



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

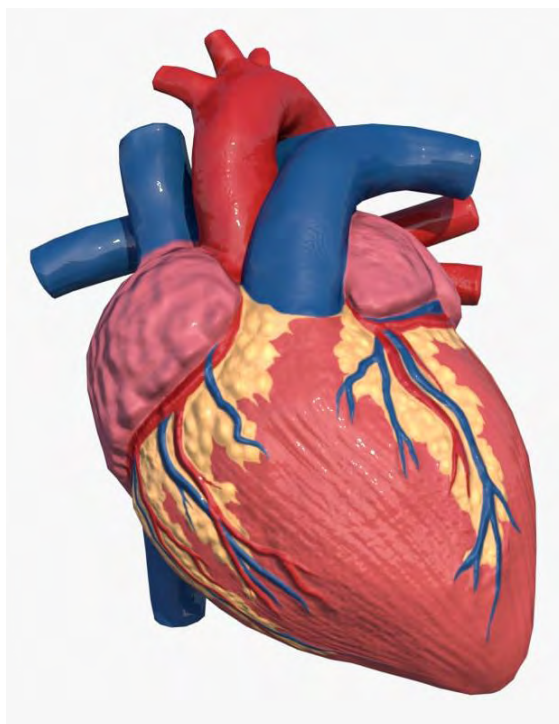
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΙΔΡΥΜΑ
ΙΑΤΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ
ΕΡΕΥΝΩΝ ΤΗΣ
ΑΚΑΔΗΜΙΑΣ ΑΘΗΝΩΝ

Διπλωματική Εργασία

Μελέτη της έναρξης και ρύθμισης της φλεγμονής σε ζωικό μοντέλο καρδιακής ανεπάρκειας



ΣΙΤΑΡΑ ΑΓΓΕΛΙΚΗ

Σεπτέμβρης 2019



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΙΔΡΥΜΑ
ΙΑΤΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ
ΕΡΕΥΝΩΝ ΤΗΣ
ΑΚΑΔΗΜΙΑΣ ΑΘΗΝΩΝ

Διπλωματική Εργασία

Μελέτη της έναρξης και ρύθμισης της φλεγμονής σε ζωικό μοντέλο καρδιακής ανεπάρκειας

Τριμελής Επιτροπή

Άννα-Μαρία Ψαρρά, PhD
Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας,
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Γιασεμή Καπετανάκη, PhD
Καθηγήτρια, Αναπληρώτρια Διευθύντρια Κέντρου Βασικής Έρευνας, Ερευνήτρια Α',
Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών

Επιστημονικός Υπεύθυνος:
Στέλιος Ψαρράς, PhD,
Ειδικός Λειτουργικός Επιστήμονας Β', Κέντρο Βασικής Έρευνας,
Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών

ΣΙΤΑΡΑ ΑΓΓΕΛΙΚΗ

Σεπτέμβρης 2019



UNIVERSITY OF THESSALY

FACULTY OF HEALTH SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY



ACADEMY OF ATHENS



BIOMEDICAL
RESEARCH
FOUNDATION,
ACADEMY OF ATHENS

Bachelor Thesis

Study of initiation and regulation of inflammation in a genetic model of heart failure

Committee

Anna-Maria Psarra, PhD
Assistant Professor of Biochemistry,
Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly

Yassemi Capetanaki, PhD
Professor , Vice Director of Center of Basic Research, Investigator A',
Biomedical Research Foundation of Academy of Athens

Supervisor:
Stelios Psarras, PhD
Staff Research Scientist - Associate Professor Level,
Center of Basic Research
Biomedical Research Foundation of Academy of Athens

SITARA ANGELIKI

September 2019

Πίνακας περιεχομένων

Ευχαριστίες.....	6
1. Εισαγωγή.....	7
1.1. Καρδιακή ανεπάρκεια	7
1.2. Ενδιάμεσα ινίδια	9
1.3. Δεσμίνη.....	10
1.4. Μοντέλο καρδιακής ανεπάρκειας desmin null.....	13
1.5. NLRP3 φλεγμονόσωμα	20
1.6. Ενδείξεις ενεργοποίησης του φλεγμονοσώματος στο des ^{-/-} μυοκάρδιο.....	24
1.7. Βιμεντίνη	27
1.8. Στόχοι της παρούσας μελέτης.....	30
2. Υλικά και μέθοδοι.....	32
2.1. Πειραματόζωα.....	32
2.2. Γενοτύπηση	33
2.3. Απομόνωση και μορφολογική αποτίμηση καρδιακού ιστού	36
2.3.1. Μέτρηση λόγου βάρους καρδιάς προς βάρους σώματος(HW/BW) και μήκος κνήμης(HW/TL)	36
2.3.2. Μέτρηση λόγου βάρους πνεύμονα προς βάρους σώματος (HW/BW) και μήκος κνήμης(HW/TL)	37
2.3.3. Αξιολόγηση ολικής καρδιακής φλεγμονής.....	37
2.3.4. Αξιολόγηση ίνωσης	37
2.4. Χρώση Masson's.....	38
2.5. Αποτίμηση καρδιακής λειτουργίας (M-mode echocardiography).....	38
2.6. Απομόνωση πρωτεϊνών και ανοσοαποτύπωση κατά Western	39
2.6.1. Απομόνωση πρωτεϊνών από την καρδιά	39
2.6.2. Μέτρηση Bradford.....	39
2.6.3. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες	40
2.6.4. Προετοιμασία δειγμάτων και ηλεκτροφόρηση	40
2.6.5. Μεταφορά σε μεμβράνη PVDF	40
2.6.6. Ανοσοαποτύπωση μεμβράνης	41
2.6.7. Ανίχνευση σήματος	41
2.6.8. Ποσοτικοποίηση σήματος με Image J.....	41
2.7. Απομόνωση RNA από ιστό	41
2.8. Απομόνωση RNA από καλλιέργεια κυττάρων	42
2.9. Αντίστροφη μεταγραφή	42
2.10. Real time PCR	43
2.11. Ανοσοφθορισμός.....	43

2.12.	Απομόνωση ενήλικων καρδιακών ινοβλαστών	44
2.13.	Απομόνωση νεογνικών καρδιακών ινοβλαστών	45
2.14.	Απομόνωση ενήλικων καρδιομυοκυττάρων.....	46
2.15.	Στατιστική ανάλυση.....	47
3.	Αποτελέσματα	49
3.1.	Αύξηση του ASC σε <i>des^{-/-}</i> καρδιές στις 4 εβδομάδες	49
3.2.	Μείωση της γαλεκτίνης-3 και του IL-1RA απουσία NLRP3	49
3.3.	Μεταγωγή της φλεγμονής από τα καρδιομυοκύτταρα στους ινοβλάστες	50
3.4.	Το ASC εντοπίζεται στους ινοβλάστες αλλά όχι στο ενδοθήλιο	55
3.5.	Μελέτη της συνεισφοράς της βιμεντίνης στο <i>des^{-/-}</i> ποντίκι	56
3.5.1.	Μέτρηση καρδιακής λειτουργίας σε μύες 4 μηνών	57
3.5.2.	Μελέτη παραμέτρων καρδιακής φλεγμονής σε ποντίκια ηλικίας 4 εβδομάδων	58
3.5.3.	Μοριακή ανάλυση φλεγμονής σε <i>des^{-/-}/vim^{-/-}</i> καρδιές 4 εβδομάδων	59
3.5.4.	Αναγνώριση κυττάρων με αυξημένο πολλαπλασιασμό στο μυοκάρδιο των <i>des^{-/-}/vim^{-/-}</i>	60
3.5.5.	Η φλεγμονή μειώνεται στις <i>des^{-/-}/vim^{-/-}</i> καρδιές 4 μηνών	61
3.5.6.	Δεν υπάρχει διαφορά στην ίνωση στις <i>des^{-/-}</i> και <i>des^{-/-}/vim^{-/-}</i> καρδιές 4 μηνών	62
3.5.7.	Αξιολόγηση μορφομετρικών παραμέτρων στους 4 μήνες	63
3.5.7.1.	Μείωση του βάρους των <i>des^{-/-}/vim^{-/-}</i> σε σχέση με τα <i>des^{-/-}</i>	63
3.5.7.2.	Τα αρσενικά <i>des^{-/-}/vim^{-/-}</i> έχουν μειωμένο βάρος πνεύμονα σε σχέση με τα αρσενικά <i>des^{-/-}</i>	64
3.5.7.3.	Το μήκος της κνήμης μειώνεται στα <i>des^{-/-}/vim^{-/-}</i> σε σχέση με τα <i>des^{-/-}</i>	64
3.5.7.4.	Η απουσία της βιμεντίνης δεν βελτιώνει την υπερτροφική καρδιά του <i>desmin-null</i> ποντικού	65
3.5.7.5.	Τάση υπερτροφίας του πνεύμονα παρουσιάζουν τα <i>des^{-/-}/vim^{-/-}</i> 4 μηνών	66
4.	Συζήτηση	68
4.1.	Ενεργοποίηση και σημασία του NLRP3 φλεγμονοσώματος στο <i>des^{-/-}</i> μοντέλο καρδιακής ανεπάρκειας	68
4.2.	Η φλεγμονή διαδίδεται από τα καρδιομυοκύτταρα στους καρδιακούς ινοβλάστες.....	70
4.3.	Μελέτη της συνεισφοράς της βιμεντίνης στην φλεγμονή του <i>des^{-/-}</i>	73
4.3.1.	Η απουσία της βιμεντίνης δεν βελτιώνει τον φαινότυπο των <i>des^{-/-}</i>	73
	Περίληψη.....	77
	Abstract	79
	Βιβλιογραφία.....	81

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, στο εργαστήριο Κυτταρικής Βιολογίας, από τον Σεπτέμβριο του 2018 έως τον Αύγουστο του 2019.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θέλω να αποδώσω στον Δρ. Στέλιο Ψαρρά, επιστημονικό υπεύθυνο και συνεπιβλέποντα της εργασίας αυτής, για την ανάθεση του θέματος, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη την διάρκεια της συνεργασίας μας, καθώς και τις πολύτιμες συμβουλές που μου παρείχε, οι οποίες με βοήθησαν να ανταπεξέλθω στις δυσκολίες που αντιμετωπίστηκαν στο διάστημα αυτό και να αποκτήσω μια επιστημονική προσέγγιση επί των διαφόρων θεμάτων. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής, την συνεπιβλέπουσα Δρ. Άννα-Μαρία Ψαρρά, Επίκουρη Καθηγήτρια του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, και τη Δρ. Γιασεμή Καπετανάκη, Ερευνήτρια Α' – Καθηγήτρια, Αναπληρώτρια Διευθύντρια του Κέντρου Βασικής Έρευνας στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών για την προθυμία τους να συμμετάσχουν στην τριμελή επιτροπή της εργασίας αυτής.

Ευχαριστώ θερμά την ερευνητική ομάδα του Δρ. Κωνσταντίνου Δάβου του Τομέα Καρδιάς και Αγγείων του Κέντρου Κλινικής Έρευνας για την βοήθειά τους και ιδιαίτερα την Δρ. Αιμιλία Βαρελά για την πολύτιμη συμμετοχή της στην παρούσα εργασία, μέσω της διεξαγωγής των υπερήχων στα πειραματόζωα και την επεξεργασία των σχετικών αποτελεσμάτων και την προθυμία για βοήθεια στο τμήμα καρδιολογικών μετρήσεων της μελέτης αυτής.

Ευχαριστίες θα αποδώσω επίσης στα μέλη του εργαστηρίου της Δρ. Καπετανάκη, Δρ. Αντιγόνη Διοκμετζίδου και Δρ. Μαίρη Τσικίτη για την παροχή της καλλιέργειας νεογνικών καρδιακών ινοβλαστών που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη αυτή, καθώς και στα υπόλοιπα μέλη Δρ. Ιωάννα Κωσταβασίλη, και Δρ. Ισμήνη Κλουκίνα. Ευχαριστώ θερμά τα μέλη της ερευνητικής ομάδας του κ. Ψαρρά, Κωνσταντίνα Σταθοπούλου, Κωνσταντίνο Ντατσούλη και Πένη Καρβούνη, για την στήριξη και τις συμβουλές τους, καθώς και την ερευνητική ομάδα του Δρ. Μανώλη Μαυροειδή, Κωνσταντίνο Τσιλαφάκη κ.α.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω, επίσης, το Εργαστήριο Κυτταρικής Βιολογίας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών για την φιλοξενία και την υλικοτεχνική υποδομή που μου παρείχε κατά την διάρκεια της εκπόνησης της Διπλωματικής μου εργασίας, την Μονάδα Οπτικής Απεικόνισης του Ιδρύματος και συγκεκριμένα, τον υπεύθυνό της Δρ. Σταμάτη Παγκάκη και την τεχνικό της Μονάδας Ελένη Ριγανά για τις πολύτιμες συμβουλές τους πάνω στην χρήση των μηχανημάτων συνεστιακής μικροσκοπίας και τις τεχνικές της οπτικής απεικόνισης.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου και τους φίλους μου, για την αμέριστη στήριξη, κατανόηση και εμπιστοσύνη που μου έδειξαν κατά την διάρκεια αυτής της εργασίας.

1. Εισαγωγή

1.1. Καρδιακή ανεπάρκεια

Η καρδιά έχει περιορισμένο αναερόβιο μεταβολισμό και εξαρτάται από το οξυγόνο¹. Η στένωση των αρτηριών λόγω αθηροσκλήρυνσης και θρόμβωσης οδηγούν σε μείωση της οξυγόνωσης του ιστού, προκαλώντας, έτσι, ισχαιμία και έμφραγμα του μυοκαρδίου. Η ισχαιμική μυοκαρδιοπάθεια αποτελεί μια από τις συχνότερες και σοβαρότερες μορφές καρδιακής βλάβης. Όπως και στην πλειονότητα των περιπτώσεων ιστικής βλάβης παρατηρείται και εδώ διήθηση του ιστού από φλεγμονώδη κύτταρα. Ύστερα από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου υπάρχει αυξημένος κίνδυνος ρήξης του τοιχώματος της καρδιάς, γι' αυτό η φλεγμονή θεωρείται εν μέρει τουλάχιστον προστατευτική, καθώς επιτρέπει στην πληγή να επουλωθεί¹. Από την άλλη, η υπερβολική ή επιμένουσα φλεγμονή παρεμποδίζει την δημιουργία μιας συμπαγούς ουλής και έχει αντίστοιχους κινδύνους². Απουσία οξυγόνου, τα καρδιομυοκύτταρα πεθαίνουν και η εξωκυττάρια μήτρα αποδομείται, οδηγώντας σε διαταραχή της αρχιτεκτονικής του ιστού. Τα προϊόντα της διεργασίας αυτής αναγνωρίζονται ως σήματα κινδύνου (Danger associated molecular patterns, DAMPs) και έτσι ξεκινά η φλεγμονώδης αντίδραση^{3,4}. Ακολούθως ενεργοποιείται η σηματοδότηση μέσω των Toll-like υποδοχέων, οδηγώντας μεταξύ άλλων στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NFκB και την επαγωγή κυτταροκινών, χημειοκινών και μορίων προσκόλλησης. Έτσι, στρατολογούνται από την κυκλοφορία στον ιστό τα ουδετερόφιλα και ακολουθούν τα μονοκύτταρα-μακροφάγα, ώστε να καθαρίσουν τα υπολείμματα των νεκρών κυττάρων και παραπροϊόντα του μεταβολισμού τους, ενώ παράλληλα διεγείρουν μονοπάτια επιδιόρθωσης^{5,6}. Στη φλεγμονώδη αυτή φάση φαίνεται να συμμετέχει το NLRP3 φλεγμονόσωμα⁷, ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο που οδηγεί τελικά στην ενεργοποίηση της φλεγμονώδους ιντερλευκίνης-1β (IL-1β). Στην συνέχεια, τα φλεγμονώδη μακροφάγα (τύπου M1) μπορεί να αντικατασταθούν από μακροφάγα που προάγουν την επούλωση, αλλά και την ίνωση (τύπου M2)⁶, αν και η αντίληψη αυτή τείνει να εγκαταλειφθεί από νεότερες μελέτες, καθώς φαίνεται ότι οι υποπληθυσμοί των μακροφάγων που συμμετέχουν στο έμφραγμα του μυοκαρδίου δεν μπορούν να ταυτοποιηθούν επαρκώς με αυτό τον τρόπο^{8,9}. Παράλληλα οι καρδιακοί ινοβλάστες πολλαπλασιάζονται και εναποθέτουν κολλαγόνο στην εξωκυττάρια μήτρα, ώστε να

δημιουργήσουν μια ουλή που θα καλύψει το κενό των νεκρών καρδιομυοκυττάρων⁵. Στη διάρκεια αυτής της αναδόμησης, τα ουδετερόφιλα και τα λευκοκύτταρα υφίστανται απόπτωση⁵.

Ύστερα από ένα οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, ο καρδιακός μυς έχει βλαφθεί από ισχαιμία, φλεγμονή και αναδόμηση. Οι καρδιές των ενήλικων θηλαστικών έχουν μικρή ικανότητα αναγέννησης, καθώς τα καρδιομυοκύτταρα δεν μπορούν να πολλαπλασιαστούν και τα πρόδρομα κύτταρα των καρδιομυοκυττάρων είναι ελάχιστα στο μυοκάρδιο^{10,11}. Συνεπώς, η αρχική ουλή μπορεί να επεκταθεί και οι γειτονικές περιοχές να επηρεαστούν με καρδιακή ίνωση, μια διαδικασία που συμβάλλει στην δυσμενή αναδόμηση του καρδιακού ιστού και οδηγεί τελικά σε καρδιακή ανεπάρκεια. Οι ασθενείς που επιζούν ενός εμφράγματος του μυοκαρδίου έχουν υψηλή πιθανότητα για ανάπτυξη καρδιακής ανεπάρκειας, λόγω της δυσμενούς αναδόμησης του ιστού.

Η καρδιακή ανεπάρκεια ορίζεται ως η αδυναμία της καρδιάς να χορηγήσει στους περιφερειακούς ιστούς το απαιτούμενο ποσό αίματος και οξυγόνου, ανάλογα με τις μεταβολικές απαιτήσεις¹². Χαρακτηρίζεται από συμπτώματα δύσπνοιας και κούρασης. Είναι μια ασθένεια που συνδέεται με 10% θνησιμότητα τον χρόνο λόγω ξαφνικού θανάτου σε ασθενείς εμφράγματος του μυοκαρδίου με χαμηλό κλάσμα εξώθησης¹³ και κυμαίνεται μέχρι και το 50% σε ασθενείς με διατακτική καρδιομυοπάθεια. Παρά τις αναπτυσσόμενες θεραπείες, οι ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια παρουσιάζουν 25-50% θνησιμότητα ύστερα από 5 χρόνια διάγνωσης¹⁴. Εκτός από την ισχαιμία στην οποία οφείλεται περίπου το 50% της καρδιακής ανεπάρκειας, υπάρχουν στο σύνολο 17 αιτιολογίες καρδιακής ανεπάρκειας, μεταξύ των οποίων είναι οι καρδιομυοπάθειες και οι ασθένειες των βαλβίδων¹⁵. Οι κληρονομίσιμες καρδιομυοπάθειες προκαλούνται λόγω μη ισχαιμικής βλάβης, κυρίως λόγω μεταλλάξεων δομικών ή λειτουργικών πρωτεϊνών των καρδιομυοκυττάρων, όπως της δεσμίνης¹⁶. Υπάρχουν αρκετά είδη καρδιομυοπαθειών με κυριότερες την υπερτροφική, τη διατακτική, την αρρυθμογενή και την περιοριστική καρδιομυοπάθεια¹⁷⁻¹⁹. Η μελέτη των καρδιαγγειακών παθήσεων περιλαμβάνει την χρήση του μοντέλου στένωσης της στεφανιαίας αρτηρίας και αυτού της αορτικής συστολής, που παρουσιάζουν συμπτώματα ισχαιμικής και υπερτασικής καρδιομυοπάθειας αντίστοιχα. Επίσης, η χρήση γενετικών μοντέλων με μεταλλάξεις σε δομικές πρωτεΐνες των καρδιομυοκυττάρων έχει βοηθήσει την ερευνητική κοινότητα στην κατανόηση των περίπλοκων μηχανισμών που οδηγούν στην ανάπτυξη καρδιομυοπάθειας.

Η θεραπεία των καρδιαγγειακών παθήσεων και κυρίως του εμφράγματος του μυοκαρδίου παρουσιάζει εξαιρετική πρόοδο. Η θεραπευτική αντιμετώπιση του εμφράγματος περιλαμβάνει επαναδιάχυση (reperfusion), για την επαναφορά της ροής του αίματος με αντιθρομβωτικά. Ωστόσο, πολλοί ασθενείς με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου πεθαίνουν κατά την διάρκειά του και αυτοί που επιζούν μπορεί να αναπτύξουν καρδιακή ανεπάρκεια σε σημαντικά ποσοστά²⁰⁻²². Κατά την βλάβη του μυοκαρδίου ενεργοποιούνται το συμπαθητικό νευρικό σύστημα, το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης και τα αγγειοενεργά πεπτιδία (neurohumoral system)¹². Η τρέχουσα αντιμετώπιση περιλαμβάνει αναστολείς του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης και β-αδρενεργικών υποδοχέων, που αντιμετωπίζουν κυρίως τα συμπτώματα και όχι τις βασικές αιτίες του προβλήματος, που οδηγούν τελικά σε καρδιακή ανεπάρκεια¹⁵. Για τον λόγο αυτό, υπάρχει η ανάγκη ανάπτυξης διαφορετικών θεραπειών που θα έχουν καλύτερα αποτελέσματα για τον ασθενή. Τα τελευταία χρόνια, υπήρξε αυξημένο ερευνητικό ενδιαφέρον για την ενεργοποίηση της εγγενούς ανοσίας στην καρδιακή ανεπάρκεια, καθώς φαίνεται ότι οι κυτταροκίνες, χημειοκίνες και τα μόρια προσκόλλησης μπορούν να αποτελέσουν νέες φαρμακολογικές θεραπείες ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια²³. Ο TNF-α (Tumor necrosis factor-α), η IL-1, η IL-6 και η CRP (C-reactive protein) είναι κυτταροκίνες και μόρια που αυξάνονται δραματικά στην καρδιακή ανεπάρκεια και τα επίπεδά τους σχετίζονται με την σοβαρότητα της παθολογίας και την πρόγνωση²⁴. Τα ευρήματα αυτά έχουν οδηγήσει στην «υπόθεση κυτταροκινών», ότι δηλαδή τέτοια μόρια δεν αποτελούν βιοδείκτες αλλά παίζουν ενεργό ρόλο και για την πρόοδο της καρδιακής ανεπάρκειας^{24,25}. Παλαιότερες στοχεύσεις τέτοιων μορίων δεν επέφεραν τα επιθυμητά αποτελέσματα, νεότερες όμως μελέτες επιβεβαιώνουν την σημασία τους ως θεραπευτικών στόχων. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η μελέτη CANTOS, στην οποία η χορήγηση canakinumab, ενός αντισώματος που εξουδετερώνει την IL1β, βελτίωσε την καρδιαγγειακή υγεία των ασθενών^{26,27}.

1.2. Ενδιάμεσα ινίδια

Ο κυτταροσκελετός των ευκαρυωτικών κυττάρων αποτελείται από τρία κυτταροσκελετικά δίκτυα: τα μικροϊνίδια ακτίνης, τους μικροσωληνίσκους και τα ενδιάμεσα ινίδια. Οι πρωτεΐνες που απαρτίζουν τα ενδιάμεσα ινίδια παρουσιάζουν ένα ιστοειδικό και αναπτυξιακά εξαρτώμενο μοτίβο έκφρασης²⁸. Στον καρδιακό ιστό εκφράζονται τα ενδιάμεσα ινίδια τύπου III: δεσμίνη, βιμεντίνη και συνκοιλίνη, τύπου IV: συνεμίνη και νεστίνη και τύπου V: οι πυρηνικές λαμίνες. Όλες

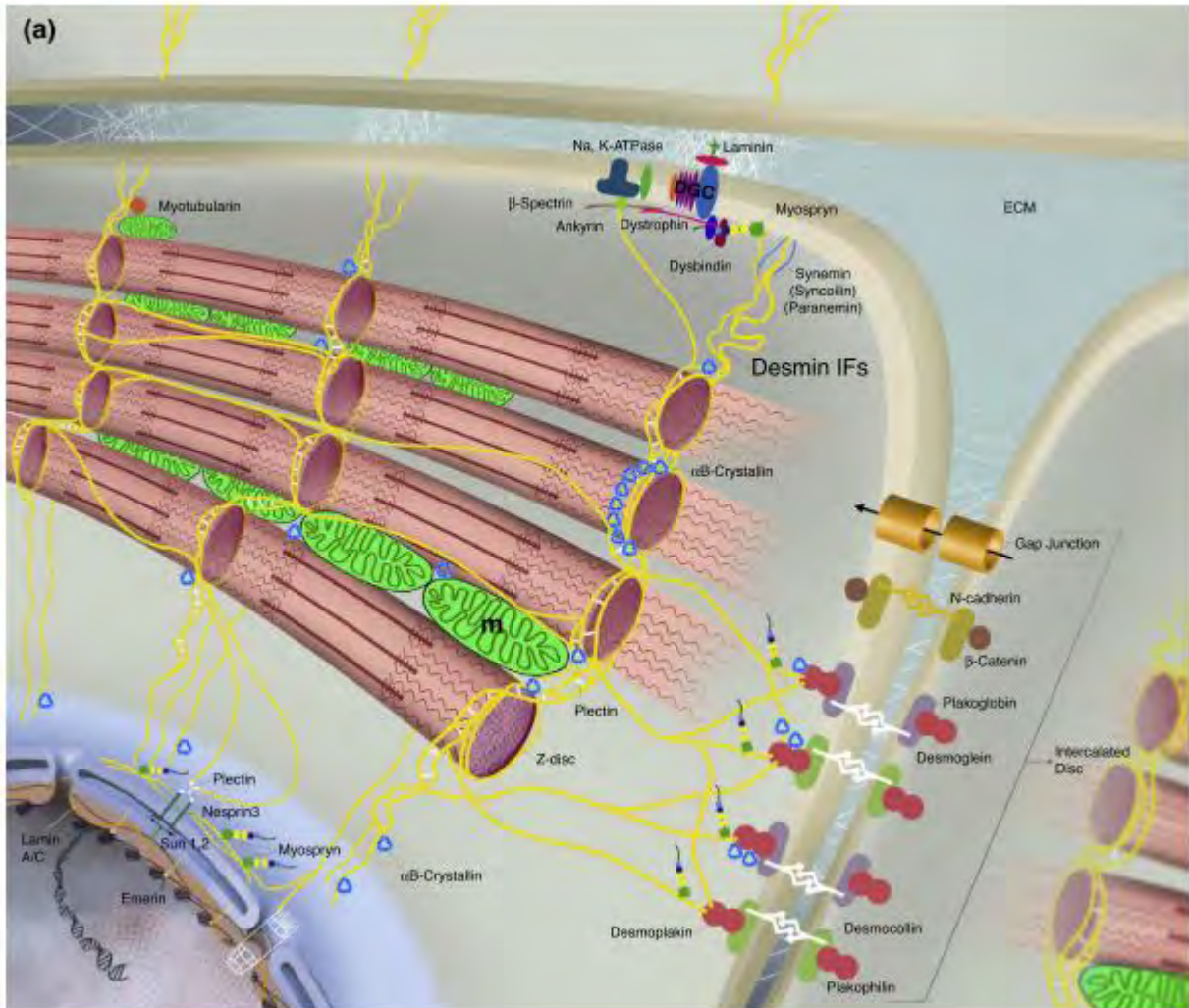
οι πρωτεΐνες των ενδιάμεσων ινιδίων έχουν μια κεντρική, συντηρημένη περιοχή α-έλικας ανάμεσα σε μια αμινο-τελική και καρβοξυ-τελική περιοχή, οι οποίες ποικίλλουν στα διαφορετικά ενδιάμεσα ινίδια. Οι σημαντικότερες λειτουργίες στις οποίες συμμετέχουν οι πρωτεΐνες των ενδιάμεσων ινιδίων είναι η βιογένεση των οργανιδίων, η μηχανοχημική μεταγωγή σήματος, η διαφοροποίηση των κυττάρων κ.α.²⁹. Πολλές λειτουργίες έχουν προταθεί για τα ενδιάμεσα ινίδια, ωστόσο η δεσμίνη, η μυο-ειδική πρωτεΐνη των ενδιάμεσων ινιδίων, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς παίζει σημαντικό ρόλο σε διάφορες σκελετικές και καρδιακές μυοπάθειες¹⁶.

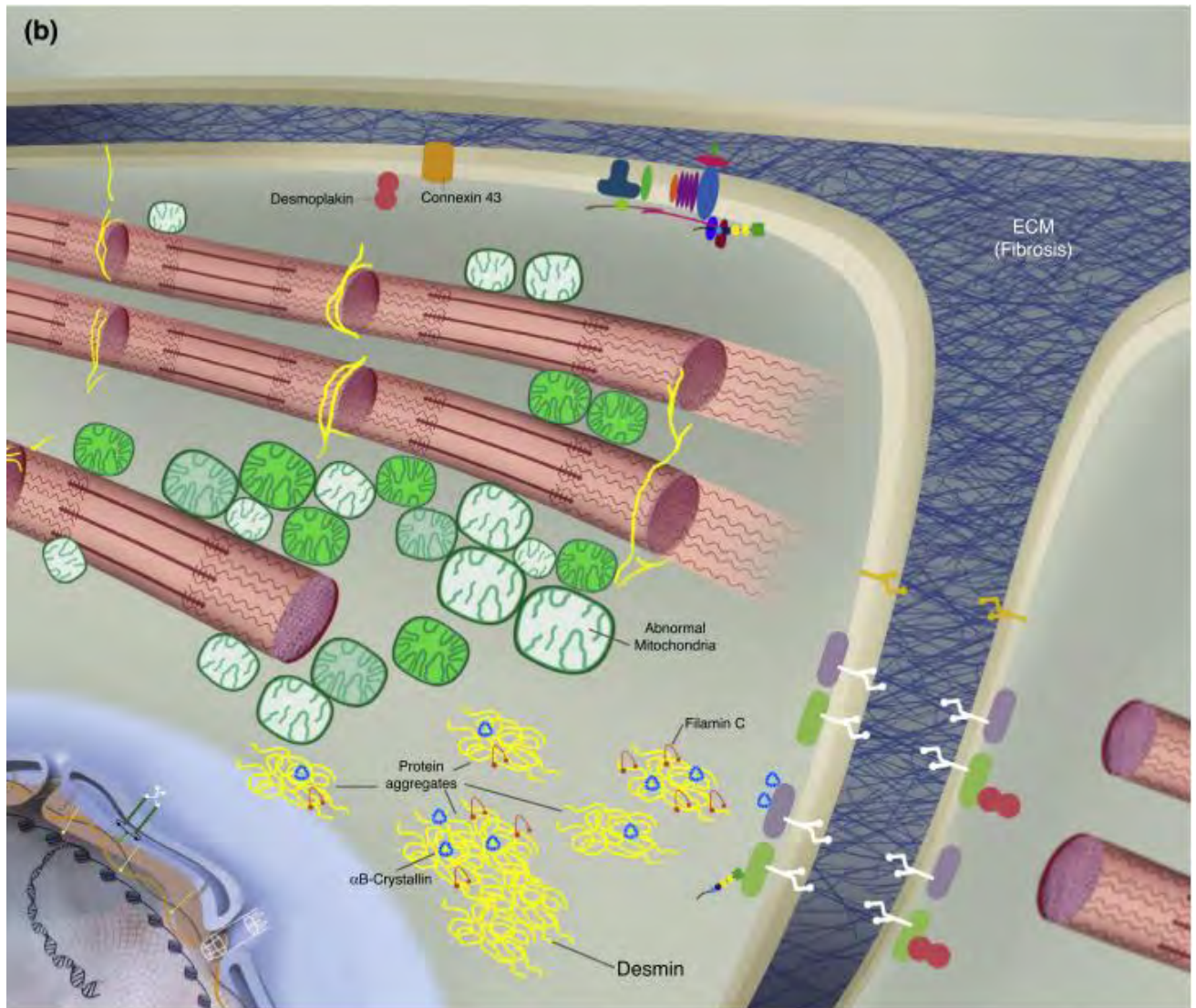
1.3. Δεσμίνη

Η δεσμίνη σχηματίζει ενδιάμεσα ινίδια, τα οποία εντοπίζονται στην περιφέρεια των Z-δίσκων των σκελετικών μυών, των καρδιομυοκυττάρων και στα πυκνά σωμάτια των λείων μυών³⁰. Η δεσμίνη κωδικοποιείται από ένα γονίδιο³¹ και εκφράζεται από την 8,25 εμβρυϊκή ημέρα πριν από όλους (εκτός από έναν) τους μυοειδικούς δείκτες^{32,33}, υποδεικνύοντας την σημασία της στην ρύθμιση και διαφοροποίηση των μυογονικών κυττάρων. Στον ώριμο ραβδωτό μυ, τα ενδιάμεσα ινίδια δεσμίνης συνδέουν ανεξάρτητα τα ινίδια το ένα μετά το άλλο στους Z δίσκους και σε άλλες ενδοκυτταρικές δομές, συμπεριλαμβανομένων των κοσταμερών και των παρεμβαλλόμενων δίσκων του σαρκολήμματος, των μιτοχονδρίων, των T- σωληνίσκων και του πυρήνα³⁴⁻³⁸.

Η δεσμίνη μαζί με άλλες πρωτεΐνες δημιουργούν μια τρισδιάστατη σκαλωσια που εκτείνεται σε όλη τη διάμετρο του καρδιομυοκυττάρου, περιβάλλει τους Z-δίσκους, ενώνοντας τη συσταλτική συσκευή με τα κοσταμερή και τους παρεμβαλλόμενους δίσκους της πλασματικής μεμβράνης, καθώς και τα μεμβρανικά οργανίδια²⁹(**Σχήμα 1α**). Το δίκτυο δεσμίνης-ενδιάμεσων ινιδίων διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και διατήρηση της ομοιόστασης του ραβδωτού μύος, μέσω συντονισμού των διαφόρων κυτταρικών παραγόντων για μηχανοχημική σηματοδότηση, αλληλεπίδραση των οργανιδίων, παραγωγή ενέργειας και τις διαδικασίες μεταφοράς για την διατήρηση της ομοιόστασης του ιστού. Πάνω από 70 μεταλλάξεις στο γονίδιο της δεσμίνης, που προκαλούν δεσμινοπάθειες³⁹⁻⁴³, έχουν βρεθεί σε ανθρώπινες καρδιοπάθειες, από τις οποίες η διατακτική μυοκαρδιοπάθεια είναι η πιο συχνή, οδηγώντας συνήθως σε μη φυσιολογική συσσώρευση συσσωματωμάτων δεσμίνης¹⁶(**Σχήμα 1β**). Επιπλέον, η δημιουργία συσσωματωμάτων δεσμίνης, μέσω της πρωτεόλυσης από την κασπάση είναι σημαντικός

ρυθμιστής της καρδιακής ανεπάρκειας που επάγεται από τον TNF- α , στην οποία παρατηρείται αποσταθεροποίηση των παρεμβαλλόμενων δίσκων, μιτοχονδριακές ανωμαλίες, θάνατος των καρδιομυοκυττάρων και τελικά καρδιακή ανεπάρκεια.⁴⁴

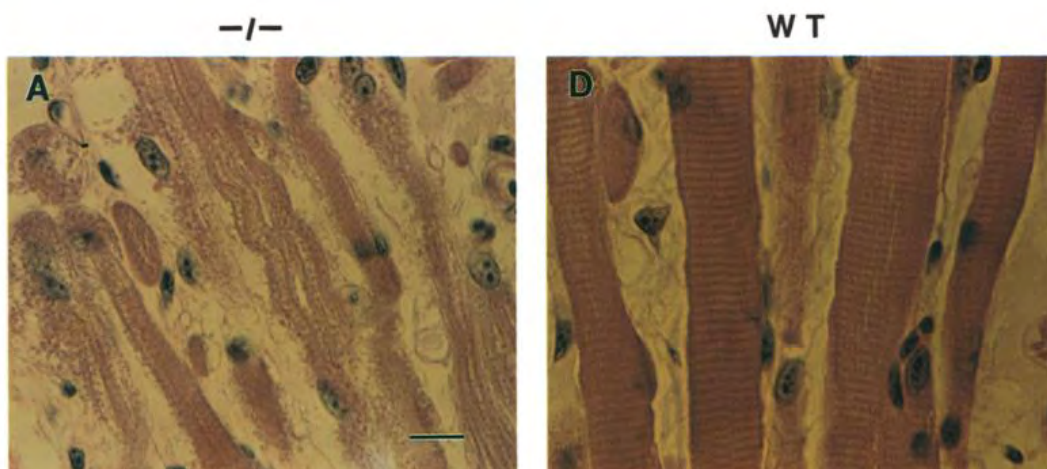




Σχήμα 1 Σχηματική αναπαράσταση του δικτύου των καρδιακών ενδιάμεσων ινιδίων και της σύνδεσής τους με διάφορα μεμβρανικά οργανίδια και διαμερίσματα. (α) Στον καρδιακό μυ, η δεσμίνη (κίτρινο) μαζί με άλλες πρωτεΐνες (α B-κρυσταλλίνη, πλεκτίνη κλπ) σχηματίζουν ένα τρισδιάστατο δίκτυο που συνδέει την συσταλτική συσκευή με επιμέρους μεμβρανικά διαμερίσματα. Η δεσμίνη με την λαμίνη λειτουργούν ως μεσάζοντες σηματοδότησης από το σαρκόλημμα, στην συσταλτική συσκευή και τελικά στον πυρήνα. Η διαταραχή του δικτύου ενδιάμεσων ινιδίων της δεσμίνης εμπλέκεται στην διατακτική μυοκαρδιοπάθεια (DCM). (β) Οι καταστροφικές επιπτώσεις της απώλειας της λειτουργίας ή της μετάλλαξης του γονιδίου της δεσμίνης ή λόγω πρωτεόλυσης επαγόμενης από τον TNF- α φαίνονται στην εικόνα. Τα συσσωματώματα δεσμίνης που περιέχουν υψηλές ποσότητες άλλων πρωτεϊνών (εδώ α B-κρυσταλλίνη και φιλαμίνη C) είναι ορατά με κίτρινο. Από τις πρώτες ανωμαλίες που παρατηρούνται είναι ο κατακερματισμός και η αποικοδόμηση των μιτοχονδρίων, καθώς και η αποκόλληση της δεσμίνης από τον πυρήνα, διαταραχές στους παρεμβαλλόμενους δίσκους και εσφαλμένη τοποθέτηση των παραγόντων τους στις πλευρικές περιοχές του σαρκόλημματος. Από Carpetanaki Y., 2015¹⁶

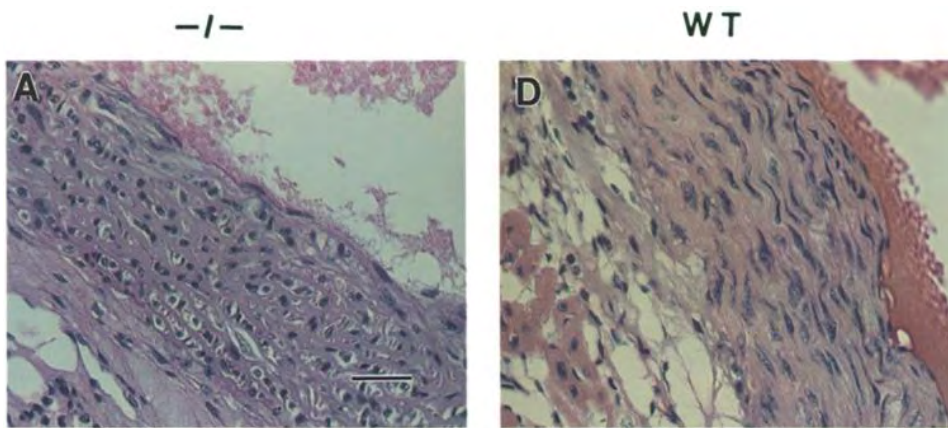
1.4. Μοντέλο καρδιακής ανεπάρκειας *desmin null*

Η δημιουργία ποντικών απουσία δεσμίνης προσέδωσε σημαντικά ευρήματα για την κατανόηση της συμμετοχής της δεσμίνης στις μυοπάθειες⁴⁵. Τα *des*^{-/-} ποντίκια είναι βιώσιμα, αναπτύσσουν λειτουργικό σκελετικό καρδιακό και λείο μυ, υποδεικνύοντας ότι η δεσμίνη δεν είναι απαραίτητη για την δημιουργία των μυών⁴⁶. Σε αντίθεση με τις δεσμινοπάθειες, τα ποντίκια με έλλειψη δεσμίνης αποτελούν ένα μοντέλο χωρίς συσσωματώματα, στα οποία επίσης αναπτύσσεται καρδιομυοπάθεια και σκελετική μυοπάθεια, υποδεικνύοντας ότι ο μηχανισμός της παθολογίας είναι κυρίως η απώλεια της λειτουργίας της δεσμίνης και της αλληλεπίδρασής της με τα επιμέρους μόρια και οργανίδια, όπως τα μιτοχόνδρια, και όχι η απόκτηση τοξικής λειτουργίας λόγω των συσσωματωμάτων. Συγκεκριμένα, παρουσιάζονται ανωμαλίες στην αρχιτεκτονική και των τριών τύπων μυών⁴⁵. Ιστολογική εξέταση του σκελετικού μυός της γλώσσας, του ποδιού και του διαφράγματος εδειξε διαταραχές στην συνοχή και την οργάνωση των μυοϊνιδίων (Σχήμα 2)



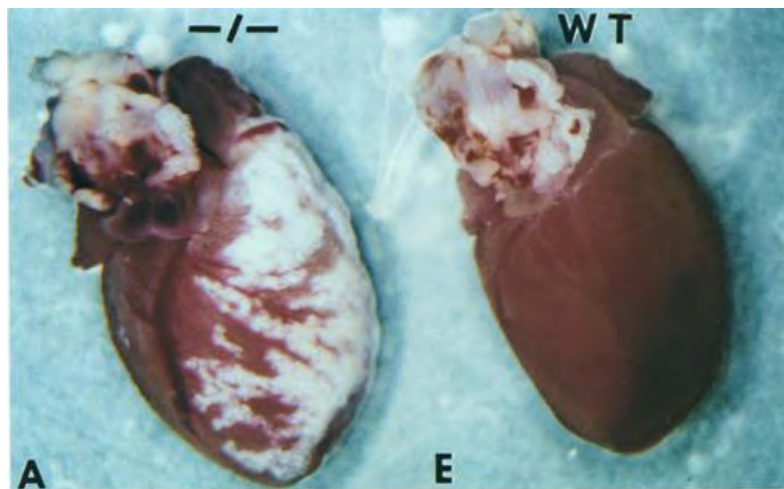
Σχήμα 2 Ανωμαλίες σκελετικού μυός στα *des*^{-/-} ποντίκια. Τομή γλώσσας από *des*^{-/-} ζώα, στην οποία τα μυοϊνίδια εμφανίζονται αποδιοργανωμένα και έτοιμα για αποδιάταξη σε σύγκριση με τα *wt* μικροϊνίδια⁴⁵

Ένας άλλος τύπος μυός, ο λείος μυς, παρουσίασε αντίστοιχες ανωμαλίες ύστερα από ιστολογική εξέταση. Ο λείος μυς της αορτής των *des*^{-/-} ποντικών εμφανίζει μια χαλαρή συνοχή λείων μυικών κυττάρων, υποπλασία και χαμηλό βαθμό αποδιάταξης (Σχήμα 3)



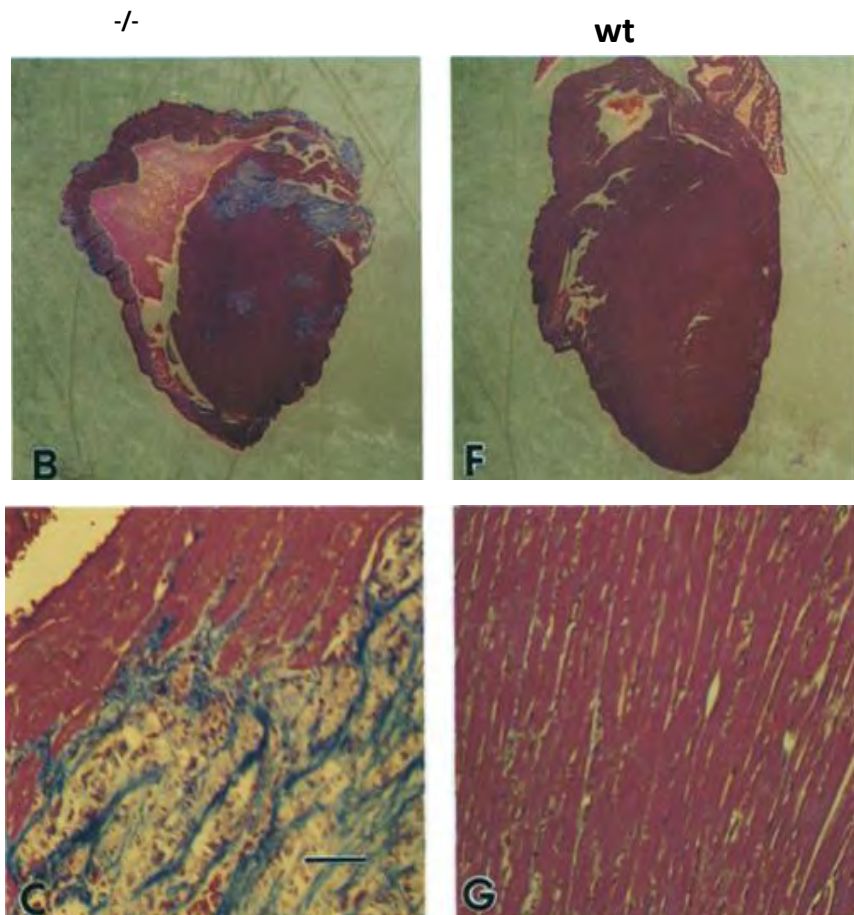
Σχήμα 3 Ανωμαλίες λείου μυός στα *des*^{-/-} ποντίκια. Τομή αορτής από *des*^{-/-} ζώα, στην οποία τα μυοκύτταρα εμφανίζονται αποδιοργανωμένα, σε χαλαρή διάταξη σε σχέση με τα *wt*⁴⁵

Από την άλλη, οι εντονότερες βλάβες λόγω της απουσίας της δεσμίνης εντοπίζονται στον καρδιακό μυ ακόμη και μακροσκοπικά. Οι καρδιές των *des*^{-/-} ποντικών παρουσιάζουν εκτεταμένη ασβεστοποίηση και διήθηση φλεγμονωδών κυττάρων στο μυοκάρδιο⁴⁷(Σχήμα 4)



Σχήμα 4 Καρδιές ποντικών 10 εβδομάδων *des*^{-/-} και *wt* παρουσιάζουν εκτεταμένη εναπόθεση ασβεστίου και φλεγμονώδη διήθηση στο μυοκάρδιο⁴⁵

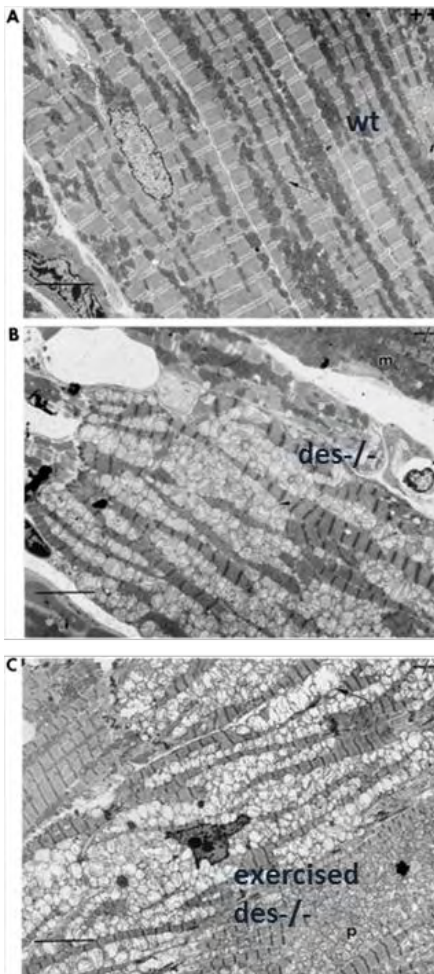
Επίσης, παρουσιάζονται περιοχές διαταραχής και αποδιοργάνωσης των καρδιακών ινιδίων με εκτεταμένη ίνωση και νέκρωση του μυοκαρδίου, όπως φαίνεται στο Σχήμα 5 με την αυξημένη εναπόθεση κολλαγόνου(μπλέ) στις *des*^{-/-} καρδιές.



Σχήμα 5 Αξιολόγηση της ίνωσης ύστερα από χρώση Masson's σε wt και $des^{-/-}$ καρδιές. Καρδιές ποντικών 10 εβδομάδων $des^{-/-}$ και wt παρουσιάζουν εκτεταμένη ίνωση και αποδιοργάνωση του μυοκαρδίου⁴⁵

Ανάλυση με ηλεκτρονική μικροσκοπία των $des^{-/-}$ καρδιών έδειξε αποδιοργάνωση των καρδιομυοκυττάρων την ημέρα 11-14 μετά την γέννηση, ενώ παρουσιάζονται περιοχές διήθησης φλεγμονωδών κυττάρων, ίνωση και ασβεστοποίηση στον ενδοκοιλιακό χώρο και στην δεξιά κοιλία, υποδεικνύοντας την ανάπτυξη καρδιομυοπάθειας στις $des^{-/-}$ καρδιές⁴⁸. Δομικά, η απουσία της δεσμίνης οδηγεί τα καρδιομυοκύτταρα σε υπερτροφική απόκριση, ελαττωματική συστολική και διαστολική λειτουργία, διαστολή των κοιλοτήτων και τελικά καρδιακή ανεπάρκεια^{47,49}.

Από τις πρώτες διαταραχές που παρατηρούνται στο μυοκάρδιο των desmin null ποντικών είναι οι μιτοχondριακές ανωμαλίες, όπως διαταραχή της δομής cristae, οίδημα, αλλαγή στο σχήμα και την θέση, κατακερματισμός των μιτοχondρίων και μειωμένη αναπνευστική λειτουργία (Σχήμα 6)^{45,50}. Παρατηρείται αύξηση του οξειδωτικού στρες, αυξημένη ενεργοποίηση του μιτοχondριακού πόρου μετάβασης της διαπερατότητας(mPTP) και μειωμένο δυναμικό μιτοχondρίων $\Delta\psi_m$ ⁵¹. Η μετριοπαθής υπερέκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως της καταλάσης, φαίνεται να βελτιώνει

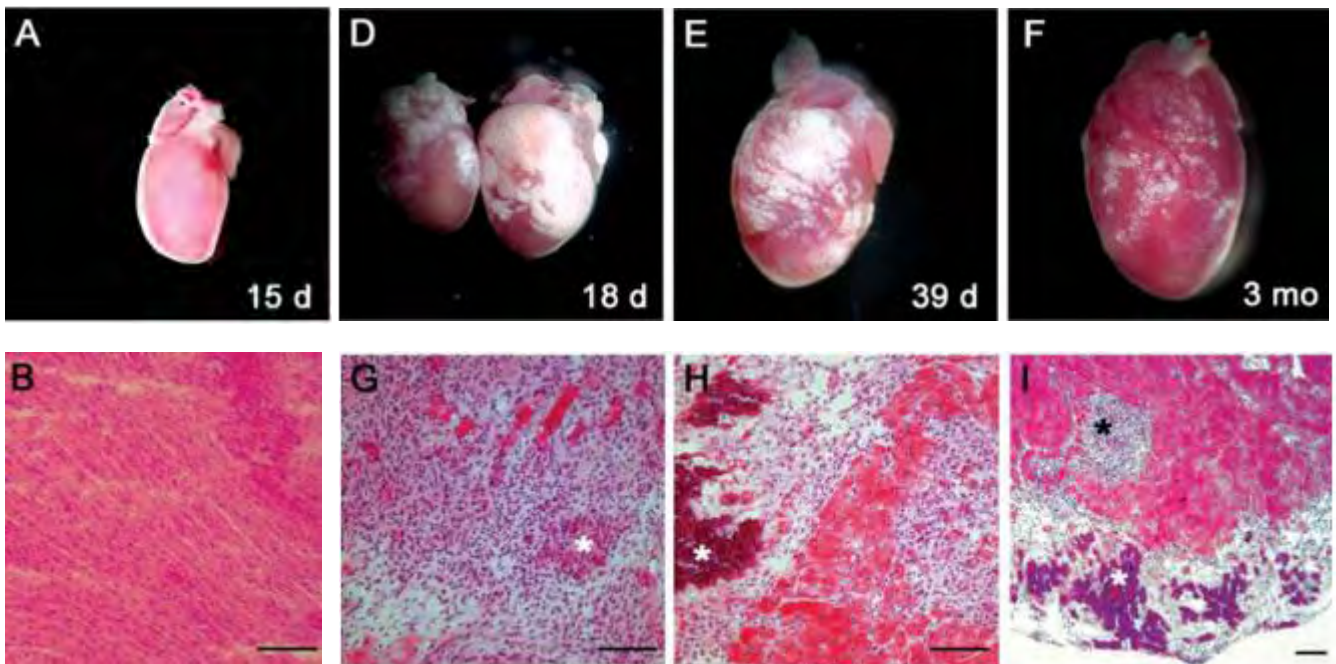


την καρδιακή λειτουργία του $des^{-/-}$ και να μειώνει την φλεγμονή, σε αντίθεση με την υπερέκφραση της MnSOD που αύξησε την θνησιμότητα των ποντικών⁵². Επίσης, η υπερέκφραση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης των μιτοχονδρίων Bcl-2 προσδίδει καρδιοπροστασία στο $des^{-/-}$ ποντίκι⁵³. Επιπλέον, οι Diokmetzidou et al έδειξαν ότι η υπερέκφραση της heat-shock πρωτεΐνης α -κρυσταλλίνης προστατεύει τις $des^{-/-}$ καρδιές από την δυσμενή αναδόμηση, μέσω ελάττωσης των μιτοχονδριακών ανωμαλιών, επαναφέροντας, έτσι, την καρδιακή λειτουργία σχεδόν σε φυσιολογικά επίπεδα⁵¹. Από τα παραπάνω, φαίνεται ότι η οξειδωτική βλάβη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της παθολογίας των $des^{-/-}$ ποντικών.

Σχήμα 6 Δομική παρατήρηση μιτοχονδριακών αλλαγών στον καρδιακό μυ. **A:** Καρδιακός μυς αγρίου τύπου με φυσιολογική απεικόνιση των καρδιομυοκυττάρων, στοιχισμένα μυοϊνίδια και φυσιολογικά μιτοχόνδρια μεταξύ αυτών. **B:** καρδιακός μυς $des^{-/-}$ ποντικών που παρουσιάζει οίδημα στα μιτοχόνδρια μεταξύ των μυοϊνιδίων και συσσωμάτωσή τους. **C:** Καρδιακός μυς $des^{-/-}$ ποντικών ύστερα από άσκηση που παρουσιάζει

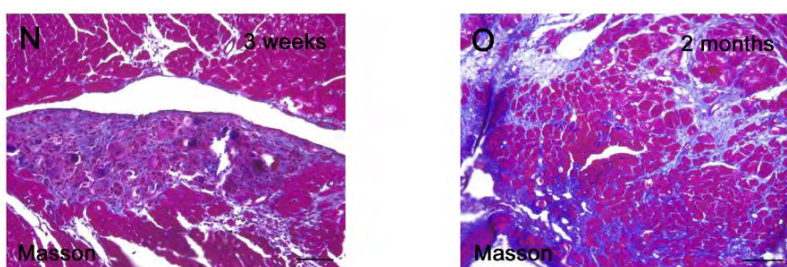
οιδηματικά μιτοχόνδρια με σπασμένη δομή *cristae*.⁵⁰

Ο θάνατος των καρδιομυοκυττάρων λόγω των μιτοχονδριακών ανωμαλιών διεγείρει την φλεγμονή στις $des^{-/-}$ καρδιές. Η φλεγμονή αποσκοπεί στον καθαρισμό της πληγής, τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (κυρίως των καρδιακών ινοβλαστών και του ενδοθηλίου) και τελικά την δημιουργία της ουλής μέσω της έκκρισης κολλαγόνου από τους ινοβλάστες, ώστε να καλυφθεί το κενό των νεκρών κυττάρων και να διατηρηθεί η γεωμετρία του ιστού⁵. Στο γενετικό μοντέλο $des^{-/-}$, η ημέρα 15/16 ταυτοποιήθηκε ως η ημέρα έναρξης της οξείας φλεγμονώδους απόκρισης, κατά την οποία τα λευκοκύτταρα της κυκλοφορίας διηθούν τον ιστό μαζί με τα μακροφάγα και οι ινοβλάστες διαφοροποιούνται προς μυοινοβλάστες ως τμήμα της ινωτικής απόκρισης⁴⁷(**Σχήμα 7**)



Σχήμα 7 Εμφάνιση φλεγμονής στο μυοκάρδιο των *des^{-/-}* στις 15/16 μέρες, η οποία αυξάνεται ραγδαία και μειώνεται σταδιακά. Φωτογραφίες ολόκληρης της καρδιάς και τομών μυοκαρδίου ύστερα από χρώση H&E (από Psarras et al⁴⁷)

Καθώς η φλεγμονή σταδιακά οδηγείται σε αποδρομή, εγκαθιδρύεται η ίνωση. Καρδιές ποντικών *des^{-/-}* 2 μηνών παρουσιάζουν αυξημένη εναπόθεση κολλαγόνου (Σχήμα 8). Παράλληλα, επάγεται η έκκριση διαφόρων ρυθμιστών της αναδόμησης, όπως η οστεοποντίνη⁴⁷, η οποία συνεντοπίζεται με τα άλατα ασβεστίου που εναποτίθενται στο αποδιοργανωμένο *des^{-/-}* μυοκάρδιο⁵⁴.



Σχήμα 8 Προοδευτική εναπόθεση κολλαγόνου στις περιοχές εκτεταμένης φλεγμονής των 3 εβδομάδων εως τις τις μεγάλες ινωτικές περιοχές των 2 μηνών (από Psarras et al⁴⁷)

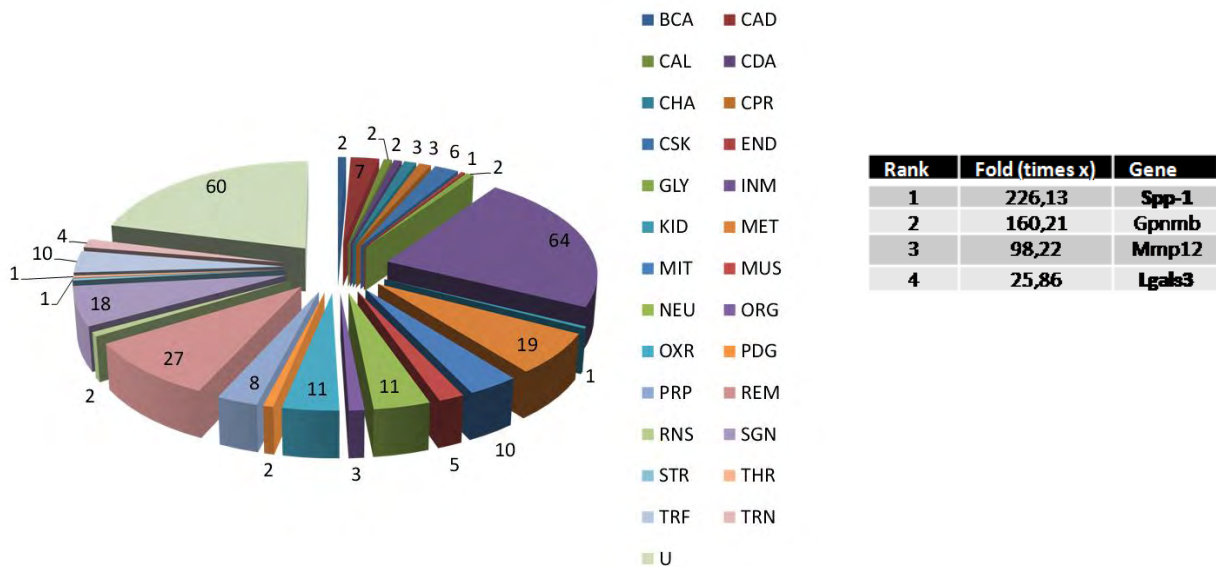
Η ανάπτυξη της καρδιομυοπάθειας του *des^{-/-}* μοντέλου είναι προοδευτική και περιλαμβάνει χαρακτηριστικά πολλών καρδιομυοπαθειών. Παρατηρείται αταξία στην διεύθυνση των μυοκυττάρων με πρόσκαιρη υπερτροφία, η οποία αντανακλάται στην αύξηση του λόγου βάρους καρδιάς/βάρους σώματος κυρίως σε ζώα 3 μηνών παράλληλα με την αύξηση του ANF (atrial natriuretic factor) και της α -ακτίνης του σκελετικού μύος (Σχήμα 9)⁴⁹. Παρουσιάζονται

χαρακτηριστικά διατακτικής καρδιομυοπάθειας με προσβολή της δεξιάς και της αριστερής κοιλίας και συστολική και διαστολική δυσλειτουργία, η οποία είναι δυσμενέστερη σε ζώα μεγαλύτερης ηλικίας, τα οποία εμφανίζουν χαρακτηριστικές παραμέτρους της καρδιακής ανεπάρκειας, ενώ παρατηρείται και αρρυθμιόγonos καρδιακή ανεπάρκεια της δεξιάς κοιλίας^{47,49,55}.



Σχήμα 9 Διατακτική καρδιομυοπάθεια και αύξηση των δεικτών ANF και α-ακτίνη του σκελετικού μυός [από Milner et al⁴⁹]

Περαιτέρω ανάλυση στο μοντέλο με στόχο να βρεθούν μόρια και κύτταρα που ρυθμίζουν την φλεγμονή, την ίνωση και την πορεία προς καρδιακή ανεπάρκεια ανέδειξε ότι ακόμα και στην φάση που ακολουθεί την οξεία φλεγμονή (3 μήνες), τα περισσότερα γονίδια (n=64) που επάγονται στην *des^{-/-}* καρδιά σχετίζονται με την φλεγμονή ή/και την ανοσολογική απάντηση, ενώ ένας σημαντικός αριθμός γονιδίων (n=27) σχετίζεται με την ιστική αναδόμηση και την αγγειογένεση⁴⁷. Υπάρχει εντονότερη υπερέκφραση τεσσάρων σχετιζόμενων με την φλεγμονώδη απόκριση μορίων: της οστεοποντίνης (226x OPN, *Spp1*), της γαλεκτίνης-3 (26x Gal3, *Lgals3*), της οστεοακτιβίνης (160x OA, *Gprmtb*) και της μεταλλοπρωτεάσης-12 (98x MMP12, *Mmp12*) (Σχήμα 10).



Σχήμα 10 Ανάλυση οντολογίας γονιδίων που υπερεκφράζονται στο μυοκάρδιο των *des*^{-/-} ποντικών. Τα τέσσερα υπερεκφραζόμενα μόρια παρουσιάζονται στον πίνακα. (από Psarras et al⁴⁷)

Σε μελέτες ανοσοιστοχημείας βρέθηκε ότι τα μόρια αυτά συνεντοπίζονται πλήρως ή εν μέρει με τα CD11b+ μακροφάγα που διηθούν το μυοκάρδιο, και όχι με καρδιομυοκύτταρα ή άλλους τοπικούς κυτταρικούς πληθυσμούς). Η οστεοποντίνη και η γαλεκτίνη-3 φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της φλεγμονής, την εγκαθίδρυση της ίνωσης και την πρόοδο προς την καρδιακή ανεπάρκεια. Συγκεκριμένα, γενετική απαλοιφή της οστεοποντίνης μειώνει την καρδιακή ίνωση και βελτιώνει τη καρδιακή δυσλειτουργία που παρουσιάζεται στο *des*^{-/-} μοντέλο, μέσω μείωσης της γαλεκτίνης-3 που εκκρίνεται από τα μακροφάγα και διαμεσολαβεί τις διαδικασίες ίνωσης και αναδόμησης του μυοκαρδίου⁴⁷. Η πρόσφατη δημιουργία ποντικών με διπλή απαλοιφή της δεσμίνης και της γαλεκτίνης-3 έδειξε επίσης βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας και της ίνωσης.^{56,57} Η απουσία της γαλεκτίνης-3 δεν επηρεάζει τον θάνατο των καρδιομυοκυττάρων, αλλά διαμεσολαβεί στις διαδικασίες επιδιόρθωσης⁵⁸, καθώς απουσία αυτής παρατηρείται διαταραχή της ομοίωσης των ινοβλαστών⁵⁶. Παράλληλα με την καρδιακή ανεπάρκεια, τα *des*^{-/-} ποντίκια αναπτύσσουν συννοσηρότητες στον πνεύμονα και τα νεφρά, με εμφυσηματικό φαινότυπο και εστίες φλεγμονής και ίνωσης, αντίστοιχα, οι οποίες φαίνεται να βελτιώνονται όταν απουσιάζει η γαλεκτίνη-3^{59,60}.

Συνολικά, στο *des*^{-/-} μοντέλο καρδιακής ανεπάρκειας παρατηρείται αυξημένη φλεγμονή στις 4 εβδομάδες, η οποία σταδιακά οδηγείται σε αποδρομή και επεκτείνονται οι διεργασίες της ίνωσης στους 4 μήνες, οι οποίες οδηγούν σε δυσμενή αναδόμηση του καρδιακού ιστού και καρδιακή δυσλειτουργία με συννοσηρότητες σε πνεύμονα και νεφρά. Η αύξηση της ίνωσης και της

καρδιακής δυσλειτουργίας προοδευτικά οδηγεί σε καρδιακή ανεπάρκεια σε 12 μηνών ποντίκια $des^{-/-}$, τα οποία έχουν μειωμένη συστολική και διαστολική λειτουργία και διάταση των κοιλοτήτων της καρδιάς^{47,49}. Η βελτίωση που παρατηρείται όταν απουσιάζουν μόρια ρυθμιστές της καρδιακής αναδόμησης του $des^{-/-}$, όπως η οστεοποντίνη και η γαλεκτίνη-3, υπογραμμίζει την σημασία της ρύθμισης της φλεγμονής στην καρδιακή ανεπάρκεια που παρατηρείται στο $des^{-/-}$.

Περαιτέρω μελέτη της φλεγμονώδους απόκρισης αποκάλυψε την αυξορρύθμιση του ανταγωνιστή του υποδοχέα της IL-1(IL-1Ra, κωδικοποιούμενου από το *Il1rn*) κατά την έναρξη της φλεγμονής στο μυοκάρδιο των $des^{-/-}$ ποντικών⁶¹. Ως φυσικός ανταγωνιστής της IL-1, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις βιολογικές αποκρίσεις της κυτταροκίνης. Η ισορροπία της έκφρασης μεταξύ του ανταγωνιστή και της IL-1β είναι μείζονος σημασίας για την πρόοδο της αναδόμησης μετά το έμφραγμα του μυοκαρδίου και η φαρμακολογική χορήγηση του IL-1Ra παρουσιάζει θετικά αποτελέσματα σε ζωικά μοντέλα αλλά και σε ασθενείς^{62,63}. Η IL-1β παίζει σημαντικό ρόλο στην διαμεσολάβηση της βλάβης του ιστού, μέσω της ενεργοποίησης φλεγμονωδών και ινωτικών μονοπατιών, όπως φαίνεται σε μοντέλα εμφράγματος σε ποντικούς αλλά και στον άνθρωπο^{64,65}. Το πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο του NLRP3 φλεγμονοσώματος είναι υπεύθυνο για την επαγωγή και έκφραση της IL-1β και συμμετέχει στην φλεγμονώδη απόκριση που παρατηρείται κατά το έμφραγμα του μυοκαρδίου(βλέπε παρακάτω). Με βάση τα αποτελέσματα αυτά μελετήσαμε την υπόθεση ενεργοποίησης του NLRP3 φλεγμονοσώματος στην $des^{-/-}$ καρδιομυοπάθεια, με την πιθανή του ανάδειξη ως βιοδείκτη και ρυθμιστή της φλεγμονής να στοχεύει στη βελτίωση της παθοφυσιολογίας του μοντέλου.

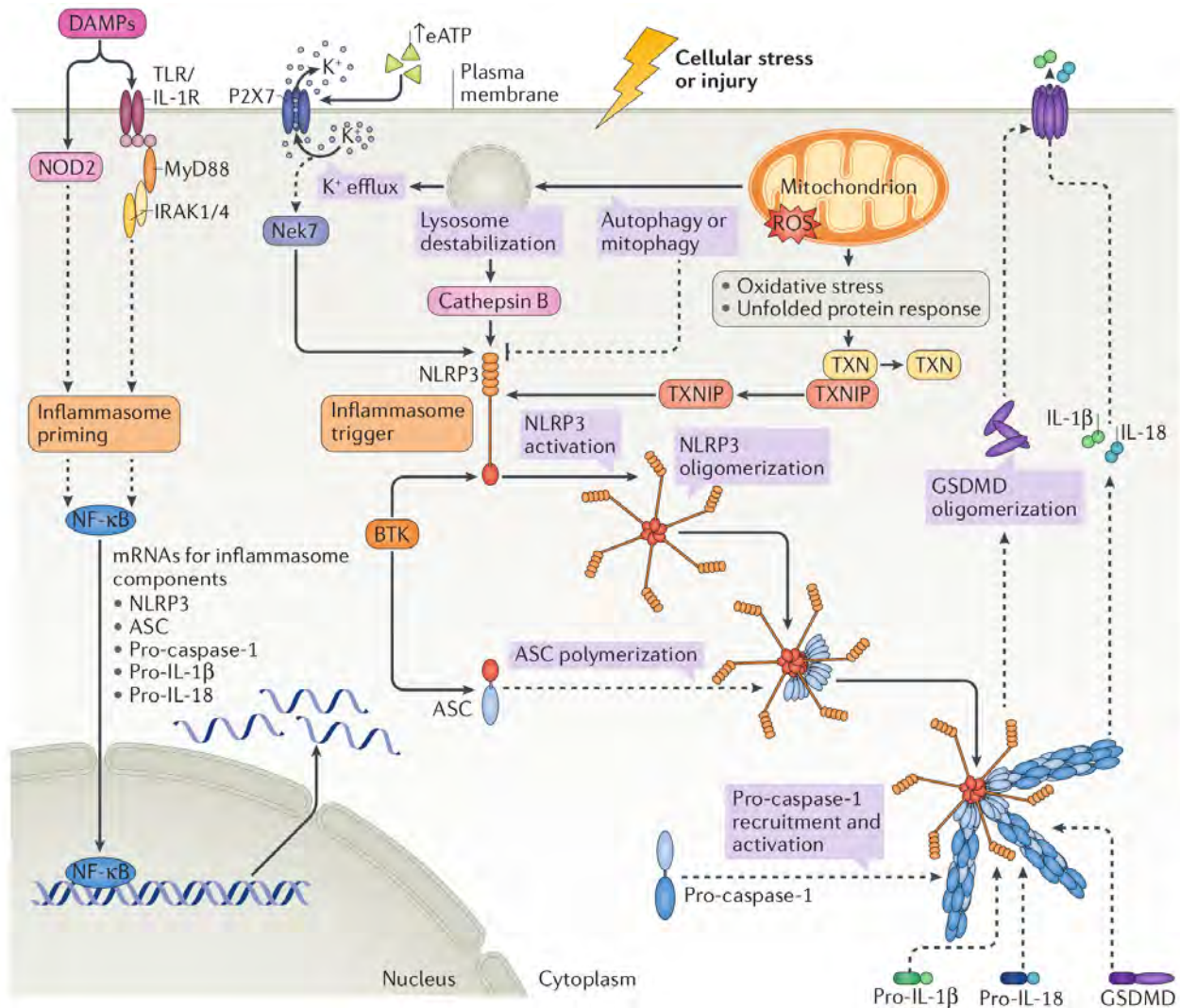
1.5. NLRP3 φλεγμονόσωμα

Ο όρος φλεγμονόσωμα δόθηκε από τους Tchorp et al⁶⁶ για να περιγραφεί ένα υψηλού μοριακού βάρους σύμπλεγμα που βρίσκεται στο κυτοσόλιο διεγερμένων ανοσοκυττάρων και μεσολαβεί την ενεργοποίηση των φλεγμονωδών κασπασών. Αρκετά είδη φλεγμονοσώματος έχουν βρεθεί να συμμετέχουν στην εγγενή άμυνα του οργανισμού απέναντι σε βακτηριακές μολύνσεις και παθογόνα⁶⁷. Οι κυριότερες πέντε πρωτεΐνες-υποδοχείς που απαρτίζουν το φλεγμονόσωμα και είναι γνωστές έως σήμερα είναι: το NLRP1, NLRC4 και η πυρίνη που ενεργοποιούνται με βακτηριακά προϊόντα και τοξίνες, το AIM2 που ενεργοποιείται παρουσία ελεύθερου DNA και το

NLRP3 (NLR binding pyrin domain containing 3) που εξειδικεύεται στην στείρα φλεγμονή, απουσία παθογόνων⁶⁸.

Το NLRP3 φλεγμονόσωμα είναι ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο, το οποίο συμμετέχει στην στείρα φλεγμονώδη απόκριση και δρα ως φύλακας του κυττάρου^{69,70}. Αποτελείται από τον ενδοκυτταρικό υποδοχέα-αισθητήρα NLRP3, ο οποίος έχει 3 περιοχές: NOD (περιοχή ολιγομερισμού των νουκλεοτιδίων), LRR (περιοχή πλούσια σε λευκίνη) και PYD (περιοχή πυρίνης)⁷¹. Η τελευταία στρατολογεί τον προσαρμογέα ASC (apoptosis speck-like protein containing a caspase recruitment domain [CARD]) και αυτός με την σειρά του στρατολογεί μέσω της περιοχής CARD την ανενεργή προ-κασπάση 1⁷². Η στρατολόγηση της προ-κασπάσης 1 στο NLRP3 φλεγμονόσωμα επάγει την πρωτεόλυση και ενεργοποίησή της, ώστε να ενεργοποιήσει τις πρόδρομες μορφές της IL-1β και της ιντερλευκίνης-18 (IL-18)⁷³⁻⁷⁵. Οι κυτταροκίνες αυτές εξέρχονται του κυττάρου μέσω των πόρων που σχηματίζει στην πλασματική μεμβράνη η γκασδερίνη D(GSDMD)^{75,76}, και ενεργοποιούν την φλεγμονή σε άλλα κύτταρα⁷⁵. Η IL-18 εκφράζεται διαρκώς⁷⁷, ενώ η μεταγραφή της IL-1β απαιτεί την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NFκB^{78,79}.

Τα σήματα κινδύνου (DAMPs) που ενεργοποιούν το NLRP3 φλεγμονόσωμα είναι πολλά και διαφορετικά και συμπεριλαμβάνουν το ATP που απελευθερώνεται από τα νεκρωτικά κύτταρα⁸⁰, τις μιτοχονδριακές αντιδραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS)⁸¹, το οξειδωμένο μιτοχονδριακό DNA⁸², την αποσταθεροποίηση του λυσοσώματος⁸³, καθώς και την εκροή K⁺⁸⁴. Παρουσία DAMPs, ενεργοποιούνται υποδοχείς TLR (TLR9, TLR4) της πλασματικής μεμβράνης και επάγουν την ενεργοποίηση και μετατόπιση του NFκB στον πυρήνα, ο οποίος με την σειρά του επάγει την μεταγραφή των NLRP3, ASC, GSDMD, και IL-1β^{71,85}. Το μονοπάτι αυτό αποτελεί το πρώτο βήμα ενεργοποίησης του NLRP3 φλεγμονόσωματος κατά την ονομαζόμενη διεργασία της επαγωγής (priming)^{79,86,87}. Για την πλήρη ενεργοποίηση του πρωτεϊνικού συμπλόκου απαιτείται ένα δεύτερο σήμα το οποίο πυροδοτεί (triggering) τον πολυμερισμό του NLRP3, ASC και τελικά την στρατολόγηση της προ-κασπάσης-1 στο σύμπλοκο, η οποία ενεργοποιείται πρωτεολυτικά και ενεργοποιεί τις IL-1β και IL-18. Στο μονοπάτι αυτό εμπλέκονται οι κινάσες Nek7 και Btk, οι οποίες είναι υπεύθυνες και την φωσφορυλίωση των NLRP3 και ASC, ώστε να πολυμεριστούν^{88,89} (Σχήμα 11)



Σχήμα 11 Μονοπάτια σχηματισμού του NLRP3 φλεγμονοσώματος. Η διέγερση των μεμβρανικών υποδοχέων TLR από σήματα κινδύνου επάγει την μετατόπιση του μεταγραφικού παράγοντα NFκB στον πυρήνα και την επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών του φλεγμονοσώματος, NLRP3, ASC, προ-κασπάσης-1, προ-ιντερλευκίνης-1β. Αποτελεί το πρώτο θήμα ενεργοποίησης του φλεγμονοσώματος και ονομάζεται επαγωγή. Για το δεύτερο θήμα ή αλλιώς πυροδοτήση κατά το οποίο ενεργοποιείται ο ενδοκυτταρικός υποδοχέας-αισθητήρας NLRP3 απαιτούνται διάφορα ενδοκυτταρικά ή εξωκυτταρικά μονοπάτια, που περιλαμβάνουν την αύξηση του εξωκυττάριου ATP, την αποσταθεροποίηση του λυσοσώματος και την εκκροή K⁺. Η κινάση BTK, επίσης, ενεργοποιεί το NLRP3 και το ASC ύστερα από ισχαιμία. Ανωμαλίες στην αναπνευστική αλυσίδα οδηγούν σε οξειδωτικό στρες, παράγοντας που διεγείρει το φλεγμονόσωμα. Οι πρωτεΐνες του φλεγμονοσώματος σχηματίζουν, τελικά, ένα σύμπλοκο, το οποίο στρατολογεί την προ-κασπάση-1 και ενεργοποιείται μέσω αυτο-πρωτεόλυσης. Οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL1β και IL18 πρωτεολύνονται από την ενεργή κασπάση-1, καθώς και η γκασδερίνη D, η οποία ολιγομερίζεται στην πλασματική μεμβράνη, δημιουργώντας πόρους από τους οποίους εξέρχονται οι κυτταροκίνες. Από Toldo et al⁷⁵

Σε μελέτες ανοσοϊστοχημείας, το ASC (προσαρμογέας του φλεγμονοσώματος) έχει βρεθεί να εκφράζεται φυσιολογικά σε διάφορους ιστούς, όπως στον πλακούντα, την σπονδυλική στήλη, την τραχεία, τους νεφρούς, τους όρχεις, το ήπαρ και το παχύ έντερο, από κυτταρικούς πληθυσμούς, όπως τα κύτταρα Leydig, τα χονδροκύτταρα, τα ηπατοκύτταρα, τα λεία μυϊκά κύτταρα, τα επιθηλιακά και τα λευκοκύτταρα της κυκλοφορίας του αίματος⁹⁰. Από τις πρώτες

ασθένειες που ταυτοποιήθηκε η συμμετοχή του NLRP3 φλεγμονοσώματος, ήταν τα περιοδικά σύνδρομα που σχετίζονται με την κρυοπυρίνη(CAPS; cryopyrin-associated periodic syndroms), που οφείλονταν σε Gain-of-Function μεταλλάξεις του NLRP3, όπως το οικογενές αυτοάνοσο σύνδρομο κρύου(FCAS; familial cold autoinflammatory syndrome,) και το σύνδρομο Muckle-Wells(MWS)⁹¹.

Στις καρδιακές παθήσεις, οι δράσεις του NLRP3 φλεγμονοσώματος ποικίλλουν, λόγω της διαφορετικής έκφρασης και λειτουργίας του^{92,93}. Αυξημένη έκφρασή του ASC ή της IL-1β έχει εντοπιστεί στην ισχαιμική καρδιομυοπάθεια^{92,94-96}, αλλά και σε μη ισχαιμικές παθήσεις, όπως η καρδιακή ανεπάρκεια με μειωμένο κλάσμα εξώθησης(HFrEF)⁹⁷ καθώς και στην διαβητική μυοκαρδιοπάθεια στην οποία αναπτύσσεται καρδιακή ανεπάρκεια με συντηρημένο κλάσμα εξώθησης(HFrEF)⁹⁸. Εκφράζεται κυρίως από μακροφάγα και λευκοκύτταρα της κυκλοφορίας⁹⁹, καθώς και στο ενδοθήλιο¹⁰⁰. Ωστόσο, υπάρχουν κάποιες μελέτες που υποδεικνύουν τον σχηματισμό του πολυπρωτεϊνικού συμπλέγματος στα καρδιομυοκύτταρα⁹⁴ ενώ άλλες υποδεικνύουν ότι ενεργοποιείται στους ινοβλάστες και όχι στα καρδιομυοκύτταρα⁹². Σε μοντέλο εμφράγματος του μυοκαρδίου, το ενεργό σύμπλοκο εντοπίστηκε ανοσοϊστοχημικά σε καρδιομυοκύτταρα, ινοβλάστες, ενδοθηλιακά κύτταρα και λευκοκύτταρα⁷. Στην κυτταρική σειρά καρδιομυοκυττάρων HL-1, η ενεργοποίησή του με LPS και ATP επάγει την πυρόπτωση, αλλά όχι την έκκριση της ώριμης IL-1β οδηγώντας τα καρδιομυοκύτταρα σε θάνατο⁷. Ακόμη, η ισχαιμία οδηγεί σε θάνατο των καρδιομυοκυττάρων και μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση του NLRP3 φλεγμονοσώματος¹⁰¹, το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε δυσμενή αναδόμηση του ιστού^{7,72}. Ωστόσο, υπάρχουν και δεδομένα που υποδεικνύουν καρδιοπροστατευτική δράση του NLRP3 στην καρδιακή βλάβη ύστερα από ισχαιμία¹⁰². Η ενεργοποίηση του NLRP3 φλεγμονοσώματος και η επακόλουθη έκκριση της IL-1β και της IL-18 πυροδοτεί την μετάδοση της φλεγμονής, που μεγεθύνει ακόμη περισσότερο την αρχική βλάβη^{7,103}. Τα ουδετερόφιλα στρατολογούνται πρώτα, και στην συνέχεια τα μονοκύτταρα-μακροφάγα⁵ ώστε να αποβάλλουν τα διάφορα υπολείμματα από την πληγή. Η έκφραση του NLRP3 φλεγμονοσώματος στα κύτταρα αυτά¹⁰⁴ διαδίδει την φλεγμονή μέσω της έκκρισης της IL-1β^{105,106}. Τελικά, επάγεται κυτταρικός θάνατος μεσολαβούμενος από την κασπάση-1, επονομαζόμενος και πυρόπτωση⁷⁶. Έτσι, η φλεγμονή καταλήγει να προκαλεί περισσότερη βλάβη στο μυοκάρδιο⁷.

Εκτός από την καρδιά, το NLRP3 φλεγμονόσωμα συμμετέχει σε εξαρτώμενες από τη φλεγμονή ασθένειες, όπως η κίρρωση του ήπατος¹⁰⁷, η ανάπτυξη χρόνιας κολίτιδας¹⁰⁸, η χρόνια

αποφρακτική πνευμονοπάθεια¹⁰⁹, οφθαλμικές ασθένειες¹¹⁰, αλλά και σε βακτηριακές μολύνσεις, όπως η μόλυνση από στρεπτόκοκκο¹¹¹.

Οι μιτοχονδριακές διαταραχές φαίνεται να συσχετίζονται άμεσα με την ενεργοποίηση του NLRP3 φλεγμονοσώματος, καθώς σε συνθήκες στρες η αυξημένη παραγωγή ROS μπορεί να οδηγήσει στην ενεργοποίησή του⁸¹. Η εξουδετέρωση των μιτοχονδριακών ROS καταστέλλει αποτελεσματικά την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος¹¹². Η απελευθέρωση του μιτοχονδριακού DNA στο κυτταρόπλασμα από τα βλαμμένα μιτοχόνδρια αποτελεί ένα ακόμη σήμα κινδύνου που ανιχνεύεται από τον ενδοκυτταρικό υποδοχέα NLRP3, προωθώντας την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος¹¹³. Με βάση τα ευρήματα αυτά, είναι πιθανή η ενεργοποίηση του NLRP3 φλεγμονοσώματος στο μυοκάρδιο των *des^{-/-}* ποντικών, λόγω των εκτεταμένων βλαβών που παρουσιάζουν τα μιτοχόνδρια.

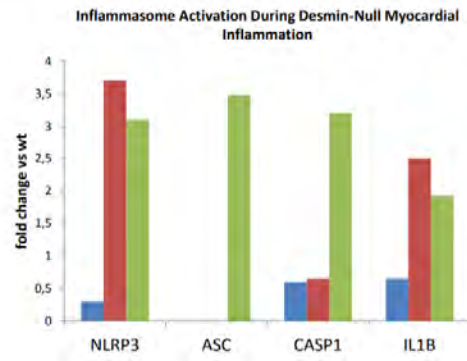
Η διαταραχή της ενεργοποίησης του NLRP3 φλεγμονοσώματος έχει συνδεθεί εκτός από αυτοφλεγμονώδη (autoinflammatory) νοσήματα (π.χ. familial cold autoinflammatory syndrome) και με την ανάπτυξη καρκίνου, καθώς και αυτοάνοσων, μεταβολικών και νευροεκφυλιστικών ασθενειών. Συνεπώς, η στενή ρύθμιση της δημιουργίας και της σηματοδότησης του φλεγμονοσώματος είναι σημαντική για την φλεγμονώδη απόκριση, χωρίς να οδηγείται σε καταστροφή του ιστού. Οι στρατηγικές μελέτης και ρύθμισης του φλεγμονοσώματος στην καρδιά περιλαμβάνουν πρωτεΐνες που δεσμεύουν την IL-1, φαρμακολογική χορήγηση του ενδογενούς αναστολέα της IL-1 (IL-1Ra, anakinra), γονιδιακή αποσιώπηση με siRNA, καθώς και δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών με έλλειψη σε κάποια από τα συστατικά του.

1.6. Ενδείξεις ενεργοποίησης του φλεγμονοσώματος στο *des^{-/-}* μυοκάρδιο

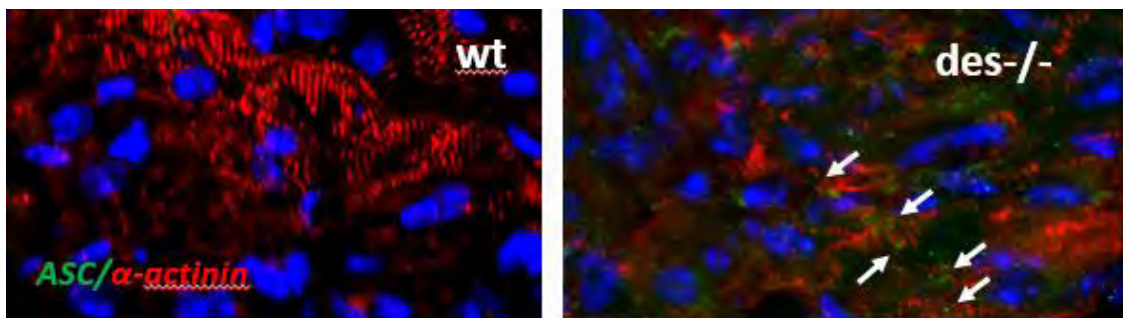
Σε προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου φάνηκε πως υπάρχει ενεργοποίηση του NLRP3 φλεγμονοσώματος στις καρδιές των *des^{-/-}* ποντικών. Συγκεκριμένα, υπάρχει αύξηση των μελών του άξονα φλεγμονοσώματος-IL1 σε επίπεδο RNA κατά την έναρξη της φλεγμονής, και συγκεκριμένα του NLRP3, του ASC, της κασπάσης-1 και ιδιαίτερα του φυσικού ανταγωνιστή του υποδοχέα της IL1 (*Il1rn*) (Σχήμα 12A), κυρίως από διηθούντα φλεγμονώδη κύτταρα⁶¹. Ακόμη, δημιουργία συσσωματωμάτων ASC (ASC specks) παρατηρήθηκε στο *des^{-/-}* μυοκάρδιο, ενδεικτική

της πιθανής ενεργοποίησης του NLRP3 φλεγμονοσώματος. Οι σχηματισμοί αυτοί παρατηρήθηκαν και εντός των καρδιομυοκυττάρων (Psarras, Unpublished) (Σχήμα 12B).

A

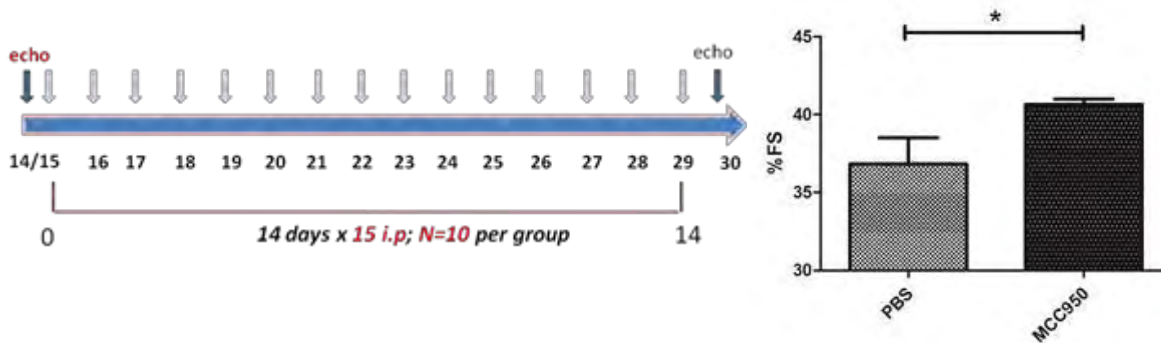


B



Σχήμα 12 Ενεργοποίηση του NLRP3 φλεγμονοσώματος στις καρδιές *des*^{-/-}. A: Ποσοτική *real-time* PCR σε καρδιές *des*^{-/-} ποντικών 10, 15 και 25 ημερών για μόρια που σχετίζονται με το σχηματισμό NLRP3 φλεγμονοσώματος. Η έκφραση του NLRP3 και της IL1b επάγεται στις 15 ημέρες, και παραμένει αυξημένη στις 25 ημέρες. Το ASC και η κασπάση-1 επάγονται στις καρδιές 25 ημερών. B: Ανοσοφθορισμός για ASC specks (πράσινο, βέλη) και α -actinin (κόκκινο, δείκτης καρδιομυοκυττάρων) σε καρδιές wt και *des*^{-/-} ποντικών. Φακός: 63X

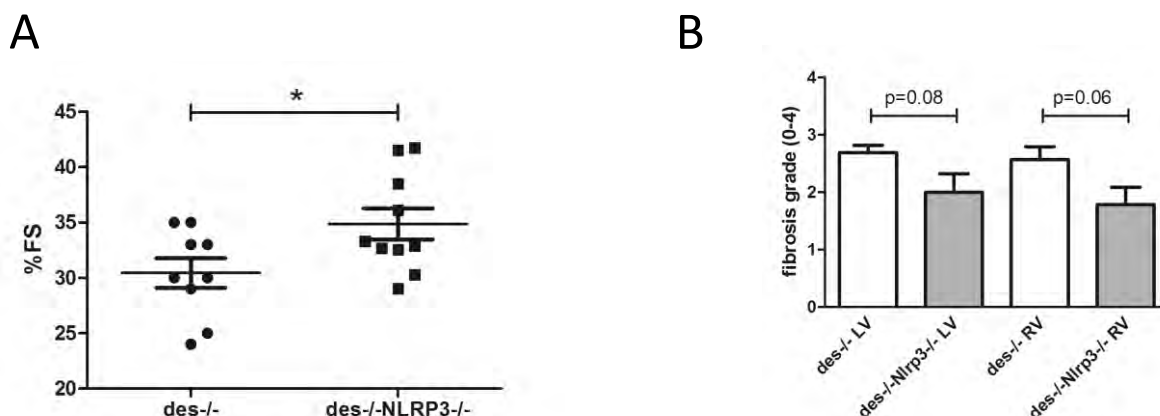
Μια πρώτη ισχυρή ένδειξη της σημασίας του σχηματισμού του NLRP3 φλεγμονοσώματος στην παθολογία του *des*^{-/-} διαφάνηκε με τη προστατευτική δράση που είχε ο ειδικός αναστολέας του MCC950¹¹⁴. Συγκεκριμένα, η χορήγηση του σε *des*^{-/-} ποντίκια οδήγησε σε βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας (Σχήμα 13) (Psarras, Unpublished).



Σχήμα 13 Χορήγηση του αναστολέα MCC950 και μέτρηση της καρδιακής λειτουργίας: (Αριστερά) Σχήμα χορήγησης του αναστολέα MCC950(40mg/kg) ή PBS ενδοπεριτοναϊκά σε $des^{-/-}$ ποντίκια. (Δεξιά) Το κλάσμα βράχυνσης(FS%) αυξάνεται σε ποντίκια $des^{-/-}$ που έλαβαν τον αναστολέα MCC950 σε σχέση με αυτά που έλαβαν PBS.

Εφόσον υπήρχαν ισχυρές ενδείξεις ενεργοποίησης του φλεγμονοσώματος στην καρδιά των $des^{-/-}$ ποντικών, αναζητήσαμε της συνεισφορά του NLRP3 φλεγμονοσώματος στην παθοφυσιολογία του $des^{-/-}$. Έτσι, διασταυρώσαμε τα $des^{-/-}$ ποντίκια με $NLRP3^{-/-}$. Αρχικά, συγκρίθηκε η καρδιακή λειτουργία στους 4 μήνες, χρονικό σημείο κατά το οποίο έχει εγκαθιδρυθεί και η καρδιακή ίνωση.

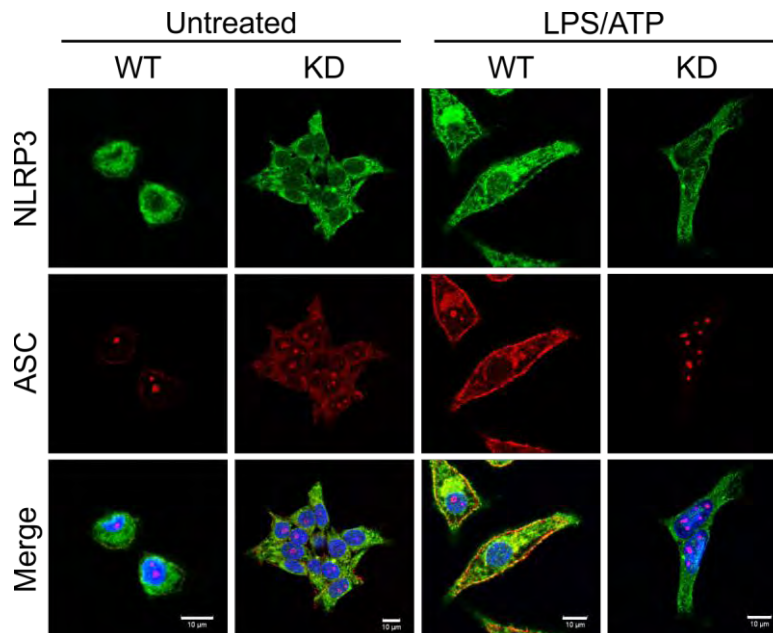
Το διπλό knock-out ποντίκι παρουσίασε βελτιωμένη καρδιακή λειτουργία καθώς και ίνωση σε σχέση με το $des^{-/-}$ (Psarras, Unpublished)(Σχήμα 14), υποδεικνύοντας έτσι την ενεργή συμμετοχή του NLRP3 στη δυσμενή αναδόμηση και την καρδιακή δυσλειτουργία του $des^{-/-}$.



Σχήμα 14 Εκτίμηση της καρδιακής λειτουργίας και της ίνωσης σε καρδιές $des^{-/-}$ και $des^{-/-}NLRP3^{-/-}$ 4 μηνών. Α: Το κλάσμα βράχυνσης(FS%), ενδεικτικό της λειτουργίας της καρδιάς, παρουσιάζει μια αύξηση στις $des^{-/-}NLRP3^{-/-}$ καρδιές αρσενικών ποντικών. Β: Τάση για λιγότερη ίνωση παρουσιάζουν τα $des^{-/-}NLRP3^{-/-}$ ποντίκια τόσο στην δεξιά (RV) όσο και την αριστερή (LV) κοιλία.

1.7. Βιμεντίνη

Ένα άλλο ενδιαμέσο ινίδιο, η βιμεντίνη, που εκφράζεται σε μεσεγχυματικά κύτταρα, όπως οι ινοβλάστες, ενδοθηλιακά κύτταρα και ανοσοκύτταρα, μπορεί να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό του φλεγμονοσώματος. Σε τρία καλά χαρακτηρισμένα μοντέλα πνευμονικής βλάβης στα οποία έχει διεγερθεί ο σχηματισμός του NLRP3 φλεγμονοσώματος, η γενετική απαλοιφή της βιμεντίνης βελτίωσε τις παρατηρούμενες παθολογίες, όπως η φλεγμονή και η ίνωση¹¹⁵. Συγκεκριμένα, η βιμεντίνη αλληλεπιδρά με τα μόρια του φλεγμονοσώματος, όπως φαίνεται ύστερα από διέγερση ανθρώπινων κυψελιδικών μακροφάγων ή της κυτταρικής σειράς J774.1 με αγωνιστές του φλεγμονοσώματος, ενώ απουσία αυτής δεν σχηματίζεται φλεγμονόσωμα.(**Σχήμα 14**).



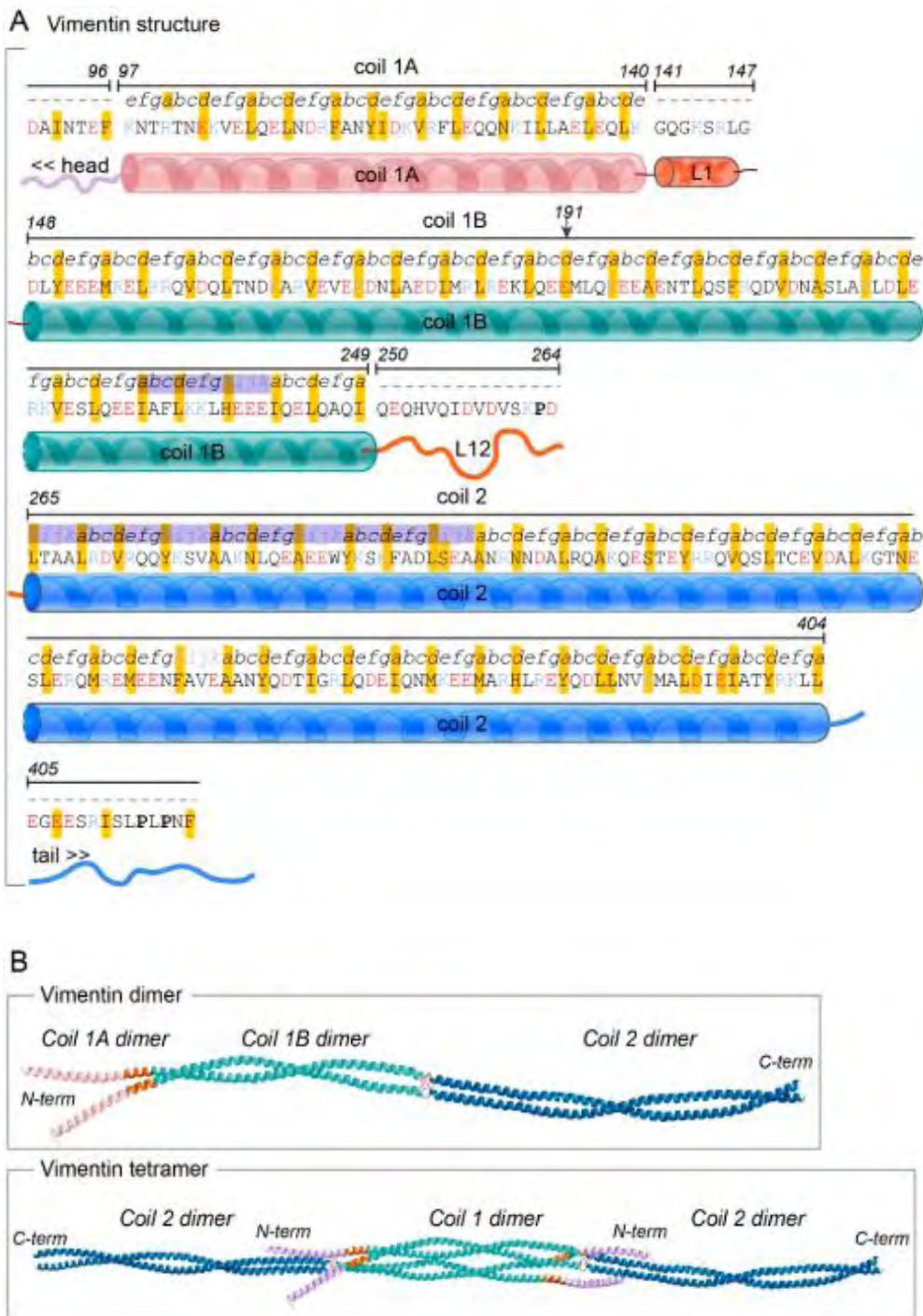
Σχήμα 15 Το NLRP3 (πράσινο) και το ASC (κόκκινο) συνεντοπίζονται όταν τα J774.1 μακροφάγα διεγερθούν για σχηματισμό φλεγμονοσώματος(LPS/ATP), ενώ η έκφραση shRNA για βιμεντίνη(KD) αναστέλλει τον σχηματισμό του φλεγμονοσώματος [από Dos Santos et al¹¹⁵]

Πράγματι, αρκετές μελέτες υποστηρίζουν την εμπλοκή των ενδιάμεσων ινιδίων, μεταξύ αυτών και της βιμεντίνης, ως μόρια σκαλωσιάς, στην σηματοδότηση μεγαλομοριακών συμπλόκων^{116–118}. Πρόσφατα, η βιμεντίνη βρέθηκε να δεσμεύεται στην NOD2(nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2), που ανήκει στην οικογένεια NLR, μέλος της οποίας είναι και η NLRP3¹¹⁹.

Η βιμεντίνη εκτός από τους ινοβλάστες¹¹⁶, τα ενδοθηλιακά κύτταρα¹²⁰ και τα μακροφάγα, εκφράζεται επίσης σε επιθηλιακά κύτταρα και λεία μυϊκά κύτταρα, αλλά όχι στα καρδιομυοκύτταρα²⁹. Συμμετέχει σε πολλές κυτταρικές διεργασίες, επηρεάζοντας σημαντικές λειτουργίες, όπως η ικανότητα προσκόλλησης, μετανάστευσης και διείσδυσης των κυττάρων, η διαφοροποίηση, η κυτταρική σηματοδότηση, , αλλά και αναδιαμορφώσεις του κυτταροσκελετού και ρυθμίζει γενικότερα την μορφολογία και ελαστικότητα των κυττάρων^{117,121-123}. Η συναρμολόγηση των ινιδίων βιμεντίνης συμβαίνει αυθόρμητα *in vitro*. Τα ινίδια αυτά αποτελούνται από coiled-coil αμινοξικές αλληλουχίες που είναι σταθεροποιημένες και συνδεδεμένες με υδρόφοβες και ιοντικές αλληλεπιδράσεις¹¹⁶ (**Σχήμα 15**). Η βιμεντίνη ξεκινά να εκφράζεται μαζί με την δεσμίνη και την νεστίνη την 9^η ημέρα της εμβρυικής ηλικίας^{32,33,124,125} και η μειορρύθμισή της παράλληλα με την συσσώρευση της δεσμίνης σηματοδοτεί την τελική διαφοροποίηση του σκελετικού μύος^{31,126}. Θεωρείται πιθανό η έκφραση της βιμεντίνης και της νεστίνης κατά τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια να αντικρούει τις πιθανές συνέπειες της απουσίας της δεσμίνης^{124,125}. Όπως και η δεσμίνη, η βιμεντίνη τοποθετείται αρχικά στους Z- δίσκους σε χαμηλά επίπεδα και σταδιακά απουσιάζει πλήρως από τον σκελετικό μυ¹²⁷. Συμμετέχει στην σημαντική διαδικασία μετάβασης από το επιθήλιο στο μεσέγγυμα(EMT), κεντρική για την ανάπτυξη, συμπεριλαμβανόμενης της καρδιογένεσης, καθώς σε αυτήν υπόκεινται κύτταρα του ενδοκάρδιου και του επικάρδιου αποδίδοντας ινοβλάστες και άλλα κύτταρα της ενήλικης καρδιάς^{29, 128}.

Η βιμεντίνη φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο και στην ιστική αναδόμηση, καθώς η απουσία της επιδρά στην κινητικότητα και μετανάστευση των ινοβλαστών, επηρεάζοντας την διαδικασία επούλωσης της πληγής¹²⁹. Ακόμη, η συνοχή των λεμφοκυττάρων και η μετανάστευσή τους μέσω του ενδοθηλίου επηρεάζονται όταν απουσιάζει η βιμεντίνη¹³⁰. Εκφράζεται και εκκρίνεται από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα¹³¹, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην καρδιακή βλάβη και την διαστολική δυσλειτουργία¹³², και πιθανώς συμμετέχει στην ωρίμανσή τους¹³³. Ακόμη, η βιμεντίνη έχει συνδεθεί με την μιτοχονδριακή λειτουργία μέσω της ρύθμισης του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης¹³⁴. Με βάση τα παραπάνω ευρήματα, που υποδεικνύουν την συμμετοχή της βιμεντίνης στην αναδόμηση και τις ινωτικές διεργασίες που ακολουθούν την καρδιακή βλάβη και την συμμετοχή της στην δημιουργία του NLRP3 φλεγμονοσώματος¹¹⁵, υπάρχει ισχυρή ένδειξη για την συμμετοχή της στην φλεγμονή που

μεσολαβείται από την IL-1, και πιθανώς να συμμετέχει στην παθολογία που παρατηρείται στις des^{-/-} καρδιές.



Σχήμα 16 A: Η αμινοξική αλληλουχία της ραβδωτής περιοχής της βιμεντίνης, με την αλληλουχία των αμινοξέων να παρουσιάζεται ακριβώς από πάνω με γράμματα. B: Σχηματική αναπαράσταση του διμερούς (επάνω) και τετραμερούς (κάτω) της βιμεντίνης, που δείχνει την αντιπαράλληλη σύνδεση των δύο coiled coil διμερών. Δεδομένα από ^{135,136}

1.8. Στόχοι της παρούσας μελέτης

Στην παρούσα εργασία αναζητήθηκαν στοιχεία των μηχανισμών διέγερσης της φλεγμονής, και πιο συγκεκριμένα του NLRP3 φλεγμονοσώματος, και της σημασίας τους στις καρδιομυοπάθειες και στην πρόοδο προς την καρδιακή ανεπάρκεια. Για την πραγματοποίηση της μελέτης, χρησιμοποιήθηκε το γενετικό μοντέλο καρδιακής ανεπάρκειας $des^{-/-}$, το οποίο παρουσιάζει εκτεταμένη φλεγμονή στις 4 εβδομάδες, αποδιοργάνωση και νέκρωση των καρδιομυοκυττάρων, αυξημένη εναπόθεση κολλαγόνου, προοδευτική μείωση της καρδιακής λειτουργίας και τελικά καρδιακή ανεπάρκεια^{45,48}. Σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση του γονιδίου που κωδικοποιεί για τον ανταγωνιστή του υποδοχέα της ιντερλευκίνης-1 (IL-1Ra), που αποτελεί και φυσικό ανταγωνιστή της κυτταροκίνης IL-1β. Επίσης, ASC specks εντοπίστηκαν σε $des^{-/-}$ καρδιές και εντός των καρδιομυοκυττάρων, ενδεικτικά της ενεργοποίησης του φλεγμονοσώματος. Παράλληλα, φαρμακολογική αναστολή του NLRP3 φλεγμονοσώματος βελτίωσε την καρδιακή λειτουργία. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, προχωρήσαμε στην αναζήτηση της συμμετοχής του NLRP3 φλεγμονοσώματος στην φλεγμονή που παρατηρείται στην καρδιακή ανεπάρκεια $des^{-/-}$.

Πιο συγκεκριμένα, σκοπός ήταν να απαντηθούν τα ακόλουθα:

- 1) Βελτιώνονται βασικά στοιχεία της παθοφυσιολογίας του $des^{-/-}$ απουσία του NLRP3, βασικού στοιχείου του φλεγμονοσώματος;

Για το σκοπό αυτό τα ποντίκια $des^{-/-}$ διασταυρώθηκαν με $NLRP3^{-/-}$ και συγκρίθηκαν παράμετροι της καρδιακής παθολογίας των διπλών διαγονιδιακών ποντικών $des^{-/-}NLRP3^{-/-}$ με αυτές των $des^{-/-}$

- 2) Μπορεί το ενεργό φλεγμονόσωμα που φαίνεται να σχηματίζεται και μέσα στα καρδιομυοκύτταρα στον $des^{-/-}$ καρδιακό ιστό να χρησιμοποιηθεί ως όχημα για τη διάδοση της φλεγμονής στο μοντέλο αυτό? Θα μπορούσαν τα κύτταρα στόχοι μια τέτοιας μεταγωγής να είναι ένας γειτονικός πληθυσμός όπως οι καρδιακοί ινοβλάστες?

Για το σκοπό αυτό, $des^{-/-}$ ή φυσιολογικά ενήλικα καρδιομυοκύτταρα ποντικού διεγέρθηκαν *ex vivo* με παράγοντες που μιμούνται τα σήματα κινδύνου που οδηγούν στη διέγερση του φλεγμονοσώματος *in vivo*. Στη συνέχεια, καρδιακοί ινοβλάστες από ποντίκι εκτέθηκαν στα εκκρίματα των καρδιομυοκυττάρων και μελετήθηκε η έκφραση μιας χαρακτηριστικής

φλεγμονώδους κυτταροκίνης, της IL-6, ως μέθοδος ανίχνευσης επαγωγής φλεγμονής στους ινοβλάστες

- 3)** Θα μπορούσε η άλλη πρωτεΐνη ενδιάμεσων ινιδίων, η βιμεντίνη, που εκφράζεται στους ινοβλάστες αλλά όχι στα καρδιομυοκύτταρα και έχει αναφερθεί ως βοηθητική κυτταρική υποδομή στην ενεργοποίηση του NLRP3 φλεγμονοσώματος, να υπηρετεί με παρόμοιο τρόπο ως μεταγωγέας το σχηματισμό του φλεγμονοσώματος στο $des^{-/-}$ μυοκάρδιο;

Για το σκοπό αυτό τα ποντίκια $des^{-/-}$ διασταυρώθηκαν με $vim^{-/-}$ και συγκρίθηκαν παράμετροι της καρδιακής παθολογίας των διπλών διαγονιδιακών ποντικών $des^{-/-}vim^{-/-}$ με αυτές των $des^{-/-}$

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1. Πειραματόζωα

Τα ποντίκια με έλλειψη δεσμίνης ($Des^{-/-}$)⁴⁵ προέρχονται από 129/Sv γενετικό υπόβαθρο. Για την δημιουργία ποντικών με διπλή απαλοιφή για τα γονίδια της δεσμίνης και *Nlrp3* ($des^{-/-}$ *NLRP3^{-/-}*), απόγονοι $des^{-/-}$ *NLRP3^{+/-}* από προϋπάρχουσα αρχική διασταύρωση των $des^{-/-}$ με *NLRP3^{-/-}*¹³⁷ διασταυρώθηκαν μεταξύ τους ώστε να προκύψουν $des^{-/-}$ *NLRP3^{-/-}* και $des^{-/-}$, σε μικτό γενετικό υπόβαθρο 129/Sv-C57Bl/6 τα οποία και συγκρίθηκαν μεταξύ τους ως προς παραμέτρους της παθοφυσιολογίας της καρδιάς. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων αυτής της εργασίας παρατηρήθηκε πρόσκαιρη μείωση της παραγωγικής δραστηριότητας και η διασταύρωση $des^{-/-}$ x *NLRP3^{-/-}* επαναλήφθηκε εξ αρχής. Ακολούθως οι F1 απόγονοι ($des^{+/-}$ *NLRP3^{+/-}*) διασταυρώθηκαν μεταξύ τους. Η γενοτύπηση της γενεάς F2 δεν έδωσε άμεσα τους κατάλληλους γενοτύπους σε αρσενικά και θηλυκά με αποτέλεσμα την αδυναμία παραγωγής νέων $des^{-/-}$ *NLRP3^{-/-}* στο χρονικό πλαίσιο της παρούσας εργασίας. Η διασταύρωση συνεχίζεται.

Για την δημιουργία ποντικών με διπλή απαλοιφή για τα γονίδια της δεσμίνης και βιμεντίνης ($des^{-/-}$ *vim^{-/-}*), απόγονοι $des^{-/-}$ *vim^{+/-}* από προϋπάρχουσα αρχική διασταύρωση $des^{-/-}$ x *vim^{-/-}*¹³⁸ διασταυρώθηκαν μεταξύ τους ώστε να προκύψουν $des^{-/-}$ *vim^{-/-}* και $des^{-/-}$ τα οποία και συγκρίθηκαν μεταξύ τους ως προς παραμέτρους της παθοφυσιολογίας της καρδιάς. Το στέλεχος των *vim^{-/-}* που χρησιμοποιήθηκε ήταν σε 129/Sv υπόβαθρο, ενώ το $des^{-/-}$ σε μικτό γενετικό υπόβαθρο 129/Sv-C57Bl/6.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν: α) για τα πειράματα σύγκρισης παθοφυσιολογίας της καρδιάς ζώα $des^{-/-}$ *NLRP3^{-/-}*, $des^{-/-}$ και $des^{-/-}$ *vim^{-/-}* ηλικίας 4 εβδομάδων και 4 μηνών β) Για τα πειράματα απομόνωσης καρδιακών ινοβλαστών ζώα wt και $des^{-/-}$ 1-3 και 25 ημερών. Όλα τα πειραματόζωα φυλάσσονταν σε συνθήκες ελεύθερες παθογόνων στην Πρότυπη Μονάδα Πειραματοζώων του ΙΙΒΕΑΑ. Τα ζώα στεγάζονταν σε ελεγχόμενες συνθήκες (θερμοκρασία 22°C, 12 ώρες κύκλος φωτός/σκότους) και είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε κανονική εργαστηριακή τροφή και νερό. Ο χειρισμός των ζώων ήταν σε συμφωνία με σύγχρονα διεθνή πρότυπα [Association for the Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC) και Federation of European Laboratory Animal Science Association (FELASA)]. Η αδειοδότηση των πειραμάτων των παρόντων αποτελεσμάτων ήταν στον Σ Ψαρρά (K7920, 14-12-16).

2.2. Γενοτύπηση

Από τους απογόνους των παραπάνω διασταυρώσεων αποκτήθηκε τμήμα ουράς, ώστε να είναι δυνατός ο προσδιορισμός του γενοτύπου του ζώου. Οι ουρές υφίστανται πέψη με 500μl διάλυμα πρωτεΐνάσης K(0.68mg/ml) και αλάτων (Tris-HCl pH 7.5 50mM, EDTA pH 8.0 0.1M, SDS 0.5% v/v) και επώαση στους 55°C για 12-16 ώρες. Στην συνέχεια ακολουθεί η απομόνωση του γενωμικού DNA. Προστίθενται 500μl διαλύματος φαινόλη/ χλωροφόρμιο/ ισοαμυλικής αλκοόλης (25/24/1) για εκχύλιση του γενωμικού DNA και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm(14000 xg) για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η υδατική φάση προστίθεται σε διάλυμα χλωροφορμίου σε αναλογία 1:1. Τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις ίδιες συνθήκες και το υπερκείμενο προστίθεται σε αναλογία 10:1 σε CH₃COONa 3M pH 5.2 και 700μl απόλυτης αιθανόλης, θερμοκρασίας -20°C. Τα δείγματα ανακινούνται ελαφρώς εως ότου καθιζάνει το DNA, το οποίο είναι ορατό. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000rpm (14000xg) για 15 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο αφαιρείται και προστίθενται 250μl 70% αιθανόλης και στην συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 13000rpm για 5 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο αφαιρείται και αφού εξατμιστεί η αιθανόλη προστίθεται 200μl νερό αποστειρωμένο και υψηλής καθαρότητας. Τα δείγματα επάζονται στους 4°C για 12-16 ώρες, ώστε να επαναδιαλυτοποιηθεί το ίζημα.

-Ενίσχυση μέσω PCR

Το 1μl από τα 200μl DNA που αποκτήθηκαν χρησιμοποιείται για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, μέσω της οποίας θα γίνει ο προσδιορισμός του γενοτύπου των ποντικών. Στην συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τρία διαγονιδιακά ποντίκια(*des*^{-/-}, *des*^{-/-}*vim*^{-/-}, *des*^{-/-}*NLRP3*^{-/-}), για τα οποία χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα, dNTPs και Taq πολυμεράση των εταιρειών Qiagen και Invitrogen. Για την γενοτύπηση των ποντικών με απαλοιφή της δεσμίνης απαιτούνται τελικές συγκεντρώσεις Mg⁺² και dNTPs 1.75mM και 0.2mM, αντίστοιχα, ενώ για τα ποντίκια με απαλοιφή του γονιδίου της βιμεντίνης ή του *Nlrp3* προστέθηκε διπλάσια ποσότητα Mg⁺². Η αλληλουχία των εκκινητών, καθώς και οι απαιτούμενες τελικές συγκεντρώσεις τους στην αντίδραση PCR, παρατίθεται παρακάτω.

Αλληλουχία εκκινητών για την ταυτοποίηση *des*^{-/-} ζώων

Συγκέντρωση

Des null F

TGATGTCAGGAGGGCTACA

2.5μM

Des null R	CGTCTATCAGGTTGTCACG	4.16μM
Neo3 (=neoPLB)	TCCTCGTGCTTTACGGTATC	5μM

Ανασυνδυσασμένο= 400bp, Αγρίου τύπου= 700bp

Πρόγραμμα ενίσχυσης μέσω PCR:

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

Αλληλουχία εκκινήτων για την ταυτοποίηση NLRP3 ^{-/-} ζώων	Συγκέντρωση
16568 - TGC CTG CTC TTT ACT GAA GG	2.5μM
16703 - TCA GTT TCC TTG GCT ACC AGA	5μM
16704 - TTC CAT TAC AGT CAC TCC AGA TGT	2.5μM

Ανασυνδυσασμένο = ~850 bp; Αγρίου τύπου = 666 bp

Πρόγραμμα ενίσχυσης μέσω PCR:

96°C 5' για αποδιάταξη ,ακολουθούμενο από 94°C ' /65°C 1' /72°C 1' για 30 κύκλους και τέλος 72°C 7'

Αλληλουχία εκκινήτων για την ταυτοποίηση Vim ^{-/-} ζώων	Συγκέντρωση	
primer 1	TGTCCTCGTCCTCCTACCGC	5μM

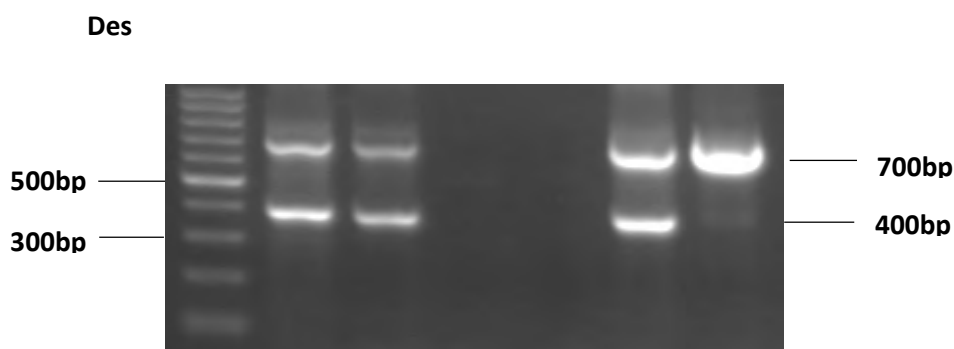
primer 2	AGCTGCTCGAGCTCAGCCAGC	2.5μM
primer 3	CTGTTCGCCAGGCTCAAGGC	5μM

primer 1-2 : 398 bp (=αγρίου τύπου); primer 2-3: 530 (=ανασυνδυασμένο)

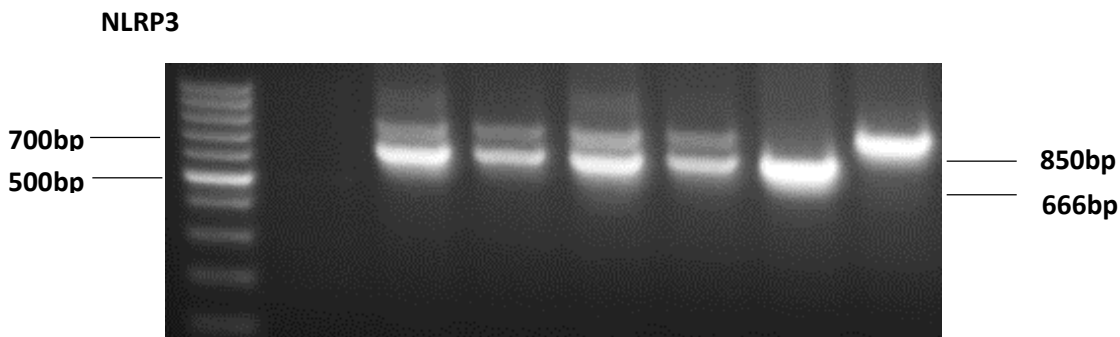
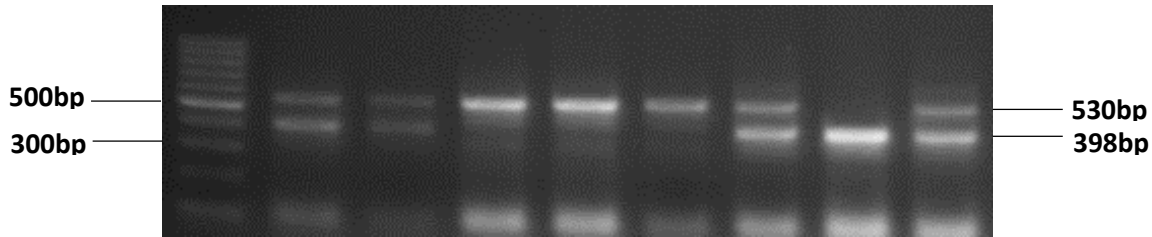
Πρόγραμμα ενίσχυσης μέσω PCR:

96°C 5' για την αποδιάταξη, 94°C 1 / 65°C 1 / 72°C 1 για 30 κύκλους και τέλος 72°C 7'

Μετά την ενίσχυση μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, ακολουθεί ο διαχωρισμός των τμημάτων DNA που προέκυψε μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 1.5% παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου. Η ταυτοποίηση του εκάστοτε γενοτύπου γίνεται με βάση το μέγεθος του προϊόντος ενίσχυσης, σύμφωνα με δείκτη γνωστού μεγέθους, καθώς και με την προσθήκη δειγμάτων με ήδη γνωστό γενότυπο.



Vim



2.3. Απομόνωση και μορφολογική αποτίμηση καρδιακού ιστού

2.3.1. Μέτρηση λόγου βάρους καρδιάς προς βάρος σώματος(HW/BW) και μήκος κνήμης(HW/TL)

Τα ποντίκια αναισθητοποιούνται με εισπνοή ισοφλουρανίου και ευθανατώνονται μέσω αυχενικής εξάρθρωσης. Η καρδιά απομακρύνεται από το ζώο και τοποθετείται σε παγωμένο PBS, όπου με την βοήθεια σύριγγας εγχύεται μέσω των αγγείων PBS, ώστε να καθαριστεί η καρδιά από τα υπολείμματα αίματος και να αποφευχθούν οι θρόμβοι. Προκειμένου να αξιολογηθεί η ενδεχόμενη υπερτροφία της καρδιάς, ύστερα από τη θυσία ζυγίστηκαν τα πειραματόζωα και οι καρδιές. Υπολογίστηκε ο λόγος βάρους καρδιάς προς βάρος σώματος (HW/BW), ο οποίος όταν αυξηθεί αποτελεί ένδειξη υπερτροφίας της καρδιάς (όπως συμβαίνει και στο *des^{-/-49}*). Το μήκος της κνήμης είναι μια άλλη παράμετρος που αντανακλά διαφορές στο μέγεθος των οργάνων, και για

τον λόγο αυτό υπολογίστηκε και το βάρος της καρδιάς ως προς το μήκος της κνήμης. Αύξηση του λόγου αντανακλά επίσης υπερτροφικό μυοκάρδιο.⁴⁹¹³⁹

2.3.2. Μέτρηση λόγου βάρους πνεύμονα προς βάρος σώματος (HW/BW) και μήκος κνήμης (HW/TL)

Προκειμένου να αξιολογηθεί η ενδεχόμενη υπερτροφία του πνεύμονα, ύστερα από την θυσία απομονώθηκε ο μονόλοβος και ο πολύλοβος πνεύμονας, ξεπλύθηκαν με PBS και ζυγίστηκαν. Υπολογίστηκε ο λόγος βάρους πνεύμονα προς βάρος σώματος ή μήκος κνήμης για να εξεταστεί η ενδεχόμενη ύπαρξη συμφορητικής καρδιακής ανεπάρκειας¹⁴⁰.

2.3.3. Αξιολόγηση ολικής καρδιακής φλεγμονής

Προκειμένου να αξιολογηθεί η ολική καρδιακή φλεγμονή, απομονώθηκαν καρδιές και εκπλύθηκαν με παγωμένο PBS. Παρατηρήθηκαν μακροσκοπικά και βαθμολογήθηκαν στην κλίμακα 0-4 σύμφωνα με την παρουσία φλεγμονώδους διηθήματος⁴⁷. Συνοπτικά, ο βαθμός 1 αντιστοιχεί σε μια εστία φλεγμονώδους διήθησης, ο βαθμός 2 σε περισσότερες από μια εστίες φλεγμονώδους διήθησης που εμφανίζονται σε περιορισμένες περιοχές του τοιχώματος του μυοκαρδίου, ο βαθμός 3 σε πολλαπλές και διάχυτες εστίες φλεγμονώδους διήθησης και ο βαθμός 4 σε πολλαπλές εκτεταμένες φλεγμονώδεις διηθήσεις που καλύπτουν τόσο το πρόσθιο όσο και το οπίσθιο τοίχωμα του καρδιακού ιστού.

2.3.4. Αξιολόγηση ίνωσης

Για να χαρακτηριστεί ιστολογικά η ίνωση, καρδιές μυών 4 μηνών απομονώθηκαν, και επωάστηκαν σε διάλυμα φορμαλίνης 10% για 18 ώρες στους 4°C και στην συνέχεια σε διάλυμα αιθανόλης 70%. Ακολούθησε εγκλεισμός σε παραφίνη και λήψη τομών πάχους 5-7μm σε 2 επίπεδα, ώστε να παραληφθεί η επιφάνεια του πρόσθιου τοιχώματος αλλά και το εσωτερικό της καρδιάς. Στην συνέχεια, έγινε χρώση κατά Masson's (βλέπε παρακάτω). Από το κάθε επίπεδο αξιολογήθηκε ο βαθμός ίνωσης από 0-4, όπως περιγράφεται⁴⁷. Συγκεκριμένα, ο βαθμός 1 αντιστοιχεί σε μια με δύο περιοχές περιορισμένης ίνωσης, 2 σε ίνωση που καλύπτει πολλαπλές περιοχές, 3 σε πολλαπλές περιοχές εκτεταμένης και διάχυτης ίνωσης και 4 σε πολλαπλές περιοχές εκτεταμένης και διάχυτης ίνωσης που βρίσκονται στην πλειονότητα του μυοκαρδίου.

2.4. Χρώση Masson's

Για την ανίχνευση του κολλαγόνου στον καρδιακό ιστό, εφαρμόστηκε τριχρωμική χρώση (Masson's trichrome), στην οποία οι πυρήνες βάφονται σκούρο καφέ, το κυτταρόπλασμα ροζ/κόκκινο και οι ίνες κολλαγόνου μπλε. Πραγματοποιείται αποπαραφίνωση των τομών ως εξής: θέρμανση στους 60°C για 2-3 λεπτά, (2X) επώαση σε ξυλένιο για 3 λεπτά, επώαση σε διαλύματα αιθανόλης (100% για 3 λεπτά, 95% για 2 λεπτά, 80% για 2 λεπτά, 50% για 2 λεπτά) και οι τομές ξεπλένονται με απεσταγμένο νερό. Τοποθετούνται σε διάλυμα αιματοξυλίνης (Harris Hematoxyline) για 5 δευτερόλεπτα, ώστε να βαφούν οι πυρήνες και στην συνέχεια σε Ερυθρό Mallory(0.5g Fuchsin acid, 0,5ml glacial acetic acid σε 100ml dH₂O) για 1 λεπτό, για χρώση του κυτταροπλάσματος. Ακολουθούν 3 πλύσεις σε απεσταγμένο νερό και επώαση σε φωσφορομολυβδικό οξύ 1% για 2 λεπτά. Στην συνέχεια, τοποθετούνται σε 2% μπλε του μεθυλενίου για 1-2 λεπτά, ώστε να βαφούν τα στοιχεία της εξωκυττάριας μήτρας (κολλαγόνο, ελαστίνη) και ακολουθεί έκπλυση με απεσταγμένο νερό. Ακολουθούν 2 πλύσεις σε 100% αιθανόλη και 1 πλύση σε οξυοισμένο οινόπνευμα. Τέλος, επάζονται σε ξυλένιο 2 φορές και κλείνουμε τις τομές με ειδική κόλλα (Coverquick 4000, VWR).

2.5. Αποτίμηση καρδιακής λειτουργίας (M-mode echocardiography)

Οι μύες αναισθητοποιήθηκαν με ενδοπεριτοναϊκή ένεση κεταμίνης (Ketamine Hydrochloride 100 mg/kg). Το υπερηχοκαρδιογράφημα έγινε στο Εργαστήριο Καρδιάς Αγγείων του ΙΙΒΕΑΑ με το σύστημα υπερήχων Vivid 7(GE) , όπως στο ⁴⁷. Αποκτήθηκε δισδιάστατη απεικόνιση από τη σύντομη προβολή του άξονα στο επίπεδο της μεγαλύτερης διάστασης της αριστερής κοιλίας (LV). Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό EchoPac PC SW 3.1.3 (GE). Μετρήθηκε η τελοδιαστολική διάμετρος (EDD), η τελοσυστολική διάμετρος (ESD), το πάχος οπίσθιου τοιχώματος σε διαστολή της LV (PWT), και ο ρυθμός (HR) . Η τελοδιαστολική προσδιορίστηκε στη μέγιστη διαστολική διάσταση της LV, και το τέλος της συστολής ελήφθη στην αιχμή της κίνησης του οπίσθιου τοιχώματος. Επίσης λήφθηκαν μετρήσεις που αντιστοιχούν στο πάχος του τοιχώματος και συγκεκριμένα στο οπίσθιο τοίχωμα της αριστερής κοιλίας στη συστολή (LVPWTs, Left Ventricular Posterior Wall Thickness Systole), και στη διαστολή (LVPWTd, Left Ventricular Posterior Wall Thickness Diastole). μέσος όρος των επιμέρους μετρήσεων προήλθε από 3 κτύπους. Ο λόγος

της ακτίνας LV προς PWT (r/h) και το ποσοστό της LV κλασματικής βράχυνσης FS (%) = [(EDD-ESD)/EDD] x 100 υπολογίστηκαν από τους αντίστοιχους τύπους. Εξετάσθηκαν ποντίκια ηλικίας 4 μηνών *des^{-/-}vim^{-/-}*, *des^{-/-}*, (μικτού γενετικού υποβάθρου 129/SvxC57Bl/6). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα (SE).

2.6. Απομόνωση πρωτεϊνών και ανοσοαποτύπωση κατά Western

2.6.1. Απομόνωση πρωτεϊνών από την καρδιά

Τα ζώα θυσιάστηκαν και η καρδιά απομονώθηκε και τοποθετήθηκε σε κρύο PBS. Στην συνέχεια, η καρδιά καταψύχεται σε υγρό άζωτο. Ο ιστός(καρδιά) ομογενοποιείται σε 1ml Western Blot Buffer(50mM Tris HCl pH 7.5, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS, 0.25% sodium deoxycholate, 150mM NaCl, 1mM EDTA pH 8.0) μαζί με 12μl διαλύματος αναστολέων πρωτεασών (protease inhibitor cocktail, Sigma P8340). Με την βοήθεια του φορητού ομογενοποιητή IKA που τίθεται σε ταχύτητα 1-2(12x75mm polystyrene FischerBrand 14-956-3C) , οι ιστοί ομογενοποιούνται εως ότου να μην υπάρχει εμφανές υπόλειμμα. Το ομογενοποίημα υφίσταται υπερήχους για 10 δευτερόλεπτα 3 φορές, τοποθετώντας το στον πάγο για 10 δευτερόλεπτα ενδιάμεσα. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε 4000 xg (6500 rpm) στους 4°C, ύστερα από την οποία διατηρείται το υπερκείμενο και ξαναφυγοκεντρείται για 10 λεπτά σε 14000 xg (12500 rpm). Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, διατηρούμε το υπερκείμενο στους -80°C μέχρι την χρήση.

2.6.2. Μέτρηση Bradford

Για την μέτρηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου των δειγμάτων ιστού χρησιμοποιήσαμε την μέτρηση Bradford. Για την δημιουργία της πρότυπης καμπύλης, παρασκευάστηκαν διαλύματα αλβουμίνης βόειου ορού(BSA) σε συγκεντρώσεις 0/0.25/0.5/1/1.5/2 mg/ml, στα οποία προστέθηκε 1.75μl Western Blot Buffer. Το δείγμα διαλύθηκε σε 25μl Western Blot Buffer. Τέλος προσθέσαμε 0.75ml του αντιδραστηρίου Bradford(B6916, Sigma) σε δείγματα και πρότυπα διαλύματα και μετρήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο στα 595nm. Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων υπολογίζονται με βάση την πρότυπη καμπύλη.

2.6.3. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες

Αφού απομονώθηκαν οι πρωτεΐνες από την καρδιά του ποντικού και μετρήθηκε η συγκέντρωσή τους, ηλεκτροφορούνται παρουσία ενός αποδιατακτικού παράγοντα, το SDS. Για την παρασκευή του SDS-PAGE απαιτείται το πήκτωμα διαχωρισμού(12% ακρυλαμίδιο, 0.375 mM Tris HCl pH 8.8, 0.1% w/v SDS, 0.05% w/v APS και 0.05% v/v TEMED), το οποίο έχει μεγάλη περιεκτικότητα σε ακρυλαμίδιο και εκεί θα διαχωριστούν οι πρωτεΐνες, και το πήκτωμα συμπύκνωσης(4% ακρυλαμίδιο, 0.126 mM Tris HCl pH 6.8, 0.1% w/v SDS, 0.1% APS και 0.1% v/v TEMED), το οποίο έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε ακρυλαμίδιο. Στα πήκτωμα προστίθεται TEMED ως παράγοντας πολυμερισμού και APS (ammonium persulfate), για δημιουργία ελεύθερων ριζών και πολυμερισμό.

2.6.4. Προετοιμασία δειγμάτων και ηλεκτροφόρηση

Τα δείγματα αραιώνονται σε Western Blot Buffer ανάλογα με την επιθυμητή συγκέντρωση μέχρι τα 20μl. Προστίθεται 1 μl DTT 1M και 5 μl sample running buffer 5X(62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% γλυκερόλη, 2% SDS, 0.05% bromophenol blue).

Ακολουθεί θέρμανση των δειγμάτων στους 100°C για 3 λεπτά, ώστε να αποδιαταχθούν οι πρωτεΐνες παρουσία του SDS, τοποθέτηση στον πάγο και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά σε 13000 rpm (14000 xg) στους 4°C. Στην συνέχεια, τα δείγματα φορτώνονται στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, το οποίο προηγουμένως έχουμε τρέξει στα 25mA για 15 λεπτά, ώστε να μετακινηθούν τα ιόντα προς τους πόλους πριν τοποθετηθούν οι πρωτεΐνες. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται στα 25mA μέχρι να φτάσουν οι πρωτεΐνες στο πήκτωμα διαχωρισμού και ύστερα στα 30-40mA. Μαζί με τις πρωτεΐνες, φορτώνεται στο πήκτωμα και ένας μάρτυρας μοριακού βάρους (SeeBluePlus2).

2.6.5. Μεταφορά σε μεμβράνη PVDF

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή πολυακρυλαμίδης μεταφέρεται σε συσκευή ηλεκτρομεταφοράς (BioRad), όπου με την εφαρμογή διαφοράς δυναμικού(15mA για 18 ώρες), οι αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες μεταφέρονται σε μεμβράνη PVDF(polyvinylidene difluoride). Προστίθεται διάλυμα μεταφοράς 1.5% Tris-Glycin.

2.6.6. Ανοσοαποτύπωση μεμβράνης

Η μεμβράνη καλύπτεται με 10ml 5% γάλα σε PBS-T(0.05% Tween 20) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να μπλοκαριστούν οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης. Στην συνέχεια, προστίθεται αντίσωμα rabbit-anti-ASC(Millipore AB3607, αραιώση 1:1000), anti-tubulin (Abcam ab6046, αραιώση 1:1000) σε 2.5% γάλα σε PBS-T και επωάζεται για 16-18 ώρες στους 4°C. Γίνονται 3 πλύσεις για 5 λεπτά με PBS-T και επώαση με αντίσωμα mouse anti-rabbit και anti-tubulin συζευγμένο με υπεροξειδάση του χρένου(HRP-conjugated), σε αραιώση 1:30000, για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν 3 πλύσεις για 5 λεπτά σε PBS-T και μεταφορά της μεμβράνης σε PBS.

2.6.7. Ανίχνευση σήματος

Στο σκοτεινό δωμάτιο προστίθεται διάλυμα ECL(enhanced chemiluminescence) στις μεμβράνες για 1 λεπτό, ώστε να αντιδράσει με την υπεροξειδάση του χρένου και να παραχθεί χημειοφωταύγεια. Οι μεμβράνες τοποθετούνται σε φωτογραφικό φιλμ για 20 λεπτά και εμφανίζονται την βοήθεια μηχανήματος.

2.6.8. Ποσοτικοποίηση σήματος με Image J

Για την ποσοτικοποίηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα ImageJ. Το φιλμ σκανάρεται και στην συνέχεια η φωτογραφία μετατρέπεται σε 8-bit. Σχεδιάζεται ένα τετράγωνο ίδιου μεγέθους γύρω από κάθε μπάντα και μετράται η μέση ένταση του σήματος. Πραγματοποιείται η ίδια διαδικασία κάτω από κάθε μπάντα, ώστε να αφαιρεθεί ο θόρυβος. Για την κανονικοποίηση, η ένταση του σήματος του ASC κάθε δείγματος διαιρείται με την ένταση του σήματος της β-τουμπουλίνης κάθε δείγματος.

2.7. Απομόνωση RNA από ιστό

Η καρδιά απομονώνεται από το ζώο και παγώνεται σε υγρό άζωτο και διατηρείται στους -80°C. Στην συνέχεια, προστίθενται 2ml Trizol(Invitrogen) και ακολουθεί ομογενοποίηση στην μέγιστη ταχύτητα (5-6). Το δείγμα διατηρείται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου(RT) και στην συνέχεια προστίθενται 0.2ml χλωροφόρμιο. Ακολουθεί γρήγορη ανάδευση, 2-3 λεπτά σε RT και φυγοκέντρηση στις 11500 rpm(12000xg) για 15 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο(0.6 ml)

μεταφέρεται σε διάλυμα 0.5ml ισοπροπανόλης και 1 μl γλυκογόνου. Το δείγμα επωάζεται 10 λεπτά σε RT και στην συνέχεια φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 11500 rpm(12000xg) στους 4°C. Ακολουθεί πλύση με 1ml αιθανόλης 75% και φυγοκέντρηση στις 8900 rpm(7500xg) για 5 λεπτά στους 4°C.

Κατεργασία με DNAαση

Το DNA απομακρύνεται με κατεργασία με DNAάση(Roche DNase I 10u/μl). Προστίθεται 1X DNase I buffer(Roche), 10units DNase(Roche) και συμπληρώνεται νερό εως τα 50μl. Γίνεται επώαση στους 37°C για 20 λεπτά και προστίθεται 150μl νερό. Προστίθεται 200μl χλωροφόρμιο(1:1) για να γίνει εκχύλιση του RNA και φυγοκεντρούνται τα δείγματα για 5 λεπτά στην μέγιστη ταχύτητα. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο Eppendorf και η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται. Για την κατακρήμνιση του RNA προστίθενται 0.3M οξικού οξέος pH 5.2, 1μl γλυκογόνο και 500μl αιθανόλη 100%. Τα δείγματα επωάζονται για 30 λεπτά στους -20°C , φυγοκεντρούνται στους 4°C για 20 λεπτά στις 13000rpm (13565 xg) και πλένονται με αιθανόλη 75% για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα RNA από τα τοιχώματα.

2.8. Απομόνωση RNA από καλλιέργεια κυττάρων

Το υπερκείμενο των κυττάρων απορρίπτεται και γίνεται πλύση με 1X PBS. Τα κύτταρα λύονται με την προσθήκη κατάλληλου όγκου Trizol(24-well 200μl) και επωάζονται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου(RT). Στην συνέχεια προστίθενται 40μl χλωροφορμίου, αναδεύονται γρήγορα και επωάζονται 2 λεπτά σε RT. Ύστερα φυγοκεντρούνται στις 11500rpm(12000xg) στους 4°C και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε διάλυμα 100μl ισοπροπανόλης και 0.5μl γλυκογόνου. Επωάζονται για 10 λεπτά σε RT και φυγοκεντρούνται για 10 λεπτά στις 11500rpm (12000 xg) στους 4°C. Γίνεται πλύση με αιθανόλη 75% και κατεργασία με DNAαση όπως περιγράφεται πρωτύτερα για τον ιστό.

2.9. Αντίστροφη μεταγραφή

2μg RNA διαλύονται σε 10μl αποστειρωμένου νερού. Προστίθεται 2μl υδατικού διαλύματος με τυχαίους εκκινητές (0.027 ng/μl) και dNTPs (0.416mM) και επωάζονται για 5 λεπτά στους 65°C. Στην συνέχεια, τα δείγματα επωάζονται με 7μl ρυθμιστικού διαλύματος (1st Strand buffer, Invitrogen, ή PrimeScript, Takara), που περιέχει DTT 0.01M και αναστολέα RNAασών

(RNAase OUT, Invitrogen) για 2 λεπτά στους 37°C και προστίθεται 200 units αντίστροφης μεταγραφάσης (PrimeScript, Takara) σε κάθε δείγμα. Η αντίδραση ολοκληρώνεται με επώαση στους 37°C για 50 λεπτά. Η συγκέντρωση του cDNA(ng/μl) μετράται σε φωτόμετρο Nanodrop.

2.10. Real time PCR

Για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων χρησιμοποιείται 25-100ng cDNA, 0.5μM από τον κάθε εκκινητή και 10μl SYBR Green (KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix) σε 96well plates με τελικό όγκο 20μl/αντίδραση. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε duplicates σε θερμοκυκλοποιητή Roche LC480, ως εξής: Κύκλος 1: (1x) βήμα 1: 50°C για 2 λεπτά, Κύκλος 2: (1x) βήμα 1: 95°C για 10 λεπτά, Κύκλος 3: (40x) βήμα 1: 95°C για 30 δευτερόλεπτα, βήμα 2: 60°C για 10 λεπτά. Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της β2-μικροσφαιρίνης(b2M). Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Primer	Sequence
mIL6ALT F	5'-TGAGATCTACTCGGCAAACCTAGTG-3'
mIL6ALTR	5'-CTTCGTAGAGAACAACATAAGTCAGATACC-3'
mKi67F	5'-GCTGTCCTCAAGACAATCATCA-3'
mKi67R	5'-GGCGTTATCCCAGGAGACT-3'
mF(b2M)	5'-TTCTGGTGCTTGTCTCACTGA-3'
mR(b2M)	5'-CAGTATGTTTCGGCTTCCCATTC-3'
mCol1a1F	5'-GTCCCAACCCCCAAAGAC-3'
mCol1a1R	5'-CCCTCGACTCCTACATCTTCTGA-3'
mGal3F	5'-GTGCCCTATGACCTGCCCTT-3'
mGal3R	5'-GGCAACATCATTCCCTCTCC-3'
mIL-1bF	5'- CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG -3'
mIL-1bR	5'- GATCCACACTCTCCAGCTGCA -3'
mIL-1rnF	5'- TCCTGTTTAGCTCACCCATGG -3'
mIL-1rnR	5' CCAGCAATGAGCTGGTTGTTT -3'

2.11. Ανοσοφθορισμός

Ύστερα από την απομόνωση και τον καθαρισμό της καρδιάς, το όργανο τοποθετείται σε OCT σε μια δεξαμενή με υγρό άζωτο έως ότου παγώσει ο ιστός. Στην συνέχεια τοποθετείται στους

-80°C για αποθήκευση. Οι τομές 7μm λαμβάνονται στο μηχάνημα του κρυοστάτη στους -25°C σε αντικειμενοφόρο πλάκα SuperFrost. Οι τομές του κρυοτόμου επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά τουλάχιστον και στην συνέχεια τοποθετούνται σε ακετόνη για 3 λεπτά στους -20°C, ώστε να μονιμοποιηθούν οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Αφού επωαστούν ξανά για 4 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ακολουθούν πλύσεις σε PBS για 5 λεπτά εις διπλούν και μια πλύση σε PBS-T για 10 λεπτά. Στην συνέχεια, η κάθε τομή μαρκάρεται με ειδικού τύπου μαρκαδόρο και τοποθετούνται οριζόντια σε επωαστήρα με υγρασία. Το πρωτογενές αντίσωμα προστίθεται στην κατάλληλη αραιώση, αφού πρώτα έχει επωαστεί με το διάλυμα μπλοκαρίσματος (10%v/v FBS, 2% w/v BSA σε PBS-T) των μη ειδικών θέσεων για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί επώαση για 12 ώρες στους 4°C. Μετά την επώαση, ακολουθούν 3 πλύσεις σε PBS-T για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Επαναλαμβάνεται το μαρκάρισμα με τον ειδικού τύπου μαρκαδόρο και προστίθεται το δευτερογενές φθορίζων αντίσωμα σε διάλυμα μπλοκαρίσματος, στην κατάλληλη αραιώση. Ακολουθεί επώαση για 1,5 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Γίνονται 3 πλύσεις σε PBS-T για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στο τέλος προστίθεται το DAPI (1:1000 σε PBS-T), το οποίο επωάζεται 5-10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Ακολουθεί πλύση σε PBS-T και κλείσιμο με fluo mounting (e.g. Dako S3023). Για την ανίχνευση του ASC, των ινοβλαστών και των ενδοθηλιακών κυττάρων στον καρδιακό ιστό χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι του ASC (AB3607 Millipore, 1:40 αραιώση), PDGFRα (AF1062, R&D Systems, 1:20 αραιώση) και PECAM-1/CD31 (sc18916, Santa Cruz, 1:100 αραιώση), αντίστοιχα, καθώς και τα κατάλληλα δευτερογενή αντισώματα σημασμένα με φθοριόχρωμα (σύστημα ALEXA) σε αραιώσεις 1:500-1:1000.

Η δημιουργία μεγαλομοριακών συμπλόκων της πρωτεΐνης ASC που είναι οπτικά ανιχνεύσιμα με ανοσοφθορισμό (speck), αποτελεί σήμα ενεργοποίησης του NLRP3 φλεγμονοσώματος¹⁴¹.

2.12. Απομόνωση ενήλικων καρδιακών ινοβλαστών

Τα ποντίκια αναισθητοποιούνται και ευθανατώνονται και η καρδιά απομακρύνεται από το ζώο και τοποθετείται σε παγωμένο PBS. Αφού συλλεχθούν όλες οι καρδιές από τα ζώα του ίδου γενοτύπου, και καθαρισθούν από τα αγγεία, αφαιρούνται οι κόλποι ώστε να διατηρηθούν μόνο οι

κοιλίες. Με την βοήθεια νυστεριού, οι καρδιές τεμαχίζονται σε μικρά κομμάτια(1mmx1mm) και τοποθετούνται σε μέσο με κολλαγενάση τύπου II[Collagenase medium: 1mg/ml collagenase II Worthington, 1mg/ml Trypsin(GIBCO, 840-7250IL) σε L15 medium]

Με την βοήθεια πιπέτας Pasteur το διάλυμα αναδεύεται μέσω αναρόφησης. Ακολουθεί επώαση για 8 λεπτά στους 37°C. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για έναν ακόμη κύκλο. Το διάλυμα αναδεύεται ξανά και αφήνεται 2-3 λεπτά ώστε να καθήσουν τα υπολείμματα του ιστού. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καινούριο σωληνάριο, προστίθεται 10ml μέσου κολλαγενάσης στον πρώτο σωλήνα (που περιέχει το ίζημα) και επαναλαμβάνεται η ανάδευση-επώαση για 2 κύκλους. Το υπερκείμενο ανακτάται και προστίθεται στο σωληνάριο που τοποθετήθηκε το πρώτο υπερκείμενο. Ο συνολικός όγκος του ιστού σε κολλαγενάση(20ml) διηθείται μέσω φίλτρου κυττάρων 70μM, ώστε να απορριφθούν τα υπολείμματα του ιστού. Γίνεται φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 1000 στροφές το λεπτό(rpm) στους 4°C. Το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 5 ml IMDM-medium(Gibco[1X] + GlutaMAX-I 31980-022) που περιέχει 20% FBS και 1% γενταμικίνης. Γίνεται μεταφορά των κυττάρων σε φλάσκα 25cm², η οποία επωάζεται στους 37°C, παρουσία ατμόσφαιρας CO₂ 5%. Την επόμενη μέρα απορρίπτεται το μέσο καλλιέργειας και προστίθεται φρέσκο IMDM-20%FBS-1% gentamycin. Οι καλλιέργειες αφήνονται να μεγαλώσουν έως ότου σχηματίσουν μια στοιβάδα κυττάρων στην επιφάνεια της φλάσκας.

Όταν η φλάσκα είναι πλήρης γίνεται τρυψινοποίηση(0.25% τρυψίνη-EDTA) και προσθήκη IMDM-20% FBS-1% gentamycin. Η καλλιέργεια μεταφέρεται σε 2 φλάσκες ίδιου μεγέθους και επωάζεται έως ότου σχηματισθεί μια πλήρης μονοστοιβάδα.

2.13. Απομόνωση νεογνικών καρδιακών ινοβλαστών

Η απομόνωση των νεογνικών ινοβλαστών έγινε όπως περιγράφεται από τους Diokmetzidou et al¹⁴². Συνοπτικά, οι καρδιές απομονώνονται από νεογνά ποντίκια 0-3 ημερών και μεταφέρονται σε HBSS. Αφού καθαριστούν, υπόκεινται σε θρυψινοποίηση(100μg/ml σε 10ml HBSS) για 16-18 ώρες στους 4°C και στην συνέχεια προστίθεται αναστολέας τρυψίνης (200μg/ml) και επωάζονται για 10 λεπτά στους 37°C. Προστίθεται κολλαγενάση (500μg/ml σε 10ml L-15) για περαιτέρω πέψη και επωάζονται για 20-25 λεπτά στους 37°C. Ακολουθεί ανάδευση με αναρόφηση των υπολειμμάτων ιστού και το υπερκείμενο φιλτράρεται από κυτταρικό διαχωριστή 70μm. Τα κύτταρα επωάζονται για 20 λεπτά και φυγοκεντρώνται για 5 λεπτά σε 50-100 xg. Το κυτταρικό

ίζημα επαναιωρείται σε μέσο καλλιέργειας νεογνικών καρδιομυοκυττάρων και επιστρώνεται σε πιάτο κυτταρικής καλλιέργειας για 1-3 ώρες, επιτρέποντας έτσι στους ινοβλάστες να κολλήσουν στην επιφάνεια του πιάτου. Τα καρδιομυοκύτταρα που βρίσκονται εν αιωρήσει αποσύρονται και οι νεογνικοί ινοβλάστες επωάζονται με το ίδιο θρεπτικό μέσο όπως και οι ενήλικοι καρδιακοί ινοβλάστες (βλ. παραπάνω), ενώ ανακαλλιεργούνται και επιστρώνονται στη συνέχεια με τον ίδιο ακριβώς τρόπο (βλ. παρακάτω).

Οι καλλιέργειες νεογνικών ινοβλαστών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, καλλιεργήθηκαν παράλληλα με τους ενήλικους ινοβλάστες, ενώ προέκυψαν από το ενδιάμεσο υλικό που διαχωρίστηκε από παράλληλες απομονώσεις νεογνικών καρδιομυοκυττάρων, που πραγματοποιούσαν οι Δρ. Διοκμετζίδου και Δρ. Τσίκτηη για άλλες πειραματικές προσεγγίσεις και το παραχώρησαν ευγενώς.

Επίστρωση των κυττάρων σε τρυβλία

Τα κύτταρα μετρούνται σε αιμοκυτταρόμετρο Newbauer και τοποθετούνται σε τρυβλία 24-well σε συγκέντρωση 5×10^4 /ml παρουσία DMEM-10%- FBS- 1% gentamycin. Η καλλιέργεια επωάζεται στον κλίβανο για μια μέρα και στην συνέχεια τοποθετείται σε μέσο καλλιέργειας DMEM-0.5% -FBS-1%gentamycin για 18 ώρες, ώστε τα κύτταρα να διατηρηθούν σε εφησυχασμό (quiescence) και να μην πολλαπλασιάζονται. Στη συνέχεια δέχονται τα ερεθίσματα με την προσθήκη κατά 50% στο θρεπτικό τους μέσο υπερκείμενων ενήλικων καρδιομυοκυττάρων διεγερμένων ή όχι για το σχηματισμό φλεγμονοσώματος όπως περιγράφεται παρακάτω.

2.14. Απομόνωση ενήλικων καρδιομυοκυττάρων

Η απομόνωση των ενήλικων καρδιομυοκυττάρων πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται από τους Diokmetzidou et al¹⁴². Συνοπτικά, καρδιές ποντικών 4-8 εβδομάδων τοποθετούνται σε πιάτο με 3ml/min διάλυμα διάχυσης[perfusion buffer(PB), 98% (v/v) stock perfusion buffer(113 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 0.6 mM KH_2PO_4 , 0.6 mM Na_2HPO_4 , 1.2 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.032 mM phenol red, 12 mM NaHCO_3 , 10 mM KHCO_3 , 10 mM HEPES, 30 mM taurine), 10 mM BDM (2,3-butanedionemonoimine), 5.5 mM glucose, το οποίο εισέρχεται μέσω της αορτής στην καρδιά εως ότου καθαριστεί πλήρως από το αίμα, όπου αντικαθίσταται από προθερμασμένο διάλυμα

πέψης[digestion buffer(DB), 87.5% v/v PB, 1mg/ml κολλαγενάση D(Roche) και 0.25% τρυψίνη(Gibco)]. Αφού ο ιστός μαλακώσει, ομογενοποιείται με νυστέρι και πιπέτα Pasteur. Στην συνέχεια, προστίθεται cardiomyocyte stopping buffer 1[90% (v/v) PB, 10% (v/v) BCS, 12.5 μ M CaCl₂] και αφήνεται σε ηρεμία. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα και τα μετρούνται τα ραβδόμορφα καρδιομυοκύτταρα (ενδεικτικά 1-1.5 x 10⁶ καρδιομυοκύτταρα ανά καρδιά). Το υπερκείμενο φυγοκεντρείται σε 180xg/min και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε cardiomyocyte stopping buffer 2 [95% v/v PB, 5% v/v BCS, 12.5 μ M CaCl₂] και προστίθεται ασβέστιο προοδευτικά κάθε 4 λεπτά(50 μ l 10 mM CaCl₂,50 μ l 10 mM CaCl₂, 100 μ l 10 mM CaCl₂,30 μ l 100 mM CaCl₂,50 μ l 100 mM CaCl₂). Στην συνέχεια, επαναιωρούνται τα καρδιομυοκύτταρα σε προθερμασμένο μέσο επίστρωσης καρδιομυοκυττάρων(91% (v/v) MEM, 5% v/v BCS, 10 mM BDM, 100 U/ml Penicillin, 2 mM L-glutamine) και επιστρώνονται(5x10³κύτταρα/cm²) σε πιάτα με επικάλυψη 5 μ g/ml λαμνίνης και επωάζονται για 2 ώρες όπου αλλάζουμε σε μέσο καλλιέργειας καρδιομυοκυττάρων, το οποίο περιέχει 98% (v/v) MEM, 100 U/ml penicillin, 2 mM L-glutamine, 0.1 mg/ml bovine serum albumin, 10% BCS και 10mM BDM.

Διέγερση ενήλικων καρδιομυοκυττάρων για ενεργοποίηση φλεγμονοσώματος

Η ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος έγινε σε επιστρωμένες καλλιέργειες des^{-/-} και wt ενήλικων καρδιομυοκυττάρων σε τρυβλία 12 θέσεων (12-well) με επικάλυψη λαμνίνης. Τα καρδιομυοκύτταρα παρέμειναν στο τρυβλίο για 16-18 ώρες (overnight) σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης καρδιομυοκυττάρων και διεγέρθηκαν για το σχηματισμό φλεγμονοσώματος σε 0.5 ml φρέσκου θρεπτικού μέσου με την προσθήκη LPS (200 ng/ml) ακολουθούμενη από την έκθεση για 30' σε 20 nM nigericin (Sigma N7143) σε θρεπτικό μέσο Opti-MEM αυτή τη φορά. Τα υπερκείμενα των κυττάρων συλλέχθηκαν και φυλάχθηκαν στους -80oC μέχρι την προσθήκη τους στο θρεπτικό μέσο ενήλικων και καρδιακών ινοβλαστών όπως περιγράφηκε παραπάνω.

Τα υπερκείμενα ενήλικων καρδιομυοκυττάρων ήταν από αρχειακό υλικό του εργαστηρίου, ενώ τα καρδιομυοκύτταρα αυτά καθεαυτά είχαν απομονωθεί από τη Δρα Α. Διοκμετζίδου (Εργ. Γ. Καπετανάκη, ΙΙΒΕΑΑ).

2.15. Στατιστική ανάλυση

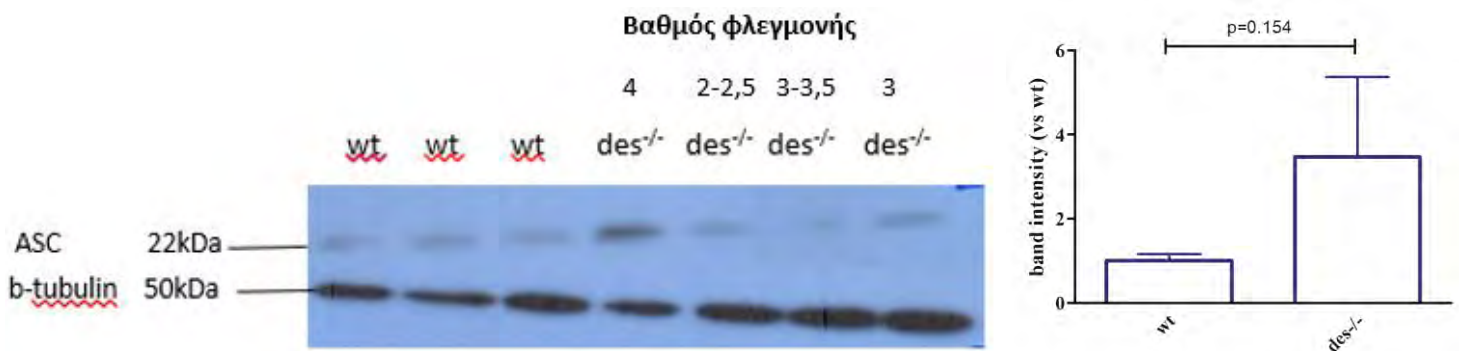
Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Graphpad Prism 6. Για τις μορφομετρικές αναλύσεις και την qPCR μεταξύ des^{-/-} και des^{-/-}vim^{-/-}, και des^{-/-} με des^{-/-}NLRP3^{-/-}

χρησιμοποιήθηκε παραμετρικό t-test με Welch's correction. Η ποσοτικοποίηση της ανοσοαποτύπωσης για ASC μεταξύ wt και des^{-/-} αναλύθηκε με παρόμοιο τρόπο. Οι διαφορές εκφράζονται με mean ± SEM.

3. Αποτελέσματα

3.1. Αύξηση του ASC σε $des^{-/-}$ καρδιές στις 4 εβδομάδες

Για να επιβεβαιώσουμε και να επεκτείνουμε τα προηγούμενα αποτελέσματα που υποδεικνύουν την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος στις $des^{-/-}$ καρδιές, αποτιμήσαμε τα επίπεδα της πρωτεΐνης ASC (adaptor του φλεγμονοσώματος) σε καρδιές wt και $des^{-/-}$ διαφορετικού βαθμού φλεγμονής. Παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης ASC στις καρδιές των $des^{-/-}$ 4 εβδομάδων σε σχέση με τις wt (Σχήμα 17). Επιπλέον, τα επίπεδα της ASC διαφέρουν μεταξύ των επιμέρους $des^{-/-}$, με τα υψηλότερα επίπεδα να παρατηρούνται στην καρδιά με την μεγαλύτερη φλεγμονή.



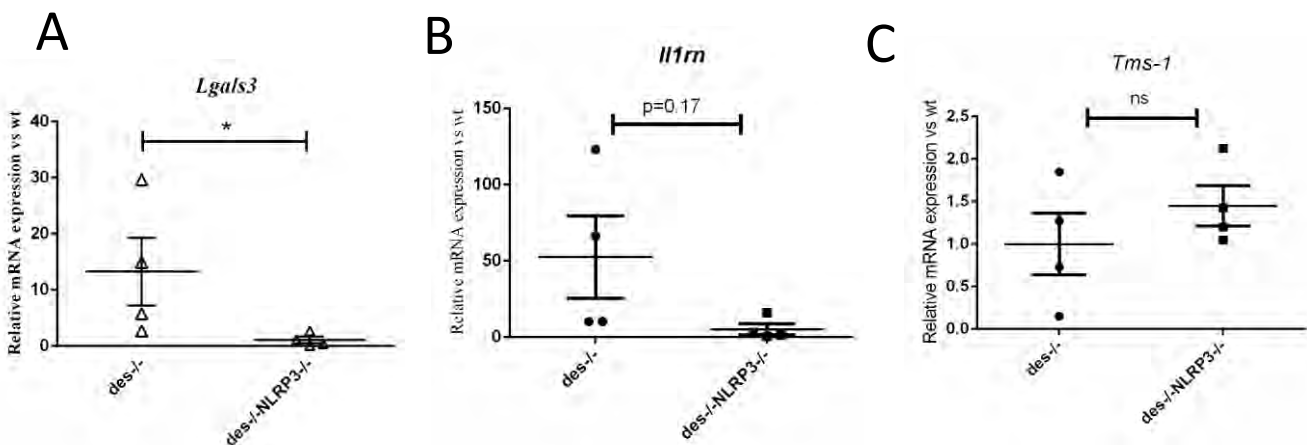
Σχήμα 17 Ανοσοαποτύπωση κατά Western για ASC σε καρδιές wt και $des^{-/-}$ 4 εβδομάδων. A: Το ASC αυξάνεται στις καρδιές των $des^{-/-}$ ποντικών με τρόπο εξαρτώμενο από την φλεγμονή. Ο βαθμός φλεγμονής σημειώνεται για κάθε $des^{-/-}$ δείγμα. Η ποσότητα της β-τουμπουλίνης στο κάτω μέρος είναι ενδεικτική του πρωτεϊνικού περιεχομένου του gel B: Ποσοτικοποίηση της έντασης του σήματος μέσω ImageJ.

3.2. Μείωση της έκφρασης της γαλεκτίνης-3 και του IL-1RA απουσία NLRP3

Στη συνέχεια μελετήθηκαν παράμετροι της φλεγμονής σε ζώα νεαρότερης ηλικίας, όπου και παρατηρείται η χαρακτηριστική φλεγμονώδης απόκριση του $des^{-/-}$. Η έκφραση της γαλεκτίνης-3, μόριου μεσολαβητή της καρδιακής αναδόμησης και λειτουργίας στο $des^{-/-}$ ⁵⁶ παρουσίασε σημαντική μείωση κατά 12.5 φορές στο μυοκάρδιο $des^{-/-}$ NLRP3^{-/-} ζώων ηλικίας 4 εβδομάδων σε

σύγκριση με τα παρατηρούμενα επίπεδα στα αντίστοιχα *des*^{-/-} ζώα. Αν και παρατηρήθηκε μείωση κατά 10 περίπου φορές και στην έκφραση IL1RA (σχετική έκφραση *des*^{-/-}NLRP3^{-/-} ως προς wt 5.2±3.68 έναντι 52.6±27 του *des*^{-/-}), αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Τέλος, η αποτίμηση της έκφρασης του *Tms-1*, προϊόν του οποίου αποτελεί το ASC, στη συγκεκριμένη ομάδα δειγμάτων δεν έδειξε διαφορές μεταξύ των *des*^{-/-}NLRP3^{-/-} και *des*^{-/-}, ούτε όμως και τη χαρακτηριστική επαγωγή της έκφρασης του στις *des*^{-/-} καρδιές έναντι αυτής των wt (**Σχήμα 18**).

Οι ισχυρές αυτές ενδείξεις καταστολής μορίων που συμμετέχουν στα μονοπάτια της φλεγμονής και του φλεγμονοσώματος δεν στάθηκε, δυστυχώς, δυνατόν να επιβεβαιωθούν και να επεκταθούν με περαιτέρω πειράματα στα πλαίσια της παρούσας εργασίας λόγω πρόσκαιρης μείωσης της αναπαραγωγικής δραστηριότητας των ζώων της συγκεκριμένης διασταύρωσης.



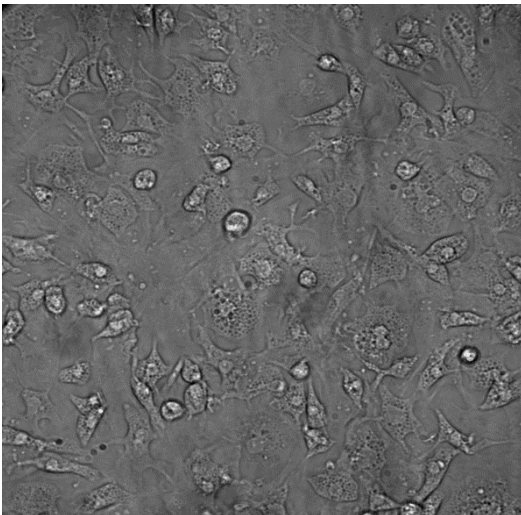
Σχήμα 18 Ποσοτική *real-time* PCR σε ζώα 4 εβδομάδων για μόρια φλεγμονής. **A:** Η έκφραση της γαλεκτίνης-3 μειώνεται 12,5 φορές στα *des*^{-/-}NLRP3^{-/-} (n=4) ποντίκια σε σχέση με τα *des*^{-/-} (n=4) (1.09 ± 0.57 έναντι 13.27 ± 6.04, p=0.028). **B** Μείωση της έκφρασης του *Il1rn* κατά 10 φορές στις *des*^{-/-}NLRP3^{-/-} καρδιές, η οποία δεν είναι στατιστικά σημαντική (5.18 ± 3.68 n=4 έναντι 52.61 ± 27 n=4, p=0.17). **C:** Δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην έκφραση του ASC μεταξύ *des*^{-/-} και *des*^{-/-}NLRP3^{-/-} (1 ± 0.36 n=4 έναντι 1.44 ± 0.23 n=4, p=0.34)

3.3. Μεταγωγή της φλεγμονής από τα καρδιομυοκύτταρα στους ινοβλάστες

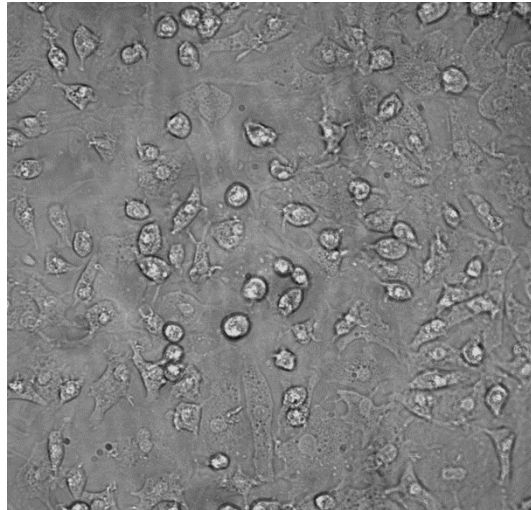
Σε μια προσπάθεια κατανόησης των ενδεχόμενων μηχανισμών σηματοδότησης της φλεγμονής στις *des*^{-/-} καρδιές, εξετάστηκε αν τα καρδιομυοκύτταρα, και πιο συγκεκριμένα τα *des*^{-/-} καρδιομυοκύτταρα, μπορούν να μεταγουν την σχετιζόμενη με το φλεγμονόσωμα φλεγμονή στους καρδιακούς ινοβλάστες. Επιλέχθηκε η μελέτη της έκφρασης της ιντερλευκίνης-6 (IL6) ως της πλέον χαρακτηριστικής φλεγμονώδους κυτταροκίνης που επάγεται κατά την έκθεση των ινοβλαστών σε φλεγμονώδη ερεθίσματα^{143,144}. Για το σκοπό αυτό απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν καρδιακοί ινοβλάστες και επιστρώθηκαν σε αραιή πυκνότητα (*sparse culture*). Χρησιμοποιήθηκαν

ινοβλάστες τόσο από ενήλικα ποντίκια (που έχουν ήδη εκτεθεί στο φλεγμονώδες περιβάλλον του $des^{-/-}$ μυοκαρδίου), όσο και από νεογνά $des^{-/-}$ ποντίκια (δηλαδή από μυοκάρδιο χωρίς φλεγμονή), ώστε να διαπιστωθούν τυχόν διαφοροποιήσεις της απόκρισης που θα οφείλονταν στην *in vivo* ενεργοποίηση των ινοβλαστών από φλεγμονώδεις διεργασίες. Παρατηρήθηκαν μικρές διαφορές στη μορφολογία των ινοβλαστών εξαρτώμενες από το αναπτυξιακό στάδιο από το οποίο προήλθαν. Έτσι, οι νεογνικοί ινοβλάστες είναι περισσότερο ομοιόμορφοι, εκτείνονται λιγότερο από τους ενήλικους, και βρίσκονται αρκετοί σε διαίρεση καθώς επίσης δεν παρατηρείται το χαρακτηριστικό πεπλατυσμένο-επιμηκυσμένο σχήμα των ινοβλαστών. (Σχήμα 19). Δεν παρατηρήθηκαν ιδιαίτερες μορφολογικές διαφορές μεταξύ $des^{-/-}$ και wt ινοβλαστών, γεγονός αναμενόμενο, τουλάχιστον για τους νεογνικούς, αφού η δεσμίνη δεν εκφράζεται στους ινοβλάστες στο φυσιολογικό μυοκάρδιο.

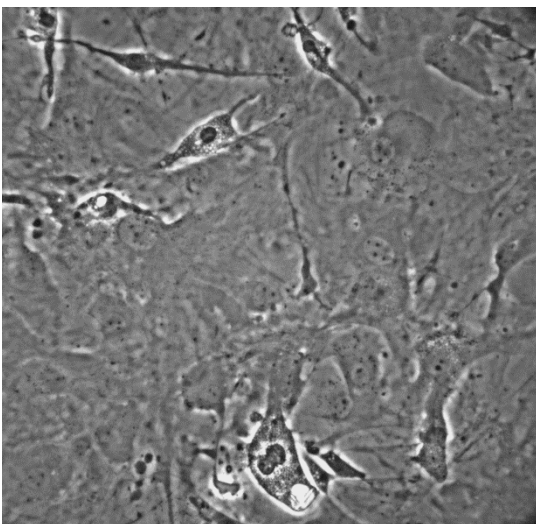
A



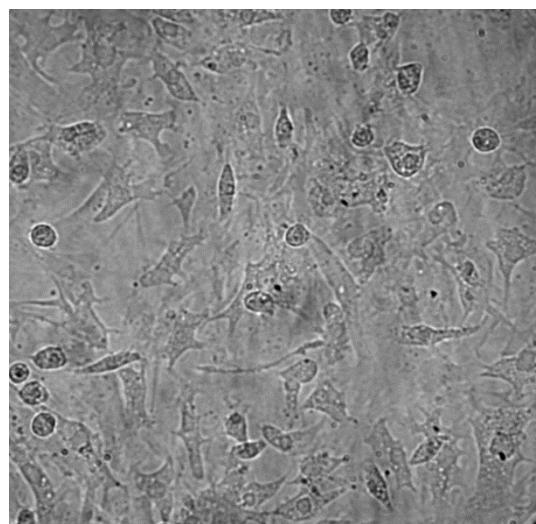
B



C



D



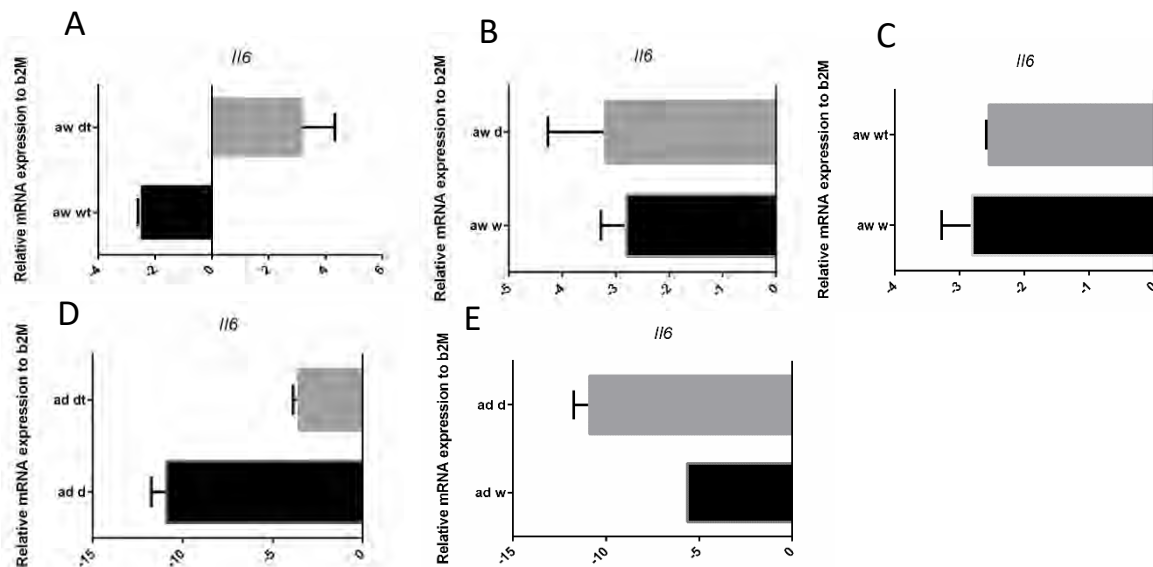
Σχήμα 19 Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες καλλιέργειας καρδιακών ινοβλαστών. A: Καλλιέργεια νεογνικών ινοβλαστών αγρίου τύπου (wt), B: καλλιέργεια νεογνικών ινοβλαστών $des^{-/-}$, C: καλλιέργεια ενήλικων ινοβλαστών αγρίου τύπου, D: καλλιέργεια ενήλικων ινοβλαστών $des^{-/-}$

Στη συνέχεια οι επιστρωμένοι ινοβλάστες οδηγήθηκαν σε εφησυχασμό με μερική στέρηση ορού ώστε να συγχρονισθούν κατά το δυνατόν στη φάση G0 του κυτταρικού κύκλου και εκτέθηκαν σε υπερκείμενο καρδιομυοκυττάρων για 24 ώρες, οπότε και απομονώθηκε το RNA της καλλιέργειας και αποτιμήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης *Il6* με real time PCR. Το υπερκείμενο των καρδιομυοκυττάρων προήλθε από αρχειακό υλικό του εργαστηρίου και αποτελούνταν από εθισμένο μέσο (conditioned medium) που συλλέχθηκε εντός 48 ωρών από καλλιέργειες ενήλικων wt και $des^{-/-}$ καρδιομυοκυττάρων ώστε να αποτιμηθεί η ικανότητα τους να επηρεάζουν φλεγμονώδη μονοπάτια σε καρδιακούς ινοβλάστες, αλλά και να συγκριθούν τα $des^{-/-}$ με τα φυσιολογικά καρδιομυοκύτταρα. Επιπλέον, σε μια προσπάθεια μίμησης της δημιουργίας του φλεγμονοσώματος, τα καρδιομυοκύτταρα είχαν πρωτύτερα διεγερθεί, σε ορισμένες περιπτώσεις, με βακτηριακό LPS και τον ρυθμιστή της ισορροπίας K^+ nigericin, σύμφωνα με ένα από τα κλασικά σχήματα *in vitro* διέγερσης φλεγμονοσώματος⁷.

Η έκθεση των φυσιολογικών ενήλικων καρδιακών ινοβλαστών σε υπερκείμενο καρδιομυοκυττάρων που είχαν διεγερθεί για την δημιουργία φλεγμονοσώματος οδήγησε σε περισσότερη έκφραση *Il6* όταν τα καρδιομυοκύτταρα προέρχονταν από $des^{-/-}$ περιβάλλον (aw dt), απ' ότι από wt (aw wt) (**Σχήμα 20A**). Απουσία διέγερσης, η έκφραση της *Il6* παραμένει ίδια στους ινοβλάστες που εκτέθηκαν σε $des^{-/-}$ (aw d) και wt(aw w) καρδιομυοκύτταρα (**Σχήμα 20B**). Από την άλλη, η διέγερση των wt καρδιομυοκυττάρων (aw wt) φάνηκε να μην επάγει περαιτέρω φλεγμονώδεις αποκρίσεις στους φυσιολογικούς ινοβλάστες, όπως φαίνεται από την έκφραση της *Il6* που παρέμεινε σταθερή (**Σχήμα 20C**).

Στους $des^{-/-}$ ενήλικους ινοβλάστες, δηλαδή καρδιακούς ινοβλάστες που προέρχονται από περιβάλλον φλεγμονής, η έκθεση σε $des^{-/-}$ διεγερμένα καρδιομυοκύτταρα (ad dt) μεσολαβεί μια φλεγμονώδη απόκριση εξαρτώμενη από την *Il6*, σε αντίθεση με αδιέγερτα $des^{-/-}$ καρδιομυοκύτταρα(ad d) (**Σχήμα 20D**). Απουσία διέγερσης, τα wt αδιέγερτα καρδιομυοκύτταρα

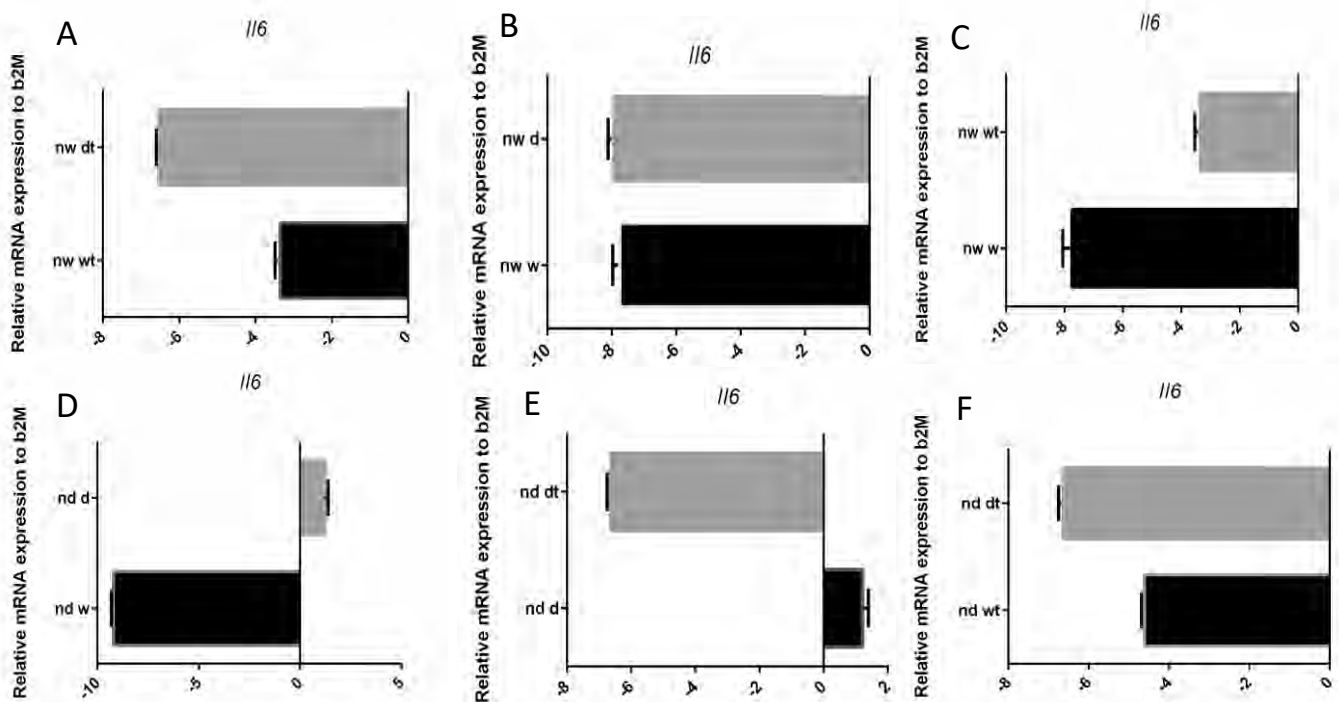
(ad w) οδηγούν σε υψηλότερα επίπεδα έκφρασης *Il6* τους *des*^{-/-} ινοβλάστες σε σύγκριση με τα *des*^{-/-} αδιεγέρτα καρδιομυοκύτταρα (ad d) (Σχήμα 20Ε).



Σχήμα 20 Α: Η έκφραση της *IL6* είναι αυξημένη στους wt ενήλικους ινοβλάστες που δέχονται υπερκείμενο διεγερμένων *des*^{-/-} καρδιομυοκυττάρων, σε σχέση με την έκθεση σε wt διεγερμένα καρδιομυοκύτταρα (3.16 ± 0.82 έναντι -2.55 ± 0.04). Β: Δεν υπάρχει διαφορά στην έκφραση της *IL6* των ινοβλαστών που εκτίθενται σε wt ή *des*^{-/-} αδιεγέρτα καρδιομυοκύτταρα. (-3.19 ± 1.08 έναντι -2.8 ± 0.47) C: Δεν υπάρχει διαφορά στην έκφραση της *IL6* των ινοβλαστών που εκτίθενται σε wt διεγερμένα ή αδιεγέρτα καρδιομυοκύτταρα. (-2.8 ± 0.47 έναντι -2.55 ± 0.04) D: Η έκφραση της *IL6* των *des*^{-/-} ινοβλαστών που εκτίθενται σε διεγερμένα *des*^{-/-} καρδιομυοκύτταρα είναι αυξημένη συγκριτικά με τους ινοβλάστες που εκτέθηκαν σε αδιεγέρτα *des*^{-/-} καρδιομυοκύτταρα. (-3.55 ± 0.29 έναντι -10.89 ± 0.85) E: Η *IL6* αυξάνεται όταν οι *des*^{-/-} ινοβλάστες εκτίθενται σε φυσιολογικά καρδιομυοκύτταρα σε σχέση με τα *des*^{-/-}. (-5.65 ± 0.0 έναντι -10.89 ± 0.85). Οι επιμέρους καλλιέργειες ινοβλαστών ήταν από $n=4$ ενήλικα ποντίκια. Οι μετρήσεις εκφράζονται ως $-\Delta C_T$ του γονιδίου *Il6* έναντι του γονιδίου αναφοράς (*b2M*).

Αντίθετα, στους νεογνικούς wt ινοβλάστες, η έκθεση σε διεγερμένα wt καρδιομυοκύτταρα (nw wt) μπορεί να επάγει την έκφραση της *IL6* περισσότερο από τα διεγερμένα *des*^{-/-} (nw dt) (Σχήμα 21Α). Όπως και στους ενήλικους ινοβλάστες, τα αδιεγέρτα wt(nw w) ή *des*^{-/-} (nw d) καρδιομυοκύτταρα δεν μπορούν να επάγουν φλεγμονώδη απόκριση στους wt νεογνικούς ινοβλάστες. (Σχήμα 21Β). Όταν τα wt καρδιομυοκύτταρα (nw wt) διεγέρθηκαν για ενεργοποίηση του NLRP3 φλεγμονοσώματος και επέδρασαν σε wt νεογνικούς ινοβλάστες αυξήθηκε η έκφραση της *IL6*, σε σχέση με την επίδραση αδιεγέρτων wt καρδιομυοκυττάρων (nw w) (Σχήμα 21C). Έτσι, η διέγερση των φυσιολογικών καρδιομυοκυττάρων οδήγησε σε επαγωγή φλεγμονής των νεογνικών ινοβλαστών, σε αντίθεση δηλαδή με ότι παρατηρήθηκε στην αντίστοιχη απόκριση των ενήλικων ινοβλαστών (σύγκρισε με σχήμα 20C).

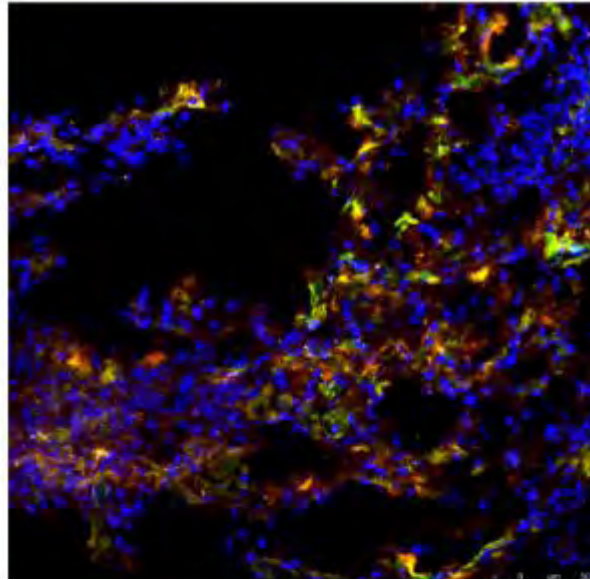
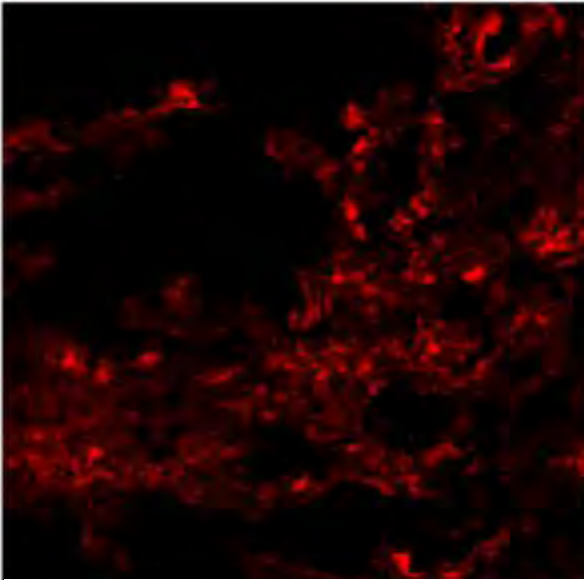
Παρ' ότι νεογνικοί ινοβλάστες δεν αναμένονταν να επηρεάζονται από την παρουσία ή απουσία δεσμίνης, παρατηρήθηκαν επιμέρους διαφορές στις αποκρίσεις των *des*^{-/-} νεογνικών ινοβλαστών. Έτσι, η έκθεση των *des*^{-/-} ινοβλαστών σε *des*^{-/-} αδιέγερτα καρδιομυοκύτταρα (nd d) οδήγησε σε περισσότερη έκφραση IL6 από την έκθεση σε αδιέγερτα wt καρδιομυοκύτταρα (nd w) (Σχήμα 21D). Ωστόσο, το υπερκείμενο των διεγερμένων *des*^{-/-} καρδιομυοκυττάρων (nd dt) ήταν αναποτελεσματικό στην επαγωγή της έκφρασης της IL6 στους *des*^{-/-} ινοβλάστες σε σχέση με τα αδιέγερτα *des*^{-/-} καρδιομυοκύτταρα (nd d) (Σχήμα 21E), σε συμφωνία με ότι παρατηρήθηκε στους νεογνικούς φυσιολογικούς ινοβλάστες (Σχήμα 21C). Επίσης, τα διεγερμένα wt καρδιομυοκύτταρα (nd wt) οδήγησαν σε υψηλότερα επίπεδα έκφρασης IL6 στους *des*^{-/-} νεογνικούς ινοβλάστες από ότι τα διεγερμένα *des*^{-/-} (nd dt) (Σχήμα 21F).



Σχήμα 21 A: Η IL6 αυξάνεται όταν οι wt νεογνικοί ινοβλάστες εκτίθενται σε wt διεγερμένα καρδιομυοκύτταρα σε σχέση με τα *des*^{-/-} (3.35 ± 0.13 έναντι 6.53 ± 0.06). B: Δεν υπάρχει διαφορά στην έκφραση της IL6 των φυσιολογικών νεογνικών ινοβλαστών, όταν αυτοί εκτίθενται σε αδιέγερτα wt ή *des*^{-/-} καρδιομυοκύτταρα (7.74 ± 0.22 έναντι 7.94 ± 0.18). C: Τα διεγερμένα wt καρδιομυοκύτταρα επάγουν φλεγμονώδεις αποκρίσεις, όπως υποδεικνύεται από την αύξηση της IL6 στους wt νεογνικούς ινοβλάστες (3.35 ± 0.13 έναντι 7.74 ± 0.22). D: Τα *des*^{-/-} καρδιομυοκύτταρα επάγουν φλεγμονώδεις αποκρίσεις, όπως υποδεικνύεται από την αύξηση της IL6 στους *des*^{-/-} νεογνικούς ινοβλάστες σε σύγκριση με τους wt (1.22 ± 0.18 έναντι 9.21 ± 0.09). E: Τα διεγερμένα *des*^{-/-} καρδιομυοκύτταρα δεν έχουν την δυνατότητα να επάγουν φλεγμονώδεις αποκρίσεις, όπως τα αδιέγερτα *des*^{-/-}, όπως υποδεικνύεται από την μειωμένη έκφραση της IL6 (6.63 ± 0.11 έναντι 1.22 ± 0.18). F: Τα wt διεγερμένα καρδιομυοκύτταρα μπορούν να επάγουν περισσότερη έκφραση IL6 στους νεογνικούς *des*^{-/-} ινοβλάστες από τα *des*^{-/-} διεγερμένα καρδιομυοκύτταρα (4.62 ± 0.06 έναντι 6.63 ± 0.11). Οι μετρήσεις εκφράζονται ως $-\Delta\Delta C_T$ του γονιδίου IL6 έναντι του γονιδίου αναφοράς (b2M).

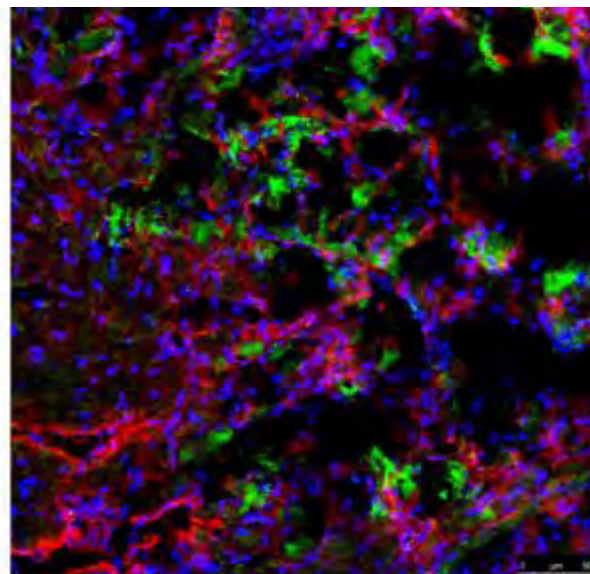
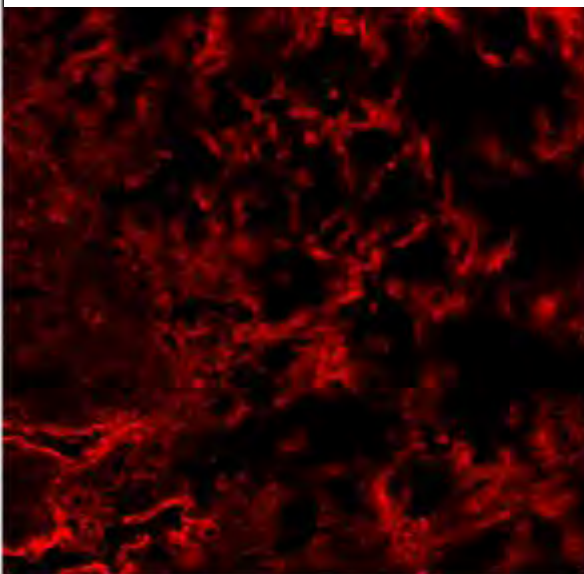
3.4. Το ASC εντοπίζεται στους ινοβλάστες αλλά όχι στο ενδοθήλιο

Για να διαπιστωθεί αν υπάρχει πράγματι ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος στον κυτταρικό πληθυσμό των ινοβλαστών και *in vivo*, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοφθορισμού για τον κυτταρικό εντοπισμό της πρωτεΐνης ASC στο *des^{-/-}* μυοκάρδιο. Η δημιουργία των ASC speck έχει παρατηρηθεί συνήθως σε φλεγμονώδη κύτταρα, κυρίως μακροφάγα, αλλά και ουδετερόφιλα και λεμφοκύτταρα^{90,145}. Στο *des^{-/-}* έχει παρατηρηθεί εκτός από το φλεγμονώδες διήθημα και στα καρδιομυοκύτταρα, όπως ήδη αναφέρθηκε, δεν είχαν όμως γίνει μελέτες εντοπισμού του σε άλλους κυτταρικούς πληθυσμούς. Μελέτες συνεντοπισμού έδειξαν ότι η πρωτεΐνη ASC και δομές παρόμοιες με συσσωματώματα ASC (ASC specks) ενυπάρχουν σε κύτταρα θετικά για PDGFRα(Σχήμα 22A, πράσινο), ενός από τους πλέον αξιόπιστους δείκτες καρδιακών ινοβλαστών¹⁴⁶, επιβεβαιώνοντας την υπόθεση ότι το NLRP3 φλεγμονόσωμα ενεργοποιείται πράγματι στους ινοβλάστες της *des^{-/-}* καρδιάς. Επίσης, εξετάστηκε η πιθανότητα να δημιουργούνται ASC specks σε ενδοθηλιακά κύτταρα(CD31+), τα οποία αποτελούν το 40-50% των κυττάρων του μυοκαρδίου¹⁴⁷, αλλά φάνηκε ότι εντοπίζονται σε γειτονικά κύτταρα και όχι εντός αυτών(Σχήμα 22B).



CD31

Merge



Σχήμα 22 Εντοπισμός του ASC σε ινοβλάστες και ενδοθήλιο. A: Τα ASC speck (πράσινο) εντοπίζονται σε καρδιακούς ινοβλάστες (PDGFRa+ κύτταρα, κόκκινο). B: Τα CD31+ κύτταρα (κόκκινο) δεν συνεντοπίζονται με τα ASC speck (πράσινο). Φακός: 40X

3.5. Μελέτη της συνεισφοράς της βιμεντίνης στο $des^{-/-}$ ποντίκι

Εφόσον οι καρδιακοί ινοβλάστες αποτελούν έναν ενεργό πληθυσμό στην μετάδοση της φλεγμονής της σχετιζόμενης με το φλεγμονόσωμα στη $des^{-/-}$ καρδιά, θελήσαμε να δούμε την επίδραση της απαλοιφής του του γονιδίου της βιμεντίνης, με βάση και την ενδεχόμενη εμπλοκή της στην ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος, όπως παρουσιάστηκε στην εισαγωγή. Έτσι, διασταυρώσαμε $des^{-/-}$ και $vim^{-/-}$ ποντίκια, ώστε να εξακριβώσουμε αν η ενδεχόμενη μειορύθμιση της ενεργοποίησης του NLRP3 φλεγμονοσώματος στους καρδιακούς ινοβλάστες θα μπορούσε να συγκρατήσει τη διάδοση της φλεγμονής και να επιδράσει θετικά στην καρδιακή αναδόμηση και λειτουργία του $des^{-/-}$ ποντικού.

3.5.1. Μέτρηση καρδιακής λειτουργίας σε μύες 4 μηνών

Πραγματοποιήθηκε υπερηχογράφημα καρδιακών μυών 4 μηνών. Δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στο $des^{-/-}vim^{-/-}$ σε σχέση με το $des^{-/-}$ ποντίκι όσον αφορά τη λειτουργία της αριστερής κοιλίας όπως περιγράφεται από το κλάσμα βράχυνσης (FS%, fractional shortening) (Σχήμα 23). Από την άλλη, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση του πάχους του τοιχώματος της αριστερής κοιλίας των θηλυκών $des^{-/-}vim^{-/-}$ σε σχέση με τα $des^{-/-}$ τόσο κατά την διαστολή (LVPWd) όσο και κατά την συστολή (LVPWs). Καθότι η λέπτυνση του τοιχώματος αποτελεί ένα από τα χαρακτηριστικά της παθολογίας του $des^{-/-}$ μυοκαρδίου το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι ο φαινότυπος όχι μόνο δεν βελτιώνεται, αλλά στην πραγματικότητα χειροτερεύει όταν απουσιάζει και η βιμεντίνη (Πίνακας 1). Τα αρσενικά δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις επιμέρους μετρήσεις του υπερήχου (Πίνακας 2).

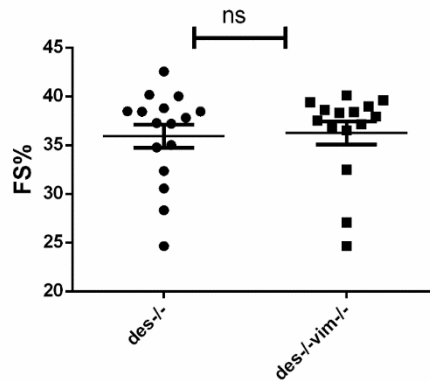
Πίνακας 1: Εκτίμηση της καρδιακής λειτουργίας στα θηλυκά

Table1	Des-/-	Des-/-Vim-/-	p-value
<i>Female mice</i>	n=8	n=5	
HR	491.75±14.94	533.13±22.42	0.1372
LVEDD (mm)	3.28±0.14	2.96±0.10	0.1418
LVESD (mm)	2.01±0.10	1.88±0.10	0.3924
LVPWd (mm)	0.73±0.01	0.69±0.01	0.0294
LVPWs (mm)	1.18±0.01	1.16±0.01	0.0257
FS (%)	38.71±0.81	36.57±1.09	0.1382
r/h	2.24±0.09	2.13±0.08	0.4434

HR; heart rate, καρδιακός ρυθμός LVEDD; Left Ventricular external end-diastolic diameter, τελοδιαστολική διάμετρος αριστερής κοιλίας LVESD; Left Ventricular external end-systolic diameter, τελοσυστολική διάμετρος αριστερής κοιλίας LVPWd; Left Ventricular Posterior Wall at diastole, Πάχος Προσθίου Τοιχώματος Αριστεράς Κοιλίας στη διαστολή LVPWs; Left ventricular Posterior Wall at systole, Πάχος Προσθίου Τοιχώματος Αριστεράς Κοιλίας στη συστολή FS; Fraction Shortening, Κλάσμα Βράχυνσης r/h; LV radius to Posterior Wall Thickening, λόγος της ακτίνας της αριστεράς κοιλίας προς το πάχος του προσθίου τοιχώματος (δείκτης του υφιστάμενου stress της αριστεράς κοιλίας)

Table2	Des-/-	Des-/-Vim-/-	p-value
<i>Male mice</i>	n=8	n=10	
HR	513.50±16.96	496.13±20.92	0.5429
LVEDD (mm)	3.68±0.11	3.33±0.18	0.1586
LVESD (mm)	2.45±0.07	2.15±0.17	0.1679
LVPWd (mm)	0.73±0.01	0.72±0.01	0.5747
LVPWs (mm)	1.18±0.01	1.17±0.01	0.4596

<i>FS (%)</i>	33.12±1.79	36.06±1.74	0.2602
<i>r/h</i>	2.53±0.08	2.33±0.13	0.2332



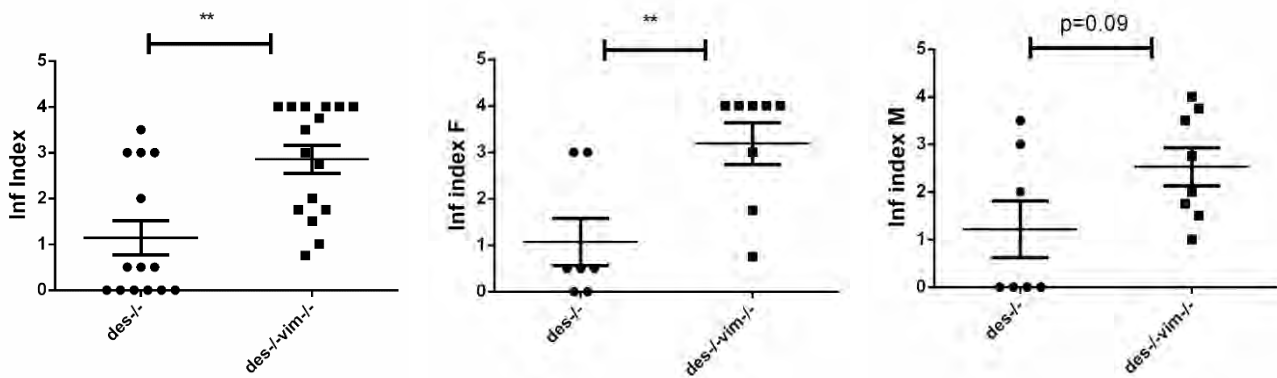
Σχήμα 23 Η καρδιακή λειτουργία στο σύνολο των ποντικών. Δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στο κλάσμα βράχυνσης(FS) μεταξύ του *des^{-/-}* (n= 16) και *des^{-/-}vim^{-/-}* (n=15)

3.5.2. Μελέτη παραμέτρων καρδιακής φλεγμονής σε ποντίκια ηλικίας 4 εβδομάδων

Για να διαπιστωθεί αν υπάρχει επίδραση της βιμεντίνης στη φλεγμονώδη αντίδραση που χαρακτηρίζει το *des^{-/-}* μυοκάρδιο έγινε ανάλυση στοιχείων φλεγμονής σε ποντίκια 4 εβδομάδων

Ολική καρδιακή φλεγμονή

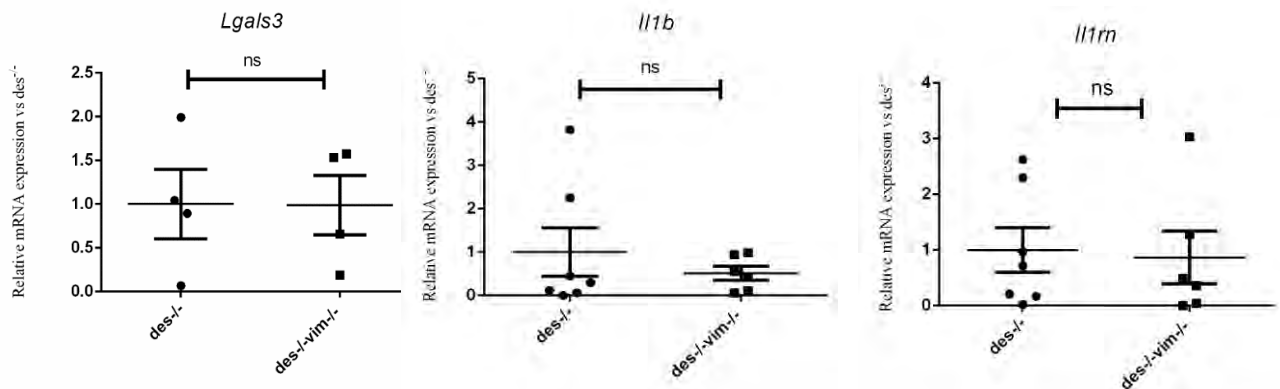
Καρδιές ποντικών *des^{-/-}* και *des^{-/-}vim^{-/-}* 4 εβδομάδων απομονώθηκαν και βαθμολογήθηκαν για τις εστίες φλεγμονής, όπως έχει περιγραφεί πρωτύτερα⁴⁷. Η φλεγμονή του *des^{-/-}* ποντικιού εμφανίζεται την 15/16η ημέρα ηλικίας του ζώου, ενώ αποδράμει εν μέρει και βρίσκεται σε ύφεση από τους 3 μήνες⁴⁷. Ενώ αναμέναμε σύμφωνα με τις αρχικές υποθέσεις μας μείωση της φλεγμονής στην ηλικία των 4 εβδομάδων παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της κατά 2.5 φορές στις καρδιές των *des^{-/-}vim^{-/-}* ποντικών σε σχέση με τις καρδιές των *des^{-/-}*. Στα θηλυκά *des^{-/-}vim^{-/-}* η ολική καρδιακή φλεγμονή αυξήθηκε περίπου 3 φορές σε σχέση με τα *des^{-/-}* ενώ στα αρσενικά *des^{-/-}vim^{-/-}* παρουσιάσθηκε τάση αύξησης της φλεγμονής 2 φορές ως προς τα *des^{-/-}* (Σχήμα 24)



Σχήμα 24 Αξιολόγηση της ολικής καρδιακής φλεγμονής στα *des^{-/-}* και *des^{-/-}vim^{-/-}* 4 εβδομάδων. Η φλεγμονή αυξάνεται στα *des^{-/-}vim^{-/-}* (n=16) 2,5 φορές σε σχέση με τα *des^{-/-}* (n=14) (2.85 ± 0.3 n=16 έναντι 1.14 ± 0.38 n=14, $p=0.0015$). Στα θηλυκά *des^{-/-}vim^{-/-}* (n=8) η φλεγμονή αυξάνεται 3-φορές σε σχέση με τα *des^{-/-}* (n=7) (3.18 ± 0.45 n=8 έναντι 1.07 ± 0.51 N=7, $p=0.0083$) Στα αρσενικά *des^{-/-}vim^{-/-}* (n=8) εμφανίζεται μια τάση αύξησης της φλεγμονής σε σχέση με τα αρσενικά *des^{-/-}* (n=7) (2.53 ± 0.4 n=8 έναντι 1.21 ± 0.6 n=7, $p=0.09$)

3.5.3.Μοριακή ανάλυση φλεγμονής σε *des^{-/-}vim^{-/-}* καρδιές 4 εβδομάδων

Λόγω της αυξημένης φλεγμονής των *des^{-/-}vim^{-/-}* ποντικών εξετάστηκε η έκφραση του γονιδίου *Lgals3*, το οποίο είναι αυχορρυθμισμένο στις *des^{-/-}* καρδιές 4 εβδομάδων, αλλά δεν υπήρξε διαφορά μεταξύ των *des^{-/-}* και *des^{-/-}vim^{-/-}* καρδιών. Επίσης εξετάστηκε η έκφραση γονιδίων

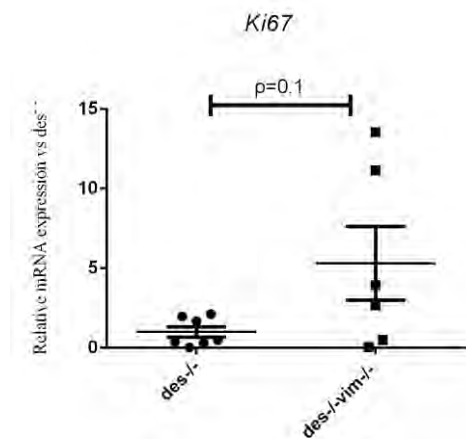


που ανήκουν στον άξονα φλεγμονοσώματος-IL1. Έτσι, τα επίπεδα έκφρασης της IL1β στο *des^{-/-}vim^{-/-}* μυσκάρδιο μειώθηκαν στο μισό (0.5-φορές) σε σχέση με τα *des^{-/-}*, αλλά η διαφορά αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Το γονίδιο *Il1rn* παρουσίασε μικρότερη και μη στατιστικά σημαντική μείωση, εκφραζόμενο στο *des^{-/-}vim^{-/-}* μυσκάρδιο 0.8 φορές σε σχέση με τα επίπεδα του *des^{-/-}*. Συνολικά δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην έκφραση της γαλεκτίνης-3 και των μορίων του άξονα φλεγμονοσώματος-IL1 που εξετάστηκαν (IL1β, IL1-RA).

Σχήμα 25 Μοριακή ανάλυση των *des*^{-/-}*vim*^{-/-} και *des*^{-/-} 4 εβδομάδων. Δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην έκφραση των γονιδίων της γαλεκτίνης-3 (1 ± 0.4 n=4 έναντι 0.73 ± 0.28 n=4, $p=0.61$), της ιντερλευκίνης 1β (0.51 ± 0.16 n=6 έναντι 1 ± 0.55 n=7) και του ανταγωνιστή του υποδοχέα της ιντερλευκίνης 1 (0.86 ± 0.47 n=6 έναντι 1 ± 0.39 n=7) μεταξύ των *des*^{-/-} (n=4 ή 7) και *des*^{-/-}*vim*^{-/-} (n= 4 ή 6).

Αυξημένος κυτταρικός πολλαπλασιασμός στο *des*^{-/-}*vim*^{-/-} μυοκάρδιο 4 εβδομάδων

Δεδομένου ότι δεν υπήρχαν διαφορές στην έκφραση των γονιδίων φλεγμονής που εξετάστηκαν αλλά η φλεγμονή ήταν αυξημένη στις καρδιές *des*^{-/-}*vim*^{-/-}, εξετάστηκε η πιθανότητα να οφείλεται αυτό σε πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Πράγματι, ο δείκτης πολλαπλασιασμού Ki67 παρουσίασε αύξηση 5-φορές σε επίπεδο έκφρασης στις *des*^{-/-}*vim*^{-/-} καρδιές σε σχέση με τις *des*^{-/-} (Σχήμα 26).

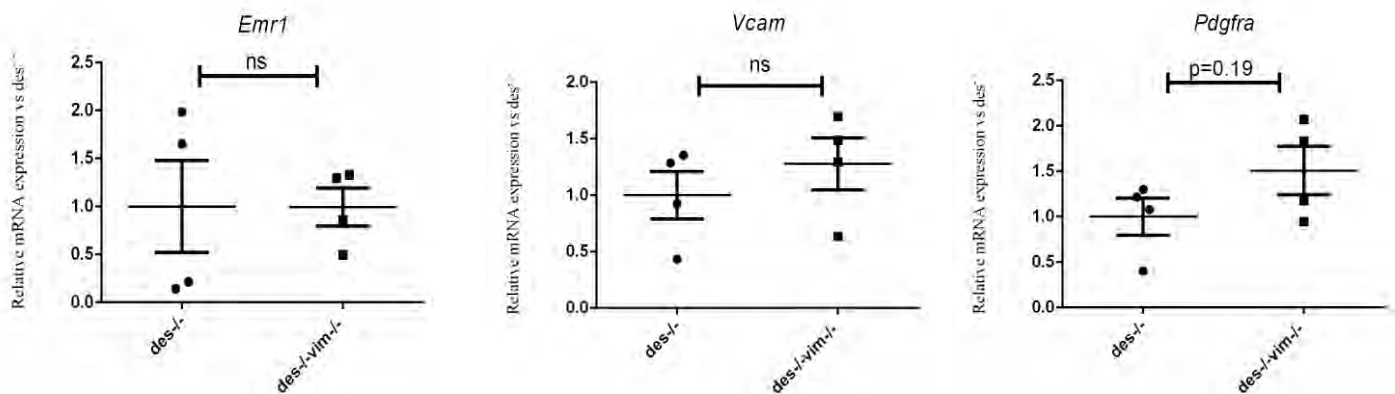


Σχήμα 26 Αξιολόγηση του πολλαπλασιασμού στα *des*^{-/-}*vim*^{-/-} και *des*^{-/-} 4 εβδομάδων. Ο δείκτης πολλαπλασιασμού αυξάνεται στα *des*^{-/-}*vim*^{-/-} (n=4) 5 φορές σε σχέση με τα *des*^{-/-} (n=4), αλλά η μέτρηση αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική (5.31 ± 2.32 n=6 έναντι 1 ± 0.33 n=7, $p=0.1$)

3.5.4. Αναγνώριση κυτταρικών μεταβολών στο μυοκάρδιο των *des*^{-/-}*vim*^{-/-}

Με βάση την αυξορρύθμιση του δείκτη πολλαπλασιασμού των κυττάρων Ki67, αναζητήσαμε τους κυτταρικούς πληθυσμούς που μπορεί να πολλαπλασιάζονται. Οι κυριότεροι κυτταρικοί τύποι που γνωρίζουμε ότι πολλαπλασιάζονται στην καρδιά κατά τις φάσεις της φλεγμονής μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου στα ποντίκια είναι κατά σειράν τα ενδοθηλιακά κύτταρα, οι ινοβλάστες και τα μακροφάγα¹⁴⁸. Έτσι, πραγματοποιήσαμε ανάλυση με real-time PCR για τα γονίδια *Emr1*(F4/80), αντιπροσωπευτικό των μακροφάγων που αποτελούν την πλειονότητα των φλεγμονωδών κυττάρων στο *des*^{-/-}, *Vcam*, αντιπροσωπευτικό των ενδοθηλιακών κυττάρων και *Pdgfra*, αντιπροσωπευτικό των καρδιακών ινοβλαστών. Αν και δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά

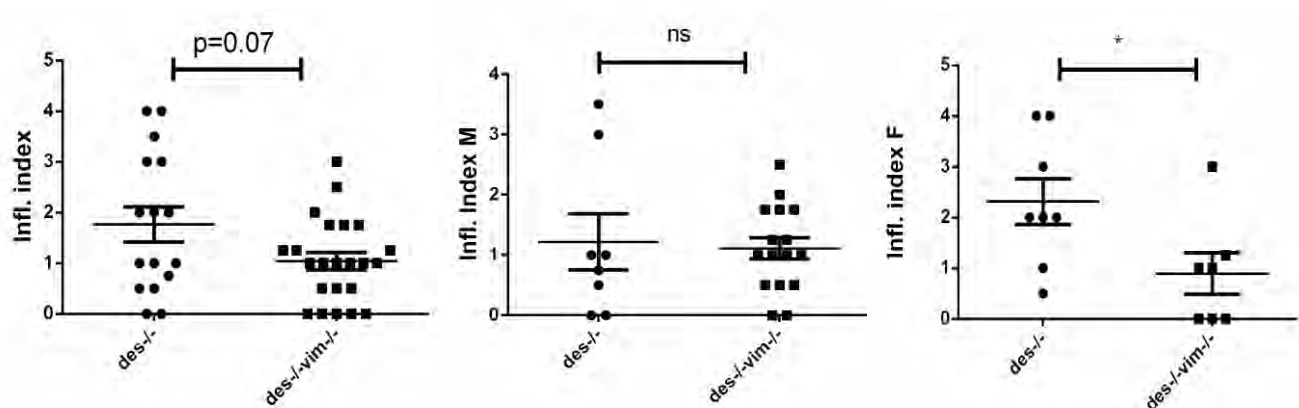
σημαντικές διαφορές, η αύξηση του PDGFRα κατά 1.5-φορά στο *des^{-/-}vim^{-/-}* μυοκάρδιο σε σχέση με το *des^{-/-}* δεν μπορεί να θεωρηθεί αμελητέα, υποδεικνύοντας ότι τα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα απουσία βιμεντίνης είναι μάλλον ινοβλάστες. Στην ανάλυση δεν συμπεριλήφθηκε δείκτης των καρδιομυοκυττάρων, καθώς γνωρίζουμε ότι δεν πολλαπλασιάζονται^{149–151}.



Σχήμα 27 Αξιολόγηση των κυτταρικών πληθυσμών που μπορεί να πολλαπλασιάζονται στα *des^{-/-}vim^{-/-}* και *des^{-/-}* 4 εβδομάδων. Οι δείκτες μακροφάγων *Emr1* και ο δείκτης ενδοθηλιακών κυττάρων *Vcam* δεν εμφανίζουν διαφορές μεταξύ των *des^{-/-}* (n=4) και *des^{-/-}vim^{-/-}* (n=4), ενώ ο δείκτης καρδιακών ινοβλαστών *Pdgfra* αυξάνεται 1.5 φορές (1.5 ± 0.26) n=4 έναντι 1.0 ± 0.2 n=4, p=0.198)

3.5.5. Η φλεγμονή μειώνεται στις *des^{-/-}vim^{-/-}* καρδιές 4 μηνών

Με βάση την αυξημένη καρδιακή φλεγμονή στις ποντίκια 4 εβδομάδων και την παρατηρούμενη αυξημένη πολλαπλασιαστική δραστηριότητα, πιθανόν από τους ινοβλάστες, διερευνήσαμε την πορεία της καρδιακής φλεγμονής απουσία βιμεντίνης σε μεταγενέστερο



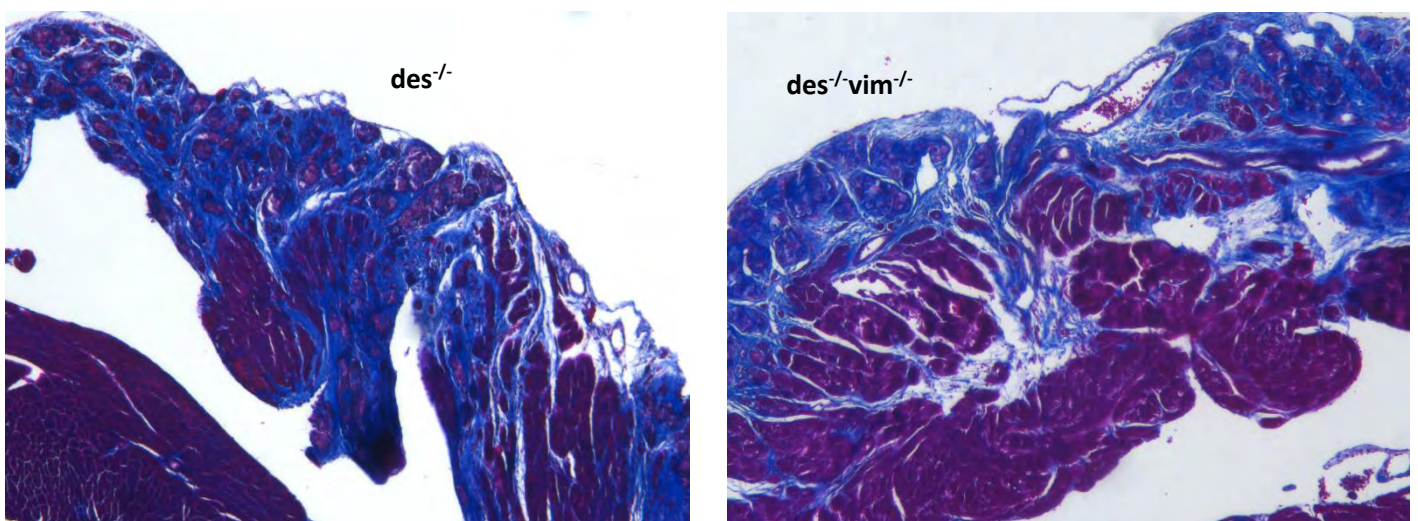
χρονικό σημείο, οπότε και παρατηρείται η σταδιακή της αποδρομή και η εγκαθίδρυση της χρόνιας

φάσης της⁴⁷. Σε αντίθεση με την αυξημένη φλεγμονή που παρατηρείται στις καρδιές $des^{-/-}vim^{-/-}$ 4 εβδομάδων, σε ζώα ηλικίας 4 μηνών η φλεγμονή παρουσιάζει τάση μείωσης φθάνοντας σε επίπεδα 0.6 φορές σε σχέση με αυτά των $des^{-/-}$. Στα αρσενικά δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές, ενώ στα θηλυκά $des^{-/-}vim^{-/-}$ υπάρχει μείωση των επιπέδων της φλεγμονής στο 0.4 αυτών του $des^{-/-}$ (0.89 ± 0.4 $n=7$ έναντι 2.31 ± 0.45 $n=8$, $p=0.03$).

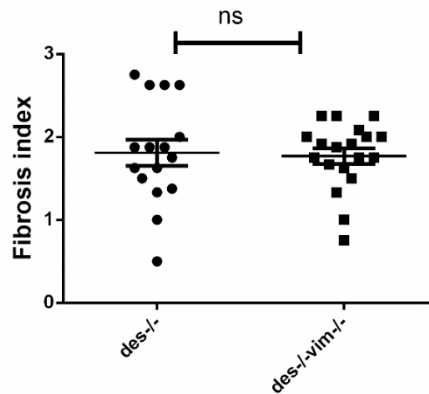
Σχήμα 28 Αξιολόγηση της φλεγμονής της καρδιάς των $des^{-/-}$ και $des^{-/-}vim^{-/-}$ 4 μηνών. Τάση για λιγότερη φλεγμονή εμφανίζουν τα $des^{-/-}vim^{-/-}$ ($n=23$) κατά 40% συγκριτικά με τα $des^{-/-}$ (1.04 ± 0.17 $n=23$ έναντι 1.76 ± 0.34 $n=16$, $p=0.073$). Τα αρσενικά δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην φλεγμονή ($p=0.9112$), ενώ τα θηλυκά $des^{-/-}vim^{-/-}$ ($n=7$) έχουν λιγότερη φλεγμονή κατά 61,3% σε σχέση με τα $des^{-/-}$ ($n=8$) θηλυκά. $p=0.03$

3.5.6. Δεν υπάρχει διαφορά στην ίνωση στις $des^{-/-}$ και $des^{-/-}vim^{-/-}$ καρδιές 4 μηνών

Με βάση τις παραπάνω παρατηρήσεις σχετικά με την φλεγμονή στις 4 εβδομάδες και τους 4 μήνες, καθώς και τα καρδιολογικά αποτελέσματα, προχωρήσαμε σε χρώση κατά Masson, ώστε να εξετάσουμε τις ενδεχόμενες διαφορές στην εναπόθεση κολλαγόνου στο μυοκάρδιο των $des^{-/-}$ και $des^{-/-}vim^{-/-}$ 4 μηνών. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην ίνωση των $des^{-/-}$ και $des^{-/-}vim^{-/-}$, υποδεινύοντας ότι η αυξημένη φλεγμονή στις 4 εβδομάδες δεν μεταφράσθηκε σε αυξημένη ίνωση κατά την πορεία της νόσου (Σχήμα 28,29).



Σχήμα 29 Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες του μυοκαρδίου, ύστερα από χρώση Masson.



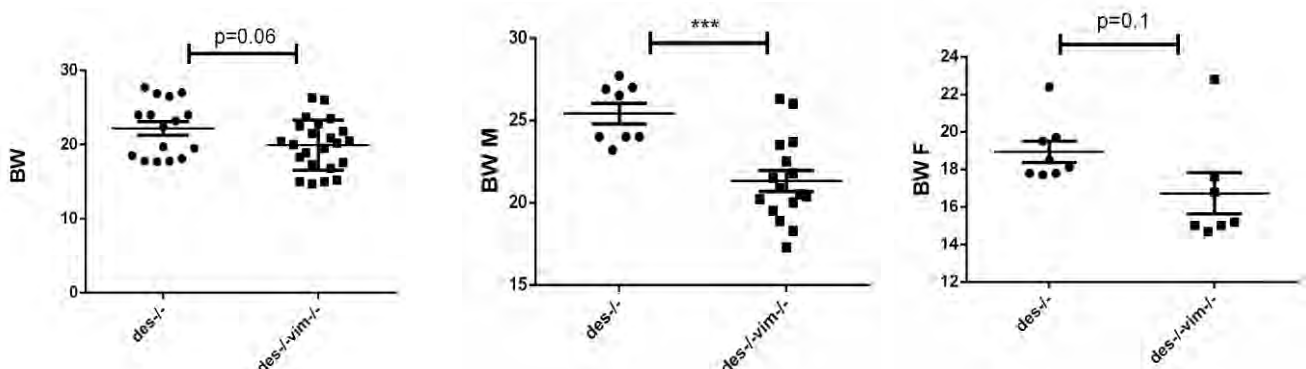
Σχήμα 30 Αξιολόγηση της ίνωσης. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην εναπόθεση κολλαγόνου, που αξιολογήθηκε με χρώση Masson μεταξύ του $des^{-/-}$ και $des^{-/-}vim^{-/-}$ (1.810 ± 0.1565 $N=16$ έναντι 1.772 ± 0.09259 $N=19$, $p=0.83$).

3.5.7. Αξιολόγηση μορφομετρικών παραμέτρων στους 4 μήνες

Παράλληλα με τις μοριακές και υπερηχογραφικές αναλύσεις, ενδιαφέροντα στοιχεία για την παθοφυσιολογία του νέου στελέχους $des^{-/-}vim^{-/-}$ προέκυψαν και από την ανάλυση μορφομετρικών παραμέτρων των ποντικών, που είχε σαν πρωταρχικό στόχο την εκτίμηση της υπετροφίας της καρδιάς, αλλά και του πνεύμονα, που παρατηρούνται στην ηλικία των 4 μηνών στα ποντίκια $des^{-/-}$ ^{49,55,57,60}

3.5.7.1. Μείωση του βάρους των $des^{-/-}vim^{-/-}$ σε σχέση με τα $des^{-/-}$

Το βάρος του σώματος εμφάνισε τάση μείωσης κατά 10% σε ποντίκια $des^{-/-}vim^{-/-}$ σε σύγκριση με τα $des^{-/-}$ (19.93 ± 0.7 $n=23$ έναντι 22.18 ± 0.93 $n=16$, $p=0.06$). Η ανάλυση έγινε και φυλετικά και παρουσιάζεται μείωση κατά 16% στα αρσενικά $des^{-/-}vim^{-/-}$ σε σχέση με τα αρσενικά $des^{-/-}$ (21.33 ± 0.63 $n=16$ έναντι 25.41 ± 0.62 $n=8$, $p=0.0002$) και μείωση κατά 11,6% στα θηλυκά $des^{-/-}vim^{-/-}$ σε σχέση με τα θηλυκά $des^{-/-}$ (16.73 ± 1.09 $N=n=7$ έναντι 18.94 ± 0.56 $n=8$, $p=0.1$). Η

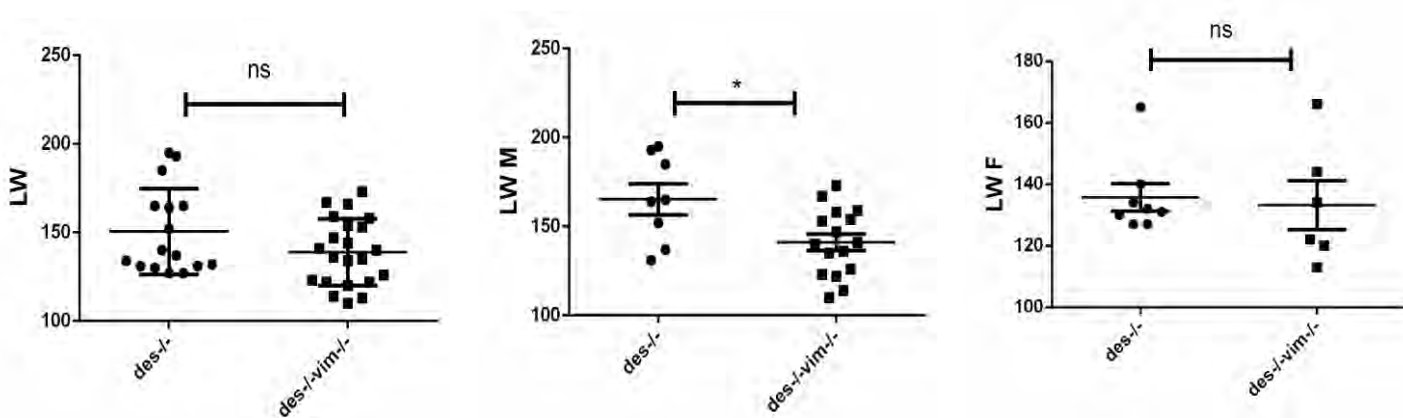


τελευταία όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική.

Σχήμα 31 Αξιολόγηση του βάρους σώματος των *des*^{-/-} και *des*^{-/-}*vim*^{-/-} 4 μηνών. Τάση μείωσης του βάρους του σώματος παρουσιάζουν τα *des*^{-/-}*vim*^{-/-} (n=23) σε σχέση με τα *des*^{-/-} (n=16) $p=0.0638$. Το βάρος σώματος των αρσενικών *des*^{-/-}*vim*^{-/-} (n=16) μειώνεται κατά 16% σε σχέση με τα αρσενικά *des*^{-/-} (n=8), ενώ στα θηλυκά *des*^{-/-}*vim*^{-/-} (n=7) η μείωση κατά 11,6% δεν είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με τα *des*^{-/-} (n=8)

3.5.7.2. Τα αρσενικά *des*^{-/-}*vim*^{-/-} έχουν μειωμένο βάρος πνεύμονα σε σχέση με τα αρσενικά *des*^{-/-}

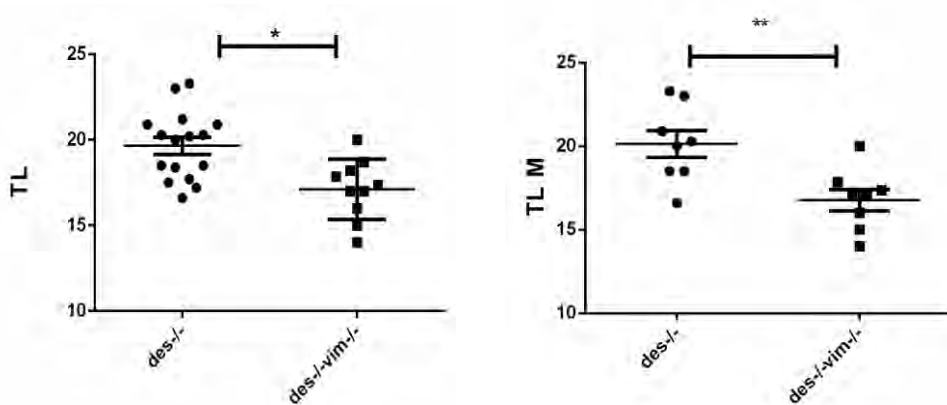
Στο σύνολο των ζώων, το βάρος του πνεύμονα των *des*^{-/-}*vim*^{-/-} δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με τα *des*^{-/-} (139 ± 4.02 n=22 έναντι 150.5 ± 6.04 n=16, $p=0.12$). Στα αρσενικά *des*^{-/-}*vim*^{-/-} όμως παρουσιάστηκε μείωση του βάρους του πνεύμονα κατά 14.5% σε σχέση με τα αρσενικά *des*^{-/-} (141.1 ± 4.71 n=16 έναντι 165.3 ± 8.65 n=8, $p=0.032$). Αντιθέτως, στα θηλυκά δεν εμφανίζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p=0.79$).



Σχήμα 32 Αξιολόγηση του βάρους του πνεύμονα των *des*^{-/-} και *des*^{-/-}*vim*^{-/-} 4 μηνών. Δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στο βάρος του πνεύμονα μεταξύ των *des*^{-/-} (n=16) και *des*^{-/-}*vim*^{-/-} (n=22) καθώς και των θηλυκών. $p=0.123$. Το βάρος του πνεύμονα των αρσενικών *des*^{-/-}*vim*^{-/-} (n=16) μειώνεται κατά 14,5% σε σχέση με τα αρσενικά *des*^{-/-} (n=8).

3.5.7.3. Το μήκος της κνήμης μειώνεται στα *des*^{-/-}*vim*^{-/-} σε σχέση με τα *des*^{-/-}

Μια άλλη σημαντική παράμετρος που δείχνει διαφορές στο μέγεθος των ζώων είναι το μήκος της κνήμης (tibial length), το οποίο είναι ενδεικτικό του μεγέθους του ζώου πέραν του βάρους του και θεωρείται ακριβέστερο όταν θέλουμε να υπολογίσουμε την σχετική μάζα των οργάνων⁶². Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση του μήκους της κνήμης των $des^{-/-}vim^{-/-}$ κατά 12.9% σε σχέση με τα $des^{-/-}$ (17.11 ± 0.55 n=10 έναντι 19.66 ± 0.49 , n=16, $p=0.002$). Στατιστικά σημαντική ήταν και η διαφορά μεταξύ των αρσενικών $des^{-/-}$ και $des^{-/-}vim^{-/-}$ (20.14 ± 0.80 n=8 έναντι 16.78 ± 0.64 n=8, $p=0.006$), με μείωση που ανέρχεται στο 16.6%. Δεν πραγματοποιήθηκε ικανός αριθμός μετρήσεων στα θηλυκά και δεν έγινε σύγκριση σε αυτό το φύλο.

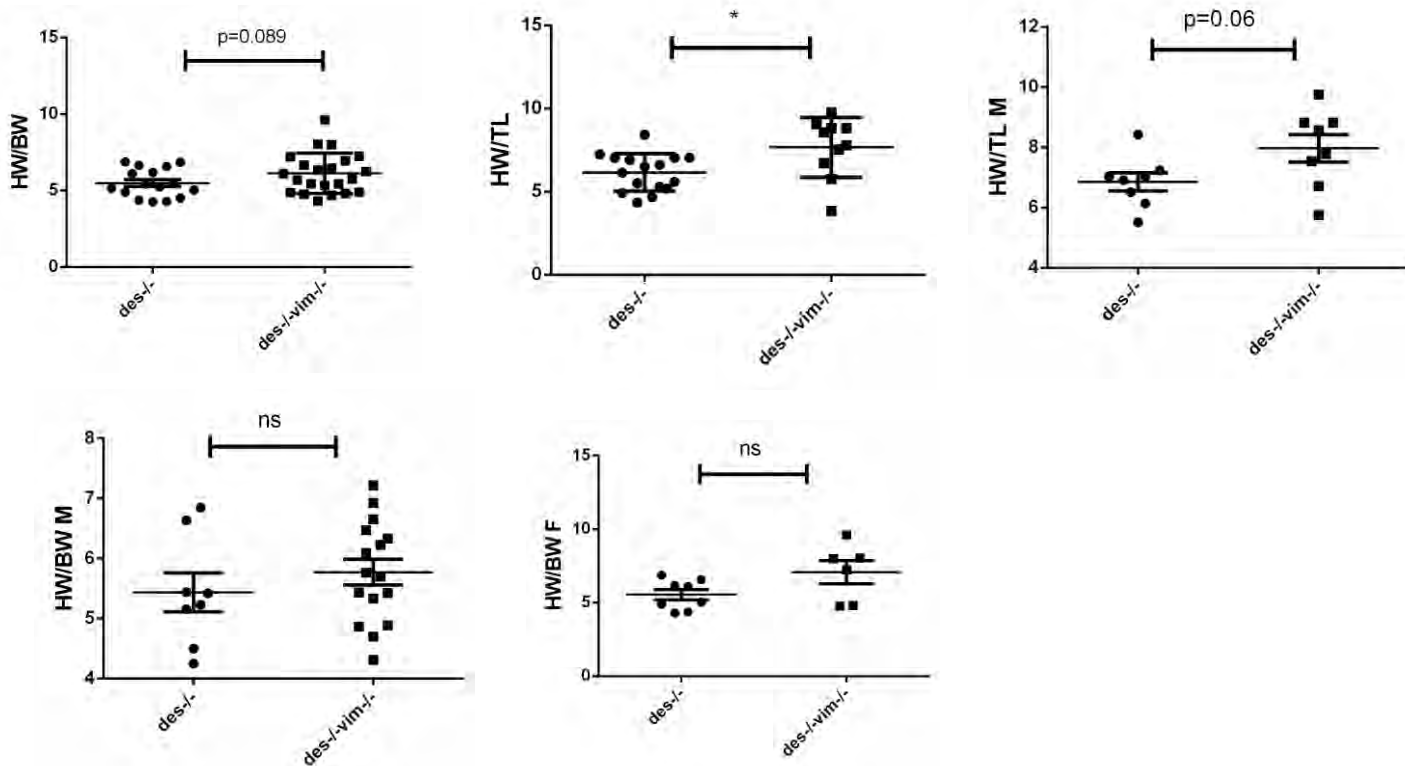


Σχήμα 33 Αξιολόγηση του μήκους της κνήμης (tibial length) των $des^{-/-}$ και $des^{-/-}vim^{-/-}$ 4 μηνών. Το μήκος της κνήμης των $des^{-/-}vim^{-/-}$ (n=10) μειώνεται κατά 12.9% σε σχέση με τα $des^{-/-}$ (n=16) $p=0.002$. Στα αρσενικά $des^{-/-}vim^{-/-}$ (n=8) η μείωση ανέρχεται στο 16.6% σε σχέση με τα $des^{-/-}$ (n=8). $p=0.006$

3.5.7.4. Η απουσία της βιμεντίνης δεν βελτιώνει την υπερτροφική καρδιά του desmin-null ποντικού

Σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου⁵⁷ παρατηρήθηκε υπερτροφία της καρδιάς σε ποντίκια $des^{-/-}$ 4 μηνών σε συμφωνία και με παλαιότερες μελέτες του εργαστηρίου Καπετανάκη, όπως αυτή των Milner et al⁴⁵ που έδειξαν ότι ο λόγος βάρους καρδιάς/βάρος σώματος αυξάνεται κατά 20% στα $des^{-/-}$ ποντίκια ήδη από τον ένα μήνα ζωής. Τάση για υπερτροφία της καρδιάς κατά 11.7% παρουσιάζουν τα $des^{-/-}vim^{-/-}$ 4 μηνών σε σχέση με τα $des^{-/-}$ (6.12 ± 0.28 n=22 έναντι 5.48 ± 0.23 n=16, $p=0.089$) που έχουν ήδη υπερτροφική καρδιά. Δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε αρσενικά και θηλυκά. Η τάση αυτή επιβεβαιώνεται και από την μέτρηση του λόγου βάρους καρδιάς/μήκος κνήμης, καθώς τα $des^{-/-}vim^{-/-}$ παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική υπερτροφία της καρδιάς κατά 24.6% σε σχέση με τα $des^{-/-}$ (7.66 ± 0.56 n=10 έναντι 6.15 ± 0.28 n=16, $p=0.032$). Τάση για αύξηση του λόγου βάρους καρδιάς/μήκος κνήμης

εμφανίζουν τα αρσενικά $des^{-/-}vim^{-/-}$ σε σχέση με τα $des^{-/-}$ (7.96 ± 0.45 $n=8$ έναντι 6.85 ± 0.3 $n=8$, $p=0.06$). Στα θηλυκά δεν υπάρχει και πάλι ικανός αριθμός μετρήσεων για ανεξάρτητη ανάλυση.

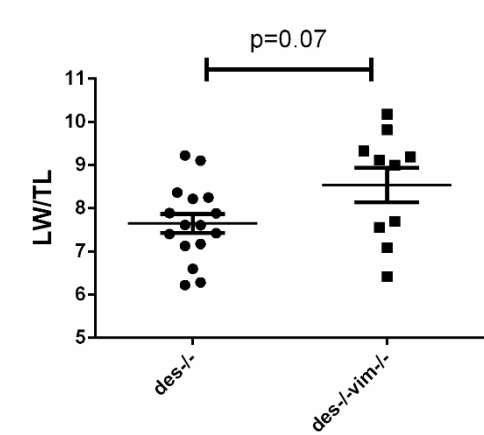


Σχήμα 34 Αξιολόγηση της υπερτροφίας της καρδιάς των $des^{-/-}$ και $des^{-/-}vim^{-/-}$ 4 μηνών. Τάση για υπερτροφία της καρδιάς κατά 11.7% παρουσιάζουν τα $des^{-/-}vim^{-/-}$ ($n=22$) σύμφωνα με την αύξηση του λόγου βάρους καρδιάς/βάρους σώματος συγκριτικά με τα $des^{-/-}$ ($n=16$). $p=0.089$. Δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε αρσενικά και θηλυκά. Τα $des^{-/-}vim^{-/-}$ ($n=10$) 4 μηνών έχουν υπερτροφική καρδιά σε σχέση με τα $des^{-/-}$ ($n=16$), σύμφωνα με την αύξηση του λόγου βάρους καρδιάς/μήκος κνήμης κατά 24.6%. $p=0.032$. Ο λόγος αυτός παρουσιάζει τάση αύξησης στα αρσενικά $des^{-/-}vim^{-/-}$ ($n=8$) σε σχέση με τα $des^{-/-}$ ($n=8$) $p=0.06$

3.5.7.5. Τάση υπερτροφίας του πνεύμονα στα $des^{-/-}vim^{-/-}$ 4 μηνών

Σε προηγούμενες μελέτες⁵⁷ αξιολογήθηκε και ο πνεύμονας των $des^{-/-}$ ποντικών, ο οποίος ήταν επίσης υπερτροφικός σε ζώα ηλικίας 4 μηνών σε σχέση με τα αγρίου τύπου. Έτσι υπολογίστηκε και το βάρος του πνεύμονα ως προς το μήκος της κνήμης στην παρούσα εργασία και παρουσιάστηκε μια τάση αύξησης 11.5% στα $des^{-/-}vim^{-/-}$ σε σχέση με τα $des^{-/-}$ (8.54 ± 0.39 $n=10$ έναντι 7.65 ± 0.21 $n=16$, $p=0.07$), υποδεικνύοντας ότι απουσία βιμεντίνης εκτός από την

υπερτροφία και την παθοφυσιολογία της $des^{-/-}$ καρδιάς δεν βελτιώνεται ούτε η παθοφυσιολογία του $des^{-/-}$ πνεύμονα.



Σχήμα 35 Αξιολόγηση της υπερτροφίας του πνεύμονα των $des^{-/-}$ και $des^{-/-}vim^{-/-}$ 4 μηνών. Η μέτρηση του λόγου βάρους πνεύμονα/ μήκος κνήμης δείχνει μια τάση για υπερτροφία κατά 11,5% στα $des^{-/-}vim^{-/-}$ (n=10) σε σχέση με τα $des^{-/-}$ (n=16), $p=0.07$.

4. Συζήτηση

Η καρδιακή ανεπάρκεια αποτελεί μια κατάσταση που πλήττει σημαντικό μέγεθος του πληθυσμού. Χαρακτηριστικά 1 στους 3 θανάτους στις ΗΠΑ οφείλονται σε καρδιαγγειακά νοσήματα²². Ανάμεσα στις διαφορετικές αιτιολογίες καρδιακής ανεπάρκειας, οι καρδιομυοπάθειες, προκαλούνται λόγω μεταλλάξεων σε δομικές ή λειτουργικές πρωτεΐνες των καρδιομυοκυττάρων, όπως της δεσμίνης, στην οποία η δημιουργία τοξικών συσσωματωμάτων δημιουργεί βλάβες στον ιστό^{16,19,152}. Η απαλοιφή του γονιδίου της δεσμίνης(απουσία συσσωματωμάτων) οδηγεί σε ανωμαλίες στην αρχιτεκτονική των μυών αναπτύσσοντας προοδευτικά διατακτική καρδιομυοπάθεια και καρδιακή ανεπάρκεια^{49,55}. Η μελέτη της ενεργοποίησης της εγγενούς ανοσίας στην καρδιακή ανεπάρκεια αποτελεί μια ελπιδοφόρα προσέγγιση, καθώς αναμένονται θετικά αποτελέσματα για την θεραπεία των ασθενών^{24,27}. Μια τέτοια προσέγγιση σχετίζεται το NLRP3 φλεγμονόσωμα, εξειδικευμένο στην στείρα φλεγμονώδη απόκριση, στην ανάπτυξη της καρδιομυοπάθειας του *des^{-/-}*, με σκοπό την πιθανή ανάδειξή του ως ρυθμιστή της φλεγμονής και δυσμενούς αναδόμησης του ιστού.

4.1. Ενεργοποίηση και σημασία του NLRP3 φλεγμονοσώματος στο *des^{-/-}* μοντέλο καρδιακής ανεπάρκειας

Σε προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου, ASC specks εντοπίστηκαν εντός των καρδιομυοκυττάρων, υποδεικνύοντας ότι το NLRP3 φλεγμονόσωμα μπορεί να δημιουργηθεί στα κύτταρα αυτά. Μια πιθανή αιτία της ενεργοποίησης στο *des^{-/-}* μυοκάρδιο θα μπορούσε να είναι οι βλάβες των των μιτοχονδρίων που παρουσιάζονται στα *des^{-/-}* καρδιομυοκύτταρα⁴⁵.

Στην παρούσα εργασία βρήκαμε ότι σε επίπεδο πρωτεΐνης, το ASC φαίνεται να αυξάνεται σε καρδιές *des^{-/-}* ποντικών με ιδιαίτερα εκτεταμένη φλεγμονή. Η συνολική αύξηση της πρωτεΐνης ASC στο *des^{-/-}* μυοκάρδιο, έστω και μη στατιστικά σημαντική στον μικρό αριθμό δειγμάτων που εξετάστηκαν (n=4), συμβαδίζει με την αύξηση σε επίπεδο RNA που είχε βρεθεί σε προηγούμενες μελέτες⁶¹. Γενικότερα, η αύξηση των επιπέδων ASC στον ιστό είναι χαρακτηριστική παθολογιών που περιλαμβάνουν ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος. Αυτό φαίνεται να ισχύει και για τον

καρδιακό ιστό, καθώς έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς με κοιλιακή μαρμαρυγή¹⁵³ καθώς και σε μοντέλο δομικής καρδιομυοπάθειας⁹⁷.

Παράλληλα με τον εντοπισμό των ASC specks στα καρδιομυοκύτταρα, είχε εντοπισθεί παλαιότερα και επαγωγή της έκφρασης μορίων του άξονα φλεγμονοσώματος-IL-1 (NLRP3, ASC, IL1b, Casp1) στην φάση της οξείας φλεγμονώδους απόκρισης. Για να ελεγχθεί η πιθανή συμμετοχή του φλεγμονοσώματος στην παθολογία του *des^{-/-}*, χορηγήθηκε ο αναστολέας MCC950. Οι VanHout et al έδειξαν ότι ο MCC950, μείωσε το μέγεθος του εμφράκτου και διατήρησε την καρδιακή λειτουργία σε μοντέλο εμφράγματος του μυοκαρδίου σε χοίρο¹⁵⁴. Πράγματι και στην προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου, η χορήγηση του MCC950 στα *des^{-/-}* ποντίκια παρουσίασε βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας. Με βάση τα παραπάνω, προχωρήσαμε σε γενετική απαλοιφή του NLRP3 από τα *des^{-/-}* ποντίκια, αναμένοντας βελτίωση του φαινοτύπου. Πράγματι, παρουσιάστηκε βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας, συνοδευόμενη από τάση μείωσης της ίνωσης. Σε μοριακή ανάλυση, η έκφραση της γαλεκτίνης-3, που φαίνεται να δρα ως μεσολαβητής της ίνωσης και της καρδιακής δυσλειτουργίας των *des^{-/-}* ποντικών^{56,58}, καθώς και των συννοσηροτήτων που εντοπίζονται σε πνεύμονες και νεφρά⁵⁹ παρουσίασε σημαντική μείωση στις καρδιές των *des^{-/-}NLRP3^{-/-}* ποντικών, επιβεβαιώνοντας τη βελτίωση της παθολογίας. Εφόσον πάντως αποτελεί ένα μόριο μεσολαβητή της καρδιακής ίνωσης, η μείωση των επιπέδων της υποδεικνύει και ένα πιθανό μηχανισμό της βελτίωσης του φαινοτύπου. Από την άλλη, παρ' ότι απουσιάζει το NLRP3, βασικό στοιχείο του φλεγμονοσώματος, δεν εμφανίστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην έκφραση άλλων γονιδίων του φλεγμονοσώματος που εξετάστηκαν, όπως είναι το ASC και ο ανταγωνιστής του υποδοχέα της IL1, αν και ο τελευταίος μειώθηκε περίπου 10 φορές στο *des^{-/-}NLRP3^{-/-}*. Τα σταθερά επίπεδα του ASC θα μπορούσαν να σημαίνουν ότι το NLRP3 δεν επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης αυτού του συστατικού του φλεγμονοσώματος, αλλά μόνο την ενεργοποίηση του σχηματισμού του πρωτεϊνικού συμπλόκου. Η προστατευτική δράση της απαλοιφής του NLRP3 έχει περιγραφεί και σε άλλες μελέτες. Σίγηση του γονιδίου *Nlrp3* με siRNA ή απαλοιφή του γονιδίου αυτού στα ποντίκια που υπόκεινται σε ισχαιμία-επαναπρόσληψη (reperfusion) οδηγεί σε μικρότερο μέγεθος εμφράκτου (infarct size) και βελτιωμένη καρδιακή λειτουργία από τα αγρίου τύπου ποντίκια^{92,95,156}. Το NLRP3 φλεγμονόσωμα συμμετέχει, επίσης, στην ανάπτυξη της διαβητικής μυοκαρδιοπάθειας και η σίγηση του *Nlrp3* έχει προστατευτικό ρόλο στην ανάπτυξη της πάθησης⁹⁸.

Αν και διαφάνηκε βελτίωση της παθολογίας του $des^{-/-}$ όταν απαλείφεται το NLRP3, πιθανώς λόγω της μείωσης της φλεγμονώδους απόκρισης, περισσότερα πειράματα που θα αναδείκνυαν και άλλες μεταβολές και θα υποδείκνυαν με περισσότερη ακρίβεια τους πιθανούς μηχανισμούς δεν πραγματοποιήθηκαν λόγω πρόσκαιρης μείωσης της αναπαραγωγής των ζώων.

4.2. Η φλεγμονή διαδίδεται από τα καρδιομυοκύτταρα στους καρδιακούς ινοβλάστες

Σε μια προσπάθεια κατανόησης των ενδεχόμενων μηχανισμών επαγωγής και διάδοσης της φλεγμονής στο $des^{-/-}$ μυοκάρδιο, εξετάστηκε αν τα καρδιομυοκύτταρα μπορούν να μετάγουν την φλεγμονή που σχετίζεται με το NLRP3 φλεγμονόσωμα στους ινοβλάστες. Έτσι, πραγματοποιήθηκε απομόνωση wt και $des^{-/-}$ καρδιομυοκυττάρων, και το υπερκείμενο, το οποίο περιέχει τα εκκρινόμενα συστατικά (π.χ. IL-1β), προστέθηκε σε καλλιέργεια ινοβλαστών wt ή $des^{-/-}$. Σε ορισμένες περιπτώσεις τα καρδιομυοκύτταρα διεγέρθηκαν και με LPS-nigericin, ώστε να ενεργοποιηθεί ο σχηματισμός του NLRP3 φλεγμονοσώματος. Πράγματι, φλεγμονή εξαρτώμενη από το φλεγμονόσωμα (εκφραζόμενη ως αύξηση της έκφρασης της IL-6) παρατηρήθηκε σε ενήλικους wt και $des^{-/-}$ ινοβλάστες που εκτέθηκαν σε διεγερμένα $des^{-/-}$ καρδιομυοκύτταρα, ενώ απουσία διέγερσης παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης της κυτταροκίνης. Επιπλέον, διεγερμένα καρδιομυοκύτταρα από $des^{-/-}$ μυοκάρδιο φαίνεται να επάγουν περισσότερο την έκφραση IL6 στους ενήλικους φυσιολογικούς ινοβλάστες από ότι αγρίου τύπου καρδιομυοκύτταρα. Από την άλλη, στους ινοβλάστες που προέρχονται από περιβάλλον φλεγμονής ($des^{-/-}$) και άρα έχουν ήδη υποστεί τη διέγερση των καρδιομυοκυττάρων σε αυτό καθαυτό το περιβάλλον στο οποίο παρατηρείται σχηματισμός φλεγμονοσώματος παρατηρείται περαιτέρω αύξηση της έκφρασης της IL-6 όταν τα $des^{-/-}$ καρδιομυοκύτταρα έχουν διεγερθεί και *in vitro* υποδεικνύοντας ότι τα καρδιομυοκύτταρα είναι ικανά να μετάγουν την σχετιζόμενη με το φλεγμονόσωμα φλεγμονή στους καρδιακούς ινοβλάστες. Από την άλλη, απουσία διέγερσης, τα αγρίου τύπου καρδιομυοκύτταρα επάγουν περισσότερη φλεγμονή στους $des^{-/-}$ ινοβλάστες απ' ό,τι τα $des^{-/-}$. Ωστόσο, αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι τα κύτταρα έχουν ήδη εκτεθεί σε περιβάλλον φλεγμονής, πιθανώς φτάνοντας σε κορεσμό και ενεργοποιούν διαφορετικά μονοπάτια. Περαιτέρω πειράματα με την αποτίμηση έκφρασης και άλλων γονιδίων του άξονα φλεγμονοσώματος-IL1, αλλά κυρίως με την ανίχνευση σχηματισμού φλεγμονοσώματος (ASC

specks, έκκριση IL-1β) στους ινοβλάστες χρειάζονται για να επιβεβαιώσουν τις παραπάνω ενδείξεις.

Σε αντίθεση με τους ενήλικους $des^{-/-}$ ινοβλάστες, οι νεογνικοί παρουσιάζουν φλεγμονώδη φαινότυπο όταν εκτεθούν σε αδιέγερτα $des^{-/-}$ καρδιομυοκύτταρα αλλά όχι σε αγρίου τύπου. Το αποτέλεσμα αυτό ενισχύει περισσότερο την υπόθεση διάδοσης της φλεγμονής από τα καρδιομυοκύτταρα στους ινοβλάστες, καθώς στην περίπτωση αυτή δεν ήταν απαραίτητη η διέγερση των καρδιομυοκυττάρων. Η παρατηρούμενη διαφορά στην απόκριση νεογνικών και ενήλικων ινοβλάστων πιθανώς οφείλεται στο γεγονός ότι οι νεογνικοί δεν έχουν έρθει σε επαφή με το περιβάλλον φλεγμονής του $des^{-/-}$. Παρ' ότι οι νεογνικοί wt και $des^{-/-}$ ινοβλάστες είναι θεωρητικά πανομοιότυποι, καθώς δεν εκφράζουν δεσμίνη και δεν έχουν εκτεθεί σε φλεγμονώδες περιβάλλον, παρατηρήθηκαν διαφορετικές αποκρίσεις. Οι αγρίου τύπου ινοβλάστες φαίνεται να ενεργοποιούνται μόνο από διεγερμένα για φλεγμονόσωμα αγρίου τύπου καρδιομυοκύτταρα, πιθανώς λόγω αναγνώρισης των σημάτων κινδύνου που προέρχονται από το ίδιο περιβάλλον.

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι στα πρώιμα στάδια της ζωής του $des^{-/-}$ ποντικού, καρδιομυοκύτταρα από το αυτό το περιβάλλον είναι ικανά να εκκινήσουν την φλεγμονή στους ινοβλάστες, ενώ στο ενήλικο ζώο η περαιτέρω διέγερση είναι απαραίτητη για την επαγωγή ισχυρών φλεγμονωδών αποκρίσεων.

Σε συμφωνία με την υπόθεση που διατυπώθηκε για το $des^{-/-}$ μυοκάρδιο, πρόσφατα, οι Chen et al¹⁵⁷ υπέδειξαν ότι ένας πιθανός μηχανισμός δράσης του NLRP3 φλεγμονοσώματος στην καρδιά σε μοντέλο οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου, είναι η ενεργοποίηση του στα καρδιομυοκύτταρα¹⁵³ και η διάδοση των βιολογικών του δράσεων αυτοκρινώς, αλλά και παρακρινώς στους καρδιακούς ινοβλάστες, οι οποίοι ενεργοποιούνται και δημιουργούν συμπλέγματα NLRP3 φλεγμονοσώματος, παράγοντας IL1β και πολλαπλασιάζοντας τελικά την φλεγμονή.

Με βάση τα αποτελέσματα που υποδεικνύουν μετάδοση του φλεγμονοσώματος από τα καρδιομυοκύτταρα στους καρδιακούς ινοβλάστες και την ύπαρξη ASC specks σε καρδιομυοκύτταρα(δες παραπάνω), αναζητήσαμε τα συσσωματώματα αυτά, ενδεικτικά της ενεργοποίησης του φλεγμονοσώματος, εκτός από την ήδη γνωστή παρουσία τους στα $des^{-/-}$ καρδιομυοκύτταρα, στους καρδιακούς ινοβλάστες. Πράγματι, ASC speck συνεντοπίστηκαν με

ινοβλάστες στο $des^{-/-}$ μυοκάρδιο, . Αντίστοιχα, σε μελέτες ισχαιμικής βλάβης του μυοκαρδίου, το NLRP3 φλεγμονόσωμα έχει βρεθεί ενεργό στους καρδιακούς ινοβλάστες⁹². Έτσι, επάγει τον φλεγμονώδη φαινότυπο των ινοβλαστών και ενισχύει την αρχική ανοσιακή απόκριση. Επίσης, έχει αναφερθεί η συμμετοχή του στην καρδιακή αναδόμηση μέσω της επαγωγής ινωτικών γονιδίων που οδηγεί τελικά σε διαφοροποίηση των ινοβλαστών προς μυοϊνοβλάστες¹⁵⁸. Συνεπώς οι ινοβλάστες στο $des^{-/-}$ μυοκάρδιο μπορούν να συνεισφέρουν στη δυσμενή αναδόμηση και μέσω σχηματισμού φλεγμονοσώματος, υπό την επίδραση των $des^{-/-}$ καρδιομυοκυττάρων.

Σημειωτέον, ότι παρά τις μελέτες που υποδεικνύουν ότι το NLRP3 φλεγμονόσωμα ενεργοποιείται και στα ενδοθηλιακά κύτταρα⁷, δεν καταφέραμε να εντοπίσουμε ASC speck στα CD31+ ενδοθηλιακά κύτταρα της καρδιάς που δημιουργούν τα αγγεία αν και αυτά είναι πολυπληθή και απαρτίζουν το 40-50% των κυττάρων του μυοκαρδίου¹⁴⁷.

Στην μελέτη αυτή εντοπίσαμε ενεργή συμμετοχή του NLRP3 φλεγμονοσώματος στην παθολογία του $des^{-/-}$ μοντέλου. Μια πιθανή αιτία για την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος στα καρδιομυοκύτταρα είναι οι ανωμαλίες των μιτοχονδρίων, οι οποίες δημιουργούν οξειδωτική βλάβη στα κύτταρα. Σε μελέτη βρέθηκε ότι οι μιτοχονδριακές αντιδραστικές ρίζες οξυγόνου είναι απαραίτητες για την δέσμευση του NLRP3 και της κασπάσης-1 στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, μέσω σύνδεσης με την καρδιολιπίνη¹⁵⁹. Παράλληλα, γνωρίζουμε ότι το οξειδωτικό στρες είναι υπεύθυνο για την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος σε μακροφάγα, οδηγώντας σε αορτικό ανεύρυσμα που επάγεται από την αγγειοτενσίνη-II⁹⁹. Ωστόσο, η υπόθεση ενεργοποίησης του φλεγμονοσώματος από κατεστραμμένα μιτοχόνδρια δεν επιβεβαιώνεται πάντα. Σε μια άλλη μελέτη, για παράδειγμα, βρέθηκε ότι η ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος ευθύνεται για την μιτοχονδριακή βλάβη, και όχι το ανάποδο¹⁶⁰. Άλλοι μηχανισμοί που πιθανώς σχετίζονται με την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος στα καρδιομυοκύτταρα του $des^{-/-}$ είναι το οξειδωμένο μιτοχονδριακό DNA που απελευθερώνεται λόγω θανάτου των κυττάρων και απελευθέρωσης του περιεχομένου των μιτοχονδρίων, το οποίο αναγνωρίζεται ως σήμα κινδύνου από το NLRP3 φλεγμονόσωμα, ενώ απουσία οξείδωσης αναγνωρίζεται από το AIM2 φλεγμονόσωμα⁸². Επιπλέον, η απελευθέρωση ATP από τα νεκρωτικά κύτταρα είναι σημαντικός μεσολαβητής της ενεργοποίησης του φλεγμονοσώματος σε πολλά μοντέλα ιστικής προσβολής, όπως για παράδειγμα στην νεφρική βλάβη¹⁰¹. Η λεπτομερής διερεύνηση των μηχανισμών που οδηγούν στην ενεργοποίηση του NLRP3 φλεγμονοσώματος, στο $des^{-/-}$ θα βοηθήσει στην κατανόηση των βασικών

μηχανισμών και θα επιτρέψει να βρεθούν μόρια ρυθμιστές που η στοχοποίησή τους θα βελτιώσει την παθοφυσιολογία στο μοντέλο αυτό.

4.3. Μελέτη της συνεισφοράς της βιμεντίνης στην φλεγμονή του *des*^{-/-}

Η βιμεντίνη εκφράζεται από κύτταρα μεσεγχυματικής προέλευσης και παρουσιάζει υψηλό βαθμό συντήρησης μεταξύ των ειδών^{33,161}, υποδεικνύοντας σημαντικές για την εξελικτική πορεία λειτουργίες. Μέχρι πρόσφατα, δεν ανιχνευόταν σημαντικός παθολογικός φαινότυπος σε ποντίκια απουσία βιμεντίνης¹³⁸. Ωστόσο, σε μελέτες δημιουργίας πληγής φαίνεται πως οι *vim*^{-/-} ινοβλάστες αδυνατούν να επουλώσουν την πληγή λόγω αδυναμίας κινητικότητας και μετανάστευσης^{162,163}. Επίσης, η απουσία της βιμεντίνης επηρεάζει την μετανάστευση των λευκοκυττάρων και την συνοχή του αγγειακού ενδοθηλίου¹³⁰, καθώς επίσης οδηγεί σε στένωση της καροτίδας και δυσλειτουργία του ενδοθηλίου¹⁶⁴, διαταραχή στην σηματοδότηση Notch¹⁶⁵ κ.α. Από την άλλη, σε πρόσφατη μελέτη, παρατηρήθηκε ότι η βιμεντίνη είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του NLRP3 φλεγμονοσώματος σε μοντέλο οξείας πνευμονικής βλάβης στον ιστό και σε μακροφάγα¹⁶⁶ και πιθανώς η αλληλεπίδρασή της με το NLRP3 συμβαίνει μέσω του ανασταλτικού παράγοντα μετανάστευσης των μακροφάγων (MIF)¹⁰⁵. Στο μοντέλο αυτό, η απαλοιφή της βιμεντίνης φαίνεται λοιπόν να καταστέλλει την φλεγμονή και την ίνωση.

Έτσι, προχωρήσαμε σε διασταύρωση *des*^{-/-} και *vim*^{-/-} ποντικών, ώστε να διαπιστωθεί αν η ενδεχόμενη μειορρύθμιση της ενεργοποίησης του NLRP3 φλεγμονοσώματος στους ινοβλάστες μπορεί να οδηγήσει σε βελτίωση της καρδιακής αναδόμησης συμπεριλαμβανόμενης της ίνωσης, καθώς και της λειτουργίας της καρδιάς.

4.3.1. Η απουσία της βιμεντίνης δεν βελτιώνει τον φαινότυπο των *des*^{-/-}

Ωστόσο, η απαλοιφή της βιμεντίνης από τα *des*^{-/-} ποντίκια (*des*^{-/-}*vim*^{-/-}) οδήγησε σε λεπτότερο τοίχωμα της αριστερής κοιλίας στους 4 μήνες στα θηλυκά, παράλληλα με μια μείωση στην ολική φλεγμονή της καρδιάς, η οποία, ωστόσο, είναι σε ύφεση στους 4 μήνες στο *des*^{-/-} ποντίκι. Η καρδιακή λειτουργία και η ίνωση του μυοκαρδίου δεν εμφανίζουν διαφορές, παρά τις μελέτες που υποδεικνύουν καθυστερημένη διαφοροποίηση των *vim*^{-/-} ινοβλαστών σε μυοινοβλάστες και ελαττωματική αναδόμηση της πληγής¹²⁹. Στις 4 εβδομάδες, υπάρχει περισσότερη φλεγμονή σε θηλυκά ζώα *des*^{-/-}*vim*^{-/-}, η οποία όμως δεν αντανακλάται στα επίπεδα έκφρασης της γαλεκτίνης-3 που παρέμειναν αμετάβλητα. Η γαλεκτίνη-3, ως χαρακτηριστικό μόριο φλεγμονής, ίνωσης και

δυσμενούς καρδιακής αναδόμησης του $des^{-/-}$, αναμέναμε να κυμαίνεται αναλογικά με την παρατηρούμενη φλεγμονή. Η διαφορά που παρατηρήθηκε πιθανώς οφείλεται σε διαφορετική σύσταση φλεγμονωδών κυττάρων στο μυοκάρδιο των $des^{-/-}vim^{-/-}$.

Μια εξήγηση για την αυξημένη φλεγμονή θα ήταν η μελέτη των Håversen et al στην οποία η απαλοιφή της βιμεντίνης αυξάνει τις ROS στα μακροφάγα¹⁶⁷, το οποίο θα μπορούσε, αντίθετα από την υπόθεση που έγινε (με βάση τη μελέτη των Dos Santos et al) να επάγει την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος, καθώς οι ROS αποτελούν σήμα ενεργοποίησης του¹⁶⁸. Παρόμοια, σε μοντέλο οξείας κολίτιδας, η απουσία της βιμεντίνης αυξάνει την θανάτωση βακτηρίων στα μακροφάγα, μέσω επαγωγής των ROS¹⁶⁹. Συνεπώς, απουσία βιμεντίνης θα αναμέναμε αύξηση των ROS και οξειδωτική βλάβη, η οποία πιθανώς ενεργοποιεί το NLRP3 φλεγμονόσωμα. Έτσι μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης μορίων του άξονα IL1-φλεγμονοσώματος, όπως IL1β και IL-1RA, τα οποία όμως παρέμειναν πρακτικά αμετάβλητα. Η μελέτη άλλων γονιδίων που σχετίζονται με το φλεγμονόσωμα, αλλά και η αποτίμηση σχηματισμού φλεγμονοσωμάτων με ανοσοϊστοχημεία στις $des^{-/-}vim^{-/-}$ καρδιές κρίνεται απαραίτητη για να ελεγχθεί η συμμετοχή του φλεγμονοσώματος στην φλεγμονή.

Ωστόσο, οι dos Santos et al δεν μελέτησαν άλλους κυτταρικούς πληθυσμούς πέραν των μακροφάγων. Η απουσία της βιμεντίνης από νεογνικούς ινοβλάστες οδηγεί σε οξειδωτική βλάβη προκαλούμενη από αυξημένη παραγωγή ROS¹⁷⁰. Με βάση το γεγονός ότι η φλεγμονή αυξήθηκε στις $des^{-/-}vim^{-/-}$ καρδιές και δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στην έκφραση των φλεγμονωδών μορίων που αναλύσαμε, ελέγξαμε την πολλαπλασιαστική δραστηριότητα των κυττάρων. Πράγματι, παρατηρήθηκε αύξηση της δραστηριότητας πολλαπλασιασμού στο $des^{-/-}vim^{-/-}$, πιθανώς οφειλόμενη στους καρδιακούς ινοβλάστες, οδηγώντας σε διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς να διηθούν το μυοκάρδιο των $des^{-/-}vim^{-/-}$. Παρά τις προηγούμενες μελέτες στις οποίες φαίνεται ότι η απουσία της βιμεντίνης σε μοντέλα ιστικής βλάβης (πχ πληγή) μπορεί να οδηγεί σε μειωμένη μετανάστευση αλλά και πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών, μειωμένη επαναεπιθηλιοποίηση και κερατινοποίηση, καθώς και ελαττωμένη συσσώρευση κολλαγόνου¹⁷¹, στην παρούσα μελέτη παρατηρήσαμε μικρή αύξηση του πολλαπλασιασμού των καρδιακών ινοβλαστών απουσία βιμεντίνης, οι οποίοι πιθανώς συνεισφέρουν στην φλεγμονώδη απόκριση. Ωστόσο, η αμετάβλητη εναπόθεση κολλαγόνου υποδεικνύει ότι κάποιοι καρδιακοί ινοβλάστες ακολουθούν τα μονοπάτια επιδιόρθωσης, αλλά πιθανώς λόγω της απουσίας της βιμεντίνης δεν

υπάρχει η δυνατότητα αυτή από όλους τους καρδιακούς ινοβλάστες, οδηγώντας τελικά στην δυσμενή αναδόμηση του ιστού.

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η βιμεντίνη φαίνεται να δρα διαφορετικά σε αρσενικά και θηλυκά, καθώς απουσία της παρατηρείται διαφορετικός φαινότυπος στα δύο φύλα. Στα αρσενικά *des^{-/-}vim^{-/-}* 4 μηνών παρατηρήθηκε αύξηση της υπερτροφίας της καρδιάς και του πνεύμονα, η οποία οφείλεται στην σημαντική μείωση του βάρους του σώματος και του μήκους της κνήμης, καθώς η καρδιά δεν παρουσίασε διαφορές, ενώ το βάρος του πνεύμονα ήταν σημαντικά μειωμένο. Παρ' ότι δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στην καρδιακή λειτουργία, την φλεγμονή και την ίνωση, οι μορφομετρικές παράμετροι υποδεικνύουν επιβαρυσμένη παθολογία σε σχέση με το *des^{-/-}* ποντίκι. Δεν είναι η πρώτη φορά που αναφέρονται διαφορές σε παθοφυσιολογία που σχετίζονται με το φύλο και ορμονικές διαφορές στα *vim^{-/-}* ποντίκια. Η βιμεντίνη αλληλεπιδρά με την ορμονο-εξαρτώμενη λιπάση, μεσολαβώντας την διαδικασία της λιπόλυσης και τον μεταβολισμό των λιπιδίων¹⁷². Επίσης, έχει δειχθεί ότι η απουσία της βιμεντίνης οδηγεί σε ελαττωματική συσσώρευση λίπους και μείωση του βάρους σώματος, καθώς και σε αυξημένη θνησιμότητα κατά 15% ειδικά στα αρσενικά¹⁷³. Η απουσία της βιμεντίνης οδηγεί σε αναποτελεσματική στεροειδογένεση στα επινεφρίδια και στις ωοθήκες, αλλά όχι στους όρχεις¹⁷⁴, πιθανώς λόγω αδυναμίας μεταφοράς της χοληστερόλης στα μιτοχόνδρια. Φαίνεται, λοιπόν, ότι η βιμεντίνη σχετίζεται με την παραγωγή ορμονών και δρα διαφορετικά σε αρσενικά και θηλυκά.

Η αρχική υπόθεση βασίσθηκε στο ότι η βιμεντίνη φαίνεται να αλληλεπιδρά με το φλεγμονόσωμα και ρυθμίζει την δράση του. Ωστόσο, αν αυτό ισχύει τελικά και στον καρδιακό ιστό και τους κυτταρικούς του πληθυσμούς, δεν μεταφράσθηκε επωφελώς στην περίπτωση του *des^{-/-}vim^{-/-}* καθώς παρατηρείται περισσότερη φλεγμονή στα θηλυκά. Επιπλέον, η υπερτροφική απόκριση στα αρσενικά, η οποία δεν είναι εύλογο να συνάδει με μειωμένη ενεργοποίηση του NLRP3 φλεγμονοσώματος, οφείλεται πιθανώς στην σημαντική μείωση του βάρους του σώματος, που αποτελεί βέβαια και στοιχείο παθολογίας. Από την άλλη, η φλεγμονή των θηλυκών κυρίως μπορεί να έχει διαφορετικά χαρακτηριστικά και σύσταση από αυτή του *des^{-/-}* που θα πρέπει να μελετηθούν. Η αυξημένη φλεγμονή πάντως υποδεικνύει ότι η ύπαρξη της βιμεντίνης μπορεί να είναι προστατευτική, δρώντας ως αναστολέας μιας ανεξέλεγκτης φλεγμονής. Πράγματι, η βιμεντίνη έχει βρεθεί να συμμετέχει στην προσκόλληση και μετανάστευση των λευκοκυττάρων¹³⁰ και η χορήγηση ανασυνδυασμένης ανθρώπινης βιμεντίνης σε μοντέλο οξείας πνευμονικής βλάβης

μειώνει την φλεγμονή μέσω αναστολής της διείσδυσης των ουδετερόφιλων στον πνεύμονα¹⁷⁵. Επίσης, σε μοντέλο βλάβης στον φακό μελετήθηκε η επίδραση της βιμεντίνης στα μεσεγχυματικά κύτταρα τα οποία οδηγούν την διαδικασία αναγέννησης, ύστερα από την πληγή. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η βιμεντίνη εξέρχεται του κυττάρου και προσκολλάται στα μεσεγχυματικά κύτταρα όπου μεσολαβεί την διαφοροποίηση προς μυοινοβλάστες όταν προϋπάρχει ένα ινωτικό μικροπεριβάλλον¹⁷⁶. Ακόμη, έκφραση της βιμεντίνης από τα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα μεσολαβεί την διαδικασία της επιδιόρθωσης της πληγής και της αναδόμησης του ιστού στην οξεία πνευμονική βλάβη¹⁷⁷.

Στο μοντέλο $des^{-/-}vim^{-/-}$ που παρουσιάζει ήπια αλλά υπαρκτή χειροτέρευση του φαινότυπου από το $des^{-/-}$, υπογραμμίζεται η σημασία της βιμεντίνης στην διατήρηση της ομοιόστασης και στην σωστή αναδόμηση του καρδιακού ιστού. Η χειροτέρευση του φαινοτύπου είναι πιθανό να οφείλεται σε αδυναμία των $vim^{-/-}$ ινοβλαστών να ακολουθήσουν επιτυχώς τα προγράμματα επιδιόρθωσης του καρδιακού ιστού καθώς και σε αυξημένη διήθηση του ιστού με ουδετερόφιλα και δυσλειτουργία του ενδοθηλίου στην διαδικασία επιδιόρθωσης της πληγής.

Η μελέτη των ποντικών στην ηλικία των 12 μηνών, όπου έχει ολοκληρωθεί η πρόοδος της μυοκαρδιοπάθειας και της καρδιακής ανεπάρκειας αναμένεται επομένως να προσδώσει σημαντικά και περισσότερο ολοκληρωμένα ευρήματα για την σημασία της βιμεντίνης στο $des^{-/-}$ μοντέλο.

Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια, αυξημένο ερευνητικό ενδιαφέρον έχει παρατηρηθεί στην μελέτη της εγγενούς ανοσίας και φλεγμονής στις καρδιαγγειακές παθήσεις, συμπεριλαμβανομένης της καρδιακής ανεπάρκειας, αποτελώντας μια υψηλά προσδοκόμενη προσέγγιση για την θεραπεία αυτών των ασθενών, καθώς μέχρι σήμερα αντιμετωπίζονται κυρίως τα συμπτώματα και όχι οι βασικές αιτίες.

Για να μελετήσουμε τις διεργασίες έναρξης και ρύθμισης της φλεγμονής και τη σημασία τους στην καρδιακή ανεπάρκεια χρησιμοποιήσαμε το ποντίκι με έλλειψη δεσμίνης ($des^{-/-}$) που αποτελεί ένα καλά μελετημένο γενετικό μοντέλο καρδιακής ανεπάρκειας και παρουσιάζει χαρακτηριστικά διατακτικής μυοκαρδιοπάθειας, με αυξημένη φλεγμονή και ίνωση, διεργασίες που οδηγούν στην δυσμενή αναδόμηση του ιστού. Σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου παρατηρήθηκε στις $des^{-/-}$ καρδιές ενεργοποίηση του μονοπατιού του NLRP3 φλεγμονοσώματος, ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλέγματος που απαντάται σε στείρα φλεγμονώδη απόκριση οδηγώντας σε παραγωγή της φλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-1 β . Φαρμακολογική αναστολή του φλεγμονοσώματος ή απαλοιφή του γονιδίου του NLRP3 έδειξε να προστατεύει το $des^{-/-}$, βελτιώνοντας την καρδιακή λειτουργία και ίνωση. Μοριακή ανάλυση του ποντικού $des^{-/-}$ NLRP3 $^{-/-}$ αποκάλυψε μειορρυθμία της γαλεκτίνης-3, μόριου μεσολαβητή της δυσμενούς καρδιακής αναδόμησης και δυσλειτουργίας του $des^{-/-}$, με παράλληλη μείωση της έκφρασης του ρυθμιστή του φλεγμονοσώματος, IL-1RA (φυσικού αναστολέα της IL-1 β), ενώ τα επίπεδα του ASC(προσαρμογέα του φλεγμονοσώματος) παρέμειναν αμετάβλητα. Σε αναζήτηση μηχανισμών διάδοσης της φλεγμονής, βρέθηκε ότι τα $des^{-/-}$ καρδιομυοκύτταρα, που ανοσοϊστοχημικά εμφανίζουν ενδείξεις σχηματισμού ASC φλεγμονοσώματος *in vivo* (ASC specks), μπορούν να μεταγάγουν, τουλάχιστον *in vitro*, φλεγμονή που σχετίζεται με το φλεγμονόσωμα σε ινοβλάστες που προέρχονται από $des^{-/-}$ καρδιές. Σε συμφωνία με αυτό το αποτέλεσμα, σχηματισμοί φλεγμονοσώματος εντοπίστηκαν *in vivo* εντός των καρδιακών ινοβλαστών στις καρδιές $des^{-/-}$, υποδεικνύοντας ότι το φλεγμονόσωμα πράγματι ενεργοποιείται σε αυτόν τον κυτταρικό πληθυσμό. Αντιθέτως, δεν παρατηρήθηκαν αντίστοιχοι σχηματισμοί στα ενδοθηλιακά κύτταρα του μυοκαρδίου υποδεικνύοντας ότι η ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος περιορίζεται στους ινοβλάστες, οι οποίοι μπορεί να διεγείρονται από τα καρδιομυοκύτταρα.

Ένα άλλο ενδιαμέσο ινίδιο που εκφράζεται στους ινοβλάστες και ρυθμίζει τη συμπεριφορά τους, η βιμεντίνη, πιθανώς ρυθμίζει το φλεγμονόσωμα, καθώς απουσία αυτής έχει αναφερθεί ότι αναστέλλεται ο σχηματισμός του. Γι αυτό το λόγο δημιουργήθηκαν ποντίκια με διπλή απαλοιφή δεσμίνης και βιμεντίνης ($des^{-/-}vim^{-/-}$) αναμένοντας να παρουσιάσουν βελτίωση του φαινοτύπου. Αντίθετα, η παθολογία χειροτέρευσε, με λέπτυνση του τοιχώματος της αριστερής κοιλίας στα θηλυκά, και αυξημένη φλεγμονή σε σχέση με το $des^{-/-}$. Μοριακή ανάλυση της φλεγμονής δεν έδωσε σημαντικά ευρήματα αναφορικά με την γαλεκτίνη-3 και γονίδια του άξονα φλεγμονόσωμα-IL1β. Παρατηρήθηκε, όμως, αύξηση της πολλαπλασιαστικής δραστηριότητας, πιθανώς οφειλόμενη στους καρδιακούς ινοβλάστες, αλλάζοντας την σύσταση των κυττάρων που διηθούν το μυοκάρδιο. Στα θηλυκά 4 μηνών η φλεγμονή συγκρατείται, ενώ η ίνωση παραμένει πρακτικά αμετάβλητη. Από την άλλη, τα αρσενικά έχουν υπερτροφική καρδιά και πνεύμονα, οφειλόμενη στην μείωση του βάρους του σώματός τους. Αν και είναι προφανές ότι η παρουσία της βιμεντίνης είναι απαραίτητη για τη συγκράτηση της παθοφυσιολογίας στο $des^{-/-}$ η ανάλυση σε μεταγενέστερο στάδιο που η καρδιακή ανεπάρκεια εκτυλίσσεται πλήρως (ηλικία 12 μηνών) θα αποκαλύψει περισσότερα σχετικά με την συνεισφορά της βιμεντίνης στο $des^{-/-}$ μοντέλο.

Φαίνεται, λοιπόν, ότι το NLRP3 είναι ενεργό και συμμετέχει στην έναρξη της φλεγμονής και την παθοφυσιολογία του $des^{-/-}$. Περαιτέρω μελέτες για την εύρεση των επακριβών μηχανισμών είναι απαραίτητες, αν και πιθανώς υπάρχουν περισσότερα μονοπάτια που εμπλέκονται στην φλεγμονή του $des^{-/-}$ ποντικού. Παράλληλα, η έλλειψη της βιμεντίνης μπορεί να μην απέδωσε τα αναμενόμενα προστατευτικά αποτελέσματα έναντι της $des^{-/-}$ φλεγμονής, αλλά η σημασία της βιμεντίνης για την συγκράτηση της δυσμενούς αναδόμησης του ιστού, καθώς και οι παρατηρούμενες διαφορές που εξαρτώνται από το φύλο είναι σημαντικές και χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης.

Abstract

During the past years, there has been growing research interest in the study of innate immunity and inflammation in cardiovascular diseases, including heart failure, constituting a highly anticipated approach for the treatment of these patients, as, up to date, treatments mainly address the symptoms rather than the underlying cause. In order to study the mechanisms of initiation and regulation of inflammation and their importance in heart failure, we used the desmin deficient ($des^{-/-}$) mouse, which is a well-studied genetic model of heart failure exhibiting features of dilated cardiomyopathy (DCM) with increased inflammation and fibrosis, processes that contribute to adverse tissue remodeling. Previous studies in the $des^{-/-}$ heart show possible formation of NLRP3 inflammasome, a multiprotein complex that triggers the activation of inflammatory cytokines, such as IL-1 β , to propagate innate immune defenses. Pharmacological inhibition of inflammasome or deletion of the NLRP3 gene seemed to protect $des^{-/-}$, by improving cardiac function and fibrosis. Molecular analysis of the $des^{-/-}$ NLRP3 $^{-/-}$ heart in comparison to $des^{-/-}$ revealed downregulation of galectin-3, mediator of adverse remodeling and cardiac dysfunction of $des^{-/-}$, and decrease of the inflammasome regulator, IL-1Ra (natural inhibitor of IL-1 β), while ASC RNA levels (adaptor of inflammasome) remained unchanged. Moreover, studies of the potential mechanisms of inflammation spread, showed that $des^{-/-}$ cardiomyocytes, which exhibit *in vivo* evidence of inflammasome formation (ASC specks) by immunohistochemistry, can transmit, at least *in vitro*, inflammation associated with inflammasome in $des^{-/-}$ cardiac fibroblasts. Consistent with this, inflammasome formation was detected *in vivo* within cardiac fibroblasts in $des^{-/-}$ hearts, indicating that inflammasome is indeed activated in this cell population. On the contrary, such formation was not observed in endothelial cells of the myocardium, suggesting that activation of inflammasome is limited to fibroblasts, which may be stimulated by cardiomyocytes.

Another intermediate filament expressed mainly by fibroblasts that regulates their behaviour, vimentin, possibly regulates inflammasome, since deletion of vimentin is reported to inhibit its formation. For this reason, double knockout mice for desmin and vimentin ($des^{-/-}$ vim $^{-/-}$) were generated, expecting to show an improvement in phenotype. In contrast, pathology worsened, with thinning of the left ventricular wall in females and increased inflammation in relation to $des^{-/-}$. Molecular analysis of inflammation did not yield significant findings regarding galectin-3 and genes of inflammasome-IL-1 β axis. However, an increase in proliferative activity,

possibly due to cardiac fibroblasts, was observed, seeming to alter the composition of the infiltrating cells in the myocardium. Inflammation was constricted in 4 month females, whereas fibrosis practically remained unchanged. On the other hand, males showed hypertrophic heart and lung, owing to a decrease in body weight. Although it is obvious that the presence of vimentin is necessary for the containment of the pathophysiology levels in $des^{-/-}$, a forthcoming analysis at the timepoint when heart failure is fully developed (12-months) should conclusively reveal the overall contribution of vimentin to the $des^{-/-}$ model.

Thus, it seems that NLRP3 is active and involved in the initiation of inflammation and the pathophysiology of $des^{-/-}$. Further studies are needed to reveal the exact mechanisms, although there are possibly more pathways involved in the inflammation of the $des^{-/-}$ mouse. At the same time, vimentin deficiency did not yield the expected protection against $des^{-/-}$ inflammatory response, but the importance of vimentin in the containment of adverse tissue remodeling, as well as the observed sex-dependent differences seem to be important and need further investigation.

Βιβλιογραφία

1. Seropian, I. M., Toldo, S., Van Tassell, B. W. & Abbate, A. Anti-inflammatory strategies for ventricular remodeling following St-segment elevation acute myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **63**, 1593–1603 (2014).
2. Gao, X. M., White, D. A., Dart, A. M. & Du, X. J. Post-infarct cardiac rupture: Recent insights on pathogenesis and therapeutic interventions. *Pharmacol. Ther.* **134**, 156–179 (2012).
3. Arslan, F., De Kleijn, D. P. & Pasterkamp, G. Innate immune signaling in cardiac ischemia. *Nat. Rev. Cardiol.* **8**, 292–300 (2011).
4. Christia, P. & Frangogiannis, N. G. Targeting inflammatory pathways in myocardial infarction. *Eur J Clin Invest* **9**, 986–995 (2013).
5. Frangogiannis, N. G. The Immune System and the Remodeling Infarcted Heart: Cell Biological Insights and Therapeutic Opportunities. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **63**, (2014).
6. Yan, X. *et al.* Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **62**, 24–35 (2013).
7. Mezzaroma, E. *et al.* The inflammasome promotes adverse cardiac remodeling following acute myocardial infarction in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 19725–19730 (2011).
8. Nahrendorf, M. & Swirski, F. K. Abandoning M1/M2 for a network model of macrophage function. *Circulation Research* **119**, 414–417 (2016).
9. Murray, P. J. *et al.* Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity* **41**, 14–20 (2014).
10. Hashimoto, H., Olson, E. N. & Bassel-Duby, R. Therapeutic approaches for cardiac regeneration and repair. *Nat. Rev. Cardiol.* **15**, 585–600 (2018).
11. Cahill, T. J., Choudhury, R. P. & Riley, P. R. Heart regeneration and repair after myocardial infarction: translational opportunities for novel therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 699–717 (2017).
12. Tanai, E. & Frantz, S. Pathophysiology of heart failure. *Compr. Physiol.* **6**, 187–214 (2016).
13. Moss, A. J. *et al.* Prophylactic implantation of a defibrillator in patients with myocardial infarction and reduced ejection fraction. *N. Engl. J. Med.* **346**, 877–83 (2002).
14. Tanai, E. & Frantz, S. Pathophysiology of heart failure. *Compr. Physiol.* **6**, 187–214 (2016).

15. Ziaeeian, B. & Fonarow, G. C. Epidemiology and aetiology of heart failure. *Nat. Rev. Cardiol.* **13**, 368–78 (2016).
16. Capetanaki, Y., Papathanasiou, S., Diokmetzidou, A., Vatsellas, G. & Tsikitis, M. Desmin related disease: A matter of cell survival failure. *Curr. Opin. Cell Biol.* **32**, 113–120 (2015).
17. Charles, J. Cardiomyopathy. *Cardiology* **43**, 2014 (2014).
18. McNally, E. M., Barefield, D. Y. & Puckelwartz, M. J. The genetic landscape of cardiomyopathy and its role in heart failure. *Cell Metab.* **21**, 174–182 (2015).
19. Dadson, K., Hauck, L. & Billia, F. Molecular mechanisms in cardiomyopathy. *Clin. Sci.* **131**, 1375–1392 (2017).
20. Velagaleti, R. S. *et al.* Long-term trends in the incidence of heart failure after myocardial infarction. *Circulation* **118**, 2057–2062 (2008).
21. Goldberg, R. J. & Spencer, F. A. A 25-year perspective into the changing landscape of patients hospitalized with acute myocardial infarction (the Worcester Heart Attack Study). *Am. J. Cardiol.* **94**, 1373–1378 (2004).
22. Emelia J. Benjamin , Paul Muntner , Alvaro Alonso , Marcio S. Bittencourt , Clifton W. Callaway , April P. Carson , Alanna M. Chamberlain , Alexander R. Chang , Susan Cheng , Sandeep R. Das , Francesca N. Delling , Luc Djousse , Mitchell S.V. Elkind , Jan, S. S. V. Heart disease and stroke statistics: 2019-an update, a report from the American Heart Association. *Circulation* **139**, (2019).
23. Aukrust, P., Gullestad, L., Ueland, T., Damås, J. K. & Yndestad, A. Inflammatory and anti-inflammatory cytokines in chronic heart failure: Potential therapeutic implications. *Annals of Medicine* **37**, 74–85 (2005).
24. Seta, Y., Shan, K., Bozkurt, B., Oral, H. & Mann, D. L. Basic mechanisms in heart failure: the cytokine hypothesis. *J. Card. Fail.* **2**, 243–9 (1996).
25. El-Menyar, A. A. Cytokines and myocardial dysfunction: state of the art. *J. Card. Fail.* **14**, 61–74 (2008).
26. Nahrendorf, M. Myeloid cell contributions to cardiovascular health and disease. *Nat. Med.* **24**, 711–720 (2018).
27. Ridker, P. M. *et al.* Antiinflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease. *N. Engl. J. Med.* **377**, 1119–1131 (2017).

28. Lazarides, E. Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature* **283**, 249–256 (1980).
29. Tsikitis, M., Galata, Z., Mavroidis, M., Psarras, S. & Capetanaki, Y. Intermediate filaments in cardiomyopathy. *Biophys. Rev.* **10**, 1007–1031 (2018).
30. Paulin, D. & Li, Z. Desmin: A major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. *Exp. Cell Res.* **301**, 1–7 (2004).
31. Capetanaki, Y. G., Ngai, J. & Lazarides, E. Characterization and regulation in the expression of a gene coding for the intermediate filament protein desmin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**, 6909–6913 (1984).
32. Schaart, G., Viebahn, C., Langmann, W. & Ramaekers, F. Desmin and titin expression in early postimplantation mouse embryos. *Development* **107**, 585–96 (1989).
33. Herrmann, H., Fouquet, B. & Franke, W. W. Expression of intermediate filament proteins during development of *Xenopus laevis*. II. Identification and molecular characterization of desmin. *Development* **105**, 299–307 (1989).
34. Granger, B. L. & Lazarides, E. The existence of an insoluble Z disc scaffold in chicken skeletal muscle. *Cell* **15**, 1253–1268 (1978).
35. Granger, B. L. & Lazarides, E. Desmin and vimentin coexist at the periphery of the myofibril Z disc. *Cell* **18**, 1053–1063 (1979).
36. Bennett, G. S., Fellini, S. A., Toyama, Y. & Holtzer, H. Redistribution of intermediate filament subunits during skeletal myogenesis and maturation in vitro. *J. Cell Biol.* **82**, (1979).
37. Richardson, F. L., Stromer, M. H., Huiatt, T. W. & Robson, R. M. Immunoelectron and immunofluorescence localization of desmin in mature avian muscles. *Eur. J. Cell Biol.* **26**, 91–101 (1981).
38. Georgatos, S. D. & Maison, C. Integration of intermediate filaments into cellular organelles. *Int. Rev. Cytol.* **164**, 91–138 (1996).
39. Munoz-Marmol, A. M. *et al.* A dysfunctional desmin mutation in a patient with severe generalized myopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 11312–11317 (2002).
40. Goldfarb, L. G. *et al.* Missense mutations in desmin associated with familial cardiac and skeletal myopathy. *Nat. Genet.* **19**, 402–3 (1998).
41. Li, D. *et al.* Desmin mutation responsible for idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* **100**, 461–

- 4 (1999).
42. Bermúdez-Jiménez, F. J. *et al.* Novel Desmin Mutation p.Glu401Asp Impairs Filament Formation, Disrupts Cell Membrane Integrity, and Causes Severe Arrhythmogenic Left Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia. *Circulation* **137**, 1595–1610 (2018).
 43. Van Spaendonck-Zwarts, K. Y. *et al.* Desmin-related myopathy. *Clin. Genet.* **80**, 354–366 (2011).
 44. Panagopoulou, P. *et al.* Desmin mediates TNF- α -induced aggregate formation and intercalated disk reorganization in heart failure. *J. Cell Biol.* **181**, 761–775 (2008).
 45. Milner, D. J., Weitzer, G., Tran, D., Bradley, A. & Capetanaki, Y. Disruption of muscle architecture and myocardial degeneration in mice lacking desmin. *J. Cell Biol.* **134**, 1255–1270 (1996).
 46. Li, Z. *et al.* Cardiovascular lesions and skeletal myopathy in mice lacking desmin. *Dev. Biol.* **175**, 362–366 (1996).
 47. Psarras, S. *et al.* Regulation of adverse remodelling by osteopontin in a genetic heart failure model. *Eur. Heart J.* **33**, 1954–1963 (2012).
 48. Thornell, L. E., Carlsson, L., Li, Z., Mericskay, M. & Paulin, D. Null mutation in the desmin gene gives rise to a cardiomyopathy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **29**, 2107–2124 (1997).
 49. Milner, D. J. *et al.* The Absence of Desmin Leads to Cardiomyocyte Hypertrophy and Cardiac Dilation with Compromised Systolic Function. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **31**, 2063–2076 (1999).
 50. Milner, D. J., Mavroidis, M., Weisleder, N. & Capetanaki, Y. Desmin cytoskeleton linked to muscle mitochondrial distribution and respiratory function. *J. Cell Biol.* **150**, 1283–1297 (2000).
 51. Diokmetzidou, A. *et al.* Desmin and α B-crystallin interplay in the maintenance of mitochondrial homeostasis and cardiomyocyte survival. *J. Cell Sci.* **129**, 3705–3720 (2016).
 52. Rapti, K. *et al.* Opposite effects of catalase and MnSOD ectopic expression on stress induced defects and mortality in the desmin deficient cardiomyopathy model. *Free Radic. Biol. Med.* **110**, 206–218 (2017).
 53. Weisleder, N., Taffet, G. E. & Capetanaki, Y. Bcl-2 overexpression corrects mitochondrial defects and ameliorates inherited desmin null cardiomyopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 769–774 (2004).
 54. Mavroidis, M. & Capetanaki, Y. Extensive induction of important mediators of fibrosis and dystrophic calcification in desmin-deficient cardiomyopathy. *Am. J. Pathol.* **160**, 943–952 (2002).
 55. Mavroidis, M. *et al.* Complement system modulation as a target for treatment of arrhythmogenic

- cardiomyopathy. *Basic Res. Cardiol.* **110**, 27 (2015).
56. Vlachou, F. *et al.* Galectin-3 affects fibroblast homeostasis mediating cardiac fibrosis and dysfunction in a genetic heart failure model. in
57. Vlachou, F. Study of the role of Galectin-3 and Mechanisms of Tissue Remodeling in Heart Failure.
58. Ntatsoulis, K. *et al.* Multiple levels of galectin-3 mediated regulation of organ remodelling and dysfunction in the desmin-deficient mouse model of heart failure. in (2019).
59. Ntatsoulis, K. *et al.* Co-morbidities in a genetic model of heart failure: Lung and kidney manifestations and the galectin-3 effect in the desmin-null mouse. (2018).
60. Ntatsoulis, K. Study of cardiac dysfunction and associated pathologies in the lung and other organs in an animal model of heart failure.
61. Dimopoulou, T., Capetanaki, Y. & Psarras, S. Activation of inflammasome and IL-1 pathways in a genetic heart failure mouse model. Abstract. *64th Congress of Hellenic Society of Biochemistry & Molecular Biology, 6-8 December, Athens, Greece* (2013).
62. Abbate, A. *et al.* Alterations in the interleukin-1/interleukin-1 receptor antagonist balance modulate cardiac remodeling following myocardial infarction in the mouse. *PLoS One* **6**, e27923 (2011).
63. Abbate, A., Van Tassell, B. W. & Biondi-Zoccai, G. G. L. Blocking interleukin-1 as a novel therapeutic strategy for secondary prevention of cardiovascular events. *BioDrugs* **26**, 217–233 (2012).
64. Bujak, M. *et al.* Interleukin-1 receptor type I signaling critically regulates infarct healing and cardiac remodeling. *Am. J. Pathol.* **173**, 57–67 (2008).
65. Saxena, A. *et al.* IL-1 Induces Proinflammatory Leukocyte Infiltration and Regulates Fibroblast Phenotype in the Infarcted Myocardium. *J. Immunol.* **191**, 4838–4848 (2013).
66. Martinon, F., Burns, K. & Tschopp, J. The Inflammasome: A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory {...}. *Mol. Cell* **10**, 417–426 (2002).
67. von Moltke, J., Ayres, J. S., Kofoed, E. M., Chavarría-Smith, J. & Vance, R. E. Recognition of bacteria by inflammasomes. *Annu. Rev. Immunol.* **31**, 73–106 (2013).
68. Broz, P. & Dixit, V. M. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 407–20 (2016).
69. Lamkanfi, M. & Dixit, V. M. Inflammasomes and Their Roles in Health and Disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **28**, 137–161 (2012).

70. Mariathasan, S. & Monack, D. M. Inflammasome adaptors and sensors: Intracellular regulators of infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 31–40 (2007).
71. Sutterwala, F. S., Haasken, S. & Cassel, S. L. Mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1319**, 82–95 (2014).
72. Salloum, F. *et al.* The Inflammasome in Myocardial Injury and Cardiac Remodeling. *Antioxid. Redox Signal.* **22**, 1146–1161 (2015).
73. Franchi, L., Eigenbrod, T., Munoz-Planillo, R. & Nunez, G. The Inflammasome: A Caspase-1 Activation Platform Regulating Immune Reponse and Disease Pathogenesis. *Nat. Immunol.* **10**, (2009).
74. Salloum, F. *et al.* The Inflammasome in Myocardial Injury and Cardiac Remodeling. *Antioxid. Redox Signal.* **22**, 1146–1161 (2014).
75. Toldo, S. & Abbate, A. The NLRP3 inflammasome in acute myocardial infarction. *Nat. Rev. Cardiol.* **15**, 203–214 (2018).
76. Liu, X. *et al.* Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature* **535**, 153–158 (2016).
77. Dinarello, C. A. Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 519–550 (2009).
78. Marchetti, C. *et al.* Independent roles of the priming and the triggering of the NLRP3 inflammasome in the heart. *Cardiovasc. Res.* **105**, 203–212 (2014).
79. Latz, E., Ts, X. & Stutz, A. Display Settings : Activation and regulation of the inflammasomes . *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 1–30 (2013).
80. Mariathasan, S. *et al.* Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* **440**, 228–232 (2006).
81. Zhou, R., Yazdi, A. S., Menu, P. & Tschopp, J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* **469**, 221–226 (2011).
82. Ramanujan, V. K. *et al.* Oxidized Mitochondrial DNA Activates the NLRP3 Inflammasome during Apoptosis. *Immunity* **36**, 401–414 (2012).
83. Eduardo P. Amaral, Nicolas Riteau, M. M. Lysosomal Cathepsin Release is Required for NLRP3 inflammasome activation by Mycobacterium tuberculosis in infected macrophages. *Front. Immunol.* **9**, (2018).

84. Muñoz-Planillo, R. *et al.* K⁺ Efflux Is the Common Trigger of NLRP3 Inflammasome Activation by Bacterial Toxins and Particulate Matter. *Immunity* **38**, 1142–1153 (2013).
85. Lei, Q., Yi, T. & Chen, C. NF-κB-Gasdermin D (GSDMD) Axis Couples Oxidative Stress and NACHT, LRR and PYD Domains-Containing Protein 3 (NLRP3) Inflammasome-Mediated Cardiomyocyte Pyroptosis Following Myocardial Infarction. *Med. Sci. Monit.* **24**, 6044–6052 (2018).
86. Bauernfeind, F. *et al.* NF-κB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J. Immunol.* **183**, 787–791 (2010).
87. Lei, Q., Yi, T. & Chen, C. NF-κB-Gasdermin D (GSDMD) Axis Couples Oxidative Stress and NACHT, LRR and PYD Domains-Containing Protein 3 (NLRP3) Inflammasome-Mediated Cardiomyocyte Pyroptosis Following Myocardial Infarction. *Med. Sci. Monit.* **24**, 6044–6052 (2018).
88. Ito, M. *et al.* Bruton's tyrosine kinase is essential for NLRP3 inflammasome activation and contributes to ischaemic brain injury. *Nat. Commun.* **6**, 1–11 (2015).
89. Yuan He, Melody Y. Zeng, Dahau Yang, Benny Motro, G. N. NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux. *Nature* **37**, 784–790 (2016).
90. Masumoto, J. *et al.* Expression of apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain, a pyrin N-terminal homology domain-containing protein, in normal human tissues. *J. Histochem. Cytochem.* **49**, 1269–75 (2001).
91. Hoffman, H. M., Mueller, J. L., Broide, D. H., Wanderer, A. A. & Kolodner, R. D. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. *Nat. Genet.* **29**, 301–305 (2001).
92. Usui, F. *et al.* Inflammasome Activation of Cardiac Fibroblasts Is Essential for Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Circulation* **123**, 594–604 (2011).
93. Mai, J. *et al.* Inflammasomes are Differentially Expressed in Cardiovascular and other Tissues. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **22**, 311–322 (2017).
94. Mezzaroma, E. *et al.* The inflammasome promotes adverse cardiac remodeling following acute myocardial infarction in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 19725–19730 (2011).
95. Bliksøen, M. *et al.* The NLRP3 inflammasome is up-regulated in cardiac fibroblasts and mediates myocardial ischaemia–reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* **99**, 164–174 (2013).
96. Mauro, A. G. *et al.* Reduction of Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury by Inhibiting Interleukin-1 Alpha. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **69**, (2017).

97. Bracey, N. A. *et al.* The Nlrp3 inflammasome promotes myocardial dysfunction in structural cardiomyopathy through interleukin-1 β . *Exp. Physiol.* **98**, 462–472 (2013).
98. Luo, B. *et al.* NLRP3 gene silencing ameliorates diabetic cardiomyopathy in a type 2 diabetes rat model. *PLoS One* **9**, e104771 (2014).
99. Usui, F. *et al.* Inflammasome activation by mitochondrial oxidative stress in macrophages leads to the development of angiotensin II-induced aortic aneurysm. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **35**, 127–136 (2015).
100. Rao, R. M., Yang, L., Garcia-Cardena, G. & Lusinskas, F. W. Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte recruitment to the vascular wall. *Circulation Research* (2007).
doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.151860b
101. Sutterwala, F. S. *et al.* Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 20388–20393 (2009).
102. Sandanger *et al.* NLRP3 inflammasome activation during myocardial ischemia reperfusion is cardioprotective. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **469**, (2016).
103. Van Tassell, B. W., Toldo, S., Mezzaroma, E. & Abbate, A. Targeting Interleukin-1 in Heart Disease. *Circulation* **128**, 1910–1923 (2013).
104. Netea, M. G. *et al.* Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1 β in monocytes and macrophages. *Blood* **113**, 2324–35 (2009).
105. Elgass, K. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor is required for NLRP3 inflammasome activation. *Nat. Commun.* **9**, (2018).
106. Dinarello, C. A. *et al.* Interleukin 1 induces interleukin 1. I. Induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro. *J. Immunol.* **139**, 1902–10 (1987).
107. Ma, X., Zheng, X., Pan, L. & Zhang, X. NLRP3 inflammasome activation in liver cirrhotic patients. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **505**, 40–44 (2018).
108. Liu, L. *et al.* The Pathogenic Role of NLRP3 Inflammasome Activation in Inflammatory Bowel Diseases of Both Mice and Humans. *J. Crohns. Colitis* **11**, 737–750 (2017).
109. Sayan, M. & Mossman, B. T. The NLRP3 inflammasome in pathogenic particle and fibre-associated lung inflammation and diseases. *Part. Fibre Toxicol.* **13**, 51 (2016).
110. Yerramothu, P., Vijay, A. K. & Willcox, M. D. P. Inflammasomes, the eye and anti-inflammasome

- therapy. *Eye (Lond)*. **32**, 491–505 (2018).
111. Valderrama, J. A. *et al.* Group A streptococcal M protein activates the NLRP3 inflammasome. *Nat. Microbiol.* **2**, 1425–1434 (2017).
112. Kim, S. R. *et al.* NLRP3 inflammasome activation by mitochondrial ROS in bronchial epithelial cells is required for allergic inflammation. *Cell Death Dis.* **5**, (2014).
113. Kanneganti, T.-D. *et al.* Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat. Immunol.* **11**, 401–414 (2006).
114. Coll, R. C. *et al.* A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nat. Med.* **21**, (2015).
115. Dos Santos, Gimena, Rogel, M. R. Vimentin regulates activation of the NLRP3 inflammasome. *Nat. Commun.* 1–10 (2015). doi:10.1109/EMBC.2016.7590696.Upper
116. Eriksson, J. E. *et al.* Introducing intermediate filaments: From discovery to disease. *Journal of Clinical Investigation* (2009). doi:10.1172/JCI38339
117. Ivaska, J., Pallari, H.-M., Nevo, J. & Eriksson, J. E. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. *Exp. Cell Res.* **313**, 2050–62 (2007).
118. Pallari, H.-M. & Eriksson, J. E. Intermediate filaments as signaling platforms. *Sci. STKE* **2006**, pe53 (2006).
119. Stevens, C. *et al.* The intermediate filament protein, vimentin, is a regulator of NOD2 activity. *Gut* **62**, 695–707 (2013).
120. Tsuruta, D. & Jones, J. C. R. The vimentin cytoskeleton regulates focal contact size and adhesion of endothelial cells subjected to shear stress. *J. Cell Sci.* **116**, 4977–84 (2003).
121. Mendez, M. G., Kojima, S.-I. & Goldman, R. D. Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB J.* (2010). doi:10.1096/fj.09-151639
122. Vuoriluoto, K. *et al.* Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer. *Oncogene* (2011). doi:10.1038/onc.2010.509
123. Dave, J. M. & Bayless, K. J. Vimentin as an integral regulator of cell adhesion and endothelial sprouting. *Microcirculation* (2014). doi:10.1111/micc.12111
124. Sejersen, T. & Lendahl, U. Transient expression of the intermediate filament nestin during skeletal

- muscle development. *J. Cell Sci.* **106 (Pt 4)**, 1291–300 (1993).
125. Kachinsky, A. M., Dominov, J. A. & Miller, J. B. Intermediate filaments in cardiac myogenesis: nestin in the developing mouse heart. *J. Histochem. Cytochem.* **43**, 843–7 (1995).
126. Olson, E. N. & Capetanaki, Y. G. Developmental regulation of intermediate filament and actin mRNAs during myogenesis is disrupted by oncogenic ras genes. *Oncogene* **4**, 907–13 (1989).
127. Tokuyasu, K. T., Maher, P. A. & Singer, S. J. Distributions of vimentin and desmin in developing chick myotubes in vivo. II. Immunoelectron microscopic study. *J. Cell Biol.* **100**, 1157–66 (1985).
128. von Gise, A. & Pu, W. T. Endocardial and epicardial epithelial to mesenchymal transitions in heart development and disease. *Circ. Res.* **110**, 1628–45 (2012).
129. Eckes, B. *et al.* Impaired wound healing in embryonic and adult mice lacking vimentin. *J. Cell Sci.* **113 (Pt 1)**, 2455–62 (2000).
130. Nieminen, M. *et al.* Vimentin function in lymphocyte adhesion and transcellular migration. *Nat. Cell Biol.* **8**, 156–62 (2006).
131. Mor-Vaknin, N., Punturieri, A., Sitwala, K. & Markovitz, D. M. Vimentin is secreted by activated macrophages. *Nat. Cell Biol.* **5**, 59–63 (2003).
132. Iwamoto, Y. *et al.* Cardiac macrophages promote diastolic dysfunction. *J. Exp. Med.* **215**, 423–440 (2018).
133. Benes, P. *et al.* Role of vimentin in regulation of monocyte/macrophage differentiation. *Differentiation.* **74**, 265–76 (2006).
134. Chernouvanenko, I. S., Matveeva, E. A., Gelfand, V. I., Goldman, R. D. & Minin, A. A. Mitochondrial membrane potential is regulated by vimentin intermediate filaments. *FASEB J.* **29**, 820–7 (2015).
135. Chernyatina, A. A., Nicolet, S., Aebi, U., Herrmann, H. & Strelkov, S. V. Atomic structure of the vimentin central α -helical domain and its implications for intermediate filament assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 13620–5 (2012).
136. Chernyatina, A. A., Guzenko, D. & Strelkov, S. V. Intermediate filament structure: The bottom-up approach. *Current Opinion in Cell Biology* **32**, 65–72 (2015).
137. Kovarova, M. *et al.* NLRP1-dependent pyroptosis leads to acute lung injury and morbidity in mice. *J. Immunol.* **189**, 2006–16 (2012).
138. Colucci-Guyon, E. *et al.* Mice lacking vimentin develop and reproduce without an obvious phenotype.

- Cell* (1994). doi:10.1016/0092-8674(94)90553-3
139. Yin, F. C., Spurgeon, H. A., Rakusan, K., Weisfeldt, M. L. & Lakatta, E. G. Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **243**, H941–H947 (2017).
140. Chen, Y. *et al.* Left ventricular failure produces profound lung remodeling and pulmonary hypertension in mice: heart failure causes severe lung disease. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)* **59**, 1170–8 (2012).
141. Andrea Stutz , Gabor L. Horvath , Brian G. Monks, and E. L. ASC speck formation as a readout of inflammasome activation. *Curr. Biol.* **15**, R581 (2005).
142. Diokmetzidou, A. *et al.* *Strategies to Study Desmin in Cardiac Muscle and Culture Systems. Methods in Enzymology* **568**, (Elsevier Inc., 2016).
143. Sundararaj, K. P. *et al.* Interleukin-6 released from fibroblasts is essential for up-regulation of matrix metalloproteinase-1 expression by U937 macrophages in coculture: Cross-talking between fibroblasts and U937 macrophages exposed to high glucose. *J. Biol. Chem.* **284**, 13714–13724 (2009).
144. Elias, J. A. & Lentz, V. IL-1 and tumor necrosis factor synergistically stimulate fibroblast IL-6 production and stabilize IL-6 messenger RNA. *J. Immunol.* **145**, 161–6 (1990).
145. Hidaka, E. *et al.* ASC, a Novel 22-kDa Protein, Aggregates during Apoptosis of Human Promyelocytic Leukemia HL-60 Cells. *J. Biol. Chem.* (2002). doi:10.1074/jbc.274.48.33835
146. Moore-Morris, T., Guimarães-Camboa, N., Yutzey, K. E., Pucéat, M. & Evans, S. M. Cardiac fibroblasts: from development to heart failure. *Journal of Molecular Medicine* (2015). doi:10.1007/s00109-015-1314-y
147. Pinto, A. R. *et al.* Revisiting Cardiac Cellular Composition Novelty and Significance. *Circ. Res.* (2016). doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.307778
148. Virag, J. I. & Murry, C. E. Myofibroblast and endothelial cell proliferation during murine myocardial infarct repair. *Am. J. Pathol.* **163**, 2433–40 (2003).
149. Bergmann, O. *et al.* Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science (80-)*. (2009). doi:10.1126/science.1164680
150. Bergmann, O. *et al.* Dynamics of Cell Generation and Turnover in the Human Heart. *Cell* (2015). doi:10.1016/j.cell.2015.05.026
151. Senyo, S. E. *et al.* Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature* **493**, 433–6

- (2013).
152. Ziaeian, B. & Fonarow, G. C. Epidemiology and aetiology of heart failure. *Nature Reviews Cardiology* **13**, 368–378 (2016).
153. Yao, C., Veleva, T. & Al, E. Enhanced Cardiomyocyte NLRP3 Inflammasome Signaling. *Circulation* (2018).
154. Van Hout, G. P. J. *et al.* The selective NLRP3-inflammasome inhibitor MCC950 reduces infarct size and preserves cardiac function in a pig model of myocardial infarction. *Eur. Heart J.* (2017). doi:10.1093/eurheartj/ehw247
155. Ching, K., Jeng, G., Frigeri, L. G. & Liu, F. Production By Human Monocytes. **42**, 113–116 (1994).
156. Liu, Y. *et al.* TXNIP mediates NLRP3 inflammasome activation in cardiac microvascular endothelial cells as a novel mechanism in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Basic Res. Cardiol.* (2014). doi:10.1007/s00395-014-0415-z
157. Chen, G., Chelu, M. G., Dobrev, D. & Li, N. Cardiomyocyte inflammasome signaling in cardiomyopathies and atrial fibrillation: Mechanisms and potential therapeutic implications. *Frontiers in Physiology* (2018). doi:10.3389/fphys.2018.01115
158. Arti, V. Shinde, Nikolaos, G. F. Fibroblasts in myocardial infarction: a reole in inflammation and repair. *J. Mol Cell Cardiol.* 74–82 (2014). doi:10.1016/j.yjmcc.2013.11.015.Fibroblasts
159. Iyer, S. S. *et al.* Cutting Edge: Mitochondrial Assembly of the NLRP3 Inflammasome Complex Is Initiated at Priming. *J. Immunol.* jj1701723 (2018). doi:10.4049/jimmunol.1701723
160. Yu, J. *et al.* Inflammasome activation leads to Caspase-1-dependent mitochondrial damage and block of mitophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 15514–9 (2014).
161. Schaffeld, M., Herrmann, H., Schultess, J. & Markl, J. Vimentin and desmin of a cartilaginous fish, the shark *Scyliorhinus stellaris*: Sequence, expression patterns and in vitro assembly. *Eur. J. Cell Biol.* (2001). doi:10.1078/0171-9335-00206
162. Eckes, B. *et al.* Impaired wound healing in embryonic and adult mice lacking vimentin. *J. Cell Sci.* **113**, 2455–2462 (2000).
163. Eckes, B. *et al.* Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts. *J. Cell Sci.* (1998).
164. Langlois, B. *et al.* Vimentin knockout results in increased expression of sub-endothelial basement

- membrane components and carotid stiffness in mice. *Sci. Rep.* **7**, 1–15 (2017).
165. Niemi, R. *et al.* Selective regulation of Notch ligands during angiogenesis is mediated by vimentin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, E4574–E4581 (2017).
166. Dos Santos, G. *et al.* Vimentin regulates activation of the NLRP3 inflammasome. *Nat. Commun.* **6**, 1–13 (2015).
167. Håversen, L. *et al.* Vimentin deficiency in macrophages induces increased oxidative stress and vascular inflammation but attenuates atherosclerosis in mice. *Sci. Rep.* **8**, 1–13 (2018).
168. Toldo, S. *et al.* Independent roles of the priming and the triggering of the NLRP3 inflammasome in the heart. *Cardiovasc. Res.* **105**, 203–212 (2015).
169. Mor-Vaknin, N. *et al.* Murine colitis is mediated by Vimentin. *Sci. Rep.* **3**, 1–8 (2013).
170. Tolstonog, G. V., Shoeman, R. L., Traub, U. & Traub, P. Role of the intermediate filament protein vimentin in delaying senescence and in the spontaneous immortalization of mouse embryo fibroblasts. *DNA Cell Biol.* **20**, 509–29 (2001).
171. Cheng, F. *et al.* Vimentin coordinates fibroblast proliferation and keratinocyte differentiation in wound healing via TGF- β -Slug signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, E4320–E4327 (2016).
172. Shen, W. J., Patel, S., Eriksson, J. E. & Kraemer, F. B. Vimentin is a functional partner of hormone sensitive lipase and facilitates lipolysis. *J. Proteome Res.* (2010). doi:10.1021/pr900909t
173. Wilhelmsson, U., Stillemark-Billton, P., Borén, J. & Pekny, M. Vimentin is required for normal accumulation of body fat. *Biol. Chem.* **0**, (2019).
174. Shen, W. J. *et al.* Ablation of vimentin results in defective steroidogenesis. *Endocrinology* **153**, 3249–3257 (2012).
175. Lam, F. W., Da, Q., Guillory, B. & Cruz, M. A. Recombinant Human Vimentin Binds to P-Selectin and Blocks Neutrophil Capture and Rolling on Platelets and Endothelium. *J. Immunol.* **200**, 1718–1726 (2018).
176. J. L. Walker, B.M. Bleaken, A. R Romisher, A. A. Alnwibit, A. S. M. In wound repair vimentin mediates the transition of mesenchymal leader cells to a myofibroblast phenotype. *Mol. Biol. Cell* **29**, 1555–1570 (2018).
177. Rogel, M. R. *et al.* Vimentin is sufficient and required for wound repair and remodeling in alveolar epithelial cells. *FASEB J.* (2011). doi:10.1096/fj.10-170795

