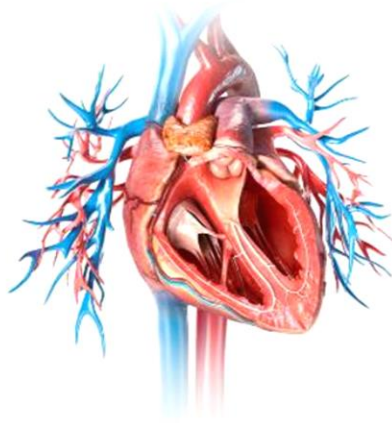


Διπλωματική εργασία

# **Μηχανισμοί επιδιόρθωσης και αναδιαμόρφωσης στην καρδιά**



**Παθιάκης Εμμανουήλ**

Σεπτέμβριος 2022



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΙΔΡΥΜΑ  
ΙΑΤΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ  
ΕΡΕΥΝΩΝ ΤΗΣ  
ΑΚΑΔΗΜΙΑΣ ΑΘΗΝΩΝΔιπλωματική εργασία**Μηχανισμοί επιδιόρθωσης και αναδιαμόρφωσης στην  
καρδιά**

---

**Τριμελής επιτροπή**

Επιστημονικός Υπεύθυνος:

Στέλιος Ψαρράς, PhD

Ειδικός Λειτουργικός Επιστήμονας Β', Κέντρο Βασικής Έρευνας,

Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών

Συνεπιβλέπουσα Καθηγήτρια:

Άννα-Μαρία Ψαρρά, PhD

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μέλος:

Δημήτρης Μπέης, PhD

Ερευνητής Β'

Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών

**Παθιάκης Εμμανουήλ**

Σεπτέμβριος 2022



UNIVERSITY OF THESSALY

FACULTY OF HEALTH SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY



ACADEMY



OF ATHENS

BIOMEDICAL  
RESEARCH  
FOUNDATION,  
ACADEMY OF ATHENS

Bachelor Thesis

## Cardiac repair and remodeling mechanisms

### Committee

Supervisor:

Stelios Psarras, PhD

Staff Research Scientist - Associate Professor Level,

Center of Basic Research Biomedical Research Foundation of Academy of Athens

Co-supervisor:

Anna-Maria Psarra, PhD

Associate Professor of Biochemistry,

Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly

Member:

Dimitris Beis, PhD

Investigator - Associate Professor Level

Center of Basic Research Biomedical Research Foundation of Academy of Athens

**Pathiakis Emmanouil**

September 2020

## Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, στο εργαστήριο Κυτταρικής Βιολογίας, το διάστημα από τον Σεπτέμβριο του 2021 έως τον Αύγουστο του 2022.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Στέλιο Ψαρρά, επιστημονικό υπεύθυνο μου όλο αυτό το διάστημα για την ευκαιρία που μου έδωσε, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθώς και για τις γνώσεις και τις εμπειρίες που μου προσέφερε. Ήταν εκεί ανελλιπώς να βοηθήσει σε οτιδήποτε χρειαζόμουν εντός και εκτός εργαστηρίου και για αυτό τον ευχαριστώ ιδιαίτερα. Ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω και στα υπόλοιπα μέλη της επιτροπής, στην Δρ. Άννα-Μαρία Ψαρρά, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας καθώς και στον Δρ. Δημήτρη Μπέη, Ερευνητή Β' στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών για την προθυμία τους να συμμετάσχουν στην τριμελή επιτροπή της εργασίας αυτής.

Επιπλέον ευχαριστώ θερμά όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία μας και ιδιαίτερα την Ζαχαρία Αναστασία που εκπονούσε εκείνο το διάστημα στον Δρ. Ψαρρά την μεταπτυχιακή διπλωματική της εργασία καθώς και τον Ντατσούλη Κωνσταντίνο μέλος της εργαστηριακής ομάδας του κ. Ψαρρά για την βοήθεια και την καθοδήγηση τους όσον αφορά την καθημερινότητα στο εργαστήριο. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Δρ. Ιωάννα Κωσταβασίλη, Δρ. Μαίρη Τσικίτη, Δρ. Μανώλη Μαυροειδή για τις συμβουλές και την πολύτιμη βοήθεια τους.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την οικονομική και κυρίως την ψυχολογική υποστήριξη τους όλο αυτό το διάστημα και όλους τους φίλους μου που είναι καθημερινά στο πλευρό μου.

## Πίνακας περιεχομένων

Ευχαριστίες.....	4
<b>1. Εισαγωγή .....</b>	<b>7</b>
1.1. Καρδιακή ίνωση και ανεπάρκεια .....	7
1.2. Καρδιακή επιδιόρθωση και αναγέννηση .....	8
1.3. Καρδιακοί ινοβλάστες στην ίνωση και επιδιόρθωση .....	9
1.4. Ο ρόλος των μακροφάγων στην καρδιακή επιδιόρθωση .....	10
1.5. Des-/- : ένα μοντέλο καρδιακής ανεπάρκειας .....	11
1.6. Ο ρόλος της γαλεκτίνης-3 στο μοντέλο des-/- .....	17
1.7. NLRP3 φλεγμονόσωμα, καρδιακή ίνωση και ανεπάρκεια .....	20
1.8. Αλληλεπιδράσεις NLRP3 φλεγμονοσώματος και γαλεκτίνης-3 .....	24
1.9. Σκοπός της εργασίας .....	25
<b>2. Υλικά και Μέθοδοι .....</b>	<b>26</b>
2.1. Πειραματόζωα .....	26
2.2. Γενοτύπηση .....	27
2.3. Απομόνωση ιστών από ποντίκια για μορφολογική και ιστολογική αποτίμηση .....	30
2.3.1. Μέτρηση του λόγου βάρους καρδιάς προς βάρους σώματος (HW/BW) και βάρους καρδιάς προς μήκος κνήμης (HW/TL) .....	31
2.3.2. Μέτρηση του λόγου βάρους πνεύμονα προς βάρους σώματος (LW/BW) και βάρους πνεύμονα προς μήκος κνήμης (LW/TL) .....	31
2.4. Χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης (H&E) .....	31
2.5. Χρώση Masson's Trichrome .....	32
2.6. Ανάλυση και ποσοτικοποίηση ίνωσης με το πρόγραμμα Imagej .....	32
2.7. Απομόνωση RNA από ολόκληρες καρδιές .....	32
2.8. Αντίστροφη μεταγραφή και δημιουργία cDNA .....	33
2.9. Απομόνωση ενήλικων καρδιακών ινοβλαστών .....	34
2.10. Απομόνωση διαφοροποίηση και πόλωση καρδιακών μακροφάγων .....	35
2.11. Προσδιορισμός του ρυθμού πολλαπλασιασμού των ινοβλαστών με χρώση Crystal Violet .....	36
2.12. Διέγερση μακροφάγων για την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος NLRP3 με ταυτόχρονη προσθήκη του αναστολέα MCC950 .....	36
2.13. Διέγερση ινοβλαστών για την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος NLRP3 .....	36
2.14. Απομόνωση RNA από καλλιέργεια κυττάρων .....	37
2.15. Απομόνωση περιτοναϊκών μακροφάγων .....	38
2.16. Στατιστική ανάλυση .....	38

<b>3. Αποτελέσματα-Συζήτηση .....</b>	<b>39</b>
3.1. Η επίδραση των καρδιακών μακροφάγων και της έλλειψης της γαλεκτίνης-3 στον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών .....	39
3.2. Η επίδραση του NLRP3 στο μοντέλο des-/- .....	41
3.3. Επίδραση του NLRP3 στην καρδιακή ίνωση .....	45
3.4. Επίδραση NLRP3 φλεγμονοσώματος και καρδιακοί ινοβλάστες στο μοντέλο des-/-... .....	46
3.5. Η σχέση NLRP3 και γαλεκτίνης-3 στη φλεγμονή και την καρδιακή αναδιαμόρφωση.. .....	47
3.5.1. Επίδραση NLRP3 φλεγμονοσώματος στα καρδιακά μακροφάγα με έλλειψη γαλεκτίνης-3 .....	47
3.5.2. Φλεγμονή και καρδιακή ομοιόσταση σε ποντίκια με διπλή έλλειψη γαλεκτίνης-3 και NLRP3. Πρώτες προσεγγίσεις .....	49
3.5.3. Αποτίμηση περιτοναϊκής φλεγμονής .....	50
Συμπεράσματα .....	52
Περίληψη.....	53
Abstract .....	54
Βιβλιογραφία .....	55

# 1.Εισαγωγή

## 1.1 Καρδιακή ίνωση και ανεπάρκεια

Στο οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου (myocardial infarction, MI), μία από τις συχνότερες αιτίες θανάτου παγκοσμίως, η ροή αίματος προς την καρδιά διακόπτεται αιφνίδια λόγω στένωσης των αρτηριών και θρόμβωσης κατά την αθηροσκλήρυνση. Ο επιπολασμός εκτιμήθηκε ότι προσεγγίζει τα 3 εκατομμύρια με περισσότερους από ένα εκατομμύριο θανάτους στις Ηνωμένες Πολιτείες [1].

Παρά το γεγονός ότι οι σύγχρονες επεμβατικές και φαρμακολογικές προσεγγίσεις έχουν μειώσει σημαντικά τα επίπεδα θνησιμότητας και νοσηρότητας μετά από MI οι ασθενείς έχουν αυξημένες πιθανότητες υποτροπιασμού τόσο βραχυπρόθεσμα όσο και μακροπρόθεσμα. Επιπλέον η συχνότητα ανάπτυξης καρδιακής ανεπάρκειας (heart failure, HF) είναι αρκετά υψηλή στους ασθενείς αυτούς, με τις μισές περίπου περιπτώσεις να σχετίζονται με προηγούμενο έμφραγμα [2]. Στο υπόλοιπο των περιπτώσεων μια σειρά από αιτιολογίες (μυοκαρδίτιδα, υπέρταση, τοξικές και γενετικές μυοκαρδιοπάθειες) μπορούν να προσβάλλουν το μυοκάρδιο και να οδηγήσουν σε καρδιακή δυσλειτουργία και τελικά ανεπάρκεια. Ως καρδιακή ανεπάρκεια ορίζεται η παθολογική εκείνη κατάσταση κατά την οποία η καρδιά αδυνατεί να τροφοδοτήσει επαρκώς με αίμα τον οργανισμό έτσι ώστε να ανταπεξέλθει στις μεταβολικές του απαιτήσεις. Η δυσμενής αναδιαμόρφωση (adverse remodeling) της αριστερής κοιλίας μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου αποτελεί βασική αιτία ανάπτυξης της καρδιακής ανεπάρκειας. Ο όρος αναδιαμόρφωση αναφέρεται στην σύνθετη διαδικασία τροποποίησης της δομής και της λειτουργίας της καρδιάς, η οποία επάγεται εξαιτίας της προσβολής και της νέκρωσης ενός τμήματος του μυοκαρδίου. Η έγκαιρη αποκατάσταση της αιματικής ροής με αντιθρομβωτικά και η πρωτογενής διαδερμική στεφανιαία παρέμβαση είναι οι κύριες προσεγγίσεις αντιμετώπισης του MI. Ωστόσο είναι πιθανόν να αυξήσουν ακόμα περισσότερο την φθορά του ιστού, κυρίως λόγω επαγωγής φλεγμονωδών αποκρίσεων. Η καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών αναδιαμόρφωσης του καρδιακού ιστού τόσο μετά από MI, όσο και κατά τις υπόλοιπες περιπτώσεις προσβολής της καρδιάς είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη αποτελεσματικότερων διαγνωστικών και θεραπευτικών προσεγγίσεων στην καρδιακή ανεπάρκεια.

## 1.2 Καρδιακή επιδιόρθωση και αναγέννηση

Η καρδιά των ενήλικων θηλαστικών δεν μπορεί να ανταποκριθεί καλά σε προσβολή ή στρες και διακρίνεται από την αδυναμία των καρδιομυοκυττάρων να πολλαπλασιαστούν, που είναι και η κύρια αιτία της πολύ μειωμένης αναγεννητικής της ικανότητας και της ατελούς επιδιόρθωσης της. Ένα από τα χαρακτηριστικά παραδείγματα ατελούς επιδιόρθωσης και αδυναμίας αναγέννησης είναι η πορεία που ακολουθείται μετά από MI. Η προκαλούμενη ισχαιμία οδηγεί κατ' αρχάς σε θάνατο μεγάλου αριθμού καρδιομυοκυττάρων που δεν μπορούν να αναπληρωθούν. Από την άλλη μεριά, δεδομένου ότι η καρδιά έχει περιορισμένο αναερόβιο μεταβολισμό και συνεπώς η λειτουργία της εξαρτάται από το οξυγόνο [3], η μη οξυγόνωση του καρδιακού ιστού επιφέρει σοβαρά προβλήματα. Η επούλωση του μυοκαρδίου μετά από τραυματισμό, όπως αυτός που προκαλείται από το MI, εξαρτάται από μία σειρά κυτταρικών συμβάντων που οδηγούν σε εναπόθεση ινώδους συνδετικού ιστού, δηλαδή σε ίνωση, και στην δημιουργία ουλής (scar formation). Παράλληλα η έντονη φλεγμονώδης αντίδραση που επάγεται μετά από το ισχαιμικό επεισόδιο μπορεί να επιφέρει δομικές, λειτουργικές και γεωμετρικές αλλαγές σε ολόκληρο το μυοκάρδιο. Οι αλλαγές αυτές αφορούν τόσο το τμήμα του ιστού που υπέστη τον τραυματισμό όσο και το άθικτο τμήμα και οδηγούν σε αλλοιωμένη καρδιακή λειτουργία.

Η διαδικασία αναδιαμόρφωσης που ενεργοποιείται μετά από ένα οξύ MI χωρίζεται σε 3 φάσεις [4]:

1. Φλεγμονώδης φάση
2. Φάση πολλαπλασιασμού
3. Φάση ωρίμανσης

Κατά την αρχική φάση, η νέκρωση ενός μεγάλου αριθμού καρδιομυοκυττάρων και η απελευθέρωση των ενδοκυτταρικών τους συστατικών, σε συνδυασμό με συστατικά της κατεστραμμένης εξωκυττάριας μήτρας, οδηγεί στην δημιουργία ενδογενών σημάτων κινδύνου (Danger-Associated Molecular Patterns, DAMPs) [4], [5]. Τα DAMPs ενεργοποιούν μονοπάτια της μη ειδικής ανοσίας και πυροδοτούν μία έντονη, αλλά παροδική, φλεγμονώδη αντίδραση. Τα DAMPs δρούν μεταξύ των άλλων και μέσω των Toll-like (TLR) υποδοχέων και οδηγούν στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ και στην παραγωγή κυτταροκινών, χημειοκινών και μορίων προσκόλλησης. Μέσω αυτών των μονοπατιών προσελκύονται στο τραυματισμένο μυοκάρδιο ανοσοκύτταρα, όπως ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα-μακροφάγα, τα οποία μεταξύ των άλλων φαγοκυτταρώνουν τα νεκρά κύτταρα και τα υπολείμματα της εξωκυττάριας μήτρας [6], [7]. Στην φάση αυτή μπορεί να ενεργοποιηθεί και το NLRP3 φλεγμονόσωμα (inflammasome), ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο, με αποτέλεσμα να παράγεται ενεργή ιντερλευκίνη 1β (IL-1β) η οποία



ενισχύει περαιτέρω την φλεγμονώδη αντίδραση [8]. Κατά την φάση του πολλαπλασιασμού πληθυσμοί μονοκυττάρων και μακροφάγων εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες που στρατολογούν στην περιοχή μεσεγχυματικά κύτταρα και επάγουν την διαφοροποίηση σε υποτύπους που βοηθούν την επιδιόρθωση, όπως οι ενεργοποιημένοι ινοβλάστες (π.χ. μυοϊνοβλάστες) και τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Οι κυτταρικοί αυτοί πληθυσμοί επεκτείνονται και με πολλαπλασιασμό. Από την άλλη, οι μυοϊνοβλάστες εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες πρωτεϊνών της εξωκυττάριας μήτρας διατηρώντας έτσι την δομική ακεραιότητα της καρδιάς [6]. Η απόπτωση των κυττάρων επιδιόρθωσης σηματοδοτεί την λήξη της φάσης πολλαπλασιασμού και την έναρξη της φάσης ωρίμανσης κατά την οποία συμβαίνει ο σχηματισμός του ουλώδους ιστού με την εναπόθεση ινιδίων κολλαγόνου και άλλων στοιχείων της εξωκυττάριας μήτρας (extracellular matrix, ECM) [4].

### 1.3 Καρδιακοί ινοβλάστες στην ίνωση και επιδιόρθωση

Ο όρος καρδιακή ίνωση περιγράφει την εκτεταμένη εναπόθεση πρωτεϊνών της ECM στον καρδιακό διάμεσο χώρο. Παρότι η ίνωση είναι ένα φαινόμενο που χαρακτηρίζει και συνεισφέρει σε πολλές παθολογικές καταστάσεις, δεν αποτελεί πρωταρχική αιτία δυσλειτουργίας του οργάνου σε όλες τις φάσεις της παθολογίας. Έτσι κατά τον τραυματισμό της καρδιάς ο ουλώδης ιστός που δημιουργείται στην περιοχή όπου έχει συμβεί θάνατος καρδιομυοκυττάρων, αναπληρώνει το κενό και υποστηρίζει την καρδιακή λειτουργία, εξισορροπώντας έτσι την αδυναμία του οργάνου να αναγεννηθεί. Επομένως, σε αυτή τη φάση της παθολογίας η ίνωση λειτουργεί προστατευτικά προκειμένου να διατηρηθεί η δομική ακεραιότητα και η λειτουργία της καρδιάς [3]. Η παρουσία και επέκταση όμως της ίνωσης στη χρόνια φάση είναι επιβλαβής για την λειτουργία της καρδιάς [9].

Το 75% του όγκου της καρδιάς των ενήλικων θηλαστικών καταλαμβάνεται από καρδιομυοκύτταρα που περιβάλλονται από ένα δίκτυο ECM αποτελούμενο μεταξύ των άλλων από κολλαγόνο IV. Στον ενδιάμεσο χώρο, περιβάλλοντας ομάδες καρδιομυοκυττάρων, βρίσκονται οι καρδιακοί ινοβλάστες, τα κύρια κύτταρα παραγωγής ECM και κολλαγόνου στην καρδιά, υπεύθυνα για την εναπόθεση ινιδίων κολλαγόνου κυρίως τύπου I, αλλά και τύπου III [10]. Διάφοροι άλλοι κυτταρικοί τύποι συνυπάρχουν στον ενδιάμεσο αυτό χώρο με τον μεγαλύτερο πληθυσμό να αποτελείται από ενδοθηλιακά κύτταρα γεγονός που αντανάκλα την πλούσια μικροαγγείωση του μυοκαρδίου [11]. Μεταξύ των ανοσοκυττάρων τα καρδιακά μακροφάγα αποτελούν την πλειοψηφία και παίζουν σημαντικό ρόλο στην ομοίωση του οργάνου. Υπάρχουν επίσης μικρότεροι πληθυσμοί άλλων ανοσοκυττάρων (μαστοκύτταρα, δενδριτικά κύτταρα κλπ) όπως επίσης και άλλα αγγειακά κύτταρα (κύτταρα λείου μυός και περικύτταρα) [12]–[15].

Οι καρδιακοί ινοβλάστες αποτελούν έναν από τους μεγαλύτερους κυτταρικούς πληθυσμούς στην καρδιά και βρίσκονται συνήθως στο ενδομύιο και στο περιμύιο [16], [17]. Οι μόνιμοι (resident) καρδιακοί ινοβλάστες είναι υπεύθυνοι για την διατήρηση της δομικής ακεραιότητας του δικτύου ECM γεγονός που επιτυγχάνεται με την συνεχή αποδόμηση και σύνθεση των ECM πρωτεϊνών [18]. Η ενεργοποίηση των ινοβλαστών υπό συνθήκες προσβολής του μυοκαρδίου μπορεί να οδηγήσει σε διαφοροποίηση τους σε μυοϊνοβλάστες. Οι μυοϊνοβλάστες είναι οι κύριοι τελεστές της ίνωσης του μυοκαρδίου σε περιπτώσεις τραυματισμού και αναδιαμόρφωσης [19], [20]. Η ενεργοποίηση αυτή μπορεί να είναι το αποτέλεσμα είτε της έκθεσης σε DAMPs που έχουν απελευθερωθεί από νεκρωτικά κύτταρα στην περιοχή του τραύματος, ή διέγερσης των ινοβλαστών από διάφορους άλλους κυτταρικούς τύπους. Για παράδειγμα ανοσοκύτταρα όπως τα μακροφάγα, αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα και περικύτταρα έχειδειχθεί ότι προάγουν την ενεργοποίηση των ινοβλαστών σε παθολογικές καταστάσεις εκκρίνοντας μεσολαβητές όπως κυτταροκίνες, αυξητικούς παράγοντες και matricellular πρωτεΐνες.

## 1.4 Ο ρόλος των μακροφάγων στην καρδιακή επιδιόρθωση

Η άποψη ότι τα μακροφάγα προέρχονται αποκλειστικά από μονοκύτταρα της κυκλοφορίας έχει πλέον εγκαταλειφθεί [21]. Έρευνες έχουν δείξει ότι τα μόνιμα (resident) μακροφάγα που υπάρχουν σε διάφορους ιστούς (εγκέφαλο, πνεύμονες, μυελό των οστών, νεφρό, καρδιά) εγκαθιδρύονται εκεί προγεννητικά, παραμένουν καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του οργανισμού και έχουν την ικανότητα να αυτοανανεώνονται [22], [23]. Τα κύτταρα αυτά στα ποντίκια αποτελούν περίπου το 5%-10% των μη καρδιομυοκυττάρων [24], [25] και προέρχονται από πρόδρομα κύτταρα του λεκιθικού ασκού ή του εμβρυικού ήπατος [26].

Μετά από ένα έμφραγμα του μυοκαρδίου (MI), μονοκύτταρα από την κυκλοφορία του αίματος κατακλύζουν το μυοκάρδιο όπου διαφοροποιούνται σε μακροφάγα [27]. Τα μονοκύτταρα από την κυκλοφορία είναι η κύρια πηγή διηθούντων μακροφάγων για τις πρώτες 7 ημέρες μετά από ένα έμφραγμα [28] αφού μέρος των μόνιμων καρδιακών μακροφάγων έχουν πεθάνει λόγω της ισχαιμίας. Δύο εβδομάδες μετά το MI ο πληθυσμός των μόνιμων καρδιακών μακροφάγων έχει πλέον αποκατασταθεί με πολλαπλασιασμό και τα κύτταρα αυτά αποτελούν διακριτό κυτταρικό πληθυσμό και μπορούν να διαχωρισθούν από τα μακροφάγα που προέρχονται από μονοκύτταρα της κυκλοφορίας [28].

Ο πληθυσμός των μακροφάγων στην τραυματισμένη καρδιά είναι δυναμικός και εμφανίζει ετερογένεια. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι οι πρώτες 5 μέρες μετά από MI όπου παρατηρείται μία οξεία φλεγμονή που αρχίζει μετέπειτα να υποχωρεί [29]: Από την 1<sup>η</sup> μέχρι την 3<sup>η</sup> ημέρα μετά το MI κυριαρχούν τα φλεγμονώδη μακροφάγα [30], η γονιδιακή έκφραση των οποίων προσομοιάζει εν μέρει σε μια

κατάσταση ενεργοποίησης που ονομάζεται M1 και επιτυγχάνεται *ex vivo* με την έκθεση των κυττάρων αυτών σε βακτηριακό LPS και ιντερφερόνη- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Αντίθετα, από την 5<sup>η</sup>-7<sup>η</sup> ημέρα μετά το MI η πλειονότητα αποτελείται από μακροφάγα που προσομοιάζουν προς την M2 κατάσταση ενεργοποίησης, η οποία επιτυγχάνεται *ex vivo* μετά από έκθεση σε ιντερλευκίνη-4 ή/και -13 (IL-4, IL-13). [30]. Αν και νεότερες μελέτες δείχνουν ότι *in vivo* τα μακροφάγα δεν μπορούν να διακριθούν ξεκάθαρα σε M1 και M2 υποτύπους [31] η κατάταξη αυτή εξακολουθεί να είναι χρήσιμη για την κατανόηση σημαντικών λειτουργιών τους. Έτσι τα φλεγμονώδη M1 μακροφάγα εκκρίνουν κυτταροκίνες, χημειοκίνες, αυξητικούς παράγοντες και MMPs έτσι ώστε να απομακρύνουν τα κυτταρικά υπολείμματα και να αποδομήσουν την ECM [32]. Αντίθετα τα αντιφλεγμονώδη M2 μακροφάγα ασκούν δράσεις που υποβοηθούν την επιδιόρθωση του ιστού φαγοκυτταρώνοντας τα αποπτωτικά κύτταρα διευκολύνοντας έτσι την αγγειογένεση και την δημιουργία ουλώδους ιστού. Όπως βέβαια εξηγήθηκε και παραπάνω, η εξάπλωση του τελευταίου κατά τη χρόνια φάση έχει επιβλαβή αποτελέσματα.

Η αποτίμηση της δράσης των καρδιακών μακροφάγων και των υποπληθυσμών τους είναι συνεπώς σημαντική παράμετρος για να κατανοήσουμε βασικά στοιχεία των μηχανισμών επιδιόρθωσης και αναδιαμόρφωσης και τη σημασία τους στην καρδιά και την καρδιακή ανεπάρκεια.

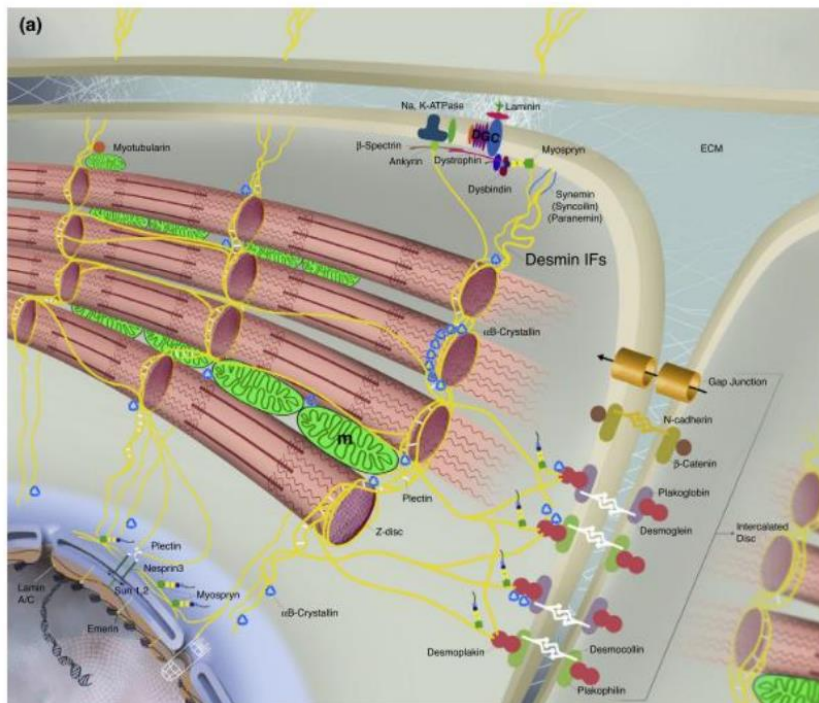
## 1.5 Des<sup>-/-</sup>: ένα μοντέλο καρδιακής ανεπάρκειας

Για τη μελέτη των μηχανισμών επιδιόρθωσης και αναδιαμόρφωσης στην καρδιά και την καρδιακή ανεπάρκεια χρησιμοποιούνται ζωικά μοντέλα, όπως αυτό του επαγόμενου εμφράγματος του μυοκαρδίου στο ποντίκι. Οι συνήθειες όμως παρατηρήσεις στο μοντέλο αυτό γίνονται εντός 1-2 εβδομάδων μετά το MI αντανakλώντας μεταβολές μιας συγκεκριμένης φάσης της παθολογίας και αγνοώντας συνήθως την πρόοδο της κατά τη χρόνια φάση. Άλλα μοντέλα προσβολής του μυοκαρδίου και καρδιακής ανεπάρκειας ανταποκρίνονται καλύτερα στη σταδιακή πρόοδο της νόσου όπως συμβαίνει και στον άνθρωπο, συμπεριλαμβάνοντας όμως κρίσιμα χαρακτηριστικά της καρδιακής φλεγμονής και της ίνωσης. Ένα τέτοιο μοντέλο είναι το γενετικό μοντέλο καρδιακής ανεπάρκειας στο ποντίκι λόγω έλλειψης της μυοειδικής πρωτεΐνης δεσμίνης, μιας πρωτεΐνης που σχηματίζει ενδιάμεσα ινίδια τύπου III.

Τα ενδιάμεσα ινίδια αποτελούν μία ετερογενή ομάδα πρωτεϊνών οι οποίες εμφανίζουν ιστοειδικότητα και έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται σε διάφορες ασθένειες [33]. Υπάρχουν πάνω από 73 πρωτεΐνες ενδιάμεσων ινιδίων οι οποίες ταξινομούνται σε 6 ομάδες ανάλογα με την αμινοξική τους ακολουθία. Παρά την ποικιλομορφία στο μέγεθος και στην αλληλουχία των αμινοξέων τους, όλες οι πρωτεΐνες ενδιάμεσων ινιδίων μοιράζονται ένα κοινό δομικό μοντέλο.

Αποτελούνται από μία διατηρημένη κεντρική περιοχή α-έλικας η οποία πλαισιώνεται από μία αμινοτελική και μία καρβοξυτελική περιοχή χαρακτηριστικού μεγέθους και αλληλουχίας για κάθε πρωτεΐνη. Οργανώνονται σε ομοδιμερή ή ετεροδιμερή [34] και εμπλέκονται σε διάφορες λειτουργίες όπως η βιογένεση, η τοποθέτηση και η λειτουργία των οργανιδίων, η μηχανοχημική μεταγωγή σήματος, η μεταγραφή και η κυτταρική διαφοροποίηση καθώς και στην ρύθμιση της προσκόλλησης και της μετανάστευσης [35]–[43].

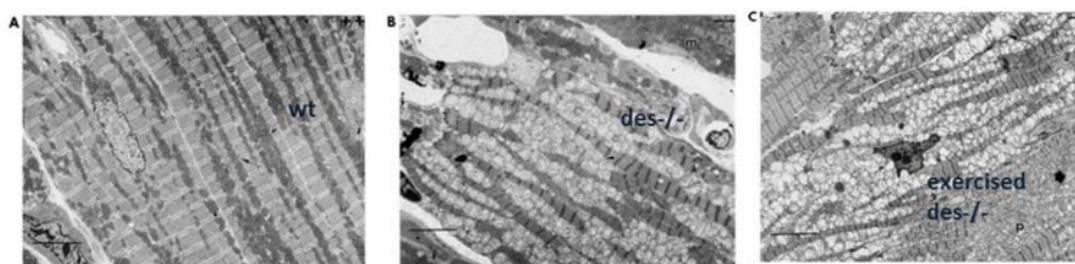
Η δεσμίνη (desmin, MB 53 kDa) είναι η πιο άφθονη πρωτεΐνη ενδιάμεσων ινιδίων στα καρδιομυοκύτταρα. Απομονώθηκε το 1976 [44] και το γονίδιο της ταυτοποιήθηκε το 1984 από την Δρ. Καπετανάκη [45]. Στα ποντίκια ανιχνεύεται ήδη από την εμβρυική ημέρα 8.25 [45], [46] γεγονός που υποδεικνύει την σημασία της στην ρύθμιση και διαφοροποίηση των μυικών κυττάρων. Εκτός από τα καρδιομυοκύτταρα, εκφράζεται επίσης στους σκελετικούς και στους λείους μύες [34], [45], [48], [49] και σχηματίζει ενδιάμεσα ινίδια διαμέτρου 10-12 nm. Η δεσμίνη περιβάλλει τους Ζ-δίσκους και αλληλεπιδρώντας με άλλες πρωτεΐνες σχηματίζει ένα δίκτυο που εκτείνεται καθ' όλο το μήκος του καρδιομυοκυττάρου και ενώνει την συσταλτή συσκευή με τα κοσταμερή και τα διάφορα μεμβρανικά κυτταρικά οργανίδια (ενδοπλασματικό δίκτυο, μιτοχόνδρια, πυρήνας) [36]. Μέσω των κοσταμερών, η δεσμίνη συνδέει την ενδοκυτταρική συσταλτή συσκευή με το εξωκυττάριο περιβάλλον και την ECM (Σχήμα 1) διευκολύνοντας έτσι την μετάδοση σημάτων.



με κίτρινο χρώμα) αλληλεπιδρούν με άλλα ινίδια δημιουργώντας γέφυρες που ενώνουν την συστατή συσκευή με διάφορα ενδοκυτταρικά διαμερίσματα και οργάνιδια. Από [43].

Προκειμένου να προσδιοριστεί ο ρόλος της δεσμίνης στην μυϊκή ανάπτυξη και την ομοιόσταση, δύο ερευνητικές ομάδες, των Paulin [50] και Carpetanaki [51] δημιούργησαν ποντίκια στα οποία είχε γίνει γενετική απαλοιφή του γονιδίου της δεσμίνης. Οι μελέτες που έγιναν στα  $des^{-/-}$  ποντίκια έδειξαν ότι τα ζώα αυτά είναι βιώσιμα και αναπτύσσουν κανονικά σκελετικό, καρδιακό και λείο μυ καταδεικνύοντας έτσι ότι η παρουσία της δεσμίνης δεν είναι απαραίτητη για τον σχηματισμό των μυών [52]. Ωστόσο, τα ποντίκια αυτά παρουσιάζουν ανωμαλίες και στα τρία είδη μυϊκού ιστού με την μεγαλύτερη βλάβη να συμβαίνει στο μυοκάρδιο[51].

Από τα πρώτα χαρακτηριστικά που παρουσιάζουν οι καρδιές στα  $des^{-/-}$  ποντίκια, είναι ανωμαλίες στην δομή και την λειτουργία των μιτοχονδρίων (Σχήμα 2) [51], [53]. Τα μιτοχόνδρια στο  $des^{-/-}$  μυοκάρδιο εμφανίζονται οιδηματικά, με διαταραγμένες ραβδώσεις, ενώ εμφανίζουν επιπλέον έντονο πολλαπλασιασμό [53], [54]. Οι ανωμαλίες αυτές σχετίζονται με την ιδιότητα της δεσμίνης να συνδέεται στα σημεία επαφής των μιτοχονδρίων και συμπεριλαμβάνουν μορφολογικές και πρωτεομικές αλλοιώσεις, προβλήματα στην αναπνευστική τους λειτουργία κ.α.

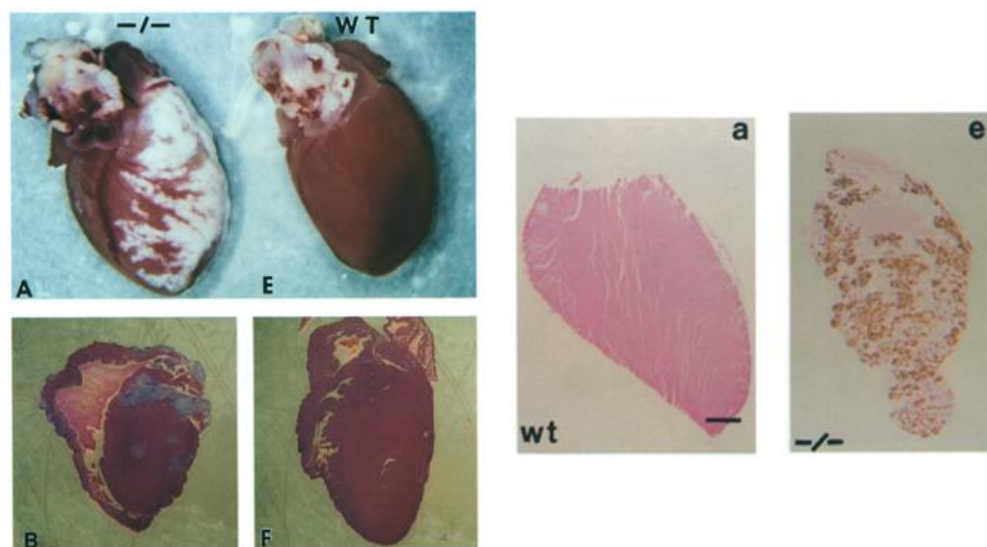


**Σχήμα 2.** Υποκυτταρικές μιτοχονδριακές αλλοιώσεις στην καρδιά του  $des^{-/-}$ .

**(A)** Φυσιολογική απεικόνιση καρδιακού ιστού από wt ποντίκι **(B)** Διαταραχές των μιτοχονδρίων που παρατηρούνται στο  $des^{-/-}$  μυοκάρδιο οι οποίες γίνονται ακόμα πιο έντονες μετά από άσκηση **(C)**. Εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Τροποποιημένο από [53]



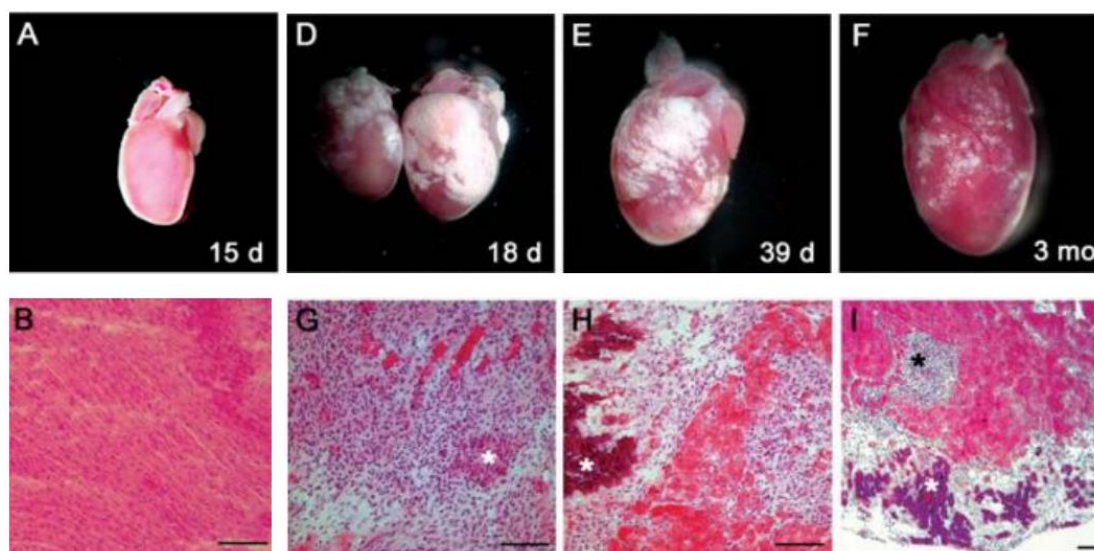
Οι μιτοχονδριακές αυτές ανωμαλίες οδηγούν σε θάνατο των καρδιομυοκυττάρων, γεγονός που πυροδοτεί μία έντονη φλεγμονώδη αντίδραση με αποτέλεσμα την διήθηση του μυοκαρδίου από ανοσοκύτταρα, κυρίως μακροφάγα [55]. Η φλεγμονή στην συνέχεια φθίνει, ενώ οι ινοβλάστες διαφοροποιούνται σε μυοϊνοβλάστες εναποθέτοντας κολλαγόνο. Στο  $des^{-/-}$  μυοκάρδιο παρατηρούνται φαινόμενα ασβεστοποίησης και ίνωσης, που έχουν ως αποτέλεσμα εκτεταμένο εκφυλισμό του μυοκαρδίου (Σχήμα 3), διατακτική καρδιομυοπάθεια και τελικά καρδιακή ανεπάρκεια.



**Σχήμα 3. Καρδιακός εκφυλισμός στο ποντίκι  $des^{-/-}$ .**

Καρδιές από (A)  $des^{-/-}$  και (E) wt ποντίκια ηλικίας 10 εβδομάδων. Είναι ορατή η παρουσία φλεγμονώδους διηθήματος στην  $des^{-/-}$  καρδιά. Τομές από (B)  $des^{-/-}$  και (F) wt καρδιές με τρίχρωμη χρώση Masson. Παρατηρούνται περιοχές εκτεταμένης ίνωσης και νέκρωσης στο  $des^{-/-}$  μυοκάρδιο. Τομές από (e)  $des^{-/-}$  και (a) wt καρδιές με χρώση von Kossa. Παρατηρείται αυξημένη εναπόθεση ασβεστίου στο  $des^{-/-}$  μυοκάρδιο. Τροποποιημένο από [51]

Η φλεγμονώδης διήθηση του  $des^{-/-}$  μυοκαρδίου εμφανίζεται αυθόρμητα κατά την 15<sup>η</sup>-16<sup>η</sup> ημέρα μετά την γέννηση και ακολουθείται από την σταδιακή αποδρομή της μέσω εκτεταμένης απόπτωσης των διηθούμενων κυττάρων. Μέρος της φλεγμονής πάντως διατηρείται εγκαθιστώντας μια χρόνια φλεγμονώδη κατάσταση (Σχήμα 4).

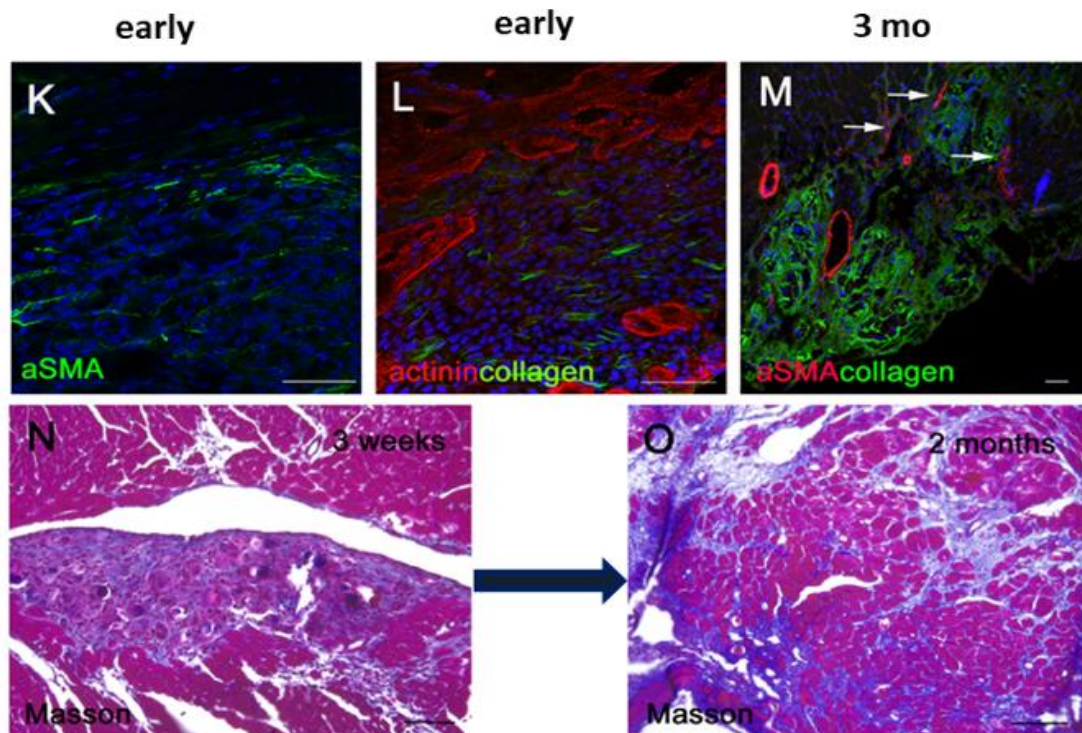


**Σχήμα 4.** Έναρξη και αποδρομή της φλεγμονής στο *des*<sup>-/-</sup> μυοκάρδιο.

(A,B) Απουσία φλεγμονής σε *des*<sup>-/-</sup> καρδιές από ποντίκια ηλικίας 15 ημερών. (D,G) Παρουσία φλεγμονώδους διηθήματος που επιβεβαιώνει την οξεία φλεγμονώδη αντίδραση που λαμβάνει χώρα μετά την 16<sup>η</sup> ημέρα και η οποία υποχωρεί με τον χρόνο (E,F,H). (I) Μεγέθυνση του H, όπου φαίνονται εστίες φλεγμονής (λευκός αστερίσκος) και ασβεστοποίησης (μαύρος αστερίσκος) στο *des*<sup>-/-</sup> μυοκάρδιο. Από [55].

Η ανάπτυξη της μυοκαρδιοπάθειας στο *des*<sup>-/-</sup> μοντέλο είναι προοδευτική και περιλαμβάνει χαρακτηριστικά πολλών μυοκαρδιοπαθειών. Έτσι, παρουσιάζονται χαρακτηριστικά διατακτικής μυοκαρδιοπάθειας 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 αρρυθμογόνος καρδιακή ανεπάρκεια της δεξιάς κοιλίας [51], [55], [56].

Μια κεντρική παράμετρος της παθολογίας είναι φυσικά η ίνωση, η οποία είναι επίσης προοδευτική [55]. Έτσι, κατά την πρώιμη φάση της φλεγμονής οι μυοϊνοβλάστες εμφανίζονται σε περιοχές εκτεταμένης φλεγμονώδους διήθησης στο *des*<sup>-/-</sup> μυοκάρδιο παράλληλα με τον σχηματισμό ινιδίων κολλαγόνου σε περιοχές από τις οποίες απουσιάζουν τα καρδιομυοκύτταρα ακριβώς λόγω των διεργασιών του κυτταρικού θανάτου που αναφέρθηκαν (Σχήμα 5). Κατά την ύστερη φάση, στις περιοχές από τις οποίες απουσιάζουν τα καρδιομυοκύτταρα αλλά είναι εμπλουτισμένες με μυοϊνοβλάστες παρατηρείται εκτεταμένη εναπόθεση κολλαγόνου, δηλαδή ίνωση (Σχήμα 5). Συνοπτικά το μυοκάρδιο μεταβαίνει από μια κατάσταση φλεγμονώδους διήθησης που συνοδεύει τον θάνατο των καρδιομυοκυττάρων σε προοδευτικά αυξανόμενη ίνωση (Σχήμα 5) που συνάδει με την προοδευτική επιδείνωση των επιδόσεων της καρδιακής λειτουργίας [54], [56], [57].



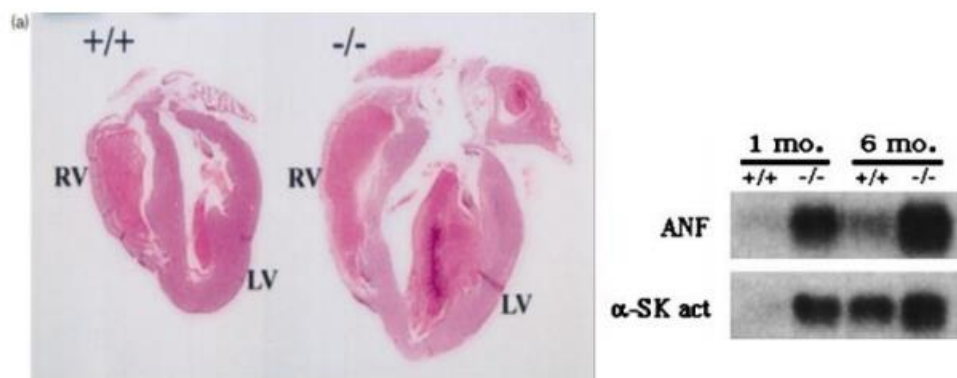
**Σχήμα 5. Προοδευτική ίνωση στο  $des^{-/-}$  μοντέλο.**

(**K**) Πρώιμη φάση φλεγμονής. Μελέτες ανοσοφθορισμού σε κρουτομές. Εμφάνιση μυοϊνοβλαστών ( $\alpha$ SMA<sup>+</sup>, πράσινος φθορισμός, κύτταρα που εκφράζουν  $\alpha$ -smooth muscle actin) σε περιοχές του μυοκαρδίου που εμφανίζουν φλεγμονώδη διήθηση (πυρηνική χρώση DAPI<sup>+</sup>, μπλε φθορισμός, περιοχή συσσώρευσης πυρήνων) (**L**) Σχηματισμός ινιδίων κολλαγόνου (πράσινος φθορισμός) σε περιοχές κενές καρδιομυοκυττάρων (απουσία κόκκινου φθορισμού που αντιστοιχεί στον δείκτη καρδιομυοκυττάρων  $\alpha$ -actinin) (**M**) Ύστερη φάση, ηλικία 3 μηνών. Εκτεταμένη εναπόθεση κολλαγόνου (πράσινο) σε περιοχές με ταυτόχρονη παρουσία μυοϊνοβλαστών ( $\alpha$ SMA<sup>+</sup>, κόκκινος φθορισμός, λευκά βέλη). Οι κυκλικές δομές με κόκκινη χρώση αντιστοιχούν σε αγγεία. (**N**), (**O**) Χρώση Masson υποδεικνύει την μετατροπή των φλεγμονοδών διηθήσεων κατά την πρώιμη φάση (κόκκινη κυτταροπλασματική χρώση αναμεμιγμένη με μπλε χρώση του ECM στο N) σε εκτεταμένες ινωτικές περιοχές ελεύθερες κυττάρων στην ύστερη φάση (απουσία κόκκινης κυτταροπλασματικής χρώσης στις μπλε περιοχές στο O). Τροποποιημένο από [55].

Εκτός της ίνωσης, στο  $des^{-/-}$  παρατηρείται και αταξία στην διευθέτηση, αλλά και υπερτροφία, δηλαδή αύξηση του μεγέθους των καρδιομυοκυττάρων που επιβίωσαν. Η αντίδραση της υπερτροφίας, η οποία μεταφράζεται και σε αύξηση του λόγου του βάρους της καρδιάς προς το βάρος του σώματος του ποντικού (HW/BW, heart weight-to-body weight ratio) παρατηρείται σε ζώα ηλικίας ενός έως 6 μηνών, όπως υποδεικνύεται και από τα επίπεδα έκφρασης των μορίων-δεικτών της καρδιακής υπερτροφίας ANF (atrial natriuretic factor) και  $\alpha$ -ακτίνη του σκελετικού μυός ( $\alpha$ -SK act, skeletal muscle actin) (σχήμα 6) [58]. Αν και η αντίδραση αυτή είναι πρόσκαιρη και υποχωρεί σε μεγαλύτερα ζώα [58] αποτελεί ένα χαρακτηριστικό της παθοφυσιολογίας του  $des^{-/-}$  και της προσαρμογής στο στρες στο οποίο υπόκειται το μυοκάρδιο. Η αύξηση του λόγου HW/BW παρατηρείται επίσης και σε άλλα μοντέλα



προσβολής του μυοκαρδίου, όπως είναι τα μοντέλα εμφράγματος (MI) και συνοδεύεται συνήθως από αντίστοιχη προσαρμογή του βάρους του πνεύμονα. Έτσι, ο λόγος lung weight-to-body weight (LW/BW) αυξάνεται επίσης και αποτελεί στοιχείο της παθοφυσιολογίας του  $des^{-/-}$ . Επιπλέον, οι πνεύμονες του  $des^{-/-}$  εμφανίζουν εμφυσηματικού τύπου αλλοιώσεις και διαταραχές της λειτουργίας τους, αλλά και αυξημένη εναπόθεση περιβρογχιακού κολλαγόνου, αποτελώντας ένα σημαντικό όργανο στην παθοφυσιολογία του μοντέλου [57].

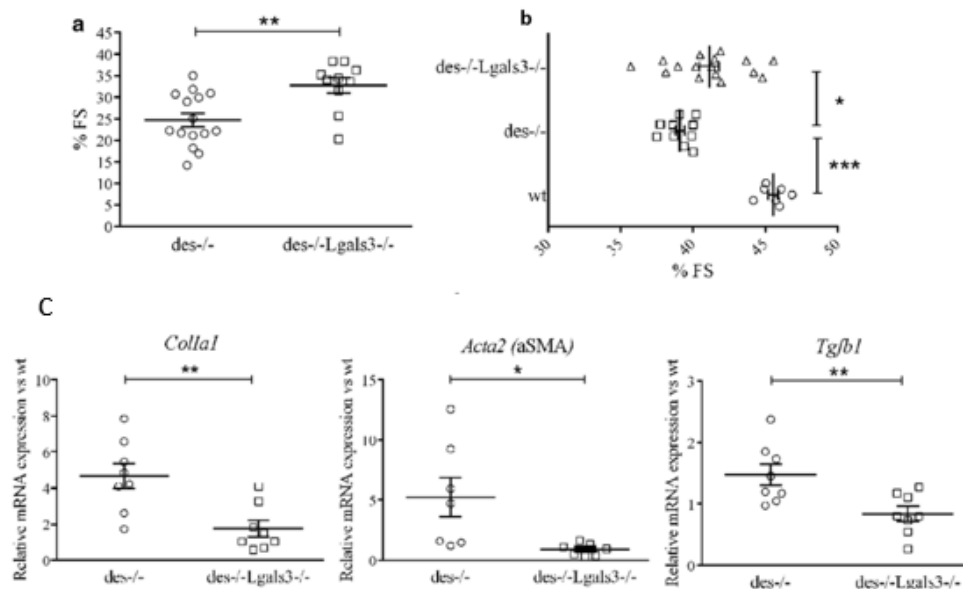


**Σχήμα 6.** Διατακτική μυοκαρδιοπάθεια με αύξηση του μεγέθους των χώρων της αριστερής (LV) αλλά και της δεξιάς κοιλίας (RV) και αυξημένα επίπεδα των δεικτών καρδιακής υπερτροφίας ANF και  $\alpha$ -SK act στο  $des^{-/-}$  μυοκάρδιο [58]

## 1.6 Ο ρόλος της γαλεκτίνης-3 στο μοντέλο $des^{-/-}$

Η γαλεκτίνη-3, μία λεκτίνη που δεσμεύει β-γαλακτοσίδη, εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία διαφόρων ασθενειών συμπεριλαμβανομένων αυτοάνοσων νοσημάτων, του διαβήτη και του καρκίνου. Φαίνεται ωστόσο ότι αποτελεί και ρυθμιστή της καρδιακής αναδιαμόρφωσης και της καρδιακής ανεπάρκειας επηρεάζοντας στοιχεία της δυσμενούς αναδιαμόρφωσης όπως η ίνωση. Σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου [55] δείχθηκε ότι οι διεργασίες αυτές διαμεσολαβούνται μερικώς από την υπερέκφραση στα μακροφάγα του  $des^{-/-}$  μυοκαρδίου, της οστεοποντίνης, μιας matricellular πρωτεΐνης, η οποία με την σειρά της αυξάνει την έκφραση της γαλεκτίνης-3. Προκειμένου να βρεθούν οι μηχανισμοί με τους οποίους η προερχόμενη από μακροφάγα γαλεκτίνη-3 δρα ως ρυθμιστής της καρδιακής αναδιαμόρφωσης έγιναν μελέτες [57] σε  $des^{-/-}$  ποντίκια με παράλληλη γενετική αποσιώπηση του γονιδίου της γαλεκτίνης-3 (διπλά διαγονιδιακά  $des^{-/-}$   $Lgals3^{-/-}$ ) ή μετά από φαρμακολογική αναστολή της. Οι μελέτες έγιναν σε ποντίκια αυξανόμενης ηλικίας (4 εβδομάδων, 4 μηνών, 12 μηνών) προκειμένου να διερευνηθεί εάν η έλλειψη της γαλεκτίνης-3 έχει επιπτώσεις σε όλα τα στάδια της προοδευτικής μυοκαρδιοπάθειας που εμφανίζουν τα  $des^{-/-}$  ποντίκια. Σε όλα τα ηλικιακά στάδια υπήρξε βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας στα  $des^{-/-}$   $Lgals3^{-/-}$

ποντίκια, με αυξημένο κλάσμα βράχυνσης (FS-Fractional Shortening) αλλά και μειωμένη τελοσυστολική διάμετρο (LVESD-Left Ventricular external end-systolic diameter) συγκριτικά με τα *des<sup>-/-</sup>* ποντίκια [57]. Σημειώθηκε επίσης μειωμένη εναπόθεση κολλαγόνου στις καρδιές από τις οποίες απουσίαζε η γαλεκτίνη-3 γεγονός το οποίο επιβεβαιώθηκε και σε μοριακό επίπεδο όπου παρατηρήθηκε μειωμένη έκφραση δεικτών ή μεσολαβητών της ίνωσης (*Colla1*, *Acta2* και *Tgfb1*) [57] (Σχήμα 7). Επιπρόσθετα βρέθηκε μειωμένη έκφραση δεικτών όπως F4/80 (δείκτης μακροφάγων), *Ccr2* (δείκτης μακροφάγων που έχουν προέλθει από μονοκύτταρα) και *Arg1* (ένζυμο που εμπλέκεται στην καρδιακή αναδιαμόρφωση, αλλά και στην ενεργοποίηση τύπου M2 των μακροφάγων) στα *des<sup>-/-</sup>Lgals3<sup>-/-</sup>* ποντίκια σε σχέση με τα *des<sup>-/-</sup>*, γεγονός που αντικατοπτρίζει μία μείωση στον αριθμό των μακροφάγων αλλά και μεταβολή των χαρακτηριστικών των μακροφάγων που διηθούν το *des<sup>-/-</sup>Lgals3<sup>-/-</sup>* μυοκάρδιο.



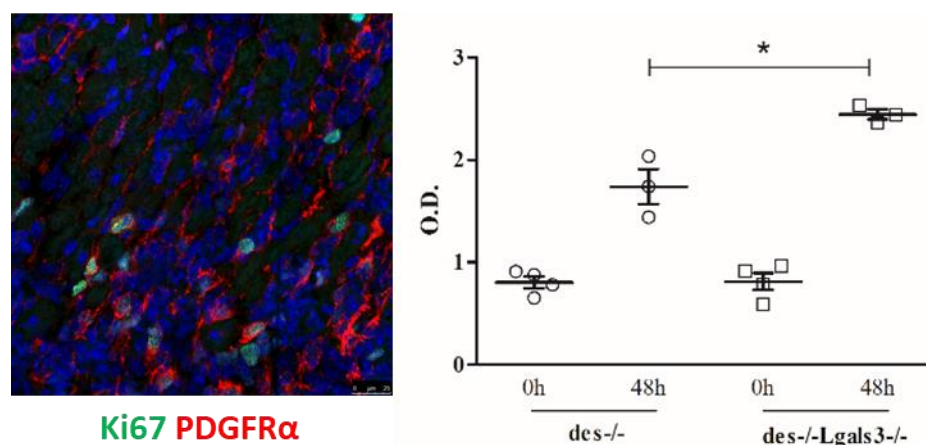
**Σχήμα 7. Βελτίωση της παθοφυσιολογίας στα *des<sup>-/-</sup>Lgals3<sup>-/-</sup>* ποντίκια**

**(a)** Προσδιορισμός του κλάσματος FS σε *des<sup>-/-</sup>Lgals3<sup>-/-</sup>* και *des<sup>-/-</sup>* ποντίκια ηλικίας 12 μηνών **(b)** Προσδιορισμός του κλάσματος FS σε *des<sup>-/-</sup>Lgals3<sup>-/-</sup>*, *des<sup>-/-</sup>* και wt ποντίκια ηλικίας 4 εβδομάδων **(c)** Αποτίμηση της έκφρασης κολλαγόνου I (*Colla1*), α-SMA (*Acta2*) και του παράγοντα επαγωγής της ίνωσης TGFβ1 (*Tgfb1*) σε *des<sup>-/-</sup>* και *des<sup>-/-</sup>Lgals3<sup>-/-</sup>* καρδιές ηλικίας 4 εβδομάδων. Η γαλεκτίνη-3 φαίνεται ότι επηρεάζει τα ινωτικά γεγονότα. Τροποποιημένο από [57].

Στην ίδια εργασία καρδιακοί ινοβλάστες εκτέθηκαν σε εθισμένο μέσο (CM, Conditioned Medium) μακροφάγων που απομονώθηκαν από το περιτόναιο ποντικών. Για να διαπιστωθεί ο ρόλος της γαλεκτίνης-3 στην παρακρινή επίδραση των μακροφάγων στους ινοβλάστες συγκρίθηκαν CM από μακροφάγα με έλλειψη γαλεκτίνης (*Lgals3<sup>-/-</sup>*) με CM από μακροφάγα που εκφράζουν γαλεκτίνη-3 (από wt ποντίκια). Δείχθηκε ότι οι ινοβλάστες που εκτέθηκαν σε CM χωρίς γαλεκτίνη-3

εμφάνισαν χαμηλότερη έκφραση κολλαγόνου I, καθώς και τάσεις μείωσης της *Acta2* ( $\alpha$ SMA) γεγονός που φανερώνει ότι η έλλειψη της γαλεκτίνης-3 αναστέλλει τις ινωτικές αποκρίσεις [57].

Ένα σημαντικό στοιχείο του μηχανισμού που προκαλεί τη βελτίωση της ίνωσης και της παθοφυσιολογίας γενικότερα αποδείχθηκε ότι ήταν η πολλαπλασιαστική ικανότητα των ινοβλαστών στο *des<sup>-/-</sup>Lgals3<sup>-/-</sup>* μυοκάρδιο. Έτσι, όχι μόνο τα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα κατά τη φάση της οξείας φλεγμονής ήταν περισσότερα στις *des<sup>-/-</sup>Lgals3<sup>-/-</sup>* καρδιές, αλλά και η πλειοψηφία αυτών των κυττάρων ήταν οι ινοβλάστες. Όταν μετρήθηκε επίσης ο ρυθμός πολλαπλασιασμού καρδιακών ινοβλαστών που μπήκαν σε καλλιέργεια, φάνηκε ότι ο πολλαπλασιασμός των ινοβλαστών που είχαν προέλθει από *des<sup>-/-</sup>Lgals3<sup>-/-</sup>* καρδιές ήταν αυξημένος σε σχέση με τους ινοβλάστες που προήλθαν από *des<sup>-/-</sup>* καρδιές (Σχήμα 8).



**Σχήμα 8. Ινοβλάστες και *des<sup>-/-</sup>* μυοκάρδιο.** Αριστερά. Μελέτες ανοσοφθορισμού κατά την πρώιμη φλεγμονή του *des<sup>-/-</sup>* μυοκαρδίου. Πολλαπλασιαζόμενοι ( $\text{Ki67}^+$ , πράσινος φθορισμός) καρδιακοί ινοβλάστες ( $\text{PDGFR}\alpha^+$ , κόκκινος φθορισμός). Δεξιά. Αποτίμηση ρυθμού πολλαπλασιασμού καλλιέργειας ινοβλαστών εντός 48 ωρών με μέτρηση απορρόφησης (οπτική πυκνότητα, O.D.) μετά από χρώση με crystal violet. Τροποποιημένο από [57].

Παράλληλες μετρήσεις έδειξαν ότι η απουσία της γαλεκτίνης-3 προστατεύει τους ινοβλάστες τόσο από γήρανση, όσο και από απόπτωση και συνεπώς διατηρεί τις ικανότητες των κυττάρων αυτών να αυξάνουν τον πληθυσμό τους εξυπηρετώντας τις ανάγκες επιδιόρθωσης του καρδιακού ιστού κατά τη φάση της εκτεταμένης φλεγμονής και θανάτου καρδιομυοκυττάρων όπως συμβαίνει στο *des<sup>-/-</sup>*. Αντίθετα, ο μειωμένος ρυθμός πολλαπλασιασμού και η αυξημένη απόπτωση και γήρανση των ινοβλαστών από τις *des<sup>-/-</sup>* καρδιές μειώνει τις ενεργότητες καρδιακής επιδιόρθωσης οδηγώντας τελικά σε αδυναμία απόκρισης στα προβλήματα που προκαλεί η

έλλειψη της δεσμίνης. Η αδυναμία αυτή μεταφράζεται τελικά σε αυξημένη καρδιακή ίνωση και δυσλειτουργία [57].

Παρά τις ισχυρές ενδείξεις που υποστηρίζουν ότι οι μεταβολές αυτές των ινοβλαστών οφείλονται εν μέρει στην επίδραση που έχουν τα εκκρίματα των μακροφάγων στο περιβάλλον της φλεγμονής του *des<sup>-/-</sup>* μυοκαρδίου, τα σχετικά *ex vivo* πειράματα έγιναν με μακροφάγα προερχόμενα από το περιτόναιο και θα είχε ιδιαίτερο ενδιαφέρον να επιβεβαιωθεί μέρος των επιδράσεων με μακροφάγα που διηθούν την *des<sup>-/-</sup>* καρδιά.

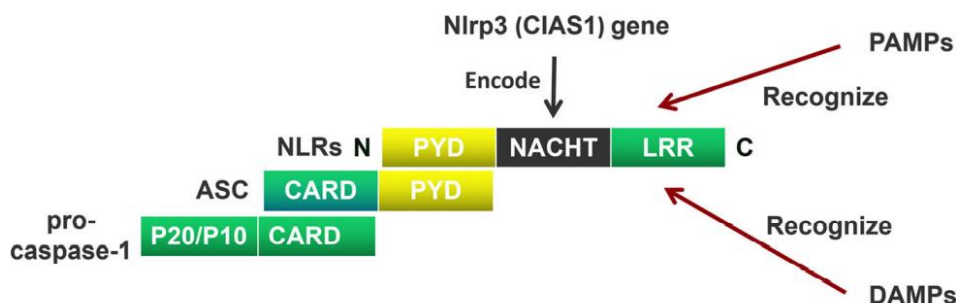
## 1.7 NLRP3 φλεγμονόσωμα, καρδιακή ίνωση και ανεπάρκεια

Εκτός από την δράση της γαλεκτίνης-3, ένα άλλο μοριακό μονοπάτι μπορεί να παίζει ρόλο στην φλεγμονή και την προοδευτική ανάπτυξη της καρδιακής ανεπάρκειας στο μοντέλο *des<sup>-/-</sup>* και αυτό είναι το φλεγμονόσωμα και το συστατικό του NLRP3. Για το σχηματισμό του φλεγμονοσώματος απαιτείται η διέγερση ενός υποδοχέα αναγνώρισης σήματος (PRR, pattern recognition receptor) που αντιδρά στο κυτταρόπλασμα με κατάλληλα σήματα κινδύνου (ενδογενή DAMPs, αλλά και εξωγενή PAMPs). Υπάρχουν τέσσερις κύριοι υποδοχείς PRR, μέλη φλεγμονοσωμάτων. Η πρωτεΐνη του υποδοχέα τύπου NOD 3 (NLRP3, NOD-like receptor protein 3), η πρωτεΐνη του υποδοχέα τύπου NOD 1 (NLRP1, NOD-like receptor protein 1), ο υποδοχέας τύπου NOD C4 (NLRC4, NOD-like receptor C4) και το AIM2 (Absent In Melanoma 2). Το NLRP3 είναι όχι μόνο το καλύτερα μελετημένο φλεγμονόσωμα, αλλά και αυτό που αφορά τη λεγόμενη στείρα φλεγμονή, δηλαδή φλεγμονή απουσία εξωγενούς μικροβιακού παράγοντα. Αυτό είναι σημαντικό γιατί στην περίπτωση του μοντέλου *des<sup>-/-</sup>* (αλλά και των μοντέλων επαγωγής καρδιακής δυσλειτουργίας μετά από MI) η φλεγμονή του μυοκαρδίου επάγεται από προσβολή του ιστού λόγω θανάτου των καρδιομυοκυττάρων απουσία εξωγενούς μικροβιακού παράγοντα.

Το NLRP3 φλεγμονόσωμα είναι ένα ενδοκυτταρικό μακρομοριακό σύμπλοκο που σχηματίζεται από τη σύνδεση και τον πολυμερισμό εκτός της πρωτεΐνης NLRP3, του προσαρμογέα (adaptor) ASC και της προ-κασπάσης-1 και περιλαμβάνει και μια σειρά άλλων μορίων.

Ο NLRP3 είναι ένας υποδοχέας τύπου NOD (NLR) και αποτελείται από μία καρβοξυτελική περιοχή πλούσια σε κατάλοιπα λευκίνης (LRR) και μία αμινοτελική περιοχή PYD (pyrin domain) οι οποίες περιβάλλουν μία περιοχή NACHT [59], [60]. Το καρβοξυτελικό τμήμα είναι η διαμεμβρανική περιοχή του υποδοχέα που αναγνωρίζει σήματα κινδύνου ενδογενούς (DAMPs) αλλά και μικροβιακής προέλευσης (PAMPs) ενώ το αμινοτελικό τμήμα είναι αυτό που αλληλεπιδρά με την

πρωτεΐνη ASC μέσω των περιοχών PYD [61]. Ο προσαρμογέας ASC αλληλεπιδρά με την σειρά του με την προ-κασπάση 1 μέσω των CARD περιοχών και σχηματίζεται τελικά το σύμπλοκο (Σχήμα 9).



**Σχήμα 9.** Μοριακά στοιχεία των υποδοχέων τύπου NOD (NLRs) και κύριες αλληλεπιδράσεις των περιοχών του NLRP3, ASC και προ-κασπάσης1 που οδηγούν στο σχηματισμό του NLRP3 φλεγμονοσώματος [62]

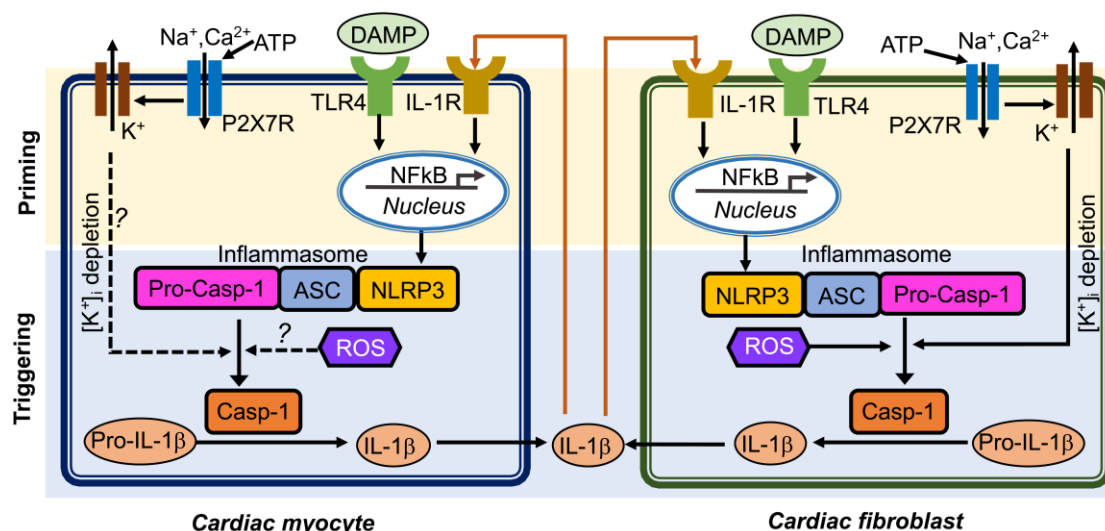
Η ενεργοποίηση του συμβαίνει σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο (priming) ένα αρχικό ερέθισμα σχετιζόμενο με τη φλεγμονή ενεργοποιεί τη μετάδοση σήματος μέσω των υποδοχέων TLR (κυρίως τον TLR4) και του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ και επάγει την έκφραση των πρόδρομων μορφών της ιντερλευκίνης-1β και -18 (IL-1β, IL-18). Στο δεύτερο στάδιο σήματα από DAMPs και PAMPs οδηγούν στην ενεργοποίηση του NLRP3 και στο σχηματισμό του συμπλόκου. Όταν το NLRP3 ενεργοποιείται, η πρωτεΐνη ASC προσελκύει την προ-κασπάση-1 προκειμένου να σχηματιστεί το φλεγμονόσωμα. Στην συνέχεια η προ-κασπάση-1 υδρολύεται σε ενεργή κασπάση-1 η οποία με την σειρά της υδρολύει τις πρόδρομες κυτταροκίνες pro-IL-1β και pro-IL-18 [61]. Η IL-1β αφού ενεργοποιηθεί εξέρχεται στο εξωκυττάριο περιβάλλον όπου προσελκύει (χημειοτακτικά) και ενεργοποιεί ανοσοκύτταρα, όπως ουδετερόφιλα, στο σημείο της μόλυνσης ή του κατεστραμμένου ιστού, επάγοντας έτσι μία φλεγμονώδη αντίδραση.

Η ενεργοποίηση του NLRP3 φλεγμονοσώματος διεγείρεται από μία ποικιλία ερεθισμάτων που μπορεί να είναι εξωκυττάρια (πχ. αυξημένα επίπεδα ATP, θραυσμάτων υαλουρονικού κ.α.) ή ενδοκυττάρια (π.χ. αλλαγές στην συγκέντρωση οξειδωτικών ROS [61], παρουσία οξειδωμένου μιτοχονδριακού DNA, συσσώρευση ενδοκυττάρια ασβεστίου [63] ή ακόμα και ρήξη των λυσοσωμάτων [61], [64]). Η πολυπλοκότητα των μονοπατιών που εμπλέκονται συμπεριλαμβανομένης της αναστολής της αυτοφαγίας [65], δεν έχει ακόμη εξηγηθεί επαρκώς. Η μείωση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης καλίου φαίνεται πάντως να αποτελεί μια κοινή παράμετρο [66], [67] και αναπαράγεται *ex vivo* με την προσθήκη nigericin για την επαγωγή του σχηματισμού φλεγμονοσώματος στα κύτταρα. Εξίσου αποτελεσματική είναι και η προσθήκη ATP στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας. Σημειωτέων ότι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στα συστατικά του συμπλόκου όπως η ουβικουιτίνωση, η φωσφορυλίωση, η αποουβικουιτίνωση και η αποφωσφορυλίωση είναι επίσης απαραίτητες για να μπορέσει να σχηματιστεί το σύμπλοκο.



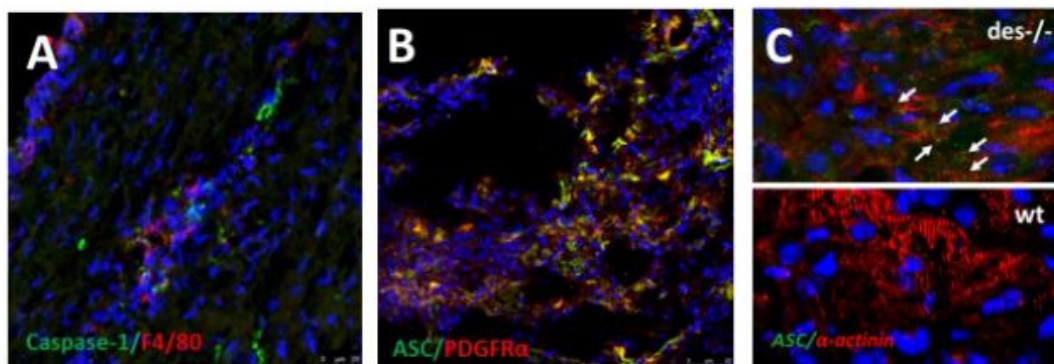
Το τελικό αποτέλεσμα του σχηματισμού του φλεγμονοσώματος είναι η απελευθέρωση των φλεγμονωδών κυτταροκινών IL-1 και IL-18 από το κύτταρο μέσω δημιουργίας πόρων στην μεμβράνη του που μπορεί να οδηγήσουν και στο θάνατο αυτού καθ' αυτού του κυττάρου από πυρόπτωση.

Το NLRP3 εκφράζεται στα μακροφάγα και άλλα ανοσοκύτταρα, καθώς και σε κύτταρα μεσεγχυματικής προέλευσης όπως τα ενδοθηλιακά κύτταρα και οι ινοβλάστες, αλλά και παράγωγα των τελευταίων όπως οι μυοϊνοβλάστες. Ο σχηματισμός του φλεγμονοσώματος είναι κατ' εξοχήν φαινόμενο των μακροφάγων, αλλά στην τραυματισμένη καρδιά φαίνεται να ενεργοποιείται τόσο σε καρδιομυοκύτταρα [68], [69] όσο και σε ινοβλάστες [70], [71]. Η απελευθέρωση των φλεγμονωδών κυτταροκινών και από τους δύο αυτούς κυτταρικούς τύπους μπορεί να μεσολαβεί στην παρακρινή αλληλεπίδραση τους και να συνεισφέρει στην παθοφυσιολογία της καρδιάς (Σχήμα 10). Πράγματι, το NLRP3 φλεγμονόσωμα έχει βρεθεί ότι συμμετέχει στη ρύθμιση της παθογένεσης ενός αριθμού καρδιαγγειακών παθήσεων, όπως το MI, η αυξημένη υπέρταση [72], και η κολπική μαρμαρυγή [73].



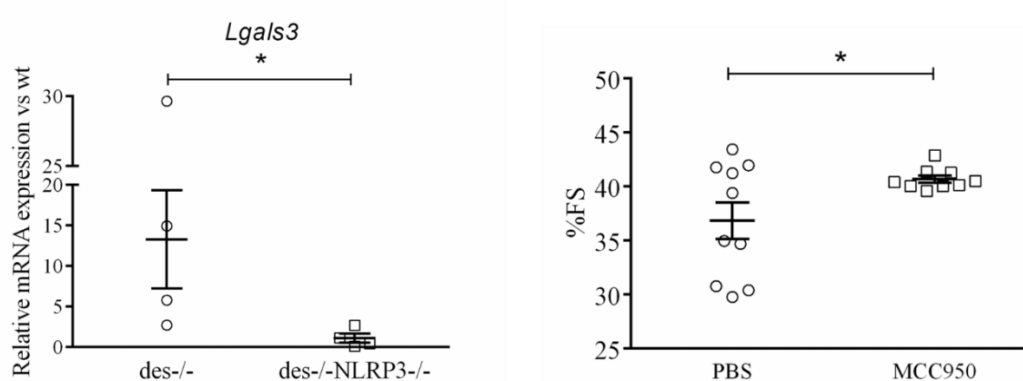
**Σχήμα 10.** Μηχανισμοί ενεργοποίησης και σχηματισμού NLRP3 φλεγμονοσώματος σε καρδιομυοκύτταρα και καρδιακούς ινοβλάστες και πιθανή αλληλεπίδραση τους κατά την καρδιακή φλεγμονή και ίνωση. Από [74]

Στο μοντέλο *des*<sup>-/-</sup>, υπάρχουν ενδείξεις ενεργοποίησης του φλεγμονοσώματος αφού παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα RNA έκφρασης των NLRP3, ASC, προ-κασπάσης-1 και ιντερλευκίνης-1 σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου [75]. Επιπλέον μελέτες ανοσοφθορισμού υποδεικνύουν την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος τόσο σε μακροφάγα, όσο και σε ινοβλάστες και καρδιομυοκύτταρα *des*<sup>-/-</sup> ποντικών (Σχήμα 11).



**Σχήμα 11.** Πειράματα ανοσοφθορισμού σε καρδιές  $des^{-/-}$  ποντικών που δείχνουν την έκφραση κασπάσης-1 (πράσινο) σε μακροφάγα ( $F4/80^{+}$ , κόκκινο) (A), καθώς και ASC (πράσινο) και χαρακτηριστικών δομών (ASC specks) του σχηματισμένου φλεγμονοσώματος (λευκά βέλη) σε ινοβλάστες ( $PDGFR\alpha^{+}$  κόκκινο) (B) και μέσα σε καρδιομυοκύτταρα ( $\alpha$ -actinin<sup>+</sup>, κόκκινο) (C). Η έκφραση ASC και οι χαρακτηριστικές δομές ASC specks δεν παρατηρούνται σε wt καρδιές. Τροποποιημένο από [76]

Για να διαπιστωθεί η σημασία του σχηματισμού του φλεγμονοσώματος στο συγκεκριμένο μοντέλο, τα ποντίκια  $des^{-/-}$  διασταυρώθηκαν από το εργαστήριο Ψαρρά με ποντίκια με έλλειψη NLRP3 ( $NLRP3^{-/-}$ ) και μελετήθηκαν βασικά χαρακτηριστικά της παθοφυσιολογίας της καρδιάς. Τα μέχρι στιγμής αποτελέσματα [77], έδειξαν ότι υπάρχει μείωση της έκφρασης γαλεκτίνης-3 σε ποντίκια με διπλή έλλειψη δεσμίνης και NLRP3 ( $des^{-/-}NLRP3^{-/-}$ ), που όπως αναφέρθηκε παραπάνω είναι μεσολαβητής της καρδιακής ίνωσης και δυσλειτουργίας στο μοντέλο αυτό (Σχήμα 12). Επιπλέον η χορήγηση του ειδικού αναστολέα του NLRP3 φλεγμονοσώματος MCC950 [78] σε ποντίκια  $des^{-/-}$  βελτίωσε την καρδιακή λειτουργία σε νεαρά  $des^{-/-}$  ποντίκια (Σχήμα 12). Τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι το φλεγμονόσωμα και το συστατικό του NLRP3 συνεισφέρουν στην παθοφυσιολογία του μυοκαρδίου στο γενετικό αυτό μοντέλο καρδιακής ανεπάρκειας. Η διαφαινόμενη ενεργοποίηση της μοριακής αυτής πλατφόρμας σε καρδιομυοκύτταρα, ινοβλάστες, αλλά και μακροφάγα στην  $des^{-/-}$  καρδιά υποδεικνύει ότι μπορεί να μεσολαβεί σε κυτταρικές αλληλεπιδράσεις καθοριστικές για την καρδιακή αναδιαμόρφωση και λειτουργία [79], [80]. Η περαιτέρω ανάλυση των στοιχείων της δυσμενούς αναδιαμόρφωσης στα  $des^{-/-}NLRP3^{-/-}$  και των χαρακτηριστικών αλληλεπιδράσεων των μακροφάγων και ινοβλαστών είναι απαραίτητη για την κατανόηση και εξειδίκευση των επιμέρους μηχανισμών.



**Σχήμα 12. NLRP3 φλεγμονόσωμα και *des*<sup>-/-</sup> καρδιά.**

Μείωση των επιπέδων RNA έκφρασης γαλεκτίνης-3 (*Lgals3*) και βελτίωση καρδιακής λειτουργίας (υψηλότερο %FS) σε *des*<sup>-/-</sup> ποντίκια με ταυτόχρονη έλλειψη NLRP3 ή μετά από χορήγηση του αναστολέα MCC950 του σχηματισμού του NLRP3 φλεγμονοσώματος. Τροποποιημένο από [76]

## 1.8 Αλληλεπιδράσεις NLRP3 φλεγμονοσώματος και γαλεκτίνης-3

Με δεδομένη την κρίσιμη μεσολάβηση της γαλεκτίνης-3 στην καρδιακή αναδιαμόρφωση και δυσλειτουργία του *des*<sup>-/-</sup> καθώς και της διαφαινόμενης συμμετοχής του NLRP3 φλεγμονοσώματος στην καρδιακή φλεγμονή αλλά και παθοφυσιολογία του ίδιου μοντέλου προκαλούν ιδιαίτερο ενδιαφέρον ορισμένες ενδείξεις αλληλεπίδρασης των δύο αυτών μονοπατιών σε καταστάσεις ιστικής φλεγμονής και αναδιαμόρφωσης, όπως προκύπτει από τη μελέτη της βιβλιογραφίας.

Συγκεκριμένα, παλαιότερες μελέτες υποδείκνυαν ότι η απελευθέρωση IL1 από τα μονοκύτταρα ρυθμίζεται από την γαλεκτίνη-3 [81]. Νεώτερα δεδομένα επιβεβαίωσαν αυτή τη σχέση αφού η γαλεκτίνη-3 βρέθηκε ότι παίζει ρόλο στην επαγόμενη από DSS (dextran sulphate sodium) ελκώδη κολίτιδα στο ποντίκι προάγοντας την ενεργοποίηση του NLRP3 φλεγμονοσώματος και την παραγωγή IL-1β στα μακροφάγα [82]. Η φλεγμονή λόγω της IL-1β των μακροφάγων περιορίστηκε και η κολίτιδα ήταν ηπιότερη σε *Lgals3*<sup>-/-</sup> ποντίκια ή μετά από φαρμακολογική αναστολή της γαλεκτίνης-3 σε wt ποντίκια. Αντίστροφα, μεταφορά wt μακροφάγων στα *Lgals3*<sup>-/-</sup> ποντίκια οδήγησε σε DSS-κολίτιδα αυξημένης δραμύτητας. Μέρος της προστασίας από τη φλεγμονή που προέκυψε κατά την έλλειψη της γαλεκτίνης-3 αποδόθηκε στην ευνοϊκότερη επαγωγή εναλλακτικής ενεργοποίησης (M2) στα *Lgals3*<sup>-/-</sup> μακροφάγα [82].



Επίσης, η γαλεκτίνη-3 φαίνεται ότι μπορεί να επάγει τον ολιγομερισμό της πρωτεΐνης-προσαρμογέα ASC οδηγώντας στην στρατολόγηση των μορίων του NLRP3-ASC-CASP1 συμπλόκου και στην παραγωγή IL-1 $\beta$  σε μακροφάγα από μυελό των οστών και στον πνεύμονα μετά από μόλυνση του ιού H5N1 στα μακροφάγα [83]. Η γαλεκτίνη-3 και η ικανότητα της να εντοπίζεται ενδοκυτταρικά σε παθολογικά λυσοσώματα οδηγεί στην επαγωγή φλεγμονοσώματος σε μικρογλοιακά κύτταρα -που αντιστοιχούν στα μακροφάγα του εγκεφάλου- σε μοντέλο νευροεκφυλιστικής νόσου [84], αλλά μπορεί να επάγει και ενδοκυτταρικά την ενεργοποίηση της μοριακής αυτής πλατφόρμας με εναλλακτική (non canonical) οδό που εμπλέκει τις κασπάσες 4 και 11 [84].

Υπάρχει όμως και η αντίστροφη σχέση μεταξύ των δύο αυτών μορίων και μάλιστα φαίνεται ότι ο σχηματισμός του φλεγμονοσώματος μπορεί να διευκολύνει τη βιολογική δράση της γαλεκτίνης-3. Τα μονοπάτια έκκρισης της γαλεκτίνης-3 περιλαμβάνουν εναλλακτικούς τρόπους καθότι ανήκει στην ομάδα των πρωτεϊνών που δεν διαθέτει συμβατική εκκριτική (secretory) αλληλουχία και χρειάζονται ενεργοποίηση της κασπάσης-1 [85]. Αντίστοιχα, ένα σημαντικό συστατικό του φλεγμονοσώματος, η gasdermin D, απαραίτητη για την δημιουργία πόρων στην κυτταρική μεμβράνη, την πυρόπτωση αλλά και την απελευθέρωση της παραγόμενης IL-1 $\beta$ , επιτρέπει την έξοδο της γαλεκτίνης-3 από τα κύτταρα [86].

Θα μπορούσαμε λοιπόν να υποθέσουμε ότι υπάρχει άξονας NLRP3-γαλεκτίνης-3 και η ενεργοποίηση του μπορεί να προάγει την δυσμενή αναδιαμόρφωση, όπως έχει ήδη ανιχνευθεί στην καρδιακή παθοφυσιολογία σε μοντέλο κολπικής μαρμαρυγής [87]. Με παρόμοιο τρόπο θα μπορούσε να συνεισφέρει και στην παθολογία του *des*<sup>-/-</sup> μοντέλου. Ένα σημαντικό εργαλείο για τη διερεύνηση της σημασίας αυτής της αλληλεπίδρασης είναι η δημιουργία ποντικών με διπλή απαλοιφή των δύο μονοπατιών (*Lgals3*<sup>-/-</sup>*NLRP3*<sup>-/-</sup>) και η μελέτη παραμέτρων σχετικών με τη φλεγμονή και την ιστική αναδιαμόρφωση.

## 1.9 Σκοπός της εργασίας

Στην παρούσα μελέτη προσπαθήσαμε να αποσαφηνίσουμε τα μονοπάτια και τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην επιδιόρθωση και αναδιαμόρφωση της καρδιάς μετά από τραυματισμό. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο καρδιακής ανεπάρκειας *des*<sup>-/-</sup>, όπου η προσβολή του καρδιακού ιστού λόγω του θανάτου των καρδιομυοκυττάρων πυροδοτεί μία οξεία φλεγμονώδη απόκριση η οποία συνοδεύεται από αυξημένη εναπόθεση κολλαγόνου, γεγονότα που συνεισφέρουν σημαντικά στην καρδιακή δυσλειτουργία. Μελετήσαμε μόρια που φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην δυσμενή αναδιαμόρφωση τόσο στο *des*<sup>-/-</sup> όσο και σε άλλα ζωικά μοντέλα καρδιακής προσβολής και ανεπάρκειας. Συγκεκριμένα την γαλεκτίνη-3 και το συστατικό NLRP3 του φλεγμονοσώματος. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν επιπλέον του *des*<sup>-/-</sup> και διπλά διαγονιδιακά *des*<sup>-/-</sup>*NLRP3*<sup>-/-</sup> και *des*<sup>-/-</sup>*Lgals3*<sup>-/-</sup> ποντίκια που διέθετε το εργαστήριο.

Γνωρίζοντας ότι η σχέση μακροφάγων-ινοβλαστών είναι σημαντική παράμετρος στις διεργασίες της ιστικής αναδιαμόρφωσης και επιδιόρθωσης χρησιμοποιήσαμε στις

μελέτες μας και καλλιέργειες μακροφάγων και ινοβλαστών που προέρχονται από το μυοκάρδιο, αλλά και το περιτόναιο. Θελήσαμε να διερευνήσουμε περαιτέρω τη συνεισφορά της γαλεκτίνης-3, του NLRP3, αλλά και του NLRP3 φλεγμονοσώματος στην καρδιακή αναδιαμόρφωση, αλλά και την απόκριση των μακροφάγων και των ινοβλαστών. Τέλος, έγιναν οι πρώτες προσεγγίσεις ανίχνευσης της σχέσης γαλεκτίνης-3 και NLRP3/φλεγμονοσώματος στο περιβάλλον αυτό με βάση διπλά διαγονιδιακά  $Lgals3^{-/-}$ /NLRP3 $^{-/-}$  ποντίκια.

Ειδικότερα, τα ερωτήματα στα οποία προσπαθήσαμε να δώσουμε απάντηση στην παρούσα εργασία ήταν τα εξής:

- a) Επηρεάζει η παρουσία γαλεκτίνης-3 την παρακρινή επίδραση των καρδιακών μακροφάγων στην πολλαπλασιαστική ικανότητα των καρδιακών ινοβλαστών;
- b) Επηρεάζει η απουσία του συστατικού NLRP3 του φλεγμονοσώματος στοιχεία της δυσμενούς αναδιαμόρφωσης στα  $des^{-/-}$  ποντίκια; Υπάρχει διαφοροποίηση στα χαρακτηριστικά των μακροφάγων και των ινοβλαστών;
- c) Επηρεάζει η ταυτόχρονη απουσία NLRP3 και γαλεκτίνης-3 στοιχεία της φλεγμονής και της καρδιακής αναδιαμόρφωσης;

## 2. Υλικά και μέθοδοι

### 2.1. Πειραματόζωα

Τα ποντίκια με έλλειψη δεσμίνης ( $Des^{-/-}$ ) προέρχονται από 129/Sv γενετικό υπόβαθρο. Για την δημιουργία ποντικών με διπλή απαλοιφή για τα γονίδια της δεσμίνης και του NLRP3 ( $des^{-/-}$  NLRP3 $^{-/-}$ ), απόγονοι με γονότυπο  $des^{-/-}$  NLRP3 $^{+/+}$  από προηγούμενη διασταύρωση των  $des^{-/-}$  με NLRP3 $^{-/-}$  (C57Bl/6 υποβάθρου) διασταυρώθηκαν μεταξύ τους και προέκυψαν απόγονοι  $des^{-/-}$  NLRP3 $^{-/-}$  και  $des^{-/-}$ , σε μικτό γενετικό υπόβαθρο 129/Sv-C57Bl/6, οι οποίοι και συγκρίθηκαν μεταξύ τους.

Για την δημιουργία ποντικών με διπλή απαλοιφή για τα γονίδια της δεσμίνης και της γαλεκτίνης-3 ( $des^{-/-}$   $Lgals3^{-/-}$ ), διασταυρώθηκαν μεταξύ τους απόγονοι  $des^{-/-}$   $Lgals3^{+/+}$  που προέκυψαν από διασταύρωση  $des^{-/-}$  (μικτού γενετικού υποβάθρου 129/Sv-C57Bl/6) x  $Lgals3^{-/-}$  και γεννήθηκαν ποντίκια  $des^{-/-}$   $Lgals3^{-/-}$  και  $des^{-/-}$  τα οποία συγκρίθηκαν μεταξύ τους.

Για την δημιουργία ποντικών με διπλή απαλοιφή για τα γονίδια της γαλεκτίνης-3 και του Nlrp3 ( $Lgals3^{-/-}$  NLRP3 $^{-/-}$ ), διασταυρώθηκαν μεταξύ τους απόγονοι  $Lgals3^{-/-}$

NLRP3<sup>+/-</sup> που προέκυψαν από προηγούμενη διασταύρωση των Lgals3<sup>-/-</sup> x NLRP3<sup>-/-</sup> και γεννήθηκαν ποντίκια Lgals3<sup>-/-</sup>NLRP3<sup>-/-</sup> και Lgals3<sup>-/-</sup>.

Για τα πειράματα απομόνωσης καρδιακών ινοβλαστών και διηθούντων μακροφάγων χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια 4 εβδομάδων ενώ για την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης σε ολόκληρες καρδιές χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια 4 μηνών. Για τις μετρήσεις μορφομετρίας τα ποντίκια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν επίσης ηλικίας 4 μηνών.

Όλα τα πειραματόζωα φυλάσσονταν σε συνθήκες ελεύθερες παθογόνων στην Πρότυπη Μονάδα Πειραματοζώων του ΙΙΒΕΑΑ. Οι διαδικασίες χειρισμού και φροντίδας των ζώων βρίσκονται σε συμφωνία με σύγχρονα διεθνή πρότυπα [AAALAC και FELASA]. Η αδειοδότηση των πειραμάτων των παρόντων αποτελεσμάτων ήταν στον Σ. Ψαρρά (Αρ. Αδ. 247895 από 08-04-20).

## 2.2. Γενοτύπηση

Προκειμένου να προσδιοριστεί ο γενότυπος του ζώου απομονώνεται ένα μικρό κομμάτι ουράς από το τελικό της τμήμα, το οποίο επωάζεται overnight στους 55°C σε 0,5ml διαλύματος Proteinase K (Tris-HCl pH 7.5 50mM, EDTA pH 8.0 0.1M, SDS 0.5% v/v). Την επόμενη ημέρα προστίθενται 0.5ml διαλύματος φαινόλης/χλωροφορμίου / ισοαμυλικής αλκοόλης σε αναλογία 50/49/1 και τα σωληνάρια τύπου Eppendorf φυγοκεντρούνται στα 14000g για 5 min σε RT. Στην συνέχεια μεταφέρονται 0.4 ml από την υδατική φάση σε ένα καινούργιο Eppendorf στο οποίο ήδη έχουν προστεθεί 0.4 ml χλωροφορμίου και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 14000g για 5 min σε RT. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης μεταφέρονται 0.35 ml υδατικής φάσης σε καινούργιο πάλι Eppendorf το οποίο περιέχει ήδη 35 μl οξικού νατρίου 3M με pH 5.2. Προστίθεται 0.7 ml απόλυτης αιθανόλης η οποία έχει παγώσει στους -20°C και τα σωληνάρια ανακινούνται μέχρι να παρατηρηθεί καταβύθιση DNA. Γίνεται φυγοκέντρηση στα 14000g για 15 min στους 4°C και έπειτα απορρίπτεται το υπερκείμενο με σύριγγα ινσουλίνης 1 ml. Το ίζημα καθαρίζεται με την προσθήκη 0.25 ml 70% αιθανόλης και φυγοκέντρηση στα 14000g για 5 min στους 4°C και αφού αφαιρεθεί ολικά η ποσότητα αιθανόλης με σύριγγα ινσουλίνης 1 ml, εισάγονται 0.2 ml νερού (DNA grade) και το απομονωμένο DNA φυλάσσεται overnight στους 4°C για την γενοτύπηση.

### - Ενίσχυση μέσω PCR

Για την ενίσχυση μέσω PCR, 1 μl απομονωμένου DNA προστίθεται σε διάλυμα που περιέχει την κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος και Taq πολυμεράσης. Στην συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν διαγονιδιακά ποντίκια 3 γενοτύπων (des<sup>-/-</sup>, des<sup>-/-</sup>Lgals3<sup>-/-</sup>, des<sup>-/-</sup>NLRP3<sup>-/-</sup>). Οι ποσότητες των συστατικών του ρυθμιστικού

διαλύματος για την ταυτοποίηση των διαφορετικών γονοτύπων παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα

	N	Lgals3	NLRP3	des
Sample	Stock	1	1	1
Buffer (incl 15Mm Mg)	10x	2.5	2.5	2.5
Mg (MgCl <sub>2</sub> KAPPA KB1001)	25mM	2	5,25	2
dNTPs	25mM	0.25	0.2	0.2
Q (Qiagen 1005485)	5x	5	5	5
Water		10.75	8.05	11.8
Taq (homemade or 5u/μl)		0.5	0.5	0.5

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε γενότυπο είναι:

#### **Galectin-3 KO**

#### **Συγκέντρωση**

IMR7107 (wild type reverse) GAG GAG GGT CAA AGG GAA AG

1 μM

IMR7399 (common) GAC TGG AAT TGC CCA TGA AC

1 μM

IMR8436 (mutant) TCG CCT TCT TGA CGA GTT CT

1 μM

#### Μέγεθος των προϊόντων της PCR (PCR amplicons)

Ενδογενές: 220 bp; Ανασυνδυασμένο: 150 bp

#### Πρόγραμμα ενίσχυσης μέσω PCR

9°C για 3min / 35 κύκλους 94°C για 30sec / 65°C για 30min / 72°C για 30sec και τέλος 1 κύκλος στους 72°C για 5min

#### **NLRP3 KO**

#### **Συγκέντρωση**

16568 (mutant forward) TGC CTG CTC TTT ACT GAA GG

1 μM

16703 (wild type forward) TCA GTT TCC TTG GCT ACC AGA	0.5 $\mu$ M
16704 (common) TTC CAT TAC AGT CAC TCC AGA TGT	1 $\mu$ M

#### Μέγεθος των προϊόντων της PCR (PCR amplicons)

Ανασυνδυασμένο = ~850 bp; Αγρίου τύπου = 666 bp

#### Πρόγραμμα ενίσχυσης μέσω PCR

96°C για 5min / 30 κύκλους 94°C για 1min / 65°C για 1min / 72°C για 1min και τέλος 1 κύκλος στους 72°C για 7min

<b>Desmin KO</b>	<b>Συγκέντρωση</b>
Des null F TGATGTCAGGAGGGCTACA	0.5 $\mu$ M
Des null R CGTCTATCAGGTTGTCACG	1 $\mu$ M
Neo3 (=neoPLB) TCCTCGTGCTTTACGGTATC	0.5 $\mu$ M

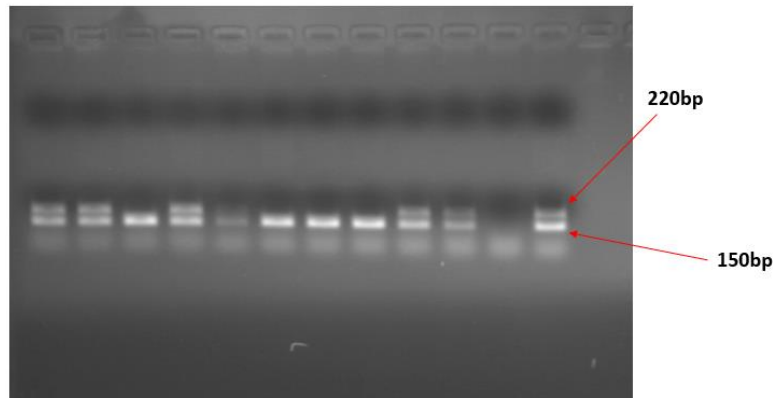
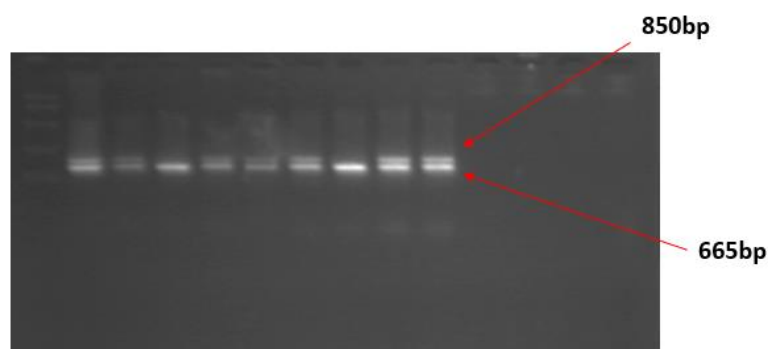
#### Μέγεθος των προϊόντων της PCR (PCR amplicons)

Ενδογενές: 700 bp; Ανασυνδιασμένο: 400 bp

#### Πρόγραμμα ενίσχυσης μέσω PCR

96°C για 5min / 35 κύκλους 94°C για 1min / 60°C για 2min / 72°C για 3min και τέλος 1 κύκλος στους 72°C για 7min

Τα προϊόντα της PCR διαχωρίστηκαν στην συνέχεια με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1.5% που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο προκειμένου να προσδιοριστεί ο γονότυπος κάθε ζώου. Η ταυτοποίηση έγινε με την βοήθεια προϋπάρχοντων δειγμάτων γνωστού γενοτύπου.

**NLRP3****Lgals3**

### **2.3. Απομόνωση ιστών από ποντίκια για μορφολογική και ιστολογική αποτίμηση**

Προκειμένου να προσδιοριστεί η κατάσταση βλάβης του καρδιακού ιστού, απομονώθηκαν ολόκληρες καρδιές από ποντίκια. Τα ποντίκια αφού αναισθητοποιήθηκαν με εισπνοή ισοφλουρανίου, θανατώθηκαν με αυχενική εξάρθρωση. Αφαιρέθηκε η καρδιά από το ζώο και με την βοήθεια σύριγγας έγινε έγχυση αποστειρωμένου PBS έτσι ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια αίματος. Στην συνέχεια αφαιρέθηκαν προσεκτικά τυχόν υπολείμματα άλλων ιστών και η καρδιά ζυγίστηκε και τοποθετήθηκε σε PBS στον πάγο. Οι καρδιές που προορίζονταν για ιστολογική ανάλυση τοποθετήθηκαν έπειτα σε φορμαλίνη για 12-16 ώρες και μετά σε 70% αιθανόλη πριν τοποθετηθούν σε blocks παραφίνης για να κοπούν τομές από τη Μονάδα Ιστολογίας του ΙΙΒΕΑΑ. Οι τομές 5μm που κόπηκαν χρησιμοποιήθηκαν για χρώση αιματοξυλίνης-εωσίνης και Masson's.

Καρδιά, πνεύμονας και νεφρό που απομονώθηκαν από ποντίκια, ξεπλύθηκαν με αποστειρωμένο PBS, ζυγίστηκαν, τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια τύπου Eppendorf και στην συνέχεια παγώθηκαν σε υγρό άζωτο πριν αποθηκευτούν στους -80°C για μελλοντική ανάλυση.

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

Προκειμένου να αξιολογηθεί ο καρδιακός ιστός και να προσδιοριστεί ο βαθμός υπερτροφίας της καρδιάς, τα ποντίκια θανατώνονται και στην συνέχεια ζυγίζονται. Μετά την απομόνωση της καρδιάς και τον προσδιορισμό του βάρους της υπολογίζεται ο λόγος βάρους καρδιάς προς βάρος σώματος (HW/BW). Έπειτα μετριέται και το μήκος της κνήμης του ζώου προκειμένου να υπολογιστεί ο λόγος βάρους καρδιάς προς μήκος κνήμης (HW/TL). Αυξημένη τιμή HW/BW ή HW/TL μαρτυρούν την ύπαρξη υπερτροφίας στο μυοκάρδιο. Και οι δύο λόγοι χρησιμοποιούνται στην ανάδειξη μεταβολών του μεγέθους της καρδιάς, με τον HW/TL να προτιμάται τα τελευταία χρόνια αφού παρακάμπτει την επίδραση ενδεχομένως πρόσκαιρων αυξήσεων του βάρους λόγω πρόληψης τροφής στο ποντίκι.

### **2.3.2. Μέτρηση του λόγου βάρους πνεύμονα προς βάρος σώματος (LW/BW) και βάρους πνεύμονα προς μήκος κνήμης (LW/TL)**

Η αύξηση βάρους του πνεύμονα και του λόγου βάρους πνεύμονα προς βάρος σώματος του ζώου είναι ένα συχνό φαινόμενο που παρατηρείται σε μοντέλα καρδιακής ανεπάρκειας. Για τον προσδιορισμό απομονώνεται ο πνεύμονας (μονόλοβος και πολύλοβος πνεύμονας) καθαρίζεται καλά από τυχόν υπολείμματα αίματος και άλλων ιστών προκειμένου να ζυγιστεί και να υπολογιστούν οι λόγοι LW/BW και LW/TL.

## **2.4. Χρώση Αιματοξυλίνης – Ηωσίνης (H&E)**

Για την χρώση των τομών με Αιματοξυλίνη-Εωσίνη αρχικά πρέπει να γίνει αποπαραφίνωση. Τα πλακάκια τοποθετούνται σε θερμαινόμενη πλάκα στους 60°C για 6-7 λεπτά και μετά εισάγονται σε 2 διαλύματα ξυλλοίου για 10 min στο καθένα. Ακολουθεί προσθήκη των τομών σε διαλύματα μειούμενης συγκέντρωσης αιθανόλης (100% EtOH-5 min/ 95% EtOH-2 min/ 80% EtOH-2 min/ 50% EtOH-2 min), 3 πλύσεις σε νερό βρύσης και εμβάπτιση του ιστού σε διάλυμα αιματοξυλίνης για 30 sec. Ακολουθούν πάλι 3 πλύσεις σε νερό βρύσης, εμβάπτιση σε υδατικό διάλυμα ηωσίνης για 1 min και άλλες 3 πλύσεις. Έπειτα οι ιστοί προστίθενται σε διαλύματα αιθανόλης αυξανόμενης συγκέντρωσης (80% EtOH-30 sec/ 95% EtOH-30 sec/ 100% EtOH-1 min/ 100% EtOH-1 min) και αμέσως μετά εισάγονται σε 2 διαλύματα ξυλλοίου για 3 min στο καθένα. Τέλος οι τομές σφραγίζονται με ειδική κόλλα (Coverquick 4000, VWR) και καλυπτρίδα.



## 2.5. Χρώση masson's Trichrome

Τομές καρδιακού ιστού σε slides βάφτηκαν με τριχρωμική χρώση (Masson's trichrome) προκειμένου να εντοπιστούν οι εναποθέσεις κολλαγόνου. Στο πρώτο στάδιο για την αποπαραφίνωση τα slides τοποθετήθηκαν σε θερμαινόμενη πλάκα στους 60°C για 2-3 min και προστέθηκαν διαδοχικά σε 2 διαλύματα ξυλολίου για 3 min στο καθένα. Στην συνέχεια προστέθηκαν σε 4 διαλύματα αιθανόλης μειούμενης συγκέντρωσης (100% EtOH-3 min/ 95% EtOH-2 min/ 80% EtOH-2 min/ 50% EtOH-2 min) και τελικά ξεπλύθηκαν σε απεσταγμένο νερό. Έπειτα για την χρώση, τα slides προστέθηκαν σε διάλυμα αιματοξυλίνης για 5 sec και αφού ξεπλύθηκαν σε απεσταγμένο νερό προστέθηκαν σε διάλυμα Ερυθρό Mallory για 1 min. Ακολούθησαν 3 πλύσεις σε απεσταγμένο νερό και τα slides εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα φωσφορομολυβδικού οξέος για 2 min. Μετά τοποθετήθηκαν σε μπλε του μεθυλενίου για 1-2 min, ξεπλύθηκαν σε απεσταγμένο νερό και αμέσως μετά καταβυθίστηκαν μια φορά σε οξυνισμένο οινόπνευμα και 2 σε διάλυμα 100% αιθανόλης. Τέλος τα πλακάκια τοποθετήθηκαν πάλι σε 2 διαλύματα ξυλολίου για 4 min στο καθένα και μετά, με την βοήθεια κόλλας (Coverquick 4000, VWR), οι βαμμένες τομές σφραγίστηκαν με καλυπτρίδα.

## 2.6. Ανάλυση και ποσοτικοποίηση ίνωσης με το πρόγραμμα ImageJ

Σε καρδιές οι οποίες είχαν βαφτεί με τριχρωμική χρώση Masson έγινε ποσοτικοποίηση της ίνωσης με την βοήθεια του προγράμματος που είχε αναπτυχθεί στο εργαστήριο στην πλατφόρμα ImageJ [55]. Φωτογραφίες των χρωσμένων τομών πάρθηκαν με την βοήθεια στερεοσκοπίου. Στην συνέχεια με το πρόγραμμα ImageJ ακολούθησε ηλεκτρονική επεξεργασία ώστε να μην συμπεριληφθεί το τμήμα της καρδιάς που περιέχει τα μεγάλα αγγεία και έχει φυσιολογικά εναπόθεση κολλαγόνου. Έπειτα από το menu στο Plugins/Colour functions/Threshold colour προσαρμόσαμε κατάλληλα την απόχρωση (hue) και τον κορεσμό (saturation) έτσι ώστε να απομακρυνθεί το background. Στην συνέχεια από το menu στο Plugins/Macros εγκαταστάθηκε το εξειδικευμένο plug-in με το οποίο προσδιορίστηκε ο αριθμός των pixels που υπάρχουν στην επεξεργασμένη πλέον εικόνα. Πραγματοποιήθηκε ακριβώς η ίδια διαδικασία με την διαφορά ότι με την κατάλληλη προσαρμογή της απόχρωσης και του κορεσμού απέμεινε μόνο στην εικόνα η περιοχή της καρδιάς που εμφανίζει ίνωση. Ακολούθησαν οι ίδιες διαδικασίες για τον προσδιορισμό των pixels. Ο λόγος των τιμών των pixels του ινωτικού προς τον συνολικό ιστό προσδιορίζει το ποσοστό της ίνωσης στην καρδιά.

## 2.7. Απομόνωση RNA από ολόκληρες καρδιές



Οι καρδιές που είχαν απομονωθεί από ποντίκια και είχαν αποθηκευτεί στους  $-80^{\circ}\text{C}$  χρησιμοποιήθηκαν για απομόνωση RNA. Για την απομόνωση στα σωληνάρια τύπου Eppendorf προστίθεται 1ml Trizol και η καρδιά ομογενοποιείται στην μέγιστη ταχύτητα με την χρήση ειδικής συσκευής (OMNI International, TM125-220-05). Μετά από 5 min ηρεμίας, προστίθεται 0.2ml χλωροφορμίου και το σωληνάριο ανακινείται έντονα. Το δείγμα αφήνεται σε RT για 2-3 min και στην συνέχεια φυγοκεντρείται στα 12000xg για 15 min στους  $4^{\circ}\text{C}$ . Έπειτα μεταφέρονται 0.6ml από το υπερκείμενο σε καινούργιο σωληνάριο όπου προστίθενται επίσης 0.5 ml ισοπροπανόλης και 1  $\mu\text{l}$  γλυκογόνου. Μετά από 10 min ηρεμίας σε RT το δείγμα φυγοκεντρείται πάλι στα 12000xg για 10 min στους  $4^{\circ}\text{C}$  και κατόπιν ξεπλένεται με 70% αιθανόλη και επαναφυγοκεντρείται στα 7500xg για 5 min στους  $4^{\circ}\text{C}$ . Η αιθανόλη απομακρύνεται με σύριγγα ισοουλίνης και το απομονωμένο RNA διαλυτοποιείται σε 10  $\mu\text{l}$  υπερκάθαρο νερό (RNA level).

Προκειμένου να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του απομονωμένου RNA, 1  $\mu\text{l}$  από κάθε δείγμα αραιώνεται σε 9  $\mu\text{l}$  νερό και μετριέται η απορρόφηση σε φωτόμετρο Nanodrop.

Παραδείγματα μετρήσεων συγκέντρωσης και καθαρότητας RNA που απομονώθηκε από ολόκληρες καρδιές ποντικών, ηλικίας 4 εβδομάδων

Δείγμα	Συγκέντρωση (ng/ $\mu\text{l}$ )	A260	A280	A260/280	Συνολική συγκέντρωση
SP 3463	1088.9	27.223	14.375	1.89	108.89 $\mu\text{g}$
SP 3466	185.8	46.494	24.79	1.88	185.98 $\mu\text{g}$
SP 3467	2063.5	51.587	27.389	1.88	206.35 $\mu\text{g}$
SP 3554	2627.3	65.683	33.750	1.95	262.73 $\mu\text{g}$
SP 3555	1361.6	34.040	18.090	1.88	136.16 $\mu\text{g}$
SP 3559	2175.3	54.382	28.583	1.9	217.53 $\mu\text{g}$
SP 3560	2168.8	54.221	28.580	1.9	216.88 $\mu\text{g}$

## 2.8. Αντίστροφη μεταγραφή και δημιουργία cDNA

Για κάθε δείγμα σε 10  $\mu\text{l}$  υδατικού διαλύματος που περιέχουν 4 $\mu\text{g}$  RNA προστίθεται 2  $\mu\text{l}$  υδατικού διαλύματος που περιέχει 0.1 $\mu\text{l}$  τυχαίους εκκινητές και 0.5 $\mu\text{l}$  dNTPs και το δείγμα επωάζεται στους  $65^{\circ}\text{C}$  για 10 min. Έπειτα στα δείγματα προστίθεται 8 $\mu\text{l}$  υδατικού διαλύματος που αποτελείται από 4  $\mu\text{l}$  ρυθμιστικού διαλύματος Primescript RT Buffer (Takara), 1  $\mu\text{l}$  αναστολέα RNAσών, και 1  $\mu\text{l}$  αντίστροφης μεταγραφάσης (Takara) και εισάγονται στον κυκλοποιητή όπου επωάζονται σε πρόγραμμα για 10 min στους  $30^{\circ}\text{C}$ , 60 min στους  $42^{\circ}\text{C}$  και 15 min στους  $70^{\circ}\text{C}$ . Τα

δείγματα στην συνέχεια φυλάσσονται στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για να αναλυθούν με Real Time PCR.

## 2.9. Απομόνωση ενήλικων καρδιακών ινοβλαστών

Για την απομόνωση καρδιακών ινοβλαστών από ποντίκια, η καρδιά που έχει απομονωθεί από το ζώο τοποθετείται σε τρυβλίο Petri όπου αφαιρείται η περίσσεια αίματος μέσω εισροής αποστειρωμένου PBS από τα μεγάλα αγγεία με την βοήθεια σύριγγας. Αφού απομακρυνθούν τα αγγεία και οι κόλποι, το υπόλοιπο κομμάτι της καρδιάς τεμαχίζεται και τοποθετείται σε σωληνάριο 50 ml τύπου Falcon με 5 ml διαλύματος κολλαγενάσης [1mg/ml collagenase 2 (LS004176 Worthington), 1mg/ml trypsin (GIBCO, 840-7250IL) σε θρεπτικό μέσο L15 (31415-029 Gibco)]. Στην συνέχεια το διάλυμα αναδεύεται με πλαστική πιπέττα Pasteur και τοποθετείται σε επωαστικό θάλαμο για 8 min, στους  $37^{\circ}\text{C}$  υπό περιστροφή. Η διαδικασία της ανάδευσης και της επώασης επαναλαμβάνεται για ακόμα μία φορά και το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία για 2-3 min/RT. Έπειτα με την πλαστική Pasteur μεταφέρεται το υπερκείμενο σε καινούργιο Falcon και αποθηκεύεται προσωρινά στον πάγο. Στα εναπομείναντα κομμάτια ιστού προστίθενται άλλα 5 ml διαλύματος κολλαγενάσης και υφίστανται άλλους δύο κύκλους ανάδευσης- επώασης όπως παραπάνω. Συλλέγεται πάλι το υπερκείμενο, ενώνεται μαζί με την αρχική ποσότητα και όλο μαζί διηθείται από φίλτρο 70μm και φυγοκεντρείται στα 200xg για 5 min στους  $4^{\circ}\text{C}$ . Το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης μεταφέρεται σε καινούργιο Falcon και φυγοκεντρείται στα 300xg για 5 min στους  $4^{\circ}\text{C}$  ενώ το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 2.5 ml Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM, Lonza, 12-722F) που περιέχει 20% FBS και 1% αντιβιοτικού (gentamycin sulfate). Το υπερκείμενο από την δεύτερη φυγοκέντρωση απορρίπτεται ενώ το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 2.5 ml πλήρους IMDM. Τα επαναδιαλυτοποιημένα pellets (5ml) ενώνονται και τα κύτταρα προστίθενται σε φλάσκα όπου και επώάζονται για 2 hr σε κλίβανο κυτταροκαλλιέργειας ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) έτσι ώστε να προσκολληθούν οι ινοβλάστες. Μετά το πέρας των 2 ωρών το medium αφαιρείται και προστίθεται φρέσκο.

Μόλις οι ινοβλάστες πολλαπλασιαστούν και η επιφάνεια της φλάσκας καλυφθεί με κύτταρα είναι απαραίτητη η ανακαλλιέργεια των κυττάρων προκειμένου να συνεχιστεί η ανάπτυξη της καλλιέργειας. Η ανακαλλιέργεια γίνεται, όταν σχηματιστεί μία πλήρης μονοστοιβάδα, ως εξής: Αφαιρείται το medium, γίνεται πλύση με PBS και προστίθενται 2ml τρυψίνης συγκέντρωσης 1mg/ml (GIBCO). Αφού καλυφθεί με το διάλυμα η επιφάνεια της φλάσκας, αφαιρείται η μεγαλύτερη ποσότητα τρυψίνης και η καλλιέργεια τοποθετείται στους  $37^{\circ}\text{C}$  για περίπου 2 min. Όταν τα κύτταρα ξεκινήσουν να ξεκολλάνε, χτυπάμε ελαφρά την φλάσκα και συλλέγουμε τα κύτταρα σε 10 ml θρεπτικού (DMEM High Glucose 10% FBS). Η ποσότητα των κυττάρων μοιράζεται τώρα σε δύο νέες φλάσκες οι οποίες τοποθετούνται στον επωαστικό για καλλιέργεια. Οι καρδιακοί ινοβλάστες που

απομονώθηκαν στην εργασία αυτήν χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα μετά από 2-3 τέτοιες ανακαλλιέργειες.

## **2.10. Απομόνωση, διαφοροποίηση και πόλωση καρδιακών μακροφάγων**

Για την απομόνωση καρδιακών μακροφάγων, απομονώνεται η καρδιά από τα ποντίκια, καθαρίζεται με PBS, απομακρύνονται τα αγγεία και οι κόλποι, τεμαχίζεται σε μικρά κομμάτια και προστίθεται σε 5ml διαλύματος κολλαγενάσης όπως ακριβώς περιγράφηκε και για την απομόνωση των καρδιακών ινοβλαστών. Έπειτα με μία πλαστική πιπέττα Pasteur το διάλυμα αναδεύεται και επωάζεται για 8 min στους 37°C. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται άλλη μία φορά (ανάδευση-επώαση) και στην συνέχεια συλλέγεται το υπερκείμενο και στα εναπομείναντα κομμάτια ιστού προστίθενται άλλα 5ml τα οποία υφίστανται άλλους δύο κύκλους ανάδευσης-επώασης. Συλλέγεται πάλι το υπερκείμενο και η συνολική ποσότητα διηθείται από φίλτρο 40μm και φυγοκεντρείται στα 300xg για 5 min στους 4°C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται ενώ τα κύτταρα διαλυτοποιούνται σε 1ml Geys buffer όπου και παραμένουν για 5 min στους 4°C για την ρήξη των ερυθροκυττάρων. Μετά από νέα φυγοκέντρηση 300xg/5 min/4°C απορρίπτεται το υπερκείμενο, γίνεται επαναιώρηση σε 5ml DMEM-5% FBS Low Glucose (1 g/l, GIBCO) και μετράται η συγκέντρωση των κυττάρων στο αιώρημα με αιμοκυττόμετρο Neubauer. Η επίστρωση των κυττάρων ( $2 \times 10^5/\text{cm}^2$ ) έγινε σε 24-well plates προεπιστρωμένα με φιμπρονεκτίνη (5μg/ml, 30 min, 37°C). Τα κύτταρα επώαστηκαν για 1 ώρα σε κλίβανο κυτταροκαλλιέργειας για να προσκολληθούν τα μακροφάγα και στην συνέχεια αφαιρέθηκε το medium που περιείχε μη προσκολλούμενα κύτταρα και προστέθηκαν 5 ml φρέσκου DMEM Low Glucose-5% FBS-1% gentamicin.

Στη συνέχεια ακολουθήθηκαν δύο προσεγγίσεις. Είτε το υπερκείμενο (conditioned medium, CM) των μακροφάγων συλλέχθηκε ύστερα από 48 ώρες, είτε τα μακροφάγα ακολούθησαν πρόγραμμα διαφοροποίησης, ακολουθούμενο από πόλωση προς τις καταστάσεις M1 και M2 και 48 ώρες μετά συλλέχθηκε το CM.

Για την διαφοροποίηση του μίγματος άωρων και ώριμων μακροφάγων που απομονώνονται από τον καρδιακό ιστό τα κύτταρα εκτέθηκαν σε διάλυμα low glucose DMEM που περιείχε 50% υπερκείμενο της κυτταρικής σειράς L929, που περιέχει υψηλές ποσότητες M-CSF, ενός αυξητικού παράγοντα που επάγει την διαφοροποίηση των μονοκυττάρων προς μακροφάγα. Μετά από δύο αλλαγές ανά τρεις ημέρες ακολούθησε η διέγερση/πόλωση των μακροφάγων προς M1 ή M2 κατάσταση ενεργοποίησης. Για την M1 διέγερση τα κύτταρα με bacterial lipopolysaccharide (LPS, L2654 Sigma) 100 ng/ml + ανασυνδυασμένη ιντερφερόνη-γ ποντικού (mouse recombinant interferon- $\gamma$ , mrlFN- $\gamma$ , 315-05; Peprotech) 100 ng/ml. Για την M2 διέγερση τα κύτταρα επώαστηκαν με 25 ng/ml ιντερλευκίνη-4 (mrlIL4, Immunotools, 12340043). Στο τέλος και των δύο προσεγγίσεων τα conditioned media συλλέγονται, φυγοκεντρούνται (400xg, 5 min) ώστε να απομακρυνθούν υπολείμματα και νεκρά κύτταρα και αποθηκεύονται στους -20°C μέχρι την χρήση.

### **2.11. Προσδιορισμός του ρυθμού πολλαπλασιασμού των ινοβλαστών με χρώση Crystal Violet**

Οι ινοβλάστες που απομονώθηκαν, καλλιεργήθηκαν και μετά από 2-3 passages επιστρώθηκαν σε πλάκες κυτταροκαλλιέργειας πολλαπλών θέσεων (multiwell plates). Η επιστροφή των κυττάρων έγινε σε 24-well plate σε συγκέντρωση  $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>. Εκεί οι ινοβλάστες παρέμειναν σε Quiescence medium (DMEM High Glucose-0,5% FBS-1% gentamicin) για 24 hr ώστε να συγχρονισθούν στη φάση G0/G1 του κυτταρικού κύκλου. Μετά το πέρας των 24 ωρών αφαιρέθηκε το medium και εκτέθηκαν για 48 hr σε CM μακροφάγων το οποίο είχε αραιωθεί 1:2 σε θρεπτικό DMEM-1% FBS. Μετά τις 48 hr αφαιρέθηκε το medium και έγινε πλύση με PBS. Στην συνέχεια προστέθηκαν στα wells 500μl PBS και 100μl διαλύματος χρωστικής crystal violet (0.65gr Crystal Violet, 25ml Formaldehyde 37%, 25ml Ethanol, 450ml PBS) και επώστηκαν για 30 min σε RT. Αμέσως μετά έγιναν 3 πλύσεις με PBS και το plate έμεινε overnight σε RT να στεγνώσει πριν αποθηκευτεί στους 4°C.

Προκειμένου να προσδιοριστεί η επίδραση που είχε το CM των μακροφάγων στην πολλαπλασιαστική ικανότητα των ινοβλαστών μετά την χρώση έγινε αποχρωματισμός και φωτομέτρηση. Για τον σκοπό αυτόν σε κάθε well προστέθηκαν 250μl διαλύματος αποχρωματισμού (20ml Glacial Acetic Acid, 60ml Methanol, 120ml water) και το plate επωάζεται για 5 min σε RT. Έπειτα η ποσότητα του διαλύματος κάθε well μεταφέρεται σε 96 Elisa plate και φωτομετρείται στα 595 nm (TECAN, SPARK 10M).

### **2.12. Διέγερση μακροφάγων για την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος NLRP3 με ταυτόχρονη προσθήκη του αναστολέα MCC950**

Τα μακροφάγα διεγέρθηκαν για 3 hr με LPS (100ng/ml) παρουσία ορού (DMEM Low Glucose-5% FBS-1% gentamicin). Για την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος προστέθηκε νέο θρεπτικό μέσο (Opti-MEM, Gibco) για την υποστήριξη της βιωσιμότητας των κυττάρων υπό την επίδραση του ATP. Η διέγερση με ATP (5mM) έγινε για 30 min απουσία ορού ενώ για τα πειράματα αναστολής σχηματισμού του NLRP3 φλεγμονοσώματος είχε προηγηθεί επώαση 30 min με 0.1μM MCC950. Μετά τις διεγέρσεις τα κύτταρα παρέμειναν σε θρεπτικό μέσο DMEM Low Glucose (LG)-5% FBS-1% gentamicin για 21 hr και στην συνέχεια αφαιρέθηκε το υπερκείμενο, έγινε πλύση με HBSS και συλλέχθηκαν σε Trizol το οποίο αποθηκεύτηκε στους -20°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση RNA.

### **2.13. Διέγερση ινοβλαστών για την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος NLRP3**

Ινοβλάστες επιστρώθηκαν σε 24-well plates και παρέμειναν σε μέσο εφησυχασμού με υψηλή περιεκτικότητα σε γλυκόζη για 24 hr. Στην συνέχεια εκτέθηκαν για 3 hr σε LPS (100ng/ml) σε DMEM High Glucose (HG)-5% FBS για να ακολουθήσει η διέγερση σχηματισμού φλεγμονοσώματος με ATP όπως και στα μακροφάγα. Στην συνέχεια επωάστηκαν σε φρέσκο DMEM HG-5% FBS medium και μετά από 3 ώρες ή 24 ώρες συλλέχθηκαν σε Trizol.

## 2.14. Απομόνωση RNA από καλλιέργεια κυττάρων

Για την απομόνωση RNA από λύμα κυττάρων το οποίο βρίσκεται σε Trizol, αφήνουμε τα κύτταρα να ξεπαγώσουν για 5 min σε RT, προσθέτουμε 40μl χλωροφορμίου και ανακινούμε έντονα το σωληνάριο. Έπειτα τα κύτταρα επωάζονται για 3 min σε RT και αμέσως μετά φυγοκεντρούνται στα 12000xg για 15 min στους 4°C. Στην συνέχεια μεταφέρονται 110-120μl της υδάτινης φάσης σε καινούργιο σωληνάριο όπου προστίθενται επίσης 100μl ισοπροπανόλης και 1μl γλυκογόνου. Μετά την φυγοκέντρωση αφήνουμε το διάλυμα σε ηρεμία για 10 min/RT, αναποδογυρίζουμε το σωληνάριο και φυγοκεντρούμε πάλι στα 12000xg για 10 min στους 4°C. Τέλος ξεπλένουμε με 75% EtOH, φυγοκεντρούμε για 5 min στα 7500xg/4°C και διαλυτοποιούμε το απομονωμένο RNA σε 10μl υπερκάθαρο H<sub>2</sub>O

Παραδείγματα μετρήσεων nanodrop από RNA wt και d0 ινοβλαστών που διεγέρθηκαν με LPS και ATP για την ενεργοποίηση του NLRP3 φλεγμονοσώματος

Δείγμα	Συγκέντρωση (ng/μl)	A260	A280	A260/280	A260/230	Συνολική συγκέντρωση
wt Fbs C (3hr)	104.5	2.612	1.733	1.51	0.37	10.45 μg
wt Fbs L/A (3hr)	156.8	3.921	2.483	1.58	0.34	15.68 μg
d0 Fbs C (3hr)	99.9	2.497	1.647	1.52	0.26	9.99 μg
d0 Fbs L/A (3hr)	115.3	2.882	1.909	1.51	0.26	11.53 μg
wt Fbs C (24hr)	124.1	3.104	1.983	1.57	0.38	12.41 μg
wt Fbs L/A (24hr)	52.6	1.316	0.821	1.60	0.38	5.26 μg
d0 Fbs C (24hr)	85.1	2.128	1.400	1.52	0.31	8.51 μg
d0 Fbs L/A (24hr)	269	6.724	4.121	1.63	0.36	26.9 μg

Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων ήταν παρόμοιες και χρησιμοποιήθηκε όλη η ποσότητα RNA για την δημιουργία cDNA. Το cDNA χρησιμοποιήθηκε στην συνέχεια

στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR) προκειμένου να προσδιοριστούν τα επίπεδα του mRNA του συστατικού NLRP3 του φλεγμονοσώματος (*Nlrp3*), της ιντερλευκίνης-18 (*Il18*) και του κολλαγόνου τύπου Ια1 (*Col1a1*). Στην αντίδραση χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς αυτό της 3-φωσφορικής αφυδρογονάσης της γλυκεραλδεΐδης (GAPDH). Τα δείγματα προστέθηκαν στο PCR plate αραιωμένα σε νερό 1/16 (0.5 μl δείγματος σε 7.5 μl νερό). Στην συνέχεια προστέθηκε 1μl από κάθε εκκινητή (reverse-forward) και 10μl διαλύματος πολυμεράσης (LightCycler® 480 SYBR Green I Master, Roche).

Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το εξής:

50°C για 2min

95°C για 10min

40x 95°C για 30sec - 60°C για 10min

Τα ζεύγη των primers που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν:

*Nlrp3*: AGCCTTCCAGGATCCTCTTC και CTTGGGCAGCAGTTTCTTTC

*TNFr*: AAGTTCCCAAATGGCCTCCC και ACGACGTGGGCTACAGGCTT

*Il18*: TCAAAGTGCCAGTGAACCCC και GGTCACAGCCAGTCCTCTTAC

*Nppa*: GGGGGTAGGATTGACAGGAT και GCAGAATCGACTGCCTTTTG

*Gata4*: CCCCAATCTCGATATGTTTGA και ATGGCCCCACAATTGACA

*Gapdh*: ATGGTGAAGGTCGGTGTGA και AATCTCCACTTTGCCACTGC

## 2.15. Απομόνωση περιτοναϊκών μακροφάγων

Για την απομόνωση περιτοναϊκών μακροφάγων μετά από ήπια διέγερση (elicited macrophages) έγινε ενδοπεριτοναϊκή ένεση 1ml υδατικού διαλύματος θειογλυκολικού (4% w/v (BD-211716), Μετά την ευθανασία αποκαλύφθηκε το περιτόναιο χορήγήθηκαν 2x 5 ml αποστειρωμένου PBS. Στην συνέχεια με σύριγγα ινσουλίνης 1ml έγινε συλλογή του περιτοναϊκού εκπλύματος το οποίο περιείχε τα μακροφάγα. Με την βοήθεια αιμοκυτταρόμετρου μετρήθηκε η συγκέντρωση των κυττάρων στο έπλυμα και λαμβάνοντας υπόψη τον όγκο (ml) του εκπλύματος που αποκτήθηκε υπολογίσθηκε ο αριθμός των περιτοναϊκών μακροφάγων που απομονώθηκε από κάθε ζώο.

## 2.16. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Graphpad Prism 8. Οι συγκρίσεις για δύο μεταβλητές έγιναν με unpaired t-test, ενώ για περισσότερες μεταβλητές με one-way ANOVA. Τα αποτελέσματα εκφράζονται με τη μορφή μέσος όρος τιμών ± τυπικό σφάλμα (SEM).

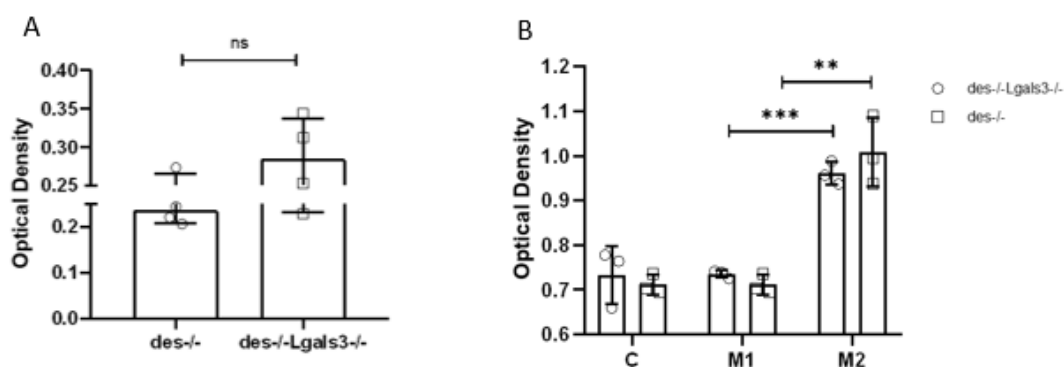


### 3.Αποτελέσματα-Συζήτηση

#### 3.1. Η επίδραση των καρδιακών μακροφάγων και της έλλειψης της γαλεκτίνης-3 στον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών

Προκειμένου να προσδιορίσουμε το πως επηρεάζουν τα καρδιακά μακροφάγα λειτουργίες των ινοβλαστών που ρυθμίζουν την καρδιακή επιδιόρθωση απομονώσαμε τα πλούσια σε μακροφάγα διηθούντα κύτταρα από το μυοκάρδιο *des<sup>-/-</sup>* ποντικών κατά τη φάση της οξείας φλεγμονής (ηλικία των 4 εβδομάδων) [55]. Η απομόνωση αυτή απέδωσε αριθμό κυττάρων ικανό για καλλιέργεια και συλλογή εθισμένου μέσου (CM, conditioned medium) σε ποσότητα επαρκή για τη διεξαγωγή πειραμάτων παρακρινούς επίδρασης σε καρδιακούς ινοβλάστες. Για να επιτευχθούν οι βέλτιστες συνθήκες προσκόλλησης και βιωσιμότητας των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε επιπλέον επίστρωση των πλαστικών της κυτταροκαλλιέργειας με ινωδονεκτίνη. Η συνολική προσέγγιση αν και τεχνικά δυσκολότερη προτιμήθηκε έναντι της συνήθως χρησιμοποιούμενης συλλογής CM από περιτοναϊκά μακροφάγα [57], ώστε να προσεγγίζεται κατά το δυνατόν η πραγματική *in vivo* κατάσταση, όπου καρδιακοί ινοβλάστες εκτίθενται στην επίδραση γειτονικών μακροφάγων [57]. Με δεδομένο ότι η ικανότητα των ινοβλαστών να πολλαπλασιάζονται υποστηρίζει στη φάση αυτή την επιδιόρθωση της καρδιάς στο μοντέλο *des<sup>-/-</sup>* [57], πρωτογενείς καλλιέργειες wt καρδιακών ινοβλαστών εκτέθηκαν σε CM από τα μακροφάγα και αποτιμήθηκε ο ρυθμός πολλαπλασιασμού τους με την φωτομετρική μέθοδο crystal violet.

Για να επιβεβαιώσουμε ότι η παρουσία γαλεκτίνης-3 στα καρδιακά μακροφάγα επηρεάζει αυτή τη δράση, συγκρίθηκε η επίδραση των μακροφάγων από *des<sup>-/-</sup>* καρδιές με αυτήν από *des<sup>-/-</sup>Lgals3<sup>-/-</sup>*. Πράγματι, η απουσία της γαλεκτίνης-3 από τα καρδιακά μακροφάγα οδήγησε σε μικρή μεν αλλά ανιχνεύσιμη αύξηση του πολλαπλασιασμού των ινοβλαστών (Σχήμα 13Α).



**Σχήμα 13.** Η γαλεκτίνη-3 και η παρακρινής επίδραση των μακροφάγων στην πολλαπλασιαστική ικανότητα των ινοβλαστών.

**A.** Αποτίμηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού wt καρδιακών ινοβλαστών που εκτέθηκαν σε CM καρδιακών μακροφάγων τα οποία απομονώθηκαν από des<sup>-/-</sup> Lgals3<sup>-/-</sup> και des<sup>-/-</sup> ποντίκια. Παρατηρείται αύξηση της οπτικής απορρόφησης crystal violet, αντανakλώντας τον αυξημένο τελικό αριθμό ινοβλαστών υπό την επίδραση των καρδιακών μακροφάγων χωρίς γαλεκτίνη-3. **B.** Αποτίμηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού wt καρδιακών ινοβλαστών που εκτέθηκαν σε CM καρδιακών μακροφάγων που απομονώθηκαν από des<sup>-/-</sup> Lgals3<sup>-/-</sup> και des<sup>-/-</sup> ποντίκια και ακολούθησαν πρόγραμμα διαφοροποίησης και πόλωσης. Τα μακροφάγα διαφοροποιήθηκαν με M-CSF και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν (πολώθηκαν) προς M1 ή M2. C: control (μη πολωμένα) μακροφάγα. Παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση της οπτικής απορρόφησης crystal violet (\*\*p<0.01 \*\*\*p<0.001) υπό την επίδραση M2 ενεργοποιημένων μακροφάγων.

Σε μια καρδιά με φλεγμονή όπως αυτή του des<sup>-/-</sup> αναμένεται η παρουσία μονοκυττάρων που μπορεί να διαφοροποιούνται προς μακροφάγα σε διάφορα στάδια της φλεγμονής. Για να διαπιστώσουμε την επίδραση αυτής της διαφοροποίησης οι καλλιέργειες εκτέθηκαν για 6 ημέρες σε υπερκείμενο της κυτταρικής σειράς L929 που είναι πλούσιο σε M-CSF. Χρησιμοποιώντας αυτή την προσομοίωση πρωτοκόλλων που ακολουθούνται για την δημιουργία διαφοροποιημένων μακροφάγων από μονοκύτταρα του μυελού των οστών (BMDM, bone marrow-derived macrophages), συλλέχθηκαν CM και επαναλήφθηκαν τα πειράματα πολλαπλασιασμού των ινοβλαστών. Για να διαπιστώσουμε επιπλέον αν η κατάσταση ενεργοποίησης των μακροφάγων αποτελεί μια καθοριστική παράμετρο τα κύτταρα εκτέθηκαν στο τέλος του προγράμματος διαφοροποίησης για επιπλέον 48 ώρες σε IL-4 (M2) ή μίγμα IFN-γ/LPS (M1). Παρατηρήθηκε ότι η παρακρινής δράση των M2 πολωμένων μακροφάγων επάγει τον πολλαπλασιασμό των καρδιακών ινοβλαστών έναντι των μη πολωμένων, ιδιότητα που χάνεται κατά την M1 πόλωση. Επαναλάβαμε το πείραμα με CM από μακροφάγα που απομονώθηκαν από des<sup>-/-</sup> Lgals3<sup>-/-</sup> καρδιές. Η επαγωγή του πολλαπλασιασμού των ινοβλαστών κατά την παρακρινή δράση M2 πολωμένων μακροφάγων παρατηρήθηκε και πάλι, ενώ η M1 πόλωση δεν προκάλεσε διαφορές (Σχήμα 13B). Ο



πολλαπλασιασμός των ινοβλαστών δεν φάνηκε όμως να επηρεάζεται στην περίπτωση αυτή από την απουσία γαλεκτίνης-3.

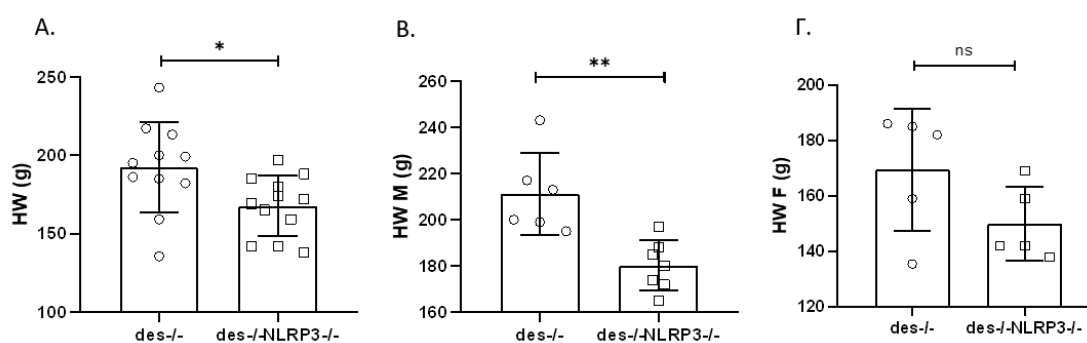
Συμπερασματικά, τα καρδιακά μακροφάγα φαίνεται να επηρεάζουν παρακρινώς τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών με τρόπο που εξαρτάται από την κατάσταση ενεργοποίησης τους. Η παρουσία γαλεκτίνης-3 σε αυτά τα ανοσοκύτταρα μπορεί να αναστέλλει υπό προϋποθέσεις ιδιότητες των ινοβλαστών που σχετίζονται με την καρδιακή επιδιόρθωση.

### 3.2. Η επίδραση του NLRP3 στο μοντέλο $des^{-/-}$

Στη συνέχεια μελετήθηκε η συνεισφορά του φλεγμονοσώματος και του συστατικού του NLRP3 στην ιστική αναδιαμόρφωση και σε στοιχεία καρδιακής επιδιόρθωσης με τη βοήθεια του μοντέλου  $des^{-/-}$ .

#### Μείωση της καρδιακής υπερτροφίας στα $des^{-/-}$ ποντίκια απουσία του NLRP3

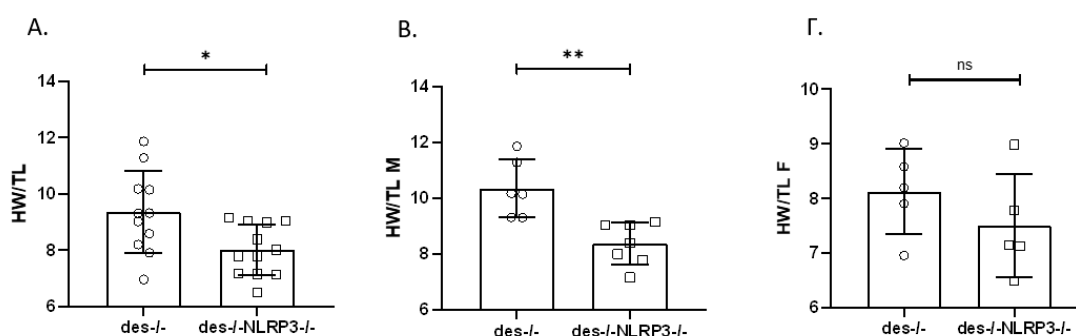
Οι μορφομετρικές μετρήσεις σε ποντίκια  $des^{-/-}$  ηλικίας 4 μηνών που στερούνται το συστατικό του φλεγμονοσώματος NLRP3 ( $des^{-/-}$ NLRP3 $^{-/-}$ ) ανέδειξαν μία στατιστικά σημαντική μείωση του βάρους της καρδιάς σε σχέση με τα  $des^{-/-}$  (Σχήμα 14). Η ανάλυση κατά φύλο επιβεβαίωσε την μείωση του βάρους της καρδιάς στα αρσενικά  $des^{-/-}$ NLRP3 $^{-/-}$  ποντίκια ενώ όσον αφορά στα θηλυκά, παρατηρήθηκε μία τάση μείωσης η οποία ωστόσο δεν ήταν στατιστικά σημαντική.



**Σχήμα 14. Προσδιορισμός του βάρους καρδιάς  $des^{-/-}$  και  $des^{-/-}$ NLRP3 $^{-/-}$  ποντικών, ηλικίας 4 μηνών.** Μειωμένο βάρος καρδιάς παρουσιάζουν τα  $des^{-/-}$ NLRP3 $^{-/-}$  ποντίκια (n=12) σε σχέση με τα  $des^{-/-}$  (n=11) **(Α)**. Το βάρος της καρδιάς εμφανίζεται μειωμένο στα αρσενικά  $des^{-/-}$ NLRP3 $^{-/-}$  ποντίκια (n=7) σε σχέση με το αυτό των  $des^{-/-}$  (n=6) **(Β)**. Στα θηλυκά το βάρος

καρδιάς παρουσιάζει μία τάση μείωσης στα  $des^{-/-}NLRP3^{-/-}$  ( $n=5$ ) συγκριτικά με τα  $des^{-/-}$  ( $n=5$ ) ποντίκια (Γ) . (ns  $p>0.05$  \* $p<0.05$  \*\* $p<0.01$  )

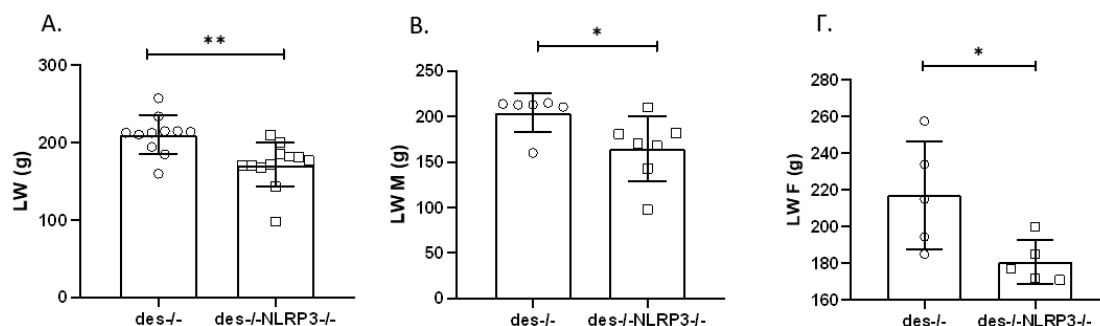
Για να διαπιστωθεί αν οι μεταβολές στο βάρος της καρδιάς αντανakλούν πράγματι μια μειωμένη υπερτροφική απόκριση του  $des^{-/-}$  μυοκαρδίου απουσία NLRP3 οι μετρήσεις κανονικοποιήθηκαν ως προς το μέγεθος του ζώου και μετρήθηκε ο λόγος του βάρους της καρδιάς προς το μήκος της κνήμης (HW/TL). Η βελτίωση του υπερτροφικού φαινοτύπου στα  $des^{-/-}NLRP3^{-/-}$  ποντίκια επιβεβαιώθηκε από τη στατιστικά σημαντική μείωση των τιμών του λόγου HW/TL στο σύνολο των  $des^{-/-}NLRP3^{-/-}$  ποντικών σε σχέση με τα  $des^{-/-}$  (Σχήμα 15). Στην ανάλυση κατά φύλο, επιβεβαιώθηκε η μείωση του λόγου HW/TL στα αρσενικά  $des^{-/-}NLRP3^{-/-}$ , ενώ στα θηλυκά παρατηρήθηκε μία τάση μείωσης η οποία και πάλι δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Σχήμα 15).



**Σχήμα 15. Προσδιορισμός του λόγου βάρους καρδιάς προς μήκος κνήμης σε ποντίκια  $des^{-/-}$  και  $des^{-/-}NLRP3^{-/-}$ , ηλικίας 4 μηνών. (Α)** Βελτίωση της υπερτροφίας παρατηρείται στα  $des^{-/-}NLRP3^{-/-}$  ποντίκια ( $n=12$ ) στα οποία ο λόγος βάρους καρδιάς προς μήκος κνήμης μειώνεται συγκριτικά με τα  $des^{-/-}$  ( $n=11$ ) **(Β)** Ο λόγος αυτός διατηρείται μειωμένος στα αρσενικά  $des^{-/-}NLRP3^{-/-}$  ( $n=7$ ) σε σχέση με τα  $des^{-/-}$  ( $n=6$ ) ενώ **(Γ)** στα θηλυκά υπάρχει μία τάση μείωσης του λόγου HW/TL στα  $des^{-/-}NLRP3^{-/-}$  ( $n=5$ ) σε σχέση τα  $des^{-/-}$  ( $n=5$ ) η οποία δεν είναι στατιστικά σημαντική. (ns  $p>0.05$  \* $p<0.05$  \*\* $p<0.01$  )

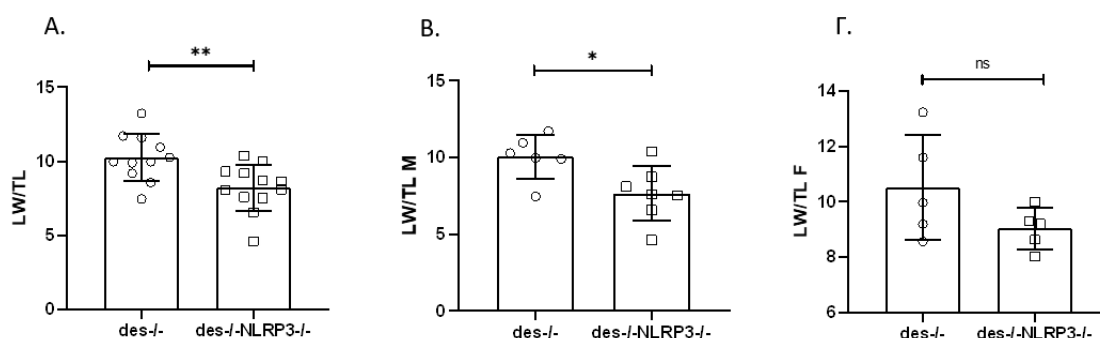
#### Μείωση στο βάρος του πνεύμονα στα $des^{-/-}NLRP3^{-/-}$ ποντίκια

Στο  $des^{-/-}$  μοντέλο εμφανίζει επίσης προβλήματα στους πνεύμονες με αύξηση του λόγου LW/BW (βάρος πνεύμονα/βάρος σώματος) και εμφυσηματικού τύπου αλλοιώσεις και δυσλειτουργία [57]. Παρακολουθήσαμε στοιχεία αυτής της παθολογίας στα  $des^{-/-}NLRP3^{-/-}$  ποντίκια. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι παράλληλα με την μείωση του βάρους της καρδιάς παρατηρείται και μία μείωση στο βάρος του πνεύμονα στα  $des^{-/-}NLRP3^{-/-}$  ποντίκια η οποία ήταν στατιστικά σημαντική τόσο στο σύνολο όσο και ξεχωριστά στα αρσενικά και στα θηλυκά (Σχήμα 16).



**Σχήμα 16. Προσδιορισμός του βάρους του πνεύμονα σε ποντίκια  $des^{-/-}NLRP3^{-/-}$  4 μηνών.** (A) Παρατηρείται μειωμένο βάρος πνεύμονα στα  $des^{-/-}NLRP3^{-/-}$  (n=12) ποντίκια συγκριτικά με τα  $des^{-/-}$  (n=11). Η μείωση αυτή είναι ορατή και (B) στα αρσενικά  $des^{-/-}NLRP3^{-/-}$  (n=7) όταν αυτά συγκρίνονται με τα αρσενικά  $des^{-/-}$  (n=6), αλλά και (Γ) στα θηλυκά  $des^{-/-}NLRP3^{-/-}$  (n=5) σε σχέση με τα θηλυκά  $des^{-/-}$  (n=5). (\* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$ )

Μειωμένος ήταν και ο λόγος βάρους πνεύμονα προς μήκος κνήμης (LW/TL) με στατιστική σημαντικότητα τόσο στο σύνολο όσο και στα αρσενικά ποντίκια ενώ στα θηλυκά η παρατηρούμενη τάση μείωσης δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Σχήμα 17).

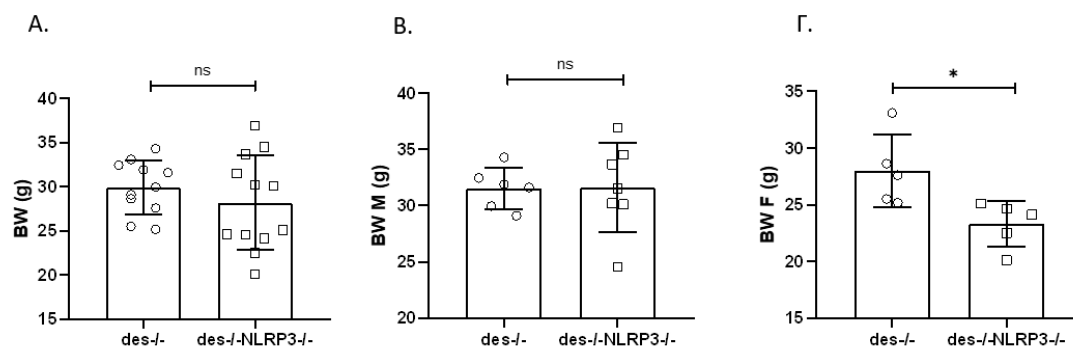


**Σχήμα 17. Λόγος LW/TL σε ποντίκια  $des^{-/-}NLRP3^{-/-}$  4 μηνών.** (A) Ο λόγος βάρους πνεύμονα προς μήκος κνήμης είναι μειωμένος στα  $des^{-/-}NLRP3^{-/-}$  ποντίκια (n=12) σε σχέση με τα  $des^{-/-}$  (n=11). (B) Η ανάλυση κατά φύλο έδειξε επίσης βελτίωση του λόγου στον πνεύμονα των αρσενικών  $des^{-/-}NLRP3^{-/-}$  (n=7) ποντικών σε σχέση με τα  $des^{-/-}$  (n=6) με σημαντική μείωση του λόγου LW/TL ενώ (Γ) παρατηρείται επίσης μία τάση μείωσης του λόγου και στα θηλυκά  $des^{-/-}NLRP3^{-/-}$  (n=5) συγκριτικά με τα  $des^{-/-}$  (n=5) (ns  $p > 0.05$  \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$ )

#### Μείωση του σωματικού βάρους στα θηλυκά $des^{-/-}NLRP3^{-/-}$ ποντίκια

Η μείωση του σωματικού βάρους αποτελεί μια παράμετρο της παθοφυσιολογίας του  $des^{-/-}$  ιδιαίτερα στα ποντίκια μεγάλης ηλικίας (π.χ. ενός έτους). Σε αντίθεση με τις μετρήσεις HW, HW/TL, LW και LW/TL που περιγράφηκαν παραπάνω και υποδεικνύουν την ευεργετική επίδραση της απουσίας του NLRP3 στην παθοφυσιολογία του  $des^{-/-}$  μοντέλου, παρατηρήθηκε μείωση του βάρους του σώματος στα θηλυκά  $des^{-/-}NLRP3^{-/-}$  ποντίκια σε σύγκριση με τα  $des^{-/-}$  (Σχήμα 18). Η μείωση αυτή είναι φυλοεξαρτώμενη καθώς δεν παρατηρήθηκε στα αρσενικά (ούτε

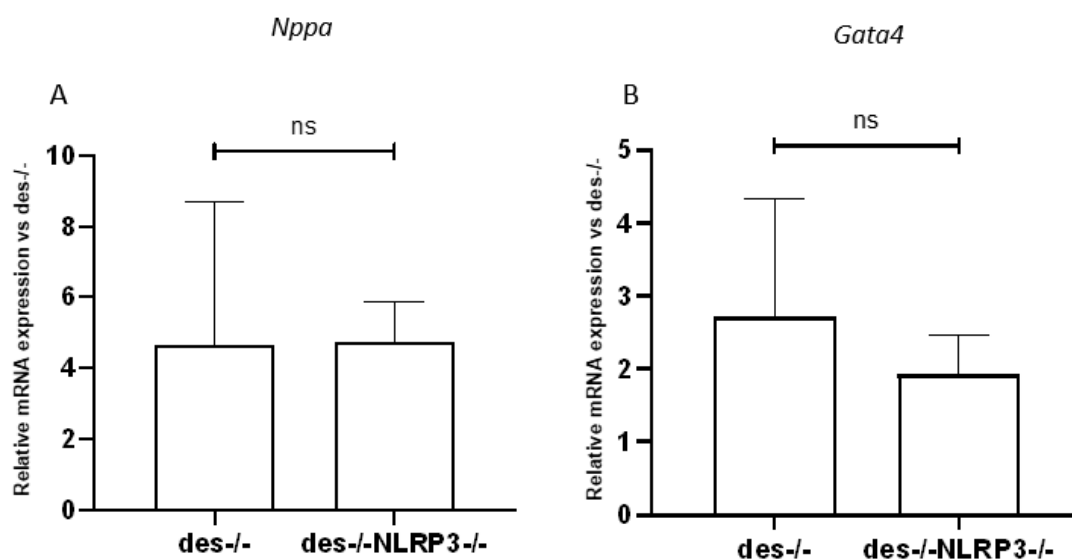
στο σύνολο) και απομένει να μελετηθεί αν αντανακλά κάποιου είδους μεταβολικό πρόβλημα που προκύπτει από την έλλειψη του NLRP3 κατά την πρόοδο της μυοκαρδιοπάθειας του μοντέλου ή αφορά τα NLRP3<sup>-/-</sup> θηλυκά ποντίκια γενικότερα.



**Σχήμα 18. Προσδιορισμός του βάρους του σώματος σε ποντίκια *des*<sup>-/-</sup>NLRP3<sup>-/-</sup> 4 μηνών. (Α)** Στο σύνολο **(Β)** και στα αρσενικά ποντίκια δεν παρατηρείται διαφορά στο BW μεταξύ των *des*<sup>-/-</sup>NLRP3<sup>-/-</sup> και *des*<sup>-/-</sup> ποντικών. Ωστόσο **(Γ)** στα θηλυκά ποντίκια τα *des*<sup>-/-</sup>NLRP3<sup>-/-</sup> παρουσιάζουν μειωμένο βάρος σώματος σε σχέση με τα *des*<sup>-/-</sup>. (ns p>0.05 \*p<0.05)

#### Σύγκριση της RNA έκφρασης των GATA4 και NPPA σε ποντίκια *des*<sup>-/-</sup> και *des*<sup>-/-</sup>NLRP3<sup>-/-</sup>

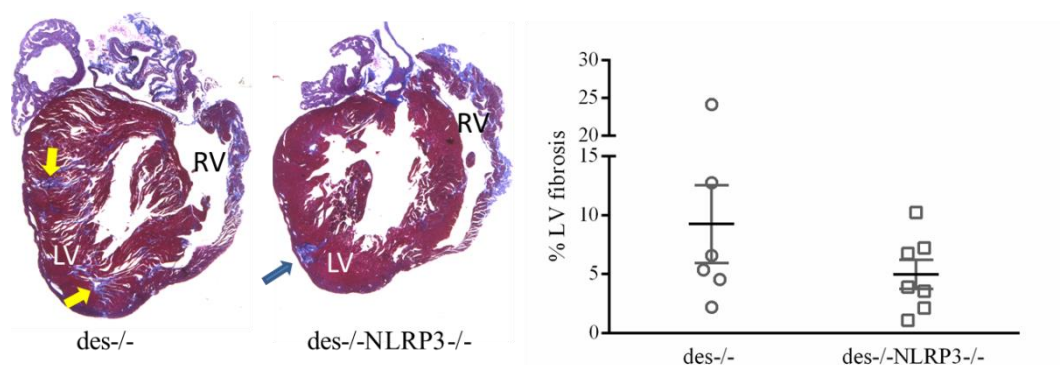
Στη συνέχεια έγινε προσπάθεια να ανιχνευθεί το μοριακό αποτύπωμα της μείωσης της καρδιακής υπερτροφίας στα *des*<sup>-/-</sup>NLRP3<sup>-/-</sup> ποντίκια. Εφόσον η στατιστικά σημαντική βελτίωση του λόγου HW/TL παρατηρήθηκε σε αρσενικά ποντίκια (Σχήμα 15B) μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την καρδιακή υπερτροφία σε ολόκληρες καρδιές αρσενικών *des*<sup>-/-</sup>NLRP3<sup>-/-</sup> και *des*<sup>-/-</sup> ποντικών ηλικίας 4 μηνών. Τα αποτελέσματα της RT-PCR όμως έδειξαν ότι δεν υπήρχε διαφορά στα επίπεδα έκφρασης (Σχήμα 19) του *Nppa* που κωδικοποιεί τον γνωστό βιοδείκτη καρδιακής υπερτροφίας ANF (Atrial natriuretic factor) και υπερκεφράζεται στο *des*<sup>-/-</sup> μυοκάρδιο (Σχήμα 6). Παρόμοια, δεν βρέθηκαν διαφορές ούτε στη έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα GATA4 που εμπλέκεται επίσης στην καρδιακή υπερτροφία (Σχήμα 19). Συνεπώς τα μορφομετρικά αποτελέσματα που υποδεικνύουν βελτίωση της υπερτροφίας δεν επιβεβαιώθηκαν σε μοριακό επίπεδο. Παραμένει το ερώτημα αν η μειωμένη αντίδραση υπερτροφίας συνέβη σε προγενέστερο στάδιο και έπαυσε να είναι ενεργή στο χρονικό σημείο που εξετάσαμε (4 μήνες). Περαιτέρω μελέτη είναι απαραίτητη για την εξήγηση αυτής της μεταβολής.



**Σχήμα 19.** Αποτίμηση έκφρασης (A) του γονιδίου *Nppa* και (B) του γονιδίου *Gata4* σε καρδιές *des*<sup>-/-</sup> (n=3) και *des*<sup>-/-</sup>*NLRP3*<sup>-/-</sup> (n=4), ηλικίας 4 μηνών. (ns p>0.05 )

### 3.3. Επίδραση του NLRP3 στην καρδιακή ίνωση

Στη συνέχεια μελετήθηκε η κυριότερη παράμετρος ιστικής αναδιαμόρφωσης στο μοντέλο καρδιακής ανεπάρκειας *des*<sup>-/-</sup>, η καρδιακή ίνωση. Χρησιμοποιώντας τη χρώση κατά Masson σε ιστολογικές τομές παραφίνης συγκρίθηκαν τα επίπεδα της ίνωσης σε *des*<sup>-/-</sup>*NLRP3*<sup>-/-</sup> και *des*<sup>-/-</sup> ποντίκια ηλικίας 4 μηνών. Η μελέτη που παρουσιάζεται έγινε σε αρσενικά ποντίκια, στο φύλο δηλαδή που παρατηρήθηκε η σημαντική μείωση του λόγου HW/TL. Όπως φαίνεται στο σχήμα 20 απουσία NLRP3 παρατηρούνται ηπιότερες εναποθέσεις κολλαγόνου στην καρδιά. Η σχετική αυτή βελτίωση παρατηρήθηκε κυρίως στο τοίχωμα της αριστερής κοιλίας (LV) ενώ οι βλάβες στο τοίχωμα της δεξιάς κοιλίας ήταν παρόμοιες (Σχήμα 20). Τα επίπεδα της ίνωσης στο τοίχωμα της αριστερής κοιλίας του καρδιακού ιστού ποσοτικοποιήθηκαν με τη χρήση ειδικού λογισμικού που έχει αναπτυχθεί στο εργαστήριο με βάση την πλατφόρμα Image J [55]. Πράγματι το ποσοστό του ινωτικού έναντι του υγιούς ιστού είναι μειωμένο σχεδόν στο μισό στο *des*<sup>-/-</sup>*NLRP3*<sup>-/-</sup> σε σχέση με το *des*<sup>-/-</sup> ( $4.98 \pm 1.21$  έναντι  $9.26 \pm 3.31$ ) (Σχήμα 20). Αν και η διαφορά δεν είναι στατιστικά σημαντική σε αυτό τον αριθμό ζώων, η τάση βελτίωσης είναι εμφανής.



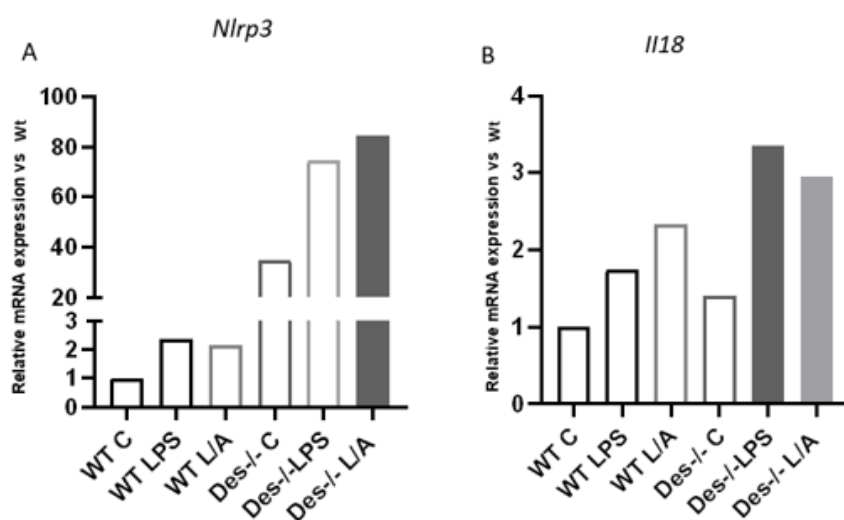
**Σχήμα 20. NLRP3 και καρδιακή ίνωση στο  $des^{-/-}$  μοντέλο.** Αριστερά. Αντιπροσωπευτικές εικόνες από τομές καρδιάς από ποντίκια ηλικίας 4 μηνών με χρώση Masson. Οι ινωτικές εναποθέσεις (μπλε χρώμα) είναι ιδιαίτερα έντονες στο τοίχωμα της δεξιάς κοιλίας (RV) και δεν φαίνεται να διαφέρουν μεταξύ  $des^{-/-}$  και  $des^{-/-}NLRP3^{-/-}$ . Αντίθετα, οι εναποθέσεις στο τοίχωμα της αριστερής κοιλίας (LV) είναι πολυπληθέστερες και πιο εκτεταμένες στο  $des^{-/-}$  (κίτρινα βέλη) σε σύγκριση με το  $des^{-/-}NLRP3^{-/-}$  (μπλε βέλος). Δεξιά. Αποτίμηση ποσοστού ίνωσης στην αριστερή κοιλία με βάση το Image J σε αρσενικά  $des^{-/-}$  ( $n=5$ ) και  $des^{-/-}NLRP3^{-/-}$  ( $n=7$ ) ποντίκια.

### 3.4. Επίδραση NLRP3 φλεγμονοσώματος και καρδιακοί ινοβλάστες στο μοντέλο $des^{-/-}$

Μετά την διαπίστωση της μερικής προστασίας που παρέχει η απουσία NLRP3 σε στοιχεία της δυσμενούς αναδιαμόρφωσης του  $des^{-/-}$  όπως η υπερτροφία και η ίνωση διερευνήσαμε την εμπλοκή του NLRP3 και του φλεγμονοσώματος στα χαρακτηριστικά των καρδιακών ινοβλαστών, των κυττάρων δηλαδή που καθορίζουν την εξέλιξη της ίνωσης. Γνωρίζοντας ότι το NLRP3 φλεγμονόσωμα ενεργοποιείται και δρα όχι μόνο στα μακροφάγα αλλά και στους ινοβλάστες θελήσαμε να διερευνήσουμε την απόκριση των ινοβλαστών στο σχηματισμό του, προσδιορίζοντας τα επίπεδα mRNA του NLRP3 και της εξαρτώμενης από το φλεγμονόσωμα κυτταροκίνης IL-18. Οι ινοβλάστες διεγέρθηκαν με LPS για 3 ώρες συνθήκη που προσομοιάζει *in vitro* την παρουσία φλεγμονής *in vivo*. Για την επαγωγή του NLRP3 φλεγμονοσώματος ινοβλάστες εκτέθηκαν επιπλέον σε ATP για άλλη μισή ώρα. Για να διαπιστώσουμε τη σημασία του φλεγμονώδους  $des^{-/-}$  περιβάλλοντος στους καρδιακούς ινοβλάστες στο πείραμα συμπεριελήφθηκαν εκτός από ινοβλάστες από υγιείς καρδιές (wt ποντίκια) και ινοβλάστες που απομονώθηκαν από  $des^{-/-}$  ποντίκια κατά την φάση της φλεγμονής.

Όπως διακρίνεται στο σχήμα 21 οι ινοβλάστες από  $des^{-/-}$  καρδιές εμφανίσθηκαν να εκφράζουν περίπου 40 φορές περισσότερο το mRNA του συστατικού του φλεγμονοσώματος NLRP3 σε σχέση με τους wt ινοβλάστες. Η έκφραση αυτή αυξήθηκε ακόμα περισσότερο όταν οι ινοβλάστες διεγέρθηκαν είτε μόνο με LPS είτε με LPS και ATP, υπερβαίνοντας τα αρχικά επίπεδα πάνω από 80-φορές. Τα επίπεδα

του mRNA της IL18 εμφανίσθηκαν και αυτά αυξημένα στους *des*<sup>-/-</sup> ινοβλάστες, αν και όχι με τόσο μεγάλη επαγωγή. Η σημαντικότερη παρατήρηση αυτού του πειράματος είναι η ιδιαίτερα αυξημένη έκφραση του NLRP3 στους ινοβλάστες από το *des*<sup>-/-</sup> μυοκάρδιο γεγονός που δημιουργεί τις προϋποθέσεις σχηματισμού ενεργού φλεγμονοσώματος στα κύτταρα αυτά. Επιπλέον υποδεικνύει ότι σε ένα φλεγμονώδες περιβάλλον όπως αυτό του *des*<sup>-/-</sup> μυοκαρδίου οι ινοβλάστες διαδραματίζουν ενεργό ρόλο στην φλεγμονή ενισχύοντας την μέσω της δράσης του φλεγμονοσώματος NLRP3 και των προϊόντων του, οδηγώντας τελικά στην ίνωση.



**Σχήμα 21.** Προσδιορισμός των επιπέδων του mRNA **(Α)** του συστατικού του φλεγμονοσώματος NLRP3 και **(Β)** της IL-18 σε wt και *des*<sup>-/-</sup> ινοβλάστες ηλικίας 4 εβδομάδων, ύστερα από διέγερση με LPS/ATP.

### 3.5. Η σχέση NLRP3 και γαλεκτίνης-3 στη φλεγμονή και την καρδιακή αναδιαμόρφωση

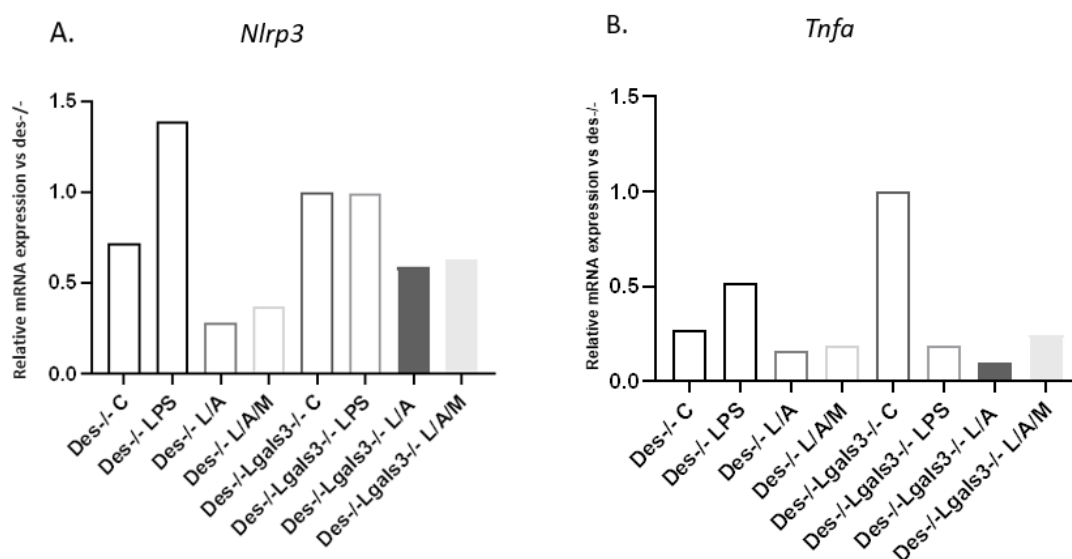
Στο τελευταίο τμήμα του πειραματισμού διερευνήσαμε στοιχεία της αμφίδρομης σχέσης NLRP3 και γαλεκτίνης-3 και την επίδραση της τόσο στο επίπεδο των χαρακτηριστικών των μακροφάγων, όσο και στην ομοιόσταση του καρδιακού ιστού γενικότερα

#### 3.5.1. Επίδραση NLRP3 φλεγμονοσώματος στα καρδιακά μακροφάγα με έλλειψη γαλεκτίνης-3



Τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα γνωρίζουμε ότι επάγουν την φλεγμονή σε περιπτώσεις προσβολής του ιστού εν μέρει και μέσω της δράσης του φλεγμονοσώματος και της παραγωγής φλεγμονωδών παραγόντων που προσελκύουν στην περιοχή ανοσοκύτταρα. Το *des*<sup>-/-</sup>, ουσιαστικά αποτελεί και ένα μοντέλο προσβολής του ιστού (του καρδιακού ιστού σε πρώτο επίπεδο) στη φλεγμονή του οποίου παίζουν σημαντικό ρόλο και τα μακροφάγα με την εκκρινόμενη από αυτά γαλεκτίνη-3, αλλά και το NLRP3 και, πιθανότατα, ο σχηματισμός φλεγμονοσώματος. Για να διαπιστώσουμε αν επαγωγή φλεγμονής (με LPS) και φλεγμονοσώματος (με LPS ακολουθούμενο από ATP) οδηγούν σε ανάπτυξη διαφορετικών χαρακτηριστικών στα μακροφάγα που διηθούν την *des*<sup>-/-</sup> καρδιά διεγείραμε τα αντίστοιχα μακροφάγα με αυτό το σχήμα. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε και ο αναστολέας σχηματισμού του NLRP3 φλεγμονοσώματος MCC950 ώστε να διαπιστωθεί αν η όποια απόκριση οφείλεται στον σχηματισμό του φλεγμονοσώματος ή απλά στην επαγωγή της φλεγμονής. Τέλος χρησιμοποιήθηκαν και μακροφάγα από *des*<sup>-/-</sup>*Lgals3*<sup>-/-</sup> καρδιές για να συγκριθούν οι αποκρίσεις τους που γνωρίζουμε από τις πρόσφατες αναλύσεις ότι οδηγούν σε ηπιότερη φλεγμονή και παθοφυσιολογία στο *des*<sup>-/-</sup> περιβάλλον. Για την αποτίμηση της απόκρισης των μακροφάγων προσδιορίστηκαν τα επίπεδα του mRNA του NLRP3 και της χαρακτηριστικής φλεγμονώδους κυτταροκίνης TNF-α.

Στα μακροφάγα που διηθούν τις *des*<sup>-/-</sup>*Lgals3*<sup>-/-</sup> καρδιές παρατηρήθηκε μια μικρή αύξηση στα επίπεδα έκφρασης του NLRP3 και μια λίγο μεγαλύτερη στα επίπεδα έκφρασης TNFα σε σχέση με μακροφάγα που απομονώθηκαν από *des*<sup>-/-</sup> καρδιές (Σχήμα 22). Μετά από διέγερση με LPS παρατηρήθηκε επαγωγή της έκφρασης RNA του NLRP3 αλλά και του TNFα στα μακροφάγα από *des*<sup>-/-</sup> καρδιά ενώ απουσία γαλεκτίνης-3 παρατηρήθηκε μείωση ή διατήρηση των επιπέδων έκφρασης των μορίων αυτών της φλεγμονής. Ο σχηματισμός του φλεγμονοσώματος ή η αναστολή του οδήγησε σε όλες τις περιπτώσεις σε μείωση των επιπέδων NLRP3 και TNFα. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι δεν αναμένονται ιδιαίτερα μεγάλες διαφοροποιήσεις στα στοιχεία του φλεγμονοσώματος ή γενικότερα της φλεγμονής κατά την περαιτέρω διέγερση των μακροφάγων αυτών, που προέρχονται από ένα ήδη διεγερμένο φλεγμονώδες περιβάλλον, αυτό του *des*<sup>-/-</sup> μυοκαρδίου. Ωστόσο, η αδυναμία έστω και μικρής επαγωγής των μακροφάγων της *des*<sup>-/-</sup>*Lgals3*<sup>-/-</sup> καρδιάς από το LPS υπενθυμίζει τα μειωμένα χαρακτηριστικά φλεγμονής που παρατηρήθηκαν πρόσφατα στο *des*<sup>-/-</sup>*Lgals3*<sup>-/-</sup> μυοκάρδιο [57].



**Σχήμα 22.** Προσδιορισμός των επιπέδων του mRNA **(Α)** του συστατικού του φλεγμονοσώματος NLRP3 και **(Β)** του TNFα σε καρδιακά μακροφάγα από *des*<sup>-/-</sup> και *des*<sup>-/-</sup> *Lgals3*<sup>-/-</sup> ποντίκια ηλικίας 4 εβδομάδων, ύστερα από διέγερση με LPS/ATP παρουσία του αναστολέα MCC950.

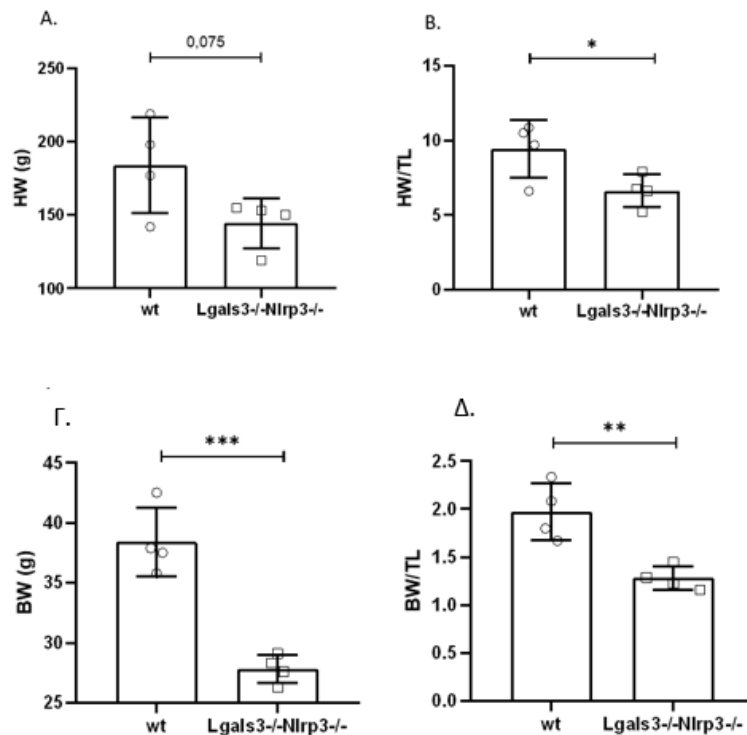
### 3.5.2. Φλεγμονή και καρδιακή ομοιόσταση σε ποντίκια με διπλή έλλειψη γαλεκτίνης-3 και NLRP3. Πρώτες προσεγγίσεις.

Για την περαιτέρω διερεύνηση της σχέσης γαλεκτίνης-3 και NLRP3 δημιουργήθηκαν ποντίκια με διπλή απαλοιφή και των δύο γονιδίων (*Lgals3*<sup>-/-</sup>*NLRP3*<sup>-/-</sup>). Τα ποντίκια επιβίωσαν κανονικά, ήταν γόνιμα και δεν εμφάνισαν ανιχνεύσιμες μεταβολές στα κύρια όργανα τους κατά την παρατήρηση τους στο εργαστήριο από την ομάδα Ψαρρά. Για να ελεγχθούν πιθανά προβλήματα στο μυοκάρδιο έγιναν οι αντίστοιχες μορφομετρικές μετρήσεις και συγκρίθηκαν με αυτές *wt* ποντικών αντίστοιχης ηλικίας και γενετικού υποβάθρου.

Παρά την κατά τα άλλα φυσιολογική εμφάνιση των διπλών διαγονιδιακών *Lgals3*<sup>-/-</sup>*NLRP3*<sup>-/-</sup> ποντικών, παρατηρήθηκε σε αυτά μείωση του βάρους της καρδιάς (HW) αλλά και του λόγου HW/TL (Σχήμα 23). Επίσης μειωμένο εμφανίστηκε και το βάρος του σώματος (BW) καθώς και ο λόγος BW/TL στα ποντίκια *Lgals3*<sup>-/-</sup>*NLRP3*<sup>-/-</sup> (Σχήμα 23).

Αν και ο αριθμός των πειραματοζώων που χρησιμοποιήθηκε είναι μικρός, χρειάζονται περαιτέρω μετρήσεις και μάλιστα με την ομάδα ελέγχου να αποτελείται από απογόνους των ίδιων γεννητόρων (littermates) και όχι από ποντίκια αντίστοιχης ηλικίας (age-matched) ώστε να επιβεβαιωθεί το αποτέλεσμα και να

διερευνηθεί το ενδεχόμενο προβλήματος στην φυσιολογική ανάπτυξη του ζώου και της καρδιάς από την ταυτόχρονη έλλειψη των δύο γονιδίων. .

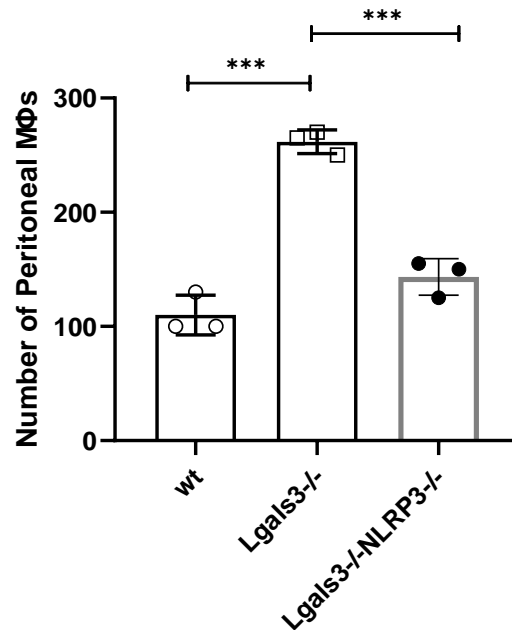


**Σχήμα 23.** Μορφομετρικές μετρήσεις για τον προσδιορισμό (Α) του βάρους της καρδιάς (Β) του λόγου HW/TL (Γ) του βάρους του σώματος και (Δ) του λόγου BW/TL σε ποντίκια wt (n=4) και Lgals3<sup>-/-</sup>NLRP3<sup>-/-</sup> (n=4) ηλικίας 4 εβδομάδων. (\*p<0.05 \*\*p<0.01 \*\*\*p<0.001)

### 3.5.3. Αποτίμηση περιτοναϊκής φλεγμονής

Τα επίπεδα του πληθυσμού των μακροφάγων που προσεκλύονται στο περιτόναιο μετά την χορήγηση θειογλυκολικού αποτελούν και ένα μέτρο της κινητικότητας και ενεργοποίησης των μακροφάγων κατά τη φλεγμονή. Για να διαπιστώσουμε αν η ταυτόχρονη απουσία NLRP3 και γαλεκτίνης-3 επηρεάζει αυτή την παράμετρο απομονώθηκαν περιτοναϊκά μακροφάγα 72 ώρες μετά τη χορήγηση θειογλυκολικού από Lgals3<sup>-/-</sup>NLRP3<sup>-/-</sup> ποντίκια και η προσέλκυση τους στο περιτόναιο συγκρίθηκε με τις αντίστοιχες σε Lgals3<sup>-/-</sup> αλλά και wt ποντίκια. Στα ποντίκια με διπλή έλλειψη NLRP3 και γαλεκτίνης-3 η προσέλκυση των μακροφάγων υστέρησε σε σχέση με τα Lgals3<sup>-/-</sup> ποντίκια (Σχήμα 24) υποδεικνύοντας μια μειωμένη απόκριση στη φλεγμονή. Από την άλλη μεριά, τα επίπεδα των Lgals3<sup>-/-</sup>NLRP3<sup>-/-</sup> μακροφάγων ήταν παρόμοια με των wt (Σχήμα 24) δείχνοντας ότι δεν υπήρξε κάποια μείωση της κινητικότητας των κυττάρων αυτών στη φλεγμονή παρά την ταυτόχρονη απουσία δύο

συστημάτων που την μετάγουν (γαλεκτίνη-3 και NLRP3 φλεγμονόσωμα). Το αποτέλεσμα αυτό που έγινε εδώ με έναν μικρό αριθμό ζώων χρήζει πάντως επιβεβαίωσης και περαιτέρω διερεύνησης. Ιδιαίτερα η σύγκριση *Lgals3*<sup>-/-</sup> και wt περιτοναϊκών μακροφάγων προκαλεί εντύπωση καθώς παλαιότερες μέλετες στο *Lgals3*<sup>-/-</sup> έδειξαν μειωμένη παρουσία ανοσοκυττάρων κατά την ήπια περιτονίτιδα που παρατηρείται μετά τη χορήγηση θειογλυκολικού εξετάζοντας παρόμοια χρονικά σημεία [88], [89].



**Σχήμα 24.** Προσδιορισμός του αριθμού των περιτοναϊκών μακροφάγων από ποντίκια wt, *Lgals3*<sup>-/-</sup> και *Lgals3*<sup>-/-</sup>*NLRP3*<sup>-/-</sup>

## **Συμπεράσματα**

Τα αποτελέσματα μας συνολικά υποδεικνύουν μια καίρια θέση των μακροφάγων και των ινοβλαστών και της αλληλεπίδρασης τους στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης και αναδιαμόρφωσης στην καρδιά. Η κατάσταση ενεργοποίησης των μακροφάγων φάνηκε να παίζει σημαντικό ρόλο με την επαγόμενη από IL-4 διέγερση τύπου M2 να οδηγεί σε διέγερση του πολλαπλασιασμού των ινοβλαστών, ιδιότητα που φαίνεται να υποστηρίζει την καρδιακή επιδιόρθωση σε καταστάσεις προσβολής και εκφυλισμού του μυοκαρδίου όπως αυτή του *des<sup>-/-</sup>* μοντέλου. Από την άλλη μεριά, η δράση μεσολαβητών της δυσμενούς καρδιακής αναδιαμόρφωσης, όπως είναι η γαλεκτίνη-3 στην καρδιά του *des<sup>-/-</sup>*, μπορεί να πραγματοποιείται μέσω της έκκρισης τους από τα καρδιακά μακροφάγα, αφού απουσία γαλεκτίνης-3 φάνηκε να διευκολύνεται η παρακρινής δράση των μακροφάγων στον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών. Από την άλλη μεριά, η πλατφόρμα του NLRP3 φλεγμονοσώματος και αυτό καθαυτό το συστατικό NLRP3, που φαίνεται να υπερεκφράζεται κατά την ενεργοποίηση των ινοβλαστών στο *des<sup>-/-</sup>* μυοκάρδιο, αποτελεί στοιχείο που προάγει την δυσμενή αναδιαμόρφωση, αφού απουσία του μειώθηκε η καρδιακή υπερτροφία, παρατηρήθηκε ισχυρή τάση μείωσης της ίνωσης και υποχώρησε μέρος της συνοδού παθοφυσιολογίας του πνεύμονα στο *des<sup>-/-</sup>* ποντίκι. Τα δύο αυτά μονοπάτια φαίνεται να σχετίζονται, καθώς σε μακροφάγα που απομονώθηκαν από το *des<sup>-/-</sup>* μυοκάρδιο η απουσία της γαλεκτίνης-3 φαίνεται να συγκρατεί την έκφραση όχι μόνο φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως ο TNFα, αλλά και την έκφραση του NLRP3 μετά από επίδραση LPS αλλά και μετά από ενεργοποίηση σχηματισμού του φλεγμονοσώματος.

## **Περίληψη**

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το γενετικό μοντέλο καρδιακής ανεπάρκειας  $des^{-/-}$  αλλά και πρωτογενείς καλλιέργειες καρδιακών ινοβλαστών και μακροφάγων για να μελετηθούν μηχανισμοί της καρδιακής αναδιαμόρφωσης και επιδιόρθωσης. Αναζητώντας την επίδραση των καρδιακών μακροφάγων σε καρδιακούς ινοβλάστες μέσω της παρακρινούς δράσης της γαλεκτίνης-3 βρέθηκε ότι τα μακροφάγα επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών και η παρουσία της γαλεκτίνης-3 μπορεί να αναστείλει επιδιορθωτικές ιδιότητες τους. Η ευεργετική επίδραση των μακροφάγων επιτυγχάνεται σε συνθήκες εναλλακτικής (M2) ενεργοποίησης τους. Στην πορεία μελετήθηκε η συνεισφορά του φλεγμονοσώματος και του συστατικού του NLRP3, που φαίνεται να επάγονται στο  $des^{-/-}$  μοντέλο, στην ιστική αναδιαμόρφωση. Δείχθηκε ότι η απουσία του NLRP3 συστατικού του φλεγμονοσώματος βελτιώνει τον υπερτροφικό φαινότυπο που παρατηρείται στην καρδιά των  $des^{-/-}$  ποντικών, αλλά και στοιχεία της πνευμονικής παθολογίας. Παρατηρήθηκαν επίσης φυλο-εξαρτώμενες μορφομετρικές μεταβολές καθώς η προστατευτική δράση της απουσίας του NLRP3 ήταν ισχυρότερη στα αρσενικά  $des^{-/-}$ NLRP3 $^{-/-}$  ενώ παρατηρήθηκε μείωση του σωματικού βάρους αλλά μόνο στα θηλυκά. Οι καρδιές από  $des^{-/-}$ NLRP3 $^{-/-}$  ποντίκια είχαν μειωμένη εναπόθεση κολλαγόνου ειδικά στο τοίχωμα της αριστερής κοιλίας. Μελέτες που έγιναν σε καρδιακούς ινοβλάστες επιβεβαίωσαν την εμπλοκή των κυττάρων αυτών στην διάδοση και την διατήρηση της φλεγμονής στο  $des^{-/-}$  μυοκάρδιο αφού βρέθηκαν να εκφράζουν αυξημένα επίπεδα mRNA για το NLRP3 και την φλεγμονώση κυτταροκίνη IL-18. Μελετήθηκε επίσης η σχέση NLRP3 και γαλεκτίνης-3. Μακροφάγα από το φλεγμονώδες μυοκάρδιο απουσία γαλεκτίνης-3 ( $des^{-/-}$ Lgals3 $^{-/-}$ ) εμφάνισαν μειωμένο φλεγμονώδες αποτύπωμα αφού μετά από διέγερση με LPS ή επαγωγή του σχηματισμού φλεγμονοσώματος τα επίπεδα RNA του NLRP3 και της φλεγμονώδους κυτταροκίνης TNFα παρέμειναν σταθερά ή μειώθηκαν. Τέλος, παρατηρήθηκαν ορισμένες μορφομετρικές ή φλεγμονώδεις αλλοιώσεις σε ποντίκια Lgals3 $^{-/-}$ NLRP3 $^{-/-}$  που χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης. Συνολικά η έκκριση γαλεκτίνης-3 από τα μακροφάγα και η υπερέκφραση NLRP3 στους ενεργοποιημένους ινοβλάστες του  $des^{-/-}$  μυοκαρδίου μπορεί να αποτελούν κομβικά στοιχεία της αλληλεπίδρασης των δύο αυτών κυτταρικών πληθυσμών κατά την δυσμενή καρδιακή αναδιαμόρφωση που συνοδεύει την αδυναμία του καρδιακού ιστού να επιδιορθωθεί.



## **Abstract**

In the present study a genetic heart failure model, the *des*<sup>-/-</sup> mouse, was used in combination with primary cardiac fibroblast and macrophage cultures to study cardiac repair and remodeling mechanisms. Investigating the effect of cardiac macrophages on cardiac fibroblasts via the paracrine action of galectin-3 it was found that the macrophages affect fibroblast proliferation and that the presence of galectin-3 may inhibit the repair potential of these cells. The beneficial effect was achieved under alternative macrophage activation (M2) conditions. The contribution of inflammasome and its component NLRP3, previously shown to be activated in the *des*<sup>-/-</sup> model, in tissue remodeling was also examined. It was shown that in the absence of NLRP3 the cardiac hypertrophy, morphometrically observed in the *des*<sup>-/-</sup> heart, ameliorates, and the same is true for *des*<sup>-/-</sup> lung pathophysiology parameters. Sex-dependent morphometric changes were also observed as the protective effect of NLRP3 absence was stronger in male *des*<sup>-/-</sup>NLRP3<sup>-/-</sup> mice, while a body weight reduction was observed only in females. In the hearts of *des*<sup>-/-</sup>NLRP3<sup>-/-</sup> mice a reduced collagen deposition was observed, specifically within the left ventricular wall. Further studies in cardiac fibroblasts confirmed their involvement in the propagation and maintenance of inflammation in the *des*<sup>-/-</sup> heart as they were shown to express increased RNA levels of NLRP3 and of the proinflammatory cytokine IL-18. The relation between NLRP3 and galectin-3 was also studied. Macrophages derived from inflamed, galectin3-free myocardia (*des*<sup>-/-</sup>Lgals3<sup>-/-</sup>) were characterized by a weaker inflammatory profile since the RNA levels of NLRP3 or of the proinflammatory TNF $\alpha$  either remained unchanged or were reduced following LPS activation or following inflammasome trigger. Finally, we observed some remarkable morphometry- or inflammation-related changes in double deficient Lgals3<sup>-/-</sup>NLRP3<sup>-/-</sup> mice, which however would need confirmation and further investigation. In all, the macrophage-mediated secretion of galectin-3 and the overexpression of NLRP3 in activated fibroblasts of the *des*<sup>-/-</sup> myocardium may form crucial parameters in the interaction of these cardiac cell populations during the adverse remodeling processes that accompany the inefficient repair of the cardiac tissue.

## **Βιβλιογραφία**

- [1] G. M. G. SA. Mechanic OJ, "Acute Myocardial Infarction.," 2022 May 9. In: *StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan–. PMID: 29083808.*
- [2] B. Ziaeian and G. C. Fonarow, "Epidemiology and aetiology of heart failure," *Nat Rev Cardiol*, vol. 13, no. 6, pp. 368–378, Jun. 2016, doi: 10.1038/nrcardio.2016.25.
- [3] I. M. Seropian, S. Toldo, B. W. van Tassell, and A. Abbate, "Anti-inflammatory strategies for ventricular remodeling following St-segment elevation acute myocardial infarction," *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 63, no. 16. Elsevier USA, pp. 1593–1603, Apr. 29, 2014. doi: 10.1016/j.jacc.2014.01.014.
- [4] N. G. Frangogiannis, "Regulation of the inflammatory response in cardiac repair," *Circulation Research*, vol. 110, no. 1. pp. 159–173, Jan. 06, 2012. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.243162.
- [5] L. Timmers, G. Pasterkamp, V. C. de Hoog, F. Arslan, Y. Appelman, and D. P. V. de Kleijn, "The innate immune response in reperfused myocardium," *Cardiovascular Research*, vol. 94, no. 2. pp. 276–283, May 01, 2012. doi: 10.1093/cvr/cvs018.
- [6] N. G. Frangogiannis, "The immune system and the remodeling infarcted heart: Cell biological insights and therapeutic opportunities," *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, vol. 63, no. 3. Lippincott Williams and Wilkins, pp. 185–195, 2014. doi: 10.1097/FJC.0000000000000003.
- [7] X. Yan *et al.*, "Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction," *J Mol Cell Cardiol*, vol. 62, pp. 24–35, Sep. 2013, doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.04.023.
- [8] S. Toldo and A. Abbate, "The NLRP3 inflammasome in acute myocardial infarction," *Nat Rev Cardiol*, vol. 15, no. 4, pp. 203–214, Apr. 2018, doi: 10.1038/nrcardio.2017.161.
- [9] R. A. de Boer *et al.*, "Towards better definition, quantification and treatment of fibrosis in heart failure. A scientific roadmap by the Committee of Translational Research of the Heart Failure Association (HFA) of the European Society of Cardiology," *Eur J Heart Fail*, vol. 21, no. 3, pp. 272–285, Mar. 2019, doi: 10.1002/ejhf.1406.
- [10] S. L. K. Bowers, I. Banerjee, and T. A. Baudino, "The extracellular matrix: At the center of it all," *J Mol Cell Cardiol*, vol. 48, no. 3, pp. 474–482, Mar. 2010, doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.08.024.
- [11] A. R. Pinto *et al.*, "Revisiting Cardiac Cellular Composition," *Circ Res*, vol. 118, no. 3, pp. 400–409, Feb. 2016, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.307778.
- [12] J. S. Lee *et al.*, "Conventional Dendritic Cells Impair Recovery after Myocardial Infarction," *The Journal of Immunology*, vol. 201, no. 6, pp. 1784–1798, Sep. 2018, doi: 10.4049/jimmunol.1800322.

- [13] S. Epelman *et al.*, “Embryonic and Adult-Derived Resident Cardiac Macrophages Are Maintained through Distinct Mechanisms at Steady State and during Inflammation,” *Immunity*, vol. 40, no. 1, pp. 91–104, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.immuni.2013.11.019.
- [14] G. Bajpai *et al.*, “The human heart contains distinct macrophage subsets with divergent origins and functions,” *Nat Med*, vol. 24, no. 8, pp. 1234–1245, Aug. 2018, doi: 10.1038/s41591-018-0059-x.
- [15] C. Gersch, O. Dewald, M. Zoerlein, L. H. Michael, M. L. Entman, and N. G. Frangogiannis, “Mast cells and macrophages in normal C57/BL/6 mice,” *Histochem Cell Biol*, vol. 118, no. 1, pp. 41–49, Jul. 2002, doi: 10.1007/s00418-002-0425-z.
- [16] M. D. Tallquist, “Cardiac Fibroblast Diversity,” *Annu Rev Physiol*, vol. 82, no. 1, pp. 63–78, Feb. 2020, doi: 10.1146/annurev-physiol-021119-034527.
- [17] P. CAMELLITI, T. BORG, and P. KOHL, “Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts,” *Cardiovasc Res*, vol. 65, no. 1, pp. 40–51, Jan. 2005, doi: 10.1016/j.cardiores.2004.08.020.
- [18] M. Eghbali *et al.*, “Localization of Types I, III and IV Collagen mRNAs in Rat Heart Cells by in situ Hybridization,” 1989.
- [19] I. Komatsubara *et al.*, “Spatially and temporally different expression of osteonectin and osteopontin in the infarct zone of experimentally induced myocardial infarction in rats,” *Cardiovascular Pathology*, vol. 12, no. 4, pp. 186–194, Jul. 2003, doi: 10.1016/S1054-8807(03)00042-5.
- [20] N. Ashizawa *et al.*, “Osteopontin is produced by rat cardiac fibroblasts and mediates A(II)-induced DNA synthesis and collagen gel contraction.,” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 98, no. 10, pp. 2218–2227, Nov. 1996, doi: 10.1172/JCI119031.
- [21] R. van Furth and Z. A. Cohn, “THE ORIGIN AND KINETICS OF MONONUCLEAR PHAGOCYTES,” *Journal of Experimental Medicine*, vol. 128, no. 3, pp. 415–435, Sep. 1968, doi: 10.1084/jem.128.3.415.
- [22] M. Nahrendorf and F. K. Swirski, “Innate immune cells in ischaemic heart disease: does myocardial infarction beget myocardial infarction?,” *Eur Heart J*, vol. 37, no. 11, pp. 868–872, Mar. 2016, doi: 10.1093/eurheartj/ehv453.
- [23] F. Ginhoux and S. Jung, “Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis,” *Nat Rev Immunol*, vol. 14, no. 6, pp. 392–404, Jun. 2014, doi: 10.1038/nri3671.
- [24] T. Heidt *et al.*, “Differential Contribution of Monocytes to Heart Macrophages in Steady-State and After Myocardial Infarction,” *Circ Res*, vol. 115, no. 2, pp. 284–295, Jul. 2014, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.303567.
- [25] A. R. Pinto *et al.*, “Revisiting Cardiac Cellular Composition,” *Circ Res*, vol. 118, no. 3, pp. 400–409, Feb. 2016, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.307778.
- [26] S. Epelman *et al.*, “Embryonic and Adult-Derived Resident Cardiac Macrophages Are Maintained through Distinct Mechanisms at Steady State and during Inflammation,” *Immunity*, vol. 40, no. 1, pp. 91–104, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.immuni.2013.11.019.

- [27] F. K. Swirski, C. S. Robbins, and M. Nahrendorf, "Development and Function of Arterial and Cardiac Macrophages," *Trends in Immunology*, vol. 37, no. 1. Elsevier Ltd, pp. 32–40, Jan. 01, 2016. doi: 10.1016/j.it.2015.11.004.
- [28] T. Heidt *et al.*, "Differential Contribution of Monocytes to Heart Macrophages in Steady-State and After Myocardial Infarction," *Circ Res*, vol. 115, no. 2, pp. 284–295, Jul. 2014, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.303567.
- [29] Y. Ma, A. J. Mouton, and M. L. Lindsey, "Cardiac macrophage biology in the steady-state heart, the aging heart, and following myocardial infarction," *Translational Research*, vol. 191. Mosby Inc., pp. 15–28, Jan. 01, 2018. doi: 10.1016/j.trsl.2017.10.001.
- [30] X. Yan *et al.*, "Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction," *J Mol Cell Cardiol*, vol. 62, pp. 24–35, Sep. 2013, doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.04.023.
- [31] T. Heidt *et al.*, "Differential contribution of monocytes to heart macrophages in steady-state and after myocardial infarction," *Circ Res*, vol. 115, no. 2, pp. 284–295, Jul. 2014, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.303567.
- [32] E. ter Horst, N. Hakimzadeh, A. van der Laan, P. Krijnen, H. Niessen, and J. Piek, "Modulators of Macrophage Polarization Influence Healing of the Infarcted Myocardium," *Int J Mol Sci*, vol. 16, no. 12, pp. 29583–29591, Dec. 2015, doi: 10.3390/ijms161226187.
- [33] F. Cheng and J. E. Eriksson, "Intermediate Filaments and the Regulation of Cell Motility during Regeneration and Wound Healing," *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 9, no. 9, p. a022046, Sep. 2017, doi: 10.1101/cshperspect.a022046.
- [34] H. Herrmann, S. v. Strelkov, P. Burkhard, and U. Aebi, "Intermediate filaments: primary determinants of cell architecture and plasticity," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 119, no. 7, pp. 1772–1783, Jul. 2009, doi: 10.1172/JCI38214.
- [35] L. Chang and R. D. Goldman, "Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk," *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 5, no. 8, pp. 601–613, Aug. 2004, doi: 10.1038/nrm1438.
- [36] Y. Capetanaki, R. J. Bloch, A. Kouloumenta, M. Mavroidis, and S. Psarras, "Muscle intermediate filaments and their links to membranes and membranous organelles," *Exp Cell Res*, vol. 313, no. 10, pp. 2063–2076, Jun. 2007, doi: 10.1016/j.yexcr.2007.03.033.
- [37] L. Chang *et al.*, "The dynamic properties of intermediate filaments during organelle transport," *J Cell Sci*, vol. 122, no. 16, pp. 2914–2923, Aug. 2009, doi: 10.1242/jcs.046789.
- [38] R. Windoffer, M. Beil, T. M. Magin, and R. E. Leube, "Cytoskeleton in motion: the dynamics of keratin intermediate filaments in epithelia," *Journal of Cell Biology*, vol. 194, no. 5, pp. 669–678, Sep. 2011, doi: 10.1083/jcb.201008095.
- [39] F. Dingli, J. B. Parys, D. Loew, S. Saule, and L. Mery, "Vimentin and the K-Ras-induced actin-binding protein control inositol-(1,4,5)-trisphosphate receptor redistribution

- during MDCK cell differentiation,” *J Cell Sci*, vol. 125, no. 22, pp. 5428–5440, Nov. 2012, doi: 10.1242/jcs.108738.
- [40] B.-M. Chung, J. D. Rotty, and P. A. Coulombe, “Networking galore: intermediate filaments and cell migration,” *Curr Opin Cell Biol*, vol. 25, no. 5, pp. 600–612, Oct. 2013, doi: 10.1016/j.ceb.2013.06.008.
- [41] A. v. Schofield and O. Bernard, “Rho-associated coiled-coil kinase (ROCK) signaling and disease,” *Crit Rev Biochem Mol Biol*, vol. 48, no. 4, pp. 301–316, Jul. 2013, doi: 10.3109/10409238.2013.786671.
- [42] N. T. Snider and M. B. Omary, “Post-translational modifications of intermediate filament proteins: mechanisms and functions,” *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 15, no. 3, pp. 163–177, Mar. 2014, doi: 10.1038/nrm3753.
- [43] Y. Capetanaki, S. Papathanasiou, A. Diokmetzidou, G. Vatsellas, and M. Tsikitis, “Desmin related disease: a matter of cell survival failure,” *Curr Opin Cell Biol*, vol. 32, pp. 113–120, Feb. 2015, doi: 10.1016/j.ceb.2015.01.004.
- [44] E. Lazarides and B. D. Hubbard, “Immunological characterization of the subunit of the 100 A filaments from muscle cells,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 73, no. 12, pp. 4344–4348, Dec. 1976, doi: 10.1073/pnas.73.12.4344.
- [45] Y. G. Capetanaki, J. Ngai, and E. Lazarides, “Characterization and regulation in the expression of a gene coding for the intermediate filament protein desmin,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 81, no. 22, pp. 6909–6913, Nov. 1984, doi: 10.1073/pnas.81.22.6909.
- [46] I. R. Kuisk, H. Li, D. Tran, and Y. Capetanaki, “A Single MEF2 Site Governs Desmin Transcription in Both Heart and Skeletal Muscle during Mouse Embryogenesis,” 1996.
- [47] D. O. Fürst, M. Osborn, and K. Weber, “Myogenesis in the mouse embryo: differential onset of expression of myogenic proteins and the involvement of titin in myofibril assembly,” *Journal of Cell Biology*, vol. 109, no. 2, pp. 517–527, Aug. 1989, doi: 10.1083/jcb.109.2.517.
- [48] J. NGAI, Y. G. CAPETANAKI, and E. LAZARIDES, “Expression of the Genes Coding for the Intermediate Filament Proteins Vimentin and Desmin,” *Ann N Y Acad Sci*, vol. 455, no. 1 Intermediate, pp. 144–157, Oct. 1985, doi: 10.1111/j.1749-6632.1985.tb50409.x.
- [49] M. Schaffeld, H. Herrmann, J. Schultess, and J. Markl, “Vimentin and desmin of a cartilaginous fish, the shark *Scyliorhinus stellaris*: Sequence, expression patterns and in vitro assembly.” [Online]. Available: [www.urbanfischer.de/journals/ejcb](http://www.urbanfischer.de/journals/ejcb)
- [50] M. C. Dalakas, K.-Y. Park, C. Semino-Mora, H. S. Lee, K. Sivakumar, and L. G. Goldfarb, “Desmin Myopathy, a Skeletal Myopathy with Cardiomyopathy Caused by Mutations in the Desmin Gene,” *New England Journal of Medicine*, vol. 342, no. 11, pp. 770–780, Mar. 2000, doi: 10.1056/NEJM200003163421104.
- [51] D. J. Milner, G. Weitzer, D. Tran, A. Bradley, and Y. Capetanaki, “Disruption of muscle architecture and myocardial degeneration in mice lacking desmin,” *Journal of Cell Biology*, vol. 134, no. 5, pp. 1255–1270, Sep. 1996, doi: 10.1083/jcb.134.5.1255.

- [52] Z. Li *et al.*, “Cardiovascular Lesions and Skeletal Myopathy in Mice Lacking Desmin,” *Dev Biol*, vol. 175, no. 2, pp. 362–366, May 1996, doi: 10.1006/dbio.1996.0122.
- [53] D. J. Milner, M. Mavroidis, N. Weisleder, and Y. Capetanaki, “Desmin Cytoskeleton Linked to Muscle Mitochondrial Distribution and Respiratory Function,” *Journal of Cell Biology*, vol. 150, no. 6, pp. 1283–1298, Sep. 2000, doi: 10.1083/jcb.150.6.1283.
- [54] Y. Capetanaki, “Desmin Cytoskeleton A Potential Regulator of Muscle Mitochondrial Behavior and Function,” *Trends Cardiovasc Med*, vol. 12, no. 8, pp. 339–348, Nov. 2002, doi: 10.1016/S1050-1738(02)00184-6.
- [55] S. Psarras *et al.*, “Regulation of adverse remodelling by osteopontin in a genetic heart failure model,” *Eur Heart J*, vol. 33, no. 15, pp. 1954–1963, Aug. 2012, doi: 10.1093/eurheartj/ehr119.
- [56] M. Mavroidis *et al.*, “Complement system modulation as a target for treatment of arrhythmogenic cardiomyopathy,” *Basic Res Cardiol*, vol. 110, no. 3, p. 27, May 2015, doi: 10.1007/s00395-015-0485-6.
- [57] F. Vlachou *et al.*, “Galectin-3 interferes with tissue repair and promotes cardiac dysfunction and comorbidities in a genetic heart failure model,” *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 79, no. 5, May 2022, doi: 10.1007/s00018-022-04266-6.
- [58] D. J. Milner *et al.*, “The Absence of Desmin Leads to Cardiomyocyte Hypertrophy and Cardiac Dilation with Compromised Systolic Function,” *J Mol Cell Cardiol*, vol. 31, no. 11, pp. 2063–2076, Nov. 1999, doi: 10.1006/jmcc.1999.1037.
- [59] A. Lu and H. Wu, “Structural mechanisms of inflammasome assembly,” *FEBS Journal*, vol. 282, no. 3, pp. 435–444, Feb. 2015, doi: 10.1111/febs.13133.
- [60] Z. Hu and J. Chai, “Structural mechanisms in NLR inflammasome assembly and signaling,” in *Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol. 397, Springer Verlag, 2016, pp. 23–42. doi: 10.1007/978-3-319-41171-2\_2.
- [61] G. Szabo and T. Csak, “Inflammasomes in liver diseases,” *J Hepatol*, vol. 57, no. 3, pp. 642–654, Sep. 2012, doi: 10.1016/J.JHEP.2012.03.035.
- [62] W. J. Zhang, S. J. Chen, S. C. Zhou, S. Z. Wu, and H. Wang, “Inflammasomes and Fibrosis,” *Frontiers in Immunology*, vol. 12, Frontiers Media S.A., Jun. 11, 2021. doi: 10.3389/fimmu.2021.643149.
- [63] G.-S. Lee *et al.*, “The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca<sup>2+</sup> and cAMP,” *Nature*, vol. 492, no. 7427, pp. 123–127, Dec. 2012, doi: 10.1038/nature11588.
- [64] B. Sun *et al.*, “NADPH Oxidase-Dependent NLRP3 Inflammasome Activation and its Important Role in Lung Fibrosis by Multiwalled Carbon Nanotubes,” *Small*, vol. 11, no. 17, pp. 2087–2097, May 2015, doi: 10.1002/smll.201402859.
- [65] Q. Wang *et al.*, “Hyperglycemia aggravates acute liver injury by promoting liver-resident macrophage <sc>NLRP</sc> 3 inflammasome activation via the inhibition of <sc>AMPK</sc> / <sc>mTOR</sc> -mediated autophagy induction,” *Immunol Cell Biol*, vol. 98, no. 1, pp. 54–66, Jan. 2020, doi: 10.1111/imcb.12297.



- [66] Y. He, M. Y. Zeng, D. Yang, B. Motro, and G. Núñez, "NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux," *Nature*, vol. 530, no. 7590, pp. 354–357, Feb. 2016, doi: 10.1038/nature16959.
- [67] Y. He, H. Hara, and G. Núñez, "Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation," *Trends Biochem Sci*, vol. 41, no. 12, pp. 1012–1021, Dec. 2016, doi: 10.1016/j.tibs.2016.09.002.
- [68] Z. Zhou *et al.*, "PEDF Inhibits the Activation of NLRP3 Inflammasome in Hypoxia Cardiomyocytes through PEDF Receptor/Phospholipase A2," *Int J Mol Sci*, vol. 17, no. 12, p. 2064, Dec. 2016, doi: 10.3390/ijms17122064.
- [69] E. Mezzaroma *et al.*, "The inflammasome promotes adverse cardiac remodeling following acute myocardial infarction in the mouse," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 108, no. 49, pp. 19725–19730, Dec. 2011, doi: 10.1073/pnas.1108586108.
- [70] M. Kawaguchi *et al.*, "Inflammasome Activation of Cardiac Fibroblasts Is Essential for Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury," *Circulation*, vol. 123, no. 6, pp. 594–604, Feb. 2011, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.982777.
- [71] Ø. Sandanger *et al.*, "The NLRP3 inflammasome is up-regulated in cardiac fibroblasts and mediates myocardial ischaemia–reperfusion injury," *Cardiovasc Res*, vol. 99, no. 1, pp. 164–174, Jul. 2013, doi: 10.1093/cvr/cvt091.
- [72] T. Pasqua, P. Pagliaro, C. Rocca, T. Angelone, and C. Penna, "Role of NLRP-3 Inflammasome in Hypertension: A Potential Therapeutic Target," *Curr Pharm Biotechnol*, vol. 19, no. 9, pp. 708–714, Nov. 2018, doi: 10.2174/1389201019666180808162011.
- [73] C. Yao *et al.*, "Enhanced Cardiomyocyte NLRP3 Inflammasome Signaling Promotes Atrial Fibrillation," *Circulation*, vol. 138, no. 20, pp. 2227–2242, Nov. 2018, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.035202.
- [74] G. Chen, M. G. Chelu, D. Dobrev, and N. Li, "Cardiomyocyte Inflammasome Signaling in Cardiomyopathies and Atrial Fibrillation: Mechanisms and Potential Therapeutic Implications," *Front Physiol*, vol. 9, Aug. 2018, doi: 10.3389/fphys.2018.01115.
- [75] Dimopoulou T, Capetanaki Y, Psarras S. "The inflammasome-IL1 axis is activated and regulated in the myocardium of the desmin-deficient cardiomyopathy mouse model by both cardiomyocytes and fibroblasts," *ASCB Conference, December 2-16, San Diego, USA, (Mol Biol Cell, Abstr P543), 2015.*
- [76] Ntatsoulis K, et al. "Revealing cellular interactions reflecting and modulating adverse cardiac remodeling with a genetic heart failure model," *2nd Olympiad in Cardiovascular Medicine, 27-30 April, Heraklion, Greece, 2022.*
- [77] Α Σιταρα., "Μελέτη της έναρξης και ρυθμισμού της φλεγμονής σε ζωικό μοντέλο καρδιακής ανεπάρκειας," *Διπλωματική εργασία. Παν Θεσσαλίας 2019.*
- [78] R. C. Coll *et al.*, "A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases," *Nat Med*, vol. 21, no. 3, pp. 248–255, Mar. 2015, doi: 10.1038/nm.3806.

- [79] Xintarakou, Tzeis, Psarras, Asvestas, Vardas "Atrial fibrosis as a dominant factor for the development of atrial fibrillation: facts and gaps," *Europace*. 2020 Mar 1;22(3):342-351. doi: 10.1093/europace/euaa009. PMID: 31998939.
- [80] Psarras, Beis, Nikouli, Tsikitis, Capetanaki "Three in a Box: Understanding Cardiomyocyte, Fibroblast, and Innate Immune Cell Interactions to Orchestrate Cardiac Repair Processes.," *Med*. 2019 Apr 2;6:32. doi: 10.3389/fcvm.2019.00032. PMID: 31001541; PMCID: PMC6454035.
- [81] Jeng KC, et al "An endogenous lectin, galectin-3 (epsilon BP/Mac-2), potentiates IL-1 production by human monocytes," *Immunol Lett*. 1994 Oct;42(3):113-6. doi: 10.1016/0165-2478(94)90072-8. PMID: 7890309.
- [82] Simovic Markovic B, et al "Galectin-3 Plays an Important Pro-inflammatory Role in the Induction Phase of Acute Colitis by Promoting Activation of NLRP3 Inflammasome and Production of IL-1 $\beta$  in Macrophages.," *J Crohns Colitis*. 2016 May;10(5):593-606. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjw013. Epub 2016 Jan 19. PMID: 26786981; PMCID: PMC4957458.
- [83] Chen YJ, et al "Galectin-3 Enhances Avian H5N1 Influenza A Virus-Induced Pulmonary Inflammation by Promoting NLRP3 Inflammasome Activation.," *Am J Pathol*. 2018 Apr;188(4):1031-1042. doi: 10.1016/j.ajpath.2017.12.014. Epub 2018 Jan 31. PMID: 29366678.
- [84] Lo TH, et al "Galectin-3 promotes noncanonical inflammasome activation through intracellular binding to lipopolysaccharide glycans.," *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021 Jul 27;118(30):e2026246118. doi: 10.1073/pnas.2026246118. PMID: 34301890; PMCID: PMC8325309.
- [85] Keller M, et al "Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion," *Cell*. 2008 Mar 7;132(5):818-31. doi: 10.1016/j.cell.2007.12.040. PMID: 18329368.
- [86] Chen Y, et al "Gasdermin D Drives the Nonexosomal Secretion of Galectin-3, an Insulin Signal Antagonist," *J Immunol*. 2019 Nov 15;203(10):2712-2723. doi: 10.4049/jimmunol.1900212. Epub 2019 Oct 9. PMID: 31597705.
- [87] Wu X, et al. "Role of NLRP3-Inflammasome/Caspase-1/Galectin-3 Pathway on Atrial Remodeling in Diabetic Rabbits," *J Cardiovasc Transl Res*. 2020 Oct;13(5):731-740. doi: 10.1007/s12265-020-09965-8. Epub 2020 Feb 11. PMID: 32048199.
- [88] Colnot C, et al Maintenance of granulocyte numbers during acute peritonitis is defective in galectin-3-null mutant mice. *Immunology*. 1998 Jul;94(3):290-6. doi: 10.1046/j.1365-2567.1998.00517.x. PMID: 9767409; PMCID: PMC1364244.
- [89] Hsu DK, et al. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. *Am J Pathol*. 2000 Mar;156(3):1073-83. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64975-9. PMID: 10702423; PMCID: PMC1876862.