

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

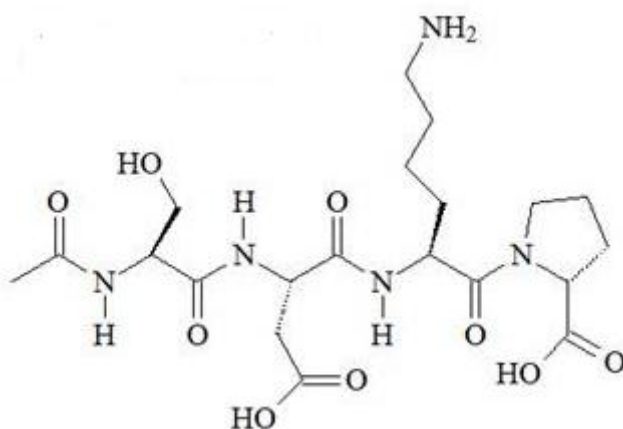
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΜΕ ΠΙΘΑΝΗ ΕΠΟΥΛΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

Διπλωματική Εργασία

Γραμματικάκη Ντιάνα- Στεφανία, Φαρμακοποιός



Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

«Κοσμητολογία - Δερματοφαρμακολογία»

Αθήνα, 2017

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΣΠΟΥΔΩΝ

**Ράλλης Μιχαήλ, Επίκουρος Καθηγητής Τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας,
Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών**

ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ:

Λιβανίου Ευαγγελία, Ερευνήτρια Α΄, ΙΠΡΕΤΕΑ, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

Κλέτσας Δημήτριος, Ερευνητής Α΄ - Διευθυντής ΙΒΕ, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

**Ράλλης Μιχαήλ, Επίκουρος Καθηγητής Τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας,
Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών**

**Ρούσσης Βασίλειος, Καθηγητής Τομέα Φαρμακογνωσίας, Τμήμα
Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών**

Λιβανίου Ευαγγελία, Ερευνήτρια Α΄, ΙΠΡΕΤΕΑ, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΕΛΙΔΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	7
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	8
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΠΟΥΛΩΣΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ	9
1.1. Εισαγωγή	9
1.2. Φάσεις της επούλωσης	10
1.2.1. Φάση 1: Αιμόσταση και φλεγμονή	11
1.2.2. Φάση 2: Πολλαπλασιασμός	14
1.2.3. Φάση 3: Ωρίμανση και αναδιαμόρφωση	18
1.2.4. Φάση 4: Συστολή της πληγής	19
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΜΕ ΠΙΘΑΝΗ ΕΠΟΥΛΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ – Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ β-ΘΥΜΟΣΙΝΩΝ	21
2.1. Θυμοσίνες	21
2.2. Η θυμοσίνη β4 (Tβ4)	22
2.3. Το τετραπεπτίδιο <i>acetyl</i> Ser-Asp-Lys-Pro-OH (AcSDKP)	32
2.4. Η θυμοσίνη 10 (Tβ10) και το τετραπεπτίδιο <i>acetyl</i> Ala-Asp-Lys-Pro-OH (AcADKP)	39
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	41
ΣΚΟΠΟΣ	42
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	43
3.1. Σύνθεση, καθαρισμός και ανάλυση πεπτιδίων	43
3.1.1. Σύνθεση πεπτιδίων με τη μέθοδο της Fmoc- πεπτιδικής σύνθεσης στερεάς φάσης (Fmoc- Solid Phase Peptide Synthesis, Fmoc- SPPS)	43
3.1.1.1. Προετοιμασία της ρητίνης	48
3.1.1.2. Σύνδεση του πρώτου αμινοξέος	48
3.1.1.3. Απομάκρυνση της Fmoc ομάδας του πρώτου αμινοξέος	48
3.1.1.4. Επιμήκυνση της πεπτιδικής αλυσίδας	48
3.1.1.5. Απομάκρυνση των πλευρικών προστατευτικών ομάδων και αποκοπή των πεπτιδίων από τη ρητίνη	49

3.1.2. Καθαρισμός και ανάλυση πεπτιδίων με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC)	50
3.2. <i>In vitro</i> κυτταρικές δοκιμασίες για τον έλεγχο της βιολογικής δράσης των πεπτιδίων	54
3.2.1. Καλλιέργειες κυττάρων	54
3.2.1.1. Κυτταρικές σειρές και συνθήκες καλλιέργειας	55
3.2.1.2. Συγχρονισμός καλλιέργειας	55
3.2.1.3. Μέτρηση αριθμού κυττάρων με σωματιδιακό αναλυτή	55
3.2.2. Έλεγχος κυτταρικής βιωσιμότητας με τη μέθοδο MTT	56
3.2.3. Ποσοτικός προσδιορισμός σύνθεσης DNA με τη μέθοδο τριτιωμένης θυμιδίνης	58
3.2.4. Προσδιορισμός σύνθεσης κολλαγόνου με τη μέθοδο τριτιωμένης προλίνης	61
3.2.5. Δοκιμασία κυτταρικής μετανάστευσης με σχηματισμό τομής (scratch assay)	65
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	68
4.1. Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση πεπτιδίων	68
4.2. Έλεγχος της βιολογικής δράσης των πεπτιδίων	74
4.2.1. Έλεγχος κυτταρικής βιωσιμότητας με τη μέθοδο MTT	74
4.2.2. Ποσοτικός προσδιορισμός σύνθεσης DNA με τη μέθοδο τριτιωμένης θυμιδίνης	79
4.2.3. Προσδιορισμός σύνθεσης κολλαγόνου με τη μέθοδο τριτιωμένης προλίνης	82
4.2.4. Δοκιμασία κυτταρικής μετανάστευσης με σχηματισμό τομής (scratch assay)	84
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	94
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	102
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	103
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ- ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΗΜΗΣΕΩΝ	108

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα την Διπλωματική Εργασία Δρα Ευαγγελία Λιβανίου, Ερευνήτρια Α΄ του Εργαστηρίου Ανοσοπεπτιδικής Χημείας στο Ινστιτούτο Πυρηνικών και Ραδιολογικών Επιστημών και Τεχνολογίας, Ενέργειας και Ασφάλειας (ΙΠΡΕΤΕΑ) του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε δίνοντάς μου αυτή την εργασία, την καθοδήγηση και την υπομονή της καθώς και για την παραχώρηση εργαστηριακού χώρου, πρωτοκόλλων και αναλώσιμων πρώτων υλών για την παρασκευή των συνθετικών πεπτιδίων. Στη συνέχεια, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον υπεύθυνο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Κοσμητολογία-Δερματοφαρμακολογία», τον Επίκουρο Καθηγητή του Τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας, κύριο Μιχαήλ Ράλλη, για την εμπιστοσύνη του καθώς και για τη συμμετοχή του στην τριμελή εξεταστική επιτροπή της παρούσας εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή του Τομέα Φαρμακογνωσίας, κύριο Βασίλειο Ρούσση, για τη συμμετοχή του στην τριμελή εξεταστική επιτροπή.

Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ στον Διευθυντή Ερευνών του Εργαστηρίου Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού και Γήρανσης στο Ινστιτούτο Βιοεπιστημών & Εφαρμογών του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», Δρα Δημήτριο Κλέτσα, τόσο για το χρόνο και την καθοδήγησή του, όσο και για την παραχώρηση του εργαστηρίου του και των απαραίτητων αναλώσιμων υλικών και πρωτοκόλλων για την διεξαγωγή των *in vitro* πειραμάτων.

Ένα ξεχωριστό ευχαριστώ οφείλω στον Εντεταλμένο Ερευνητή του Εργαστηρίου Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού και Γήρανσης, του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», Δρα Χαράλαμπο Πρατσίνη καθώς και στη μεταδιδακτορική συνεργάτιδα του Εργαστηρίου Ανοσοπεπτιδικής Χημείας του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», Χρυσούλα Καραχάλιου, οι οποίοι ήταν δίπλα μου σε κάθε βήμα, βοηθώντας με απίστευτα στο σχεδιασμό και τη διεξαγωγή των πειραμάτων, αλλά και δίνοντάς μου λύσεις σε όλες τις απορίες που είχα.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω το Συνεργάτη του Εργαστηρίου Ανοσοπεπτιδικής Χημείας (ΙΠΡΕΤΕΑ, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»), Δρα Hubert Kalbacher (Interfakultäres Institut für Biochemie, Universität Tübingen), για την ανάλυση των συνθετικών πεπτιδίων με τη μέθοδο της φασματομετρίας μαζών μέσω ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI-MS).

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ακόμη τη συμφοιτήτριά μου, τη Δέσποινα, για τη βοήθειά της κατά τη διεξαγωγή των *in vitro* πειραμάτων αλλά και τα παιδιά του εργαστηρίου, τον Νίκο, τη Μαριλίζα και τη Μελίνα για την εμπύχωσή τους καθώς και για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας που δημιούργησαν.

Τέλος, ένα τεράστιο ευχαριστώ στην οικογένειά μου και στους φίλους μου για τη στήριξη, τόσο υλική όσο και ψυχολογική, που μου παρείχαν σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αντικείμενο της παρούσας εργασίας ήταν, αρχικά, η εργαστηριακή σύνθεση, ο καθαρισμός και ο αναλυτικός χαρακτηρισμός (ταυτοποίηση) των πεπτιδίων *acetyl*Ser-Asp-Lys-Pro-OH (AcSDKP) και *acetyl*Ala-Asp-Lys-Pro-OH (AcADKP), με άμεσο στόχο την παράλληλη *in vitro* βιολογική τους αξιολόγηση σε συστήματα κυττάρων που σχετίζονται με το φαινόμενο της επούλωσης δερματικών πληγών. Τα πεπτίδια AcSDKP και AcADKP αποτελούν τα αμινοτελικά τετραπεπτίδια δύο μεγαλύτερων βιοδραστικών πεπτιδίων, των 43-πεπτιδίων θυμοσίνη β4 (Tβ4) και θυμοσίνη β10 (Tβ10), αντίστοιχα, που ανήκουν σε μία ευρύτερη οικογένεια ενδογενών πεπτιδίων, τις β-θυμοσίνες. Η Tβ4 και η Tβ10, που παρουσιάζουν υψηλή δομική ομολογία, εκφράζονται σε όλα σχεδόν τα ανθρώπινα κύτταρα και η βιολογική δράση τους φαίνεται ότι είναι σημαντική. Σύμφωνα με στοιχεία της βιβλιογραφίας, τόσο η Tβ4 όσο και το τετραπεπτίδιο AcSDKP (που προκύπτει από πρωτεόλυση της Tβ4) έχουν θετική επίδραση στην επούλωση πληγών του δέρματος, ενώ πολύ λιγότερα στοιχεία είναι γνωστά για την επίδραση της Tβ10 (ή τμημάτων της) στο φαινόμενο της επούλωσης.

Η σύνθεση των τετραπεπτιδίων AcSDKP και AcADKP έγινε με την τεχνική της Fmoc-πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεά φάση. Ο καθαρισμός των AcSDKP και AcADKP έγινε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC και η καθαρότητα των τελικών προϊόντων ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC (στην οποία χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο εμπορικά διαθέσιμο AcSDKP). Η καθαρότητα των πεπτιδίων ήταν εξαιρετική και η συνολική απόδοση της σύνθεσης (~ 30 %) πολύ ικανοποιητική. Τα καθαρά πεπτίδια ταυτοποιήθηκαν με φασματομετρία μαζών με τη μέθοδο του ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI-MS).

Η *in vitro* βιολογική αξιολόγηση των AcSDKP και AcADKP έγινε ως εξής: Αρχικά, ελέγχθηκε η πιθανή κυτταροτοξική δράση των AcSDKP και AcADKP σε ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες (AG01523c) και κερατινοκύτταρα (HaCaT), με τη δοκιμασία MTT (κατά την οποία χρησιμοποιήθηκε επίσης, ως πρότυπο, εμπορικά διαθέσιμο AcSDKP), καθώς και η επίδρασή τους στον πολλαπλασιασμό των δερματικών ινοβλαστών, μέσω του ποσοτικού προσδιορισμού της σύνθεσης DNA με τη μέθοδο τριτιωμένης θυμιδίνης. Στη συνέχεια, ελέγχθηκε η επίδραση των τετραπεπτιδίων AcSDKP και AcADKP στη σύνθεση κολλαγόνου από τους δερματικούς ινοβλάστες με τη μέθοδο της τριτιωμένης προλίνης καθώς και η επίδρασή τους στη μετανάστευση των κερατινοκυττάρων, μέσω της δοκιμασίας κυτταρικής μετανάστευσης με σχηματισμό τομής (scratch assay). Οι παραπάνω *in vitro* κυτταρικές δοκιμασίες δεν έδειξαν στατιστικά σημαντική επίδραση των τετραπεπτιδίων AcSDKP και AcADKP στις υπό μελέτη βιολογικές παραμέτρους, τουλάχιστον υπό τις πειραματικές συνθήκες που ακολουθήθηκαν. Ωστόσο, από τα πειραματικά αποτελέσματα της παρούσας εργασίας προκύπτει ότι τα τετραπεπτίδια AcSDKP και AcADKP μπορούν να παρασκευασθούν στο εργαστήριο, σε ικανές ποσότητες (της τάξης των mg) και σε υψηλή καθαρότητα, ακολουθώντας συγκεκριμένα πρωτόκολλα σύνθεσης και καθαρισμού. Τα πεπτίδια αυτά δεν είναι τοξικά (σε συγκεντρώσεις από 10^{-10} έως 10^{-7} M), όταν επωάζονται με τους δερματικούς ινοβλάστες ή τα κερατινοκύτταρα. Τα παραπάνω πεπτίδια μπορούν να παρασκευασθούν στο εργαστήριο και να χρησιμοποιηθούν σε επιλεγμένες βιολογικές δοκιμασίες, με στόχο την περαιτέρω μελέτη της επίδρασής τους στο φαινόμενο της επούλωσης πληγών του δέρματος.

ABSTRACT

The aim of the present study was, first, the laboratory synthesis, purification and analytical characterization of acetylSer-Asp-Lys-Pro-OH (AcSDKP) and *acetyl*Ala-Asp-Lys-Pro-OH (AcADKP) peptides and, second, the *in vitro* biological evaluation of these peptides, using specific cell lines which are involved in the dermal healing process. The AcSDKP and AcADKP peptides are identical with the N-terminal tetrapeptide of two longer bioactive peptides, the 43-peptides thymosin β 4 (T β 4) and thymosin β 10 (T β 10), respectively. T β 4 and T β 10 exhibit high structural homology and belong to a family of endogenous peptides, the β -thymosins. They are expressed in almost all human cells and their biological activity appears to be important. According to literature data, both T β 4 and AcSDKP (which is formed by T β 4 proteolysis) have a positive effect on dermal wound healing, while less is known about T β 10 and its fragments.

The synthesis of the tetrapeptides AcSDKP and AcADKP was performed with the Fmoc - solid phase peptide synthesis technique. Purification of AcSDKP and AcADKP was performed with semi-preparative RP-HPLC and the final product purity was evaluated with analytical RP-HPLC (in which commercially available AcSDKP was used as an internal standard). The purity of the peptides was excellent and the overall synthesis yield ($\sim 30\%$) was very satisfactory. Pure peptides were identified by Electrospray Ionization – Mass Spectrometry (ESI-MS).

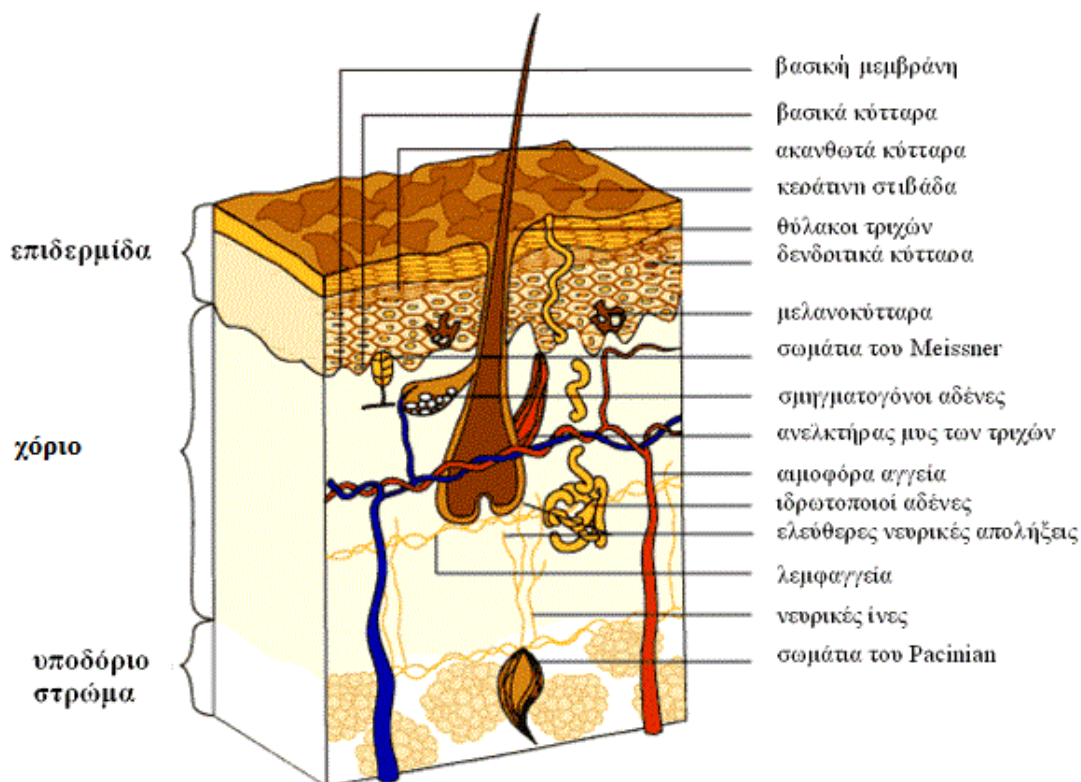
The *in vitro* biological evaluation of AcSDKP and AcADKP was performed as follows: Initially, the potential cytotoxic effect of AcSDKP and AcADKP on human dermal fibroblasts (AG01523c) and keratinocytes (HaCaT) was tested by the MTT assay (in which commercially available AcSDKP was used in parallel, for comparison reasons). Also, was tested the effect of AcSDKP and AcADKP on the proliferation of dermal fibroblasts, by quantifying the DNA synthesis with the tritiated thymidine assay. The effect of AcSDKP and AcADKP tetrapeptides on fibroblast's collagen synthesis was also investigated, as well as, their effect on keratinocyte migration, using the scratch assay. The above *in vitro* cell assays did not show any statistically significant effect of the AcSDKP and AcADKP tetrapeptides on the biological parameters studied, at least under the experimental conditions used. However, the experimental results of the present study show that both AcSDKP and AcADKP can be prepared in the laboratory in sufficient quantities (mg amounts) and in high purity, following specific synthesis and purification protocols. These peptides are non toxic (at concentrations of 10^{-10} to 10^{-7} M) when incubated with dermal fibroblasts or keratinocytes. Thus, the above peptides may be prepared in the laboratory and used in a series of specially selected biological assays, in order to further study their effect on dermal wound healing.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΠΟΥΛΩΣΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

1. 1. Εισαγωγή

Το δέρμα, ως το μεγαλύτερο και πιο εκτεθειμένο όργανο του σώματός μας (Εικόνα 1.1), αποτελεί τον εξωτερικό φραγμό για την είσοδο διάφορων στρεσογόνων περιβαλλοντικών παραγόντων (Eming et al., 2014). Για αυτό το λόγο, έχει αναπτύξει μια σειρά πολύπλοκων μηχανισμών, τόσο για την προστασία, όσο και για την επανόρθωση της ιστικής ακεραιότητας, σε περίπτωση τραύματος (Dreifke et al., 2014).



Εικόνα 1.1: Εγκάρσια διατομή του δέρματος.

Τραύμα (πληγή) χαρακτηρίζεται η λύση της συνέχειας της επιφάνειας του δέρματος και μπορεί να συνοδεύεται από διαταραχή στη φυσιολογική ανατομία και λειτουργία του επιθηλίου ή και των υποκείμενων φυσιολογικών ιστών (Velnar et al., 2009). Η επούλωση ενός τραύματος εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, οι οποίοι μπορούν να δράσουν ανασταλτικά, με μηχανισμούς που βρίσκονται ακόμα υπό μελέτη. Μερικοί από αυτούς τους παράγοντες είναι η ηλικία, οι βακτηριακές μολύνσεις, ο διαβήτης, οι αγγειακές παθήσεις καθώς και ο καρκίνος (Eming et al., 2014). Έτσι, τα τραύματα μπορούν να κατηγοριοποιηθούν κλινικά, βάσει του χρόνου επούλωσης, σε οξεία και χρόνια.

1. 2. Φάσεις της επούλωσης

- Φάση της αιμόστασης (hemostasis) και της φλεγμονής (inflammation)
- Φάση του πολλαπλασιασμού (proliferation)
- Φάση της ωρίμανσης (maturation) και της αναδιαμόρφωσης (remodeling)
- Συστολή του τραύματος (wound contraction) (Tejiram et al., 2016)



Διαφορετικές περιοχές ενός τραύματος μπορεί να βρίσκονται σε διαφορετικό στάδιο επούλωσης, οποιαδήποτε στιγμή. Η χρονική διάρκεια και οι αλληλεπιδράσεις των παραγόντων που λαμβάνουν μέρος στη διαδικασία της επούλωσης διαφέρουν για τα οξέα και τα χρόνια τραύματα, αν και τα κύρια στάδια παραμένουν ίδια (Velnar et al., 2009).

1.2.1. Φάση 1: Αιμόσταση και φλεγμονή

Αιμόσταση

Μέσα σε δευτερόλεπτα από τον τραυματισμό του δέρματος, προκαλείται αγγειοσυστολή για να μειωθεί η απώλεια αίματος. Έτσι, ξεκινάει η φάση της αιμόστασης και της πήξης του αίματος. Ο κύριος ρόλος αυτών των μηχανισμών είναι η διακοπή της αιμορραγίας, με σκοπό την προστασία του αγγειακού συστήματος, ώστε να διατηρηθεί η ανατομική ακεραιότητα και η λειτουργία του. (Velnar et al., 2009).

Καθώς το αίμα ρέει από την περιοχή του τραύματος, τα αιμοπετάλια έρχονται σε επαφή και προσκολλώνται με το τοίχωμα των αιμοφόρων αγγείων και το υποενδοθηλιακό κολλαγόνο (Velnar et al., 2009; Tejiram et al., 2016). Αυτή η επαφή μεταξύ του κολλαγόνου και των αιμοπεταλίων, καθώς και η παρουσία θρομβίνης, φимπρονεκτίνης και των θραυσμάτων τους, οδηγεί στην απελευθέρωση κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων από τα α-κοκκία των αιμοπεταλίων, όπως του αιμοπεταλιακού αυξητικού παράγοντα (Platelet Derived Growth Factor, PDGF), του μετασχηματίζοντα αυξητικού παράγοντα - β (Transforming Growth Factor – β, TGF-β) και του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (Tejiram et al., 2016; Diegelmann et al., 2004; Clark, 1988). Όλοι αυτοί οι παράγοντες οδηγούν στο σχηματισμό θρόμβου ινώδους (fibrin clot), ο οποίος χρησιμεύει στον έλεγχο της αιμορραγίας και της απώλειας των υγρών και των ηλεκτρολυτών (Tejiram et al., 2016; Velnar et al., 2009 και δευτερευόντως λειτουργεί ως «υπόστρωμα» (scaffold) για τα κύτταρα που μεταναστεύουν προς την περιοχή του τραύματος, όπως ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα, ινοβλάστες και ενδοθηλιακά κύτταρα (Tejiram et al., 2016; Clark 1988).

Φλεγμονή

Η φλεγμονή ενεργοποιείται σταδιακά κατά τη διάρκεια της αιμόστασης και της πήξης, με σκοπό την αποκατάσταση του «ανοσολογικού φραγμού» έναντι των μικροοργανισμών (Velnar et al., 2009). Η φάση αυτή χαρακτηρίζεται από αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα, χημειοταξία κυττάρων από την κυκλοφορία προς το περιβάλλον του τραύματος (wound milieu), τοπική απελευθέρωση κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων και ενεργοποίηση μεταναστευτικών κυττάρων (Tejiram et al., 2016). Κοινές τοπικές εκδηλώσεις της αποτελούν η ερυθρότητα, το οίδημα, η αύξηση

της θερμοκρασίας και ο πόνος (Boron και Boulpaep, 2005). Τα α-κοκκία των αιμοπεταλίων που προαναφέρθηκαν απελευθερώνουν, εκτός από κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες, αγγειοδραστικές αμίνες, όπως η σεροτονίνη, οι οποίες προκαλούν αγγειοδιαστολή και αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα, με αποτέλεσμα διήθηση του πλάσματος προς το μεσοκυττάριο υγρό και σχηματισμό οιδήματος (Velnar et al., 2009; Tejiram et al., 2016).

Η φλεγμονή μπορεί να διαιρεθεί σε μια πρώιμη, πρωτογενή φλεγμονώδη φάση (early inflammatory phase) και σε μια μεταγενέστερη, δευτερογενή φλεγμονώδη φάση (late inflammatory phase).

• Πρωτογενής Φλεγμονώδης Φάση

Η πρωτογενής φλεγμονώδης αντίδραση ξεκινά κατά τη διάρκεια της πύξης και περιλαμβάνει ποικίλες λειτουργίες (Velnar et al., 2009). Μέσα σε 6 ώρες από τον τραυματισμό, τα κυκλοφορούντα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος μεταναστεύουν στο τραύμα. Η αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα που προκαλείται από τη φλεγμονή και την απελευθέρωση προσταγλανδινών, σε συνδυασμό με την παρουσία χημειοτακτικών ουσιών όπως παράγοντες του συμπληρώματος (complement factors), ιντερλευκίνη-1 (Interleukin-1, IL-1), παράγοντας νέκρωσης όγκων - α (Tumor Necrosis Factor - α , TNF- α), TGF- β και πιθανόν βακτηριακά προϊόντα, διεγείρουν τη μετανάστευση των ουδετερόφιλων, τα οποία και αποτελούν τα πρώτα λευκοκύτταρα του αίματος που εισέρχονται στην περιοχή του τραύματος (Tejiram et al., 2016).

Ο αριθμός των ουδετερόφιλων κορυφώνεται 24-48 ώρες μετά τον τραυματισμό (Tejiram et al., 2016) και η κύρια λειτουργία τους είναι η αποτροπή της μόλυνσης, μέσω της φαγοκυττάρωσης των τυχόν παρόντων βακτηρίων και της απομάκρυνσης ξένων σωματιδίων και τμημάτων κατεστραμμένων ιστών (Velnar et al., 2009; Tejiram et al., 2016). Η παρουσία των ουδετερόφιλων δεν θεωρείται απαραίτητη για την ολοκλήρωση της επούλωσης, με την προϋπόθεση ότι δεν υπάρχει βακτηριακή μόλυνση (Tejiram et al., 2016). Αν όμως υπάρχει βακτηριακή μόλυνση, η φαγοκυτταρική τους δραστηριότητα είναι ζωτικής σημασίας, δεδομένου ότι οι μολυσμένες πληγές δεν επουλώνονται φυσιολογικά (Velnar et al., 2009).

Μέσω μεταβολών στη ρύθμιση των μορίων προσκόλλησης της κυτταρικής επιφάνειας, τα ουδετερόφιλα αρχίζουν να προσκολλώνται χαλαρά στα ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών και των φλεβιδίων, περιβάλλοντας τα όρια του τραύματος (margination). Στη συνέχεια, τα ουδετερόφιλα μετακινούνται κατά μήκος της επιφάνειας του αγγείου, υποβοηθούμενα από τη ροή του αίματος (Boron και Boulpaep, 2005, Velnar et al., 2009). Χημειοκίνες που εκκρίνονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα ενεργοποιούν ταχύτατα ένα ισχυρότερο σύστημα προσκόλλησης, που μεσολαβείται από τις ιντεγκρίνες (Velnar et al., 2009), με αποτέλεσμα τη στενή σύνδεση ενδοθηλιακών και ουδετερόφιλων κυττάρων (Boron και Boulpaep, 2005). Στη συνέχεια, τα ουδετερόφιλα αρχίζουν να μετακινούνται έξω από τα αιμοφόρα αγγεία προς τον προσβεβλημένο ιστό, διασχίζοντας το ενδοθήλιο με τη διεργασία της διαπίδυσης. Κατά τον τρόπο αυτόν, μεγάλοι αριθμοί ουδετερόφιλων μεταναστεύουν προς τη φλεγμαίνουσα περιοχή και κινούνται προς τα μικρόβια (Boron και Boulpaep, 2005). Στην περιοχή του τραύματος, τα ουδετερόφιλα φαγοκυττάρωνουν ξένο υλικό, βακτήρια και κατεστραμμένα συστατικά της

εξωκυττάριας μήτρας (Extracellular Matrix, ECM), με τη δράση πρωτεολυτικών ενζύμων που απελευθερώνουν καθώς και ελεύθερων ριζών προερχόμενων από δραστικές ενώσεις οξυγόνου (Diegelmann et al., 2004).

Η δραστηριότητα των ουδετερόφιλων αλλάζει σταδιακά μέσα σε λίγες ημέρες από τον τραυματισμό, όταν όλα τα μολυσματικά βακτήρια έχουν καταστραφεί. Μετά την ολοκλήρωση του έργου τους, τα ουδετερόφιλα πρέπει να απομακρυνθούν από την πληγή πριν από την μετάβαση στην επόμενη φάση της επούλωσης. Απορρίπτονται με εξώθηση στην επιφάνεια του τραύματος και απόπτωση, επιτρέποντας την εξάλειψη του συνόλου του πληθυσμού των ουδετερόφιλων χωρίς την πρόκληση βλάβης στον ιστό ή κλιμάκωση της φλεγμονώδους απόκρισης. Στη συνέχεια, τα κυτταρικά υπολείμματα φαγοκυτταρώνονται από τα μακροφάγα (Velnar et al., 2009).

- **Δευτερογενής Φλεγμονώδης Φάση**

Ως μέρος της μεταγενέστερης φλεγμονώδους φάσης, τρεις ημέρες μετά τον τραυματισμό, τα μακροφάγα που προέρχονται από κυκλοφορούντα μονοκύτταρα εμφανίζονται στην περιοχή της πληγής, ώστε να συνεχίσουν τη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης. Τα μακροφάγα έχουν πολύ μεγαλύτερη διάρκεια ζωής από τα ουδετερόφιλα και παραμένουν στο τραύμα έως ότου ολοκληρωθεί η επούλωση (Velnar et al., 2009; Tejiram et al., 2016). Προσελκύονται από πολυάριθμους χημειοτακτικούς παράγοντες, όπως πηκτικοί παράγοντες, συστατικά του συμπληρώματος, αυξητικοί παράγοντες (PDGF, TGF-β) και προϊόντα υδρόλυσης του κολλαγόνου (Velnar et al., 2009). Τα κύτταρα αυτά παίζουν κεντρικό ρόλο στην ενορχήστρωση του καταρράκτη της επούλωσης (Tejiram et al., 2016) και είναι θεμελιώδους σημασίας για τα τελευταία στάδια της φλεγμονής, δρώντας ως κύρια ρυθμιστικά κέντρα και παρέχοντας πλήθος ισχυρών αυξητικών παραγόντων στους προσβεβλημένους ιστούς, ιδιαίτερα τον TGF-β, καθώς και άλλους μεσολαβητές, όπως οι TGF-α, ο HB-EGF (heparin-binding epidermal growth factor), ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (fibroblast growth factor, FGF), η κολλαγενάση, κ.λπ. (Velnar et al., 2009; Bhattacharya, 2013). Ακόμη, ενεργοποιούν κερατινοκύτταρα, ινοβλάστες και ενδοθηλιακά κύτταρα (Velnar et al., 2009).

Τα τελευταία κύτταρα που προσελκύονται στην περιοχή του τραύματος στη μεταγενέστερη (δευτερογενή) φλεγμονώδη φάση, είναι τα λεμφοκύτταρα, περίπου 72 ώρες μετά τον τραυματισμό (Velnar et al., 2009). Η παρουσία και η ενεργοποίηση τόσο των μακροφάγων όσο και των λεμφοκυττάρων στο τραύμα είναι κρίσιμη για την εξέλιξη της φυσιολογικής διαδικασίας της επούλωσης (Tejiram et al., 2016). Ο αριθμός τους κορυφώνεται την πέμπτη μέρα μετά τον τραυματισμό, με τη δράση της IL-1, συστατικών του συμπληρώματος καθώς και προϊόντων διάσπασης των ανοσοσφαιρινών G (IgG) (Velnar et al., 2009).

Η φλεγμονή είναι ζωτικής σημασίας για την φυσιολογική εξέλιξη των επακόλουθων φάσεων επούλωσης του τραύματος. Η τυχόν μειωμένη φλεγμονώδης απόκριση επηρεάζει σημαντικά τις επόμενες φάσεις της επούλωσης, όπως παρατηρείται κλινικά σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη. Από την άλλη πλευρά, η εμμένουσα φλεγμονή είναι χαρακτηριστικό της καθυστερημένης επούλωσης του τραύματος και / ή της υπερβολικής ίνωσης (Tejiram et al., 2016).

1.2.2. Φάση 2: Πολλαπλασιασμός

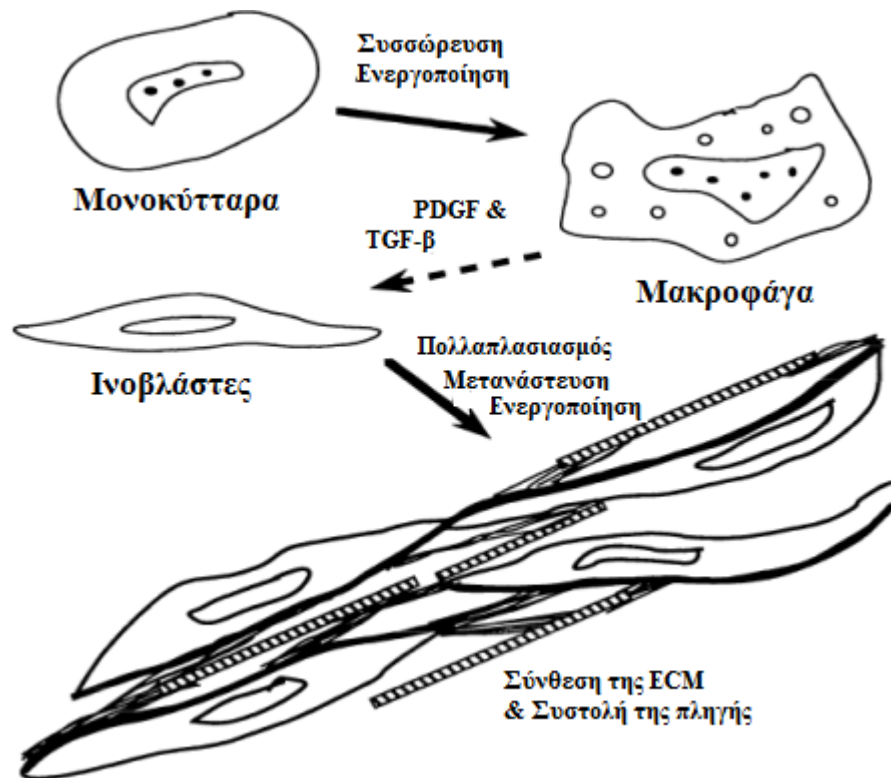
Η πολλαπλασιαστική φάση ξεκινά από την τρίτη ημέρα μετά τον τραυματισμό και διαρκεί περίπου δύο εβδομάδες. Χαρακτηρίζεται από μετανάστευση των ινοβλαστών και εναπόθεση της νέας ECM, η οποία αντικαθιστά το προσωρινό δίκτυο που είχε δημιουργηθεί από ινώδες και φιμπρονεκτίνη. Σε μακροσκοπικό επίπεδο, η φάση αυτή χαρακτηρίζεται από έντονη δημιουργία κοκκιώδους ιστού (Velnar et al., 2009). Οι κυριότερες διεργασίες που συμβαίνουν κατά τη φάση του πολλαπλασιασμού παρουσιάζονται εν περιλήψει στη συνέχεια.

- **Ινοπλασία**

Η ινοπλασία αναφέρεται στη δημιουργία συστατικών του κοκκιώδους ιστού, που προκύπτουν από τους ινοβλάστες (Εικόνα 1.3) (Clark 1988). Οι ινοβλάστες εμφανίζονται για πρώτη φορά στην περιοχή της πληγής την τρίτη ημέρα μετά τον τραυματισμό και ο αριθμός τους κορυφώνεται περίπου την έβδομη ημέρα (Velnar et al., 2009; Tejiram et al., 2016). Απαραίτητη διαδικασία είναι η μετάβαση των ινοβλαστών από την ήρεμη (quiescent state) στην ενεργοποιημένη φάση, στην οποία χαρακτηρίζονται από ταχύ πολλαπλασιασμό (Tejiram et al., 2016). Αυτό επιτυγχάνεται με μια σειρά κυτταροκινών, όπως οι PDGF, βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (Basic Fibroblast Growth Factor, bFGF) ή επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (Epidermal Growth Factor, EGF), με χημειοτακτικές, μιτογόνες και ρυθμιστικές δράσεις, οι οποίες προέρχονται είτε από τα αιμοπετάλια και τα μακροφάγα, είτε από τους ίδιους τους ινοβλάστες (Clark 1988; Tejiram et al., 2016). Ανεξάρτητα από την ακριβή προέλευσή τους, οι κυτταροκίνες που παράγονται σε μια περιοχή του τραύματος πιθανότατα δρουν συνεργιστικά για να διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών, τη μετανάστευσή τους στον χώρο του τραύματος καθώς και την παραγωγή ECM (Clark 1988).

Οι ινοβλάστες αποτελούν πολύ σημαντικά κύτταρα για την επουλωτική διαδικασία και είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή της πλειονότητας των δομικών πρωτεϊνών, που είναι απαραίτητες για την ανασύσταση των ιστών (Tejiram et al., 2016; Bhattacharya, 2013). Οι ταχέως πολλαπλασιαζόμενοι ινοβλάστες παράγουν κυρίως υαλουρονικό οξύ, φιμπρονεκτίνη, πρωτεογλυκάνες (proteoglycans), τύπου I και τύπου III προκολλαγόνο και άλλες πρωτεΐνες της εξωκυττάριας μήτρας (Velnar et al., 2009; Diegelmann et al., 2004).

Το κύριο πρωτεϊνικό προϊόν των ινοβλαστών είναι μια οικογένεια γλυκοπρωτεϊνών τριπλής αλυσού, που είναι γνωστές ως κολλαγόνο και που αποτελούν το κύριο συστατικό της ECM (Tejiram et al., 2016). Η σύνθεση του κολλαγόνου είναι ιδιαίτερα σημαντική διαδικασία σε όλες τις φάσεις της επούλωσης του τραύματος. Το κολλαγόνο προσδίδει ακεραιότητα και αντοχή σε όλους τους ιστούς και διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο τόσο στη φάση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων όσο και στη φάση της αναδιαμόρφωσης των ιστών (Velnar et al., 2009). Το κολλαγόνο ανιχνεύεται για πρώτη φορά στην πληγή την τρίτη ημέρα μετά τον τραυματισμό. Τα επίπεδα αυξάνονται γρήγορα για περίπου 3 εβδομάδες, ενώ συνεχίζει να συσσωρεύεται στην περιοχή με πιο αργό ρυθμό έως και 3 μήνες μετά τον τραυματισμό (Tejiram et al., 2016).



Εικόνα 1.3: Η έναρξη της ινοπλασίας από ενεργοποιημένα μονοκύτταρα - μακροφάγα και ενεργοποιημένους ινοβλάστες (Clark 1988).

Μέχρι το τέλος της πρώτης εβδομάδας, παράγεται άφθονη ECM, η οποία υποστηρίζει περαιτέρω τη μετανάστευση των κυττάρων και είναι απαραίτητη για την επιδιορθωτική διαδικασία. Στη συνέχεια οι ινοβλάστες μετατρέπονται φαινοτυπικά σε μυοϊνοβλάστες (myofibroblasts). Οι τελευταίοι είναι απαραίτητοι για τη συστολή του τραύματος (wound contraction), η οποία αποτελεί σημαντικό γεγονός στην επουλωτική διαδικασία και βοηθά στην προσέγγιση των άκρων της πληγής. Όταν ολοκληρωθεί αυτή η διαδικασία οι περιττοί ινοβλάστες αποβάλλονται με απόπτωση (Velnar et al., 2009).

- **Αγγειογένεση - Σχηματισμός του Κοκκιώδους Ιστού**

Η επαναγγείωση της πληγής επιτελείται παράλληλα με την ινοπλασία (Tejiram et al., 2016). Η διαμόρφωση και η δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων ονομάζεται αγγειογένεση (Clark 1988), είναι κρίσιμη στην επούλωση τραυμάτων και συμβαίνει σε όλες τις φάσεις της επιδιορθωτικής διαδικασίας (Velnar et al., 2009). Η αγγειογένεση πραγματοποιείται με ένα συνδυασμό πολλαπλασιασμού και μετανάστευσης (Tejiram et al., 2016) και στηρίζεται στην ισορροπία μεταξύ ανασταλτικών και διεγερτικών παραγόντων οι οποίοι δρουν επί των ηρεμούντων ενδοθηλιακών κυττάρων, τόσο άμεσα όσο και έμμεσα, οδηγώντας σε ενεργοποίηση και σε πολλαπλασιασμό τους, σε μετανάστευση και σε έκκριση ενδοθηλιακών αυξητικών παραγόντων (Boron και Boulpaep, 2005).

Το πρώτο βήμα για το σχηματισμό νέων αγγείων είναι η σύνδεση των αυξητικών παραγόντων με υποδοχείς επί των ενδοθηλιακών κυττάρων των υφισταμένων αιμοφόρων αγγείων, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του αντίστοιχου ενδοκυττάριου καταρράκτη σηματοδότησης. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα απελευθερώνουν μεταλλοπρωτεΐνες προκαλώντας λύση του περιβάλλοντος ιστού, ώστε να είναι εφικτός ο συνεχής πολλαπλασιασμός του ενδοθηλίου (Reinke & Sorg, 2012).

Στη συνέχεια, τριχοειδείς «κάλυκες» (capillary buds) αναπτύσσονται από τα αιμοφόρα αγγεία που γειτνιάζουν με το τραύμα και εκτείνονται στο χώρο του τραύματος. Τα ηρεμούντα ενδοθηλιακά κύτταρα από την πλευρά του φλεβιδίου που βρίσκεται πλησιέστερα στο τραύμα, αρχίζουν να μεταναστεύουν αποκρινόμενα σε αγγειογόνα ερεθίσματα (Tejiram et al., 2016). Αυτοί οι τριχοειδείς βλαστοί (capillary sprouts) διακλαδίζονται και τα άκρα τους συνδέονται για να σχηματίσουν τριχοειδείς βρόγχους (capillary loops), μέσω των οποίων αρχίζει να ρέει αίμα. Νέοι βλαστοί εκτείνονται ακολούθως από αυτούς τους βρόγχους, για να σχηματίσουν τελικά ένα τριχοειδές πλέγμα (capillary plexus). Οι μεσολαβητές για την ανάπτυξη και τη χημειοταξία των ενδοθηλιακών κυττάρων περιλαμβάνουν κυτταροκίνες που παράγονται από τα αιμοπετάλια, τα μακροφάγα και τα λεμφοκύτταρα στο τραύμα, συμπεριλαμβανομένων των FGF, PDGF, TGF- α , TGF- β , αγγειογενίνης και αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) -ειδικά, ο VEGF θεωρείται ως ένας από τους πιο ισχυρούς αγγειογενετικούς παράγοντες (Tejiram et al., 2016). Επίσης, ως παράγοντες χημειοταξίας δρουν η χαμηλή τάση οξυγόνου, το γαλακτικό οξύ και διάφορες βιογενείς αμίνες (Velnar et al., 2009; Tejiram et al., 2016).

Η μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι συνέπεια χημειοταξίας και αποτελεί προαπαιτούμενο στάδιο για την αγγειογένεση. Η κυτταρική μετανάστευση απαιτεί τρεις διαφορετικές ενέργειες: την εξώθηση του κυττάρου, την προσκόλληση, η οποία περιλαμβάνει σύνδεση του κυτταροσκελετού με την ECM, και την έλξη, η οποία καθοδηγεί το κυτταρόπλασμα (Velnar et al., 2009).

➤ *Εξώθηση*

Με τρεις τύπους διασυνδεδεμένων νηματίων, ο κυτταρικός σκελετός αγκιστρώνεται μεταξύ των κυττάρων και μεταξύ κυττάρων-ECM, παρέχοντας μηχανική υποστήριξη για τα κύτταρα. Το δίκτυο ακτίνης είναι γνωστό για τη δυναμική του αναδιοργάνωση και είναι σημαντικό για τον συντονισμό της κυτταρικής μετανάστευσης. Η κατεύθυνση της κίνησης του κυττάρου διατηρείται μέσω της περιοδικής συναρμολόγησης και αποσυναρμολόγησης των νηματίων ακτίνης, ενώ πολύπλοκες οδοί σηματοδότησης και ρυθμιστικές πρωτεΐνες ελέγχουν τη λειτουργία της ακτίνης και τις αλλαγές της κυτταρικής μορφολογίας (Velnar et al., 2009).

➤ *Προσκόλληση*

Η προσκόλληση στο στερεό υπόστρωμα της εξωκυττάριας μήτρας είναι ένα ιδιαίτερα σημαντικό βήμα στην κυτταρική μετανάστευση και ρυθμίζεται από τις ιντεγκρίνες. Η προσκόλληση και η μετανάστευση είναι αντίρροπες ρυθμιστικές διαδικασίες. Ο βέλτιστος ρυθμός μετανάστευσης επιτυγχάνεται με την αύξηση της προσκόλλησης, αλλά η κινητικότητα μειώνεται με περαιτέρω

προσκόλληση. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα μεταναστεύουν ταχύτερα αμέσως μετά τον τραυματισμό, ενώ αργότερα αποκτούν βραδύτερο ρυθμό μετανάστευσης, ο οποίος και διατηρείται κατά τη διάρκεια της επουλωτικής διαδικασίας (Velnar et al., 2009).

➤ *Έλξη των παρακειμένων ιστών*

Συσταλτικές δυνάμεις, που διαβιβάζονται μέσω των συνδέσεων ιντεγκρίνης-κυτταροσκελετού, επιτρέπουν στα κύτταρα να έλξουν το κυτταρόπλασμα προς τα εμπρός, δημιουργώντας αντίστοιχη τάση στο υπόστρωμα. Ο βαθμός της αντοχής της σύζευξης ιντεγκρίνης-κυτταροσκελετού επηρεάζεται από την ακαμψία του υποστρώματος. Με ισχυρότερες συζεύξεις στην επιφάνεια των κυττάρων, οι δυνάμεις μπορούν να μεταδίδονται στα κύτταρα που μεταναστεύουν περισσότερο αποτελεσματικά. Τα μακροφάγα, οι πολλαπλασιαζόμενοι ινοβλάστες και τα αναπτυσσόμενα αιμοφόρα αγγεία, σε συνδυασμό με το υπόστρωμα κολλαγόνου, το ινωδογόνο, την φιμπρονεκτίνη και το υαλουρονικό οξύ, αποτελούν τον κοκκιώδη ιστό που αντικαθιστά το προσωρινό υπόστρωμα θρόμβου που είχε δημιουργηθεί. Με τη συσσώρευση του κολλαγόνου, η πυκνότητα των αιμοφόρων αγγείων μειώνεται και ο κοκκιώδης ιστός ωριμάζει για την παραγωγή μιας ουλής (=ινώδης ιστός που αντικαθιστά το δέρμα μετά από τραυματισμό) (Velnar et al., 2009).

• **Επανεπιθηλιοποίηση**

Ενώ ο κοκκιώδης ιστός και η σύνθεση κολλαγόνου προχωρούν βαθιά στο τραύμα, αποκαθίσταται η επιθηλιακή ακεραιότητα στην επιφάνεια του τραύματος (Tejiram et al., 2016). Η επανεπιθηλιοποίηση της πληγής αρχίζει μέσα σε λίγες ώρες από τον τραυματισμό και περιλαμβάνει αρκετές επιμέρους διαδικασίες, όπως τη μετανάστευση των επιδερμικών κερατινοκυττάρων από τα χείλη του τραύματος εντός του τραύματος, τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων, τη διαφοροποίηση του νεοεπιθηλίου σε στρωματοποιημένη επιδερμίδα (stratified epidermis), καθώς και την αποκατάσταση της ζώνης που περιλαμβάνει τη βασική μεμβράνη του επιθηλίου (basement membrane zone) (Tejiram et al., 2016; Li et al., 2007).

Η μετανάστευση των κερατινοκυττάρων ξεκινά από τα άκρα του τραύματος, μέσα σε 24 ώρες από τον τραυματισμό. Γίνεται «επιπεδοποίηση» (flattening) και «επιμήκυνση» (elongation) των κερατινοκυττάρων, ανάπτυξη ψευδοποδίων, απώλεια των διεπαφών κυττάρου-κυττάρου και κυττάρου-ECM, σύσπαση των ενδοκυτταρικών νηματίων (intracellular tonofilaments) και σχηματισμός νηματίων ακτίνης στην άκρη του κυτταροπλάσματος. Στη διαδικασία αυτή συμμετέχουν υποδοχείς ιντεγκρίνης, αυξητικοί παράγοντες καθώς και μεταλλοπρωτεϊνάσες (Li et al., 2007).

Η επανεπιθηλιοποίηση περιλαμβάνει επίσης αυξημένο πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων που βρίσκονται στα χείλη του τραύματος. Αυτή η πηγή πολλαπλασιαζόμενων κερατινοκυττάρων εξασφαλίζει την επαρκή παροχή κυττάρων που μεταναστεύουν για να καλύψουν το τραύμα. Όταν η μετανάστευση παύει, πιθανώς ως αποτέλεσμα της αναστολής λόγω επαφής, τα κερατινοκύτταρα επανασυνδέονται με το υποκείμενο υπόστρωμα, γίνεται ανασύσταση της βασικής μεμβράνης του επιθηλίου και στη συνέχεια επαναλαμβάνεται η διαδικασία της τελικής διαφοροποίησης, με σκοπό τη δημιουργία πολυστιβαδωτής επιδερμίδας.

Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία μονού στρώματος κερατινοκυττάρων στο κέντρο του τραύματος και πολλαπλών στρώσεων κοντά στα χείλη του τραύματος (Li et al., 2007).

Η διαμόρφωση μιας νέας βασικής μεμβράνης που συνδέει την επιδερμίδα με το χόριο είναι απαραίτητη για την αποκατάσταση της ακεραιότητας και της λειτουργίας του δέρματος. Μέσα σε επτά έως εννέα ημέρες από την επαναεπιθηλιοποίηση, πραγματοποιείται η αποκατάσταση αυτής της μεμβράνης (Li et al., 2007).

1.2.3. Φάση 3: Ωρίμανση και αναδιαμόρφωση

Η φάση αυτή εκτείνεται από την ανάπτυξη νέου επιθηλίου έως και το σχηματισμό της ουλής. Η σύνθεση της ECM στην φάση πολλαπλασιασμού και στη φάση αναδιαμόρφωσης γίνεται ταυτόχρονα με τη δημιουργία του κοκκιώδους ιστού. Αυτή η φάση μπορεί να διαρκέσει μέχρι και 1 ή 2 χρόνια, ή μερικές φορές και ακόμη περισσότερο. Η αναδιαμόρφωση της πληγής είναι αυστηρά ελεγχόμενη, στοχεύοντας στην πλήρη επούλωση και εξαρτάται από την ωρίμανση της ECM, την αύξηση της διαμέτρου των ινών κολλαγόνου και την υδρόλυση του υαλουρονικού οξέος και της φιμπρονεκτίνης (Velnar et al., 2009).

Χαρακτηριστικό αυτής της φάσης είναι η μεταβολή της σύστασης της ECM (Li et al., 2007), η οποία ακολουθεί ένα ορισμένο πρότυπο με την πάροδο του χρόνου. Αρχικά, η ECM αποτελείται κυρίως από ινώδες και φιμπρονεκτίνη που προέρχονται από την αιμόσταση και τα μακροφάγα. Μια άλλη πρόιμα εκφρασμένη πρωτεΐνη είναι η θρομβοσπονδίνη-1 (thrombospondin-1), η οποία επίσης διεγείρει την κυτταρική προσέλκυση στο περιβάλλον του τραύματος. Γλυκοζαμινογλυκάνες, πρωτεογλυκάνες και άλλες πρωτεΐνες όπως η εκκρινόμενη πλούσια σε κυστεΐνη όξινη πρωτεΐνη συντίθενται στη συνέχεια και υποστηρίζουν την περαιτέρω εναπόθεση και αναδιαμόρφωση της μήτρας. Ακολούθως, το κολλαγόνο γίνεται η κυρίαρχη πρωτεΐνη της ουλής (Tejiram et al., 2016; Clark 1988).

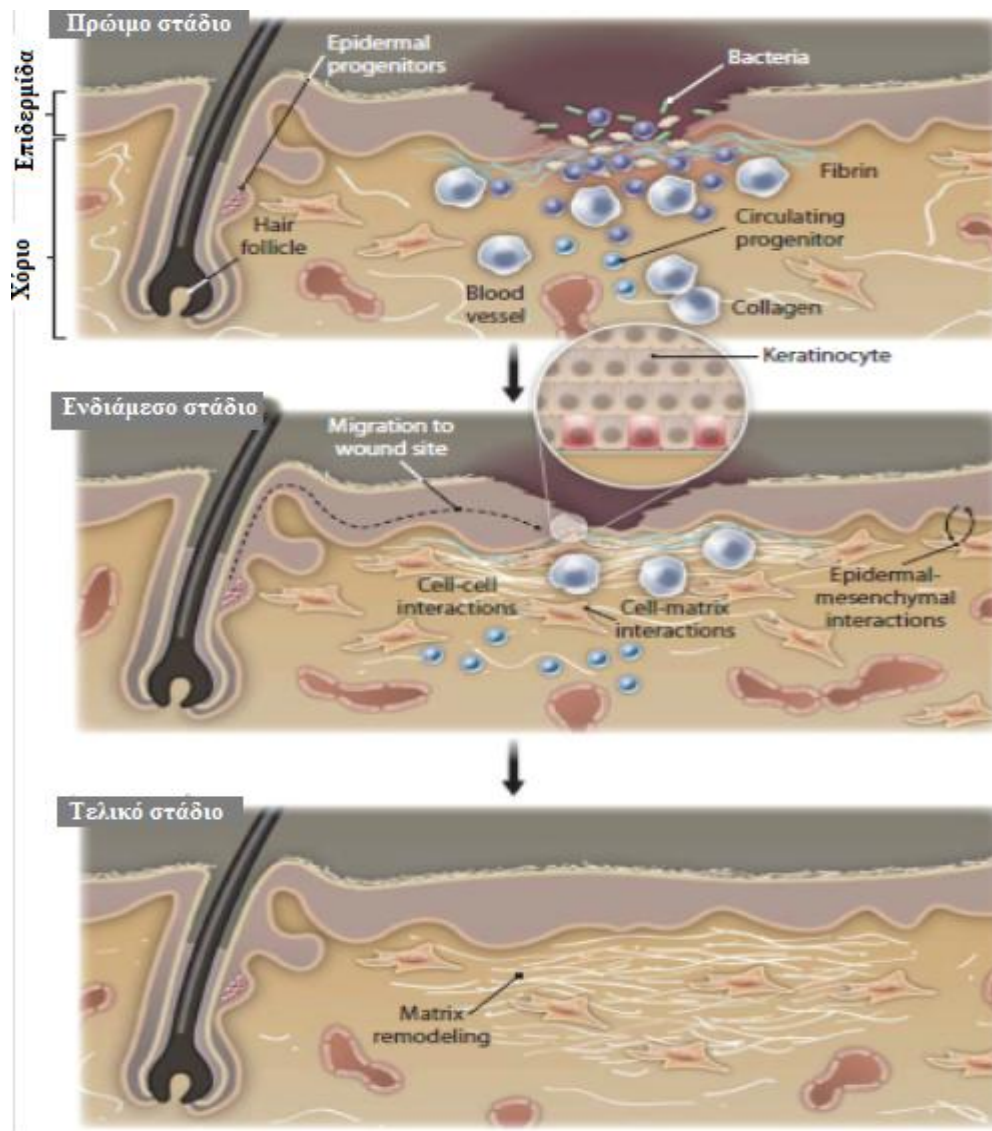
Το κολλαγόνο αρχικά εναποτίθεται με φαινομενικά τυχαίο τρόπο. Στη συνέχεια, τα μεμονωμένα ινίδια κολλαγόνου αναδιοργανώνονται με διασταυρούμενη σύνδεση σε κανονικά ευθυγραμμισμένα δεμάτια προσανατολισμένα κατά μήκος των τοπολογικών «γραμμών Langer» (lines of stress, Langers's lines, skin tension lines) στο υπό επούλωση τραύμα. Οι ινοβλάστες είναι επίσης υπεύθυνοι για την παραγωγή άλλων συστατικών της ECM, συμπεριλαμβανομένης της φιμπρονεκτίνης και των γλυκοζαμινογλυκανών (Tejiram et al., 2016). Το κολλαγόνο τύπου ΙΙΙ το οποίο επικρατεί στον κοκκιώδη ιστό, αντικαθίσταται πλέον από το ισχυρότερο κολλαγόνο τύπου Ι (Li et al., 2007). Η μηχανική αντοχή του τραύματος αυξάνει προοδευτικά με την εναπόθεση κολλαγόνου. Οι ίνες κολλαγόνου μπορούν να ανακτήσουν περίπου το 80% της αρχικής αντοχής σε σύγκριση με τον μη τραυματισμένο ιστό. Η σύνθεση του κολλαγόνου, όπως και η αναδιαμόρφωση της ECM, τείνουν να σταθεροποιηθούν περίπου 3 εβδομάδες μετά τον τραυματισμό (Velnar et al., 2009; Tejiram et al., 2016).

Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες μήτρας (Matrix Metalloproteinases - MMPs), οι οποίες παράγονται από τα ουδετερόφιλα, τα μακροφάγα και τους ινοβλάστες στην περιοχή του τραυματισμού, είναι τα ένζυμα που ευθύνονται για την υδρόλυση του κολλαγόνου (Velnar et al., 2009). Η δράση τους ρυθμίζεται αυστηρά από ανασταλτικούς παράγοντες. Καθώς η δράση των ανασταλτικών παραγόντων αυξάνεται σταδιακά, αυτό έχει ως επακόλουθο τη μείωση της δραστηριότητας των MMPs και τη σταδιακή εναπόθεση της νέας ECM. Παρά το γεγονός ότι η αρχική εναπόθεση των ινών κολλαγόνου δεν φαίνεται να έχει συγκεκριμένη οργάνωση, με την πάροδο του χρόνου οι ίνες αποκτούν όλο και πιο οργανωμένη δομή (Velnar et al., 2009, Li J et al., 2007).

1.2.4. Φάση 4: Συστολή της πληγής

Σε επόμενο στάδιο, αρχίζει η συρρίκνωση του τραύματος, η οποία είναι ανάλογη του βάθους του τραύματος. Για πλήρους πάχους τραύματα, η συρρίκνωση αποτελεί σημαντικό στάδιο της επούλωσης και οδηγεί σε μείωση του μεγέθους τους έως και 40%. Σε τραύματα μερικού πάχους, η συρρίκνωση είναι μικρότερη και ανάλογη με το βάθος τους. Οι μυοϊνοβλάστες είναι οι κυρίαρχοι διαμεσολαβητές αυτής της διαδικασίας λόγω της συσταλτικής τους ικανότητας. Κατά τη διάρκεια του σχηματισμού κοκκιώδους ιστού, οι ινοβλάστες σταδιακά μετασχηματίζονται σε μυοϊνοβλάστες, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από δέσμες μικρονηματίων ακτίνης, παρόμοιες με εκείνες που παρατηρούνται σε λεία μυϊκά κύτταρα (οι οποίες δεν εντοπίζονται στα δίκτυα των φυσιολογικών ινοβλαστών δέρματος). Αυτή η μορφή ακτίνης ονομάζεται ακτίνη-α των λείων μυϊκών κυττάρων (α -SMA - α -Smooth Muscle Actin) και αποτελεί χαρακτηριστικό δείκτη της διαφοροποίησης των λείων μυϊκών κυττάρων αλλά και των μυοϊνοβλαστών. Τα κύτταρα εντός του τραύματος ευθυγραμμίζονται κατά μήκος των τοπολογικών «γραμμών Langer», με αποτέλεσμα το κλείσιμο του τραύματος να εμφανίζεται επίσης στην κατεύθυνση αυτών των γραμμών (Li et al., 2007).

Οι συσπάσεις που προκαλούν οι μυοϊνοβλάστες στην πληγή και οι πολλαπλές προσκολλήσεις στο κολλαγόνο, έχουν ως αποτέλεσμα την μείωση της επιφάνειας της ουλής. Δεδομένου ότι η πληγή επουλώνεται, η πυκνότητα των ινοβλαστών και των μακροφάγων μειώνεται σταδιακά, μέσω απόπτωσης. Με την πάροδο του χρόνου, η ανάπτυξη των τριχοειδών σταματά, η ροή του αίματος μειώνεται και η μεταβολική δραστηριότητα στην περιοχή της προϋπάρχουσας πληγής ελαττώνεται. Το τελικό αποτέλεσμα είναι μια πλήρως ωριμασμένη ουλή, με μειωμένο αριθμό κυττάρων και αυξημένη αντοχή (Velnar et al., 2009).



Εικόνα 1.4: Μοριακοί και κυτταρικοί μηχανισμοί στην φυσιολογική επούλωση του δέρματος. Το πρώιμο στάδιο της επούλωσης περιλαμβάνει την αιμόσταση και την ενεργοποίηση των κερατινοκυττάρων καθώς και των κυττάρων της φλεγμονής. Το ενδιάμεσο στάδιο αφορά στον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των κερατινοκυττάρων, τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών, την εναπόθεση της εξωκυττάριας μήτρας και την αγγειογένεση. Το τελικό στάδιο της επούλωσης περιλαμβάνει την αναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας μήτρας (matrix remodeling), η οποία οδηγεί στο σχηματισμό ουλής και την αποκατάσταση του φραγμού του δέρματος. Αυτή η χωροχρονική διαδικασία ελέγχεται αυστηρά από διάφορα είδη κυττάρων, τα οποία εκκρίνουν πολυάριθμους αυξητικούς παράγοντες, κυτταροκίνες και χημειοκίνες, για να κλείσει η πληγή και να επιτευχθεί η λειτουργική αποκατάσταση του δερματικού φραγμού [Epidermal progenitors: επιδερμικά προγονικά κύτταρα, hair follicle: θύλακος τριχών, blood vessel: αιμοφόρο αγγείο, fibrin: ινώδες, bacteria: βακτήρια, circulating progenitors: κυκλοφορούντα προγονικά κύτταρα, collagen: κολλαγόνο, migration to wound site: μετανάστευση στην περιοχή του τραύματος, cell-cell interactions: διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις, cell-matrix interactions: αλληλεπιδράσεις κυττάρων-εξωκυττάριας μήτρας, epidermal-mesenchymal interactions: επιδερμικές-μεσεγχυματικές αλληλεπιδράσεις] (Eming et al., 2014).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΜΕ ΠΙΘΑΝΗ ΕΠΟΥΛΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ – Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ β-ΘΥΜΟΣΙΝΩΝ

2.1. Θυμοσίνες

Ιστορική αναδρομή

Οι μελέτες των θυμοσινών ξεκίνησαν το 1965 από τους Klein, Goldstein και White (Klein et al., 1965), οι οποίοι μελετούσαν θυμικούς παράγοντες υπεύθυνους για τις φυσιολογικές λειτουργίες του θύμου αδένος. Για να επαναφέρουν τη λειτουργία του αδένος σε ζώα με ανεπάρκεια θύμου αδένος ή, γενικά, με ανοσοανεπάρκεια, καθώς και σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς ή σε ασθενείς με πρωτογενή ανοσοανεπάρκεια, οι παραπάνω ερευνητές παρασκεύασαν ένα εκχύλισμα από βόειο θύμο αδένος. Το εκχύλισμα αυτό πράγματι οδήγησε σε βελτίωση της ανοσολογικής απόκρισης (Hannappel & Huff, 2003). Δεδομένου ότι η διαδικασία απομόνωσης του εκχυλίσματος από βόειο θύμο πραγματοποιήθηκε σε πέντε στάδια, το τελικό προϊόν ονομάστηκε θυμοσινικό κλάσμα 5 (Thymosin Fraction 5, TF5) (Huff et al., 2001).

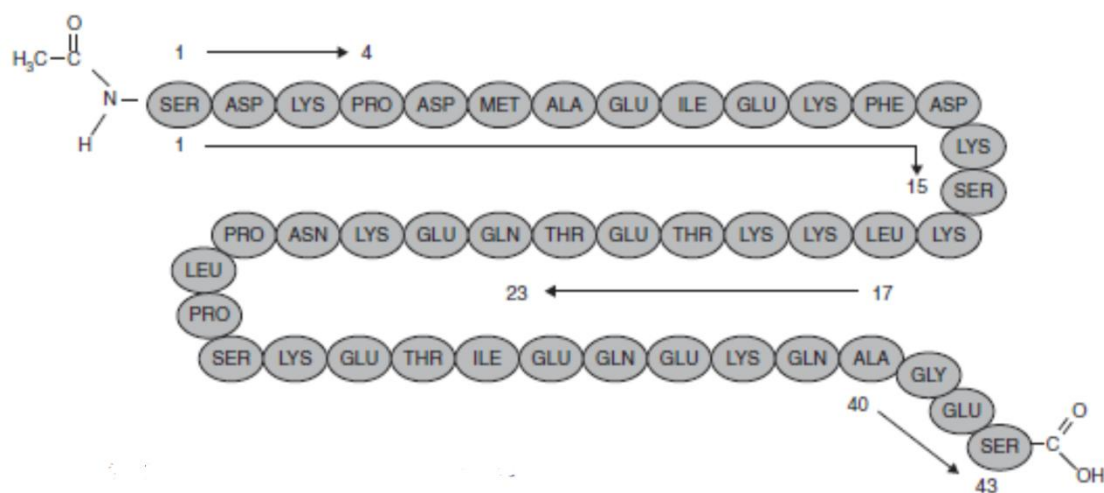
Το 1966, οι Klein, Goldstein και White (Klein et al., 1966) επινόησαν τον όρο «θυμοσίνη» για τον βιοδραστικό παράγοντα του θυμοσινικού κλάσματος 5. Αρχικά, θεωρήθηκε ότι η «θυμοσίνη» είναι ένα απλό πολυπεπτίδιο μοριακού βάρους 12,6 kDa, που δρα ως ορμόνη του θύμου. Αργότερα, ωστόσο, αποδείχθηκε ότι το θυμοσινικό κλάσμα 5 αποτελείται από ένα μείγμα μικρών πεπτιδίων με μοριακό βάρος που κυμαίνεται από 1 έως 15 kDa (Hannappel & Huff, 2003). Μερικά από αυτά τα πεπτίδια θα μπορούσαν να είναι θραύσματα μεγαλύτερων πολυπεπτιδίων, τα οποία δημιουργούνται κατά τη διαδικασία παρασκευής του TF5 (Huff et al., 2001).

Λόγω του μεγάλου αριθμού πεπτιδίων που ανιχνεύτηκαν στο TF5, προτάθηκε συγκεκριμένη ομαδοποίηση και ονοματολογία. Η κατηγοριοποίηση των πεπτιδίων έγινε με βάση το ισοηλεκτρικό σημείο (pI) τους, ως εξής: α-θυμοσίνες (pI κάτω από 5), β-θυμοσίνες (pI μεταξύ 5 και 7), και γ-θυμοσίνες (pI πάνω από 7). Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν αριθμητικοί δείκτες για να υποδηλώσουν τη χρονολογική σειρά απομόνωσης των πεπτιδίων (Hannappel & Huff, 2003; Huff et al., 2001). Κάποια από αυτά τα πεπτίδια (όπως η θυμοσίνη α1 και η θυμοσίνη β4) εντοπίστηκαν σε μεγαλύτερες ποσότητες, οπότε επιλέχτηκαν για περαιτέρω καθαρισμό και μελέτη της βιολογικής τους δράσης. Οι μελέτες έδειξαν ότι τα πεπτίδια αυτά δεν έχουν ορμονική δράση, είναι όμως βιολογικά σημαντικά, με συμμετοχή σε ποικίλες ενδοκυτταρικές και εξωκυτταρικές λειτουργίες (Hannappel & Huff, 2003).

2.2. Η θυμοσίνη β4 (Τβ4)

Η θυμοσίνη β4 (Τβ4) αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά βιοδραστικά συστατικά του ΤF5 (Hannappel & Huff, 2003) και αντιπροσωπεύει περίπου το 70-80% του συνόλου των β-θυμοσινών (Hannappel & Huff, 2003; Crockford et al., 2010). Η πρωτοταγής δομή της Τβ4 ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1981 (Low et al., 1981). Πρόκειται για ένα εξαιρετικά συντηρημένο πεπτίδιο, το οποίο απαντά φυσιολογικά σε όλους τους ιστούς και σε όλους τους τύπους κυττάρων, με εξαίρεση τα ερυθροκύτταρα. Εντοπίζεται επίσης στο αίμα και σε άλλα σωματικά υγρά, συμπεριλαμβανομένων των δακρύων, του σάλιου, του εγκεφαλονωτιαίου υγρού και του υγρού των πλεγμών (εξίδρωμα) (Kleinman&Sosne, 2016). Η συγκέντρωση της Τβ4 στο ολικό αίμα βρέθηκε ίση με 16 μg/mL (Pipes&Yang, 2016), ενώ στο εξίδρωμα 13 μg/mL. Οι τιμές αυτές αποδόθηκαν στην παρουσία του πεπτιδίου σε υψηλές συγκεντρώσεις τόσο στα αιμοπετάλια, όσο και στα λευκοκύτταρα (Kleinman&Sosne, 2016). Η Τβ4 έχει επίσης ανιχνευθεί στο πλάσμα (σε συγκεντρώσεις περίπου 1% αυτών του ολικού αίματος) καθώς και τον ορό του αίματος, προερχόμενη πιθανότατα από τα αιμοπετάλια και τα λευκοκύτταρα, παρά το γεγονός ότι η αλληλουχία της δεν διαθέτει κάποιο ειδικό εκκριτικό σήμα (Huff et al., 2002; Huff et al., 2001).

Η Τβ4 είναι ένα μικρό πολυπεπτίδιο (pI 5,1) μοριακού βάρους 4.964 Da, το οποίο αποτελείται από 43 αμινοξέα (Εικόνα 2.1), εκ των οποίων η σερίνη του Ν-τελικού άκρου της εμφανίζεται συχνά ακετυλιωμένη στα κύτταρα (Hara, 2011). Στον άνθρωπο, η Τβ4 εκφράζεται από το γονίδιο *TMSB4X*, το οποίο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα X, στη θέση q21,3-q22 (Hara, 2011; Pipes&Yang, 2016).



Εικόνα 2.1: Η πρωτοταγής αλληλουχία της Τβ4 (Goldstein&Kleinman, 2015).

Η Τβ4 χαρακτηρίζεται από μια δυναμική και ευέλικτη διαμόρφωση. Αναλύσεις NMR έδειξαν ότι σε υδατικά διαλύματα, το πεπτίδιο έχει τυχαία διαμόρφωση (Crockford et al., 2010). Εντούτοις, σε υδατικά διαλύματα που περιέχουν φθοριωμένες αλκοόλες, έχει την τάση να σχηματίζει α-ελικοειδείς δομές, που αποτελούνται από τα αμινοξέα 4-16 και σε μικρότερο βαθμό από τα αμινοξέα 30-40 (Huff et al., 2001). Επιπλέον,

έχει αναφερθεί ότι η Tβ4 υιοθετεί διάφορες ανώτερες δομές κατά την αλληλεπίδρασή της με άλλες πρωτεΐνες, ιδιότητα που είναι γνωστό ότι διευκολύνει μόρια με πολλαπλές λειτουργίες («moonlighting» μόρια) (Hara, 2011).

Δράσεις της Tβ4

A. Ενδοκυτταρικές δράσεις

Η Tβ4 εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, αν και έχει επίσης ανιχνευθεί στον κυτταρικό πυρήνα (Goldstein et al., 2005).

Στο κυτταρόπλασμα, η Tβ4 θεωρείται ως η κύρια πρωτεΐνη που δεσμεύει την ακτίνη και, ως εκ τούτου, συμμετέχει στη διαμόρφωση του κυτταροσκελετού. Συγκεκριμένα, η Tβ4 αλληλεπιδρά μέσω της αλληλουχίας L¹⁷KKTET²² με τα μονομερή G-ακτίνης, σχηματίζοντας σύμπλεγμα σε αναλογία 1:1 (Crockford et al., 2010; Kleinman&Sosne, 2016). Μέσω αυτής της αλληλεπίδρασης, αναστέλλεται ο πολυμερισμός των μονομερών της G-ακτίνης προς F-ακτίνη και ο επακόλουθος σχηματισμός μικροϊνιδίων ακτίνης (Hara, 2011). Έτσι, ο μηχανισμός δράσης της Tβ4 πιστεύεται ότι συνδέεται με τη διατήρηση μιας δυναμικής ισορροπίας μεταξύ της G- και F-ακτίνης, που είναι απαραίτητη για την ταχεία αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού. Με αυτό τον τρόπο η Tβ4 επηρεάζει τη διαφοροποίηση και τη μετανάστευση των κυττάρων καθώς και τις διαδικασίες της οργανογένεσης και της μορφογένεσης (Crockford et al., 2010).

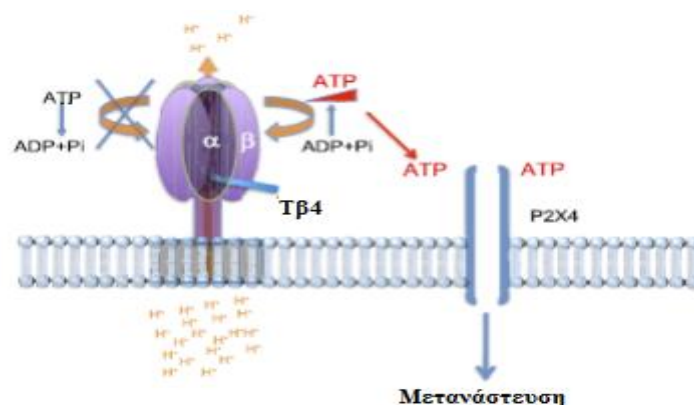
Πέρα από την ακτίνη, έχουν ταυτοποιηθεί πολλές άλλες πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την Tβ4 μέσα στο κύτταρο: π.χ. η Ku80 υπομονάδα της DNA ελικάσης (DNA helicase), η σταμπιλίνη-2 (stabilin-2), η PINCH-1, η συνδεδεμένη με ιντεγκρίνη κινάση (Integrin Linked Kinase, ILK) και η hMLH1. Ιδιαίτερα η αλληλεπίδραση της Tβ4 με την ILK, που είναι η ίδια ένα κομβικό μόριο μονοπατιών σηματοδότησης και ρυθμίζει έμμεσα μία ευρεία ποικιλία κυτταρικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένης της κινητικότητας, της προσκόλλησης, της μετανάστευσης και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, είναι πιθανόν να ενέχεται στους μηχανισμούς δράσης της Tβ4 (Pipes&Yang, 2016).

Λόγω του μικρού μεγέθους της, η Tβ4 μπορεί να εισέλθει στον πυρήνα με απλή διάχυση μέσω των πυρηνικών πόρων, όπου έχει επίσης εντοπισθεί και όπου εικάζεται ότι θα μπορούσε να λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας (Goldstein et al., 2005).

B. Εξωκυτταρικές δράσεις – Δράση στην επούλωση

Εκτός από τις διάφορες ενδοκυτταρικές δράσεις της Τβ4, πολλά στοιχεία της βιβλιογραφίας συνηγορούν στη συμμετοχή του 43-πεπτιδίου σε σημαντικές εξωκυτταρικές λειτουργίες. Πιο συγκεκριμένα, σημαντική ποσότητα Τβ4 είναι πιθανόν να απελευθερώνεται από τα κύτταρα, με μηχανισμούς που δεν έχουν πλήρως διευκρινισθεί, και στη συνέχεια το πεπτίδιο να δρα ως παρακρινικός παράγοντας, συμμετέχοντας σε αρκετές φυσιολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της αγγειογένεσης, της ρύθμισης της φλεγμονής, της αναγέννησης διάφορων ιστών καθώς και της επούλωσης τραυμάτων (Hara, 2011; Huff et al., 2002).

Στη βιβλιογραφία, έχουν προταθεί δύο πιθανοί τρόποι δράσης της εξωκυτταρικής Τβ4: είτε εισέρχεται, μέσω αδιευκρίνιστου μηχανισμού, στο κύτταρο και δρα προάγοντας από εκεί τις επιμέρους λειτουργίες της, είτε σηματοδοτεί μέσω ενός αγνώστου υποδοχέα στην επιφάνεια των κυττάρων. Ωστόσο, κανένας από τους προτεινόμενους ενδοκυτταρικούς μηχανισμούς δράσης της Τβ4 δεν μπορεί να εξηγήσει την διέγερση της κυτταρικής μετανάστευσης, που προκαλεί η εξωκυτταρική Τβ4, ειδικά καθώς οι παροδικές αυξήσεις στα κυτταροπλασματικά επίπεδα του μορίου έχει αναφερθεί ότι αναστέλλουν τη μετανάστευση. Το εύρημα αυτό συνηγορεί στην ύπαρξη υποδοχέων, που διαμεσολαβούν την εξωκυτταρική δράση της Τβ4 (Freeman et al., 2011).



Εικόνα 2.2: Προτεινόμενος μηχανισμός εξωκυτταρικής σηματοδότησης της Τβ4 (Freeman et al., 2011).

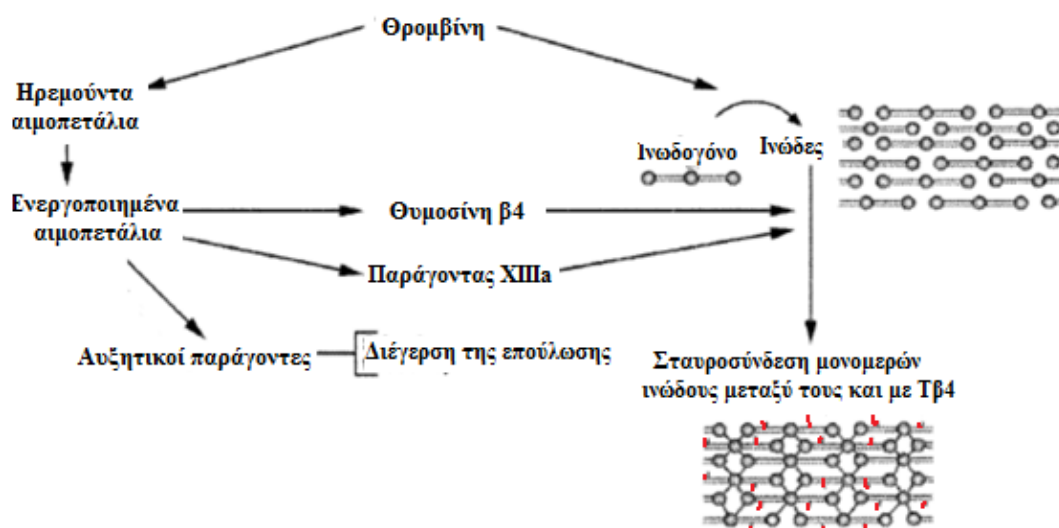
Παρά τις προσπάθειες, μικρή πρόοδος έχει μέχρι στιγμής επιτευχθεί ως προς τον εντοπισμό και το χαρακτηρισμό κυτταρικών υποδοχέων που θα μπορούσαν να διαμεσολαβούν τις εξωκυτταρικές δράσεις της Τβ4. Η ακτίνη έχει εντοπισθεί στην κυτταρική επιφάνεια και είναι πιθανόν να δρα ως υποδοχέας, αλλά αυτή η υπόθεση δεν έχει αποδειχθεί. Η Τβ4 είναι επίσης πιθανόν να δρα μέσω πουρινεργικών υποδοχέων, καθώς σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η δράση θραύσματος του πεπτιδίου ($L^{17}KKTETQ^{23}$) σε *in vitro* σύστημα μετανάστευσης (scratch assay) κυττάρων PAM212 (κερατινοκύτταρα ποντικού) αναστάλη παρουσία suramin, γνωστού ανταγωνιστή των P2-υποδοχέων (Huang et al., 2006). Σύμφωνα με μεταγενέστερο άρθρο της βιβλιογραφίας (Εικόνα 2.2), η Τβ4 είναι πιθανόν να δεσμεύεται στην ATP συνθάση, στη θέση ενός αναστολέα. Η ATP συνθάση είναι ένα ένζυμο που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή ATP στα κύτταρα και έχει εντοπισθεί στην κυτταρική μεμβράνη κυττάρων HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells - ανθρώπινα

ενδοθηλιακά κύτταρα ομφάλιας φλέβας). Η δέσμευση της Τβ4 έχει ως αποτέλεσμα να αυξάνεται η συγκέντρωση ATP στην επιφάνεια του κυττάρου. Τα αυξημένα επίπεδα ATP διεγείρουν, με τη σειρά τους, τον πουρινεργικό υποδοχέα P2X₄, ο οποίος φάνηκε, σε συγκεκριμένα πειράματα, να είναι απαραίτητος για την επαγόμενη από τη Τβ4 μετανάστευση των HUVEC κυττάρων (Freeman et al., 2011).

Ο ρόλος της Τβ4 στην επούλωση του δέρματος

Μετά από τραυματισμό, στο εξίδρωμα εμφανίζονται αυξημένες συγκεντρώσεις της Τβ4, γεγονός που υποδεικνύει ότι το πεπτιδίο μπορεί να συμμετέχει ενεργά στα διάφορα στάδια της επούλωσης (Kleinman&Sosne, 2016). Επίσης, η Τβ4 είναι πιθανόν να ενέχεται και στο αρχικό στάδιο, της αιμόστασης.

Σύμφωνα με τους Huff et al. (2002), η Τβ4 εμπλέκεται στην πήξη του αίματος, μια από τις πρώτες φάσεις της επούλωσης. Συγκεκριμένα, μετά την ενεργοποίηση των ανθρώπινων αιμοπεταλίων από τη θρομβίνη, πιθανόν να απελευθερώνεται Τβ4 και να σταυροσυνδέεται με το ινώδες. Δεδομένου ότι ο παράγοντας XIIIa (που δρα ως τρανσγλουταμινάση) απελευθερώνεται ταυτόχρονα με την Τβ4 από τα θρομβοκύτταρα, προτάθηκε ότι είναι πιθανόν να διαμεσολαβεί τη σταυροσύνδεση της Τβ4 με το ινώδες. Η υπόθεση αυτή παρέχει έναν πιθανό μοριακό μηχανισμό για τη «σταθεροποίηση» της Τβ4 κοντά στις θέσεις ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, επιτρέποντάς της να συνεισφέρει σε βιολογικές διεργασίες που σχετίζονται με την πήξη και την επιδιόρθωση του τραύματος (Εικόνα 2.3).



Εικόνα 2.3: Σχηματική παράσταση της πιθανολογούμενης εμπλοκής της Τβ4 στην πήξη του αίματος. Τα μόρια Τβ4 φαίνονται σαν κόκκινες κατακόρυφες μικρές γραμμές (Huff et al., 2002).

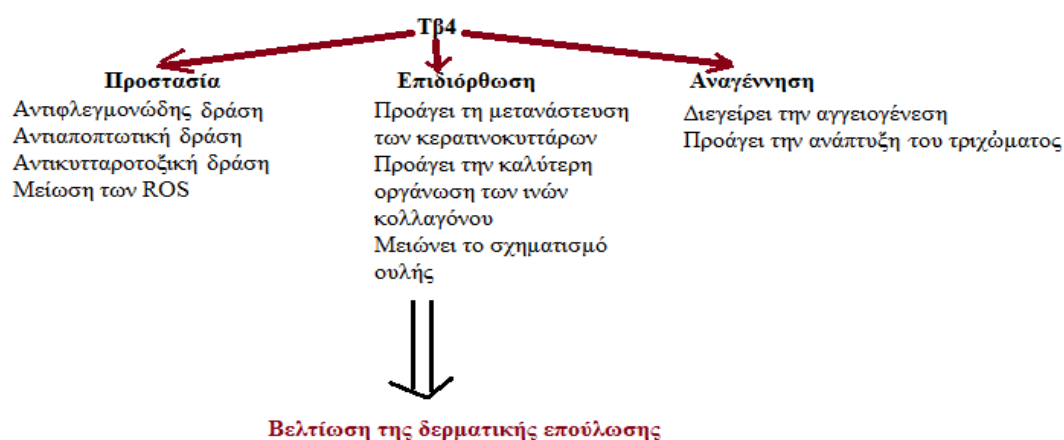
Τα συνήθη συμπτώματα μιας χρόνιας πληγής είναι η παρατεταμένη φλεγμονή, ο δυσλειτουργικός πολλαπλασιασμός των κυττάρων και η μη φυσιολογική εναπόθεση κολλαγόνου. Στη φάση της φλεγμονής, η Τβ4, που βρίσκεται σε αφθονία στα αιμοπετάλια, πιθανόν να εμφανίζει χημειοτακτικό ρόλο, συμβάλλοντας στην κατευθυνόμενη μετανάστευση των κερατινοκυττάρων και των ενδοθηλιακών

κυττάρων, τα οποία άμεσα μεταναστεύουν στην τραυματισμένη περιοχή, επιτρέποντας να ξεκινήσει η διαδικασία της επούλωσης. Η Τβ4 εμφανίζει επίσης αντιφλεγμονώδη και αντιαποπτωτικό ρόλο, προστατεύοντας τον τραυματισμένο ιστό από επιπλέον καταστροφή που μπορεί να επιφέρουν υπολείμματα που εκκρίνουν τα κατεστραμμένα κύτταρα. Μελέτες έδειξαν ακόμη ότι διαθέτει αντικυτταροτοξικές δράσεις, προστατεύοντας από τις αρνητικές επιπτώσεις διάφορων βλαπτικών παραγόντων. Επιπροσθέτως, η Τβ4 αποδείχτηκε ότι προκαλεί μείωση των επιπέδων των δραστικών μορφών οξυγόνου (που εμφανίζονται λόγω της υποξίας στο τραύμα) σε ορισμένα κύτταρα, γεγονός που θα μπορούσε να ωφελήσει και τη δερματική επούλωση (Kleinman&Sosne, 2016).

Κατά τη διάρκεια της φάσης του πολλαπλασιασμού, η Τβ4 προάγει τη μετανάστευση διάφορων κυττάρων στο τραύμα, συμπεριλαμβανομένων των ινοβλαστών, των κερατινοκυττάρων και των ενδοθηλιακών κυττάρων. Οι ινοβλάστες πολλαπλασιάζονται και εναποθέτουν τον κοκκιώδη ιστό. Ακόμη, η Τβ4 διεγείρει τη μετανάστευση των κερατινοκυττάρων κατά μήκος του κοκκιώδους ιστού, η οποία είναι σημαντική στην αποκατάσταση του φραγμού του δέρματος για την πρόληψη της απώλειας υγρών και της μόλυνσης. Η Τβ4 διεγείρει επίσης την αγγειογένεση και προκαλεί αύξηση στα επίπεδα μορίων, όπως του VEGF, κ.λπ. Επιπλέον μελέτες δείχνουν ότι επιδρά θετικά στο ρυθμό σύνθεσης του κολλαγόνου, ενώ προάγει τον πιο οργανωμένο σχηματισμό των ινών κολλαγόνου. Έχει επίσης αποδειχθεί ότι μειώνει τον σχηματισμό των μυοϊνοβλαστών και αυτό εξηγεί πιθανώς την αντι-ινωτική της δράση (Kleinman&Sosne, 2016).

Κατά τη διάρκεια της φάσης αναδιαμόρφωσης, η Τβ4 δρα προάγοντας την καλύτερη οργάνωση των ινών κολλαγόνου και πιθανώς μειώνει τον σχηματισμό ουλής. Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι προάγει την ανάπτυξη των τριχών σε διάφορα ζωικά πρότυπα, συμπεριλαμβανομένων προτύπων αρουραίων, υπερέλικων ποντικών καθώς και ποντικών που εμφανίζουν απώλεια τριχώματος, η οποία επάγεται από χημειοθεραπευτικούς παράγοντες (Kleinman&Sosne, 2016).

Ο ρόλος της Τβ4 (προστατευτικός, επιδιορθωτικός, αναγεννητικός) στην επούλωση πληγών του δέρματος συνοψίζεται παραστατικά στην Εικόνα 2.4.



Εικόνα 2.4: Ο ρόλος της Τβ4 στη δερματική επούλωση (τροποποιημένη από Kleinman&Sosne, 2016).

Ο ρόλος της Tβ4 στην επούλωση του καρδιακού ιστού

Οι καρδιακές παθήσεις συμπεριλαμβανομένου του εμφράγματος μυοκαρδίου, του εγκεφαλικού επεισοδίου και των περιφερικών αγγειακών παθήσεων αποτελούν μία από τις κύριες αιτίες θανάτου στον σύγχρονο κόσμο. Το έμφραγμα μυοκαρδίου οφείλεται στην οξεία απώλεια της μυοκαρδιακής λειτουργίας λόγω αγγειακής απόφραξης της στεφανιαίας αρτηρίας. Υπάρχουν αρκετές μελέτες που αφορούν στην εμπλοκή της Tβ4 στην επούλωση του καρδιακού ιστού και κάποιοι μηχανισμοί δράσης έχουν ήδη προταθεί.

Ένας κύριος μηχανισμός καρδιοπροστασίας από την Tβ4 είναι η μείωση του κυτταρικού θανάτου κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας ή της βλάβης επαναιμάτωσης. Αυτή η επίδραση είναι ευρεία στον καρδιακό ιστό: η επιβίωση των καρδιομυοκυττάρων, των ινοβλαστών, των επικαρδιακών κυττάρων και των ενδοθηλιακών προγονικών κυττάρων (EPCs-endothelial progenitor cells) βελτιώνεται σε όλα τα είδη αυτών των κυττάρων μετά από χορήγηση Tβ4 (Pipes&Yang, 2016). Επιπλέον, η Tβ4 φαίνεται να προάγει την ανάπτυξη των αιμοφόρων αγγείων. Σε δοκιμασία χοριοαλλαντοϊκής μεμβράνης, η Tβ4 διέγειρε την αγγειογένεση σε όλες τις υπό δοκιμή συγκεντρώσεις (Koutrafouri et al., 2001). Αρκετές μελέτες σε πρότυπα εμφραγματικών ποντικών αναφέρουν αυξημένη πυκνότητα τριχοειδών στην περιοχή που γειτνιάζει με το έμφραγμα, σε ποσοστό 60% έως 250%, μετά από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση Tβ4 (Pipes&Yang, 2016).

Ένας προτεινόμενος μηχανισμός δράσης αναφέρει ότι η εξωγενώς χορηγούμενη Tβ4 αυξάνει την έκφραση της πρωτεΐνης PINCH. Η Tβ4 δεσμεύεται στην PINCH και σχηματίζει ένα λειτουργικό σύμπλεγμα με την κινάση ILK. Το σύμπλεγμα αυτό φωσφορυλιώνει την πρωτεϊνική κινάση B (Akt2), οδηγώντας σε αύξηση της παραγωγής της MMP-2, μεταλλοπρωτεϊνάσης που είναι υπεύθυνη για την αποικοδόμηση της ECM. Η διαδικασία διάσπασης της ECM, που αποτελεί εμπόδιο στην κυτταρική κινητικότητα, είναι απαραίτητη κατά τη διάρκεια της μετανάστευσης των μυοκαρδιακών κυττάρων (Fan et al., 2009).

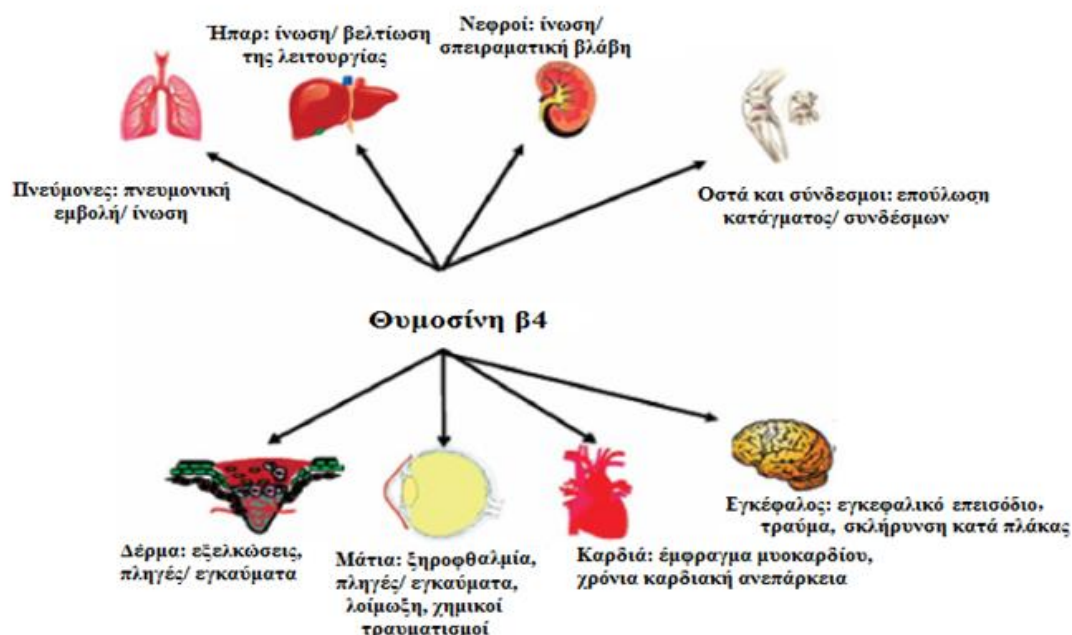
Ο ρόλος της Tβ4 στην επούλωση άλλων ιστών

Η Tβ4 έχει εμπλακεί στην επούλωση του κερατοειδούς σε διάφορα ζωικά πρότυπα. Με εξωτερική εφαρμογή στον οφθαλμό, η Tβ4 έχει αναφερθεί ότι προάγει τις επαφές κυττάρου-κυττάρου και κυττάρου - εξωκυττάριας μήτρας και αυξάνει τη διαύγεια του κερατοειδούς μετά από τραυματισμό. Επίσης, διεγείρει τη μετανάστευση των επιθηλιακών κυττάρων του επιπεφυκότα και αναστέλλει την προκαλούμενη από τραυματισμό κυτταρική απόπτωση. Σε αντίθεση με την καρδιά και το δέρμα, η Tβ4 επιταχύνει την επούλωση του κερατοειδούς μειώνοντας την έκφραση των μεταλλοπρωτεϊνών, κυρίως της MMP-2 και της MMP-9 (Crockford et al., 2010; Sosne et al., 2010).

Τα επίπεδα της Tβ4 αυξάνονται μετά από εγκεφαλική ισχαιμία, υποδεικνύοντας την πιθανή εμπλοκή της στη διαδικασία επούλωσης του εγκεφαλικού ιστού. Ακόμη, η Tβ4 προάγει την επιβίωση των νευρικών κυττάρων, εν μέρει με την αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης L1, μεμβρανικής γλυκοπρωτεΐνης που εκφράζεται σε

νευρικά κύτταρα και που είναι σημαντική για την επιβίωση και την ανάπτυξη νευρώνων του νωτιαίου μυελού σε καλλιέργειες (Sosne et al., 2010; Yang et al, 2008). Η επίδραση στα επίπεδα της L1 φαίνεται να είναι δοσοεξαρτώμενη. Έτσι, η Tβ4 θα μπορούσε να έχει θεραπευτική σημασία στην επιδιόρθωση και την αναγέννηση των τραυματισμένων νευρών και του εγκεφαλικού ιστού. Ο ρόλος αυτός στη νευρική αποκατάσταση έχειδειχθεί σε ένα ζωικό πρότυπο σκλήρυνσης κατά πλάκας, όπου η Tβ4 προστατεύει τον ιστό του εγκεφάλου από βλάβες και προάγει τη λειτουργική αποκατάσταση του τραυματισμένου ιστού (Sosne et al., 2010).

Η Εικόνα 2.5 συνοψίζει τις βιβλιογραφικές πληροφορίες, που αναφέρονται στην επουλωτική δράση της Tβ4 σε ιστούς και όργανα.



Εικόνα 2.5: Συνοπτική εικόνα της επουλωτικής δράσης της Tβ4 σε διάφορα όργανα, όπως έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία (Goldstein&Kleinman, 2015).

Tβ4 και καρκίνος

Η εμπλοκή της Tβ4 στην καρκινογένεση αποτελεί αμφιλεγόμενο ζήτημα. Κάποιες μελέτες, τη συσχετίζουν με μεταστατικούς όγκους. Συγκεκριμένα, έχει καταγραφεί υπερέκφραση της Tβ4 σε συμπαγείς πνευμονικούς όγκους προερχόμενους από την κακοήγη κυτταρική σειρά B16-F10. Η υπερέκφραση αυτή, μάλιστα, συσχετίστηκε με την αύξηση του αριθμού των αιμοφόρων αγγείων, η οποία και αποδόθηκε σε αύξηση της έκφρασης του αυξητικού παράγοντα VEGF (Smart et al., 2007a). Ωστόσο, σε πιο πρόσφατες μελέτες, όπου μυελωματικά κύτταρα ποντικού είχαν υποστεί επεξεργασία για υπερέκφραση της Tβ4, παρατηρήθηκε μειωμένος πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο και αυξημένη ευαισθησία σε

διάφορους αντιμυελωματικούς παράγοντες, σε σύγκριση με τους μάρτυρες (Kleinman&Sosne, 2016).

Η Τβ4 έχει μεν προταθεί ότι απελευθερώνεται από κύτταρα όπως τα αιμοπετάλια, ωστόσο, σύμφωνα με κάποιους ερευνητές, τόσο δομικά, όσο και λειτουργικά δεν θεωρείται αυξητικός παράγοντας, διότι:

- Σε αντίθεση με πολλούς αυξητικούς παράγοντες, δεν δεσμεύεται με ηπαρίνη, η οποία είναι πανταχού παρούσα στους ιστούς. Ως εκ τούτου, η Τβ4 μπορεί ελεύθερα να διαχυθεί στους ιστούς για την προώθηση της αγγειογένεσης, της κυτταρικής μετανάστευσης και της αναστολής της φλεγμονής, ανάμεσα σε άλλους παράγοντες.
- Επιπλέον, η Τβ4 είναι παρούσα εντός όλων των κυττάρων και δεν διαθέτει σήμα έκκρισης, ενώ οι αυξητικοί παράγοντες παράγονται μόνο από ορισμένα κύτταρα και εκκρίνονται εξωκυτταρικά
- Τέλος, υπάρχουν πολλές παραλλαγές (variants) του ίδιου αυξητικού παράγοντα. Αντιθέτως, στους ανθρώπινους ιστούς, η Τβ4 συνοδεύεται από δύο μόνο ομόλογα πεπτίδια, τη θυμοσίνη β10 (Τβ10) και τη θυμοσίνη β15 (Τβ15) (Kleinman&Sosne, 2016).

Τβ4: κλινικές εφαρμογές και μελλοντικές προοπτικές

Ο μεγάλος αριθμός *in vitro* και *in vivo* μελετών, που έδειξαν σημαντική συμβολή της Τβ4 στη δερματική επούλωση, οδήγησαν σε εφαρμογή της και κλινικά. Συγκεκριμένα, διεξήχθησαν κλινικές μελέτες Φάσης II με ειδικά μορφοποιημένη γέλη της Τβ4 για δερματική χρήση (RGN-137) σε ασθενείς με έλκη κατάκλισης σταδίου III και IV, φλεβικά έλκη κατάκλισης και πομφολυγώδη επιδερμόλυση. Οι μελέτες αυτές έδειξαν μεν τάση βελτίωσης όχι όμως στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με τους μάρτυρες (Treadwell et al., 2012; Kleinman&Sosne, 2016). Επίσης, πραγματοποιήθηκαν ειδικές κλινικές μελέτες Φάσης II (compassionate studies) με χρήση στείρου διαλύματος Τβ4, απαλλαγμένου από συντηρητικά, με τη μορφή οφθαλμικών σταγόνων (RGN-259) σε ασθενείς που έπασχαν από μέτρια έως σοβαρή ξηρότητα οφθαλμών και νευροτροφική κερατίτιδα. Τα αποτελέσματα ήταν αρκετά ελπιδοφόρα και έδειξαν βελτίωση, τόσο ως προς τον περιορισμό του μεγέθους της βλάβης, όσο και ως προς τη μείωση των συμπτωμάτων (μείωση του ερεθισμού και του άλγους) (Crockford et al., 2010; Goldstein&Kleinman, 2015).

Τόσο η τοπική (οφθαλμική και δερματική) χορήγηση της Τβ4 σε μελέτες Φάσης II, όσο και η συστηματική χρήση της σε κλινική μελέτη ασφαλείας Φάσης I (σε υγιείς εθελοντές, στους οποίους έγινε ενδοφλέβια χορήγηση στείρου διαλύματος Τβ4, απαλλαγμένου από συντηρητικά), έδειξε χαμηλή τοξικότητα, καθώς παρατηρήθηκαν ελάχιστες ανεπιθύμητες ενέργειες (Crockford et al., 2010; Treadwell et al., 2012; Goldstein&Kleinman, 2015; Kleinman&Sosne, 2016).

Ταυτόχρονα, η διαθεσιμότητα του συνθετικού μορίου σε βιομηχανική κλίμακα, διευκολύνει τις περαιτέρω μελέτες και αφήνει περιθώριο μελλοντικής εφαρμογής της Τβ4 τόσο σε κλινικές μελέτες Φάσης III, όσο και στον έλεγχο διαφορετικών

δοσολογικών σχημάτων σε μελέτες Φάσης I και II (Crockford et al., 2010; Goldstein&Kleinman, 2015).

Η ικανότητα της Τβ4 να περιορίζει το σχηματισμό ουλώδους ιστού αναδεικνύει έναν αριθμό πρόσθετων δράσεων με πιθανή εφαρμογή στη θεραπεία αυτοάνοσων και φλεγμονωδών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων της ηπατικής ίνωσης, της σπειραματονεφρικής νόσου και άλλων διαταραχών που σχετίζονται με τη διαδικασία της κυτταρικής γήρανσης, όπως η οφθαλμική ξηρότητα, η αθηροσκλήρωση και ασθένειες του καρδιαγγειακού συστήματος (Goldstein&Kleinman, 2015). Ακόμη, έχει μορφοποιηθεί διάλυμα αερολύματος της Τβ4 (RGN-457) για άμεση μεταφορά στον πνεύμονα. Σε συνδυασμό με την κατάλληλη συσκευή χορήγησης αερολυμάτων, το RGN-457 θα μπορούσε να στοχεύσει διάφορες περιοχές των αεραγωγών και να χρησιμοποιηθεί σε κλινικές μελέτες για την κυστική ίνωση, η οποία αποτελεί τη συνηθέστερη συγγενή θανατηφόρο πνευμονοπάθεια στον κόσμο (Crockford et al., 2010).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον όσον αφορά στον πιθανό ρόλο της Τβ4 στη διαδικασία της γήρανσης έχει η παρατήρηση ότι τα επίπεδά της στα ανθρώπινα δάκρυα και τον σίελο μειώνονται σημαντικά με την ηλικία και ότι η προσθήκη Τβ4 μπορεί να μειώσει τη γήρανση ενδοθηλιακών προγονικών κυττάρων κατά δόσοεξαρτώμενο τρόπο, όπως τουλάχιστον έδειξαν προκαταρκτικές *in vitro* μελέτες. Παρατηρήθηκε επίσης ότι η Τβ4 αύξησε τη δράση της τελομεράσης και την έκφραση του mRNA της αντίστροφης μεταγραφάσης της τελομεράσης σε ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα. Δεδομένου του σημαντικού ρόλου της τελομεράσης στη διατήρηση του μήκους των τελομερών και της γνωστής συσχέτισής της με τη διαδικασία γήρανσης, η χρήση Τβ4 ως πιθανής νέας θεραπευτικής προσέγγισης για την αντιμετώπιση ηλικιοεξαρτώμενων ασθενειών, όπως ξηροφθαλμία, αθηροσκλήρωση και καρδιακές παθήσεις, αναδύεται ως νέα πιθανή κλινική ευκαιρία και βρίσκεται υπό μελέτη (Goldstein&Kleinman, 2015).

Δραστικές περιοχές στο μόριο της Τβ4

Δεδομένων των ποικίλων βιολογικών δραστηριοτήτων της Τβ4, δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι εντοπίστηκαν περισσότερες της μιας δραστικές θέσεις στο μόριό της. Οι θέσεις αυτές ταυτοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας είτε συνθετικά πεπτίδια είτε φυσικά θραύσματα και η καθεμιά φαίνεται να παίζει το δικό της ρόλο στις δράσεις της Τβ4 και ειδικά στη διαδικασία της δερματικής επούλωσης (Εικόνα 2.6).



Εικόνα 2.6: Σχηματική αναπαράσταση δραστικών περιοχών της Τβ4. Τα αμινοξέα παρουσιάζονται με το συμβολισμό ενός γράμματος (Hara, 2011).

Το πεπτίδιο 17-22 (LKKTET)

Πρόκειται, ουσιαστικά, για πεπτίδιο που περιέχει την κεντρική αλληλουχία της Τβ4, η οποία συνδέεται με την G-ακτίνη. Εκτός από τη σύνδεσή της με την G-ακτίνη, η περιοχή αυτή έχει επιπλέον λειτουργίες, που τη συσχετίζουν με τη δερματική επούλωση, μεταξύ των οποίων, η διέγερση της κυτταρικής μετανάστευσης καθώς και της αγγειογένεσης. Αυτό το κεντρικό πεπτίδιο έχει βρεθεί στο εξίδρωμα τραυμάτων, γεγονός που υποδεικνύει ότι πιθανόν να αποτελεί προϊόν φυσιολογικής διάσπασης της Τβ4. Η σηματοδότηση διαμέσου του πεπτιδίου πιθανόν να διαμεσολαβείται από τους πουρινεργικούς υποδοχείς, οι οποίοι έχουν περιγραφεί για τη Τβ4 (βλ. Εικόνα 2.2) (Sosne et al., 2010; Kleinman&Sosne, 2016).

Το πεπτίδιο 1-15 (AcSDKPDMAEIEKFDKS)

Η δραστική θέση για την αντιαποπτωτική και την κυτταροπροστατευτική δράση της Τβ4 έχει προταθεί ότι εδράζεται στα πρώτα 15 αμινοξέα του αμινοτελικού άκρου της. Σε *in vitro* μελέτη με ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες, το 15-πεπτίδιο αυτό έδειξε προστατευτική δράση, μειώνοντας την επαγόμενη από διάφορους τοξικούς παράγοντες (όπως βενζαλκόνιο, υπεροξειδίο του υδρογόνου, χλωρεξιδίνη) κυτταρική απόπτωση. Αυτή η πληροφορία είναι σημαντική, δεδομένου ότι μπορεί να συνδεθεί με τη δυνατότητα προστασίας τραυματισμένων ιστών, από τοξικές ουσίες που υπάρχουν στο τραύμα λόγω κατεστραμμένων κυττάρων ή μόλυνσης (Sosne et al., 2010; Kleinman&Sosne, 2016).

Το πεπτίδιο 1-4 (AcSDKP)

Το αμινοτελικό τετραπεπτίδιο της Τβ4 (Τβ4[1-4], *acetyl*Ser-Asp-Lys-Pro-OH, AcSDKP) εντοπίστηκε αρχικά ως αυτόνομο μόριο μέσα στο πλάσμα του αίματος, ως αναστολέας του πολλαπλασιασμού των ολοδύναμων αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων

(pluripotent hematopoietic stem cells). Όπως διαπιστώθηκε στη συνέχεια, το τετραπεπτίδιο αυτό προέρχεται από την πρωτεολυτική διάσπαση της Τβ4, διαθέτει δε αντιφλεγμονώδη και αντι-ινωτική δράση. Συγκεκριμένα, το τετραπεπτίδιο AcSDKP βρέθηκε να αναστέλει τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών, να μειώνει την έκκριση του TNF-α από τα μακροφάγα και να καταστέλλει την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Smad (αναστέλλοντας έτσι το συγκεκριμένο σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF-β). Κάποιες μελέτες αναφέρουν ακόμη αγγειογενετική δράση. Όσον αφορά τη δράση του ειδικά στη δερματική επούλωση, το τετραπεπτίδιο πιθανόν να συμμετέχει στη μείωση της φλεγμονής και του σχηματισμού της ουλής καθώς και στην ενίσχυση της αγγειογένεσης (Sosne et al., 2010; Kleinman&Sosne, 2016). Περισσότερα στοιχεία σχετικά με το AcSDKP αναφέρονται στη συνέχεια.

2.3. Το τετραπεπτίδιο *acetyl*Ser-Asp-Lys-Pro-OH (AcSDKP)

Βιοσύνθεση και καταβολισμός του AcSDKP

Το AcSDKP είναι ένα τετραπεπτίδιο που εντοπίζεται φυσιολογικά σε ανθρώπινα όργανα και βιολογικά υγρά καθώς και σε πειραματόζωα. Αρχικά απομονώθηκε από το μυελό των οστών εμβρύου μόσχου και περιγράφηκε ως φυσικός αναστολέας του πολλαπλασιασμού των πολυδύναμων αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων, ο οποίος εμπόδιζε την είσοδό τους στη φάση S του κυτταρικού κύκλου, αποτρέποντας τη σύνθεση του DNA (Robinson et al., 1993).

Η Τβ4 προτάθηκε ως πιθανό πρόδρομο μόριο του τετραπεπτιδίου AcSDKP, καθώς διαθέτει την απαραίτητη αλληλουχία στο αμινοτελικό της άκρο (Εικόνα 2.7). Έτσι, μία μοναδική διάσπαση του πεπτιδικού δεσμού που συνδέει το 4^ο με το 5^ο αμινοξύ της Τβ4 (Pro⁴-Asp⁵), θα ήταν επαρκής για να απελευθερωθεί το τετραπεπτίδιο (Cavasin, 2006). Πράγματι, σύμφωνα με *in vitro* πειραματική μελέτη, το AcSDKP απελευθερώνεται από το αμινοτελικό άκρο της Τβ4 με την δράση του ενζύμου προλυλο-ολιγοπεπτιδάση (prolyl oligopeptidase, POP), μια πρωτεάση σερίνης η οποία κατανέμεται ευρέως σε πολλά όργανα των θηλαστικών και διασπά πεπτιδικούς δεσμούς στο καρβοξυτελικό άκρο αμινοξέων προλίνης σε πεπτιδικές ορμόνες (Cavasin et al., 2004).

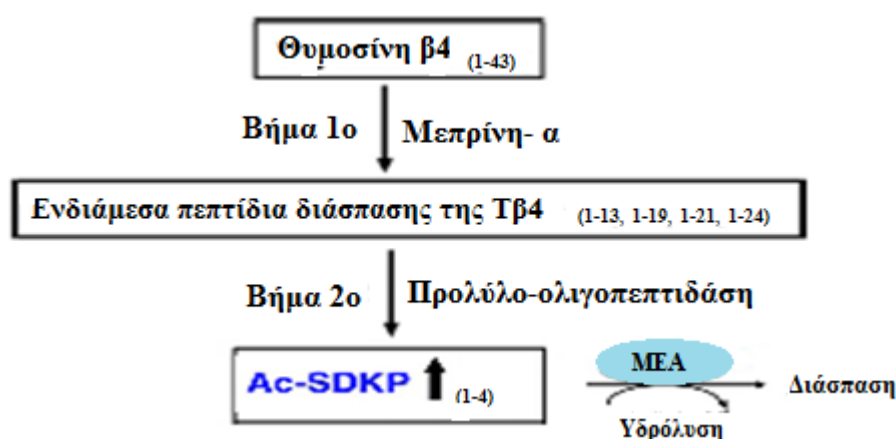


Εικόνα 2.7: Η Τβ4 εμπεριέχει στο αμινοτελικό άκρο της το τετραπεπτίδιο AcSDKP (τροποποιημένη από Kanasaki et al., 2014)

Η POP, ωστόσο, έχει μια χαρακτηριστική δομή η οποία καθιστά αδύνατη την υδρόλυση πεπτιδίων που έχουν >30 αμινοξέα, επομένως μεγαλύτερα πεπτίδια είναι ανθεκτικά στην υδρόλυσή της. Από τη στιγμή που η Τβ4 αποτελείται από 43 αμινοξέα, έγινε η υπόθεση ότι ένα άγνωστο ιστικό ένζυμο διασπά αρχικά την Τβ4, απελευθερώνοντας ένα (ή περισσότερα) ενδιάμεσο αμινοτελικό πεπτίδιο και σε

επόμενο στάδιο η POP υδρολύει αυτό το πεπτίδιο, απελευθερώνοντας τελικά το τετραπεπτίδιο AcSDKP (Kumar et al., 2016). Η ερευνητική ομάδα των Kumar κ.ά. (2016) έδειξε ότι η συγχορήγηση της POP και της μεπρίνης-α (meprin-α), η οποία είναι μια εξαρτώμενη από ψευδάργυρο ενδοπεπτιδάση (zinc endopeptidase), οδηγεί σε *in vitro* απελευθέρωση του AcSDKP από το πρόδρομο μόριο, την Τβ4. Η συγχορήγηση των δύο ενζύμων οδήγησε σε απελευθέρωση σημαντικά μεγαλύτερης ποσότητας AcSDKP, σε σύγκριση με την ποσότητα που προέκυψε όταν έγινε χορήγηση του κάθε ενζύμου ξεχωριστά (Εικόνα 2.8).

Το AcSDKP βιοαποικοδομείται μέσω της υδρόλυσής του σχεδόν αποκλειστικά από το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτασίνης (MEA - Angiotensin Converting Enzyme, ACE). Η πληροφορία αυτή προέκυψε και επιβεβαιώθηκε από μελέτες, στις οποίες συγχορήγηση του τετραπεπτιδίου με έναν αναστολέα του MEA (καπτοπρίλη), οδήγησε σε πενταπλάσια αύξηση της συγκέντρωσης του πρώτου, σε σχέση με μάρτυρες, στους οποίους χορηγήθηκε μόνον το τετραπεπτίδιο (Cavasin, 2006).



Εικόνα 2.8: Σχηματική αναπαράσταση της βιοσύνθεσης και του καταβολισμού του AcSDKP (τροποποιημένη από Kanasaki et al., 2014 και Kumar et al., 2016).

Βιολογικές δράσεις του τετραπεπτιδίου AcSDKP σε *in vitro* και *in vivo* συστήματα μελέτης

Σε αντίθεση με το πρόδρομο μόριο Τβ4, το τετραπεπτίδιο AcSDKP είναι λιγότερο μελετημένο. Οι μελέτες περιορίζονται σε *in vitro* και σε *in vivo* συστήματα, χωρίς να έχουν φτάσει σε επίπεδο κλινικών δοκιμών. Όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 2.1, το τετραπεπτίδιο AcSDKP έχει μελετηθεί ιδιαίτερα ως προς την αντι-ινωτική και αγγειογενετική του δράση.

Πίνακας 2.1: Δράση του AcSDKP σε διάφορα *in vitro* και *in vivo* πειραματικά συστήματα μελέτης (Sosne et al., 2010).

Δράση	Πειραματικό σύστημα μελέτης
Αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ολοδύναμων αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων	<i>In vitro</i> : πολυδύναμα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα από το μυελό των οστών
Αναστέλλει την ανάπτυξη και επάγει την αποκοκκίωση των σιτευτικών κυττάρων	<i>In vitro</i> : σιτευτικά κύτταρα (μαστοκύτταρα)
Διεγείρει την αγγειογένεση	<i>In vitro</i> : ενδοθηλιακά κύτταρα (αυξάνει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των κυττάρων, επάγει το σχηματισμό σωληνοειδών δομών και αγγείων) <i>In vivo</i> : αγγεία της καρδιάς (ποντικοί ή αρουραίοι με έμφραγμα μυοκαρδίου)
Αναστέλλει την πειραματικά επαγόμενη σύνθεση του DNA/ κολλαγόνου	<i>In vitro</i> : καρδιακοί ινοβλάστες
Αναστέλλει την έκφραση του ενεργοποιητή πλασμινογόνου που διαμεσολαβείται από τον TGF-β	<i>In vitro</i> : ανθρώπινα μεσαγγειακά κύτταρα
Προλαμβάνει την επέκταση της μεσαγγειακής μήτρας	<i>In vivo</i> : διαβητικοί db / db ποντικοί
Αντι-ινωτική δράση στον καρδιακό ιστό	<i>In vivo</i> : αρουραίοι
Αντιστρέφει την καρδιακή φλεγμονή / ίνωση	<i>In vivo</i> : αρουραίοι με έμφραγμα μυοκαρδίου
Αντιστρέφει την καρδιακή ίνωση	<i>In vivo</i> : αρουραίοι με νεφραγγειακή υπέρταση
Προλαμβάνει την αορτική ίνωση	<i>In vivo</i> : αρουραίοι με υπέρταση επαγόμενη από αγγειοτασίνη II
Αναστέλλει την εξέλιξη της νεφρικής ίνωσης	<i>In vivo</i> : αρουραίοι WKY με σπειραματική νεφρίτιδα
Αντι-ινωτική στην καρδιά και τους νεφρούς	<i>In vivo</i> : αρουραίοι με υπέρταση επαγόμενη από άλας αλδοστερόνης

AcSDKP και έλεγχος κυτταρικού κύκλου - κυτταρικού πολλαπλασιασμού

Η επίδραση του AcSDKP επί του κυτταρικού πολλαπλασιασμού δεν περιορίζεται μόνο στο αιμοποιητικό σύστημα, αφού, όπως έχει δειχθεί, το AcSDKP αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των μεσαγγειακών κυττάρων (mesangial cells) του ανθρώπου, καθώς και τον πολλαπλασιασμό νεφρικών και καρδιακών ινοβλαστών (Kanasaki et al., 2014). Επίσης, μετά από χορήγηση σε ποντικούς που είχαν υποστεί μερική ηπατεκτομή (κατά 2/3), βρέθηκε να μειώνει τον πολλαπλασιασμό των ηπατοκυττάρων κατά 50%. (Rhaleb et al., 2001).

Ο λεπτομερής μηχανισμός μέσω του οποίου το AcSDKP ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο δεν είναι ακόμα σαφής, αλλά φαίνεται ότι το AcSDKP μπορεί να αναστέλλει τη σηματοδότηση της ERK κινάσης (Extracellular Signal - Regulated Kinase). Εναλλακτικά, έχει προταθεί ότι αναστέλλει την επαγόμενη από τον παράγοντα PDGF σύνθεση του DNA σε μεσαγγειακά κύτταρα, μέσω της επαγωγής ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου, όπως του p53 (Kanasaki et al., 2014).

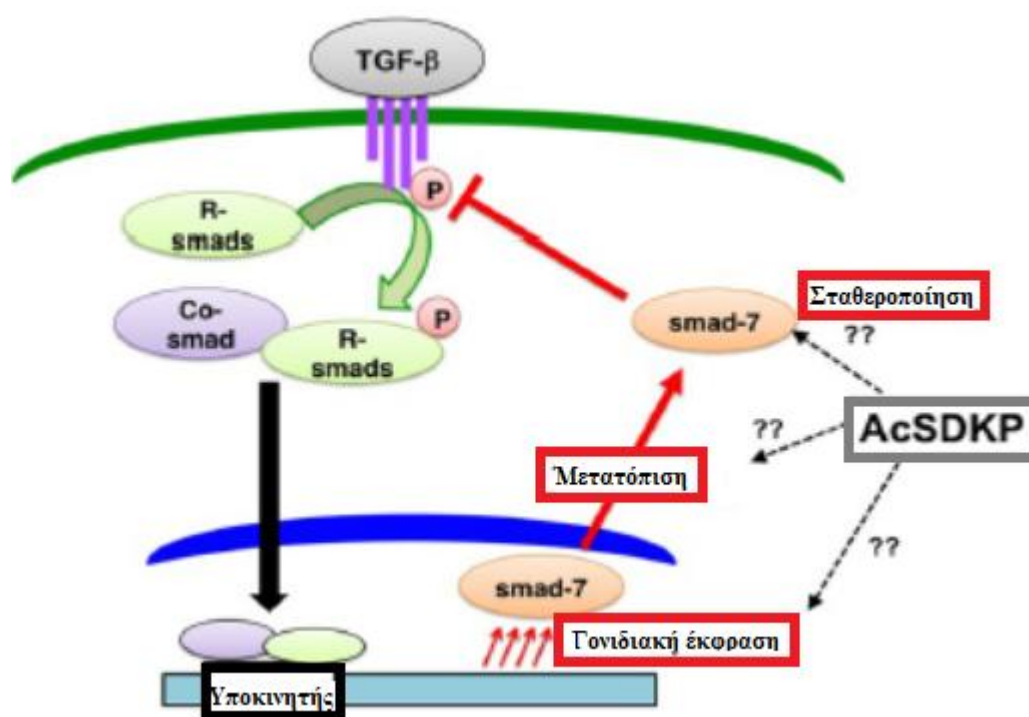
AcSDKP και αντι-ινωτική δράση στην καρδιά, στους νεφρούς και τους πνεύμονες

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα κύτταρα που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή του κολλαγόνου και του συνδετικού ιστού είναι οι ινοβλάστες, οι οποίοι επομένως παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη ιστικής ίνωσης. Όπως προαναφέρθηκε, το AcSDKP έδειξε να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρδιακών και των νεφρικών ινοβλαστών. Επιπλέον, βρέθηκε ότι ελαττώνει την επαγόμενη από τον TGFβ αύξηση της κολλαγονοσύνθεσης σε καρδιακούς ινοβλάστες ποντικών, γεγονός που υποδεικνύει ότι το AcSDKP ασκεί αντι-ινωτική δράση στον καρδιακό μυ (Rhaleb et al., 2001).

Οι ενεργοποιημένοι ινοβλάστες ονομάζονται μυοϊνοβλάστες, χαρακτηρίζονται από υψηλή ικανότητα συστολής και υπερεκφράζουν την α-SMA πρωτεΐνη. Η ιστική ίνωση χαρακτηρίζεται από ευρεία μετατροπή των ινοβλαστών σε μυοϊνοβλάστες. Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές, η διαφοροποίηση των καρδιακών ινοβλαστών προς μυοϊνοβλάστες (Peng et al., 2010) και, αντίστοιχα, των πνευμονικών ινοβλαστών προς μυοϊνοβλάστες (Xu et al., 2012) αναστέλλεται παρουσία του AcSDKP, γεγονός που ενισχύει την υπόθεση περί αντι-ινωτικής δράσης του τετραπεπτιδίου στην καρδιά και τους πνεύμονες.

Μια κυτταροκίνη που εμπλέκεται στη διαφοροποίηση των ινοβλαστών προς μυοϊνοβλάστες είναι ο TGF-β. Σε σχετικά πρόσφατο άρθρο επισκόπησης οι Kanasaki και συνεργάτες αναφέρουν ότι το AcSDKP ασκεί αντι-ινωτική δράση αναστέλλοντας το μονοπάτι Smad, που σηματοδοτεί ο TGF-β (Kanasaki et al., 2014): το AcSDKP φέρεται ότι αναστέλλει την επαγόμενη από τον TGF-β φωσφορυλίωση του Smad2 και η οδός αντι - TGF-β/Smad είναι το κλειδί για την κατανόηση της αντι-ινωτικής δράσης του τετραπεπτιδίου. Πιο συγκεκριμένα: Μετά τη δέσμευση του TGF-β, ο υποδοχέας τύπου II του TGF-β αλληλεπιδρά αυθόρμητα με τον υποδοχέα τύπου I επάγοντας τη φωσφορυλίωση των αμινοξέων σερίνης στον δεύτερο. Ο φωσφορυλιωμένος υποδοχέας τύπου I φωσφορυλιώνει τους R-Smads (Smad2 και 3), και οι φωσφορυλιωμένοι R-Smads στη συνέχεια αλληλεπιδρούν με τους co-Smads

(Smad4) στο κυτταρόπλασμα. Τα ετεροδιμερή R-Smad και co-Smad μετατοπίζονται τότε μέσα στον πυρήνα με τη βοήθεια της importin-β. Τα ετεροδιμερή Smad προσδένονται σε ειδικές περιοχές του DNA, στους υποκινητές που ονομάζονται SBE (Smad-Binding Element). Αντίθετα, οι I-Smads (Smad6 και 7), που εντοπίζονται στον πυρήνα, μετά τη δέσμευση του TGF-β και την ενεργοποίηση του μονοπατιού, μετατοπίζονται στο κυτταρόπλασμα. Οι I-Smads πιστεύεται ότι αναστέλλουν ανταγωνιστικά τη φωσφορυλίωση των R-Smads από τον υποδοχέα τύπου I. Αν και οι υποκείμενοι μηχανισμοί, με τους οποίους το AcSDKP αναστέλλει την επαγόμενη από τον TGF-β φωσφορυλίωση των R-Smads δεν είναι εντελώς γνωστοί, οι μηχανισμοί αυτοί είναι πιθανόν να περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων, επίδραση του AcSDKP στους I-Smads (Εικόνα 2.9).



Εικόνα 2.9: Πιθανός μηχανισμός της αντι-ινωτικής δράσης του τετραπεπτιδίου AcSDKP (Kanasaki et al., 2014).

AcSDKP και απόπτωση

Όπως προαναφέρθηκε, το τετραπεπτίδιο AcSDKP αρχικά αναγνωρίστηκε ως ρυθμιστής του πολλαπλασιασμού των πολυδύναμων αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων. Το AcSDKP μπορεί να αναστείλει την απόπτωση των αιμοποιητικών κυττάρων που επάγεται από κυτταροτοξικούς παράγοντες, όπως η χημειοθεραπεία, η ακτινοβολία, η υψηλή θερμοκρασία. Από την άλλη πλευρά, η ενισχυμένη κυτταρική απόπτωση συνδέεται με τη δημιουργία ιστικής ίνωσης, οπότε η αντι-ινωτική δράση του AcSDKP πιθανόν να συνδέεται με την ικανότητα του τετραπεπτιδίου να αναστέλλει την κυτταρική απόπτωση (Kanasaki et al., 2014).

AcSDKP και φλεγμονή

Το AcSDKP αναστέλλει την χημειοτακτική πρωτεΐνη των μονοκυττάρων-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1, MCP-1), μια από τις βασικές χημειοκίνες που ρυθμίζουν τη διήθηση των μακροφάγων. Επίσης, έχειδειχτεί πειραματικά ότι το AcSDKP αναστέλλει τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) και τις συναφείς χημειοκίνες, που συνδέονται με τη φλεγμονή. Η φλεγμονή παίζει σημαντικό ρόλο στην επιδιόρθωση των ιστών. Από την άλλη πλευρά, ωστόσο, παρατεταμένη φλεγμονή μπορεί να οδηγήσει σε ίνωση του ιστού, που αναγνωρίζεται ως χρόνια πληγή με προβληματική επούλωση. Έτσι, βιβλιογραφικές πληροφορίες υποδεικνύουν ότι το τετραπεπτίδιο AcSDKP αναστέλλει τη φλεγμονή, ενώ παράλληλα ρυθμίζει τη φυσιολογική επούλωση των ιστών (Kanasaki et al., 2014).

AcSDKP και νευροπροστατευτική δράση

Σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη της ομάδας των Zhang κ.ά. (2016), το AcSDKP παρουσιάζει νευροπροστατευτική και αντιφλεγμονώδη δράση *in vivo* σε αρουραίους που έχουν υποστεί εγκεφαλική κάκωση (traumatic brain injury), όταν χορηγηθεί μέσα στην πρώτη ώρα από τον τραυματισμό. Συγκεκριμένα, παρέχει νευροπροστασία (μειωμένη απώλεια νευρώνων και περιορισμένη συσσώρευση ινώδους), προάγει τη νευροαγγειακή αναδιαμόρφωση (αυξημένη αγγειογένεση και νευρογένεση), μειώνει την νευροφλεγμονή και βελτιώνει τη λειτουργική αποκατάσταση, η οποία μπορεί να διαμεσολαβείται εν μέρει από την αναστολή του σηματοδοτικού μονοπατιού TGF-β / NF-κB.

AcSDKP και αγγειογένεση

Όπως έχει αναφερθεί, η αγγειογένεση, που ορίζεται ως ο σχηματισμός νέων αιμοφόρων αγγείων, χαρακτηρίζεται από διάσπαση των δεσμών ανάμεσα στο ενδοθήλιο και την υποκείμενη βασική μεμβράνη του επιθηλίου, την κυτταρική μετανάστευση και το σχηματισμό σωληνοειδών δομών, με αποκορύφωμα την ανάπτυξη ενός νέου τριχοειδούς. Η αγγειογένεση είναι απαραίτητη για την ομοιοστασία του ιστού και για την επαγωγή της επιδιόρθωσής του. Το AcSDKP είναι ένας ισχυρός αγγειογενετικός παράγοντας τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. *In vitro*, προάγει την αγγειογενετική απόκριση των ενδοθηλιακών κυττάρων (Wang et al., 2004; Liu et al., 2003), με αποτέλεσμα αυξημένη έκκριση της δραστηκής μορφής του συμπλέγματος μεταλλοπρωτεΐνης-1 (MMP-1) καθώς και διέγερση της μετανάστευσης και της διαφοροποίησης των κυττάρων σε τριχοειδείς δομές με τη δοκιμασία Matrigel (Liu et al., 2003). *In vivo*, προάγει την αύξηση των μυοκαρδιακών τριχοειδών σε μοντέλα αρουραίων ή ποντικών με έμφραγμα μυοκαρδίου (Wang et al., 2004; Smart et al., 2007b), ενισχύει την πυκνότητα των αγγείων στο μοντέλο της χοριοαλλαντοϊκής μεμβράνης και σε μυς αρουραίων (Liu et al., 2003), ενώ φαίνεται να βελτιώνει την αγγειογένεση και σε μοντέλα τομών του δέρματος από αρουραίους (Fromes et al., 2006).

AcSDKP και επούλωση του δέρματος

Το τετραπεπτίδιο AcSDKP δεν έχει μελετηθεί ως προς τη δράση του στην επούλωση του δέρματος στο βαθμό που έχει μελετηθεί το πρόδρομο μόριο, Tβ4. Σε μία από τις ελάχιστες σχετικές *in vivo* μελέτες, το τετραπεπτίδιο AcSDKP βρέθηκε να αποτρέπει τη νέκρωση των ιστών σε πειραματικές τομές του δέρματος (skin flap models), μέσω κυρίως της ενίσχυσης της αγγειογένεσης, βελτιώνοντας και επιταχύνοντας κατά αυτόν τον τρόπο την δερματική επούλωση (Fromes et al., 2006).

AcSDKP και μελλοντικές προοπτικές

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ενδιαφέρουσα θα ήταν η διερεύνηση της πιθανής θεραπευτικής εφαρμογής του AcSDKP σε καρδιακές ασθένειες, δεδομένης της αντι-ινωτικής δράσης του επί των καρδιακών ινοβλαστών αλλά και της σημαντικής αγγειογενετικής δράσης του. Παρά το γεγονός ότι η χρήση του σε ασθενείς που υποβάλλονται ήδη σε θεραπεία με αναστολείς MEA θα ήταν απαγορευτική, θα μπορούσε να μελετηθεί, όπως έχει προταθεί, για πιθανή χορήγηση σε ασθενείς με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου που δεν λαμβάνουν την προηγούμενη θεραπεία. Επίσης, θα ήταν σημαντική η διερεύνηση της πιθανής εφαρμογής του σε άλλες ασθένειες, στις οποίες η υπερβολική εναπόθεση κολλαγόνου παίζει κρίσιμο ρόλο (Cavasin, 2006). Για παράδειγμα, δεδομένων των ενθαρρυντικών ενδείξεων γύρω από την αντι-ινωτική δράση του, το τετραπεπτίδιο AcSDKP θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε κλινικές δοκιμές σε ασθενείς που πάσχουν από ινοπολλαπλασιαστικές ασθένειες (fibroproliferative diseases), όπως η διαβητική νεφροπάθεια (Kanasaki et al., 2014).

Επιπλέον, η νευροπροστατευτική δράση του πεπτιδίου, που αναφέρθηκε πολύ πρόσφατα μετά από *in vivo* πειράματα σε αρουραίους, θα μπορούσε να διερευνηθεί περαιτέρω (Zhang et al., 2016).

Τέλος, όσον αφορά ειδικά τη δερματική επούλωση: δεδομένου ότι τόσο η αντι-ινωτική και η αγγειογενετική όσο και η αντιφλεγμονώδης δράση του AcSDKP φαίνεται να οδηγούν σε επιτάχυνση και βελτίωση της επούλωσης τραυμάτων σε άλλους ιστούς, θα ήταν ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα η περαιτέρω μελέτη της δράσης του τετραπεπτιδίου σε *in vitro* συστήματα μελέτης με εξειδικευμένα δερματικά κύτταρα καθώς και σε *in vivo* συστήματα δερματικών πληγών σε ζωικά πρότυπα.

Σε κάθε περίπτωση, θα ήταν σημαντική η ανάπτυξη πεπτιδικών ομολόγων του AcSDKP, ανθεκτικών στην υδρόλυση παρουσία του MEA, ή και μη πεπτιδικών αναλόγων, ώστε να αυξηθεί η βιοδιαθεσιμότητα του τελευταίου και να ενισχυθεί η *in vivo* βιοδραστικότητά του.

2.4. Η θυμοσίνη 10 (Tβ10) και το τετραπεπτίδιο *acetylAla-Asp-Lys-Pro-OH* (AcADKP)

Η Tβ4, όπως ήδη αναφέρθηκε, είναι η ευρύτερα απαντώμενη β-θυμοσίνη, εντοπίζεται στα περισσότερα είδη κυττάρων και αντιπροσωπεύει το 70-80% του συνόλου των β-θυμοσινών. Στον άνθρωπο, εντοπίζονται δύο ακόμα εκπρόσωποι των β-θυμοσινών, η θυμοσίνη β10 (Tβ10) και η θυμοσίνη β15 (Tβ15), οι οποίες αποτελούν δομικά ομόλογα της Tβ4 (Εικόνα 2.10) (Smart et al., 2007a). Η Tβ10, όπως και η Tβ4, εντοπίζεται στα περισσότερα κύτταρα, αν και σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα (5-10% των επιπέδων της Tβ4) (Theunissen et al., 2014), ενώ η Tβ15 σπάνια εκφράζεται σε φυσιολογικούς ιστούς. Εκτός από τον εμβρυϊκό εγκέφαλο, η Tβ15 είναι παρούσα σε μεταστατικούς καρκίνους του προστάτη, αλλά όχι σε φυσιολογικό προστατικό ιστό (Kleinman&Sosne, 2016).

thymosin β4 Ac SDKPDMAEIEKFDKSK¹LKKTET²²Q¹EKNPLPSKETIEQ¹EKQAGES
thymosin β10 Ac ADKPD¹MGEIASFDKAK¹LKKTET²²Q¹EKN¹TLPTKETIEQ¹EKRSEIS
thymosin β15 Ac SDKPDLSEVETFDKSK¹LKKTN¹TE¹EKN¹TLPSKETIQ¹QEKEYNQRS

Εικόνα 2.10: Πρωτοταγής αλληλουχία των Tβ4, Tβ10, Tβ15. Τα αμινοξέα παρουσιάζονται με το συμβολισμό ενός γράμματος. Τα N-τελικά αμινοξέα σερίνη (Tβ4, Tβ15) ή αλανίνη (Tβ10) έχουν την α-αμινομάδα ακετυλιωμένη (Hara, 2011).

Η ανθρώπινη Tβ10 διαφέρει από την Tβ4 κατά 10 αμινοξέα (23%). Εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα και έχει στην αμινοξική αλληλουχία της ένα συντηρημένο μοτίβο (L¹⁷KKTET²²), όπως και η Tβ4, το οποίο είναι κρίσιμο για τη σύνδεση με την G-ακτίνη. Η Tβ10 έχει δείχθει ότι συμμετέχει στην οργάνωση του κυτταροσκελετού, όπως και η Tβ4, ενώ έχει επίσης συσχετισθεί με τον πολλαπλασιασμό, τη μορφολογία και την κινητικότητα των κυττάρων (Sribenja et al., 2009). Παρά την υψηλή δομική ομολογία της με την Tβ4, η Tβ10 φαίνεται να εμφανίζει αντίρροπες δράσεις ως προς αυτήν, σε διαδικασίες όπως η αγγειογένεση και η απόπτωση. Συγκεκριμένα, ενώ η Tβ4 παρουσιάζει σημαντική αγγειογενετική δράση, η Tβ10 φαίνεται να αναστέλλει την αγγειογένεση (Koutrafouris et al., 2001), γεγονός που υποδεικνύει πιθανή αντικαρκινική δράση (Sribenja et al., 2009). Επίσης, η Tβ4 εμφανίζεται ως αντι-αποπτωτικό πεπτίδιο, ενώ η υπερέκφραση της Tβ10 συσχετίστηκε με επιταχυνόμενη απόπτωση (Theunissen et al., 2014; Sribenja et al., 2009).

Η Tβ10 θεωρείται ότι διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην εμβρυϊκή ανάπτυξη του ανθρώπου και ιδιαίτερα στην ανάπτυξη του νευρικού ιστού. Υψηλές συγκεντρώσεις της εντοπίζονται στον ανθρώπινο εμβρυϊκό εγκέφαλο, που ελαττώνονται μετά τη γέννηση, αλλά και στο νευροβλάστωμα. Ακόμη, μεγάλες ποσότητές της εμφανίζονται στους αναπτυσσόμενους νεφρούς, γεγονός που υποδεικνύει ότι η Tβ10 εμπλέκεται στην ανάπτυξη και άλλων ιστών, πέραν του νευρικού (Sribenja et al., 2009).

Σε σύγκριση με την Tβ4, το αμινοτελικό τετραπεπτίδιο της Tβ10 έχει διαφοροποιημένο το πρώτο αμινοξύ (ακετυλιωμένη αλανίνη αντί ακετυλιωμένης σερίνης, Εικόνα 2.10). Σε αντίθεση με το AcSDKP, το αμινοτελικό τετραπεπτίδιο της

Tβ10, AcADKP, δεν έχει βρεθεί αυτόνομο μέσα σε βιολογικά υγρά, ενώ ελάχιστες βιβλιογραφικές αναφορές αναφέρονται στη δράση του.

Παρά το γεγονός ότι οι μοριακοί μηχανισμοί της δράσης της δεν είναι απολύτως κατανοητοί, η Tβ10 είναι πιθανόν να ενέχεται στους μηχανισμούς της επούλωσης πληγών. Σύμφωνα με μία από τις ελάχιστες μελέτες της βιβλιογραφίας που αναφέρονται στην πιθανή σχέση της Tβ10 με την επούλωση τραυμάτων, οι ερευνητές εντόπισαν θραύσματα τόσο της Tβ4 όσο και, για πρώτη φορά, της Tβ10 στο εξίδρωμα δερματικών πληγών, χρησιμοποιώντας διατάξεις τριχοειδούς υπερδιήθησης για τη συλλογή των πρωτεϊνών του εξιδρώματος, πρωτεόλυση με θρυψίνη και ανάλυση φασματομετρίας μάζας (Huang et al., 2006).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ

Αντικείμενο της παρούσας εργασίας ήταν, αρχικά, η εργαστηριακή σύνθεση, ο καθαρισμός και ο αναλυτικός χαρακτηρισμός (ταυτοποίηση) των πεπτιδίων *acetylSer-Asp-Lys-Pro-OH* (AcSDKP) και *acetylAla-Asp-Lys-Pro-OH* (AcADKP), με άμεσο στόχο την *in vitro* βιολογική τους αξιολόγηση σε συστήματα κυττάρων που σχετίζονται με το φαινόμενο της επούλωσης δερματικών πληγών. Τα πεπτίδια AcSDKP και AcADKP αποτελούν τα αμινοτελικά τετραπεπτίδια δύο μεγαλύτερων βιοδραστικών πεπτιδίων, των 43-πεπτιδίων θυμοσίνη β4 (Tβ4) και θυμοσίνη β10 (Tβ10), αντίστοιχα, που ανήκουν σε μία ευρύτερη οικογένεια ενδογενών πεπτιδίων, τις β-θυμοσίνες. Η Tβ4 και η Tβ10, που παρουσιάζουν υψηλή δομική ομολογία, εκφράζονται σε όλα σχεδόν τα ανθρώπινα κύτταρα και η βιολογική δράση τους φαίνεται ότι είναι σημαντική. Σύμφωνα με στοιχεία της βιβλιογραφίας, τόσο η Tβ4 όσο και το τετραπεπτίδιο AcSDKP (που προκύπτει από πρωτεόλυση της Tβ4) έχουν θετική επίδραση στην επούλωση πληγών του δέρματος, ενώ πολύ λιγότερα στοιχεία είναι γνωστά για την επίδραση της Tβ10 (ή τμημάτων της) στο φαινόμενο της επούλωσης.

Για να επιτευχθεί ο σκοπός της εργασίας, πραγματοποιήθηκε αρχικά η σύνθεση των τετραπεπτιδίων AcSDKP και AcADKP στο εργαστήριο, με την τεχνική της Fmoc-πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεά φάση. Στη συνέχεια, τα τετραπεπτίδια καθαρίστηκαν με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC και τα τελικά προϊόντα χαρακτηρίστηκαν με αναλυτική RP-HPLC και ταυτοποιήθηκαν με φασματομετρία μαζών με τη μέθοδο του ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI-MS). Στη συνέχεια, τα τετραπεπτίδια AcSDKP και AcADKP αξιολογήθηκαν με κατάλληλες *in vitro* κυτταρικές δοκιμασίες.

Στα *in vitro* πειράματα της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν δύο κυτταρικές σειρές, ανθρώπινοι δερματικοί ινοβλάστες AG01523c και ανθρώπινα αθανатоποιημένα κερατινοκύτταρα HaCaT. Οι ινοβλάστες και τα κερατινοκύτταρα είναι κύτταρα του χορίου και της επιδερμίδας αντίστοιχα, τα οποία συμμετέχουν φυσιολογικά σε διάφορα στάδια της επούλωσης μιας πληγής του δέρματος. Έτσι, σε συνδυασμό με τις κατάλληλες πειραματικές συνθήκες καλλιέργειας, τα κύτταρα αυτά παρέχουν ικανοποιητικώς αξιόπιστα μοντέλα προσομοίωσης της διαδικασίας δερματικής επούλωσης *in vitro*. Με τις *in vitro* κυτταρικές δοκιμασίες της παρούσας εργασίας ελέγχθηκε αρχικά η πιθανή κυτταροτοξική δράση των τετραπεπτιδίων AcSDKP και AcADKP, στους δερματικούς ινοβλάστες και τα κερατινοκύτταρα, με τη δοκιμασία MTT, καθώς και η επίδρασή τους στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των δερματικών ινοβλαστών, μέσω του ποσοτικού προσδιορισμού της σύνθεσης DNA με τη μέθοδο τριτιωμένης θυμιδίνης. Στη συνέχεια, ελέγχθηκε η επίδραση των τετραπεπτιδίων AcSDKP και AcADKP στη σύνθεση κολλαγόνου από τους δερματικούς ινοβλάστες με τη μέθοδο της τριτιωμένης προλίνης, καθώς και η επίδρασή τους στη μετανάστευση των κερατινοκυττάρων, μέσω της δοκιμασίας κυτταρικής μετανάστευσης με σχηματισμό τομής (scratch assay).

Στα επόμενα Κεφάλαια παρουσιάζονται αναλυτικά τα Υλικά και οι Μέθοδοι, που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση της εργασίας, και τα αντίστοιχα πειραματικά Αποτελέσματα. Ακολουθεί εκτενής Συζήτηση των Αποτελεσμάτων και, σε σύνοψη, τα Συμπεράσματα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Σύνθεση, καθαρισμός και ανάλυση πεπτιδίων

Σκοπός της σύνθεσης των τετραπεπτιδίων AcSDKP και AcADKP, τα οποία αποτελούν αμινοτελικά πεπτίδια της Tβ4 και της Tβ10, αντίστοιχα, ήταν η μελέτη της βιολογικής δράσης τους σε συγκεκριμένα *in vitro* συστήματα κυττάρων, που σχετίζονται έμμεσα με τους μηχανισμούς της *in vivo* διαδικασίας της επούλωσης. Η πορεία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση, τον καθαρισμό και την ταυτοποίησή τους συνοψίζεται στην εικόνα 3.1.



Εικόνα 3.1: Διαγραμματική απεικόνιση της πειραματικής πορείας παρασκευής των τετραπεπτιδίων AcSDKP και AcADKP στο εργαστήριο.

3.1.1. Σύνθεση των πεπτιδίων με τη μέθοδο της Fmoc - πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεά φάση (Fmoc - Solid Phase Peptide Synthesis, Fmoc-SPPS)

Αρχή της μεθόδου

Η σύνθεση πεπτιδίων περιλαμβάνει ευρύ φάσμα πειραματικών διαδικασιών που επιτρέπουν την παρασκευή προϊόντων, τα οποία κυμαίνονται από διπεπτίδια και τριπεπτίδια έως μεγάλου μήκους πεπτίδια, με > 100 αμινοξέα. Η πρωτοποριακή εργασία του Bruce Merrifield (Merrifield, 1963), ο οποίος εισήγαγε τη πεπτιδική σύνθεση στερεάς φάσης (SPPS) και βραβεύθηκε για την επινόησή του αυτή με το βραβείο Nobel Χημείας το 1984, άλλαξε δραματικά τη στρατηγική της σύνθεσης

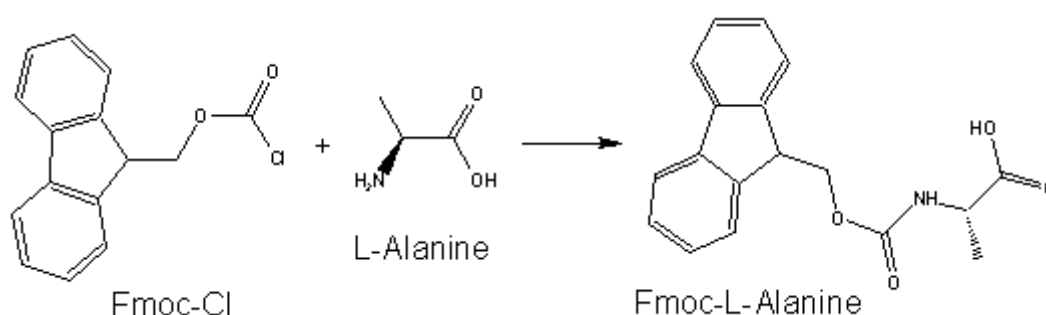
πεπτιδίων. Σε αυτή τη μέθοδο γίνεται χρήση ενός ενεργοποιημένου στερεού υποστρώματος, επάνω στο οποίο γίνεται η σύνθεση και το οποίο παρέχει αρκετά πλεονεκτήματα. Με ένα τέτοιο σύστημα, τα υπό προσθήκη αμινοξέα (και τα υπόλοιπα απαραίτητα αντιδραστήρια) μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε υψηλή περίσσεια, με αποτέλεσμα την ταχύτερη ολοκλήρωση των αντιδράσεων σύζευξης (αντιδράσεις προσθήκης των διαδοχικών αμινοξέων). Η περίσσεια των αντιδραστηρίων και των παραπροϊόντων μπορεί να διαχωριστεί από το υπό σύνθεση πεπτίδιο, που βρίσκεται προσδεμένο στο στερεό υπόστρωμα, με απλή διήθηση και έκπλυση, ενώ όλα τα βήματα της σύνθεσης μπορούν να διεξαχθούν στο ίδιο δοχείο. Σήμερα, η SPPS έχει γίνει πλέον μέθοδος πρώτης επιλογής για την παραγωγή πεπτιδίων, καθώς εκτός από την απλότητά της, επιτρέπει την αυτοματοποίηση και τη χρήση ρομποτικής. Ο κατ' εξοχήν διαλύτης, που χρησιμοποιείται σε όλα τα στάδια της μεθόδου, είναι το διμεθυλοφορμαμίδιο ή DMF (Amblard et al, 2006).

Η μέθοδος σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεά φάση βασίζεται:

- Στην πρόσδεση του πρώτου αμινοξέος της πεπτιδικής αλυσίδας («αγκυροβόληση», anchoring) σε ένα ενεργοποιημένο στερεό πολυμερές (ρητίνη). Η πρόσδεση γίνεται μέσω ομοιοπολικού δεσμού που αναπτύσσεται μεταξύ της α-καρβοξυλομάδας του αμινοξέος και μιας ενεργού ομάδας ενός μορίου-συνδέτη (linker), που παρεμβάλλεται μεταξύ στερεού πολυμερούς και 1^{ου} αμινοξέος.
- Στην ανάπτυξη του πεπτιδίου, επάνω στη ρητίνη, προσθέτοντας το κατάλληλο αμινοξύ κάθε φορά, μέχρι τη «συναρμολόγηση» της επιθυμητής αλληλουχίας. Κατά τη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεά φάση είναι απαραίτητη τόσο η προσωρινή προστασία της α-αμινομάδας του αμινοξέος που προστίθεται, όσο και η προστασία των πλευρικών χαρακτηριστικών ομάδων των αμινοξέων, έτσι ώστε να αποφευχθούν τα προβλήματα πολυμερισμού ή διακλαδισμένων προϊόντων. Για το λόγο αυτό, όλα τα αμινοξέα που προστίθενται περιέχουν μία προστατευτική ομάδα της α-αμινομάδας τους, γνωστή ως παροδική προστατευτική ομάδα (temporary protection group), ενώ όσα αμινοξέα έχουν χαρακτηριστική πλευρική ομάδα (π.χ. ασπαρτικό οξύ) περιέχουν επίσης μία δεύτερη προστατευτική ομάδα, γνωστή ως μόνιμη προστατευτική ομάδα (permanent protection group), της πλευρικής ομάδας τους. Ο χαρακτηρισμός παροδική αναφέρεται στη δυνατότητα απομάκρυνσης της προστατευτικής ομάδας κατά τη διάρκεια της σύνθεσης, σε αντίθεση με τη μόνιμη, η οποία δεν απομακρύνεται κατά τη διάρκεια των σταδίων της σύνθεσης.
- Στην απομάκρυνση (αποκοπή) του πεπτιδίου από τη στερεά φάση μετά την προσθήκη και του τελευταίου αμινοξέος.

Η Fmoc προστατευτική ομάδα

Κατά τη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεά φάση θα πρέπει η προστατευτική ομάδα της α-αμινομάδας των αμινοξέων να μπορεί να απομακρύνεται εύκολα (παροδική προστασία) μετά την ολοκλήρωση του σταδίου της σύζευξης (coupling), έτσι ώστε η α-αμινομάδα να είναι πλέον ελεύθερη (μη προστατευμένη) και έτοιμη να αντιδράσει με την α-καρβοξυλομάδα του επόμενου αμινοξέος προς σχηματισμό πεπτιδικού δεσμού. Σήμερα, η συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη προστατευτική ομάδα της α-αμινομάδας των αμινοξέων είναι η 9-fluorenylmethoxycarbonyl ομάδα ή Fmoc ομάδα (Εικόνα 3.2). Αντίθετα, οι πλευρικές ομάδες προστασίας πρέπει να είναι σταθερές σε όλους τους επαναλαμβανόμενους κύκλους αποπροστασίας των α-αμινομάδων (μόνιμη προστασία) (Amblard et al, 2006).

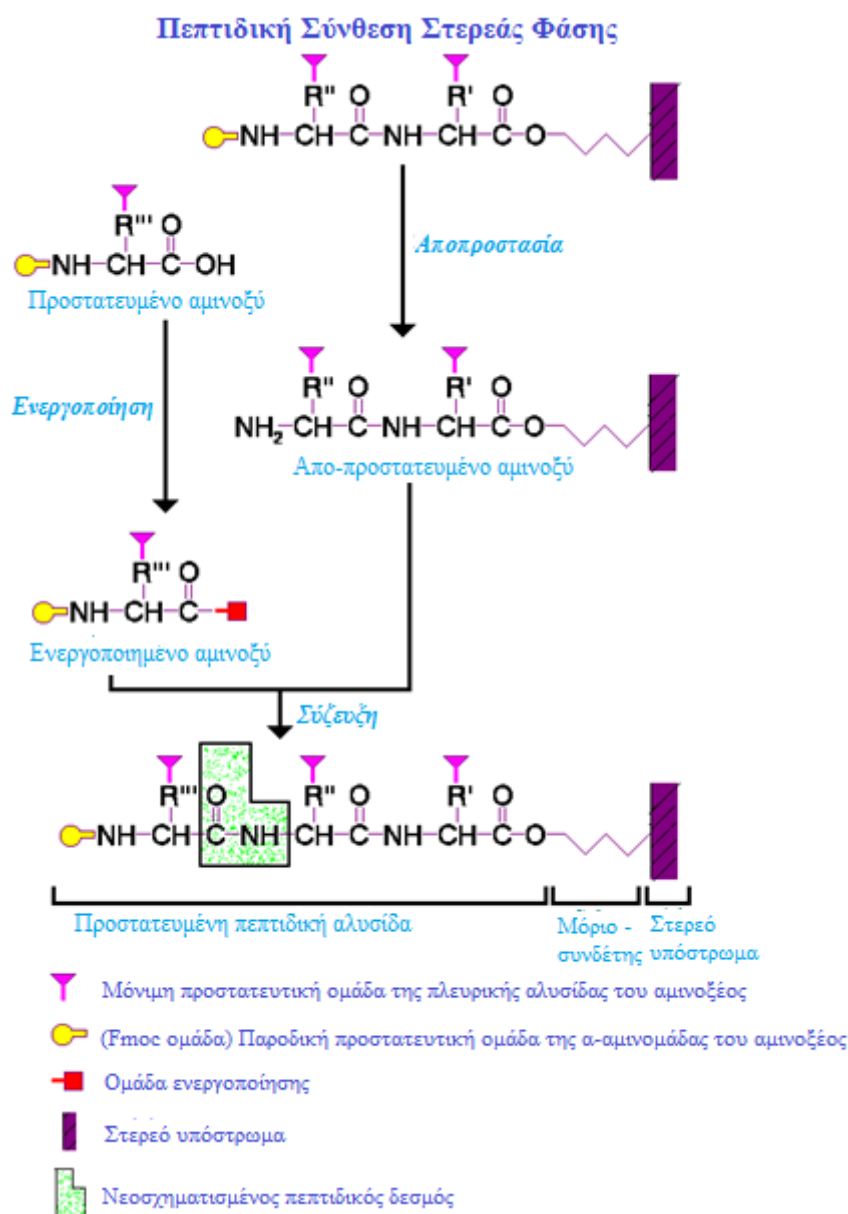


Εικόνα 3.2: Προστασία της α-αμινομάδας του αμινοξέος L-αλανίνη με την ομάδα Fmoc

Επιγραμματικά, η μεθοδολογία της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεά φάση με την Fmoc ομάδα παροδικής προστασίας (Fmoc-στρατηγική) περιλαμβάνει τα στάδια που ακολουθούν, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.3:

1. Την ομοιοπολική σύζευξη του αμινοξέος που βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο του προς σύνθεση πεπτιδίου μέσω ενός ενδιάμεσου μορίου-συνδέτη (linker). Το αμινοξύ έχει την πλευρική του ομάδα καθώς και την α-αμινομάδα του προστατευμένες. Ο ομοιοπολικός δεσμός που δημιουργείται με την ομάδα του μορίου-συνδέτη παραμένει σταθερός σε όλη τη διάρκεια της σύνθεσης.
2. Την αποπροστασία της α-αμινομάδας του πρώτου αμινοξέος σε συνθήκες στις οποίες η προστασία των πλευρικών ομάδων παραμένει σταθερή. Συγκεκριμένα, η ομάδα προστασίας Fmoc απομακρύνεται γρήγορα με πρωτοταγείς και δευτεροταγείς αμίνες - συνήθως με διάλυμα πιπεριδίνης 20-50% σε DMF (Chang et al, 1980, Amblard et al, 2006).
3. Την κατάλληλη ενεργοποίηση της καρβοξυλικής ομάδας του επόμενου αμινοξέος της αλληλουχίας και τη σύζευξή του στην ελεύθερη αμινομάδα του προηγούμενου αμινοξέος, μέσω του σχηματισμού ενός πεπτιδικού δεσμού.

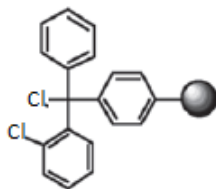
4. Την επανάληψη των σταδίων της αποπροστασίας και της προσθήκης του επόμενου ενεργοποιημένου αμινοξέος, έως ότου παρασκευασθεί το πεπτίδιο με την επιθυμητή αλληλουχία.
5. Τέλος, την αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη με ειδικά μείγματα αποκοπής, ανάλογα με τη σύσταση του πεπτιδίου. Κατά την αποκοπή απομακρύνονται επίσης οι μόνιμες προστατευτικές ομάδες των αμινοξέων.



Εικόνα 3.3: Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεά φάση

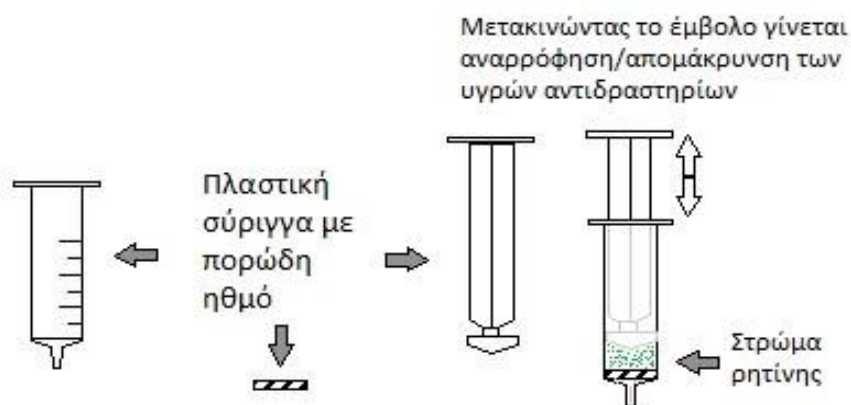
Υλικά και όργανα:

- N,N'-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF), διχλωρομεθάνιο (DCM), μεθανόλη (MeOH), τετραϋδροφουράνιο (THF), πιπεριδίνη, διαιθυλαιθέρας (Et₂O), DIC (N,N'-δισοπροπυλοκαρβοδιμίδιο): Merck. Τριφθοροξικό οξύ (TFA), τρισοπροπυλοσιλάνιο (TIS), δισοπροπυλοαιθυλαμίνη (DIEA): Sigma
- Fmoc-προστατευμένα αμινοξέα [Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ala-OH], Oxyma (ethyl cyanohydroxyiminoacetate) (Merck/Novabiochem)
- Η σύνθεση των τετραπεπτιδίων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την εμπορικά διαθέσιμη ρητίνη 2-Chloro-trityl-chloride (2-CTC resin, Εικόνα 3.4), της εταιρείας Merck/Novabiochem. Η χρήση της συγκεκριμένης ρητίνης οδηγεί, μετά την αποκοπή, σε πεπτίδια που έχουν ελεύθερη την τελική καρβοξυλομάδα.



Εικόνα 3.4: Ρητίνη 2-CTC

- Όλα τα στάδια της SPPS έγιναν, για κάθε πεπτίδιο, σε ειδική, εμπορικά διαθέσιμη σύριγγα, της εταιρείας Intavis. Στο στόμιο της σύριγγας ήταν τοποθετημένος πορώδης ηθμός, ώστε να πραγματοποιούνται εκπλύσεις χωρίς την απομάκρυνση της ρητίνης και του αναπτυσσόμενου πεπτιδίου, που ήταν συνδεδεμένο σε αυτήν (Εικόνα 3.5). Η σύριγγα ήταν κατασκευασμένη από πλαστικό συμβατό με οργανικούς διαλύτες.



Εικόνα 3.5: Ειδική σύριγγα, που χρησιμοποιήθηκε στη σύνθεση των πεπτιδίων

- Φασματοφωτόμετρο Shimadzu, UV-1800
- Φυγόκεντρος Heraeus, Varifuge RF

Πειραματική διαδικασία (Zikos et al., 2003)

3.1.1.1. Προετοιμασία της ρητίνης

Αρχικά, ζυγίστηκε ποσότητα ρητίνης (300 mg, βαθμού υποκατάστασης 0,5 mmol/g), η οποία τοποθετήθηκε στη σύριγγα. Στη συνέχεια, διαβιβάστηκε στη σύριγγα DCM (τρεις φορές) και το σύστημα έμεινε για να ισορροπήσει για 1 min μετά από κάθε προσθήκη (με τον τρόπο αυτό, η ρητίνη διογκώνεται, εκθέτοντας στην επιφάνειά της περιοχές διαθέσιμες για τη σύνδεση του πρώτου αμινοξέος, που πιθανόν να είναι «κρυμμένες» στο εσωτερικό των σφαιριδίων της). Ακολούθησε διήθηση και προσθήκη μείγματος θειονυλοχλωριδίου 4% σε DCM. Μετά από 30 min έγινε διήθηση και προσθήκη νέας ποσότητας του παραπάνω μείγματος. Η διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές. Στη συνέχεια, έγιναν τέσσερις εκπλύσεις του 1 min με THF και τέσσερις εκπλύσεις του 1 min με DCM.

3.1.1.2. Σύνδεση του πρώτου αμινοξέος

Σε γυάλινο φιαλίδιο ζυγίστηκε περίσσεια (X4 μοριακά ισοδύναμα, με βάση την ποσότητα και το βαθμό υποκατάστασης της ρητίνης) από το συγκεκριμένο Fmoc-αμινοξύ (Fmoc-Pro-OH), η οποία διαλύθηκε σε άνυδρο DCM. Μετά την πλήρη διάλυση του αμινοξέος, έγινε προσθήκη περίσσειας (X8 μοριακά ισοδύναμα, με βάση την ποσότητα και το βαθμό υποκατάστασης της ρητίνης) DIEA. Το διάλυμα που προέκυψε προστέθηκε στη ρητίνη και έμεινε να αντιδράσει υπό ανακίνηση για 2 h. Ακολούθησε διήθηση, τέσσερις εκπλύσεις με DCM και πέντε εκπλύσεις με DMF. Τη σύνδεση του πρώτου Fmoc-αμινοξέος ακολούθησε το στάδιο της αποπροστασίας, για την απομάκρυνση της Fmoc ομάδας, όπως περιγράφεται στη συνέχεια (3.1.1.3), ώστε να είναι δυνατή η σύζευξη του επόμενου αμινοξέος.

3.1.1.3. Απομάκρυνση της Fmoc ομάδας του πρώτου αμινοξέος

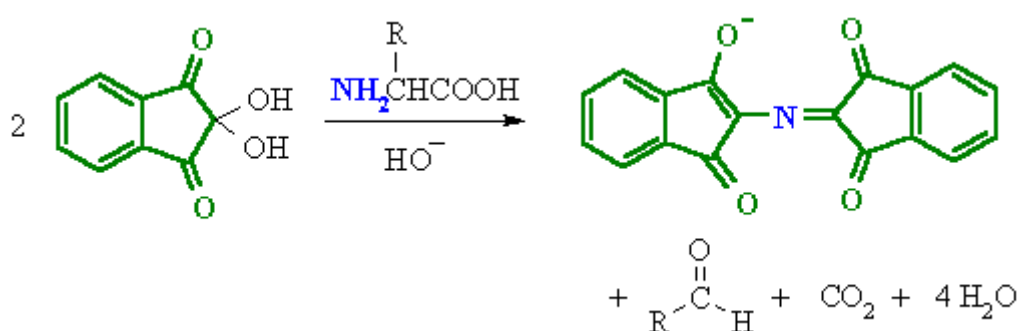
Η απομάκρυνση της Fmoc ομάδας του πρώτου αμινοξέος πραγματοποιήθηκε με διάλυμα πιπεριδίνης 20% σε DMF. Το διάλυμα της πιπεριδίνης αφέθηκε στη σύριγγα για 5 min. Ακολούθησε διήθηση και προσθήκη νέας ποσότητας διαλύματος πιπεριδίνης. Στο σύνολο, έγιναν τέσσερις προσθήκες εντός 30 min (5 min, 5 min, 10 min, 10 min) και τα διηθήματα συλλέχθηκαν σε κωνική φιάλη. Η ολοκλήρωση του σταδίου ελέγχθηκε φασματοφωτομετρικά, στα 301 nm, καθώς σε αυτό το μήκος κύματος απορροφά το προϊόν που προκύπτει από την αντίδραση της Fmoc με την πιπεριδίνη. Ο τερματισμός σχηματισμού του προϊόντος αυτού (οπότε η τιμή της οπτικής απορρόφησης στα 301 nm πρακτικά μηδενίζεται) σημαίνει και την ολοκλήρωση του σταδίου της αποπροστασίας. Μετά το πέρας του σταδίου, έγιναν 10 εκπλύσεις του 1 min με DMF και ακολούθησε η διαδικασία της επιμήκυνσης της πεπτιδικής αλυσίδας μέσω της σύζευξης των επόμενων αμινοξέων, όπως περιγράφεται παρακάτω.

3.1.1.4. Επιμήκυνση της πεπτιδικής αλυσίδας

Σε γυάλινο φιαλίδιο ζυγίζοταν περίσσεια του επόμενου στην αλληλουχία Fmoc-αμινοξέος καθώς και του αντιδραστηρίου Oxyma (X4 μοριακά ισοδύναμα, με βάση την ποσότητα και το βαθμό υποκατάστασης της ρητίνης). Στη συνέχεια, γινόταν προσθήκη DMF και το φιαλίδιο, που περιείχε το διάλυμα Fmoc-αμινοξέος/Oxyma (~0,25 M), αφηνόταν σε πάγο για 8-10 min. Ακολουθούσε η προσθήκη περίσσειας του αντιδραστηρίου DIC (X4 μοριακά ισοδύναμα, με βάση την ποσότητα και το βαθμό υποκατάστασης της ρητίνης) και παραμονή του φιαλιδίου για άλλα 4 min σε πάγο. Στη συνέχεια, γινόταν προσθήκη του διαλύματος του ενεργοποιημένου Fmoc-

αμινοξέος στη σύριγγα, ώστε να γίνει σύζευξή του με το προηγούμενο αμινοξύ. Το μείγμα έμενε να αντιδράσει υπό ανακίνηση για 2 h και ακολουθούσε έκπλυση της ρητίνης με DMF (πέντε φορές).

Ο έλεγχος της ολοκλήρωσης της σύζευξης γινόταν με βάση τη δοκιμασία νινυδρίνης (Kaiser test, Εικόνα 3.6) (Kaiser et al., 1970) ή με τη δοκιμασία της τετραχλωρο-*p*-βενζοκινόνης (Chloranil test) (Christensen, 1979), για να επιβεβαιωθεί η κάλυψη πρωτοταγών ή δευτεροταγών αμινομάδων αντίστοιχα. Στις περιπτώσεις που η δοκιμασία Kaiser απέβαινε έντονα θετική (έντονο μπλε χρώμα στα σφαιρίδια της ρητίνης), η σύζευξη επαναλαμβανόταν (double coupling). Στις περιπτώσεις που η δοκιμασία ήταν αμυδρά θετική, ακολουθούσε ακετυλίωση (capping) των τυχόν ελεύθερων αμινομάδων. Η ακετυλίωση γινόταν με προσθήκη μίγματος οξικού ανυδρίτη / DMF/ DIEA, 1:1:1 και επώαση της ρητίνης υπό ανάδευση για 30 min. Τέλος, γίνονταν 5 εκπλύσεις του 1 min με DMF.



Εικόνα 3.6: Σχηματισμός έγχρωμου προϊόντος παρουσία ελεύθερων πρωτοταγών αμινομάδων, κατά τη δοκιμασία της νινυδρίνης.

Η προηγούμενη πορεία επαναλαμβανόταν για κάθε διαδοχικά προστιθέμενο αμινοξύ, προς δημιουργία πεπτιδικού δεσμού με το προηγούμενο. Μετά την προσθήκη και την αποπροστασία του τελευταίου αμινοξέος, ακολούθησε ακετυλίωση της τελικής α-αμινομάδας (με τις συνθήκες που περιγράφηκαν προηγουμένως), εκπλύσεις (επτά εκπλύσεις του 1 min με DCM και τρεις εκπλύσεις του 1 min με πετρελαϊκό αιθέρα) και το στάδιο της ξήρανσης, με τη βοήθεια αντλίας κενού, για 24 h.

3.1.1.5. Απομάκρυνση των πλευρικών προστατευτικών ομάδων και αποκοπή των πεπτιδίων από τη ρητίνη

Η επιλογή του μίγματος αποκοπής γίνεται βάσει της αμινοξικής αλληλουχίας του πεπτιδίου. Στη δική μας περίπτωση, χρησιμοποιήθηκε μείγμα TFA/ H₂O/ TIS, 95 : 2,5 : 2,5, v/v. Η διαδικασία ήταν η ακόλουθη:

Σε γυάλινο φιαλίδιο γινόταν προσθήκη των συστατικών του μίγματος κοπής. Ακολουθούσε προσθήκη του μίγματος στη σύριγγα, που περιείχε τη ρητίνη με το προς αποκοπή πεπτίδιο και παραμονή για 2 h. Στη συνέχεια, γινόταν διήθηση σε δύο σωλήνες πολυπροπυλενίου (σωλήνες falcon) των 50 mL, σε κάθε έναν από τους οποίους είχε γίνει προσθήκη 10 mL διαιθυλαιθέρα, ενώ η ρητίνη εκπλενόταν με TFA για την απομάκρυνση ποσότητας πεπτιδίου που πιθανόν είχε απομείνει χωρίς να αποκοπεί. Εν συνεχεία, οι δύο σωλήνες falcon τοποθετούνταν σε πάγο για ~ 10 min, ώστε να μειωθεί η διαλυτότητα του πεπτιδίου και να καταβυθιστεί πιο γρήγορα ως ίζημα. Ακολουθούσε φυγοκέντρωση για 5 min και τρεις εκπλύσεις με διαιθυλαιθέρα, ακολουθούμενες από αντίστοιχες φυγοκεντρήσεις των 5 min (1.000 rpm). Μετά την

τελευταία φυγοκέντρωση, ο διαιθυλαιθέρας απορριπτόταν και το πεπτίδιο, που παραλαμβάνονταν ως ίζημα, έμενε να στεγνώσει για 30 min. Ακολουθούσε ανάλυση του ακατέργαστου πεπτιδίου με αναλυτική RP-HPLC και καθαρισμός του σε ημιπαρασκευαστική RP-HPLC.

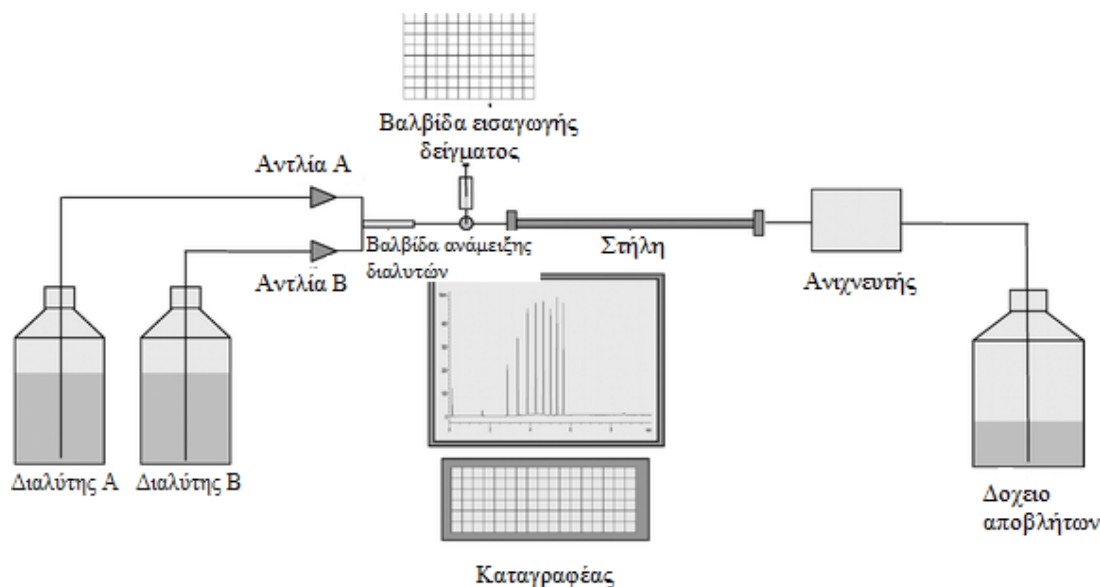
3.1.2. Καθαρισμός και ανάλυση πεπτιδίων με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC)

Αρχή της μεθόδου

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) θεωρείται σήμερα η καλύτερη μέθοδος υγρής χρωματογραφίας και αποτελεί βασικό εργαλείο καθαρισμού, ανάλυσης και έμμεσης ταυτοποίησης (μέσω μαρτύρων) πληθώρας ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων των μικρών πρωτεϊνών και πεπτιδίων (Prathap et al., 2013)

Όπως φαίνεται παραστατικά στην εικόνα 3.7, ένα σύστημα HPLC αποτελείται γενικά από τα εξής μέρη (Watson, 2005):

1. *Δύο δοχεία αποθήκευσης διαλυτών* (Α και Β), τα οποία είναι συνήθως συνδεδεμένα με απαερωτές, για την απομάκρυνση του διαλυμένου αέρα, ο οποίος επηρεάζει την ανάλυση.
2. *Βαλβίδα ανάμιξης διαλυτών*. Συντελεί στην ανάμιξη των διαλυτών πριν αυτοί εισέλθουν στο θάλαμο διαχωρισμού και περάσουν από τη στήλη.
3. *Αντλίες*. Η υψηλή πίεση, που πρέπει να εφαρμοστεί στην υγρή κινητή φάση για να διέλθει από τη στήλη με ικανοποιητική ταχύτητα, επιτυγχάνεται με τις αντλίες. Η κατασκευή των αντλιών γίνεται από υψηλής ποιότητας ανοξείδωτο χάλυβα ή από αδρανή πολυμερή, όπως το πολυτετραφθοροαιθυλένιο, ώστε να αντιστέκονται στην προσβολή από οποιαδήποτε κινητή φάση.
4. *Βαλβίδα εισαγωγής δείγματος*. Περιέχει ένα βαθμονομημένο βρόγχο, ώστε να εισάγεται σταθερός και επαναλήψιμος όγκος δείγματος κάθε φορά ή περιέχει βρόγχο μεγάλης περιεκτικότητας και ο όγκος δείγματος υπολογίζεται με σύριγγα.
5. *Προστήλη*. Η προστήλη έχει τα ίδια ακριβώς υλικά με τη στήλη και δρα ως χημικό φίλτρο, απομακρύνοντας ισχυρώς κατακρατούμενες ενώσεις που είναι δυνατόν να κορέσουν την αναλυτική στήλη και να ελαττώσουν τη διάρκεια ζωής της.
6. *Στήλη*. Ως υλικά πλήρωσης των στηλών έχουν χρησιμοποιηθεί πολλά συστατικά (άνθρακας, οργανικά πολυμερή, κ.ά.), ενώ η επιλογή τους καθορίζει και το φυσικό φαινόμενο που λαμβάνει χώρα στους διαχωρισμούς και συνεπώς το είδος της χρωματογραφίας. Το οξείδιο του πυριτίου (silica) είναι το πιο διαδεδομένο υλικό πλήρωσης.
7. *Ανιχνευτές*. Χρησιμοποιείται πληθώρα ανιχνευτών και όλοι παράγουν ένα ενισχυμένο σήμα ανάλογο της ποσότητας της ουσίας που εκλύεται κάθε στιγμή. Οι ευρύτερα χρησιμοποιούμενοι ανιχνευτές είναι οι φασματοφωτομετρικοί (UV ή IR) και οι φθορισμομετρικοί.



Εικόνα 3.7: Σχηματική απεικόνιση των κύριων μονάδων ενός συστήματος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)

Οι μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης είναι οι ευρύτερα χρησιμοποιούμενες μέθοδοι HPLC, λόγω του ότι χαρακτηρίζονται από μεγάλο εύρος δυνητικών εφαρμογών. Η στατική φάση που χρησιμοποιείται στις μεθόδους RP-HPLC είναι οξείδιο του πυριτίου. Η στατική φάση, μετά από κατάλληλη χημική επεξεργασία, φέρει στην επιφάνειά της αλκυλο-πυριτικές ομάδες, συνήθως δεκαοκτυλο-πυριτικές (C_{18}), που της προσδίδουν υδρόφοβο χαρακτήρα. Η κατακράτηση στη στήλη των προς καθαρισμό ή ανάλυση ουσιών οφείλεται κυρίως στην ανάπτυξη υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων μεταξύ αυτών και της επιφάνειας της στατικής φάσης. Για την έκλυση των ουσιών χρησιμοποιείται κυρίως μια πολική κινητή φάση, αποτελούμενη συνήθως από H_2O και $MeOH$, CH_3CN ή κάποιον άλλον οργανικό διαλύτη αναμίξιμο με H_2O . Οι διάφορες ουσίες εκκλύονται κατά σειρά αύξουσας υδροφοβικότητας (Lim, 1987).

Υλικά και όργανα

- Ακετονιτρίλιο (CH_3CN), Sigma
- Τριφθοροξικό οξύ (TFA), Sigma
- Εμπορικά διαθέσιμο, συνθετικό τετραπεπτίδιο AcSDKP, Bachem (εσωτερικό πρότυπο)
- Σύστημα αναλυτικής υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, αντίστροφης φάσης, Waters, αποτελούμενο από αντλίες Model 600E και ανιχνευτή τύπου 991 PDA
- Σύστημα ημιπαρασκευαστικής στήλης υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης, (RP-HPLC) Waters αποτελούμενο από αντλίες Model 600 και ανιχνευτή υπεριώδους/ορατού (UV/Vis) Model 486
- Στήλη 10Nucleosil 7 C18 (250 x 12,7 mm ID), Macherey- Nagel
- Στήλη LiChrospher RP C18 (250 x 4,6 mm ID), Merck
- Συσκευή λυοφιλοποίησης Christ, Beta 1-8

Πειραματική πορεία

Έπειτα από την αποκοπή των συνθετικών τετραπεπτιδίων AcSDKP και AcADKP από την αντίστοιχη ρητίνη, τα ακατέργαστα πεπτίδια ξηράνθηκαν για 24 h σε ξηραντήρα υψηλού κενού πάνω από P_2O_5 , όπως ήδη αναφέρθηκε. Ακολούθησε η ανάλυση των ακατέργαστων πεπτιδίων με αναλυτική RP-HPLC, ο καθαρισμός τους με ημιπαρασκευαστική στήλη RP-HPLC και η εκ νέου ανάλυση των πεπτιδίων, μετά τον καθαρισμό τους, με αναλυτική RP-HPLC.

Οι συνθήκες που ακολουθήθηκαν κατά την αναλυτική και την παρασκευαστική RP-HPLC περιγράφονται στον Πίνακα 3.1:

Πίνακας 3.1: Συνθήκες ανάλυσης και καθαρισμού των συνθετικών τετραπεπτιδίων AcSDKP και AcADKP με αναλυτική και ημιπαρασκευαστική RP-HPLC

Αναλυτική	Γραμμική μεταβολή σύστασης του μείγματος έκλουσης
	0% B → 20% B 20min
	Λοιπές συνθήκες
	Στήλη: LiChrospher RP C18 (250 x 4,6 mm ID) Διαλύτες έκλουσης: A (0,05% TFA σε H_2O) και B (90% CH_3CN σε διαλύτη A) Ταχύτητα ροής: 1 mL/min Ανίχνευση: UV (220 nm)
	Γραμμική μεταβολή σύστασης του μείγματος έκλουσης
Ημιπαρασκευαστική	0% B → 20% B 60min
	Λοιπές συνθήκες
	Στήλη: 10 Nucleosil 7 C18 (250 x 12,7 mm ID) Διαλύτες έκλουσης: A (0,05% TFA σε H_2O) και B (60% CH_3CN σε διαλύτη A) Ταχύτητα ροής: 3 mL/min Ανίχνευση: UV (220 nm)
	Γραμμική μεταβολή σύστασης του μείγματος έκλουσης
	0% B → 20% B 60min

Τα κλάσματα που περιείχαν τα καθαρά πεπτίδια συνενώθηκαν, λυοφιλοποιήθηκαν και τα πεπτίδια αποθηκεύθηκαν στους -30 °C.

Η ταυτοποίηση των συνθετικών τετραπεπτιδίων AcSDKP και AcADKP, μετά τον καθαρισμό τους, έγινε με φασματομετρία μαζών με τη μέθοδο του ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ElectroSpray Ionization Mass Spectrometry, ESI-MS) στο Πανεπιστήμιο Tübingen, Γερμανία.

Αφού ολοκληρώθηκαν οι διαδικασίες σύνθεσης, καθαρισμού και ταυτοποίησης των δύο τετραπεπτιδίων, AcSDKP και AcADKP, ακολούθησε έλεγχος της *in vitro* βιολογικής δράσης τους, σε επιλεγμένες κυτταρικές σειρές και με ειδικές δοκιμασίες, όπως περιγράφεται στη συνέχεια.

3.2. *In vitro* κυτταρικές δοκιμασίες για τον έλεγχο της βιολογικής δράσης των πεπτιδίων

Μετά τη σύνθεση, τον καθαρισμό και την ταυτοποίηση των δύο τετραπεπτιδίων, AcSDKP και AcADKP, ακολούθησε ο έλεγχος της βιολογικής τους δράσης *in vitro*, με συγκεκριμένες κυτταρικές δοκιμασίες. Χρησιμοποιήθηκαν δύο κυτταρικές σειρές, ανθρώπινοι δερματικοί ινοβλάστες AG01523c και ανθρώπινα αθανатоποιημένα κερατινοκύτταρα HaCaT, κύτταρα του χορίου και της επιδερμίδας, αντίστοιχα, τα οποία συμμετέχουν φυσιολογικά σε διάφορα στάδια της επούλωσης μιας πληγής. Έτσι, σε συνδυασμό με τις κατάλληλες πειραματικές συνθήκες καλλιέργειας, παρέχουν ικανοποιητικώς αξιόπιστα μοντέλα προσομοίωσης της διαδικασίας δερματικής επούλωσης *in vitro*. Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας ελέγχθηκε η πιθανή τοξική δράση των AcSDKP και AcADKP στα δύο είδη κυττάρων, η επίδρασή τους στη σύνθεση του DNA και στη κολλαγονοσύνθεση των ινοβλαστών, καθώς και η επίδρασή τους στη μετανάστευση των κερατινοκυττάρων.

3.2.1. Καλλιέργειες κυττάρων

Υλικά και όργανα:

- Ανθρώπινοι δερματικοί ινοβλάστες AG01523c (The Human Mutant Cell Repository, Coriell Institute for Medical Research, Camden, USA)
- Ανθρώπινα αθανатоποιημένα κερατινοκύτταρα HaCaT

Οι συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές επιλέχθηκαν επειδή αντιπροσωπεύουν δερματικά κύτταρα, τα οποία συμμετέχουν ενεργά στην επούλωση. Έτσι λοιπόν, προσφέρουν ένα φθινό και ικανοποιητικό μοντέλο in vitro μελέτης της διαδικασίας δερματικής επούλωσης. Συγκεκριμένα, οι ινοβλάστες είναι κύτταρα του χορίου, τα οποία μεταναστεύουν στην περιοχή του τραύματος, εκκρίνοντας κολλαγόνο και άλλες ουσίες της εξωκυττάριας μήτρας, ενώ τα κερατινοκύτταρα εντοπίζονται στην επιδερμίδα και μεταναστεύουν από την άκρη της πληγής, σχηματίζοντας ένα λεπτό στρώμα επιθηλιακών κυττάρων τα οποία βοηθούν στο κλείσιμο του τραύματος.

- Θρεπτικό υλικό DMEM (Dulbecco's Minimal Essential Medium), αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη, L-γλουταμίνη, πυροσταφυλικό και διττανθρακικό νάτριο (Biochrom AG, Berlin, Germany)
- Εμβρυϊκός βόειος ορός (Fetal Bovine Serum, FBS), Gibco BRL (Paisley, UK)
- Θρυψίνη, Invitrogen (California)
- Πλάκες κυτταροκαλλιιεργειών πολλαπλών θέσεων, Greiner (Hanover, Germany)
- Σωματιδιακός αναλυτής Beckman Coulter Counter (Beckman, USA)
- Επωαστικός κλίβανος CO₂ Thermo Forma Series II (Ohio, USA)
- Εστία νηματικής ροής Safeflow 1.8, Bioair Instruments (Siziano, Italy)
- Ανάστροφο μικροσκόπιο Wild MPS 52, Leitz (Heerbrugg, Switzerland)

3.2.1.1. Κυτταρικές σειρές και συνθήκες καλλιέργειας

Χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινοι δερματικοί ινοβλάστες AG01523c, οι οποίοι καλλιεργήθηκαν σε DMEM, στο οποίο είχαν προστεθεί, πυροσταφυλικό οξύ (1mM), διάλυμα πενικιλίνης (10.000 U/L), διάλυμα στρεπτομυκίνης (10.000 µg/L) και L-γλουταμίνη (4 mM), παρουσία 15% (v/v) FBS, σε ατμόσφαιρα 5% CO₂, 95% υγρασία και θερμοκρασία 37°C.

Τα κύτταρα αφήνονταν να καλύψουν τον πυθμένα της φιάλης κυτταροκαλλιέργειας σχηματίζοντας μονοστιβάδα. Στη συνέχεια, ακολουθούσε ανακαλλιέργεια με διάλυμα 0,25% (w/v) θρυψίνης, 10 mM κιτρικού νατρίου, 110 mM NaCl pH 7,2. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα εκπλένονταν αρχικά με διάλυμα θρυψίνης και επωάζονταν με 3,0-4,5 mL θρυψίνης ανά φιάλη ανακαλλιέργειας εμβαδού 75 cm², στους 37°C για 2 min. Αμέσως μετά απομακρυνόταν σχεδόν όλη η ποσότητα της θρυψίνης και η αποκόλληση των κυττάρων γινόταν με μηχανική ανατάραξη της φιάλης ανακαλλιέργειας. Ακολουθούσε ήπια επαναιώρηση των κυττάρων σε νέο θρεπτικό υλικό και αυτό διαμοιραζόταν σε νέες φιάλες, με λόγο κατανομής (split ratio) 1:2 ή 1:4. Η εργασία λάμβανε χώρα υπό άσηπτες συνθήκες, σε εστία νηματικής ροής (laminar flow).

Ακόμη, χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινα αθανатоποιημένα κερατινοκύτταρα HaCaT. Τα κύτταρα αυτά ανακαλλιεργούνταν στο θρεπτικό μέσο που περιγράφηκε για τα AG01523c κύτταρα, παρουσία 10% (v/v) FBS. Η ανακαλλιέργεια γινόταν όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη παράγραφο, με λόγο ανακαλλιέργειας 1:8 (Πρατσίνης, 1988).

3.2.1.2. Συγχρονισμός καλλιέργειας

Οι ανθρώπινοι δερματικοί ινοβλάστες επιστρώνονταν αρχικά παρουσία DMEM/ 15% FBS. Αφήνονταν να αναπτυχθούν έως ότου η επιφάνεια να καλυφθεί κατά περίπου 80% και στη συνέχεια τα κύτταρα παρέμεναν σε ηρεμία παρουσία μικρής ποσότητας ορού (DMEM/ 0,1% FBS) για 48 h. Με τον συγκεκριμένο τρόπο, επιτυγχάνεται συγχρονισμός των κυττάρων στην G₀ φάση του κυτταρικού κύκλου. Η διαδικασία αυτή ενδείκνυται για τη μελέτη διέγερσης σηματοδοτικών μονοπατιών από εξωγενή ερεθίσματα, όπως οι αυξητικοί παράγοντες (Πρατσίνης, 1988).

3.2.1.3. Μέτρηση αριθμού κυττάρων με σωματιδιακό αναλυτή

Η μέτρηση του συνολικού αριθμού των κυττάρων γινόταν σε σωματιδιακό αναλυτή Beckman Coulter Counter. Σε ισότονο αλατούχο διάλυμα γινόταν προσθήκη συγκεκριμένου όγκου κυτταρικού εναιωρήματος (0,5 mL), ώστε ο τελικός όγκος να είναι 12,5 mL. Ο συνολικός αριθμός των κυττάρων υπολογιζόταν, λαμβάνοντας υπόψη τις αραιώσεις και το γεγονός ότι το όργανο μετρά τον αριθμό σωματιδίων που περιέχονται σε 0,5 mL ισότονου κυτταρικού εναιωρήματος. Ο συγκεκριμένος τρόπος είναι ταχύτατος και ακριβής, ενώ απαιτεί καλά επαναιωρημένο κυτταρικό πληθυσμό,

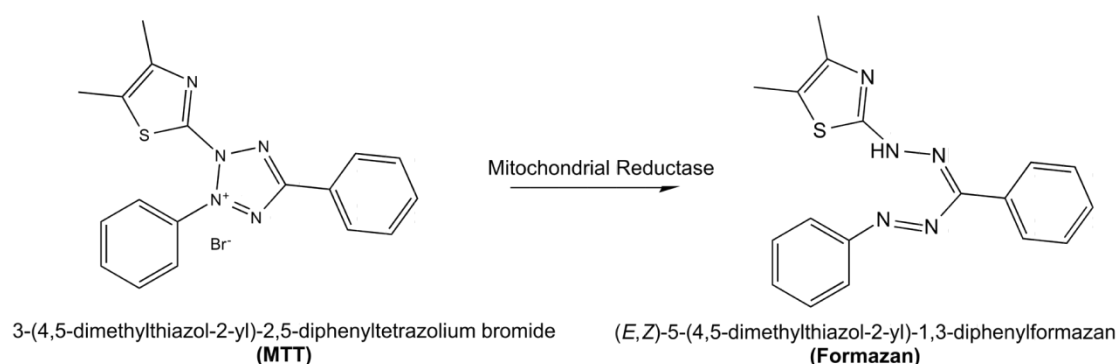
χωρίς συσσωματώματα και απελευθερωμένο από πάσης φύσης υπολείμματα, των οποίων η ύπαρξη αλλοιώνει τη μέτρηση του πραγματικού αριθμού των κυττάρων.

3.2.2. Έλεγχος κυτταρικής βιωσιμότητας με τη μέθοδο MTT

Αρχή της μεθόδου

Το MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Thiazolyl Blue) είναι ένα υδατοδιαλυτό άλας το οποίο παράγει ένα διάλυμα κίτρινου χρώματος, όταν παρασκευαστεί σε θρεπτικό μέσο ή διάλυμα από όπου απουσιάζει η χρωστική ερυθρό της φαινόλης (Mosmann, 1983).

Το διαλυμένο MTT μπορεί να μετατραπεί σε μωβ αδιάλυτους κρυστάλλους φορμαζανίου, μετά τη διάσπαση του δακτυλίου τετραζολίου (Εικόνα 3.8) από συγκεκριμένα μιτοχονδριακά ένζυμα, τις δεϋδρογενάσες και τις οξειδοοδουκτάσες, οι οποίες είναι παρούσες σε μεταβολικώς ενεργά κύτταρα (Berridge et al, 2005).



Εικόνα 3.8: Μετατροπή του MTT σε έγχρωμο προϊόν φορμαζανίου από τα μιτοχονδριακά ένζυμα

Το αδιάλυτο στο νερό φορμαζάνιο, μπορεί να διαλυτοποιηθεί χρησιμοποιώντας ισοπροπανόλη ή διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) και να μετρηθεί φασματοφωτομετρικά στα 550 nm. Η μετρούμενη απορρόφηση θα είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της παραγόμενης χρωστικής και επομένως και του αριθμού των ζωντανών (μεταβολικώς ενεργών) κυττάρων.

Με τη δοκιμασία MTT μπορεί να προσδιοριστεί ποιοτικά η επίδραση κάποιου παράγοντα στην βιωσιμότητα και τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων και επομένως μπορεί να εκτιμηθεί η κυτταροστατικότητα ή/και η κυτταροτοξικότητα του παράγοντα αυτού (Mosmann, 1983).

Υλικά και όργανα

- Ανθρώπινοι δερματικοί ινοβλάστες AG01523c
- Ανθρώπινα αθανатоποιημένα κερατινοκύτταρα HaCaT
- Θρεπτικό υλικό DMEM, όπως προαναφέρθηκε
- Εμβρυϊκός βόειος ορός (Fetal Bovine Serum, FBS), Gibco BRL (Paisley, UK)
- Χρωστική MTT, Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
- Ισοπροπανόλη, Merck (Damstadt, Germany)
- Δοξορουβικίνη, PCH Pharmachemie (Netherlands)

Η δοξορουβικίνη είναι χημειοθεραπευτικός παράγοντας και δρα μέσω παρεμβολής μεταξύ γειτονικών ζευγών βάσεων της διπλής έλικας του DNA, μέσω της δέσμευσης ενζύμων που σχετίζονται με το DNA, όπως της τοποϊσομεράσης I, ενώ δρα και επί των μεμβρανών, ασκώντας συνολικά κυτταροτοξική δράση επί των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων (Tacar et al., 2012, Hilmer et al., 2004). Στα πειράματά μας χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας, σε συγκέντρωση 0,875 µg/mL.

- Τετραπεπτίδιο acetylSer-Asp-Lys-Pro-OH (AcSDKP), που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο, και εμπορικά διαθέσιμο τετραπεπτίδιο acetylSer-Asp-Lys-Pro-OH (AcSDKP), Bachem AG (Bubendorf, Switzerland).

Οι συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν ήταν από 10^{-10} έως 10^{-7} M και επιλέχθηκαν με βάση τη διαθέσιμη βιβλιογραφία.

- Τετραπεπτίδιο acetylAla-Asp-Lys-Pro-OH (AcADKP), που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο.

Το τετραπεπτίδιο αυτό δεν διατίθεται στο εμπόριο, επομένως το προϊόν που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο κατά την εκπόνηση της παρούσας εργασίας ήταν το μόνο διαθέσιμο για τη μελέτη μας. Οι συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν ήταν από 10^{-10} έως 10^{-7} M, κατά αντιστοιχία με αυτές του τετραπεπτιδίου AcSDKP, μιας και τα βιβλιογραφικά στοιχεία που αναφέρονται στο AcADKP είναι ελάχιστα.

- Πλάκες κυτταροκαλλιεργειών πολλαπλών θέσεων, Greiner (Hanover, Germany)
- Επωαστικός κλίβανος CO₂ Thermo Forma Series II (Ohio, USA)
- Εστία νηματικής ροής Safeflow 1.8, Bioair Instruments (Siziano, Italy)
- Αναδευτήρας Shaker Titramax 1000, Heidolph (Germany)
- Αναλυτής απορρόφησης / φθορισμού μικροπλακών FLUOstar OPTIMA, BMG LABTECH, Ortenberg, Germany

Πειραματική διαδικασία

Την πρώτη ημέρα γινόταν η επίστρωση των κυττάρων, στο αρχικό τους θρεπτικό υλικό (DMEM/ 10% FBS για τα κερατινοκύτταρα και DMEM/FBS 15% για τους ινοβλάστες), σε πλάκα 96 θέσεων (περίπου 5.000-10.000 κύτταρα ανά θέση). Οι ινοβλάστες επωάζονταν έπειτα για τρεις ημέρες σε κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37°C, 95% υγρασία και 5% CO₂. Την τέταρτη ημέρα, γινόταν αντικατάσταση του θρεπτικού υλικού με φρέσκο, το οποίο είχε χαμηλή περιεκτικότητα σε ορό (DMEM/ 0,1% FBS) και επώαση για άλλη μια ημέρα στον κλίβανο, προκειμένου τα κύτταρα να εισέλθουν σε φάση ηρεμίας. Έπειτα, προσθέτονταν οι παράγοντες επίδρασης, διαλυμένοι σε DMEM/ 0,1% FBS, στις επιθυμητές προς έλεγχο συγκεντρώσεις, καθώς και οι αρνητικοί και οι θετικοί μάρτυρες. Ως αρνητικός μάρτυρας (control) χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο χωρίς την προσθήκη κάποιου παράγοντα. Στα κερατινοκύτταρα, μια ημέρα ήταν αρκετή για τη μόνιμη αγκυροβόλησή τους στο πλαστικό υπόστρωμα, οπότε η προσθήκη των παραγόντων επίδρασης, των διαλυμένων σε DMEM/ 10% FBS, γινόταν την δεύτερη ημέρα. Ο τελικός όγκος υγρού σε κάθε θέση ήταν 125 μL. Τα κύτταρα επωάζονταν έπειτα για τρεις ημέρες στον κλίβανο.

Την τελευταία ημέρα, γινόταν η αφαίρεση του υλικού (με τους παράγοντες) και η προσθήκη διαλύματος MTT διαλυμένου σε θρεπτικό υλικό, χωρίς ερυθρό της φαινόλης, σε συγκέντρωση 1 mg/mL. Μετά από 3 h, αφαιρείτο το θρεπτικό μέσο με το MTT και γινόταν προσθήκη ισοπροπανόλης, 60-100 μL ανά θέση, για διαλυτοποίηση των κρυστάλλων φορμαζανίου που είχαν σχηματιστεί στα ζωντανά κύτταρα. Ακολουθούσε ανάδευση σε αναδευτήρα μέχρι πλήρους διάλυσης των κρυστάλλων (10-15 min) και έπειτα γινόταν ποσοτική εκτίμηση της συγκέντρωσης της χρωστικής με φωτομέτρηση σε αναλυτή μικροπλακών FLUOstar OPTIMA, σε μήκος κύματος απορρόφησης 550 nm και μήκος κύματος αναφοράς 630 nm.

3.2.3. Ποσοτικός προσδιορισμός σύνθεσης DNA με τη μέθοδο τριτιωμένης θυμιδίνης

Αρχή της μεθόδου

Πρόκειται για μια αξιόπιστη δοκιμασία εκτίμησης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, καθώς μετρά άμεσα το ρυθμό σύνθεσης του DNA. Η μέθοδος βασίζεται στην προσθήκη επισημασμένης με τρίτιο θυμιδίνης (³H-TdR) στο θρεπτικό υλικό των ηρεμούντων κυττάρων που έχουν δεχτεί το μιτογόνο ερέθισμα και την επακόλουθη επώαση επί συγκεκριμένο χρονικό διάστημα στους 37°C. Με αυτό τον τρόπο, η ραδιενεργός θυμιδίνη ενσωματώνεται στις νεοσυντιθέμενες έλικες του DNA, κατά τη μιτωτική διαίρεση των κυττάρων (Morsmann, 1983).



Εικόνα 3.9: Σχηματική αναπαράσταση α) της πειραματικής διαδικασίας προσδιορισμού της σύνθεσης DNA με τη μέθοδο τριτωμένης θυμιδίνης (αριστερά), και, β) της τριτωμένης θυμιδίνης και τμήματος DNA, στο οποίο η τριτωμένη θυμιδίνη έχει ενσωματωθεί (δεξιά)

Στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας συλλέγεται το λύμα των κυττάρων και η ποσότητα ραδιενεργού θυμιδίνης που ενσωματώθηκε στο DNA μετράται σε μετρητή β-ακτινοβολίας (Εικόνα 3.9), με τη μέθοδο υγρού σπινθηρισμού (scintillation counting). Η τιμή της μέτρησης αντιπροσωπεύει επομένως τη σύνθεση DNA που πραγματοποίησε η καλλιέργεια κατά το χρονικό διάστημα που μεσολάβησε από την προσθήκη ^3H -TdR έως τη στιγμή της συλλογής και λύσης των κυττάρων.

Υλικά και όργανα:

- Ανθρώπινοι δερματικοί ινοβλάστες AG01523c
- Θρεπτικό υλικό DMEM, όπως προαναφέρθηκε.
- Εμβρυϊκός βόειος ορός (Fetal Bovine Serum, FBS), Gibco BRL (Paisley, UK)
- Τριχλωροοξικό οξύ (Trichloroacetic acid, TCA), Panreac (Barcelona, Spain)
- Triton X-100, Merck (Damstadt, Germany)
- Τολουόλιο, Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
- 2,5-Diphenyloxazole – PPO, Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
- 1,4-bis(5-Phenyloxazol-2-yl) benzene - POPOP, Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
- Ισοτονικό ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών - χλωριούχων 10X, pH 7,2 (Phosphate Buffer Saline, PBS)

Na_2HPO_4	14,4 g
NaCl	80 g
KH_2PO_4	2,4 g
KCl	2 g

Τα παραπάνω συστατικά διαλύονται σε H_2O , ώστε να προκύψει τελικός όγκος 1 L.

- Τριτιωμένη θυμιδίνη [(methyl- ^3H) thymidine], GE Healthcare (UK)
- Αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (Platelet Derived Growth Factor, PDGF), Peprotech (Rocky Hill, USA)

Ο PDGF είναι αυξητικός παράγοντας με μιτογόνο δράση, ο οποίος επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη σύνθεση του DNA σε ινοβλάστες που βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας (Hannink & Donogue, 1989). Για αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας, σε τελική συγκέντρωση 10 ng/mL, η οποία επιλέχθηκε βάσει προηγούμενης εμπειρίας του εργαστηρίου.

- Εμπορικά διαθέσιμο τετραπεπτίδιο acetylSer-Asp-Lys-Pro-OH, Bachem AG (Bubendorf, Switzerland)

Χρησιμοποιήθηκε σε τελική συγκέντρωση 10^{-9} M. Η συγκέντρωση αυτή επιλέχθηκε καθώς, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία βρίσκεται στην τάξη συγκεντρώσεων που το τετραπεπτίδιο έχει ανιχνευθεί στο πλάσμα (Pradelles et al., 1990), ενώ η ίδια συγκέντρωση έχει επίσης χρησιμοποιηθεί σε συναφείς in vitro δοκιμασίες του AcSDKP (Rhaleb et al., 2001).

- Τετραπεπτίδιο acetylAla-Asp-Lys-Pro-OH, που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο.

Χρησιμοποιήθηκε σε τελική συγκέντρωση 10^{-9} M. Η συγκέντρωση επιλέχθηκε κατ' αντιστοιχία με εκείνη του τετραπεπτιδίου AcSDKP, επειδή τα διαθέσιμα στη βιβλιογραφία στοιχεία για το AcADKP είναι ελάχιστα.

- Πλάκες κυτταροκαλλιεργειών πολλαπλών θέσεων, Greiner (Hanover, Germany)
- Επωαστικός κλίβανος CO₂ Thermo Forma Series II (Ohio, USA)
- Εστία νηματικής ροής Safeflow 1.8, Bioair Instruments (Siziano, Italy)
- Αναδευτήρας Shaker Multi Microplate – Genie, Scientific Industries (NY, USA)
- Φυγόκεντρος SANYO HARRIER 18180 Refrigerated, MSE (UK)
- Μετρητής β-ακτινοβολίας - Liquid Scintillation Analyzer TRI- CARB 2100 TR Packard, PerkinElmer (USA)

Πειραματική διαδικασία

Η μέθοδος που επιλέχτηκε αποτελεί τροποποίηση αυτής των Heldin et al. (1987). Συγκεκριμένα, την πρώτη ημέρα γινόταν η επίστρωση των ινοβλαστών, στο αρχικό τους θρεπτικό υλικό (DMEM/ 15% FBS), σε πλάκα 48 θέσεων και επώασή τους για τρεις ημέρες σε κλίβανο με σταθερή θερμοκρασία 37°C, 95% υγρασία και 5% CO₂. Στη συνέχεια, γινόταν αντικατάσταση του θρεπτικού υλικού με φρέσκο, το οποίο είχε χαμηλή περιεκτικότητα σε ορό (DMEM/ 0,1% FBS), και επώασή τους για άλλες δύο ημέρες στον κλίβανο, για να συγχρονιστούν τα κύτταρα σε φάση ηρεμίας. Έπειτα, προσθέτονταν οι παράγοντες επίδρασης, διαλυμένοι σε DMEM/ 0,1% FBS, στις επιθυμητές προς εξέταση συγκεντρώσεις, μαζί με 0,2 $\mu\text{Ci/mL}$ ^3H -TdR, ειδικής

ενεργότητας 1 mCi/mL. Προσθέτονταν επίσης οι αρνητικοί και οι θετικοί μάρτυρες, όπου οι αρνητικοί μάρτυρες ήταν κύτταρα στο θρεπτικό υλικό τους, χωρίς την προσθήκη κάποιου παράγοντα, ενώ οι θετικοί μάρτυρες ήταν κύτταρα, στο θρεπτικό υλικό των οποίων είχε γίνει προσθήκη του παράγοντα PDGF. Μετά από τρεις ημέρες επώασης, απορριπτόταν το θρεπτικό υλικό, στο οποίο περιεχόταν όση ^3H -TdR δεν ενσωματώθηκε στα κύτταρα, και μετά από εκπλύσεις (δισ) με PBS, ακολουθούσε προσθήκη 10% (w/v) διαλύματος TCA, θερμοκρασίας 4°C, για μονιμοποίηση των κυττάρων. Τα κύτταρα επωάζονταν επί 15 min στον πάγκο εργασίας και στη συνέχεια εκπλένονταν πολύ καλά με H_2O , ώστε να απομακρυνθούν τα υπολείμματα του TCA, ο οποίος είναι ισχυρότατος παράγων σβέσεως (quencher) του υγρού σπινθηρισμού και μπορεί έτσι να προκαλέσει υποτίμηση των μετρήσεων. Αφού η πλάκα είχε στεγνώσει, ακολουθούσε λύση των κυττάρων με προσθήκη διαλύματος λύσης (lysis buffer- υδατικό διάλυμα 1% (w/v) SDS – 0,3 N NaOH) και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 h υπό ανάδευση σε ειδικό αναδευτήρα. Στη συνέχεια, το λύμα των κυττάρων μεταφερόταν σε ειδικό φιαλίδιο σπινθηρισμού (scintillation vial), όπου αναμιγνυόταν – υπό έντονη ανάδευση – με υγρό σπινθηρισμού (scintillation fluid), το οποίο έχει την ακόλουθη σύσταση:

PPO	5,5 g
POPOP	0,1 g
Τολουόλιο	633 mL
Triton X-100	330 mL

Ας σημειωθεί εδώ, ότι ο όγκος του υδατικού διαλύματος SDS/NaOH στον οποίο λύνονται τα κύτταρα, έπρεπε να είναι μικρότερος του 1/10 του όγκου του υγρού σπινθηρισμού, ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία γαλακτώματος, που αλλοιώνει τη μέτρηση. Τα φιαλίδια μετρούνταν στη συνέχεια σε μετρητή β-ακτινοβολίας.

3.2.4. Προσδιορισμός σύνθεσης κολλαγόνου με τη μέθοδο τριτιωμένης προλίνης

Αρχή της μεθόδου

Το κολλαγόνο είναι μια δομική πρωτεΐνη και το κύριο συστατικό της εξωκυττάριας μήτρας. Παράγεται από τους ινοβλάστες και μαζί με άλλες πρωτεΐνες, όπως η ελαστίνη, συμβάλλει στην ελαστικότητα του δέρματος, ενώ είναι απαραίτητο σε κάθε στάδιο της επούλωσης. Η προλίνη είναι ένα από τα απαραίτητα αμινοξέα για τη σύνθεση του κολλαγόνου και αποτελεί το 17% του συνόλου των αμινοξέων που το αποτελούν. Έτσι, ο ποσοτικός προσδιορισμός της σύνθεσης του κολλαγόνου μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη μέθοδο της τριτιωμένης προλίνης (L-[5- ^3H]Proline).

Μία ειδική δοκιμασία έχει αναπτυχθεί, στην οποία το ραδιενεργό κολλαγόνο μπορεί να μετρηθεί ποσοτικά, ακόμη και παρουσία μεγάλων ποσοτήτων άλλων πρωτεϊνών. Η μέθοδος βασίζεται στην προσθήκη της επισημασμένης με τρίτιο προλίνης στο

θρεπτικό υλικό των ηρεμούντων κυττάρων που έχουν δεχτεί το μιτογόνο ερέθισμα και την ακόλουθη επώαση επί συγκεκριμένο χρονικό διάστημα στους 37°C. Με αυτό τον τρόπο, η ραδιενεργός προλίνη ενσωματώνεται στις νεοσυντιθέμενες έλικες του κολλαγόνου. Ακολουθεί καταβύθιση των πρωτεϊνών του υπερκειμένου με TCA και, έπειτα, επαναδιάλυση του ιζήματος (μακρομόρια) σε ουδέτερο διάλυμα. Στη συνέχεια, γίνεται χρήση βακτηριακής κολλαγονάσης η οποία διασπά εκλεκτικά το κολλαγόνο σε μικρότερα πεπτίδια. Εμπορικά διαθέσιμη κολλαγονάση βρέθηκε ωστόσο να περιέχει τουλάχιστον δύο πρωτεΐνες με ευρύτερη πρωτεολυτική δράση, μη ειδική για το κολλαγόνο. Η δραστηριότητα των μη ειδικών πρωτεασών μπορεί να κατασταλεί πλήρως με τη χρήση N-αιθυλμλεϊμίδιου. Στη συνέχεια, οι μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες επανακαταβυθίζονται με TCA/ταννικό οξύ και η ραδιενέργεια των πεπτιδίων που προέρχονται από το κολλαγόνο, τα οποία παραμένουν στο υπερκείμενο διάλυμα, μετράται με τη μέθοδο υγρού σπινθηρισμού (scintillation counting). Η τιμή της μέτρησης αντιπροσωπεύει επομένως τη σύνθεση του κολλαγόνου, που πραγματοποίησε η καλλιέργεια, κατά το χρονικό διάστημα που μεσολάβησε από την προσθήκη L-[5-³H]Proline έως τη στιγμή της συλλογής του υπερκειμένου (Peterkofsky & Diegelmann, 1971).

Υλικά και όργανα:

- Ανθρώπινοι δερματικοί ινοβλάστες AG01523c
- Θρεπτικό υλικό DMEM, όπως προαναφέρθηκε
- Εμβρυϊκός βόειος ορός (Fetal Bovine Serum, FBS), Gibco BRL (Paisley, UK)
- Τριχλωροοξικό οξύ (Trichloroacetic acid, TCA), Panreac (Barcelona, Spain)
- Ασκορβικό νάτριο (Sodium Ascorbate), Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
- β-Αμινοπροπιονιτρίλιο (β-amino propionitrile - βAPN), Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
- N-αιθυλμλεϊμίδιο (NEM - N-ethyl-maleimide),
- Κολλαγονάση (Collagenase), Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
- Triton X-100, Merck (Damstadt, Germany)
- Τολουόλιο, Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
- 2,5-Diphenyloxazole (PPO), Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
- 1,4-bis(5-Phenyloxazol-2-yl) benzene (POPOP), Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
- Ρυθμιστικό διάλυμα Hepes 1 M, Biochrom AG (Berlin, Germany)
- Αλβουμίνη βόειου ορού (Bovine Serum Albumin, BSA), Genaxis Biotechnology (Germany)
- Τριτωμένη προλίνη (L-[5-³H] Proline), Moraveck Biochemicals (California, USA)
- Μετασχηματίζων αυξητικός παράγοντας - β1 (Transforming Growth Factor - β1, TGF-β1), Pectotech (Rocky Hill, USA)

Πρόκειται για κυτταροκίνη, η οποία εμπλέκεται στη διαδικασία της ιστικής ίνωσης, μέσω της διέγερσης της παραγωγής του κολλαγόνου (Wynn TA, 2008). Για αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας, σε τελική συγκέντρωση 2,5 ng/mL, η οποία επιλέχθηκε βάσει προηγούμενης εμπειρίας του εργαστηρίου.

- Εμπορικά διαθέσιμο τετραπεπτίδιο *acetylSer-Asp-Lys-Pro-OH*, Bachem AG (Bubendorf, Switzerland)

Η τελική συγκέντρωση ήταν 10^{-9} M, η ίδια που ελέγχθηκε και στη δοκιμασία σύνθεσης του DNA.

- Τετραπεπτίδιο *acetylAla-Asp-Lys-Pro-OH*, που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο

Η τελική συγκέντρωση ήταν 10^{-9} M, η ίδια που ελέγχθηκε και στη δοκιμασία σύνθεσης του DNA, κατ' αναλογία με εκείνη του τετραπεπτιδίου AcSDKP.

- Πλάκες κυτταροκαλλιεργειών πολλαπλών θέσεων, Greiner (Hanover, Germany)
- Επώαστικός κλίβανος CO₂ Thermo Forma Series II (Ohio, USA)
- Εστία νηματικής ροής Safeflow 1.8, Bioair Instruments (Siziano, Italy)
- Αναδευτήρας Shaker Multi Microplate – Genie, Scientific Industries (NY, USA)
- Αναδευτήρας Shaker Titramax 1000, Heidolph (Germany)
- Αναδευτήρας Vortex Genie (Massachusetts, USA)
- Φυγόκεντρος SANYO HARRIER 18180 Refrigerated, MSE (UK)
- Μετρητής β-ακτινοβολίας - Liquid Scintillation Analyzer TRI- CARB 2100 TR Packard, PerkinElmer (USA)

Πειραματική διαδικασία

Η μέθοδος που επιλέχθηκε αποτελεί τροποποίηση αυτής των Peterkofsky B & Diegelmann R. (1971). Συγκεκριμένα, την πρώτη ημέρα γινόταν η επίστρωση των ινοβλαστών, στο αρχικό τους θρεπτικό υλικό (DMEM/ 15% FBS), σε πλάκα 48 θέσεων (15.000 κύτταρα ανά θέση) και επώασή τους για μια ημέρα σε κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37°C, 95% υγρασία και 5% CO₂. Στη συνέχεια, γινόταν αντικατάσταση του θρεπτικού υλικού με φρέσκο, το οποίο είχε χαμηλή περιεκτικότητα σε ορό (DMEM/ 0,1% FBS), και επώασή τους για άλλη μια ημέρα στον κλίβανο, για να συγχρονιστούν τα κύτταρα σε φάση ηρεμίας. Έπειτα, προσθέτονταν οι παράγοντες επίδρασης, διαλυμένοι σε DMEM/ 0,1% FBS, στις επιθυμητές προς εξέταση συγκεντρώσεις, μαζί με 5 μ Ci/mL L-[5-³H] Proline, ειδικής ενεργότητας 5 mCi/mL, 50 μ g/mL ασκορβικό νάτριο καθώς και 50 μ g/mL βAPN. Το ασκορβικό οξύ, συμμετέχει ως συνένζυμο για τη δράση των υδροξυλασών, κατά τη διαδικασία υδροξυλίωσης των αμινοξέων προλίνης, στα αρχικά στάδια της σύνθεσης του κολλαγόνου (Boyer et al., 1998), ενώ το β-αμινοπροπιονιτρίλιο είναι παράγοντας διατήρησης του κολλαγόνου σε διαλυτή μορφή (αναστολέας σχηματισμού σταυροσυνδέσμων μεταξύ των σχηματιζόμενων ελίκων του κολλαγόνου) (Senturk et al., 2004). Επίσης προσθέτονταν οι αρνητικοί και οι θετικοί μάρτυρες, όπου οι αρνητικοί μάρτυρες ήταν κύτταρα στο θρεπτικό υλικό τους, χωρίς την προσθήκη κάποιου παράγοντα, ενώ οι θετικοί μάρτυρες ήταν κύτταρα, στο θρεπτικό υλικό των οποίων είχε γίνει προσθήκη του παράγοντα TGF- β 1. Μετά από τρεις ημέρες επώασης, από κάθε φρεάτιο συλλεγόταν το υπερκείμενο σε φιαλίδια τύπου

eppendorf και ακολουθούσε έκπλυση με Tris-HCl 50 mM pH 7,2 / NaCl 110 mM, 1 : 1, v/v, το υγρό της οποίας προστίθετο στα φιαλίδια. Ακολουθούσε προσθήκη διαλύματος BSA (τελικής συγκέντρωσης 0,75 mg/mL) και στο τέλος TCA 100% (ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση 10%) για την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών του υπερκειμένου. Τα μείγματα που προέκυπταν από όλα τα φρεάτια συνολικά, μετά από έντονη ανάδευση στον αναδευτήρα Vortex επωάζονταν σε πάγο για περίπου 1 h. Στη συνέχεια γινόταν φυγοκέντρηση στα 10.000 rpm, στους 4°C για 10 min και μετά απόρριψη του υπερκειμένου. Έπειτα, το στερεό υπόλειμμα εκπλενόταν με TCA 5% και μετά από έντονη ανάδευση, επωαζόταν για 30 min στον πάγο. Τη διαδικασία αυτή διαδεχόταν μια ακόμη φυγοκέντρηση, ως ανωτέρω, και απόρριψη του υπερκειμένου.

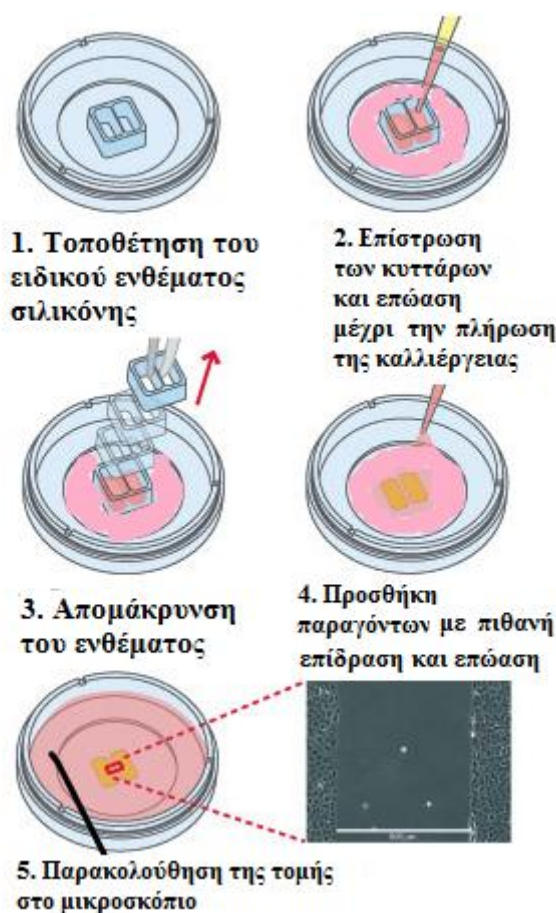
Ακολουθούσε προσθήκη NaOH 0,2 N και έντονη ανάδευση, οπότε γινόταν επαναδιάλυση του ιζήματος. Στη συνέχεια, γινόταν προσθήκη HCl 0,3 N, Hepes 1 M και NEM 25 mM (τελική συγκέντρωση 2,5 mM), για αναστολή πρωτεασών, και ειδικά της κλοστριπαΐνης, μίας πρωτεάσης που ενίοτε επιμολύνει ακόμη και την «καθαρή» από προσμείξεις πρωτεασών, κολλαγονάση. Μετά από έντονη ανάδευση, το μείγμα από κάθε φιαλίδιο τύπου eppendorf μοιραζόταν σε δύο επιμέρους φιαλίδια, το ένα εκ των οποίων περιείχε κολλαγονάση 1 U/μL (τελικής περιεκτικότητας περίπου 0,05 U/μL), ενώ το άλλο περιείχε διάλυμα χωρίς το ένζυμο (Tris-HCl 50 mM pH 7,2 / CaCl₂ 10 mM). Τα μείγματα, μετά από έντονη ανάδευση στον αναδευτήρα Vortex, επωάζονταν αρχικά για 2 h στους 37°C και στη συνέχεια για περίπου 18 h (overnight) στους 25°C.

Την επόμενη μέρα, γινόταν μεταφορά των δειγμάτων στους 4°C, για να σταματήσει η δράση της κολλαγονάσης. Ακολουθούσε καταβύθιση των πρωτεϊνών με TCA 10% / ταννικό οξύ 0,5% και, μετά από ισχυρή ανάδευση, παραμονή στους 4°C για τουλάχιστον 30 min, καθώς σε χαμηλή θερμοκρασία γίνεται αποτελεσματικότερη η καταβύθιση. Έπειτα, γινόταν φυγοκέντρηση, όπως προαναφέρθηκε, και το υπερκείμενο μεταφερόταν σε ειδικά φιαλίδια σπινθηρισμού (scintillation vials), όπου αναμειγνυόταν – υπό έντονη ανάδευση – με υγρό σπινθηρισμού (scintillation fluid), η σύσταση του οποίου περιγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα (προσδιορισμός σύνθεσης DNA με τη μέθοδο τριτιωμένης θυμιδίνης, 3.2.3.). Ακολουθούσε μέτρηση της ραδιενέργειας των φιαλιδίων σε μετρητή β-ακτινοβολίας. Οι «καθαρές» κρούσεις ανά λεπτό (counts per min, cpm) προέκυπταν μετά την αφαίρεση των τιμών των δειγμάτων χωρίς κολλαγονάση από τις τιμές των δειγμάτων με κολλαγονάση.

3.2.5. Δοκιμασία κυτταρικής μετανάστευσης με σχηματισμό τομής (scratch assay)

Αρχή της μεθόδου

Η δοκιμασία αυτή είναι μια εύκολη και οικονομική λύση για την *in vitro* μελέτη της μετανάστευσης των κυττάρων, ενώ αποτελεί αρκετά αξιόπιστη προσομοίωση της δοκιμασίας μετανάστευσης *in vivo*. Βασίζεται στο γεγονός ότι κατά τη δημιουργία μιας τεχνητής κενής λωρίδας, που ονομάζεται «τομή», μέσα σε μια μονοστιβαδική καλλιέργεια κυττάρων, τα κύτταρα που βρίσκονται στην άκρη της, τείνουν να μετακινούνται εντός της, έως ότου σχηματιστούν εκ νέου οι διακυτταρικές επαφές και κλείσει πλήρως η τομή (Liang et al., 2007).



Εικόνα 3.10: Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής διαδικασίας αξιολόγησης της κυτταρικής μετανάστευσης με σχηματισμό τομής (scratch assay)

Η δοκιμασία (Εικόνα 3.10) περιλαμβάνει αρχικά τη δημιουργία τομής, με τη βοήθεια ενός εμπορικά διαθέσιμου αυτοκόλλητου ενθέματος σιλικόνης, σε μονοστιβαδική καλλιέργεια κυττάρων και επώαση έως ότου παρατηρηθεί κλείσιμο της τομής. Στη

συνέχεια τα κύτταρα μπορούν να χρωματιστούν με ειδική χρωστική και να ληφθούν ψηφιακές φωτογραφίες, από τις οποίες συγκρίνεται ποιοτικά η μετανάστευση των κυττάρων κάτω από την επίδραση διεγερτικών παραγόντων, έναντι των μαρτύρων (κύτταρα στα οποία δεν επιδρά κάποιος παράγοντας).

Υλικά και όργανα

- Ανθρώπινα αθανатоποιημένα κερατινοκύτταρα HaCaT.
- Θρεπτικό υλικό DMEM, όπως προαναφέρθηκε.
- Εμβρυϊκός βόειος ορός (Fetal Bovine Serum, FBS), Gibco BRL (Paisley, UK)
- Χρωστική Giemsa (Giemsa stain), Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
- Ουδέτερη φορμαλίνη (neutral formalin), Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
- Ισοτονικό ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών - χλωριούχων 10X, pH 7,2 (Phosphate Buffer Saline, PBS)

Na₂HPO₄ 14,4 g

NaCl 80 g

KH₂PO₄ 2,4 g

KCl 2 g

Τα παραπάνω συστατικά διαλύονται σε H₂O, ώστε να προκύψει τελικός όγκος 1 L.

- Εμπορικά διαθέσιμο τετραπεπτίδιο *acetyl*Ser-Asp-Lys-Pro-OH (AcSDKP), Bachem AG (Bubendorf, Switzerland)

Η τελική συγκέντρωση ήταν 10⁻⁹ M, η ίδια που ελέγχθηκε και στις δοκιμασίες σύνθεσης του DNA και κολλαγονοσύνθεσης.

- Τετραπεπτίδιο *acetyl*Ala-Asp-Lys-Pro-OH (AcADKP), που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο.

Η τελική συγκέντρωση ήταν 10⁻⁹ M, κατ' αντιστοιχία με εκείνη του τετραπεπτιδίου AcSDKP.

- Πλάκες κυτταροκαλλιεργειών πολλαπλών θέσεων, Greiner (Hanover, Germany)
- Ενθέματα σιλικόνης (Culture Insert 2-well), Ibidi, (Germany)
- Επωαστικός κλίβανος CO₂ Thermo Forma Series II (Ohio, USA)
- Εστία νηματικής ροής Safeflow 1.8, Bioair Instruments (Siziano, Italy)
- Αναδευτήρας Shaker Titramax 1000, Heidolph (Germany)
- Ψηφιακή φωτογραφική μηχανή Canon PowerShot A640
- Ανάστροφο μικροσκόπιο Wild MPS 52, Leitz (Heerbrugg, Switzerland)

Πειραματική διαδικασία

Σε πλάκα 24 θέσεων, τοποθετούνταν τα ενθέματα σιλικόνης (inserts) και γινόταν η επίστρωση των κυττάρων, σε θρεπτικό μέσο με 10% FBS. Στη συνέχεια επωάζονταν σε κλίβανο με σταθερή θερμοκρασία 37°C, 95% υγρασία και 5% CO₂, μέχρι πλήρωσης της καλλιέργειας (confluent). Ο στόχος ήταν να γεμίσει παντού το τρυβλίο, εκτός από τα σημεία που είχαν προσκολληθεί τα ενθέματα. Στη συνέχεια, η πλήρης καλλιέργεια υποβαλλόταν σε στέρηση FBS για 48 h. Κατόπιν απομακρύνονταν προσεκτικά τα ενθέματα, ώστε να μην συμπαρασυρθούν και τα κύτταρα, γίνονταν τρεις εκπλύσεις με υλικό χωρίς FBS και προσθέτονταν οι παράγοντες επίδρασης, διαλυμένοι σε θρεπτικό υλικό με 0,1% FBS, στις επιθυμητές προς εξέταση συγκεντρώσεις. Ο μάρτυρας (control) ήταν κύτταρα σε θρεπτικό υλικό με 0,1% FBS. Τα κύτταρα επωάζονταν για όσο διάστημα χρειαζόταν έως ότου να παρατηρηθεί κλείσιμο της τομής κατά 50% περίπου στους μάρτυρες (συνήθως 24 h) και ακολουθούσε μονιμοποίηση των κυττάρων με διάλυμα 4% ουδέτερης φορμαλίνης. Τα κύτταρα επωάζονταν για 15 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ακολουθούσε προσεκτική έκπλυση (δισ) με PBS. Στη συνέχεια, γινόταν χρώση με χρωστική Giemsa και επώαση για άλλα 30-60 min. Ακολουθούσαν τρεις εκπλύσεις με απιονισμένο νερό και στέγνωμα των τρυβλίων πάνω σε χαρτί. Ακολουθούσε παρατήρηση στο μικροσκόπιο μέσω του φακού 4x, φωτογράφιση και αποθήκευση των φωτογραφιών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση πεπτιδίων

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, έγινε συνθετική παρασκευή δύο τετραπεπτιδίων, των AcASKP και AcADKP, τα οποία αποτελούν αμινοτελικά πεπτίδια της Tβ4 και της Tβ10, αντίστοιχα, με στόχο τη βιολογική αξιολόγησή τους σε *in vitro* συστήματα κυττάρων που συμμετέχουν στη διαδικασία της επούλωσης δερματικών πληγών. Το τετραπεπτίδιο AcSDKP, που ανιχνεύεται ως αυθύπαρκτο μόριο σε ιστούς και υγρά του σώματος και προέρχεται από πρωτεόλυση της Tβ4, έχει συσχετισθεί στη βιβλιογραφία με την επούλωση ιστών, κυρίως του καρδιακού και άλλων ιστών, ενώ πολύ λιγότερες είναι οι πληροφορίες σχετικά με τη δράση του στην επούλωση του δέρματος. Σε αντίθεση με τη Tβ4 και το πεπτίδιο AcSDKP, πολύ λιγότερα στοιχεία είναι γνωστά στη βιβλιογραφία σε σχέση με τη δράση της Tβ10 και του αμινοτελικού της τετραπεπτιδίου AcADKP (που δεν έχει ανιχνευθεί ως αυθύπαρκτο μόριο στους ιστούς ή τα σωματικά υγρά) στο φαινόμενο της επούλωσης πληγών. Παρακάτω παρατίθεται η αμινοξική αλληλουχία της Tβ4 και της Tβ10, ενώ παράλληλα επισημαίνονται και τα αντίστοιχα τετραπεπτίδια.

Tβ4: AcS¹DKP DMAEIEKFDKSK LKKTET QEKNPLPSKETIEQEKQAGES⁴³

Tβ10: AcA¹DKP DMGEIASFDKAK LKKTET QEKNPLPTKETIEQEKRSSEIS⁴³

Εικόνα 4.1: Πρωτοταγής δομή της Tβ4 και της Tβ10 (τα αμινοξέα παρουσιάζονται με το συμβολισμό ενός γράμματος). Τα αμινοτελικά τετραπεπτίδια των Tβ4 και Tβ10, που παρασκευάστηκαν συνθετικά, είναι σημειωμένα με κόκκινο και γαλάζιο χρώμα, αντίστοιχα.

Η εργαστηριακή σύνθεση των τετραπεπτιδίων AcSDKP και AcADKP έγινε με την τεχνική της Fmoc - πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεά φάση, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Η ρητίνη που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση των πεπτιδίων ήταν η 2-Chloro-tritylo-chloride Resin. Μετά την αποκοπή τους από τη ρητίνη, τα πεπτίδια παραλήφθηκαν με ακετυλωμένη την τελική αμινομάδα τους και με ελεύθερη την τελική καρβοξυλομάδα τους.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι τα τετραπεπτίδια διαφέρουν ως προς το πρώτο αμινοξύ στο αμινοτελικό άκρο τους, καθώς και το γεγονός ότι η πεπτιδική σύνθεση σε στερεά φάση ξεκινάει από το καρβοξύ-τελικό άκρο, η σύνθεση αυτών των δύο πεπτιδίων ξεκίνησε στην ίδια ποσότητα ρητίνης. Μόλις ολοκληρώθηκε η προσθήκη του 3^{ου} αμινοξέος, η ρητίνη χωρίστηκε σε δύο μέρη και η σύνθεση συνεχίστηκε με προσθήκη σερίνης [ως Fmoc-Ser(tBu)-OH] στο ένα μέρος και αλανίνης [ως Fmoc-Ala-OH] στο δεύτερο.

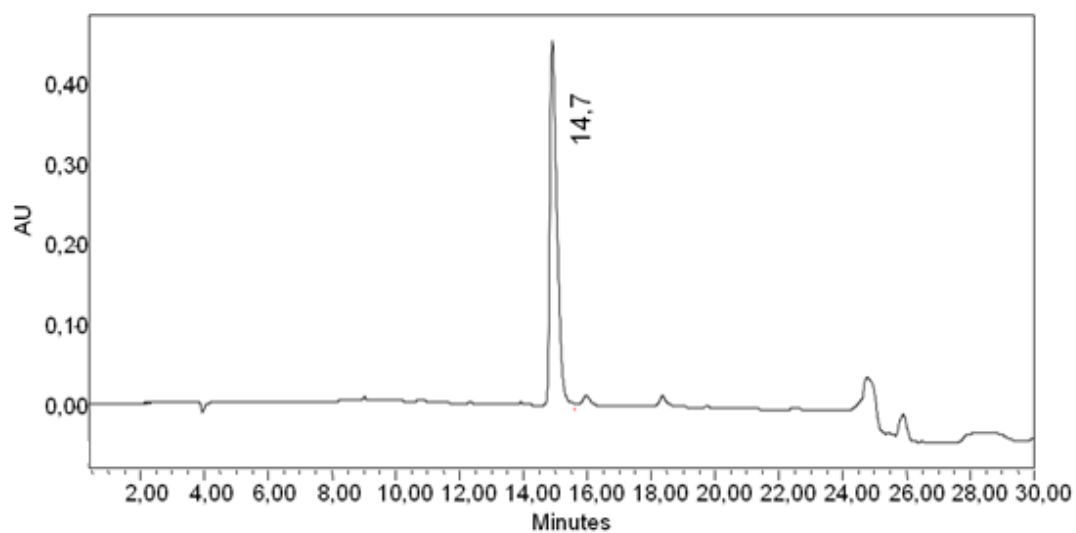
Μετά την προσθήκη και την αποπροστασία του τελευταίου αμινοξέος από κάθε πεπτίδιο, έγινε ακετυλίωση της α-αμινομάδας και ακολούθησε το στάδιο της

αποκοπής του πεπτιδίου από τη ρητίνη. Κατά το στάδιο αυτό γίνεται ταυτόχρονα απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων του κάθε πεπτιδίου. Το μείγμα αποκοπής ήταν και για τα δύο πεπτίδια TFA/ H₂O/ TIS, 95 : 2,5 : 2,5, v/v. Η επιλογή του μείγματος αποκοπής έγινε βάσει στοιχείων της βιβλιογραφίας αλλά και προηγούμενης εμπειρίας του εργαστηρίου.

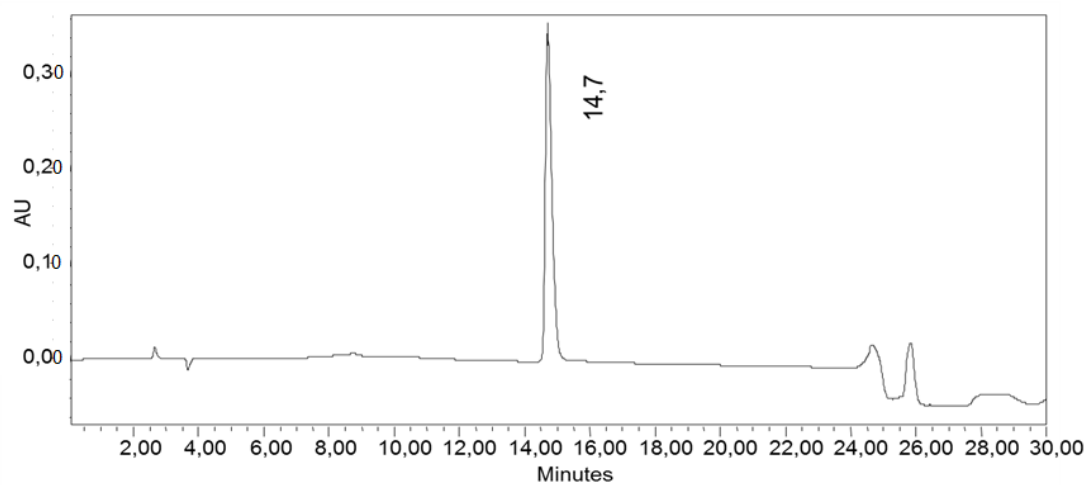
Στη συνέχεια, τα τετραπεπτίδια καθαρίστηκαν με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC, υπό τις συνθήκες που παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1 του κεφαλαίου Υλικά και Μέθοδοι. Τα κλάσματα, που συλλέχθηκαν κατά τον καθαρισμό των πεπτιδίων και αντιστοιχούσαν στην κύρια κορυφή του χρωματογραφήματος, συγκεντρώθηκαν και λυοφιλοποιήθηκαν.

Τέλος, η καθαρότητα των πεπτιδίων ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC, υπό τις συνθήκες που παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1 του κεφαλαίου Υλικά και Μέθοδοι. Το καθαρό συνθετικό τετραπεπτίδιο AcSDKP ελέγχθηκε και σε σύγκριση με το αντίστοιχο, εμπορικά διαθέσιμο συνθετικό προϊόν, που χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο. Στις Εικόνες 4.2 – 4.5 παρατίθενται χρωματογραφήματα αναλυτικής RP-HPLC για τα τετραπεπτίδια AcSDKP και AcADKP.

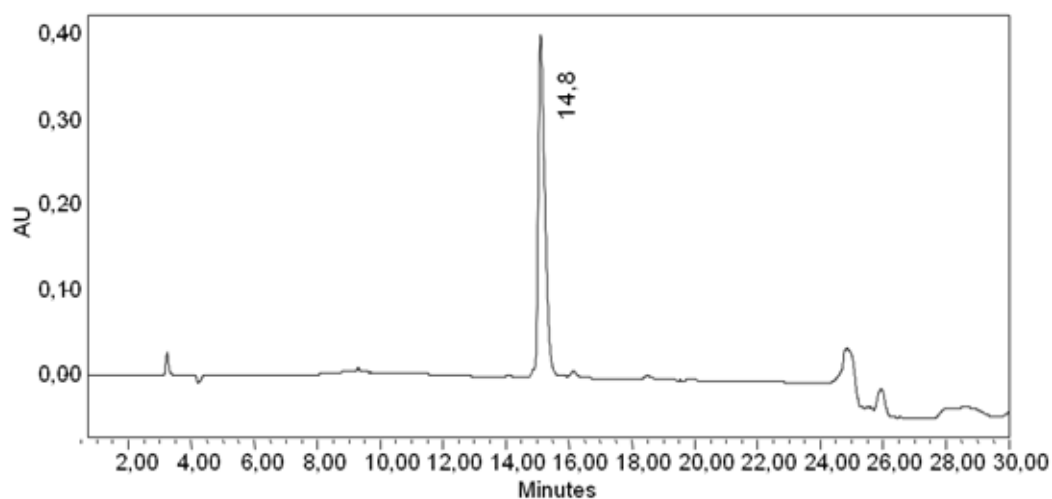
Δείγματα από τα καθαρά πεπτίδια AcSDKP και AcADKP εστάλησαν στο Πανεπιστήμιο Tübingen, Γερμανία, για ταυτοποίηση μέσω προσδιορισμού της μοριακής μάζας με φασματομετρία μαζών μέσω ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI-MS). Στις Εικόνες 4.6 και 4.7 φαίνονται τα αντίστοιχα φάσματα ESI-MS.



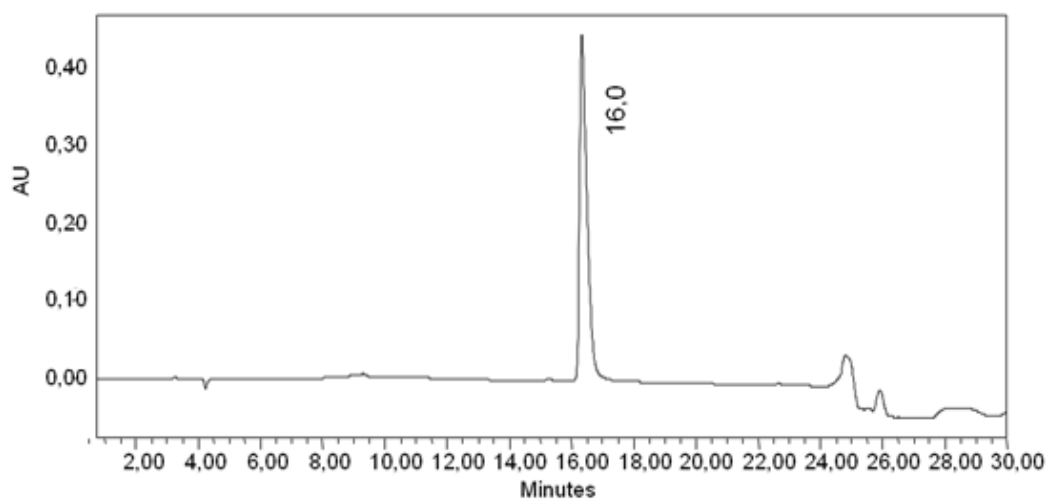
Εικόνα 4.2: Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του τετραπεπτιδίου AcSDKP που παρασκευάστηκε συνθετικά στο εργαστήριο, μετά τον καθαρισμό του



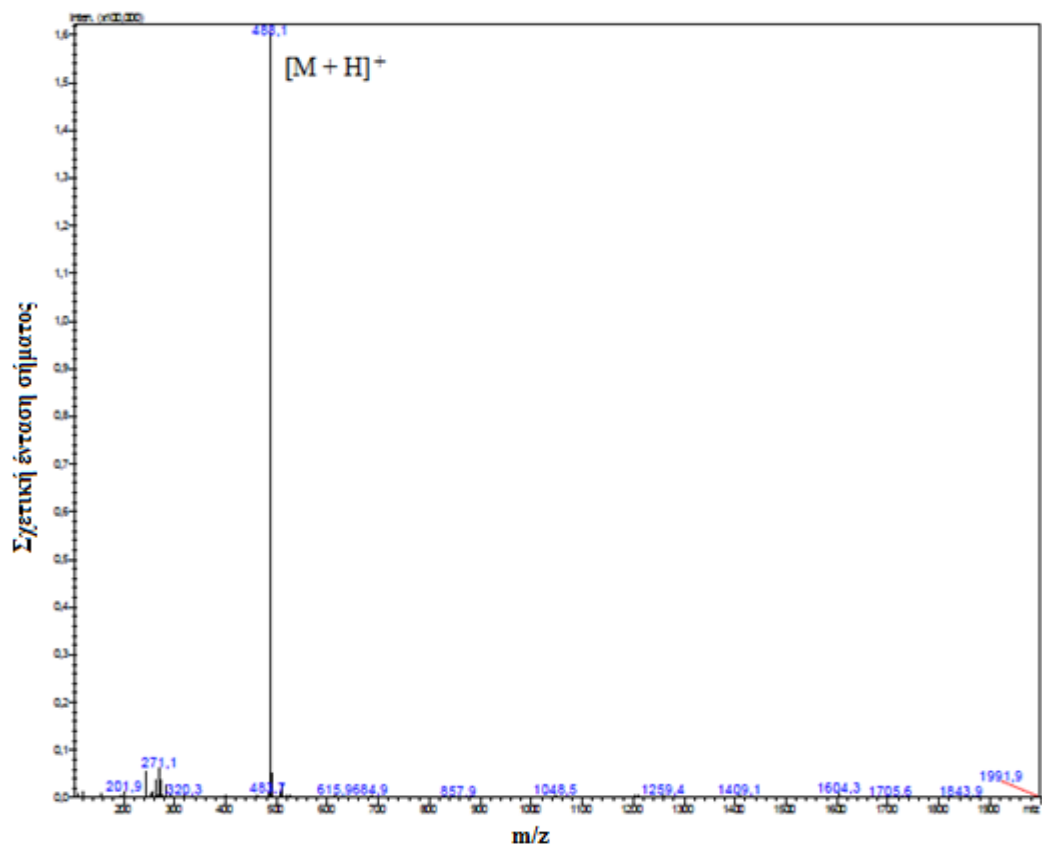
Εικόνα 4.3: Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του εμπορικά διαθέσιμου τετραπεπτιδίου AcSDKP (εσωτερικό πρότυπο)



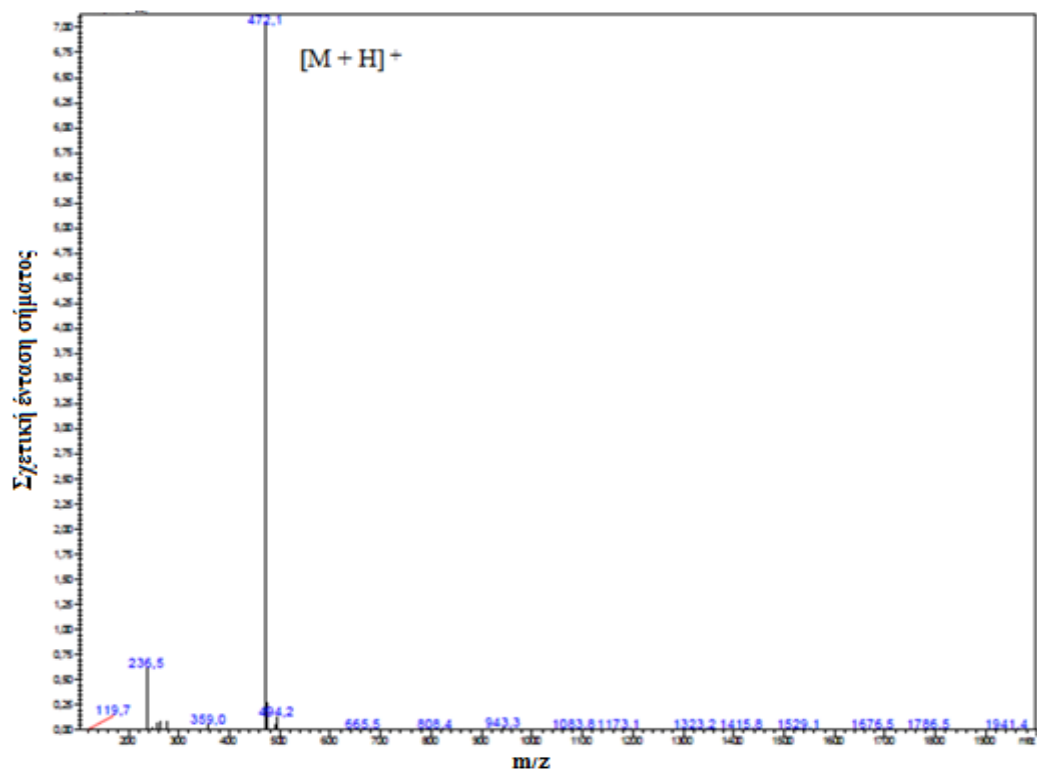
Εικόνα 4.4: Συγχρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του AcSDKP που παρασκευάστηκε συνθετικά στο εργαστήριο και του εμπορικά διαθέσιμου AcSDKP (εσωτερικό πρότυπο). Οι δύο μορφές AcSDKP συνεκλύονται από τη στήλη.



Εικόνα 4.5: Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του τετραπεπτιδίου AcADKP που παρασκευάστηκε συνθετικά στο εργαστήριο, μετά τον καθαρισμό του



Εικόνα 4.6: Φάσμα ESI-MS του τετραπεπτιδίου AcSDKP, που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο



Εικόνα 4.7: Φάσμα ESI-MS του τετραπεπτιδίου AcADKP, που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο

Οι τιμές μοριακής μάζας, που προέκυψαν βάσει των πειραματικών αποτελεσμάτων των φασμάτων ESI-MS, και οι θεωρητικές τιμές που προκύπτουν από την πρωτοταγή δομή των πεπτιδίων, δεν παρουσιάζουν αποκλίσεις (Πίνακας 4.1), γεγονός που επιβεβαιώνει τη δομή των τετραπεπτιδίων.

Πίνακας 4.1: Πειραματικά προσδιορισμένη και θεωρητικά αναμενόμενη μοριακή μάζα των συνθετικών πεπτιδίων

Πεπτίδιο	Πειραματικά προσδιορισμένη μοριακή μάζα	Θεωρητικά αναμενόμενη μοριακή μάζα
AcSDKP	488,10	487,47
AcADKP	472,10	471,47

Συνοψίζοντας, έλαβε χώρα η συνθετική παρασκευή δύο τετραπεπτιδίων, των AcSDKP και AcADKP. Τα πεπτίδια καθαρίστηκαν με ημι-παρασκευαστική RP-HPLC, η καθαρότητά τους ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC και ταυτοποιήθηκαν με ESI-MS. Συνολικά, παρελήφθησαν 10-12 mg καθαρού προϊόντος για κάθε πεπτίδιο (απόδοση ~30%).

4.2. Έλεγχος της βιολογικής δράσης των πεπτιδίων

Μετά τη σύνθεση, τον καθαρισμό και την ταυτοποίηση των δύο τετραπεπτιδίων, AcSDKP και AcADKP, ακολούθησε ο έλεγχος της βιολογικής τους δράσης *in vitro*. Χρησιμοποιήθηκαν δύο κυτταρικές σειρές, ανθρώπινοι δερματικοί ινοβλάστες AG01523c και ανθρώπινα αθανатоποιημένα κερατινοκύτταρα HaCaT. Πρόκειται για κύτταρα του χορίου και της επιδερμίδας αντίστοιχα, τα οποία συμμετέχουν φυσιολογικά σε διάφορα στάδια της επούλωσης μιας πληγής. Έτσι, σε συνδυασμό με τις κατάλληλες πειραματικές συνθήκες καλλιέργειας, παρέχουν ικανοποιητικώς αξιόπιστα μοντέλα προσομοίωσης της διαδικασίας δερματικής επούλωσης *in vitro*.

Η καλλιέργεια των κυττάρων έγινε όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Με συγκεκριμένες δοκιμασίες, που περιγράφονται στο ίδιο κεφάλαιο, ελέγχθηκε η πιθανή τοξική δράση των AcSDKP και AcADKP στα δύο είδη κυττάρων, η επίδρασή τους στη σύνθεση του DNA και στη κολλαγονοσύνθεση των ινοβλαστών, καθώς και η επίδρασή τους στη μετανάστευση των κερατινοκυττάρων.

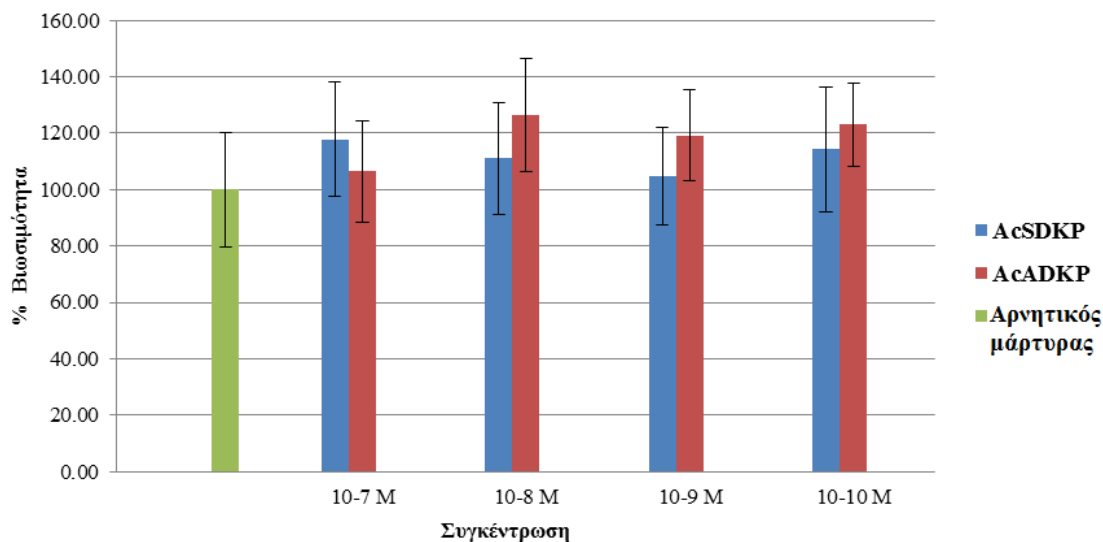
4.2.1. Έλεγχος κυτταρικής βιωσιμότητας με τη μέθοδο MTT

Αρχικά εκτιμήθηκε η κυτταροτοξική δράση των τετραπεπτιδίων AcSDKP και AcADKP με τη μέθοδο MTT, όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Χρησιμοποιήθηκαν τόσο κερατινοκύτταρα, όσο και ινοβλάστες αφού και τα δύο είδη κυττάρων εντοπίζονται στο δέρμα και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της επούλωσης.

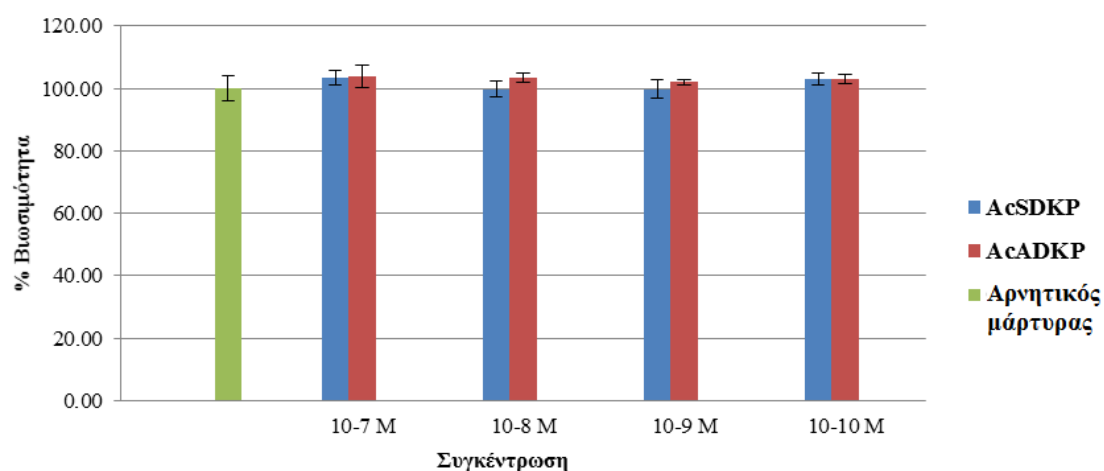
Ως αρνητικοί μάρτυρες (Control) χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα τα οποία είχαν καλλιεργηθεί στο θρεπτικό τους υλικό, χωρίς την επίδραση κάποιου παράγοντα, ενώ οι συγκεντρώσεις των πεπτιδίων που δοκιμάστηκαν ήταν από 10^{-10} έως 10^{-7} M και επιλέχθηκαν βάσει διαθέσιμης βιβλιογραφίας. Σε ορισμένες περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν, ως θετικοί μάρτυρες, κύτταρα που είχαν επωασθεί με το γνωστό κυτταροτοξικό παράγοντα δοξορουβικίνη, σε τελική συγκέντρωση 0,175 $\mu\text{g/mL}$, η οποία επιλέχθηκε με βάση τη βιβλιογραφία, αλλά και προηγούμενη εμπειρία του εργαστηρίου.

Στις Εικόνες 4.8 – 4.11 παρατίθενται τα διαγράμματα που προκύπτουν από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων τεσσάρων πειραμάτων με κερατινοκύτταρα που επώασθηκαν με AcSDKP ή AcADKP, σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν το εμπορικά διαθέσιμο συνθετικό πεπτίδιο AcSDKP καθώς και το συνθετικό πεπτίδιο AcADKP που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο. Κανένα από τα δύο πεπτίδια δεν φαίνεται να παρουσιάζει τοξική δράση για τα κερατινοκύτταρα, στις συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν. Γενικά, δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στη βιωσιμότητα των κυττάρων που επώασθηκαν με τα δύο πεπτίδια, σε σχέση με τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν χωρίς κάποιον παράγοντα (μάρτυρες). Αν και σε κάποια μεμονωμένα πειράματα (Εικόνες 4.10 και 4.11) κάποιες συγκεντρώσεις οδηγούν σε μία μικρή, στατιστικά σημαντική μείωση της βιωσιμότητας, τα αποτελέσματα αυτά

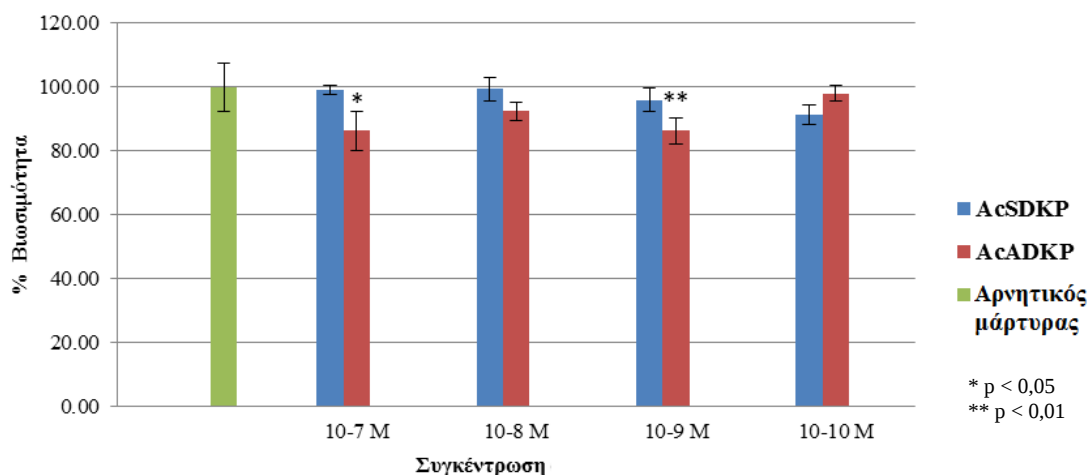
δεν επαναλαμβάνονται συστηματικά (π.χ. στην Εικόνα 4.8 παρατηρείται τάση για αύξηση της βιωσιμότητας και στην Εικόνα 4.9 καμία μεταβολή, αποτελέσματα που υποστηρίζονται και από την Εικόνα 4.12, κατωτέρω), ούτε δείχνουν δόσοεξάρτηση.



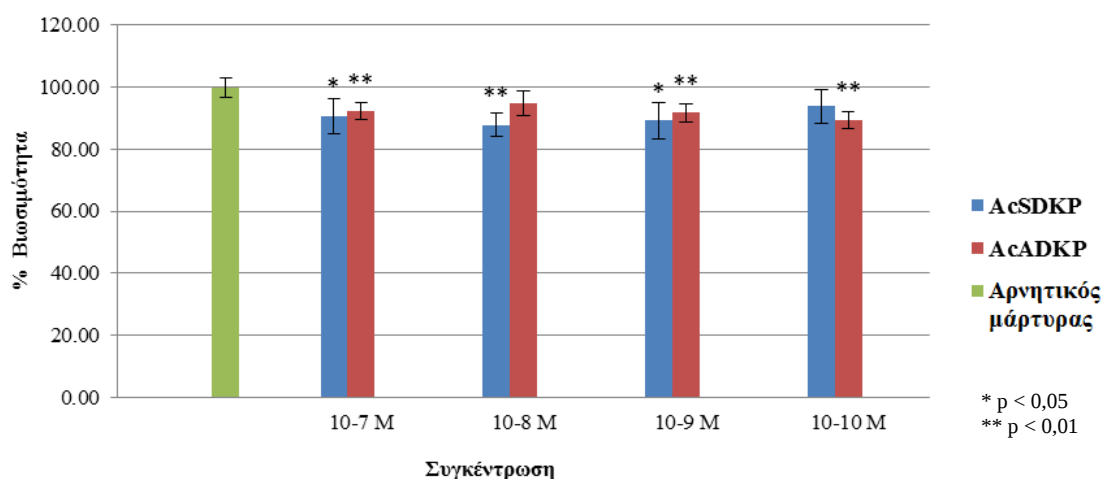
Εικόνα 4.8: Διάγραμμα βιωσιμότητας των κερατινοκυττάρων (HaCaT) παρουσία των τετραπεπτιδίων AcSDKP ή AcADKP, σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (κύτταρα σε θρεπτικό υλικό, χωρίς άλλο παράγοντα) - 1^ο πείραμα



Εικόνα 4.9: Διάγραμμα βιωσιμότητας των κερατινοκυττάρων (HaCaT) παρουσία των τετραπεπτιδίων AcSDKP ή AcADKP, σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (κύτταρα σε θρεπτικό υλικό, χωρίς άλλο παράγοντα) - 2^ο πείραμα



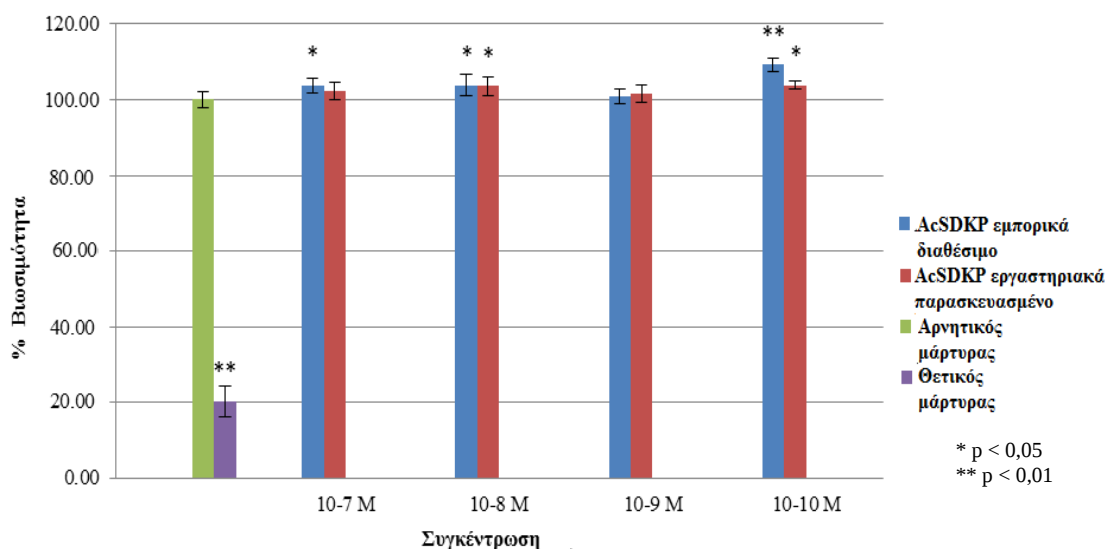
Εικόνα 4.10: Διάγραμμα βιωσιμότητας των κερατινοκυττάρων (HaCaT) παρουσία των τετραπεπτιδίων AcSDKP ή AcADKP, σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (κύτταρα σε θρεπτικό υλικό, χωρίς άλλο παράγοντα) - 3^ο πείραμα



Εικόνα 4.11: Διάγραμμα βιωσιμότητας των κερατινοκυττάρων (HaCaT) παρουσία των τετραπεπτιδίων AcSDKP ή AcADKP, σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (κύτταρα σε θρεπτικό υλικό, χωρίς άλλο παράγοντα) - 4^ο πείραμα

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ένα συγκριτικό πείραμα, κατά το οποίο ελέγχθηκε η κυτταροτοξικότητα του πεπτιδίου AcSDKP που παρασκευάστηκε συνθετικά στο εργαστήριο, έναντι του αντίστοιχου, εμπορικά διαθέσιμου πεπτιδίου, στα κερατινοκύτταρα. Τα δύο τετραπεπτιδία χρησιμοποιήθηκαν στις συγκεντρώσεις 10^{-10} έως 10^{-7} M, όπως και στα προηγούμενα πειράματα. Αρνητικοί μάρτυρες ήταν κερατινοκύτταρα τα οποία είχαν καλλιεργηθεί στο θρεπτικό τους υλικό, χωρίς την επίδραση κάποιου παράγοντα. Θετικοί μάρτυρες ήταν κύτταρα τα οποία είχαν επωαστεί με δοξορουβικίνη (175 $\mu\text{g/mL}$).

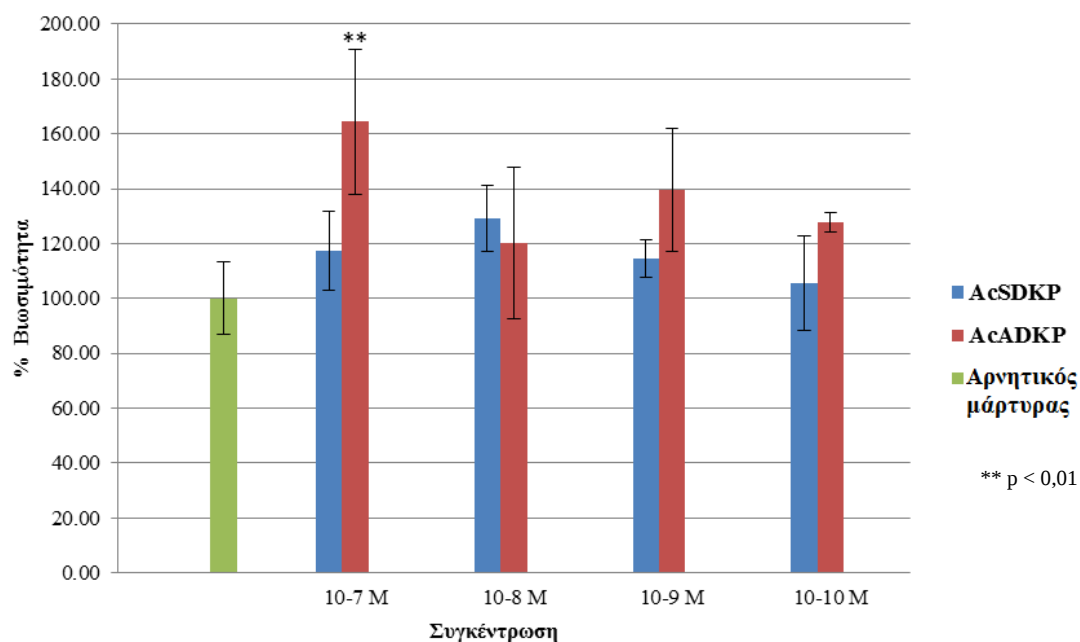
Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.12, το πεπτίδιο AcSDKP που παρασκευάστηκε συνθετικά στο εργαστήριο, όπως και το εμπορικά διαθέσιμο αντίστοιχο πεπτίδιο, δεν φαίνεται να έχει κυτταροτοξική δράση, σε σχέση με τους μάρτυρες. Ακόμη, δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο μορφών του τετραπεπτιδίου AcSDKP, ως προς την επίδραση στη βιωσιμότητα των κερατινοκυττάρων.



Εικόνα 4.12: Διάγραμμα βιωσιμότητας των κερατινοκυττάρων (HaCaT) παρουσία του τετραπεπτιδίου AcSDKP που παρασκευάστηκε συνθετικά στο εργαστήριο ή του αντίστοιχου, εμπορικά διαθέσιμου AcASKP. Οι δύο πρώτες στήλες αντιστοιχούν στον αρνητικό μάρτυρα (κύτταρα σε θρεπτικό υλικό, χωρίς προσθήκη άλλου παράγοντα) και το θετικό μάρτυρα (κύτταρα σε θρεπτικό υλικό με προσθήκη δοξορουβικίνης).

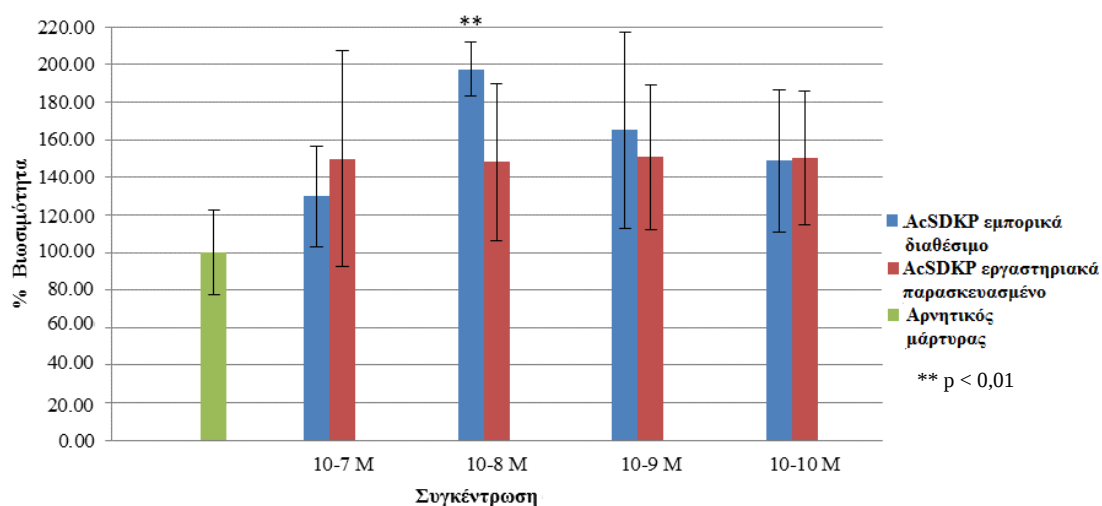
Πέραν των κερατινοκυττάρων, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ελέγχου της κυτταροτοξικότητας για τους ινοβλάστες, τόσο για το εμπορικά διαθέσιμο πεπτίδιο AcSDKP όσο και για τα πεπτίδια AcSDKP και AcADKP που παρασκευάστηκαν συνθετικά στο εργαστήριο. Οι συγκεντρώσεις των πεπτιδίων που δοκιμάστηκαν ήταν από 10^{-10} έως 10^{-7} M, κατ' αντιστοιχία με τα πειράματα σε κερατινοκύτταρα. Ως αρνητικοί μάρτυρες (Control) χρησιμοποιήθηκαν ινοβλάστες οι οποίοι είχαν καλλιεργηθεί στο θρεπτικό τους υλικό, χωρίς την επίδραση κάποιου παράγοντα.

Όπως φαίνεται στις Εικόνες 4.13 και 4.14 τα δύο τετραπεπτίδια AcSDKP και AcADKP δεν φαίνεται να παρουσιάζουν τοξική δράση για τους ινοβλάστες, στις ελεγχθείσες συγκεντρώσεις. Γενικά, δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές στη βιωσιμότητα των κυττάρων που επωάστηκαν με τα δύο πεπτίδια, σε σχέση με τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν χωρίς κάποιον παράγοντα (αρνητικοί μάρτυρες). Τα πειράματα επί των καλλιεργειών ινοβλαστών παρουσιάζουν μεγαλύτερες τυπικές αποκλίσεις σε σχέση με αυτά επί των κερατινοκυττάρων. Κάποια μεμονωμένα αποτελέσματα όπου εμφανίζεται στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς το μάρτυρα (π.χ. στη συγκέντρωση 10^{-7} M στην Εικόνα 4.13 ή στη συγκέντρωση 10^{-8} M στην Εικόνα 4.14) δεν επαναλαμβάνονται πάντοτε και θεωρούνται τυχαία.



Εικόνα 4.13: Διάγραμμα βιωσιμότητας των δερματικών ινοβλαστών (AG01523c) παρουσία των τετραπεπτιδίων AcSDKP ή AcADKP, σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (κύτταρα σε θρεπτικό υλικό, χωρίς άλλο παράγοντα)

Τέλος, όπως προκύπτει από την Εικόνα 4.14, το συνθετικό πεπτίδιο AcSDKP που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο δεν φαίνεται να διαφέρει σημαντικά από το αντίστοιχο, εμπορικά διαθέσιμο πεπτίδιο, ως προς την επίδραση στη βιωσιμότητα των ινοβλαστών.



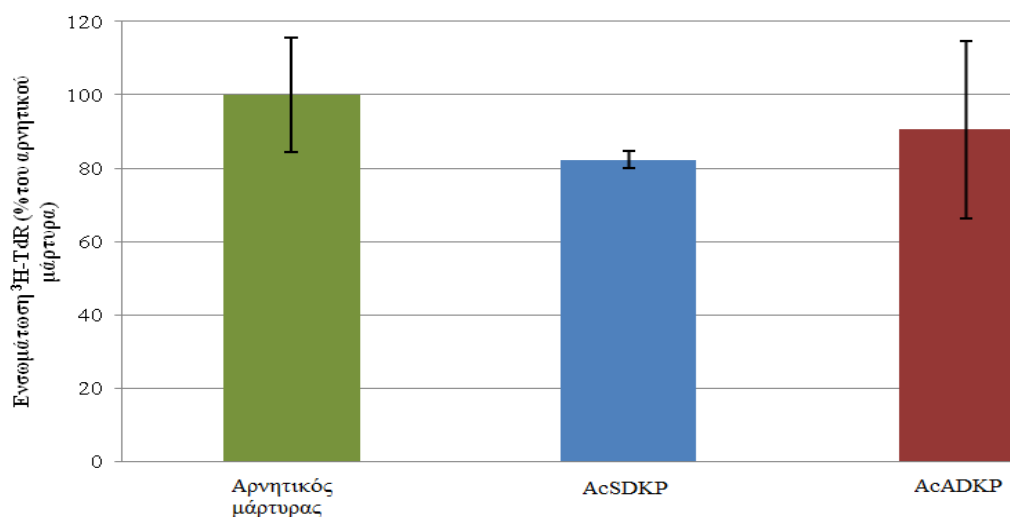
Εικόνα 4.14: Διάγραμμα βιωσιμότητας των δερματικών ινοβλαστών (AG01523c) παρουσία του τετραπεπτιδίου AcSDKP που παρασκευάστηκε συνθετικά στο εργαστήριο ή του αντίστοιχου, εμπορικά διαθέσιμου AcSDKP. Η πρώτη στήλη αντιστοιχεί στον αρνητικό μάρτυρα (κύτταρα σε θρεπτικό υλικό, χωρίς άλλο παράγοντα)

4.2.2. Ποσοτικός προσδιορισμός σύνθεσης DNA με τη μέθοδο τριτιωμένης θυμιδίνης

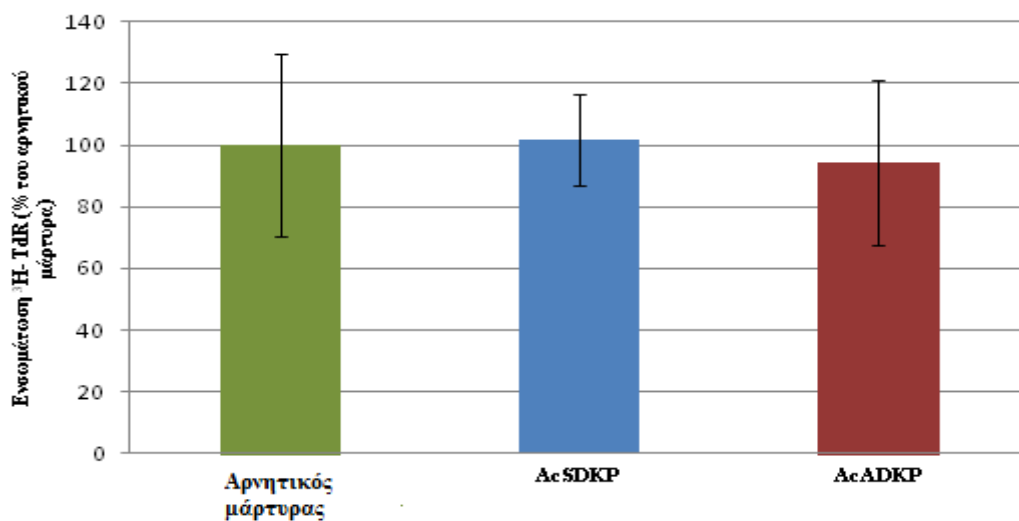
Μετά την εκτίμηση της επίδρασης των πεπτιδίων AcSDKP και AcADKP στη βιωσιμότητα των κερατινοκυττάρων και των ινοβλαστών με τη μέθοδο MTT και αφού διαπιστώθηκε ότι κανένα από τα δύο τετραπεπτίδια δεν έχει κυτταροτοξική δράση, ακολούθησε ποσοτική εκτίμηση της δράσης τους στον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών. Η εκτίμηση αυτή πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της ενσωμάτωσης τριτιωμένης θυμιδίνης (^3H -TdR), η οποία εκτιμά με μεγάλη ευαισθησία το ποσοστό των κυττάρων της καλλιέργειας που διέρχονται από τη φάση S του κυτταρικού κύκλου εντός δεδομένου χρονικού διαστήματος. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε περιγράφεται στην αντίστοιχη παράγραφο του κεφαλαίου Υλικά και Μέθοδοι.

Σε αυτή τη δοκιμασία, για λόγους εξοικονόμησης αντιδραστηρίων και αναλώσιμων υλικών, χρησιμοποιήθηκε ένα μόνο είδος κυττάρων, οι δερματικοί ινοβλάστες, και μία μόνο συγκέντρωση για κάθε τετραπεπτίδιο. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η συγκέντρωση 10^{-9} M, η οποία, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ανήκει στην τάξη των συγκεντρώσεων του πεπτιδίου AcSDKP που είναι φυσιολογικά ανιχνεύσιμες στο πλάσμα αίματος (Pradelles et al., 1990), ενώ η ίδια συγκέντρωση έχει επίσης χρησιμοποιηθεί σε *in vitro* δοκιμασίες του παραπάνω πεπτιδίου (Rhaleb et al., 2001). Κατ' αντιστοιχία και για λόγους ευχερούς σύγκρισης, χρησιμοποιήθηκε η ίδια συγκέντρωση και για το πεπτίδιο AcADKP (το οποίο δεν έχει εντοπισθεί ως αυτόνομο μόριο στο αίμα ή στους ιστούς και για το οποίο υπάρχουν πολύ λιγότερα βιβλιογραφικά στοιχεία, σε σχέση με το AcSDKP).

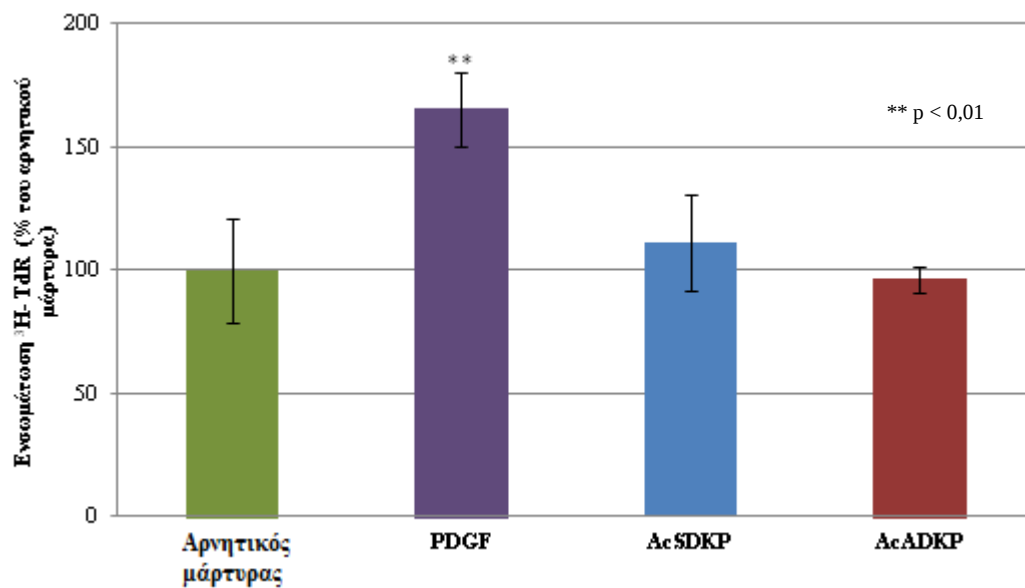
Συνολικά, πραγματοποιήθηκαν τέσσερα πειράματα, όπου ως αρνητικοί μάρτυρες (Control) χρησιμοποιήθηκαν ινοβλάστες οι οποίοι είχαν καλλιεργηθεί στο θρεπτικό τους υλικό, χωρίς την επίδραση κάποιου παράγοντα. Σε δύο εκ των τεσσάρων πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκαν και θετικοί μάρτυρες, ινοβλάστες δηλαδή οι οποίοι είχαν επωαστεί μαζί με τον αυξητικό παράγοντα PDGF, σε τελική συγκέντρωση 10 ng/mL, η οποία επιλέχτηκε βάσει προηγούμενης εμπειρίας του εργαστηρίου. Τα αποτελέσματα των τεσσάρων πειραμάτων απεικονίζονται στις Εικόνες 4.15 – 4.18, όπου φαίνεται ότι τα δύο τετραπεπτίδια, AcSDKP και AcADKP, δεν επιφέρουν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών, σε σχέση με τους μάρτυρες.



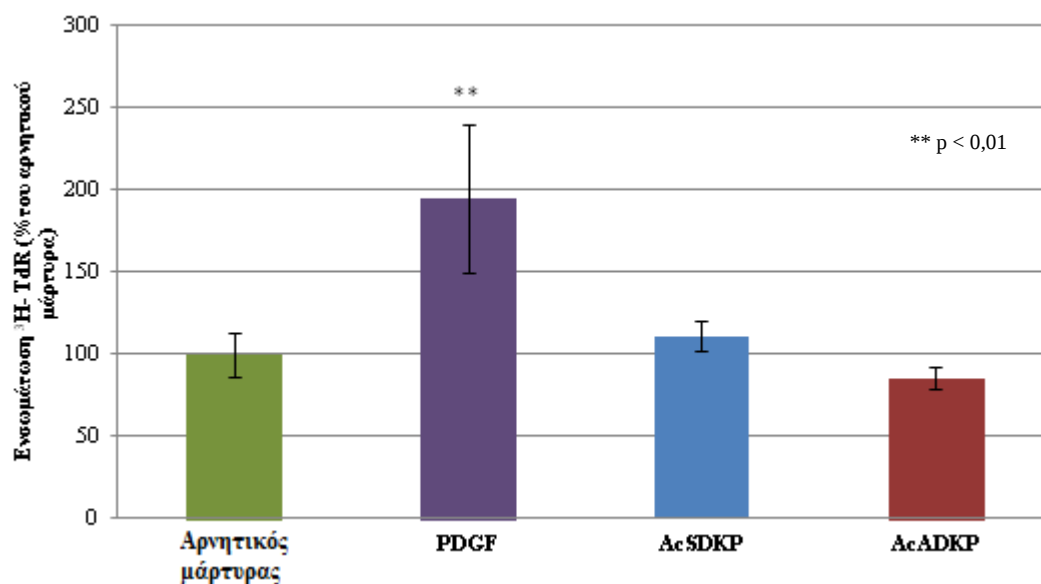
Εικόνα 4.15: Διάγραμμα ενσωμάτωσης της $^3\text{H-TdR}$ στο DNA δερματικών ινοβλαστών (AG01523c) με επίδραση των δύο πεπτιδίων, AcSDKP και AcADKP (10^{-9} M), σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (κύτταρα σε θρεπτικό υλικό, χωρίς άλλο παράγοντα)
1^ο πείραμα



Εικόνα 4.16: Διάγραμμα ενσωμάτωσης της $^3\text{H-TdR}$ στο DNA δερματικών ινοβλαστών (AG01523c) με επίδραση των δύο πεπτιδίων, AcSDKP και AcADKP (10^{-9} M), σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (κύτταρα σε θρεπτικό υλικό, χωρίς άλλο παράγοντα)
2^ο πείραμα



Εικόνα 4.17: Διάγραμμα ενσωμάτωσης της ³H-TdR στο DNA δερματικών ινοβλαστών (AG01523c) με επίδραση των δύο πεπτιδίων, AcSDKP και AcADKP (10^{-9} M), σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (κύτταρα σε θρεπτικό υλικό, χωρίς άλλο παράγοντα). Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα σε θρεπτικό υλικό με προσθήκη PDGF.
3^ο πείραμα



Εικόνα 4.18: Διάγραμμα ενσωμάτωσης της ³H-TdR στο DNA δερματικών ινοβλαστών (AG01523c) με επίδραση των δύο πεπτιδίων, AcSDKP και AcADKP (10^{-9} M), σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (κύτταρα σε θρεπτικό υλικό, χωρίς άλλο παράγοντα). Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα σε θρεπτικό υλικό με προσθήκη PDGF.
4^ο πείραμα

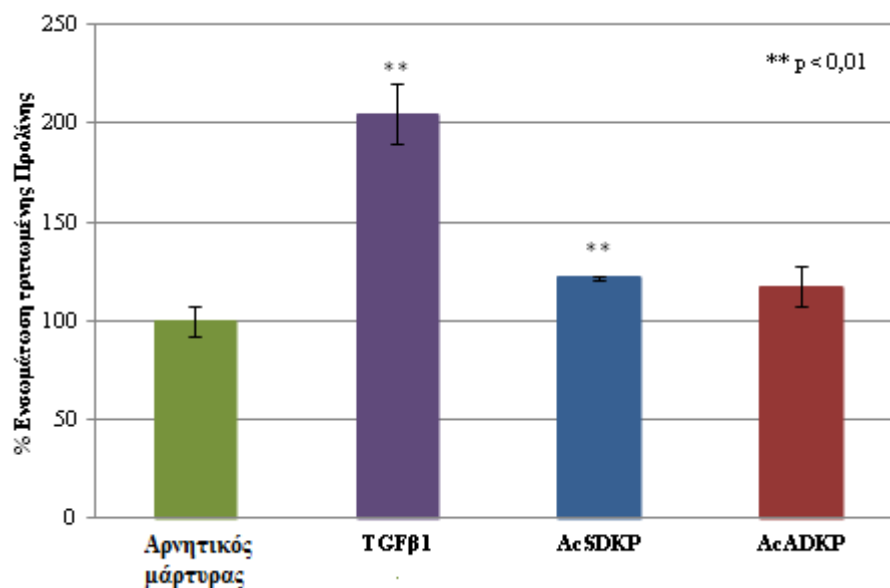
4.2.3. Προσδιορισμός σύνθεσης κολλαγόνου με τη μέθοδο τριτιωμένης προλίνης

Αφού ελέγξαμε την επίδραση των δύο τετραπεπτιδίων, AcSDKP και AcADKP, στον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών, προχωρήσαμε στη διεξαγωγή μιας δοκιμασίας, για να εκτιμήσουμε την πιθανή επίδρασή τους στη σύνθεση του κολλαγόνου. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο ενσωμάτωσης τριτιωμένης προλίνης, η οποία παρέχει τη δυνατότητα ποσοτικής εκτίμησης του νεοσυντιθέμενου κολλαγόνου από ηρεμούντα κύτταρα τα οποία διεγείρονται με κάποιο παράγοντα προαγωγής της σύνθεσής του. Ακολουθήσαμε το πρωτόκολλο που περιγράφηκε στην αντίστοιχη παράγραφο του κεφαλαίου Υλικά και Μέθοδοι.

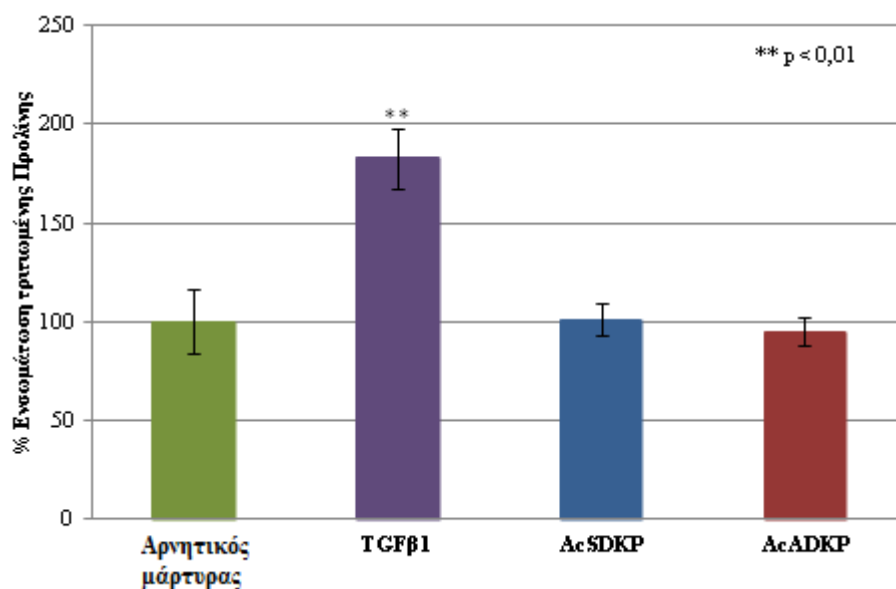
Κατά τη δοκιμασία χρησιμοποιήθηκαν δερματικοί ινοβλάστες, καθώς πρόκειται για τα εξειδικευμένα κύτταρα του δέρματος τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή του κολλαγόνου. Όπως και στη δοκιμασία σύνθεσης του DNA, εστίασαμε σε μία μόνο συγκέντρωση για κάθε τετραπεπτίδιο, για λόγους εξοικονόμησης αντιδραστηρίων και αναλώσιμων υλικών. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε και εδώ η συγκέντρωση 10^{-9} M, η οποία, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ανήκει στην τάξη συγκεντρώσεων του πεπτιδίου AcSDKP που είναι φυσιολογικά ανιχνεύσιμες στο πλάσμα αίματος (Pradelles et al., 1990), ενώ έχει επίσης χρησιμοποιηθεί σε *in vitro* δοκιμασίες του παραπάνω πεπτιδίου (Rhaleb et al., 2001). Κατ' αντιστοιχία και για λόγους συγκρισιμότητας, χρησιμοποιήθηκε η ίδια συγκέντρωση για το τετραπεπτίδιο AcADKP.

Συνολικά, πραγματοποιήθηκαν δύο πειράματα, όπου ως αρνητικοί μάρτυρες (Control) χρησιμοποιήθηκαν ινοβλάστες οι οποίοι είχαν καλλιεργηθεί στο θρεπτικό τους υλικό, χωρίς την επίδραση κάποιου παράγοντα. Ταυτόχρονα, χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες ινοβλάστες οι οποίοι είχαν επωαστεί μαζί με τον ινωτικό παράγοντα TGF- β 1, σε τελική συγκέντρωση 2,5 ng/mL, η οποία επιλέχθηκε βάσει προηγούμενης εμπειρίας του εργαστηρίου.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων απεικονίζονται στις Εικόνες 4.19 και 4.20, όπου φαίνεται ότι τα δύο τετραπεπτίδια AcSDKP και AcADKP πιθανότατα δεν επιφέρουν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στη σύνθεση του κολλαγόνου από τους ινοβλάστες, σε σχέση με τους μάρτυρες.



Εικόνα 4.19: Διάγραμμα ενσωμάτωσης της τριτωμένης προλίνης σε νεοσυντιθέμενο κολλαγόνο δερματικών ινοβλαστών (AG01523c) με επίδραση των δύο τετραπεπτιδίων, AcSDKP και AcADKP (10^{-9} M), σε σχέση με τον αρνητικό και το θετικό μάρτυρα (κύτταρα σε θρεπτικό υλικό χωρίς προσθήκη άλλου παράγοντα, ή, με προσθήκη TGF-β1, αντίστοιχα)
1^ο πείραμα



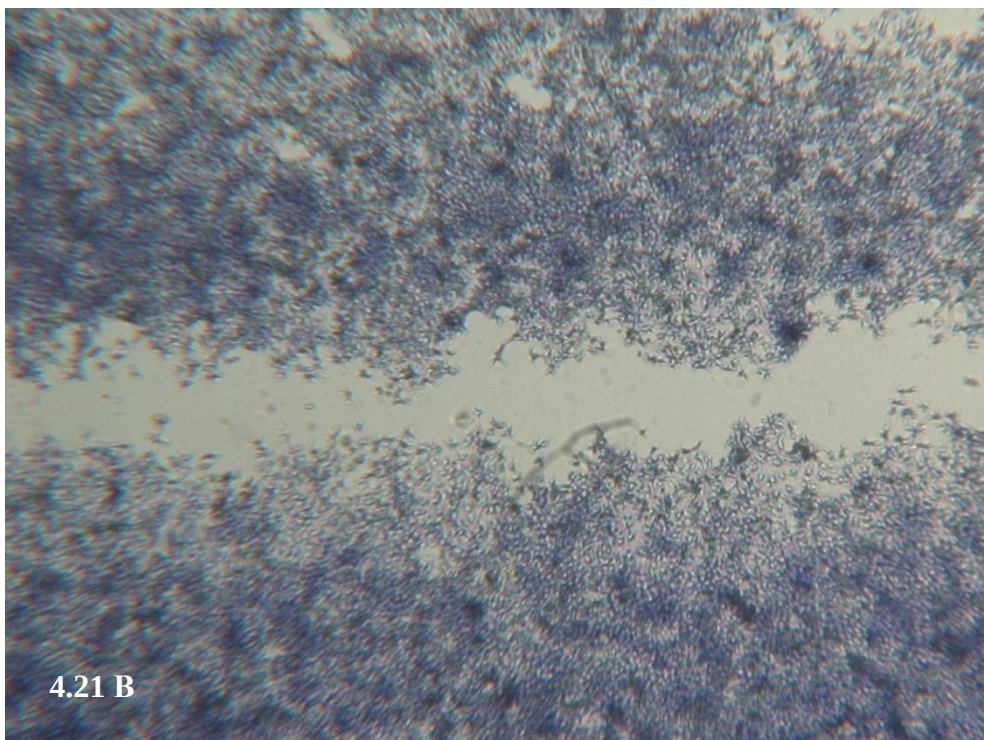
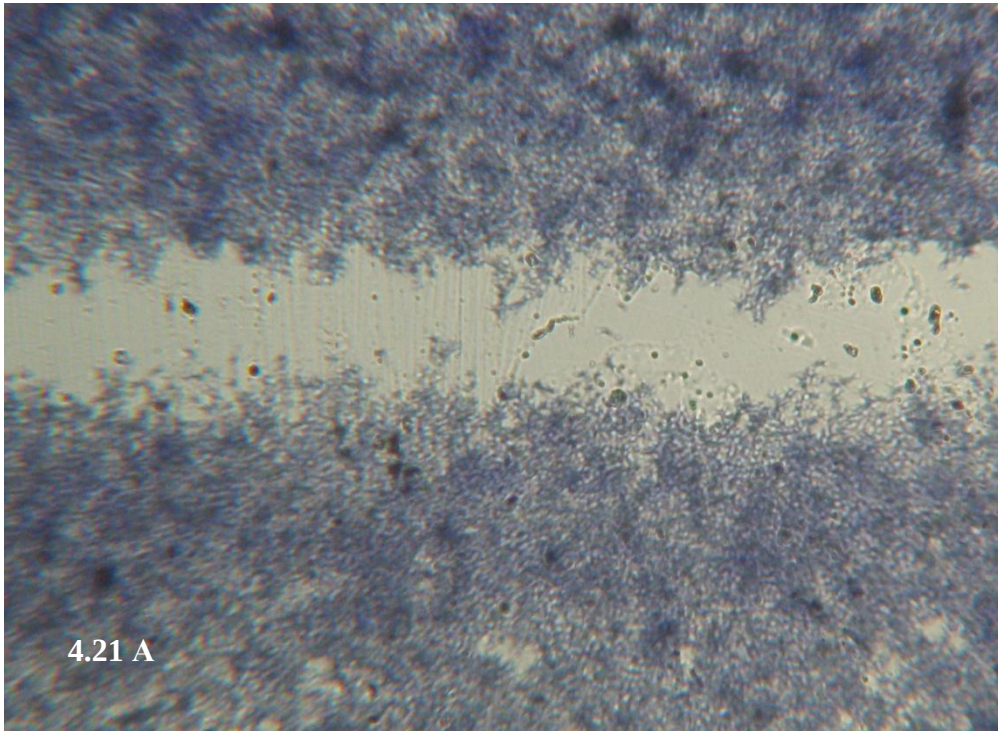
Εικόνα 4.20: Διάγραμμα ενσωμάτωσης της τριτωμένης προλίνης σε νεοσυντιθέμενο κολλαγόνο δερματικών ινοβλαστών (AG01523c) με επίδραση των δύο τετραπεπτιδίων, AcSDKP και AcADKP (10^{-9} M), σε σχέση με τον αρνητικό και το θετικό μάρτυρα (κύτταρα σε θρεπτικό υλικό χωρίς προσθήκη άλλου παράγοντα, ή, με προσθήκη TGF-β1, αντίστοιχα)
2^ο πείραμα

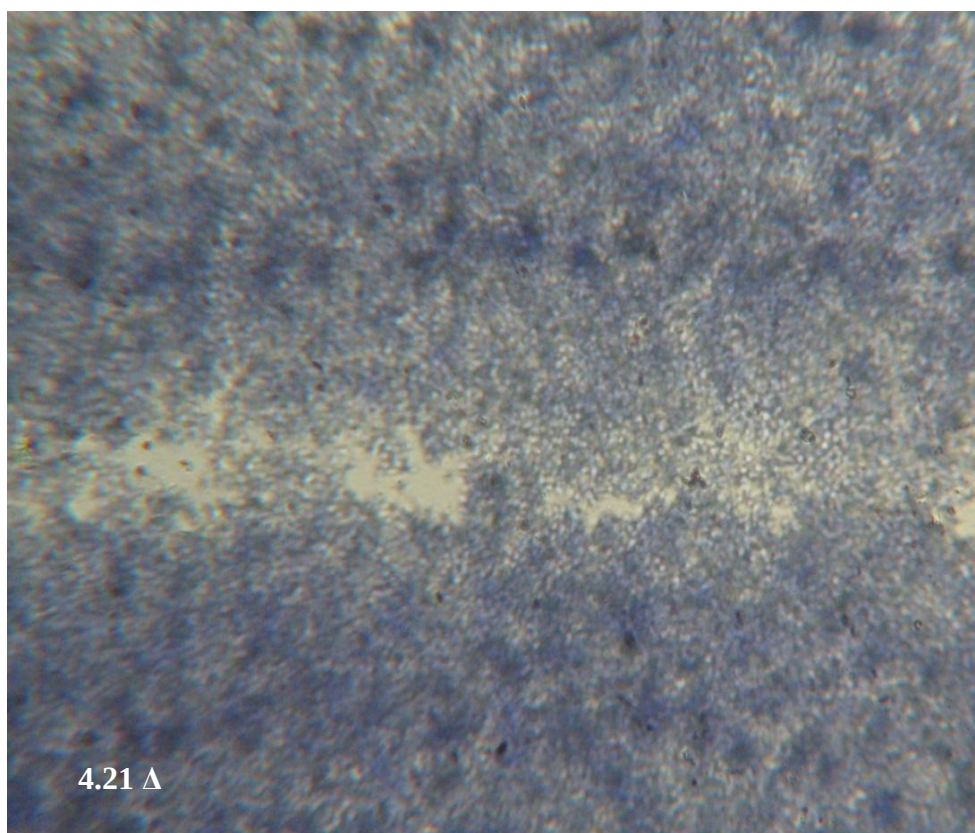
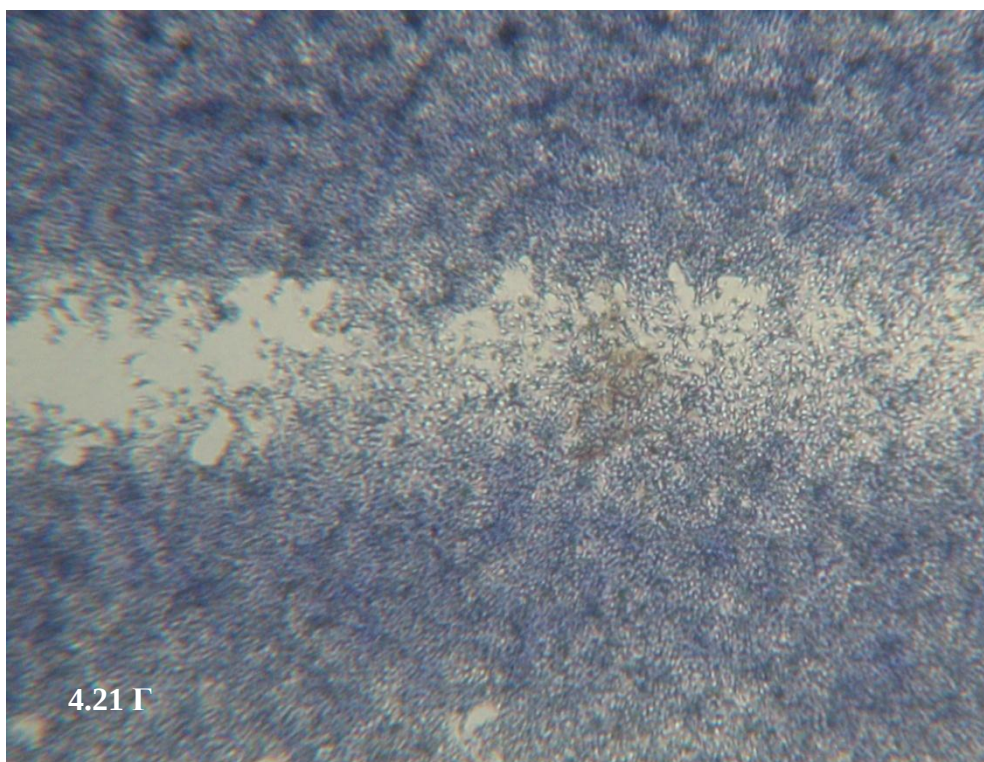
4.2.4. Δοκιμασία κυτταρικής μετανάστευσης με σχηματισμό τομής (scratch assay)

Από τα προηγούμενα πειράματα διαπιστώθηκε ότι τα δύο τετραπεπτίδια, AcSDKP και AcADKP, δεν είναι τοξικά σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις όταν επωάζονται με ινοβλάστες ή κερατινοκύτταρα. Επίσης, σύμφωνα με τις πρώτες εκτιμήσεις μας πιθανότατα δεν επιδρούν στον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών σε συγκέντρωση φυσιολογικά ανιχνεύσιμη στο πλάσμα για το AcSDKP. Ακόμη, από τα πειραματικά αποτελέσματά μας, φάνηκε ότι πιθανότατα δεν επιδρούν στην κολλαγονοσύνθεση δερματικών ινοβλαστών, όταν δοκιμάστηκαν σε αυτή τη φυσιολογική συγκέντρωση.

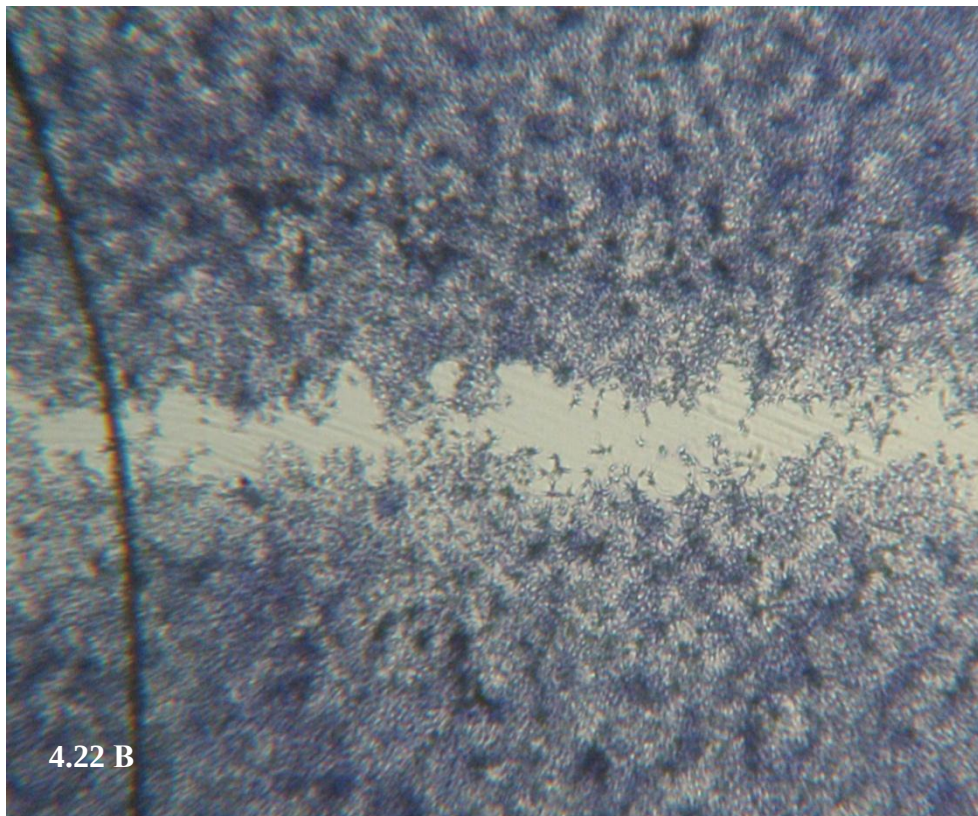
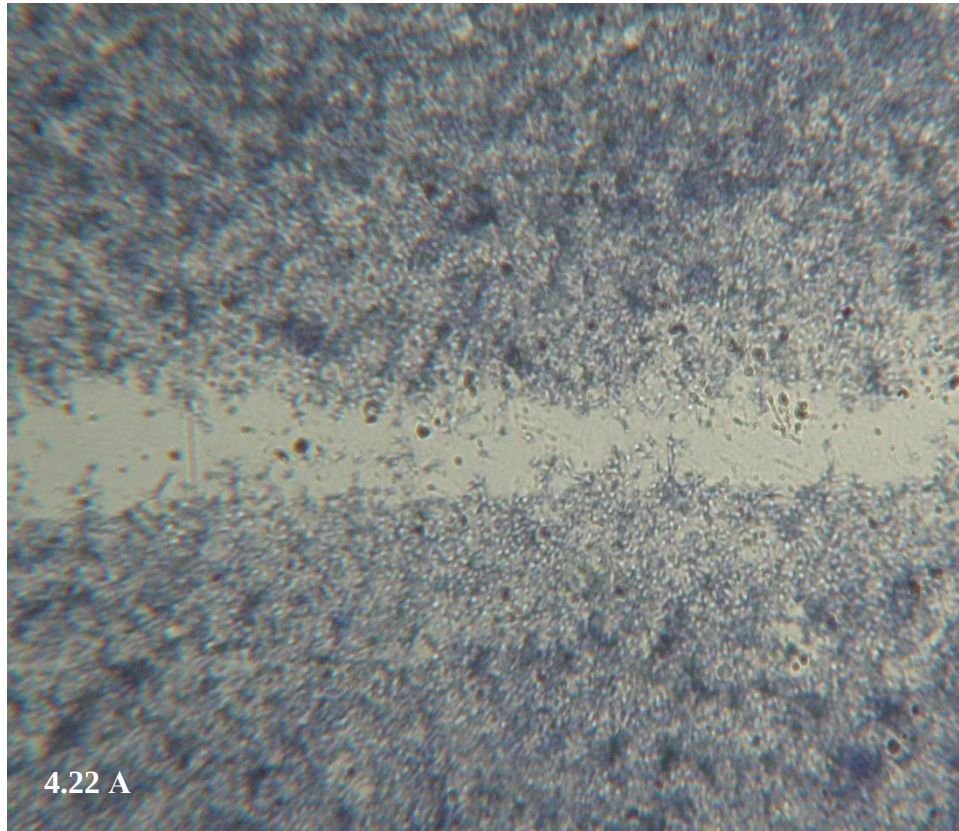
Προχωρήσαμε στη συνέχεια στην διεξαγωγή μιας ακόμη εξειδικευμένης δοκιμασίας, η οποία σχετίζεται επίσης με τη διαδικασία της επούλωσης. Συγκεκριμένα, ελέγξαμε αν τα δύο πεπτίδια AcSDKP και AcADKP, προάγουν ή αναστέλλουν τη μετανάστευση των κερατινοκυττάρων. Ακολουθήσαμε το πρωτόκολλο που περιγράφηκε στην αντίστοιχη παράγραφο του κεφαλαίου Υλικά και Μέθοδοι. Όπως και στις προηγούμενες δύο δοκιμασίες, δοκιμάστηκε μία μόνο συγκέντρωση για κάθε τετραπεπτίδιο, συγκεκριμένα η 10^{-9} M, για λόγους εξοικονόμησης αντιδραστηρίων και αναλώσιμων υλικών.

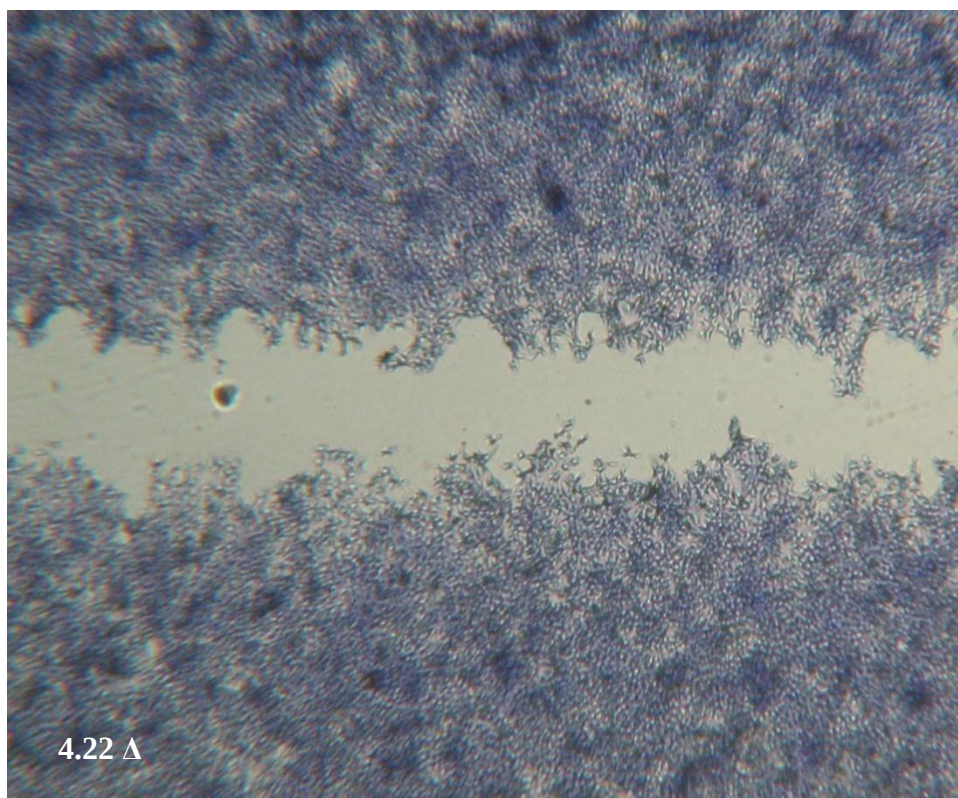
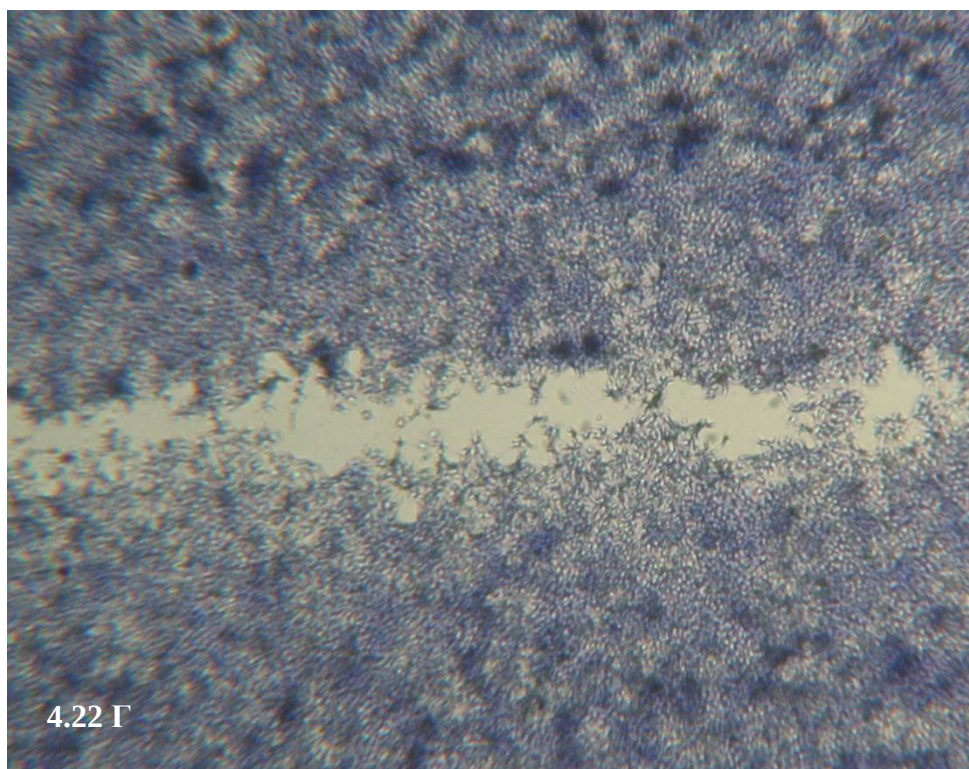
Συνολικά, πραγματοποιήθηκαν δύο πειράματα, όπου ως αρνητικοί μάρτυρες (Control) χρησιμοποιήθηκαν κερατινοκύτταρα τα οποία είχαν καλλιεργηθεί στο θρεπτικό τους υλικό, χωρίς την επίδραση κάποιου άλλου παράγοντα. Στο δεύτερο πείραμα δοκιμάστηκε μόνο το τετραπεπτίδιο AcSDKP, σε σχέση με τους αρνητικούς μάρτυρες, για καλύτερη επαναξιολόγηση των αποτελεσμάτων του πρώτου πειράματος. Τα κύτταρα χρωματίστηκαν με χρωστική Giemsa και ελήφθησαν ψηφιακές φωτογραφίες, οι οποίες εμφανίζονται στις Εικόνες 4.21-4.25. Όπως φαίνεται, παρατηρείται σημαντική ετερογένεια στα αποτελέσματα, που αντιστοιχούν τόσο στα κύτταρα που επώασθηκαν με τα πεπτίδια, όσο και στα κύτταρα - μάρτυρες, γεγονός που δυσχεραίνει την αξιόπιστη αξιολόγηση της δράσης των δύο τετραπεπτιδίων επί της κυτταρικής μετανάστευσης των κερατινοκυττάρων.



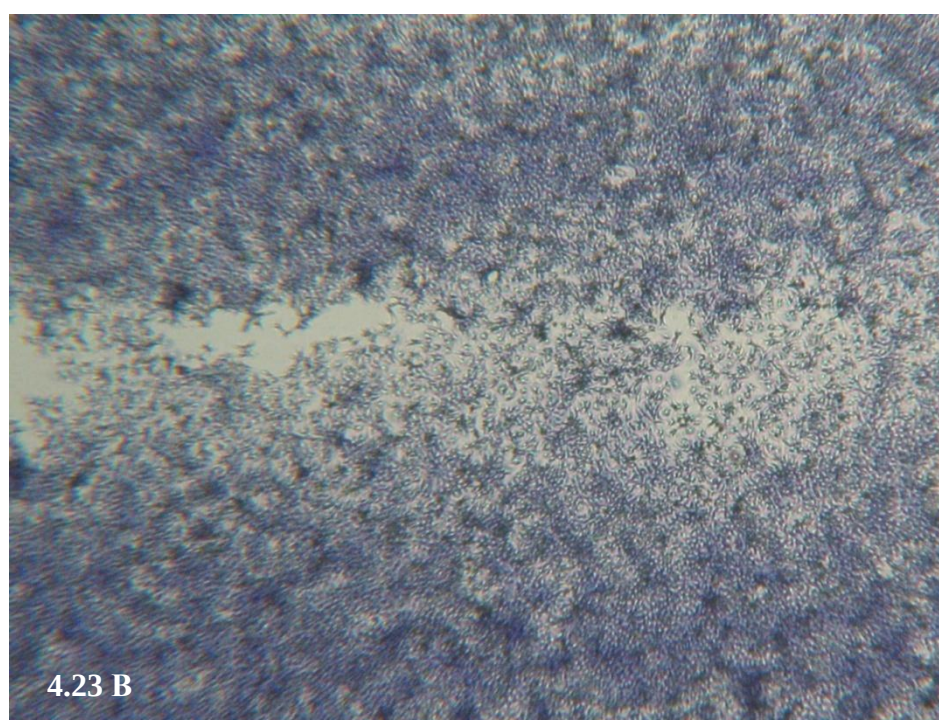
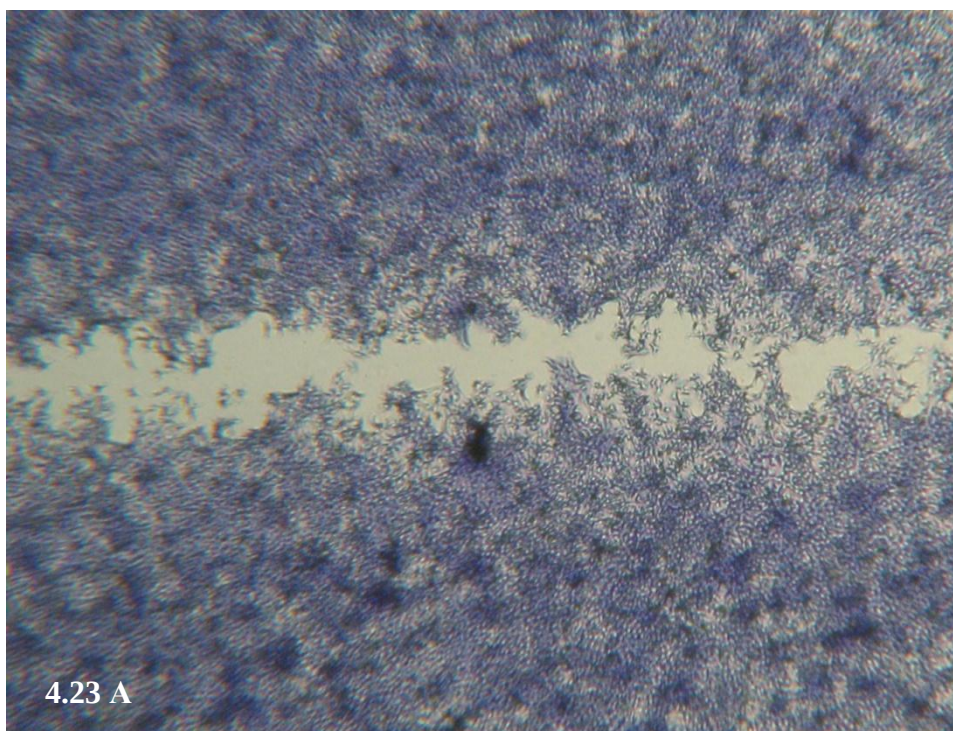


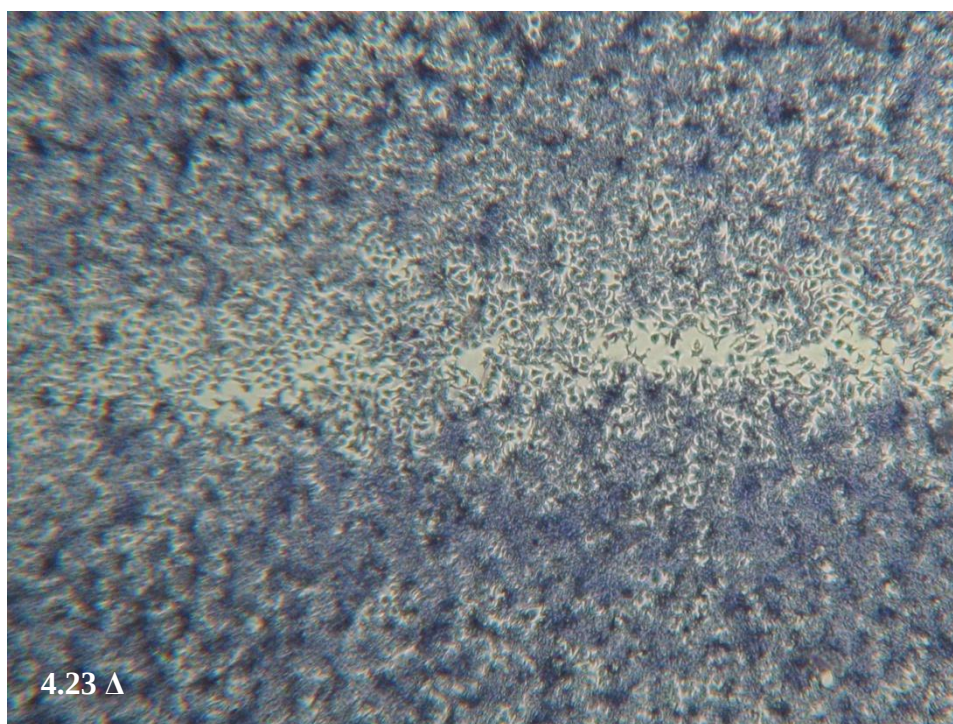
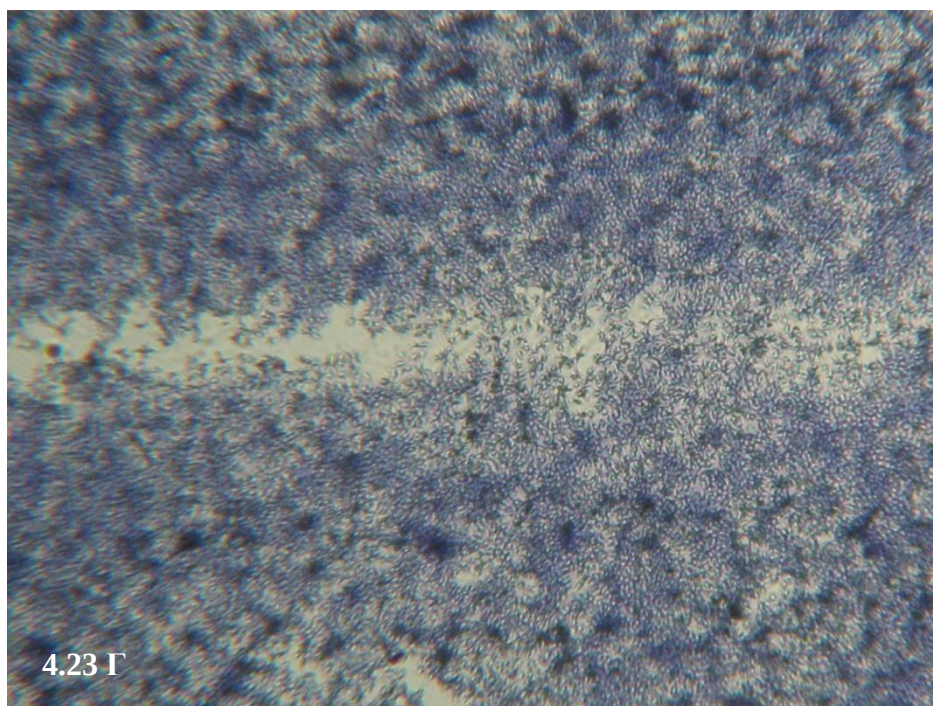
Εικόνα 4.21: (Α,Β,Γ,Δ): Μετανάστευση των κερατινοκυττάρων, όπως παρατηρείται στους μάρτυρες (1^ο πείραμα). Α,Β: Μικρή τάση μετανάστευσης. Γ,Δ: Μεγάλη τάση μετανάστευσης, η τομή σχεδόν έκλεισε.



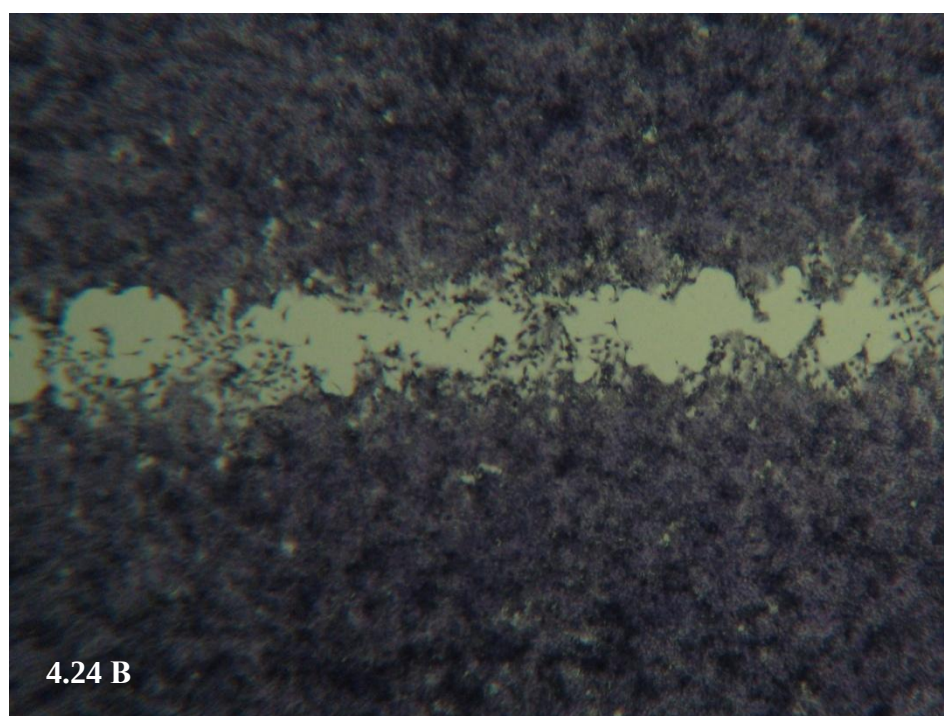
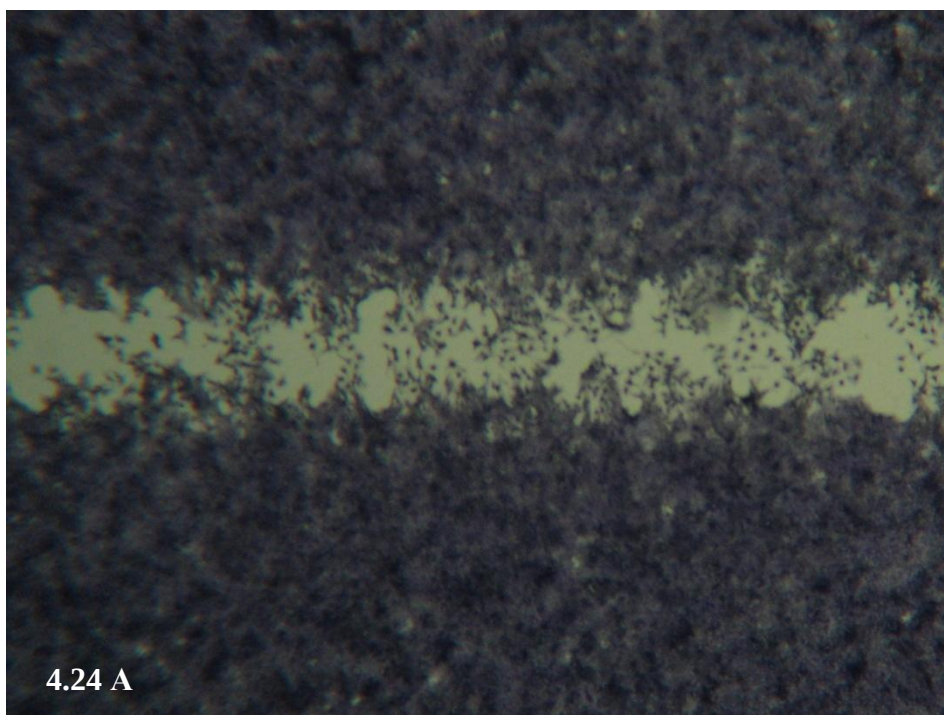


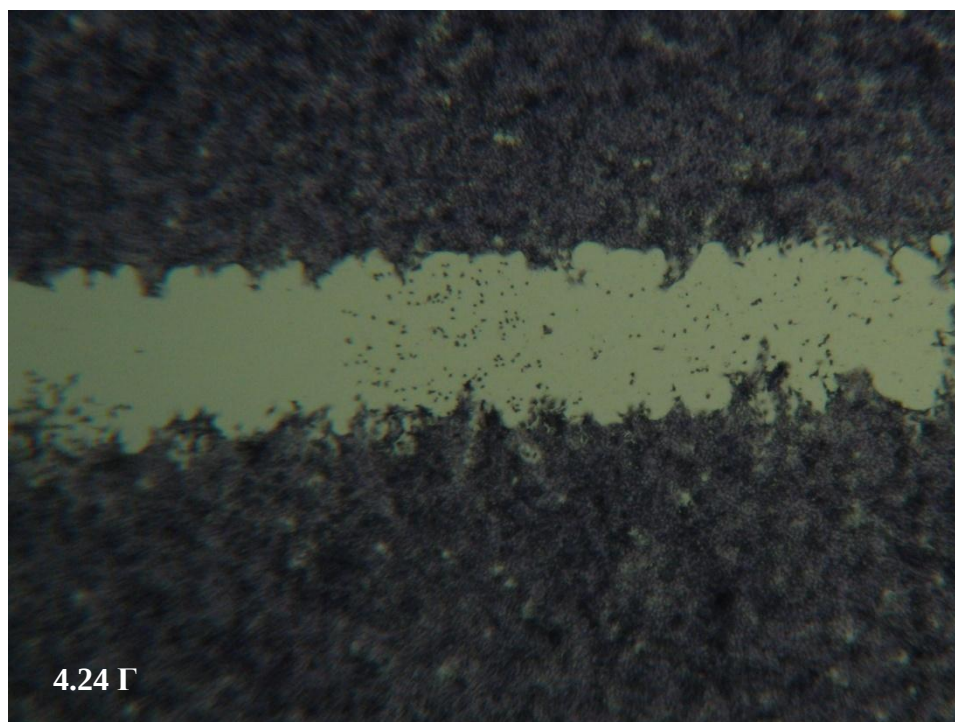
Εικόνα 4.22: (Α,Β,Γ,Δ): Μετανάστευση των κερατινοκυττάρων υπό την επίδραση του πεπτιδίου AcADKP (1^ο πείραμα). Παρατηρείται μικρή τάση μετανάστευσης, δεν παρατηρείται κάποια διαφορά σε σχέση με τους μάρτυρες.



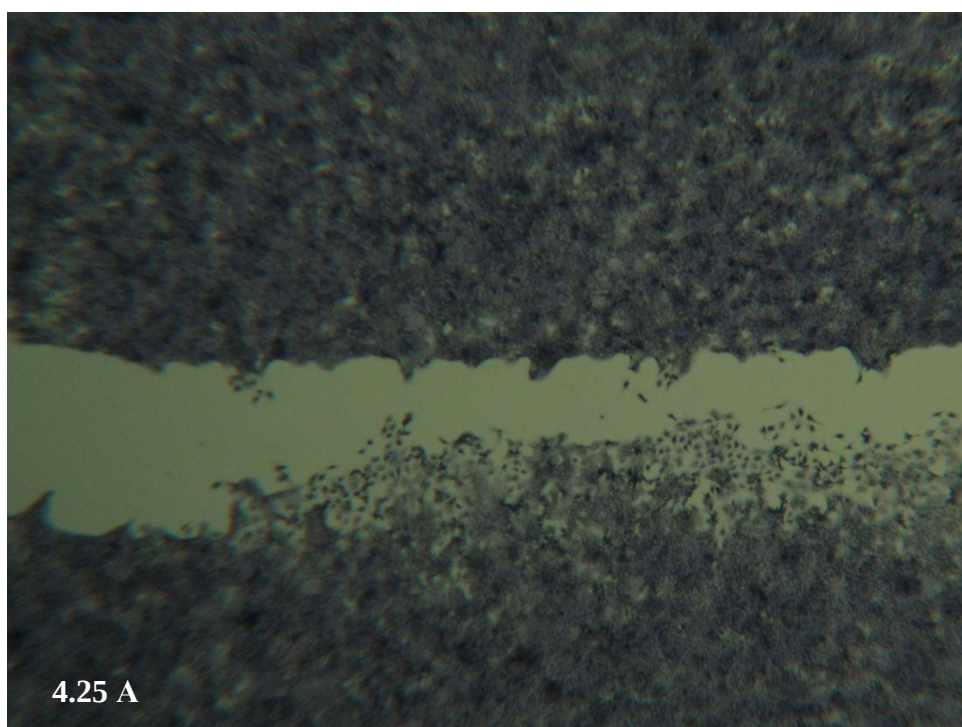


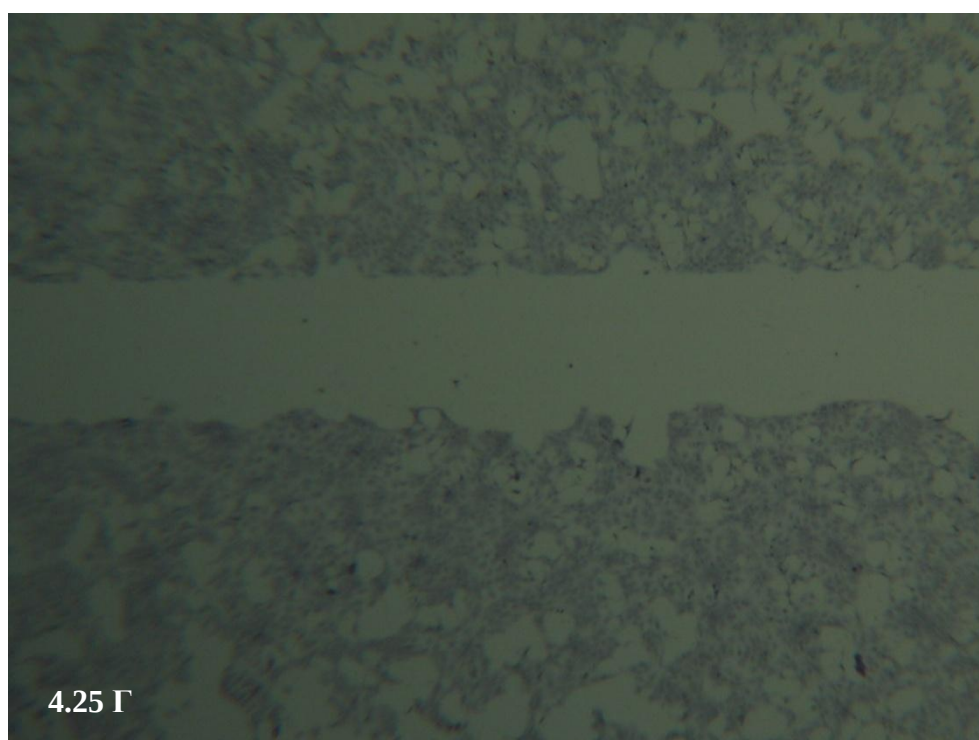
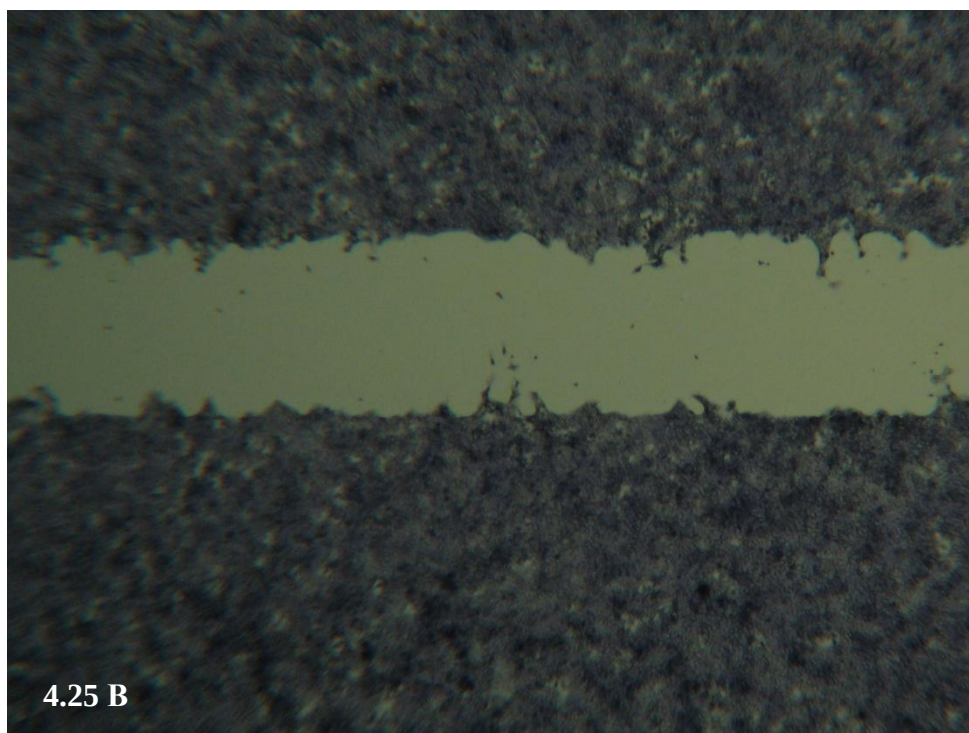
Εικόνα 4.23: (Α,Β,Γ,Δ): Μετανάστευση των κερατινοκυττάρων υπό την επίδραση του πεπτιδίου AcSDKP (1^ο πείραμα). Παρατηρείται σχετικά μεγάλη τάση μετανάστευσης σε όλες τις εικόνες και κάποια μικρή διαφορά σε σχέση με τους μάρτυρες, ιδιαίτερα στις εικόνες Β,Γ,Δ.





Εικόνα 4.24: (Α,Β,Γ): Μετανάστευση των κερατινοκυττάρων, όπως παρατηρείται στους μάρτυρες (2^ο πείραμα). Μικρή τάση μετανάστευσης.





Εικόνα 4.25: (Α,Β,Γ): Μετανάστευση των κερατινοκυττάρων, υπό την επίδραση του πεπτιδίου AcSDKP (2^ο πείραμα). Δεν παρατηρείται κάποια διαφορά σε σχέση με τους μάρτυρες.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το δέρμα, ως το μεγαλύτερο και πιο εκτεθειμένο όργανο του σώματός μας, αποτελεί τον εξωτερικό φραγμό έναντι διάφορων «στρεσογόνων» περιβαλλοντικών παραγόντων (Emining et al., 2014). Η λύση της συνέχειας της επιφάνειας του δέρματος χαρακτηρίζεται ως τραύμα (πληγή). Η σύνθετη διαδικασία που οδηγεί σε επαναφορά της ομαλής δομής και της ομαλής λειτουργίας των ιστών του δέρματος είναι γνωστή ως επούλωση. Ένα τραύμα μπορεί να κατηγοριοποιηθεί ως οξύ ή χρόνιο. Χρόνια τραύματα είναι εκείνα στα οποία η διαδικασία της επούλωσης αδυνατεί να προχωρήσει ομαλά και έγκαιρα και η αποκατάσταση της ανατομικής και της λειτουργικής ακεραιότητας των ιστών είναι ανεπαρκής ή διαταραγμένη (Velnar et al., 2009).

Τα τελευταία χρόνια, ερευνώνται ολοένα και περισσότερα πεπτιδία τα οποία εντοπίζονται φυσιολογικά σε ανθρώπινους ιστούς ή σε βιολογικά υγρά, ως προς την πιθανή θετική τους επίδραση στην επούλωση. Η χρήση στη θεραπευτική αυτών των πεπτιδίων ή θραυσμάτων τους θα ήταν ιδιαίτερα επιθυμητή, δεδομένου ότι πρόκειται για ενδογενή μόρια, τα οποία, αναγνωριζόμενα ως «εαυτά», δεν επάγουν την ανοσολογική απόκριση του οργανισμού, και έχουν μικρή πιθανότητα εμφάνισης τοξικών παρενεργειών.

Μια κατηγορία πεπτιδίων που ερευνώνται για την πιθανή επουλωτική τους δράση, είναι οι β-θυμοσίνες. Η θυμοσίνη β4 (Τβ4), κύριος εκπρόσωπος των β-θυμοσινών, εντοπίστηκε αρχικά ως βιολογικά δραστικό συστατικό ενός ανοσοδραστικού παρασκευάσματος που είχε απομονωθεί από βόειο θύμο αδένα, γνωστού ως θυμοσινικό κλάσμα 5 (Hannappel & Huff, 2003). Η Τβ4 είναι ένα εξαιρετικά συντηρημένο 43-πεπτίδιο, που απαντάται φυσιολογικά σε όλους τους ιστούς και σε όλους τους τύπους κυττάρων, με εξαίρεση τα ερυθροκύτταρα, η δομή του οποίου ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1981 (Εικόνα 2.1). Εντοπίζεται επίσης στο αίμα και σε άλλα σωματικά υγρά, συμπεριλαμβανομένου του υγρού των πλεγμών (εξιδρώματος) (Kleinman&Sosne, 2016). Η Τβ4 θεωρείται ότι δρα ενδοκυτταρικά ως ο κύριος παράγοντας που δεσμεύει την G-ακτίνη και, ως εκ τούτου, συμμετέχει στη διαμόρφωση του κυτταροσκελετού, ενώ είναι πιθανόν να συμμετέχει και σε άλλες ενδοκυτταρικές λειτουργίες (Crockford et al., 2010; Kleinman&Sosne, 2016). Λόγω της εμπλοκής της στη διαμόρφωση του κυτταροσκελετού, η Τβ4 έχει συσχετισθεί με τη διαφοροποίηση και τη μετανάστευση των κυττάρων, καθώς και με τις διαδικασίες της οργανογένεσης και της μορφογένεσης (Crockford et al., 2010). Εκτός από τις δράσεις της μέσα στο κύτταρο, η Τβ4, φαίνεται ότι ασκεί επίσης εξωκυτταρικές δράσεις. Για παράδειγμα, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, σημαντική ποσότητα Τβ4 απελευθερώνεται από τα κύτταρα, μέσω μηχανισμού που δεν είναι απολύτως διευκρινισμένος, και στη συνέχεια δρα ως παρακρινικός παράγοντας συμμετέχοντας σε αρκετές φυσιολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της αγγειογένεσης, της ρύθμισης της φλεγμονής, της αναγέννησης διάφορων ιστών και της επούλωσης τραυμάτων. Η Τβ4 έχει εμπλακεί ιδιαίτερα στην επούλωση του δέρματος, του κερατοειδούς χιτώνα του οφθαλμού, του καρδιακού ιστού, του εγκεφαλικού ιστού καθώς και άλλων ιστών (Hara, 2011; Huff et al., 2002; Sosne et al., 2010). Ο μηχανισμός μέσω του οποίου η Τβ4 ασκεί την εξωκυτταρική της δράση δεν έχει διαλευκανθεί μέχρι στιγμής.

Στο μόριο της Τβ4 έχουν εντοπιστεί μικρότερες δραστικές περιοχές, οι οποίες πιθανολογείται ότι διαμεσολαβούν κάποιες από τις δράσεις της. Η μικρότερη από αυτές είναι το αμινοτελικό τετραπεπτίδιο AcSDKP (Εικόνα 2.7) (Sosne et al., 2010;

Kleinman&Sosne, 2016). Αρχικά το AcSDKP, που εντοπίζεται φυσιολογικά σε ανθρώπινα όργανα και βιολογικά υγρά, απομονώθηκε από το μυελό των οστών εμβρύου μόσχου και περιγράφηκε, ανεξάρτητα από τη Τβ4, ως φυσικός αναστολέας του πολλαπλασιασμού των ολοδύναμων αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων (Robinson et al., 1993). Η Τβ4 προτάθηκε ως το πιθανότερο πρόδρομο μόριο του AcSDKP, καθώς διαθέτει την αλληλουχία του τετραπεπτιδίου στο αμινοτελικό της άκρο (Cavasin, 2006). Πράγματι, όπως αποδείχθηκε στη συνέχεια, το τετραπεπτίδιο AcSDKP προκύπτει μετά από πρωτεολυτική διάσπαση της Τβ4 με τη δράση δύο ενζύμων, της μεπρίνης-α και της προλυλ-ολιγοπεπτιδάσης (POP), ενώ μπορεί να αποικοδομηθεί μέσω της υδρόλυσής του από το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτασίνης (MEA) (Cavasin et al., 2004; Cavasin, 2006; Kumar et al., 2016). Το AcSDKP έχει μελετηθεί ιδιαίτερος τα τελευταία χρόνια ως προς τις δράσεις του στην επούλωση διάφορων ιστών, συμπεριλαμβανομένων του καρδιακού ιστού, των νεφρών, του πνεύμονα, του εγκεφαλικού ιστού μετά από εγκεφαλικές κακώσεις και, σε μικρότερο βαθμό, του δέρματος (Kanasaki et al., 2014).

Όπως έχει προταθεί στη βιβλιογραφία, το AcSDKP είναι πιθανόν να συμμετέχει με διάφορους τρόπους στην επουλωτική διαδικασία. Για παράδειγμα, το AcSDKP έχει δείχθει ότι δρα ως ένας ισχυρός αγγειογενετικός παράγοντας τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. *In vitro*, προάγει την μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων (Wang et al., 2004; Liu et al., 2003), ενώ *in vivo* έχει αναφερθεί ότι επιταχύνει και βελτιώνει την επούλωση τομών του δέρματος, αποτρέποντας τη νέκρωση των ιστών, κυρίως μέσω της ενίσχυσης της αγγειογένεσης (Fromes et al., 2006). Ακόμη, έχει αναφερθεί ότι παρέχει νευροπροστασία *in vivo* σε αρουραίους (μειωμένη απώλεια νευρώνων και περιορισμένη συσσώρευση ινώδους), προάγει τη νευροαγγειακή αναδιαμόρφωση (αυξημένη αγγειογένεση και νευρογένεση), ενώ επίσης μειώνει την νευροφλεγμονή και βελτιώνει τη λειτουργική αποκατάσταση του ιστού, πιθανόν μέσω της αναστολής του σηματοδοτικού μονοπατιού TGF-β / NF-kB (Zhang et al., 2016). Η προστατευτική και ιδιαίτερα η αντι-ινωτική δράση του AcSDKP έχει επίσης δείχθει στους ιστούς της καρδιάς, των νεφρών και των πνευμόνων (Rhaleb et al., 2001; Kanasaki et al., 2014). Η αντι-ινωτική δράση του AcSDKP πιθανόν να σχετίζεται με την αναστολή του σηματοδοτικού μονοπατιού TGF-β / Smad (Kanasaki et al., 2014).

Το τετραπεπτίδιο AcSDKP μελετήθηκε σε διάφορα *in vitro* και *in vivo* πειραματικά συστήματα επούλωσης (Sosne et al., 2010), ενώ η Τβ4 έφτασε σε επίπεδο κλινικών δοκιμών Φάσης I & II, κατά τις οποίες επέδειξε πολύ καλά τοξικολογικά χαρακτηριστικά και τάση βελτίωσης της κλινικής εικόνας των ασθενών (παρότι στατιστικώς μη σημαντική, τουλάχιστον για τις δόσεις που εφαρμόστηκαν). Έτσι, δεδομένων των ενθαρρυντικών αποτελεσμάτων των *in vitro* και *in vivo* πειραμάτων καθώς και των αρχικών κλινικών δοκιμών, κρίνεται σημαντική η συνέχιση των μελετών βασικής και εφαρμοσμένης έρευνας επί της πιθανής επουλωτικής δράσης της Τβ4 και των βιοδραστικών θραυσμάτων της (Crockford et al., 2010; Treadwell et al., 2012; Goldstein&Kleinman, 2015; Kleinman&Sosne, 2016).

Στον άνθρωπο, εντοπίζονται δύο ακόμα εκπρόσωποι των β-θυμοσινών, η θυμοσίνη β10 (Τβ10) και η θυμοσίνη β15 (Τβ15), οι οποίες αποτελούν δομικά ομόλογα της Τβ4 (Εικόνα 2.10) (Smart et al., 2007a). Η Τβ10, όπως και η Τβ4, εντοπίζεται στα περισσότερα κύτταρα, αν και σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα (5-10% αυτών της Τβ4) (Theunissen et al., 2014), ενώ η Τβ15 εκφράζεται κυρίως σε καρκινικούς ιστούς και όργανα -κυρίως σε καρκίνο του προστάτη (Kleinman&Sosne, 2016).

Η ανθρώπινη Τβ10 διαφέρει από την Τβ4 κατά 10 αμινοξέα (23%). Εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα και έχει αποδειχθεί ότι συμμετέχει στην οργάνωση του κυτταροσκελετού, όπως η Τβ4, και, ευρύτερα, στη διαμόρφωση της κυτταρικής μορφολογίας καθώς και στον πολλαπλασιασμό και την κινητικότητα των κυττάρων, μέσω της (κοινής με τη Τβ4) αλληλουχίας L¹⁷KKTET²², που θεωρείται ότι αποτελεί θέση σύνδεσης στην G-ακτίνη (Sribenja et al., 2009). Από την άλλη πλευρά και παρά την υψηλή δομική ομοιότητα των δύο 43-πεπτιδίων, η Τβ10 φαίνεται να εμφανίζει αντίρροπες δράσεις ως προς τη Τβ4 σε διαδικασίες, όπως η αγγειογένεση ή η απόπτωση. Συγκεκριμένα, η Τβ10 έχει αναφερθεί ότι αναστέλλει την αγγειογένεση (Koutrafouris et al., 2001), ενώ η υπερέκφρασή της έχει συσχετισθεί με αυξημένη απόπτωση (Theunissen et al., 2014; Sribenja et al., 2009). Παρά το γεγονός ότι οι μοριακοί μηχανισμοί της λειτουργίας της δεν είναι απολύτως κατανοητοί, η Τβ10 θα μπορούσε να εμφανίζει σημαντικές ρυθμιστικές δράσεις στην επούλωση των πληγών, σε συνδυασμό με αυτές της Τβ4. Μάλιστα, σε προγενέστερο άρθρο της βιβλιογραφίας, έχει αναφερθεί η απομόνωση τόσο Τβ4 όσο και Τβ10 από υγρό πληγής του δέρματος (Huang et al., 2006; Sribenja et al., 2009).

Το αμινοτελικό τετραπεπτίδιο της Τβ10 διαφέρει από το αντίστοιχο της Τβ4 ως προς το πρώτο αμινοξύ, όπου αντί για σερίνη (*acetylSer*) έχει αλανίνη (*acetylAla*). Σε αντίθεση με το AcSDKP, το τετραπεπτίδιο AcADKP δεν έχει βρεθεί αυτόνομο σε ιστούς ή σε βιολογικά υγρά, ενώ υπάρχουν ελάχιστες βιβλιογραφικές αναφορές για τη δράση του. Επίσης, θα πρέπει να αναφερθεί ότι το πεπτίδιο AcADKP δεν είναι εμπορικά διαθέσιμο και η μελέτη του προϋποθέτει την εργαστηριακή παρασκευή του μέσω ειδικών πρωτοκόλλων σύνθεσης και καθαρισμού. Αντίθετα, λόγω της γνωστής από τη βιβλιογραφία βιολογικής του δράσης, το πεπτίδιο AcSDKP διατίθεται στην αγορά από συγκεκριμένες Εταιρείες.

Αντικείμενο της παρούσας εργασίας ήταν αρχικά η εργαστηριακή παρασκευή (σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση) των τετραπεπτιδίων AcSDKP και AcADKP, τα οποία, όπως αναφέρθηκε, αποτελούν αμινοτελικά πεπτίδια των βιοδραστικών 43-πεπτιδίων Τβ4 και Τβ10, αντίστοιχα, με επόμενο στόχο την παράλληλη *in vitro* βιολογική τους αξιολόγηση σε συστήματα κυττάρων που σχετίζονται με το φαινόμενο της επούλωσης δερματικών πληγών. Η παράλληλη βιολογική αξιολόγηση και σύγκριση των AcSDKP και AcADKP αποφασίσθηκε λόγω της άλλοτε ομοειδούς και άλλοτε αντίρροπης δράσης των Τβ4 και Τβ10, αντίστοιχα, σε διάφορες ενδοκυτταρικές και εξωκυτταρικές λειτουργίες. Η επιλογή των AcSDKP και AcADKP, έναντι των αντίστοιχων πρόδρομων 43-πεπτιδίων, έγινε επειδή τα τετραπεπτίδια, λόγω του μικρού μοριακού τους μεγέθους, προσφέρουν μεγαλύτερες δυνατότητες πιθανής φαρμακολογικής αξιοποίησης στο μέλλον, ενώ μπορούν ευχερέστερα να χρησιμοποιηθούν ως βάση για το σχεδιασμό βιομιμητικών αναλόγων.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση των τετραπεπτιδίων AcSDKP και AcADKP με την τεχνική της Fmoc-πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεά φάση. Στη συνέχεια, τα τετραπεπτίδια καθαρίστηκαν με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC και η καθαρότητα των τελικών προϊόντων ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC. Κατά τον έλεγχο χρησιμοποιήθηκε εμπορικά διαθέσιμο AcSDKP ως εσωτερικό πρότυπο. Έπειτα, τα καθαρά πεπτίδια ταυτοποιήθηκαν με φασματομετρία μαζών με τη μέθοδο του ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI-MS).

Αφού ολοκληρώθηκαν οι διαδικασίες σύνθεσης, καθαρισμού και ταυτοποίησης των δύο τετραπεπτιδίων, ακολούθησε ο έλεγχος της βιολογικής δράσης τους *in vitro*.

Τα πιο εξειδικευμένα *in vitro* πειραματικά συστήματα μελέτης της επούλωσης εξετάζουν επιλεκτικά κάποια από τις παραμέτρους-κλειδιά, που διέπουν το φαινόμενο της επούλωσης των ιστών, όπως το σχηματισμό της ουλής (σχηματισμός ινώδους), την αγγειογένεση, την επανεπιθηλιοποίηση ή τη συστολή της πληγής. Για τη μελέτη του σχηματισμού της ουλής (ινώδης ιστός) μπορεί να διερευνηθεί η παραγωγή εξωκυττάριας μήτρας από τους ινοβλάστες ή άλλα κύτταρα, μετά από διέγερση με συγκεκριμένους παράγοντες, όπως π.χ. με τον παράγοντα TGF- β που είναι γνωστό ότι επάγει την παραγωγή κολλαγόνου τύπου I. Η αγγειογένεση, από την άλλη πλευρά, είναι δυνατόν να μελετηθεί με πολλές *in vitro* δοκιμασίες, οι περισσότερες από τις οποίες βασίζονται στη χρήση ενδοθηλιακών κυττάρων, όπως τα κύτταρα HUVEC. Όταν τοποθετηθούν σε κατάλληλες τρισδιάστατες μήτρες, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, ιδιαίτερα υπό την επίδραση συγκεκριμένων παραγόντων, σχηματίζουν σωληνοειδείς δομές που μοιάζουν με αγγεία. Η χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη του εμβρύου όρνιθας έχει επίσης χρησιμοποιηθεί ως σύστημα για τη διερεύνηση της αγγειογενετικής δράσης διαφόρων παραγόντων. Επίσης, παράγοντες που προάγουν την επανεπιθηλιοποίηση είναι δυνατόν να μελετηθούν σε *in vitro* κυτταρικά συστήματα, τα περισσότερα από τα οποία βασίζονται στη χρήση κερατινοκυττάρων. Η ταχύτητα της μετανάστευσης των κερατινοκυττάρων μπορεί να αξιολογηθεί με πολλούς τρόπους. Ένας από αυτούς είναι να απομακρυνθεί, με μηχανικά μέσα, ένα «μονοπάτι» (λωρίδα) κερατινοκυττάρων από μια καλλιέργεια που έχει φθάσει σε πληρότητα (confluent). Μόλις δημιουργηθεί κενό ανάμεσα στα κύτταρα της καλλιέργειας, η απώλεια της επαφής μεταξύ των κυττάρων διεγείρει τη μετανάστευση. Ο χρόνος που θα απαιτηθεί για να «κλείσει» το κενό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέτρο της επανεπιθηλιοποίησης. Τέλος, η συστολή της πληγής ελέγχεται συνήθως με το σύστημα «εξωκυττάριας μήτρας που έχει εποικισθεί με ινοβλάστες» (“fibroblast-populated collagen matrix”). Με το σύστημα αυτό, ινοβλάστες τοποθετούνται σε μήτρα κολλαγόνου σχήματος δίσκου. Με την πάροδο του χρόνου, η μήτρα συστέλλεται και, επακολούθως, τα κύτταρα συστέλλονται και μεταναστεύουν. Η ταχύτητα της συστολής εξαρτάται από τη συγκέντρωση των κυττάρων, τη σύσταση της μήτρας και άλλους παράγοντες. Τα παραπάνω *in vitro* συστήματα έχουν κατ’ επανάληψη χρησιμοποιηθεί στην αξιολόγηση της επίδρασης διαφόρων παραγόντων στο φαινόμενο της επούλωσης. (Greenhalgh, 2005)

Στα *in vitro* πειράματα της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν δύο κυτταρικές σειρές, ανθρώπινοι δερματικοί ινοβλάστες AG01523c και ανθρώπινα αθανатоποιημένα κερατινοκύτταρα HaCaT. Οι ινοβλάστες και τα κερατινοκύτταρα είναι κύτταρα του χορίου και της επιδερμίδας αντίστοιχα, τα οποία συμμετέχουν φυσιολογικά σε διάφορα στάδια της επούλωσης μιας πληγής του δέρματος. Έτσι, σε συνδυασμό με τις κατάλληλες πειραματικές συνθήκες καλλιέργειας, τα κύτταρα αυτά παρέχουν ικανοποιητικώς αξιόπιστα μοντέλα προσομοίωσης της διαδικασίας δερματικής επούλωσης *in vitro*.

Με τις *in vitro* κυτταρικές δοκιμασίες της παρούσας εργασίας ελέγχθηκε αρχικά η πιθανή κυτταροτοξική δράση των δύο τετραπεπτιδίων, AcSDKP και AcADKP, σε δερματικούς ινοβλάστες και κερατινοκύτταρα, με τη δοκιμασία MTT, καθώς και η επίδρασή τους στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό δερματικών ινοβλαστών, μέσω του ποσοτικού προσδιορισμού της σύνθεσης DNA με τη μέθοδο τριτιωμένης θυμιδίνης.

Στη συνέχεια, ελέγχθηκε η επίδραση των δύο τετραπεπτιδίων στη σύνθεση κολλαγόνου από τους δερματικούς ινοβλάστες με τη μέθοδο της τριτιωμένης προλίνης, καθώς και η επίδρασή τους στη μετανάστευση των κερατινοκυττάρων, μέσω της δοκιμασίας κυτταρικής μετανάστευσης με σχηματισμό τομής (scratch assay).

Αρχικά, εκτιμήθηκε η πιθανή κυτταροτοξική δράση των τετραπεπτιδίων τόσο σε κερατινοκύτταρα, όσο και σε δερματικούς ινοβλάστες, με τη μέθοδο MTT. Πιο συγκεκριμένα εκτιμήθηκε η βιωσιμότητα των κυττάρων είτε παρουσία των υπό μελέτη πεπτιδίων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, ή παρουσία του γνωστού κυτταροτοξικού παράγοντα δοξορουβικίνη (θετικοί μάρτυρες) καθώς και απουσία οποιουδήποτε παράγοντα (αρνητικοί μάρτυρες). Οι συγκεντρώσεις των πεπτιδίων που δοκιμάστηκαν (10^{-10} έως 10^{-7} M) επιλέχθηκαν βάσει στοιχείων της βιβλιογραφίας (Zhang et al., 2011; Kanasaki et al., 2006).

Στο πλαίσιο των πειραμάτων με τη μέθοδο MTT, πραγματοποιήθηκε ένα συγκριτικό πείραμα, κατά το οποίο ελέγχθηκε η κυτταροτοξικότητα του παρασκευασμένου στο εργαστήριο συνθετικού πεπτιδίου AcSDKP έναντι του αντίστοιχου εμπορικά διαθέσιμου πεπτιδίου, τόσο σε κερατινοκύτταρα όσο και σε ινοβλάστες. Το πείραμα αυτό έγινε για να ελεγχθεί η ύπαρξη ιχνών από τυχόν προσμίξεις στο εργαστηριακά παρασκευασμένο τετραπεπτίδιο, που θα μπορούσαν να επηρεάσουν την κυτταροτοξικότητά του. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το παρασκευασμένο στο εργαστήριο συνθετικό τετραπεπτίδιο AcSDKP, όπως και το αντίστοιχο εμπορικά διαθέσιμο, δεν έδειξε κυτταροτοξική δράση, ούτε παρατηρήθηκαν ουσιώδεις διαφορές μεταξύ των δύο μορφών του τετραπεπτιδίου, ως προς την επίδραση στη βιωσιμότητα των κερατινοκυττάρων και των δερματικών ινοβλαστών. Επίσης, στα ίδια κύτταρα (κερατινοκύτταρα και δερματικούς ινοβλάστες) και με την ίδια μέθοδο (MTT), μελετήθηκαν παράλληλα τα τετραπεπτίδια AcSDKP και AcADKP. Τα δύο τετραπεπτίδια, σε αντίθεση με το γνωστό κυτταροτοξικό παράγοντα δοξορουβικίνη, δεν φάνηκε να παρουσιάζουν κυτταροτοξική δράση, ούτε ως προς κερατινοκύτταρα, ούτε ως προς τους ινοβλάστες, στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν.

Μετά την ποιοτική εκτίμηση της επίδρασης των τετραπεπτιδίων AcSDKP και AcADKP στη βιωσιμότητα των κερατινοκυττάρων και των δερματικών ινοβλαστών με τη μέθοδο MTT και αφού διαπιστώθηκε ότι τα δύο τετραπεπτίδια δεν έχουν κυτταροτοξική δράση, ακολούθησε ποσοτική εκτίμηση της δράσης τους στον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών. Η εκτίμηση αυτή πραγματοποιήθηκε μέσω του ποσοτικού προσδιορισμού της σύνθεσης DNA με τη μέθοδο τριτιωμένης θυμιδίνης. Στη δοκιμασία ποσοτικού προσδιορισμού της σύνθεσης DNA χρησιμοποιήθηκε ένα μόνο είδος κυττάρων, οι δερματικοί ινοβλάστες, και μία μόνο συγκέντρωση των τετραπεπτιδίων AcSDKP και AcADKP, για λόγους εξοικονόμησης αντιδραστηρίων και εργαστηριακών αναλωσίμων. Τα δύο τετραπεπτίδια χρησιμοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 10^{-9} M, με βάση στοιχεία της βιβλιογραφίας, όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο Αποτελέσματα. Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν επίσης κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία του παράγοντα PDGF, που είναι γνωστό ότι επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (θετικοί μάρτυρες) καθώς και κύτταρα που καλλιεργήθηκαν απουσία οποιουδήποτε παράγοντα (αρνητικοί μάρτυρες). Συνολικά, πραγματοποιήθηκαν τέσσερα πειράματα, τα οποία έδειξαν ότι τα δύο τετραπεπτίδια, σε αντίθεση με τον παράγοντα PDGF, δεν προκάλεσαν

στατιστικά σημαντικές μεταβολές στον πολλαπλασιασμό των δερματικών ινοβλαστών, σε σχέση με τους αρνητικούς μάρτυρες.

Στη συνέχεια, προχωρήσαμε στη διεξαγωγή μιας εξειδικευμένης δοκιμασίας, για να εκτιμήσουμε την πιθανή επίδραση των τετραπεπτιδίων AcSDKP και AcADKP στη σύνθεση κολλαγόνου από δερματικούς ινοβλάστες. Τα κύτταρα αυτά επιλέχθηκαν επειδή αποτελούν εξειδικευμένα κύτταρα του δέρματος τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή του κολλαγόνου. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της τριτιωμένης προλίνης, η οποία παρέχει τη δυνατότητα ποσοτικής εκτίμησης του νεοσυντιθέμενου κολλαγόνου από ηρεμούντα κύτταρα που διεγείρονται με κάποιο παράγοντα προαγωγής της κολλαγονοσύνθεσης. Όπως και στη δοκιμασία ποσοτικού προσδιορισμού της σύνθεσης DNA με τη μέθοδο τριτιωμένης θυμιδίνης, ελέγχθηκε μόνο μία συγκέντρωση για κάθε τετραπεπτίδιο (10^{-9} M). Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν επίσης κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία του παράγοντα TGF- β 1, που είναι γνωστό ότι επάγει την κολλαγονοσύνθεση (θετικοί μάρτυρες), καθώς και κύτταρα που καλλιεργήθηκαν απουσία οποιουδήποτε παράγοντα (αρνητικοί μάρτυρες). Συνολικά, πραγματοποιήθηκαν δύο πειράματα, τα οποία έδειξαν ότι τα δύο τετραπεπτίδια, AcSDKP και AcADKP, σε αντίθεση με τον παράγοντα TGF- β 1, πιθανότατα δεν επιφέρουν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στη σύνθεση του κολλαγόνου από τους δερματικούς ινοβλάστες, σε σχέση με τους αρνητικούς μάρτυρες.

Τέλος, προχωρήσαμε στη διεξαγωγή μιας ακόμη εξειδικευμένης δοκιμασίας, η οποία σχετίζεται με τη διαδικασία της επούλωσης του δέρματος. Συγκεκριμένα, ελέγξαμε αν τα τετραπεπτίδια AcSDKP και AcADKP προάγουν ή αναστέλλουν τη μετανάστευση των κερατινοκυττάρων. Όπως και στις προηγούμενες δύο δοκιμασίες, δοκιμάστηκε μία μόνο συγκέντρωση για κάθε τετραπεπτίδιο, συγκεκριμένα η 10^{-9} M, για λόγους εξοικονόμησης αντιδραστηρίων και αναλώσιμων υλικών. Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν επίσης κύτταρα που καλλιεργήθηκαν απουσία οποιουδήποτε άλλου παράγοντα (αρνητικοί μάρτυρες). Συνολικά, πραγματοποιήθηκαν δύο πειράματα: στο πρώτο από αυτά αξιολογήθηκαν παράλληλα και τα δύο τετραπεπτίδια, ενώ στο δεύτερο πείραμα δοκιμάστηκε μόνο το τετραπεπτίδιο AcSDKP, σε σχέση με τους αρνητικούς μάρτυρες, για καλύτερη επαναξιολόγηση των αποτελεσμάτων του πρώτου πειράματος. Συνολικά, παρατηρήθηκε ετερογένεια στα πειραματικά μας αποτελέσματα, όχι μόνο όσον αφορά τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία των τετραπεπτιδίων, αλλά και στα κύτταρα-μάρτυρες, γεγονός που δυσχεραίνει την αξιόπιστη αξιολόγηση της επίδρασης των τετραπεπτιδίων AcSDKP και AcADKP στη μετανάστευση των κερατινοκυττάρων.

Συνοψίζοντας: Οι *in vitro* κυτταρικές δοκιμασίες της παρούσας εργασίας (δοκιμασία κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο MTT, δοκιμασία κυτταρικού πολλαπλασιασμού μέσω προσδιορισμού της σύνθεσης DNA με τη μέθοδο τριτιωμένης θυμιδίνης, δοκιμασία σύνθεσης κολλαγόνου με τη μέθοδο της τριτιωμένης προλίνης και δοκιμασία κυτταρικής μετανάστευσης με σχηματισμό τομής), που έγιναν με δερματικούς ινοβλάστες ή/και κερατινοκύτταρα, δεν έδειξαν στατιστικά σημαντική επίδραση των τετραπεπτιδίων AcSDKP και AcADKP στις υπό μελέτη παραμέτρους, τουλάχιστον υπό τις πειραματικές συνθήκες που ακολουθήθηκαν. Σε ό,τι αφορά το αμινοτελικό τετραπεπτίδιο της T β 10, AcADKP, τα πειραματικά αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην παρούσα εργασία είναι τα μόνα της βιβλιογραφίας,

τουλάχιστον από όσο γνωρίζουμε. Σε ό,τι αφορά το αμινοτελικό τετραπεπτίδιο της Tβ4, AcSDKP, στη βιβλιογραφία υπήρχαν αναφορές σε πειράματα αντίστοιχα με τα δικά μας. Ειδικά σε ό,τι αφορά τις δοκιμασίες της σύνθεσης DNA με τη μέθοδο τριτιωμένης θυμιδίνης και της σύνθεσης κολλαγονόου με τη μέθοδο της τριτιωμένης προλίνης, αντίστοιχα πειράματα με AcSDKP (10^{-9} M) είχαν κατά το παρελθόν διεξαχθεί σε καρδιακούς (όχι δερματικούς) ινοβλάστες αρουραίων (Rhaleb et al., 2001). Τα πειράματα αυτά έδειξαν στατιστικά σημαντική αναστολή τόσο της σύνθεσης του DNA όσο και της κολλαγονοσύνθεσης, παρέχοντας ενδείξεις αντι-ινωτικής δράσης, όμως στα συγκεκριμένα πειράματα το AcSDKP είχε συνεπωαστεί με παράγοντα διέγερσης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και με παράγοντα που προάγει τη σύνθεση κολλαγόνου, αντίστοιχα. Συναφής μεταγενέστερη μελέτη (Peng et al., 2010), κατά την οποία καρδιακοί ινοβλάστες συνεπώασθηκαν με AcSDKP και με τον παράγοντα TGF-β1, έδειξε επίσης στατιστικά σημαντική μείωση στην κολλαγονοσύνθεση των καρδιακών ινοβλαστών, σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα (κύτταρα που επώαστηκαν μόνο παρουσία του παράγοντα TGF-β1). Τέλος, μελέτη του τετραπεπτιδίου AcSDKP ως προς την πιθανή επίδρασή του στην κυτταρική μετανάστευση έχει πραγματοποιηθεί σε διάφορες κυτταρικές σειρές, ειδικά σε ενδοθηλιακά κύτταρα (Liu et al, 2003; Wang et al., 2004), με αποτελέσματα που έδειξαν θετική επίδραση στη μετανάστευση των κυττάρων και αγγειογενετική δράση. Στα δικά μας πειράματα, που έγιναν με κερατινοκύτταρα, υπήρξε μεγάλη ετερογένεια των αποτελεσμάτων, όπως ήδη αναφέρθηκε, και ως εκ τούτου δεν ήταν δυνατή η αξιόπιστη αξιολόγηση της δράσης των τετραπεπτιδίων. Συνεκτιμώντας τα παραπάνω αποτελέσματα, πιστεύουμε ότι θα ήταν ενδιαφέρουσα η συνέχιση της μελέτης εφαρμόζοντας τις δοκιμασίες της παρούσας εργασίας, αλλά σε μεγαλύτερο εύρος συνθηκών (π.χ. σε περισσότερες συγκεντρώσεις των τετραπεπτιδίων, σε συνθήκες συνεπώασης με κατάλληλα επιλεγμένους παράγοντες, κ.λπ.). Επίσης, ενδιαφέρουσα θα ήταν η αξιολόγηση των τετραπεπτιδίων AcSDKP και AcADKP σε επιπλέον *in vitro* πειραματικές δοκιμασίες μελέτης της επούλωσης, με κερατινοκύτταρα και δερματικούς ινοβλάστες ή, ενδεχομένως, και με άλλα κύτταρα που συμμετέχουν στις διαδικασίες της επούλωσης πληγών του δέρματος.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τα πειραματικά αποτελέσματα της παρούσας εργασίας προκύπτει ότι τα τετραπεπτίδια AcSDKP και AcADKP μπορούν να παρασκευασθούν στο εργαστήριο, σε ικανές ποσότητες (της τάξης των mg) και σε υψηλή καθαρότητα, ακολουθώντας συγκεκριμένα πρωτόκολλα σύνθεσης και καθαρισμού. Τα πεπτίδια αυτά δεν είναι τοξικά σε συγκεντρώσεις από 10^{-10} έως 10^{-7} M, όταν επωάζονται με δερματικούς ινοβλάστες (AG01523c) ή κερατινοκύτταρα (HaCaT). Τα παραπάνω πεπτίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε σειρά επιλεγμένων βιολογικών δοκιμασιών, όπως αυτές που εκπονήθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας αλλά και ευρύτερα, με στόχο την περαιτέρω μελέτη της επίδρασής τους στο φαινόμενο της επούλωσης πληγών του δέρματος. Άλλα πεπτίδια της οικογένειας των θυμοσινών ή θραύσματά τους μπορούν επίσης, εν δυνάμει, να παρασκευασθούν στο εργαστήριο και να μελετηθούν μελλοντικά ως προς την πιθανή επουλωτική δράση τους.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Πρατσίνης Χαράλαμπος, "ΕΞΩΓΕΝΗ ΚΑΙ ΕΝΔΟΓΕΝΗ ΜΙΤΟΓΟΝΑ ΚΑΤΑ ΤΟΝ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ" ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ, 1998, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ). Σχολή Θετικών Επιστημών. Τμήμα Βιολογίας. Τομέας Βιοχημείας, Κυτταρικής και Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής (DOI: 10.12681/eadd/11166).
- Amblard M, Fehrentz JA, Martinez J, Subra G. *Methods and protocols of modern solid phase Peptide synthesis*. Mol. Biotechnol. 2006, 33:239-54.
- Berridge MV, Herst PM, Tan AS. *Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction*. Biotechnol. Annu. Rev. 2005, 11:127-52.
- Boron FW, Boulpaep LE. *Ιατρική Φυσιολογία: Κυτταρική και Μοριακή Προσέγγιση*. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης. 2005, p. 628, 1675-1680.
- Boyera N, Galey I, Bernard BA. *Effect of vitamin C and its derivatives on collagen synthesis and cross-linking by normal human fibroblasts*. Int. J. Cosmet. Sci. 1998, 20:151-8.
- Cavašin MA, Rhaleb NE, Yang XP, Carretero OA. *Prolyl oligopeptidase is involved in release of the antifibrotic peptide Ac-SDKP*. Hypertension 2004, 43:1140-5.
- Cavašin MA. *Therapeutic potential of thymosin-beta4 and its derivative N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline (Ac-SDKP) in cardiac healing after infarction*. Am. J. Cardiovasc. Drugs 2006, 6:305-11.
- Chang CD, Waki M, Ahmad M, Meienhofer J, Lundell EO, Haug JD. *Preparation and properties of N-alpha-9-fluorenylmethyloxycarbonylamino acids bearing tert-butyl side chain protection*. Int. J. Pept. Protein Res. 1980, 15:59-66.
- Christensen T. *A qualitative test for monitoring coupling completeness in solid phase peptide synthesis using chloranil*. Acta Chem. Scand. B 1979, 33:763-6.
- Clark RAF. *Wound Repair: Overview and General Considerations*. In: The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair (Clark RAF, Ed.), Springer, 1988, 2, pp.: 4-50.
- Crockford D, Turjman N, Allan C, Angel J. *Thymosin beta4: Structure, function, and biological properties supporting current and future clinical applications*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2010, 1194:179-89.
- Diegelmann RF, Evans MC. *Wound healing: An overview of acute, fibrotic and delayed healing*. Front. Biosci. 2004, 9:283-9.
- Dreifke MB, Jayasuriya AA, Jayasuriya AC. *Current wound healing procedures and potential care*. Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl. 2015, 48:651-62.
- Eming SA, Martin P, Tomic-Canic M. *Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation*. Sci. Transl. Med. 2014, 6(265):265sr6.

- Fan Y, Gong Y, Ghosh PK, Graham LM, Fox PL. *Spatial coordination of actin polymerization and ILK-Akt2 activity during endothelial cell migration*. Dev. Cell. 2009, 16:661-74.
- Freeman KW, Bowman BR, Zetter BR. *Regenerative protein thymosin beta-4 is a novel regulator of purinergic signaling*. FASEB J. 2011, 25:907-15.
- Fromes Y, Liu JM, Kovacevic M, Bignon J, Wdzieczak-Bakala J. *The tetrapeptide acetyl-serine-aspartyl-lysine-proline improves skin flap survival and accelerates wound healing*. Wound Repair Regen. 2006, 14:306-12.
- Goldstein AL, Hannappel E, Kleinman HK. *Thymosin beta4: actin-sequestering protein moonlights to repair injured tissues*. Trends Mol. Med. 2005, 11:421-9.
- Goldstein AL, Kleinman HK. *Advances in the basic and clinical applications of thymosin β 4*. Expert Opin. Biol. Ther. 2015, 15 Suppl 1:S139-45.
- Greenhalgh DG. *Models of wound healing*. J. Burn Care Rehabil. 2005, 26:293-305.
- Hannappel E, Huff T. *The thymosins. Prothymosin alpha, parathymosin, and beta-thymosins: Structure and function*. Vitam. Horm. 2003, 66:257-96.
- Hannappel E. *beta-Thymosins*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2007, 1112:21-37.
- Hannink M, Donoghue DJ. *Structure and function of platelet-derived growth factor (PDGF) and related proteins*. Biochim. Biophys. Acta 1989, 989:1-10.
- Hara T. *Thymosins and muscle regeneration*. Vitam. Horm. 2011, 87:277-90.
- Heldin CH, Johnsson A, Ek B, Wennergren S, Rönstrand L, Hammacher A, Faulders B, Wasteson A, Westermark B. *Purification of human platelet-derived growth factor*. Methods Enzymol. 1987, 147:3-13.
- Hilmer SN, Cogger VC, Muller M, Le Couteur DG. *The hepatic pharmacokinetics of doxorubicin and liposomal doxorubicin*. Drug Metab. Dispos. 2004, 32:794-9.
- Huff T, Müller CS, Otto AM, Netzker R, Hannappel E. *beta-Thymosins, small acidic peptides with multiple functions*. Int. J. Biochem. Cell Biol. 2001, 33:205-20.
- Huff T, Otto AM, Müller CS, Meier M, Hannappel E. *Thymosin beta4 is released from human blood platelets and attached by factor XIIIa (transglutaminase) to fibrin and collagen*. FASEB J. 2002, 16:691-6.
- Kaiser E, Colescott RL, Bossinger CD, Cook PI. *Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides*. Anal. Biochem. 1970, 34:595-8.
- Kanasaki K, Haneda M, Sugimoto T, Shibuya K, Isono M, Isshiki K, Araki S, Uzu T, Kashiwagi A, Koya D. *N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline inhibits DNA synthesis in human mesangial cells via up-regulation of cell cycle modulators*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2006, 342:758-65.
- Kanasaki K, Nagai T, Nitta K, Kitada M, Koya D. *N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline: a valuable endogenous anti-fibrotic peptide for combating kidney fibrosis in diabetes*. Front. Pharmacol. 2014, 5, Article 70.

- Klein JJ, Goldstein AL, White A. *Enhancement of in vivo incorporation of labeled precursors into DNA and total protein of mouse lymph nodes after administration of thymic extracts*. Proc. Natl Acad. Sci. USA 1965, 53:812-7.
- Klein JJ, Goldstein AL, White A. *Effects of the thymus lymphocytopoietic factor*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1966, 135:485-495.
- Kleinman HK, Sosne G. *Thymosin β 4 promotes dermal healing*. Vitam. Horm. 2016, 102:251-75.
- Koutrafouris V, Leondiadis L, Avgoustakis K, Livaniou E, Czarnecki J, Ithakissios DS, Evangelatos GP. *Effect of thymosin peptides on the chick chorioallantoic membrane angiogenesis model*. Biochim. Biophys. Acta - General Subjects 2001, 1568:60–6.
- Kumar N, Nakagawa P, Janic B, Romero CA, Worou ME, Monu SR, Peterson EL, Shaw J, Valeriote F, Onger EM, Niyitegeka JM, Rhaleb NE, Carretero OA. *The anti-inflammatory peptide Ac-SDKP is released from thymosin- β 4 by renal meprin- α and prolyl oligopeptidase*. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 2016, 310:F1026-34.
- Li J, Chen J, Kirsner R. *Pathophysiology of acute wound healing*. Clin. Dermatol. 2007, 25:9-18.
- Liakou E, Mavrogonatou E, Pratsinis H, Rizou S, Evangelou K, Panagiotou PN, Karamanos NK, Gorgoulis VG, Kletsas D. *Ionizing radiation-mediated premature senescence and paracrine interactions with cancer cells enhance the expression of syndecan 1 in human breast stromal fibroblasts: The role of TGF- β* . Aging 2016, 8:1650-69.
- Liang CC, Park AY, Guan JL. *In vitro scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro*. Nat. Protoc. 2007, 2:329-33.
- Lim CK. HPLC of small molecules, a practical approach. IRL Press, 1986.
- Liu JM, Lawrence F, Kovacevic M, Bignon J, Papadimitriou E, Lallemand JY, Katsoris P, Potier P, Fromes Y, Wdzieczak-Bakala J. *The tetrapeptide AcSDKP, an inhibitor of primitive hematopoietic cell proliferation, induces angiogenesis in vitro and in vivo*. Blood 2003, 101:3014-20.
- Low TLK, Hu S-K, Goldstein AL. *Complete amino acid sequence of bovine thymosin β 4: A thymic hormone that induces terminal deoxynucleotidyl transferase activity in thymocyte populations*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1981, 78:1162-6.
- Merrifield B. *Solid phase peptide synthesis I. The synthesis of a tetrapeptide*. J. Am. Chem. Soc. 1963, 85(14):2149-54.
- Mosmann T. *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J. Immunol. Methods 1983, 65:55-63.
- Peng H, Carretero OA, Peterson EL, Rhaleb NE. *Ac-SDKP inhibits transforming growth factor-beta1-induced differentiation of human cardiac*

- fibroblasts into myofibroblasts*. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2010, 298:H1357-64.
- Peterkofsky B, Diegelmann R. *Use of a mixture of proteinase-free collagenases for the specific assay of radioactive collagen in the presence of other proteins*. Biochemistry 1971, 10:988-94.
 - Pipes GT, Yang J. *Cardioprotection by thymosin beta 4*. Vitam Horm. 2016, 102:209-26.
 - Pratsinis H, Armatas A, Kletsas D. *Response of fetal and adult cells to growth factors*. In: Human Fetal Tissue Transplantation (Bhattacharya N, Stubblefield P, Eds), Springer, 2013, pp. 65-77.
 - Pradelles P, Frobert Y, Créminon C, Liozon E, Massé A, Frindel E. *Negative regulator of pluripotent hematopoietic stem cell proliferation in human white blood cells and plasma as analysed by enzyme immunoassay*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1990, 170:986-93.
 - Prathap B, Dey A, Srinivasa rao GH, Johnson P, Arthanariswaran P. *A review - Importance of RP-HPLC in analytical method development*. IJNTPS 2013, 3:15-23.
 - Rhaleb NE, Peng H, Harding P, Tayeh M, LaPointe MC, Carretero OA. *Effect of N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline on DNA and collagen synthesis in rat cardiac fibroblasts*. Hypertension 2001, 37:827-32.
 - Robinson S, Lenfant M, Wdzieczak-Bakala J, Riches A. *The molecular specificity of action of the tetrapeptide acetyl-N-Ser-Asp-Lys-Pro (AcSDKP) in the control of hematopoietic stem cell proliferation*. Stem Cells 1993, 11:422-7.
 - Senturk N, Keles GC, Kaymaz FF, Yildiz L, Acikgoz G, Turanli AY. *The role of ascorbic acid on collagen structure and levels of serum interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha in experimental lathyrism*. Clin. Exp. Dermatol. 2004, 29:168-75.
 - Smart N, Rossdeutsch A, Riley PR. *Thymosin β 4 and angiogenesis: Models of action and therapeutic potential*. Angiogenesis 2007a, 10:229-41.
 - Smart N, Risebro CA, Melville AA, Moses K, Schwartz RJ, Chien KR, Riley PR. *Thymosin beta4 induces adult epicardial progenitor mobilization and neovascularization*. Nature. 2007b, 7124:177-82.
 - Sosne G, Qiu P, Goldstein AL, Wheeler M. *Biological activities of thymosin beta4 defined by active sites in short peptide sequences*. FASEB J. 2010, 24:2144-51.
 - Sribenja S, Li M, Wongkham S, Wongkham C, Yao Q, Chen C. *Advances in thymosin beta10 research: Differential expression, molecular mechanisms, and clinical implications in cancer and other conditions*. Cancer Invest. 2009, 27:1016-22.
 - Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. *Doxorubicin: An update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems*. J. Pharm. Pharmacol. 2013, 65:157-70.

- Tejiram S, Kavalukas SL, Shupp JW, Barbul A. *Wound Healing*. In: *Wound Healing Biomaterials. Volume 1: Therapies and Regeneration*. Regeneration. (Agren M., Ed.), Elsevier, 2016, pp. 3-39.
- Theunissen W, Fanni D, Nemolato S, Di Felice E, Cabras T, Gerosa C, Van Eyken P, Messana I, Castagnola M, Faa G. *Thymosin beta 4 and thymosin beta 10 expression in hepatocellular carcinoma*. Eur. J. Histochem. 2014, 58:2242
- Treadwell T, Kleinman HK, Crockford D, Hardy MA, Guarnera GT, Goldstein AL. *The regenerative peptide thymosin β 4 accelerates the rate of dermal healing in preclinical animal models and in patients*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2012, 1270:37-44.
- Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. *The wound healing process: An overview of the cellular and molecular mechanisms*. J. Int. Med. Res. 2009, 37:1528-42.
- Wang D, Carretero OA, Yang XY, Rhaleb NE, Liu YH, Liao TD, Yang XP. *N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline stimulates angiogenesis in vitro and in vivo*. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2004, 287:H2099-105.
- Watson DG. *Φαρμακευτική Ανάλυση*. Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου, 2^η έκδοση, 2005, σελ. 264-6.
- Wynn TA. *Cellular and molecular mechanisms of fibrosis*. J. Pathol. 2008, 214:199-210.
- Xu H, Yang F, Sun Y, Yuan Y, Cheng H, Wei Z, Li S, Cheng T, Brann D, Wang R. *A new antifibrotic target of Ac-SDKP: Inhibition of myofibroblast differentiation in rat lung with silicosis*. PLoS One 2012, 7(7):e40301.
- Yang H, Cheng X, Yao Q, Li J, Ju G. *The promotive effects of thymosin beta4 on neuronal survival and neurite outgrowth by upregulating L1 expression*. Neurochem. Res. 2008, 33:2269-80.
- Zervolea I, Pratsinis H, Tsagarakis S, Karavitaki N, Stathakos D, Thalassinos N, Kletsas D. *The impact of chronic in vivo glucocorticoid excess on the functional characteristics of human skin fibroblasts obtained from patients with endogenous Cushing's syndrome*. Eur. J. Endocrinol. 2005, 152:895-902.
- Zhang L, Yang F, Li Q, Zhang X, Wang R. *AcSDKP inhibits the proliferation and collagen expression of cardiac fibroblasts induced by PDGF through blocking the ERK1/2 and JNK pathway activation*. International Conference on Human Health and Biomedical Engineering. 2011.
- Zhang Y, Zhang ZG, Chopp M, Meng Y, Zhang L, Mahmood A, Xiong Y. *Treatment of traumatic brain injury in rats with N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline*. J. Neurosurg. 2017, 126:782-95.
- Zikos C, Livaniou E, Leondiadis L, Ferderigos N, Ithakissios DS, Evangelatos GP. *Comparative evaluation of four trityl-type amidomethyl polystyrene resins in Fmoc solid phase peptide synthesis*. J. Pept. Sci. 2003, 9:419-29.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΗΜΗΣΕΩΝ

AcADKP	– Tβ10[1-4], <i>acetyl</i> Ala-Asp-Lys-Pro-OH
AcSDKP	- Tβ4[1-4], <i>acetyl</i> Ser-Asp-Lys-Pro-OH
AG01523c	- Ανθρώπινοι δερματικοί ινοβλάστες
Akt2	- Πρωτεϊνική κινάση B
α-SMA	(α-Smooth Muscle Actin)- Ακτίνη-α των λείων μυϊκών κυττάρων
βAPN	(β-Amino Propionitrile) - β-Αμινοπροπιονιτρίλιο
bFGF	(basic Fibroblast Growth Factor) - Βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών
Boc	(Butyloxycarbonyl group)
tBu	(tert-Butyl group)
BSA	(Bovine Serum Albumin) - Αλβουμίνη βόειου ορού
CH₃CN	- Ακετονιτρίλιο
DCM	- Διχλωρομεθάνιο
DIC	- N,N'-δισοπροπυλοκαρβοδιμίδιο
DIEA	- Δισοπροπυλοαιθυλαμίνη
DMF	- N,N'-διμεθυλοφορμαμίδιο
DMEM	(Dulbecco's Minimal Essential Medium) - Θρεπτικό υλικό
DMSO	- Διμεθυλοσουλφοξείδιο
ECM	(Extracellular Matrix) – Εξωκυττάρια μήτρα
EGF	(Epidermal Growth Factor) - Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
EPCs	(Endothelial Progenitor Cells) – Ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα
ERK κινάση	(Extracellular Signal - Regulated Kinase)
ESI-MS	(ElectroSpray Ionization Mass Spectrometry) - Φασματομετρία μαζών με μέθοδο του ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό

FBS (Fetal Bovine Serum) - Εμβρυϊκός βόειος ορός

FGF (Fibroblast Growth Factor) - Αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών

Fmoc (9-Fluorenylmethoxycarbonyl group)

HaCaT - Ανθρώπινα αθανатоποιημένα κερατινοκύτταρα

HB-EGF (Heparin-Binding Epidermal Growth Factor) – Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας που μπορεί να δεσμεύεται με την ηπαρίνη

Hepes (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)

³H-TdR - Επισημασμένη με τρίτιο θυμιδίνη

HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) - Ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα ομφάλιας φλέβας

IL-1 (Interleukin-1) - Ιντερλευκίνη-1

ILK (Integrin Linked Kinase) - Κινάση συνδεδεμένη με ιντεγκρίνη

L-[5-³H]Proline - Τριτιωμένη προλίνη

MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) – Χημειοτακτική πρωτεΐνη των μονοκυττάρων-1

MEA - Μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτασίνης (ACE - Angiotensin Converting Enzyme)

MMPs (Matrix Metalloproteinases) – Μεταλλοπρωτεϊνάσες μήτρας

MTT - 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NF-κB (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

NEM (N-ethyl-maleimide) - Ν-αιθυλμηλεϊμίδιο

Oxyma - ethyl cyanohydroxyiminoacetate

PBS (Phosphate Buffer Saline) - Ισοτονικό ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών - χλωριούχων

PDGF (Platelet Derived Growth Factor) - Αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας

pI - Ισοηλεκτρικό σημείο

POP (prolyl oligopeptidase) - Προλυλο-ολιγοπεπτιδάση

POPOP - 1,4-bis(5-Phenylloxazol-2-yl) benzene

PPO - 2,5-Diphenyloxazole

RP-HPLC (Reverse Phase - High Performance Liquid Chromatography) - Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης

SBE - Smad-Binding Element

SDS - Sodium dodecyl sulfate

SPPS (Solid Phase Peptide Synthesis) - Πεπτιδική σύνθεση σε στερεά φάση

Tβ4 (Thymosin β4) - Θυμοσίνη β4

Tβ10 (Thymosin β10) - Θυμοσίνη β10

Tβ15 (Thymosin β15) - Θυμοσίνη β15

TF5 (Thymosin Fraction 5) - Θυμοσινικό κλάσμα 5

TFA - Τριφθοροξικό οξύ

TGF-α (Transforming Growth Factor-α) - Μετασχηματίζων αυξητικός παράγοντας-α

TGF-β (Transforming Growth Factor-β) - Μετασχηματίζων αυξητικός παράγοντας-β

THF - Τετραϋδροφουράνιο

TIS - Τρισοπροπυλοσιλάνιο

TNF-α (Tumor Necrosis Factor – α) - Παράγοντας νέκρωσης όγκων - α

VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) - Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας