

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΙΔΡΥΜΑ ΙΑΤΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ ΑΚΑΔΗΜΙΑΣ ΑΘΗΝΩΝ
(ΙΙΒΕΑΑ)
ΚΕΝΤΡΟ ΒΑΣΙΚΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ Ι

**Ο ρόλος της φλεγμονής και του οξειδωτικού stress στην ανάπτυξη
παθολογίας σε πειραματόζωο μοντέλο καρδιακής ανεπάρκειας.**

ΤΣΙΛΑΦΑΚΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2012

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΙΔΡΥΜΑ ΙΑΤΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ ΑΚΑΔΗΜΙΑΣ ΑΘΗΝΩΝ
(ΙΙΒΕΑΑ)
ΚΕΝΤΡΟ ΒΑΣΙΚΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ Ι

**Ο ρόλος της φλεγμονής και του οξειδωτικού stress στην ανάπτυξη
παθολογίας σε πειραματόζωο μοντέλο καρδιακής ανεπάρκειας.**

**The role of inflammation and oxidative stress in the development of
pathology in an animal model of heart failure.**

ΤΣΙΛΑΦΑΚΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

Επιβλέπων Καθηγητής:
Μαυροειδής Εμμανουήλ
Ερευνητής Δ΄
Ίδρυμα ΙατροΒιολογικών
Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών
(ΙΙΒΕΑΑ)
Κέντρο Βασικής Έρευνας Ι
Εργαστήριο Βιολογίας Κυττάρου

Συνεπιβλέπων Καθηγητής:
Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος
Αναπληρωτής Καθηγητής
Τμήματος Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΛΑΡΙΣΑ 2012

Τριμελής Επιτροπή:

- *Μαυροειδής Εμμανουήλ*, Ερευνητής Δ΄ (Λέκτορας), Ίδρυμα ΙατροΒιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ), Κέντρο Βασικής Έρευνας Ι, Εργαστήριο Βιολογίας Κυττάρου.
- *Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος*, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
- *Σαραφίδου Θεολογία*, Λέκτορας Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα μου κ. Μαυροειδή Εμμανουήλ για την πολύτιμη αρωγή και εμπιστοσύνη που μου προσέφερε απλόχερα, γιατί αναθέτοντάς μου τη συγκεκριμένη ερευνητική μελέτη, μου πρόσφερε την ευκαιρία να αποκτήσω τη σπουδαία αυτή ερευνητική εμπειρία.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον συνεπιβλέποντα κ. Μαθιόπουλο Κωνσταντίνο και την κ. Σαραφίδου Θεολογία για τη συνεργασία και βοήθειά τους.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά όλα τα μέλη του εργαστηρίου και τον καθένα ξεχωριστά, για τις χρήσιμες συμβουλές, την κατανόηση και το φιλικό και ευχάριστο κλίμα συνεργασίας.

Περίληψη

Η καρδιακή ανεπάρκεια είναι ένα μείζον πρόβλημα υγείας, το οποίο αγγίζει σχεδόν επιδημικές διαστάσεις στις ΗΠΑ, αφού επηρεάζει το 2% του πληθυσμού. Η ανάπτυξη καρδιακής ανεπάρκειας μπορεί να προκύψει εν μέρει από την ανεπαρκή επούλωση ενός αρχικού εμφράγματος του μυοκαρδίου. Ως εκ τούτου, ένας σημαντικός στόχος στην τρέχουσα καρδιολογία είναι ο καθορισμός βέλτιστων στρατηγικών για την ελαχιστοποίηση της νέκρωσης του μυοκαρδίου και η βελτιστοποίηση της καρδιακής ανάκαμψης μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου.

Με άξονα προηγούμενα αποτελέσματα, μελετήσαμε το ρόλο του υποδοχέα του C5a (C5aR) σε πειραματόζωα μοντέλα με καρδιακή ανεπάρκεια (Des^{-/-}). Για το σκοπό αυτό, έγινε συγκριτική μελέτη σε ποντίκια με διπλή έλλειψη των γονιδίων της δεσμίνης και του C5aR (C5aR^{-/-}Des^{-/-}) και σε Des^{-/-}, διερευνώντας το ρόλο τόσο της φλεγμονής όσο και του οξειδωτικού στρες στην ανάπτυξη παθολογίας (φλεγμονώδης αντίδραση, αναδιαμόρφωση του καρδιακού ιστού). Εξετάσαμε, αν η βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας (Fraction Shortening, FS) που έχει παρατηρηθεί στα C5aR^{-/-}Des^{-/-} ποντίκια σε σύγκριση με τα Des^{-/-}, μπορεί να αποδοθεί κατά ένα μέρος στη μείωση του οξειδωτικού στρες και της φλεγμονώδους αντίδρασης.

Αρχικά, η ιστολογική ανάλυση με H/E και Masson's trichrome, έδειξε πράγματι ότι τα ποντίκια C5aR^{-/-}Des^{-/-} εμφανίζουν μείωση κατά 22% της ίνωσης και της δυσμενούς καρδιακής αναδιαμόρφωσης σε σχέση με τα Des^{-/-}. Επίσης, ανέδειξε και τη συμβολή της ενεργοποίησης του συμπληρώματος στην απώλεια της σαρκολειματικής ακεραιότητας των ελλείπει δεσμίνης καρδιομυοκυττάρων, ύστερα από χρώση με EBD, όπου C5aR^{-/-}Des^{-/-} ποντίκια ηλικίας 20-25 ημερών σε σύγκριση με Des^{-/-} εμφάνισαν μείωση κατά 75-80% των θετικών σε EBD καρδιομυοκυττάρων. Επομένως, η βελτίωση αυτή μπορεί να οφείλεται μερικώς στη μείωση της φλεγμονώδους αντίδρασης, είτε μέσω της εξ' ορισμού απαλοιφής του C5aR είτε μέσω της μείωσης κατά 23% της συγκέντρωσης της φλεγμονώδους κυτοκίνης TNF-α που παρατηρήθηκε στα C5aR^{-/-}Des^{-/-} ποντίκια ηλικίας 20-30 ημερών σε σχέση με τα Des^{-/-}, καθώς και στη μείωση του οξειδωτικού στρες κατά 56% στα C5aR^{-/-}Des^{-/-} ποντίκια ηλικίας 20-30 ημερών σε σχέση με τα Des^{-/-}, όπως προέκυψε από τη μέθοδο MDA.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	4
Περίληψη.....	5
1. Εισαγωγή.....	8
1.1 Έμφραγμα του μυοκαρδίου.....	8
1.1.1 Έμφραγμα του μυοκαρδίου και ανοσοποιητικό σύστημα.....	8
1.1.2 Έμφραγμα του μυοκαρδίου και οξειδωτικό στρες.....	11
1.2 Δραστικές Ενώσεις Οξυγόνου (ROS - Reactive Oxygen Species).....	11
1.2.1 Οι ROS συμμετέχουν στην προώθηση της καταστροφής του ιστού.....	12
1.2.2 ROS και φλεγμονώδεις κυτοκίνες.....	14
1.3 Υπεροξειδωση λιπιδίων (παραγωγή MDA) και Συμπλήρωμα.....	15
1.4 TNF- α , ROS και Συμπλήρωμα.....	16
1.5 Το πειραματικό μας μοντέλο.....	18
Σκοπός της μελέτης.....	20
2. Υλικά & Μέθοδοι.....	22
2.1 Ζωικά πρότυπα.....	22
2.2 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA.....	22
2.3 Ανάλυση γονιδιωματικού DNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	23
2.4 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	24
2.5 Ιστολογικές χρώσεις.....	24
2.5.1 Χρώση τομών με αιματοξυλίνη/εωζίνη.....	25
2.5.2 Χρώση τομών με Masson's trichrome.....	25
2.5.3 Αξιολόγηση του “replacement index”.....	25
2.5.4 Εκτίμηση της μεμβρανικής ακεραιότητας με έγχυση της χρωστικής Evans blue.....	26
2.5.5 Ανοσοφθορισμός.....	26
2.5.6 Μικροσκοπία.....	27
2.6 Εκχύλιση πρωτεϊνών από καρδιακό ιστό.....	27
2.6.1 Εκχύλιση πρωτεϊνών για ELISA, και MDA ανάλυση.....	28

2.7 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford.....	28
2.8 Μέτρηση υπεροξειδωσης λιπιδίων με τη μέθοδο MDA	28
2.9 Εύρεση συγκέντρωσης TNF-α.....	29
2.10 Στατιστική ανάλυση.....	29
3. Αποτελέσματα.....	30
3.1 Γενοτύπηση διαγονιδιακών ποντικών με PCR.....	30
3.2 Συγκριτική ιστολογική ανάλυση του καρδιακού ιστού σε Des-/- και C5aR-/-Des-/- ποντίκια.....	31
3.2.2 Εκτίμηση της μεμβρανικής ακεραιότητας των καρδιομυοκυττάρων με EBD χρώση.....	34
3.3 Συγκέντρωση TNF-α σε καρδιακά εκχυλίσματα και ορρούς αίματος.....	34
3.4 Προσδιορισμός της υπεροξειδωσης λιπιδίων με τη μέθοδο MDA.....	37
4. Συζήτηση-Συμπεράσματα.....	39
Βιβλιογραφία.....	41

1. Εισαγωγή

Το έμφραγμα του μυοκαρδίου είναι το πιο συχνό καρδιαγγειακό συμβάν στο δυτικό κόσμο και είναι υπεύθυνο για ένα μεγάλο ποσοστό όλων των καρδιαγγειακών θανάτων που συμβαίνουν. Η βελτιωμένη κλινική διαχείριση του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου έχει μειώσει σημαντικά τη θνησιμότητα τις τελευταίες δύο δεκαετίες (Lloyd-Jones, Adams et al. 2009), αλλά οι ασθενείς που επιβιώνουν εξακολουθούν να αντιμετωπίζουν μια άλλη σημαντική επιπλοκή: την ανάπτυξη καρδιακής ανεπάρκειας, η οποία προκύπτει εν μέρει από την ανεπαρκή επούλωση του αρχικού εμφράγματος. Η καρδιακή ανεπάρκεια είναι ένα μείζων πρόβλημα υγείας, το οποίο αγγίζει σχεδόν επιδημικές διαστάσεις στις ΗΠΑ, αφού επηρεάζει το 2% του πληθυσμού. Είναι, επίσης, ένα οικονομικό πρόβλημα, αφού το κόστος των νοσηλείων που σχετίζονται με καρδιακή ανεπάρκεια είναι σήμερα το διπλάσιο από όλες τις μορφές καρκίνου και εμφραγμάτων του μυοκαρδίου μαζί (O'Connell 2000). Ως εκ τούτου, ένας σημαντικός στόχος στην τρέχουσα καρδιολογία είναι ο καθορισμός βέλτιστων στρατηγικών για την ελαχιστοποίηση της νέκρωσης του μυοκαρδίου και η βελτιστοποίηση της καρδιακής ανάκαμψης μετά από οξύ έμφραγμα μυοκαρδίου.

1.1 Έμφραγμα του μυοκαρδίου

Το πιο σημαντικό δομικό συμβάν μετά το έμφραγμα είναι η προοδευτική αναδιαμόρφωση (remodeling) της αριστερής κοιλίας (White et al. 1987) που οδηγεί τελικά σε καρδιακή ανεπάρκεια. Ο υποκείμενος μηχανισμός της αναδιαμόρφωσης αυτής είναι πολυπαραγοντικός, εμπλέκονται πολλές βιολογικές αντιδράσεις (ένδο- και εξωκυτταρικές) κατά το χρονικό της αναδιαμόρφωσης, όπως α) τοπική ισχαιμία και καρδιομυοκυτταρικός θάνατος, β) φλεγμονώδεις αντιδράσεις στο τραυματισμένο μυοκάρδιο (Frangogiannis et al. 2002), γ) καρδιοκατασταλτικές αντιδράσεις λόγω της παραγωγής δραστικών ενώσεων οξυγόνου (ROS, reactive oxygen species) και φλεγμονωδών κυτοκινών (Ferdinandy et al. 2000, Suematsu et al. 2003), δ) αλλαγές στον εξωκυττάριο χώρο επακόλουθες ενεργοποιήσεων των εξωκυττάρων μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs, matrix metalloproteinases) (Siwik and Colucci 2004), καθώς και σύνθεση κολλαγόνου και εναπόθεση ινωτικού ιστού στο μυοκάρδιο και ε) δομικές αλλαγές στα καρδιομυοκύτταρα σε απάντηση του μηχανικού στρες (Peng et al. 2002). Αυτές οι δραστικές διαδικασίες σχετίζονται μεταξύ τους και προβαίνουν από οξείες αντιδράσεις σε χρόνιες αλλαγές.

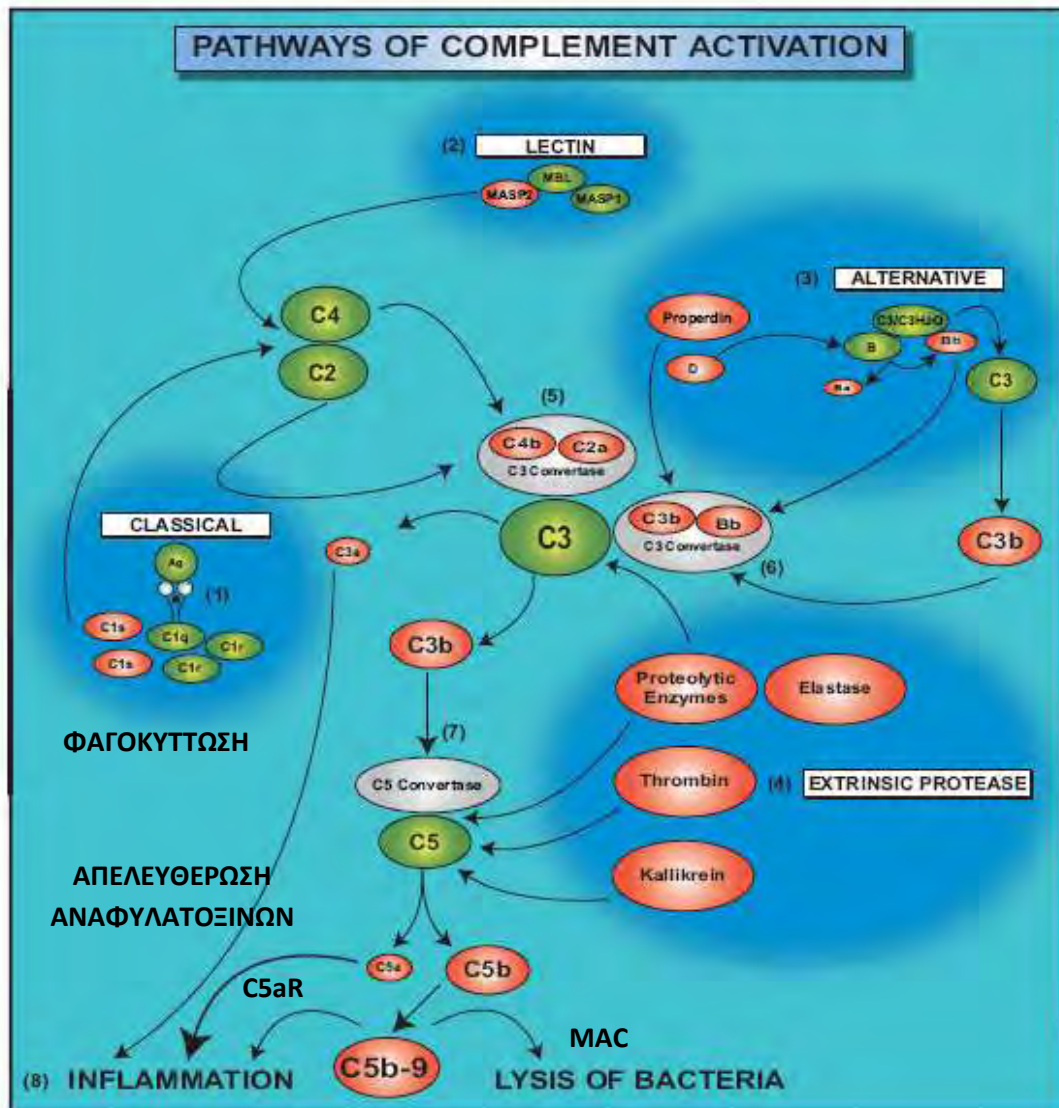
1.1.1 Έμφραγμα του μυοκαρδίου και ανοσοποιητικό σύστημα

Τα νεκρά κύτταρα ενεργοποιούν τους εγγενείς ανοσοποιητικούς μηχανισμούς, ξεκινώντας μια φλεγμονώδη αντίδραση που έχει διττή επίδραση, αρχικά αποκαθιστά το τραύμα, αλλά ταυτόχρονα μπορεί να προξενήσει και μια δυσμενή αναδιαμόρφωση του καρδιακού ιστού με καταστροφικές συνέπειες εάν η ενεργοποίηση είναι αυξημένη ή ανεξέλεγκτη. Η εγγενής ή φυσική (innate) ανοσία είναι ένας αρχέγονος

μηχανισμός (συναντάται και στα ασπόνδυλα) και ο κύριος λόγος ενεργοποίησης αυτού του συστήματος αντίδρασης σε αυτούς τους κατώτερους οργανισμούς ήταν να αποφευχθεί η μόλυνση (infection), να απορριφθούν τα αποπτωτικά, νεκρωτικά και κατεστραμμένα κύτταρα και τελικά να διευκολυνθεί η επούλωση του τραύματος. Το μέγεθος της ενδεχόμενης ουλής δεν ήταν ιδιαίτερης σημασίας στα ασπόνδυλα. Από την άλλη, όμως, ο ουλώδης ιστός είναι σε μεγάλο βαθμό ακυτταρικός και στερείται των φυσιολογικών βιοχημικών ιδιοτήτων των κυττάρων και στον καρδιακό ιστό αυτή η κατάσταση οδηγεί σε ηλεκτρική αποσύνδεση, μηχανική δυσλειτουργία και απώλεια της δομικής ακεραιότητας. Σε μεταγενέστερο στάδιο, αναπτύσσεται μία αντισταθμιστική υπερτροφία της μη αποφραχθείσας περιοχής, συνοδευόμενη από διάταση της καρδιάς και αυξημένη έκφραση εμβρυϊκών γονιδίων, όπου τελικά αυτές οι αλλαγές οδηγούν στην ανάπτυξη καρδιακής ανεπάρκειας (Jennings, Steenbergen et al. 1995). Πιστεύεται ότι η παροδικά ρυθμιζόμενη ενεργοποίηση και καταστολή της εγγενούς ανοσίας είναι ουσιώδους σημασίας για την ελαχιστοποίηση του τραυματισμού του καρδιακού ιστού, επιτυγχάνοντας έτσι μια πιο αποτελεσματική καρδιακή επιδιόρθωση και ανάπλαση (Jiang and Liao 2010).

Ο ουσιαστικός ρόλος που διαδραματίζει το σύστημα του συμπληρώματος στο φαινόμενο τραυματισμού ισχαιμίας/επαναιμάτωσης, περιγράφηκε πρώτη φορά από τους Hill και Ward στις αρχές της δεκαετίας του 1970 (Hill and Ward 1971). Το σύστημα του συμπληρώματος είναι ένας σημαντικός βραχίονας της εγγενούς ανοσίας και συμβάλει ουσιαστικά στην ομοίωση του οργανισμού, εξαλείφοντας τα κυτταρικά υπολείμματα και τα μολυσματικά μικρόβια, διευθύνοντας τις ανοσολογικές αποκρίσεις και στέλνοντας «σήματα κινδύνου» (Ricklin, Hajishengallis et al. 2010). Ο καταρράκτης του συμπληρώματος ενεργοποιείται από τρία μονοπάτια: το κλασικό, το εναλλακτικό και των λεκτινών (Εικόνα 1.1). Το συμπλήρωμα μπορεί, επίσης, να ενεργοποιηθεί από εξωτερικές πρωτεάσες, όπως η θρομβίνη (από τον καταρράκτη της πήξης), όπου συμβαίνει απευθείας διάσπαση των C3 και C5 (Amara, Rittirsch et al. 2008).

Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος σε περιοχές τραυματισμού του ιστού διεγείρει τα ουδετερόφιλα, επάγοντας χημειοτακτικά την μετανάστευση, τη συσσωμάτωση (Crawford, Grover et al. 1988) και την απελευθέρωση κυτταροτοξικών προϊόντων, όπως πρωτεάσες, ελαστάσες και ROS, που μπορούν να θέσουν σε κίνδυνο την ακεραιότητα του ιστού (Hori and Nishida 2009). Τα ουδετερόφιλα ενεργοποιούνται είτε από το C5a είτε από το iC3b που εναποτίθενται στα τοιχώματα των αγγείων (Hirahashi, Mekala et al. 2006) και μπορούν να συμβάλλουν στη μικροαγγειακή απόφραξη, επάγοντας την ίνωση και τη θρόμβωση, έτσι ώστε το σύστημα του συμπληρώματος να συνεισφέρει σε έναν φαύλο κύκλο αγγειοσύσπασης, μικροαγγειακής υποαιμάτωσης και κυτταρικού θανάτου, διακινδυνεύοντας περαιτέρω την ακεραιότητα του ιστού (Rezkalla and Kloner 2002). Στην περίπτωση, λοιπόν, της ισχαιμίας περιορισμένης διάρκειας ακολουθούμενη από επαναιμάτωση, υπάρχουν σοβαρές ενδείξεις ότι οι ελεύθερες ρίζες, τα ουδετερόφιλα και τα ενεργοποιημένα συστατικά του συμπληρώματος είναι ουσιώδους σημασίας στην καταστροφή του καρδιακού ιστού (Diepenhorst, van Gulik et al. 2009).



Εικόνα 1.1 Το σύστημα του συμπληρώματος είναι ένα σύνολο διαλυτών και μεμβρανικών πρωτεϊνών που “αντιλαμβάνεται” τα σήματα κινδύνου και τα μετατρέπει σε αποκρίσεις της φυσικής και επαγόμενης ανοσίας (Από M. Markiewski and J. Lambris. 2007)

Εκτεταμένα πειραματικά δεδομένα από πλήθος ζωικών προτύπων έχουν δείξει ότι η καταστολή της ενεργοποίησης του συμπληρώματος προσφέρει προστασία στον καρδιακό ιστό μετά την ισχαιμία/ επαναιμάτωση (Diepenhorst, van Gulik et al. 2009). Γενικότερα τα τελευταία 30 χρόνια έχει δειχθεί ότι η χρήση συγκεκριμένων στρατηγικών που ρυθμίζουν την ανοσολογική απόκριση οδηγεί σε δραματικές μειώσεις του μεγέθους του εμφράγματος και της δυσμενούς αναδιαμόρφωσης του μυοκαρδίου σε πολλά πειραματόζωα μοντέλα (Frangogiannis 2008). Ωστόσο, οι προσπάθειες εφαρμογής αυτής της γνώσης (περιορισμού της φλεγμονώδους αντίδρασης) σε ασθενείς μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου είχαν απογοητευτικά αποτελέσματα. Αν και το σύστημα του συμπληρώματος συχνά συντελεί στην καταστροφή του ιστού, όπως στην περίπτωση ισχαιμίας/ επαναιμάτωσης, δεν είναι εύκολο να διαχωρίσει κανείς αυτή τη διεργασία από τα ευεργετικά αποτελέσματα του συμπληρώματος όπως είναι ο ρόλος του στην αποκομιδή των κυτταρικών υπολειμμάτων (Walport 2001), στην προσέλκυση βλαστικών κυττάρων (Ratajczak,

Reca et al. 2006), στην αναγέννηση (Markiewski, DeAngelis et al. 2009) και την αγγειογένεση (Nozaki, Raisler et al. 2006), όπως έχουν αναγνωριστεί σε άλλα μοντέλα. Η ιδανικότερη προσέγγιση είναι πιθανόν η ρύθμιση παρά η απότομη άμβλυση της ενεργοποίησης του συμπληρώματος.

1.1.2 Έμφραγμα του μυοκαρδίου και οξειδωτικό στρες

Το έμφραγμα του μυοκαρδίου συνήθως ξεκινά από μυοκαρδιακή ισχαιμία που οφείλεται σε απόφραξη κάποιας στεφανιαίας αρτηρίας. Στο ισχαιμικό μυοκάρδιο παράγονται ROS, ιδιαίτερα μετά την επαναιμάτωση (Kukielka et al. 1995). Τα ουδετερόφιλα είναι η κύρια πηγή ROS κατά την επαναιμάτωση (Duilio et al. 2001). Τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα καρδιομυοκύτταρα μπορούν, επίσης, να παράγουν ROS. Πιο συγκεκριμένα, οι ROS παράγονται από την οξειδάση της ξανθίνης στα ενδοθηλιακά κύτταρα, από τις αλυσιδωτές αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια των καρδιομυοκυττάρων, από την οξειδάση του NADPH (φωσφορικού διουκλεοτιδίου νικοτιναμιδίου-αδενίνης) στα φλεγμονώδη κύτταρα (Wayra et al. 2002, Duilio et al. 2001, Scarabelli et al. 2001), καθώς και από την δυσλειτουργική συνθάση νιτρικού οξειδίου (NOS) (Bauersachs et al, 1999). Οι ROS βλάπτουν άμεσα την κυτταρική μεμβράνη και προκαλούν κυτταρικό θάνατο. Οι καταστροφικές συνέπειες των ROS, αποδεικνύονται σαφώς από τα ευρήματα σε διαγονιδιακά ποντίκια στα οποία αν υπερεκφραστεί (σαν διαγονίδιο), η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) μια αντιοξειδωτική πρωτεΐνη που μετατρέπει το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) σε νερό, το μέγεθος του εμφράγματος μειώνεται σημαντικά (Chen et al. 1998). Μια έξαρση των ROS από τα ενδοθηλιακά και τα καρδιομυοκύτταρα μπορεί να ενισχύσει την τοπική φλεγμονώδη αντίδραση και να επηρεάσει τα γειτονικά ουδετερόφιλα, οδηγώντας σε μια αλυσιδωτή αντίδραση παραγωγής ROS (Cooper et al. 2002).

1.2 Δραστικές Ενώσεις Οξυγόνου (ROS - Reactive Oxygen Species)

Το οξυγόνο είναι απαραίτητο για τη ζωή και ως διατομικό μόριο είναι ιδιαίτερα αδρανές. Οι Δραστικές Ενώσεις Οξυγόνου, όπως είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), η υδροξυλική ρίζα (OH^\cdot) και το υπεροξειδικό ανιόν ($O_2^{\cdot-}$), ορίζονται ως μόρια οξυγόνου σε διάφορες καταστάσεις οξείδωσης ή αναγωγής, καθώς και σύνθετα μόρια οξυγόνου με υδρογόνο. Έχει δειχθεί ότι έχουν επιβλαβή δράση σε διάφορα βιολογικά μόρια, όπως είναι οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια και το DNA. Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται οποιοδήποτε μόριο ή ένωση που περιέχει αζευγάρωτα ηλεκτρόνια, όπως πχ η υδροξυλική ρίζα και το υπεροξειδικό ανιόν. Μια ελεύθερη ρίζα σχηματίζεται από την απώλεια ηλεκτρονίου από κάποια μη-ρίζα (Hool and Corry 2007).

Το υπεροξειδικό ανιόν ($O_2^{\cdot-}$), προέρχεται από την προσθήκη ενός ηλεκτρονίου στο μοριακό οξυγόνο. Το $O_2^{\cdot-}$ είναι ασθενής βάση σε φυσιολογικό pH. Είναι ιδιαίτερος διαλυτό στο νερό και δεν διασχίζει μεμβράνες, αν και μπορεί να μεταφέρεται μέσω ιοντικών καναλιών (Turrens 2003).

Το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2), προέρχεται από την προσθήκη δύο ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο. Κάθε βιολογικό σύστημα που παράγει υπεροξειδικό ανιόν, παράγει και H_2O_2 , μέσω της αντίδρασης της δυσμουτάσης, εκτός και αν το O_2^- απορροφηθεί από κάποιο άλλο συστατικό του κυττάρου, πχ από το κυτόχρωμα c (Halliwell and Gutteridge, 1989). Το H_2O_2 είναι ασθενής οξειδωτικός παράγοντας, ο οποίος μπορεί άμεσα να απενεργοποιήσει ένζυμα μέσω οξείδωσης των θειολικών τους ομάδων. Επιπλέον, αντιδρώντας με ιόντα σιδήρου ή και χαλκού, κατά την αντίδραση Fenton, μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή της πολύ πιο δραστικής υδροξυλικής ρίζας, η οποία προκαλεί τοξικές βλάβες (Halliwell and Gutteridge, 1989). Η επικινδυνότητα του H_2O_2 έγκειται στην ικανότητά του να διαχέεται σε μεγάλες αποστάσεις προτού μετατραπεί στην υδροξυλική ρίζα. Η ταχύτητα διάχυσης μάλιστα είναι παρόμοια με αυτή του νερού. Επιπλέον, λόγω αυτής της ικανότητας, δρα και ως σηματοδοτικό μόριο (Antunes and Cadenas, 2000). Το H_2O_2 ελέγχει την καταλυτική ενεργότητα ενζύμων μέσω της οξειδοαναγωγικής τροποποίησης κυστεϊνών.

Μια άλλη ισχυρή οξειδωτική ουσία είναι το υποχλωριώδες οξύ (HOCl) που παράγεται από τη δράση της μυελοπεροξειδάσης (MPO). Η μυελοπεροξειδάση απελευθερώνεται ενδοφαγοσωμικά και εξωκυτταρικά από ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα και μερικά μακροφάγα, όπου καταλύει την παραγωγή του ισχυρού οξειδωτικού HOCl από το H_2O_2 και ιόντα χλωρίου (Cl^-) (Hampton et al. 1998). Η ενδοφαγοσωμική παραγωγή HOCl φαίνεται να έχει ευεργετικό ρόλο στην ανοσολογική άμυνα, μεσολαβώντας στον θάνατο βακτηρίων. Ωστόσο, η καταστροφή του ιστού εξαιτίας της εξωκυττάριας παραγωγής HOCl, ενοχοποιείται ως κρίσιμο παθολογικό φαινόμενο σε αρκετές ανθρώπινες φλεγμονώδεις ασθένειες (Nicholls and Hazen 2005, Davies et al. 2008). Η MPO παράγει πλήθος δραστικών οξειδωτικών και διάχυτων ελευθέρων ριζών (Klebanoff 1980), που είναι ικανά να ξεκινήσουν τόσο την υπεροξειδωση λιπιδίων (Zhang, Brennan et al. 2002, Zhang, Shen et al. 2002) όσο και να προάγουν ένα εύρος από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις σε πρωτεΐνες στόχους, όπως αλογόνωση, νιτροποίηση και οξειδωτική διασταύρωση, με κύριο στόχο αμινοξέα τυροσίνης (Podrez et al. 2000).

1.2.1 Οι ROS συμμετέχουν στην προώθηση της καταστροφής του ιστού

Οι ελεύθερες ρίζες εμπλέκονται στην προώθηση της καταστροφής του ιστού που σχετίζεται με τη φλεγμονώδη διαδικασία (Lucchesi 1994). Η υπεροξειδωση λιπιδίων αντιπροσωπεύει μια άμεση εκδήλωση των δηλητηριωδών αποτελεσμάτων των ελευθέρων ριζών στις κυτταρικές μεμβράνες και, επίσης, η έναρξη συγκεκριμένων ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών από ελεύθερες ρίζες μπορεί να διαδίδεται στον τραυματισμένο ιστό (Abe and Berk 1998). Επιπλέον, αυτές οι οξειδωτικές ουσίες βλάπτουν κυτταρικές πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα (Ashraf and Zhai 1995). Η επαναιμάτωση της ισχαιμικής καρδιάς δημιουργεί ελεύθερες ρίζες που θεωρείται ότι συμβάλλουν κατά ένα μέρος στη μη αναστρέψιμη βλάβη του ιστού μετά την ισχαιμία-επαναιμάτωση (Zweier 1988). Η επαναιμάτωση του ισχαιμικού μυοκαρδίου μεταφέρει ουδετερόφιλα στην περιοχή κινδύνου, όπου διεισδύουν στον

ιστό και απελευθερώνουν κυτταροτοξικές ενεργές ρίζες οξυγόνου, όπως το υπεροξειδικό ανιόν (O_2^-) (Miki et al. 1988). Οι ρίζες οξυγόνου έχει δειχθεί ότι διεγείρουν την μεταγραφή ποικίλων γονιδίων, όπως για παράδειγμα ενεργοποιούν τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB (πυρηνικός παράγοντας κ των ενεργοποιημένων Β κυττάρων). Επιπλέον, ενεργοποιούν αρκετά μονοπάτια φωσφορυλίωσης που επηρεάζουν με τη σειρά τους την έκφραση γονιδίων (Abe and Berk 1998). Αν και είναι γνωστό ότι οι ελεύθερες ρίζες ενεργοποιούν το σύστημα του συμπληρώματος, η δράση των ελευθέρων ριζών στη μεταγραφή του συμπληρώματος παραμένει άγνωστη (Tanhehco et al. 2000).

Πράγματι, ο Tanhehco και οι συνεργάτες του κατέδειξαν πως σε απομονωμένο μυοκάρδιο, οι ελεύθερες ρίζες αυξάνουν την παραγωγή των C1q, C1r, C3, C8 και C9 mRNA και του πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου MAC (membrane attack complex). Προτείνουν, λοιπόν, πως η τοπική ενεργοποίηση του συμπληρώματος από ελεύθερες ρίζες μπορεί να συμβαίνει κατά τη διάρκεια του οξειδωτικού στρες και πιθανόν να συνεισφέρει στο τραυματισμό του ιστού. Τόσο το κλασικό όσο και το εναλλακτικό μονοπάτι ενεργοποίησης του συμπληρώματος φαίνεται να συμμετέχουν κατά τον τραυματισμό του ιστού στην επαναιμάτωση (Murohara et al. 1995). Οι ελεύθερες ρίζες φαίνεται να ενεργοποιούν το εναλλακτικό μονοπάτι (Collard et al. 1997). Αν και το κλασικό μονοπάτι άρχεται από αντισώματα, η υπερέκφραση των C1q και C1r σε απομονωμένες καρδιές, υποδεικνύει πως το οξειδωτικό στρες μπορεί επίσης να ενεργοποιήσει και την κλασική οδό (Tanhehco et al. 2000). Επιπροσθέτως, έχει προταθεί ότι ο NF-κB, ο οποίος ενεργοποιείται από τις ROS, μεσολαβεί στην έκφραση του C3 σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα (Moon et al. 1999). Επιπλέον, επειδή, οι C3a και C5a είναι χημειοελκυστικά μόρια (αναφυλατοξίνες), αυξάνουν την τοπική παραγωγή συμπληρώματος, επιστρατεύουν κυτταρικούς τύπους στην περιοχή κινδύνου, διατηρώντας έτσι την ύπαρξη ελευθέρων ριζών από φλεγμονώδη κύτταρα καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου επαναιμάτωσης. Τέλος, οι ελεύθερες ρίζες και η ενεργοποίηση του συμπληρώματος συμμετέχουν σε πληθώρα φλεγμονωδών διαδικασιών, όπου η μία κατάσταση μπορεί να επάγει την άλλη δημιουργώντας έναν φαύλο κύκλο, ο οποίος κατ' επέκταση ενισχύει τον τραυματισμό του ιστού (Tanhehco et al. 2000).

Παρόλο που οι κύριες συνέπειες των υψηλών επιπέδων ROS στην καρδιακή ανεπάρκεια μπορεί να σχετίζονται με την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, η υπερβολική ενεργοποίηση της φαγοκυτταρικής NAD(P)H οξειδάσης, σε απάντηση νευροορμονικής ενεργοποίησης, μπορεί να συμβάλλει επίσης στην απόπτωση και στην ενεργοποίηση MMPs, οδηγώντας τελικά σε αναδιαμόρφωση της ανεπαρκούς αριστερής κοιλίας (Fischer et al. 2005). Βασικοί τελεστές της μετατροπής του εξωκυττάριου χώρου (extracellular matrix (ECM) turnover) είναι οι μεταλλοπρωτεϊνάσες, ένζυμα που έχουν έντονα συνδεθεί με την ίνωση και την αναδιαμόρφωση στην κολπική μαρμαρυγή (Chen et al. 2008). Πιο συγκεκριμένα, η δράση των MMPs ρυθμίζεται από αντιδράσεις οξειδοαναγωγής. Πρόσφατες μελέτες συνιστούν η προερχόμενη από λευκοκύτταρα μυελοπεροξειδάση (MPO), το οποίο παράγει το υποχλωριώδες οξύ (HOCl) είναι ουσιώδης ρυθμιστικός παράγοντας διαμόρφωσης της δράσης των MMPs (Fu et al. 2001, 2003). Η αυξημένη εναπόθεση

και μετατροπή των εξωκυττάρων πρωτεϊνών, επιταχύνεται στα κοιλικά μυοκύτταρα μετά την διέγερση από κυτοκίνες, τη C-αντιδρώσα πρωτεΐνη και το συμπλήρωμα (Issac et al. 2007).

1.2.2 ROS και φλεγμονώδεις κυτοκίνες

Οι ROS, διεγείρουν τη μεταγωγή σήματος φλεγμονωδών κυτοκινών, πχ του παράγοντα νέκρωσης όγκων-α (TNF-α), των ιντερλευκινών IL-1b και IL-6, στην ισχαιμική περιοχή του μυοκαρδίου ως αντίδραση του ξενιστή (host reaction). Με τη σειρά τους, οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες ρυθμίζουν την κυτταρική επιβίωση και τον κυτταρικό θάνατο στην αλυσιδωτή αντίδραση με τις ROS. Οι ROS διεγείρουν την παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών και αντίστροφα, οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες διεγείρουν το σχηματισμό ROS. Και οι δύο, είναι καρδιοκατασταλτικές ουσίες, κυρίως λόγω της διαταραχής που προκαλούν στην ενδοκυτταρική ομοιόσταση του ασβεστίου (Hori and Nishida 2009).

Το οξειδωτικό στρες και οι κυτοκίνες παίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στον αποπτωτικό όσο και στο νεκρωτικό καρδιομυοκυτταρικό θάνατο. Στην απόπτωση, υπάρχουν δυο κύρια αποπτωτικά σηματοδοτικά μονοπάτια, το ενδοκυτταρικό μονοπάτι μέσω των μιτοχονδρίων και το εξωτερικό μέσω του Fas προσδέτη ή TNF-α (Youle and Strasser 2008). Για παράδειγμα, το εξωγενές μονοπάτι ενεργοποιείται όταν προσδέτες θανάτου, πχ Fas προσδέτης ή TNF-α, προσδέονται σε συγγενικό υποδοχέα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (Ashkenazi and Dixit 1998). Αυτοί οι υποδοχείς περιλαμβάνουν ένα ενδοκυτταρικό τμήμα θανάτου, το οποίο επιστρατεύει και ενεργοποιεί την κασπάση 8 μέσω του προσαρμογέα FADD (Fas-συνδεδεμένη πρωτεΐνη στην περιοχή θανάτου), επάγοντας τον κυτταρικό θάνατο (Chinnaiyan et al. 1995, Hsu et al 1995).

Τα μονοκύτταρα αντιπροσωπεύουν την κύρια κυτταρική πηγή και έναν από τους βασικούς κυτταρικούς στόχους των πρώιμων φλεγμονωδών κυτοκινών (Apostolakis et al, 2010). Άπαξ και ενεργοποιηθούν, τα μονοκύτταρα/ μακροφάγα παράγουν περισσότερες κυτοκίνες, χημειοκίνες και αυξητικούς παράγοντες, όπως IL-1α και -β, IL-6, TNF-α (Swirski et al. 2009). Ακόμα και στα ηπιότερα και πιο αρχικά στάδια της καρδιακής ανεπάρκειας, παρατηρείται μεταβολή στη δραστηριότητα των κυτοκινών, ιδιαιτέρως αυξημένα επίπεδα των IL-6 και TNF-α, η οποία εκτιμάται ως πιθανός μάρτυρας επικινδυνότητας, έγκαιρης διάγνωσης και πρόγνωσης της καρδιακής ανεπάρκειας. Συγκεκριμένα, ο TNF-α εμπλέκεται στην πρόοδο της καρδιακής ανεπάρκειας ως μεσολαβητής στην δυσλειτουργία του μυοκαρδίου και της δυσμενούς αναδιαμόρφωσης (Armstrong et al. 2006). Θεωρείται ότι η παρατεταμένη αύξηση κυτοκινών, συμπεριλαμβανομένων του TNF-α και του υποδοχέα του, έχει ως αποτέλεσμα την φαινοτυπική μετάπτωση των μονοκυττάρων, καθώς και την απόπτωση καρδιομυοκυττάρων και την ενεργοποίηση εξωκυττάρων μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs), οδηγώντας τελικά σε καρδιακή υπερτροφία και δυσμενή αναδιαμόρφωση αριστερής κοιλίας (Mann et al. 2004). Ταυτόχρονα, η χρόνια απελευθέρωση ROS συνδέεται με την ανάπτυξη και την εξέλιξη της καρδιακής ανεπάρκειας (Bauersachs et al. 1999).

Τέλος, σε χρόνιο στάδιο, οι ROS και οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες, ενεργοποιούν τις MMPs και την εναπόθεση κολλαγόνου, γεγονότα που συντελούν στις δομικές αλλαγές και στην αναδιαμόρφωση του τραυματισμένου μυοκαρδίου (Siwik et al. 2000).

1.3 Υπεροξειδωση λιπιδίων (παραγωγή MDA) και Συμπλήρωμα

Η υπεροξειδωση λιπιδίων έχει χαρακτηριστεί ως ο κύριος μηχανισμός κυτταρικού τραυματισμού σε πολλά βιολογικά συστήματα φυτικής και ζωικής προέλευσης. Ο μηχανισμός περιλαμβάνει μια διαδικασία όπου ακόρεστα λιπίδια οξειδώνονται προς το σχηματισμό επιπρόσθετων ελευθέρων ριζών, καθώς και τοξικά παραπροϊόντα, τα οποία μπορεί να είναι επιβλαβή για τον οργανισμό. Τα πολυακόρεστα λιπίδια είναι ιδιαίτερος ευαίσθητα σε αυτό το είδος βλάβης όταν βρίσκονται σε οξειδωτικό περιβάλλον και τότε αντιδρούν για να σχηματίσουν υπεροξειδία λιπιδίων. Τα υπεροξειδία λιπιδίων είναι από μόνα τους ασταθή και υφίστανται περαιτέρω αποδόμηση σχηματίζοντας μια σύνθετη σειρά ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων ενεργών καρβονυλικών ενώσεων. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, όταν υπεροξειδώνονται περαιτέρω σχηματίζουν, εκτός των άλλων, τη μαλονδιαλδεύδη (MDA). Και τα φωσφολιπίδια μεμβρανών, όταν υπόκεινται σε υπεροξειδωση λιπιδίων σχηματίζουν MDA και άλλα ενεργά προϊόντα αποδόμησης. Η MDA είναι μία από τις βασικές αλδεύδες που προέρχονται από την υπεροξειδωση λιπιδίων, είναι ιδιαίτερα δραστική και αντιδρά με αμινοξέα λυσίνης σε πρωτεΐνες. Η αντίδραση της MDA με τη λυσίνη οδηγεί στο σχηματισμό πλήθους προϊόντων προσθήκης, όπως το παράγωγο διϋδροπυριδινική λυσίνη (DHPlysine) (Esterbauer et al. 1991).

Η οξειδωτική καταστροφή στα λιπίδια (υπεροξειδωση λιπιδίων) έχει βρεθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο σε ποικίλες ασθένειες και διαδικασίες γήρανσης. Κατά τα πρώιμα στάδια της υπεροξειδωσης λιπιδίων, σχηματίζονται τα υδροϋπεροξειδία λιπιδίων (LOOH). Αυτά μπορούν να αντιδράσουν επιπλέον προς τον σχηματισμό όψιμου σταδίου τελικά προϊόντα, όπως μαλονδιαλδεύδη ή μηλονική διαλδεύδη (malondialdehyde, MDA) και υδροξυεννεανάλη (hydroxynonenal, HNE). Τα LOOH ενίοτε μετρώνται για την ποσοτικοποίηση του πρώιμου σταδίου ή της οξείας υπεροξειδωσης λιπιδίων, ενώ η MDA συνήθως μετράται για την ποσοτικοποίηση του όψιμου σταδίου ή της χρόνιας υπεροξειδωσης λιπιδίων (Esterbauer et al. 1991).

Κατά την υπεροξειδωση λιπιδίων, λοιπόν, έχουμε την παραγωγή MDA και άλλων οξειδωτικών προϊόντων αποδόμησης. Αυτά μπορούν με τη σειρά τους να τροποποιήσουν ενδογενή μόρια, παράγοντας ειδικούς επιτόπους οξείδωσης (oxidation-specific epitopes, OSEs), οι οποίοι είναι επίσης παρόντες στην επιφάνεια αποπτωτικών κυττάρων (Chang et al. 1999). Πολλοί από αυτούς αναγνωρίζονται ως σήματα κινδύνου από εγγενείς ανοσολογικούς υποδοχείς (Miller et al. 2011). Η MDA και τα προϊόντα της είναι αξιόπιστοι δείκτες οξειδωτικού στρες και έχουν συσχετιστεί με πολλές ασθένειες, όπως η αθηροσκλήρωση (Chou et al. 2008, Miller et al. 2011). Οι MDA-τροποποιημένες πρωτεΐνες είναι γνωστό ότι επάγουν φλεγμονώδεις αποκρίσεις και αναγνωρίζονται από το ανοσοποιητικό (Thiele et al. 2004). Γενικά οι

OSEs είναι κύριος στόχος των εγγενών φυσικών αντισωμάτων τόσο στα ποντίκια όσο και στους ανθρώπους και το 15% του συνόλου των φυσικών αντισωμάτων ανοσοσφαιρίνης M (IgM) προσδένεται σε τύπου MDA-προϊόντων προσθήκης (πχ DHPlysine), υποδεικνύοντας την ανάγκη προστασίας έναντι αυτών των συγκεκριμένων τροποποιήσεων (Chou et al. 2008).

Ο παράγοντας H του συμπληρώματος (Complement factor H, CFH) είναι μία από τις αφθονότερες πρωτεΐνες του πλάσματος (100-700mg/ml) και κύριος ρυθμιστής της ενεργοποίησης του συμπληρώματος (Zipfel and Skerka 2009). Διαμεσολαβεί σε αντιφλεγμονώδεις λειτουργίες, προστατεύοντας τα ίδια τα κύτταρα από την ενεργοποίηση του συμπληρώματος (Zipfel and Skerka 2009), η οποία είναι ιδιαιτέρως σημαντική για κύτταρα που πεθαίνουν και τα οποία έχουν χάσει άλλους ρυθμιστές του συμπληρώματος στην επιφάνειά τους (Trouw et al. 2007). Γνωρίζουμε ότι η MDA είναι κύριος προσδέτης για τον CFH σε αποπτωτικά/ νεκρωτικά κύτταρα και φαίνεται ότι οι MDA-επίτοποι παρέχουν το έδαφος για τον CFH να επιτρέψει την τοπική παραγωγή αντιφλεγμονωδών iC3b παραγόντων (Weismann et al, 2011). Το γεγονός αυτό καθίσταται σχετικό σε καταστάσεις όπου δημιουργούνται μεγάλες ποσότητες κυτταρικών υπολειμμάτων. Αξίζει να σημειωθεί ότι, νεκρωτικά και, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, αποπτωτικά κύτταρα είναι προ-φλεγμονώδη (Savill et al. 2002, Chang et al. 2004). Υπό αυτή την άποψη, η αλληλεπίδραση του CFH με MDA-τροποποιημένα κυτταρικά συστατικά είναι επίσης σημαντική, διότι ο CFH περιορίζει την επαγόμενη από MDA έκκριση της IL-8 (Weismann et al, 2011).

1.4 TNF- α , ROS και Συμπλήρωμα

Η διατακτική καρδιομυοπάθεια είναι η βασική αιτία καρδιακής ανεπάρκειας στους ανθρώπους. Θεωρείται ότι η χρόνια φλεγμονώδης αντίδραση μυοκαρδίου πιθανόν συμβάλλει στην παθογένεια διατακτικής καρδιομυοπάθειας (Kawai 1999). Ο TNF- α είναι μια κυτοκίνη με πλειοτροπική δράση που συντελεί στην κυτταρική ανοσία και στις φλεγμονώδεις αντιδράσεις σε ένα εύρος φλεγμονωδών ασθενειών, ενώ παράλληλα φαίνεται να εμπλέκεται στενά στην εξέλιξη της καρδιακής νόσου (Cecconi et al. 1998). Ο TNF αρχικά συντίθεται ως μια 26kDa, τύπου II διαμεμβρανική πρωτεΐνη, που στη συνέχεια διασπάται και απελευθερώνεται στο εξωτερικό του κυττάρου από ένα δεσμευμένο στη μεμβράνη ένζυμο ονόματι μετατρεπτικό ένζυμο του TNF- α (TACE ή ADAM17), το οποίο ανήκει στην οικογένεια των ADAM μεταλλοπρωτεϊνών. Το μονομερές 17kDa TNF που προκύπτει από την επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης, κατόπιν σχηματίζει ένα βιολογικά ενεργό ομοτρίμερές, το οποίο είναι ικανό να ξεκινήσει την κυτταρική σηματοδότηση (Black et al. 1997).

Σε υγιείς καρδιές, η συγκέντρωση του TNF- α είναι χαμηλή και εντοπίζεται κυρίως στο ενδοθήλιο και στα κάρδιο-εδρεύοντα σιτευτικά κύτταρα (Schulz 2008). Επίσης, στο ανθρώπινο μυοκάρδιο υπό καρδιακή ανεπάρκεια, αλλά όχι στις υγιείς καρδιές, εκφράζεται άφθονη ποσότητα TNF- α (Doyama 1996). Ο υποδοχέας 1 του TNF (TNFR1, p55) και ο υποδοχέας 2 (TNFR2, p75) εκφράζονται στα περισσότερα καρδιακά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων και των καρδιομυοκυττάρων (Kadokami

et al. 2000). Κατά την ισχαιμία μυοκαρδίου, η προμορφή του TNF- α ελευθερώνεται εντός ολίγων λεπτών από τα καρδιο-εδρεύοντα σιτευτικά κύτταρα και τα μακροφάγα (Gilles et al. 2003). Όταν η ισχαιμία επιμένει, ο TNF- α παράγεται επίσης και από τα καρδιομυοκύτταρα (Dorge et al. 2002). Έχει δειχθεί σε αρουραίους ότι μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου, η πυκνότητα του TNFR1 αυξάνεται για 10 μέρες, ενώ του TNFR2 παραμένει αμετάβλητη (Irwin et al. 1999). Αντίθετα, οι TNFR1 και TNFR2 υποεκφράζονται στην καρδιακή ανεπάρκεια, ενώ οι διαλυτοί TNFRs αυξάνονται (Torre-Amione et al. 1996), εξαιτίας της πρωτεολυτικής διάσπασης του TNFR των καρδιομυοκυττάρων και της απελευθέρωσής του στην κυκλοφορία από κυστιδία τύπου εξωσωμάτων (Zhang et al. 2008). Η αυξημένη περιεκτικότητα διαλυτών TNFRs μειώνει τη βιοενεργότητα του TNF- α , ενώ ταυτόχρονα παρατείνει το χρόνο ημιζωής του (Sugano et al. 2004).

Ο TNF- α συμβάλλει τόσο στον αντιστρεπτό (συστολική δυσλειτουργία) (Skyschally et al. 2007) όσο και στον μη αντιστρεπτό (έμφραγμα του μυοκαρδίου) τραυματισμό του ιστού (Schulz 2008). Για παράδειγμα, πριν την ισχαιμία, έγινε χορήγηση αντισωμάτων του TNF- α (Belosjorow et al. 2003) ή του διαλυτού TNFR1 (Sugano et al. 2004), σε ζώα που δεν εξέφραζαν TNF- α (Maekawa et al. 2002) ή TNFR1 (Flaherty et al. 2008) και σε όλα μειώθηκε η αποφραχθείσα περιοχή. Τα τελευταία ευρήματα επισημαίνουν τη λειτουργική διαφορά και τις συνέπειες της ενεργοποίησης του TNFR1 ή TNFR2 στον τραυματισμό από ισχαιμία/επαναιμάτωση, όπου μόνο η σηματοδότηση του TNFR1 είναι καταστροφική (Hamid et al. 2009). Ο TNF- α χειροτερεύει την αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας μέσω του TNFR1, ενώ τη βελτιώνει μέσω του TNFR2 (Monden et al. 2007). Ο TNF- α στην αποφραχθείσα περιοχή συντελεί στην απόπτωση των καρδιομυοκυττάρων, ενώ ο ίδιος στην περιοχή γύρω από αυτήν πιθανόν ενεργοποιεί τους ινοβλάστες (ίνωση) (Gurantz et al. 2005), σταθεροποιώντας έτσι την αποφραχθείσα περιοχή και προσελκύει βλαστικά κύτταρα (Chen et al. 2003) για την καρδιακή επιδιόρθωση και καταστολή της φλεγμονής (Bao et al. 2008). Εκτός της σηματοδότησης μέσω των υποδοχέων του, ο TNF- α μπορεί να έχει είτε ευεργετικές είτε καταστροφικές συνέπειες ανάλογα τη συγκέντρωσή του, τον τόπο και τη χρονική στιγμή. Ο ρόλος, λοιπόν, των TNF- α και TNFRs είναι διττός και αντιμαχόμενος (Schulz and Heusch 2009).

Ποντίκια τόσο ελλείπει TNFR1 όσο και TNFR2 εμφάνισαν λιγότερο σχηματισμό ROS (Hamid et al. 2009). Εκτός από αλλαγές στην ομοιόσταση του ασβεστίου, η αυξημένη συγκέντρωση του TNF- α , μειώνει τη συσταλτική λειτουργία, αυξάνοντας το σχηματισμό ROS μέσω αύξησης της ενεργότητας των ενζύμων NOS (συνθάση του οξειδίου του αζώτου, NO) και της οξειδάσης της ξανθίνης (XO) (Ferdinandy et al. 2000). Αυτές οι μορφές ROS απουσιάζουν σε ελλείπει (knock out) TNFR1 ποντίκια, αλλά όχι σε ελλείπει TNFR2 ποντίκια, υποδηλώνοντας ότι η ενεργότητα και των δυο ενζύμων αυξάνεται μέσω της ενεργοποίησης του TNFR1. Ο αυξημένος σχηματισμός ROS προέρχεται, επίσης, από την TNF- α επαγόμενη αναστολή της μεταφοράς ηλεκτρονίων κατά την αναπνευστική αλυσίδα στα μιτοχόνδρια (Lancaster et al. 1989).

Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος οδηγεί στην παραγωγή προφλεγμονωδών μορίων, για παράδειγμα των C3a και C5a αναφυλατοξινών, όπως και του τερματικού συμπλόκου του συμπληρώματος C5b-9 (Caroll 1998). Το C5b-9 είναι μέρος του πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου MAC. Το C5b-9 είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση και έκκριση προφλεγμονωδών μορίων, όπως κυτοκίνες, χημειοκίνες ή αυξητικούς παράγοντες (Morgan 1992, Benzaquen et al. 1994, Niculescu et al. 1997). Οι περισσότερες από αυτές τις επιδράσεις φαίνεται να μεσολαβούν μέσω της C5b-9-επαγόμενης εισροής Ca^{+2} στα κύτταρα, καθώς και μέσω σηματοδότησης μέσω ενεργοποίησης MAP κινασών και του NF-κΒ (Niculescu 1997, 1999). Ο C5b-9 έχει βρεθεί πως εναποτίθεται στο μυοκάρδιο στην διατατική καρδιομυοπάθεια. Επίσης, επάγει σηματοδοτικούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στη σύνθεση του TNF-α, πιθανόν μέσω επαγωγής του μονοπατιού σύνθεσης του TNF-α μέσω ενεργοποίησης του NF-κΒ (Meldrum 1998). Η μελέτη των Zwaka και των συνεργατών του έδειξε ότι η εναπόθεση C5b-9 σε ιστό μυοκαρδίου ασθενών με διατατική καρδιομυοπάθεια σχετίζεται με την έκφραση TNF-α στα καρδιομυοκύτταρα και επειδή το C5b-9 επάγει τη σύνθεση του TNF-α και την απελευθέρωση του από καρδιομυοκύτταρα *in vitro*, προτείνουν ότι το C5b-9 που επιτίθεται στα καρδιομυοκύτταρα μπορεί να συμβάλλει στην αυτοκρινή σύνθεση του TNF-α στο μυοκάρδιο υπό καρδιακή ανεπάρκεια *in vivo* (Zwaka et al. 2002).

1.5 Το πειραματικό μας μοντέλο

Ποντίκια στα οποία έχει απαλειφθεί το γονίδιο δεσμίνης (knock out), αναπτύσσουν παροδική υπερτροφία καρδιομυοκυττάρων, ακολούθως αναπτύσσουν διατατική μυοκαρδιοπάθεια και τελικά καρδιακή ανεπάρκεια (Milner et al. 1996, 1999, Li et al. 1996).

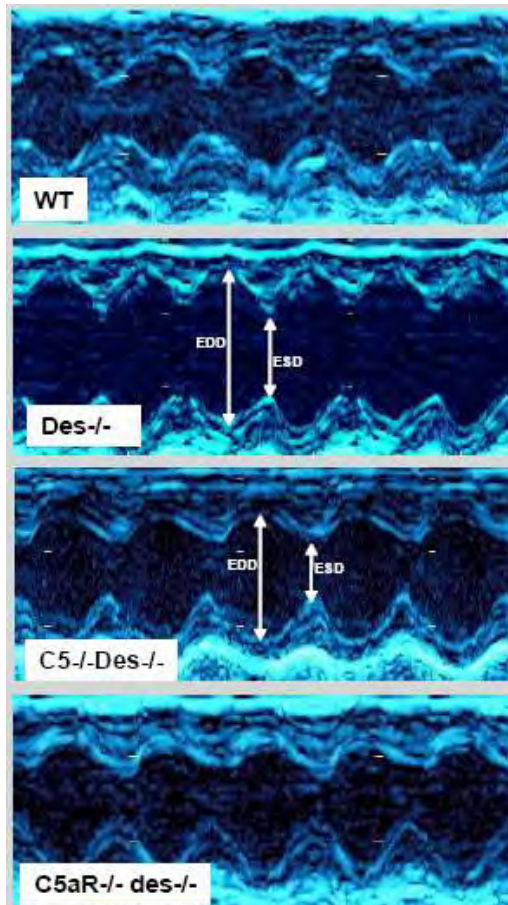
Αυτό το ζωικό μοντέλο καρδιακής ανεπάρκειας (ελλείπει δεσμίνης ποντίκια, Desmin-null) παρουσιάζει ομοιότητες με μοντέλα οξέος εμφράγματος μυοκαρδίου, καθώς και με πρότυπα αρρυθμογενούς δυσπλασίας δεξιάς κοιλίας (ARVD). Πολλαπλές μεταλλάξεις στο ανθρώπινο γονίδιο της δεσμίνης οδηγούν σε μυοπάθειες αμφοτέρης σκελετικής και καρδιακής δυσλειτουργίας ποικίλης έντασης (van Spaendonck-Zwarts, van Hessem et al. 2010). Πάνω από το 50% των φορέων πάσχουν από μυοκαρδιοπάθεια και το 60% περίπου από ασθένειες καρδιακής αγωγιμότητας. Η διατατική μυοκαρδιοπάθεια, η κύρια αιτία καρδιακής ανεπάρκειας, είναι η πιο συχνή μυοκαρδιοπάθεια που σχετίζεται με τη δεσμίνη (Taylor, Slavov et al. 2007).

Η δεσμίνη είναι μία πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού και μία μυο-ειδική πρωτεΐνη των ενδιάμεσων ινιδίων. Η κυτταρική και ιστολογική παθολογία που συνδέεται με την καρδιακή δυσλειτουργία στα Desmin-null ποντίκια έχει εκτιμηθεί επαρκώς. Εν συντομία, τα ποντίκια που στερούνται δεσμίνης, επιδεικνύουν διατάραξη της μυϊκής αρχιτεκτονικής, σε συνδυασμό με μιτοχονδριακές ανωμαλίες, όπως απώλεια φυσιολογικής θέσης, εκτεταμένο πολλαπλασιασμό και συσσώρευση, καθώς και μειωμένη αναπνευστική λειτουργία (Milner et al. 1996, Milner et al. 2000).

Επίσης, παρουσιάζουν εκτεταμένο καρδιομυοκυτταρικό θάνατο από θρομβωτική νέκρωση και μια επακόλουθη οξεία φλεγμονώδη αντίδραση μετά τη δεύτερη εβδομάδα ζωής τους (Mavroidis and Carpetanaki 2002, Psarras et al. 2011). Αυτές οι ανωμαλίες ακολουθούνται από εκφύλιση του μυοκαρδίου με εκτεταμένη ίνωση και δυστροφική εναπόθεση ασβεστίου. Οι μοριακοί μηχανισμοί που διέπουν την ανάπτυξη αυτών των ανωμαλιών είναι κυρίως άγνωστοι (Mavroidis and Carpetanaki 2002).

Σύμφωνα με αδημοσίευτα δεδομένα του εργαστηρίου έχει προκύψει πως το σύστημα του συμπληρώματος παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της παθολογίας στο Des^{-/-} πειραματόζωο. Πιο συγκεκριμένα σε C5^{-/-}Des^{-/-} ποντίκια (όπου C5 είναι το πέμπτο συστατικό του συμπληρώματος) έχει παρατηρηθεί σημαντική μείωση εναπόθεσης ασβεστίου και ίνωσης κατά 30% και βελτιωμένη καρδιακή λειτουργία (Fraction Shortening, FS) σε σχέση με Des^{-/-} (Εικόνα 1.2). Η βελτιωμένη καρδιακή λειτουργία με τον ίδιο τρόπο έχει παρατηρηθεί και σε C5aR^{-/-}Des^{-/-} ποντίκια (όπου C5aR είναι ο υποδοχέας της C5a αναφυλατοξίνης του συμπληρώματος) σε σύγκριση με Des^{-/-} σε διάφορες ηλικίες (Εικόνα 1.2).

Οι συνέπειες της ενεργοποίησης του συστατικού του συμπληρώματος C5a (74 αμινοξέων γλυκοπρωτεΐνη) εξαρτώνται από τη θέση του υποδοχέα του C5a. Η έκφραση του C5aR υποδοχέα (CD88), είναι ευρέως διαδεδομένη και συνεπώς το C5a επάγει ένα ευρύ φάσμα βιολογικών λειτουργιών (Manthey et al. 2009). Ο CD88 ανήκει στους υποδοχείς που συνδέονται με G πρωτεΐνες. (Monk et al. 2007). Κύτταρα της μυελώδους σειράς και ενεργοποιημένα σιτευτικά κύτταρα εκφράζουν τον CD88 και ενεργοποιούνται από το C5a. Ανάλογα τον τύπο κυττάρου, η σύνδεση του C5a στον CD88 οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων του ενδοκυτταρικού ασβεστίου και ενεργοποίηση ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών συνοδευόμενη με πλήθος λειτουργικών αποκρίσεων, όπως προσέλκυση και ενεργοποίηση φλεγμονωδών κυττάρων, απόπτωση, φαγοκύττωση, οξειδωτικό στρες, παραγωγή κυτοκινών και χημειοκινών, αγγειοδιαστολή, κα (Guo and Ward, 2005). Πλέον είναι γνωστό ότι ο CD88 εκφράζεται επίσης και από μη μυελοειδή κύτταρα, όπως από καρδιομυοκύτταρα, προκαλώντας μια ποικιλία αποκρίσεων (Monk et al. 2007).



Εικόνα 1.2 Αντιπροσωπευτικά υπερηχοκαρδιογραφήματα ζώων 4 μηνών, όπου φαίνεται η βελτιωμένη καρδιακή λειτουργία εκφρασμένη ως $FS(\%) = [(EDD-ESD)/EDD] \times 100$, στα $C5^{-/-}Des^{-/-}$ και $C5aR^{-/-}Des^{-/-}$ ποντίκια σε σχέση με τα $Des^{-/-}$ (EDD, τελο-διαστολική διάσταση, ESD, τελο-συστολική διάσταση)

Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να διερευνήσουμε, το ρόλο του υποδοχέα του C5a (C5aR) σε πειραματόζωα μοντέλα με καρδιακή ανεπάρκεια ($Des^{-/-}$). Για το σκοπό αυτό έγινε συγκριτική μελέτη σε ποντίκια με διπλή έλλειψη των γονιδίων της δεσμίνης και του C5aR ($C5aR^{-/-}Des^{-/-}$) και σε $Des^{-/-}$, διερευνώντας το ρόλο τόσο της φλεγμονής όσο και του οξειδωτικού στρες στην ανάπτυξη παθολογίας (φλεγμονώδης αντίδραση, αναδιαμόρφωση καρδιακού ιστού). Θα εξετάσουμε, λοιπόν, την υπόθεση αν η βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας (Fraction Shortening, FS) που έχει παρατηρηθεί στα $C5aR^{-/-}Des^{-/-}$ ποντίκια σε σύγκριση με τα $Des^{-/-}$, μπορεί να αποδοθεί εν μέρει στη μείωση του οξειδωτικού στρες και της φλεγμονώδους αντίδρασης.

Ο ρόλος της υπεροξειδωσης λιπιδίων και πρωτεϊνών που σχετίζονται με την ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης των καρδιομυοκυττάρων και ο ρόλος της φλεγμονώδους αντίδρασης στην οξειδωτική επιβάρυνση και όχι μόνο, θα συγκριθεί στα αναφερθέντα ζωικά μοντέλα μέσω:

- ✓ Ιστολογικής εκτίμησης της ίνωσης και της δυσμενούς αναδιαμόρφωσης του καρδιακού ιστού
- ✓ Εκτίμησης της απώλειας της σαρκολειματικής ακεραιότητας με τη μέθοδο Evans Blue Dye
- ✓ Προσδιορισμού της υπεροξειδωσης λιπιδίων ή/και πρωτεϊνών με τη μέθοδο μαλονδιαλδεύδης (MDA)
- ✓ Υπολογισμού της συγκέντρωσης του δείκτη φλεγμονής TNF-α.

2. Υλικά & Μέθοδοι

2.1 Ζωικά πρότυπα

Τα πειραματόζωα μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν στην εν λόγω μελέτη ήταν ποντίκια αρσενικά ή θηλυκά α) αγρίου τύπου (wt), β) ποντίκια που δεν εκφράζουν (knock out) δεσμίνη (Des^{-/-}) τα οποία είχαν κατασκευασθεί από δύο ερευνητικές ομάδες (Milner et al., 1996, Li et al., 1996) και γ) ποντίκια που δεν εκφράζουν τον υποδοχέα CD88 της πρωτεΐνης του συμπληρώματος C5a (C5aR^{-/-}). Τα ποντίκια αυτά είχαν κατασκευαστεί από την ερευνητική ομάδα του Gerard C (Hopken et al., 1996). Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν και δ) ποντίκια με διπλή έλλειψη γονιδίων της δεσμίνης και του C5aR υποδοχέα (C5aR^{-/-}Des^{-/-}).

Όλα τα πειραματόζωα μοντέλα φυλάσσονταν σε κλωβούς σε ειδικά διαμορφωμένο περιβάλλοντα χώρο, ελεύθερο παθογόνων (specific pathogen free, SPF), σύμφωνα με τα σύγχρονα διεθνή πρότυπα [Association for the Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC) και Federation of European Laboratory Animal Science Association (FELASA), για περισσότερες πληροφορίες βλ. www.bioacademy.gr/lab/lab.php?lb=25].

Για τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια κυρίως δυο ηλικιών. Ποντίκια ηλικίας 16-30 ημερών όπου παρατηρείται η αρχική εκφύλιση του μυοκαρδίου και η έναρξη της φλεγμονώδους αντίδρασης και ποντίκια 4 μηνών όπου είναι έκδηλα τα συμπτώματα της καρδιακής ανεπάρκειας. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν και ποντίκια ηλικίας 11 μηνών όπου η καρδιακή ανεπάρκεια στα Des^{-/-} ποντίκια είναι τελικού σταδίου (εικόνα 1.2)

2.2 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA

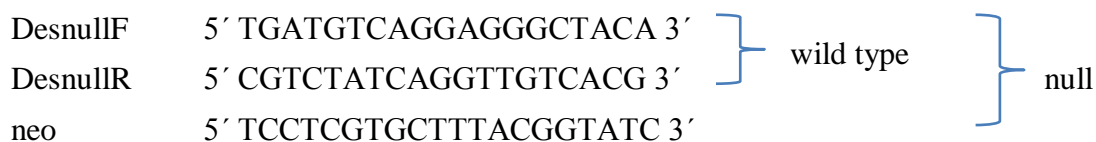
Για την εύρεση του γενοτύπου των διαγονιδιακών ποντικών χρησιμοποιήθηκε γονιδιωματικό DNA, το οποίο απομονώθηκε από τμήμα ουράς. Αρχικά, ο ιστός επωάζεται στους 55°C σε διάλυμα πρωτεΐνάσης K (Sigma-Aldrich) (0,6mg/ml σε 50mM Tris HCl pH 7.5, 100mM EDTA και 0.5% SDS) για τουλάχιστον 8 ώρες. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται διπλός καθαρισμός σε ίσο όγκο φαινόλης (pH 8) και ομοίως σε ίσο όγκο διαλύματος χλωροφορμίου: ισοαμλικής αλκοόλης (24:1). Ακολουθεί κατακρήμνιση με προσθήκη οξικού νατρίου pH 6.0 σε τελική συγκέντρωση 300mM και διπλάσιου όγκου αιθανόλης 100% (-20°C). Το ίζημα επαναδιαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα TE (5mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA) και φυλάσσεται στους 4°C.

2.3 Ανάλυση γονιδιωματικού DNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιείται συνήθως για την ενίσχυση μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA, η οποία βρίσκεται ανάμεσα σε δύο περιοχές γνωστής αλληλουχίας. Στην αντίδραση χρησιμοποιούνται δύο εναρκτήριες αλληλουχίες ως εναρκτήρια μόρια για μία σειρά από συνθετικές αντιδράσεις, οι οποίες καταλύονται από μία DNA πολυμεράση, την Taq πολυμεράση, η οποία είναι ανθεκτική σε υψηλές θερμοκρασίες. Η κάθε εναρκτήρια αλληλουχία είναι συμπληρωματική με τη μία, εκ των δύο, αλυσίδα της μήτρας DNA. Αρχικά, πραγματοποιείται αποδιάταξη της μήτρας DNA με θέρμανση. Το μίγμα της αντίδρασης, στη συνέχεια, ψύχεται σε θερμοκρασία επανασύνδεσης, η οποία επιτρέπει την υβριδοποίηση των εναρκτήριων μορίων με τις συμπληρωματικές αλυσίδες και τέλος, πραγματοποιείται επιμήκυνση των αναδιαταγμένων μορίων από την DNA πολυμεράση. Ο κύκλος της αποδιάταξης, επανασύνδεσης και επιμήκυνσης επαναλαμβάνεται πολλές φορές και τα προϊόντα κάθε κύκλου χρησιμοποιούνται ως μήτρα DNA στους επόμενους κύκλους.

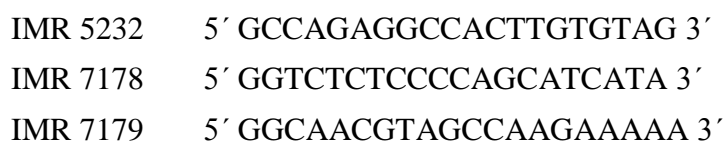
Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η μέθοδος εφαρμόστηκε για τον έλεγχο του γενοτύπου των διαγονιδιακών ποντικών. Ο έλεγχος γίνεται με απομόνωση γονιδιωματικού DNA από τα προς εξέταση ποντίκια, με τον τρόπο που περιγράφηκε στην προηγούμενη παράγραφο.

➤ Για τον έλεγχο της γονιδιακής απενεργοποίησης της δεσμίνης χρησιμοποιήθηκε η Taq πολυμεράση της QIAGEN, dNTPs και οι ακόλουθοι εκκινητές:



Οι τελικές συγκεντρώσεις των εκκινητών είναι 0,4μM, 0,2μM και 0,03μM αντίστοιχα. Οι συνθήκες της αντίδρασης περιλαμβάνουν: 10' στους 96°C, 35 επαναλήψεις του κύκλου: 1' στους 94°C, 2' στους 60°C και 3' στους 72°C, τέλος 5' στους 72°C και 15' στους 4 °C. Το αλληλόμορφο άγριου τύπου της δεσμίνης Des+/+ δημιουργεί ζώνη μεγέθους 700bp, ενώ το διαγονιδιακό αλληλόμορφο Des-/- δημιουργεί ζώνη μεγέθους 390bp.

➤ Για τον έλεγχο της γονιδιακής απενεργοποίησης του C5aR χρησιμοποιήθηκε η Taq πολυμεράση της QIAGEN, dNTPs και το ακόλουθο ζευγάρι εκκινητών:



Η τελική συγκέντρωση όλων των εκκινητών είναι 1,92μM. Οι συνθήκες της αντίδρασης περιλαμβάνουν: 3' στους 94°C, 35 επαναλήψεις του κύκλου: 1' στους 94°C, 1' στους 60°C και 1' στους 72°C, τέλος 2' στους 72°C και 30' στους 4 °C. Το

αλληλόμορφο άγριου τύπου του C5aR+/+ δημιουργεί ζώνη μεγέθους 386bp, ενώ το διαγονιδιακό αλληλόμορφο C5aR-/- δημιουργεί ζώνη μεγέθους 244bp.

Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR αναλύονται με ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.

2.4 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση όλων των PCR προϊόντων πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης. Μόρια DNA, μεγέθους 200b-50kb, μπορούν να διαχωριστούν σε πηκτώματα αγαρόζης διαφόρων συγκεντρώσεων. Όταν το πήκτωμα βρίσκεται σε ηλεκτρικό πεδίο, το DNA, το οποίο σε ουδέτερο pH είναι αρνητικά φορτισμένο, κινείται προς την άνοδο με ρυθμό αντιστρόφως ανάλογο του λογαρίθμου (log10) του μοριακού βάρους του. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης εξαρτάται επίσης και από τη συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα. Ο πίνακας που ακολουθεί παρουσιάζει την αντιστοιχία μεταξύ της αναλογίας αγαρόζης στο πήκτωμα και του μεγέθους των τμημάτων του DNA που μπορούν να αναλυθούν.

Ποσοστό % αγαρόζης	Μέγεθος DNA (kb)
0.3	60-5
0.6	20-1
0.7	10-0.8
0.9	7-0.5
1.2	6-0.4
1.5	4-0.2
2.0	3-0.1

Σε 100ml διαλύματος ηλεκτροφόρησης TAE (0.04M Tris-acetate, 0,001M EDTA) διαλύεται με θέρμανση στους 100°C η αντίστοιχη ποσότητα αγαρόζης. Στη συνέχεια, προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 1 µg/ml και το διάλυμα στερεοποιείται σε υποδοχέα-μήτρα διαστάσεων 15x22cm. Τα δείγματα του DNA αναλύονται σε οριζόντιες συσκευές ηλεκτροφόρησης, υπό σταθερή τάση 45-70V.

2.5 Ιστολογικές χρώσεις

Οι καρδιακοί ιστοί που χρησιμοποιήθηκαν για τις ιστολογικές χρώσεις προέρχονται από πειραματόζωα που θυσιάστηκαν με αυχενική μετατόπιση, μετά από αναισθησία με αιθέρα. Μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα φορμαλίνης 10% ή παραφορμαλδεΐδης 4% για τουλάχιστον 8 ώρες και στη συνέχεια επώαστηκαν σε διάλυμα σουκρόζης 30% σε PBS για τρεις με τέσσερις ώρες. Για την αφυδάτωση των ιστών χρησιμοποιήθηκε σειρά διαλυμάτων με αυξανόμενη συγκέντρωση αιθανόλης (70%, 80%, 90%, 95% και 100%). Ο αφυδατωμένος ιστός επωάζεται στη συνέχεια

δύο φορές σε 100% ξυλόλη, σε απαγωγό, για 20'. Ακολουθεί επώαση σε διάλυμα ξυλόλης/παραφίνης (1:1), στους 65°C για 45'. Τέλος, ο ιστός εμβαπτίζεται σε 100% παραφίνη στους 65°C, εγκλείεται σε παραφίνη και φυλάσσεται στους 4°C. Από τα μπλοκ παραφίνης κόβονται τομές πάχους 5μm με μικροτόμο, οι οποίες φυλάσσονται σε δροσερό μέρος.

Αρχικά, οι τομές πριν εφαρμοστεί κάποιου είδους χρώση, υπόκεινται σε αποπαραφίνοποίηση και ενυδάτωση, προκειμένου να μπορέσει η υδατοδιαλυτή χρωστική να βάλει τον ιστό.

2.5.1 Χρώση τομών με αιματοξυλίνη/εωζίνη

Η αιματοξυλίνη βάφει τους πυρήνες ιώδεις, ενώ η εωζίνη βάφει το κυτταρόπλασμα ροζ. Η πειραματική διαδικασία είναι η εξής:

- Επώαση σε διάλυμα αιματοξυλίνης για 1' σε θερμοκρασία δωματίου (RT)
- 3 εκπλύσεις με απεσταγμένο νερό
- Επώαση σε διάλυμα εωζίνης (eosin Y 0,5% w/v) για 1' σε RT
- 3 εκπλύσεις με απεσταγμένο νερό

Έπειτα από τη χρώση οι τομές αφυδατώθηκαν, όπως περιγράφηκε, και εγκλείστηκαν με τη χρήση υλικού έγκλεισης Depex (mounting medium, Serva) και καλυπτρίδα.

2.5.2 Χρώση τομών με Masson's trichrome

Η τριχρωμία Masson's βάφει τους πυρήνες καφέ, το κυτταρόπλασμα ροζ και το κολλαγόνο ιώδες/μπλε. Η πειραματική διαδικασία περιγράφεται ως ακολούθως:

- Επώαση σε διάλυμα αιματοξυλίνης για 1' σε RT
- Επώαση σε διάλυμα "ερυθρό του Mallory" (Fuscin acid 0,5%, glacial acetic acid 0,5%) για 1' σε RT
- Επώαση σε διάλυμα φωσφορομολυβδικού οξέος 1%, για 2' σε RT
- Επώαση σε διάλυμα μεθυλικού μπλε (methyl blue), για 1' σε RT

Έπειτα από τη χρώση οι τομές αφυδατώθηκαν, όπως περιγράφηκε, και εγκλείστηκαν με τη χρήση υλικού έγκλεισης Depex (mounting medium, Serva) και καλυπτρίδα.

2.5.3 Αξιολόγηση του "replacement index"

Το "replacement index" είναι ένας δείκτης βλάβης του καρδιακού ιστού και αντιπροσωπεύει την αντικατάσταση του καρδιακού ιστού με ινωτικό ιστό και/ή ασβέστωση και/ή διήθηση φλεγμονωδών κυττάρων. Είναι της κλίμακας 0 έως 4, όπου 0 ορίζονται οι φυσιολογικές καρδιές, 1= καρδιές με μία ή δύο εστίες περιορισμένης αντικατάστασης, συνήθως στην δεξιά κοιλία, 2= καρδιές με δύο - τρεις εστίες σε δύο διαφορετικές περιοχές του καρδιακού ιστού, 3= καρδιές με πολλαπλές εστίες εκτεταμένης αντικατάστασης, συνήθως σε όλα τα κοιλιακά διαμερίσματα (δεξιά και αριστερά κοιλιακά ελεύθερα τοιχώματα και διάφραγμα), 4= καρδιές με πολλαπλές εστίες εκτεταμένης και διάχυτης ίνωσης που καταλαμβάνει περισσότερο από το 50% της επιφάνειας του μυοκαρδίου στη συγκεκριμένη τομή.

Για τη μέτρηση του “replacement index” οι καρδιές τμήθηκαν στα δυο, κατά το διαμήκη άξονα και εγκλείστηκαν σε παραφίνη. Αναλύθηκαν οχτώ τομές ανά καρδιά για κάθε ζώο (από δύο ανεξάρτητους παρατηρητές). Στις τομές παραφίνης υπήρχαν όλα τα τμήματα της καρδιάς (δεξιά και αριστερή κοιλία και κόλποι)

2.5.4 Εκτίμηση της μεμβρανικής ακεραιότητας με έγχυση της χρωστικής Evans blue

Η απώλεια της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης υποδεικνύεται με την ενδοκυτταρική χρώση πρωτεϊνών του ορού και Evans Blue Dye (EBD). Το κύριο χαρακτηριστικό της EBD είναι η ικανότητά της να σχηματίζει ένα ισχυρό σύμπλοκο με την αλβουμίνη του ορού μέσα σε δευτερόλεπτα μετά την έγχυση της στην κυκλοφορία (Reeve, 1957) και να βάφει ενδοκυττάρια τα κύτταρα που έχουν πρόβλημα μεμβρανικής ακεραιότητας.

Η πορεία έγινε όπως περιγράφεται από τον Straub και τους συνεργάτες του (Straub et al., 1997). Αρχικά, παρασκευάζουμε διάλυμα EBD σε ρυθμιστικό φωσφορικό αλατούχο διάλυμα (PBS) (0,15M NaCl, 10mM phosphate buffer, pH 7.4) με τελική συγκέντρωση 10mg EBD/ml PBS. Εγχύουμε το διάλυμα (50μl/10g βάρος σώματος του ζώου) στην περιτοναϊκή κοιλότητα χωρίς αναισθησία. Την επόμενη μέρα θυσιάζουμε το ζώο με τη χορήγηση διαλύματος χλωριούχου καλίου (10mg/ml) σε PBS. Ύστερα, ενσωματώνουμε την καρδιά σε OCT compound και την παγώνουμε στους -80°C, ώστε με τη βοήθεια κρυο-μικροτόμου να έχουμε τομές 10μm. Μονιμοποιούμε τις τομές με κρύα ακετόνη (-20°C) για 10'. Ξεπλένουμε με PBS 3 φορές για 15'. Τέλος, προσθέτουμε τη χρωστική DAPI και εγκλείουμε τον ιστό με το μέσο έγκλεισης (Vectashield mounting medium, Vector Laboratories, Inc.) και καλυπτρίδα. Η χρώση με EBD παρουσιάζει μια έντονη ερυθρή εκπομπή (διεγείρεται στα 620nm και εκπέμπει στα 680nm).

Οι καρδιές τμήθηκαν κατά μήκος του διαμήκη άξονα και αναλύθηκαν πέντε τομές ανά καρδιά ανά ζώο. Ο υπολογισμός των θετικών, ως προς τη χρώση EBD, καρδιομυοκυττάρων έγινε ανεξάρτητα από δύο ερευνητές σε μικροσκόπιο φθορισμού.

2.5.5 Ανοσοφθορισμός

Ο ανοσοφθορισμός είναι μια μέθοδος κατά την οποία χρησιμοποιούνται φθορίζοντα αντισώματα για την ανίχνευση και εντόπιση μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης σε ιστούς ή κύτταρα. Σε τομές καρδιακών ιστών από ποντίκια που τους χορηγήθηκε EBD, με τον τρόπο που περιγράφουμε στην προηγούμενη παράγραφο, πραγματοποιήθηκε ανοσοφθορισμός για την α-ακτινίνη, μία πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού που βάφει ειδικά τα μυοκαρδιοκύτταρα. Αρχικά, η μονιμοποίηση του ιστού περιλαμβάνει 1' σε 2% φορμαλίνη/PBS, πλύσιμο με PBS και μετά 5' με αιθανόλη 100% (-20°C) και ξέπλυμα του ιστού για 2' με PBS. Στη συνέχεια, “μπλοκάρουμε” τις τομές για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με 10% αλβουμίνη RIA (Aplichem) σε διάλυμα PBS. Έπειτα προσθέτουμε το πρώτο αντίσωμα (mouse anti-a-actinin), το οποίο είναι σε διάλυμα 10% αλβουμίνης RIA (Aplichem) σε PBS-

Tween-20 0,1% με αναλογία 1:1000 και επωάζεται για όλο το βράδυ στους 4°C. Την επομένη πλένουμε τις τομές με PBS-Tween-20 0,01% 2 φορές για 5' και επωάζουμε τις τομές με το δεύτερο αντίσωμα (donkey anti-mouse-alexa-488) το οποίο φθορίζει σε πράσινο μήκος κύματος. Τέλος, πλένουμε τις τομές με PBS-Tween-20 0,1% 2 φορές για 5' προσθέτουμε τη χρωστική DAPI η οποία δεσμεύεται στο DNA και φθορίζει στο μπλέ και εγκλείουμε τον ιστό με το μέσο έγκλεισης (DAKO Fluor, fluorescence mounting medium).

2.5.6 Μικροσκοπία

Οι ιστολογικές χρώσεις των τομών που βάφτηκαν με H/E και Masson's trichrome, παρατηρήθηκαν και αναλύθηκαν σε οπτικό φωτονικό μικροσκόπιο της εταιρείας Zeiss, μοντέλο AxioPhot (Zeiss-AxioPhot οπτικό φωτομικροσκόπιο), ενώ η λήψη των εικόνων έγινε με τη βοήθεια ψηφιακής κάμερας της εταιρείας Leica, μοντέλο DC-500. Τέλος, η ανάλυση των εικόνων αυτών έγινε με τη βοήθεια του λογισμικού ανάλυσης εικόνας IM50 της εταιρείας Leica.

Η παρατήρηση, καθώς και η ανάλυση των χρώσεων EBD, πραγματοποιήθηκε σε μικροσκόπιο φθορισμού της εταιρείας Leica, μοντέλο CTR το οποίο είχε κάμερα Leica DFC 350 FX και το πρόγραμμα Leica Application suite V3.6.

2.6 Εκχύλιση πρωτεϊνών από καρδιακό ιστό.

Προκειμένου να διερευνηθεί η παρουσία διαφόρων πρωτεϊνών σε ολικά εκχυλίσματα από καρδιές ποντικών διαφόρων γενοτύπων, οι ιστοί αρχικά κονιορτοποιούνται ως ακολούθως. Μετά τη θυσία, η καρδιά βυθίζεται σε υγρό άζωτο για να πραγματοποιηθεί άμεση ψύξη. Κατόπιν ο ιστός μεταφέρεται σε ιγδίο όπου και λειοτριβείται με τη χρήση υγρού αζώτου. Οι κονιορτοποιημένοι ιστοί μπορούν να φυλαχτούν σε υπερ-καταψύκτη -80°C, ή να προχωρήσουν απευθείας σε διαδικασία εκχύλισης.

2.6.1 Εκχύλιση πρωτεϊνών για ELISA, και MDA ανάλυση

Στον κονιορτοποιημένο καρδιακό ιστό προστίθεται κρύο ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης [extraction buffer: PBS + 2mM αιθυλοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA), 0,1% Tween-20, 1mM διθειοθρεϊτόλη (DTT), 0,2mM Na₂VO₃, 1mM NaF], καθώς και ξεχωριστά βενζαμιδίνη, βουτυλυδροξυτολουένιο (BHT, αντιοξειδωτικό για αποτροπή περαιτέρω οξειδωσης κατά την ομογενοποίηση) με 2mM και 5mM τελική συγκέντρωση αντίστοιχα και αναστολείς πρωτεασών (protease inhibitors, Sigma).

Το μίγμα ομογενοποιείται με τη βοήθεια ηλεκτρικού ομογενοποιητή τύπου polytron και τοποθετείται σε υδατόλουτρο υπερήχων για 1'. Εν συνεχεία, επωάζουμε το ομογενοποίημα σε ανακινητή τύπου rocker για 15' στους 4°C. Ακολούθως φυγοκεντρούμε για 10' στα 13000g, στους 4°C. Κρατάμε το υπερκείμενο (ELISAsup) για TNFα και MDA ανάλυση (βλέπε επόμενες παραγράφους), καθώς και το ίζημα

(pellet), στους -80°C . Όλη η διαδικασία γίνεται στον πάγο. Επίσης, δημιουργούμε aliquots έτσι ώστε τα δείγματα να ξεπαγώνονται μία φορά.

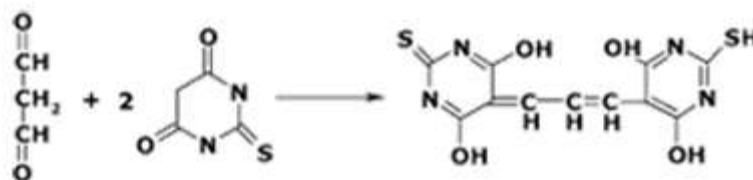
2.7 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Με τη μέθοδο Bradford προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στα διάφορα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα. Η δέσμευση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue στα βασικά κυρίως αμινοξέα των πρωτεϊνών αποτελεί τη βάση αυτής της μεθόδου. Η δέσμευση αυτή είναι ανάλογη της ποσότητας της πρωτεΐνης και μετατοπίζει το μήκος κύματος της μέγιστης απορρόφησης της χρωστικής από τα 470 nm στα 595 nm. Το χρώμα του συμπλόκου πρωτεΐνης-χρωστικής είναι σταθερό για μια ώρα περίπου και έχει υψηλό μοριακό συντελεστή απορρόφησης που συνεπάγεται υψηλή ευαισθησία στις ποσοτικές μετρήσεις πρωτεϊνικών δειγμάτων.

Σε 10μl πρωτεϊνικού δείγματος προσθέτουμε 70μl H_2O . Στη συνέχεια, αναδεύουμε και προσθέτουμε 720μl Bradford Reagent (Sigma). Επαναλαμβάνουμε την ανάδευση και αφήνουμε το διάλυμα να επωαστεί στο σκοτάδι για 15'. Η απορρόφηση 0,2ml του δείγματος μετράται στα 595nm χρησιμοποιώντας μετρητή ELISA plate SpectraMax 190, ο οποίος χρησιμοποιεί για ανάλυση το πρόγραμμα Soft Max Pro (Molecular Devices). Με τη βοήθεια διαλυμάτων αλβουμίνης ορού βοός (BSA) γνωστών συγκεντρώσεων 0,02-2mg/ml, κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη από την οποία υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων σε πρωτεΐνη. Όλες οι μετρήσεις γίνονται εις διπλούν.

2.8 Μέτρηση υπεροξειδωσης λιπιδίων με τη μέθοδο MDA

Η μαλονδιαλδεΐδη (MDA), που παράγεται όπως έχουμε αναφέρει από την υπεροξειδωση των λιπαρών οξέων (βλ. παράγραφο 1.4), μετράται συνήθως για την ποσοτικοποίηση του τελευταίου σταδίου ή της χρόνιας υπεροξειδωσης λιπιδίων. Η μέθοδος βασίζεται στην αντίδραση της MDA με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA) όπου σχηματίζεται ένα MDA-TBA₂ σύμπλοκο (Εικόνα 2.1) που απορροφά στα 532nm. Η μέθοδος υπολογίζει και την MDA που προσδένεται σε αμινοξέα, όπως τη λυσίνη, για το σχηματισμό MDA-πρωτεϊνικών προϊόντων (Botsoglou et al. 1994).



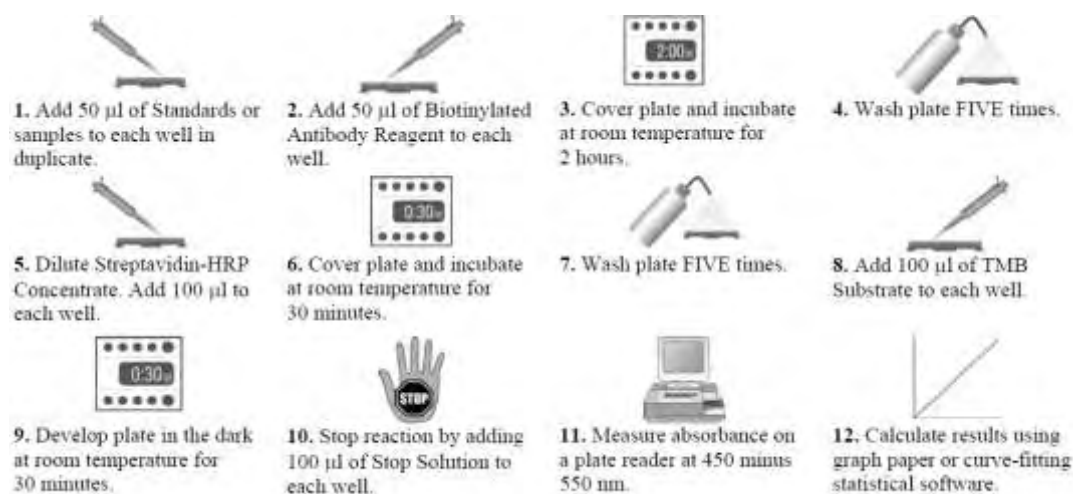
Εικόνα 2.2 Αντίδραση μαλονδιαλδεΐδης - θειοβαρβιτουρικού οξέος για τη δημιουργία συμπλόκου.

Σε 50μl καρδιακών εκχυλισμάτων, που απομονώθηκαν όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.6.1 (ELISA sup), προσθέτουμε 375μl φωσφορικού οξέος 0,15M και 125μl TBA 50mM σε 0,5xPBS pH 7, αναδεύουμε για 1' και επωάζουμε για 60' στους 95°C. Αφήνουμε τα δείγματα για 2' σε θερμοκρασία δωματίου να κρυώσουν και τα φυγοκεντρούμε για 15' στα 3000rpm. Κατόπιν 200μl από το υπερκείμενο φωτομετρούνται σε ELISA reader (SpectraMax 190) στα 532nm. Η πρότυπη καμπύλη κατασκευάζεται χρησιμοποιώντας διαδοχικές συγκεντρώσεις 1,95-125μM δις-μαλονδιαλδεύδη (διαίθυλ ακετάλη, συνώνυμη ονομασία 1,1,3,3-τετρααιθοξυπροπανίο, TEP). Όλες οι μετρήσεις γίνονται εις διπλούν.

2.9 Εύρεση συγκέντρωσης TNF-α

Η συγκέντρωση του παράγοντα νέκρωσης όγκου άλφα (TNF-α) σε καρδιακά εκχυλίσματα (τύπου ELISA sup, βλέπε παράγραφο 2.6.1) και ορούς αίματος έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Mouse TNFα ELISA Kit της Thermo Scientific. Η πορεία φαίνεται αναλυτικά στην Εικόνα 2.2. Όλες οι μετρήσεις έγιναν εις διπλούν.

Η ευαισθησία της μεθόδου είναι <9 pg/ml TNF και το εύρος μετρήσεων είναι για συγκεντρώσεις 50-2.450 pg/ml. Αυτή η ELISA είναι ειδική για τη μέτρηση του φυσικού και ανασυνδυασμένου TNF-α από ποντίκια. Δεν αντιδρά με: IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, GM-CSF, IFNγ από ποντίκια ή με τον TNF-α ανθρώπου.



Εικόνα 3.2 Αναπαράσταση του συνόλου των διαδικασιών για την TNFα ELISA.

2.10 Στατιστική ανάλυση

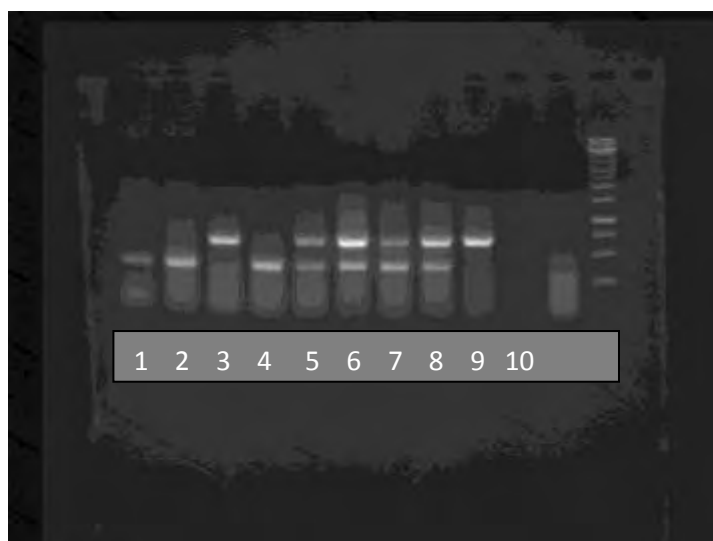
Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέσοι όροι ± τυπικό σφάλμα για συνεχείς μεταβλητές. Οι στατιστικές συγκρίσεις έγιναν χρησιμοποιώντας (unpaired) Student's *t*-test. Μια τιμή θεωρείται στατιστικά σημαντική για $p < 0,05$.

3. Αποτελέσματα

3.1 Γενοτύπηση διαγονιδιακών ποντικών με PCR.

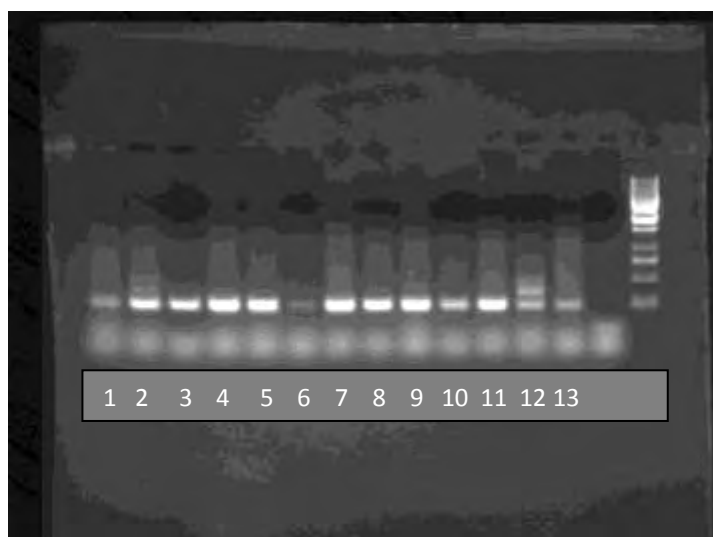
Όπως έχουμε αναφέρει στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια αγρίου τύπου (wt), ποντίκια με απαλοιφή του γονιδίου της δεσμίνης (Des^{-/-}) και ποντίκια με ταυτόχρονη απαλοιφή των γονιδίων της δεσμίνης και του υποδοχέα του συμπληρώματος C5aR (C5aR^{-/-}Des^{-/-}). Για τον έλεγχο του γενοτύπου των διαγονιδιακών ποντικών απομονώθηκε DNA από τμήμα της ουράς του ζώου και έγινε ανάλυση με PCR. Η ανάλυση των PCR προϊόντων έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 1,5%.

Στην Εικόνα 3.1 φαίνονται τα αποτελέσματα μιας ενδεικτικής PCR ανάλυσης για τη δεσμίνη. Το αλληλόμορφο αγρίου τύπου της δεσμίνης Des^{+/+} δημιουργεί ζώνη μεγέθους 700bp, ενώ το διαγονιδιακό αλληλόμορφο Des^{-/-} δημιουργεί ζώνη μεγέθους 390bp. Για παράδειγμα η στήλη νούμερο 1, αντιστοιχεί σε Des^{-/-} γενότυπο, η στήλη 3 σε Des^{+/+}, και η στήλη 5 σε ετερόζυγα Des^{+/-}. Οι δύο τελευταίες στήλες είναι το τυφλό και ο μάρτυρας DNA γνωστών μεγεθών (DNA ladder 1kb, GeneRuler).



Εικόνα 4.1 Ηλεκτροφόρηση PCR προϊόντων για δεσμίνη.

Στην Εικόνα 3.2 απεικονίζονται τα αποτελέσματα μιας ενδεικτικής PCR ανάλυσης για το C5aR. Το αλληλόμορφο άγριου τύπου του C5aR^{+/+} δημιουργεί ζώνη μεγέθους 386bp, ενώ το διαγονιδιακό αλληλόμορφο C5aR^{-/-} δημιουργεί ζώνη μεγέθους 244bp. Παρατηρούμε, λοιπόν, πως όλα τα δείγματα είναι C5aR^{-/-}, εκτός από δύο (στήλες 2 και 12) που είναι ετερόζυγα C5aR^{+/-}. Οι δύο τελευταίες στήλες είναι το τυφλό και ο μάρτυρας DNA γνωστών μεγεθών (DNA ladder 1kb, GeneRuler).



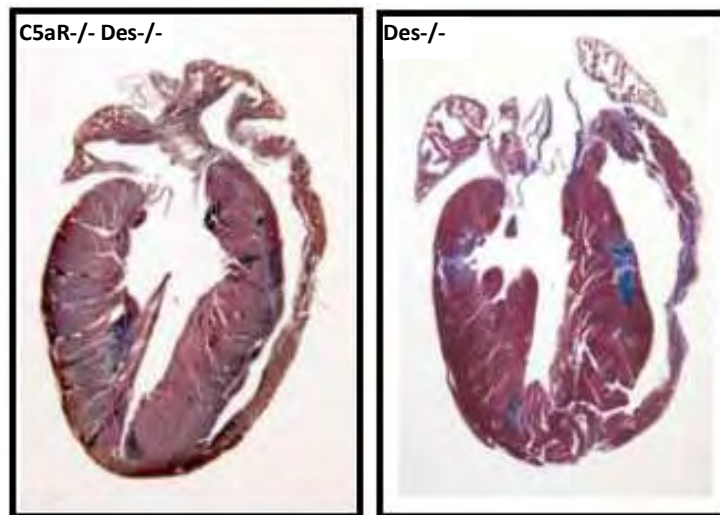
Εικόνα 3.2 Ηλεκτροφόρηση PCR προϊόντων για C5aR.

3.2 Συγκριτική ιστολογική ανάλυση του καρδιακού ιστού σε Des^{-/-} και C5aR^{-/-}Des^{-/-} ποντίκια.

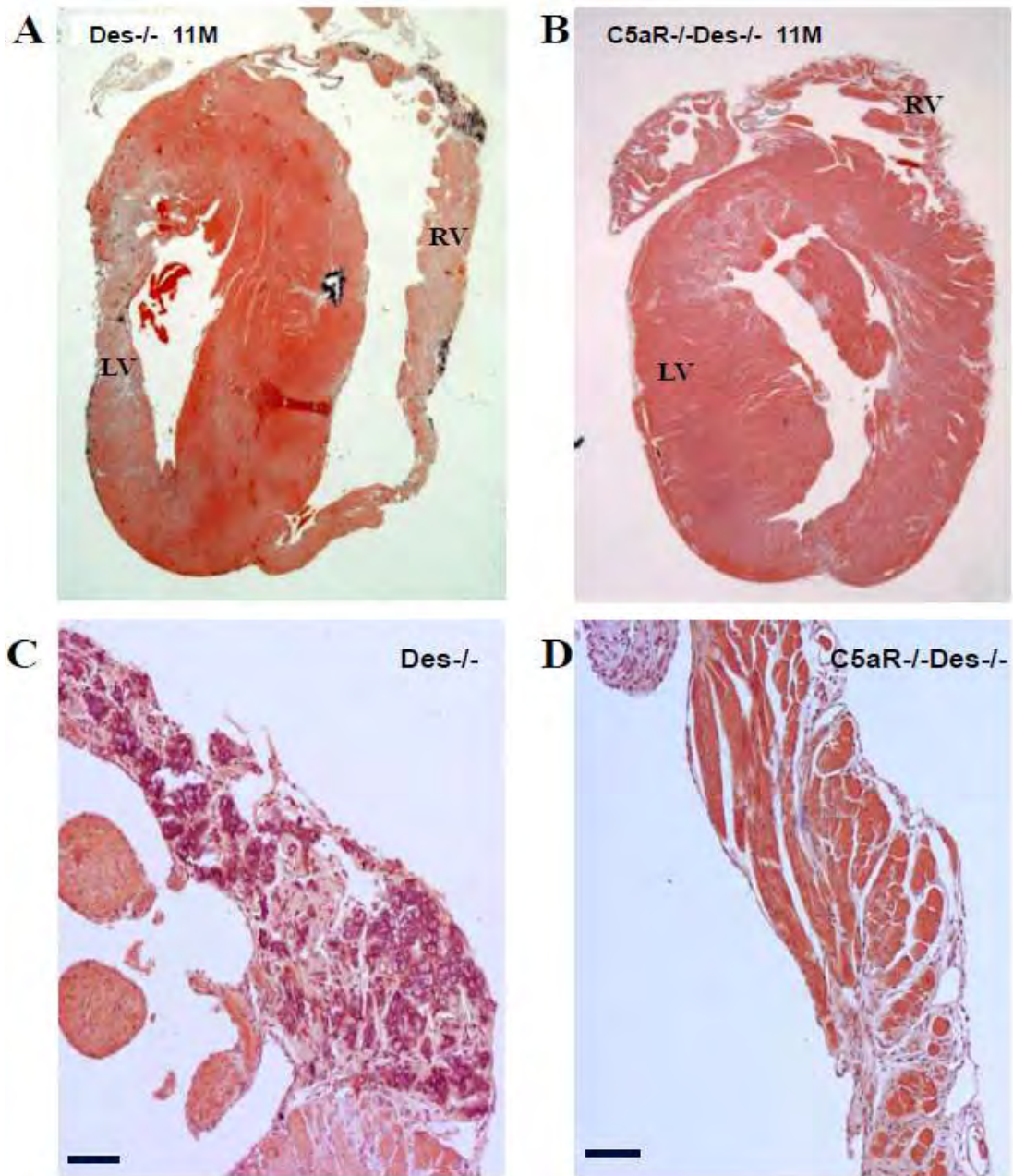
Για να βρεθεί αν η απαλοιφή του C5aR υποδοχέα του συμπληρώματος οδηγεί σε βελτίωση της παθολογίας που εμφανίζεται στο Des^{-/-} καρδιακό ιστό, τομές καρδιακών ιστών που συλλέχθηκαν από ποντίκια αγρίου τύπου (wt), από ποντίκια που δεν εκφράζουν τη δεσμίνη (Des^{-/-}) και από ποντίκια με διπλή έλλειψη των γονιδίων της δεσμίνης και του C5aR (C5aR^{-/-}Des^{-/-}), υποβλήθηκαν σε ιστολογικές χρώσεις, όπως Masson's trichrome (Εικόνα 3.4) και H/E (Εικόνα 3.5) (βλ. παράγραφο 2.5). Με τις χρώσεις αυτές αξιολογήθηκε το “replacement index” (όπως έχουμε αναλύσει στην παράγραφο 2.5.3), το οποίο αντιπροσωπεύει τις περιοχές του καρδιακού ιστού που έχουν αντικατασταθεί με ινωτικό ιστό και/ή εναπόθεση ασβεστίου και/ή διήθηση φλεγμονωδών κυττάρων. Στις Εικόνες 3.4 και 3.5, φαίνεται η μειωμένη ίνωση και καρδιακή αναδιαμόρφωση (remodeling) των ποντικιών C5aR^{-/-}Des^{-/-} σε σύγκριση με τα Des^{-/-} ποντίκια σε ηλικία 4 μηνών με χρώση Masson's trichrome και σε ηλικία 11 μηνών με χρώση H/E, αντίστοιχα. Στην Εικόνα 3.3 απεικονίζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες καρδιών ποντικιών C5aR^{-/-}Des^{-/-} και Des^{-/-} ηλικίας 4 μηνών, όπου διακρίνεται και σε επίπεδο ιστού η φαινοτυπική αυτή καλυτέρευση. Δεν παρουσιάζονται εικόνες που αφορούν ποντίκια αγρίου τύπου διότι εξ ορισμού έχουν μηδέν replacement index.



Εικόνα 3.3 Αντιπροσωπευτικές εικόνες καρδιών ποντικών C5aR-/-Des-/- (αριστερά) και Des-/- (δεξιά) ηλικίας 4 μηνών. Στα Des-/- ποντίκια διακρίνεται ξεκάθαρα η εναπόθεση ασβεστίου.



Εικόνα 3.4 Χρώση τομών καρδιακών ιστών με Masson's trichrome, όπου παρατηρείται μειωμένη αναδιαμόρφωση και ίνωση σε ποντίκια C5aR-/-Des-/- (αριστερά) ηλικίας 4 μηνών σε σύγκριση με ποντίκια Des-/- (δεξιά). Με μπλε βάφονται οι ινωτικές περιοχές.

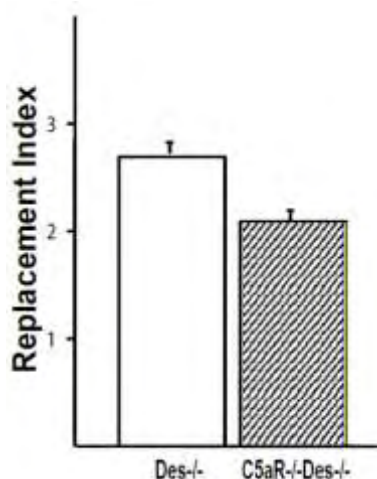


Εικόνα 3.5 Χρώση τομών καρδιακών ιστών με Η/Ε, όπου παρατηρείται εντυπωσιακή βελτίωση στην καρδιακή αναδιαμόρφωση και μειωμένη ίνωση σε ποντίκια C5aR-/-Des-/- ηλικίας 11 μηνών σε σύγκριση με ποντίκια Des-/- . A) Παρατηρείται μυοκαρδιακή καταστροφή με δυστροφική εναπόθεση ασβεστίου και ίνωση και στις δύο κοιλίες της καρδιάς σε Des-/- ποντίκια. Η λέπτυνση του τοιχώματος και η ανευρισματική διάταση είναι πιο εμφανείς στη δεξιά κοιλία (RV). Επίσης, είναι προφανές και το μειωμένο πάχος του τοιχώματος στην αριστερή κοιλία (LV). C) Μια μεγεθυσμένη περιοχή της δεξιάς κοιλίας (από την εικόνα A), δείχνει την ολική αντικατάσταση των καρδιομυοκυττάρων από ίνωση και εναπόθεση ασβεστίου. Οι αντίστοιχες εικόνες από τα ποντίκια C5aR-/-Des-/- (B και D), υποδεικνύουν την σημαντική βελτίωση της ιστοπαθολογίας.

Στον Πίνακα 3.1 και στην Εικόνα 3.6, περιγράφονται και απεικονίζονται τα αποτελέσματα της αξιολόγησης του replacement index σε ποντίκια wt, Des-/- και C5aR-/-Des-/- ηλικίας 4 μηνών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, λοιπόν, διαπιστώνουμε μια στατιστικά σημαντική μείωση του replacement index (κατά 22%) στα C5aR-/-Des-/- ποντίκια σε σχέση με τα Des-/- στην ηλικία των 4 μηνών.

Πίνακας 3.1 Αξιολόγηση του replacement index σε ποντίκια 4 μηνών.

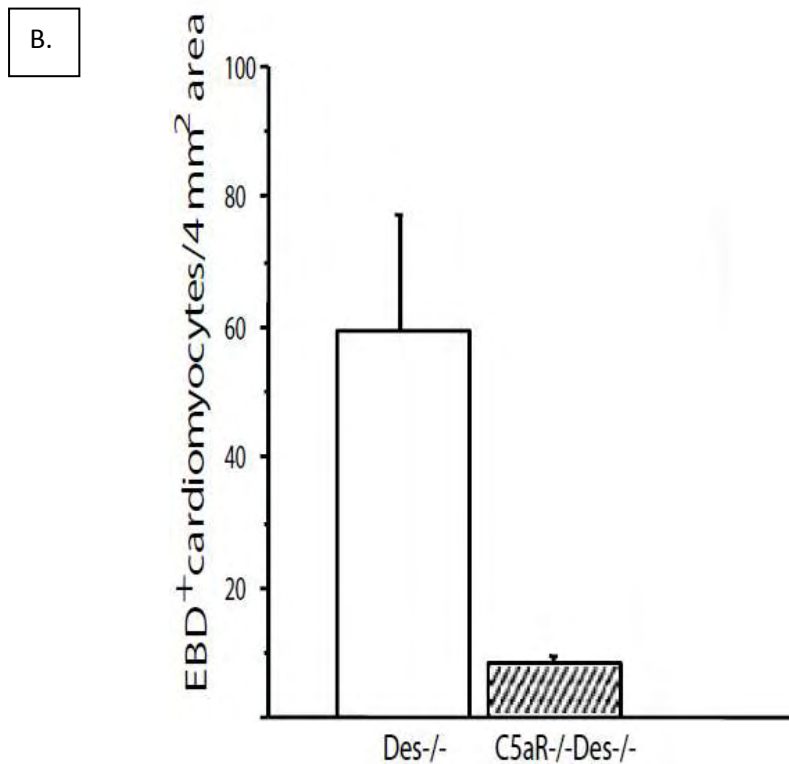
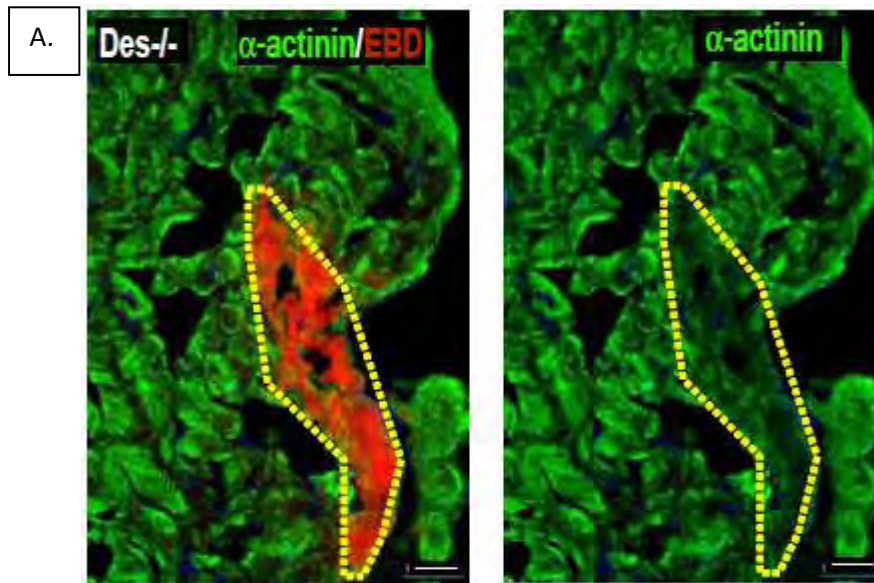
	C5aR ^{-/-} Des ^{-/-} (n=14)	Des ^{-/-} (n=19)	Wildtype (n=11)
Replacement index	2,1 ± 0,14	2,7 ± 0,11	0



Εικόνα 3.6 Ιστόγραμμα αξιολόγησης του replacement index. Φαίνεται μειωμένος στα C5aR^{-/-}Des^{-/-} ποντίκια ηλικίας 4 μηνών σε σχέση με τα Des^{-/-} ($p < 0,01$ έναντι του Des^{-/-}).

3.2.2 Εκτίμηση της μεμβρανικής ακεραιότητας των καρδιομυοκυττάρων με EBD χρώση.

Για την εκτίμηση της λύσης της μεμβρανικής συνέχειας των καρδιομυοκυττάρων χρησιμοποιήθηκε η ιστολογική χρώση EBD (Evans Blue Dye) όπως έχουμε περιγράψει στην παράγραφο 2.5.4. Η χρωστική αυτή εισέρχεται στα κύτταρα με ανωμαλίες στη μεμβρανική ακεραιότητα. Ταυτόχρονα έγινε και χρώση με ανοσοφθορισμό για την α-ακτινίνη (συστατικό των σαρκομεριδίων) η οποία «βάφει» ειδικά τα μυοκαρδιοκύτταρα. Η έλλειψη δεσμίνης επηρεάζει αρνητικά τη μεμβρανική ακεραιότητα των καρδιομυοκυττάρων με τις ανάλογες συνέπειες στην παθολογία της καρδιακής ανεπάρκειας, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.7A. Αναρωτηθήκαμε, λοιπόν, αν παίζει ρόλο και η ενεργοποίηση του συμπληρώματος. Πράγματι παρατηρήθηκε μείωση κατά 75-80% των θετικών σε EBD καρδιομυοκυττάρων από καρδιακούς ιστούς C5aR^{-/-}Des^{-/-} ποντικών ($8,25 \pm 1,11$, n=8) σε σύγκριση με Des^{-/-} ποντίκια (58.75 ± 21.56 , n=8, $p < 0.01$) ηλικίας 20-25 ημερών (Εικόνα 3.7B).



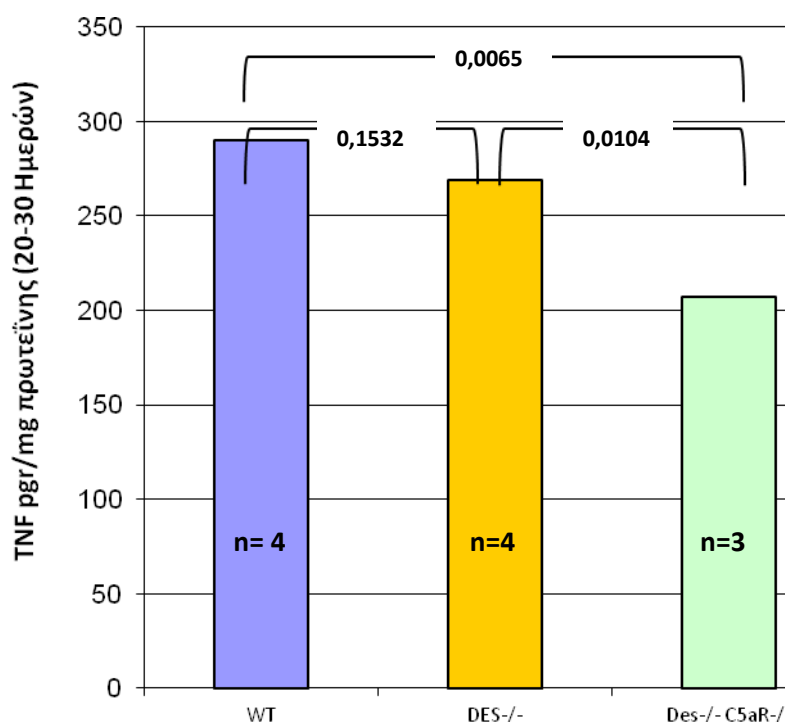
Εικόνα 3.7 Χρώση EBD και ανοσοφθορισμός για α -ακτινίνη. Α.) Χαρακτηριστική τομή καρδιακού ιστού από Des^{-/-} ποντίκια ηλικίας 16 ημερών. Παρατηρείται σε Des^{-/-} καρδιομυοκύτταρα απώλεια του προτύπου των Z δίσκων (α -ακτινίνη, πράσινο) με ταυτόχρονη αυξημένη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης (EBD, κόκκινο) που σημαίνει απώλεια της μυοκυτταρικής ακεραιότητας και βιωσιμότητας. Β.) Εμφανίζεται μείωση των θετικών σε EBD καρδιομυοκυττάρων σε καρδιακούς ιστούς C5aR^{-/-}Des^{-/-} ποντικών (n=8), σε σχέση με Des^{-/-} ποντίκια (n=8) ηλικίας 20-25 ημερών (p<0,01 έναντι του Des^{-/-}).

3.3 Συγκέντρωση TNF- α σε καρδιακά εκχυλίσματα και ορούς αίματος

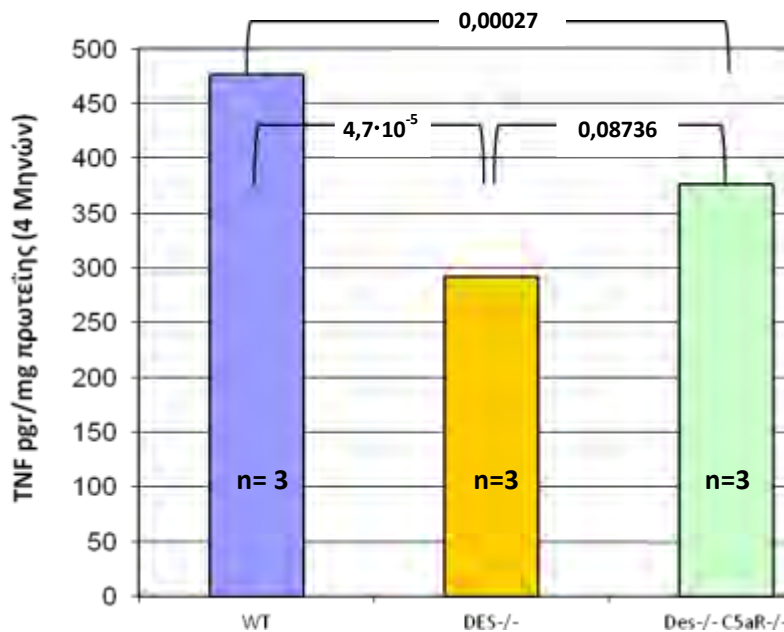
Ο παράγοντας νέκρωσης όγκου άλφα (TNF- α) είναι μια φλεγμονώδης κυτοκίνη, που εκτός των άλλων η παραγωγή του επάγεται από τις ROS και το αντίστροφο, επιπλέον, φαίνεται πως συμβάλλει στην πρόοδο της καρδιακής

ανεπάρκειας (βλ. παράγραφο 1.4). Η συγκέντρωσή του, λοιπόν, μετρήθηκε σε καρδιακά εκχυλίσματα και ορρούς αίματος ποντικών ηλικίας 20-30 ημερών (οξεία φλεγμονώδης αντίδραση) (Εικόνα 3.8) και 4 μηνών (έκδηλα συμπτώματα καρδιακής ανεπάρκειας) (Εικόνα 3.9), προκειμένου να παρατηρήσουμε τη συμμετοχή του στην επίπτωση του φαινοτύπου στους γενότυπους C5aR^{-/-}Des^{-/-} και Des^{-/-} σε σχέση με τα wt, καθώς και τη συσχέτισή του με το σχηματισμό ROS. Ο υπολογισμός έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Mouse TNF α ELISA Kit της Thermo Scientific. Η συγκέντρωση του TNF- α εκφράζεται σε pg/ml ορού και σε pg/mg πρωτεΐνης στα καρδιακά εκχυλίσματα. Ανάλυση ορρών από WT, Des^{-/-} και C5aR^{-/-}Des^{-/-} ποντίκια έδειξαν ότι οι συγκεντρώσεις του TNF- α βρίσκονταν κάτω από την ουδό ανίχνευσης της μεθόδου (ευαισθησία: <9pg/ml). Άρα τα επίπεδα του TNF α στον ορό αυτών των πειραματόζωων ήταν πολύ χαμηλά.

Κατόπιν μετρήσαμε τη συγκέντρωση του TNF α σε καρδιακά εκχυλίσματα από WT, Des^{-/-} και C5aR^{-/-}Des^{-/-} ποντίκια. Σε αυτά τα δείγματα παρατηρήσαμε αυξημένη συγκέντρωση TNF- α από 200-500 pg/mg πρωτεΐνης περίπου. Μεταξύ των διαφορετικών ζώων διακρίνεται μείωση της συγκέντρωσης TNF- α στα C5aR^{-/-}Des^{-/-} (207 \pm 10,5) ποντίκια σε σχέση τόσο με τα wt (290 \pm 41,7) όσο και με τα Des^{-/-} (269 \pm 28,2) στην ηλικία των 20-30 ημερών, κατά 28% και 23% αντιστοίχως. Το ίδιο παρατηρείται και στα C5aR^{-/-}Des^{-/-} (376 \pm 43,5) ποντίκια σε σχέση με τα wt (476 \pm 12,1) στην ηλικία των 4 μηνών, δηλαδή μείωση της συγκέντρωσης TNF- α κατά 21%. Τέλος, πολύ σημαντική μείωση (38%) έχουμε στα Des^{-/-} (291 \pm 43,1) ποντίκια 4 μηνών σε σύγκριση με τα wt (476 \pm 12,1) της ίδιας ηλικίας.



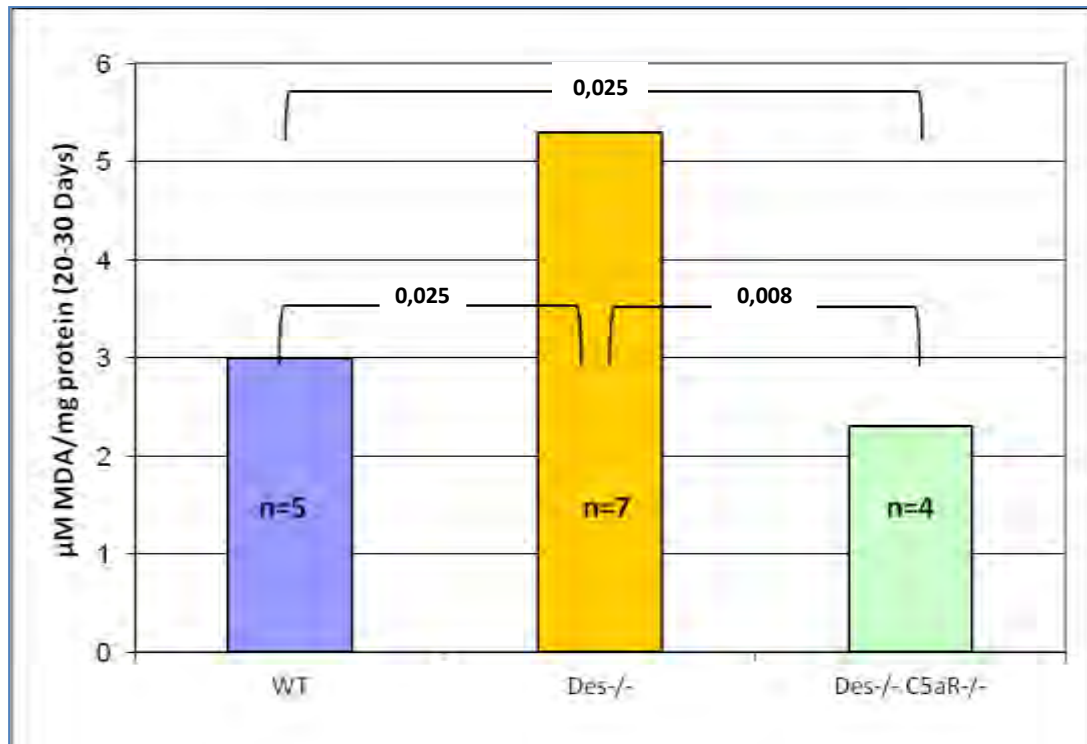
Εικόνα 3.8 Η συγκέντρωση του TNF- α (pg/mg πρωτεΐνης) σε wt (1^η στήλη), Des^{-/-} (2^η στήλη) και C5aR^{-/-}Des^{-/-} (3^η στήλη) ποντίκια ηλικίας 20-30 ημερών.



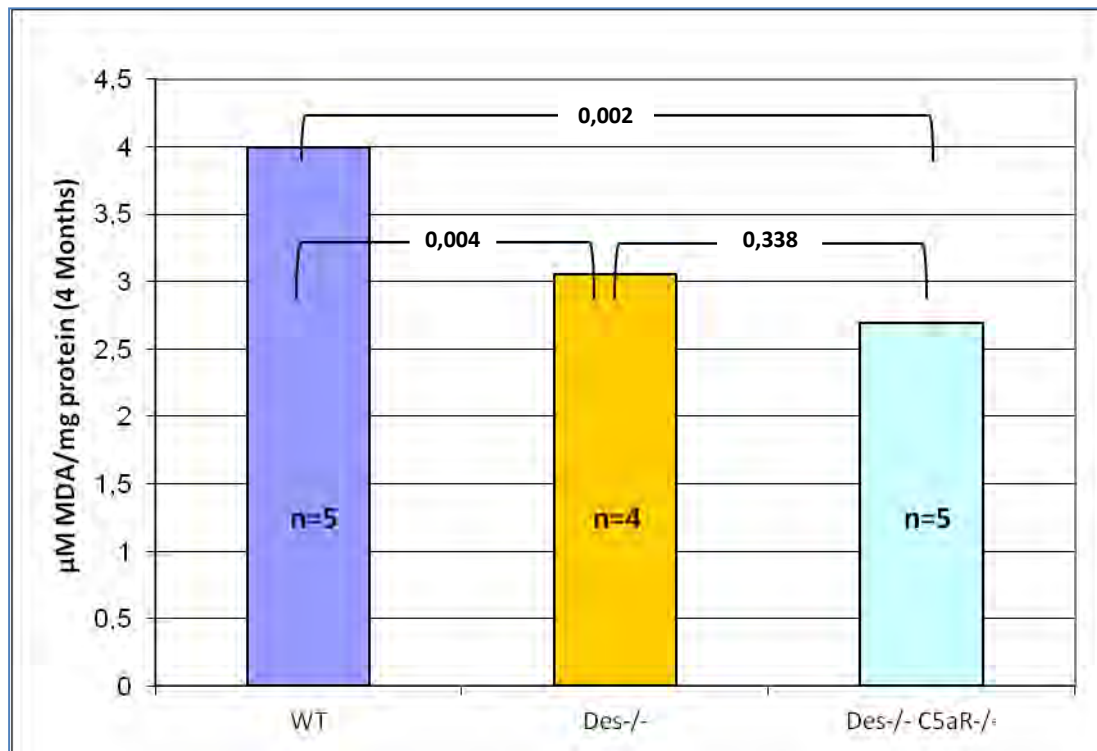
Εικόνα 3.9 Η συγκέντρωση του TNF-α (pg/mg πρωτεΐνης) σε wt (1^η στήλη), Des-/- (2^η στήλη) και C5aR-/-Des-/- (3^η στήλη) ποντίκια ηλικίας 4 μηνών.

3.4 Προσδιορισμός της υπεροξειδωσής λιπιδίων με τη μέθοδο MDA

Για τη μελέτη του οξειδωτικού στρες χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο MDA (βλ. παράγραφο 2.8). Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε καρδιακά εκχυλίσματα ποντικών wt, C5aR-/-Des-/- και Des-/- ηλικίας 20-30 ημερών (οξεία φλεγμονώδης αντίδραση) (Εικόνα 3.10) και 4 μηνών (έκδηλα συμπτώματα καρδιακής ανεπάρκειας) (Εικόνα 3.11), προκειμένου να συγκριθούν τα επίπεδα του οξειδωτικού στρες - τα οποία εκφράζονται ως $\mu\text{M MDA/mg πρωτεΐνης}$ - στις τρεις περιπτώσεις και να διαπιστώσουμε αν πράγματι έχουμε μείωση του οξειδωτικού στρες στα C5aR-/-Des-/- ποντίκια. Όντως, παρατηρούμε μείωση της συγκέντρωσης MDA στα C5aR-/-Des-/- ποντίκια ($2,3 \pm 0,04$) σε σχέση τόσο με τα Des-/- ποντίκια ($5,3 \pm 0,75$) όσο και με τα wt ποντίκια ($3,1 \pm 0,21$) ηλικίας 20-30 ημερών, κατά 56% και 25% αντιστοίχως. Επίσης, έχουμε μείωση της συγκέντρωσης MDA στα C5aR-/-Des-/- ποντίκια ($2,7 \pm 0,27$) σε σχέση με τα wt ποντίκια ($4 \pm 0,08$) ηλικίας 4 μηνών κατά 32,5%.



Εικόνα 3.10 Η συγκέντρωση της MDA (μM/mg πρωτεΐνης) σε wt (1^η στήλη), Des-/- (2^η στήλη) και C5aR-/-Des-/- (3^η στήλη) ποντίκια ηλικίας 20-30 ημερών.



Εικόνα 3.11 Η συγκέντρωση της MDA (μM/mg πρωτεΐνης) σε wt (1^η στήλη), Des-/- (2^η στήλη) και C5aR-/-Des-/- (3^η στήλη) ποντίκια ηλικίας 4 μηνών.

4. Συζήτηση-Συμπεράσματα

Η καρδιακή ανεπάρκεια είναι ένα μείζων πρόβλημα υγείας με τις ανάλογες οικονομικές προεκτάσεις (O'Connell 2000). Επομένως, ένας σημαντικός στόχος στην τρέχουσα καρδιολογία είναι ο καθορισμός βέλτιστων στρατηγικών για την ελαχιστοποίηση της νέκρωσης του μυοκαρδίου και η βελτιστοποίηση της καρδιακής ανάκαμψης μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου.

Εμείς επιχειρήσαμε να διαπιστώσουμε αν η καλύτερευση που παρατηρείται στο φαινότυπο σε ένα πειραματόζωο καρδιακής ανεπάρκειας, ύστερα από αναστολή του συστήματος του συμπληρώματος, οφείλεται εν μέρει στη μείωση της φλεγμονώδους αντίδρασης και του οξειδωτικού στρες. Αυτό το επιτύχαμε χρησιμοποιώντας διαγονιδιακά ποντίκια με απαλοιφή του C5aR γονιδίου και ταυτόχρονη απαλοιφή της δεσμίνης, επεμβαίνοντας δηλαδή στο σύστημα του συμπληρώματος σε πειραματόζωο μοντέλο καρδιακής ανεπάρκειας.

Αρχικά διαπιστώσαμε σε αυτό το ζωικό μοντέλο (C5aR^{-/-} Des^{-/-}) βελτίωση της καρδιακής παθολογίας σε ιστολογικό επίπεδο. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της συγκριτικής ιστολογικής ανάλυσης με Masson's Trichrome και H/E και υπολογισμού του replacement index, σε τομές καρδιακών ιστών ποντικών παρατηρείται μείωση του replacement index κατά 22% στα C5aR^{-/-} Des^{-/-} ποντίκια ηλικίας 4 μηνών σε σχέση με τα Des^{-/-}, δηλαδή της ίνωσης και της δυσμενούς καρδιακής αναδιαμόρφωσης.

Επίσης, από την εκτίμηση της μεμβρανικής ακεραιότητας των καρδιομυοκυττάρων με EBD χρώση, προέκυψε ότι σε καρδιακούς ιστούς C5aR^{-/-} Des^{-/-} ποντικών σε σύγκριση με Des^{-/-} ποντίκια έχουμε μείωση κατά 75-80% των θετικών σε EBD καρδιομυοκυττάρων (λύση μεμβρανικής ακεραιότητας). Το φαινόμενο αυτό εντοπίστηκε στην περίοδο ηλικίας 20-25 ημερών, δηλαδή, της οξείας φλεγμονώδους αντίδρασης και εκφυλισμού των καρδιομυοκυττάρων, υποδεικνύοντας ξεκάθαρα τη σημαντικότητα της ενεργοποίησης του συμπληρώματος στην απώλεια της σαρκολεϊματικής ακεραιότητας των ελλείψει δεσμίνης καρδιομυοκυττάρων.

Στη συνέχεια, από τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του TNF-α σε καρδιακά εκχυλίσματα και ορρούς αίματος καταλήξαμε στο εξής παράδοξο όσον αφορά στα καρδιακά εκχυλίσματα: τα wt ποντίκια εμφανίζουν αυξημένες συγκεντρώσεις TNF-α τόσο στην ηλικία των 20-30 ημερών όσο και στην ηλικία των 4 μηνών, σε σύγκριση με άλλες μελέτες που έχουν υπολογίσει τη συγκέντρωση του TNFα σε καρδιακά εκχυλίσματα. Η ερμηνεία που μπορούμε να δώσουμε σε αυτά τα αποτελέσματα είναι ότι κατά τη διαδικασία εκχύλισης των πρωτεϊνών χρησιμοποιήσαμε απορρυπαντικό, το Tween-20, με αποτέλεσμα να καταφέρουμε να υπολογίσουμε και τη διαμεμβρανική μορφή του TNF-α, ενώ η διαλυτή μορφή ελευθερώνεται στον ορρό. Σε αντίθεση με άλλες μελέτες που χρησιμοποιούν μόνο φυσιολογικό ορό κατά την εκχύλιση (Bryant et al. 1998, Dibbs et al. 2003). Κατά τα άλλα η πολύ χαμηλή συγκέντρωση του TNF-α σε ορρό αίματος wt ποντικών, δηλαδή της διαλυτής μορφής, συμφωνεί με τα μέχρι τώρα δεδομένα. Η μειωμένη συγκέντρωση του TNF-α στα καρδιακά εκχυλίσματα Des^{-/-} ποντικών ηλικίας 20-30 ημερών σε σχέση με τα wt, μπορεί να βασίζεται σε λιγότερη παραγωγή ή εντοπισμό του TNF-α στην κυτταρική μεμβράνη, πιθανόν και λόγω του φαινοτύπου όπου προκαλείται διαταραχή

της μεμβρανικής ακεραιότητας (Εικόνα 3.7A). Το ίδιο μπορεί να συμβαίνει και στα C5aR^{-/-}Des^{-/-} ποντίκια ηλικίας 20-30 ημερών και να εμφανίζουν μειωμένη συγκέντρωση TNF-α σε σχέση με τα wt. Ενώ η μείωση στα C5aR^{-/-}Des^{-/-} σε σχέση με τα Des^{-/-}, μπορεί να βασίζεται και στη μείωση της φλεγμονώδους αντίδρασης εξαιτίας της απαλοιφής του C5aR και συνεπώς παρατηρείται ακόμη λιγότερη παραγωγή TNF-α. Για τους ίδιους λόγους, μπορεί να έχουμε παρόμοια αποτελέσματα και στους 4 μήνες. Αξίζει δε να σημειώσουμε, ότι στους 4 μήνες τα επίπεδα φλεγμονής μειώνονται.

Τέλος, από τον προσδιορισμό του οξειδωτικού στρες με τη μέθοδο MDA προκύπτει ότι τα C5aR^{-/-}Des^{-/-} ποντίκια στην ηλικία τόσο των 20-30 ημερών όσο και των 4 μηνών εμφανίζουν μειωμένο οξειδωτικό στρες σε σύγκριση με τα Des^{-/-} (όχι όμως στους 4 μήνες αφού δεν είναι στατιστικά σημαντική η διαφορά) και τα wt ποντίκια, υποδεικνύοντας έτσι τη συμμετοχή του συστήματος του συμπληρώματος και συγκεκριμένα του C5a στην παραγωγή οξειδωτικού στρες, πιθανόν λόγω μείωσης της φλεγμονώδους αντίδρασης (ενεργοποίησης και προσέλκυσης φλεγμονωδών κυττάρων), καθώς και μείωσης της παραγωγής ή/και ενεργοποίησης κυτοκινών που προάγουν το σχηματισμό ROS. Όσον αφορά την υψηλή συγκέντρωση MDA στα wt ποντίκια 4 μηνών μπορεί να οφείλεται σε διαδικασίες γήρανσης, αλλά το πιο πιθανό είναι να οφείλεται σε σφάλμα της πειραματικής πορείας και να απαιτείται ανάλυση περισσότερων δειγμάτων.

Συμπεραίνουμε, λοιπόν, ότι η απαλοιφή (knockout) του υποδοχέα του C5a, C5aR, σε πειραματόζωο μοντέλο με καρδιακή ανεπάρκεια (Des^{-/-}) βελτιώνει γενικά το φαινότυπο της καρδιακής ανεπάρκειας (μειώνονται: η ίνωση, η εναπόθεση ασβεστίου και η δυσμενής αναδιαμόρφωση του καρδιακού ιστού), όπως προέκυψε από τις ιστολογικές μεθόδους. Η βελτίωση αυτή, ενδεχομένως, μπορεί να οφείλεται εν μέρει στη μείωση της φλεγμονώδους αντίδρασης, είτε μέσω της εξ ορισμού απαλοιφής του C5aR είτε μέσω της μείωσης της φλεγμονώδους κυτοκίνης TNF-α, καθώς και στη μείωση του οξειδωτικού στρες όπως προκύπτει από τη μέθοδο MDA. Παράγοντες που όπως έχουμε αναφέρει στην εισαγωγή φαίνεται να εμπλέκονται άμεσα με τη δράση τους στην επιβάρυνση της καρδιακής ανεπάρκειας.

Βιβλιογραφία

- Abe J and Berk BC (1998). Reactive oxygen species as mediators of signal transduction in cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med* 8: 59-64.
- Amara U, Rittirsch D et al. (2008). Interaction between the coagulation and complement system. *Adv Exp Med Biol* 632: 71-79.
- Antunes F and Cadenas E (2000). Estimation of H₂O₂ gradients across biomembranes. *FEBS Lett* 475:121-6.
- Apostolakis S, Lip G YH and Shantsila E (2010). Monocytes in heart failure: relationship to a deteriorating immune overreaction or a Desperate attempt for tissue repair? *Cardiovascular Research* 85: 649-660
- Armstrong EJ, Morrow DA, Sabatine MS (2006). Inflammatory biomarkers in acute coronary syndromes. Part I: introduction and cytokines. *Circulation* 113: 72-75.
- Ashkenazi A, Dixit VM (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281: 1305-1308.
- Ashraf M and Zhai X (1995). Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: role of oxygen free radicals. *Transplant Proc* 27: 2800-2801.
- Bao C, Guo J, Lin G, Hu M, Hu Z (2008). TNFR gene-modified mesenchymal stem cells attenuate inflammation and cardiac dysfunction following MI. *Scand Cardiovasc J*: 42: 56-62.
- Bauersachs J, Bouloumie A, Fraccarollo D, Hu K, Busse R, Ertl G (1999). Endothelial dysfunction in chronic myocardial infarction Despite increased vascular endothelial nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase expression: role of enhanced vascular superoxide production. *Circulation* 100: 292-298.
- Belosjorow S, Bolle I, Duschin A, Heusch G, Schulz R (2003). TNF- α antibodies are as effective as ischemic preconditioning in reducing infarct size in rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: 927-930.
- Benzaquen LR, Nicholson-Weller A, Halperin JA (1994). Terminal complement proteins C5b-9 release basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor from endothelial cells. *J Exp Med* 179: 985-992
- Black RA, et al. (1997). *Nature* 385: 729. [PubMed: 9034190]
- Botsoglou NA et al. (1994). Rapid, Sensitive, and Specific Thiobarbituric Acid Method for Measuring Lipid Peroxidation in Animal Tissue. *Food and Feedstuff Samples J Agric Food Chem* 42: 1931-1937.
- Bryant D, Becker L, Richardson J, Shelton J, Franco F, Peshock R, Thompson M, Giroir B (1998). Cardiac Failure in Transgenic Mice With Myocardial Expression of Tumor Necrosis Factor- α . *American Heart Association*: 1375-1381.
- Carroll RC (1998). The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. *Annu Rev Immunol* 16: 545-568
- Cecconi C, Curello S, Bachetti T, Corti A, Ferrari R (1998). Tumor necrosis factor in congestive heart failure: a mechanism of disease for the new millennium? *Prog Cardiovasc Dis* 41: 25-30
- Chang M K et al. (1999). Monoclonal antibodies against oxidized low-density lipoprotein bind to apoptotic cells and inhibit their phagocytosis by elicited macrophages: evidence that oxidation-specific epitopes mediate macrophage recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 6353-6358.
- Chang M K et al. (2004). Apoptotic cells with oxidation-specific epitopes are immunogenic and proinflammatory. *J Exp Med* 200: 1359-1370.
- Chen Z, Siu B, Ho YS, Vincent R, Chua CC, Hamdy RC et al. (1998). Overexpression of MnSOD protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol* 30: 2281-2289.
- Chen Y, Ke Q, Yang Y, Rana JS, Tang J, Morgan JP, Xiao YF (2003). Cardiomyocytes overexpressing TNF- α attract migration of embryonic stem cells via activation of p38 and c-Jun amino-terminal kinase. *FASEB J* 17: 2231-2239.
- Chen CL, et al. (2008). Upregulation of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitors of metalloproteinases in rapid atrial pacing-induced atrial fibrillation. *J Mol Cell Cardiol* 45: 742-753. [PubMed:18692064]
- Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81: 505-512.
- Chou M Y et al. Oxidation-specific epitopes are important targets of innate immunity. *J Intern Med* 263: 479-488.
- Collard CD, Vakeva A, Bukusoglu C, Zund G, Sperati CJ, Colgan SP, Stahl GL (1997). Reoxygenation of hypoxic human umbilical vein endothelial cells activates the classic complement pathway. *Circulation* 96: 326-333.

- Cooper D, Stokes KY, Taylor A, Granger DN (2002). Oxidative stress promotes blood cell-endothelial cell interactions in the microcirculation. *Cardiovasc Toxicol* 2: 165-180.
- Crawford MH, Grover FL, et al. (1988). Complement and neutrophil activation in the pathogenesis of ischemic myocardial injury. *Circulation* 78: 1449-1458.
- Davies MJ, Hawkins CL, Pattison DI, Rees MD (2008). Mammalian heme peroxidases: From molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal* 10: 1199-1234.
- Dibbs ZI, Diwan A, Nemoto S, DeFreitas G, Abdellatif M, Carabello BA, Spinale FG, Feuerstein G, Sivasubramanian N, Mann DL (2003). Targeted Overexpression of Transmembrane Tumor Necrosis Factor Provokes a Concentric Cardiac Hypertrophic Phenotype. *Circulation* 2003 108: 1002-1008.
- Diepenhorst GM, van Gulik TM et al. (2009). Complement-mediated ischemia-reperfusion injury: lessons learned from animal and clinical studies. *Ann Surg* 249: 889-899.
- Dorge H, Schulz R, Belosjorow S, Post H, van de Sand A, Konietzka I, Frede S, Hartung T, Vinten-Johansen J, Youker KA, Entman ML, Erbel R, Heusch G (2002). Coronary microembolization: the role of TNF- α in contractile dysfunction. *J Mol Cell Cardiol* 34: 51- 62.
- Doyama K, Fujiwara H, Fukumoto M, Tanaka M, Fujiwara Y, Oda T, Inada T, Ohtani S, Hasegawa K, Fujiwara T, Sasayama S (1996). Tumour necrosis factor is expressed in cardiac tissues of patients with heart failure. *Int J Cardiol* 54: 217-225
- Duilio C, Ambrosio G, Kuppusamy P, DiPaula A, Becker LC, Zweier JL (2001). Neutrophils are primary source of O₂ radicals during reperfusion after prolonged myocardial ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: 2649-2657.
- Esterbauer H, Schaur RJ and Zollner H (1991). Chemistry and Biochemistry of 4-Hydroxynonenal, Malonaldehyde and Related Aldehydes. *Free Rad Biol Med* 11: 81-128.
- Ferdinandy P, Danial H, Ambrus I, Rothery RA, Schulz R (2000). Peroxynitrite is a major contributor to cytokine-induced myocardial contractile failure. *Circ Res* 87: 241-247.
- Fischer D, Rossa S, Landmesser U, Spiekermann S, Engberding N, Hornig B et al. (2005). Endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure is independently associated with increased incidence of hospitalization, cardiac transplantation, or death. *Eur Heart J* 26: 65-69.
- Flaherty MP, Guo Y, Tiwari S, Rezazadeh A, Hunt G, Sanganalmath SK, Tang XL, Bolli R, Dawn B (2008). The role of TNF- α receptors p55 and p75 in acute myocardial ischemia/reperfusion injury and late preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 45: 735-741.
- Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML (2002). The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 53: 31-47.
- Frangogiannis NG (2008). The immune system and cardiac repair. *Pharmacol Res* 58: 88-111.
- Fu X, Kassim SY, Parks WC, Heinecke JW (2001). Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro-matrix metalloproteinase-7 (MMP-7). A mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase. *J Biol Chem* 276: 41279-41287. [PubMed: 11533038]
- Fu X, Kassim SY, Parks WC, Heinecke JW (2003). Hypochlorous acid generated by myeloperoxidase modifies adjacent tryptophan and glycine residues in the catalytic domain of matrix metalloproteinase-7 (matrixin): an oxidative mechanism for restraining proteolytic activity during inflammation. *J Biol Chem* 278: 28403-28409. [PubMed: 12759346]
- Gilles S, Zahler S, Welsch U, Sommerhoff CP, Becker BF (2003). Release of TNF- α during myocardial reperfusion depends on oxidative stress and is prevented by mast cell stabilizers. *Cardiovasc Res* 60: 608-616.
- Guo RF, Ward PA (2005). Role of C5a in inflammatory responses. *Annu Rev Immunol* 23: 821-52.
- Gurantz D, Cowling RT, Varki N, Frikovsky E, Moore CD, Greenberg BH (2005). IL-1 and TNF- α upregulate angiotensin II type 1 (AT1) receptors on cardiac fibroblasts and are associated with increased AT1 density in the post-MI heart. *J Mol Cell Cardiol* 38: 505-515.
- Halliwell B and Gutteridge J (1989). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press.
- Hamid T, Gu Y, Ortines RV, Bhattacharya C, Wang G, Xuan Y-T, Prabhu SD (2009). Divergent tumor necrosis factor receptor-related remodeling responses in heart failure: role of nuclear factor- κ B and inflammatory activation. *Circulation* 119: 1386 -1397.
- Hampton MB, Kettle AJ and Winterbourn CC (1998). Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 92: 3007-3017.

- Hill JH and Ward PA (1971). The phlogistic role of C3 leukotactic fragments in myocardial infarcts of rats. *J Exp Med* 133: 885-900.
- Hirahashi J, Mekala D et al. (2006). Mac-1 signaling via Src-family and Syk kinases results in elastase-dependent thrombohemorrhagic vasculopathy. *Immunity* 25: 271-283.
- Homeister JW, Satoh P, Lucchesi BR (1992). Effects of complement activation in the isolated heart. Role of the terminal complement components. *Circ Res* 71: 303-19
- Hool LC and Corry B (2007). Redox control of calcium channels: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 9: 409-35.
- Hopken UE, Lu B, Gerard NP, Gerard C (1996). The C5a chemoattractant receptor mediates mucosal defence to infection. *Nature* 383: 86-89.
- Hori M and Nishida K (2009). Oxidative stress and left ventricular remodelling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 81: 457-464.
- Hsu H, Xiong J, Goeddel DV (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81: 495-504.
- Jennings RB, Steenbergen C et al. (1995). Myocardial ischemia and reperfusion. *Monogr Pathol* 37: 47-80.
- Jiang B and Liao R (2010). The paradoxical role of inflammation in cardiac repair and regeneration. *J Cardiovasc Transl Res* 3: 410-416.
- Irwin MW, Mak S, Mann DL, Qu R, Penninger JM, Yan A, Dawood F, Wen WH, Shou Z, Liu P (1999). Tissue expression and immunolocalization of tumor necrosis factor- α in postinfarction dysfunctional myocardium. *Circulation* 99: 1492-1498.
- Issac TT, Dokainish H, Lakkis NM (2007). Role of inflammation in initiation and perpetuation of atrial fibrillation: a systematic review of the published data. *J Am Coll Cardiol* 50: 2021-2028. [PubMed: 18021867]
- Kadokami T, McTiernan CF, Kubota T, Frye CS, Feldman AM (2000). Sex-related survival differences in murine cardiomyopathy are associated with differences in TNF-receptor expression. *J Clin Invest* 106: 589-597.
- Kawai C (1999): From myocarditis to cardiomyopathy: mechanisms of inflammation and cell death: learning from the past for the future. *Circulation* 99: 1091-1100
- Klebanoff SJ (1980). Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Ann Intern Med* 93: 480-489.
- Kukielka GL, Smith CW, Manning AM, Youker KA, Michael LH, Entman ML (1995). Induction of interleukin-6 synthesis in the myocardium. Potential role in postreperfusion inflammatory injury. *Circulation* 92: 1866-1875.
- Lancaster JR Jr, Laster SM, Gooding LR (1989). Inhibition of target cell mitochondrial electron transfer by tumor necrosis factor. *FEBS Lett* 248: 169-174
- Li Z, Colucci-Guyon E, Pincon-Raymond M, Mericskay M, Pournin S, Paulin D, Babinet C (1996). Cardiovascular lesions and skeletal myopathy in mice lacking Desmin. *Dev Biol* 175: 362-6
- Lloyd-Jones D, Adams R, et al. (2009). Heart disease and stroke statistics-2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 119: 480-486.
- Maekawa N, Wada H, Kanda T, Niwa T, Yamada Y, Saito K, Fujiwara H, Sekikawa K, Seishima M (2002). Improved myocardial ischemia/reperfusion injury in mice lacking tumor necrosis factor- α . *J Am Coll Cardiol* 39: 1229 -1235.
- Mann DL, McMurray JJ, Packer M, Swedberg K, Borer JS, Colucci WS et al. (2004). Targeted anticytokine therapy in patients with chronic heart failure: results of the randomized Etanercept worldwide evaluation (RENEWAL). *Circulation* 109: 1594-1602.
- Manthey HD, Woodruff TM, Taylor SM, Monk PN (2009) Complement component 5a (C5a). *Int J of Bioch & Cell Biol* 41: 2114-2117
- Markiewski MM, DeAngelis RA, et al. (2009). The regulation of liver cell survival by complement. *J Immunol* 182: 5412-5418.
- Mavroidis M and Yassemi Capetanaki (2002). Extensive Induction of Important Mediators of Fibrosis and Dystrophic Calcification in Desmin-Deficient Cardiomyopathy *Am J of Pathol* 160(3): 943-952.
- Meldrum DR (1998). Tumor necrosis factor in the heart. *Am J Physiol* 274: 577-595.

- Miki S, Ashraf M, Salka S, Sperelakis N (1988). Myocardial dysfunction and ultrastructural alterations mediated by oxygen metabolites. *J Mol Cell Cardiol* 20: 1009-1024.
- Miller YI et al. (2011). Oxidation-specific epitopes are danger-associated molecular patterns recognized by pattern recognition receptors of innate immunity. *Circ Res* 108: 235-248.
- Milner DJ, Weitzer G, Tran D, Bradley A, Capetanaki Y (1996). Disruption of muscle architecture and myocardial degeneration in mice lacking Desmin. *J Cell Biol* 134: 1255-70.
- Milner DJ, Taffet GE, Wang X, Pham T, Tamura T, Hartley C, GerDes AM, Capetanaki Y (1999). The absence of Desmin leads to cardiomyocyte hypertrophy and cardiac dilation with compromised systolic function. *J Mol Cell Cardiol* 31: 2063-2076.
- Milner DJ, Mavroidis M, Weisleder N, Capetanaki Y (2000). Desmin cytoskeleton linked to muscle mitochondrial distribution and respiratory function. *J Cell Biol* 150: 1283-1298.
- Monden Y, Kubota T, Inoue T, Tsutsumi T, Kawano S, Ide T, Tsutsui H, Sunagawa K (2007). Tumor necrosis factor-alpha is toxic via receptor 1 and protective via receptor 2 in a murine model of myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: 743-753.
- Monk PN, Scola AM, Madala P, Fairlie DP (2007). Function, structure and therapeutic potential of complement C5a receptors. *Br J Pharmacol* 152: 429-48.
- Moon MR, Parikh AA, Pritts TA, Fischer JE, Cottongim S, Szabo C, Salzman AL, Hasselgren PO (1999). Complement component C3 production in IL-1b-stimulated human intestinal epithelial cells is blocked by NF-kB inhibitors and by transfection with Ser 32/36 mutant IkBa. *J Surg Res* 82: 48-55.
- Morgan BP (1992). Effects of the membrane attack complex of complement on nucleated cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 178: 115-140.
- Mullane KM, Kraemer R, Smith B (1985). Myeloperoxidase activity as an assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. *J Pharmacol Methods* 14: 157-167.
- Murohara T, Guo JP, Delyani JA, Lefer AM (1995). Cardioprotective effects of selective inhibition of the two complement activation pathways in myocardial ischemia and reperfusion injury. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 17: 449-507.
- Nicholls SJ and Hazen SL (2005). Myeloperoxidase and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 1102-1111.
- Niculescu F, Rus H, van Biesen T, Shin ML (1997). Activation of Ras and mitogen-activated protein kinase pathway by terminal complement complex is G protein dependent. *J Immunol* 158: 4405-4412.
- Niculescu F, Badea T, Rus H (1999). Sublytic C5b-9 induces proliferation of human aortic smooth muscle cells: role of mitogen activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Atherosclerosis* 142: 47-56.
- Nozaki M, Raisler BJ et al. (2006). Drusen complement components C3a and C5a promote choroidal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(7): 2328-2333.
- O'Connell JB (2000). The economic burden of heart failure. *Clin Cardiol* 23 (3 Suppl): 6-10.
- Peng J, Gurantz D, Tran V, Cowling RT, Greenberg BH (2002). Tumor necrosis factor-alpha-induced AT1 receptor upregulation enhances angiotensin II-mediated cardiac fibroblast responses that favor fibrosis. *Circ Res* 91: 1119-1126.
- Podrez EA, Abu-Soud HM, Hazen SL (2000). Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 28: 1717-1725.
- Psarras S, Mavroidis M et al. (2011). Regulation of adverse remodeling by osteopontin in a genetic heart failure model. *Eur Heart J*.
- Ratajczak MZ, Reza R et al. (2006). Modulation of the SDF-1-CXCR4 axis by the third complement component (C3)--implications for trafficking of CXCR4+ stem cells. *Exp Hematol* 34(8): 986-995.
- Rezkalla SH and Kloner RA (2002). No-reflow phenomenon. *Circulation* 105(5): 656-662.
- Ricklin D and Lambris JD (2007). Complement-targeted therapeutics. *Nat Biotechnol* 25(11): 1265-1275.
- Ricklin D, Hajishengallis G et al. (2010). Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* 11(9): 785-797.
- Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C (2002). A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nature Rev Immunol* 2: 965-975.
- Scarabelli T, Stephanou A, Rayment N, Pasini E, Comini L, Curello S et al. (2001). Apoptosis of endothelial cells precedes myocyte cell apoptosis in ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 104: 253-256.

- Schulz R (2008). TNF in myocardial ischemia/reperfusion: damage vs. protection. *J Mol Cell Cardiol* 45: 712-714.
- Schulz R and Gerd H (2009). Tumor Necrosis Factor- α and Its Receptors 1 and 2 Yin and Yang in Myocardial Infarction? *Circulation* 119: 1355-1357.
- Siwik DA, Chang DL, Colucci WS (2000). Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts in vitro. *Circ Res* 86: 1259-1265.
- Siwik DA, Colucci WS (2004). Regulation of matrix metalloproteinases by cytokines and reactive oxygen/nitrogen species in the myocardium. *Heart Fail Rev* 9: 43-51.
- Skyschally A, Gres P, Hoffmann S, Haude M, Erbel R, Schulz R, Heusch G (2007). Bidirectional role of tumor necrosis factor-alpha in coronary microembolization: progressive contractile dysfunction versus delayed protection against infarction. *Circ Res* 100: 140-146.
- Straub V, Rafael JA, Chamberlain JS, Campbell KP (1997). Animal models for muscular dystrophy show different patterns of sarcolemmal disruption. *J Cell Biol* 139: 375-85.
- Suematsu N, Tsutsui H, Wen J, Kang D, Ikeuchi M, Ide T et al. (2003). Oxidative stress mediates tumor necrosis factor-alpha-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in cardiac myocytes. *Circulation* 107: 1418-1423.
- Sugano M, Tsuchida K, Hata T, Makino N (2004). In vivo transfer of soluble TNF-alpha receptor 1 gene improves cardiac function and reduces infarct size after myocardial infarction in rats. *FASEB J* 18: 911-913.
- Sugano M, Hata T, Tsuchida K, Suematsu N, Oyama J, Satoh S, Makino N (2004). Local delivery of soluble TNF-alpha receptor 1 gene reduces infarct size following ischemia/reperfusion injury in rats. *Mol Cell Biochem* 266:127-132.
- Swirski FK, Weissleder R, Pittet MJ (2009). Heterogeneous in vivo behavior of monocyte subsets in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29: 1424-1432.
- Tanhehco EJ, Yasojima K, McGeer PL, Washington RA, Lucchesi BR (2000). Free radicals upregulate complement expression in rabbit isolated heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279: 195-201.
- Taylor MR, Slavov D et al. (2007). Prevalence of Desmin mutations in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 115(10): 1244-1251.
- Thiele GM et al. (2004). Malondialdehyde-acetaldehyde (MAA)modified proteins induce pro-inflammatory and pro-fibrotic responses by liver endothelial cells. *Comp Hepatol* 3 (suppl. 1).
- Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Durand JB, Bies RD, Young JB, Mann DL (1996). Tumor necrosis factor- α and tumor necrosis factor receptors in the failing human heart. *Circulation* 93: 704 -711.
- Trouw LA et al. (2007). C4b-binding protein and factor H compensate for the loss of membrane-bound complement inhibitors to protect apoptotic cells against excessive complement attack. *J Biol Chem* 282: 28540-28548.
- Turrens JF (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552: 335-44.
- van Spaendonck-Zwarts K, van Hessem L et al. (2010). Desmin-related myopathy: a review and meta-analysis. *Clin Genet*.
- Walport MJ (2001). Complement. Second of two parts. *N Engl J Med* 344(15): 1140-1144.
- Waypa GB, Marks JD, Mack MM, Boriboun C, Mungai PT, Schumacker PT (2002). Mitochondrial reactive oxygen species trigger calcium increases during hypoxia in pulmonary arterial myocytes. *Circ Res* 91: 719-726.
- Weismann D, Hartvigsen K, Lauer N, Bennett KL, Scholl H, Issa PC, Cano M, Brandstatter H, Tsimikas S, Skerka C, Superti-Furga G, Handa JT, Zipfel PF, Witztum JL, Binder CJ (2011). Complement factor H binds malondialdehyde epitopes and protects from oxidative stress. *Nature* 478: 76-81.
- White HD, Norris RM, Brown MA, Brandt PW, Whitlock RM, Wild CJ (1987). Left ventricular end-systolic volume as the major determinant of survival after recovery from myocardial infarction. *Circulation* 76: 44-51.
- Youle RJ, Strasser A (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 47-59.
- Zhang R, Brennan ML, Shen Z, MacPherson JC, Schmitt D, Molenda CE, Hazen SL (2002). Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation. *J Biol Chem* 277: 46116-46122.

- Zhang R, Shen Z, Nauseef WM, Hazen SL (2002). Defects in leukocytemediated initiation of lipid peroxidation in plasma as studied in myeloperoxidase-deficient subjects: systematic identification of multiple endogenous diffusible substrates for myeloperoxidase in plasma. *Blood* 99: 1802-1810.
- Zhang J, Hawari FI, Shamburek RD, Adamik B, Kaler M, Islam A, Liao DW, Rouhani FN, Ingham M, Levine SJ (2008). Circulating TNFR1 exosome-like vesicles partition with the LDL fraction of human plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 366: 579-84.
- Zipfel PF and Skerka C (2009). Complement regulators and inhibitory proteins. *Nature Rev Immunol* 9: 729-740.
- Zwaka TP, Manolov D, Ozdemir C, Marx N, Kaya Z, Kochs M, Hoher M, Hombach V, Torzewski J (2002). Complement and Dilated Cardiomyopathy A Role of Sublytic Terminal Complement Complex-Induced Tumor Necrosis Factor- α Synthesis in Cardiac Myocytes. *Am J of Pathology* 161(2): 449-457.
- Zweier JL (1988). Measurement of superoxide-derived free radicals in the reperfused heart. *J Biol Chem* 263: 1353-1367.