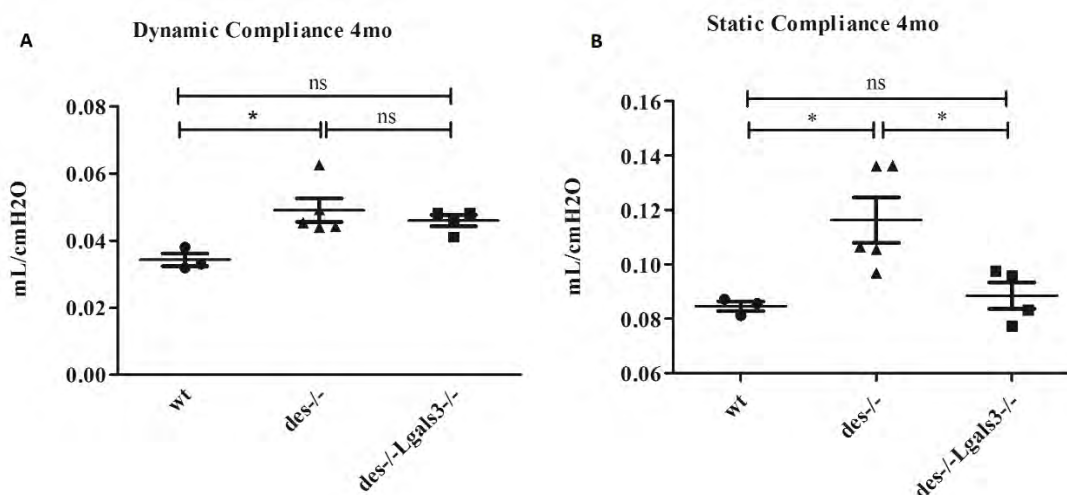
### 3.1 Μελέτη της Λειτουργίας του Πνεύμονα

Η παρατήρηση ότι ο αυξημένος λόγος LW/BW στους  $des^{-/-}$  πνεύμονες μειώνεται στους  $des^{-/-}$   $Lgals3^{-/-}$  πνεύμονες σε συνδυασμό με την ύπαρξη αυξημένων επιπέδων γαλεκτίνης-3 στους  $des^{-/-}$  πνεύμονες, οδήγησαν σε πειράματα αποτίμησης της λειτουργίας του πνεύμονα τόσο σε  $des^{-/-}$  όσο και σε  $des^{-/-}$   $Lgals3^{-/-}$  ποντίκια σε δύο ηλικιακές ομάδες: τεσσάρων και δώδεκα μηνών. Στην ηλικία των 4 μηνών στην  $des^{-/-}$  καρδιά έχουν εγκαθιδρυθεί οι εκτεταμένες ινωτικές αλλοιώσεις [1] ενώ εμφανίζεται και δυσλειτουργία [127, 106], ενώ στην ηλικία των 12 μηνών, παράλληλα με τις ινωτικές αλλοιώσεις διευρύνεται και κορυφώνεται η δυσμενής κοιλιακή διαστολική και συστολική λειτουργία [1, 106, 107]. Συγκεκριμένα, αποτιμήθηκε η αντίσταση ολικού πνεύμονα (total lung resistance), η αντίσταση κεντρικού αεραγωγού (central airway resistance), η δυναμική ελαστικότητα (dynamic compliance) και η στατική ελαστικότητα (static compliance) σε  $des^{-/-}$  όσο και σε  $des^{-/-}$   $Lgals3^{-/-}$  ποντίκια και συγκρίθηκε με wt ποντίκια ίδιας ηλικίας. Όλα τα ποντίκια που χρησιμοποιήθηκαν για τις μετρήσεις αυτές ήταν θηλυκά.



Σχήμα 19 Αντίσταση του κεντρικού αεραγωγού σε ποντίκια 4 μηνών (4mo) (A), παρατηρήθηκε μείωση στα  $des^{-/-}$  έναντι των wt (\*\*P<0.01) και στα  $des^{-/-}$   $Lgals3^{-/-}$  έναντι των wt (\*\*P<0.01). Μετρήσεις της ολικής αντίστασης του πνεύμονα σε ποντίκια ηλικίας 4 μηνών (B), με μείωση στα  $des^{-/-}$  έναντι των wt (\*\*P<0.001) και μείωση στα  $des^{-/-}$   $Lgals3^{-/-}$  έναντι των wt (\*\*P<0.01). Wt n=3,  $des^{-/-}$  n=4,  $des^{-/-}$   $Lgals3^{-/-}$  n=5.

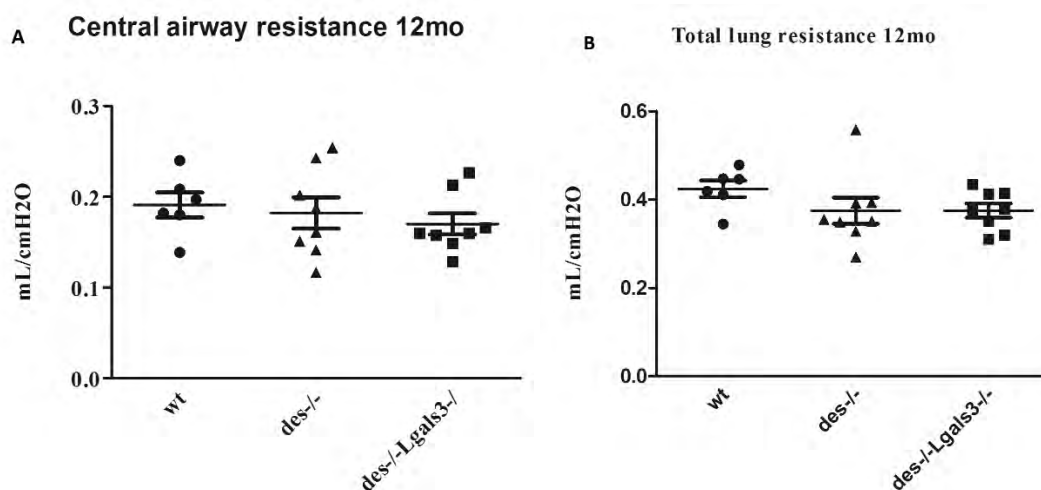
Τα αποτελέσματα της αντίστασης του κεντρικού αεραγωγού του πνεύμονα στην ηλικιακή ομάδα των τεσσάρων μηνών έδειξαν στατιστικά σημαντική μείωση στα  $des^{-/-}$  ποντίκια σε σύγκριση με τα wt κατά 0.099 mL/cmH<sub>2</sub>O (43,7%). Παρόμοια αποτελέσματα έδωσε και η ομάδα των  $des^{-/-}Lgals3^{-/-}$  με μια ελαφρά μικρότερη μείωση 0.077 mL/cmH<sub>2</sub>O (31.1%), μη στατιστικά σημαντική όμως σε σύγκριση με τα  $des^{-/-}$ . Στην ολική αντίσταση του πνεύμονα, τα  $des^{-/-}$  ζώα έδειξαν στατιστικά σημαντική μείωση κατά 0.1528 mL/cmH<sub>2</sub>O (28.1%) σε σχέση με τα wt. Τα  $des^{-/-}Lgals3^{-/-}$  έδειξαν επίσης μείωση κατά 0.1293 mL/cmH<sub>2</sub>O (25.6%), που δεν διέφερε πάντως σημαντικά από αυτή των  $des^{-/-}$  (Σχήμα 19).



Σχήμα 20 Α. Δυναμική ελαστικότητα του πνεύμονα σε ποντίκια 4 μηνών (Α). Αύξηση στα  $des^{-/-}$  σε σύγκριση με αυτή των wt (\* $P < 0.05$ ) και μη σημαντική (ns) αύξηση στα  $des^{-/-}Lgals3^{-/-}$  έναντι των wt. Β. Στατική ελαστικότητα. Αύξηση στα  $des^{-/-}$  έναντι των wt (\* $P < 0.05$ ) και μείωση στα  $des^{-/-}Lgals3^{-/-}$  έναντι των  $des^{-/-}$  (\* $P < 0.05$ ). Wt n=3,  $des^{-/-}$  n=4,  $des^{-/-}Lgals3^{-/-}$  n=5.

Όσον αφορά τη μέτρηση της δυναμικής ελαστικότητας του πνεύμονα, παρατηρήθηκε αύξηση στην ομάδα των  $des^{-/-}$  κατά 0.01477 mL/cmH<sub>2</sub>O (43.1%), στατιστικά σημαντική, σε σύγκριση με τα wt, όπως επίσης και στην ομάδα των  $des^{-/-}Lgals3^{-/-}$  κατά 0.01171 mL/cmH<sub>2</sub>O (34,1%), μη στατιστικά σημαντική όμως. Στην στατική ελαστικότητα παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των  $des^{-/-}$  κατά 0.03151 mL/cmH<sub>2</sub>O (37,2%) έναντι των wt. Στην περίπτωση αυτή η γαλεκτίνη-3

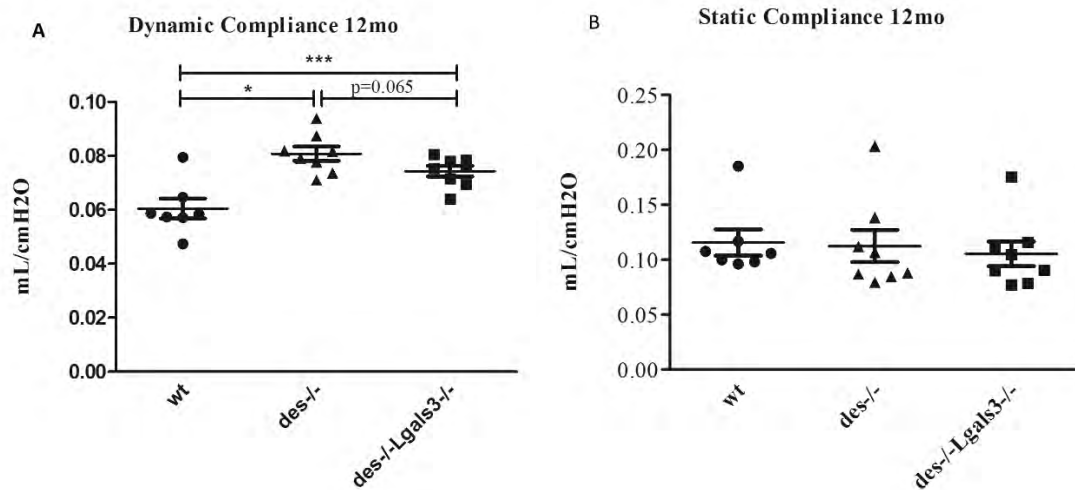
φάνηκε να παίζει σημαντικό ρόλο, αφού παρατηρήθηκε και στατιστικά σημαντική μείωση της ελαστικότητας των  $des^{-/-}Lgals3^{-/-}$  πνευμόνων κατά 0.02764 mL/cmH<sub>2</sub>O (31.3%), σε σύγκριση με τα  $des^{-/-}$ . Οι μετρήσεις μάλιστα της ελαστικότητας των  $des^{-/-}Lgals3^{-/-}$  πνευμόνων σε ποντίκια 4 μηνών προσέγγιζαν αυτές των wt (Σχήμα 20).



Σχήμα 21 A. Αντίσταση του κεντρικού αεραγωγού σε ποντίκια 12 μηνών. Δεν παρατηρήθηκε κάποια αυξομείωση σε κανέναν από τους γενότυπους. Το ίδιο ισχύει και για την ολική αντίσταση του πνεύμονα (B). Wt n=6,  $des^{-/-}$  n=8,  $des^{-/-}Lgals3^{-/-}$  n=8.

Αντίθετα με τις μετρήσεις της αντίστασης του πνεύμονα στους 4 μήνες, όπου φάνηκε μια μείωση της αντίστασης τόσο στους  $des^{-/-}$  όσο και στους  $des^{-/-}Lgals3^{-/-}$  πνεύμονες, στην ηλικιακή ομάδα των 12 μηνών δεν φάνηκε να υπάρχει κάποια διαφορά μεταξύ των τριών γενοτύπων (Σχήμα 21).

Στις μετρήσεις της ελαστικότητας του πνεύμονα στην ηλικιακή ομάδα των 12 μηνών, η δυναμική ελαστικότητα στα  $des^{-/-}$  ήταν αυξημένη κατά 0.0203 mL/cmH<sub>2</sub>O (33.6%), με στατιστική σημαντικότητα, ενώ στα  $des^{-/-}Lgals3^{-/-}$  φάνηκε μια ισχυρή τάση μείωσης σε σύγκριση με τα  $des^{-/-}$  κατά 0.0065 mL/cmH<sub>2</sub>O (8.7%), ( $P=0.065$ ). Η στατική ελαστικότητα δεν έδειξε καμία διαφορά μεταξύ των τριών γενοτύπων, σε αντίθεση με τα αποτελέσματα των 4 μηνών (Σχήμα 22).

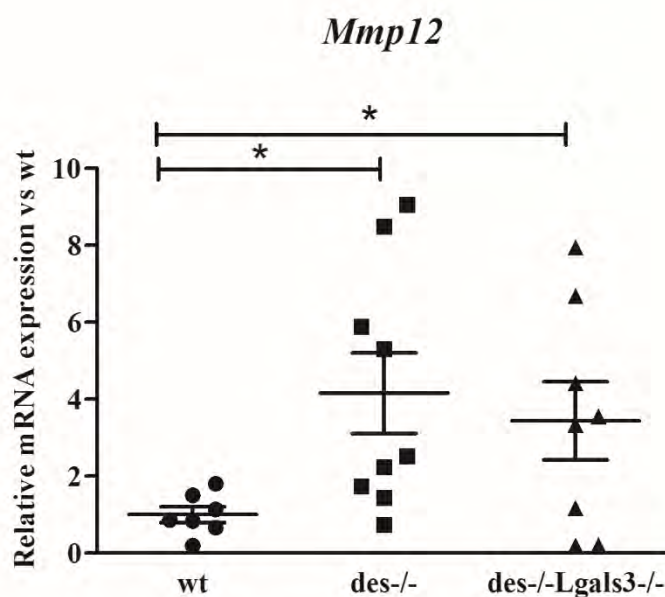


Σχήμα 22 Δυναμική ελαστικότητα του πνεύμονα σε ποντίκια 12 μηνών (A), παρατηρήθηκε αύξηση στα  $des^{-/-}$  σε σύγκριση με αυτή των wt (\* $P < 0.05$ ) και αύξηση στα  $des^{-/-}Lgals3^{-/-}$  έναντι των wt (\*\*\*) $P < 0.05$ ). Στη στατική ελαστικότητα (B) δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των τριών ομάδων. Wt n=7,  $des^{-/-}$  n=8,  $des^{-/-}Lgals3^{-/-}$  n=8.

Συνολικά, τα αποτελέσματα των μετρήσεων έδειξαν μείωση της αντίστασης του αέρα στον πνεύμονα των ποντικών  $des^{-/-}$  4 μηνών, ενώ φάνηκε αύξηση στην ελαστικότητα του. Οι αλλαγές στις μετρήσεις αυτές συνάδουν με εμφυσηματικό πνεύμονα. Επίσης παρατηρείται μια συνολική βελτίωση του φαινοτύπου στα ποντίκια  $des^{-/-}Lgals3^{-/-}$  και στις τέσσερις αυτές μετρήσεις, με εντονότερη τη σημαντική βελτίωση της στατικής ελαστικότητας. Όσον αφορά τα ποντίκια των 12 μηνών, η αντίσταση φάνηκε να επιστρέφει στις φυσιολογικές τιμές και στους 2 γενοτύπους ( $des^{-/-}$ ,  $des^{-/-}Lgals3^{-/-}$ ), ενώ η δυναμική ελαστικότητα συνέχισε να διαφέρει.

### 3.2 Μελέτες Έκφρασης σε Πνεύμονες Ηλικίας Τεσσάρων Μηνών

Εφόσον οι μετρήσεις της λειτουργίας στα ποντίκια των 4 μηνών έδειξαν έναν πιθανώς εμφυσηματικό πνεύμονα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα RT- qPCR για το γονίδιο *Mmp12*, το οποίο κωδικοποιεί την μεταλλοπρωτεάση Matrix metalloproteinase 12 (MMP12), ένζυμο που αποδομεί την εξωκυττάρια ουσία [100] και τυχόν αυξημένη του έκφραση αποτελεί δείκτη εμφυσήματος.



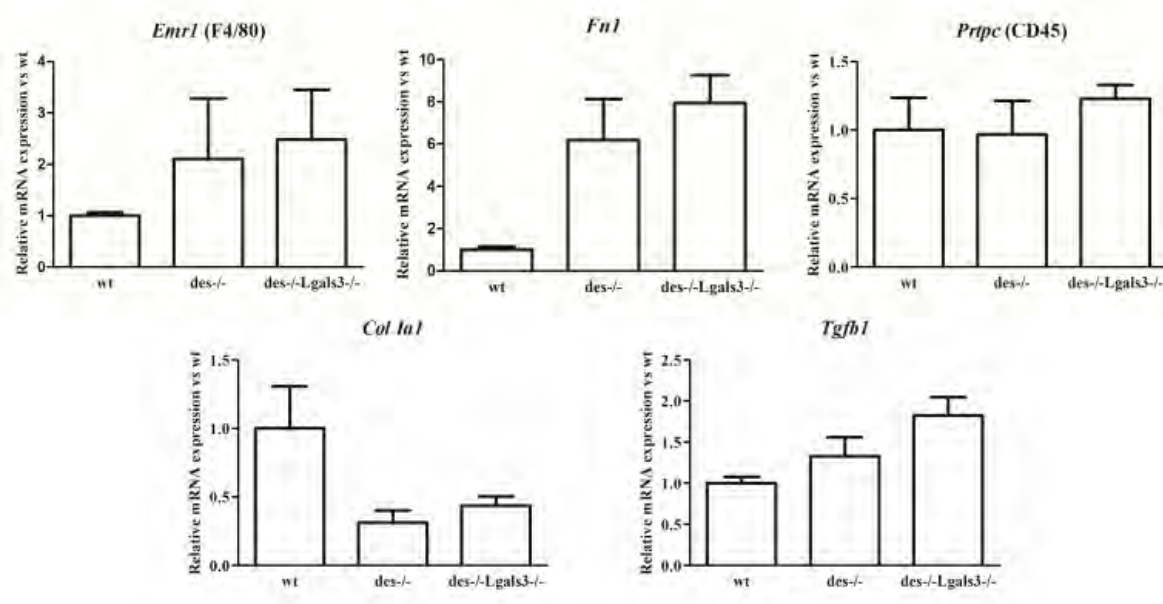
Σχήμα 23 Αποτίμηση έκφρασης για το γονίδιο της MMP12 (*Mmp12*) με RT-qPCR σε πνεύμονες 4 μηνών. Οι *des<sup>-/-</sup>* πνεύμονες εμφανίζουν στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης του σε σύγκριση με τα wt ( $4.160 \pm 1.044$ ), ενώ το ίδιο συμβαίνει και στους *des<sup>-/-</sup>Lgals3<sup>-/-</sup>* ( $3.437 \pm 1.017$ ). Αποτέλεσμα 3 ανεξάρτητων πειραμάτων, wt n=7, *des<sup>-/-</sup>* n=9 και *des<sup>-/-</sup>Lgals3<sup>-/-</sup>* n=8.

Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση >4 φορές στην έκφραση της MMP12 στους *des<sup>-/-</sup>* πνεύμονες έναντι των wt, καθώς και >3 φορές στους *des<sup>-/-</sup>Lgals3<sup>-/-</sup>* σε σύγκριση με τους wt. Παρατηρήθηκε επίσης μια μείωση της έκφρασης του *Mmp12* στα *des<sup>-/-</sup>Lgals3<sup>-/-</sup>* σε σύγκριση με τα *des<sup>-/-</sup>* ζώα, χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντική. Λόγω του ότι έχει δειχθεί ότι η έκφραση της MMP12 στον εμφυσηματικό πνεύμονα είναι κυρίως από τα μακροφάγα [96], αποτιμήθηκε η έκφραση του γονιδίου *Emr1* (F4/80), δείκτη πληθυσμών μακροφάγων [112]. Αν και παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης του τόσο στους *des<sup>-/-</sup>* και όσο τους *des<sup>-/-</sup>*



Lgals3<sup>-/-</sup> πνεύμονες, αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Σχήμα 24), υποδεικνύοντας ότι η αυξημένη έκφραση της MMP12 πιθανόν και να οφείλεται σε κάποιον άλλο κυτταρικό τύπο.

Στην συνέχεια αναλύθηκαν μόρια που σχετίζονται με την ίνωση, όπως το κολλαγόνο 1 (*Col 1a1*), η fibronectin (*Fn1*), ένα μόριο της εξωκυττάριας ουσίας που έχει βρεθεί να σχετίζεται με παθολογίες που συμπεριλαμβάνουν την ίνωση [113], και ο TGF-β1 (*Tgfb1*), ένας παράγοντας του οποίου τα επίπεδα έκφρασης είναι αυξημένα σε ινωτικές ασθένειες του πνεύμονα συμπεριλαμβανομένου του ΧΑΠ και του εμφυσήματος [114]. Η απορρυθμισμένη σηματοδότηση του TGF-β1 έχει βρεθεί να αυξάνει τα επίπεδα των MMPs κατά την ανάπτυξη του εμφυσήματος [115]. Επίσης αναλύθηκε η έκφραση του δείκτη λευκοκυττάρων CD45 (*Prtpc*), ο οποίος αντανακλά την φλεγμονή.



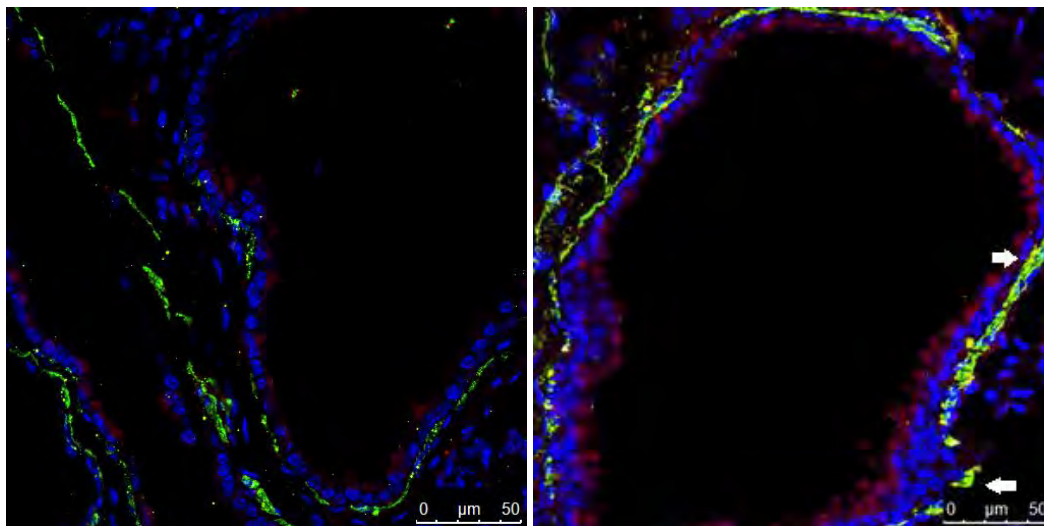
Σχήμα 24 RT- qPCR σε πνεύμονες 4 μηνών για μόρια που σχετίζονται με φλεγμονή και ίνωση. Χρησιμοποιήθηκαν n=3-4 δείγματα από κάθε γενότυπο σε ένα (*Fn1*, *Prtpc*, *Col 1a1*, *Tgfb1*) ή 2 (*Emr1*) ανεξάρτητα πειράματα.

Σε σχέση με τα φυσιολογικά ζώα (wt), παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση της fibronectin (*Fn1*) και μειωμένη του *Colla1* τόσο τους des<sup>-/-</sup>, όσο και στους des<sup>-/-</sup>

Lgals3<sup>-/-</sup> πνεύμονες, χωρίς στατιστική σημαντικότητα, ενδεχομένως λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων που αναλύθηκαν. Δεν εμφανίσθηκαν ιδιαίτερες διαφορές στην έκφραση TGF-β1 (*Tgfb1*) και CD45 (*Prtpc*) (Σχήμα 29). Τέλος, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ des<sup>-/-</sup> και des<sup>-/-</sup>Lgals3<sup>-/-</sup>.

### 3.3 Μελέτη Εντοπισμού της MMP12 στον des<sup>-/-</sup> Πνεύμονα Τεσσάρων Μηνών

Από τα προηγούμενα φάνηκε ότι η MMP12 έχει αυξημένη έκφραση στο des<sup>-/-</sup> πνεύμονα, αλλά μπορεί να σχετίζεται με άλλο κυτταρικό τύπο εκτός των μακροφάγων. Έχει αναφερθεί ότι η MMP12 συμμετέχει στην αναδόμηση του πνεύμονα στον άνθρωπο και μπορεί να εκφράζεται και από τα λεία μυϊκά κύτταρα των αεραγωγών [97]. Έτσι έγιναν πειράματα ανοσοϊστοχημείας σε πνεύμονες wt και des<sup>-/-</sup> 4 μηνών με συνεπώαση αντισωμάτων έναντι της MMP12 και της alpha-smooth muscle actin (α-SMA), η οποία εκφράζεται χαρακτηριστικά στα λεία μυϊκά κύτταρα.



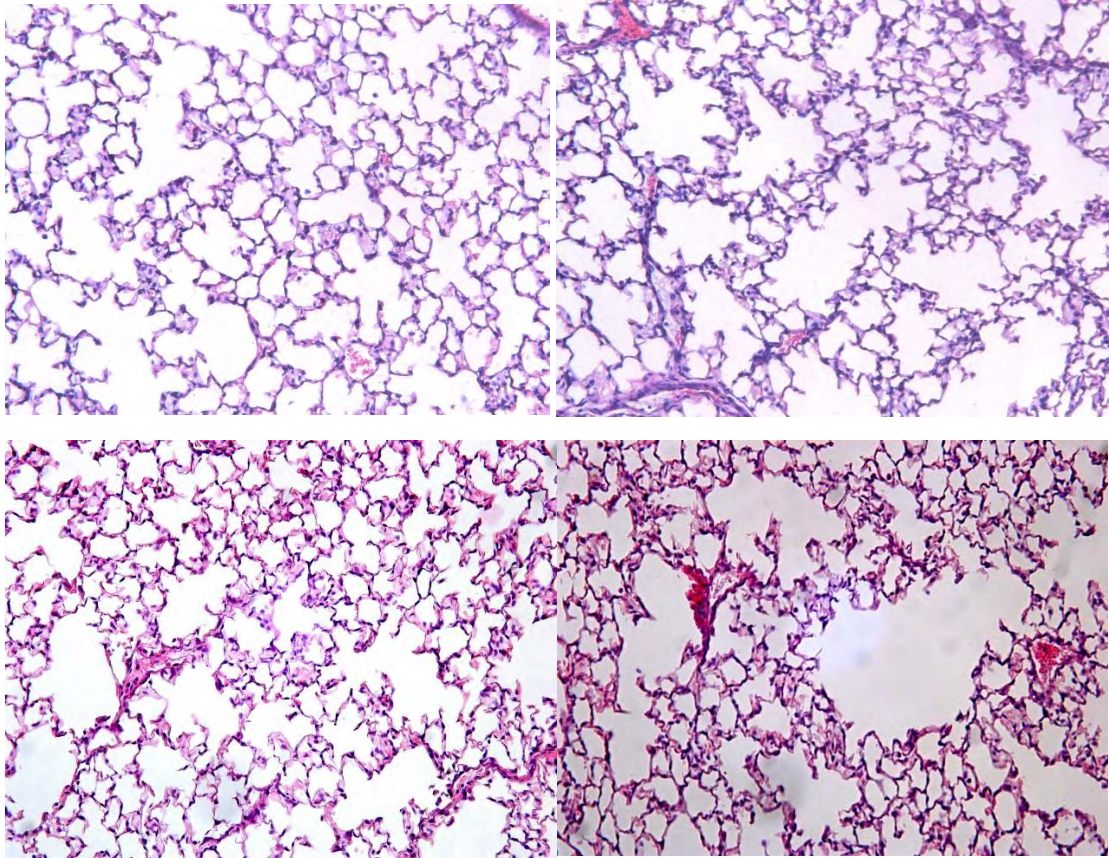
Σχήμα 25 Αριστερά εικόνα από πνεύμονα wt 4 μηνών, δεξιά εικόνα από πνεύμονα des<sup>-/-</sup> 4 μηνών. Μπλέ: πυρηνική χρώση (DAPI), πράσινο: α-SMA, κόκκινο: MMP12, συνεστιακή μικροσκοπία, φακός 63x. Μέρος των α-SMA+ κυττάρων στους des<sup>-/-</sup> πνεύμονες εκφράζει MMP12 (κίτρινο, άσπρα βέλη).

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 25, στα ποντίκια des<sup>-/-</sup> 4 μηνών παρατηρήθηκε αυξημένο σήμα για την α-SMA σε σύγκριση με τα αντίστοιχα wt, αλλά και σήμα για την

MMP12. Η σημαντική παρατήρηση είναι ο μερικός συνεντοπισμός της α-SMA με την MMP12 στους *des<sup>-/-</sup>* πνεύμονες, που υποδεικνύει ότι μέρος τουλάχιστον της αυξημένης έκφρασης της MMP12 στους *des<sup>-/-</sup>* πνεύμονες οφείλεται στην έκφραση της από λεία μυϊκά κύτταρα των αεραγωγών.

### **3.4 Ιστολογικές Μελέτες στον Πνεύμονα των *des<sup>-/-</sup>* Ποντικιών.**

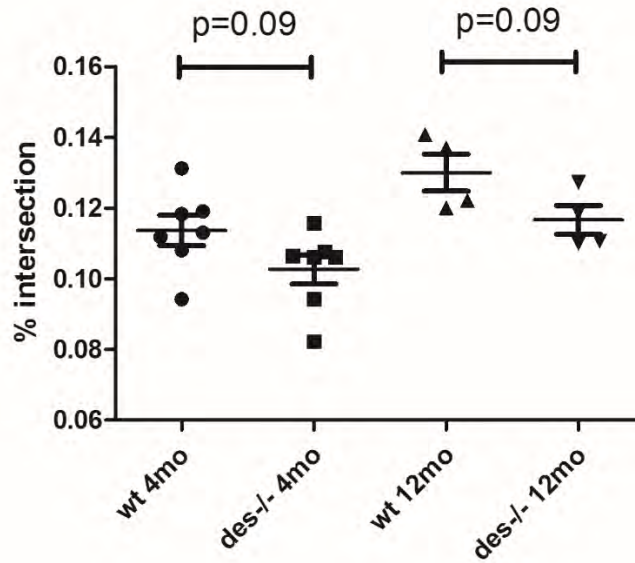
Ένα χαρακτηριστικό της παθοφυσιολογίας του εμφυσήματος είναι η καταστροφή των τοιχωμάτων των κυψελίδων με αποτέλεσμα την μη αντιστρεπτή διεύρυνση τους [98]. Αυτό προκαλεί λειτουργικά προβλήματα, όπως αυτά που φάνηκαν στις μετρήσεις της λειτουργίας του *des<sup>-/-</sup>* πνεύμονα, αλλά μπορεί να προκαλεί και πνευμονική υπέρταση λόγω της καταστροφής των τριχοειδών αγγείων που βρίσκονται στα τοιχώματα των κυψελίδων. Για να μπορέσουμε να δούμε αν η παθολογία του *des<sup>-/-</sup>* ποντικίου συμβαδίζει με το πρότυπο ενός εμφυσηματικού πνεύμονα, απομονώθηκαν πνεύμονες οι οποίοι μονιμοποιήθηκαν και σκινώθηκαν σε μπλοκ παραφίνης. Στην συνέχεια πάρθηκαν τομές 5μm σε μικροτόμο και ακολούθησε αποπαραφίνωση και χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης (H&E). Από κάθε δείγμα πάρθηκαν έξι φωτογραφίες σε μικροσκόπιο με έγχρωμη κάμερα σε μεγέθυνση 20x. Όλες οι εικόνες απεικόνιζαν περιοχές του πνεύμονα οι οποίες περιείχαν μόνο δομές κυψελίδων.



Σχήμα 26 Χαρακτηριστικές εικόνες όπου φαίνεται ή διεύρυνση των κυψελίδων στα  $des^{-/-}$  ποντίκια σε σύγκριση με τα wt. Πάνω ηλικιακή ομάδα 4 μηνών, από αριστερά προς τα δεξιά wt,  $des^{-/-}$ . Κάτω, ομάδα 12 μηνών, από αριστερά προς τα δεξιά wt,  $des^{-/-}$ . Φακός 20x.

Στις εικόνες αυτές παρατηρήθηκε χαλάρωση των δομών του πνεύμονα (διεύρυνση των κυψελιδικών χώρων) στα  $des^{-/-}$  ζώα, που συμφωνεί με τις μετρήσεις πνευμονικής λειτουργίας. Για την ποσοτικοποίηση έγινε μέτρηση της διεύρυνσης των κυψελίδων μέσω κατάλληλου λογισμικού (με βάση το πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνων ImageJ) και το αποτέλεσμα εκφράστηκε ως ποσοστό σημείων τομής ενός πλέγματος με τα τοιχώματα των κυψελίδων (Σχήμα 27). Αν και παρόμοιες δομές παρατηρήθηκαν και στους  $des^{-/-}Lgals3^{-/-}$  πνεύμονες δεν κατέστη δυνατή η ποσοτικοποίηση λόγω περιορισμένου αριθμού δειγμάτων με κατάλληλα διατηρημένες τις κυψελιδικές περιοχές.





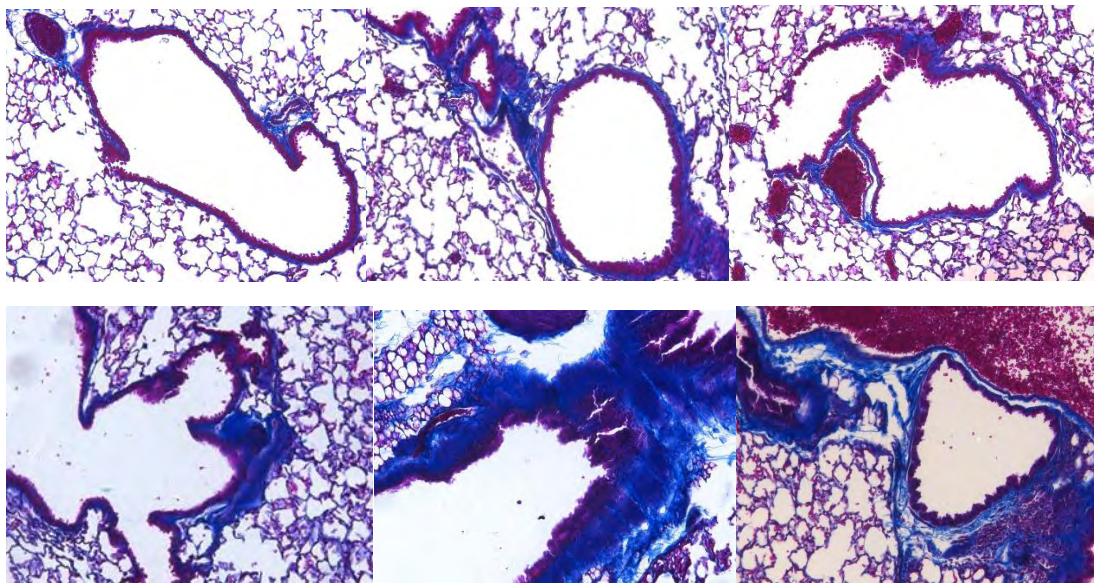
Genotype	wt	Des-/-	wt	Des-/-
Age	4 months	4 months	12 months	12 months
% interception	0.114±0.004	0.103±0.004	0.13±0.005	0.117±0.004
n	7	7	4	4

Σχημα 27 Διάγραμμα % σημείων τομής σε πνεύμονες 4 μηνών και 12 μηνών σε wt και  $des^{-/-}$  ποντίκια. Για τον μέσο όρο του κάθε δείγματος χρησιμοποιήθηκαν τα αποτελέσματα από την μέτρηση έξι εικόνων.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων αυτών έδειξαν ισχυρή τάση μείωσης ( $p=0.09$ ) στο ποσοστό των σημείων τομής στα ποντίκια  $des^{-/-}$  σε σύγκριση με τα wt, που ήταν παρόμοια και στην ηλικιακή ομάδα των τεσσάρων μηνών, αλλά και σε αυτή των δώδεκα μηνών (9.6 και 10% αντίστοιχα). Η μείωση αυτή αντιπροσωπεύει τη διεύρυνση των τοιχωμάτων των κυψελίδων στα  $des^{-/-}$  ποντίκια, ένα πιθανό και αναμενόμενο αποτέλεσμα με βάση την παθοφυσιολογία του εμφυσήματος αλλά και των αποτελεσμάτων των προηγούμενων πειραμάτων.

### 3.5 Μελέτη της Ίνωσης σε Πνεύμονες $des^{-/-}$ και $des^{-/-} Lgals3^{-/-}$ Ποντικών

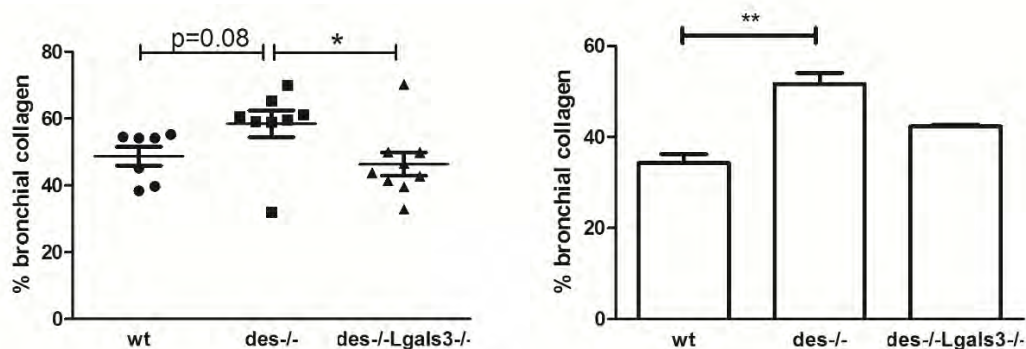
Στην συνέχεια έγινε χρώση κατά Masson σε τομές πνεύμονα ώστε να γίνει μελέτη της ίνωσης, που μας ενδιέφερε επειδή α) αποτελεί επίσης χαρακτηριστικό των πνευμόνων στο εμφύσημα και τη ΧΑΠ και β) η γαλεκτίνη-3 φαίνεται να συμμετέχει στην ιστική ίνωση εκτός από την καρδιά [127] και στον πνεύμονα αλλά και στα νεφρά [99]. Από κάθε δείγμα πάρθηκαν 4 φωτογραφίες που απεικόνιζαν την ίνωση γύρω από μικρούς βρόγχους και αγγεία. Παρατηρήθηκε αυξημένη εναπόθεση κολλαγόνου στους  $des^{-/-}$  πνεύμονες σε σχέση με τους wt. Επιπλέον, η ίνωση φάνηκε να μειώνεται στους πνεύμονες  $des^{-/-}Lgals3^{-/-}$  (Σχήμα 28).



Σχήμα 28 Χαρακτηριστικά παραδείγματα απεικόνισης της ίνωσης με χρώση κατά Masson και στις δύο ηλικιακές ομάδες 4 και 12 μηνών. Πρώτη σειρά 4 μήνες, από αριστερά προς τα δεξιά wt,  $des^{-/-}$ ,  $des^{-/-}Lgals3^{-/-}$ . Δεύτερη σειρά 12 μήνες, από αριστερά προς τα δεξιά wt,  $des^{-/-}$ ,  $des^{-/-}Lgals3^{-/-}$ . Φακός 20x.

Για την ποσοτικοποίηση αυτών των παρατηρήσεων, οι εικόνες αυτές στην συνέχεια επεξεργάστηκαν μέσω ενός λογισμικού με βάση το πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνων ImageJ [1] μέσω του οποίου απομονώνεται μόνο το μπλε χρώμα, που απεικονίζει το κολλαγόνο. Έτσι έχοντας μετρήσει την επιφάνεια της εικόνας που καλύπτει το σύνολο του ιστού και την επιφάνεια που καλύπτει το κολλαγόνο

χρησιμοποιούμε τον λόγο  $\frac{\text{επιφάνεια κολλαγόνου}}{\text{συνολική επιφάνεια ιστού}} \times 100\%$  ώστε να βρούμε το ποσοστό της ίνωσης σε κάθε δείγμα. Για την ηλικιακή ομάδα των 4 μηνών χρησιμοποιήθηκαν συνολικά n=24 δείγματα, ενώ για των 12 μηνών n=10 δείγματα.

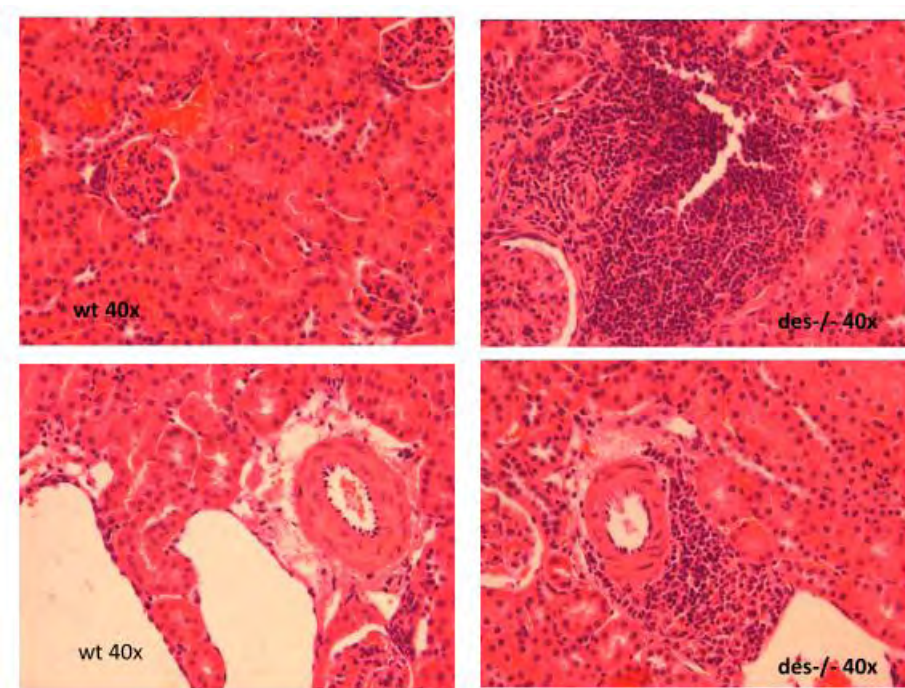


Σχήμα 29 Αριστερά, διάγραμμα % βρογχικού κολλαγόνου σε ποντίκια 4 μηνών wt n=7, des<sup>-/-</sup> n=8 και des<sup>-/-</sup>Lgals3<sup>-/-</sup> n=9. Δεξιά, διάγραμμα % βρογχικού κολλαγόνου σε ποντίκια 12 μηνών wt n=4, des<sup>-/-</sup> n=4 και des<sup>-/-</sup>Lgals3<sup>-/-</sup> n=2.

Οι μετρήσεις αυτές έδειξαν ισχυρή τάση αύξησης (p=0.08) του ποσοστού του βρογχικού κολλαγόνου κατά περίπου 10% στα des<sup>-/-</sup> σε σύγκριση με τα wt ζώα, υποδεικνύοντας ενεργή περιβρογχιακή ίνωση στον des<sup>-/-</sup> πνεύμονα. Επιπλέον, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση περίπου 12% στα des<sup>-/-</sup>Lgals3<sup>-/-</sup> σε σύγκριση με τα des<sup>-/-</sup>, στην ηλικιακή ομάδα των 4 μηνών (Σχήμα 29). Στην ομάδα των 12 μηνών είχαμε παρόμοια αποτελέσματα, με διεύρυνση της ίνωσης στα des<sup>-/-</sup> (στατιστικά σημαντική αύξηση περίπου 15% σε σχέση με το wt) και επίσης μείωση στα des<sup>-/-</sup>Lgals3<sup>-/-</sup> έναντι των des<sup>-/-</sup> περίπου κατά 8%, που δεν ήταν όμως στατιστικά σημαντική, στο μικρό αριθμό δειγμάτων που εξετάστηκαν. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν μια αυξημένη εναπόθεση κολλαγόνου στον πνεύμονα των des<sup>-/-</sup> ποντικών που διευρύνεται με την πρόοδο της ηλικίας και της νόσου. Επίσης η μείωση της εναπόθεσης στα des<sup>-/-</sup>Lgals3<sup>-/-</sup> ποντίκια υποδεικνύει μια πιθανή εμπλοκή της γαλεκτίνης-3 στην ίνωση του πνεύμονα στο μοντέλο des<sup>-/-</sup>.

### 3.6 Ιστολογικές Μελέτες των Νεφρών

Σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου είχαν πραγματοποιηθεί χρώσεις H&E σε νεφρά ποντικών 2-12 μηνών, στις οποίες είχε παρατηρηθεί μια διείσδυση κυττάρων σε ορισμένα σημεία του νεφρού στα  $des^{-/-}$  ζώα (Σχήμα 30). Η ύπαρξη φλεγμονώδους διήθησης εκτιμήθηκε ότι εμφανίζεται σε ποντίκια 8-10 μηνών, παρατηρείται κυρίως στην μυελική πυραμίδα, αυξάνεται με την πρόοδο της ηλικίας και της παθολογίας της καρδιάς του  $des^{-/-}$  και αφορά υψηλό ποσοστό των ζώων ( $\geq 55\%$  σε ζώα ηλικίας 9-12 μηνών και  $\geq 67\%$  σε ζώα ηλικίας 11-12 μηνών, Psarras unpublished).

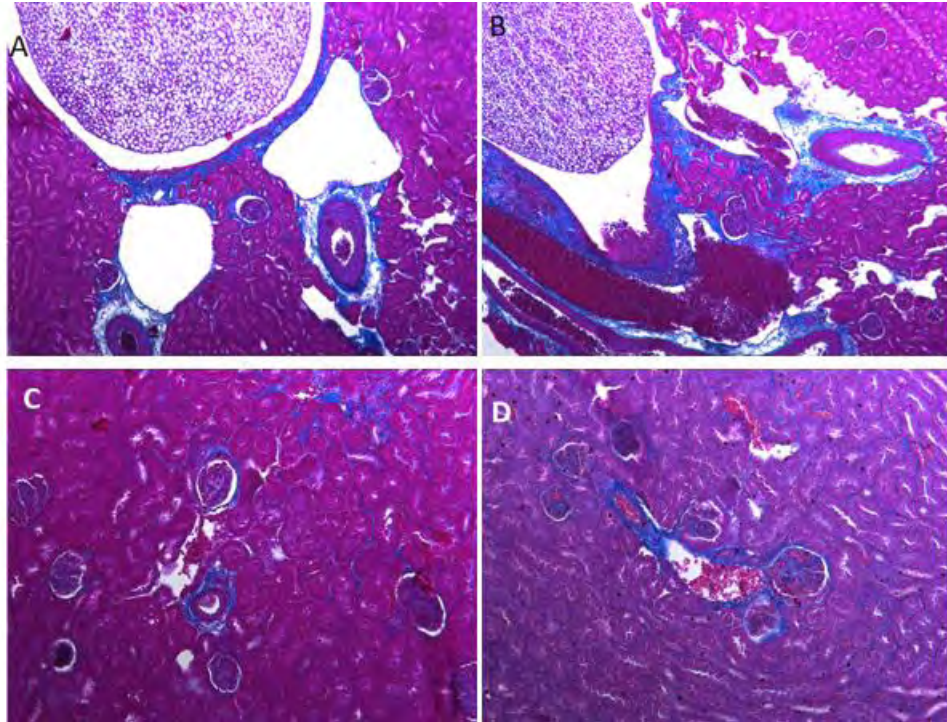


Σχήμα 30 Χρώση H&E σε τομές παραφίνης νεφρών. Δεξιά τομές  $des^{-/-}$  ποντικών με φακό μεγέθυνσης 40x όπου διακρίνεται η διείσδυση των κυττάρων στον ιστό. Αριστερά τομές wt ποντικών.

Έτσι, εφόσον παρατηρήθηκε αυτή η διείσδυση των κυττάρων, τέθηκε αρχικά το ερώτημα αν υπάρχουν και στα νεφρά αυξημένα επίπεδα συνοδού ή επακόλουθης ίνωσης. Για τον έλεγχο της υπόθεσης αυτής πραγματοποιήθηκε χρώση κατά Masson σε τομές παραφίνης νεφρών 12 μηνών, όπου φάνηκαν αυξημένη εναπόθεση



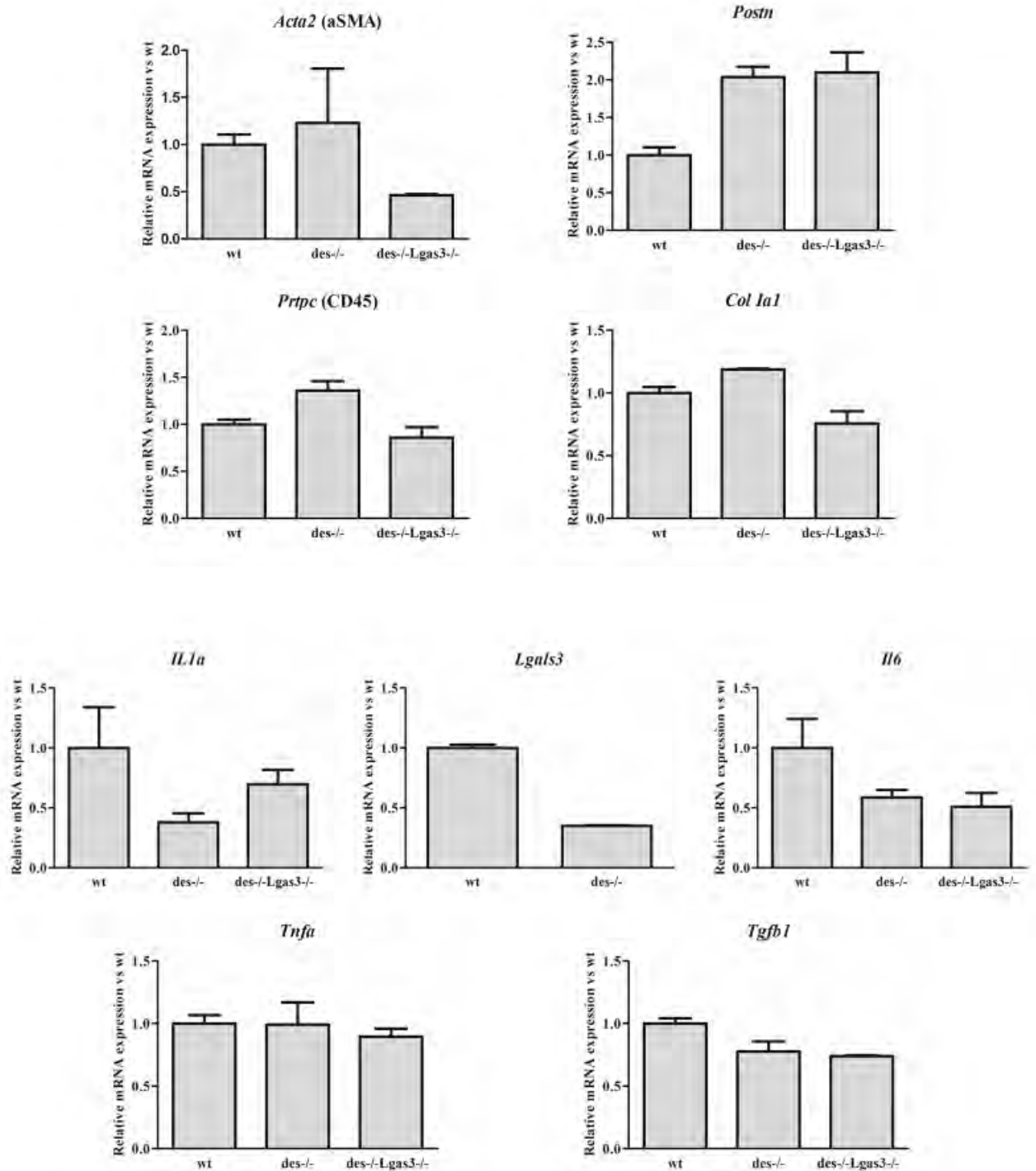
κολλαγόνου γύρω από μικρά αγγεία και στο εσωτερικό μέρος του μυελού των νεφρών (Σχήμα 31).



Σχήμα 31 Χρώση Masson's σε τομές παραφίνης νεφρών 12 μηνών. A) wt ποντίκι με φακό μεγέθυνσης 10x, B)  $des^{-/-}$  ποντίκι με φακό μεγέθυνσης 10x, C) wt ποντίκι με φακό μεγέθυνσης 20x, D)  $des^{-/-}$  ποντίκι με φακό μεγέθυνσης 20x.

### 3.7 Μελέτες Έκφρασης σε Νεφρά Ηλικίας Δέκα Μηνών

Εφόσον στις ιστολογικές παρατηρήσεις φάνηκε να υπάρχει διείσδυση κυττάρων και αυξημένη ίνωση στα νεφρά των  $des^{-/-}$  ποντικίων, πραγματοποιήθηκαν πειράματα RT-qPCR σε νεφρά ζώων 10 μηνών για σειρά μορίων που σχετίζονται με την φλεγμονή και την ίνωση. Με δεδομένη την γνωστή εμπλοκή της γαλεκτίνης-3 σε ζωικά μοντέλα νεφρικής ίνωσης (βλ. εισαγωγή), στις μελέτες αυτές συμπεριελήφθησαν και ποντίκια  $des^{-/-}Lgals3^{-/-}$ .



Σχήμα 32 RT-qPCR σε νεφρά ποντικών 10 μηνών. Για την ανάλυση έγιναν δύο ανεξάρτητα πειράματα με συνολικά n=6 δείγματα για τις ομάδες wt και des<sup>-/-</sup> και n=3 για την ομάδα των des<sup>-/-</sup>Lgals3<sup>-/-</sup>.

Στην ανάλυση αυτή την εντονότερη αύξηση της έκφρασης ως προς wt νεφρούς (περίπου 2 φορές) εμφάνισε το γονίδιο *Postn* που κωδικοποιεί την Periostin και

φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία και ίνωση των νεφρών (βλ. εισαγωγή). Η απουσία της γαλεκτίνης-3 πάντως δεν επηρέασε την έκφραση του γονιδίου που παρέμεινε αυξημένο στα  $des^{-/-}Lgals3^{-/-}$  νεφρά ( $des^{-/-}$   $2.03 \pm 0.14$ ,  $des^{-/-}Lgals3^{-/-}$   $2.10 \pm 0.27$ ). Επίσης υπήρξαν μικρές αυξήσεις στην έκφραση CD45 (*Prtpc*) και στο Κολλαγόνο I (*Col 1a*), που θα μπορούσαν να αντανakλούν την παρουσία φλεγμονής και ίνωσης στους  $des^{-/-}$  νεφρούς, οι οποίες επιπλέον μειώθηκαν στους  $des^{-/-}Lgals3^{-/-}$  προσεγγίζοντας τα επίπεδα έκφρασης των υγιών wt νεφρών (Σχήμα 32). Αντίθετα, παρά την παρουσία φλεγμονωδών διηθήσεων στους  $des^{-/-}$  νεφρούς, παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων έκφρασης σημαντικών φλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως της ιντερλευκίνης-1α (*Il1a*), και της ιντερλευκίνης-6 (*Il6*), τόσο στα  $des^{-/-}$  όσο και στα  $des^{-/-}Lgals3^{-/-}$ , ενώ δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην έκφραση του TNF-α. Παρόμοια, παρά την παρουσία ίνωσης δεν βρέθηκαν αξιόλογες μεταβολές στην έκφραση TGFβ και αSMA, ενώ μειώθηκε η έκφραση γαλεκτίνης-3 (*Lgals3*). Επιπλέον, δεν εμφανίσθηκαν αξιόλογες διαφοροποιήσεις στους  $des^{-/-}Lgals3^{-/-}$  νεφρούς, με την εξαίρεση της μείωσης έκφρασης του αSMA (*Acta2*), σε επίπεδα μάλιστα κατώτερα και αυτών του wt (Σχήμα 32).

#### 4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η καρδιακή ανεπάρκεια είναι ένα σημαντικό πρόβλημα για τη δημόσια υγεία, με σημαντικό βάρος για τους ασθενείς, την υγειονομική περίθαλψη και την κοινωνία. Στις ανεπτυγμένες χώρες, περίπου το 2% των ενηλίκων έχουν καρδιακή ανεπάρκεια και σε όσους είναι άνω των 65 ετών, το ποσοστό αυξάνει σε 6-10% [9]. Έχει δειχθεί ότι σε ποντίκια που πάσχουν από καρδιακή ανεπάρκεια μπορεί να προκαλείται πνευμονική υπέρταση και εκτεταμένη ίνωση του πνεύμονα [12]. Επίσης η μειωμένη νεφρική λειτουργία έχει βρεθεί να είναι ένας ανεξάρτητος παράγοντας σε ασθενείς με χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια. Αποτελεί έναν παράγοντα που αυξάνει το ρίσκο νοσηρότητας και θνησιμότητας με ασθενείς με συστολική αλλά και διαστολική δυσλειτουργία [76]. Κατά την τελευταία δεκαετία, η επιστήμη έχει προωθήσει σημαντικά την κατανόηση των μηχανισμών αλληλεπίδρασης μεταξύ της καρδιάς, του πνεύμονα και των νεφρών. Υπάρχει ανάγκη για την μελέτη της επικοινωνίας των τριών αυτών οργάνων διότι είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της ομοιόστασης

του σώματος και συμμετέχει στην παθοφυσιολογία [10]. Πιο συγκεκριμένα στην καρδιακή ανεπάρκεια, η αποκάλυψη των μηχανισμών δυσμενούς παρεμβολής του κάθε οργάνου στη λειτουργία του άλλου και η αποκάλυψη μορίων που μπορεί να ρυθμίζουν αυτή την επικοινωνία είναι προφανώς πολύ σημαντική. Έτσι, τα προβλήματα των πνευμόνων και των νεφρών που αποκαλύφθηκαν στην παρούσα εργασία στο μοντέλο *desmin-null* και η ενδεχόμενη εμπλοκή της γαλεκτίνης-3 μπορεί να βοηθήσουν σημαντικά στην κατανόηση των αντίστοιχων συννοσηροτήτων της καρδιακής ανεπάρκειας.

#### 4.1 Η Έλλειψη της Δεσμίνης Προκαλεί Πρόβλημα στη Λειτουργία του Πνεύμονα που Φαίνεται να Βελτιώνεται Απουσία της Γαλεκτίνης-3

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων λειτουργίας του πνεύμονα (Σχήματα 19, 20) έδειξαν ότι υπάρχει μείωση της αντίστασης του αέρα στον πνεύμονα των ποντικών *des<sup>-/-</sup>* 4 μηνών σε σύγκριση με τα ποντίκια αγρίου τύπου (*wt*) και αύξηση της ελαστικότητας του. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και σε μια παλαιότερη μελέτη αποτίμησης της λειτουργίας του *des<sup>-/-</sup>* πνεύμονα, που όμως επικεντρώθηκε στην υπερτροφία και υπεραντιδραστικότητα των λείων μυϊκών κυττάρων του πνεύμονα, χωρίς όμως ιστολογικά ευρήματα ή χαρακτηρισμό [133]. Η μείωση της αντίστασης του αέρα και η παράλληλη αύξηση στην ελαστικότητα του υποδεικνύουν έναν πιθανό εμφυσηματικό φαινότυπο του πνεύμονα [101]. Επίσης παρατηρείται τουλάχιστον τάση βελτίωσης του φαινοτύπου στα ποντίκια *des<sup>-/-</sup>* *Lgals3<sup>-/-</sup>* και στις τέσσερις παραμέτρους που μετρήθηκαν, που γίνεται στατιστικά σημαντική στη στατική ελαστικότητα, κάτι το οποίο μας υποδεικνύει μια πιθανή εμπλοκή της γαλεκτίνης-3 στην παθολογία του πνεύμονα στο μοντέλο *desmin-null*. Στις ίδιες μετρήσεις που έγιναν στην ηλικιακή ομάδα των 12 μηνών, η δυναμική ελαστικότητα συνέχισε να είναι αυξημένη στα *des<sup>-/-</sup>* ποντίκια σε σύγκριση με τα *wt* και μειωμένη στα *des<sup>-/-</sup>* *Lgals3<sup>-/-</sup>* σε σύγκριση με τα *des<sup>-/-</sup>* (Σχήμα 22). Συγκριτικά με τους 4 μήνες, η διαφορά της δυναμικής ελαστικότητας μεταξύ των *wt* και *des<sup>-/-</sup>* στους 12 μήνες φάνηκε να μειώνεται κατά 9,48%, άρα ο φαινότυπος φαίνεται να συγκρατείται στους 12 μήνες. Η αντίσταση από την άλλη, φάνηκε να επιστρέφει στα

φυσιολογικά επίπεδα τόσο στα  $des^{-/-}$  αλλά όσο και στα  $des^{-/-}Lgals3^{-/-}$  ποντίκια 12 μηνών (Σχήμα 21), παρά την προοδευτική χειροτέρευση της καρδιακής λειτουργίας του  $desmin$ -null μοντέλου.

Μετά την ιστολογική ανάλυση της δομής των κυψελίδων στους πνεύμονες ηλικίας τεσσάρων και δώδεκα μηνών στα  $des^{-/-}$  ποντίκια, βρέθηκε μια ισχυρή τάση μείωσης του ποσοστού των σημείων επαφής με το πλέγμα του προγράμματος Imajel και στις δύο ηλικιακές ομάδες, σε σύγκριση με τα  $wt$  ποντίκια. Αυτό ερμηνεύεται ως εκτεταμένη χαλάρωση και καταστροφή των κυψελιδικών δομών και διεύρυνση του κυψελιδικού χώρου και συνάδει με το αποτέλεσμα της μέτρησης της λειτουργίας των πνευμόνων, δηλαδή τον εμφυσηματικό φαινότυπο του πνεύμονα, μιας και η διεύρυνση και το σπάσιμο των κυψελίδων είναι κύριο χαρακτηριστικό της ασθένειας. Η παρατήρηση αυτή όμως δεν φαίνεται να διευρύνεται όσο μεγαλώνει το ζώο μιας και οι διαφορές μεταξύ των  $wt$  και  $des^{-/-}$  δεν αυξάνονται (Σχήμα 27). Αυτό το τελευταίο θα μπορούσε να σημαίνει ότι το πρόβλημα στον πνεύμονα δεν επηρεάζεται από τη χειροτέρευση της καρδιακής λειτουργίας που παρατηρείται προοδευτικά στο  $des^{-/-}$  μυοκάρδιο, αλλά αποτελεί ένα πρόβλημα αυτής καθ'εαυτής της έλλειψης της δεσμίνης στον πνεύμονα, το οποίο σταδιακά εξισορροπείται από εσωτερικούς μηχανισμούς του οργάνου. Από την άλλη μεριά, άλλοι μηχανισμοί αποκατάστασης ή παράλληλες παθολογίες που επηρεάζονται από τη πρόοδο της καρδιακής ανεπάρκειας θα μπορούσαν να οδηγούν σε διαφοροποιημένο φαινότυπο της παθολογίας του πνεύμονα. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η επαγωγή της ίνωσης.

Πράγματι, τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης της ίνωσης στον  $des^{-/-}$  πνεύμονα συνάδουν με τις προηγούμενες παρατηρήσεις ότι σε μοντέλα καρδιακής ανεπάρκειας μπορεί να αναπτύσσεται ίνωση και στον πνεύμονα [12]. Στα πειράματα αυτά παρατηρήσαμε αύξηση του κολλαγόνου, γύρω από τους βρόγχους και μικρά αγγεία του πνεύμονα, κατά περίπου 10% στα  $des^{-/-}$  σε σύγκριση με τα  $wt$ , ενώ φαίνεται να υπάρχει στατιστικά σημαντική μείωση περίπου 12% στα  $des^{-/-}Lgals3^{-/-}$  σε σύγκριση με τα  $des^{-/-}$ , στην ηλικιακή ομάδα των 4 μηνών. Η ομάδα των 12 μηνών παρουσίασε παρόμοια αποτελέσματα με στατιστικά σημαντική αύξηση στα  $des^{-/-}$  σε σύγκριση με τα  $wt$  περίπου 15% και μείωση στα  $des^{-/-}Lgals3^{-/-}$  σε

σύγκριση με τα  $des^{-/-}$  περίπου 8% (Σχήμα 29). Η αυξημένη εναπόθεση κολλαγόνου και η διεύρυνσή της με την πρόοδο της ηλικίας και της νόσου μπορεί να δικαιολογεί την επαναφορά της μέτρησης της αντίστασης του πνεύμονα στα φυσιολογικά επίπεδα στους 12 μήνες, καθώς η αυξημένη ίνωση αυξάνει την αντίσταση του πνεύμονα. Σε κάθε περίπτωση πάντως, αυτή η μεταβολή δεν σημαίνει επιστροφή του πνεύμονα στην ομοιόσταση, αφού η ίνωση αποτελεί αυταπόδεικτο πρόβλημα στον πνεύμονα, αλλά διαφοροποίηση του εμφυσηματικού φαινοτύπου και των αντίστοιχων μετρήσεων.

Οι συνολικές παρατηρήσεις, εκτός από την διαπίστωση παθολογίας του πνεύμονα στο *desmin*-null μοντέλο, μας υποδεικνύουν ότι η γαλεκτίνη-3 μπορεί να ρυθμίζει τον φαινότυπο της λειτουργίας και της ίνωσης στον *desmin*-null πνεύμονα. Τέλος, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συνάδουν και με την ύπαρξη υπερτροφίας του πνεύμονα στο 4 μηνών  $des^{-/-}$  ποντίκι, καθώς και με τη βελτίωση της απουσία γαλεκτίνης-3.

Η επέκταση των μετρήσεων σε αρσενικά ζώα, η αποτίμηση της διεύρυνσης των κυψελίδων σε  $des^{-/-}Lgals3^{-/-}$  πνεύμονες και η συσχέτιση της πνευμονικής λειτουργίας με την ίνωση και την καρδιακή λειτουργία σε κάθε ζώο θα αποτελούσαν κρίσιμα πειράματα για τη συνέχεια.

#### 4.2 Πιθανή Εμπλοκή της Matrix Metalloproteinase-12 (MMP12) στην Παθολογία του Πνεύμονα του *desmin* null Μοντέλου

Υπάρχουν αναφορές που δείχνουν αυξημένη λειτουργία των μεταλλοπρωτεασών στο εμφύσημα, με την MMP12 να έχει πρωταρχικό ρόλο [67]. Η έκφραση του ενζύμου αυτού δεν είναι αποτέλεσμα μόνο της ενεργοποίησης των μακροφάγων, αλλά έχει φανεί να εκφράζεται και από κύτταρα του ίδιου του πνεύμονα όπως τα λεία μυϊκά κύτταρα [97].

Στο μοντέλο *desmin*-null, μετά την πραγματοποίηση ανάλυσης real time PCR στον πνεύμονα ποντικών 4 μηνών, βρέθηκε αύξηση της έκφρασης του γονιδίου *Mmp12* (4 φορές) χωρίς όμως οι ενδείξεις αυξημένων επιπέδων μακροφάγων να είναι



στατιστικά σημαντικές (βλ. *Emr1* (F4/80) Σχήματα 23 και 24). Αυτό το αποτέλεσμα μας προτείνει ότι η αυξημένη έκφραση της MMP12 στον πνεύμονα του *desmin-null* πιθανώς να προέρχεται από άλλα κύτταρα του πνεύμονα. Με χρήση ανοσοϊστοχημείας δείξαμε ότι υπάρχει συνεντόπιση της MMP12 με λεία μυϊκά κύτταρα στους *des<sup>-/-</sup>* πνεύμονες 4 μηνών. Αυτό συνάδει με παθολογική ενεργοποίηση αυτών των κυττάρων, που πράγματι εμφανίζουν υπερτροφία ρυθμιζόμενη από το microRNA miR26a στον *des<sup>-/-</sup>* πνεύμονα [134].

Τα αποτελέσματα αυτά μαζί (η αύξηση της έκφρασης της MMP12 με την παράλληλη μη σημαντική αύξηση του αριθμού των μακροφάγων και ο συνεντοπισμός της MMP12 με τα λεία μυϊκά κύτταρα) δηλώνουν μια πιθανή εμπλοκή της MMP12 στην παθοφυσιολογία του πνεύμονα του *desmin null*, η οποία όμως μπορεί να μην οφείλεται σε αυξημένη παρουσία μακροφάγων, αλλά σε αυτά καθαυτά τα λεία μυϊκά κύτταρα του πνεύμονα. Η δεσμίνη φυσιολογικά εκφράζεται από τα λεία μυϊκά κύτταρα, έτσι η παρατηρούμενη αύξηση της έκφρασης της MMP12 από τα κύτταρα αυτά στο *des<sup>-/-</sup>* μοντέλο πιθανώς να οφείλεται στην απουσία της δεσμίνης.

Από την άλλη μεριά, στον *des<sup>-/-</sup>* πνεύμονα εμφανίζονται αυξημένα τα κύτταρα που εκφράζουν γαλεκτίνη-3, που θα μπορούσαν να είναι ενεργοποιημένα μακροφάγα ή και άλλα ανοσοκύτταρα που συμμετέχουν στην παθολογία. Επίσης, η μικρή μείωση της έκφρασης της MMP12 στον πνεύμονα των *des<sup>-/-</sup>Lgals3<sup>-/-</sup>* ποντικών σε σύγκριση με τους *des<sup>-/-</sup>* πνεύμονες, δεν μπορεί να εξηγήσει την βελτίωση που έδειξαν οι *des<sup>-/-</sup>Lgals3<sup>-/-</sup>* πνεύμονες στις λειτουργικές μετρήσεις. Έτσι η επέκταση των πειραμάτων της μελέτης της έκφρασης άλλων γονιδίων που σχετίζονται με την εμφάνιση εμφυσήματος, όπως η Neutrophil Elastase [132], θα μπορούσε να υποδείξει άλλους μηχανισμούς οι οποίοι εμπλέκονται στην εμφάνιση των φαινοτύπων αυτών.

### 4.3 Η Έλλειψη της Δεσμίνης Φαίνεται να Προκαλεί Εστίες Φλεγμονής και Ίνωσης στα Νεφρά Ποντικών

Οι χρόνιες ανωμαλίες της καρδιακής λειτουργίας μπορεί προοδευτικά να προκαλέσουν την εμφάνιση μιας μόνιμης χρόνιας νεφρικής νόσου [13]. Έτσι και στο



desmin-null μοντέλο, που χαρακτηρίζεται από μια χρόνια δυσλειτουργία της καρδιάς [1, 45] θα μπορούσε να εμφανισθεί παθολογία και στα νεφρά.

Πράγματι, τα αποτελέσματα των ιστολογικών μελετών των νεφρών ποντικών ηλικίας 10 και 12 μηνών έδειξαν ότι υπάρχει μια διείσδυση κυττάρων, πιθανώς φλεγμονωδών, και αυξημένα επίπεδα ίνωσης γύρω από τα μικρά αγγεία, αλλά και στο εσωτερικό του μυελού των νεφρών. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται να συμπληρώσουν οι μελέτες της έκφρασης γονιδίων με RT-qPCR οι οποίες έδειξαν αύξηση της Periostin, ενός βιοδείκτη της Χρόνιας Νεφρικής Ανεπάρκειας που προάγει την φλεγμονή και την ίνωση [116]. Επιπροσθέτως οι μικρές αυξήσεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τον δείκτη λευκοκυττάρων CD45 και το κολλαγόνο τύπου 1, συνάδουν με την παρουσία φλεγμονής και ίνωσης. Η σχετική μείωση τους και η επαναφορά τους σε επίπεδα wt, στα νεφρά  $des^{-/-}Lgals3^{-/-}$  (Σχήμα 32) θα μπορούσαν να ερμηνευθούν ως μεσολάβηση της γαλεκτίνης-3 ως ρυθμιστή της φλεγμονής και της ίνωσης και στα νεφρά του  $des^{-/-}$  ποντικού.

Για την επιβεβαίωση των παραπάνω θα πρέπει να αποτιμηθεί ιστολογικά η έκταση της φλεγμονής και της ίνωσης στα νεφρά των ζώων και να γίνει ποσοτική σύγκριση μεταξύ  $des^{-/-}$  και  $des^{-/-}Lgals3^{-/-}$  ζώων, όχι μόνο στην ηλικία των 10 μηνών, αλλά και στους 12 μήνες, όπου παρουσιάζεται η εντονότερη παθοφυσιολογία στην καρδιά και όπου οι πρώτες παρατηρήσεις έδειξαν ότι χειροτερεύει και η φλεγμονή των  $des^{-/-}$  νεφρών.

Στο πλαίσιο αυτό έγινε σύγκριση των επιπέδων της periostin, του μοναδικού μορίου που είχε στατιστικά σημαντική >2 φορές επαγωγή της έκφρασης του στα  $des^{-/-}$  σε σύγκριση με τα φυσιολογικά νεφρά. Η σύγκριση αυτή έδειξε ότι και απουσία γαλεκτίνης-3, η periostin ήταν εξίσου αυξημένη (Σχήμα 32). Συνεπώς, η periostin δεν μπορεί να αποτελεί δείκτη ή μεσολαβητή της διαφαινόμενης ηπιότερης φλεγμονής και ίνωσης απουσία γαλεκτίνης-3. Επιπλέον, η σχετικά σταθερή έκφραση των σημαντικών μεσολαβητών της ίνωσης και της φλεγμονής TGF- $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL6 και IL1 $\alpha$  μεταξύ των γενοτύπων που εξετάστηκαν, θα μπορούσε να οφείλεται σε χαρακτηρισμό και ρύθμιση της παθολογίας στα  $des^{-/-}$  νεφρά από άλλα μόρια. Αντίστοιχα, για παράδειγμα, η ίνωση και παθολογία στο  $des^{-/-}$  μυοκάρδιο δεν χαρακτηρίζεται από τους παραπάνω γνωστούς μεσολαβητές, αλλά το λιγότερο

μελετημένο μόριο της οστεοποντίνης [1]. Η πιο εκτεταμένη ανάλυση γονιδιακής έκφρασης με τη βοήθεια μικροσυστοιχιών, αλλά και σε μικρότερες ηλικιακές ομάδες για τον χαρακτηρισμό της απαρχής του φαινοτύπου, θα μπορούσε να υποδείξει ενδεχομένως τα εμπλεκόμενα μονοπάτια σηματοδότησης.

## Βιβλιογραφία

- [1] Psarras, S., et al., *Regulation of adverse remodelling by osteopontin in a genetic heart failure model*. Eur Heart J, 2012. **33**(15): p. 1954-63.
- [2] Go, A.S., et al., *Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association*. Circulation, 2013. **127**(1): p. e6-e245.
- [3] van Berlo, J.H. and J.D. Molkentin, *An emerging consensus on cardiac regeneration*. Nat Med, 2014. **20**(12): p. 1386-93.
- [4] Brenner, S. and G. Ertl, *Remodelling and adverse remodelling in CAD*. Herz, 2012. **37**(6): p. 590-6.
- [5] Moe G. Heart failure with multiple comorbidities. Curr Opin Cardiol. 2016 Mar;31(2):209-16. doi: 10.1097/HCO.0000000000000257. Review. PubMed PMID: 26808008
- [6] Hawkins NM, Petrie MC, Jhund PS, Chalmers GW, Dunn FG, McMurray JJ. Heart failure and chronic obstructive pulmonary disease: diagnostic pitfalls and epidemiology. Eur J Heart Fail. 2009 Feb;11(2):130-9. doi: 10.1093/eurjhf/hfn013. Review. PubMed PMID: 19168510; PubMed Central PMCID: PMC2639415.
- [7] Ronco C, Haapio M, House AA, Anavekar N, Bellomo R. Cardiorenal syndrome. J Am Coll Cardiol. 2008 Nov 4;52(19):1527-39. doi: 10.1016/j.jacc.2008.07.051. Review. PubMed PMID: 19007588.
- [8] Redfield MM, Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. N Engl J Med 2016;375:1868-77
- [9] McMurray, J.J. and M.A. Pfeffer, *Heart failure*. Lancet, 2005. **365**(9474): p. 1877-89.
- [10] Husain-Syed et al. Cardio-Pulmonary-Renal Interactions JACC VOL. 65, NO. 22, 2015 JUNE 9, 2 015:2433-48
- [11] Matthay MA. Resolution of pulmonary edema. Thirty years of progress. Am J Respir Crit Care Med 2014;189:1301-8.
- [12] Chen et al. Left Ventricular Failure Produces Profound Lung Remodeling and Pulmonary Hypertension in Mice, Hypertension. 2012;59:1170-1178.
- [13] Ronco et al. Cardiorenal syndrome: refining the definition of a complex symbiosis gone wrong. Intensive Care Med (2008) 34:957-962.
- [14] Capetanaki, Y.G., J. Ngai, and E. Lazarides, *Characterization and regulation in the expression of a gene coding for the intermediate filament protein desmin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(22): p. 6909-13.
- [15] Ngai, J., Y.G. Capetanaki, and E. Lazarides, *Expression of the genes coding for the intermediate filament proteins vimentin and desmin*. Ann N Y Acad Sci, 1985. **455**: p. 144-57.
- [16] Lazarides, E. and B.D. Hubbard, *Immunological characterization of the subunit of the 100 A filaments from muscle cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(12): p. 4344-8.

- [17] Hol, E, Capetanaki Y. Type III Intermediate Filaments Desmin, Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP), Vimentin, and Peripherin Cold Spring Harb Perspect Biol doi:10.1101/cshperspect.a021642
- [18] Fuchs, E. and K. Weber, *Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease*. Annu Rev Biochem, 1994. **63**: p. 345-82.
- [19] Carlsson, L., et al., *Differences in the distribution of synemin, paranemin, and plectin in skeletal muscles of wild-type and desmin knock-out mice*. Histochem Cell Biol, 2000. **114**(1): p. 39-47.
- [20] Paulin, D. and Z. Li, *Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle*. Exp Cell Res, 2004. **301**(1): p. 1-7.
- [21] Capetanaki, Y., *Desmin cytoskeleton: a potential regulator of muscle mitochondrial behavior and function*. Trends Cardiovasc Med, 2002. **12**(8): p. 339-48.
- [22] Brachvogel, B., et al., *Isolated Anxa5+/Sca-1+ perivascular cells from mouse meningeal vasculature retain their perivascular phenotype in vitro and in vivo*. Exp Cell Res, 2007. **313**(12): p. 2730-43.
- [23] Nitou, M., K. Ishikawa, and N. Shiojiri, *Immunohistochemical analysis of development of desmin-positive hepatic stellate cells in mouse liver*. J Anat, 2000. **197 Pt 4**: p. 635-46.
- [24] Sparn, H.G., B.A. Lieder-Ochs, and W.W. Franke, *Immunohistochemical identification and characterization of a special type of desmin-producing stromal cells in human placenta and other fetal tissues*. Differentiation, 1994. **56**(3): p. 191-9.
- [25] Rogatsch, H., et al., *Expression of vimentin, cytokeratin, and desmin in Sertoli cells of human fetal, cryptorchid, and tumour-adjacent testicular tissue*. Virchows Arch, 1996. **427**(5): p. 497-502.
- [26] Herrmann, A., E. Tozzo, and J. Funk, *Semi-automated quantitative image analysis of podocyte desmin immunoreactivity as a sensitive marker for acute glomerular*
- [27] Dalakas, M.C., et al., *Desmin myopathy, a skeletal myopathy with cardiomyopathy caused by mutations in the desmin gene*. N Engl J Med, 2000. **342**(11): p. 770-80.
- [28] Goldfarb, L.G., et al., *Missense mutations in desmin associated with familial cardiac and skeletal myopathy*. Nat Genet, 1998. **19**(4): p. 402-3.
- [29] Capetanaki, Y., et al., *Muscle intermediate filaments and their links to membranes and membranous organelles*. Exp Cell Res, 2007. **313**(10): p. 2063-76.
- [30] Milner, D.J., et al., *Disruption of muscle architecture and myocardial degeneration in mice lacking desmin*. J Cell Biol, 1996. **134**(5): p. 1255-70.
- [31] Capetanaki Y., et al., *Desmin related disease: a matter of cell survival failure*. Curr Opin Cell Biol. 2015 Feb;32:113-20.
- [32] Li, Z., et al., *Cardiovascular lesions and skeletal myopathy in mice lacking desmin*. Dev Biol, 1996. **175**(2): p. 362-6.
- [33] Capetanaki, Y., D.J. Milner, and G. Weitzer, *Desmin in muscle formation and maintenance: knockouts and consequences*. Cell Struct Funct, 1997. **22**(1): p. 103-16.
- [34] Agbulut, O., et al., *Analysis of skeletal and cardiac muscle from desmin knock-out and normal mice by high resolution separation of myosin heavy-chain isoforms*. Biol Cell, 1996. **88**(3): p. 131-5.
- [35] Thornell, L., et al., *Null mutation in the desmin gene gives rise to a cardiomyopathy*. J Mol Cell Cardiol, 1997. **29**(8): p. 2107-24.
- [36] Milner, D.J., et al., *Desmin cytoskeleton linked to muscle mitochondrial distribution and respiratory function*. J Cell Biol, 2000. **150**(6): p. 1283-98.

- [37] Linden, M., et al., *Effects of desmin gene knockout on mice heart mitochondria*. J Bioenerg Biomembr, 2001. **33**(4): p. 333-41.
- [38] Weisleder, N., G.E. Taffet, and Y. Capetanaki, *Bcl-2 overexpression corrects mitochondrial defects and ameliorates inherited desmin null cardiomyopathy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(3): p. 769-74.
- [39] Lacolley, P., et al., *Mechanical properties and structure of carotid arteries in mice lacking desmin*. Cardiovasc Res, 2001. **51**(1): p. 178-87.
- [40] Li, Z., et al., *Desmin is essential for the tensile strength and integrity of myofibrils but not for myogenic commitment, differentiation, and fusion of skeletal muscle*. J Cell Biol, 1997. **139**(1): p. 129-44.
- [41] Shardonofsky, F.R., Y. Capetanaki, and A.M. Boriek, *Desmin modulates lung elastic recoil and airway responsiveness*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006. **290**(5): p. L890-6
- [42] Meyer, G.A. and R.L. Lieber, *Skeletal muscle fibrosis develops in response to desmin deletion*. Am J Physiol Cell Physiol, 2012. **302**(11): p. C1609-20.
- [43] Haubold, K.W., et al., *Loss of desmin leads to impaired voluntary wheel running and treadmill exercise performance*. J Appl Physiol (1985), 2003. **95**(4): p. 1617-22.
- [44] Mavroidis, M. and Y. Capetanaki, *Extensive induction of important mediators of fibrosis and dystrophic calcification in desmin-deficient cardiomyopathy*. Am J Pathol, 2002. **160**(3): p. 943-52.
- [45] Milner, D.J., et al., *The absence of desmin leads to cardiomyocyte hypertrophy and cardiac dilation with compromised systolic function*. J Mol Cell Cardiol, 1999. **31**(11): p. 2063-76.
- [46] Mavroidis, M., et al., *Complement system modulation as a target for treatment of arrhythmogenic cardiomyopathy*. Basic Res Cardiol, 2015. **110**(3): p. 27.
- [47] Sprinkart, A.M., et al., *Characterization of the failing murine heart in a desmin knock-out model using a clinical 3 T MRI scanner*. Int J Cardiovasc Imaging, 2012. **28**(7): p. 1699-705.
- [48] Schrickel, J.W., et al., *Cardiac conduction disturbances and differential effects on atrial and ventricular electrophysiological properties in desmin deficient mice*. J Interv Card Electrophysiol, 2010. **28**(2): p. 71-80.
- [49] Fountoulakis, M., et al., *Alterations in the heart mitochondrial proteome in a desmin null heart failure model*. J Mol Cell Cardiol, 2005. **38**(3): p. 461-74.
- [50] Liu, J., et al., *Aberrant protein aggregation is essential for a mutant desmin to impair the proteolytic function of the ubiquitin-proteasome system in cardiomyocytes*. J Mol Cell Cardiol, 2006. **40**(4): p. 451-4.
- [51] Seong, S.Y. and P. Matzinger, *Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(6): p. 469-78.
- [52] Barondes, S.H., et al., *Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins*. J Biol Chem, 1994. **269**(33): p. 20807-10.
- [53] Cooper, D.N., *Galectinomics: finding themes in complexity*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1572**(2-3): p. 209-31.
- [54] Wang, J.L., J.G. Laing, and R.L. Anderson, *Lectins in the cell nucleus*. Glycobiology, 1991. **1**(3): p. 243-52.
- [55] Yang, R.Y., G.A. Rabinovich, and F.T. Liu, *Galectins: structure, function and therapeutic potential*. Expert Rev Mol Med, 2008. **10**: p. e17.
- [56] Elola, M.T., et al., *Galectins: matricellular glycan-binding proteins linking cell adhesion, migration, and survival*. Cell Mol Life Sci, 2007. **64**(13): p. 1679-700.
- [57] Liu, F.T., R.J. Patterson, and J.L. Wang, *Intracellular functions of galectins*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1572**(2-3): p. 263-73.

- [58] Colnot, C., et al., *Embryonic implantation in galectin 1/galectin 3 double mutant mice*. Dev Dyn, 1998. **211**(4): p. 306-13.
- [59] Sussan, T.E., et al., Targeting Nrf 2 with the triterpenoid CDDO- imidazolide attenuates cigarette smoke-induced emphysema and cardiac dysfunction in mice. 250-255, PNAS, January 6, 2009, vol.106, no1
- [60] Ghorani et al. Tobacco Induced Diseases (2017) 15:25 DOI 10.1186/s12971-017-0130-2
- [61] Churg A., et al., Proteases and emphysema. Curr Opin Pulm Med 11:153–159.
- [62] Mannino DM: Chronic obstructive pulmonary disease: definition and epidemiology. Respir Care 2003; 48:1185–1191.
- [63] Laurell CB, Eriksson S: The electrophoretic alpha-1-globulin pattern of serum in alpha-1-antitrypsin deficiency. Scand J Clin Invest 1963; 15:132–140.
- [64] McCawley LJ, Matrisian LM: Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! Curr Opin Cell Biol 2001; 13:534–540.
- [65] Haro H, Crawford HC, Fingleton B, et al. Matrix metalloproteinase-7-dependent release of tumor necrosis factor-alpha in a model of herniated disc resorption. J Clin Invest 2000; 105:143–150.
- [66] Churg A, Wang RD, Tai H, et al. Macrophage metalloelastase mediates acute cigarette smoke-induced inflammation via tumor necrosis factor-a release. Am J Respir Crit Care Med 2003; 167:1083–1089.
- [67] Hautamaki RD, Kobayashi DK, Senior RM, Shapiro SD. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. Science 1997;277:2002–4.
- [68] Wang, J.L., J.G. Laing, and R.L. Anderson, *Lectins in the cell nucleus*. Glycobiology, 1991. **1**(3): p. 243-52.
- [69] Hughes, R.C., *Mac-2: a versatile galactose-binding protein of mammalian tissues*. Glycobiology, 1994. **4**(1): p. 5-12.
- [70] Birdsall, B., et al., *NMR solution studies of hamster galectin-3 and electron microscopic visualization of surface-adsorbed complexes: evidence for interactions between the N- and C-terminal domains*. Biochemistry, 2001. **40**(15): p. 4859-66.
- [71] Krzeslak, A. and A. Lipinska, *Galectin-3 as a multifunctional protein*. Cell Mol Biol Lett, 2004. **9**(2): p. 305-28.
- [72] Rosenberg, I., et al., *Mac-2-binding glycoproteins. Putative ligands for a cytosolic beta-galactoside lectin*. J Biol Chem, 1991. **266**(28): p. 18731-6.
- [73] Sato, S. and R.C. Hughes, *Regulation of secretion and surface expression of Mac-2, a galactoside-binding protein of macrophages*. J Biol Chem, 1994. **269**(6): p. 4424-30.
- [74] Luis M. Ruilope et al., Renal Function: The Cinderella of Cardiovascular Risk Profile, Journal of the American College of Cardiology, Vol. 38, No. 7, 2001.
- [75] Hillege H.L. et al., Renal Function, Neurohormonal Activation, and Survival in Patients With Chronic Heart Failure, Circulation. 2000;102:203-210.
- [76] Hillege H.L. et al., Renal Function as a Predictor of Outcome in a Broad Spectrum of Patients With Heart Failure, Circulation. 2006;113:671-678.
- [77] McCullough PA. Contrast induced nephropathy. J Am Coll Cardiol 2008;51:1419 –28.
- [78] Semenza, G.L. and P.P. Ruvolo, Introduction to tumor microenvironment regulation of cancer cell survival, metastasis, inflammation, and immune surveillance. Biochim Biophys Acta, 2016. 1863(3): p. 379-81.
- [79] Menon, R.P. and R.C. Hughes, Determinants in the N-terminal domains of galectin-3 for secretion by a novel pathway circumventing the endoplasmic reticulum-Golgi complex. Eur J Biochem, 1999. 264(2): p. 569-76.
- [80] Mehul, B. and R.C. Hughes, Plasma membrane targeting, vesicular budding and release of galectin 3 from the cytoplasm of mammalian cells during secretion. J Cell Sci, 1997. 110 ( Pt 10): p. 1169-78.

- [81] Hughes, R.C., The galectin family of mammalian carbohydrate-binding molecules. *Biochem Soc Trans*, 1997. 25(4): p. 1194-8.
- [82] Hughes, R.C., Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1999. 1473(1): p. 172-85.
- [83] Liu, F.T., et al., Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. *Am J Pathol*, 1995. 147(4): p. 1016-28.
- [84] Kim, H., et al., Expression and immunohistochemical localization of galectin-3 in various mouse tissues. *Cell Biol Int*, 2007. 31(7): p. 655-62.
- [85] Henderson, N.C. and T. Sethi, The regulation of inflammation by galectin-3. *Immunol Rev*, 2009. 230(1): p. 160-71.
- [86] Hsu, D.K., et al., Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. *Am J Pathol*, 2000. 156(3): p. 1073-83.
- [87] Colnot, C., Ripoche, M. A., Milon, G., Montagutelli, X., Crocker, P. R. & Poirier, F. (1998) *Immunology* 94, 290–296.
- [88] Farnworth, S.L., et al., Galectin-3 reduces the severity of pneumococcal pneumonia by augmenting neutrophil function. *Am J Pathol*, 2008. 172(2): p. 395-405.
- [89] Zuberi, R.I., et al., Critical role for galectin-3 in airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *Am J Pathol*, 2004. 165(6): p. 2045-53.
- [90] Nishi, Y., et al., Role of galectin-3 in human pulmonary fibrosis. *Allergol Int*, 2007. 56(1): p. 57-65.
- [91] Henderson, N.C., et al., Galectin-3 expression and secretion links macrophages to the promotion of renal fibrosis. *Am J Pathol*, 2008. 172(2): p. 288-98.
- [92] Ho, J.E., et al., Galectin-3, a marker of cardiac fibrosis, predicts incident heart failure in the community. *J Am Coll Cardiol*, 2012. 60(14): p. 1249-56.
- [93] Jiang, J.X., et al., Galectin-3 modulates phagocytosis-induced stellate cell activation and liver fibrosis in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012. 302(4): p. G439-46.
- [94] Calvier, L., et al., Galectin-3 mediates aldosterone-induced vascular fibrosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013. 33(1): p. 67-75.
- [95] Vernon, M.A., K.J. Mylonas, and J. Hughes, Macrophages and renal fibrosis. *Semin Nephrol*, 2010. 30(3): p. 302-17.
- [96] Andrew Churg and Joanne L. Wright *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 2005, 11:153-159
- [97] Shaoping Xie et. al, *Respiratory Research* 2005, 6:148
- [98] MacNee W (1994) Pathophysiology of cor pulmonale in chronic obstructive pulmonary disease. Part One. *Am J Respir Crit Care Med* 150:833-852.
- [99] Nishi, Y., et al., Role of galectin-3 in human pulmonary fibrosis. *Allergol Int*, 2007. 56(1): p. 57-65.
- [100] N. Garbacki et al. / *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 22 (2009) 267–278
- [101] D. Papandrinopoulou et al. Lung Compliance and Chronic Obstructive Pulmonary Disease, *Pulmonary Medicine Volume 2012*, Article ID 542769.
- [102] Ziaieian B, Fonarow GC. Epidemiology and aetiology of heart failure. *Nat Rev Cardiol*. 2016 Jun;13(6):368-78. doi:10.1038/nrcardio.2016.25. Epub 2016 Mar 3. Review. PubMed PMID: 26935038; PubMed Central PMCID: PMC4868779.
- [103] Watkins H, Ashrafian H, Redwood C. Inherited cardiomyopathies. *N Engl J Med*. 2011 Apr 28;364(17):1643-56. doi: 10.1056/NEJMra0902923. Review. PubMed PMID:21524215
- [104] R Mahadeva et al., Chronic obstructive pulmonary disease 3: Experimental animal models of pulmonary emphysema, *Thorax* 2002;57:908–914
- [105] S. Psarras et al., Oxidants in Asthma and in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD), *Current Pharmaceutical Design*, 2005, 11, 2053-2062.



- [106] Mavroidis M. et al., Extensive Induction of Important Mediators of Fibrosis and Dystrophic Calcification in Desmin-Deficient Cardiomyopathy, *American Journal of Pathology*, Vol. 160, No. 3, March 2002.
- [107] Milner DJ, Taffet GE, Wang X, Pham T, Tamura T, Hartley C, Gerdes AM, Capetanaki Y. The absence of desmin leads to cardiomyocyte hypertrophy and cardiac dilation with compromised systolic function. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31: 2063–2076.
- [108] Mehul, B. and Hughes, R.C. (1997) Plasma membrane targeting, vesicular budding and release of galectin 3 from the cytoplasm of mammalian cells during secretion. *J Cell Sci* 110, 1169-1178
- [109] Alan S. et al., Heart Disease and Stroke Statistics—2014 Update, *Circulation* January 21, 2014
- [110] Rosenberg, I., et al., Mac-2-binding glycoproteins. Putative ligands for a cytosolic beta-galactoside lectin. *J Biol Chem*, 1991. 266(28): p. 18731-6.
- [111] Okamura D.M. et al., Galectin-3 preserves renal tubules and modulates extracellular matrix remodeling in progressive fibrosis, *Am J Physiol Renal Physiol* 300: F245–F253, 2011.
- [112] Hamann J et al., EMR1, the human homolog of F4/80, is an eosinophil-specific receptor, *Eur J Immunol*. 2007 Oct;37(10):2797-802.
- [113] Bhattacharyya S. et al., FibronectinEDA promotes chronic cutaneous fibrosis through Toll-like receptor signaling, *Sci Transl Med*. 2014 Apr 16;6(232):232ra50.
- [114] Belinda J. Thomas et al., In the Shadow of Fibrosis: Innate Immune Suppression Mediated by Transforming Growth Factor- $\beta$ , *Am J Respir Cell Mol Biol* Vol 55, Iss 6, pp 759–766, Dec 2016.
- [115] Morris, D. G., X. Huang, N. Kaminski, Y. Wang, S. D. Shapiro, G. Dolganov, A. Glick, and D. Sheppard. 2003. Loss of integrin  $\alpha$ (v) $\beta$ 6-mediated TGF- $\beta$  activation causes Mmp12-dependent emphysema. *Nature* 422: 169–173.
- [116] Niki Prakoura et al., Periostin: The Missing Link to Attenuate Kidney Fibrosis, *Am J Nephrol* 2017;46:498–500.
- [117] Prakoura N, Chatziantoniou C: Periostin in kidney diseases. *Cell Mol Life Sci* 2017; 74: 4315–4320.
- [118] Diokmetzidou et al., Desmin and  $\alpha$ B-crystallin interplay in the maintenance of mitochondrial homeostasis and cardiomyocyte survival, *J Cell Sci*. 2016 Oct 15;129(20):3705-3720.
- [119] Sharma, U.C., et al., *Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction*. *Circulation*, 2004. **110**(19): p. 3121-8.
- [120] van Kimmenade, R.R., et al., *Utility of amino-terminal pro-brain natriuretic peptide, galectin-3, and apelin for the evaluation of patients with acute heart failure*. *J Am Coll Cardiol*, 2006. **48**(6): p. 1217-24.
- [121] Wu, C.K., et al., Galectin-3 level and the severity of cardiac diastolic dysfunction using cellular and animal models and clinical indices. *Sci Rep*, 2015. 5: p. 17007.
- [122] Gao et al., Galectin-3: its role in asthma and potential as an anti-inflammatory target *Respiratory Research* 2013, 14:136
- [123] Kasper M et al., Immunocytochemical evidence for a modulation of galectin 3 (Mac-2), a carbohydrate binding protein, in pulmonary fibrosis. *J Pathol*. 1996 Jul;179(3):309-16.
- [124] Imran TF, Shin HJ, Mathenge N, Wang F, Kim B, Joseph J, Gaziano JM, Djousse L (2017) Meta-analysis of the usefulness of plasma galectin-3 to predict the risk of mortality in patients with heart failure and in the general population. *Am J Cardiol* 119(1):57–64
- [125] Zivlas C, Triposkiadis F, Psarras S, Giamouzis G, Skoularigis I, Chrysanthopoulos S, Kapelouzou A, Ramcharitar S, Barnes E, Papasteriadis E, Cokkinos D (2017) Left atrial volume index in patients with heart failure and severely impaired left ventricular systolic function:

the role of established echocardiographic parameters, circulating cystatin C and galectin-3. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 11(11):283–295

[126] Vlachou F, Varela A, Apostolou A, Bellou B, Davos C, Capetanaki Y, Psarras S. Galectin-3 affects fibroblast homeostasis mediating cardiac fibrosis and dysfunction in a genetic heart failure model. Selected Oral Presentation. 67<sup>th</sup> Congress of Hellenic Society of Biochemistry & Molecular Biology, 25-27 November 2016, Ioannina, Greece

[127] Vlachou F. Study of the Role of Galectin-3 and Mechanisms of Tissue Remodeling in Heart Failure. MSc Thesis. NCUA, Athens 2017

[128] Daryl M. Okamura et al., Galectin-3 preserves renal tubules and modulates extracellular matrix remodeling in progressive fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 300: F245–F253, 2011.

[129] del Pozo V et al. Gene Therapy with galectin-3 inhibits bronchial obstruction and inflammation in antigen challenged rats through inteleukin-5 downregulation. *Am J Respir Crit Care Med* 166, 732-7, 2002.

[130] Wynn TA, Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest.* 2007 Mar;117(3):524-9.

[131] Dina Visca et al. Cardiovascular Function in Pulmonary Emphysema. *BioMed Research International*, Volume 2013

[132] Steven D. Shapiro et al., Neutrophil Elastase Contributes to Cigarette Smoke-Induced Emphysema in Mice. *American Journal of Pathology*, Vol. 163, No. 6, December 2003.

[133] Shardonofsky FR, Capetanaki Y, Boriek AM. Desmin modulates elastic recoil and airway responsiveness. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290, L890-896, 2006.

[134] Mohamed JS, Hajira A, Li Z, Paulin D, Boriek AM. Desmin Regulates Airway Smooth Muscle Hypertrophy through Early Growth-responsive Protein-1 and MicroRNA-26a *J Biol. Chem.* 286, 43394–43404, 2011