



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

Εργαστήριο Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού και Γήρανσης, ΙΒΕ,
«ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ»

~~~~~

**Επίδραση Θυμοσινικών Πεπτιδίων σε  
Ανθρώπινους Δερματικούς Ινοβλάστες in  
vitro για τη Ρύθμιση Κυτταρικών Λειτουργιών  
Σχετικών με την Επούλωση.**

Διπλωματική Εργασία  
Αννα Σαντοριναίου, Βιολόγος

**Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης  
«Κοσμητολογία - Δερματοφαρμακολογία»  
Τμήμα Φαρμακευτικής,**

Αθήνα, 2019

## **ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ**

Ράλλης Μιχαήλ

Επίκουρος Καθηγητής του Τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Κλέτσας Δημήτριος

Ερευνητής Α΄ - Διευθυντής ΙΒΕ, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

Δάλλας Παρασκευάς

Επίκουρος Καθηγητής Τομέας Φαρμακευτικής Τεχνολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

## **ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΣΠΟΥΔΩΝ ΚΑΙ ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ :**

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

## **ΣΥΝΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ:**

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

Πρατσίνης Χαράλαμπος, Εντεταλμένος ερευνητής ΙΒΕ, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Για την πραγματοποίηση και ολοκλήρωση της συγκεκριμένης ερευνητικής εργασίας συνέβαλαν αρκετοί άνθρωποι, τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω έστω και μέσα από αυτές τις λίγες γραμμές.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ράλλη Μιχαήλ, Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος Φαρμακευτικής και υπεύθυνο του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών Κοσμητολογίας-Δερματοφαρμακολογίας του τμήματος Φαρμακευτικής, για όλη την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης του μεταπτυχιακού μου και ο οποίος μου έδωσε την ευκαιρία να συμμετάσχω στο συγκεκριμένο μεταπτυχιακό, μεταδίδοντάς μου όλη την απαραίτητη γνώση που χρειαζόμουν ως βάση για τη μετέπειτα εξέλιξη μου επαγγελματικά και με ένταξε στο, νέο για εμένα, χώρο του φαρμάκου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον κ. Δημήτριο Κλέτσα, Ερευνητής Α΄-Διευθυντή ΙΒΕ, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» που μου επέτρεψε να πραγματοποιήσω την διπλωματική μου εργασία και με καλωσόρισε θερμά στο εργαστήριό του. Με εισήγαγε στο κόσμο της Μοριακής Βιολογίας Είμαι ιδιαίτερα ευγνώμων για τον πολύτιμο χρόνο του που μου αφιέρωσε, παρέχοντάς μου σημαντικές συμβουλές και καθοδήγηση. Επίσης, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω και για την παραχώρηση των απαραίτητων αναλώσιμων υλικών και πρωτοκόλλων για την διεξαγωγή των in vitro πειραμάτων.

Τις βαθιές μου ευχαριστίες θα ήθελα επίσης να εκφράσω για τον κ.Χαράλαμπο Πρατσίνη, Ερευνητή Β΄ του ΙΒΕ, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» και συνεπιβλέποντα στη διπλωματική μου εργασία ο οποίος ήταν δίπλα μου καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της συγκεκριμένης ερευνητικής εργασίας, καθοδηγώντας με και δίνοντας μου όλα τα απαραίτητα μαθησιακά εφόδια για την εκπόνηση της εργασίας, ανοίγοντας μου νέους ορίζοντες και μαθαίνοντας μου νέους τρόπους σκέψης και κριτικής. Τον ευχαριστώ ιδιαιτέρως για όλη της την βοήθεια, στήριξή του κάθε φορά που τα «έβρισκα δύσκολα» αλλά και για τα πολύτιμα εφόδια γνώσεων που μου προσέφερε σχετικά με τον τομέα Μοριακής και Κυτταρικής Βιολογίας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω και για τον κ. Δάλλα Παρασκευά, Επίκουρο καθηγητή του Τμήματος Φαρμακευτικής, ο οποίος και εκείνος ως καθηγητής μου στο μεταπτυχιακό μου έδωσε πολύτιμα και απαραίτητα εφόδια γνώσεων και δέχτηκε να αποτελέσει το τρίτο μέλος της εξεταστικής επιτροπής της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας.

Τέλος, θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω την κα.Λιβανίου, Ερευνήτρια Α΄ του ΠΙΡΕΤΕΑ, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», για την προθυμία της να βοηθήσει και να μας καθοδηγήσει κάθε φορά!

Και σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου για τις όμορφες στιγμές και την απεριόριστη βοήθεια που μου έδωσαν απλόχερα όσες φορές την είχα ανάγκη.

Στην Οικογένειά μου  
και τους φίλους μου.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

|                                                                      |                                     |
|----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....                                                        | 7                                   |
| ABSTRACT.....                                                        | 9                                   |
| ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....                                                        | 11                                  |
| 1. ΕΠΟΥΛΩΣΗ ΕΛΚΩΝ - WOUND HEALING .....                              | 12                                  |
| ➤ ΤΟ ΔΕΡΜΑ .....                                                     | 12                                  |
| ➤ Η ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ ΤΩΝ ΠΛΗΓΩΝ .....                            | 17                                  |
| 2. ΜΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΠΟΥΛΩΣΗ ΠΛΗΓΩΝ .....                              | 28                                  |
| 3. ΘΥΜΟΣΙΝΕΣ – THYMOSINS.....                                        | 31                                  |
| ΘΥΜΟΣΙΝΙΚΟ ΠΕΠΤΙΔΙΟ Tα1 .....                                        | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |
| ΘΥΜΟΣΙΝΙΚΟ ΠΕΠΤΙΔΙΟ Tβ4 .....                                        | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |
| ΤΕΤΡΑΠΕΠΤΙΔΙΟ Ac-SDKP .....                                          | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |
| 4. ΑΥΞΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ .....                                        | 52                                  |
| • Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF) .....                       | 53                                  |
| • Αυξητικός Παράγοντας Ινοβλαστών (FGF) .....                        | 55                                  |
| • Μετασχηματίζον αυξητικός παράγοντας β (TGF-beta).....              | 56                                  |
| • Αιμοπεταλιακός Αυξητικός Παράγοντας (PDGF) .....                   | 58                                  |
| • Αυξητικός Παράγων Αγγειακού Ενδοθηλίου (VEGF).....                 | 59                                  |
| 5. ΚΟΛΛΑΓΟΝΑ ΣΤΗΝ ΕΠΟΥΛΩΣΗ ΠΛΗΓΩΝ .....                              | 61                                  |
| 6. ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΙΝΑΣΕΣ (MMP's) .....                                  | 64                                  |
| <i>Ο Ρόλος των Μεταλλοπρωτεϊνών στην Επουλωτική Διαδικασία .....</i> | <i>65</i>                           |
| <i>Ο Ρόλος των Αναστολέων των Μεταλλοπρωτεϊνών στην Επουλωτική</i>   | <i>70</i>                           |
| <i>Διαδικασία.....</i>                                               | <i>72</i>                           |
| ΣΚΟΠΟΣ .....                                                         | 72                                  |
| ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....                                               | 74                                  |
| ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΔΙΕΞΑΓΩΓΗΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ .....                                 | 79                                  |
| Επιλογή Κυτταρικής Σειράς.....                                       | 79                                  |
| Θυμοσινικά Πεπτίδια .....                                            | 80                                  |
| ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ .....                                           | 82                                  |
| 1) Ξεπάγωμα Κυττάρων από Υγρό Άζωτο .....                            | 84                                  |
| 2) Ανακαλλιέργεια Κυττάρων.....                                      | 84                                  |
| 3) Συγχρονισμός Κυττάρων στη Φάση G0 .....                           | 85                                  |
| 4) Πάγωμα Κυττάρων σε Υγρό Άζωτο .....                               | 85                                  |

|                                                                                                                                     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5) Καταμέτρηση Κυττάρων με Σωματιδιακό Αναλυτή .....                                                                                | 86  |
| Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου παρουσία<br>δωδεκυλοθειικού νατρίου (SDS-PAGE) .....                                      | 86  |
| Ανοσοαποτύπωμα (Western blot) .....                                                                                                 | 90  |
| Προσδιορισμός Μεταλλοπρωτεϊνών με τη μέθοδο της ενζυμογραφίας<br>(Zymography) .....                                                 | 97  |
| Ποσοτική ανάλυση της πέψης συνθετικού υποστρώματος που εμφανίζει<br>φθορισμό μέσω μεταφοράς ενέργειας λόγω συντονισμού (FRET) ..... | 99  |
| Μέθοδος προσομοίωσης επούλωσης πληγών δι' αμυχής (Wound Healing<br>Assay) .....                                                     | 103 |
| Έλεγχος γονιδιακής έκφρασης με την τεχνική της Real Time RT-PCR ...                                                                 | 105 |
| 1) Αρχή λειτουργίας της PCR .....                                                                                                   | 105 |
| 2) Αρχή λειτουργίας της Real-Time PCR .....                                                                                         | 107 |
| Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης με χρήση της αντίστροφης<br>μεταγραφάσης (Real-Time RT-PCR) .....                               | 110 |
| Στατιστική Ανάλυση Αποτελεσμάτων .....                                                                                              | 115 |
| <i>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</i> .....                                                                                                           | 116 |
| 1. Ποσοτική Εκτίμηση του Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού Ανθρωπίνων<br>Δερματικών Ινοβλαστών .....                                       | 117 |
| 2. Ποσοτική Εκτίμηση της Μετανάστευσης Ανθρωπίνων Δερματικών<br>Ινοβλαστών .....                                                    | 118 |
| 3. Μελέτη της Παραγωγής και Αποικοδόμησης του Κολλαγόνου σε<br>Ανθρώπινους Δερματικούς Ινοβλάστες .....                             | 121 |
| 3.1. Έλεγχος γονιδιακής έκφρασης με την τεχνική της Real Time RT-<br>PCR .....                                                      | 121 |
| 3.2 Έλεγχος της Ενεργότητας Μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs) που<br>εκκρίνονται από ανθρώπινους Δερματικούς Ινοβλάστες .....                 | 127 |
| 4. Μελέτη της Επίδρασης των Θυμοσινικών Πεπτιδίων Μονοπάτια<br>Ενδοκυτταρικής Σηματοδότησης .....                                   | 132 |
| <i>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</i> .....                                                                                                               | 140 |
| <i>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</i> .....                                                                                                           | 149 |

# ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αντικείμενο μελέτης της παρούσας πειραματικής εργασίας ήταν η βιολογική αξιολόγηση των ενδογενών θυμοσινικών πεπτιδίων θυμοσίνη α1 (Ta1) και θυμοσίνη β4 (Tβ4), καθώς και του αμινοτελικού τετραπεπτιδίου της Tβ4 (Ac-SDKP), σε *in vitro* κυτταρικές δοκιμασίες, με ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες, όσον αφορά σημαντικές παραμέτρους της επούλωσης πληγών.

Τα πεπτίδια αυτά ευρίσκονται σχεδόν σε όλα τα κύτταρα του ανθρώπινου οργανισμού συμμετέχοντας σε ποικίλες διαδικασίες, μεταξύ των οποίων και η επούλωση πληγών. Ιδιαίτερα όσον αφορά το θυμοσινικό πεπτίδιο Tβ4 και το αμινοτελικό τετραπεπτίδιο Ac-SDKP υπάρχουν στη βιβλιογραφία πολλά δεδομένα που στηρίζουν τη θετική τους επίδραση στην επιδιόρθωση διαφόρων τύπων ιστών όπως για παράδειγμα καρδιακό, νεφρικό, κερατοειδή χιτώνα ματιού, κ.α., καθώς και μελέτες σε πειραματόζωα που υποδεικνύουν συμμετοχή στην επούλωση δερματικών πληγών. Στον αντίποδα, ολιγάριθμες είναι οι βιβλιογραφικές αναφορές για το θυμοσινικό πεπτίδιο Ta1 σε σχέση με την επούλωση πληγών.

Στην παρούσα εργασία εστιάσαμε στη μελέτη βασικών κυτταρικών λειτουργιών όπως ο κυτταρικό πολλαπλασιασμός, η κυτταρική μετανάστευση και η παραγωγή του κολλαγόνου, οι οποίες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της επούλωσης. Για να διαλευκανθεί ο τρόπος δράσης των εν λόγω θυμοσινικών πεπτιδίων πραγματοποιήθηκαν μηχανιστικές μελέτες σχετικά με τη μεταγραφική ρύθμιση (γονιδιακή έκφραση) του κολλαγόνου τύπου I και III, των κολλαγονολυτικών ενζύμων MMP-1 και MMP-2 καθώς και των ιστικών αναστολέων των ενζύμων αυτών TIMP1 και TIMP2. Επίσης μελετήθηκε σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο η ενεργότητα των εκκρινόμενων μεταλλοπρωτεϊνών καθώς και η διεγερση κομβικών σηματοδοτικών μονοπατιών (Smad-2 / -3, MAPKs) από τα θυμοσινικά πεπτίδια.

Σχετικά με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρική μετανάστευση φαίνεται πως και τα τρία θυμοσινικά πεπτίδια δρουν διεγερτικά με εντονότερη την επίδραση της Ta1 στην κυτταρική μετανάστευση ανθρώπινων ινοβλαστών. Όσον αφορά τη γονιδιακή έκφραση, παρατηρήθηκε επαγωγή του γονιδίου του κολλαγόνου I και III από την θυμοσίνη Tβ4, ενώ η Ta1 και το Ac-SDKP σε υψηλή συγκέντρωση (10nM) φαίνεται να αναστέλλουν την μεταγραφή του κολλαγόνου τύπου III. Επιπλέον, και τα τρία θυμοσινικά πεπτίδια φαίνεται να αναστέλλουν το γονίδιο της MMP-1 ενώ διεγείρουν το γονίδιο της MMP-2. Τέλος η έκφραση των TIMPs δεν φαίνεται να επηρεάζεται σημαντικά, με εξαίρεση την αναστολή της μεταγραφής του TIMP-1 από το Ac-SDKP. Όσον αφορά την proMMP2 με την

δράση των θυμοσινικών πεπτιδίων Τα1 και με το τετραπεπτίδιο Ac-SDKP (1nM και 10nM) φάνηκε να αυξάνεται αρκετά έντονα η εκκρισή της

Από τη μελέτη της ενδοκυτταρικής σηματοδότησης προέκυψαν ενδείξεις διέγερσης των ERK και JNK κυρίως αμέσως μετά την προσθήκη των θυμοσινών α1 και β4. Τέλος κατά την ταυτόχρονη χορήγηση θυμοσινικών πεπτιδίων με τον αυξητικό παράγοντα TGF-β φαίνεται να ενισχύεται η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Smad-3 με τρόπο χρονοεξαρτώμενο, γεγονός που συνάδει με τη συνεργιστική δράση θυμοσινικών πεπτιδίων και TGF-β στην επαγωγή της σύνθεσης κολλαγόνου.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα των *in vitro* μελετών μας υποστηρίζουν την επουλωτική δράση των μελετηθέντων θυμοσινικών πεπτιδίων, μέσω της διέγερσης του πολλαπλασιασμού και της μετανάστευσης των ανθρωπίνων δερματικών ινοβλαστών και παρέχουν κάποια αρχικά μηχανιστικά δεδομένα για τον τρόπο με τον οποίο τα πεπτίδια αυτά διεγείρουν τη σύνθεση κολλαγόνου.

## ABSTRACT

The main purpose of the present study was the *in vitro* biological evaluation of peptides, thymosin  $\alpha$ 1 (T $\alpha$ 1), thymosin  $\beta$ 4 (T $\beta$ 4) and its N-terminal tetrapeptide Ac-SDKP using cell strains which are associated with dermal wound healing. The T $\alpha$ 1, T $\beta$ 4 and Ac-SDKP belong to the family of thymosins, which are endogenous peptides and are present in almost all human cells.

Both T $\beta$ 4 and AcSDKP have a positive effect on the wound healing process of various tissues (heart, kidney, liver, skin) according to *in vitro* assays (endothelial cells, fibroblasts of cardiac and renal origin etc.) and *in vivo* assays in animal models. The few studies on the effect of T $\alpha$ 1 on the dermal wound healing phenomenon are mainly related to its angiogenic effect in *in vitro* assays, as well as, to its overall effect in animal models.

In an attempt to unravel the mechanisms of the healing effects of T $\beta$ 4 and Ac-SDKP and to further investigate the potential effects of T $\alpha$ 1, human cutaneous fibroblasts, which are actively participating in most stages of healing, were selected as a study system for an *in vitro* simulation of the dermal healing process. In particular, the effects of the T $\alpha$ 1, T $\beta$ 4 and Ac-SDKP peptides on fibroblast proliferation and migration were studied. Moreover, their effects on the regulation of collagen, matrix metalloprotease (MMP) and tissue inhibitor of MMP (TIMP) gene expression were examined, as well as, on the levels of MMP secretion in fibroblast conditioned media. Finally, the ability of the three thymosinic peptides to trigger pivotal signal transduction pathways was also tested.

Fibroblast proliferation was marginally yet statistically significantly stimulated by all three thymosinic peptides. Migration of these cells was also induced by these peptides, with T $\alpha$ 1 exhibiting the most potent effect. T $\beta$ 4 was found to induce both type-I and type-III collagen gene expression, while T $\alpha$ 1 and Ac-SDKP at high concentration (10 nM) inhibited the expression of collagen type-III. All three peptides inhibited MMP-1 gene expression but they stimulated the transcription of MMP-2 gene. TIMP expression was not altered, with the exception of TIMP-1 inhibition by Ac-SDKP. Furthermore, T $\alpha$ 1 and Ac-SDKP were found to induce the secretion of pro-MMP2 in human fibroblast supernatants.

Signal transduction studies offered indications of ERK and JNK phosphorylation, especially at the early time-points following their administration. Finally, during simultaneous treatment of human skin fibroblasts with the thymosinic peptides and the potent ECM inducer TGF- $\beta$ , Smad-3 phosphorylation was found to be enhanced (compared to the individual effect of TGF- $\beta$ ) in a time-dependent manner, a fact consistent with the additive effects exerting the three thymosinic peptides and TGF- $\beta$  on collagen synthesis when administered jointly.

In conclusion, the results of our *in vitro* studies support the beneficial effects of the three thymosinic peptides on wound healing through the induction of skin fibroblast proliferation and migration. Also, our data provide some clues regarding the mechanisms underlying the stimulatory effects of the thymosinic peptides on skin fibroblast collagen synthesis.

## ***ΕΙΣΑΓΩΓΗ.***

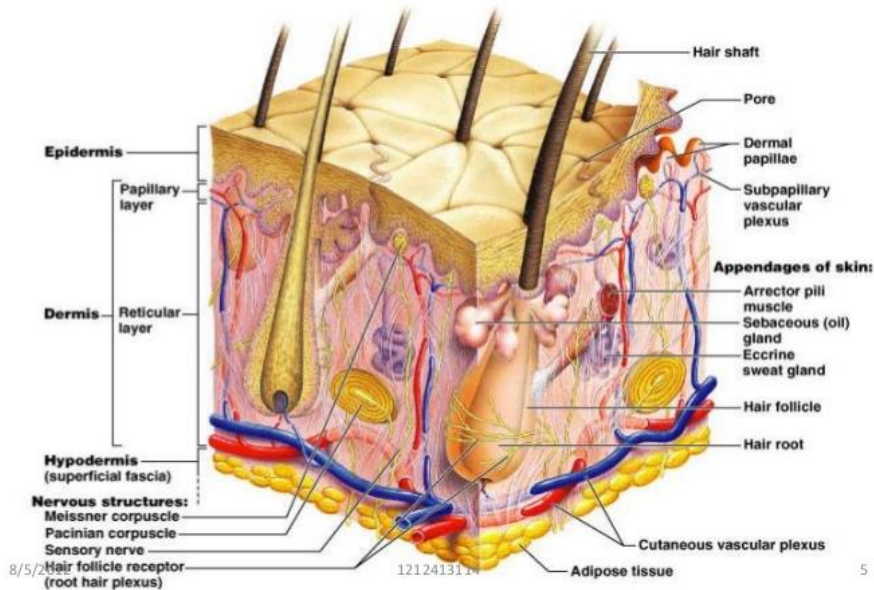
## **1. ΕΠΟΥΛΩΣΗ ΕΛΚΩΝ - WOUND HEALING**

Η επούλωση των τραυμάτων είναι μια πολύπλοκη και δυναμική διαδικασία αντικατάστασης των κυτταρικών δομών και των στρωμάτων των ιστών τα οποία έχουν υποστεί κάποια ρήξη. Η διαδικασία της επούλωσης αποτελείται από πολλαπλά γεγονότα που συμπεριλαμβάνουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφόρων κυτταρικών και μοριακών συνιστωσών οι οποίες συμβάλλουν στο κλείσιμο του τραύματος δημιουργώντας με αυτό τον τρόπο τον καινούριο λειτουργικό ιστό. Οι δυνατότητες για επούλωση των ελκών διαφέρουν ανάλογα με τον ιστό που παθαίνει ρήξη κάθε φορά στον οργανισμό. Ιστοί όπως οι επιθηλιακοί, λεμφοειδείς, αιμοποιητικοί, μεσεγχυματικοί (και αντίστοιχα κυτταρικοί τύποι όπως ινοβλάστες, οστεοβλάστες, χονδροκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα) αλλά και ιστοί με υψηλή αγγείωση εμφανίζουν μεγαλύτερη δυνατότητα αναγέννησης και επούλωσής τους σε σχέση με τα νεύρα, τους μύες (σκελετικοί και καρδιακοί) και τους χόνδρους οι οποίοι έχουν χαμηλότερη δυνατότητα επούλωσης .

### ➤ **ΤΟ ΔΕΡΜΑ**

Το δέρμα καλύπτει εξωτερικά τον ανθρώπινο οργανισμό και αποτελεί το σημείο του σώματος που έρχεται σε άμεση επαφή με το περιβάλλον, γι' αυτό και διαθέτει ιδιότητες απαραίτητες για την επιβίωση. Δεν πρόκειται ουσιαστικά και μόνο για ένα απλό προστατευτικό κάλυμμα αλλά για ένα φράγμα που παρεμποδίζει τη διείσδυση βλαβερών ξένων ουσιών και ακτινοβολίας, ελέγχει την απώλεια πολύτιμων υγρών από το σώμα, προστατεύει από τα μηχανικά χτυπήματα και ρυθμίζει την απώλεια θερμότητας από τον οργανισμό. Συνήθως, αναφέρεται ως το πιο μεγάλο όργανο στο σώμα και διακρίνεται σε 2 χαρακτηριστικές στοιβάδες που είναι οι εξής : 1) Η επιδερμίδα και 2) το χόριο ή δερμίδα (κυρίως δέρμα), όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα.

# Structure of skin



**Εικόνα Ε. 1:** Η δομή του δέρματος σε εγκάρσια τομή. Διακρίνονται τα επιμέρη του. (Dr Laxman Khanal, Assistant Professor, Human Anatomy at BP Koirala Institute of Health Sciences, 2012)/ <http://www.webset-lms.com/vtct/Course.aspx?id=4431>

1) Η **Επιδερμίδα** : Αποτελεί το λεπτό, εξωτερικό επίπεδο του δέρματος, το οποίο και έρχεται σε απευθείας επαφή με το εξωτερικό περιβάλλον, δεν περιέχει αιμοφόρα αγγεία και έχει την ικανότητα να αναγεννάται από μόνο του κάθε 4 με 6 βδομάδες. Το πάχος της επιδερμίδας είναι συνήθως 0,03 έως 0,05 mm στις παλάμες των χεριών και 2 έως 4 mm στις πατούσες των ποδιών. Περιέχει μελανίνη και καροτίνη οι οποίες συνεισφέρουν στην δημιουργία του χρώματος του εκάστοτε δέρματος αλλά σε μεγαλύτερο ποσοστό το χρώμα του δέρματος και η ικανότητα να μαυρίζει εξαρτάται από τη μελανίνη. Η επιδερμίδα, από το χόριο και προς τα έξω διακρίνεται σε 5 υποστοιβάδες που περιέχουν κερατινοκύτταρα και οι οποίες είναι οι εξής :

- Η βασική στοιβάδα
- Η ακανθωτή στοιβάδα
- Η κοκκιώδης στοιβάδα
- Η διαυγής στοιβάδα
- Η κεράτινη στοιβάδα

Βασική Στοιβάδα : Είναι η βαθύτερη στιβάδα της επιδερμίδας και αποτελεί το όριο μεταξύ της επιδερμίδας και του χόριου. Αποτελεί περιοχή παραγωγής των κερατινοκυττάρων, ενώ διαθέτει μελανοκύτταρα και κύτταρα Merkel τα οποία είναι ένα είδος αισθητηριακών κυττάρων. Η βασική στοιβάδα είναι υπεύθυνη, μαζί με την αρχική μοίρα της επόμενης στοιβάδας, για τη συνεχή ανανέωση των επιδερμικών κυττάρων ενώ ταυτοχρόνως χαρακτηρίζεται από μία έντονη μιτωτική δραστηριότητα και περιέχει πολλά αρχέγονα κύτταρα. Τα επιθηλιακά της κύτταρα παρουσιάζουν μιτώσεις και πολλαπλασιάζονται ανεβαίνοντας την επιφάνεια για να σχηματίσουν τελικώς την ανώτερη κεράτινη στιβάδα. Χαρακτηριστικό της αποτελεί η σειρά κυβοειδών ή κυλινδρικών κυττάρων που στηρίζονται στη βασική στοιβάδα της συμβολής επιδερμίδας-χόριου. Τέλος, διάφοροι παράγοντες, όπως είναι η ηλικία ή η περιοχή του σώματος, επηρεάζουν το χρόνο αναγέννησής της βασικής μεμβράνης της επιδερμίδας αλλά σε φυσιολογικά πλαίσια ανανεώνεται κάθε 15 με 30 μέρες.

Ακανθωτή Στοιβάδα : Το όνομά της προκύπτει λόγω των δεσμοσωμάτων που διαθέτει και έχουν σχήμα άκανθου μιας και έχουν αγκάθια στις εξωτερικές μεμβράνες τους. Η ακανθωτή στοιβάδα περιλαμβάνει ελαφρώς πεπλατυσμένα ή κυβοειδή κύτταρα, που διαθέτουν κυτταρόπλασμα, κεντρικό πυρήνα και αποφυάδες οι οποίες είναι γεμάτες με δεσμίδες νηματίων κερατίνης και καλούνται τονοϊνίδια. Οι συγκεκριμένες δεσμίδες είναι υπεύθυνες για την αντίσταση του κυττάρου απέναντι σε διάφορες δυνάμεις τριβής καθώς επίσης και για τη διατήρηση της συνοχής μεταξύ των κυττάρων που την απαρτίζουν. Το πάχος της κυμαίνεται από 50  $\mu\text{m}$  έως 150  $\mu\text{m}$  ενώ στα σημεία που δέχονται έντονες δυνάμεις τριβής, όπως είναι για παράδειγμα τα πέλματα των ποδιών, η ακανθωτή στοιβάδα της επιδερμίδας κατέχει μεγαλύτερο πάχος. Βασική και ακανθωτή στοιβάδα συνιστούν την μαλπιγγιανή στοιβάδα, την μόνη στην οποία δημιουργούνται τα αρχέγονα κύτταρα και πιθανή καταστροφή της οδηγεί στη δημιουργία ενός δερματικού κενού.

Κοκκιώδης Στοιβάδα : Η συγκεκριμένη στοιβάδα αποτελείται από πεπλατυσμένα πολυγωνικά κύτταρα τα οποία σχηματίζουν 3 έως 5 σειρές και διαθέτουν κυτταρόπλασμα πλούσιο σε κοκκία (απ'όπου παίρνει το όνομά της η στοιβάδα) ενώ το πάχος της κυμαίνεται συνήθως στα 3 $\mu\text{m}$ . Τα κοκκία μπορεί να περιέχουν λιπίδια εσωτερικά και να περιβάλλονται από μεμβράνη (πεταλιώδη κοκκίδια, τα οποία απελευθερώνουν τα λιπίδια που περιέχουν ανάμεσα στα κύτταρα της ακανθωτής στοιβάδας ύστερα από σύντηξή τους με τις κυτταρικές μεμβράνες), είτε να περιέχουν εσωτερικά φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες και να μην περιβάλλονται από μεμβράνη (κοκκία κερατουαλίνης). Ο ρόλος των προαναφερθέντων λιπιδίων που απελευθερώνονται είναι να καθιστούν το δέρμα αδιαπέραστο από τις ξένες ουσίες που υπάρχουν στο περιβάλλον και να παρεμποδίζουν τον διασκορπισμό των επιφανειακών κυττάρων της επιδερμίδας.

Διανυγής Στοιβάδα : Χαρακτηρίζεται από τη μεγάλη διαθλαστική της ικανότητα και την πυκνή διάταξη των κυττάρων της, αν και δεν υπάρχουν σαφή δεδομένα για τους πυρήνες των κυττάρων και τα οργανίδια που περιέχουν, ενώ για το κυτταρόπλασμα είναι γνωστό πως αποτελείται από διάφορα πυκνά συσσωρευμένα νημάτια κερατίνης. Η διανυγής στοιβάδα αποτελείται από πολύ πεπλατυσμένα κύτταρα, είναι λεπτή και διαφανής και διακρίνεται καλύτερα στο παχύ δέρμα.

Κεράτινη Στοιβάδα : Η κεράτινη στοιβάδα αποτελείται από απύρηνα, πεπλατυσμένα κύτταρα που το κυτταρόπλασμά τους περιέχει κερατίνη – μία πρωτεΐνη πολύ σκληρή. Τα κύτταρα αυτά σχηματίζουν 15 έως 20 στοιβάδες και έχει πάχος συνολικά γύρω στα 8-15  $\mu\text{m}$ . Στη συγκεκριμένη στοιβάδα ολοκληρώνεται η διαδικασία της κερατινοποίησης των κυττάρων τα οποία, ως κερατινοκύτταρα πλέον, αποτελούνται από παχύς κυτταρικές μεμβράνες και από άμορφες ή ινώδεις πρωτεΐνες. Επιπλέον, λόγω της σταθερότητας στη συνένωσή τους δίνουν στην επιδερμίδα την ικανότητα της αδιαπερατότητας. Ο χρόνος διαφοροποίησης που εμφανίζει το εκάστοτε κερατινοκύτταρο έως την απόπτωσή του από τη στιγμή της δημιουργίας του στη βασική μεμβράνη υπολογίζεται περίπου στις 28 ημέρες.

Στην επιδερμίδα εκτός των κερατινοκυττάρων υπάρχουν και τα μελανοκύτταρα, τα κύτταρα Merkel και τα κύτταρα Langerhans. Τα κερατινοκύτταρα διαιρούνται και διαφοροποιούνται, κινούμενα από αυτό το βαθύτερο στρώμα στα πιο επιφανειακά στρώματα. Τα μελανοκύτταρα παράγονται από νευρικά κύτταρα και η λειτουργία τους είναι κατά κύριο λόγο η παραγωγή της χρωστικής μελανίνης η οποία απορροφά την ακτινοβολούμενη ενέργεια από τον ήλιο και προστατεύει το δέρμα από τις επιβλαβείς επιδράσεις της υπερϊώδους ακτινοβολίας. Η μελανίνη συσσωρεύεται σε οργανίδια που ονομάζονται μελανοσώματα τα οποία ενσωματώνονται σε δενδρίτες και αγκυροβολούν το μελανόσωμα στα περιβάλλοντα κερατινοκύτταρα. Τέλος, τα κύτταρα αυτά αποτελούν τις θέσεις προέλευσης του μελανώματος. Τα κύτταρα Langerhans προέρχονται από τον μυελό των οστών και βρίσκονται στα βασικά, σπειροειδή και κοκκώδη στρώματα της επιδερμίδας. Χρησιμεύουν ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα καθώς έχουν την ικανότητα εγκόλπωσης των ξένων για τον οργανισμό αντιγόνων. Τέλος, τα κύτταρα Merkel προέρχονται επίσης από νευρικά κύτταρα και εντοπίζονται στα νύχια, στα γεννητικά όργανα και σε άλλες περιοχές του δέρματος. Τα κύτταρα αυτά είναι εξειδικευμένα στην αντίληψη της ελαφριάς επαφής (Carlson BM., 1994 ; Burns DA. *et al.*, 2004). Η δερματοεπιδερμική ένωση είναι μία κυματοειδής μεμβράνη που προσκολλά την επιδερμίδα με τη δερμίδα.

2) Το Χόριο ή Δερμίδα : Αποτελείται από ίνες συνδετικού ιστού και η κύρια λειτουργία της είναι η διατήρηση, η θρέψη και η στήριξη της επιδερμίδας. Πρόκειται για τη στοιβάδα του δέρματος με πάχος που κυμαίνεται από 2 – 4 mm, η οποία παραλαμβάνει τα απαραίτητα σωματίδια που χρειάζεται από την ινώδη και άμορφη εξωκυττάρια ύλη. Το κυρίως δέρμα αποτελείται επίσης από λεμφικά αγγεία, λιπώδη ιστό, αδένες εφίδρωσης και την πλειονότητα αισθητήριων υποδοχέων, όπως και μύες που είναι σημαντικοί για την κυκλοφορία της θερμότητας. Περιέχει απαραίτητα συστατικά του δέρματος, όπως το υαλουρονικό οξύ και πρωτεΐνες, όπως το κολλαγόνο, η ελαστίνη και που είναι υπεύθυνα για την ελαστικότητα του δέρματος, τη δομή και την ποσότητα της ενυδάτωσής του και αλλοιώνονται με το πέρασμα των χρόνων. Οι ινοβλάστες αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό κυττάρων της ενώ επίσης υπάρχουν μακροφάγα, λεμφοκύτταρα και ιστιοκύτταρα τα οποία είναι υπεύθυνα για την πυροδότηση των αλλεργικών αντιδράσεων.

Οι κυρίαρχες πρωτεΐνες που βρίσκονται στη δερμίδα είναι το κολλαγόνο και η ελαστίνη, οι οποίες συνθέτονται από τους ινοβλάστες. Αυτά τα κύτταρα παράγουν και εκκρίνουν ίνες προκολλαγόνου που διασπώνται τελικώς από πρωτεολυτικά ένζυμα σε κολλαγόνο και ελαστικές ίνες. Οι ίνες κολλαγόνου είναι σφιχτά διασυνδεδεμένες παρέχοντας αντοχή σε εφελκυσμό και αντοχή στη διάτμηση και άλλες μηχανικές δυνάμεις. Το κολλαγόνο αποτελεί το 70% του βάρους του δέρματος, και συνίσταται κυρίως σε τύπου I (85% του συνολικού κολλαγόνου) και τύπου III (15% του συνολικού κολλαγόνου). Οι ελαστικές ίνες αποτελούν λιγότερο από το 1% του βάρους του δέρματος, αλλά διαδραματίζουν έναν τεράστιο λειτουργικό ρόλο, καθώς ανθίστανται στις παραμορφωτικές δυνάμεις και επαναφέρουν το δέρμα στο σχήμα ηρεμίας.

Η δερμίδα είναι μια πιο περίπλοκη δομή και αποτελείται από 2 στρώματα, το πιο επιφανειακό θηλώδες δέρμα και το βαθύτερο δικτυωτό χόριο.

Το θηλώδες δέρμα είναι λεπτότερο, και αποτελείται από χαλαρούς συνδετικούς ιστούς που περιέχουν τριχοειδή αγγεία, ελαστικές ίνες, δικτυωτές ίνες και κολλαγόνο. Περιέχει πολλά αιμοφόρα αγγεία και περισσότερο νερό σε σχέση με το δικτυωτό χόριο.

Το δικτυωτό χόριο συγκροτεί το 80% περίπου της δερμίδας και αποτελείται από ένα παχύτερο στρώμα πυκνού συνδετικού ιστού που περιέχει μεγαλύτερα αιμοφόρα αγγεία, στενά συνενωμένες ελαστικές ίνες και χονδροειδείς δέσμες ινών κολλαγόνου τοποθετημένες σε στρώματα παράλληλα προς την επιφάνεια που παρέχουν δύναμη και ελαστικότητα. Επιπλέον, περιέχει ινοβλάστες, ιστιοκύτταρα, νευρικές απολήξεις, λεμφαδενικά και επιδερμικά επιπρόσθετα. . Στο δικτυωτό χόριο ευρίσκονται επίσης οι ιδρωτοποιοί αδένες, τα θυλάκια των τριχών, διάφορα νεύρα και αιμοφόρα κύτταρα.

Κάτω από το χόριο (κυρίως δέρμα) βρίσκεται ο υποδόριος ιστός που υποβοηθά το δέρμα, παρέχοντάς του τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά και εξοπλίζοντάς το με

ζωτικότητα και δύναμη. Κύριος στόχος του είναι ο εφοδιασμός τους δέρματος με νεύρα και αγγεία ενώ ταυτόχρονα το συγκρατεί στους μύες και τα κόκαλα που βρίσκονται από κάτω του.

### ➤ Η ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ ΤΩΝ ΠΛΗΓΩΝ

Η επούλωση των ελκών είναι μια διαδικασία εξελικτικά συντηρημένη μεταξύ των ειδών και αποτελείται από διάφορα γεγονότα, τα οποία όταν είναι καλά οργανωμένα καταλήγουν σε επιδιόρθωση του δέρματος και ανάκτηση της λειτουργίας του ως φραγμού για ξένες ουσίες του εξωτερικού περιβάλλοντος που το περιβάλλει. Φυσιολογικά, σχηματίζεται ένας φραγμός προς τα ερεθίσματα του εξωτερικού περιβάλλοντος με τα οποία έρχεται σε επαφή το δέρμα, λόγω της ισορροπίας που υπάρχει ανάμεσα στην επιδερμίδα και στη δερμίδα. Η βλάβη ή διακοπή της φυσιολογικής ανατομικής δομής και λειτουργίας του δέρματος χαρακτηρίζεται ως έλκος. Η βλάβη αυτή μπορεί να ποικίλλει από ένα πιο βαθύ έλκος εκτεινόμενο σε εσωτερικούς ιστούς με καταστροφή τενόντων, μυών, αγγείων, νεύρων, παρεγχυματικών οργάνων αλλά και οστών έως μία πιο απλή βλάβη στην επιθηλιακή ακεραιότητα του δέρματος. Ο τραυματισμός, ανεξάρτητα από την αιτία, παθολογική ή μη, και την μορφή, καταστρέφει τον ιστό και το τοπικό περιβάλλον σε αυτό. Η φυσιολογική απόκριση σε μια βλάβη είναι η αιμορραγία, η συστολή των αγγείων για την πήξη του αίματος, η ενεργοποίηση του συμπληρώματος καθώς και φλεγμονώδη απόκριση.

Ανεξαρτήτως του είδους έλκους που υφίσταται, η επούλωση ξεκινάει αμέσως μετά τον τραυματισμό που έχει υποστεί ο ιστός ακολουθώντας παρόμοιες διαδικασίες αλλά διαφορετικό χρόνο αποκατάστασης. Τα τραύματα θεραπεύονται είτε με **πρωτογενή** είτε με **δευτερογενή** τρόπο. Η πρωτογενής επούλωση μπορεί να συμβεί ως αποτέλεσμα χειρουργικού κλεισίματος και η δευτερογενής συμβαίνει όταν το τραύμα αφήνεται ανοικτό για να επουλωθεί με αναγέννηση ιστού που έχει διαταραχθεί από τραύμα ή κυτταρικό θάνατο. Το βάθος, το μέρος και η γεωμετρία που έχει το εκάστοτε έλκος επηρεάζει τον τρόπο που θα επουλωθεί το έλκος κατά τη δευτερογενή επούλωση. Ο χρόνος αποτελεί ένα από τους βασικότερους παράγοντες για την επιδιόρθωση των ελκών. Έτσι, έχει παρατηρηθεί ότι έλκη που βρίσκονται σε σημεία του σώματος που δεν αιματώνονται πολύ ή σε περιοχές που επηρεάζονται από την πίεση τείνουν να χρειάζονται μεγαλύτερο χρόνο επούλωσής τους. Ο χρόνος επούλωσης, λοιπόν, ποικίλει και δεν είναι λίγα τα παραδείγματα ελκών τα οποία χρειάζονται ένα χρόνο και παραπάνω για την πλήρη επούλωσή τους. Ωστόσο, η πορεία επούλωσης ορισμένων ελκών τείνει να επιβραδύνεται λόγω διαφόρων τοπικών και συστημικών παραγόντων με αποτέλεσμα τη μη έγκαιρη θεραπεία τους και την πρόκληση

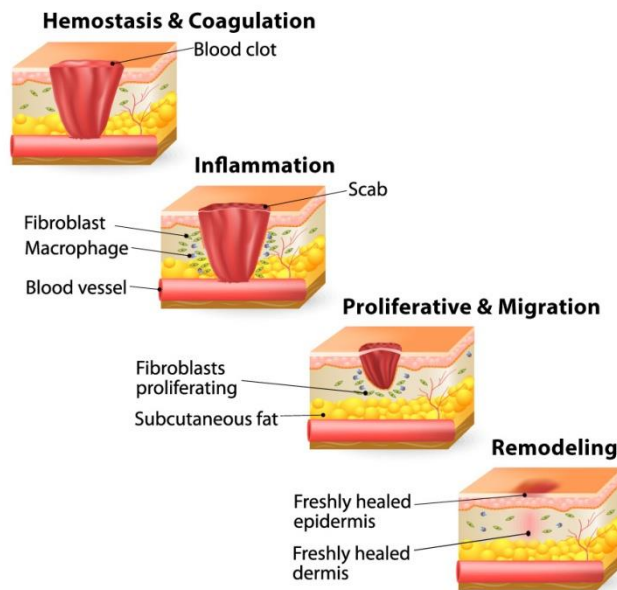
διαταραχών στις λεπτά ισορροπημένες διεργασίες επιδιόρθωσης μετατρέποντας τις πληγές αυτές σε χρόνια τραυματικά έλκη. Το τραύμα που έχει ανακτήσει μια φυσιολογική ανατομική δομή, λειτουργία και εμφάνιση του ιστού μέσα σε εύλογο χρονικό διάστημα χαρακτηρίζεται ως πλήρως επουλωμένο.

Τα έλκη διακρίνονται σε **οξεία** ή **χρόνια** ανάλογα με το χρονικό πλαίσιο επούλωσής τους. Τα οξεία έλκη έχουν χρόνο πλήρους επούλωσής τους από 5 έως 10 μέρες ή γενικότερα εντός 30 ημερών. Έτσι χαρακτηρίζονται τα έλκη που επιδιορθώνονται μόνα τους και ακολουθούν μια φυσιολογική διαδικασία επιδιόρθωσης μέσω μιας σωστής και έγκαιρης θεραπευτικής οδού, με τελικό αποτέλεσμα την πλήρη αποκατάστασή τους. Από την άλλη πλευρά, ως χρόνια έλκη χαρακτηρίζονται όλες εκείνα που αποτυγχάνουν να προχωρήσουν στα φυσιολογικά στάδια της ίασης και δεν επιδιορθώνονται εγκαίρως. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα μία ατελή αποθεραπεία η οποία διαταράσσεται από διάφορους παράγοντες που παρατείνουν το χρονικό περιθώριο της επούλωσης.

Επίσης, και το βάθος ενός έλκους (εξαρτάται από το ποίες στοιβάδες έχουν υποστεί ρήξη) είναι ένας βασικός παράγοντας που χαρακτηρίζει την σοβαρότητά του και επηρεάζει το χρόνο που θα χρειαστεί για την πλήρη θεραπεία του. Τα έλκη μερικούς πάχους που περιλαμβάνουν μόνο την επιδερμίδα και ορισμένα στρώματα από τη δερμίδα παρουσιάζουν διαφορετικό τρόπο θεραπείας σε σχέση με τα πλήρους πάχους έλκη που περιλαμβάνουν όλη την επιδερμίδα και την δερμίδα αλλά και διάφορες υποδερμικές δομές. Τα έλκη μερικού πάχους υποβάλλονται σε ελάχιστη συστολή και επανεπιθηλιώνονται από το περιθώριο του τραύματος και από τους πληθυσμούς επιδερμικών βλαστοκυττάρων που βρίσκονται γύρω από τους ιδρωτοποιούς αδένες και τους θύλακες των τριχών. Αντιθέτως, τα έλκη πλήρους πάχους εξαρτώνται πλήρως από την επιθηλιοποίηση από τις άκρες του τραύματος λόγω της καταστροφής αυτών των επιπρόσθετων πληθυσμών επιδερμικών βλαστοκυττάρων που σχετίζονται με ένα τραύμα πλήρους πάχους. Επιπλέον, τα έλκη πλήρους πάχους είναι πιθανότερο να υποστούν συστολή κατά τη διάρκεια της επούλωσης, πιθανώς με αποτέλεσμα μια κοσμητικά ή λειτουργικά ανεπιθύμητη σύσπαση.

Μόλις γίνει ο τραυματισμός ξεκινάει η διαδικασία της επούλωσής του, μία διαδικασία που χωρίζεται σε 4 διακριτά στάδια τα οποία είναι τα ακόλουθα : 1) Αιμόσταση, 2) Φλεγμονή, 3) Πολλαπλασιασμός, και 4) Αναδιαμόρφωση. Η καλύτερη κατανόηση των κυτταρικών και μοριακών μηχανισμών που συμμετέχουν στην επούλωση του τραύματος, θα μας επιτρέψει, τελικώς, να επηρεάσουμε και να επιταχύνουμε τη διαδικασία αναγέννησης του δέρματος. Παρακάτω ακολουθεί πιο αναλυτική παρουσίαση των χαρακτηριστικών που καθορίζουν κάθε στάδιο και το πώς επιδρούν στην ολοκληρωτική επούλωση του έλκους.

## WOUND HEALING



**Εικόνα Ε.2 :** Σύνοψη αναπαράσταση των τεσσάρων διαφορετικών σταδίων που ακολουθούνται στη διαδικασία της επούλωσης πληγών (*Considerations for Preclinical Wound Healing Models* Jun 15, 2015 / <http://surpassinc.com/preclinical-blog/considerations-preclinical-wound-healing-models/>)

### 1) ΑΙΜΟΣΤΑΣΗ

Το πρώτο βήμα της φυσιολογικής ή οξείας επούλωσης ελκών αφορά τη δημιουργία μίας προσωρινής μήτρας έλκους, η οποία δημιουργείται απευθείας μετά τον τραυματισμό και ολοκληρώνεται έπειτα από μερικές ώρες (Reinke J.M. *et al.*, 2012). Αυτό το αρχικό στάδιο ουσιαστικά λειτουργεί ως αποτροπή της περαιτέρω αιμορραγίας στα ήδη κατεστραμένα αιμοφόρα αγγεία και εκκίνηση της διαδικασίας της φλεγμονής. Στη φάση αυτή ο οργανισμός αρχίζει να δέχεται μία πληθώρα μηνυμάτων από παράγοντες και κύτταρα απαραίτητα για τη διαδικασία της επούλωσης, μία κατάσταση που πρέπει να διαχειρίσεται καλά καθώς απουσιάζει η μηχανική αντοχή του τραύματος (Robson MC., *et al.*, 2001). Με το τραυματισμό του δέρματος που ξεπερνά την επιδερμική στιβάδα, τα αίμα και τα λεμφικά αγγεία που τραυματίζονται, ξεπλένουν το τραύμα για την απομάκρυνση των μικροοργανισμών και των αντιγόνων (Strodtbeck F. *et al.*, 2001).

Το βασικό σημείο στη πρώτη φάση επούλωσης του τραύματος είναι η δημιουργία του θρόμβου, ο οποίος προκύπτει μέσω συσσωμάτωσης των αιμοπεταλίων και οδηγεί στην αναστολή της αιμορραγίας μέσω απόφραξης των τραυματισμένων αγγείων και στη συνέχεια χρησιμεύει ως προσωρινή μήτρα για την επούλωση. Τα αιμοπετάλια είναι κυτταροπλασματικά θραύσματα από μεγακαρυοκύτταρα που προέρχονται από τον μυελό των

οστών. Μόλις ενεργοποιηθούν από κάποιο ενδοθηλιακό τραυματισμό ή έκθεση σε συστατικά της εξωκυττάριας ύλης, προσκολλώνται αμέσως στην αγγειακή βλάβη προσλαμβάνοντας επιπλέον αιμοπετάλια και εκκινούν τελικώς τη διαδικασία της πήξης του αίματος στη περιοχή που θα δημιουργηθεί ο θρόμβος. Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια προκαλούν αυτές τις λειτουργίες μέσω απελευθέρωσης διφωσφορικής αδενοσίνης, ινωδογόνου, σεροτονίνης, θρομβοξανθής A2, φμπρονεκτίνης, παραγόντων von Willebrand και θρομβοσπονδίνης (Plow EF. *et al.*, 1985). Ο σχηματισμός και η σταθεροποίηση του πρωτοπαθούς αιμοπεταλιακού εμβόλου συμβαίνει λόγω της μεγάλης παραγωγής θρομβίνης στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων. Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια εκκρίνουν επίσης στο περιβάλλον του τραύματος διάφορους αυξητικούς παράγοντες συμπεριλαμβανομένου του αιμοπεταλιακού αυξητικού παράγοντα PDGF, του μετασχηματίζον αυξητικού παράγοντα TGF-α και TGF-β και του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF) Οι συγκεκριμένοι παράγοντες διεγείρουν τους ινοβλάστες να παράγουν κολλαγόνο, πρωτεογλυκάνες και γλυκοζαμινογλυκάνες (Bauer EA. *et al.*, 1985; Brissett AE. *et al.*, 2003), οι οποίες συνεισφέρουν στο προσωρινό υπόστρωμα του θρόμβου ινώδους.

Στη συνέχεια, αρχίζουν οι διαφορετικοί μηχανισμοί σχηματισμού του θρόμβου, οι οποίοι εκκινούν με παράγοντες πήξης από το τραυματισμένο δέρμα (εξωγενές σύστημα) ενώ τα θρομβοκύτταρα ενεργοποιούνται για συσσωμάτωση με εκτεθειμένο κολλαγόνο (ενδογενές σύστημα). Η δομή του υποστρώματος ινώδους καθορίζει τις βιολογικές ικανότητες που διαθέτει και τελικώς την ποιότητα της επούλωσης του έλκους και καθορίζεται από την διαπερότητα, την αραιότητα της ύλης, την διάμετρο των ινών του καθώς επίσης και την διακλάδωση που εμφανίζει (Mosesson MW. *et al.*, 2001). Ο θρόμβος ινώδους χρησιμεύει ως ένα ικρίωμα για την προσάρτηση των κυττάρων διήθησης και των συστατικών της εξωκυττάριας ύλης. Πολλά είδη κυττάρων, όπως για παράδειγμα τα λευκοκύτταρα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, οι ινοβλάστες και τα λεία μυϊκά έχουν την ικανότητα να προσδένουν τους θρόμβους ινώδους είτε μέσω των υποδοχέων ιντεγκρίνης είτε μέσω συμφύσεων μορίων. Έτσι, ο θρόμβος χρησιμεύει για την διάδοση της τοπικής φλεγμονώδους διαδικασίας, την ανάπτυξη νέων αγγείων και τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών στην περιοχή του τραύματος.

Τα τραυματισμένα αγγεία υφίστανται αγγειοσυστολή 5-10 λεπτών, που προκαλείται από τα αιμοπετάλια, για να μειωθεί η απώλεια αίματος και να γεμίσει το κενό ιστού με έναν θρόμβο αίματος που αποτελείται από κυτοκίνες και αυξητικούς παράγοντες (Martin P., 1997). Επιπλέον, ο θρόμβος αίματος περιέχει μόρια φμπρίνης, φμπρονεκτίνη, βιτρονεκτίνη και θρομβοσπονδίνες, σχηματίζοντας την προσωρινή μήτρα ως δομή ικρίωματος για τη μετανάστευση λευκοκυττάρων, κερατινοκυττάρων, ινοβλαστών και ενδοθηλιακών κυττάρων και ως δεξαμενή αυξητικών παραγόντων. Η αγγειοσύσπαση με σχηματισμό θρόμβων αντιπροσωπεύει μια τοπική ανεπάρκεια διάχυσης με διαδοχική έλλειψη οξυγόνου, αυξημένη

γλυκόλυση και αλλαγές στο pH (Woo YC., *et al.* 2004). Η αγγειοσυστολή ακολουθείται από μια αγγειοδιαστολή στην οποία τα θρομβοκύτταρα εισβάλλουν στην προσωρινή μήτρα τραύματος (Robson MC., *et al.*, 2001). Επιπλέον, τα αιμοπετάλια επηρεάζουν τη διείσδυση λευκοκυττάρων με την απελευθέρωση χημειοτακτικών παραγόντων. Τόσο τα αιμοπετάλια όσο και τα λευκοκύτταρα απελευθερώνουν κυτοκίνες και αυξητικούς παράγοντες για να ενεργοποιήσουν τη φλεγμονώδη διεργασία (IL-1α, IL-1β, IL-6 και TNF-α), διεγείρουν τη σύνθεση κολλαγόνου (FGF-2, IGF-1, TGF- (FGF-2, VEGF-A, HIF-1α, TGF-β) και υποστηρίζουν τη διαδικασία επανεπιθηλίωσης (EGF, FGF-2, IGF- TOP-α) (Werner S., *et al.*, 2003). Η αγγειοδιαστολή μπορεί επίσης να αναγνωριστεί από τοπική ερυθρότητα (υπεραιμία) και από οίδημα του τραύματος.

## 2) ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ ΦΑΣΗ

Η φλεγμονώδης φάση ξεκινάει αμέσως με τη δημιουργία του τραύματος, δηλαδή ενεργοποιείται κατά τη διάρκεια της φάσης της αιμόστασης και της πήξης του αίματος και χαρακτηρίζεται από την είσοδο λευκοκυττάρων στο τοπικό περιβάλλον του έλκους. Διαρκεί περίπου για 4 έως 6 ημέρες και μπορεί να χωριστεί σε μια πρόιμη φάση με την παρουσία ουδετερόφιλων και μια καθυστερημένη φάση με την εμφάνιση και τον μετασχηματισμό των μονοκυττάρων. Ο σκοπός της φάσης αυτής είναι παρόμοιος με το στόχο της φάσης της αιμόστασης, δηλαδή ο σχηματισμός θρόμβου και η αποδόμηση και εν συνεχεία απομάκρυνση, από τα φλεγμονώδη κύτταρα, των νεκρωμένων ιστών.

Η λειτουργία των ουδετερόφιλων είναι κρίσιμη στις πρώτες ημέρες μετά τον τραυματισμό, επειδή η ικανότητά τους στη φαγοκυττάρωση και την έκκριση πρωτεάσης σκοτώνει τα τοπικά βακτήρια και βοηθά στην αποικοδόμηση του νεκρωτικού ιστού. Τα ουδετερόφιλα εισέρχονται στο σημείο που έχει υποστεί ρήξη το δέρμα και, εκτός από περιπτώσεις όπως για παράδειγμα η μόλυνσή του έλκους, παραμένουν στο σημείο για περίπου 2 έως 5 ημέρες, όπου προσλαμβάνουν τα υποπροϊόντα που προκύπτουν από την βακτηριακή αποικοδόμηση καθώς επίσης και θραύσματα αιμοπεταλίων, ενώ ταυτοχρόνως δρουν χημειοτακτικά για τα υπόλοιπα κύτταρα που εμπλέκονται στην φλεγμονώδη φάση. Μεσολαβητές όπως ο TNF-α, η IL-1 β και η IL-6 απελευθερώνονται από τα ουδετερόφιλα και ενισχύουν τη φλεγμονώδη απόκριση ενώ ταυτοχρόνως διεγείρουν την παραγωγή VEGF και IL-8. Επιπρόσθετα, αρχίζουν την απομάκρυνσή τους απελευθερώνοντας πολύ δραστικές αντιμικροβιακές ουσίες (κατιονικά πεπτίδια και εικοσανοειδή) και πρωτεϊνάσες (ελαστάση, καθεψίνη G, πρωτεϊνάση 3 και ενεργοποιητή πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης) (Eming SA, *et al.*, 2007).

Τα ουδετερόφιλα είναι τα βασικά κύτταρα που λαμβάνουν δράση κατά τις 3 πρώτες μέρες εμφάνισης ενός τραύματος σημειώνοντας την μεγαλύτερη έξαρσή τους στις 48 ώρες. Στη συνέχεια, έπειτα από τις 3 ημέρες εισέρχονται στο σημείο του τραύματος και λαμβάνουν δράση τα μακροφάγα κύτταρα τα οποία υποστηρίζουν τη διαδικασία με την φαγοκυττάρωση των παθογόνων μικροοργανισμών και των κυτταρικών υπολειμμάτων τους (Tziotzios C. *et al.*, 2012; Profyris C. *et al.*, 2012). Επιπλέον, συνεισφέρουν στην διαδικασία της επούλωσης με την έκκριση αυξητικών παραγόντων, χημειοκινών και κυτοκινών. Τα μακροφάγα αναφέρονται σαν τα θεμελιώδη κύτταρα στην επούλωση του τραύματος. Αποδομούν νεκρωμένους ιστούς, ενεργοποιούν την ανοσολογική αντίδραση, προάγουν την αγγειογένεση και διεγείρουν τα κερατινοκύτταρα. Επιπλέον, παράγουν και εκκρίνουν κυτοκίνες, παράγοντες του συμπληρώματος, πρωτεάσες και πρωτεασικούς υποδοχείς, αυξητικούς παράγοντες (που διεγείρουν άλλα κύτταρα να μεταναστεύσουν, πολλαπλασιαστούν και να εκκρίνουν τις πρωτεΐνες τους) καθώς και προϊόντα της εξωκυττάριας ύλης. Με αυτές τις λειτουργίες τους ενισχύουν την διαδικασία της αγγειογένεσης, της ινωπλασίας και σύνθεσης της εξωκυττάριας ύλης. Με τη δράση των μακροφάγων αρχικώς, ενεργοποιείται η θρομβίνη η οποία μετατρέπει το ινωδογόνο σε ινώδες, ουσιαστικός παράγοντας της επούλωσης του τραύματος, εντός του οποίου μεταναστεύουν φλεγμονώδη κύτταρα, αιμοπετάλια και πρωτεΐνες του πλάσματος αλλά επιπλέον, προάγει την μετανάστευση των κυττάρων της φλεγμονής στο τραύμα με την αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων. Με αυτό το μηχανισμό, οι απαραίτητοι παράγοντες αλλά και κύτταρα αναγκαία για την επούλωση των τραυμάτων καταφέρνουν να εξέλθουν από τον ενδοαγγειακό στον εξαγγειακό χώρο. Τα μακροφάγα έχουν την ικανότητα να αντιλαμβάνονται το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται και να παράγουν επαγωγικά και ανασταλτικά σήματα τόσο για την διαδικασία της φλεγμονής όσο και για την αγγειογένεση. Τέλος, εκτός των μακροφάγων που προσελκύονται στο σημείο του τραύματος υπάρχουν και τοπικά μακροφάγα κύτταρα, τα οποία καλούνται κύτταρα Langerhans και τα οποία επηρεάζονται από το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται μέσω των κυτοκινών. Ο ρόλος τους είναι να ελέγχουν το ανοσοποιητικό σύστημα, αντιλαμβάνόμενα τα αντιγόνα στο δέρμα και μεταφέροντάς τα στους λεμφαδένες όπου τα αντιγόνα παρουσιάζονται στα ευαίσθητα T-λεμφοκύτταρα.

Τέλος, στη φάση αυτή παίρνουν μέρος και τα ιστιοκύτταρα, τα οποία είναι αμυντικά κύτταρα που βρίσκονται ήδη στη περιοχή του τραύματος, ανάμεσα στους ιστούς. Τα κύτταρα αυτά ευρίσκονται περισσότερο στο περιτόναιο, στις περιαγγειακές περιοχές, στο δέρμα και στο επιθήλιο του εντέρου τονίζοντας τον ρόλο τους έναντι των μικροβίων στις πιο ευάλωτες περιοχές, στη διαρκή κυτταρική στρατολόγηση και την επιρροή τους επί του τοπικού αγγειακού συστήματος.

### 3) ΦΑΣΗ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ

Η φάση του πολλαπλασιασμού (γνωστή και ως παραγωγική φάση), η οποία λαμβάνει χώρα 3 έως 10 ημέρες μετά τον τραυματισμό, έχει ως θεραπευτικό στόχο την κάλυψη της επιφάνειας του τραύματος με το σχηματισμό κοκκιώδους ιστού – αποτελείται από μακροφάγα, ινοβλάστες, ανώριμο κολλαγόνο, πρωτοσχηματιζόμενα αιμοφόρα αγγεία και πρωτοσχηματιζόμενη εξωκυττάρια ύλη – και στην αποκατάσταση του αγγειακού δικτύου. Η κύρια ομάδα κυττάρων που συμμετέχει σε αυτή τη φάση είναι οι ινοβλάστες οι οποίοι συμμετέχουν στην επούλωση του έλκους και στη δημιουργία του υποστρώματός της. Στο τέλος της φάσης του πολλαπλασιασμού συμβαίνει η επιθηλίωση, δηλ. η μετανάστευση των κερατινοκυττάρων από τα ακριανά μέρη του έλκους. Έτσι, θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι η συγκεκριμένη φάση της επούλωσης ελκών μπορεί να διακριθεί σε 4 μέρη : 1) Την επιθηλιοποίηση, 2) Την αγγειογένεση, 3) Τον σχηματισμό κοκκιώδους συνδετικού ιστού και 4) Τη συστολή.

- Επιθηλιοποίηση : Η δημιουργία του επιθηλίου που καταστράφηκε λόγω του έλκους στις απογυμνωμένες επιφάνειες ξεκινάει από τα άκρα του τραύματος. Η σχετική υγρασία που επικρατεί στο σημείο του έλκουσ είναι ένας πολύ σημαντικός παράγοντας για την ανασύσταση του επιθηλίου. Όσο πιο υγρό είναι το περιβάλλον τόσο πιο γρήγορα εξελίσσεται η διαδικασία επούλωσης του έλκους, σε σχέση με το χρόνο που απαιτείται για να επουλωθεί κάτω από την εσχάρα (κακκάδι). Η διαδικασία της επανεπιθηλίωσης εξασφαλίζεται από τα τοπικά κερατινοκύτταρα που βρίσκονται στις άκρες του τραύματος και από τα επιθηλιακά βλαστοκύτταρα των θυλακίων της τρίχας και των ιδρωτοποιών αδένων (Martin P., 1997; Lau K., *et al.*, 2009; Miller SJ., *et al.*, 1998; Roh C., *et al.*, 2006). Η διαδικασία αυτή ενεργοποιείται από μονοπάτια σηματοδότησης επιθηλιακών και μη-επιθηλιακών κυττάρων στα άκρα του τραύματος, τα οποία απελευθερώνουν πολλές διαφορετικές κυτοκίνες και αυξητικούς παράγοντες, όπως για παράδειγμα οι EGF, KGF, IGF-1 και NGF (Werner S., *et al.*, 2003). Οι μικρές πρωτεΐνες GTPases τροποποιούν την ενδοκυτταρική οργάνωση των ινών κολλαγόνου και είναι απαραίτητες για τη σωστή διεκπεραίωση της διαδικασίας της επιθηλιοποίησης καθώς και για τον τερματισμό της μετανάστευσης των κυττάρων. Η διαδικασία προχωράει έως ότου τα κύτταρα που μεταναστεύουν να αγγίζουν το ένα το άλλο. Στη συνέχεια, οι GTPases πιθανώς θα απενεργοποιηθούν οδηγώντας σε αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού (Jacinto A. *et al.*, 2001). Η σύντηξη των δύο απέναντι επιθηλίων πραγματοποιείται με οργάνωση των ινών ακτίνης σε φιλοπόδια, τα οποία προσδένονται αρχικά το ένα στο άλλο και

στη συνέχεια αντικαθίστανται από επαφές διακυτταρικής προσκόλλησης για να κλείσουν τελικά το τραύμα σαν φερμουάρ (Jacinto A. *et al.*, 2001).

Επιπλέον, βασικό είναι να αναφερθεί ότι στην επιθηλιοποίηση κύριο ρόλο διαδραματίζει η κατάσταση που βρίσκεται η βασική μεμβράνη. Εάν η βασική μεμβράνη έχει καταστραφεί, το τραύμα επανα-επιθηλιοποιείται από φυσιολογικά κύτταρα από την περιφέρεια αυτού ή από εξαρτήματα του δέρματος, εφόσον είναι ακέραια (θύλακες τριχών, αδένες). Στην περίπτωση αυτή υφίσταται μετακίνηση των κυττάρων από την αρχική τους θέση περίπου από 1 έως 3 cm προς όλες τις κατευθύνσεις. Αντιθέτως, όταν η βασική μεμβράνη είναι ανέπαφη, τα επιθηλιακά κύτταρα μεταναστεύουν προς τα πάνω στο φυσιολογικό επίπεδο. Τα αρχέγονα επιθηλιακά κύτταρα κάτω από το τραύμα, παραμένουν ανέπαφα και τα φυσιολογικά επίπεδα της επιδερμίδος αποκαθίστανται σε 2-3 ημέρες.

- Αγγειογένεση : Ένα από τα πιο βασικά χαρακτηριστικά όλων των σταδίων επούλωσης/αναγέννησης ενός τραύματος είναι η συμμετοχή της αγγειογένεσης. Η αποκατάσταση του αγγειακού συστήματος του δέρματος είναι ένας σύνθετος μηχανισμός κυτταρικών, χημικών και μοριακών συμβάντων ώστε το τραύμα να αρχίσει να αιματώνεται ξανά φυσιολογικά και να παραλαμβάνει όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά που χρειάζεται. Τα τριχοειδή είναι εκείνα που προσφέρουν όλες τις απαραίτητες θρεπτικές ουσίες στο τραύμα και βοηθούν στη διατροφή του κοκκιώδους ιστού. Ανεπάρκεια θρέψης του έχει σαν αποτέλεσμα το χρόνιο μη επουλωμένο τραύμα. Ως εκκινητές της διαδικασίας της αγγειογένεσης δρουν διάφοροι αυξητικοί παράγοντες, π.χ. VEGF, PDGF, bFGF.

Το πρώτο στάδιο στο σχηματισμό νέου αγγείου είναι η δέσμευση αυξητικών παραγόντων στους υποδοχείς τους στα ενδοθηλιακά κύτταρα των υπαρχόντων αγγείων, ενεργοποιώντας έτσι τους μηχανισμούς ενδοκυτταρικής σηματοδότησης. Τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν πρωτεολυτικά ένζυμα τα οποία διαλύουν το βασικό στρώμα. Έτσι, τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι τώρα σε θέση να πολλαπλασιάζονται και να μεταναστεύουν μέσα στο τραύμα, μια διαδικασία γνωστή και ως «εκβλάστηση». Τα ενδοθηλιακά κύτταρα προσανατολίζονται προς τα μόρια επιφανειακής προσκόλλησης, π.χ. Ιντεγκρίνες (αυβ3, αυβ5, α5β1). Επιπλέον, απελευθερώνουν μεταλλοπρωτεϊνάσες λύοντας τον περιβάλλοντα ιστό με στόχο τον συνεχιζόμενο ενδοθηλιακό πολλαπλασιασμό και μετανάστευσή τους. Οι νεοσχηματιζόμενοι αγγειακοί βλαστοί σχηματίζουν μικρά σωληνωτά κανάλια (αυλούς) τα οποία διασυνδέονται με άλλους που σχηματίζουν

βρόχο αγγείων (αναστόμωση). Στη συνέχεια, τα νέα αγγεία διαφοροποιούνται σε αρτηρίες και φλεβίδια και ωριμάζουν με μια περαιτέρω σταθεροποίηση του αγγειακού τους τοιχώματος μέσω της πρόσληψης περικυττάρων και κυττάρων λείου μυός. Τέλος, η αρχική ροή αίματος ολοκληρώνει την αγγειογενετική διαδικασία. Μέσα σε πλήρους πάχους έλκη του δέρματος, η διαδικασία νεοαγγειοποίησης ακολουθεί ένα ξεχωριστό μοτίβο στο χρόνο και το σχήμα. Στην αρχή τα αγγεία σχηματίζουν ένα εσωτερικό δακτύλιο από κυκλικά διατεταγμένα αγγεία στο περιθώριο του τραύματος, ακολουθούμενο από εξωτερικά ακτινωτά τοποθετημένα αγγεία που τροφοδοτούν τα εσωτερικά αγγεία. Καθώς προχωράει το κλείσιμο του τραύματος, ο εσωτερικός αγγειακός αυλός συρρικνώνεται, με αποτέλεσμα την πλήρη εξαφάνιση του αυλού του αγγείου. Ωστόσο, τα ακτινωτά διατεταγμένα αγγεία διασυνδέονται μεταξύ τους σχηματίζοντας ένα νέο δερματικό αγγειακό δίκτυο (Sorg H., *et al.*, 2007). Συνοψίζοντας, το στάδιο της αγγειογένεσης μπορεί να διαχωριστεί στα εξής βήματα : 1) Έναρξη της αγγειογένεσης, 2) Ενίσχυση της αγγειογένεσης, 3) Αγγειακός πολλαπλασιασμός, 4) Αγγειακή σταθεροποίηση και 5) Καταστολή της αγγειογένεσης.

- Ανάπτυξη κοκκιώδους συνδετικού ιστού : Το τελευταίο και πιο σημαντικό τμήμα της φάσης του πολλαπλασιασμού είναι η ανάπτυξη κοκκιώδους συνδετικού ιστού. Κατά τη διάρκεια της διεκπεραίωσής του έχει ήδη αρχίσει και η τελευταία φάση επούλωσης ελκών, δηλαδή η φάση αναδιαμόρφωσης. Ο συνδετικός ιστός χαρακτηρίζεται από υψηλή πυκνότητα ινοβλαστών, κοκκιοκυττάρων, μακροφάγων, τριχοειδών αγγείων και χαλαρά οργανωμένων δεσμών κολλαγόνου. Λόγω της μεγάλης ποσότητας κυτταρικών ενώσεων που έχει, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ονομάζεται ιστός κοκκιοποίησης. Επίσης, καθώς η αγγειογένεση δεν έχει ολοκληρωθεί τελείως, αυτός ο ιστός αγγειώνεται έντονα, με αποτέλεσμα να εμφανίζεται αρκετά ερυθρός και να μπορεί να τραυματιστεί εύκολα.

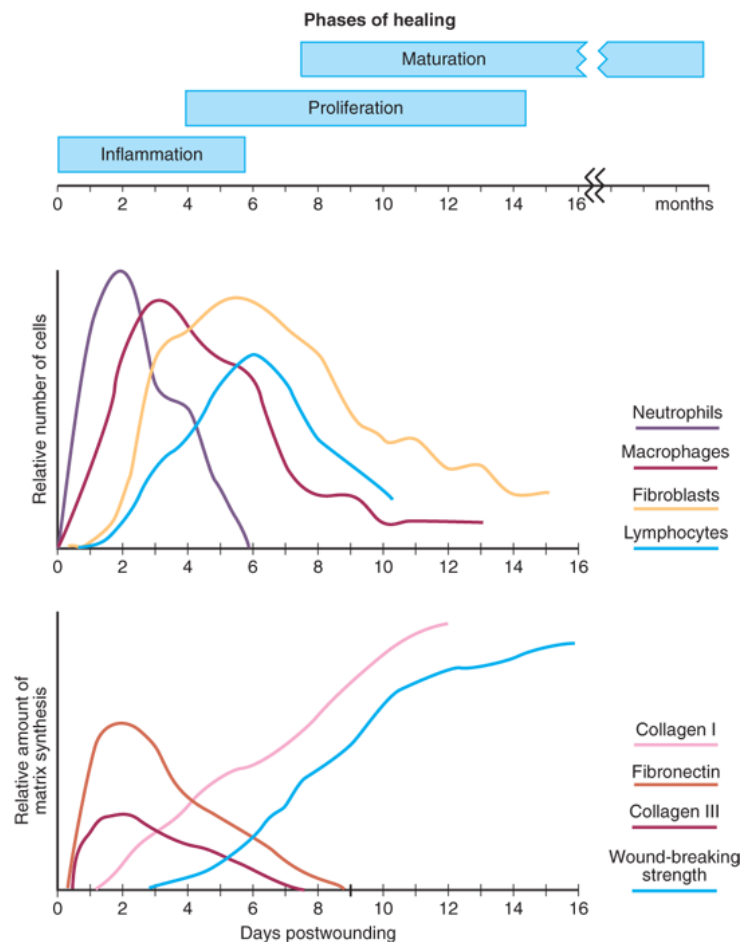
Η παραγωγή κολλαγόνου και άλλων μορίων της εξωκυττάριας μήτρας (όπως π.χ. φιβρονεκτίνη, γλυκοζαμινογλυκάνες, πρωτεογλυκάνες και υαλουρονικό οξύ) γίνεται από τους ινοβλάστες, οι οποίοι πολλαπλασιάζονται στα βαθύτερα τμήματα του τραύματος και αρχίζουν να παράγουν μικρές ποσότητες κολλαγόνου, οι οποίες δρουν σαν υπόστρωμα για τον πολλαπλασιασμό και παραγωγή περισσότερων ινοβλαστών. Οι ινοβλάστες αυξάνουν τη ποσότητα κολλαγόνου και πρωτεογλυκάνης που παράγουν μετά το πέρας 5 ημερών από τον τραυματισμό. Οι ίνες αυτές κολλαγόνου που παράγονται διατάσσονται τυχαία σε διασταυρούμενες δεσμίδες ενώ, αντιστοίχως, οι πρωτεογλυκάνες φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην μορφολογία και διάταξη των συγκεκριμένων ινών. Στο τέλος αυτής της φάσης ο

αριθμός των ινοβλαστών μειώνεται, καθώς ένα μέρος τους διαφοροποιείται προς μυοϊνοβλάστες, οι οποίοι στη συνέχεια υφίστανται απόπτωση (Hinz B., *et al.*, 2007).

- Συστολή : Όπως αναφέρθηκε, στο προηγούμενο στάδιο γίνεται μεγάλη παραγωγή κολλαγόνου ενώ, ταυτοχρόνως με την έναρξη σύνθεσής του, το τραύμα υφίσταται συστολή με τελικό σκοπό τη σμίκρυνση της ουλής. Η συγκεκριμένη παραγωγή κολλαγόνου δεν παίζει κάποιο ρόλο στη συστολή που υφίσταται το τραύμα απλώς ταυτίζεται με αυτή χρονικώς.

#### 4) ΦΑΣΗ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ Ή ΑΝΑΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ (Remodeling)

Η αναδιαμόρφωση είναι η τελευταία φάση σε ολόκληρη τη διαδικασία επούλωσης ελκών, λαμβάνει χώρα από την 8<sup>η</sup> ημέρα μετά το τραυματισμό και μπορεί να διαρκέσει μέχρι και 1 έτος και περιλαμβάνει την ωρίμανση και αναδιοργάνωση του κολλαγόνου από τους ινοβλάστες, τους αυξητικούς παράγοντες, τα MMPs και τους TIMPs. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, κατά τη φάση πολλαπλασιασμού παράγεται κολλαγόνο τύπου III το οποίο, στη φάση αυτή, αντικαθίσταται από το ισχυρότερο κολλαγόνο I που είναι προσανατολισμένο σε μικρές παράλληλες δέσμες (Gurtner GC. *et al.*, 2000). Επίσης, αυτή η αύξηση στην απόθεση κολλαγόνου φθάνει σε plateau μετά από 21 ημέρες. Οι μυοϊνοβλάστες που προκαλούν συσπάσεις λόγω της πολλαπλής προσκόλλησής τους στο κολλαγόνο, οδηγούν σε συστολή του τραύματος, η οποία συνεχίζει από τη φάση πολλαπλασιασμού, οδηγώντας τελικώς σε μείωση της επιφάνειας της αναπτυσσόμενης ουλής (Gurtner GC. *et al.*, 2000; Tziotzios C. *et al.*, 2012; Profyris C. *et al.*, 2012). Τελικώς, οι αγγειογενετικές διεργασίες μειώνονται, η ροή αίματος τραύματος μειώνεται και η οξεία μεταβολική δραστηριότητα του τραύματος επιβραδύνεται και τελικά σταματά. Επομένως, ένα ώριμο έλκος χαρακτηρίζεται τόσο από ελαττωμένη αγγείωση όσο και από μειωμένους κυτταροβρίθεια (Greenhalgh DG. 1998).



**Εικόνα Ε.3 :** Διαγραμματική απεικόνιση των διαφορετικών ομάδων κυτταρικών πληθυσμών που συμμετέχουν στην επούλωση των ελκών, καθώς επίσης και των βασικών πρωτεϊνών που λαμβάνουν μέρος στη διαδικασία σε σχέση με τις φάσεις επούλωσης (Schwartz's Principles of surgery, Adrian Barbul; David T. Efron; Sandra L. Kavalukas) .

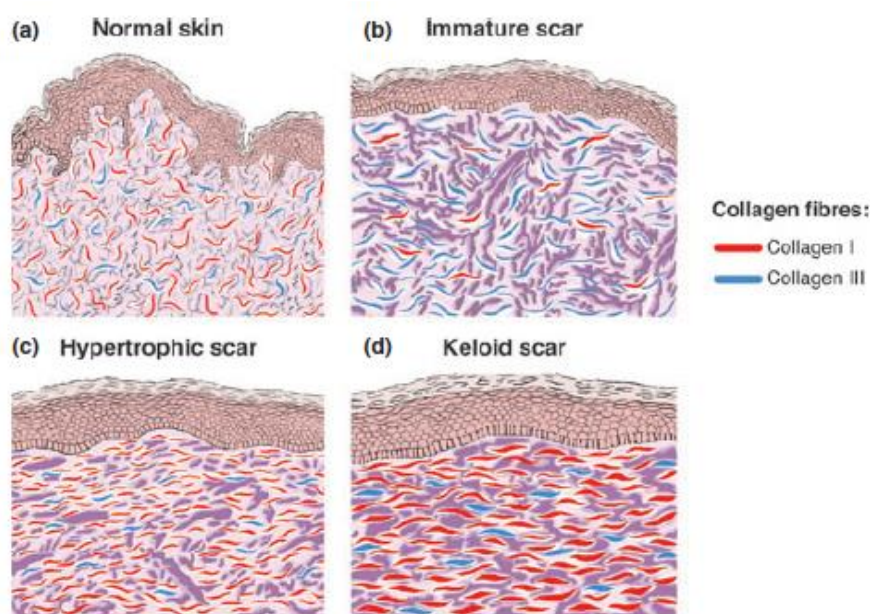
Ολοκληρώνοντας την αναφορά γύρω από τα βασικά χαρακτηριστικά της επούλωσης ελκών θα ήταν παράλειψη να μην αναφερθεί ότι η επούλωση δεν ολοκληρώνεται πάντα φυσιολογικά αλλά μπορεί να επηρεαστεί από διάφορους παράγοντες. Όλοι αυτοί οι παράγοντες μπορούν να δράσουν ξεχωριστά αλλά και σε συνδυασμό μεταξύ τους και να προκαλέσουν αναστολή ή καθυστέρηση στην επούλωση του τραύματος. Εκτενέστερη αναφορά στη μη φυσιολογική επουλωτική διαδικασία γίνεται στην επόμενη ενότητα

## 2. ΜΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΠΟΥΛΩΣΗ ΠΛΗΓΩΝ

Η επούλωση τραυμάτων είναι μια πολύπλοκη σειρά συμβάντων που είναι κρίσιμη για την αποκατάσταση του δερματικού φραγμού και την πρόληψη της απώλειας αίματος και της μόλυνσης από εισβολή ξένων σωμάτων μετά από τραυματισμό. Ο ρυθμός και η ποιότητα της επούλωσης πληγών επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες, όπως το βάθος και το μέγεθος της επιφάνειας του τραύματος και άλλους που συμβάλλουν στη νοσηρότητα (Emmerson E., 2010). Η καθυστέρηση στην επούλωση τραυμάτων συχνά οδηγεί σε τοπική μόλυνση και τη μετάβαση σε μη θεραπευμένο τραύμα. Κάθε βλάβη στη συνοχή του δερματικού ιστού που δεν αποκαθίσταται σε 4-6 εβδομάδες οδηγεί σε μη φυσιολογική επουλωτική διαδικασία και η πληγή θεωρείται πλέον χρόνια. Οι κύριες παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με μη φυσιολογική επουλωτική διαδικασία διακρίνονται σε δύο ευρείες κατηγορίες τις χρόνιες πληγές και τις πληγές που καταλήγουν στη δημιουργία ουλώδους ιστού (Martin & Nunan, 2015). Σε γενικές γραμμές, οι παράγοντες που επηρεάζουν την αποκατάσταση μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τοπικό και συστηματικό επίπεδο. Οι τοπικοί παράγοντες είναι αυτοί που επηρεάζουν άμεσα τα χαρακτηριστικά της πληγής, ενώ οι συστηματικοί παράγοντες είναι η γενική κατάσταση της υγείας ή της νόσου του ατόμου που επηρεάζει την ικανότητά του να θεραπευτεί. Πολλοί από αυτούς τους παράγοντες σχετίζονται μεταξύ τους και οι συστηματικοί παράγοντες δρουν μέσω των τοπικών επιδράσεων που επηρεάζουν την επούλωση πληγών. Στους τοπικούς παράγοντες ανήκουν η οξυγόνωση, η μόλυνση, διάφορα ξένα σώματα που μπορεί να υπάρχουν στον οργανισμό (π.χ. παθογόνοι μικροοργανισμοί) και η φλεβική ανεπάρκεια. Από την άλλη πλευρά στους συστηματικούς ανήκουν πιο ευρείς παράγοντες όπως είναι η ηλικία και φύλο, οι σεξουαλικές ορμόνες, το στρες, η ισχαιμία, διάφορες ασθένειες (διαβήτης, ίνωση, κληρονομικές διαταραχές επούλωσης, ίκτερος, ουραιμία), η παχυσαρκία, διάφορα φάρμακα (στεροειδή γλυκοκορτικοειδών, μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα, χημειοθεραπεία), ο αλκοολισμός και κάπνισμα, μερικές ανοσοκατασταλμένες καταστάσεις: καρκίνος, ακτινοθεραπεία, AIDS και τέλος, η διατροφή του ατόμου.

Όλες αυτές οι επιδράσεις μπορούν να οδηγήσουν σε μη φυσιολογική επούλωση της εκάστοτε πληγής και στη δημιουργία μη φυσιολογικού δερματικού ιστού μετέπειτα, όπως αναφέρθηκε προτύτερα. Στα χρόνια έλκη κατατάσσονται όλες οι πληγές που δεν ακολουθούν την τυπική χρονική πορεία των μοριακών και κυτταρικών συμβάντων που οδηγούν στην επούλωση υγιούς οξείας πληγής και επιφέρουν δυσμενείς επιπτώσεις στη ζωή και υγεία των ατόμων που τις φέρουν. Σε αυτές συγκαταλέγονται τα διαβητικά έλκη, τα έλκη πίεσεως και τα φλεβικά έλκη. Αντιστοίχως, στις πληγές που προκαλούν έντονη ουλοποίηση ανήκουν τα χηλοειδή και οι υπερτροφικές ουλές, οι οποίες είναι ουλές μεγάλου πάχους λόγω

υπερβολικής σύνθεσης πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας και ιδιαίτερα του κολλαγόνου μετά από οξύ τραύμα. Οι υπερτροφικές ουλές περιορίζονται στα όρια του τραυματισμένου δέρματος ενώ τα χηλοειδή τραύματα εκτείνονται και πέρα από τα όρια αυτά (Martin & Nunan, 2015).

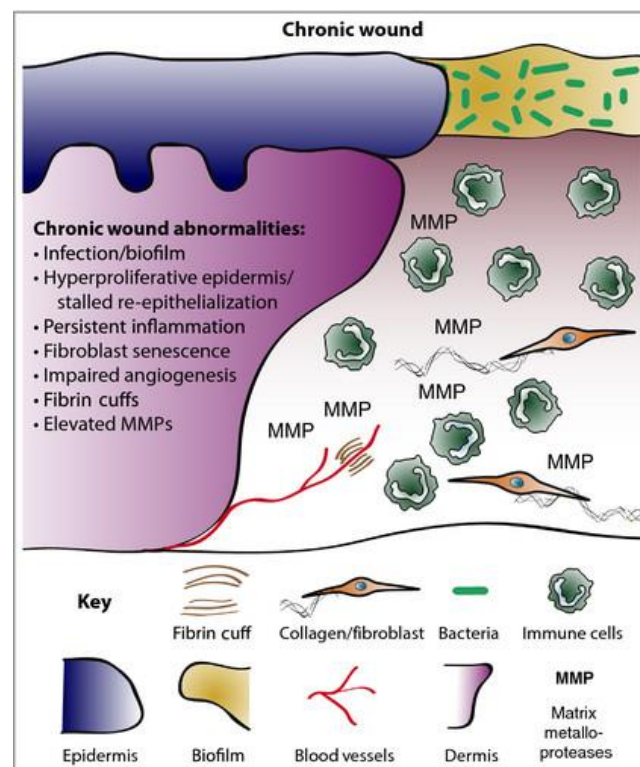


**Εικόνα Ε. 4:** Μια σχηματική απεικόνιση της σχετικής έκφρασης, κατανομής και οργάνωσης του κολλαγόνου I και III στο (α) φυσιολογικό δέρμα, (β) ανώριμη πληγή (γ) υπερτροφική ουλή και (δ) χηλοειδής ουλή. Η έκφραση του κολλαγόνου III είναι εμφανής στην πρώιμη φάση επούλωσης τραύματος του ανώριμου ιστού ουλής (β) οι οποίες αντικαθίστανται από ισχυρότερες ίνες κολλαγόνου I καθώς ωριμάζουν. Οι ίνες κολλαγόνου είναι πιο εμφανείς στον ιστό του χηλοειδούς ουλώδους ιστού (δ) από ότι στον υπερτροφικό ιστό (c). Η έκφραση κολλαγόνου, ιδιαίτερα του κολλαγόνου I, είναι υψηλότερη τόσο στον υπερτροφικό ιστό (c) όσο και στον χηλοειδή ιστό (d) σε σύγκριση με το φυσιολογικό δέρμα και τις ανώριμες ουλές. Σε χηλοειδείς ιστούς ουλής (δ), οι ίνες κολλαγόνου εμφανίζονται σε παχύ δεσμούς αντί για δίκτυο και είναι λιγότερο οργανωμένες, οι ίνες είναι παχύτερες, παράλληλες και έχουν μικρότερες διασταυρώσεις μεταξύ ινών σε σχέση με το φυσιολογικό δέρμα (α) και ανώριμες ουλές (β). Η αναλογία κολλαγόνου I / III ήταν υψηλότερη στον χημειοειδή ιστό (17: 1) (6: 1). Οι μοβ δομές αντιπροσωπεύουν μόρια ECM που υπάρχουν στο χόριο, και δεν αντιπροσωπεύονται μεμονωμένα. (Sidgwick G.P. & Bayat A., 2011)

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, πολλοί παράγοντες μπορεί να προκαλέσουν εξασθένηση της επούλωσης επηρεάζοντας μία ή περισσότερες φάσεις της διαδικασίας (Guo S., et al., 2010). Διαταραχές σε οποιοδήποτε φάση της επούλωσης, όπως η χρονική παράταση ή η μη ολοκλήρωση κάποιου σταδίου οδηγούν σε ανατομικές και λειτουργικές επιπλοκές του ιστού (Menke et al., 2006). Οι κυριότερες επιπλοκές είναι ο ανεπαρκής σχηματισμός ουλής, η υπερβολική ουλοποίηση και η υπερβολική σύσπαση (Rubin, 2002). Σε γενικές γραμμές, παρατηρείται αδυναμία σύνθεσης των βασικών πρωτεϊνών που δομούν την εξωκυττάρια ουσία με ταυτόχρονο / ή μειωμένο σχηματισμό κωκκιδώδους ιστού, ιδιότητες που οδηγούν

καταληκτικά σε ανεπαρκή σχηματισμό ουλής. Μερικά ακόμα χαρακτηριστικά που προκαλούνται από τους παράγοντες που αναφέρθηκαν προγενέστερα και έχουν ως καίριο αποτέλεσμα τη μη φυσιολογική επουλωτική διαδικασία είναι η μειωμένη λειτουργία των αιμοπεταλίων καθώς και η ικανότητα επαναεπιθηλιοποίησης. Επιπλέον, υπάρχει μειωμένη πολλαπλασιαστική ικανότητα από τους ινοβλάστες και παράγονται λιγότερες ή μη φυσιολογικού και λειτουργικού τύπου πρωτεΐνες της εξωκυττάριας μήτρας, ενώ τα κύτταρα δεν εμφανίζουν πλέον υψηλή πίεση εφελκυσμού. Η αγγειακή τροφοδοσία της προσβεβλημένης περιοχής είναι παράγοντας μείζονος σημασίας για τους μηχανισμούς της επούλωσης, παρόλα αυτά, σε περιπτώσεις μη φυσιολογικής επουλωτικής διαδικασίας παρατηρείται μειωμένη αγγειογενετική ικανότητα. Τέλος, διευρύνεται αρκετά το στάδιο της φλεγμονής καθώς διάφοροι μικροοργανισμοί μπορούν και εισχωρούν στο σημείο του τραύματος καθυστερώντας τη σωστή επιτέλεση της διαδικασίας.

Η γνώση για την επιστήμη της επούλωσης πληγών επεκτείνεται. Στο εγγύς μέλλον θα μπορούμε να αναπτύξουμε νέες θεραπείες για αργές ή μη φυσιολογικά θεραπευμένες πληγές που θα βασίζονται στη γενετική και την ανοσολογία. Αρκετά αποτελεσματικοί βιολογικοί επίδεσμοι και αυξητικοί παράγοντες είναι ήδη διαθέσιμοι και αποδεικνύονται χρήσιμοι για επιλεγμένους ασθενείς.



**Εικόνα Ε.5 :** Χαρακτηριστικά βιολογικά φαινόμενα που συμβαίνουν στις χρόνιες πληγές. (Martin & Nunan, 2015).

### 3. ΘΥΜΟΣΙΝΕΣ – THYMOSINS

Οι θυμοσίνες είναι μικρές πρωτεΐνες/πεπτίδια που υπάρχουν σε πολλούς ζωικούς ιστούς. Ονομάζονται θυμοσίνες επειδή απομονώθηκαν αρχικά από τον θύμο αδένα, αλλά οι περισσότερες πλέον είναι γνωστό ότι υπάρχουν σε πολλούς άλλους ιστούς (Hannappel, E; Huff, T., 2003). Οι θυμοσίνες έχουν ποικίλες βιολογικές δράσεις και πιο συγκεκριμένα οι θυμοσίνες α1 και β4 έχουν δυνητικά σημαντικές χρήσεις στην ιατρική. Σε σχέση με τις ασθένειες, οι θυμοσίνες έχουν ταξινομηθεί ως «τροποποιητές βιολογικής απόκρισης» (Low, TL; Goldstein, AL., 1984).

Πρωτεργάτης στην έρευνα επί των θυμοσινών υπήρξε ο Allan L. Goldstein, ο οποίος μαζί με τους συνεργάτες του στη δεκαετία του 1960 ξεκίνησαν έρευνες για το ρόλο του θύμου αδένος στην ανάπτυξη του ανοσοποιητικού συστήματος των σπονδυλωτών, οι οποίες εν τέλει οδήγησαν στην ανακάλυψη των θυμοσινικών πεπτιδίων. Το όνομα θυμοσίνη χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά για να περιγράψει τον παράγοντα με λεμφοποιητική δραστηριότητα, σε παρασκεύασμα που προερχόταν από θύμο αδένος μοσχαριού και μπορούσε να διεγείρει την *in vivo* ενσωμάτωση της  $^3\text{[H]}$ θυμιδίνης σε λεμφαδένες ποντικού (Goldstein et al., 1966). Αρχικά, το 1966 παρασκευάστηκε βιοδραστικό εκχύλισμα βόειου θύμου αδένος, το λεγόμενο θυμοσινικό κλάσμα 3 (Thymosin Fraction 3/TF-3) και χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά ο όρος «θυμοσίνη», ενώ το 1972 ο Goldstein και οι συνεργάτες του κατάφεραν να απομονώσουν από βόειο θύμο αδένος, με μια διαδικασία 5 σταδίων, ένα εμπλουτισμένο βιοδραστικό εκχύλισμα, που το ονόμασαν θυμοσινικό κλάσμα 5 / TF-5 (Goldstein, 2007). Έπειτα από αλληπάλληλες χορηγήσεις και επιτυχημένες βιολογικές εφαρμογές του TF5, οι ερευνητές οδηγήθηκαν τελικώς σε φυσικοχημικό χαρακτηρισμό των δραστικών συστατικών του κλάσματος (Goldstein & Badamchian, 2005). Συγκεκριμένα, το TF-5 βρέθηκε να περιέχει πάνω από 40 μικρά πεπτίδια (με μοριακά βάρη που κυμαίνονται από 1000 έως 15.000 Da), (Goldstein AL., 2007), τα οποία ονομάστηκαν "θυμοσίνες" και ταξινομήθηκαν ως α, β (και γ) θυμοσίνες, με βάση το ισοηλεκτρικό σημείο τους. Παρόλο που βρέθηκαν μαζί στο TF-5, είναι πλέον γνωστό ότι οι α- και οι β- θυμοσίνες είναι δομικά και γενετικά άσχετες μεταξύ τους, ενώ φαίνεται ότι και οι μηχανισμοί μέσω των οποίων ασκούν τη βιολογική τους δράση είναι, εν πολλοίς, διαφορετικοί.

Οι θυμοσίνες είναι, υπό φυσιολογικές συνθήκες, βραχείες, πολύ φορτισμένες και «εγγενώς μη δομημένες» (intrinsically disordered) μικρές πρωτεΐνες/πεπτίδια. Εν τούτοις, υπό συγκεκριμένες συνθήκες μπορεί να υιοθετήσουν ανώτερη δομή, π.χ. με εξουδετέρωση φορτίου σε χαμηλό pH ή με την προσθήκη ιόντων  $\text{Zn}^{2+}$ , οργανικών διαλυτών/αντιδραστηρίων όπως τριφθοροαιθανόλης, εξαφθοροπροπανόλης ή βρωμιούχου N-δωδεκυλοτριμεθυλαμμωνίου ή μετά από αλληλεπίδραση με τις φυσικές πρωτεΐνες - στόχους

τους. Οι δομές αρκετών θυμοσινών έχουν μελετηθεί με κυκλικό διχρωισμό, πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό και κρυσταλλογραφικές μεθόδους, προκειμένου να κατανοηθεί καλύτερα ο βιολογικός ρόλος τους.

Σήμερα οι θυμοσίνες χαρακτηρίζονται ως βιολογικώς ενεργά μόρια, που επιτελούν ευρύτερο ρόλο από αυτόν της ορμόνης του θύμου αδένος, ο οποίος τους είχε αρχικά αποδοθεί, καθώς έχουν πλέον ανιχνευθεί σε πλήθος κυττάρων και ιστών πέραν του θύμου αδένος, ενώ ταυτόχρονα έχει βρεθεί ότι δρουν τόσο εξωκυτταρικά όσο και ενδοκυτταρικά. Ενδοκυτταρικά, οι α-θυμοσίνες έχουν συσχετισθεί κυρίως με την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, μέσω της δέσμευσής τους σε μόρια ιστόνης H1 στον κυτταρικό πυρήνα (Segade F., et al., 1999; Papamarcaki T., et al., 1994), ενώ οι β-θυμοσίνες έχουν συσχετισθεί κυρίως με τις λειτουργίες του κυτταροσκελετού, μέσω της δέσμευσής τους στη G-ακτίνη (Bao L., et al., 1998; Nachmias V.T., et al., 1993; Sun H.-Q. et al., 1995; Heintz D., et al., 1993).

Είναι ενδιαφέρον να αναφερθεί ότι τουλάχιστον δύο θυμοσινικά πεπτίδια, η θυμοσίνη α1 (Ta1) και η θυμοσίνη β4 (Tb4) μελετώνται σήμερα ως πιθανοί θεραπευτικοί παράγοντες. Συγκεκριμένα, μετά από κλινικές δοκιμές η Ta1 έχει εγκριθεί σε ορισμένες χώρες ως συγχορηγούμενος ανοσοενισχυτικός παράγοντας για τη θεραπεία της ηπατίτιδας Β και C (Garaci et al., 2007), ενώ η Tb4 μελετάται σε επίπεδο κλινικών δοκιμών ως προς την επουλωτική της δράση, κυρίως σε τραύματα του δέρματος και των οφθαλμών (Kleinman & Sosne, 2016).

## ΘΥΜΟΣΙΝΙΚΟ ΠΕΠΤΙΔΙΟ Τα1

Η πρώτη α-θυμοσίνη, που απομονώθηκε από το TF-5 και χαρακτηρίστηκε ως προς την αμινοξική αλληλουχία της, ήταν η Τα1 (Low & Goldstein, JBC 254: 987-995, 1979). Στις α-θυμοσίνες ανήκουν επίσης η προθυμοσίνη α (ProTa), μία μικρή πρωτεΐνη/πολυπεπτίδιο 109 αμινοξέων, και η παραθυμοσίνη α (ParaTa), μία μικρή πρωτεΐνη/πολυπεπτίδιο 101 αμινοξέων, εν μέρει ομόλογο με την ProTa (Komiya T., et al., 1986), οι οποίες θεωρούνται οι κύριες α-θυμοσίνες στα θηλαστικά (Segade F., et al., 1999). Εξωκυτταρικά, η ProTa θεωρείται ότι ενισχύει την κυτταρομεσολαβούμενη ανοσία (Ioannou et al., Cancer Immunol Immunother 61: 599-614, 2012). Ενδοκυτταρικά, η ProTa εμπλέκεται στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, αλληλεπιδρώντας με την πυρηνική πρωτεΐνη ιστόνη H1 (Paramarcaki T. et al., 1994), ενώ έχει επίσης αναφερθεί ότι συμμετέχει στη διαδικασία της απόπτωσης (Jiang et al., Science 299: 223-226, 2003). Η ParaTa, που δεσμεύεται επίσης με την πυρηνική πρωτεΐνη ιστόνη H1 (Kondili K. et al., 1996), αρχικά θεωρήθηκε ότι λειτουργεί ως ρυθμιστικός /αντισταθμιστικός παράγοντας των λειτουργιών της ProTa (Clinton M., et al., 1989). Μεταγενέστερα, αναφέρθηκε η αλληλεπίδραση της ParaTa με τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών και η δράση της ως αναστολέα της μεταγραφικής δράσης του παράγοντα NF-κB (Okamoto et al., Endocrinology 157: 4973-4986, 2016).

Η Τα1 είναι πεπτίδιο 28 αμινοξέων (MB: 3.108 Da), η N-τελική σειρά του οποίου είναι ακετυλιωμένη (Goldstein et al., 1977). Η αλληλουχία των αμινοξέων της Τα1 φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:



Πρόκειται για ένα εξαιρετικά συντηρημένο όξινο πεπτίδιο (ισοηλεκτρικό σημείο 4,2), με υψηλή ομολογία πρωτοταγούς δομής σε ποντικούς, βοοειδή και ανθρώπους. Το πεπτίδιο είναι ταυτόσημο με τα 28 πρώτα N-τελικά αμινοξέα της ProTa, από την οποία προέρχεται. Αρχικά, αρκετοί ερευνητές θεώρησαν ότι η Τα1 προκύπτει από *in vitro* πρωτεόλυση της ProTa κατά τη διαδικασία της εκχύλισης του θύμου αδένα. Ωστόσο, είναι

επίσης πιθανόν να προκύπτει κατά την *in vivo* πρωτεόλυση της ProTa, η οποία έχει αναφερθεί ότι διασπάται από μία λυσοσωμική ενδοπεπτιδάση της ασπαραγίνης (λεγουμείνη), που υπάρχει στα κύτταρα των θηλαστικών (Sarandeses, Covelo, Díaz-Jullien, & Freire, 2003). Μάλιστα, τόσο η Ta1 (Franco, Diaz, Barcia, & Freire, 1992) όσο και οι λεγουμείνες (Chen, Dando, Rawlings et al, 1997) μοιράζονται μια ευρεία κατανομή σε διαφορετικούς ιστούς, υποδηλώνοντας ότι η πρωτεολυτική επεξεργασία της ProTa προς Ta1 αντιπροσωπεύει μια γενικευμένη διαδικασία στους ιστούς των θηλαστικών. Επιπροσθέτως, έχει βρεθεί υψηλή δραστηριότητα λεγουμείνης σε ιστούς λεμφαδένων, που έχει αναφερθεί ότι παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα Ta1 (Franco et al., 1992). Σε αντίθεση με την ProTa, η Ta1 δεν διαθέτει στο μόριό της σήμα πυρηνικού εντοπισμού, ενώ ούτε η ProTa ούτε η Ta1 διαθέτουν σήμα εξωκυτταρικής έκκρισης (Eschenfeldt et al., 1989, Manrow et al., 1991).

Υπό συγκεκριμένες συνθήκες, η Ta1 υιοθετεί δομή που περιέχει μία α-έλικα (περιοχή 14-26) και δύο διπλές β-στροφές (περιοχή 1-12, “παραμορφωμένη έλικα”) (Elizondo-Riojas et al., 2011, Grottesi et al., 1998).

Η χημική σύνθεση της Ta1 έχει επιτευχθεί με διάφορες τεχνικές σύνθεσης πεπτιδίων τόσο σε διάλυμα, όσο και σε στερεά φάση (A. L. Goldstein, 1993). Τα τελευταία χρόνια έχει επιτευχθεί η έκφραση διμερών της Ta1 με την τεχνική του ανασυνδυασμένου DNA σε πλασμίδια βακτηρίου *E. coli* (Li et al., 2011).

### Μηχανισμός Δράσης της Ta1 στο Κύτταρο

Ο ακριβής μηχανισμός της εξωκυτταρικής δράσης των θυμοσινικών πεπτιδίων και πιο συγκεκριμένα της Ta1 δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένος. Υπάρχουν διάφορες ενδείξεις σχετικά με τον πιθανό τρόπο αλληλεπίδρασής της με τα κύτταρα. Ένας από αυτούς είναι η πιθανή αλληλεπίδραση του πεπτιδικού μορίου με την κυτταρική μεμβράνη σε μερική **ένθεση** (Neprevishtha, R. et al., 2016). Αυτό το χαρακτηριστικό εμφανίζεται σε αρκετά πεπτίδια και πρωτεΐνες **με ορμονική δράση**, σε μελέτες με χρήση διάφορων διαλυτών / χαοτροπικών παραγόντων, λόγω χάρη του διαλύτη τριφθοροαιθανόλη (TFE) ο οποίος θεωρείται ότι δημιουργεί συνθήκες προσομοίωσης με αυτές του μεμβρανικού περιβάλλοντος και, ως εκ τούτου, αποτελεί βέλτιστο εργαλείο για τη μελέτη της δομής και δράσης βιολογικά σημαντικών, ενδογενών πεπτιδίων (Elizondo-Riojas et al., 2011; Grottesi et al., 1998). Έτσι, πειραματικά δεδομένα τεχνικών φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού (CD) και NMR υποδηλώνουν ότι η Ta1 αναδιπλώνεται κατά την εισαγωγή της στη μεμβράνη και, όταν εισάγεται, μπορεί να επιπλέει επί της μεμβράνης, λόγω της ρευστότητας της μεμβράνης, και τελικά να αλληλεπιδρά με παρακείμενες πρωτεΐνες και / ή υποδοχείς, που δρουν ως

τελεστικός παράγοντας και προκαλούν έναν καταρράκτη κυτταρικής σηματοδότησης (Nepravishita, R. et al., 2016). Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με πειραματικά αποτελέσματα CD και NMR, είναι πιθανόν η πεπτιδική αλυσίδα της Ta1 να αναδιπλώνεται σε ελικοειδείς διαμορφώσεις κατά την αλληλεπίδραση της με μεμβράνες που εκθέτουν αρνητικά φορτία στην επιφάνειά τους. Αρχικά, η Ta1 εισάγει το N-άκρο της στην υδρόφοβη περιοχή της μεμβράνης (Nepravishita, R. et al., 2016). Στη συνέχεια, η Ta1 έρχεται σε άμεση αλληλεπίδραση με αρνητικές περιοχές της μεμβράνης, π.χ. μόρια φωσφατιδυλοσερίνης που έχουν εκτεθεί στην επιφάνεια, οπότε το μόριο της Ta1 υιοθετεί συγκεκριμένα στοιχεία ανώτερης δομής, π.χ. α-έλικα. Το σχήμα αυτό μπορεί να θεωρηθεί πρότυπο για το μηχανισμό δράσης της Ta1, ως του ενεργοποιητή καταρράκτη σηματοδότησης μετά την αλληλεπίδρασή της με διαφορετικούς κυτταρικούς υποδοχείς.

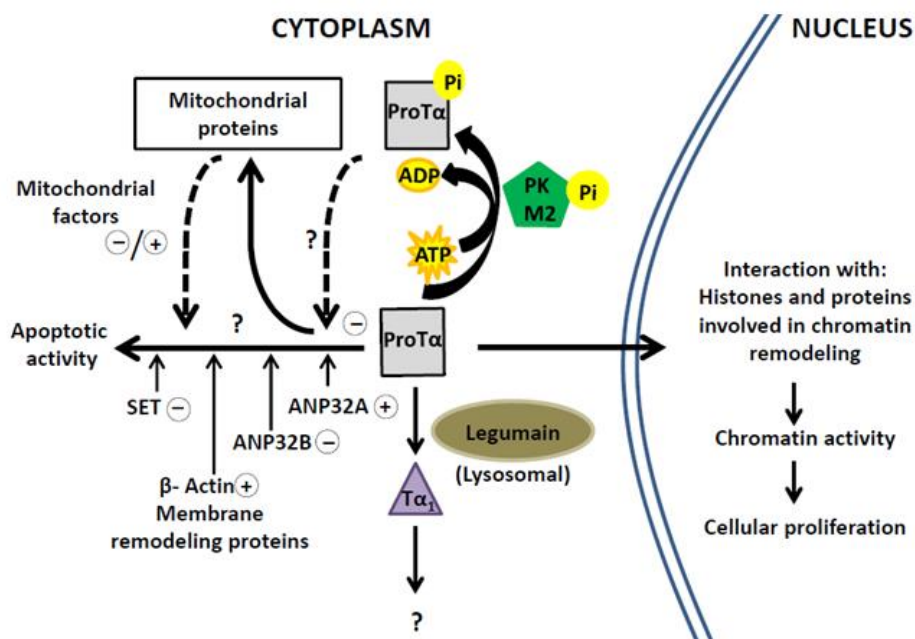
Άλλες μελέτες έδειξαν ότι η Ta1 ρυθμίζει την έκφραση του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης I σε καρκινικές κυτταρικές σειρές ποντικού και ανθρώπου και σε πρωτογενείς καλλιέργειες μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος εμπλουτισμένων με ανθρώπινα μονοκύτταρα (Giuliani, Napolitano, Mastino, et al., 2000). Έχει επίσης αναφερθεί ότι η Ta1 επάγει την ωρίμανση των T-κυττάρων και των δενδριτικών κυττάρων (DC) και την έκφραση της ιντερλευκίνης-2 (IL-2) (Knutsen et al., 1999, Romani et al., 2004). Είναι επίσης ικανή να διεγείρει την έκφραση των υποδοχέων τύπου Toll (TLR) 2 και 9 (σε μεγαλύτερο βαθμό συγκριτικά με τους 5 και 8) σε δενδριτικά κύτταρα ποντικού και να προστατεύει τους μύς από πρόκληση επεμβατικής ασπεργίλλωσης στον εξαρτώμενο τύπο MyD88 (μυελοειδές διαφοροποιημένο παράγοντα 88) (Romani et al., 2004). Επιπλέον, σημαντικό είναι να αναφέρουμε ότι, όπως έχει αναφερθεί, η Ta1 ενεργοποιεί μια οδό σηματοδότησης κινάσης C (PKC)-IκB που οδηγεί στην ενεργοποίηση του πυρηνικού παράγοντα-kB (NF-kB), ο οποίος με τη σειρά του εκκινεί την έκφραση του γονιδίου της κυτοκίνης IL-6 σε μακροφάγα προερχόμενα από τον μυελό των οστών του ποντικού (Zhang, Chan, Dragoi et al., 2005).

### Κλινικές Εφαρμογές της Ta1

Σε *in vitro* και *in vivo* μελέτες που έγιναν έπειτα από την απομόνωσή της από το θυμοσινικό κλάσμα TF5, η Ta1 βρέθηκε να είναι 10-1000 φορές δραστικότερη από το TF5, (Goldstein et al., 1977). Σήμερα, η Ta1 θεωρείται «Τροποποιητής της Βιολογικής Απόκρισης» (biological response modifier) καθώς έχει την δυνατότητα να ενεργοποιεί τα διάφορα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, τόσο της φυσικής όσο και της επίκτητης ανοσίας, επιφέροντας ευεργετικά κλινικά αποτελέσματα σε διαταραχές του οργανισμού στις οποίες εμφανίζονται αναποτελεσματικές και εξασθενημένες οι ανοσολογικές αντιδράσεις.

Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων διαταραχών της ανοσολογικής απόκρισης αποτελούν χρόνιες και οξείες μολύνσεις όπως η βαριά σήψη, λοιμώξεις των πνευμόνων συμπεριλαμβανομένης της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονικής διαταραχής (COPD), λοιμώξεις μετά από μεταμόσχευση μυελού των οστών, η ηπατίτιδα Β και C και η λοίμωξη με HIV, νεοπλασίες (κυρίως ηπατοκυτταρικός καρκίνος, καρκίνος του πνεύμονα και μελάνωμα), αλλά και η μη ανταπόκριση σε εμβόλια. Λόγω της ισχυρής ανοσοενισχυτικής δράσης της, η Τα1 έχει εγκριθεί για συμμετοχή σε κλινικές μελέτες Φάσης II, III και IV, ενώ η κυκλοφορία του πεπτιδίου (συνήθως, συνθετικής προέλευσης) προς θεραπευτική χρήση έχει λάβει έγκριση σε διάφορες Ασιατικές χώρες και κυρίως την Κίνα (Tuthill & King, 2013; Garaci et al., 2012; Perruccio et al., 2010; Chadwick et al., 2003). Συγκεκριμένα, η Τα1 έχει εγκριθεί σε διάφορες χώρες για τη θεραπεία πολλών ιογενών λοιμώξεων (Andreone et al., 2001, Iino et al., 2005, Kullavanuava et al., 2001, You et al., 2006) καθώς και ως βοηθητικό ανοσοενισχυτικό (Carraro κ.ά., 2012, Goldstein, 2009). Επιπλέον, έχει επίσης προταθεί για τη θεραπεία του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα, του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, του AIDS και του κακοήθους μελανώματος (Billich, 2002, Maio et al., 2010). Θα πρέπει να σημειωθεί, παρ' όλα αυτά, ότι ο μηχανισμός δράσης της Τα1 είναι ακόμη άγνωστος, εφόσον δεν έχει ολοκληρωθεί η ταυτοποίηση ειδικών κυτταρικών υποδοχέων που να συνδέονται και να ενεργοποιούνται από το πεπτίδιο. Από την άλλη πλευρά, ένα αυξανόμενο σύνολο αποδεικτικών στοιχείων που αποκτήθηκαν τις τελευταίες δεκαετίες πιστοποιεί την πλειοτροπική δράση αυτού του πεπτιδίου, που φαίνεται ότι αλληλεπιδρά με πολλαπλά κυτταρικά συστατικά (Garaci et al., 2012, Romani et al., 2012, Serafino et al., 2014).

Η προοπτική θεραπευτικής εφαρμογής της Τα1 δημιούργησε ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον ως προς τις δυνατότητες βέλτιστης *in vivo* μεταφοράς του πεπτιδίου στα κύτταρα-στόχους. Με αυτό το στόχο, επιχειρήθηκε σχετικά πρόσφατα η σύζευξη της Τα1 με το μοτίβο RGD, ώστε να πραγματοποιηθεί στοχευμένη αλληλεπίδραση της Τα1 με κύτταρα όγκου (Lao, Liu, Chen, & Zheng, 2013). Η στόχευση οφείλεται στην αμινοξική αλληλουχία RGD (Arg-Gly-Asp), η οποία είναι ικανή να αναγνωρίσει τις ιντεγκρίνες ανβ3, οι οποίες υπερεκφράζονται στον όγκο, λόγω υπερέκφρασής τους στα κύτταρα του ενδοθηλίου και, επίσης, λόγω του αυξημένου αριθμού αιμοφόρων αγγείων στον όγκο (Zetter, 1997).



**Εικόνα Ε.6 :** Δράσεις της προθυμοσίνης α σε πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα που σχετίζονται με πυρηνικές και κυτταροπλασματικές λειτουργίες μέσω αλληλεπιδράσεων με τις υποδεικνυόμενες πρωτεΐνες (Freire M. et al., 2018)

### Τα1 και Δερματική Επούλωση

Οι μελέτες που έχουν διεξαχθεί σχετικά με τα αποτελέσματα που μπορεί να επιφέρει το θυμοσινικό πεπτίδιο Τα1 στην επούλωση δερματικών ελκών (ουλών?) είναι ολιγάριθμες. Όπως αναφέρθηκε και προγενέστερα, η Τα1 θεωρείται ως «Τροποποιητής της Βιολογικής Απόκρισης» και ταυτόχρονα ρυθμιστής του ανοσοποιητικού συστήματος, χαρακτηριστικό που μπορεί να επιδρά με επωφελή ή μη τρόπο στο στάδιο της φλεγμονής της δερματικής επουλωτικής διαδικασίας, στο οποίο συμμετέχουν διάφορα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα βασικά ευρήματα αφορούν τη δράση που έχει η Τα1 σε ενδοθηλιακά κύτταρα ομφαλίου λώρου (HUVEC) και σε κύτταρα από χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη εμβρύου κότας όσον αφορά την κυτταρική μετανάστευση και την αγγειογένεση. Σύμφωνα με τους Koutrafouris V. και τους συνεργάτες της (Koutrafouris et al., 2001), αποδείχθηκε ότι τόσο η ProTa όσο και η Τα1 έχουν μία θετική επίδραση όσον αφορά την αγγειογενετική διαδικασία, που εμφανίζεται εκτενέστερα στο τρίτο στάδιο της επούλωσης των ελκών (ουλών?). Επιπλέον, έδειξαν ότι η ParaTa είχε αρνητική επίδραση στη διαδικασία

αγγειογένεσης και έτσι κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι ParaTa και ProTa διαδραματίζουν συμπληρωματικούς ρόλους στην αγγειογενετική διαδικασία.

Βάση για την εκπόνηση των παραπάνω πειραμάτων που αναφέρθηκαν αποτέλεσε η μελέτη των Malinda και των συνεργατών της το 1998, οι οποίοι μελετώντας την κυτταρική διαφοροποίηση και μετανάστευση των κυττάρων HUVEC μετά την επίδραση της Ta1 απέδειξαν ότι το συγκεκριμένο πεπτίδιο διεγείρει τόσο τη διαφοροποίηση όσο και την μετανάστευση των κυττάρων αυτών. Επιπλέον, πρόσθετα πειράματα έδειξαν ότι η Ta1 ενεργεί ως χημειοτακτικός παράγοντας. Συγκεκριμένα, *in vitro* πειράματα χημειοτακτισμού (Boyden chamber) με μία ποικιλία κυτταρικών σειρών έδειξαν ότι η μεταναστευτική διέγερση συνέβη ειδικά σε ενδοθηλιακά κύτταρα και μονοκύτταρα. Τέλος, ακολούθησαν και *in vivo* μελέτες, από την ίδια ομάδα ερευνητών, με υποδόρια χορήγηση της Ta1, είτε τοπικά είτε ενδοπεριτοναϊκά, στις οποίες δείχθηκε ότι επιταχύνεται η επούλωση σε ένα μοντέλο πρόκλησης επιφανειακού τραύματος μέσω διάτρησης (punch model) σε αρουραίο.

## **ΘΥΜΟΣΙΝΙΚΟ ΠΕΠΤΙΔΙΟ Τβ4**

Οι β-θυμοσίνες απομονώθηκαν αρχικά από βόειο θύμο αδένες και θεωρήθηκαν ότι είναι θυμικές ορμόνες (Goldstein, Slater, & White, 1966). Σήμερα γνωρίζουμε ότι είναι θερμοσταθερά πολυλειτουργικά πεπτίδια (5 kDa, ~ 45 αμινοξέα), που εκφράζονται ευρύτατα μεταξύ των ζωικών ειδών. Η κύρια β-θυμοσίνη στον άνθρωπο είναι η θυμοσίνη β4 (Τβ4), ενώ εκφράζεται επίσης ένα ομόλογο πεπτίδιο, η θυμοσίνη β10 (Τβ10). Επίσης, σε συγκεκριμένους ανθρώπινους ιστούς έχει αναφερθεί η έκφραση μίας ακόμη β-θυμοσίνης, της θυμοσίνης β15 (Τβ15) (Goldstein et al., 2005, Huff et al., 2001)

Η Τβ4, που είναι το πλέον άφθονα εκφραζόμενο μέλος της οικογένειας των β-θυμοσινών (Low, Hu & Goldstein, 1981), απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε για πρώτη φορά το 1981 από τους Low και Goldstein ~~αδένες~~ (Low TL., et al., 1981). Η δράση της Τβ4 χαρακτηρίστηκε αρχικά με βάση την ικανότητά της να επάγει την έκφραση του ενζύμου τερματική δεοξυνουκλεοτιδυλ-τρανσφεράση (TdT) στα βλαστοκύτταρα μυελού των οστών, που δεν εκφράζουν τις συγκεκριμένες τρανσφεράσες, όπως και στα αρνητικά σε TdT θυμοκύτταρα τόσο σε *in vivo* όσο και *in vitro* μελέτες (Hu SK., et al., 1981). Από άποψη

πρωτοταγούς δομής, η Τβ4 είναι ένα όξινο 43-πεπτίδιο με μοριακό βάρος 4964,5 Da και ισοηλεκτρικό σημείο 4.6 (Hannappel E., 2010). Αρχικά, όταν πρωτοανακαλύφθηκε από το TF-5, ταξινομήθηκε ως β-θυμοσίνη με ισοηλεκτρικό σημείο 5.1 (Low TL, et al., 1981). Αν και η Τβ4 απομονώθηκε πρώτα από βόειο θύμο αδένα, είναι πλέον γνωστό ότι έχει μια πανταχού παρούσα κατανομή (Hu SK, et al., 1981). Επιπλέον, απομόνωση της Τβ4 από μια ποικιλία ιστών έχει αποδείξει ότι είναι η πιο σημαντική από τη μεγάλη οικογένεια των πεπτιδίων β-θυμοσίνης και παίζει βασικό ρόλο στη δυναμική του κυτταροσκελετού, ενώ ταυτοχρόνως παρουσιάζει ποικίλη σειρά από άλλες ενδοκυτταρικές και εξωκυτταρικές λειτουργίες. Πλέον, όπως και τα περισσότερα ενδογενώς απαντώμενα μόρια, η Τβ4 παρασκευάζεται συνθετικά, ενώ τα τελευταία χρόνια επιτεύχθηκε έκφραση του συγκεκριμένου πεπτιδίου με τις τεχνικές ανασυνδυασμένου πλασμιδίου (Kleinman & Sosne, 2016).

Οι β-θυμοσίνες είναι διαλυτές σε αραιό υπερχλωρικό οξύ (0,4 M) ή τριχλωροξικό οξύ (5% TCA), είναι αδιάλυτες σε 20-30% TCA (Hu SK. Et al., 1981). Το ένα πέμπτο των 41 έως 44 πλευρικών αλυσίδων αμινοξέων των β-θυμοσινών είναι θετικά φορτισμένο ενώ το ένα τέταρτο είναι αρνητικά φορτισμένα. Αυτή η αναλογία των βασικών σε σχέση με τα όξινα φορτισμένα αμινοξέων είναι υπεύθυνη για τα ελαφρώς όξινα ισοηλεκτρικά σημεία (pIs) της β-θυμοσίνης. Η υψηλή περιεκτικότητα σε φορτισμένα υπολείμματα αμινοξέων (~ 45%) σε αντίθεση με τα μη πολικά υπολείμματα αμινοξέων (~ 17%) εξηγεί την εξαιρετικά υψηλή διαλυτότητα της Τβ4 στο νερό (> 100 mg / ml) (Goldstein A., et al., 2011).

Μέχρι στιγμής, δεν έχει ανιχνευθεί μεγαλύτερο πρόδρομο πεπτίδιο της Τβ4, ούτε φαίνεται το μόριο να περιέχει σήμα εξωκυτταρικής έκκρισης. Πεπτίδια με τα παραπάνω χαρακτηριστικά θεωρούνται συχνά ως ενδοκυτταρικά, ωστόσο είναι πιθανόν τα πεπτίδια αυτά να χρησιμοποιούν άγνωστους, μη κλασσικούς μηχανισμούς εξόδου από το κύτταρο (Goldstein A., et al., 2011). Αρκετά παραδείγματα δείχνουν ότι διάφορες πρωτεΐνες μπορούν να μετατοπιστούν από το κυτταρόπλασμα στο εξωκυτταρικό διαμέρισμα με μη συμβατικά μέσα (Butler GS., et al., 2009).

Η Τβ4 απαντάται ενδογενώς σε όλους τους τύπους κυττάρων του οργανισμού, εκτός των ερυθροκυττάρων, με τα μεγαλύτερα ποσοστά της να εμφανίζονται κυτταροπλασματικά, ενώ σύμφωνα με μελέτες βρέθηκαν ίχνη της και μέσα στον πυρήνα των εκάστοτε υπό μελέτη κυττάρων (Huff et al., 2004). Τα επίπεδα της Τβ4 στο κυκλοφοριακό σύστημα διαφέρουν αρκετά σύμφωνα με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας (Tan et al., 2018), παρόλα ταύτα, σημαντικά επίπεδά της έχουν ανιχνευθεί τόσο σε πλάσμα αίματος όσο και στον ορό, ενώ σε εκχύλισμα από ολικό αίμα έχει επίσης ανιχνευθεί σε συγκέντρωση περίπου 16,3 μg/ml, το οποίο θεωρείται πως προέρχεται τόσο από τα λευκοκύτταρα όσο και από τα αιμοπετάλια. Σε κατεστραμμένο ιστό, η Τβ4 παράγεται και απελευθερώνεται από διάφορους κυτταρικούς τύπους, όπως ινοβλάστες, κοκκιοκύτταρα, αιμοπετάλια, μακροφάγα, αγγειακά

ενδοθηλιακά κύτταρα και επιθηλιακά κύτταρα κερατοειδούς (Goldstein et al., 2005, Grant et al., 1995, Huff et al., 2001, Huff et al., 2002, Xu et al., 1982). Το συγκεκριμένα θυμοσινικό πεπτίδιο αντιπροσωπεύει την κύρια β-θυμοσίνη στον ιστό των θηλαστικών, με εξαίρεση τα κουνέλια όπου αντικαθίσταται από θυμοσίνη β4<sup>Ala</sup>. Ανάλογα με τον ιστό και το στάδιο ανάπτυξής του, η Τβ4 συνοδεύεται συχνά από μια δεύτερη β-θυμοσίνη, όπως είναι η Τβ10, που αναφέραμε ήδη, η αλληλουχία της οποίας έχει ταυτοποιηθεί σε διάφορα είδη, όπως σε άνθρωπο, αρουραίο, ποντίκι, γάτα, μόσχο και άλογο.

Όπως έδειξαν μελέτες φασματοσκοπίας NMR παρουσία διαφόρων πολυφθοριωμένων αλκοολών, το μόριο της Τβ4 τείνει να σχηματίζει α-έλικα στις θέσεις 4-16 και 30-40 (Zarbock et al., 1990; Volk et al., 2012), ενώ σε υδατικό περιβάλλον η Τβ4 λαμβάνει τυχαία διαμόρφωση. Επιπλέον, σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές των τελευταίων χρόνων, η Τβ4 χαρακτηρίζεται ως μόριο με πολλαπλές δράσεις λόγω της ιδιότητάς της να λαμβάνει ανώτερες δομές κατά την αλληλεπίδρασή της με διάφορες άλλες πρωτεΐνες (Goldstein et al., 2005; Hara, 2011).

#### Μηχανισμός Δράσης της Τβ4 στο Κύτταρο

Βασικό χαρακτηριστικό των θυμοσινών από όταν πρώτο ανακαλύφθηκαν ήταν ότι αποκαθιστούν πολλές από τις ανοσολογικές ελλείψεις που παρατηρούνται σε ζώα που στερούνται θύμου αδένος (Goldstein, 2007). Πλήρεις ή θραυσματοποιημένα παράγωγα των β-θυμοσινών έχουν βρεθεί σε αρκετά εξωκυτταρικά ανθρώπινα υγρά συμπεριλαμβανομένου του ορού του αίματος και του πλάσματος (Mannherz & Hannappel, 2009) και εμφανίζουν ορμονικές ή παρακρινικές δράσεις που ρυθμίζουν την ανοσοαπόκριση και τον καταρράκτη επούλωσης και αναγέννησης των ιστών μετά από τραυματισμούς. Διάφορες παρακρινικές επιδράσεις έχουν αναφερθεί για τις β-θυμοσίνες, για παράδειγμα, στην αγγειογένεση, στην καρδιακή προστασία, στη διέγερση επούλωσης τραυμάτων του δέρματος και του κερατοειδούς, στη μετανάστευση κυττάρων και στη μείωση της φλεγμονής (Huff et al, 2001, Mannherz and Hannappel, 2009, Sosne et al., 2010). Οι β-θυμοσίνες αντιπροσωπεύουν επομένως ελπιδοφόρα προοπτική για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών πεπτιδίων και πολυπεπτιδίων με εφαρμογή στον τομέα της υγείας του ανθρώπου και των ζώων και μελετώνται σε αρκετές κλινικές δοκιμές που περιλαμβάνουν την επιδιόρθωση και αναγέννηση των ιστών (Crockford et al., 2010, Goldstein and Kleinman, 2015). Εντούτοις, οι πολλαπλοί αλληλεπιδρώντες υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας, οι δομικοί ρυθμιστικοί μηχανισμοί και οι οδοί μεταγωγής πλήρους μοριακού σήματος που υποστηρίζουν όλες τις δραστηριότητές τους ως εξωκυτταρικοί διαμορφωτές στην αποκατάσταση ιστών, στη

μετανάστευση κυττάρων και στην ανοσολογική άμυνα παραμένουν ασαφείς. Εκτός από τις παραπάνω παρακρινικές επιδράσεις, οι β-θυμοσίνες εκφράζονται, επίσης, σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις εντός των περισσότερων κυττάρων των μεταζώων όπου οι κύριοι προσδέτες τους φαίνεται να είναι η κυτταροσκελετική πρωτεΐνη δέσμησης ATP, ακτίνη. Τα τελευταία χρόνια, διάφορες σημαντικές δομικές και λειτουργικές ιδιότητες αυτών των πεπτιδίων, που δεσμεύουν ακτίνη, μελετώνται ενδελεχώς, ώστε να κατανοηθεί η ικανότητά τους να συντονίζουν διαφορετικές λειτουργίες στη δυναμική της αυτοοργάνωσης των μορίων ακτίνης και στην ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών, με απώτερο στόχο την αναδιαμόρφωση του κυτταρικού σκελετού (Renault. L. 2016).

Είναι γνωστό πως η ακτίνη, βασική κυτταροσκελετική πρωτεΐνη, αναδιαμορφώνεται συνεχώς στα ευκαρυωτικά κύτταρα για τον έλεγχο και τον συντονισμό πολλών κινητικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής μετανάστευσης, της κυτταρικής προσκόλλησης, της κυτοκίνησης, της ενδοκυτταρικής μεταφοράς, της φαγοκυττάρωσης και της αντιμετώπισης των ενδοκυτταρικών παθογόνων λοιμώξεων. Ο κυτταροσκελετός ακτίνης ρυθμίζεται από περισσότερες από 100 λειτουργικά διαφορετικές δεσμευτικές πρωτεΐνες της ακτίνης, γνωστές ως ABPs (dos Remedios et al., 2003). Κάθε ABP ρυθμίζει στοιχειώδεις λειτουργίες με G- ή F-ακτίνη, και συνεργάζεται συχνά με άλλες ABPs για να ρυθμίσει τη «συναρμολόγηση» και «αποσυναρμολόγηση» της F-ακτίνης (Renault L. et al., 2016). Μεταξύ των μεταζώων, οι β-θυμοσίνες αντιπροσωπεύουν βασικούς ρυθμιστές της ομάδας της G-ακτίνης, σε συνδυασμό με μια άλλη σημαντική πρωτεΐνη δεσμεύσεως της G ακτίνης, που ονομάζεται προφιλίνη (Huff et al., 2001, Mannherz & Hannappel, 2009, Xue & Robinson, 2013). Οι β-θυμοσίνες είναι οι βραχύτερες λειτουργικές ABPs που είναι γνωστές, με μέγεθος της τάξεως των 5 kDa. Ανήκουν σε μία μεγαλύτερη οικογένεια μικρών, ευρύτατα διαδεδομένων παραγόντων δεσμεύσεως της ακτίνης, που χαρακτηρίζονται από ανυπαρξία ανώτερων δομών στο μόριό τους και που ονομάζονται πεδία WH2 / β-θυμοσίνης (βT περιοχές). Οι βT περιοχές είναι παρούσες, σε διαφορετικό βαθμό, σε μεγάλο αριθμό πολυπεπτιδικών ABPs πρωτεϊνών. Τα τελευταία χρόνια, παράγοντες που διαθέτουν μικρές παραλλαγές της βασικής αλληλουχίας δέσμησης στην ακτίνη μελετήθηκαν ως ευπροσάρμοστοι ρυθμιστές της δυναμικής αυτοσυναρμολόγησης της ακτίνης, αλληλεπιδρώντας με G- και / ή F-ακτίνη και μερικές φορές με πρόσθετες πρωτεΐνες ή γειτονικές περιοχές των ABPs (Carlier, Husson, Renault, & Didry, 2011; Dominguez, 2009; Renault, Deville, & van Heijenoort, 2013).

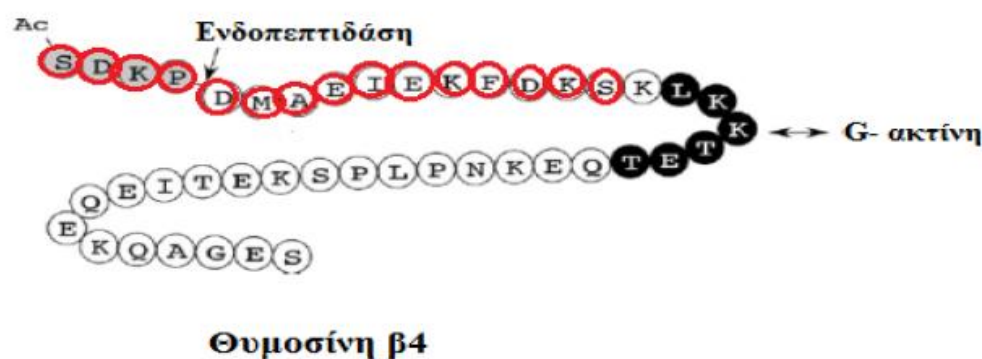
Η Tβ4 εμπλέκεται κυρίως στη διατήρηση μεγάλης ποσότητας μη πολυμερισμένης G-ακτίνης (μονομερές ακτίνης) ως ενδοκυτταρικό μόριο που δεσμεύει την G ακτίνη, ρυθμίζοντας τον πολυμερισμό της, που είναι απαραίτητος για την κυτταρική κινητικότητα και οργανογένεση (Sanders κ.ά., 1992). Η αυξανόμενη συγκέντρωση της Tβ4 στα διάφορα οργανικά συστήματα, όπου εμφανίζεται, υποδηλώνει ότι συνδέεται με αρκετές φυσιολογικές

διεργασίες που περιλαμβάνουν τις: αγγειογένεση, απόπτωση, ανάπτυξη, διαφοροποίηση, ανάπτυξη τριχών, φλεγμονή και επούλωση τραυμάτων (Cha et al., 2003, Grant et al., 1999, Huff et al. Philp et al., 2004). Έκφραση της Tβ4 ανιχνεύεται στο νευρικό σύστημα και στα κύτταρα που διαφοροποιούν την καρδιά κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης (Gomez-Marquez et al., 1996, Lugo et al., 1991, Yamamoto et al., 1994). Διαγονιδιακά ποντίκια με υπερέκφραση Tβ4 παρουσιάζουν μη φυσιολογική ανάπτυξη δοντιών (Cha et al., 2010). Η Tβ4 επηρεάζει επίσης τη διαφοροποίηση των T κυττάρων και των ενδοθηλιακών κυττάρων (Grant et al., 1999, Hu et al., 1981, Low et al., 1981). Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι σε καρδιακές βλάβες μετά από απόφραξη της στεφανιαίας, η Tβ4 αυξάνεται ενδογενώς και προωθεί διαδικασίες αποκατάστασης με αποτέλεσμα τη βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας (Bock-Marquette, Saxena, White, DiMaio, & Srivastava, 2004).

Μελέτες έχουν δείξει ότι η Tβ4 μπορεί να παίζει ρόλο στην ωρίμανση των λεμφοειδών βλαστοκυττάρων για να σχηματίσει προθυμοκύτταρα (Goldstein AL. et al., 2011). Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι η Tβ4 είχε μη ειδική δράση ανασταλτικού παράγοντα της μετανάστευσης των μακροφάγων (MIF) καθώς είχε την ικανότητα να αναστέλει τη μετανάστευση μακροφάγων ανεξάρτητα από οποιοδήποτε αντιγόνο (Low TL. et al., 1983).

Αυξημένη έκφραση της Tβ4 παρατηρείται σε διάφορους τύπους όγκων, όπως στο μεταστατικό μελάνωμα, στο ινοσάρκωμα, στα κακοήγη γλοιώματα, στους καρκίνους του μαστού, στους καρκίνους των ωοθηκών και στους καρκίνους του παχέος εντέρου (Clark κ.ά., 2000, Ji et al., 2013, Kobayashi κ.ά., 2002, Larsson and Holck, 2007, Wang et al., 2004, Wirsching et al., 2014). Στους όγκους, η Tβ4 προάγει την επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετάβαση (EMT) διεγείροντας τη σύνθεση πολλών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένου του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) και του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (FGF), που συμβάλλουν στην αγγειογένεση και τη μετάσταση του όγκου (Cha κ.ά., 2003, Kim et al., 2011). Τέλος, αυξημένη συγκέντρωση της Tβ4 παρατηρείται στο σκληροδερμικό πνεύμονα, στην υποξική εγκεφαλική ισχαιμία και στην νεφρική ίνωση (De Santis et al., 2011, Vartiainen et al., 1996, Zuo et al., 2013). Συνολικά, αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι το Tβ4 συμμετέχει τόσο στη φυσιολογική όσο και στην παθολογική φυσιολογία και ρυθμίζει μια ποικιλία βιολογικών διεργασιών, ενώ ταυτόχρονα εμπλέκεται στην ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση διαφόρων τύπων κυττάρων, καθώς και στην απόκριση του οργανισμού σε τραυματισμό πολλών οργάνων.

## Θυμοσίνη Τβ4 και Δερματική Επούλωση



**Εικόνα E.7 :** Περιοχές του θυμοσινικού πεπτιδίου Τβ4 με πιθανή επουλωτική δράση (Hara et al., 2011).

Το θυμοσινικό πεπτίδιο Τβ4 είναι, όπως ήδη αναφέρθηκε, η ευρύτερα απαντώμενη σε ευκαρυωτικούς ιστούς β-θυμοσίνη και διαθέτει μοναδικές βιολογικές λειτουργίες, που αποδίδονται σε διαφορετικές αλληλουχίες εντός του μορίου της και που είναι σημαντικές στην ανάπτυξη των ιστών καθώς και στην επούλωση / αναγέννησή τους (Goldstein AL. Et al., 2005).

Οι βασικές βιολογικές διεργασίες, σχετικά με τα στάδια επιδιόρθωσης των πληγών στους διαφόρους ιστούς, περιλαμβάνουν την πρόσληψη και διαφοροποίηση του προγονικού στελέχους των κυττάρων σε ώριμα κύτταρα (Smart N, et al., 2007; Morris DC, et al., 2010; Morris DC, et al., 2010; Philp D, et al., 2004), τη μείωση των κυτοκινών και χημειοκινών που συμμετέχουν στη διαδικασία της φλεγμονής (Badamchian M, et al., 2003; ; Cavasin MA. et al., 2006; Sosne G, et al., 2002; Sosne G, et al., 2007; Wet al., 2005; Young JD, et al., 1999), και την αναστολή του σχηματισμού των ουλών (Young JD, et al., 1999; ; Bock-Marquette I, et al., 2004; Cavasin MA. et al., 2006; Ehrlich HP, et al., 2010).

Η Τβ4 βρίσκεται σε όλα σχεδόν τα κύτταρα (Goldstein et al., 2012) και έχει βιολογική δράση συνδεδεμένη και με τις τρεις κύριες πτυχές της αναγέννησης των ιστών, που είναι σημαντικές στη δερματική επούλωση: στην προστασία, στην αποκατάσταση και στην αναγέννηση. Στα πρώτα στάδια της επούλωσης, είναι πολύ σημαντικό για την αποκατάσταση του δέρματος ότι τα αιμοπετάλια είναι πλούσια σε Τβ4: Η Τβ4 των αιμοπεταλίων δρα ως χημειοτακτικός παράγοντας και επιφέρει την κατευθυνόμενη μετανάστευση τόσο των ενδοθηλιακών κυττάρων όσο και των κερατινοκυττάρων, τα οποία μεταναστεύουν ταχέως στην περιοχή του τραύματος επιτρέποντας την έναρξη της διαδικασίας επούλωσης (Grant κ.ά., 1995, Malinda κ.ά., 1997, Roy κ.ά., 2001). Η Τβ4 έχει επίσης αντιαποπτωτική και αντιφλεγμονώδη δράση, προστατεύοντας έτσι τον τραυματισμένο ιστό από περαιτέρω βλάβη λόγω των πρωτεϊνών και των κυτταρικών θραυσμάτων που απελευθερώνονται από τα

κατεστραμμένα κύτταρα (Badamchian et al., 2003, Ho et al., 2007, Popoli et al., 2007, Sosne, Siddiqi and Kurpakus-Wheater, 2004, Sosne et al., 2002, Young et al., 1999). Άμεσες μελέτες για την τοξικότητα με τη χρήση γλουταμινικού οξέος, βενζαλκονίου και αιθανόλης έχουν δείξει την αντιτοξική/αντιαποπτωτική δράση της Τβ4 (Popoli et al., 2007, Sosne et al., 2010). Η υποξία στο τραύμα αυξάνει επίσης την έκφραση της Τβ4, η οποία έχειδειχθεί ότι μειώνει τις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) σε ορισμένα κύτταρα, γεγονός το οποίο μπορεί να είναι επωφελές για την προστασία των κυττάρων και την δερματική επούλωση (Ho et al., 2008, Kumar and Gupta, 2011, Wei et al., 2012 ).

Η Τβ4 που απελευθερώνεται από τα αιμοπετάλια έχει αντιμικροβιακές ιδιότητες, που βοηθούν στην καταπολέμηση ή/και πρόληψη της μόλυνσης στην περιοχή της πληγής (Huang LC, et al., 2007). Επίσης, προστατεύει τα κύτταρα από βλάβες και αναστέλλει την απόπτωση σε περιπτώσεις που χρειάζεται (Bock-Marquette I, et al., 2004; Ho JH, et al., 2008; Ho JH, et al., 2007). Στην καρδιά μετά από το έμφραγμα του μυοκαρδίου (που μπορεί να θεωρηθεί τραυματισμός του καρδιακού ιστού), η Τβ4 μειώνει τον κυτταρικό θάνατο, προάγοντας με τον τρόπο αυτόν την κυτταρική επιβίωση. Μία επιπρόσθετη λειτουργία της Τβ4 στην περιοχή πρώιμης πληγής είναι η ικανότητά της να προάγει τη μετανάστευση των κυττάρων, συμπεριλαμβανομένης της επανεπιθηλίωσης, και να διεγείρει την παραγωγή της λαμνίνης 5, η οποία έχει αποδειχθεί τόσο σε οφθαλμικές όσο και σε επιδερμικές πληγές (Sosne G, et al., 2004; Malinda KM, et al., 1997; Qiu P, et al., 2007; Roy P, et al., 2001; Sosne G, et al., 2002; Sosne G, et al., 2004; Sosne G, et al., 2010). Η Τβ4 μειώνει τη διείσδυση των λευκών αιμοσφαιρίων (μειώνει τη φλεγμονή) και έτσι αποτρέπει τη διόγκωση και την περαιτέρω βλάβη του ιστού, ενώ ταυτόχρονα μειώνει επίσης τη φλεγμονή αναστέλλοντας τον παράγοντα TNF-α και προάγοντας την ενεργοποίηση του NF-κΒ (Sosne G, et al., 2007).

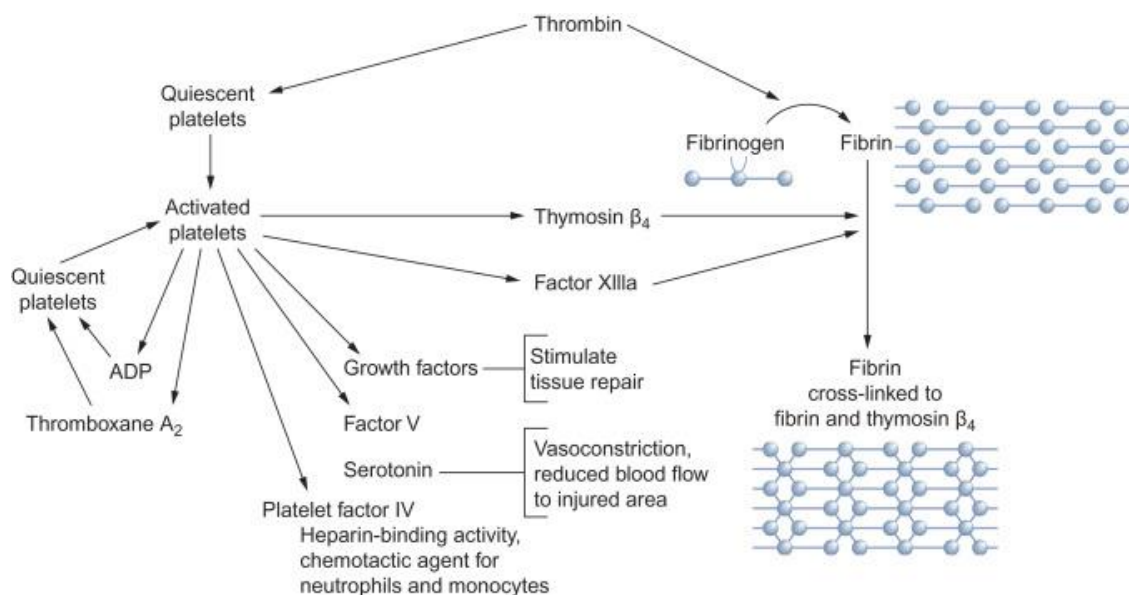
Μείζονος σημασίας αποτελεί η μείωση του σχηματισμού ουλών παρουσία της Τβ4, η οποία βοηθά στη διατήρηση της λειτουργίας των ιστών, ιδιαίτερα στην καρδιακή αποκατάσταση μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου (Bock-Marquette I, et al., 2004; Ehrlich HP, et al., 2010; Hinkel R, et al., 2008). Όπως έχει αναφερθεί, η Τβ4 προωθεί την κινητοποίηση και πρόσληψη βλαστικών κυττάρων καθώς επίσης και τη μετανάστευση και τη διαφοροποίησή τους (Shah SP, et al., 2011; Smart N, et al., 2010; Smart N, et al., 2011; Shah SP, et al., 2011; Morris DC, et al., 2010; Cavašin MA. et al., 2006). Άλλη μία σημαντική δράση της Τβ4, σημαντική στην επούλωση δερματικών πληγών και στην ανάνηψη έπειτα από έμφραγμα του μυοκαρδίου και τραυματική εγκεφαλική βλάβη, είναι η ικανότητα προώθησης ενός νέου πλέγματος αιμοφόρων αγγείων (αγγειογένεση) μέσω της πρόσληψης βλαστικών κυττάρων ή/και την αυξημένη έκφραση του VEGF, που είναι γνωστό ότι προάγει τον σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων (Smart N, et al., 2007; Malinda KM, et al., 1997; Grant DS, et al., 1995). Εντούτοις δεν έχει αναφερθεί ο σχηματισμός νέων αιμοφόρων αγγείων σε οφθαλμικές πληγές, που έχουν υποβληθεί σε θεραπεία με Τβ4.

Κατά τη διάρκεια της φάσης του πολλαπλασιασμού στη δερματική επούλωση, η Τβ4 προάγει τη μετανάστευση διαφόρων κυττάρων στο τραύμα, περιλαμβανομένων των ινοβλαστών, των κερατινοκυττάρων και των ενδοθηλιακών κυττάρων. Ο ρυθμός σύνθεσης κολλαγόνου και ο πιο οργανωμένος σχηματισμός των ινών κολλαγόνου αυξάνονται με την επίδραση της Τβ4 (Ehrlich & Hazard, 2012). Άλλες πρωτεΐνες σημαντικές στην επιδιόρθωση τραυμάτων επίσης αυξάνονται με την Τβ4, συμπεριλαμβανομένων των λαμινίνης-332, HGF, VEGF, φλεγμονωδών μεσολαβητών κ.λπ. (Jo et al., 2010, Sosne et al., 2005, Sosne, Xu et al., 2004 · Sosne, Qiu, Christopherson, & Wheeler, 2007). Η Τβ4 έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τον σχηματισμό των μυοϊνοβλαστών και αυτό εξηγεί πιθανώς την ικανότητά της να μειώνει τον σχηματισμό ίωσης / ουλής (Ehrlich and Hazard, 2010, Ehrlich and Hazard, 2012). Επιπλέον, φαίνεται να δρα διακόπτοντας τα μικροσωληνάρια και μεταβάλλοντας το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF-β-Smad. Ενώ κατά τη διάρκεια της φάσης αναδιαμόρφωσης, η Τβ4 δρα για την καλύτερη οργάνωση των ινών κολλαγόνου και πιθανώς μειώνει τον σχηματισμό ουλών.

Σε προκλινικές μελέτες, η Τβ4 βρέθηκε να προωθεί την πλήρη δερματική επούλωση σε φυσιολογικά ζώα καθώς και σε διαβητικούς, ηλικιωμένους και σε ζώα που έχουν δεχθεί θεραπεία με στεροειδή (Ruff D, et al., 2010; Malinda KM, et al., 1999; Philp D, et al., 2003). Τόσο η ανασυνδυασμένη όσο και η συνθετική Τβ4 λειτουργεί καλά, ενώ επίσης και θραύσματα του πεπτιδίου μπορούν να προωθήσουν την (επισκευή ουλών) αναγέννηση ιστών όταν χρησιμοποιούνται τοπικά σε τραύματα ηλικιωμένων ζώων. Η Τβ4 δρα αυξάνοντας την μετανάστευση των κερατινοκυττάρων (επανεπιθηλίωση), οργανώνοντας την ευθυγράμμιση και την κατανομή του κολλαγόνου (επανα-κοκκιοποίηση) και διεγείροντας την αγγειογένεση (νέος σχηματισμός αιμοφόρων αγγείων) (Ehrlich HP., et al., 2010). Επιπλέον, προωθεί την παραγωγή λαμινίνης-5, η οποία είναι σημαντική στην ακεραιότητα των ιστών. Η Τβ4 μειώνει τον αριθμό των μυοϊνοβλαστών, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τη δημιουργία ουλής και παρατηρούνται πιο οργανωμένες ίνες κολλαγόνου με μείωση του ιστού της ουλής (Ehrlich HP., et al., 2010). Στο σημείο αυτό, σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι στις ινωτικές αλλοιώσεις, η Τβ4 ελέγχει άμεσα την παραγωγή των συστατικών της ECM διεγείροντας την έκφραση γονιδίου και τη σύνθεση του κολλαγόνου και της φιβρονεκτίνης (Kumar and Gupta, 2011, Malinda et al., 1999, Sosne et al., 2004, Zuo et al.). Ανακεφαλαιώνοντας, παρατηρούμε ότι η Τβ4 είναι ένας ενδογενής παράγοντας επιδιόρθωσης / αναγέννησης ο οποίος όταν προστεθεί εξωγενώς, αυξάνει τον ρυθμό επούλωσης και, το σημαντικότερο χαρακτηριστικό του είναι ότι μειώνει τις ουλές.

Η ικανότητα της Τβ4 να προωθεί την αναγέννηση των ιστών μετά από τραυματισμό έδωσε το έναυσμα για δυναμική χρήση του μορίου σε κλινικές δοκιμές. Συγκεκριμένα, οι

μελέτες που προαναφέρθηκαν αποτέλεσαν την αιτία για κλινικές δοκιμές με Tβ4 σε ασθενείς με στάδιο III / IV πίεσης ελκών και φλεβικής τάσης ελκών (Treadwell T., et al., 2012).



**Εικόνα Ε.8 :** Συσσωμάτωση Tβ4 από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια μαζί με τον παράγοντα XIIIa (τρανσγλουταμινάση) για τον σχηματισμό διασταυρώσεων με ινώδες κατά τη διάρκεια του σχηματισμού θρόμβων (Litwach G. Et al., 2018).

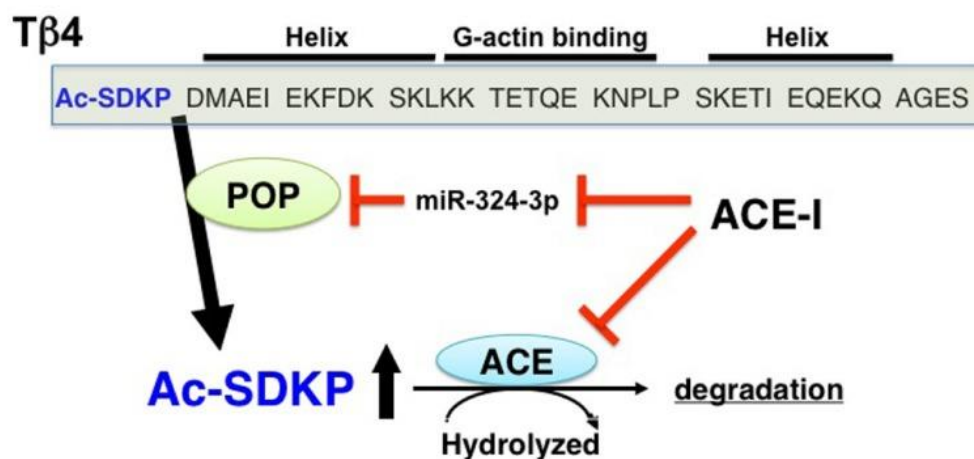
Οι βασικές βιολογικές διεργασίες, σχετικά με τα στάδια επιδιόρθωσης των πληγών στους διαφόρους ιστούς, περιλαμβάνουν την πρόσληψη και διαφοροποίηση του προγονικού στελέχους των κυττάρων σε ώριμα κύτταρα (Smart N, et al., 2007; Morris DC, et al., 2010; Morris DC, et al., 2010; Philp D, et al., 2004), τη μείωση των κυτοκινών και χημειοκινών που συμμετέχουν στη διαδικασία της φλεγμονής (Badamchian M, et al., 2003; ; Cavasin MA. et al., 2006; Sosne G, et al., 2002; Sosne G, et al., 2007; Wet al., 2005; Young JD, et al., 1999), και την αναστολή του σχηματισμού των ουλών (Young JD, et al., 1999; ; Bock-Marquette I, et al., 2004; Cavasin MA. et al., 2006; Ehrlich HP, et al., 2010).

## ΤΕΤΡΑΠΕΠΤΙΔΙΟ Ac-SDKP

Το τετραπεπτίδιο Ac-SDKP αποτελεί το αμινοτελικό άκρο της Tβ4 με αλληλουχία αμινοξέων Ac-Ser-Asp-Lys-Pro-OH. Η αλληλουχία αυτή δεν απαντάται σε άλλες πρωτεΐνες (Sosne G., et al., 2010), πέραν της Tβ15, όπως θα δούμε στη συνέχεια. Η απελευθέρωση του Ac-SDKP από την Tβ4 περιγράφηκε αρχικά από τους Lenfant et.al. το 1989. Εκτός από την Tβ4, το πρόσφατα αναγνωρισμένο θυμοσινικό πεπτίδιο Tβ15 αναφέρθηκε ότι φέρει αλληλουχία Ac-SDKP (J. Banyard., et al., 2007; S. Dhaese., et al., 2009). Κύτταρα μυελού των οστών εκκρίνουν κανονικά Tβ4 και Ac-SDKP στο μέσο καλλιέργειας κυττάρων. Πρώτη πειραματική απόδειξη της απελευθέρωσης Ac-SDKP από πρωτεολυτική διάσπαση της Tβ4 παρουσιάστηκε από τους Grillon et.al. το 1990. Σύμφωνα με τους ερευνητές αυτούς, ραδιοσημασμένο [<sup>3</sup>H] Ac-SDKP απελευθερώθηκε όταν [<sup>3</sup>H] Tβ4 επώαστηκε με εκχυλίσματα μυελού των οστών από κουνέλια (C. Grillon, et al., 1990; W.Q. Huangand., et al., 2001). Περαιτέρω αποτελέσματα επιβεβαίωσαν αυτό το εύρημα όταν η απελευθέρωση Ac-SDKP παρεμποδίστηκε μετά από μικρό παρεμβαλλόμενο RNA (siRNA) που ανέστειλε την σύνθεση της Tβ4 σε κύτταρα HeLa (J.M. Liu., et al., 2010). Ωστόσο, αυτές οι μελέτες διεξήχθησαν *in vitro* και μπορεί να μην αναπαράγουν πλήρως τις *in-vivo* συνθήκες. Πεπτίδια ομόλογα με την Tβ4 (όπως το Tβ15) θα μπορούσαν να αντισταθμίσουν την απουσία Tβ4 σύμφωνα με έρευνες που αποδεικνύουν πως βρίσκεται έστω και πολύ μικρή συγκέντρωση του τετραπεπτιδίου σε πειραματόζωα, από τα οποία λείπει η Tβ4 (N. Kumar., et al., 2018). Παρ' όλα αυτά, τα πειραματικά στοιχεία δείχνουν ότι η Tβ4 παραμένει η κύρια πηγή του Ac-SDKP σε φυσιολογικές συνθήκες.

Με βάση κινητικές παραμέτρους και αναγνώριση συγκεκριμένου υποστρώματος, εντοπίστηκαν δυο ένζυμα, συγκεκριμένα η βακτηριακή ενδοπρωτεάση Asp-N και η προλυλ-ολιγοπεπτιδάση (POP) των θηλαστικών, κατά τη δεκαετία του 1990, ως πιθανοί υποψήφιοι για την απελευθέρωση του Ac-SDKP από το Tβ4 (C. Grillon, et al., 1990). Οι Grillon et.al. σε έρευνά τους ανέφεραν ότι η βακτηριακή Asp-N ενδοπρωτεάση ήταν ικανή να απελευθερώσει Ac-SDKP από την Tβ4 σε μία απλή διάσπαση ενζυμικής υδρόλυσης στο N-τελικό άκρο του Asp στο δεσμό Pro4-Asp5 (C. Grillon, et al., 1990). Ωστόσο, η POP δεν μπορούσε να απελευθερώσει Ac-SDKP από την Tβ4 σε ένα μόνο βήμα, αυξάνοντας την πιθανότητα δύο διαφορετικά ένζυμα να συμπράττουν σε αυτή τη διαδικασία (Kuman N. et al., 2018), συμπεριλαμβανομένου του ενζύμου POP (M.A. Cavasin., et al., 2004). Οι Kumar et.al. ανέφεραν πρόσφατα τη σημασία της μεπρίνης-α ως ενζύμου «πρώτου σταδίου» που υδρολύει το Tβ4 σε ενδιάμεσα πεπτίδια μικρότερα από 30 αμινοξέα, ενώ στη συνέχεια το ενδιάμεσο πεπτίδιο γίνεται υπόστρωμα για το ένζυμο «δεύτερου σταδίου», δηλ. της POP, για την τελική απελευθέρωση Ac-SDKP (N. Kumar., et al., 2016). Από την άλλη πλευρά το Ac-SDKP

αποικοδομείται από το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτασίνης (Angiotensin Converting Enzyme, ACE).



**Εικόνα Ε. 9:** Σχηματική αναπαράσταση της δομής, του σχηματισμού και της αποικοδόμησης του Ac-SDKP (Kanasaki et al., 2014)

Έτσι, είναι αντιληπτό πως η συγκέντρωση του τετραπεπτιδίου Ac-SDKP στους ιστούς ρυθμίζεται από δύο κύριους μηχανισμούς: 1) την απελευθέρωσή του από το πρόδρομο πεπτίδιο Tβ4 μέσω διαδοχικής υδρόλυσης με ένζυμα meprin-α και POP και 2) την αποικοδόμησή του με ACE (Kumar N., et al., 2018). Το Ac-SDKP έχει βρεθεί στον ανθρώπινο ορό και σε άλλα σωματικά υγρά (Azizi M., et al., 1997).

#### Μηχανισμός Δράσης του τετραπεπτιδίου Ac-SDKP στο Κύτταρο

Το μικρό αμινοτελικό πεπτίδιο 1-4 της Tβ4, Ac-SDKP, είναι ικανό να ασκήσει αντινωτική δράση όπως προσδιορίζεται από *in vivo* μελέτες και αντιφλεγμονώδη δράση όπως προσδιορίζεται από *in vitro* έρευνες (Cavasin, 2006, Sosne κ.ά., 2010). Οι διάφορες μελέτες έχουν επίσης δείξει ότι το πεπτίδιο αυτό μπορεί να αντιστρέψει την ίνωση στην καρδιά και στους νεφρούς (Castoldi et al., 2013, Cavasin, 2006, Cavasin et al., 2007, Gonzalez et al., 2014, Wang et al., 2010, Zuo et al., 2013). Ενδιαφέρον αποτελούν οι αναστολείς του ενζύμου POP, που μειώνουν τα επίπεδα του κυκλοφορούντος Ac-SDKP στα διάφορα ιστικά συστήματα και αυξάνουν την ίνωση. Αντίθετα, οι αναστολείς ACE αυξάνουν

τα επίπεδα του κυκλοφορούντος Ac-SDKP έως και πέντε φορές και είναι επίσης αυξημένα στην καρδιά, τους νεφρούς και τα ούρα. Οι αναστολείς ACE μειώνουν την ίνωση και είναι πιθανό ότι η προστασία του ιστού που παρατηρείται με τους αναστολείς ACE οφείλεται σε αυξημένα επίπεδα Ac-SDKP. Το Ac-SDKP έχει επίσης βρεθεί ότι μειώνει τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών, αναστέλλει τη διαφοροποίηση των κυττάρων του μυελού των οστών, μειώνει την απελευθέρωση του TNF-α από μακροφάγα και καταστέλλει την ενεργοποίηση των Smad πρωτεϊνών (μπλοκάρει τη σηματοδότηση του TGF-β). Ορισμένες μελέτες αναφέρουν επίσης την αγγειογενετική δράση του τετραπεπτιδίου (Wang, Carretero, et al., 2004).

| Activity                                                           | Model system                                                                                                       |
|--------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Fibrosis</b>                                                    |                                                                                                                    |
| Prevents aortic fibrosis                                           | Angiotensin II-induced hypertensive rat                                                                            |
| Ameliorates progression of renal fibrosis                          | WKY rats with glomerular nephritis                                                                                 |
| Prevents mesangial matrix expansion                                | Diabetic db/db mice                                                                                                |
| Antifibrotic in heart                                              | Rat                                                                                                                |
| Reverses cardiac inflammation/fibrosis                             | Rats with myocardial infarction                                                                                    |
| Reverses cardiac fibrosis                                          | Rats with renovascular hypertension                                                                                |
| Antifibrotic in heart and kidney                                   | Rats with aldosterone salt hypertension                                                                            |
| <b>Other</b>                                                       |                                                                                                                    |
| Stimulates angiogenesis                                            | <i>In vitro</i> : endothelial proliferation, migration, tube formation; <i>in vivo</i> : corneal and heart vessels |
| Inhibits DNA/collagen production                                   | <i>In vitro</i> : fibroblasts                                                                                      |
| Inhibits TGF β-mediated plasminogen activator inhibitor expression | <i>In vitro</i> : human mesangial cells                                                                            |
| Inhibits growth of hematopoietic cells                             | <i>In vitro</i> : hematopoietic progenitor cells from bone marrow                                                  |
| Inhibits growth and induces degranulation                          | <i>In vitro</i> : mast cells                                                                                       |

**Εικόνα E.10 :** Βιολογικές δράσεις του N-τελικού τετραπεπτιδίου (Ac-SDKP) της Tβ4 (Sosne G., et al., 2010)

Σε γενικές γραμμές, το τετραπεπτίδιο Ac-SDKP έχει μελετηθεί, κυρίως, για την αγγειογενετική και την αντινωτική του δράση σε διάφορους ιστούς, όπως ο καρδιακός και ο νεφρικός ιστός (*in vivo*) και σε διάφορες κυτταρικές σειρές, ενδοθηλιακά κύτταρα και καρδιακούς ινοβλάστες (*in vitro*), σε αντίθεση με την Tβ4 που έχει ερευνηθεί για τις βιολογικές της ιδιότητες σε μεγάλο εύρος *in vitro* και *in vivo* μελετών (Sosne et al., 2010).

Το Ac-SDKP έχει ποικίλες βιολογικές λειτουργίες που σχετίζονται με τους μηχανισμούς επούλωσης / αναγέννησης των ιστών. Κάποιες από αυτές δεν έχουν παρατηρηθεί στο πλήρες μόριο της Tβ4, υποδηλώνοντας ότι οι συγκεκριμένες λειτουργίες αυτές ενεργοποιούνται μόνο κατά τη διάσπαση της Tβ4 προς Ac-SDKP. Αρχικά, το Ac-SDKP είχε βρεθεί να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των πολυδύναμων αιματοποιητικών αρχέγονων κυττάρων (Bonnet D., et al., 1993), ενώ στη συνέχεια αποδείχθηκε ότι προάγει την αγγειογένεση *in vitro* και *in vivo* σε διάφορα μοντέλα (Wang D., et al., 2004; Smart N., et al., 2007). Αργότερα συσχετίστηκε με τη μείωση της φλεγμονής σε πολλά μοντέλα, τη μείωση

και την πρόληψη της ίνωσης στην υπέρταση, και ακόμη και την αντιστροφή της ίνωσης μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου (Yang F., et al., 2003; Kanasaki K., et al., 2006; Lin C., et al., 2008; Shibya K., et al., 2005; Peng H., et al., 2001). Επιπλέον, τα λεμφικά κύτταρα συνθέτουν μια παραλλαγή ματίσματος της Τβ4, η οποία έχει επιπλέον 6 αμινοτελικά αμινοξέα που περιέχουν μία δεύτερη περιοχή με την αλληλουχία του τετραπεπτιδίου (Giradi M., et al., 2003). Δεν είναι σαφές πώς είναι αυτές οι περιοχές διασπώνται, αλλά η Τβ4 των παραπάνω κυττάρων έχει αναφερθεί ότι διαθέτει ισχυρότερη αντιφλεγμονώδη δράση από την κανονική Τβ4. Οι μηχανισμοί που οδηγούν σε μείωση της φλεγμονής σχετίζονται, εν μέρει, με την αναστολή λειτουργιών, όπως η διαφοροποίηση των μονοκυττάρων του μυελού των οστών σε μακροφάγα, η ενεργοποίηση και μετανάστευση των μακροφάγων και η απελευθέρωση της προφλεγμονώδους κυτοκίνης TNF-α από ενεργοποιημένα μακροφάγα (Sharma U., et al., 2008).

Το τετραπεπτίδιο, επιπλέον, μειώνει ή/και εμποδίζει την ίνωση σε διάφορα ζωικά μοντέλα καρδιακής, αορτικής και νεφρικής βλάβης. Γι' αυτό το λόγο, θεωρήθηκε ότι η αύξηση της ίνωσης των οργάνων, που προκαλούν οι ενεργοποιητές του ενζύμου ACE, πιθανόν να οφείλεται στη μείωση των επιπέδων Ac-SDKP (Cavasin M., et al., 2007). Από την άλλη πλευρά, οι αναστολείς της POP, που οδηγεί σε απελευθέρωση του Ac-SDKP από την Τβ4, αυξάνουν την ίνωση των οργάνων (Cavasin M., et al., 2007). Επειδή οι αναστολείς ACE βελτιώνουν την κλινική έκβαση των ασθενών με νεφρική νόσο, πιθανόν αυξάνοντας τα επίπεδα του κυκλοφορούντος στον ορό Ac-SDKP, έχει προταθεί στη βιβλιογραφία ότι τόσο η Τβ4 όσο και το Ac-SDKP μπορούν να χορηγούνται προληπτικά, ως εναλλακτική ή συμπληρωματική θεραπεία, σε ασθενείς που ενδέχεται να παρουσιάσουν ίνωση, εάν οι αναστολείς ACE δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν, ή ακόμη και σε συνδυασμό με αυτούς τους αναστολείς. Το Ac-SDKP έχει επίσης αναφερθεί ότι αναστρέφει την ίνωση σε ζωικά μοντέλα, γεγονός που αποδεικνύει ότι η Τβ4 ή ανάλογά της πεπτίδια μπορεί να έχουν δυνατότητα χρήσης σε ασθενείς με εμφανείς ασθένειες ουλώδους ιστού. Έτσι σε περιπτώσεις ασθενών με έμφραγμα του μυοκαρδίου, εγκεφαλικό επεισόδιο ή τραυματισμό στη σπονδυλική στήλη, όπου μπορεί να προκληθεί μόνιμη βλάβη από ίνωση ή ουλώδες, μπορεί να δεχθούν θεραπεία με Ac-SDKP ή Τβ4, σε πολύ πρώιμα στάδια. Τέλος, είναι πιθανό κατάλληλα, μη-πεπτιδικά μιμητικά ανάλογα του Ac-SDKP να σχεδιασθούν και να έχουν θεραπευτική χρήση στο μέλλον, ώστε να εξαλειφθεί τυχόν προβλήματα λόγω της ταχείας *in vivo* αποικοδόμησης του τετραπεπτιδίου (Sosne G., et al., 2010).

### Αμινοτελικό τετραπεπτίδιο Ac-SDKP και Δερματική Επούλωση

Όπως και στην περίπτωση του πρόδρομου πεπτιδίου, Tβ4, οι ακριβείς μηχανισμοί, μέσω των οποίων το Ac-SDKP ασκεί την επουλωτική δράση του δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένοι. Στην δερματική επούλωση, αυτή η περιοχή είναι πιθανόν σημαντική στη μείωση τόσο της φλεγμονής όσο και του σχηματισμού ουλών (Sosne G., et al., 2010). Το Ac-SDKP έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τη σύνθεση του κολλαγόνου *in vitro* σε καρδιακούς ινοβλάστες αρουραίου μέσω καταστολής της φωσφορυλίωσης της Smad2 και της μετατόπισής της στον πυρήνα (Pokharel, S., et al., 2002). Επιπλέον, το τετραπεπτίδιο αναστέλλει τη δραστηριότητα του μετασχηματίζοντος αυξητικού παράγοντα – β (TGF-β), η οποία είναι σημαντική στη σύνθεση κολλαγόνου, εν μέρει με την καταστολή της ενεργοποίησης των Smad πρωτεϊνών η οποία παρεμποδίζει τη μεταγωγή σήματος από τον TGF-β (Kanasaki K., et al., 2002; Cavasin M., 2006). 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).

#### 4. ΑΥΞΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

| <u>Αυξητικοί Παράγοντες</u>                            | <u>Παραγωγή</u>                                    | <u>Γνωστές Δράσεις</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|--------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <u>1. Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF)</u>       | Αιμοπετάλια, Μακροφάγα                             | Διεγείρει τους ινοβλάστες να εκκρίνουν κολλαγενάση για την αποικοδόμηση της μήτρας κατά τη διάρκεια της φάσης αναδιαμόρφωσης. Διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων και των ινοβλαστών. Μπορεί να μειώσει το χρόνο επούλωσης όταν εφαρμόζεται τοπικά.                                                                                                                                                                                                                                                        |
| <u>2. Μετασχηματίζον αυξητικός παράγοντας (TGF)</u>    | Αιμοπετάλια, Μακροφάγα, Λεμφοκύτταρα, Ηπατοκύτταρα | <p><u>TGF-α</u>: Μιτογόνο και χημειοτακτικό για κερατινοκύτταρα και ινοβλάστες</p> <p><u>TGF-b1 και TGF-b2</u>: Προωθεί την αγγειογένεση, ρυθμίζει αυξητικά την παραγωγή κολλαγόνου και αναστέλλει την αποικοδόμηση, προάγει την χημική προσέλκυση των φλεγμονωδών κυττάρων.</p> <p><u>Ο TGF-b3 (ανταγωνιστής του TGF-b1 και b2)</u>: Έχει βρεθεί σε υψηλά επίπεδα στην επούλωση τραυμάτων του εμβρύου και έχει προωθήσει την πειραματική επούλωση χωρίς ουλές σε ενήλικες όταν καταστέλλεται ο TGF-b1 και ο TGF-b2.</p> |
| <u>3. Αυξητικό Παράγον αγγειακού ενδοθηλίου (VEGF)</u> | Ενδοθηλιακά Κύτταρα                                | Προωθεί την αγγειογένεση κατά τη διάρκεια της υποξίας των ιστών.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| <u>4. Αυξητικό Παράγοντας Ινοβλαστών (FGF)</u>         | Μακροφάγα, μαστοκύτταρα, T-λεμφοκύτταρα            | Προάγει αγγειογένεση, κοκκοποίηση και επιθηλιοποίηση μέσω μετανάστευσης ενδοθηλιακών κυττάρων, ινοβλαστών και κερατινοκυττάρων, αντίστοιχα.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| <u>5. Αιμοπεταλιακός Αυξητικός Παράγοντας (PDGF)</u>   | Αιμοπετάλια, μακροφάγα και ενδοθηλιακά κύτταρα     | Ελκύει μακροφάγα και ινοβλάστες στην περιοχή τραυματισμού. Προωθεί τη σύνθεση κολλαγόνου και πρωτεογλυκάνης.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| <u>6. Ιντερλευκίνες</u>                                | Μακροφάγα, κερατινοκύτταρα,                        | <u>IL-1</u> : Προφλεγμονώδης, χημειοτακτική για ουδετερόφιλα, ινοβλάστες και                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |

|                                                 |                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                               |
|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                 | ενδοθηλιακά κύτταρα,<br>λεμφοκύτταρα,<br>ινοβλάστες,<br>οστεοβλάστες,<br>βασεόφιλα,<br>μαστοκύτταρα | κερατινοκύτταρα. Ενεργοποιεί τα ουδετερόφιλα<br><br><u>IL-4</u> : Ενεργοποιεί τη διαφοροποίηση των ινοβλαστών. Προκαλεί σύνθεση κολλαγόνου και πρωτεογλυκάνης.<br><br><u>IL-8</u> : Χημειοτακτική για ουδετερόφιλα και ινοβλάστες.                            |
| <u>7. Παράγοντες διέγερσης αποικιών</u>         | Στρωματικά κύτταρα, ινοβλάστες, ενδοθηλιακά κύτταρα, λεμφοκύτταρα                                   | <u>Συντελεστής διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων (G-CSF)</u> : Διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των κοκκιοκυττάρων.<br><br><u>Συντελεστής διέγερσης αποικιών μακροφάγων κοκκιοκυττάρων (GM-CSF)</u> : Διεγείρει τον πολλαπλασιασμό κοκκιοκυττάρων και μακροφάγων. |
| <u>8. Αυξητικός Παράγοντας Κερατινοκυττάρων</u> | Ινοβλάστες                                                                                          | Διεγείρει τη μετανάστευση των κερατινοκυττάρων, τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό τους.                                                                                                                                                                 |

**Πίνακας Ε.1 :** Οι αυξητικοί παράγοντες στην επούλωση συνοπτικά (Gabriel A., et al., 2018)

- **Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF)**

Ίσως οι καλύτερα χαρακτηρισμένοι αυξητικοί παράγοντες στην επούλωση πληγών είναι αυτοί που προέρχονται από την οικογένεια των EGF. Οι συνδέτες περιλαμβάνουν: EGF, EGF που δεσμεύεται με ηπαρίνη (HB-EGF), μετασχηματίζων αυξητικός παράγοντα-άλφα (TGF α), επιρεγουλίνη, αμφιρεγουλίνη, βητακυτταρινίνη, επιγενίνη, NRG-1 NRG-2, NRG-3, NRG-4, NRG-5 και NRG-6. (Abraham J, et al., 1997; Greenhalgh DG. et al., 1996; Schultz GS, et al., 1987; Steed DL. et al., 1998; Sasaki T. et al., 1989; Shoyab M, et al., 1989; Shirakata Y, et al., 2000; Hashimoto K, et al., 1994; Coffey RJ Jr., et al., 1987; Chiang CP, et al., 1986; Mine N, et al., 2005; Shing Y, et al., 1993; Higashiyama S, et al., 2008) Τα κύρια μέλη που εμπλέκονται στην επούλωση πληγών περιλαμβάνουν: EGF, TGF-α και EGF-HB. Αυτοί οι συνδέτες δεσμεύονται στον υποδοχέα του EGF (EGFR), μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη κινάσης τυροσίνης, με αποτέλεσμα το διμερισμό του υποδοχέα, την αυτοφωσφορυλίωση και τη φωσφορυλίωση τυροσίνης των μειωμένων πρωτεϊνών (Oda K, et al., 2005) Ο EGF αναφέρθηκε αρχικά από τον Δρ Stanley Cohen (Cohen S et al., 1963; Carpenter G, et al.,

1990), Εκκρίνεται από τα αιμοπετάλια, τα μακροφάγα και τους ινοβλάστες και δρα με παρακρινή τρόπο στα κερατινοκύτταρα (Shiraha H, et al.,1999; Schultz G, et al., 1991). Μελέτες *in vitro* έδειξαν ότι ο EGF ρυθμίζεται ανοδικά μετά από οξεία βλάβη και επιταχύνει σημαντικά την επανεπιθηλίωση<sup>46</sup> και την αύξηση της αντοχής εφελκυσμού σε τραύματα. (Brown GL, et al., 1988) Ένας μηχανισμός μέσω του οποίου λειτουργεί το EGF είναι αυξάνοντας την έκφραση των κερατινών K6 και K16, που εμπλέκονται στην οδό πολλαπλασιαστικής σηματοδότησης. (Jiang CK, et al., 1993; White LA, et al., 2000).

Σε μελέτες *in vitro*, έχειδειχθεί ότι η ενεργοποίηση του EGFR παίζει σημαντικό ρόλο στην επανεπιθηλίωση μέσω της αύξησης του πολλαπλασιασμού των κερατινοκυττάρων και της κυτταρικής μετανάστευσης σε οξείες ουλές. Οι προσδέτες που συνδέονται με τον EGFR συντίθενται ως μορφές με αγκυροβόληση μεμβράνης, οι οποίες υφίστανται πρωτεόλυση σε βιοδραστικές διαλυτές μορφές. Ωστόσο, η απομάκρυνση του προσδέτη EGFR είναι απαραίτητη για τη μετανάστευση των κερατινοκυττάρων και έχει αποδειχθεί ότι ο EGF επιταχύνει τη μετανάστευση τους και προάγει την επανεμφάνισή τους (Tokumaru S, et al., 2000; Ando Y, et al., 1993) Επιπλέον, οι EGF είναι ισχυρό μιτογόνο για τα κερατινοκύτταρα (Nanney LB. 1990; Reiss M,et al., 1987) και οι διαμεμβρανικές μορφές του είναι ικανές να διεγείρουν την ανάπτυξη των κερατινοκυττάρων μέσω των διακυτταρικών τους επαφών (juxtacrine signaling), υποδηλώνοντας τη συμμετοχή τους στην επαναιπιθηλιοποίηση (Massague J., Et al., 1993)

Ένα άλλο μέλος αυτής της οικογένειας, ο TGF-α, εκκρίνεται από τα αιμοπετάλια, τα κερατινοκύτταρα, τα μακροφάγα, τους ινοβλάστες και τα λεμφοκύτταρα και δρα με αυτοκρινή τρόπο στα κερατινοκύτταρα. (Coffey RJ Jr.,et al., 1987; Schultz G., Et al., 1991; Bennett SP, et al., 2003; Pittelkow MR, et al., 1993; Rappolee DA, et al., 1988; Hashimoto K.. 2000). Οι *in vitro* μελέτες αποδεικνύουν ότι ο TGF-α έχει την ικανότητα να αυξάνει τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό (Cha D, et al., 1996; Gottlieb AB, et al., 1988; Barrandon Y,et al., 1987) των κερατινοκυττάρων (Li Y, et al., 2006) και προκαλεί την έκφραση των κερατινών K6 και K16 (Jiang CK, et al., 1993) Τέλος, ο HB-EGF που επίσης επάγεται στην οξεία πληγή (Namiki A, et al., 1995; Marikovsky M, et al., 1993), εκκρίνεται από τα κερατινοκύτταρα με αυτοκρινή τρόπο με σύνδεση στους υποτύπους EGFR HER1 και HER472 και προωθεί και αυτός με τη σειρά του την επανεπιθηλίωση (Hashimoto K, et al., 1994). Ο HB-EGF εμπλέκεται *in vivo* παίζοντας ρόλο στην επούλωση πληγών ως ο κύριος αυξητικός παράγοντας που βρίσκεται στο υγρό του τραύματος (Marikovsky M, et al., 1993) και συμβάλλει στην προώθηση της μετανάστευσης των κερατινοκυττάρων και στην επαναιπιθηλιοποίηση των τραυματισμένων ιστών (Shirakata Y, et al., 2005).

- **Αυξητικός Παράγοντας Ινοβλαστών (FGF)**

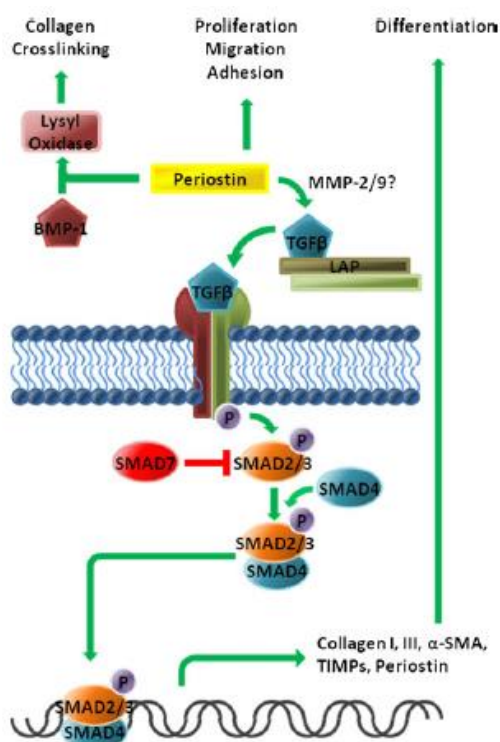
Η οικογένεια των FGF αποτελείται από 23 μέλη, από τα οποία, τα τρία σημαντικότερα μέλη που εμπλέκονται στην δερματική επούλωση τραυμάτων είναι οι: FGF-2, FGF-7 και FGF-10. Οι FGFs παράγονται από κερατινοκύτταρα, ινοβλάστες, ενδοθηλιακά κύτταρα, κύτταρα λείου μυός, χονδροκύτταρα και ιστιοκύτταρα (Bennett SP, et al., 2003; Wu L., et al., 1996; Ceccarelli S, et al., 2007; Gallucci RM, et al., 2004; Sato M, et al., 1999). Οι υποδοχείς τους είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες κινάσης τυροσίνης, οι οποίοι λειτουργούν παρόμοια με τον EGFR (Wood LC, et al., 1996). Ο βασικός FGF, (bFGF ή FGF-2) αυξάνεται στην οξεία πληγή και παίζει ρόλο στον σχηματισμό κοκκώδους ιστού, την επανεπιθηλίωση και την αναδιαμόρφωση του ιστού (Powers CJ, et al., 2000; Ornitz DM, et al., 2000; Clark RAF 1996). Από *in vitro* μελέτες έχουν δείχθει ότι ο FGF-2 ρυθμίζει τη σύνθεση και την εναπόθεση διαφόρων στοιχείων ECM, αυξάνει την κινητικότητα των κερατινοκυττάρων κατά τη διάρκεια της επανεπιθηλίωσης, (Sogabe Y, et al., 2006; Grellner W, et al., 2000; Di Vita G, et al., 2006), και προάγει τη μετανάστευση ινοβλαστών διεγείροντάς τους για παραγωγή κολλαγενάσης (Sasaki T. et al., 1992). Τα επίπεδα FGF-2 μειώνονται σε χρόνιες πληγές (Robson MC. 1997). Ο FGF-7, ή παράγοντας ανάπτυξης του κερατινοκυττάρου-1 (KGF-1) και ο ομόλογος του FGF-10, ή KGF-2, είναι και οι δύο εκφραζόμενοι σε οξεία τραύματα (Werner S, et al., 1992; Ornitz DM, et al., 1996). Όσο ο FGF-7 όσο και ο FGF-10 δρουν με παρακρινικό τρόπο μέσω του υποδοχέα FGFR2IIIb που βρίσκεται μόνο στα κερατινοκύτταρα (Ornitz DM, et al., 1996) είναι επίσης σε θέση να δεσμεύεται στον FGFR1IIIb και έχει αποδειχθεί ότι έχει μιτογόνο δράση σε κύτταρα που περιέχουν αυτόν τον υποδοχέα (Ornitz DM, et al., 1996; Lu W, et al., 1999). Μελέτες *in vitro* έχουν δείξει ότι ο FGF-7 και ο FGF-10 διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των κερατινοκυττάρων που παίζουν σημαντικό ρόλο στην επανεπιθηλιοποίηση. Επιπλέον, οι FGF-7 και ο FGF-10 αυξάνουν τη μεταγραφή παραγόντων που εμπλέκονται στην αποτοξίνωση των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS). Ειδικά για τον FGF-7 έχει φανεί πολύ σημαντική η δράση του κατά τη διάρκεια των μεταγενέστερων σταδίων αγγειοποίησης όταν αναπτύσσονται οι κοιλιακοί χώροι και οι βασικές μεμβράνες. Πιο συγκεκριμένα, αποτελεί ένα ισχυρό μιτογόνο για τα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα και βοηθάει στην ενεργητική αύξηση του VEGF. Τέλος, διεγείρει επίσης τα ενδοθηλιακά κύτταρα για την παραγωγή ενός ενεργοποιητή πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης, μιας πρωτεάσης που απαιτείται για νεοαγγείωση (Niu J, et al., 2007).

- **Μετασχηματίζον αυξητικός παράγοντας β (TGF-beta)**

Η οικογένεια TGF-β περιλαμβάνει τα ακόλουθα μέλη: TGF-β 1-3, μορφογενετικές πρωτεΐνες οστών (BMP) και ακτιβίνες. Οι TGF-β1, TGF-β2 και TGF-β3 είναι οι κύριες μορφές που έχουν βρεθεί σε θηλαστικά. Παράγονται κυρίως από μακροφάγα, ινοβλάστες, κερατινοκύτταρα και αιμοπετάλια (Lee HS, et al., 1997; Eppley BL, et al., 2004; Wu L, et al., 1997; Mani H, et al., 2002; Rolfe KJ, et al., 2007) και λειτουργούν με δέσμευση σε ένα σύμπλοκο ετερομερούς υποδοχέα που αποτελείται από έναν τύπου I και έναν τύπου II υποδοχέα, και οι δύο από τους οποίους είναι κινάσες σερίνης-θρεονίνης. Μόλις οι υποδοχείς αυτοφωσφορυλιωθούν ενεργοποιούν τα μόρια σηματοδότησης που ανήκουν στους μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας Smad πρωτεϊνών (Liu W, et al., 2005) Πιο συγκεκριμένα, ο ενεργοποιημένος TGF-β δεσμεύεται στα ετερομερή των υποδοχέων τύπου I και τύπου II του TGF-β. Οι υποδοχείς τύπου I (ALK5) φωσφορυλιώνουν τις πρωτεΐνες Smad2 και Smad3 και συνδέονται με τη Smad4 και όλο το σύμπλοκο αυτό μεταφέρεται στον πυρήνα, όπου δεσμεύεται στα γονίδια στόχους (Massague and Wotton 2000). Ο TGF-β είναι, επίσης, γνωστό ότι μπορεί να κάνει σηματοδότηση και μέσω των πρωτεϊνών FAK, ERK, JNK και p38 (Leask 2008). Τα γονίδια-στόχοι της σηματοδότησης του TGF-β περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων τα adAmA, MMP, TIMP, περισίνη, τον αυξητικό παράγοντα συνδετικού ιστού (CCN2) και το κολλαγόνο τύπου I (Kocher and Madri 1989; Igarashi et al. 1993; Takeshita et al. 1993; Holmes et al. 2001; Verrecchia et al. 2001).

Στην επούλωση πληγών, ο TGF-β1 παίζει σημαντικό ρόλο στη φλεγμονή, την αγγειογένεση, την επαν επιθηλίωση και την αναγέννηση του συνδετικού ιστού. Εμφανίζεται ότι έχει αυξημένη έκφραση κατά την έναρξη του τραυματισμού (Korecki Z, et al., 2007; Kane CJ, et al., 1991). Ο TGF-β1 διευκολύνει την πρόσληψη επιπρόσθετων φλεγμονωδών κυττάρων και ενισχύει την αποδέσμευση των ιστών που προκαλείται από μακροφάγα (review Clark81). Είναι επίσης ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι μόλις ο χώρος της πληγής αποστειρωθεί, ο TGF-β1 μπορεί να απενεργοποιήσει το παραγόμενο υπεροξειδίο του υδρογόνου από τα μακροφάγα *in vitro* (Mitra R, et al., 2004). Αυτό βοηθά στην προστασία του περιβάλλοντα υγιή ιστού και προετοιμάζει το τραύμα για σχηματισμό κοκκώδους ιστού (Tsunawaki S, et al., 1988). *In vitro* μελέτες δείχνουν ότι ο TGF-β1 βοηθά στην έναρξη του σχηματισμού κοκκιδώδους ιστού αυξάνοντας την έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με το σχηματισμό ECM που περιλαμβάνουν τη φιβρονεκτίνη, τον υποδοχέα φιβρονεκτίνης και αναστολείς κολλαγόνου και πρωτεασών (White LA, et al., 2000; Goldberg MT, et al., 2007; Greenwel P, et al., 1997; Mauviel A, et al., 1996; Papakonstantinou E, et al., 2003; Zeng G, et al., 1996). Ο TGF-β έχει ακόμα μία δράση, εμπλέκεται επίσης στην αύξηση της ρύθμισης του αγγειογόνου αυξητικού παράγοντα VEGF (Riedel K, et al., 2007). Επιπλέον, *in vitro* μελέτες

δείχνουν ότι ο TGF-β1 παίζει ένα ρόλο στη συστολή του τραύματος, διευκολύνοντας τη συστολή των ινοβλαστών της μήτρας κολλαγόνου (Meckmongkol TT, et al., 2007).



**Εικόνα E.11 :** Σχηματική αναπαράσταση του κυτταρικού μονοπατιού σηματοδότησης των Smad πρωτεϊνών από τον TGF-β. (Elliott CG., et al., 2011)

Όσον αφορά τη φάση σχηματισμού της εξωκυττάριας μήτρας και της αναδιαμόρφωσης της επούλωσης τραύματος, ο TGF-β1 εμπλέκεται στην παραγωγή κολλαγόνου (ιδιαίτερα τύπου I και III). Επίσης είναι ισχυρός αναστολέας των μεταλλοπρωτεϊνών MMP-1, MMP-3 και MMP-9 και προαγωγός της σύνθεσης του αναστολέα των μεταλλοπρωτεϊνών TIMP-1, αναστέλλοντας έτσι την αποικοδόμηση του κολλαγόνου (Mauviel A, et al., 1996; Papakonstantinou E, et al., 2003; Zeng G, et al., 1996; White LA, et al., 2000). Τέλος, η ικανότητα του TGF-β1 να διεγείρει την παραγωγή κολλαγόνου είναι τόσο ισχυρή που μπορεί να οδηγήσει σε παθολογικά φαινόμενα. Ο TGF-β1 παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της ίνωσης προκαλώντας και διατηρώντας την ενεργοποίηση των χηλοειδών ουλών από τους ινοβλάστες (Corsini E, et al., 1998).

Η δεύτερη isoμορφή του TGF-β, ο TGF-β2, έχει επίσης δειχθεί ότι έχει ρόλο στην επούλωση πληγών καθώς εμπλέκεται σε όλα τα στάδια της επούλωσης του τραύματος. Από τις βασικές δράσεις του είναι ότι συμμετέχει στην πρόσληψη φλεγμονωδών κυττάρων και ινοβλαστών στην περιοχή του τραύματος. Πειράματα *in vivo* δείχνουν ότι ο TGF-β2 διεγείρει

το σχηματισμό κοκκιώδους ιστού προκαλώντας αγγειογένεση (Cordeiro MF, Reichel et al., 1999; Roberts AB, et al., 1986) Έχει επίσης αποδειχθεί ότι επιταχύνει την επανεπιθηλίωση *in vivo* (Cordeiro MF, Reichel et al., 1999; Cox DA, et al., 1992). Με την αύξηση της πρόσληψης ινοβλαστών στην περιοχή του τραύματος, αυξάνεται η εναπόθεση κολλαγόνου (ιδιαίτερα των τύπων I και III) και ο σχηματισμός ουλής *in vivo* (Cordeiro MF, Reichel et al., 1999; Shah M, et al., 1995).

Η τρίτη ισομορφή, ο TGF-β3, έχει δειχθεί ότι και αυτό με τη σειρά του συνεισφέρει στην επούλωση πληγών. Μελέτες *in vivo* έδειξαν ότι ο TGF-β3 προωθεί την πρόσληψη φλεγμονωδών κυττάρων και ινοβλαστών στη θέση του τραύματος και διευκολύνει τη μετανάστευση κερατινοκυττάρων, ενώ επίσης φαίνεται να είναι ένα ισχυρό διεγερτικό της νεοαγγειοποίησης και της αγγειακή αναδιάταξη (Tyrone JW, et al., 2000; Merwin JR, et al., 1991). Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι ο TGF-β3 αναστέλει πιθανώς τη σύνθεση DNA σε ανθρώπινα κερατινοκύτταρα. Επιπλέον, σε αντίθεση με τις άλλες δύο ισομορφές που προάγουν το σχηματισμό ουλής, ο TGF-β3 αναστέλλει τη δημιουργία ουλών και προωθεί την καλύτερη οργάνωση του κολλαγόνου *in vivo* (Shah M, et al., 1995).

Στο σημείο αυτό, σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι σε χρόνιες πληγές, οι παράγοντες της οικογένειας του TGF-β μειώνονται σημαντικά πιθανώς λόγω της αποικοδόμησής τους από πρωτεολυτικά ένζυμα, ιδιαίτερα από την ελαστάση των ουδετερόφιλων. (Chen SM, et al., 1997), , ενώ έχει δειχθεί ότι ο TGF-β μπορεί να συμπλεχθεί μόρια όπως ντεκορίνη, ινωδογόνο, αλβουμίνη και α2-μακροσφαιρίνη, οδηγώντας σε περιορισμό της βιοδραστικότητάς τους (Markmann A, et al., 2000; Thomson AW, et al., 2003).

- **Αιμοπεταλιακός Αυξητικός Παράγοντας (PDGF)**

Ο PDGF περιλαμβάνει μία οικογένεια από ομο ή ετεροδιμερείς αυξητικούς παράγοντες όπως οι PDGF-AA, PDGF-AB, PDGFBB, PDGF-CC και PDGF-DD. Οι PDGF παράγονται από αιμοπετάλια, μακροφάγα, αγγειακό ενδοθήλιο, ινοβλάστες, και κερατινοκύτταρα (Bennett SP, et al., 2003; Niessen FB, et al., 2001; Uutela M, et al., 2004). Αυτοί οι συνδέτες δεσμεύονται σε δύο διαφορετικούς διαμεμβρανικούς υποδοχείς κινάσης τυροσίνης (άλφα και βήτα) (Lederle W, et al., 2006). Ο PDGF συμμετέχει σε κάθε στάδιο επούλωσης τραύματος.

Κατά τη δημιουργία τραύματος ο PDGF απελευθερώνεται από την αποκοκκίωση των αιμοπεταλίων και υπάρχει στο υγρό του τραύματος (Trengove NJ, et al., 2000; Vogt PM, et al., 1998). Αυτό διεγείρει τη μιτογονικότητα και τη χημειοταξία των ουδετερόφιλων, των μακροφάγων, των ινοβλαστών και κυττάρων του λείου μυός στη θέση του τραύματος. (Heldin CH, et al., 1999). Επίσης, διεγείρει τα μακροφάγα να παράγουν και να εκκρίνουν

αυξητικούς παράγοντες όπως ο TGF- $\beta$ , ενώ αυξάνει επίσης την αποδόμηση των ιστών με τη μεσολάβηση μακροφάγων και τον σχηματισμό κοκκώδους ιστού (Lederle W, et al., 2006). Ο PDGF διεγείρει και την αγγειογένεση, αν και η αγγειογενετική δράση του είναι ασθενέστερη από αυτή των FGF και VEGF. Επίσης, ο PDGF παίζει ρόλο στην επανεπιθηλιοποίηση των ιστών με ρύθμιση της παραγωγής του IGF-1 και της θρομβοσπονδίνης-1 *in vitro* (Rabhi-Sabile S, et al., 1996). Έχει δειχθεί *in vitro* ότι ο IGF-1 αυξάνει την κινητικότητα των κερατινοκυττάρων και η θρομβοσπονδίνη-1 καθυστερεί την πρωτεολυτική αποικοδόμηση και προάγει την πολλαπλασιαστική απόκριση στο τραύμα (Krishnaswami S, et al., 2002; Ando Y, et al., 1993). Επιπλέον, ο PDGF φαίνεται να ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών με επακόλουθο την παραγωγή εξωκυττάριας ύλης ECM (Lin H, et al., 2006). Επιπροσθέτως, διεγείρει τους ινοβλάστες να συστέλλουν τις μήτρες κολλαγόνου και επάγει το μυοϊνοβλαστικό φαινότυπο σε αυτά τα κύτταρα (Rhee S, et al., 2006). Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι κατά τη διάρκεια της αναδιαμόρφωσης του ιστού, ο PDGF βοηθά στη διάσπαση του παλιού κολλαγόνου από ρυθμιστικές μεταλλοπρωτεϊνάσες της μήτρας (Jinnin M, et al., 2005).

- **Αυξητικός Παράγων Αγγειακού Ενδοθηλίου (VEGF)**

Η οικογένειας VEGF περιλαμβάνει τους VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E και τον αυξητικό παράγοντα πλακούντα (Saaristo A, et al., 2006). Ο VEGF-A παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα κερατινοκύτταρα, τα κύτταρα λείων μυών ινοβλαστών, τα αιμοπετάλια, τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα (Nissen NN, et al., 1998; Banks RE, et al., 1998; Gaudry M, et al., 1997; Berse B, et al., 1992; Jazwa A, et al., 2006; Namiki A, et al., 1995). Δεσμεύεται σε υποδοχείς της επιφάνειας των κυττάρων η οποίοι ανήκουν στην κατηγορία κινάσης τυροσίνης Flt-1 (υποδοχέας VEGF-1) και τον KDR (VEGF υποδοχέα-2 [VEGFR-2]) (Thomas KA. Et al., 1996; de Vries C, et al., 1992; Terman BI, et al., 1992), που εντοπίζονται στην ενδοθηλιακή επιφάνεια των αιμοφόρων αγγείων (Breier G, et al., 1997; Olander JV, et al., 1991; Peters KG, et al., 1993).

Αρχικά, ο VEGF-A είναι σημαντικός στην επούλωση τραυμάτων επειδή προάγει τα πρώιμα συμβάντα στην αγγειογένεση, ιδιαίτερα τη μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων (Yebra M, et al., 1996; Suzuma K, et al., 1998; Senger DR, et al., 1996) και τον πολλαπλασιασμό (Morbidelli L, et al., 1996; Pepper MS, et al., 1992; Goto F, et al., 1993; Watanabe Y, et al., 1997; Gerber HP, et al., 1998) όπως φαίνεται σε μερικές *in vitro* μελέτες. Η μεταγραφή και η έκκριση VEGF-A μαζί με τον VEGFR είναι αυξημένα στα οξεία τραύματα (Frank S, et al., 1995; Brown LF, et al., 1992; Shukla A et al., 1998). Μετά από τραυματισμό, ενεργοποιημένα αιμοπετάλια απελευθερώνουν VEGF-A (Banks RE, et al.,

1998; Brogi E, et al., 1994). Επιπροσθέτως, τα μακροφάγα απελευθερώνουν VEGFA κατά την επούλωση πληγών (Brown LF, et al., 1992) καθώς επίσης απελευθερώνουν TNF- $\alpha$ , που επάγει την έκφραση VEGF-A στα κερατινοκύτταρα και στους ινοβλάστες.<sup>185</sup> Άλλες κυτοκίνες και αυξητικοί παράγοντες που δρουν ως παρακρινείς παράγοντες και ενισχύουν την έκφραση του VEGF-A περιλαμβάνουν τους TGF- $\beta$ 1, EGF, TGF- $\alpha$ , KGF, bFGF, PDGF-BB, και IL-1b (Frank S, et al., 1995; Brogi E, et al., 1994; Stavri GT, et al., 1995).

Εκτός από τα αποτελέσματά του επί του φαινομένου της αγγειογένεσης, ο VEGF-A συμμετέχει στην λεμφοαγγειογένεση κατά τη διάρκεια της επούλωσης των τραυμάτων. Μία *in vitro* μελέτη έδειξε ότι ο VEGF-A προάγει τον σχηματισμό λεμφατικών αγγείων μέσω της ενεργοποίησης του υποδοχέα VEGFR-2 (Hong YK, et al., 2004).

Όσον αφορά τον VEGF-C, ρυθμίζεται, επίσης, κατά τη διάρκεια της επούλωσης του τραύματος. Αυτός ο παράγοντας ανάπτυξης απελευθερώνεται κυρίως από τα μακροφάγα και είναι σημαντικός κατά τη διάρκεια του φλεγμονώδους σταδίου της επούλωσης ουλών (Schoppmann SF, et al., 2002). Ο VEGF-C λειτουργεί κυρίως μέσω του VEGF υποδοχέα-3 (VEGFR3). Μελέτες *in vitro* δείχνουν ότι ο συγκεκριμένος αυξητικός παράγοντας παίζει ρόλο στη διευκόλυνση της αιμοποιητικής και φλεγμονώδους πρόσληψης κυττάρων στη θέση του τραύματος τόσο άμεσα όσο και έμμεσα με τη σύνδεση με την αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας του VEGFR-2 (Cao Y, et al., 1998; Witzénbichler B, et al., 1998). *In vitro* μελέτες δείχνουν, επίσης, ότι ο VEGF-C παίζει ρόλο στην λεμφοαγγειογένεση με σύνδεση στον VEGFR-3 (Karkkainen MJ, et al., 2004) και στην αγγειογένεση μετά από πρωτεολυτική διάσπαση με σύνδεση του στον υποδοχέα VEGFR-2 (Joukov V, et al., 1997; McColl BK, et al., 2003; Cao Y, et al., 1998; Witzénbichler B, et al., 1998).

Ο παράγοντας ανάπτυξης πλακούντα (PLGF) είναι ένα προ-αγγειογόνο μόριο που ρυθμίζεται αυξητικά κατά τη διάρκεια της επούλωσης του τραύματος. Στο δέρμα, ο συγκεκριμένος αυξητικός παράγοντας εκφράζεται από τα κερατινοκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Δρα δεσμευόμενος και ενεργοποιώντας τον VEGFR-1. Έχει δειχθεί, *in vitro*, ότι προάγει τη χημειοταξία των μονοκυττάρων και την κινητικότητα πρόδρομων κυττάρων που προέρχονται από μυελό των οστών (Clauss M, et al., 1996; Pipp F, et al., 2003; Hattori K, et al., 2002). Επίσης εμπλέκεται στο σχηματισμό ικοκκιδώδους στού, στην ωρίμανση και στην αγγειοποίηση. Θεωρείται ότι συνεργάζεται με το VEGF ενισχύοντας τη λειτουργία του (Carmeliet P, et al., 2001; Cianfarani F, et al., 2006). Επιπλέον, ο PLGF έχει αποδειχθεί ότι διεγείρει άμεσα τη μετανάστευση ινοβλάστων σε κυτταροκαλλιέργειες, γεγονός που υποδηλώνει τον άμεσο ρόλο στην επιτάχυνση της ωρίμανσης του κοκκιδώδους ιστού (Berrientos S., et al., 2008).

Σε γενικά πλαίσια έχουν γίνει έρευνες ως προς τον πιθανό φαρμακευτικό ρόλο που θα μπορούσαν να έχουν οι αυξητικοί παράγοντες σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, μερικοί από τους οποίους έχουν πάρει τη σχετική έγκριση από τον FDA για χρήση τους σε κλινικές μελέτες. Οι περισσότερες αφορούν τα χρόνια έλκη τα οποία είναι δυσκολότερα σε χειρισμό όπως και τα διαβητικά έλκη. Οι περισσότερο ελπιδοφόροι αυξητικοί παράγοντες που απαιτούν κλινικές δοκιμές είναι οι VEGF, bFGF και GM-CSF. Ο Το PDGF-BB έχει ήδη εγκριθεί από τον FDA και χρησιμοποιείται επί του παρόντος στη θεραπεία χρόνιων ελκών (Barriento S., et al.,2008).

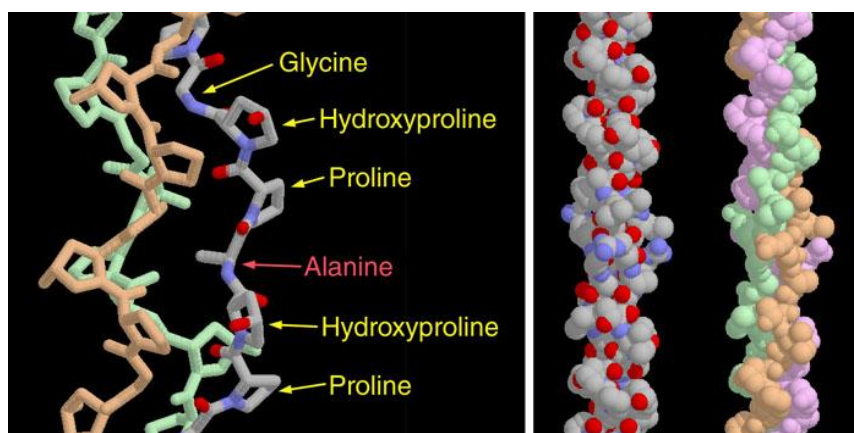
## **5. ΚΟΛΛΑΓΟΝΑ ΣΤΗΝ ΕΠΟΥΛΩΣΗ ΠΛΗΓΩΝ**

Το κολλαγόνο είναι το μοναδικό μόριο πρωτεΐνης τριπλής έλικας, το οποίο αποτελεί το κύριο μέρος της εξωκυτταρικής δερματικής μήτρας (ECM) μαζί με τις γλυκοζαμινογλυκάνες, πρωτεογλυκάνες, λαμινίνη, φιμπρονεκτίνη, ελαστίνη και κυτταρικά συστατικά (Hopkinson, 1992a, b, Berry et al, 1998, Enoch and Leaper, 2008). Αποτελεί την πλέον άφθονη πρωτεΐνη στους ζωικούς ιστούς, αντιπροσωπεύοντας το 70-80% του ξηρού βάρους της δερμίδας (Hopkinson, 1992) και ταυτόχρονα το 25% με 35% της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες ολόκληρου του σώματος.. Παράγεται κυρίως από τους ινοβλάστες και έχουν αναγνωριστεί τουλάχιστον 21 γενετικά διακριτά κολλαγόνα, με έξι από αυτά να υπάρχουν στο δέρμα. Το κολλαγόνο τύπου I αποτελεί περίπου το 70% του κολλαγόνου στο δέρμα, όπου ο τύπος III είναι 10% και υπάρχουν και ίχνη κολλαγόνου τύπου IV, V, VI και VII (Uitto et al, 1989 Hay, 1991). Το κολλαγόνο αποτελείται από αμινοξέα περιελιγμένα μεταξύ τους που σχηματίζουν τριπλές έλικες επιμηκυσμένων ινιδίων. Βρίσκεται κυρίως σε ινώδεις ιστούς όπως τένοντες, συνδέσμους και δέρμα. Λόγω της ακαμψίας και της αντοχής του στο τέντωμα, είναι η τέλεια μήτρα για το δέρμα, τους τένοντες, τα οστά και τους συνδέσμους.

Η κύρια λειτουργία του κολλαγόνου είναι ότι ενεργεί ως σκελετός στο συνδετικό ιστό, κυρίως στις μορφές του τύπου I, II και III. Σε τραύματα πρώιμης επούλωσης, εμφανίζεται πρώτα ο τύπος III, με την αναλογία του τύπου I να αυξάνεται καθώς ο σχηματισμός ουλών προχωρεί σε αναδιαμόρφωση. Η εναπόθεση κολλαγόνου και η αναδιαμόρφωση συμβάλλουν στην αυξημένη αντοχή εφελκυσμού του τραύματος, που είναι περίπου 20% του φυσιολογικού έπειτα από τρεις εβδομάδες μετά τον τραυματισμό, φθάνοντας σταδιακά το

70% του κανονικού δέρματος (Desmouliere et al, 1995). Παρόλο που οι επιθηλιακές δομές μπορούν να επουλωθούν με αναγέννηση, οι συνδετικοί ιστοί δεν μπορούν και εξαρτώνται από τη διαδικασία της επιδιόρθωσης κυρίως με το σχηματισμό κολλαγονούχου ουλώδους ιστού (Berry et al, 1998), τύπου I, που χρησιμεύει στην αποκατάσταση της συνέχειας, της αντοχής και της λειτουργίας του ιστού.

Όσον αφορά την δομή του κολλαγόνου υπάρχουν κάποια συγκεκριμένα βιοχημικά χαρακτηριστικά που το διακρίνουν από τα υπόλοιπα ενδογενή μόρια και το καθιστούν ως μία από τις πιο βασικές πρωτεΐνες του οργανισμού. Το υψηλό ποσοστό γλυκίνης (περίπου 33% του συνόλου των αμινοξέων), η υψηλή περιεκτικότητα σε ιμινοξέα, η προλίνη και η υδροξυπρολίνη (περίπου 22%), η παρουσία υδροξυλυσίνης και η απουσία τρυπτοφάνης διακρίνουν το κολλαγόνο από όλες τις άλλες γνωστές πρωτεΐνες (Mnashi S., 1977). Αξιοσημείωτη επίσης είναι η απουσία κυστεΐνης, η οποία εξαλείφει τη δυνατότητα δημιουργίας δισουλφιδικών δεσμών στο μόριο. Η πρωτεύουσα αλληλουχία αμινοξέων του κολλαγόνου είναι γλυκίνη-προλίνη-X ή γλυκίνη-X-υδροξυπρολίνη (Saghaleini SH., et al., 2018), όπου το X μπορεί να είναι οποιοδήποτε από τα άλλα 17 αμινοξέα, ενώ κάθε τρίτο αμινοξύ αποτελείται από γλυκίνη. Το κολλαγόνο αποτελείται από 3 αλυσίδες. Οι αλυσίδες περιελίσσονται μαζί για να σχηματίσουν μια τριπλή έλικα. Δεδομένου ότι η γλυκίνη είναι το μικρότερο από όλα τα αμινοξέα, επιτρέπει στην αλυσίδα να σχηματίζει μια σφιχτή διαμόρφωση και να μπορεί να αντέξει το στρες. Η διαδικασία σύνθεσης κολλαγόνου συμβαίνει τόσο ενδοκυτταρικά όσο και εξωκυτταρικά, κυρίως στα κύτταρα ινοβλαστών που είναι εξειδικευμένα κύτταρα με κύρια λειτουργία τη σύνθεση κολλαγόνου και στρώματος (Marlyn W., Crane J., 2019).



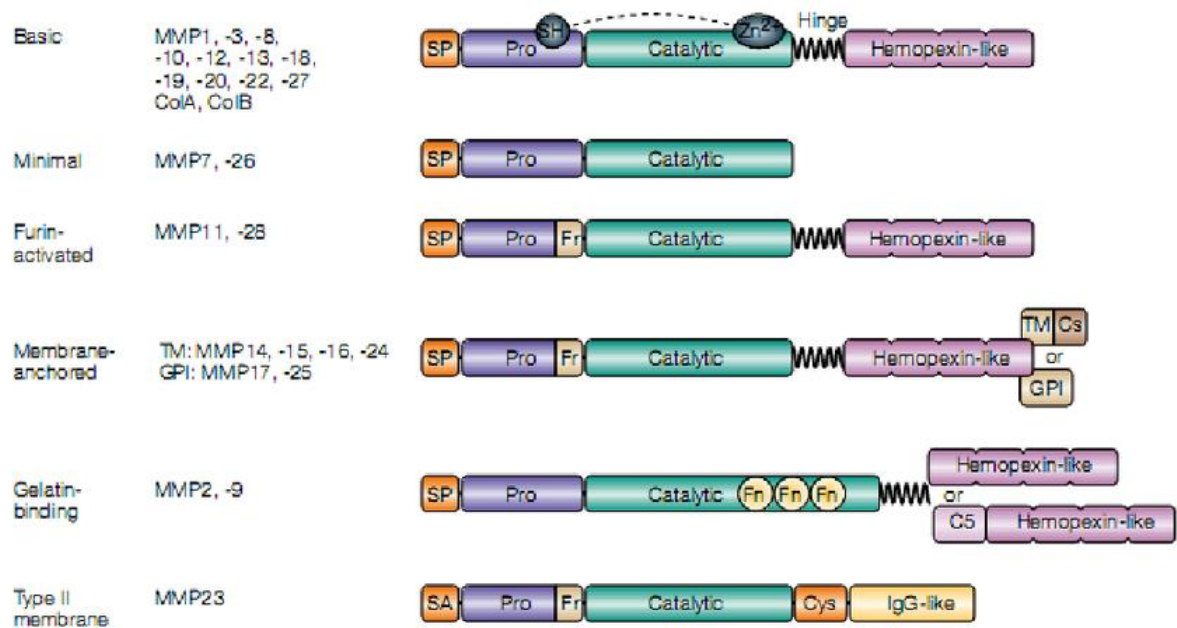
Εκτός από το γεγονός ότι είναι το κύριο συστατικό του ουλώδους ιστού, το κολλαγόνο διαδραματίζει βασικό ρόλο στα εξής:

- Έλεγχος της φλεγμονώδους απόκρισης σε τραυματισμό και επακόλουθη αποκατάσταση με λειτουργίες που επηρεάζουν την κυτταρική μιτογένεση, διαφοροποίηση και μετανάστευση
- Σύνθεση πρωτεϊνών στην εξωκυτταρική μήτρα (ECM)
- Σύνθεση και απελευθέρωση φλεγμονωδών κυτοκινών και παραγόντων ανάπτυξης
- Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ενζύμων που αναδιαμορφώνουν την εξωκυττάρια μήτρα (ECM), συμπεριλαμβανομένων των μεταλλοπρωτεϊνών μήτρας (MMPs) και των αναστολέων τους (TIMPs).

Παράλληλα με τις κρίσιμες λειτουργίες κολλαγόνου ως προς τη σωστή δερματική επουλωτική διαδικασία, αρκετοί άλλοι παράγοντες που σχετίζονται με την κακή επούλωση πληγών επηρεάζουν άμεσα τον μεταβολισμό του κολλαγόνου. Μεταξύ των εξωγενών παραγόντων συγκαταλέγεται ο διαβήτης στον οποίο η υπεργλυκαιμία μειώνει την κανονική παραγωγή κολλαγόνου και προκαλεί μη ενζυματική γλυκοζυλίωση του κολλαγόνου και της κερατίνης, οδηγώντας στον σχηματισμό ανώμαλου άκαμπτου κολλαγόνου και σε διάσπαση του ιστού (Black et al, 2003). Το κολλαγόνο κατά τη διάρκεια της παραγωγής του μπορεί να σχηματίσει μη φυσιολογικές ουλές, οι οποίες εμποδίζουν την επούλωση πληγών (Gault, 1999). Επιπλέον, ένα μεγάλο μέρος της σχετιζόμενης με την ηλικία καθυστερημένης επούλωσης πληγών προκαλείται από την εξασθενημένη σύνθεση κολλαγόνου και την αυξημένη αποικοδόμησή του (Ashcroft et al, 2002). Το κάπνισμα, με τη σειρά του, επηρεάζει τους ρυθμούς σύνθεσης των επιπέδων κολλαγόνου, MMP και TIMP1 στο δέρμα, οδηγώντας σε ανισορροπίες στον κύκλο του κολλαγόνου (Knuutinen et al, 2002). Επίσης, ενδογενείς παράγοντες που περιλαμβάνουν μεταβολές στην τάση οξυγόνου μπορούν να μεταβάλλουν τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών και την παραγωγή κολλαγόνου και επίσης να ενισχύσουν τη δομική υποστήριξη που απαιτείται για την τριχοειδή αγγειογένεση (Hunt and Pai, 1975) και μια ανώμαλη υπερβολική τοπική φλεγμονώδη απόκριση που οδηγεί σε μη φυσιολογικές, υπερτροφικές ή χηλοειδείς ουλές (Wang et al, 2007).

## 6. ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΑΣΕΣ (MMP's)

Μεταλλοπρωτεϊνάση ή μεταλλοπρωτεάση καλείται κάθε πρωτεολυτικό ένζυμο που το ενεργό του μέρος καλύπτεται από κάποιο μέταλλο και πιο συγκεκριμένα από ιόντα  $Zn^{2+}$  ή  $Ca^{2+}$  που συμμετέχουν στους καταλυτικούς μηχανισμούς των ενζύμων. Η οικογένεια MMP είναι μια ομάδα ενζύμων εξαρτώμενη από το ασβέστιο και τον ψευδάργυρο και εμπλέκονται στον καταβολισμό της ECM. Τα μέλη της οικογένειας αυτής μοιράζονται δομικές ομοιότητες καθώς και ομοιότητες στην αλληλουχία των αμινοξέων τους, μία εύκαμπτη περιοχή άρθρωσης πλούσια σε προλίνη και μία ομοιάζουσα με αιμοπηξίνη καρβοξυτελική περιοχή, η οποία λειτουργεί σε αναγνώριση των υποστρωμάτων (συνήθως ECM) που έρχονται σε επαφή με τις μεταλλοπρωτεϊνάσες. Εξαιρέσεις από αυτά τα χαρακτηριστικά είναι οι MMP-7, MMP-23 και MMP-26, στις οποίες λείπει ο τομέας που μοιάζει με αιμοπηξίνη. Κάποια MMPs έχουν πρόσθετες παρεμβολές, οι οποίες συμβάλλουν στην λειτουργικές διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των διαφορετικών τύπων MMPs. Οι MMPs διακρίνονται σε επτά ομάδες με βάση την προτίμηση του υποστρώματος και την οργάνωση των δομών τους οι οποίες είναι οι εξής: (1) κολλαγενάσες, (2) ζελατινάσες, (3) στρομελυσίνες, (4) ματριλυσίνες, (5) μεταλλοελαστάσες, (6) μεμβρανικού τύπου MMPs (MT-MMP), και (7) άλλες MMPs (Caley M., et al., 2014).



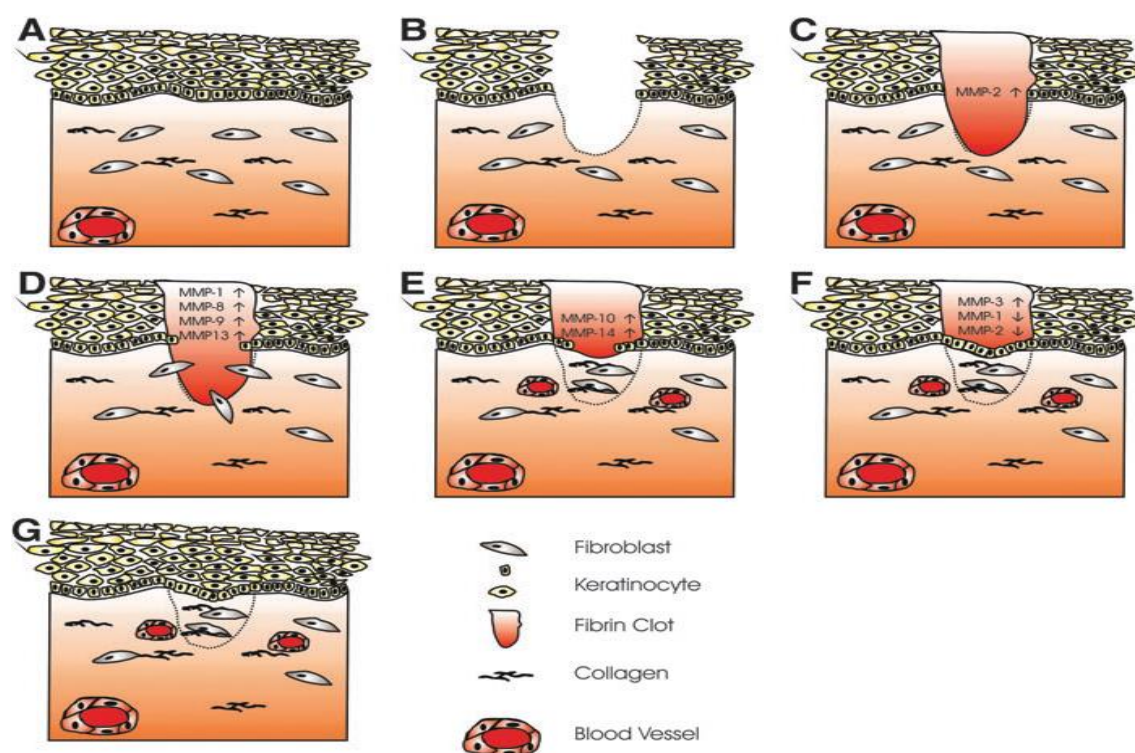
**Εικόνα Ε. 12:** Δομή των τομέων της οικογένειας των MMPs θηλαστικών. Τα σημαντικά χαρακτηριστικά των μεταλλοπρωτεϊνών μήτρας (MMPs) απεικονίζονται, παρουσιάζοντας τις χαρακτηριστικές περιοχές των μορίων. Μια ξεκάθαρη κατηγοριοποίηση βασίζεται στη διάκριση μεταξύ των MMPs που εκκρίνονται και εκείνων που είναι αγκυροβολημένες στην κυτταρική επιφάνεια με ένα εγγενές μοτίβο: δηλαδή μια διαμεμβρανική περιοχή (TM) (MMP14, -15, -16 και -24), μία άγκυρα γλυκοζυλοφωσφατιδυλινοσιτόλης (GPI) (MMP17 και MMP25) ή μία άγκυρα αμινοτελικού σήματος (SA) (MMP23). Τόσο οι τομείς TM όσο και οι άγκυρες GPI συνδέονται με τον τομέα που μοιάζει με αιμοπηξίνη με ένα σύντομο συνδετικό τμήμα. Οι εκκρινόμενες MMPs μπορεί να περιορίζονται στην κυτταρική επιφάνεια μέσω αλληλεπιδράσεων με ειδικά βοηθητικά μακρομόρια. Επειδή οι μηχανισμοί που ελέγχουν την ενεργοποίηση (δηλαδή, μετατροπή του proMMP σε ενεργό MMP) είναι βασικά βήματα στην ρύθμιση της πρωτεόλυσης, μια άλλη κατηγοριοποίηση των MMPs μπορεί να γίνει με βάση την ενδοκυτταρική ενεργοποίηση με πρωτεϊνάσες φουρίνης. Εννέα MMP, συμπεριλαμβανομένων όλων των ενζύμων με αγκύλη μεμβράνης, έχουν περιοχή αναγνώρισης φουρίνης. (Υπόμνημα: C5, περιοχή τύπου-V-κολλαγόνου. Col, πρωτεΐνη τύπου κολλαγενάσης. Cs, κυτοσολικό; Cys, διάταξη κυστεΐνης. Fn, επαναλαμβανόμενη φιδιπροεκτίνη. Fr, θέση διάσπασης φουρίνης. Pro, pro-domain; SH, ομάδα θειόλης. SP, πεπτίδιο σήματος. Zn, ψευδάργυρος). (Parks W.C., et al., 2004)

Υπάρχουν 25 MMPs, 24 από τις οποίες βρίσκονται στα θηλαστικά (Birkedal-Hansen et al, 1993, Parks, Wilson, Lopez-Boado, 2004). Ο υποτιθέμενος ρόλος των συγκεκριμένων ενδοπεπτιδασών περιοριζόταν στον καταβολισμό της εξωκυτταρικής ύλης (ECM). Ωστόσο, διάφορες τελευταίες μελέτες έχουν διαπιστώσει ότι οι MMP αποτελούν μία ποικιλία εξωκυτταρικών, βιοδραστικών υποστρωμάτων και ρυθμίζουν τη δραστηριότητα πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην επιτέλεση σημαντικών λειτουργιών, που περιλαμβάνουν την απελευθέρωση αυξητικών παραγόντων από την κυτταρική μεμβράνη ή την εξωκυττάρια ύλη (ECM), την απομάκρυνση των υποδοχέων των αυξητικών παραγόντων από την κυτταρική επιφάνεια, την αποβολή μορίων κυτταρικής προσκόλλησης και την ενεργοποίηση άλλων MMPs (Egeblad & Werb, 2002, Mott & Werb, 2004; Parks et al., 2004).

### **Ο Ρόλος των Μεταλλοπρωτεϊνών στην Επούλωτική Διαδικασία**

Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες έχουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της φλεγμονώδους απόκρισης που συμβαίνει κατά τη διαδικασία της δερματικής επούλωσης και αυτό περιλαμβάνει τον έλεγχο της δραστηριότητας των χημειοκινών, την απελευθέρωση χημειοτακτικών παραγόντων και την εξαγγείωση των λευκοκυττάρων από το αίμα στους τραυματικούς ιστούς (Gills S. & Parks W., 2008). Όλες οι MMPs συμμετέχουν εν μέρει στην διαδικασία της δερματικής επούλωσης, με κυριότερες τις MMP1 / MMP2 / MMP3 και

MMP9, η δράση των οποίων είναι εντονότερη συγκριτικά με τις υπόλοιπες μεταλλοπρωτεϊνάσες και φαίνεται να εμπλέκεται σε αρκετά διαφορετικούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης. Είναι γνωστό πως οι MMPs εκφράζονται κατά τη διάρκεια όλων των διαδικασιών που συνιστούν την επούλωση πληγών, οι μηχανισμοί, όμως, μέσω των οποίων λειτουργούν δεν έχουν πλήρως αποσαφινιστεί. Μέχρι σήμερα, φαίνεται ότι σχεδόν όλες οι MMPs αποτελούν θετικούς ρυθμιστές αυτών των διαδικασιών. Ωστόσο, έχει προταθεί ότι τόσο οι MMP2 όσο και οι MMP9 μπορεί να έχει ανασταλτικές επιδράσεις στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Gills S. & Parks W., 2008). Ένας από τους πρωτεύοντες ρόλους τους είναι ο έλεγχος της παραγωγής και δραστηριότητας παραγόντων που συμμετέχουν στην φλεγμονώδη φάση της επούλωσης. Έχει δειχθεί ότι οι προερχόμενες από το επιθήλιο MMPs ρυθμίζουν πολυάριθμες πτυχές της φλεγμονής, όπως τη διαεπιθηλιακή μετανάστευση των λευκοκυττάρων όπως και τη δραστηριότητα και διαμερισματοποίηση χημειοκινών (Parks et al., 2004; Yong, 2005).



**Εικόνα E.13 :** Σχηματική αναπαράσταση της δράσης των μεταλλοπρωτεϊνών μήτρας (MMPs) κατά τις διαφορετικές φάσεις της επούλωσης πληγών. Το υγιές δέρμα αποτελείται από στρωματοποιημένο πλακώδες επιθήλιο, βασική μεμβράνη και χόριο (A). Το επιθήλιο αποτελείται από τα κερατινοκύτταρα (πολλαπλασιαστικά) και τα στρωματοποιημένα κερατινοκύτταρα (που διαφοροποιούνται), τα οποία τελικά χάνουν το πυρηνικό τους υλικό. Το χόριο αποτελείται από η εξωκυτταρική μήτρα, κυρίως το κολλαγόνο, συμπυκνώνεται από ινοβλάστες και περιέχει τα αιμοφόρα αγγεία που τροφοδοτούν το δέρμα. (B). Ένα τραύμα πλήρους πάχους του δέρματος καταστρέφει τόσο την

επιδερμίδα όσο και το δέρμα. (C). Φλεγμονώδης φάση, το τραύμα γεμίζεται με θρόμβο ινώδους που σφραγίζει το τραύμα, η έκφραση της MMP-2 αυξάνεται. (D). Οι ινοβλάστες μεταναστεύουν στην περιοχή του τραύματος, χρησιμοποιώντας MMPs, αναδιαμορφώνουν τον θρόμβο ινώδους που το αντικαθιστά με νέα εξωκυτταρική μήτρα. Τα επιθηλιακά κύτταρα ρυθμίζουν αυξητικά την έκφραση των MMPs και μεταναστεύουν στην περιοχή του τραύματος (E). (F) επανεπιθηλίωση: επιθηλιακά κύτταρα μεταναστεύουν από το περιβάλλον επιθήλιο, πολλαπλασιάζονται και κλείνουν την πληγή. (G) Η ωρίμανση πληγών: πολλαπλασιασμός επιθηλιακών κυττάρων και διαφοροποίησή τους, αναδημιουργώντας το στρωματοποιημένο πλακώδες επιθήλιο. Οι ινοβλάστες συνεχίζουν να αναδιαμορφώνουν την υποκείμενη δερμίδα για διάστημα αρκετών μηνών μετά το κλείσιμο της πληγής. (Caley M., et al., 2014

Τα φλεγμονώδη κύτταρα είναι γνωστό ότι επάγουν την έκφραση των MMPs. Ωστόσο, τα επιθηλιακά και τα στρωματικά κύτταρα σε τραυματισμένο ιστό έχουν επίσης αποδειχθεί ότι εκφράζουν διάφορες MMPs συμπεριλαμβανομένων των MMP1, 2, 3, 7, 9, 10 και 28 (Corry et al., 2004; Corry et al., 2002; Dunsmore et al., 1998; Inoue, Kratz, Haegerstrand, & Stahle-B ° ackdahl, 1995 ; Pilcher, Sudbeck, Dumin, Welgus, & Parks, 1998; Pilcher et al., 1999; Saarialho-Kere et al., 2002; Saarialho-Kere, Crouch, & Parks, 1995; Salmela et al., 2004; Warner et al., 2004). Πολλές από αυτές τις μεταλλοπρωτεϊνάσες μπορούν να ρυθμίσουν την δραστηριότητα των χημειοκινών είτε με άμεση πρωτεόλυσή τους είτε επηρεάζοντας το σχηματισμό των παραγόμενων ουσιών των χημειοκινών. Πιο συγκεκριμένα, η διάσπαση των χημειοκινών από τις MMPs οδηγεί συχνότερα σε μείωση της δραστικότητάς τους (Gills S. & Parks W., 2008). Αυτό ισχύει ιδιαίτερα για τις χημειοκίνες CC ενώ οι χημειοκίνες CXC έχουν ποικίλη απόκριση στη διάσπαση τους από τις MMPs. Από όλες τις MMPs παρατηρείται ότι οι MMP 1, 3 και 9 ρυθμίζουν συνηθέστερα τη σηματοδότηση των χημειοκινών, με αποτελέσματα που κυμαίνονται από πλήρη αποικοδόμηση της χημειοκίνης ή δημιουργία ανταγωνιστών υποδοχέα έως και δραματική αύξηση της δραστικότητάς της (Gills S. & Parks W., 2008).

Πολλαπλές MMP έχουν συσχετισθεί με αυτή την επιθηλιακή επιδιόρθωση της πληγής και σε αυτές περιλαμβάνονται οι MMP 1, 3, 7, 9, 10, 14 και 28 (Atkinson, Toennies, Holmbeck & Senior, 2007; Dunsmore et al., 1998; McCawley, O'Brien, & Hudson, 1998; Pilcher et al., 1999; Saarialho-Kere et al., 2002). Η MMP1 (κολλαγενάση-1) είναι παρούσα σε ανθρώπινες δερματικές πληγές κατά την επανεπιθηλίωση, αλλά απενεργοποιείται αφού ολοκληρωθεί το κλείσιμο του τραύματος (Inoue et al., 1995; Saarialho-Kere, Vaalamo, et al., 1995). Στο τραυματισμένο δέρμα, καθώς τα κερατινοκύτταρα μεταναστεύουν από τη βασική στοιβάδα του δέρματος, συναντούν μια δερματική μήτρα πλούσια σε κολλαγόνο τύπου I, και η σύνδεση με το κολλαγόνο, μέσω της α<sub>2</sub>β<sub>1</sub> ιντεγκρίνης, διεγείρει την έκφραση της MMP1, καθώς και πολλών άλλων γονιδίων (Pilcher et al., 1998, Spradling, McDaniel, Lohi, & Pilcher, 2001). Η MMP1 διευκολύνει τη μετανάστευση κερατινοκυττάρων πάνω από την

δερματική μήτρα μειώνοντας τη συγγένεια του κολλαγόνου με την ιντεγκρίνη (Pilcher et al., 1997).

Όσον αφορά τις υπόλοιπες μεταλλοπρωτεϊνάσες, η MMP10 (στρομελυσίνη-2) συνεντοπίζεται με την MMP1 ενώ η MMP3 (στρομελυσίνη-1) εντοπίζεται σε κύτταρα πίσω από το μεταναστευτικό μέτωπο. Ο μη-αλληλεπικαλυπτόμενος εντοπισμός των MMP3 και MMP10, οι οποίες αποτελούν αρκετά παρόμοιες πρωτεϊνάσες, υποδηλώνει ότι αυτές οι δύο εξυπηρετούν διαφορετικές λειτουργίες στην επανεπιθηλίωση. Όσον αφορά την MMP7, αυτή ρυθμίζει την επαναιπιθηλιοποίηση του δερματικού ιστού με διάσπαση της E-καντερίνης εντός της συγκολλητικής σύνδεσης, η οποία διευκολύνει τη μετανάστευση των επιθηλιακών κυττάρων μακριά από την άκρη του τραύματος (McGuire κ.ά., 2003). Τέλος, και η MMP9 ή ζελατινάση Β έχει επίσης φανεί ότι εμπλέκεται στην επαναιπιθηλιοποίηση μετά από κάποιον τραυματισμό (Gills S. & Parks W., 2008).

Η κύρια λειτουργία των μεταλλοπρωτεϊνών, που είχε θεωρηθεί αρχικά και ως ο βασικός τους ρόλος, ήταν η αποδόμηση της εξωκυττάριας μήτρας (Gills S. & Parks W., 2008). Η ικανότητα αυτή αποικοδόμησης των πρωτεϊνών της ECM έχει αποδειχθεί για μερικά μέλη της οικογένειας MMP μέσω της χρήσης προσεγγίσεων κέρδους ή απώλειας λειτουργίας (McCawley & Matrisian, 2001, Parks κ.ά., 2004). Πιο συγκεκριμένα, οι μεταλλοπρωτεϊνάσες που επιτελούν αυτό το ρόλο είναι οι MMP1, 3 και 13 καθώς και τα MMP14, οι οποίες είναι ικανές να διασπούν το κολλαγόνο καθώς και η MMP7, η οποία μπορεί να πρωτεολύσει καταλλήλως και συγχρόνως τη συνδεκίνη-1 και την ελαστίνη (Parks et al., 2004). Λόγω, λοιπόν, αυτής της ικανότητας των MMPs για αποδόμηση των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ύλης, διαδικασία που επάγεται κατά τη φάση της ανάπλασης στην επουλωτική διαδικασία, φαίνεται εύλογο ότι οι μεταλλοπρωτεϊνάσες θα συμμετέχουν και στην αναδιαμόρφωση του κολλαγόνου στη φάση αυτή. Επιπλέον, σε μελέτες με χρήση κυτταροκαλλιιεργιών, έχει αποδειχθεί ότι τα κερατινοκύτταρα εκφράζουν αμφότερα τις MMP2 και 9 ενώ οι ινοβλάστες εκφράζουν μόνο MMP2 (Sawicki, Marcoux, Sarkhosh, Tredget & Ghahary, 2005), ενώ σε συγκαλλιέργεια και των δύο τύπων κυττάρων τα κερατινοκύτταρα και οι ινοβλάστες οδηγούν σε αυξημένη έκκριση τόσο MMP 2 όσο και 9, αφθονία που υποδηλώνει ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ των κερατινοκυττάρων και των ινοβλαστών, που συμβαίνει κατά τη διάρκεια της επούλωσης του τραύματος, ρυθμίζει την έκφραση και των 2 αυτών κομβικών για την επουλωτική διαδικασία μεταλλοπρωτεϊνών (Sawicki et al., 2005).

**Table 1. Mammalian matrix metalloproteinases: substrate specificities and role in wound healing**

| Member                       | Substrates                                                                                                                                                                  | Role in wound healing                                                                                                                                                                                        | Determined in |                  |
|------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|------------------|
|                              |                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                              | Cell culture  | In vivo, ex vivo |
| Collagenases                 |                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                              |               |                  |
| MMP-1 (collagenase-1)        | Collagen I, II, III, VII, and X; aggrecan; serpins; alpha2-macroglobulin; kallikrein; chymase                                                                               | Promotes human keratinocyte migration on fibrillar collagen<br>Expressed by keratinocytes at their trailing membrane edge during wound healing<br>Overexpression in keratinocytes delays reepithelialization | X             | X                |
| MMP-8 (collagenase-2)        | Collagen I, II, and III; aggrecan; serpins; 2-MG                                                                                                                            | Cleaves collagens, predominant collagenase in healing wounds                                                                                                                                                 |               | X                |
| MMP-13 (collagenase-3)       | Collagen I, II, III, IV, IX, X, and XIV; gelatin; fibronectin; laminin; tenascin; aggrecan; fibrillin; serpins                                                              | Promotes reepithelialization indirectly by affecting wound contraction                                                                                                                                       |               | X                |
| Gelatinases                  |                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                              |               |                  |
| MMP-2 (gelatinase A)         | Gelatin; collagen I, IV, V, VII, and X; laminin; aggrecan; fibronectin; tenascin                                                                                            | Accelerates cell migration                                                                                                                                                                                   | X             |                  |
| MMP-9 (gelatinase B)         | Gelatin; collagen I, III, IV, V and VII; aggrecan; elastin; fibrillin                                                                                                       | Expressed by keratinocytes at the leading edge of the wound<br>Promotes cell migration and reepithelialization except in cornea                                                                              | X             | X                |
| Stromelysins                 |                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                              |               |                  |
| MMP-3 (stromelysin -1)       | Collagen IV, V, IX, and X; fibronectin; elastin; gelatin; aggrecan; nidogen; fibrillin; E-cadherin                                                                          | Expressed by keratinocytes at the proximal proliferating population that supplies the leading edge during wound healing<br>Affects wound contraction                                                         | X             | X                |
| MMP-10 (stromelysin-2)       | Collagen IV, V, IX, and X; fibronectin; elastin; gelatin; laminin; aggrecan; nidogen; E-cadherin                                                                            | Expressed by keratinocytes at the leading edge of the wound                                                                                                                                                  |               | X                |
| MMP-11 (stromelysin-3)       | Serine protease inhibitors; 1-proteinase inhibitor                                                                                                                          | Unknown                                                                                                                                                                                                      |               |                  |
| Matrilysins                  |                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                              |               |                  |
| MMP-7 (matrilysin)           | Elastin; fibronectin; laminin; nidogen; collagen IV; tenascin; versican; 1-proteinase inhibitor; E-cadherin; tumor necrosis factor                                          | Required for reepithelialization of mucosal wounds                                                                                                                                                           | X             | X                |
| Metalloelastases             |                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                              |               |                  |
| MMP-12 (metalloelastase)     | Collagen IV; gelatin; fibronectin; laminin; vitronectin; elastin; fibrillin; 1-proteinase inhibitor; apolipoprotein A                                                       | Macrophage specific (not expressed by epithelial cells)                                                                                                                                                      |               |                  |
| Membrane-type MMPs           |                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                              |               |                  |
| MMP-14 (MT1-MMP)             | Collagen I, II, and III; gelatin; fibronectin; laminin; vitronectin; aggrecan; tenascin; nidogen; perlecan; fibrillin; 1-proteinase inhibitor; alpha2-macroglobulin; fibrin | Promotes keratinocyte outgrowth, airway reepithelialization and cell migration                                                                                                                               | X             | X                |
| MMP-15 (MT2-MMP)             | Fibronectin; laminin; aggrecan; tenascin; nidogen; perlecan                                                                                                                 | Unknown                                                                                                                                                                                                      |               |                  |
| MMP-16 (MT3-MMP)             | Collagen III; fibronectin; gelatin; casein; laminin; alpha2-macroglobulin                                                                                                   | Unknown                                                                                                                                                                                                      |               |                  |
| MMP-17 (MT4-MMP)             | Fibrin; fibrinogen; tumor necrosis factor precursor                                                                                                                         | Unknown                                                                                                                                                                                                      |               |                  |
| MMP-24 (MT5-MMP)             | Progelatinase A                                                                                                                                                             | Unknown                                                                                                                                                                                                      |               |                  |
| MMP-25 (MT6-MMP; leukolysin) | Gelatin                                                                                                                                                                     | Unknown                                                                                                                                                                                                      |               |                  |
| Other MMPs                   |                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                              |               |                  |
| MMP-19 (RASI-1)              | Gelatin; aggrecan; cartilage oligomeric matrix protein; collagen IV; laminin; nidogen; large tenascin                                                                       | Unknown                                                                                                                                                                                                      |               |                  |
| MMP-20 (enamelysin)          | Amelogenin; aggrecan; cartilage oligomeric matrix protein                                                                                                                   | Expressed in developing teeth                                                                                                                                                                                |               |                  |
| MMP-21                       |                                                                                                                                                                             | Unknown                                                                                                                                                                                                      |               |                  |
| MMP-22                       |                                                                                                                                                                             | Unknown                                                                                                                                                                                                      |               |                  |
| MMP-23 (CA-MMP)              |                                                                                                                                                                             | Unknown                                                                                                                                                                                                      |               |                  |
| MMP-26 (endometase)          |                                                                                                                                                                             | Expressed by migrating keratinocytes during cutaneous wound healing                                                                                                                                          |               |                  |
| MMP-27                       |                                                                                                                                                                             | Unknown                                                                                                                                                                                                      |               |                  |
| MMP-28 (epilysin)            | Casein                                                                                                                                                                      | Expressed by a distal intact population of keratinocytes during wound healing                                                                                                                                |               |                  |

Adapted from Chen and Parks<sup>1</sup> and Zhang and Nothnack.<sup>2</sup>  
MMP, matrix metalloproteinase; MT, membrane type.

**Εικόνα Ε.14 :** Οι μεταλλοπρωτεάσες της εξωκυττάριας μήτρας των θηλαστικών και ο ρόλος τους στην επούλωση πληγών (Caley M., et al., 2014)

## **Ο Ρόλος των Αναστολέων των Μεταλλοπρωτεϊνών στην Επουλωτική Διαδικασία**

Οι αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών (ή αλλιώς TIMPs), ανήκουν σε μία οικογένεια πρωτεϊνών στην οποία περιλαμβάνονται οι TIMP1, TIMP2, TIMP3 και TIMP4. Εκκρίνονται από πολλούς τύπους κυττάρων και βρίσκονται σε αφθονία στους ιστούς. Η έκφραση των MMP και των TIMP είναι αλληλοεξαρτώμενη και πρέπει να ρυθμίζονται συντονισμένα για να οδηγήσουν στο τελικό επιθυμητό αποτέλεσμα, την φυσιολογική επούλωση του τραυματισμένου ιστού. Είναι πιθανό η έκκρισή τους να εξαρτάται από το φλεγμονώδες ερέθισμα. Η συντονισμένη δράση τους μάλλον βοηθάει στο περιορισμό του τραυματισμένου ιστού κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής φάσης αναδιαμόρφωσης που σχετίζεται με τη φλεγμονή ενώ η μη συντονισμένη δράση τους, ενδεχομένως οδηγεί σε πούλωση και τελικώς σε τραυματισμό περαιτέρω του ιστού (Steve D. Shapiro. 2009).

Πιο συγκεκριμένα, και οι τέσσερις αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών έχουν διάφορες δράσεις ως προς τη ρύθμιση των MMPs στα διάφορα στάδια της επουλωτικής διαδικασίας. Όσον αφορά τη φάση της φλεγμονής, ο TIMP-3 είναι ένας από τους πρωταρχικούς αναστολείς του ADAM-17, και έχει αναπόσπαστο ρόλο στη ρύθμιση της φλεγμονής (Amour et al., 1998). Ο θεμελιώδης ρόλος του στον έλεγχο της φλεγμονώδους απόκρισης γίνεται μέσω της ρύθμισης του σηματοδοτικού μονοπατιού του TNF-α. Εκτός του TIMP-3 και οι υπόλοιποι αναστολείς έχει δείχθει πως συμμετέχουν στη φάση της φλεγμονής. Ειδικότερα, για τον TIMP-1, σε μελέτη των Kim και συνεργατών του το 2005 παρατηρήθηκε η αυξημένη παραγωγή του και δράση του στη φλεγμονώδη απόκριση των κυττάρων τραυματισμένου ιστού πνεύμονα. Σε γενικές γραμμές, οι αναστολείς μεταλλοπρωτεϊνών, ιδιαίτερα ο TIMP-3, απαιτούνται για τη ρύθμιση της φλεγμονώδους απόκρισης μέσω του ελέγχου της σηματοδότησης των κυτοκινών και την επεξεργασία των υποδοχέων φλεγμονώδους κυτταρικής προσκόλλησης (Gills S. & Parks W., 2008). Σχετικά με τη φάση επιδιόρθωσης του τραυματισμένου ιστού, η ικανότητα των αναστολέων των μεταλλοπρωτεϊνών να ρυθμίζουν τη δραστηριότητα των MMPs υποδηλώνει ότι είναι σημαντικές σε όλες τις πτυχές της επιδιόρθωσης των πληγών, ιδιαίτερα της κυτταρικής μετανάστευσης, προφανώς περιορίζοντας τη δραστηριότητα των ειδικών MMPs που συμμετέχουν στα συγκεκριμένα στάδια. Ο TIMP-1 επάγεται κατά τη διάρκεια της επανεπιθηλίωσης, και τα υπερβολικά επίπεδα αυτού του αναστολέα μπορεί να συνεπάγονται μειωμένη μετανάστευση των επιθηλιακών κυττάρων (Chen et al., 2006). Ο TIMP-2 έχει δείχθει ότι επιταχύνει τη μετανάστευση των κερατινοκυττάρων σε καλλιέργειες κυττάρων, καθώς επίσης και σε *in vivo* πειράματα (Terasaki, Kanzaki, Aoki, Iwata & Saiki, 2003). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι οι TIMPs έχουν ανεξάρτητες δράσεις από τις MMPs (Baker et al., 2002), όπως επεξηγείται από τον TIMP-3 και την πιθανή ισχυρή αναστολή στην

αγγειογένεσης που επάγει (Qi et al., 2003). Οι Qi και οι συνεργάτες τους απέδειξαν, επίσης, ότι ο TIMP-3 δεσμεύεται απευθείας στον υποδοχέα του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα 2 (VEGFR) και αναστέλλει την αλληλεπίδραση του με τον αυξητικό παράγοντα VEGF και την επακόλουθη ενδοκυτταρική σηματοδότηση που απαιτείται για τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και την αγγειογένεση (Qi et al., 2003). Τέλος, στη φάση αναδιαμόρφωσης, οι αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών παίζουν σημαντικό ρόλο στη συστολή που υφίσταται η εκάστοτε πληγή. Η ανακατασκευή του κολλαγόνου μπορεί να ρυθμιστεί μερικώς από το TIMP-3 (Gills S. & Parks W., 2008). Η αναδιαμόρφωση του κολλαγόνου και της φιμπρονεκτίνης τροποποιείται απουσία του TIMP-3 γεγονός που υποδεικνύει ότι ο TIMP-3 και η ικανότητά του να αναστέλλει τη δράση των μεταλλοπρωτεϊνών είναι απαραίτητοι για τη διατήρηση της φυσιολογικής σύνθεσης της ECM. Καταλήγοντας, στοιχεία από πειράματα απώλειας ή/και κέρδους λειτουργίας δείχνουν τον σημαντικό ρόλο που έχουν οι αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών στη ρύθμιση της αναδιάταξης της εξωκυττάριας μήτρας.

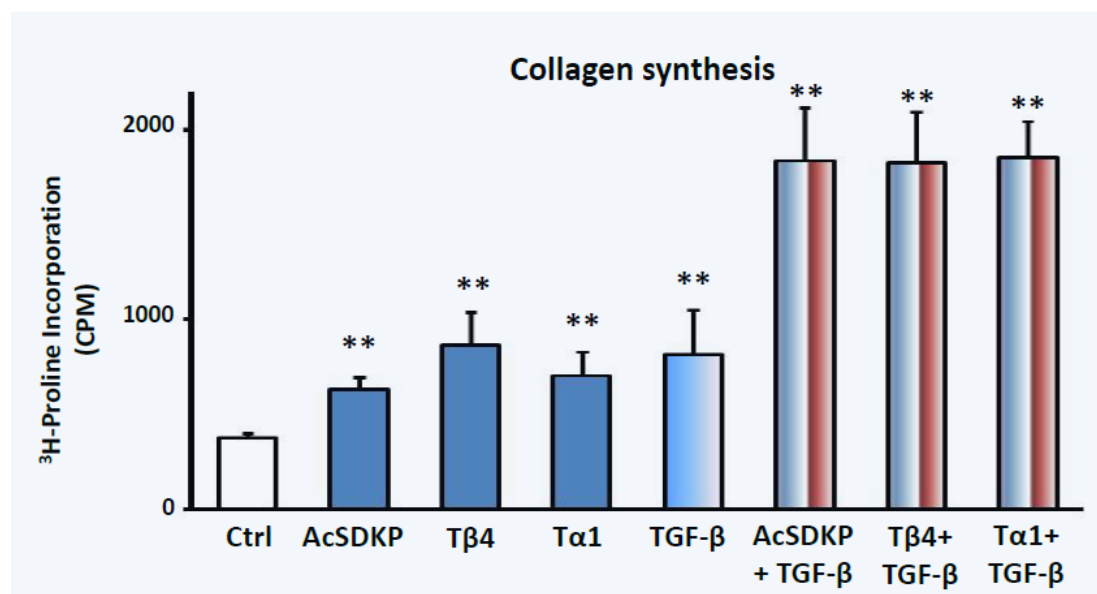
Σε γενικές γραμμές, η μη φυσιολογική συγκέντρωση και σύσταση των ιστών με μεταλλοπρωτεϊνάσες μήτρας είναι χαρακτηριστικό διαφόρων παθολογικών καταστάσεων ή/και μπορεί να οδηγήσει σε μη φυσιολογική επουλωτική διαδικασία. Χρόνιες πληγές, συμπεριλαμβανομένων των πληγών υπό πίεση, τα φλεβικά έλκη και τα διαβητικά έλκη, αποτελούν σημαντικό κλινικό πρόβλημα με σημαντική νοσηρότητα και κοινωνικοοικονομικές συνέπειες. Ο έλεγχος της έκκρισης και των τελικών επιπέδων MMPs στις πληγές θα μπορούσε να έχει ως επιθυμητό αποτέλεσμα τη βελτιωμένη επούλωσή τους.

Στη συνέχεια ακολουθεί σχετική επεξήγηση των πειραματικών μεθόδων που εκπονήθηκαν στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, σύνοψη των αποτελεσμάτων και συμπερασματική ανάλυσή τους.

## ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπό της παρούσας διπλωματικής πειραματικής εργασίας αποτέλεσε η μελέτη και αξιολόγηση της δράσης των ενδογενώς απαντούμενων θυμοσινικών πεπτιδίων Τα1, Τβ4 και του αμινοτελικού τετραπεπτιδίου Ac-SDKP σε *in vitro* συστήματα ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών όσον αφορά διεργασίες σχετιζόμενες με την δερματική επουλωτική διαδικασία. Η επιλογή των ανθρώπινων δερματικών ινοβλάστων ως μοντέλο των *in vitro* δοκιμασιών έγινε με βάση το γεγονός ότι α) η δερματική επούλωση στον άνθρωπο εμφανίζει σημαντικές διαφορές σε σχέση με άλλα θηλαστικά και ιδιαίτερα με τα τρωκτικά (Wong, 2011) και β) οι ινοβλάστες είναι τα κύτταρα του χορίου που συμμετέχουν με ποικίλους μηχανισμούς σε διάφορα στάδια της επουλωτικής διαδικασίας -κυρίως μέσω της δυνατότητάς τους να παράγουν κολλαγόνο, μια από τις σημαντικότερες πρωτεΐνες της εξωκυττάριας μήτρας (Eckes, 2000).

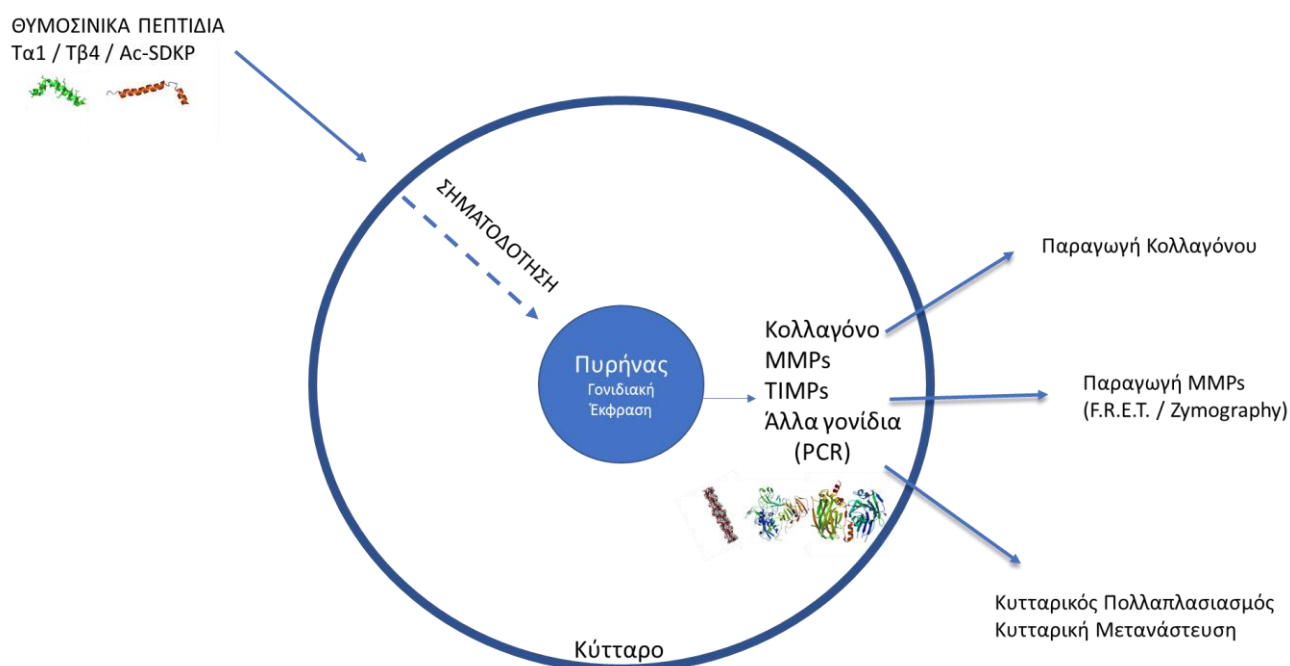
Αφετηρία της μελέτης μας αποτέλεσαν υπάρχοντα δεδομένα από παλαιότερη διπλωματική εργασία (Κικίδου 2018). Όπως φαίνεται στην Εικόνα Ε, και τα τρία ανωτέρω θυμοσινικά πεπτίδια επάγουν τη σύνθεση κολλαγόνου από ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες σε επίπεδο αντίστοιχο με την επαγωγή από τον αυξητικό παράγοντα TGF-β (γνωστό ισχυρό επαγωγέα της σύνθεσης εξωκυττάριας μήτρας) και περαιτέρω, κατά την ταυτόχρονη χορήγησή τους με τον παράγοντα αυτόν εμφανίζουν ακόμα πιο έντονη (αθροιστική) επαγωγή.



**Εικόνα Ε.15:** Διάγραμμα ενσωμάτωσης τριτιωμένης προλίνης στο υπερκείμενο καλλιεργειών ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών υπό την επίδραση θυμοσινικών

πεπτιδίων ή/και TGF- $\beta$  (προσαρμογή από τα αποτελέσματα της μεταπτυχιακής εργασίας της Κικκίδου Λένας, 2018). Χρησιμοποιήθηκε το κυτταρικό στέλεχος AG01523, συγκεντρώσεις 1 nM θυμοσινικών πεπτιδίων, 5 ng/ml TGF- $\beta$  και ακολουθήθηκε η μέθοδος της ελεύθερης πρωτεασών κολλαγενάσης (Κικκίδου 2018).

Στην παρούσα εργασία ερευνήθηκε σε μεταγραφικό επίπεδο η επίδραση των Τα1, Τβ4 και Ac-SDKP στην έκφραση γονιδίων απαραίτητων για την επούλωση όπως είναι το κολλαγόνο καθώς και γονιδίων που σχετίζονται με την αποικοδόμηση του κολλαγόνου, όπως είναι οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs) καθώς και οι αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών (TIMPs). Επίσης, έγινε προσπάθεια μελέτης της έκκρισης των MMPs καθώς και της ενεργότητάς τους έπειτα από την επίδραση με τα θυμοσινικά πεπτίδια. Επιπλέον, μελετήθηκε ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η κυτταρική μετανάστευση των ινοβλαστών μετά την επίδραση με τις θυμοσίνες, σε συγκεντρώσεις μη τοξικές προς τα κύτταρα. Τέλος διερευνήθηκαν μονοπάτια ενδοκυτταρικής σηματοδότησης που διεγείρονται από τα θυμοσινικά πεπτίδια στις καλλιέργειες ανθρωπίνων δερματικών ινοβλαστών και πιθανόν να ενέχονται στις ανωτέρω επουλωτικές διεργασίες (κολλαγονοσύνθεση, πολλαπλασιασμό, μετανάστευση).



**Σχήμα 1:** ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ ΚΑΤΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΘΥΜΟΣΙΝΙΚΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΕΠΙ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΔΕΡΜΑΤΙΚΩΝ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ

Στη συνέχεια ακολουθούν η σχετική εξήγηση των πειραματικών μεθόδων που εκπονήθηκαν και του εξοπλισμού που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή των πειραμάτων της εν λόγω διπλωματικής εργασίας καθώς επίσης και σύνοψη των αποτελεσμάτων και ανάλυση των συμπερασμάτων από αυτά.

## ***ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.***

**ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΥΛΙΚΑ**

|                                                                                                             |                                        |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| Ανθρώπινοι δερματικοί Ινοβλάστες<br>AG01523 / GM21808                                                       | Coriell Institute for Medical Research |
| DMEM, high glucose                                                                                          | GIBCO, Invitrogen                      |
| Εμβρυϊκός βόειος ορός                                                                                       | GIBCO                                  |
| Διάλυμα αντιβιοτικών πενικιλίνης /<br>στρεπτομυκίνης                                                        | INVITROGEN                             |
| Πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM                                                                                  | GIBCO                                  |
| Θρεπτικό μέσο για την καλλιέργεια των<br>κυττάρων DMEM                                                      | GIBCO                                  |
| Πολυκλωνικά αντισώματα κουνελιού                                                                            | Cell Signaling Technology              |
| Διάλυμα Τρυψίνης-EDTA                                                                                       | GIBCO                                  |
| Μονοκλωνικά αντίσωματα ποντικού                                                                             | BD Transduction Laboratories           |
| FBS                                                                                                         | GIBCO<br>10106-169                     |
| Ρυθμιστικό διάλυμα PBS                                                                                      | GIBCO                                  |
| Phosphatase Inhibitor cocktail 2 και<br>Phosphatase Inhibitor Cocktail 3 και Protease<br>Inhibitor Cocktail | Sigma                                  |
| DMSO                                                                                                        | Sigma                                  |
| Ακρυλαμίδιο                                                                                                 | Sigma                                  |
| Tris(2-hydroxymethyl-2methyl-1,3-<br>propanediol)                                                           | Sigma                                  |
| SDS (sodium dodecyl sulfate or sodium<br>lauryl sulfate)                                                    | Sigma                                  |
| TEMED                                                                                                       | Sigma                                  |
| Ammonium persulfate (APS)                                                                                   | Sigma                                  |
| Γλυκερόλη                                                                                                   | Sigma                                  |

|                                                                    |                               |
|--------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
|                                                                    |                               |
| Μπλε της Βρωμοφαινόλης                                             | Sigma                         |
| Υδροχλωρικό οξύ (HCl)                                              | APPLICHEM                     |
| qPCRBIO SyGreen Mix Lo-ROX                                         | PCR Biosystems Ltd            |
| Εκκινητές RT-PCR                                                   | PREMIER Biosoft International |
| Μεμβράνη Polyvinylidene PVDF                                       | Amersham Biosciences          |
| Μεθανόλη                                                           | Sigma                         |
| Γλυκίνη                                                            | Sigma                         |
| Tris-base                                                          | Sigma                         |
| Μιας χρήσης tips για μικροπιπέττες                                 | ANTI-CELL A.E.                |
| Μικρό γυάλινο ή πλαστικό δοχείο με καπάκι<br>(π.χ. 12 x 16 x 3 εκ) | ANTI-CELL A.E.                |
| Πλαστικά σωληνάρια τύπου Eppendorf                                 | ANTI-CELL A.E.                |
| Αποστειρωμένα σιφόνια 1, 5, 10 και 25 ml                           | ANTI-CELL A.E.                |
| Γυάλινες αποστειρωμένες πιπέτες Pasteur<br>(για αναρροφήσεις)      | ANTI-CELL A.E.                |
| Σωληνάρια τύπου Falcon χωρητικότητας 15 ml                         | ANTI-CELL A.E.                |
| Σύριγγα                                                            | ANTI-CELL A.E.                |
| Φύλτρο                                                             | ANTI-CELL A.E.                |
| 6 well-plates /12 well-plates / 24 well-plates                     | COSTAR                        |
| Σύστημα χημειοφωτάυγειας (ECL)                                     | GE-Healthcare                 |
| Τριζόλη                                                            | ThermoFisher Scientific       |

|                                  |                |
|----------------------------------|----------------|
|                                  |                |
| Χρωστική Coomassie Blue R-250    | Sigma          |
| 0,1% TWEEN                       | Sigma          |
| Διάλυμα μονομοποίησης (fix)      | AGFA           |
| Σωληνάρια των 15 ml τύπου Falcon | ANTI-CELL A.E. |
| Φορμαλεδεύδη                     | Sigma          |
| kit PrimeScript RT Reagent       | Takara         |

**ΜΗ ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΥΛΙΚΑ**

|                                                                                                             |                              |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| Θάλαμος νηματικής ροής Safeflow 1.8                                                                         | Bioair Instruments           |
| Αυτόματες πιπέτες                                                                                           | ANTI-CELL A.E.               |
| Υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 37 °C                                                                          | BIOLINE SCIENTIFIC CO. LTD   |
| Ψυχώμενη φυγόκεντρος (swing-rotor)                                                                          | ANTI-CELL A.E.               |
| Nanodrop                                                                                                    | THERMO SCIENTIFIC            |
| Επώαστικός θάλαμος με αυτόματη ρύθμιση θερμοκρασίας και διοξειδίου του άνθρακα (CO <sub>2</sub> ) και 37 °C | Thermo Forma                 |
| Αυτόματος αναρροφητής                                                                                       | BIORAD ELABORATORIES         |
| LAS-4000                                                                                                    | G.E. Healthcare Life Science |
| Καταμετρητής κυττάρων (hand tally counter)                                                                  | ANTI-CELL A.E.               |
| Σωματιδιακλος Αναλυτής                                                                                      | Beckman Coulter              |
| Οπτικό μικροσκόπιο                                                                                          | BIORAD ELABORATORIES         |
| Θερμαινόμενη πλάκα                                                                                          | Stuart Scientific            |

|                                                                                 |                                                                                                                                                             |
|---------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Συσκευή παραγωγής υπερήχων Sonicator                                            | MSE Ltd (London, UK).                                                                                                                                       |
| Αναδευτήρας Vortex-Gen2                                                         | Scientific Industries Inc. (NY, USA)                                                                                                                        |
| Αναδευτήρας πλακών πολλαπλών θέσεων<br>Heidolph Titramax 1000                   | Heidolph Instruments GmbH & CO. KG<br>(Schwabach, Germany).                                                                                                 |
| Όργανο μέτρησης ολικού αριθμού κυττάρων<br>Beckman Coulter Counter              | Beckman Coulter                                                                                                                                             |
| Ζυγός ακριβείας                                                                 | Mettler Toledo                                                                                                                                              |
| Φωτομετρητής πλάκας πολλαπλών θέσεων<br>Fluostar Optima microplate reader       | BMG Labtechnologies (Offenburg,<br>Germany)                                                                                                                 |
| Κλίβανος επώασης κυτταροκαλλιιεργειών                                           | Thermo Forma Series II                                                                                                                                      |
| Συσκευή μίνι πήγματος                                                           | BIORADELABORATORIES                                                                                                                                         |
| Θερμικός κυκλοποιητής PCR<br>πραγματικού χρόνου Mx 3000P QPCR<br>Systems Cyclor | (Stratagene, La Jolla, USA).                                                                                                                                |
| Φυγόκεντροι HERMLE Z233 M-2                                                     | Labnet Int.(NY,USA), BHG Fixette από τη<br>Hermle Labortechnik GmbH (Wehingen,<br>Germany) και HARRIER 18/80 Refrigerated<br>από τη MSE, SANYO (London, UK) |
| Συσκευή ηλεκτροφόρησης                                                          | Pharmacia Biotech                                                                                                                                           |
| Συσκευή ηλεκτρομεταφοράς                                                        | Hoefer Inc                                                                                                                                                  |
| Τροφοδοτικό ισχύος (ισχύος 200 V, 500<br>mA)                                    | Pharmacia Biotech                                                                                                                                           |
| Συσκευή φυγοκέντρωσης Eppendorf                                                 | ANTI-CELL A.E.                                                                                                                                              |
| Αναδευτήρας                                                                     | ANTI-CELL A.E.                                                                                                                                              |

## **ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΔΙΕΞΑΓΩΓΗΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ**

Όλες οι διεργασίες επιτελέστηκαν σε άσηπτο περιβάλλον, μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής για την αποφυγή μολύνσεων. Κάθε φορά πριν την έναρξη οποιασδήποτε διαδικασίας ανάβει η λάμπα UV και ο αερισμός στην υψηλή σκάλα για μισή ώρα ώστε να απολυμανθεί πλήρως το περιβάλλον και να γίνει αποστείρωση του χώρου εργασίας (θαλάμου) μέσα στο οποίο θα εκτελεστεί το πείραμα. Στη συνέχεια, τοποθετούνται τα πειραματικά εργαλεία που θα χρειαστούν μέσα στο θάλαμο ώστε να απολυμανθούν και αυτά εξίσου. Επιπλέον όλες οι επιφάνειες στο χώρο πειραματισμού εκπλένονται με αιθανόλη 70% v/v. Η συγκεκριμένη διαδικασία επαναλαμβάνεται στην έναρξη κάθε πειραματικού χειρισμού της ημέρας. Προτού γίνει οποιαδήποτε ενέργεια πάνω στα κύτταρα ελέγχουμε για πιθανές μολύνσεις τους. Αν υπάρξουν, η διαδικασία επαναλαμβάνεται από την αρχή σε οποιοδήποτε βήμα. Επιπλέον, τα αναλώσιμα και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για τη διεξαγωγή των πειραμάτων είναι αποστειρωμένα και φυλασσόμενα στις κατάλληλες θερμοκρασιακές συνθήκες που ορίζει ο κατασκευαστής τους.

### **Επιλογή Κυτταρικής Σειράς**

Για τη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά στελέχη ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών, AG01523 και GM21808 από το Coriell Institute for Medical Research. Οι συγκεκριμένοι δερματικοί ινοβλάστες προέρχονται από πρωτογενή καλλιέργεια κυττάρων από αρσενικό άτομο 46 X,Y και έχουν ψυχθεί στο πέραςμα 6 και 4 αντιστοίχως. Η επιλογή του συγκεκριμένου κυτταρικού στελέχους έγινε λόγω της προϋπάρχουσας εκτεταμένης εμπειρίας του εργαστηρίου στη χρήση των κυττάρων αυτών στις πειραματικές διαδικασίες που προέβλεπε ο σχεδιασμός της παρούσας εργασίας. Γενικότερα η επιλογή του κυτταρικού τύπου βασίσθηκε στο ότι οι δερματικοί ινοβλάστες είναι από τους σημαντικότερους κυτταρικούς τύπους που συμμετέχουν στα πιο καίρια σημεία της επουλωτικής διαδικασίας. Αποτελούν κύτταρα παραγωγής κολλαγόνου και άλλων πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ύλης, απαραίτητα συστατικά για την ομαλή και σωστή επούλωση της ουλής, ενώ ταυτόχρονα ενεργοποιούνται και προσελκύονται στα σημεία της πληγής από τα διάφορα χημειοτακτικά μόρια παράγωγα των αιμοπεταλίων, όπως ο TGF-β και ο PDGF. Τα συγκεκριμένα μόρια και η αλληλεπίδραση τους με τους δερματικούς ινοβλάστες στα διαφορετικά ερεθίσματα απασχόλησαν και την παρούσα διπλωματική μελέτη. Τέλος, ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των ινοβλαστών είναι η ικανότητα, παρουσία του TGF-β, αλλαγής του φαινότυπού τους σε μυοϊνοβλάστες, οι οποίοι παράγουν την πρωτεΐνη α-SMA (α-Smooth

Muscle Actin) και ευθύνονται για την συστολή του τραύματος κατά το τελικό στάδιο της επούλωσης (Menke et al., 2006; Reinke et al., 2012).

### **Θυμοσινικά Πεπτίδια**

Όλα τα πεπτίδια που χρησιμοποιήθηκαν στη διεξαγωγή των πειραμάτων ήταν εμπορικά διαθέσιμα.

#### **➤ Θυμοσίνη Τα1**

BACHEM

Thymosin α1 acetate salt

Catalog No.: H 77561000

Product No.: 40958781000

Lot No.: 1073413

M.W.: 310832

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, η θυμοσίνη α1 παράγεται ως θραύσμα 28 αμινοξέων, από ένα μακρύτερο πρόδρομο 113 αμινοξέων, την προθυμοσίνη α. Πρόκειται για ένα πεπτιδικό θραύσμα που προέρχεται από την προθυμοσίνη άλφα. Έχει θεωρηθεί ότι προκύπτει από ενδοκυτταρική πρωτεόλυση του πρόδρομου πολυπεπτιδίου της προθυμοσίνης άλφα μέσω της δράσης μιας ασπαραγινυλο-ενδοπεπτιδάσης. Το άμινο-τελικό άκρο της Τα1 είναι ακετυλιωμένο. Παρουσία οργανικών διαλυτών (π.χ. φθοριωμένων αλκοολών) η δομή της Τα1 είναι μορφή α'- έλικας μεταξύ των αμινοξέων 14 και 26 ενώ επικρατεί η τυχαία διαμόρφωση σε υδατικό περιβάλλον. Η Τα1 έχει πολλές διαφορετικές δραστηριότητες τροποποιητή ως βιολογική απάντηση στο ανοσοποιητικό σύστημα (Oates k. et al., 1995). Μελέτες σχετικά με το συγκεκριμένο μόριο έχουν δείξει το βασικό του ρόλο ως ανοσοτροποποιητικός παράγοντας, παράγοντας αντοχής σε μυκοβακτηρίδια, μύκητες και ιούς, καθώς επίσης και την ενεργή συμμετοχή του σε διεργασίες εκτός του ανοσοποιητικού συστήματος όπως η κυτταρική διαφοροποίηση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η απόπτωση (Enrico Garaci, 2007). Λίγες αποτελούν οι βιβλιογραφικές μελέτες συγκριτικά με την επωφελή δράση του συγκεκριμένου θυμοσινικού μορίου στη δερματική επουλωτική διαδικασία.

➤ Θυμοσίνη Tβ4

BACHEM

Thymosin β<sub>4</sub> (human, bovine, horse, rat) acetate salt

Catalog No: H 2608 0001

Product No: 40430200001

LotNo: 1056566

M.W.: 4963.51

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, η θυμοσίνη β<sub>4</sub> αποτελείται από 43 αμινοξέα. Πρόκειται για ένα από τα πιο ευρέως απαντώμεθα μόρια συγκριτικά με τα υπόλοιπα θυμοσινικά πεπτίδια καθώς βρίσκεται σε όλα τα κυτταρικά συμπλέγματα πλην των ερυθροκυττάρων με μεγαλύτερη αναλογία παρακρινικά στο κυτταρόπλασμα αλλά έχει βρεθεί και στον πυρήνα . Όπως και στην Τα1 Το αμινο-τελικό άκρο της είναι ακετυλιωμένο. Επίσης, παρουσία οργανικών διαλυτών (π.χ. φθοριωμένων αλκοολών) η δομή της Tβ<sub>4</sub> είναι μορφής α' - έλικας μεταξύ των αμινοξέων στις θέσεις 4-16 και 30-40 ενώ επικρατεί η τυχαία διαμόρφωση σε υδατικό περιβάλλον. Βασική ιδιότητα της είναι να δεσμεύεται στα μονομερή G-ακτίνης μη επιτρέποντας τον πολυμερισμό σε F ακτίνη. Από τις κύριες λειτουργίες του συγκεκριμένου φυσικά απαντημένου πεπτιδίου αποτελεί ο ρόλος της ως αγγειογενετικός παράγοντας και η συμμετοχή του στην κυτταρική διαφοροποίηση και μετανάστευση, διαφόρων κυττάρων, δρώντας ως χημειοτακτικός η μη παράγοντας (Malinda K., et al., 1999). Επιπλέον, μειώνει τον αριθμό των μυοϊνοβλάστες στα τραύματα, με αποτέλεσμα τον μειωμένο σχηματισμό ουλής και την ίνωση καθώς επίσης, διαδραματίζει ζωτικό ρόλο στην αποκατάσταση και αναγέννηση των τραυματισμένων κυττάρων και ιστών (Goldstein A., et al., 2012). Λόγω των συγκεκριμένων χαρακτηριστικών, η δράση της Tβ<sub>4</sub> στα διάφορα στάδια της επουλωτικής διαδικασίας είναι αρκετά μελετημένη βιβλιογραφικά.

➤ Θυμοσινικό Τετραπεπτίδιο Ac-SDKP

BACHEM

Catalog number: H-1156.0005

Product number: 4016348.0005

Product: Ac- Ser- Asp- Lys- Pro- OH

Molecular formula: C<sub>20</sub>H<sub>33</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub>

Relative molecular mass: 487.51

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, το Ac-SDKP αποτελεί το αμινοτελικό τετραπεπτίδιο της θυμοσίνης Τβ4 με αλληλουχία αμινοξέων acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro-OH. Το ενδογενές τετραπεπτίδιο, που απαντάται κανονικά σε διάφορα όργανα και βιολογικά υγρά, παράγεται από τη δράση του ενζύμου προλυλο-ολιγοπεπτιδάση (P0P), μιας πρωτεάσης σερίνης, που διασπά πεπτιδικούς δεσμούς μετά από το αμινοξύ προλίνη (Conte E., et al., 2016). Απαραίτητη διαδικασία για τη δράση του ενζύμου είναι η διάσπαση της Τβ4 σε μικρότερα πεπτίδια παρουσία του ενζύμου Μεπρίνη-α προηγουμένως. Επίσης, το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης (ΜΕΑ) βιοαποικοδομεί το Ac-SDKP μέσω υδρόλυσης. Όπως και η Τβ4 από την οποία προέρχεται το τετραπεπτίδιο, συμμετέχει ενεργά με διάφορες διαφορετικές λειτουργίες στην δερματική επουλωτική διαδικασία καθώς και αυτό εμφανίζει δράσεις αγγειογενετικού παράγοντα λαμβάνοντας χώρα ενεργά στη φάση της αναγέννησης ενώ ταυτόχρονα επάγει τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση κυττάρων ενώ εμφανίζει αντι-ινωτική δράση σε διάφορους ιστούς. Οι βιβλιογραφικές μελέτες σχετικά με τη δράση του τετραπεπτιδίου στην διαδικασία της επούλωσης δεν είναι τόσο εκτενείς συγκριτικά με τη θυμοσίνη Τβ4.

## **ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ**

### **Υλικά και Εξοπλισμός**

- Ανθρώπινοι δερματικοί ινοβλάστες GM 21808
- Ανθρώπινοι δερματικοί ινοβλάστες AG 01523c
- Θρεπτικό υλικό DMEM (Dulbeco's Minimal Essential Medium), αντιβιοτικά πενικιλίνη (10.000 U/L) και στρεπτομυκίνη (10.000 µg/L), L-γλουταμίνη (4 mM), πυροσταφυλικό οξύ (1 mM) και διττανθρακικό νάτριο
- Εμβρυϊκός βόειος ορός (Fetal Bovine Serum, FBS)
- Θρυψίνη (0,25% (w/v) θρυψίνης, 10 mM κιτρικού νατρίου, 110 mM χλωριούχου νατρίου pH 7,2)

- Πλάκες κυτταροκαλλιέργειών πολλαπλών θέσεων, Greiner
- Σωματιδιακός αναλυτής
- Επωαστικός κλίβανος CO<sub>2</sub>
- Εστία νηματικής ροής
- Ανάστροφο μικροσκόπιο

Η καλλιέργεια των κυττάρων έγινε σε πλήρες θρεπτικό υλικό υψηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη 4,5g/L (5,5mM) παρουσία των αντιβιοτικών πενικιλίνης και στρεπτομυκίνης (1% διάλυμα: 100IU/ml penicillin, 100μg/ml streptomycin), 10%v/v ορού εμβρύου βοός (fetal bovine serum, FBS) και 2mM γλουταμίνη. Η προσθήκη των αντιβιοτικών και του ορού στο θρεπτικό μέσο γίνεται σε άσηπτες συνθήκες. Για τον ορό εμβρύου βόου (fetal bovine serum, FBS) κάνουμε Heat inactivation και μοιράζεται σε σωληνάρια τύπου falcon χωρητικότητας 50ml για αποφυγή επιμέρους μολύνσεων του αρχικού ορού. Μετά τη παραγωγή του το θρεπτικό υλικό φυλάσσεται και συντηρείται στο ψυγείο στους 4°C για περίπου 3-4 εβδομάδες. Για να χρησιμοποιηθεί στις κυτταροκαλλιέργειες πρέπει να έχει θερμοκρασία δωματίου επομένως πριν από κάθε χρήση πρέπει να παραμείνει μισή ώρα σε υδατόλουτρο για να φθάσει στην κατάλληλη θερμοκρασία. Η διατήρηση των κυττάρων έγινε σε πλαστικά τρυβλία Petri 100mm με επώασή τους σε επωαστικό θάλαμο θερμοκρασίας 37 °C, 5%CO<sub>2</sub> και υγρασία 95%.

Το FBS περιέχει όλα τα απαραίτητα συστατικά που χρειάζονται τα κύτταρα για να επιβιώσουν και να πολλαπλασιασθούν (για παράδειγμα αυξητικούς παράγοντες όπως οι PDGF, FGF, EGF, IGF, ορμόνες όπως ινσουλίνη, αναπτυξιακή ορμόνη, υδροκορτιζόνη) και ταυτόχρονα αυξάνει το ιξώδες του μέσου που προστατεύει τα κύτταρα από μηχανικές βλάβες κατά την ανάδευση της καλλιέργειας και αποτελεί τη βασική πηγή αναστολέων πρωτεασών (π.χ. α1-αντιθρυψίνη) και βασικών θρεπτικών συστατικών (π.χ. αμινοξέα, νουκλεοτίδια, γλυκόζη κ.α.). Επίσης, περιέχει πρωτεΐνες όπως αλβουμίνη (για μεταφορά λιπιδίων, βιταμινών, ορμονών) και φιβρονεκτίνη που προωθεί τη συγκόλληση των κυττάρων στο υπόστρωμα.

## 1) Ξεπάγωμα Κυττάρων από Υγρό Άζωτο

### Πειραματική Διαδικασία

- Μετακίνηση “κρυοφυαλιδίου” από υγρό άζωτο με συγκεκριμένο στέλεχος κυττάρων και τοποθέτηση σε υδατόλουτρο για να ξεπαγώσει
- Επίστρωση κυττάρων σε ανάλογη φλάσκα με εκείνη που ήταν πριν παγώσουν
- Προσθήκη θρεπτικού υλικού, FBS και επιλεγμένα κύτταρα με DMSO
- Παρατήρηση κύτταρων σε μικροσκόπιο για τη μορφή τους
- Τοποθέτηση φλασκών σε επωαστικό κλίβανο (37C, 5%CO<sub>2</sub>, υγρασία 95%)
- Αλλαγή θρεπτικού υλικού με 1,5% FBS μετά από 24h.
- Επώαση φλάσκας σε επωαστικό κλίβανο με CO<sub>2</sub> 5%, 37 C και υγρασία 95% για 3 ημέρες, ώστε να βρίσκονται σε φάση ανάπτυξης και ποσοστό συρροής 80-90% για να μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν σε in vitro δοκιμασία, να ανακαλλιεργηθούν ή να καταψυχτούν (Πρατσίνης, 1988).

## 2) Ανακαλλιέργεια Κυττάρων

### Πειραματική Διαδικασία

- Μικροσκόπηση κυττάρων για παρατήρηση ευζωίας και συρροής σε επίπεδο 90%
- Αφαίρεση θρεπτικού υλικού σε θάλαμο νηματικής ροής
- Προσθήκη θρυψίνης, ανακίνηση φλάσκας και απορρόφησή της
- Προσθήκη εκ νέου ποσότητα θρυψίνης και επώαση σε κλίβανο με CO<sub>2</sub> 5%, 37 °C και υγρασία 95% για 1-2’
- Παρατήρηση κυττάρων σε μικροσκόπιο για θρυψινοποίησή τους και μηχανική ανατάραξη της φλάσκας που βοηθάει σε αποκόλληση των κυττάρων από το τοίχωμα
- Προσθήκη θρεπτικού υλικού με ορό (FBS) στη φλάσκα και συνεχείς εκπλύσεις του τοιχώματος της φιάλης ώστε να ισοκατανεμηθούν τα κύτταρα στο διάλυμα
- Διαχωρισμός κυττάρων σε 2 νέες φλάσκες από ίση ποσότητα και τοποθέτησή τους σε επωαστικό κλίβανο με CO<sub>2</sub> 5%, 37°C και υγρασία 95%.

### **3) Συγχρονισμός Κυττάρων στη Φάση G0**

#### **Πειραματική Διαδικασία**

Ο συγχρονισμός της καλλιέργειας έχει σκοπό τον έλεγχο των συνθηκών της καλλιέργειας, αλλά και την λήψη ισοδύναμων μετρήσεων σε μελέτες διέγερσης σηματοδοτικών οδών από εξωγενείς παράγοντες, όπως της συγκεκριμένης μελέτης (Πρατσίνης, 1998). Φυσιολογικά τα συγκεκριμένα στελέχη κυττάρων με τα οποία εκπονήθηκε η διπλωματική μελέτη αναπτύσσονται σε DMEM /15% FBS (σύμφωνα με τον προμηθευτή). Ο ορός περιέχει αιμοπεταλιακούς αυξητικούς παράγοντες, οι οποίοι παρεμβαίνουν στη μελέτη κυτταρικών διεργασιών, οι οποίες ρυθμίζονται από διάφορους αυξητικούς παράγοντες (π.χ.: TGF- $\beta$ , PDGF), όπως δοκιμασίες κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ελέγχου τοξικότητας ή κολλαγονοσύνθεση. Γι' αυτό το λόγο, για να γίνει συγχρονισμός των κυττάρων στην φάση G0 του κυτταρικού τους κύκλου χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό DMEM / 0,1% FBS ώστε τα κύτταρα να βρίσκονται σε φάση ηρεμίας (G<sub>0</sub>).

### **4) Πάγωμα Κυττάρων σε Υγρό Άζωτο**

#### **Πειραματική Διαδικασία**

- Επιλογή κυττάρων που έχουν ανακαλλιεργηθεί σύντομα ώστε να είναι σε εκθετική φάση
- Ακολούθηση βημάτων ανακαλλιέργειας, αφήνοντας τα κύτταρα λιγότερη ώρα με τη θρυψίνη στον επωαστικό θάλαμο και κάνοντας λιγότερες αναδεύσεις στο τέλος (τα κύτταρα επειδή βρίσκονται σε φάση πολλαπλασιασμού είναι πιο αραιά και ξεκολλάνε με μεγαλύτερη ευκολία)
- Προσθήκη σε φλάσκα θρεπτικού υλικού με ορό (20-30%) και DMSO – κρυοπροστατευτικό σε cryovials
- Τοποθέτηση κυττάρων στους -20 °C για 1 ώρα και έπειτα στους -80 °C over night.
- Τοποθέτηση κυττάρων σε υγρό άζωτο.

## 5) Καταμέτρηση Κυττάρων με Σωματιδιακό Αναλυτή

Πριν την εναπόθεση των κυττάρων στα διάφορα well-plates στα οποία θα διεξαχθεί μετέπειτα το εκάστοτε πείραμα, σημαντική είναι η καταμέτρηση των κυττάρων αυτών ώστε να μην υπάρχουν μεγάλες αποκλείσεις ανάμεσα στα πηγαδάκια. Η καταμέτρηση των κυττάρων γίνεται σε σωματιδιακό αναλυτή Beckman Coulter Counter. Ο μετρητής Coulter αποτελεί μια συσκευή που έχει την δυνατότητα να καταμετρά κύτταρα που αιωρούνται σε ειδικά διαλύματα ηλεκτρολυτών. Ένας μετρητής Coulter συνήθως έχει έναν ή περισσότερους μικροδιαύλους, οι οποίοι χωρίζουν τους δυο θαλάμους με τα διαλύματα. Καθώς το κυτταρικό εναιώρημα έλκεται μέσω του μικροδιαύλου, κάθε κύτταρο προκαλεί σύντομη αλλαγή στην αγωγιμότητα του υγρού. Οι αλλαγές ανιχνεύονται από τον μετρητή με μια ηλεκτρική αντίσταση.

Στο ειδικό διάλυμα ηλεκτρολυτών είναι απαραίτητο να προστεθούν κύτταρα τα οποία είναι καλά επαναιωρημένα, χωρίς υπολείμματα και συσσωματώματα ώστε να γίνει σωστά η καταμέτρηση και να μην υπάρχουν σφάλματα στον αριθμό των κυττάρων. Ο συνολικός αριθμός των κυττάρων υπολογίζεται, λαμβάνοντας υπόψη τις αραιώσεις και ότι η ένδειξη του αναλυτή αφορά τον αριθμό των κυττάρων που περιέχονται σε συγκεκριμένο όγκο κυτταρικού εναιωρήματος (Coulter & Hogg, 1977). Τέλος, γίνεται μέτρηση των κυττάρων με αναγωγή σε Μέσο Όρο μετρήσεων.

## Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου παρουσία δωδεκυλοθειικού νατρίου (SDS-PAGE)

### Αρχή της Μεθόδου

Η ανάλυση των πρωτεϊνών έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων (SDS, DTT). Στόχος είναι η εύρεση ή όχι της φωσφορυλίωσης διαφόρων κομβικών πρωτεϊνών που συμμετέχουν στα βασικά σηματοδοτικά μονοπάτια της δερμικής επούλωσης ώστε να διαλευκανθεί ο ρόλος των θυμοσινικών πεπτιδίων που χρησιμοποιήσαμε σε κυτταρικό επίπεδο. Για να πραγματοποιηθεί αυτός ο προσδιορισμός πρέπει πρώτα να γίνει απομόνωση εκχυλισμάτων, διαχωρισμός των πρωτεϊνών του δείγματος με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση, ηλεκτρομεταφορά σε μεμβράνη νικτροκυτταρίνης ή PVDF (Polyvinylidene difluoride) και τέλος ανοσοστύπωμα Western με αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης-στόχου.

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή (gel) πολυακρυλαμίδης (Polyacrylamide gel electrophoresis ή PAGE), απουσία ή παρουσία θειϊκού δωδεκακυλικού νατρίου (sodium dodecyl sulphate ή SDS), αποτελεί πλέον μία από τις πιο σημαντικές βιοχημικές μεθόδους για τη μελέτη των πρωτεϊνών. Οι εφαρμογές της ποικίλουν καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό του μοριακού βάρους της πρωτεΐνης, την ανάλυση της καθαρότητας της πρωτεΐνης, για την επαλήθευση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης κ.α. Το SDS αποτελεί ένα ιοντικό απορρυπαντικό το οποίο δεσμεύεται σε πρωτεΐνες με σταθερή αναλογία βάρους (1,4gr SDS / gr πρωτεΐνης) και έχει την ικανότητα να προσδένεται στις υπό διαχωρισμό πρωτεΐνες και να τους προσδίδει ομοιόμορφο αρνητικό φορτίο, καλύπτοντας το φυσικό τους φορτίο. Επιπλέον, καταστρέφει τη δευτεροταγή και τεταρτοταγή δομή των πρωτεϊνών οδηγώντας στην αποδιάταξή τους, έτσι ώστε οι πρωτεΐνες να διαχωριστούν μόνο με βάση το μοριακό τους βάρος. Γι' αυτό το λόγο η προσθήκη ή όχι του SDS καθιστά τη μέθοδο μετουσιωτική ή όχι, αντίστοιχα. Η διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών από τους αναγωγικούς παράγοντες β-μερκαπτοαιθανόλη (β-ME) ή διθειοθρεϊτόλη (DTT) ενισχύει την αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Επομένως, το μοριακό βάρος των πολυπεπτιδικών αλυσίδων των πρωτεϊνών είναι αυτό που ορίζει ουσιαστικά το ρυθμό μετακίνησης, από το θετικό προς τον αρνητικό πόλο, των πρωτεϊνών. Μεγάλου μοριακού βάρους μόρια κινούνται πιο αργά σε σχέση με τα μικρότερα μόρια σχηματίζοντας χαρακτηριστικές ζώνες στο gel της ηλεκτροφόρησης.

Το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου περιέχει ακρυλαμίδιο το οποίο πρόκειται για ένα πολυμερές που έχει ανάγκη τη χρήση ειδικών καταλυτών για το σωστό πολυμερισμό του. Σαν καταλύτες χρησιμοποιούνται σήμερα σχεδόν αποκλειστικά 0,03 % N,N,N',N'-τετραμεθυλεθυλενδιαμίνη (TEMED) και 0,07 % περοξυ-δισουλφικό αμμώνιο (ammonium persulfate, APS). Η κύρια λειτουργία του TEMED είναι να καταλύει τη δημιουργία ελεύθερων ριζών που δημιουργούνται από το APS και οι οποίες είναι υπεύθυνες να κατευθύνουν το πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου. Η ταχύτητα του πολυμερισμού της πηκτής εξαρτάται από τη συγκέντρωση των καταλυτών. Επιπλέον, το υλικό της ακρυλαμίδης πλεονεκτεί έναντι των άλλων γιατί είναι ανθεκτικό και διαυγές, σταθερό έναντι ενζυμικών αντιδράσεων και ρυθμίζοντας ανάλογα τη συγκέντρωσή του μπορούμε να αλλάξουμε τη διάμετρο των πόρων της πηκτής.

Οι συσκευές της ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιούνται αποτελούνται από ένα ζεύγος γυάλινων πλακών που χωρίζονται από ένα ζεύγος ισοπαχών διαχωριστών (spacers). Ο πολυμερισμός της πηκτής πολυακρυλαμίδης πραγματοποιείται στο χώρο μεταξύ των δύο πλακών. Η πηκτή αποτελείται από δύο ανισομεγέθη στρώματα: το πήκτωμα επιστοίβασης (stacking gel), με μεγαλύτερους πόρους (μικρότερη συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης), το οποίο είναι πιο αραιό, με μικρότερη συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης και με πιο μεγάλους πόρους και το μεγαλύτερο που ονομάζεται πήκτωμα διαχωρισμού (separating ή running ή

resolving gel), το οποίο είναι μεγαλύτερο, πιο πυκνό και έχει μικρότερους πόρους, στο οποίο γίνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών και μπορεί να είναι σταθερής ή διαβαθμισμένης συγκέντρωσης. Η βασική διαφορά των δύο αυτών πηκτωμάτων έγκειται στο pH τους, που διαφέρει κατά δύο μονάδες και ουσιαστικά το separating gel έχει την ιδιότητα να συγκεντρώνει τα μακρομόρια σε στοιβάδες λεπτών ζωνών, που διατάσσονται σύμφωνα με την κινητικότητά τους. Η διαχωριστική ανάλυση των πρωτεϊνών που θα εισέλθουν στο separating gel αυξάνεται λόγω του stacking gel λόγω της παρουσίας ιόντων χλωρίου στο stacking gel τα οποία μεταναστεύουν ταχύτερα μέσω του πηγματος από ότι το δείγμα πρωτεΐνης και των ιόντων γλυκίνης, που βρίσκονται στο ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης, τα οποία μεταναστεύουν πιο αργά. Ως αποτέλεσμα, τα πρωτεϊνικά μόρια παγιδεύονται μεταξύ αυτών των ιόντων και καθώς εισέρχονται από το stacking gel στο separating gel που έχει διαφορετική σύσταση, η γλυκίνη ιονίζεται και έτσι οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το μέγεθός τους. Τέλος, τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών που μελετούνται σε κάθε περίπτωση καθορίζουν την εκατοστιαία σύσταση της πηκτής.

#### Υλικά και Εξοπλισμός

- Ακρυλαμίδιο / Bis(29:1) (ακρυλαμίδιο/μεθυλεν-δισ-ακρυλαμίδιο)
- Tris 1,5M / pH:8,8 (2-hydroxymethyl-2methyl-1,3-propanediol)
- Tris 0,5M / pH:6,8 (2-hydroxymethyl-2methyl-1,3-propanediol)
- Υπερκάθαρο νερό
- SDS (sodium dodecyl sulfate or sodium lauryl sulfate)
- TEMED (*N,N,N',N'*-tetramethylene-ethylenediamine)
- Protease & Phosphatase Inhibitors
- HCl
- Αιθανόλη
- Μεθανόλη
- Διάλυμα υπερθευικού αμμωνίου – Ammonium persulfate (APS) 10% κ.β.
- β-μερκαπτοαιθανόλη
- Γλυκερόλη
- 0,1% Μπλε της Βρωμοφαινόλης
- Μεμβάνες PVDF
- Γάλα σε σκόνη
- Γλυκίνη
- Trisma

- Συσκευή μίνι πήγματος.
- Τροφοδοτικό ισχύος (ισχύος 200 V, 500 mA)
- Συσκευή φυγοκέντρωσης Eppendorf
- Μιας χρήσης tips για μικροπιπέττες
- Μικρό γυάλινο ή πλαστικό δοχείο με καπάκι (π.χ. 12 x 16 x 3 εκ)
- Πλαστικά σωληνάρια τύπου Eppendorf
- Πιπέτα Hamilton
- Cell Scrapers
- Αναδευτήρας
- Μηχάνημα εμφάνισης LAS

### Πειραματική Διαδικασία

#### **1) Συλλογή πρωτεϊνών από κύτταρα σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές**

##### 2x Sample Buffer

|                        |        |
|------------------------|--------|
| 4x stacking gel        | 500μl  |
| 10% SDS                | 2400μl |
| 100% glycerol          | 400μl  |
| Mercaptoethanole       | 200μl  |
| 0,1% Bromophenole Blue | 500μl  |
| Protease Inhibitor     | 40μl   |
| Phosphate Inhibitor    | 40μl   |
| ddH2O                  | 3880μl |

Γίνεται προετοιμασία του Lysis Buffer με το οποίο θα μαζέψω τις πρωτεΐνες από τα κύτταρα τα οποία είναι αποδομημένα. Το συγκεκριμένο διάλυμα περιέχει διάφορους χαοτροπικούς και αποδιατακτικούς παράγοντες με αποτέλεσμα να διαρρηγνύει τις μεμβράνες των κυττάρων και να αποδιατάσσει το γενετικό υλικό και χωρίς να επιφέρει βλάβες στις πρωτεΐνες. Επίσης, απαραίτητο βήμα αποτελεί η προσθήκη αναστολέων των πρωτεασών και φωσφατασών, για να αποφευχθεί η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών αλλά και η αποφωσφορυλίωσή όσων από αυτές είναι φωσφορυλιωμένες. Η συλλογή των κυτταρικών πρωτεϊνών γίνεται σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές ώστε να μπορεί ευκολότερα να ελεγχθεί οποιαδήποτε φωσφορυλίωση μπορεί να επέλθει με τη πάροδο του χρόνου και την επίδραση των θυμοσινικών πεπτιδίων, Επιπλέον, γίνεται χρήση και 2 αυξητικών παραγόντων του PDGF και

TGF- $\beta$  ως θετικών μαρτύρων, λόγω της ήδη γνωστής από τη βιβλιογραφία επαγωγής της φωσφορυλίωσης των συγκεκριμένων πρωτεϊνών που μελετώνται.

- Αφαίρεση θρεπτικού υλικού από τα τρυβλία των κυτταροκαλλιεργειών
- Προσθήκη 2x Sample Buffer και μάζεμα κυττάρων σε αποστειρωμένο eppendorf
- Θέρμανση σε Heat Block στους 100 °C για 1min
- Μεταφορά δειγμάτων σε Sonicator για 30sec
- Φυγοκέντρηση δειγμάτων για 10 min στις 13.000rcf
- Αποθήκευση δειγμάτων στους -30 °C για μετέπειτα χρήση.

### **Ανοσοαποτύπωμα (Western blot)**

Η διαδικασία μεταφοράς των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη καλείται «αποτύπωμα» ή «στύπωμα» και παρόλο που μπορεί να επιτευχθεί με απλή ροή του διαλύτη συνήθως γίνεται ηλεκτροφορητικά, γιατί έτσι είναι πιο γρήγορη και πιο αποτελεσματική. Οι πρωτεΐνες είναι περισσότερο προσβάσιμες στα αντισώματα όταν βρίσκονται στην επιφάνεια του φίλτρου παρά στο πήκτωμα, οι δε χρόνοι χρώσης/αποχρωματισμού αλλά και οι χρόνοι επώασης με τα υπόλοιπα αντιδραστήρια είναι πολύ πιο σύντομοι στις περιπτώσεις πρωτεϊνών προσδεμένων σε μεμβράνες, καθώς εδώ οι αντιδράσεις είναι επιφανειακές. Επιπρόσθετα, πλεονέκτημα αποτελεί το ότι η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης που χρησιμοποιείται στο αποτύπωμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για περισσότερες της μιας ανοσοανιχνεύσεις, αφού εκδιωχθεί με χρήση αποδιατακτικών παραγόντων το προσδεδεμένο σε αυτήν αντίσωμα. Τέλος, οι μεμβράνες είναι πιο εύχρηστες και πιο ανθεκτικές σε σχέση με τα πηκτώματα.

Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την εκλεκτική ανίχνευση μιας πρωτεΐνης-αντιγόνου, με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων που έχουν παρασκευαστεί γι' αυτό και περιλαμβάνει την ηλεκτροφορητική ανάλυση του πρωτεϊνούχου διαλύματος σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, την ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνες και τέλος τη δέσμευση των ειδικών αντισωμάτων στο αντιγόνο. Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν μεμβράνες PVDF (polyvinylidene difluoride). Οι συγκεκριμένες μεμβράνες είναι υδρόφοβες και εμφανίζουν καλύτερη αποτελεσματικότητα στην συγκράτηση των πρωτεϊνών σε διάφορες δυσμενείς συνθήκες πχ. παρουσία οργανικών διαλυτών ή σε ιδιαίτερα υψηλά/χαμηλά pH. Συμβαίνει επιφανειακή πρόσδεση των πρωτεϊνών με τη μεμβράνη με αποτέλεσμα οι χρόνοι χρώσεως και επώασης να είναι αρκετά μικρότεροι σε σχέση με το πήκτωμα.

## Παρασκευή Διαλυμάτων

### 1) Για πήκτωμα διαχωρισμού (Separating Gel 10%)

|                         |               |
|-------------------------|---------------|
| Dh2O                    | 2,520 ml      |
| 1,5M Tris-HCl           | 4,000 ml      |
| SDS 10%                 | 0,100 $\mu$ l |
| Acrylamide / Bis (29:1) | 3,335 ml      |
| APS 10%                 | 0,040 $\mu$ l |
| TEMED                   | 0,005 $\mu$ l |

### Διάλυμα 1,5 M Tris-HCl (pH=8,8)

Για το 1 L χρησιμοποιούμε p38 εξής αναλογίες:

- 1) 18.165 gr Tris base διαλύονται σε 800 mL ddH<sub>2</sub>O.
- 2) Με την χρήση συμπυκνωμένου διαλύματος HCl ρυθμίζουμε το pH σε 8,8.
- 3) Προσθήκη ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο 100mL.

### 2) Για πήκτωμα Επιστοίβασης (Stacking Gel)

|                         |               |
|-------------------------|---------------|
| dH2O                    | 6,015 ml      |
| 0,5M Tris-HCl p.H.: 6,8 | 2,500 ml      |
| 10% SDS                 | 0,100 $\mu$ l |
| Acrylamide / Bis (29:1) | 1,330 ml      |
| APS 10%                 | 0,040 $\mu$ l |
| TEMED                   | 5 $\mu$ l     |

### Διάλυμα 0,5 M Tris-HCl (pH=6,8)

Για το 1 L χρησιμοποιούμε τις εξής αναλογίες:

- 6,055 g Tris base διαλύονται σε 700 mL ddH<sub>2</sub>O.
- Με την χρήση συμπυκνωμένου HCl ρυθμίζουμε το pH σε 6,8.

Προσθήκη ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο 1 L.

### Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (Transfer buffer)

Το ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (Transfer buffer) συνήθως είναι χαμηλής ιοντικής ισχύος αλλά η ακριβής σύνθεσή του ποικίλει ανάλογα με τη φύση του πηκτώματος και των πρωτεϊνών που αναλύονται. Ένα τυπικό διάλυμα έχει ως εξής:

Αρχικά, για τη χρήση του διαλύματος Transfer buffer απαιτείται η Παρασκευή 1x Running Buffer, συμπληρώνοντας ανάλογα με την επιθυμητή ποσότητα με τα εξής :

- ❖ Μεθανόλη
- ❖ ddH<sub>2</sub>O
- ❖ 10x Running buffer

#### Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων (10x) (SDS Running Buffer)

- Trisma
- Γλυκίνη 4M

Από αυτό παίρνουμε 10% 10x Running Buffer, 90% H<sub>2</sub>O και 0,15 SDS w/v.

#### Διάλυμα για Blocking μη ειδικών θέσεων αντισωμάτων

##### 1) TBS-Tween

- TBS 10x
- H<sub>2</sub>O
- Tween

##### 2) Γάλα 5%

- Regilait
- TBS-Tween

#### Πειραματική Διαδικασία

- Διαμορφώνεται ειδική μήτρα διαστάσεων 9,5 cm X 7,5 cm X 0,1 cm, μέσα στην οποία θα πραγματοποιηθεί ο πολυμερισμός των πηκτωμάτων διαχωρισμού και συμπυκνώσεως.
- Σε μεθανόλη γίνεται καθαρίσμα των υαλοπινάκων της ηλεκτροφόρησης
- Συναρμολόγηση του «σάντουιτς» πηγματος σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τοποθέτηση των υαλοπινάκων και των πλακιδίων αλουμίνιας έτσι ώστε να δημιουργείται ανάμεσά τους κενό 1mm (θα περιέχει το υγρό που θα πολυμεριστεί).
- Πραγματοποιείται πολύ καλή και γρήγορη ανάδευση των συστατικών που απαρτίζουν το πηκτωμα διαχωρισμού 10%.

- Απόχυση των υγρών ακόμα συστατικών του πηκτώματος διαχωρισμού στην υάλινη μήτρα αφήνοντας ένα κενό κάτω από το τελικό σημείο των πλακών.
- Προσθήκη υπερκάθολου νερού στη κορυφή του πηκτώματος διαχωρισμού για να γίνει επίπεδη η επιφάνειά του και να εμποδίζει το πήκτωμα διαχωρισμού να έρθει σε επαφή με το O<sub>2</sub> που επηρεάζει το πολυμερισμό.
- Το πήγμα αφήνεται για χρονικό διάστημα 30 με 60 min σε θερμοκρασία δωματίου για να πολυμεριστεί.
- Απομάκρυνση υπερκάθολου νερού εφόσον έχει πολυμεριστεί το πήκτωμα διαχωρισμού.
- Πραγματοποιείται πολύ καλή και γρήγορη ανάδευση των συστατικών που απαρτίζουν το πήκτωμα συμπτκνώσεως.
- Απόχυση των υγρών ακόμα συστατικών του πηκτώματος συμπτκνώσεως στην μήτρα, πάνω από την επιφάνεια του πηκτώματος διαχωρισμού.
- Το συνολικό πήκτωμα αφήνεται να πολυμεριστεί και να σταθεροποιηθεί το πήκτωμα συμπτκνώσεως (10-20 λεπτά).
- Τοποθέτηση χτενάκιου για το σχηματισμό πηγαδιών στα οποία θα φορτωθούν τα δείγματα.
- Βράσιμο των δειγμάτων για 1 λεπτό
- Φυγοκέντρωση δειγμάτων στις 13.500rcf
- Εφόσον το πήκτωμα έχει πολυμεριστεί απομακρύνεται το χτενάκι και η συσκευή του πηκτώματος μεταφέρεται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης.
- Προσθήκη των δειγμάτων στις ειδικές υποδοχές του πηκτώματος επιστοίβασης. Ο όγκος δείγματος που θα φορτωθεί σε κάθε πηγαδάκι υπολογίζεται αναλόγως της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών που περιέχει κάθε δείγμα (σύμφωνα με μέθοδο Bradford) και του ότι σε κάθε πηγαδάκι πρέπει να υπάρχει ίδια ποσότητα πρωτεϊνών-50mg.
- Πραγματοποίηση της ηλεκτροφόρησης σε θερμοκρασία δωματίου με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου σταθερής έντασης 360 mA, 90 V, για περίπου 30min, μέχρις ότου τα δείγματα να έχουν περάσει το πήκτωμα διαχωρισμού και στη συνέχεια εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου σταθερής έντασης 360 mA , 120 V για περίπου 2 ώρες, ώστε να γίνει μετακίνηση των δειγμάτων από τον αρνητικό προς τον θετικό πόλο του συστήματος και να γίνει διαχωρισμός τους με βάση το μοριακό τους βάρος.
- Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφορητικής ανάλυσης, γίνεται κλείσιμο παροχής ρεύματος με ταυτόχρονη απομάκρυνση των ηλεκτρόδιων και των πλακιδίων πηκτώματος από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης και τοποθέτηση του πηκτώματος διαχωρισμού σε κατάλληλη συσκευή, για τη μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα σε μεμβράνη PVDF (Western Blot).

### Προετοιμασία της Μembrάνης PVDF

- Χρήση μεμβράνης PVDF ομοίων διαστάσεων με το πήκτωμα για σωστή μεταφορά των πρωτεϊνών
- Επώαση της μεμβράνης για πλήρη ενυδάτωση σε διάλυμα μεθανόλης για 15 λεπτά
- Τοποθέτηση μεμβράνης στο ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς / Transfer Buffer

#### ➤ Διαδικασία Αποτυπώματος (Μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη)

Η διαδικασία γίνεται μέσω ηλεκτροφόρησης καθώς πρόκειται για μία πιο ευαίσθητη και γρήγορη τεχνική, παρόλο που θα μπορούσε να επιτευχθεί απλούστερα με ροή του διαλύτη. Η ίδια βασική αρχή ηλεκτροφόρησης ακολουθείται για τη μεταφορά των πρωτεϊνών, με τη μοναδική διαφορά την εφαρμογή του ρεύματος υπό γωνία 90μοιρών ως προς τη πήκτη ώστε να γίνει μετανάστευση των πρωτεϊνών με κατεύθυνση τους τη μεμβράνη PVDF.

- Κόβονται διηθητικά χαρτιά, κατά μισό εκατοστό περιμετρικά μεγαλύτερα της μεμβράνης PVDF και τοποθετούνται εντός δοχείου με Transfer buffer μέχρι να διαποτιστούν πλήρως.
- Στρώση με τη μορφή “sandwich” πηκτής – μεμβράνης κατά σειρά στη συσκευή ημίξηρου αποτυπώματος. Αφού ολοκληρωθεί ο σχηματισμός του sandwich μεταφοράς, τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης με φορά τέτοια ώστε η μεμβράνη να βρίσκεται προς τη πλευρά του θετικού πόλου.
- Προσαρμογή των κατάλληλων βυσμάτων στα ηλεκτρόδια ώστε να γίνει παροχή ρεύματος με σταθερή ένταση ρεύματος 360mA για 2,5 ώρες, έτσι ώστε οι αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες που βρίσκονται μέσα στο πήκτωμα να μεταφερθούν στη μεμβράνη PVDF.

#### ➤ Ανοσοεντόπιση Πρωτεϊνών στη Μembrάνη PVDF

Η διαδικασία της ανοσολογικής ανίχνευσης (Immunostaining, immunoblotting), η οποία εφαρμόζεται τόσο για αποδιατεταγμένα πεπτίδια όσο και για μη αποδιατεταγμένες πρωτεΐνες, ξεκινάει από τη στιγμή που οι πρωτεΐνες έχουν πλέον περάσει από τη πήκτη στη μεμβράνη PVDF. Η ανίχνευση των πρωτεϊνών στη μεμβράνη PVDF και η ταυτοποίησή της βασίζεται

στην ειδική πρόσδεση των αντισωμάτων σε συγκεκριμένες πρωτεϊνικές θέσεις/αντιγόνα, επομένως είναι πολύ σημαντική η ελαχιστοποίηση της μη-ειδικής σύνδεσης των αντισωμάτων στη μεμβράνη (blocking). Στη συνέχεια, η μεμβράνη επωάζεται με το πρωτογενές αντίσωμα που αναγνωρίζει την Fc περιοχή της πρωτεΐνης στόχου και ακολουθεί το δευτερογενές αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει και δένεται στην Fc περιοχή του πρώτου αντισώματος. Το δεύτερο αντίσωμα είναι σημασμένο είτε ενζυμικά είτε ραδιενεργά, οπότε είναι δυνατή η ανίχνευση του συμπλόκου αντιγόνου αντισώματος μετά από την προσθήκη κατάλληλου υποστρώματος.

#### ➤ BLOCKING

Καθώς η ταυτοποίηση βασίζεται στην ειδική πρόσδεση αντισωμάτων σε συγκεκριμένες πρωτεΐνες ή αντιγόνα, είναι πολύ σημαντική η ελαχιστοποίηση της μη-ειδικής σύνδεσης των αντισωμάτων στη μεμβράνη. Μέσω της διαδικασίας γίνεται η κάλυψη των μη-ειδικών θέσεων της μεμβράνης με κάποια άλλη οποιαδήποτε πρωτεΐνη, η οποία δεν περιέχει κοινές περιοχές και δεν θα αναγνωρίζεται ύστερα από το αντίσωμα.

Η μεμβράνη υφίσταται κατάλληλη επεξεργασία ανάλογα με το είδος της πρωτεΐνης που αναλύεται, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η παρεμποδιστεί η μη ειδική δέσμευση των αντισωμάτων. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής :

- Επώαση μεμβράνης σε για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με ταυτόχρονη ανάδευση με Γάλα Ελεύθερο λιπαρών και TBS-Tween 1x.

#### ➤ Τοποθέτηση Πρωτογενούς Αντισώματος

- Αραίωση αντισώματος 1:1000 με 4 μl αντίσωμα σε 4 ml διαλύματος, στο ήδη παρασκευασμένο διάλυμα του blocking
- Τοποθέτηση μεμβράνης σε διαφανή σακούλα που περιέχει το αντίσωμα με το παραπάνω διάλυμα.
- Επώαση over night σε θερμοκρασία δωματίου και με ταυτόχρονη ήπια ανάδευση.
- Το επόμενο πρωί, γίνεται απόχυση του παραπάνω διαλύματος και εν συνεχεία γίνονται 3 πολύ καλές πλύσεις στη μεμβράνη για περίπου 15min η καθεμία, με διάλυμα blocking για απομάκρυνση του μη-προσδεμένου

αντισώματος και διάσπαση των ασθενών και μη-ειδικών αλληλεπιδράσεων αντιγόνου-αντισώματος.

➤ Τοποθέτηση Δευτερογενούς αντισώματος

- Αραίωση αντισώματος 1:2000 στο διάλυμα blocking
- Τοποθέτηση μεμβράνης σε διάφανη σακούλα που περιέχει το αντίσωμα με το παραπάνω διάλυμα
- Επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου με ταυτόχρονη ήπια ανάδευση.
- Απόχυση του διαλύματος και εν συνεχεία γίνονται 3 πολύ καλές πλύσεις στη μεμβράνη, με διάλυμα blocking οι πρώτες 2 για 15min και η τελευταία με TBS-Tween για 20min.
- Εμφάνιση ανασοστυπώματος πρωτεΐνη στη μεμβράνη με σύστημα χημειοφωταύγειας (ECL).

➤ Εμφάνιση πρωτεϊνών με το σύστημα χημειοφωταύγειας ECL (Enhanced ChemiLuminescence)

Η χημειοφωταύγεια είναι μία από τις πιο δημοφιλείς μεθόδους ανίχνευσης στις εφαρμογές στύπωσης western, επειδή προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα έναντι των υποστρωμάτων που κατακρημνίζονται, συμπεριλαμβανομένης της υψηλής ευαισθησίας και της δυνατότητας απογύμνωσης και εκτύπωσης του στυπώματος. Όλη η διαδικασία εμφάνισης των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε σε σκοτεινό θάλαμο παρουσία ελάχιστου ερυθρού φωτός.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- Επώαση μεμβράνης με 1:1 μίγμα χημειοφωταύγειας (ECL) για 5min.
- Στέγνωμα ελαφρά της μεμβράνης, περιτύλιξή της με διαφανή μεμβράνη και επακόλουθη τοποθέτησης της σε μηχανή εμφάνισης LAS.

## **Προσδιορισμός Μεταλλοπρωτεϊνών με τη μέθοδο της ενζυμογραφίας (Zymography)**

### **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ**

Ρυθμιστικό Διάλυμα Δειγμάτων Ενζυμογραφήματος (4x)

- 250mM Tris-HCl pH 6.8
- 40% v/v Γλυκερόλη
- 5 w/v SDS
- 0,04% μπλε της βρωμοφαινόλης

Διάλυμα Ενεργοποίησης Ενζυμογραφήματος

- 0,25M Tris
- 2,5M γλυκίνη

Διάλυμα Έκπλυσης

- 2.5% v/v TritonX-100
- Tris-HCl 50mM pH:7,5
- CaCl<sub>2</sub> 5mM
- NaN<sub>3</sub> 0,02% w/v

Διάλυμα Χρωστικής COOMASIE BRILLIANT BLUE

- 30% v/v Μεθανόλη
- 10% v/v Οξικό οξύ
- 0.25% w/v Coomassie Brilliant Blue

Αποχρωστικό Διάλυμα

- 30% v/v Μεθανόλη
- 10% v/v Οξικό οξύ

### **Αρχή Μεθόδου**

Η ζυμογραφία και η αντίστροφη ζυμογραφία περιγράφονται ως απλές, ευαίσθητες, ποσοτικοποιήσιμες και λειτουργικές αναλύσεις για την ανάλυση των MMP και TIMP σε βιολογικά δείγματα (Hawkes, et al., 2001; Leber, T.M. et al., 1997). Όλοι οι τύποι ζυμογραφίας υποστρώματος προέρχονται από ζυμογραφία ζελατίνης. Οι τεχνικές είναι οι ίδιες εκτός από

το ότι το υπόστρωμα διαφέρει ανάλογα με τον τύπο των MMP ή TIMP που πρόκειται να ανιχνευθούν. Στη ζυμογραφία, οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση υπό μετουσίωση [δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS)], σε μη αναγωγικές συνθήκες καθώς λείπει η β-μερκαπτοαιθανόλη. Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται σε μία γέλη πολυακρυλαμίδιου που περιέχει ένα ειδικό υπόστρωμα το οποίο συμπολυμερίζεται με το ακρυλαμίδιο (Heussen, C. et al., 1980; Fernandez-Resa, P., et al., 1995). Κατά την ηλεκτροφόρηση, το SDS αναγκάζει τις MMPs να μετουσιωθούν και να γίνουν ανενεργές. Μετά την ηλεκτροφόρηση, το πήκτωμα πλένεται, το οποίο προκαλεί την ανταλλαγή του SDS με Triton® X-100, όπου τα ένζυμα μερικώς επαναδιατάσσονται και ανακτούν τη δραστηριότητα τους (Heussen, C. et al., 1980; Woessner, J.F., Jr. 1995.). Επιπροσθέτως, οι λανθάνουσες μορφές των MMPs ενεργοποιούνται χωρίς διάσπαση (Oliver, G.W., et al., 1997). Στη συνέχεια, το πήκτωμα επώάζεται σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα ενεργοποίησης. Κατά τη διάρκεια αυτής της επώασης, οι συμπυκνωμένες, ανακαταταξινομημένες MMPs στο πήκτωμα θα πέσουν το υπόστρωμα (Hawkes, et al., 2001; Fernandez-Resa, P., et al., 1995). Μετά την επώαση, η πηκτή χρωματίζεται με Coomassie® Blue και τα MMP ανιχνεύονται ως διαυγείς ζώνες έναντι ενός μπλε υποστρώματος (Hawkes, et al., 2001; Fernandez-Resa, P., et al., 1995). Οι σαφείς ζώνες της γέλης μπορούν να ποσοτικοποιηθούν με πυκνομετρία (Woessner, J.F., Jr. 1995.). Η ζυμογραφία βασίζεται στις ακόλουθες αρχές: (i) κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης, η ζελατίνη διατηρείται στο πήκτωμα, (ii) η δράση της MMP αναστέλλεται αναστρέψιμα με το SDS κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης, και (iii) το SDS προκαλεί το διαχωρισμό των συμπλοκών MMP-TIMP κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης. Αυτό επιτρέπει την ανίχνευση των MMPs και των TIMP ανεξάρτητα το ένα από το άλλο (Hawkes, et al., 2001;). Ένα επιπλέον πλεονέκτημα της ζυμογραφίας είναι ότι τόσο τα προένζυμα όσο και οι ενεργές μορφές των MMP μπορούν να διακριθούν με βάση το μοριακό τους βάρος (Woessner, J.F., Jr. 1995.). Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το SDS διαχωρίζει τα TIMP από τα MMP, τα οποία μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα υψηλότερη δραστηριότητα από ό,τι *in vivo*. Επειδή η ζυμογραφία δείχνει μόνο εάν το προένζυμο εμφανίζεται παρουσία TIMP *in vivo*, είναι αβέβαιο πόση δραστηριότητα θα έδειχνε μια τέτοια ενεργή μορφή παρουσία TIMP *in vivo* (Woessner, J.F., Jr. 1995.). Επιπροσθέτως, οι αναδιαμορφωμένες MMPs μετά την ηλεκτροφόρηση ανακτούν μόνο ένα μέρος της αρχικής δραστηριότητάς τους.

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- Χορήγηση θυμοσινικών πεπτιδίων σε συγκεντρώσεις (1nM και 10nM) για 24h και n=3
- Συλλογή το υπερκειμένου και φύλαξη δειγμάτων στους -80°C

- Ανάμειξη εθισμένου μέσου με διάλυμα φόρτωσης 4x με αναλογία  $\frac{1}{4}$  και επώαση για 20 λεπτά στους 25 °C
- Προσθήκη στα φρεάτια της πηκτής επιστοίβαξης των ανάλογων ποσοτήτων εθισμένου μέσου, μαρτύρων με γνωστά μοριακά βάρη, και θετικός μάρτυρας έκφρασης μεταλλοπρωτεασών (καρκινικών κυττάρων HT1080)
- Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων σε σταθερή τάση (περίπου 10 V/cm πηκτής), για 2 ώρες στο διάλυμα ηλεκτροφόρησης
- Έκπλυση της πηκτής 3 φορές από 30 λεπτά με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης
- Επώαση στους 37°C, σε σταθερή υγρασία, για 48 ώρες, με το το διάλυμα έκπλυσης απουσία Triton-X-100
- Επώαση με διάλυμα χρώσης Coomassie Brilliant Blue για 1 ώρα, σε συνεχή ήπια ανάδευση, σε T δωματίου
- Αποχρωματισμός πηκτής σε θερμοκρασία δωματίου με διάλυμα αποχρωματισμού, για 30 λεπτά και αλλαγή 3 φορές
- Σταδιακή εμφάνιση των ζωνών αποχρωματισμού

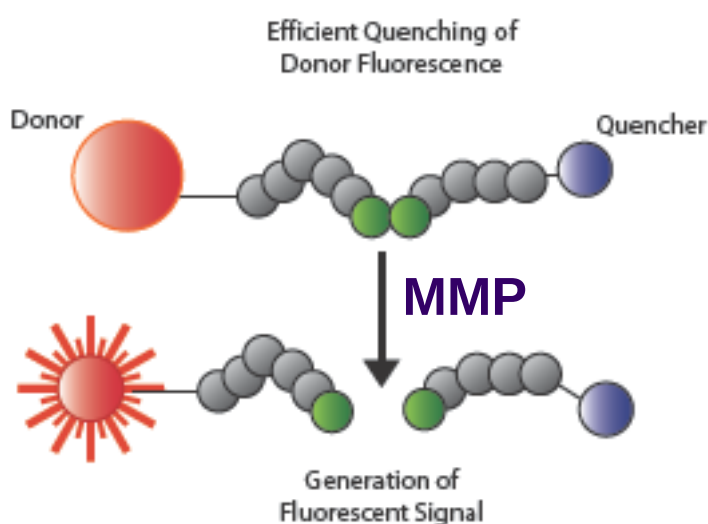
### **Ποσοτική ανάλυση της πέψης συνθετικού υποστρώματος που εμφανίζει φθορισμό μέσω μεταφοράς ενέργειας λόγω συντονισμού (FRET)**

Η μέτρηση φθορισμού λόγω μεταφοράς ενέργειας μέσω συντονισμού (Fluorescence Resonance Energy Transfer – FRET) είναι μια διαδεδομένη τεχνική που χρησιμοποιείται κυρίως σε ομογενείς αντιδράσεις γονιδιακής ανάλυσης. Το φαινόμενο FRET περιγράφει το φαινόμενο μεταφοράς ενέργειας μεταξύ δύο χρωμοφώρων. Το χρωμοφόρο – δότης όταν είναι σε διεγερμένη κατάσταση μπορεί να μεταφέρει ενέργεια σε χρωμοφόρο - δέκτη μέσω μηχανισμού σύζευξης διπόλου – διπόλου, χωρίς ακτινοβολία. Ο δέκτης θα πρέπει να βρίσκεται σε μικρή απόσταση από το δότη, τυπικά μικρότερη των 10 nm. Το μόριο - δέκτης μπορεί είτε να αποσβέσει την ακτινοβολία του δότη, είτε να διεγερθεί και να εκπέμψει ακτινοβολία σε διαφορετικό μήκος κύματος. Όταν και τα δύο χρωμοφόρα είναι φθορίζουσες ουσίες χρησιμοποιείται ο όρος φθορισμός μέσω μεταφοράς ενέργειας λόγω συντονισμού, αν και η ενέργεια που μεταφέρεται δεν είναι φθορισμός (Kwok, 2001).

Η απόδοση της FRET (E) ορίζεται ως το κλάσμα της ενέργειας που μεταφέρεται σε κάθε διέγερση του δότη:

$$E = \frac{k_{ET}}{k_f + k_{ET} + \sum k_i}$$

όπου  $k_{ET}$  είναι ο ρυθμός μεταφοράς ενέργειας,  $k_f$  η εξασθένιση της ακτινοβολίας και  $k_i$  οι ρυθμοί αποδιέγερσης μέσω άλλων τρόπων. Η απόδοση E εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως, η απόσταση μεταξύ δότη και δέκτη, ο βαθμός αλληλοεπικάλυψης του φάσματος εκπομπής του δότη με το φάσμα απορρόφησης του δέκτη και ο προσανατολισμός των στιγμιαίων διπόλων εκπομπής του δότη και απορρόφησης του δέκτη.



### Παραγωγή Εθισμένου Μέσου Καλλιέργειας

Σύμφωνα με την μέθοδο που αναπτύχθηκε από τους Pratsinis et al., 1997 είναι εφικτή η παραγωγή και συλλογή εθισμένου μέσου καλλιέργειας, δίνοντας ιδιαίτερη σημασία σε δύο χαρακτηριστικά ανάπτυξης των κυτταροκαλλιιεργειών. Πιο συγκεκριμένα, οι καλλιέργειες που θα χρησιμοποιηθούν για την εκάστοτε συλλογή εθισμένου μέσου πρέπει να έχουν αναπτυχθεί απουσία ορού, καθώς ο ορός περιέχει ήδη διάφορους παράγοντες που είναι προς μελέτη η έκφρασή τους αλλά και επίσης επειδή περιέχει και παράγοντες που επηρεάζουν την πειραματική διαδικασία σε διάφορα στάδια. Επιπλέον, οι κυτταροκαλλιέργειες που

επιλέγονται για την συγκεκριμένη διαδικασία πρέπει να είναι πλήρεις διότι τα κύτταρα σε ημιπλήρεις καλλιέργειες αδυνατούν να επιβιώσουν απουσία ορού.

#### Υλικά και Εξοπλισμός

- Φθορίζον υπόστρωμα TNO211
- 4 – Αμινοφαινυλδραργυρικό οξικό (APMA)
- Καρκινική κυτταρική σειρά HT1080
- 96 well-plate
- Κλίβανος
- Επωαστικός θάλαμος CO<sub>2</sub>
- Αναδευτήρας πλακών
- Sterile Buffer A για υπόστρωμα TNO211
- Θρεπτικό υλικό DMEM
- Σωματιδιακός αναλυτής
- Φωτομετρητής πολλαπλών θέσεων Fluostar Optima microplate reader

#### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

##### 1) Παραγωγή εθισμένου μέσου καλλιέργειας (Conditioned Medium, CM)

- Καλλιέργεια κυττάρων σε τρυβλία 10cm μέχρι τη δημιουργία πλήρους καλλιέργειας
- Έκπλυση 3 φορές με MEM διάλυμα για απομάκρυνση υπολειμμάτων ορού
- Απόρριψη διαλύματος έκπλυσης και προσθήκη 10mL MEM ανά τρυβλίο για επώαση για 48 h
- Μεταφορά εθισμένου μέσου σε φυγοκεντρικούς σωλήνες και φυγοκέντρωση για 5 min σε 2000 rcf στους 4 °C
- Απομόνωση υπερκειμένου και φύλαξη στους -80 °C

Σημειώνεται πως, τόσο στην φάση αλλαγής του θρεπτικού υλικού με το νέο το οποίο θα συλλεχθεί αργότερα, όσο και στη φάση της απομόνωσης του εθισμένου υλικού, υπολογίζεται ο αριθμός των ζωντανών και νεκρών κυττάρων που υπάρχουν στην κάθε κυτταροκαλλιέργεια.

##### 2) Ενεργοποίηση των MMP's με 4-αμινοφαινυλδραργυρικό οξικό APMA

Με την βοήθεια της δράσης ενεργοποιητών των μεταλλοπρωτεϊνάσων στο απομονωμένο εθισμένο μέσο όπως είναι η ένωση APMA, είναι εφικτή η μελέτη της ενεργότητας των

MMPs *in vitro*. Η συγκεκριμένη τεχνική αποτελεί μια επιπλέον επιβεβαίωση της ύπαρξης ή όχι ενεργοποιημένων μορφών μεταλλοπρωτεϊνάσεων στα δείγματά μας χωρίς όμως να μπορεί να δείξει συγκεκριμένα για ποια μεταλλοπρωτεϊνάση πρόκειται. Η εύρεση συγκεκριμένων MMPs γίνεται με την τεχνική της ζυμογραφίας.

- Επώαση δειγμάτων με την ένωση APMA για 3h σε T=37 °C και σε τελική συγκέντρωση 1mM ώστε να έχουμε 10% APMA.
- Ανακίνηση του 96άρι well-plate πριν την μεταφοράς στον κλίβανο

### 3) Ανάλυση ενεργότητας των MMPs με την χρήση φθορίζον υποστρώματος

Για την μελέτη της ολικής ενεργότητας των μεταλλοπρωτεϊνάσεων έγινε χρήση του φθορίζοντος υποστρώματος Dabcyl-Gaba-Pro-Gln-Gly-Leu-Glu-(EDANS)-Ala-Lys-NH<sub>2</sub> (TNO211) που αναγνωρίζει τις κύριες μεταλλοπρωτεϊνάσεις που εκκρίνονται κατά τα διάφορα στάδια επούλωσης, δηλαδή κατά σειρά ειδικότητας τις MMP-2, -9, -3, -1. Το συγκεκριμένο υπόστρωμα διασπώμενο από τις ενεργές MMPs φθορίζει στα 480nm μετά από διέγερση στα 340nm.

- Επώαση δειγμάτων εθισμένου μέσου καλλιέργειών με το ρυθμιστικό διάλυμα επώασης Sterile Buffer A (Tris HCL 50mM pH=7,5 , NaCl 150mM, CaCl<sub>2</sub> 5mM, ZnCl<sub>2</sub> 1μM) που περιέχει και το φθορίζον υπόστρωμα TNO211 σε τελική συγκέντρωση 7μM για 3h στους 37°C
- Επώαση δειγμάτων εθισμένου μέσου που είχαν επωαστεί με APMA με ρυθμιστικό διάλυμα επώασης παρουσία υποστρώματος σε τελική συγκέντρωση 1mM για 3h στους 37°C
- Μέτρηση της έντασης φθορισμού κάθε δείγματος σε μήκος κύματος απορρόφησης 340nm και εκπομπής στα 480nm

Στα δείγματα μας ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιείται δείγμα εθισμένου μέσου από κυτταροκαλλιέργειες καρκινικών κυττάρων HT1080 ενώ ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιείται καθαρό θρεπτικό υλικό.

### **Μέθοδος προσομοίωσης επούλωσης πληγών δι' αμυγής (Wound Healing Assay)**

Η μέθοδος προσομοίωσης τραύματος δι' αμυγής είναι μία αρκετά εύκολη και οικονομική μέθοδος (Liang, 2007). Πρόκειται για μία μέθοδο ευρέως αποδεκτή για τη μελέτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της κυτταρικής μετανάστευσης (Banerjee, 2014). Η παρούσα μεθοδολογική προσέγγιση δίνει τη δυνατότητα για έλεγχο της ικανότητας των κυττάρων να πολλαπλασιάζονται και ταυτόχρονα να μεταναστεύουν για διάφορες χρονικές περιόδους υπό την επίδραση διαφόρων ερεθισμάτων. Για τις μεταναστευτικές μελέτες των προσκολλημένων κυττάρων, είναι απαραίτητο να δημιουργηθεί μία «χάραξη» σε πλήρεις κυτταροκαλλιέργειες. Η χρήση πιπέτων pasteur ή tips πιπέτας είναι δυσκολότερη στη δημιουργία όμοιας χάραξης σε όλα τα πηγαδάκια που είναι στρωμένα τα κύτταρα και ενέχει το κίνδυνο στρεσαρίσματος και καταστροφής των κυττάρων.

Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία παραλήφθηκε η ανάγκη δημιουργίας γρατσουνιών και χρησιμοποιείται ειδική κολλώδης μεμβράνη σιλικόνης που διαιρεί την πλάκα σε 2 φρεάτια. Με την προσεκτική αφαίρεση, δημιουργείται ένα σαφώς καθορισμένο κενό κυττάρων που μπορεί να μελετηθεί. Μπορεί να παρατηρηθεί η συμπεριφορά των κυττάρων ενώ ταυτόχρονα μελετάται χρονοεξαρτώμενα η «επούλωση της πληγής» παρουσία ή απουσία των θυμοσινικών πεπτιδίων που έχουν χρησιμοποιηθεί για συγκεκριμένες ορισμένες χρονικές στιγμές. Η συγκεκριμένη μέθοδος μιμείται την μεταναστευτικότητα που εμφανίζουν τα κύτταρα *in vivo*. Παρ'όλο αυτά δεν διευκρινίζεται απόλυτα αν το αποτέλεσμα της συγκεκριμένης μεθόδου οφείλεται και στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ή είναι αποτέλεσμα μόνο της κυτταρικής μετακίνησης. Επιπλέον, το περιεχόμενο απελευθέρωσης των κυττάρων που απελευθερώνεται με τον μηχανικό τραυματισμό των κυττάρων μπορεί και αυτό με τη σειρά του να επηρεάσει την κυτταρική κίνηση. Στη παρούσα μελέτη για τον έλεγχο και τη σύγκριση του βαθμού μετανάστευσης που εμφάνισαν τα κύτταρα ινοβλαστών σε σχέση με τα control κύτταρα ινοβλαστών, χρησιμοποιήθηκαν τα θυμοσινικά πεπτίδια Ta1, Tβ4 και Ac-SDKP σε συγκεντρώσεις 1nM και 10nM και σε χρονική επίδραση 24h.

#### Υλικά και όργανα:

- Θρεπτικό υλικό DMEM
- FBS
- Θυμοσινικά πεπτίδια
- Silicon Inserts
- Αυτόματες πιπέτες
- Αποστειρωμένες πιπέτες 5ml και 10ml
- Θάλαμος νηματικής ροής
- Ανάστροφο μικροσκόπιο
- 24 well-plates

#### ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- Τοποθέτηση silicon inserts σε κάθε φρεάτιο της πλάκας
- Επίστρωση κυττάρων σε κάθε ένα από τα 24 φρεάτια της πλάκας μαζί με 0,5ml πλήρες θρεπτικού υλικού και επώασή τους για 24h στους 37°C και σε 5% CO<sub>2</sub>.
- Αναρρόφηση υπο κενό του θρεπτικού υλικού DMEM, 1% penicillin/streptomycin , 15% FBS και προσθήκη 0,5ml θρεπτικού μέσου DMEM high glucose, 1% penicillin/streptomycin, 0,1% FBS.
- Επώαση κυττάρων στον επωαστικό θάλαμο στους 37°C και 5% CO<sub>2</sub> για 24h.
- Αφαίρεση θρεπτικού υλικού και προσθήκη DMEM 0,1%Fbs και θυμοσινικά πεπτίδια σε ανάλογες συγκεντρώσεις
- Προσεχτική αφαίρεση silicon inserts
- Επώαση σε κλίβανο στους 37°C και 5% CO<sub>2</sub> για 24h-72h.
- Μονιμοποίηση κυττάρων με φορμαλδεύδη
- Χρώση κυττάρων για παρατήρηση κυτταρικής μετανάστευσης με χρωστική Giemsa
- Παρατήρηση μικροσκοπικά της επικάλυψης των καναλιών και της μετανάστευσης των κυττάρων
- Λήψη φωτογραφιών στο σημείο της χαραγής.

Η διαδικασία επαναλήφθηκε για n=3 και N=18 και εκτιμήθηκε η κινητικότητα των κυττάρων μέσω στατιστικού έλεγχου των δεδομένων με ανάλυση της διακύμανσης μέσω t-TEST και με ανάλυση στο πρόγραμμα Excel και στο πρόγραμμα GraphPad InStat version 3.10. Όλα τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσες τιμές  $\pm$  το τυπικό σφάλμα (S.E.M.).

## Έλεγχος γονιδιακής έκφρασης με την τεχνική της Real Time RT-PCR

### ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

#### 1) Αρχή λειτουργίας της PCR.

Η λογαριθμική ενζυμική ενίσχυση μικρών αλληλουχιών DNA (100-600 bp) με τη χρήση υποστρώματος μεγαλύτερου δίκλωνου μορίου DNA καλείται αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR). Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μια μέθοδος στοχευμένης ενίσχυσης γενετικού υλικού, η οποία στηρίζεται στον ημισυντηρητικό τρόπο αντιγραφής του γενετικού υλικού. Κατ' αυτόν τον τρόπο, είναι δυνατή η αποτίμηση της ύπαρξης ή μη συγκεκριμένων τμημάτων γενετικού υλικού καθώς και η συγκριτική ποσοτικοποίησή τους. Εφευρέτης της μεθόδου αυτής είναι ο Kerry Mullis, ο οποίος ανακοίνωσε την εφευρεσή του το 1984 και τιμήθηκε γι' αυτήν με βραβείο Νόμπελ το 1993 (Βερβερίδης, 2003).

Η διαδικασία περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενους κύκλους σε διαφορετικές θερμοκρασίες, με γρήγορη μετάβαση από τη μια θερμοκρασία στην άλλη. Σε κάθε στάδιο γίνεται επώαση του δείγματος σε διαφορετική κάθε φορά θερμοκρασία, με την βοήθεια ενός ειδικού μηχανήματος, του θερμικού κυκλοποιητή (thermal cycler). Ο κυκλοποιητής έχει την δυνατότητα να θερμαίνει και να ψύχει τα δείγματα σε σύντομο χρόνο (Βερβερίδης, 2003). Τα στάδια που αποτελούν τον επαναλαμβανόμενο κύκλο είναι τα εξής:

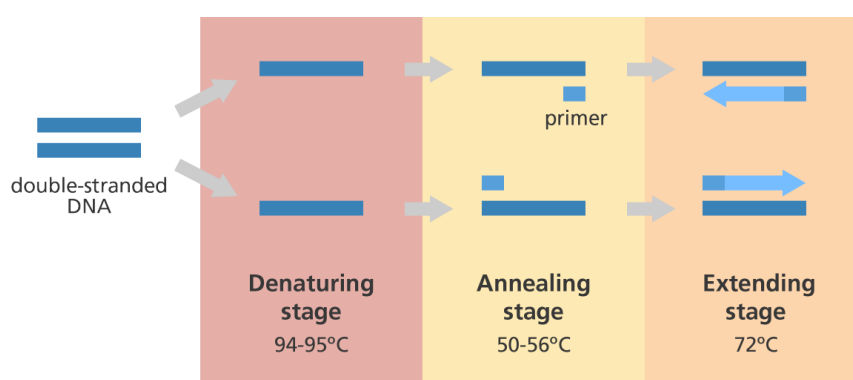
A) Θέρμανση σε υψηλή θερμοκρασία (93–95ο C) ώστε να αποδιαταχθεί το DNA (denaturation step) και από δίκλωνο να μετατραπεί σε μονόκλωνο.

B) Θερμοκρασία υβριδισμού (annealing step) προκειμένου οι ενεργοποιητές να υβριδοποιηθούν με το DNA. Η θερμοκρασία υβριδισμού εξαρτάται από το μήκος του εκκινητή και την περιεκτικότητά του σε G και C. Ένας τρόπος υπολογισμού της θερμοκρασίας του εκκινητή είναι μέσω του τύπου  $T_m = 2(A+T) + 4(C+G)$ . Η θερμοκρασία του υβριδισμού είναι τελικά 5°C κάτω από τον μέσο όρο των τιμών  $T_m$  των δύο εκκινητών της αντίδρασης. (extention step).

Γ) Θερμοκρασία πολυμερισμού ή επιμήκυνσης (extention step). Κατά τη διάρκεια αυτού του βήματος λαμβάνει χώρα η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA, με τη δράση της DNA πολυμεράσης. Έτσι σχηματίζονται δύο νέοι κλώνοι DNA συμπληρωματικοί προς αυτούς των δύο κλώνων του προτύπου DNA με αποτέλεσμα το διπλασιασμό του DNA στόχου.

Κατά την διάρκεια του πρώτου σταδίου το τμήμα DNA που μας ενδιαφέρει υποβάλλεται σε θερμοκρασία 94°C προκειμένου να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των αλυσίδων του δίκλωνου

αυτού DNA (αποδιάταξη/denaturation, Εικ.1). Στο δεύτερο στάδιο η θερμοκρασία μειώνεται στους 50-60°C και έτσι επιτυγχάνεται η ένωση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA σε κάθε αλυσίδα (υβριδοποίηση εκκινητών/primer annealing.). Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C και με την βοήθεια της DNA πολυμεράσης, που προσθέτει τα νουκλεοτίδια (dNTP's) στο 3' άκρο των εκκινητών, επιτυγχάνεται η σύνθεση των νέων συμπληρωματικών αλυσίδων DNA. Η σύνθεση των αντιγράφων γίνεται από την DNA πολυμεράση πάντα με κατεύθυνση 5' προς 3'. Σε χρονικό διάστημα ολίγων ωρών, η συγκεκριμένη περιοχή του DNA που επεκτείνεται (DNA στόχος), πολλαπλασιάζεται σε ένα μεγάλο αριθμό αντιγράφων.



Εικόνα Ε.16 : Σχηματική αναπαράσταση των 3 σταδίων της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης PCR. (Genome Research Limited)

Η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω επαναλαμβάνεται για 25–30 κύκλους συνήθως. Κατά τη διάρκεια των κύκλων η παραγωγή των προϊόντων της αντίδρασης γίνεται με εκθετικό ρυθμό, εφόσον βέβαια δεν παρουσιαστούν περιοριστικοί παράγοντες, όπως για παράδειγμα η έλλειψη νουκλεοτιδίων. Τα απαραίτητα αντιδραστήρια για την PCR είναι DNA στόχος, εκκινητές “primers”, τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια, ένζυμο Taq DNA πολυμεράση, ιόντα  $Mg^{++}$  απαραίτητα για την ενζυμική δράση και κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα ( $pH \approx 8.2$ ) για τη δράση του ενζύμου. Το DNA στόχος, πολλαπλασιάζεται μετά από πολλαπλές αντιγραφές, σε σημείο που να είναι ανιχνεύσιμο. Το DNA στόχος αποτελεί το πρότυπο DNA στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης και ως αφετηρίες χρησιμοποιούνται 2 συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (18-22 βάσεων) που έχουν συμπληρωματική δομή ως προς τις πλευρικές αλληλουχίες του DNA στόχου, το καθένα αντίστοιχα προς τον ένα κλώνο του στόχου και με αντίθετη κατεύθυνση. Οι εκκινητές (primers) είναι ειδικές αλληλουχίες σχεδιασμένες με κατάλληλες προδιαγραφές ώστε να έχουν την δυνατότητα πρόσδεσης στα κατάλληλα σημεία του γενετικού υλικού και να

επιτρέπουν έπειτα στο ένζυμο DNA πολυμεράση να αντιγράψει και να επεκτείνει την νεοσυντιθέμενη συμπληρωματική αλληλουχία.

Η διαδικασία της PCR χωρίζεται σε τρεις φάσεις:

A) Εκθετική (exponential) φάση: Είναι η φάση κατά την οποία έχει αρχίσει ο πολλαπλασιασμός της προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA. Σ' αυτή την φάση η αντίδραση είναι πολύ αποτελεσματική και σε κάθε κύκλο διπλασιάζεται η προεπιλεγμένη αλληλουχία DNA,

B) Γραμμική (linear) φάση: Η φάση στην οποία παρατηρείται μειωμένη παραγωγή αντιγράφων της αλληλουχίας DNA εξαιτίας της μείωσης της ενεργότητας των αντιδραστηρίων,

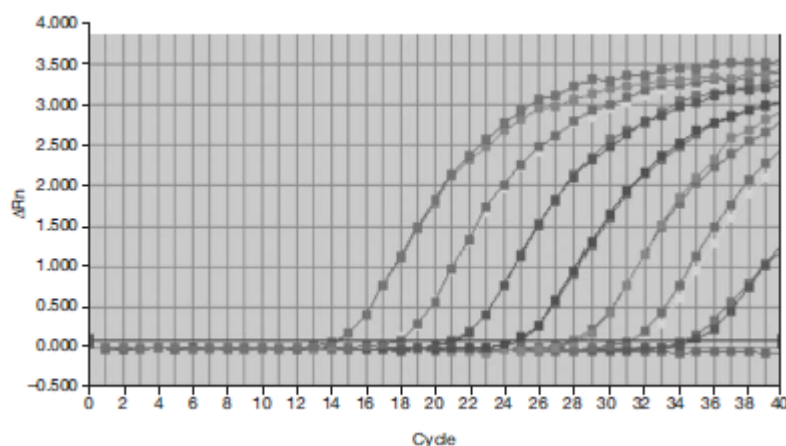
Γ) Φάση Plateau: Στη φάση αυτή έχει σταματήσει η αντίδραση PCR καθώς και η παραγωγή νέων αντιγράφων εξαιτίας της εξάντλησης των αντιδραστηρίων. (Applied Biosystems, XX).

Η PCR βρίσκει εφαρμογή σε πολλούς τομείς και, τελευταία, έχουν αναπτυχθεί πολλές παραλλαγές της παραπάνω βασικής αντίδρασης. Μία ευρέως χρησιμοποιούμενη παραλλαγή είναι η RT-PCR, κατά την οποία χρησιμοποιείται ως μήτρα για ενίσχυση RNA, το οποίο πρώτα μεταγράφεται σε cDNA με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση (Reverse transcriptase), την οποία εφαρμόσαμε και εμείς στο συγκεκριμένο πείραμα για τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης που υπήρχε σε συγκεκριμένα γονίδια που μας ενδιέφεραν έπειτα της χρήσης των επιλεγμένων θυμοσινικών πεπτιδίων.

## **2) Αρχή λειτουργίας της Real-Time PCR**

Παραλλαγή της συμβατικής μεθόδου της PCR αποτελεί η μέθοδος της Real-Time PCR όπου γίνεται χρήση ο πολλαπλασιασμός, η ανίχνευση καθώς και η ποσοτικοποίηση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA, RNA ή cDNA σε πραγματικό χρόνο. Η μέθοδος χρησιμοποιείται κυρίως στον έλεγχο και ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης (Promega, 2009). Η αναφοράς της λειτουργίας της συγκεκριμένης μεθόδου γίνεται και με κάποιες ακόμα διαφορετικές ονομασίες όπως Quantitative real-time PCR (QRT-PCR) ή Kinetic PCR. Παρόλο που η μέθοδος της Real time PCR στηρίζεται στις βασικές αρχές της PCR παρουσιάζει μεγαλύτερη ακρίβεια, αποδοτικότητα και σε μικρότερο χρόνο απ' ότι η PCR και δίδει την δυνατότητα παρακολούθησης της πορείας σύνθεσης του DNA σε κάθε κύκλο της αντίδρασης (Houghton et al, 2006). Το διάλυμα της αντίδρασης της Real Time PCR αποτελείται από τα ίδια αντιδραστήρια με αυτά της συμβατικής PCR εκτός από τους μηχανισμούς ανίχνευσης DNA που αφορούν την προσθήκη συγκεκριμένων χρωστικών

(Houghton et al, 2006). Η παρατήρηση των προς ανάλυση δειγμάτων γίνεται με τη χρήση υπολογιστή συνδεδεμένου με το μηχάνημα της Real-Time PCR όπου είναι εφικτή η ανάλυση και ποσοτικοποίηση του σήματος ανίχνευσης του γενετικού υλικού σε κάθε κύκλο της αντίδρασης κάθε δείγματος.



Εικόνα Ε.17 : Απεικόνιση των τιμών φθορισμού της SYBR Green χρωστικής ως προς την σταδιακή αύξηση τους σε σχέση με την αύξηση των αντιγράφων σε κάθε κύκλο.

Στην Real time PCR η παρακολούθηση της σύνθεσης του DNA που παράγεται στην αντίδραση γίνεται με την σήμανση των αντιγράφων με φθορίζοντα μόρια (fluorescent reporter molecule) καθώς και με διάφορα χρωμογόνα μόρια, στα πρώτα στάδια της αντίδρασης (εκθετική φάση). Τα μόρια αυτά εκπέμπουν φθορισμό, ο οποίος μετράται σε κάθε κύκλο και βοηθάει στη ποσοτικοποίηση του προϊόντος (Εικόνα 5). Η ένταση του φθορισμού αυξάνεται σταδιακά σε συνάρτηση με την αύξηση των αντιγράφων που παράγονται σε κάθε κύκλο της αντίδρασης (Stratagene, 2006). Η γραμμή Threshold (Εικ. 6) είναι το σημείο στο οποίο ξεχωρίζει έντονα το φθορίζον σήμα των προϊόντων της Real time PCR από το φόντο, ενώ ο κύκλος κατά την διάρκεια του οποίου, το δείγμα φτάσει την γραμμή Threshold ονομάζεται Threshold cycle (Ct) ή τιμή Ct (Applied Biosystems, XX). Όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα της αρχικής αλληλουχίας DNA στο κάθε δείγμα τόσο νωρίτερα θα εμφανιστεί η τιμή Ct για κάθε δείγμα, δηλαδή αναλογικά η Ct θα είναι μικρότερη (Wong et al, 2005). Υπάρχουν δυο διαφορετικές μέθοδοι ποσοτικοποίησης που μπορούν να επιλεγθούν. Οι μέθοδοι αυτές είναι: Απόλυτη ποσοτικοποίηση (Absolute quantification) και Σχετική ποσοτικοποίηση (Relative quantification) (Livak et al, 2001).

### Απόλυτη ποσοτικοποίηση (Absolute quantification)

Μέτρηση της ακριβούς ποσότητας της αλληλουχίας γενετικού υλικού στο κάθε δείγμα δίνοντας τη δυνατότητα μεγαλύτερης ακρίβειας στην ποσοτικοποίηση των δειγμάτων. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην χρήση μίας καμπύλης αναφοράς (standard curve) με τη βοήθεια γνωστής συγκέντρωσης-μάρτυρα, που μπορεί να προέρχεται από DNA, γενωμικό DNA, RNA, cDNA, ανασυνδιασμένο (recombinant) πλασμιδιακό DNA (recDNA) ή συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (Stratagene, 2006). Η καμπύλη αναφοράς εμφανίζεται σε γράφημα ως μια ευθεία γραμμή που εκφράζει τον αριθμό των αντιγράφων του αρχικού μάρτυρα και τις Ct values της κάθε αραιώσης και με την βοήθεια της συσκευής της Real time PCR μπορεί να γίνει σύγκριση των τιμών Ct των πειραματικών δειγμάτων με αυτές της καμπύλης αναφοράς και έτσι να ποσοτικοποιηθούν τα άγνωστα δείγματα (Stratagene, 2006).

### Σχετική ποσοτικοποίηση (Relative quantification)

Πιο απλή η χρήση της καθώς δεν απαιτεί τη δημιουργία και χρήση πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην σύγκριση της έντασης φθορισμού του υπο μελέτη γονιδίου μετά από την αλυσιδωτή ενίσχυση με εκείνη ενός γονιδίου αναφοράς (reference ή control gene) του ίδιου οργανισμού στην ίδια αντίδραση (Pfaffl, 2002).

Υπάρχουν διάφορες μεθοδολογίες που χρησιμοποιούνται στην ποσοτική ανάλυση της Real-Time PCR (Quantative PCR) για την ανίχνευση του εν λόγω σήματος του κάθε δείγματος. Στις μεθοδολογίες αυτές ανήκει η χρωστική SYBR Green η οποία όταν παρεμβάλλεται σε δίκλωνο DNA, φθορίζει έντονα πράσινο χρώμα, ενώ όταν βρίσκεται ελεύθερη μέσα στο διάλυμα εμφανίζει σχετικά χαμηλό φθορισμό. Στη συγκεκριμένη πειραματική μελέτη χρησιμοποιήθηκε η εν λόγω φθορίζουσα χρωστική για την οποία σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι έχει ισχυρή δυνατότητα σήματος όταν δεσμεύεται σε δίκλωνα μόρια DNA αλλά μπορεί να είναι εφικτή με μικρότερη απόδοση και σε μονόκλωνα μόρια DNA ή μόρια RNA. Ο φθορισμός εκπέμπεται σε μήκος κύματος  $\lambda=520\text{nm}$  μετά από διέγερση στα  $497\text{nm}$ . Όλες οι ενώσεις με ικανότητα ισχυρής δέσμευσης στο DNA είναι δυνητικά μεταλλαξογόνες αλλά χρησιμοποιείται ως ασφαλέστερο συγκριτικά με το τη χρήση βρωμιούχου αιθιδίου. Μειονέκτημα αυτής αποτελεί η έλλειψη εξειδίκευσης, έτσι δεν είναι δυνατή η πιστοποίηση του σήματος που εκπέμπεται ότι αντιστοιχεί στην συγκέντρωση των αντιγράφων της αλληλουχίας DNA που μας ενδιαφέρει (Houghton et al, 2006). Εναλλακτική μεθοδολογία αποτελεί η μέθοδος των ολιγονουκλεοτιδίων-ιχνηλατών (moleculal-probes) που παρουσιάζει μεγαλύτερη ακρίβεια και εξειδίκευση σε σχέση με την μέθοδο της SYBR Green I. Η χρήση της συγκεκριμένης μεθόδου μπορεί να γίνει με διάφορα είδη ιχνηλατών όπως: 1)

γραμμικοί ιχνηλάτες (linear probes), 2) ιχνηλάτες με δευτεροταγή δομή (structured probes), 3) ιχνηλάτες τύπου σκορπιού (Scorpion probe) και 4) οι ιχνηλάτες τύπου FRET (fluorescence resonance energy transfer).

Τέλος, ένα ακόμα πλεονέκτημα της τεχνολογίας της Real Time PCR είναι η κατασκευή καμπύλης αποδιάταξης (Melting curve ή Dissociation curve) με την οποία μπορούν να αξιολογηθούν τα προϊόντα της αντίδρασης, να δούμε δηλαδή αν τα προϊόντα που παρήχθησαν είναι αυτά που θέλουμε ή όχι. Η καμπύλη αυτή βασίζεται στην θερμοκρασία αποδιάταξης (melting temperature ή  $T_m$ ) των προϊόντων της αντίδρασης (Houghton et al, 2006).

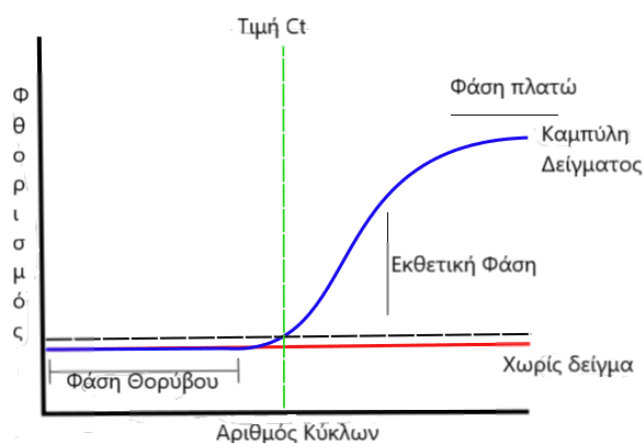
Έτσι αντιλαμβανόμαστε ότι με την Real-Time PCR είναι εφικτή η ακριβής ποσοτικοποίηση των προϊόντων της αντίδρασης με παρακολούθηση της πορείας τους καθ'όλη τη διάρκεια της αντίδρασης. Επίσης, τα προϊόντα ανιχνεύονται κατά την διάρκεια της εκθετικής (exponential) φάσης, όπου τα αποτελέσματα είναι πιο ακριβή (Gachon et al., 2004). Επιπλέον, η ανίχνευση των προϊόντων της αντίδρασης είναι δυνατή κατά τη διάρκεια της αντίδρασης και όχι μετά, καθώς χρησιμοποιείται συγκεκριμένη χρωστική ουσία (π.χ. SYBR Green) μέσω κατάλληλου ανιχνευτή της ακτινοβολίας της χρωστικής, ενώ τέλος μέσω της βοήθειας της Melting Curve είναι εφικτή η σωστή αξιολόγηση των προϊόντων της αντίδρασης.

Η μέθοδος της Real-Time PCR μπορεί να βρει εφαρμογή σε πολλά διαφορετικά πεδία έρευνας και εφαρμογών όπως στους τομείς μοριακής βιολογίας και ιατρικής, καθώς μπορεί να βοηθήσει στη διάγνωση ασθενειών από διάφορους παθογόνους μικροοργανισμούς, να ανιχνεύσει και να αναλύσει γονιδιακές μεταλλάξεις που σχετίζονται με γενετικές ανωμαλίες, με κληρονομικές ασθένειες αλλά και ασθένειες όπως διάφοροι τύποι καρκίνου (Gibson et al., 2006), καθώς και να ανιχνεύσει και να ποσοτικοποιήσει την γονιδιακή έκφραση (gene expression), να επαληθεύσει δεδομένα από μικροσυστοιχίες γονιδίων (microarray data, Gibson, 2006), και να γίνει έλεγχος των γενετικά τροποποιημένων οργανισμών (GMOs). Επίσης, βρίσκει εφαρμογή σε τομείς όπως οι βιομηχανίες τροφίμων για τον έλεγχο της ασφάλειας των τροφίμων.

### **Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης με χρήση της αντίστροφης μεταγραφάσης (Real-Time RT-PCR)**

Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση mRNA που προέρχεται από κάποιο ιστό. Στην PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR) ως αρχικό δείγμα χρησιμοποιείται το ολικό RNA το οποίο μετατρέπεται σε cDNA παρουσία του

ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης (reverse transcriptase). Για τη μεταγραφή αυτή χρησιμοποιούνται τυχαία εξαμερή ή εννιαμερή όλιγοdTs και το cDNA που θα παραχθεί θα χρησιμοποιηθεί ως εκμαγείο για την DNA πολυμεράση στη συνήθη τεχνική της PCR. Εξελίξεις στην RT-PCR περιλαμβάνουν την ανάπτυξη απλών πρωτοκόλλων στα οποία η σύνθεση cDNA και η αντίδραση PCR εκτελούνται σε ένα στάδιο (one step RT-PCR). Η μέθοδος χρησιμοποιείται κυρίως στον έλεγχο και ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης (Promega, 2009).



**Εικόνα Ε.18:** Γραφική αναπαράσταση της καμπύλης ποσοτικοποίησης μίας ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Με μπλε χρώμα είναι η καμπύλη ενός δείγματος που περιέχει το DNA στόχο. Με κόκκινο είναι μια που δεν το περιέχει. Η φάση θορύβου είναι το σημείο της αντίδρασης που δεν έχει πολλαπλασιαστεί επαρκής ποσότητα γενετικού υλικού από το δείγμα. Η τιμή Ct είναι η τιμή – «κατώφλι», δηλαδή ο κύκλος στον οποίο η ένταση φθορισμού είναι τόση που να έχει παραχθεί αρκετό DNA, ώστε το δείγμα να θεωρηθεί θετικό. Η τιμή Ct είναι αντιστρόφως ανάλογη της ποσότητας γενετικού υλικού στο δείγμα. Μικρό Ct σημαίνει μεγάλη ποσότητα DNA και αντίστροφα. Με αυτό τον τρόπο είναι δυνατή η συγκριτική ποσοτικοποίηση της έκφρασης γονιδίων σε διαφορετικά δείγματα. Στο σχήμα φαίνονται επίσης η εκθετική φάση πολλαπλασιασμού και η φάση πλατώ. Στην φάση πλατώ η αντίδραση σταματάει λόγω κορεσμού του ενζύμου ή εξάντλησης των αντιδραστηρίων.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε απομόνωση RNA από κυτταροκαλλιέργειες των κυττάρων AG01523 και GM21808 που είχαν την επίδραση κάποιου παράγοντα, στη δικιά μας περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν τα θυμοσινικά πεπτίδια Ta1, Tβ4, Ac-SDKP σε συγκεντρώσεις 1nM και 10nM καθώς και control κυττάρων που δεν είχαν υποστεί καμία εξωτερική επίδραση.

## ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

- Ανθρώπινοι δερματικοί ινοβλάστες AG01523c και GM21808 (NIGMS Human Genetic Cell Repository, Coriell Institute for Medical Research)
- Θρεπτικό υλικό DMEM (Dulbeco's Minimal Essential Medium), αντιβιοτικά πενικιλίνη (10.000 U/L) και στρεπτομυκίνη (10.000 µg/L), L-γλουταμίνη (4 mM), πυροσταφυλικό οξύ (1 mM) και διττανθρακικό νάτριο (Biochrom AG, Berlin, Germany)
- Εμβρυϊκός βόειος ορός (Fetal Bovine Serum, FBS), Gibco BRL (Paisley, UK)
- Θρυψίνη (0,25% (w/v) θρυψίνης, 10 mM κιτρικού νατρίου, 110 mM χλωριούχου νατρίου (pH 7,2), Invitrogen (California)
- Τετραπεπτίδιο acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro-OH, Ac-SDKP, Bachem AG (Bubendorf, Switzerland)
- Θυμοσίνη β4, Bachem AG (Bubendorf, Switzerland)
- Θυμοσίνη α1, Bachem AG (Bubendorf, Switzerland)

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

### **1) Απομόνωση RNA**

Αρχικό στάδιο για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης σε μεταγραφικό επίπεδο είναι η απομόνωση του ολικού RNA των υπό μελέτη κυττάρων. Για τη διαδικασία αυτή απαραίτητη είναι η συλλογή των κυττάρων και η διατήρησή τους με Τριζόλη η οποία έχει την ιδιότητα να διαρρηγνύει τα κύτταρα καθώς επίσης περιέχει και αναστολείς RNAάσων. Αναλυτικότερα η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

- Αφαίρεση θρεπτικού υλικού από κυτταροκαλλιέργειες
- Προσθήκη Τριζόλης και μεταφορά υγρού με κύτταρα σε αποστειρωμένο eppendorf
- Μεταφορά και φύλαξη κυττάρων στους -80°C

Για την απομόνωση του ολικού RNA των κυττάρων η παρακάτω διαδικασία πραγματοποιείται με χρονική διάρκεια 2 ημερών στους 4°C.

- Προσθήκη χλωροφορμίου σε δείγματα κυττάρων συλλεγμένα με Τριζόλη από τους -80°C και ανακίνηση σε Vortex

- Ακινησία για 2min και φυγοκέντρηση για 15min σε 1200rcf
- Συλλογή υπερκλειμένου (υδατική φάση) σε αποστειρωμένο tube ελεύθερα RNAσών και ανακίνηση σε Vortex
- Προσθήκη ισοπροπανόλης για κατακρύμνιση RNA
- Φύλαξη over night στους -20°C
- Φυγοκέντρηση για 10min στις 1200rcf και στους 4°C
- Συλλογή ιζήματος με RNA και απομάκρυνση υπερκλειμένου
- Πλύση με προσθήκη 75% αιθανόλης και ανακίνηση σε Vortex
- Φυγοκέντρηση στις 7500rcf για 5min στους 4°C
- Αφαίρεση υπερκλειμένου με αιθανόλη και άφεση δειγμάτων για 15min περίπου σε θερμοκρασία δωματίου με ανοιχτό eppendorf ώστε να εξατμιστεί η ολική αιθανόλη
- Προσθήκη H<sub>2</sub>O for injection και ανάδευση δειγμάτων με τη χρήση της πιπέτας σε πάγο
- Μέτρηση ποσότητας απομονωμένου RNA σε συσκευή nanodrop με φωτομέτρηση και υπολογισμός απαραίτητων αραιώσεων ώστε να χρησιμοποιηθούν 500ng RNA στη διαδικασία σύνθεσης cDNA.

## 2) Υπολογισμός της Καθαρότητας και της Ποσότητας του Ολικού Mrna

Η καθαρότητα του RNA και η απόδοση της απομόνωσης προσδιορίζονται φωτομετρικά με τη βοήθεια του φασματοφωτόμετρου Infinite M200 (TECAN). Τα νουκλεϊκά οξέα παρουσιάζουν μέγιστο απορρόφησης στα 260 nm, ενώ οι πρωτεΐνες στα 280 nm. Το RNA για να θεωρηθεί καθαρό δεν πρέπει να περιέχει προσμίξεις DNA ή πρωτεϊνών. Το καθαρό RNA πρέπει να έχει λόγο A260/A280 που να κυμαίνεται μεταξύ 1.8-2.1. Μέσα σε αυτά τα όρια, θεωρούμε ότι το RNA είναι ικανοποιητικής καθαρότητας. Αν ο παραπάνω λόγος είναι πολύ μικρότερος συνιστάται επανεκχύλιση του RNA με συνέπεια χαμηλή απόδοση στην απομόνωση. Η καθαρότητα του RNA που απομονώνεται από τα κύτταρα είναι σημαντικοί παράγοντες για τη χρήση του σε διάφορες τεχνικές, μία από τις οποίες είναι και η ανάλυση με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time-PCR). Για να βρούμε την ποσότητα του RNA που απομονώθηκε, ισχύει η παραδοχή ότι μία μονάδα απορρόφησης (A260) ισοδυναμεί με 40 µg μονόκλωνου RNA/mL (1 A260unit = 40 µg/ml RNA).

## 3) Κατασκευή συμπληρωματικής αλυσίδας DNA (cDNA)

Όλη η διαδικασία σύνθεσης της συμπληρωματικής αλυσίδας DNA πραγματοποιείται στους 4°C και σε τελικό όγκο 10 µl (Mastermix – RNA – H<sub>2</sub>O for injection). Τα βήματα που ακολουθήθηκαν βάση του TAKARA RT-Reagent Kit είναι τα εξής:

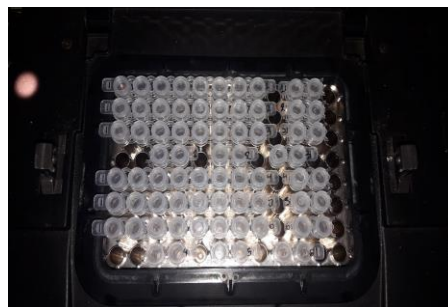
- Παρασκευή mastermix για συν 1 δείγματα σε τελικό όγκο 3μl συνολικά με τα συνθετικά:
  - 5x Primescript Buffer
  - OligoDT Primer 50μM
  - Primescript RT Cenzyme Mix
- Προσθήκη σε mastermix αραιωμένο RNA και συμπλήρωση με H<sub>2</sub>O for injection για τελικό όγκο 10μl.
- Επώαση στους 37°C για 30min
- Επώαση στους 85°C για 5sec
- Αραίωση δειγμάτων σε τελικό όγκο 1:25 για χρήση σε αντίδραση PCR
- Φύλαξη στους -80°C των νεοσυντιθέμενων cDNA

#### **4) Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου RT-PCR**

Εκπόνηση ολόκληρης της διαδικασίας στους 4°C πριν την τοποθέτηση των δειγμάτων σε θερμικό κυκλοποιητή. Για κάθε γονίδιο ετοιμάστηκε mix με ποσότητες δείγματος x3 (triplicates) για καλύτερη επαναληψιμότητα. Σε κάθε PCR tube προστίθεται συνολικό όγκος 20μl ( 15μl παραγόμενο mastermix συν 5μl συντιθέμενου cDNA. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν βάση του TAKARA RT-Reagent Kit είναι τα εξής :

- Παρασκευή PCR mastermix για συν 1 δείγμα με τα εξής συνθετικά:
  - SYBRGreen Mix 2x qPCRBio
  - Forward Primer
  - Reverse Primer
  - H<sub>2</sub>O for injection
- Προσθήκη συντιθέμενου cDNA κάθε δείγματος δείγματος σε PCR Mastermix
- Φυγοκέντρηση PCR Tubes
- Μεταφορά PCR Tubes σε θερμικό κυκλοποιητή για εκτέλεση αντίδρασης της πολυμεράσης με συνθήκες :
  - 95° C για 2 min
  - 95° C για 5 sec
  - 60° C για 20 sec
  - 72° C για 10 sec

Εκτέλεση 45 κύκλων.



**Εικόνα Ε.19:** Χαρακτηριστικές εικόνες διεξαγωγής του πειραματικού σχεδιασμού

### **Στατιστική Ανάλυση Αποτελεσμάτων**

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της RT-PCR έγινε με το λογισμικό MXPRO mx3000p της Stratagene και με το Microsoft excel, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο  $\Delta\Delta Ct$  (Pfaffl, 2001). Οι συγκρίσεις (μέση τιμή  $\pm$  τυπικό σφάλμα) έγιναν μεταξύ της κάθε πειραματικής ομάδας και του αντίστοιχου πειράματος αναφοράς ctrl έχοντας ως μέτρο σύγκρισης και το γονίδιο αναφοράς GAPDH. Η στατιστική ανάλυση επιβεβαιώθηκε και με τα προγράμματα GraphPad και Excel με τα οποία επίσης σχεδιάστηκαν και τα ανάλογα διαγράμματα που παρουσιάζονται στην Ενότητα των Αποτελεσμάτων. Και για τα υπόλοιπα αποτελέσματα ακολούθησε σύγκριση (μέση τιμή  $\pm$  τυπικό σφάλμα) μεταξύ της κάθε πειραματικής ομάδας και του αντίστοιχου πειράματος αναφοράς ctrl ενώ επίσης επιβεβαιώθηκε η στατιστική ανάλυση με τα προγράμματα GraphPad και Excel. Τέλος, αναφορικά με τη πυκνομέτρηση των πρωτεϊνικών ζωνών στην ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου παρουσία δωδεκυλοθεικού νατρίου (SDS-PAGE) χρησιμοποιήθηκε τα προγράμματα ανάλυσης εικόνας Image-J και Band Leader.

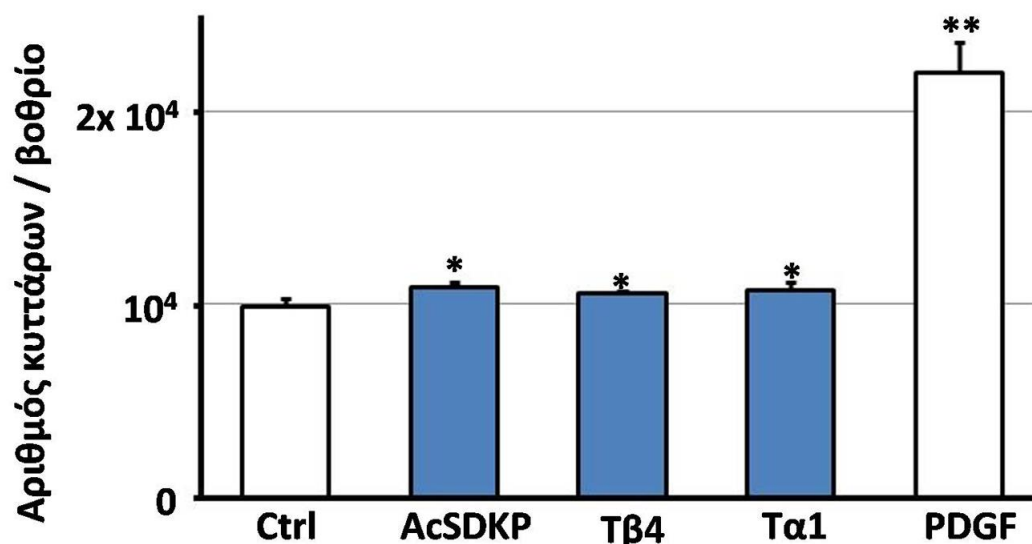
## ***ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.***

### **Έλεγχος της Δράσης των Θυμοσινικών Πεπτιδίων επί Δερματικών Ινοβλαστών όσον αφορά Κυτταρικές Λειτουργίες με κομβικό ρόλο στην Επούλωση Πληγών**

Στο συγκεκριμένο κεφάλαιο της διπλωματικής πειραματικής μελέτης παρατίθενται τα αποτελέσματα των *in vitro* μελετών σε ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες – 2 στελέχη (AG01523 και GM21808) – για την πιθανή επουλωτική δράση των θυμοσινικών πεπτιδίων Τα1, Τβ4 και του αμινοτελικού τετραπεπτιδίου Ac-SDKP. Ειδικότερα μελετώνται διάφορες κυτταρικές λειτουργίες στις οποίες μετέχουν οι ινοβλάστες και αποτελούν κομβικές παραμέτρους της επουλωτικής διαδικασίας, όπως είναι ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η κυτταρική μετανάστευση και η παραγωγή κολλαγόνου. Η μελέτη, όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, βασίζεται και σε προηγούμενα ευρήματα του εργαστηρίου επί της διεγερτικής επίδρασης που έχουν τα συγκεκριμένα θυμοσινικά πεπτίδια στη σύνθεση κολλαγόνου (Εικόνα Ε. 15). Γι' αυτό το λόγο, προβήκαμε επιπλέον και σε μηχανιστικές μελέτες μεταγραφικών και μετα-μεταφραστικών ρυθμίσεων (π.χ. δράση MMPs / TIMPs κ.α.) καθώς επίσης και στον έλεγχο της ενεργοποίησης γνωστών μονοπατιών ενδοκυτταρικής σηματοδότησης υπό την επίδραση των θυμοσινικών πεπτιδίων στους δερματικούς ινοβλάστες.

#### **1. Ποσοτική Εκτίμηση του Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού Ανθρώπινων Δερματικών Ινοβλαστών**

Σκοπός του συγκεκριμένου πειραματικού σχεδιασμού ήταν η εκτίμηση της επίδραση των θυμοσινικών πεπτιδίων Τα1, Τβ4 και του τετραπεπτιδίου Ac-SDKP στο πολλαπλασιαστικό δυναμικό των ινοβλαστών με μέτρηση στο σωματιδιακό αναλυτή. Τα θυμοσινικά πεπτίδια ελέχθηκαν σε συγκέντρωση 10nM , έπειτα από συνεπώασή τους με τα κύτταρα για 72 ώρες απουσία ορού. Η συγκέντρωση επιλέχθηκε βάσει προηγούμενων μελετών σχετικά με την κυτταρική βιωσιμότητα. Ως αρνητικός μάρτυρας (control) χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα που επώαστηκαν σε θρεπτικό μέσο χωρίς την προσθήκη κάποιας ουσίας, ενώ θετικός μάρτυρας ήταν ο PDGF σε συγκέντρωση 10ng/mL, βάσει της προηγούμενης εμπειρίας του εργαστηρίου. Το πείραμα επαναλήφθηκε για n=3.

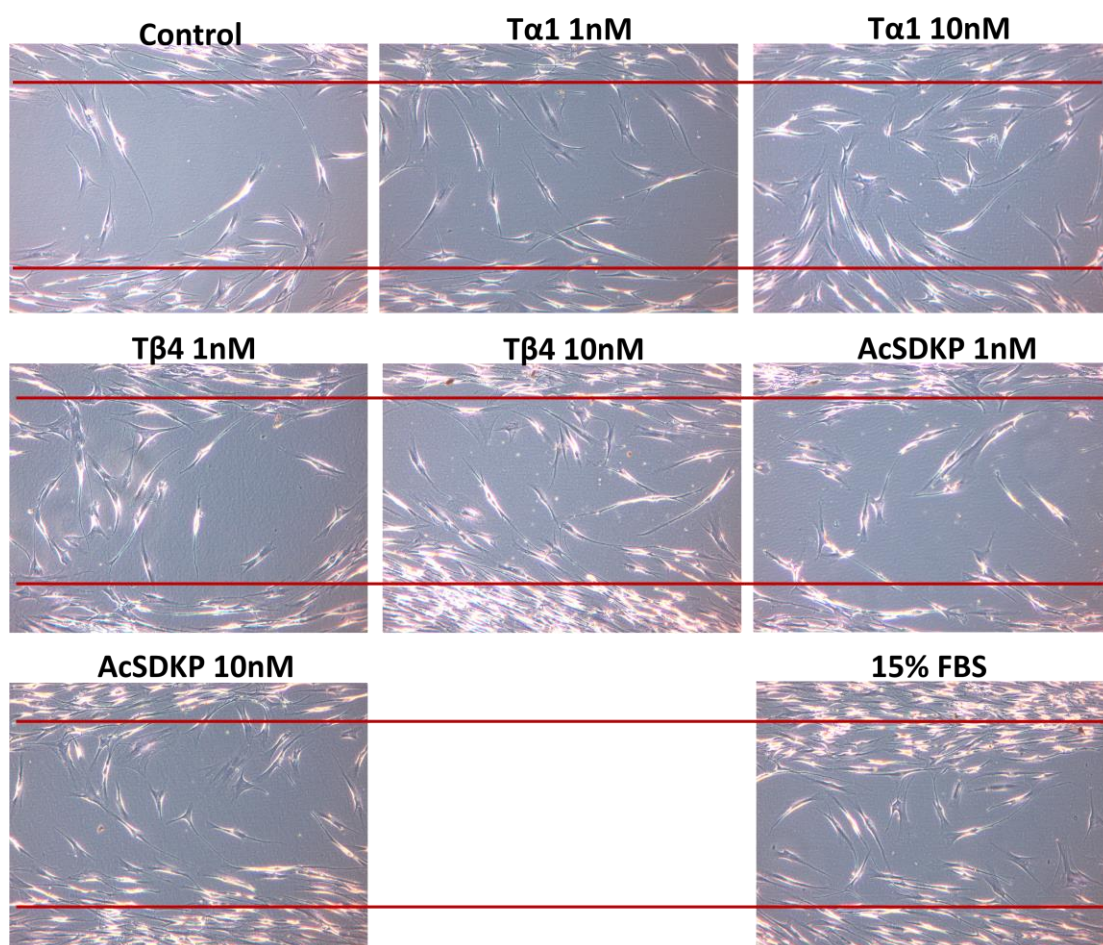


**Εικόνα E.20 :** Ποσοτική διαγραμματική απεικόνιση του πολλαπλασιασμού των δερματικών ινοβλαστών AG01523 έπειτα από επίδραση των θυμοσινικών πεπτιδίων για 72h, συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα (Control-κύτταρα που αναπτύχθηκαν χωρίς την επίδραση κάποιας ουσίας) και το θετικό μάρτυρα (PDGF).

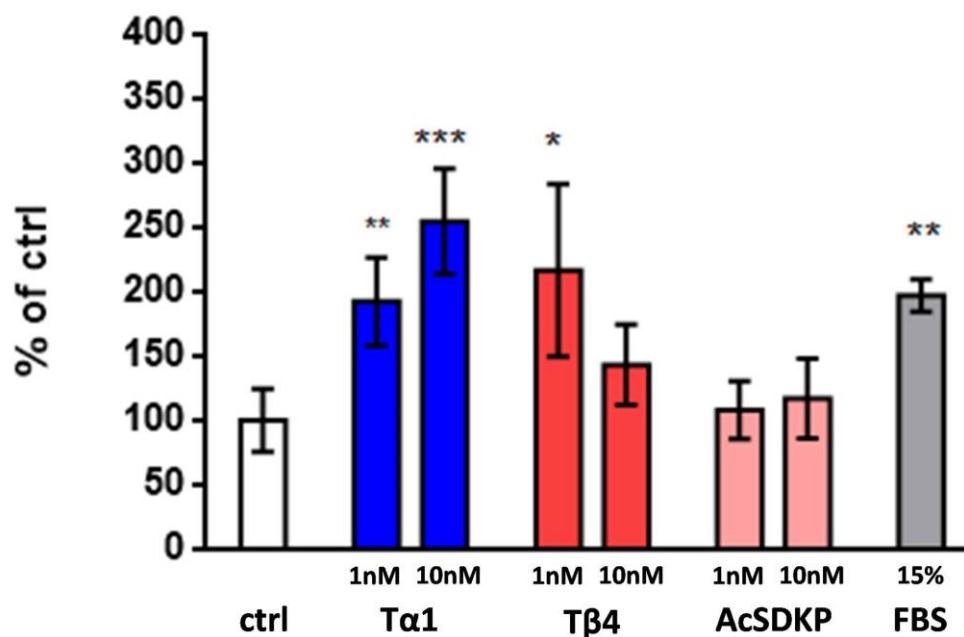
Παρατηρήθηκε ότι και τα τρία θυμοσινικά πεπτίδια διεγείρουν οριακά μεν, στατιστικά σημαντικά δε ( $p < 0.05$ ) τον πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών. Η επιτυχής εφαρμογή της μεθόδου πιστοποιήθηκε από την αναμενόμενη έντονη διέγερση του πολλαπλασιασμού υπό την επίδραση του PDGF.

## 2. Ποσοτική Εκτίμηση της Μετανάστευσης Ανθρώπινων Δερματικών Ινοβλαστών

Ακολούθησε εκτίμηση της επίδραση των θυμοσινικών πεπτιδίων Tα1, Tβ4 και του τετραπεπτιδίου Ac-SDKP ως προς την κυτταρική μετανάστευση των ινοβλαστών. Τα θυμοσινικά πεπτίδια ελέγχθηκαν σε συγκεντρώσεις 1nM και 10nM , έπειτα από συνεπώασή τους με τα κύτταρα για 72 ώρες απουσία ορού. Οι συγκεντρώσεις επελέγησαν βάσει προηγούμενων μελετών σχετικά με την κυτταρική βιωσιμότητα. Ως αρνητικός μάρτυρας (control) χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα που επωάστηκαν σε θρεπτικό μέσο χωρίς την προσθήκη κάποιας ουσίας, ενώ ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε βόειος εμβρυϊκός ορός (15% v/v), βάσει της προηγούμενης εμπειρίας του εργαστηρίου. Το πείραμα επαναλήφθηκε για  $n=3$ .



***Εικόνα E.21 : Χαρακτηριστικές φωτογραφίες της κυτταρικής μετανάστευσης των δερματικών ινοβλαστών AG01523 έπειτα από επίδραση των θυμοσινικών πεπτιδίων για 72h. Αρνητικός μάρτυρας (Control-κύτταρα χωρίς την επίδραση κάποιου παράγοντα), Θετικός μάρτυρας FBS (15% v/v). Οι φωτογραφίες ελήφθησαν σε ανάστροφο μικροσκόπιο με φακό 10x και δακτύλιο αντίθεσης φάσης (phase contrast).***



**Εικόνα E.22 :** Ποσοτική διαγραμματική απεικόνιση της κυτταρικής μετανάστευσης των δερματικών ινοβλαστών AG01523 έπειτα από επίδραση των θυμοσινικών πεπτιδίων για 72h, συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα (Control-κύτταρα που αναπτύχθηκαν χωρίς την επίδραση κάποιας ουσίας) και το θετικό μάρτυρα (15% FBS) Μέσοι όροι  $\pm$  τυπική απόκλιση (n=3).

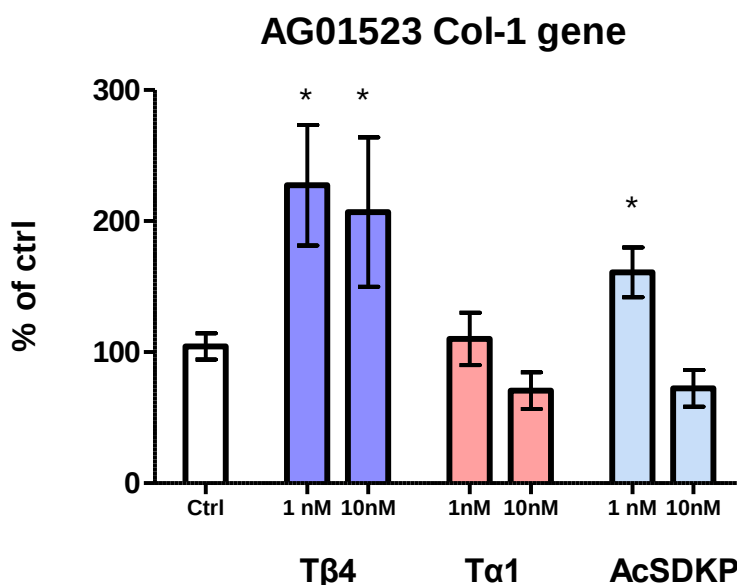
Κατά τη στατιστική ανάλυση των μετρήσεων της κυτταρικής μετανάστευσης (72 ώρες) με τα προγράμματα Excel και GraphPad παρατηρήθηκε ότι και οι δύο συγκεντρώσεις της Ta1 διεγείρουν στατιστικά σημαντικά την κυτταρική μετανάστευση ( $p < 0.001$ ) όπως και η Tβ4 σε συγκέντρωση 1nM ( $p < 0.05$ ) σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Αντίθετα η διέγερση από την Tβ4 σε συγκέντρωση 10nM και από τις δύο συγκεντρώσεις Ac-SDKP δεν είναι στατιστικά σημαντική. Η επιτυχής εφαρμογή της μεθόδου πιστοποιήθηκε από την αναμενόμενη διέγερση της μετανάστευσης υπό την επίδραση του ορού.

### **3. Μελέτη της Παραγωγής και Αποικοδόμησης του Κολλαγόνου σε Ανθρώπινους Δερματικούς Ινοβλάστες**

Βασιζόμενοι στα προηγούμενα αποτελέσματα σχετικά με τη στατιστικά σημαντική διέγερση της κολλαγονοσύνθεσης έπειτα από την επίδραση των θυμοσινικών πεπτιδίων Τα1, Τβ4 και του τετραπεπτιδίου Ac-SDKP (Εικόνα Ε. 15) (Κικκίδου Λένα, 2018), προχωρήσαμε σε μελέτες των επί μέρους μηχανισμών της παραγωγής και αποικοδόμησης του κολλαγόνου στους ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες υπό την επίδραση των τριών θυμοσινικών πεπτιδίων.

#### **3.1. Έλεγχος γονιδιακής έκφρασης με την τεχνική της Real Time RT-PCR**

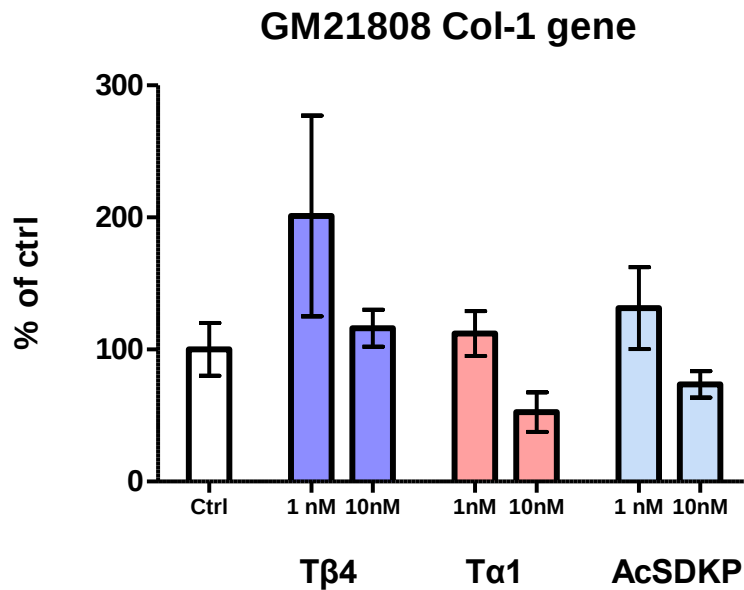
Εν συνεχεία των αποτελεσμάτων σχετικά με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρική μετανάστευση των δερματικών ινοβλαστών προβήκαμε σε περαιτέρω μελέτη της επίδρασης που έχουν τα συγκεκριμένα θυμοσινικά πεπτίδια σε επίπεδο μεταγραφής του mRNA των δύο βασικών γονιδίων του κολλαγόνου στο δέρμα (κολλαγόνο-I και -III), καθώς και δύο κολλαγονολυτικών ενζύμων (MMP-1 και -2) και των ιστικών αναστολέων τους (TIMP-1 και -2). Τα θυμοσινικά πεπτίδια ελέγχθηκαν σε συγκέντρωση 1nM και 10nM, έπειτα από συνεπώασή τους με τα κύτταρα για 48 ώρες,. Ως αρνητικός μάρτυρας (control) χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα που επωάστηκαν σε θρεπτικό μέσο χωρίς την προσθήκη κάποιας ουσίας. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε και για τις δύο σειρές δερματικών ινοβλαστών που ελέγξαμε εξαρχής και επαναλήφθηκε για  $n=3$ .



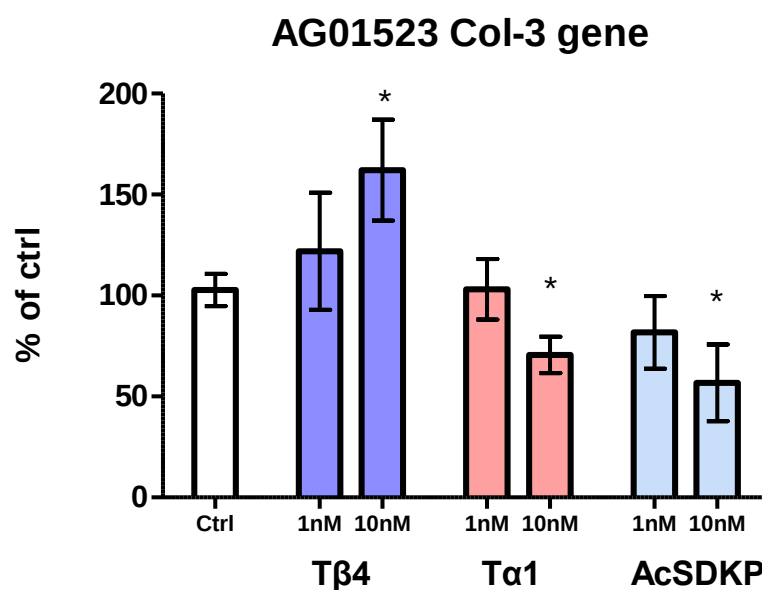
***Εικόνα E.23: Ποσοτική διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου που κωδικοποιεί το κολλαγόνο τύπου I (Col-1) έπειτα από επίδραση με τα θυμοσινικά πεπτίδια Tα1, Tβ4 και Ac-SDKP σε συγκεντρώσεις 1nM και 10nM σε κύτταρα δερματικών ινοβλαστών AG01523 συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα (Control-κύτταρα που αναπτύχθηκαν χωρίς την επίδραση κάποιας ουσίας). Η έκφραση του μελετώμενου γονιδίου έχει κανονικοποιηθεί ως προς το γονίδιο αναφοράς GAPDH (GAPDH gene).***

Παρατηρούμε (Εικόνα E.23) ότι τόσο η Tβ4 και στις δύο συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν όσο και το αμινοτελικό της πεπτίδιο Ac-SDKP στη συγκέντρωση 1 nM διεγείρουν στατιστικά σημαντικά τη μεταγραφή του γονιδίου του κολλαγόνου τύπου I. Το ίδιο παρατηρήθηκε και κατά τη μελέτη του δεύτερου στελέχους ανθρωπίνων δερματικών ινοβλαστών GM21808 (Εικόνα E.24), αν και στην περίπτωση αυτή οι τυπικές αποκλίσεις ήταν αρκετά μεγάλες, ούτως ώστε τα αποτελέσματα να μην είναι στατιστικά σημαντικά.

Αντίθετα η γονιδιακή έκφραση του κολλαγόνου τύπου III διεγείρεται μόνο από τη μέγιστη συγκέντρωση Tβ4 (10 nM), παραμένει ανεπηρέαστη από τα θυμοσινικά πεπτίδια σε συγκέντρωση 1 nM και αναστέλλεται από τις συγκεντρώσεις 10 nM των Tα1 και Ac-SDKP, καθώς και από το συνδυασμό Tβ4 και Tα1 (Εικόνα E.25).

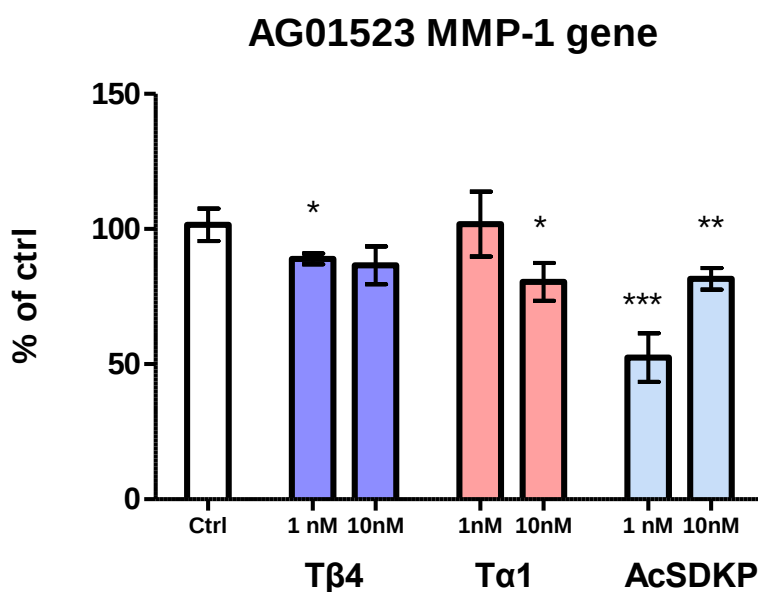


**Εικόνα Ε.24:** Ποσοτική διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου που παράγει κολλαγόνο τύπου I (Col-1) έπειτα από επίδραση με τα θυμοσινικά πεπτίδια Tα1, Tβ4 και Ac-SDKP σε συγκεντρώσεις 1nM και 10nM σε κύτταρα δερματικών ινοβλαστών GM21808 συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα (Control-κύτταρα που αναπτύχθηκαν χωρίς την επίδραση κάποιας ουσίας). Η έκφραση του μελετώμενου γονιδίου έχει κανονικοποιηθεί ως προς το γονίδιο αναφοράς GAPDH (GAPDH gene).



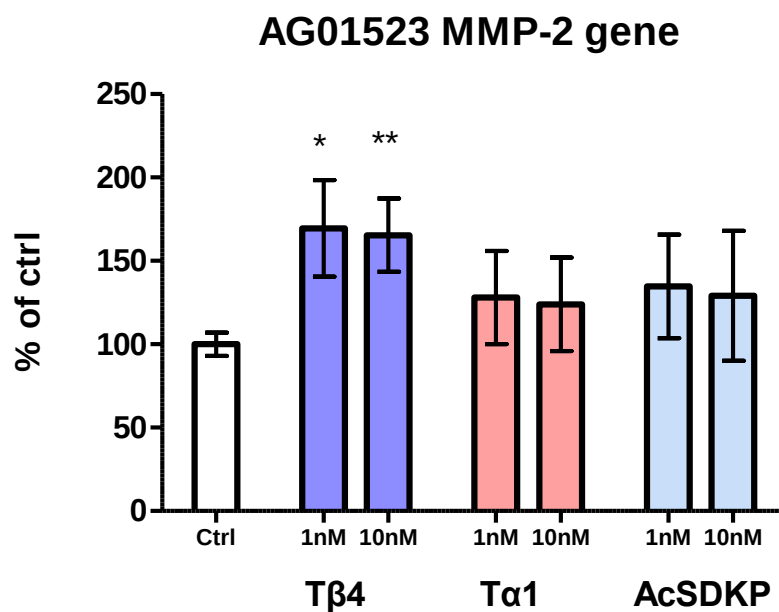
**Εικόνα E.25 :** Ποσοτική διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου που παράγει κολλαγόνο τύπου III (Col-3) έπειτα από επίδραση με τα θυμοσινικά πεπτίδια Tα1, Tβ4 και Ac-SDKP σε συγκεντρώσεις 1nM και 10nM σε κύτταρα δερματικών ινοβλαστών AG01523 συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα (Control-κύτταρα που αναπτύχθηκαν χωρίς την επίδραση κάποιας ουσίας). ). Η έκφραση του μελετώμενου γονιδίου έχει κανονικοποιηθεί ως προς το γονίδιο αναφοράς GAPDH (GAPDH gene).

Εν συνεχεία των παραπάνω αποτελεσμάτων θελήσαμε να ελέγξουμε και την επίδραση επί των ανθρωπίνων δερματικών ινοβλαστών των θυμοσινικών πεπτιδίων Tα1, Tβ4 και Ac-SDKP σε μεταγραφικό επίπεδο ως προς την έκφραση δύο βασικών μεταλλοπρωτεϊνών που παράγονται από τους δερματικούς ινοβλάστες και πιο συγκεκριμένα των κολλαγονολυτικών ενζύμων MMP-1 και -2.



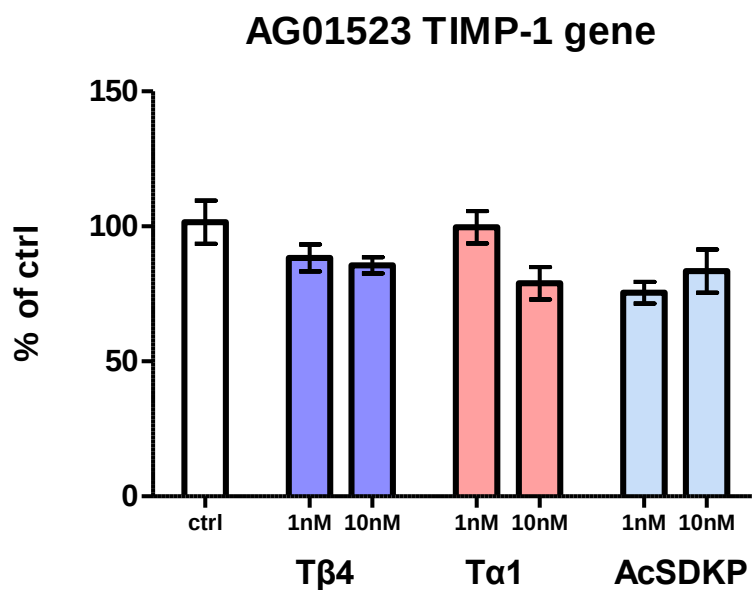
**Εικόνα E.26:** Ποσοτική διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου που παράγει τη μεταλλοπρωτεϊνάση MMP-1 έπειτα από επίδραση με τα θυμοσινικά πεπτίδια Tα1, Tβ4 και Ac-SDKP σε συγκεντρώσεις 1nM και 10nM σε κύτταρα δερματικών ινοβλαστών AG01523 συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα (Control-κύτταρα που αναπτύχθηκαν χωρίς την επίδραση κάποιας ουσίας). ). Η έκφραση του μελετώμενου γονιδίου έχει κανονικοποιηθεί ως προς το γονίδιο αναφοράς GAPDH (GAPDH gene).

Όπως φαίνεται στην Εικόνα E.26 η έκφραση του γονιδίου MMP-1 καταστέλλεται ήπια από την Tβ4 (1 nM) και την Τα1 (10 nM) και πιο έντονα και από τις δύο συγκεντρώσεις Ac-SDKP που μελετήθηκαν. Αντίθετα η έκφραση του γονιδίου MMP-2 διεγείρεται στατιστικά σημαντικά και από τις δύο συγκεντρώσεις Tβ4 που μελετήθηκαν (1 nM και 10 nM), όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα E.27.

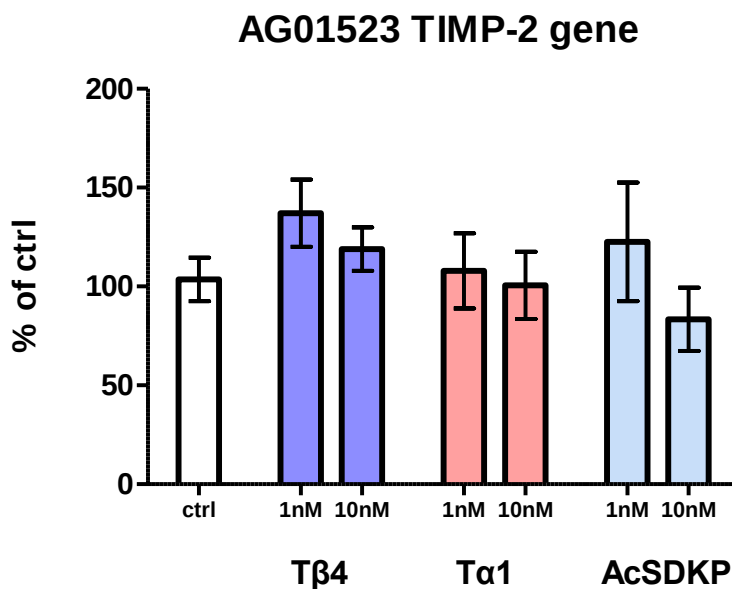


***Εικόνα E.27 : Ποσοτική διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου που παράγει τη μεταλλοπρωτεϊνάση MMP-2 έπειτα από επίδραση με τα θυμοσινικά πεπτίδια Τα1, Tβ4 και Ac-SDKP σε συγκεντρώσεις 1nM και 10nM σε κύτταρα δερματικών ινοβλαστών AG01523 συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα (Control-κύτταρα που αναπτύχθηκαν χωρίς την επίδραση κάποιας ουσίας). Η έκφραση του μελετώμενου γονιδίου έχει κανονικοποιηθεί ως προς το γονίδιο αναφοράς GAPDH (GAPDH gene).***

Τέλος, μελετήσαμε τα θυμοσινικά πεπτίδια Τα1, Tβ4 και Ac-SDKP σε συγκεντρώσεις 1nM και 10nM όσον αφορά την επίδρασή τους στη γονιδιακή έκφραση των ιστικών αναστολέων μεταλλοπρωτεϊνών TIMP-1 και TIMP-2 σε κύτταρα δερματικών ινοβλαστών AG01523.



***Εικόνα E.28 :** Ποσοτική διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου που παράγει τον αναστολέα *TIMP-1*, της μεταλλοπρωτεϊνάσης *MMP-1*, έπειτα από επίδραση με τα θυμοσινικά πεπτίδια *Tα1*, *Tβ4* και *Ac-SDKP* σε συγκεντρώσεις *1nM* και *10nM* σε κύτταρα δερματικών ινοβλαστών *AG01523* συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα (*Control*-κύτταρα που αναπτύχθηκαν χωρίς την επίδραση κάποιας ουσίας). ). Η έκφραση του μελετώμενου γονιδίου έχει κανονικοποιηθεί ως προς το γονίδιο αναφοράς *GAPDH* (*GAPDH* gene).*



**Εικόνα E.29 : Ποσοτική διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου που παράγει τον αναστολέα TIMP-2, της μεταλλοπρωτεϊνάσης MMP-2, έπειτα από επίδραση με τα θυμοσινικά πεπτίδια Ta1, Tβ4 και Ac-SDKP σε συγκεντρώσεις 1nM και 10nM σε κύτταρα δερματικών ινοβλαστών AG01523 συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα (Control-κύτταρα που αναπτύχθηκαν χωρίς την επίδραση κάποιας ουσίας). ). Η έκφραση του μελετώμενου γονιδίου έχει κανονικοποιηθεί ως προς το γονίδιο αναφοράς GAPDH (GAPDH gene).**

Όπως φαίνεται στις εικόνες E.28 και E.29 μόνο η Ta1 σε συγκέντρωση 10 nM και το Ac-SDKP σε συγκέντρωση 1 nM προκάλεσαν ήπια καταστολή της γονιδιακής έκφρασης του TIMP-1, ενώ κανένα από τα θυμοσινικά πεπτίδια δεν επέφερε στατιστικά σημαντική μεταβολή στην έκφραση του γονιδίου TIMP-2.

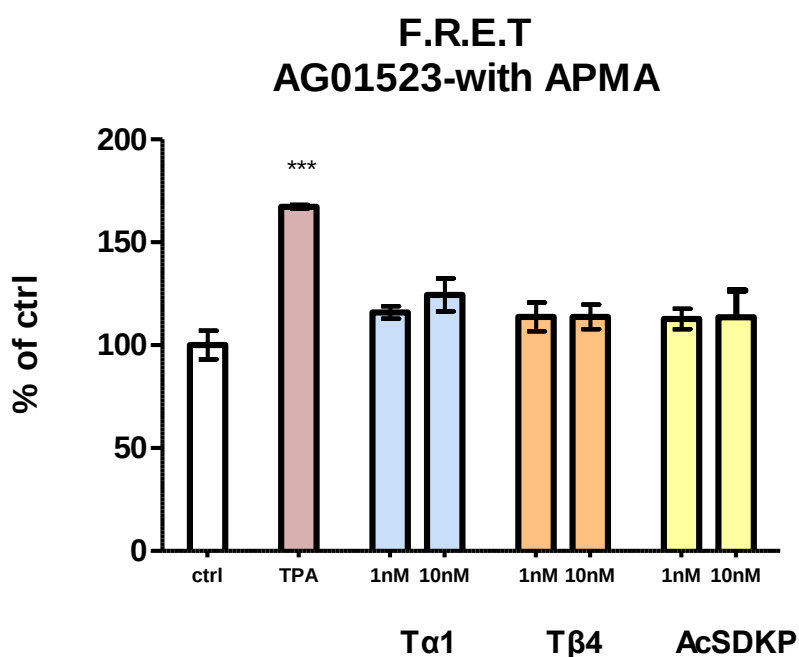
### **3.2 Έλεγχος της Ενεργότητας Μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs) που εκκρίνονται από ανθρώπινους Δερματικούς Ινοβλάστες**

#### **3.2.1. Ποσοτική ανάλυση της πέψης συνθετικού υποστρώματος που εμφανίζει φθορισμό μέσω μεταφοράς ενέργειας λόγω συντονισμού (FRET)**

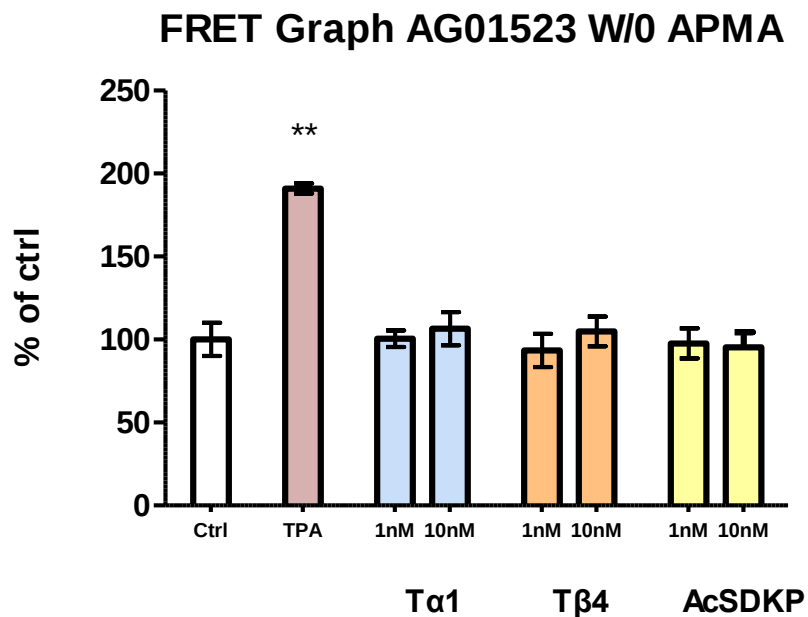
Σκοπός του συγκεκριμένου πειραματικού σχεδιασμού ήταν η εκτίμηση σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο της επίδραση των θυμοσινικών πεπτιδίων Ta1, Tβ4 και του τετραπεπτιδίου Ac-SDKP επί της συνολικής ενεργότητας MMPs που εκκρίνονται στο εξωκυττάριο υγρό των ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών Τα θυμοσινικά πεπτίδια ελέγχθηκαν σε συγκεντρώσεις 1nM και 10 nM, έπειτα από συνεπώασή τους με τα κύτταρα για 48 ώρες. Ως αρνητικός μάρτυρας (control) χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα που επωάστηκαν σε θρεπτικό μέσο χωρίς την προσθήκη κάποιας ουσίας, ενώ θετικός μάρτυρας ήταν ο φορβολικός εστέρας phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), γνωστός και με την

εναλλακτική ονομασία 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) που χορηγήθηκε στα κύτταρα σε συγκέντρωση 10ng/mL, η οποία σύμφωνα και με προηγούμενα δεδομένα του

εργαστηρίου επάγει την έκφραση των μεταλλοπρωτεϊνών. Επιπλέον, τα εθισμένα μέσα (conditioned media) των καλλιιεργειών ελέγχθηκαν τόσο ως είχαν, όσο και μετά από ενεργοποίηση των περιεχομένων σε αυτά μεταλλοπρωτεϊνών με οξικό 4-αμινο-φαινυλ-υδράργυρος (4-aminophenylmercuric acetate: APMA). Το πείραμα επαναλήφθηκε για n=3.



***Εικόνα E.30: Ποσοτική διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων των ενεργοποιημένων MMPs, από τον παράγοντα APMA, που εκκρίνονται στον εξωκυττάριο χώρο των ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών AG01523 έπειτα από επίδραση των θυμοσινικών πεπτιδίων Ta1, Tβ4 και Ac-SDKP για 48h, συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα (Control-κύτταρα που αναπτύχθηκαν χωρίς την επίδραση κάποιας ουσίας) και το θετικό μάρτυρα (πρωτεΐνη TPA).***

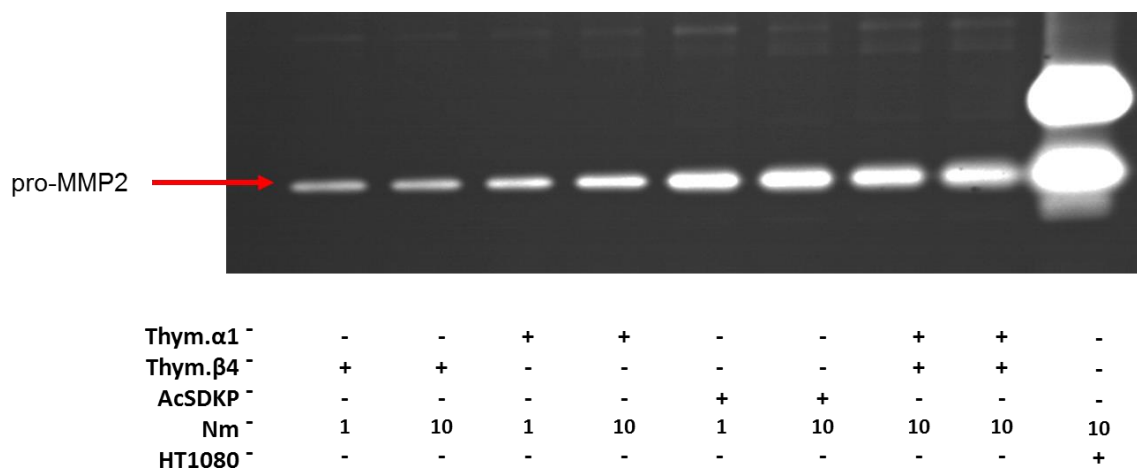


***Εικόνα E.31 : Ποσοτική διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων των συνολικών (ενεργοποιημένων και μη ενεργοποιημένων) MMPs που εκκρίνονται στον εξωκυττάριο χώρο των ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών AG01523 έπειτα από επίδραση των θυμοσινικών πεπτιδίων για 48h, συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα (Control-κύτταρα που αναπτύχθηκαν χωρίς την επίδραση κάποιας ουσίας) και το θετικό μάρτυρα (TPA).***

Όπως φαίνεται στις εικόνες E.30 και E.31 δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή της εκκρινόμενης ενεργότητας μεταλλοπρωτεϊνών στις καλλιέργειες που είχαν επωασθεί με τα θυμοσινικά πεπτίδια σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα. Η επιτυχής εφαρμογή της μεθόδου πιστοποιήθηκε από την αναμενόμενη διέγερση της ενεργότητας MMPs από το θετικό μάρτυρα, τόσο σε επίπεδο ενεργών MMPs (χωρίς επεξεργασία με APMA) όσο και σε επίπεδο ολικών MMPs (μετά από επεξεργασία με APMA) .

### 3.2.2. Ανίχνευση Μεταλλοπρωτεϊνών με τη Μέθοδο του Ζυμογραφήματος Ζελατίνης

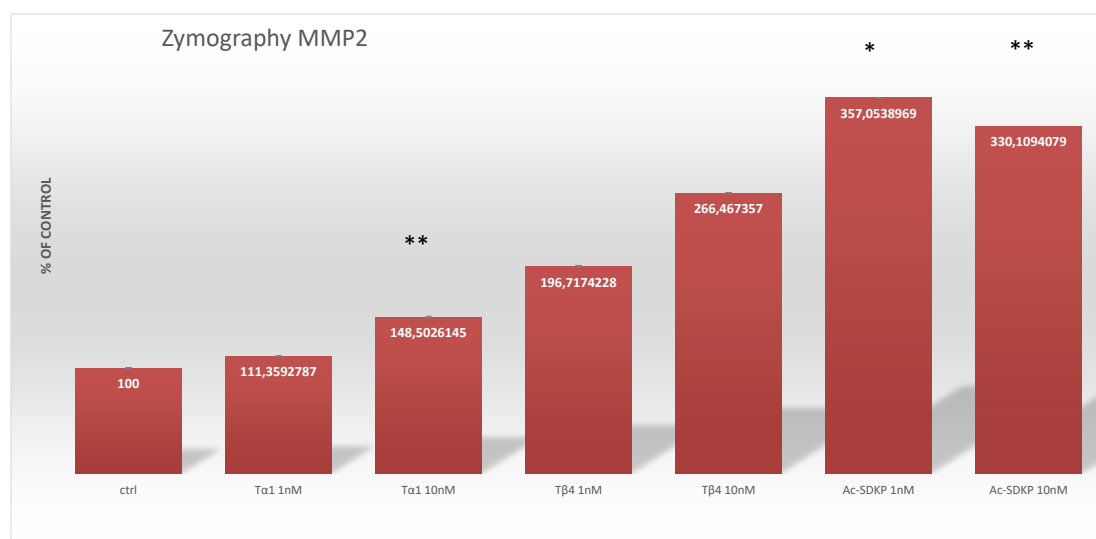
Τα ανωτέρω εθισμένα μέσα καλλιέργειας ανθρωπίνων δερματικών ινοβλαστών AG01523 υπό την επίδραση των θυμοσινικών πεπτιδίων Τα1, Τβ4 και του τετραπεπτιδίου Ac-SDKP ελέγχθηκαν και όσον αφορά την έκκριση των ζελατινολυτικών ενζύμων MMP-2 και MMP-. Όπως και ανωτέρω, τα θυμοσινικά πεπτίδια ελέγχθηκαν σε συγκεντρώσεις 1nM και 10nM, έπειτα από συνεπώασή τους με τα κύτταρα για 48 ώρες. Ως αρνητικός μάρτυρας (control) χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα που επωάστηκαν σε θρεπτικό μέσο χωρίς την προσθήκη κάποιας ουσίας. Η πειραματική διαδικασία επαναλήφθηκε για n=3.



**Εικόνα E.32 :** Αντιπροσωπευτική απεικόνιση των επιπέδων της MMP-2 (pro-MMP2) που εκκρίνεται στο εθισμένο μέσο καλλιέργειας των δερματικών ινοβλαστών AG01523 έπειτα από επίδραση των θυμοσινικών πεπτιδίων Τα1, Τβ4, Ac-SDKP και Τα1+Τβ4 για 48h σε συγκέντρωση ζελατίνης: 0.025% w/v και σε πηκτή (gel) ηλεκτροφόρησης 10% SDS-PAGE, συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα (Control-κύτταρα που αναπτύχθηκαν χωρίς την επίδραση κάποιας ουσίας) και το θετικό μάρτυρα (εθισμένο μέσο κυττάρων ινοσαρκώματος HT1080).

Στην παραπάνω εικόνα παρατηρείται αύξηση στη συγκέντρωση της proMMP-2 που εκκρίνεται στο υπερκείμενο θρεπτικό μέσο των δερματικών ινοβλαστών AG01523 έπειτα από την επίδραση της Τα1, ειδικότερα στα 10 nM, ενώ εντονότερη είναι η αύξηση με τα την επίδραση του τετραπεπτιδίου Ac-SDKP (C= 1nM και 10nM). Έπειτα από την επανάληψη

του πειράματος για δεύτερη φορά, ακολούθησε ποσοτικοποίηση των ζωνών της MMP-2 με τη μέθοδο της πυκνομετρίας και τα προγράμματα ανάλυσης εικόνας Image-J και Band Leader. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων (t-Test) έγινε με το πρόγραμμα Excel και το πρόγραμμα Graphpad.



***Εικόνα E.33 : Διαγραμματική απεικόνιση των πρωτεϊνικών ζωνών για την εκκρινόμενη μεταλλοπρωτεϊνάση MMP-2 (επί των δερματικών ινοβλαστών AG01523, συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα (Control-κύτταρα που αναπτύχθηκαν χωρίς την επίδραση κάποιας ουσίας).***

Παρατηρείται καθολική αύξηση της proMMP2 με την δράση των θυμοσινικών πεπτιδίων η οποία είναι εντονότερη με το τετραπεπτίδο Ac-SDKP (1nM και 10nM). Στατιστική σημαντικότητα ( $p < 0,05$ ), ωστόσο, παρατηρείται με την επίδραση της Ta1 (10nM) και με το τετραπεπτίδο Ac-SDKP (1nM και 10nM).

#### 4. Μελέτη της Επίδρασης των Θυμοσινικών Πεπτιδίων Μονοπάτια Ενδοκυτταρικής Σηματοδότησης

Παράλληλα με τις ανωτέρω μελέτες κυτταρικών λειτουργιών σχετιζόμενων με την επούλωση, θελήσαμε να ελέγξουμε και ορισμένα κομβικά σηματοδοτικά μονοπάτια που συμμετέχουν στις λειτουργίες αυτές, ώστε να διασαφηνίσουμε εάν τα θυμοσινικά πεπίδια Τα1 και Τβ4 διεγείρουν τους συγκεκριμένους μηχανισμούς ενδοκυτταρικής σηματοδότησης. Η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε με λήψη κυτταρικών λυμάτων (cell lysates) από τις εκάστοτε κυτταροκαλλιέργειες, έπειτα από επίδραση με τα παραπάνω θυμοσινικά πεπτίδια, σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές ώστε να ελεγχθεί η ένταση και η χρονοεξάρτηση της πιθανής ενεργοποίησης.

Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά το σηματοδοτικό μονοπάτι των Smad πρωτεϊνών επιχειρήσαμε να ελέγξουμε την επιρροή των θυμοσινικών πεπτιδίων σε συνδυασμό με τον αυξητικό παράγοντα TGF-β, που είναι γνωστό από την βιβλιογραφία ότι επάγει τις Smad πρωτεΐνες βασιζόμενοι στο αποτέλεσμα σχετικά με τη διέγερση της κολλαγονοσύνθεσης έπειτα από τη συνεργατική τους δράση. Για τις Smad πρωτεΐνες έγινε μετέπειτα έλεγχος πυκνομέτρησης των πρωτεϊνικών ζωνών για ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής έκφρασης με τη βοήθεια των προγραμμάτων Image J καθώς και Bnad Leader.

p-Smad3 / Τα1 (10nM) σε AG cells



ctrl Ta1-15' Ta1-30' Ta1-1h Ta1-3h Ta1-6h Ta1-12h Ta1-24h

50 μl / L

***Εικόνα E.34: Αντιπροσωπευτική απεικόνιση των πρωτεϊνικών ζωνών για τη φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη Smad-3 στις διαφορετικές χρονικές στιγμές με επίδραση της θυμοσίνης Τα1 σε συγκέντρωση 10nM σε δερματικούς ινοβλάστες AG01523, συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα (Control-κύτταρα που αναπτύχθηκαν χωρίς την επίδραση κάποιας ουσίας) και το θετικό μάρτυρα TGF-β.***

pSmad2 / Tβ4 (10nM ) σε AG cells



TGF-beta Ta1-24h Ta1-12h Ta1-6h Ta1-3h Ta1-1h Ta1-30' Ta1-15' ctrl

50 μl / L

pSmad2 / Tβ4 (10nM) σε AG cells



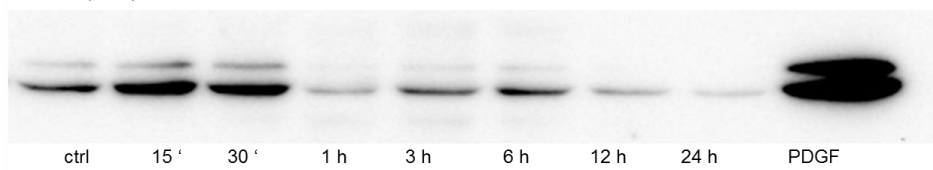
TGF-beta Tβ4-24h Tβ4-12h Tβ4-6h Tβ4-3h Tβ4-1h Tβ4-30' Tβ4-15' ctrl

50 μl / L

***Εικόνα E.35: Αντιπροσωπευτική απεικόνιση των πρωτεϊνικών ζωνών για τη φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη Smad-2 στις διαφορετικές χρονικές στιγμές με επίδραση της θυμοσίνης Ta1 και της Tβ4 σε συγκέντρωση 10nM σε δερματικούς ινοβλάστες AG01523, συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα (Control-κύτταρα που αναπτύχθηκαν χωρίς την επίδραση κάποιας ουσίας) και το θετικό μάρτυρα TGF-β.***

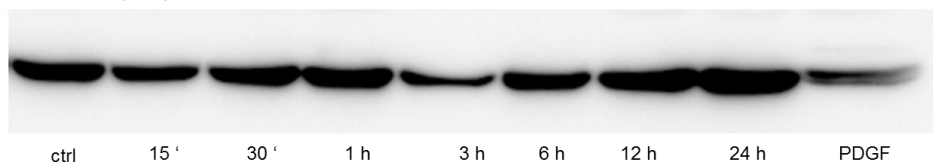
Όπως φαίνεται από τις εικόνες E.34 και E.35 δεν παρατηρήθηκε φωσφορυλίωση των Smad2 και Smad3 υπό την επίδραση των μελετώμενων θυμοσινικών πεπτιδίων.

pERK, σε AG cells με Tβ4



50 μl / L

panERK, σε AG cells με Tβ4

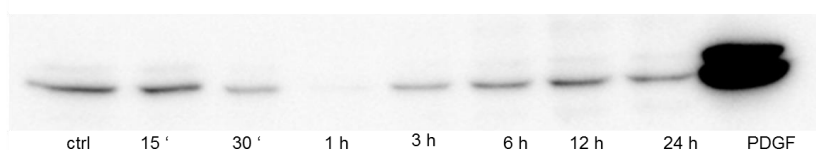


50 μl / L

31

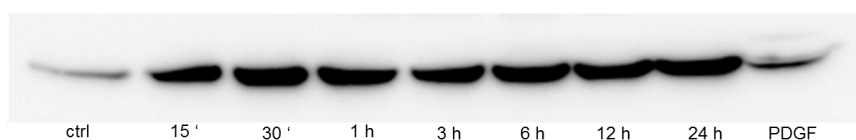
***Εικόνα E.36 :*** Αντιπροσωπευτική απεικόνιση των πρωτεϊνικών ζωνών για την φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη ERK (pERK) (άνω) και την ολική πρωτεΐνη ERK (κάτω) στις διαφορετικές χρονικές στιγμές με επίδραση της θυμοσίνης Tβ4 σε συγκέντρωση 10nM σε δερματικούς ινοβλάστες AG01523, συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα (Control-κύτταρα που αναπτύχθηκαν χωρίς την επίδραση κάποιας ουσίας) και τον θετικό μάρτυρα PDGF. Ο έλεγχος της ολικής πρωτεΐνης ERK (panERK) πραγματοποιήθηκε για επιβεβαίωση της ισοφόρτωσης των δειγμάτων κατά την ηλεκτροφόρηση.

pERK, σε AG cells με Ta1



50 μl / L

panERK, σε AG cells με Ta1



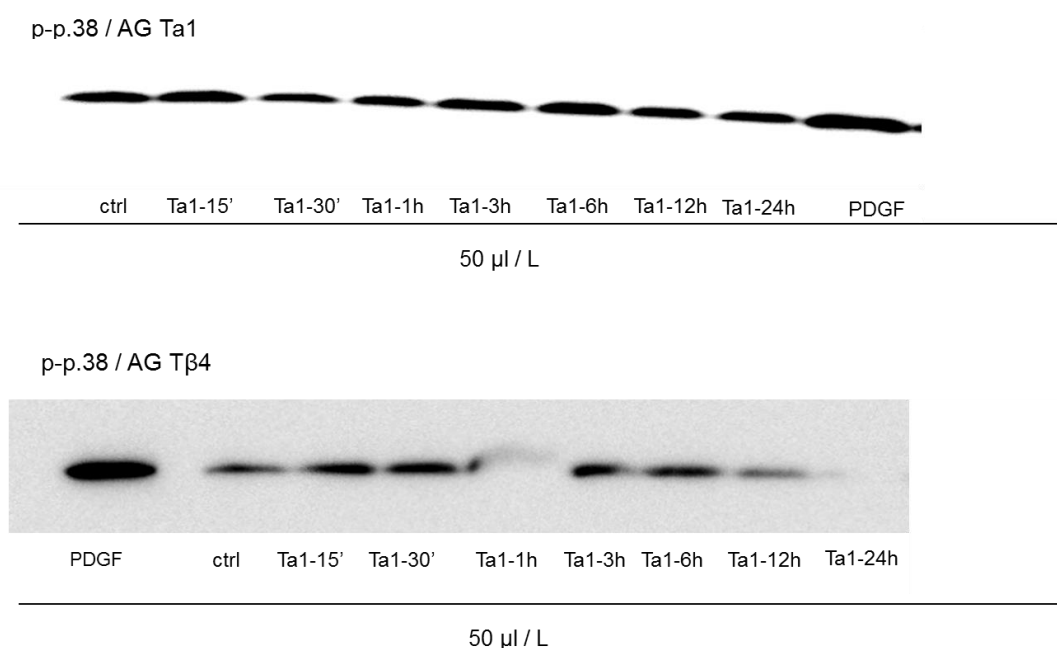
50 μl / L

33

***Εικόνα E.37 :*** Αντιπροσωπευτική απεικόνιση των πρωτεϊνικών ζωνών για την φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη ERK (pERK) (άνω) και την ολική πρωτεΐνη ERK (κάτω) στις

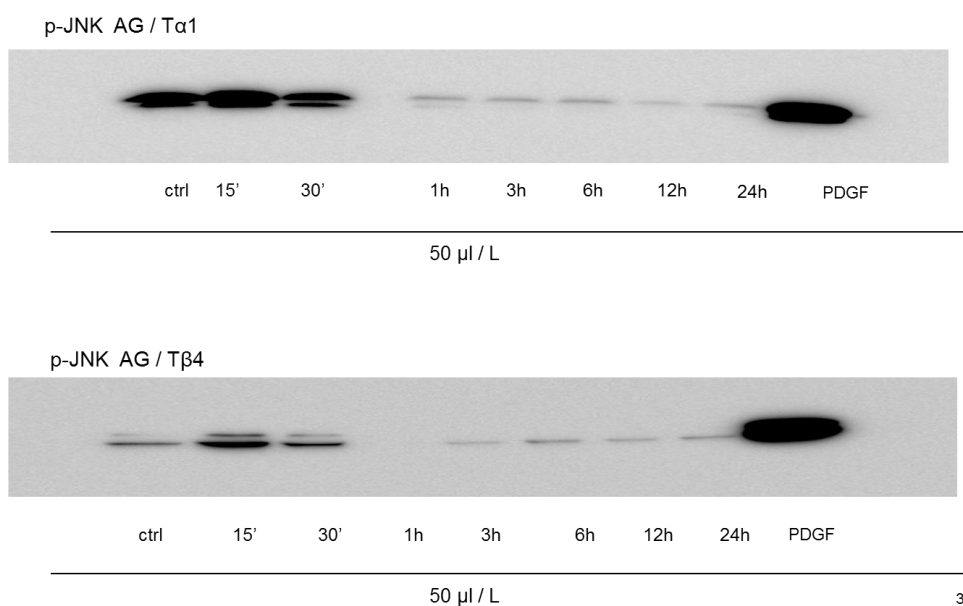
*διαφορετικές χρονικές στιγμές με επίδραση της θυμοσίνης Ta1 σε συγκέντρωση 10nM σε δερματικούς ινοβλάστες AG01523, συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα (Control-κύτταρα που αναπτύχθηκαν χωρίς την επίδραση κάποιας ουσίας) και τον θετικό μάρτυρα PDGF. Ο έλεγχος της ολικής πρωτεΐνης ERK (panERK) πραγματοποιήθηκε για επιβεβαίωση της ισοφόρτωσης των δειγμάτων κατά την ηλεκτροφόρηση.*

Τα θυμοσινικά πεπτίδια Ta1 και Tβ4 επί των δερματικών ινοβλαστών AG01523 φαίνεται να επηρεάζουν στα αρχικά στάδια προσθήκης τους, προκαλώντας μία έντονη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης ERK η οποία μειώνεται με την πάροδο του χρόνου και παρατηρείται ξανά στις 3 ώρες μία μικρή αύξησή της έως τα αρχικά επίπεδα. Το φαινόμενο αυτό είναι πιο έντονο για την Tβ4 ενώ με την Ta1 παρατηρείται ίδιο επίπεδο φωσφορυλίωσης για όλες τις χρονικές στιγμές πέραν της 1 ώρας όπου αναστέλλεται εντελώς η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης ERK.



**Εικόνα E.38 :** Αντιπροσωπευτική απεικόνιση των πρωτεϊνικών ζωνών για την φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη p.38 (p-p.38) (άνω) και την ολική πρωτεΐνη p.38 (κάτω) στις διαφορετικές χρονικές στιγμές με επίδραση της θυμοσίνης Ta1 και της θυμοσίνης Tβ4 σε συγκέντρωση 10nM σε δερματικούς ινοβλάστες AG01523, συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα (Control-κύτταρα που αναπτύχθηκαν χωρίς την επίδραση κάποιας ουσίας) και τον θετικό μάρτυρα PDGF.

Όσον αφορά την φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης p38 δεν παρατηρείται κάποια διακριτή διαφορά με τη δράση του θυμοσινικού πεπτιδίου Ta1 ενώ με το πεπτίδιο Tβ4 παρατηρείται ασθενής διέγερση μέχρι τις 6 ώρες με την επίδραση της θυμοσίνης ενώ με την πάροδο του χρόνου (T=12h και T=24h) παρατηρείται μία έντονη μείωση στην φωσφορυλίωση.

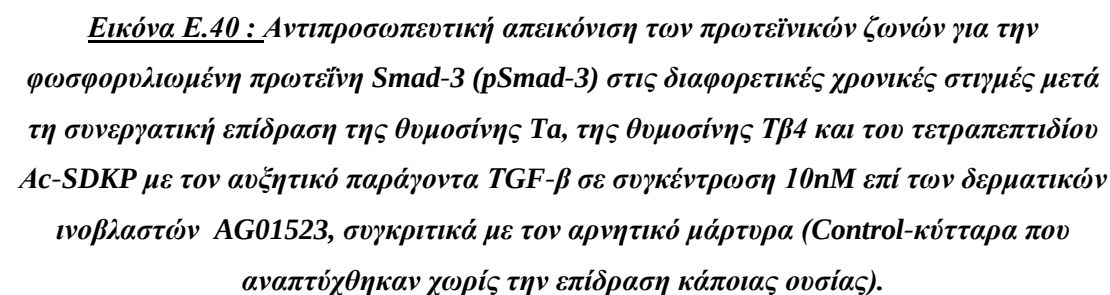


***Εικόνα E.39: Αντιπροσωπευτική απεικόνιση των πρωτεϊνικών ζωνών για την φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη JNK (pJNK) (άνω) και την ολική πρωτεΐνη JNK (κάτω) στις διαφορετικές χρονικές στιγμές με επίδραση της θυμοσίνης Ta1 και της θυμοσίνης Tβ4 σε συγκέντρωση 10nM σε δερματικούς ινοβλάστες AG01523, συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα (Control-κύτταρα που αναπτύχθηκαν χωρίς την επίδραση κάποιας ουσίας) και τον θετικό μάρτυρα PDGF.***

Σχετικά με την JNK και την επίδραση της θυμοσίνης Tβ4 παρατηρείται μία έντονη φωσφορυλίωση στις πρώτες χρονικές στιγμές έπειτα από την προσθήκη των θυμοσινικών πεπτιδίων στους ινοβλάστες (T=15min και T=30min) η οποία μειώνεται άμεσα καθώς πλησιάζουμε τις 24 ώρες. Η φωσφορυλίωση είναι εντονότερη με τη επίδραση της Ta1 συγκριτικά με την Tβ4. Και σε αυτήν την MAP Κινάση παρατηρείται μηδαμινή φωσφορυλίωση στην 1 ώρα.,

Τα παραπάνω αποτελέσματα μας δίνουν ενδείξεις για την ενεργοποίηση ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών από τα θυμοσινικά πεπτίδια, είναι όμως απαραίτητη η

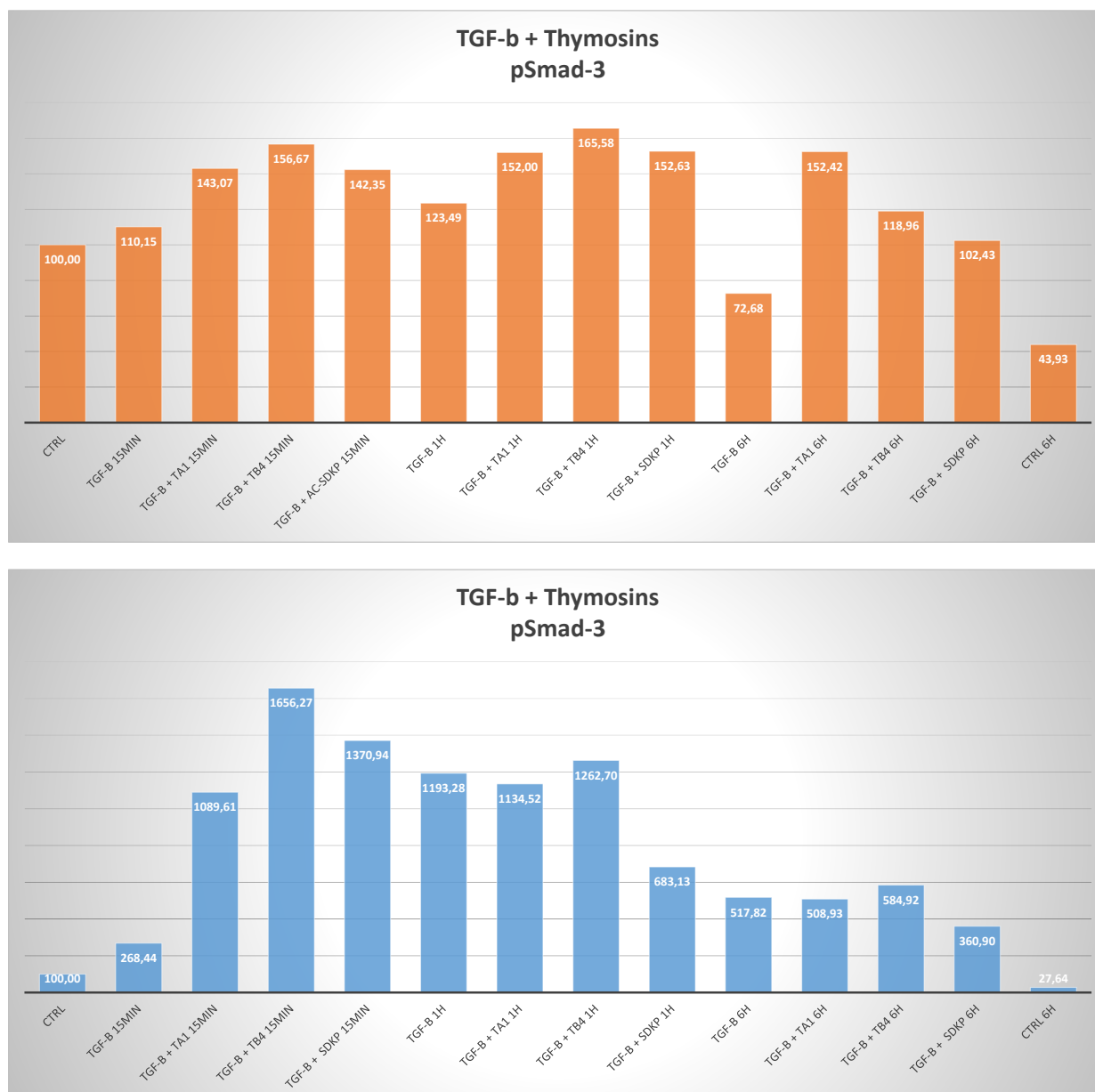
Τέλος, παρά τη μη ενεργοποίηση των πρωτεϊνών Smad από τα θυμοσινικά πεπτιδία (βλ. ανωτέρω εικόνες E.34 και E.35 λόγω της συνεργιστικής δράσης θυμοσινών και TGF- $\beta$  στην παραγωγή κολλαγόνου (Εικόνα E.15) επιχειρήσαμε να ελέγξουμε την ταυτόχρονη επίδραση των θυμοσινικών πεπτιδίων Ta1, T $\beta$ 4 και του τετραπεπτιδίου Ac-SDKP με τον αυξητικό παράγοντα TGF- $\beta$  σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές, όσον αφορά την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Smad-3, η διέγερση της οποίας έχει δειχθεί ότι είναι απαραίτητη για τη ρύθμιση του γονιδίου του κολλαγόνου τύπου-I στους ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες (Purohit T., et al., 2016).



137

θυμοσινικών πεπτιδίων Τα1, Τβ4 και του τετραπεπτιδίου Ac-SDKP η οποία παραμένει και μετά τη πάροδο της 1 ώρας, ενώ στις 6 ώρες η φωσφορυλίωση μειώνεται.

Το πείραμα επαναλήφθηκε για n=3 και ακολούθησε ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών ζωνών με τη μέθοδο της πυκνομετρίας και το πρόγραμμα ανάλυσης εικόνας Image-J και στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων (t-Test) με το πρόγραμμα Excel και το πρόγραμμα Graphpad.



**Εικόνα E.41 :** Διαγραμματική απεικόνιση των πρωτεϊνικών ζωνών για την φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη Smad-3 (p-Smad3) στις διαφορετικές χρονικές στιγμές μετά τη συνεργατική επίδραση της θυμοσίνης Τα1, της Τβ4 και του τετραπεπτιδίου Ac-SDKP

*με τον αυξητικό παράγοντα TGF- $\beta$  σε συγκέντρωση 10nM επί των δερματικών  
ινοβλαστών AG01523, συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα (Control-κύτταρα που  
αναπτύχθηκαν χωρίς την επίδραση κάποιας ουσίας).*

Τα παραπάνω διαγράμματα αποτελούν 2 διαφορετικές πειραματικές επαναλήψεις στις ίδιες πειραματικές συνθήκες και με τη χρήση των θυμοσινικών πεπτιδίων και του αυξητικού παράγοντα TGF- $\beta$  στις ίδιες συγκεντρώσεις. Η στατιστική επεξεργασία δεν είναι εφικτή λόγω μεγάλης διαφοράς στα βασικά επίπεδα φωσφορυλίωσης της Smad3 (φωσφορυλίωση στο δείγμα του αρνητικού μάρτυρα) μεταξύ των δύο επαναλήψεων.

## ***ΣΥΖΗΤΗΣΗ.***

---

Τα οξεία ή χρόνια έλκη και η ανάγκη για γρήγορη και ουσιαστική επούλωσή τους αποτελούν ένα σημαντικό θέμα που πλήττει ένα μεγάλο ποσοστό ατόμων την σημερινή εποχή, με μεγάλο αντίκτυπο στην οικονομία της κάθε χώρας και χρήζει ανάγκης για περαιτέρω και συνδυαστική έρευνα για εύρεση καινοτόμων και γρήγορων θεραπειών. Τα τελευταία χρόνια γίνονται όλο και περισσότερες έρευνες για την εύρεση νέων στρατηγικών και εναλλακτικών μεθόδων θεραπείας των τραυμάτων, όπως για παράδειγμα η χρήση διαφόρων φυσιολογικών βιοδραστικών μορίων, όπως είναι και τα θυμοσινικά πεπτίδια που μελετήθηκαν στη συγκεκριμένη πειραματική εργασία.

Μεγάλη είναι η βιβλιογραφική αναφορά στις θετικές επιδράσεις που έχει το θυμοσινικό πεπτίδιο Τβ4 όπως και το N-τελικό τετραπεπτίδιο Ac-SDKP τόσο στην επιδιόρθωση ιστικών βλαβών γενικά, όσο και ειδικότερα στην επούλωση δερματικών πληγών. Πρόκειται για έναν ενδογενή παράγοντα επιδιόρθωσης / αναγέννησης, ο οποίος όταν προστεθεί εξωγενώς, αυξάνει τον ρυθμό επούλωσης και, το σημαντικότερο χαρακτηριστικό του είναι ότι μειώνει τις ουλές. Συμμετέχει στα 3 βασικά στάδια που αποτελούν τη δερματική επουλωτική διαδικασία, δηλαδή στην προστασία του τραυματισμένου ιστού από μόλυνση, στην επιδιόρθωσή του, καθώς επίσης και στην ανάπλαση του νέου λειτουργικού ιστού (Goldstein et al., 2012). Έχει αντι-ινωτική και αντι-ουλώδη δράση (Ehrlich and Hazard, 2010, Ehrlich and Hazard, 2012) ενώ ταυτόχρονα βοηθάει στη μείωση της απόπτωσης των κυττάρων και έχει αντιφλεγμονώδη δράση (Sosne et al., 2002). Όσον αφορά το τετραπεπτίδιο Ac-SDKP, όπως και η Τβ4 από την οποία προέρχεται, έχει χαρακτηριστική αντιφλεγμονώδη δράση και βοηθάει στη μείωση σχηματισμού ουλής στον τραυματισμένο ιστό ενώ ταυτόχρονα έχει μία έντονη αγγειογενετική και αντινωτική δράση και συνεισφέρει στη μείωση της νέκρωσης ιστών που έχουν υποστεί κάποια βλάβη (Fromes et al., 2006), χαρακτηριστικά που το καθιστούν ιδανικό θεραπευτικό μόριο για την επούλωση πληγών. Το θυμοσινικό πεπτίδιο Τβ4 έχει ήδη γίνει χρήση του σε προκλινικές μελέτες, αλλά και το τετραπεπτίδιο Ac-SDKP αποτελούν μόρια πολλά υποσχόμενα με πιθανώς αρκετά επωφελή δράση σχετικά με την επούλωση πληγών σύμφωνα κιόλας και με τις μελέτες με τη χρήση πειραματόζων.

Αναφερόμενοι στο θυμοσινικό πεπτίδιο της Τα1, μικρή είναι η βιβλιογραφική αναφορά και πειραματική μελέτη που έχει γίνει σχετικά με το μόριο αυτό και την επίδραση του στη επούλωση. Τα βασικά ευρήματα αφορούν την επωφελή δράση της στην κυτταρική μετανάστευση και στην αγγειογένεση σε ενδοθηλιακά κύτταρα (Malinda et al., 1998; Kouytafouris V., et al., 2001). Σε γενικές γραμμές, η θυμοσίνη Τα1 δρα επί του ανοσοποιητικού συστήματος περισσότερο καθώς επίσης συμμετέχει σε διαδικασίες όπως η ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των ινοβλαστών (Franco et al., 1992).

Τα παραπάνω δεδομένα, λοιπόν, σε συνδυασμό με την ανάγκη που υπάρχει για εύρεση καινοτόμων βιολογικά ενεργών μορίων που θα βοηθάνε εκτενώς στη διαδικασία της

επούλωσης και θα έχουν επουλωτικές ιδιότητες αποτέλεσαν το έναυσμα για την πραγματοποίηση της συγκεκριμένης πειραματικής μελέτης. Στην παρούσα διπλωματική ερευνητική εργασία διερευνήθηκε η βιολογική δράση των θυμοσινικών πεπτιδίων Τα1, Τβ4 και του τετραπεπτιδίου Ac-SDKP σε *in vitro* πειραματικό σύστημα ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών, κατάλληλο για τη μελέτη κυτταρικών λειτουργιών που σχετίζονται με την επούλωση. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η κυτταρική μετανάστευση, η έκκριση και η μελέτη της ενεργότητας των μεταλλοπρωτεϊνών, η διέγερση ή η αναστολή κομβικών γονιδίων που παράγουν πρωτεΐνες απαραίτητες για την επουλωτική διαδικασία, καθώς επίσης και η επίδραση των συγκεκριμένων θυμοσινικών πεπτιδίων σε σηματοδοτικά μονοπάτια που είναι βιβλιογραφικά γνωστό ότι συμμετέχουν στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού, της μετανάστευσης και της σύνθεσης κολλαγόνου.

Σε όλες τις *in vitro* πειραματικές διαδικασίες χρησιμοποιήθηκαν τα θυμοσινικά πεπτίδια σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις (1nM και 10nM), οι οποίες αφ' ενός μεν είναι γνωστό από προηγούμενη εμπειρία στο εργαστήριο ότι δεν είναι κυτταροτοξικές, αφ' ετέρου δε η χρήση τους σε *in vitro* μελέτες υποστηρίζεται βιβλιογραφικά (Rhaleb et al., 2001; Peng et al., 2010). Επιπλέον, καθώς τα θυμοσινικά πεπτίδια είναι ενδογενή μόρια, γνωρίζουμε ότι οι συγκεκριμένες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στη διεξαγωγή των πειραμάτων αντιστοιχούν στο εύρος των συγκεντρώσεων που εμφανίζονται στον ανθρώπινο οργανισμό. Συγκεκριμένα το τετραπεπτίδιο Ac-SDKP έχει αναφερθεί ότι βρίσκεται σε συγκέντρωση 0,7 – 2,5 pmol/mL, (Liozon et al., 1993), η Τβ4 σε συγκέντρωση 6,9 – 23,0 ng/mL, (Weller et al., 1992) και τέλος, η Τα1 σε συγκέντρωση 252 – 1158 pg/mL, (Weller et al., 1992).

Ο πειραματικός σχεδιασμός έγινε σε επίπεδο μελέτης των κυτταρικών λειτουργιών στις οποίες συμμετέχουν οι δερματικοί ινοβλάστες, ένας κυτταρικός τύπος κομβικός για τη διαδικασία της επούλωσης των πληγών. Έχοντας ως βάση ότι τα εν λόγω θυμοσινικά πεπτίδια τόσο μεμονωμένα όσο και σε συνεργατική δράση με τον αυξητικό παράγοντα TGF-β δρουν διεγερτικά επί της σύνθεσης κολλαγόνου (Κικίδου 2018, Εικόνα 15) έγινε έλεγχος των μηχανισμών (τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο) οι οποίοι ρυθμίζουν την κολλαγονοσύνθεση.

Αρχικά, ελεγχθήκαν δύο βασικές κυτταρικές λειτουργίες, δηλαδή έγινε ποσοτική εκτίμηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της κυτταρικής μετανάστευσης. Η επίδραση των πεπτιδίων στην πολλαπλασιαστική ικανότητα των ινοβλαστών αξιολογήθηκε με καταμέτρηση των κυττάρων σε σωματιδιακό αναλυτή έπειτα από επίδραση των θυμοσινικών για 72 ώρες. Παρατηρήθηκε ότι και τα τρία θυμοσινικά πεπτίδια (Τα1, Τβ4 και το τετραπεπτίδιο Ac-SDKP) σε συγκέντρωση 10nM εμφάνισαν διέγερση του πολλαπλασιασμού η οποία ήταν στατιστικά σημαντική. Επιπλέον, όσον αφορά την κυτταρική μετανάστευση των ινοβλαστικών κυττάρων, παρατηρήθηκε ότι και τα 3 θυμοσινικά πεπτίδια σε συγκεντρώσεις 1nM και 10nM επάγουν την κυτταρική μετανάστευση, ενώ στατιστικά

σημαντικά ήταν τα αποτελέσματα για τη θυμοσίνη Τα1 (1nM και 10nM) ( $p < 0.001$ ) και τη θυμοσίνη Τβ4 (1 nM) ( $p < 0.01$ ). Τα αποτελέσματα αυτά δεν είναι εύκολο να αντιπαραβληθούν με τη βιβλιογραφία, καθώς οι αναφορές για δερματικούς ινοβλάστες είναι πολύ περιορισμένες (υπάρχουν μελέτες που αφορούν διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους, όπως π.χ. ενδοθηλιακά κύτταρα). Σε μία μόνο βιβλιογραφική αναφορά είχε αναφερθεί ότι η θυμοσίνη Τβ4 δεν επηρέαζε τη μετανάστευση ινοβλαστών (Malinda et al., 1997), όμως στην περίπτωση αυτή είχε ελεγχθεί η χημειοτακτική απόκριση στην Τβ4 με τη χρήση θαλάμου Boyden και όχι η προς όλες τις κατευθύνσεις μετανάστευση μετά από «πληγή» στο ταπήτιο της καλλιέργειας (scratch assay), όπως στην παρούσα εργασία. Σε γενικές γραμμές έχειδειχθεί ότι επάγεται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός σε ενδοθηλιακά κύτταρα από την Τβ4 και το τετραπεπτίδιο Ac-SDKP (Grant, D.S., et al., 1999) καθώς και σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα εντερικής προέλευσης από τις θυμοσίνες Τα1 και Τβ4 (Elitsur Y., et al., 1990), ενώ η θυμοσίνη Τβ4 και το τετραπεπτίδιο Ac-SDKP φάνηκαν να καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό κυττάρων HL-60 (Huang, W., et al., 2006) όπως επίσης και συστημικών αιματοποιητικών κυττάρων (Chevion, N., et al., 1996). Παρόμοια αποτελέσματα έχουνδειχθεί και σχετικά με την κυτταρική μετανάστευση η οποία επάγεται με τη δράση του θυμοσινικού πεπτιδίου σε ενδοθηλιακά κύτταρα (Malinda et al., 1997, Grant, D.S., et al., 1999; Sribenja S., et al., 2013). Συνοψίζοντας, από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας συμπεραίνεται πως οι θυμοσίνες Τα1 και Τβ4 επάγουν ελαφρά τον πολλαπλασιασμό και πιο έντονα τη μετανάστευση των ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών, χωρίς προς το παρόν να έχουμε διασαφηνίσει μέσω ποίων μηχανισμών. Προς διαλεύκανση των παραπάνω αποτελεσμάτων καθώς και του ήδη προαναφερθέντος αποτελέσματος της διέγερσης της κολλαγονοσύνθεσης ακολούθησαν οι μηχανιστικές μελέτες της παρούσας εργασίας, δηλαδή τα πειράματα γονιδιακής έκφρασης, οι μετρήσεις ενεργότητας των MMPs και ο έλεγχος των ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών, μέσω των οποίων μπορεί να επάγεται τόσο η κολλαγονοσύνθεση όσο και ο πολλαπλασιασμός και η μετανάστευση των δερματικών ινοβλαστών.

Αρχικά ελέγχθηκαν σε μεταγραφικό επίπεδο βασικά γονίδια που σχετίζονται με τη σύνθεση και την αποικοδόμηση του κολλαγόνου και συγκεκριμένα τα γονίδια του κολλαγόνου τύπου I και III, τα γονίδια των κολλαγονολυτικών ενζύμων MMP1 και MMP2 όπως επίσης και στα γονίδια των ιστικών αναστολέων των μεταλλοπρωτεϊνών αυτών, TIMP1 και TIMP2. Παρατηρήθηκε ότι η θυμοσίνη Τβ4 και στις δύο υπό μελέτη συγκεντρώσεις διεγείρει στατιστικά σημαντικά τη μεταγραφή των γονιδίων του κολλαγόνου τύπου I και III ( $p < 0,05$ ). Για το κολλαγόνο Τύπου I παρατηρήθηκε πως και το τετραπεπτίδιο Ac-SDKP σε συγκέντρωση 1nM διεγείρει τη μεταγραφή ενώ και στους δύο τύπου του κολλαγόνου το τετραπεπτίδιο σε συγκέντρωση 10nM αναστέλλει τη μεταγραφή. Ειδικότερα για το γονίδιο του κολλαγόνου Τύπου III φαίνεται πως αναστέλλεται και από την Τα1

(10nM) και από το Ac-SDKP (1nM). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η επαγωγή της σύνθεσης κολλαγόνου από την Tβ4 και το αμινοτελικό της πεπτιδίου Ac-SDKP σε συγκέντρωση 1 nM οφείλεται κατά σημαντικό μέρος στη ρύθμιση του γονιδίου του κολλαγόνου τύπου I σε μεταγραφικό επίπεδο. Από την άλλη η επαγωγή της σύνθεσης κολλαγόνου από την Τα1 δεν οφείλεται σε μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων κολλαγόνου (τουλάχιστον τύπου I και III) και θα πρέπει να αναζητηθεί κάποιος άλλος υποκείμενος μηχανισμός, ενδεχομένως η καταστολή της αποικοδόμησης του κολλαγόνου (βλ. κατωτέρω). Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και σε δεύτερο στέλεχος ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών (GM21808). Η διαφορική ρύθμιση των δύο τύπων κολλαγόνου που παρατηρήθηκε ενδέχεται να αντικατοπτρίζει ενδογενή χαρακτηριστικά των ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών, που σημειωτέον προέρχονται από ενήλικο δότη (Uitto et al, 1989 Hay, 1991). Σε ινοβλάστες ποντικού έχει παρατηρηθεί ότι όσο προχωρά η ανάπτυξη από το έμβρυο προς τον ενήλικο οργανισμό μειώνεται η έκφραση του κολλαγόνου τύπου III και αυξάνεται αυτή του τύπου I, γεγονός που έχει συσχετισθεί με τη μετάβαση από την εμβρυϊκή ιστική αναγέννηση χωρίς ουλή προς την επούλωση που χαρακτηρίζει τον ενήλικο οργανισμό (Carter et al., 2009). Έτσι και η διαφορική ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων κολλαγόνου από τις δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις τετραπεπτιδίου Ac-SDKP που ελέγχθηκαν ενδέχεται να μπορεί να βρει εφαρμογή στην προσπάθεια να επιτευχθεί η επούλωση πληγών στους ενήλικους με τη μικρότερη δυνατή δημιουργία ουλώδους ιστού. Πάντως, εδώ θα πρέπει να τονισθεί ότι στη βιβλιογραφία αναφέρονται μελέτες σε ινοβλάστες από διαφορετικούς ιστούς (π.χ. καρδιά, πνεύμονα κτλ.) όπου η θυμοσίνη Tβ4 και το αμινοτελικό της πεπτιδίου Ac-SDKP έχουν σαφώς αντι-ινωτική δράση, καταστέλλοντας την επαγόμενη από τον TGF-β σύνθεση κολλαγόνου (Peng 2010; Conte 2015) σε αντίθεση με τα δικά μας αποτελέσματα στους δερματικούς ινοβλάστες. Συνεπώς οι δράσεις των θυμοσινικών πεπτιδίων μπορεί να εμφανίζουν ιστο-ειδικότητα.

Περνώντας στα κολλαγονολυτικά ένζυμα MMP-1 και MMP-2, παρατηρήθηκε μία συνολική ανασταλτική επίδραση και από τα τρία θυμοσινικά πεπτιδία όσον αφορά τη μεταλλοπρωτεϊνάση MMP-1 ενώ αντιθέτως στη μεταλλοπρωτεϊνάση MMP-2 εμφάνισαν συνολικά διεγερτική δράση αν και μόνο η διέγερση από την Tβ4 ήταν στατιστικά σημαντική. Είναι ευρέως γνωστό, πως ο ρόλος τους στη διαδικασία της επούλωσης δερματικών πληγών είναι η αποικοδόμηση του κολλαγόνου, και μάλιστα η MMP-1 αποικοδομεί κατά προτίμηση το πολυμερισμένο κολλαγόνο, ενώ η MMP-2 θεωρείται ζελατινάση, δηλαδή αποικοδομεί κατά προτίμηση το μη πολυμερισμένο κολλαγόνο (Parks et al., 2004; Gills S. & Parks W., 2008). Επομένως, είναι πιθανό η αύξηση των μεταγράφων mRNA της MMP-2 από τη διεγερτική επίδραση των θυμοσινών Τα1, Tβ4 και του τετραπεπτιδίου Ac-SDKP να οδηγεί σε αυξημένη αποικοδόμηση της ζελατίνης (μη πολυμερισμένο κολλαγόνο) το οποίο να ωφελεί τελικώς στη μείωση της τάσης των πληγών με τελικό αποτέλεσμα την καλύτερη

επούλωσή των πληγών (Peacock E., et al., 1962). Επιπλέον, η αυξημένη γονιδιακή έκφραση της μεταλλοπρωτεϊνάσης MMP-2 μπορεί να σχετίζεται και με δευτερογενή απόκριση των κυττάρων μέσω ανάδρομης ρύθμισης λόγω της αυξημένης παραγωγής κολλαγόνου που εμφάνισαν οι ανθρώπινοι δερματικοί ινοβλάστες. Ειδικότερα όσον αφορά τη θυμοσίνη Tβ4, τα αποτελέσματα της μελέτης μας συμφωνούν γενικά με βιβλιογραφικά δεδομένα που υποστηρίζουν την επαγωγή της μεταγραφής της MMP-2 από την Tβ4 σε κύτταρα δερματικού ενδοθηλίου αλλά και σε ινοβλάστες, καθώς και σε δείγματα ιστού από πληγές σε πειραματόζωα όπου είχε εφαρμοσθεί τοπικά Tβ4 (Philip D., et al., 2006; Cierniewski C.S., et al., 2007). Από την άλλη πλευρά η μείωση της μεταγραφής της MMP-1 ενδέχεται να συνεισφέρει στην παρατηρούμενη επαγωγή της σύνθεσης κολλαγόνου, είτε δρώντας συνεργατικά με την αύξηση της μεταγραφής των γονιδίων κολλαγόνου από την Tβ4 ή και αφ' εαυτής στην περίπτωση της Tα1. Επομένως, συμπεραίνουμε ότι και τα τρία θυμοσινικά πεπτίδια ενδεχομένως να επηρεάζουν έμμεσα το χρόνο επούλωσης των πληγών και τη δημιουργία ουλής μέσω της δράσης τους στη μεταγραφική ρύθμιση των MMPs.

Τέλος, αναλύοντας τα αποτελέσματα που αφορούν τους ιστικούς αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών TIMP1 και TIMP2, φαίνεται πως δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές μεταβολές πλην της καταστολής της έκφρασης του TIMP-1 από το Ac-SDKP σε συγκέντρωση 1 nM. Το αποτέλεσμα αυτό οδηγεί προς την αντίθετη κατεύθυνση από την καταστολή της έκφρασης του γονιδίου της MMP-1 και πιθανόν να ερμηνεύεται ως παλίνδρομη ρύθμιση ώστε να διατηρηθεί το ισοζύγιο MMPs/TIMPs σε σχετικά φυσιολογικά επίπεδα.. Ας σημειωθεί εδώ, ότι από τα βασικά χαρακτηριστικά που οδηγούν σε φυσιολογική επούλωση πληγών και αποφυγή παθολογικών καταστάσεων αποτελεί η ύπαρξη σωστού ισοζυγίου MMPs/TIMPs, καθώς υψηλή συγκέντρωση MMPs με ταυτόχρονη χαμηλή συγκέντρωση TIMPs έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία χρόνιων πληγών (Muller M., et al., 2008). Επίσης έχει αναφερθεί ότι η θυμοσίνη Tβ4 σε περιπτώσεις πειραματικής βλάβης του κερατοειδούς σε ποντίκια μεταβάλλει την ισορροπία των μεταλλοπρωτεϊνών με τους αναστολείς τους υπέρ της επιδιόρθωσης της εξωκυττάριας μήτρας (Sosne G., et al., 2005).

Πέραν των μελετών της γονιδιακής έκφρασης, στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκαν και πειράματα για τον έλεγχο της ενεργότητας των μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs) που εκκρίνονται στο εθισμένο μέσο (υπερκείμενο) από τους δερματικούς ινοβλάστες. Η μελέτη της ενεργότητας που εμφανίζουν οι μεταλλοπρωτεϊνάσες μετά την επίδραση με τα θυμοσινικά πεπτίδια πραγματοποιήθηκε αρχικά με χρήση του φθορίζοντος πεπτιδίου TNO211 που αποτελεί υπόστρωμα των μεταλλοπρωτεϊνών MMP-1 / MMP-2 / MMP-3 και MMP-9, όπου δεν φάνηκε να μεταβάλλεται στατιστικά σημαντικά έπειτα από τη επίδραση κανενός από τα τρία θυμοσινικά πεπτίδια. Πιθανώς αυτό να οφείλεται στο ότι λαμβάνεται ένα συνδυαστικό αποτέλεσμα από όλες τις MMPs ταυτόχρονα και όπως ήδη γνωρίζουμε από τη γονιδιακή τους έκφραση, τα θυμοσινικά πεπτίδια

καταστέλλουν μεν την MMP-1 αλλά διεγείρουν την MMP-2. Ακολούθως προβήκαμε σε μελέτη με ενζυμογραφία ζελατίνης, η οποία υφίσταται πέψη από τις MMP-2 και MMP-9. Διαπιστώθηκε, όπως αναμένεται για τους δερματικούς ινοβλάστες, ότι η έκκριση της MMP-9 ήταν αμελητέα, σε αντίθεση με την MMP-2, η οποία παρατηρήθηκε να αυξάνεται υπό την επίδραση όλων των θυμοσινικών πεπτιδίων ξεχωριστά, αν και στατιστική σημαντικότητα εμφάνισαν το τετραπεπτίδιο Ac-SDKP (1 nM και 10nM) και η θυμοσίνη Ta1 στα 10 nM. Είναι ενδιαφέρον ότι η μεν γονιδιακή έκφραση της MMP-2 παρατηρήθηκε να επάγεται από την Tβ4, ενώ η εκκρινόμενη από τους ινοβλάστες MMP-2 φάνηκε να επάγεται από το αμινοτελικό πεπτίδιο Ac-SDKP. Πάντως, λόγω και της φύσης της τεχνικής της ενζυμογραφίας, ίσως να απαιτούνται περισσότερες επαναλήψεις των πειραμάτων αυτών, ώστε να εξαχθούν πιο ασφαλή σε ποσοτικό επίπεδο αποτελέσματα. Επίσης με βάση τα μοριακά μεγέθη των ζωνών που παρατηρήθηκαν στην ενζυμογραφία, συνάγεται ότι το μεγαλύτερο ποσοστό της MMP-2 που εκκρίνεται από τους ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες βρίσκεται στην προ-μορφή της (μη ενεργή) και δεν παρατηρήθηκε ενεργοποίησή της υπό την επίδραση των θυμοσινικών πεπτιδίων. Σε παρόμοιες μελέτες σε καλλιέργειες καρδιακών ινοβλαστών το τετραπεπτίδιο Ac-SDKP δείχθηκε ότι καταστέλλει την επαγόμενη από την ιντερλευκίνη-1β ενεργοποίηση των MMPs μέσω της αύξησης των ιστικών αναστολέων τους (TIMPs) (Rhaleb NE., et al., 2013)..

Εν συνεχεία, έγινε έλεγχος της επίδρασης των θυμοσινικών πεπτιδίων σε διάφορα μονοπάτια ενδοκυτταρικής σηματοδότησης με κινητικές μελέτες. Πιο συγκεκριμένα ελεγχθήκαν οι MAP Κινάσες (ERK, p-38 και JNK), Smad-2 / -3, ενώ επίσης ορμώμενοι από το θετικό αποτέλεσμα επί της κολλαγονοσύνθεσης με τη συνεργατική δράση των θυμοσινών και του TGF-β επιχειρήσαμε να ελέγξουμε την ταυτόχρονη επίδραση των θυμοσινικών πεπτιδίων Ta1, Tβ4 και του τετραπεπτιδίου Ac-SDKP με τον αυξητικό παράγοντα TGF-β σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές, σχετικά με την ενεργοποίηση (φωσφορυλίωση) της πρωτεΐνης Smad-3, η διέγερση της οποίας έχειδειχθεί ότι είναι απαραίτητη για τη ρύθμιση του γονιδίου του κολλαγόνου τύπου-I στους ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες (Purohit T., et al., 2016). Αρχικά, δεν παρατηρήθηκε καμία φωσφορυλίωση των Smad-2 / -3 πρωτεϊνών μετά την επίδραση των θυμοσινικών πεπτιδίων Ta1 και Tβ4 σε διαφορετικές χρονικές στιγμές συμπεραίνοντας πως από μόνα τους τα συγκεκριμένα θυμοσινικά πεπτίδια δεν ενεργοποιούν το σηματοδοτικό μονοπάτι των Smad πρωτεϊνών. Κατά τον έλεγχο των MAPK's με τις ίδιες πειραματικές συνθήκες με τις Smad πρωτεΐνες παρατηρήθηκε αύξηση της φωσφορυλίωσης στα 15 και 30 λεπτά η οποία μειωνόταν με τη πάροδο του χρόνου και στις τρεις, ERK, p-38 και JNK. Χαρακτηριστικό είναι πως τόσο στην ERK όσο και στην p-38 και στην JNK μετά τη πάροδο μίας ώρας με την επίδραση των θυμοσινικών πεπτιδίων Ta1 και Tβ4 σε συγκέντρωση 10nM η φωσφορυλίωση των κινασών χάνεται, γεγονός που οφείλεται πιθανώς στη δράση κάποιας φωσφατάσης στους δερματικούς ινοβλάστες ώστε να

επανέλθει η φωσφορυλίωση σε φυσιολογικά επίπεδα. Περιορισμένες είναι οι βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με την αντιστοιχία των υπό μελέτη θυμοσινικών πεπτιδίων με κάποιο σηματοδοτικό μονοπάτι που συμμετέχει στην επούλωση πληγών. Σε γενικές γραμμές έχειδειχθεί ότι η θυμοσίνη Tβ4 ενεργοποιεί την πρωτεΐνη ERK σε κύτταρα HeLa (Su-YoungOh., et al., 2006), συμμετέχει στο σηματοδοτικό μονοπάτι των ERK και Smad πρωτεϊνών σε MDPC-23 οδοντοβλαστικά κύτταρα (Choi BD., et al., 2018), ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μονοπάτι της p38MAPK σε πρωτογενή νευρικά προγονικά κύτταρα αρουραίου (NPCs) (Santra M., et al., 2012) καθώς επίσης έχει φανεί πως και σε ανθρώπινα παγκρεατικά κύτταρα ενεργοποιεί το μονοπάτι της JNK πρωτεΐνης (Zhang Y., et al., 2008) ενώ για τη θυμοσίνη Ta1 έχειδειχθεί ότι ενεργοποιεί τη JNK σε μακροφάγα προερχόμενα από μυελό οστών ποντικού αλλά και την p38 (BMDMs) (AjitSodhi., et al., 2002; Xiao Pend., et al., 2007).

Καταληκτικά, σχετικά με τη συνεργατική δράση των θυμοσινών και του TGF-β για την ενεργοποίηση (φωσφορυλίωση) της πρωτεΐνης Smad-3, διαπιστώθηκε αύξηση της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης στα 15 λεπτά επίδρασης του TGF-β και των θυμοσινικών πεπτιδίων Ta1, Tβ4 και του τετραπεπτιδίου Ac-SDKP η οποία παραμένει και μέχρι το χρονικό σημείο των 60 λεπτών. Η αύξηση της φωσφορυλίωσης της Smad 3 από τα θυμοσινικά πεπτίδια σε επίπεδα υψηλότερα από τη διέγερση που προκαλεί από μόνος του ο TGF-β συνάδει με τη συνεργιστική δράση τους στην σύνθεση κολλαγόνου (βλ. Εικόνα 15, Σκοπός) και προσφέρει μία αρχική μηχανιστική εξήγηση στο φαινόμενο αυτό. Υπενθυμίζεται ότι σύμφωνα και με τη βιβλιογραφία, η ρύθμιση της παραγωγής κολλαγόνου τύπου-I από τον TGF-β στους ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες μετάγεται μέσω της πρωτεΐνης Smad-3 (Purohit T., et al., 2016).

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας θεωρούμε πως θα συμβάλλουν με τον τρόπο τους στην καλύτερη κατανόηση της επίδρασης διαφόρων σημαντικών ενδογενών πεπτιδίων, όπως τα θυμοσινικά πεπτίδια, στους μηχανισμούς που εμπλέκονται στη διαδικασία της δερματικής επούλωσης πληγών. Η μέχρι τώρα πειραματική πορεία για τη διαλεύκανση των μηχανισμών δράσης των θυμοσινικών πεπτιδίων ενδοκυτταρικά έχει δώσει αρκετές απαντήσεις αλλά περαιτέρω πειράματα είναι απαραίτητα για την υποστήριξη των απόψεων και την οριστική απόδειξη των ενδείξεων που υπάρχουν έως τώρα. Περαιτέρω μελέτες, όπως για παράδειγμα η χρήση αναστολέων κομβικών σηματοδοτικών μονοπατιών που φάνηκε να επηρεάζεται η ενεργοποίηση τους από τις θυμοσίνες, η μελέτη διαφορετικών πρωτεϊνών που μπορεί έμεσα να επηρεάζουν τις πρωτεΐνες των σηματοδοτικών μονοπατιών που μελετήθηκαν, η μελέτη της ενεργότητας και των υπολοίπων MMPs που δεν έχουν ακόμη μελετηθεί, καθώς επίσης και η χρήση διαφορετικών κυτταρικών τύπων λ.χ. κερατινοκύτταρα ή δερματικοί ινοβλάστες από διαφορετικά στρώματα του δερματικού ιστού ή από διαφορετικό ηλικιακό φάσμα θα μπορούσαν να

οδηγήσουν σε ένα πιο ολοκληρωμένο και σαφές αποτέλεσμα από όλες τις απόψεις για τον τρόπο δράσης των θυμοσινικών πεπτιδίων επί των κυττάρων. Ολοκληρώνοντας, η επούλωση πληγών είναι μία πολύ σημαντική διαδικασία για τη φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού που σε περιπτώσεις αδυναμίας αποκατάστασής της μετατρέπεται σε χρόνιο παθολογικό νόσημα, κάνοντας αναγκαία την εύρεση καινοτόμων θεραπευτικών προσεγγίσεων. Τα θυμοσινικά πεπτίδια, που είναι ενδογενή μόρια, αποτελούν μία πολύ ελπιδοφόρα προσθήκη στο οπλοστάσιό μας για τη θεραπεία πληγών ή ουλών και αξίζει να εξετασθεί η δυνατότητα χρήσης τους και σε περιπτώσεις όχι μόνο εξωτερικών δερματικών πληγών αλλά και εσωτερικών τραυματισμών, καθώς επίσης και για τη μείωση του ουλώδους ιστού που δημιουργείται σε περιπτώσεις μη φυσιολογικής επουλωτικής διαδικασίας. Συνεπώς, η αποσαφήνιση του τρόπου δράσης τους μπορεί να συμβάλει ουσιαστικά στον τομέα του φαρμάκου.

## ***ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.***

1. Abraham J, Klagsbrun M. In: Clark RA, editor. The molecular and cellular biology of wound repair. 2nd ed. New York: Plenum Press, 1996.
2. Actin filament nucleation and elongation factors Structure-function relationships Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 44 (6) (2009), pp. 351-366
3. Ajit Sodhi, Saki Paul, Involvement of mitogen-activated protein kinases in the signal transduction pathway of bone marrow-derived macrophage activation in response to in vitro treatment with thymosin alpha 1, International Immunopharmacology, 2002, Pages 47-58.
4. Ando Y, Jensen PJ. Epidermal growth factor and insulinlike growth factor I enhance keratinocyte migration. J Invest Dermatol 1993; 100: 633-9.
5. Andreone et al., 2001 P. Andreone, C. Cursaro, A. Gramenzi, et al. In vitro effect of thymosin-alpha1 and interferon-alpha on Th1 and Th2 cytokine synthesis in patients with chronic hepatitis C Journal of Viral Hepatitis, 8 (2001), pp. 194-201
6. Ashcroft GS, Mills SJ, Ashworth JJ (2002) Ageing and wound healing (review). Biogerontology 3(6): 337-45
7. Azizi. F., Kimiagar M., A.A. Ghazi, and . Nafarbandi. The effects of iodized oil injection in eu- and hypothyroid iodine deficient rats. J. Endocrinol. Invest. 1997, 20: 18-23
8. B. Xue, R.C. Robinson Guardians of the actin monomer European Journal of Cell Biology, 92 (10-11) (2013), pp. 316-332
9. B.R. Zetter On target with tumor blood vessel markers Nature Biotechnology, 15 (12) (1997), pp. 1243-1244
10. Badamchian M, Fagarasan MO, Danner RL, et al. Thymosin beta4 reduces lethality and down-regulates inflammatory mediators in endotoxin-induced septic shock. Int Immunopharmacol 2003;3:1225-33
11. Banks RE, Forbes MA, Kinsey SE, Stanley A, Ingham E, Walters C, Selby PJ. Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. Br J Cancer 1998; 77: 956-64.
12. Bao, L., Loda, M. & Zetter, B.R. Thymosin  $\beta$ 15 expression in tumor cell lines with varying metastatic potential Clin Exp Metastasis (1998) 16: 227
13. Barrandon Y, Green H. Cell migration is essential for sustained growth of keratinocyte colonies: the roles of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor. Cell 1987; 50: 1131-7.
14. Bauer, E. A., Cooper, T. W., Huang, J. S., Altman, J., & Deuel, T. F. (1985). Stimulation of in vitro human skin collagenase expression by platelet-derived growth factor. Proceedings of the National Academy of Sciences, 82(12), 4132-4136.
15. Bennett SP, Griffiths GD, Schor AM, Leese GP, Schor SL. Growth factors in the treatment of diabetic foot ulcers. Br J Surg 2003; 90: 133-46.
16. Berry DP1, Harding KG, Stanton MR, Jasani B, Ehrlich HP. Human wound contraction: collagen organization, fibroblasts, and myofibroblasts. Plast Reconstr Surg. 1998 Jul;102(1):124-31;
17. Berse B, Brown LF, Van de Water L, Dvorak HF, Senger DR. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. Mol Biol Cell 1992; 3: 211-20.
18. Billich A., Thymosin alpha1 SciClone Pharmaceuticals Current Opinion in Investigational Drugs, 3 (2002), pp. 698-707
19. Birkedal-Hansen, H., *Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction.* J Periodontal Res, 1993. **28**(6 Pt 2): p. 500-10.
20. Black, E., et al., *Decrease of collagen deposition in wound repair in type 1 diabetes independent of glycemic control.* Arch Surg, 2003. **138**(1): p. 34-40.
21. Bock-Marquette I, Saxena A, White MD, et al. Thymosin beta4 activates integrin-linked kinase and promotes cardiac cell migration, survival and cardiac repair. Nature 2004;432:466-72
22. Bonnet, D., Lemoine, F. M., Pontvert-Deluc, S., Baillou, C., Najman, A., and Guigon, M. (1993) Direct and reversible inhibitory effect of the tetrapeptide acetylN-ser-asp-lys- pro (seraspénide) on the growth of human CD34<sup>+</sup> subpopulations in response to growth factors. Blood 82, 3307-3314
23. Breier G, Damert A, Plate KH, Risau W. Angiogenesis in embryos and ischemic diseases. Thromb Haemost 1997; 78: 678-83.
24. Brissett, A. E., & Hom, D. B. (2003). The effects of tissue sealants, platelet gels, and growth factors on wound healing. Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery, 11(4), 245-250.

25. Brogi E, Wu T, Namiki A, Isner JM. Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only. *Circulation* 1994; 90: 649–52.
26. Brown GL, Curtsinger L III, Brightwell JR, Ackerman DM, Tobin GR, Polk HC Jr., George-Nascimento C, Valenzuela P, Schultz GS. Enhancement of epidermal regeneration by biosynthetic epidermal growth factor. *J Exp Med* 1986; 163: 1319–24.
27. Brown GL, Curtsinger LJ, White M, Mitchell RO, Pietsch J, Nordquist R, von Fraunhofer A, Schultz GS. Acceleration of tensile strength of incisions treated with EGF and TGF-beta. *Ann Surg* 1988; 208: 788–94.
28. Brown LF, Yeo KT, Berse B, Yeo TK, Senger DR, Dvorak HF, van de Water L. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. *J Exp Med* 1992; 176: 1375–9.
29. Butler GS, Overall CM. Proteomic identification of multitasking proteins in unexpected locations complicates drug targeting. *Nat Rev Drug Discov* 2009;8:935–48
30. C. Grillon, K. Rieger, J. Bakala, D. Schott, J.L. Morgat, E. Hannappel, W. Voelter, and M. Lenfant. Involvement of thymosin beta 4 and endoproteinase Asp-N in the biosynthesis of the tetrapeptide AcSerAspLysPro a regulator of the hematopoietic system. *FEBS letters*. 274:30–34 (1990).
31. Caley, M. P., Martins, V. L., & O'Toole, E. A. (2015). Metalloproteinases and Wound Healing. *Advances in wound care*, 4(4), 225–234. doi:10.1089/wound.2014.0581
32. Cao Y, Linden P, Farnebo J, Cao R, Eriksson A, Kumar V, Qi JH, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor C induces angiogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 14389–94.
33. Carlson, B.M. (1994) Human embryology and development biology. St Louis: Mosby
34. Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *J Biol Chem* 1990; 265: 7709–12.
35. Carraro et al., 2012 G. Carraro, A. Naso, E. Montomoli, et al. Thymosin-alpha 1 (Zadaxin) enhances the immunogenicity of an adjuvanted pandemic H1N1v influenza vaccine (Focetria) in hemodialyzed patients: A pilot study *Vaccine*, 30 (2012), pp. 1170–1180
36. Carter R<sup>1</sup>, Jain K, Sykes V, Lanning D. Differential expression of procollagen genes between mid- and late-gestational fetal fibroblasts. *J Surg Res*. 2009 Sep;156(1):90–4.
37. Castoldi, G., et al., *Renal antifibrotic effect of N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline in diabetic rats*. *Am J Nephrol*, 2013. **37**(1): p. 65–73.
38. Cavasin 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
39. Cavasin, M.A., et al., *Decreased endogenous levels of Ac-SDKP promote organ fibrosis*. *Hypertension*, 2007. **50**(1): p. 130–6
40. Cavasin, M.A., *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**(5): p. 305–11.
41. Ceccarelli S, Cardinali G, Aspite N, Picardo M, Marchese C, Torrisi MR, Mancini P. Cortactin involvement in the keratinocyte growth factor and fibroblast growth factor 10 promotion of migration and cortical actin assembly in human keratinocytes. *Exp Cell Res* 2007; 313: 1758–77.
42. Cha D, O'Brien P, O'Toole EA, Woodley DT, Hudson LG. Enhanced modulation of keratinocyte motility by transforming growth factor-alpha (TGF-alpha) relative to epidermal growth factor (EGF). *J Invest Dermatol* 1996; 106: 590–7.
43. Cha HJ, Philp D, Lee SH, et al. Overexpression of thymosin beta4 promotes abnormal tooth development and stimulations of hair growth. *Int J Dev Biol.*, 2010;54:135–40
44. Cha, H.J., M.J. Jeong, and H.K. Kleinman, Role of thymosin beta4 in tumor metastasis and angiogenesis. *J Natl Cancer Inst*, 2003. 95(22): p. 1674–80.
45. Chadwick D1, Pido-Lopez J, Pires A, Imami N, Gotch F, Villacian JS, Ravindran S, Paton NI., A pilot study of the safety and efficacy of thymosin alpha 1 in augmenting immune reconstitution in HIV-infected patients with low CD4 counts taking highly active antiretroviral therapy. *Clin Exp Immunol*. 2003 Dec;134(3):477–81
46. Chen JM1, Dando PM, Rawlings ND, Brown MA, Young NE, Stevens RA, Hewitt E, Watts C, Barrett AJ. Cloning, isolation, and characterization of mammalian legumain, an asparaginyl endopeptidase. *J Biol Chem*. 1997 Mar 21;272(12):8090–8.

47. Chen SM, Ward SI, Olutoye OO, Diegelmann RF, Kelman Cohen I. Ability of chronic wound fluids to degrade peptide growth factors is associated with increased levels of elastase activity and diminished levels of proteinase inhibitors. *Wound Repair Regen* 1997; 5: 23–32.
48. Cheviron, N. , Grillon, C. , Carlier, M. and Wdzieczak-Bakala, J. (1996), The antiproliferative activity of the tetrapeptide Acetyl-N-SerAspLysPro, an inhibitor of haematopoietic stem cell proliferation, is not mediated by a thymosin  $\beta$ 4-like effect on actin assembly. *Cell Proliferation*, 29: 437-446
49. Chiang CP, Nilsen-Hamilton M. Opposite and selective effects of epidermal growth factor and human platelet transforming growth factor-beta on the production of secreted proteins by murine 3T3 cells and human fibroblasts. *J Biol Chem* 1986; 261: 10478–81.
50. Choi BD<sup>1</sup>, Lim HJ<sup>2</sup>, Lee SY<sup>1</sup>, Lee MH<sup>1</sup>, Kil KS<sup>1</sup>, Lim DS<sup>2</sup>, Jeong SJ<sup>3</sup>, Jeong MJ<sup>1</sup>. Thymosin  $\beta$ 4 is associated with bone sialoprotein expression via ERK and Smad3 signaling pathways in MDPC-23 odontoblastic cells. *Int J Mol Med*. 2018 Nov;42(5):2881-2890.
51. CIERNIEWSKI, C. S., MALINOWSKI, M. , BEDNAREK, R. and CIERNIEWSKA-CIESLAK, A. (2007), Adhesive and Proteolytic Phenotype of Migrating Endothelial Cells Induced by Thymosin  $\beta$ -4. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1112: 123-139.
52. Clark RAF. In: Clark RAF, editor. *The molecular and cellular biology of wound repair*. 2nd ed. New York: Plenum Press, 1996.
53. Clinton, M., et al., Prothymosin alpha and parathymosin: mRNA and polypeptide levels in rodent tissues. *Arch Biochem Biophys*, 1989. 269(1): p. 256-63.
54. Coffey RJ Jr., Derynck R, Wilcox JN, Bringman TS, Gousti AS, Moses HL, Pittelkow MR. Production and auto-induction of transforming growth factor-alpha in human keratinocytes. *Nature* 1987; 328: 817–20..
55. Cohen S, Elliott GA. The stimulation of epidermal keratinisation by a protein isolated from the submaxillary gland of the mouse. *J Invest Dermatol* 1963; 40: 1–5.
56. Conte E<sup>1</sup>, Iemmolo M, Fruciano M, Fagone E, Gili E, Genovese T, Esposito E, Cuzzocrea S, Vancheri C. Effects of thymosin  $\beta$ 4 and its N-terminal fragment Ac-SDKP on TGF- $\beta$ -treated human lung fibroblasts and in the mouse model of bleomycin-induced lung fibrosis. *Expert Opin Biol Ther*. 2015;15 Suppl 1:S211-21.
57. Cordeiro MF, Reichel MB, Gay JA, D'Esposito F, Alexander RA, Khaw PT. Transforming growth factor-beta1,-beta2, and -beta3 in vivo: effects on normal and mitomycin C-modulated conjunctival scarring. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40: 1975–82.
58. Corsini E, Primavera A, Marinovich M, Galli CL. Selective induction of cell-associated interleukin-1alpha in murine keratinocytes by chemical allergens. *Toxicology* 1998; 129: 193–200.
59. Cox DA, Kunz S, Cerletti N, McMaster GK, Burk RR. Wound healing in aged animals—effects of locally applied transforming growth factor beta 2 in different model systems. *EXS* 1992; 61: 287–95.
60. Crockford, D., et al., Thymosin beta4: structure, function, and biological properties supporting current and future clinical applications. *Ann N Y Acad Sci*, 2010. 1194: p. 179-89.
61. de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992; 255: 989–91.
62. DeSantis, C. , Siegel, R. , Bandi, P. and Jemal, A. (2011), *Breast cancer statistics, 2011*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 61: 408-418.
63. Desmouliere A, Redard M, Darby I, Gabbiani G (1995) Apoptosis mediates the decrease in cellularity during transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol* 146: 56–66
64. Di Vita G, Patti R, D'Agostino P, Caruso G, Arcara M, Buscemi S, Bonventre S, Ferlazzo V, Arcoleo F, Cillari E. Cytokines and growth factors in wound drainage fluid from patients undergoing incisional hernia repair. *Wound Repair Regen* 2006; 14: 259–64.
65. dos Remedios CG1, Chhabra D, Kekic M, Dedova IV, Tsubakihara M, Berry DA, Nosworthy NJ., Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev*. 2003 Apr;83(2):433-73.
66. Egeblad M1, Werb Z., New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 2002 Mar;2(3):161-74.
67. Ehrlich HP, Sprague WH. Thymosin beta4 enhances repair by organizing connective tissue and preventing the appearance of myofibroblasts. *Ann NY Acad Sci* 2010;1194:118-24

68. ELITSUR Y, MG MUTCHNICK, WA SAKR, GD LUK Thymosin  $\alpha$ 1 and thymosin  $\beta$ 4 modulate human colonic lamina propria lymphocyte function. - Immunopharmacology, 1990 - Elsevier
69. Elizondo-Riojas et al., 2011 M.A. Elizondo-Riojas, S.M. Chamow, C.W. Tuthill, et al. NMR structure of human Thymosin  $\alpha$ -1 Biochemical and Biophysical Research Communications, 416 (2011), pp. 356-361
70. Elliott, C. G., & Hamilton, D. W. (2011). Deconstructing fibrosis research: do pro-fibrotic signals point the way for chronic dermal wound regeneration?. *Journal of cell communication and signaling*, 5(4), 301–315. doi:10.1007/s12079-011-0131-5
71. Eming, S. A., Krieg, T., & Davidson, J. M. (2007). Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(3), 514-525.
72. Emmerson E, Campbel L, Ashcroft G, Hardman M., (2010) The phytoestrogen genistein promotes wound healing by multiple independent mechanisms, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 184-193,
73. Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg* 2004; 114: 1502–8.
74. Eschenfeldt et al., 1989 W.H. Eschenfeldt, R.E. Manrow, M.S. Krug, S.L. Berger Isolation and partial sequencing of the human proThymosin  $\alpha$  gene family. Evidence against export of the gene products *The Journal of Biological Chemistry*, 264 (1989), pp. 7546-7555
75. Falanga V, Eaglstein WH. The “trap” hypothesis of venous ulceration. *Lancet* 1993; 341: 1006–8.
76. Fernandez-Resa, P., E. Mira, and A.R. Quesada. 1995. Enhanced detection of casein zymography of matrix metalloproteinases. *Anal. Biochem.* 224:434-435.
77. Fernando Segade, Jaime Gómez-Márquez, Prothymosin  $\alpha$ , *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 1999, P. 1243-1248, *Cell Biol.* 31 (1999) 1243-1248.
78. Frank S, Hubner G, Breier G, Longaker MT, Greenhalgh DG, Werner S. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem* 1995; 270: 12607–13.
79. Franko, F.J., Diaz, C., Barcia, M., and Freire, M. (1992). Thymosin  $\alpha$ 1 is a native peptide in several tissues. *Biochim. Biophys. Acta.* 1120, 43-48
80. Freedberg IM, Tomic-Canic M, Komine M, Blumenberg M. Keratins and the keratinocyte activation cycle. *J Invest Dermatol* 2001; 116: 633–40.
81. Fromes, Y., et al., *The tetrapeptide acetyl-serine-aspartyl-lysine-proline improves skin flap survival and accelerates wound healing*. *Wound Repair Regen*, 2006. 14(3): p. 306-12
82. Gachon C.A., et al., Real-Time PCR: What relevance to plant studies?, *Journal of Experimental Botany*, Vol.5, No.402, pp.1445-1454.
83. Gallucci RM, Sloan DK, Heck JM, Murray AR, O'Dell SJ. Interleukin 6 indirectly induces keratinocyte migration. *J Invest Dermatol* 2004; 122: 764–72.
84. Garaci et al., 2012 E. Garaci, F. Pica, A. Serafino, et al. Thymosin  $\alpha$ 1 and cancer: Action on immune effector and tumor target cells *The Annals of the New York Academy of Sciences*, 1269 (2012), pp. 26-33
85. GARACI, E. , FAVALLI, C. , PICA, F. , SINIBALDI VALLEBONA, P. , TERESA PALAMARA, A. , MATTEUCCI, C. , PIERIMARCHI, P. , SERAFINO, A. , MASTINO, A. , BISTONI, F. , ROMANI, L. and RASI, G. (2007), Thymosin Alpha 1. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1112: 225-234.
86. Gaudry M, Bregerie O, Andrieu V, El Benna J, Pocard MA, Hakim J. Intracellular pool of vascular endothelial growth factor in human neutrophils. *Blood* 1997; 90: 4153–61.
87. Gault S (1999) Scars and contractures. *Surgery* 17: 73–5
88. Gerald Litwack, Chapter 21 - Blood and Lymphatic System, *Human Biochemistry*, Academic Press, 2018, Pages 681-708
89. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 30-kinase/Akt signal transduction pathway Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 1998; 273: 30336–43.
90. Gibson DG, et al. (2006) Cell cycle execution point analysis of ORC function and characterization of the checkpoint response to ORC inactivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells* 11(6):557-73
91. Gill SE1, Parks WC., Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(6-7):1334-47.

92. Giuliani, G. Napolitano, A. Mastino, et al. Thymosin- $\alpha$ 1 regulates MHC class I expression in FRTL-5 cells at transcriptional level, *European Journal of Immunology*, 30 (2000), pp. 778-786
93. Goldberg MT, Han YP, Yan C, Shaw MC, Garner WL. TNF- $\alpha$  suppresses  $\alpha$ -smooth muscle actin expression in human dermal fibroblasts: an implication for abnormal wound healing. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 2645–55.
94. Goldstein A.L., F.D. Slater, A. White. Preparation, assay and partial purification of a thymic lymphocytopoietic factor (thymosin), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 56 (3) (1966), pp. 1010-1017
95. Goldstein AL, Hannappel E, Kleinman HK, Thymosin beta 4: actin-sequestering protein moonlights to repair injured tissues, 2005,
96. Goldstein AL, Low TL, McAdoo M, McClure J, Thurman GB, Rossio J, Lai CY, Chang D, Wang SS, Harvey C, Ramel AH, Meienhofer J, 1977, Thymosin  $\alpha$ 1: isolation and sequence analysis of an immunologically active thymic polypeptide. *PNAS USA* 1977; 74: 725-9.
97. Goldstein AL, Thymosin X1: Chemistry, mechanism of action and clinical applications, 1993, *Combination Therapies 2*, Edited by AL Goldstein and E Garaci Plenum Press, New York.
98. Goldstein AL, Guha A, Zatz MM, Hardy MA, White A. Purification and biological activity of thymosin, a hormone of the thymus gland. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1972 Jul;69(7):1800-3.
99. Goldstein AL., History of the discovery of the thymosins. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 Sep;1112:1-13. Epub 2007 Jun 28.
100. Goldstein AL. From lab to bedside: Emerging clinical applications of Thymosin  $\alpha$ 1 *Expert Opinion on Biological Therapy*, 9 (2009), pp. 593-608
101. Goldstein AL1, Badamchian M., Thymosins: chemistry and biological properties in health and disease. *Expert Opin Biol Ther*. 2004 Apr;4(4):559-73.
102. Goldstein AL1, Hannappel E, Sosne G, Kleinman HK. Thymosin  $\beta$ 4: a multi-functional regenerative peptide. Basic properties and clinical applications. *Expert Opin Biol Ther*. 2012 Jan;12(1):37-5
103. Goldstein, A. L., Slater, F. D., & White, A. (1966). Preparation, assay, and partial purification of a thymic lymphocytopoietic factor (thymosin). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 56(3), 1010–1017.
104. Goldstein, A.L., & Kleinman, H.K. (2015). Advances in the basic and clinical applications of thymosin  $\beta$ 4. *Expert opinion on biological therapy*, 15 Suppl 1, S139-45 .
105. Gomez-Marquez, J., et al., High levels of mouse thymosin beta4 mRNA in differentiating P19 embryonic cells and during development of cardiovascular tissues. *Biochim Biophys Acta*, 1996. 1306(2-3): p. 187-93.
106. Gonzalez, G.E., et al., *N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline reduces cardiac collagen cross-linking and inflammation in angiotensin II-induced hypertensive rats*. *Clin Sci (Lond)*, 2014. 126(1): p. 85-94.
107. Goto F, Goto K, Weindel K, Folkman J. Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gels. *Lab Invest* 1993; 69: 508–17.
108. Gottlieb AB, Chang CK, Posnett DN, Fanelli B, Tam JP. Detection of transforming growth factor  $\alpha$  in normal, malignant, and hyperproliferative human keratinocytes. *J Exp Med* 1988; 167: 670–5.
109. Grant DS, Kinsella JL, Kibbey MC, et al. Matrigel induces thymosin beta4 gene in differentiating endothelial cells. *J Cell Sci* 1995;108:3685-94 Ruff D, Crockford D, Girardi G, Zhang Y. A randomized, placebo-controlled, single and multiple dose study of intravenous thymosin beta4 in healthy volunteers. *Ann NY Acad Sci* 2010;1194:223-9
110. Grant, D.S., et al., Matrigel induces thymosin beta 4 gene in differentiating endothelial cells. *J Cell Sci*, 1995. 108 ( Pt 12): p. 3685-94.
111. Grant, D.S., et al., Thymosin  $\beta$ 4 enhances endothelial cell differentiation and angiogenesis. *Angiogenesis*, 1999. 3(2): p. 125-135.
112. Greenhalgh DG. The role of growth factors in wound healing. *J Trauma* 1996; 41: 159–67. 16. Schultz GS, White M, Mitchell R, Brown G, Lynch J, Twardzik DR, Todaro GJ. Epithelial wound healing enhanced by transforming growth factor- $\alpha$  and vaccinia growth factor. *Science* 1987; 235: 350–2.
113. Greenhalgh, D. G. (1998). "The role of apoptosis in wound healing." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 30(9): 1019-1030.

- 114.Greenwel P, Inagaki Y, Hu W, Walsh M, Ramirez F. Sp1 is required for the early response of alpha2(I) collagen to transforming growth factor-beta1. *J Biol Chem* 1997; 272: 19738–45.
- 115.Grellner W, Georg T, Wilske J. Quantitative analysis of proinflammatory cytokines (IL-1beta, IL-6, TNF-alpha) in human skin wounds. *Forensic Sci Int* 2000; 113: 251–64.
- 116.Grottesi et al., 1998 A. Grottesi, M. Sette, T. Palamara, et al. The conformation of peptide Thymosinalpha 1 in solution and in a membrane like environment by circular dichroism and NMR spectroscopy. A possible model for its interaction with the lymphocyte membrane
- 117.Grottesi, A., et al., The conformation of peptide thymosin alpha 1 in solution and in a membrane-like environment by circular dichroism and NMR spectroscopy. A possible model for its interaction with the lymphocyte membrane. *Peptides*, 1998. 19(10): p. 1731-8.
- 118.Guo, S., & DiPietro, L. A. (2010). Factors affecting wound healing. *Journal of dental research*, 89(3), 219–229. doi:10.1177/0022034509359125
- 119.Guo, S., & DiPietro, L. A. (2010). Factors Affecting Wound Healing. *Journal of Dental Research*, 89(3), 219–229.
- 120.Gurtner, G. C., & Evans, G. R. (2000). Advances in Head and Neck Reconstruction. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 106(3), 683.
- 121.H.G. Mannherzand E. Hannappel. The beta-thymosins: intracellular and extracellular activities of a versatile actin binding protein family. *Cell motility and the cytoskeleton*. 66:839-851 (2009).
- 122.Hannappel E. Thymosin beta4 and its posttranslational modifications. *Ann NY Acad Sci* 2010;1194:27-35
- 123.Hannappel E1, Huff T. The thymosins. Prothymosin alpha, parathymosin, and beta-thymosins: structure and function. *Vitam Horm*. 2003;66:257-96.
- 124.Hara T, Thymosins and muscle regeneration, 2011, *Vitam. Horm*. 2011, 87:277-90.
- 125.Hashimoto K, Higashiyama S, Asada H, Hashimura E, Kobayashi T, Sudo K, Nakagawa T, Damm D, Yoshikawa K, Taniguchi N. Heparin-binding epidermal growth factorlike growth factor is an autocrine growth factor for human keratinocytes. *J Biol Chem* 1994; 269: 20060–6
- 126.Hashimoto K, Higashiyama S, Asada H, Hashimura E, Kobayashi T, Sudo K, Nakagawa T, Damm D, Yoshikawa K, Taniguchi N. Heparin-binding epidermal growth factorlike growth factor is an autocrine growth factor for human keratinocytes. *J Biol Chem* 1994; 269: 20060–6.
- 127.Hashimoto K. Regulation of keratinocyte function by growth factors. *J Dermatol Sci* 2000; 24 (Suppl 1): S46–50.
- 128.Hawkes, S.P., H. Li, and G.T. Taniguchi. 2001. Zymography and reverse zymography for detecting MMPs, and TIMPs, p. 399-410. In I. Clark (Ed.), *Matrix Metalloproteinases Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ.
- 129.Hay ED (1991) *Cell Biology of the Extracellular Matrix*. 2nd edn. Plenum Press, New York
- 130.Heintz, D., Reichert, A., Mihelic-Rapp, M., Stoeva, S., Voelter, W. & Faulstich, H. (1994) The sulfoxide of thymosin p4 almost lacks the polymerization-inhibiting capacity for actin, *Eur: J. Biochem*. 223, 345-350.
- 131.Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* 1999; 79: 1283–316.
- 132.Heussen, C. and E.B. Dowdle. 1980. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal. Biochem*. 102:196-202.
- 133.Higashiyama S, Iwabuki H, Morimoto C, Hieda M, Inoue H, Matsushita N. Membrane-anchored growth factors, the epidermal growth factor family: beyond receptor ligands. *Cancer Sci* 2008; 99: 214–20.
- 134.Hinkel R, El-Aouni C, Olson T, et al. Thymosin beta4 is an essential paracrine factor of embryonic endothelial progenitor cell-mediated cardioprotection. *Circulation* 2008;117:2232-40
- 135.Hinz, B. (2007). Formation and Function of the Myofibroblast during Tissue Repair. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(3), 526-537.
- 136.Ho JH, Chuang CH, Ho CY, et al. Internalization is essential for the antiapoptotic effects of exogenous thymosin beta-4 on human corneal epithelial cells. *Invest OphthalmolVis Sci* 2007;48:27-33
- 137.Ho JH, Tseng KC, Ma WH, et al. Thymosin beta-4 upregulates anti-oxidative enzymes and protects corneal epithelial cells against oxidative damage. *Br J Ophthalmol* 2008;92:992-7’.
- 138.Holmes A, Abraham DJ, Sa S et al (2001) CTGF and SMADs, maintenance of scleroderma phenotype is independent of SMAD signaling. *J Biol Chem* 276:10594–10601

139. Hong YK, Lange-Asschenfeldt B, Velasco P, Hirakawa S, Kunstfeld R, Brown LF, Bohlen P, Senger DR, Detmar M. VEGF-A promotes tissue repair-associated lymphatic vessel formation via VEGFR-2 and the  $\alpha 1\beta 1$  and  $\alpha 2\beta 1$  integrins. *FASEB J* 2004; 18: 1111–3.
140. Hopkinson, I., *Molecular components of the extracellular matrix*. J Wound Care, 1992. 1(1): p. 52–54.
141. Houghton, Scott G. et al. Real-time PCR: Overview and applications. *Surgery*, Volume 139, Issue 1, 1 – 5
142. <https://emedicine.medscape.com/article/1298196-overview#showall>
143. Hu SK, Low TL, Goldstein AL. Modulation of terminal deoxynucleotidyl transferase activity by thymosin. *Mol Cell Biochem* 1981;41:49–58
144. Huang LC, Jean D, Proske RJ, et al. Ocular surface expression and in vitro activity of antimicrobial peptides. *Curr Eye Res* 2007;32:595–609
145. Huang, W. Q., Wang, B. H. and Wang, Q. R. (2006), Thymosin  $\beta 4$  and AcSDKP inhibit the proliferation of HL-60 cells and induce their differentiation and apoptosis. *Cell Biology International*, 30: 514–520.
146. Huff T, Otto AM, Müller CS, Meier M, Hannappel E, Thymosin  $\beta 4$  is released from human blood platelets and attached by factor XIIIa (transglutaminase) to fibrin and collagen, 2002, *FASEB J*. 2002, 16:691–6.
147. Huff, T., et al., Nuclear localisation of the G-actin sequestering peptide thymosin  $\beta 4$ . *J Cell Sci*, 2004. 117(Pt 22): p. 5333–41.
148. Huff, T., et al., Thymosin  $\beta 4$  is released from human blood platelets and attached by factor XIIIa (transglutaminase) to fibrin and collagen. *FASEB J*, 2002. 16(7): p. 691–6.
149. Hunt T, Pai M (1975) The effect of varying ambient oxygen tensions on wound metabolism and collagen synthesis. *Surg Gynecol Obstet* 135: 561–7
150. Igarashi A, Okochi H, Bradham DM et al (1993) Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. *Mol Biol Cell* 4:637–645
151. J. Banyard, L.M. Hutchinson, and B.R. Zetter. Thymosin  $\beta 4$  is the human isoform of rat thymosin  $\beta 15$ . *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1112:286–296 (2007).
152. J.M. Liu, M.C. Garcia-Alvarez, J. Bignon, M. Kusinski, K. Kuzdak, A. Riches, and J. Wdzieczak-Bakala. Overexpression of the natural tetrapeptide acetyl-N-ser-asp-lys-pro derived from thymosin  $\beta 4$  in neoplastic diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1194:53–59(2010).
153. Jacinto, A., A. Martinez-Arias, et al. (2001). "Mechanisms of epithelial fusion and repair." *Nat Cell Biol* 3(5): E117–E123
154. Jazwa A, Loboda A, Golda S, Cisowski J, Szelag M, Zagorska A, Sroczynska P, Drukala J, Jozkowicz A, Dulak J. Effect of heme and heme oxygenase-1 on vascular endothelial growth factor synthesis and angiogenic potency of human keratinocytes. *Free Radic Biol Med* 2006; 40: 1250–63.
155. Ji, Y.I., et al., Expression patterns of Thymosin  $\beta 4$  and cancer stem cell marker CD133 in ovarian cancers. *Pathol Oncol Res*, 2013. 19(2): p. 237–45.
156. Jiang CK, Magnaldo T, Ohtsuki M, Freedberg IM, Berner F, Blumenberg M. Epidermal growth factor and transforming growth factor  $\alpha$  specifically induce the activation and hyperproliferation-associated keratins 6 and 16. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 6786–90.
157. Jinnin M, Ihn H, Mimura Y, Asano Y, Yamane K, Tamaki K. Regulation of fibrogenic/fibrolytic genes by platelet-derived growth factor C, a novel growth factor, in human dermal fibroblasts. *J Cell Physiol* 2005; 202: 510–7.
158. Joukov V, Sorsa T, Kumar V, Jeltsch M, Claesson-Welsh L, Cao Y, Saksela O, Kalkkinen N, Alitalo K. Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGFC. *EMBO J* 1997; 16: 3898–911.
159. 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, 2014, *Front. Pharmacol.* 14 April 2014,
160. Kane CJ, Hebda PA, Mansbridge JN, Hanawalt PC. Direct evidence for spatial and temporal regulation of transforming growth factor  $\beta 1$  expression during cutaneous wound healing. *J Cell Physiol* 1991; 148: 157–73.
161. Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, Jeltsch M, Jackson DG, Talikka M, Rauvala H, Betsholtz C, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* 2004; 5: 74–80.

162. Kleinman HK, Sosne G. Thymosin  $\beta$ 4 Promotes Dermal Healing. *Vitam Horm.* 2016;102:251-75.
163. Knutsen A.P., J.J. Freeman, K.R. Mueller, et al. Thymosin- $\alpha$ 1 stimulates maturation of CD34 + stem cells into CD3+4 + cells in an in vitro thymic epithelia organ coculture model, *International Journal of Immunopharmacology*, 21 (1999), pp. 15-26
164. Knuutinen A, Kokkonen N, Risteli J, Vähäkangas K, Kallioinen M, Salo T, Sorsa T, Oikarinen A (2002) Smoking affects collagen synthesis and extracellular matrix turnover in human skin. *Br J Dermatol* 146: 588–94
165. Kobayashi, T., et al., Thymosin- $\beta$ 4 regulates motility and metastasis of malignant mouse fibrosarcoma cells. *Am J Pathol*, 2002. 160(3): p. 869-82.
166. Kocher O, Madri JA (1989) Modulation of actin mRNAs in cultured vascular cells by matrix components and TGF- $\beta$ 1. *In Vitro Cell Dev Biol* 25:424–434
167. Komiyama T, Komiyama L.X. Pan, A.A. Horitos, J.W. Wideman, Y.C.E. Pan, M. Chang, I. Rogers, B.L. Horecker The primary structure of parathymosin *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83 (1986), p. 1242
168. Kopecki Z, Luchetti MM, Adams DH, Strudwick X, Mantamadiotis T, Stoppacciaro A, Gabrielli A, Ramsay RG, Cowin AJ. Collagen loss and impaired wound healing is associated with c-Myb deficiency. *J Pathol* 2007; 211: 351–61.
169. Koutrafouris V1, Leondiadis L, Avgoustakis K, Livanou E, Czarnecki J, Ithakissios DS, Evangelatos GP. Effect of thymosin peptides on the chick chorioallantoic membrane angiogenesis model. *Biochim Biophys Acta*. 2001 Nov 7;1568(1):60-6.
170. Krishnaswami S, Ly QP, Rothman VL, Tuszynski GP. Thrombospondin-1 promotes proliferative healing through stabilization of PDGF. *J Surg Res* 2002; 107: 124–30.
171. Kullavanuava et al., 2001 P. Kullavanuava, S. Treeprasertsuk, D. Thong-Ngam, et al. The combined treatment of interferon  $\alpha$ -2a and Thymosin  $\alpha$ 1 for chronic hepatitis C: The 48 weeks end of treatment results *Journal of the Medical Association of Thailand*, 84 (2001), pp. 462-468
172. Kumar S, Gupta S (2011) Thymosin  $\beta$ 4 Prevents Oxidative Stress by Targeting Antioxidant and Anti-Apoptotic Genes in Cardiac Fibroblasts. *PLoS ONE* 6(10): e26912. doi:10.1371/journal.pone.0026912
173. Kupper TS, Deitch EA, Baker CC, Wong WC. The human burn wound as a primary source of interleukin-1 activity. *Surgery* 1986; 100: 409–15.
174. Kwok P.Y. (2001) Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 2, 235–258.
175. L. Renault, C. Deville, C. van Heijenoort, Structural features and interfacial properties of WH2,  $\beta$ -thymosin domains and other intrinsically disordered domains in the regulation of actin cytoskeleton dynamics *Cytoskeleton* (Hoboken, N.J.), 70 (11) (2013), pp. 686-705
176. L. Romani, F. Bistoni, R. Gaziano, et al. Thymosin  $\alpha$ 1 activates dendritic cells for antifungal Th1 resistance through toll-like receptor signalling *Blood*, 103 (2004), pp. 4232-4239
177. L. Romani, S. Moretti, F. Fallarino, et al. Jack of all trades: Thymosin  $\alpha$ 1 and its pleiotropy, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1269 (2012), pp. 1-6
178. Larsson, L.-I., & Holck, S. (2007). Occurrence of thymosin  $\beta$ 4 in human breast cancer cells and in other cell types of the tumor microenvironment. *Human Pathology*, 38(1), 114-119.
179. Lau, K., Paus, R., Tiede, S., Day, P. and Bayat, A. (2009), Exploring the role of stem cells in cutaneous wound healing. *Experimental Dermatology*, 18: 921–933.
180. Leask A (2008) Targeting the TGF $\beta$ , endothelin-1 and CCN2 axis to combat fibrosis in scleroderma. *Cell Signal* 20:1409–1414
181. Leber, T.M. and F.R. Balkwill. 1997. Zymography: a single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. *Anal. Biochem.* 249:24-28.
182. Lederle W, Stark HJ, Skobe M, Fusenig NE, Mueller MM. Platelet-derived growth factor-BB controls epithelial tumor phenotype by differential growth factor regulation in stromal cells. *Am J Pathol* 2006; 169: 1767–83.
183. Lee HS, Kooshesh F, Sauder DN, Kondo S. Modulation of TGF- $\beta$ 1 production from human keratinocytes by UVB. *Exp Dermatol* 1997; 6: 105–10.
184. Lenfant, M., et al., *Enhancement of the adherence of hematopoietic stem cells to mouse bone marrow-derived stromal cell line MS-1-T by a tetrapeptide acetyl-N-Ser-Asp-Lys-Pro*. *Exp Hematol*, 1989. 17(8): p. 898-902.

- 185.Li Y, Fan J, Chen M, Li W, Woodley DT. Transforming growth factor- $\alpha$ : a major human serum factor that promotes human keratinocyte migration. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 2096–105.
- 186.Li, W., et al., Expression, purification and characterization of a novel soluble human thymosin  $\alpha$ 1 concatemer exhibited a stronger stimulation on mice lymphocytes proliferation and higher anti-tumor activity. *Int J Biol Sci*, 2011. 7(5): p. 618-28.
- 187.Liang CC<sup>1</sup>, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc.* 2007;2(2):329-33.
- 188.Lin H, Chen B, Sun W, Zhao W, Zhao Y, Dai J. The effect of collagen-targeting platelet-derived growth factor on cellularization and vascularization of collagen scaffolds. *Biomaterials* 2006; 27: 5708–14.
- 189.Liozon E, Pradelles P, Venot J, Rigaud M, Cransac M, Bordessoule D, Frindel E, Serum levels of a negative regulator of cell proliferation (Ac-SDKP) are increased in certain human haemopathies, 1993, *Leukemia* 7: 808-12.
- 190.Liu W, Chua C, Wu X, Wang D, Ying D, Cui L, Cao Y. Inhibiting scar formation in rat wounds by adenovirus-mediated overexpression of truncated TGF- $\beta$  receptor II. *Plast Reconstr Surg* 2005; 115: 860–70.
- 191.Low TL, Goldstein AL., Thymosins: structure, function and therapeutic applications. *Thymus*. 1984;6(1-2):27-42.
- 192.Low TL, Thurman GB, McAdoo M, McClure J, Rossio JL, Naylor PH, Goldstein AL. The chemistry and biology of thymosin. I. Isolation, characterization, and biological activities of thymosin  $\alpha$ 1 and polypeptide  $\beta$ 1 from calf thymus. . *J Biol Chem*. 1979 Feb 10;254(3):981-6.
- 193.Low TLK, Hu SK, Goldstein AL, Complete amino acid sequence of bovine thymosin  $\beta$ 4: A thymic hormone that induces terminal deoxynucleotidyl transferase activity in thymocyte populations, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1981, 78:1162-6.
- 194.Lu W, Luo Y, Kan M, McKeehan WL. Fibroblast growth factor-10. A second candidate stromal to epithelial cell andromedin in prostate. *J Biol Chem* 1999; 274: 12827–34.
- 195.Lugo, D.I., et al., Developmental regulation of beta-thymosins in the rat central nervous system. *J Neurochem*, 1991. 56(2): p. 457-61.
- 196.M. Maio, A. Mackiewicz, A. Testori, et al. Large randomized study of Thymosin  $\alpha$  1, interferon  $\alpha$ , or both in combination with dacarbazine in patients with metastatic melanoma, *Journal of Clinical Oncology*, 28 (2010), pp. 1780-1787
- 197.M., Sherling, M. A., Filler, R. B., Shires, J., Theodoridis, E., Hayday, A. C., Tigelaar, R. E. (2003) Anti-inflammatory effects in the skin of thymosin  $\beta$ 4 splice variants. *Immunology* 1–7. hypertensive rats. *Hypertension* 37, 794–800 Giradi
- 198.M.F. Carlier, C. Husson, L. Renault, D. Didry Control of actin assembly by the WH2 domains and their multifunctional tandem repeats in Spire and Cordon-Bleu *International Review of Cell and Molecular Biology*, 290 (2011), pp. 55-85
- 199.Malinda KM, Goldstein AL, Kleinman HK. Thymosin  $\beta$ 4 stimulates directional migration of human umbilical vein endothelial cells. *FASEB J* 1997;11:474-81
- 200.Malinda KM, Sidhu GS, Banaudha KK, Gaddipati JP, Maheshwari RK, Goldstein AL, Kleinman HK, Thymosin  $\alpha$ 1 Stimulates Endothelial Cell Migration, Angiogenesis, and Wound Healing, 1998, 160 (2) 1001-1006.
- 201.Malinda KM, Sidhu GS, Mani H, et al. Thymosin  $\beta$ 4 accelerates wound healing. *J Invest Dermatol* 1999;113:364-8
- 202.Mani H, Sidhu GS, Kumari R, Gaddipati JP, Seth P, Maheshwari RK. Curcumin differentially regulates TGF $\beta$ 1, its receptors and nitric oxide synthase during impaired wound healing. *Biofactors* 2002; 16: 29–43.
- 203.Mannherz HG<sup>1</sup>, Hannappel E., The beta-thymosins: intracellular and extracellular activities of a versatile actin binding protein family. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2009 Oct;66(10):839-51.
- 204.Manrow et al., 1991 R.E. Manrow, A.R. Sburlati, J.A. Hanover, S.L. Berger Nuclear targeting of proThymosin  $\alpha$  The *Journal of Biological Chemistry*, 266 (1991), pp. 3916-3924
- 205.Manuel Freire<sup>1\*</sup>, Pablo Barbeito<sup>1</sup>, Concepción S. Sarandeses<sup>1</sup>, Cristina Díaz-Jullien<sup>1</sup>, Juan Muras<sup>1</sup>, Guillermo Covelo<sup>1</sup>, David Moreira<sup>1</sup> and Carmen Freire-Cobo<sup>1</sup>, Prothymosin  $\alpha$ , a protein implicated in the proliferation and survival of lymphocytes, (2018)., *Journal of Immunological Sciences*, pp. 19-25
- 206.Marikovskiy M, Breuing K, Liu PY, Eriksson E, Higashiyama S, Farber P, Abraham J, Klagsbrun M. Appearance of heparin-binding EGF-like growth factor in wound fluid as a response to injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 3889–93.

207. Markmann A, Hausser H, Schonherr E, Kresse H. Influence of decorin expression on transforming growth factor-beta-mediated collagen gel retraction and biglycan induction. *Matrix Biol* 2000; 19: 631–6.
208. Martin, P. (1997). Wound Healing--Aiming for Perfect Skin Regeneration. *Science*, 276(5309), 75–81.
209. Martin, P., & Nunan, R. (2015). Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. *The British journal of dermatology*, 173(2), 370–378.
210. Massague J, Pandiella A. Membrane-anchored growth factors. *Annu Rev Biochem* 1993; 62: 515–41.
211. Massague J, Wotton D (2000) Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J* 19:1745–1754
212. Mauviel A, Chung KY, Agarwal A, Tamai K, Uitto J. Cellspecific induction of distinct oncogenes of the Jun family is responsible for differential regulation of collagenase gene expression by transforming growth factor-beta in fibroblasts and keratinocytes. *J Biol Chem* 1996; 271: 10917–23.
213. McColl BK, Baldwin ME, Roufail S, Freeman C, Moritz RL, Simpson RJ, Alitalo K, Stacker SA, Achen MG. Plasmin activates the lymphangiogenic growth factors VEGF-C and VEGF-D. *J Exp Med* 2003; 198: 863–8.
214. Meckmongkol TT, Harmon R, McKeown-Longo P, Van De Water L. The fibronectin synergy site modulates TGF-beta-dependent fibroblast contraction. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 360: 709–14.
215. Menke, Nathan & Ward, Kevin & Witten, Tarynn & Bonchev, Danail & Diegelmann, Robert. (2007). Impaired wound healing. *Clin Dermatol. Clinics in Dermatology*. 25. 19-25. 10.1016/j.clindermatol.2006.12.005.
216. Merwin JR, Roberts A, Kondaiah P, Tucker A, Madri J. Vascular cell responses to TGF-beta 3 mimic those of TGF-beta 1 in vitro. *Growth Factors* 1991; 5: 149–58.
217. Miller, S. J., Burke, E. M., Rader, M. D., Coulombe, P. A., & Lavker, R. M. (1998). Re-epithelialization of Porcine Skin By The Sweat Apparatus. *Journal of Investigative Dermatology*, 110(1), 13–19.
218. Mine N, Iwamoto R, Mekada E. HB-EGF promotes epithelial cell migration in eyelid development. *Development* 2005; 132: 4317–26.
219. Mitra R, Khar A. Suppression of macrophage function in AK-5 tumor transplanted animals: role of TGF-beta1. *Immunol Lett* 2004; 91: 189–95.
220. Mohle R, Green D, Moore MA, Nachman RL, Rafii S. Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 663–8.
221. Morbidelli L, Chang CH, Douglas JG, Granger HJ, Ledda F, Ziche M. Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium. *Am J Physiol* 1996; 270 (1 Pt 2): H411–5.
222. Morris DC, Chopp M, Zhang L, et al. Thymosin beta4 improves functional neurological outcome in a rat model of embolic stroke. *Neuroscience* 2010; 169: 674–82
223. Morris DC, Chopp M, Zhang ZG. Thymosin beta4: a candidate for treatment of stroke. *Ann NY Acad Sci* 2010; 1194: 112–17
224. MOESSON, M. W., SIEBENLIST, K. R. and MEH, D. A. (2001), The Structure and Biological Features of Fibrinogen and Fibrin. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 936: 11–30.
225. Mott JD1, Werb Z., Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol*. 2004 Oct; 16(5): 558–64.
226. Muller, M. , Trocme, C. , Lardy, B. , Morel, F. , Halimi, S. and Benhamou, P. Y. (2008), Matrix metalloproteinases and diabetic foot ulcers: the ratio of MMP-1 to TIMP-1 is a predictor of wound healing. *Diabetic Medicine*, 25: 419–426.
227. Murphy GM, Dowd PM, Hudspeth BN, Brostoff J, Greaves MW. Local increase in interleukin-1-like activity following UVB irradiation of human skin in vivo. *Photodermatol* 1989; 6: 268–74.
228. Nachmias V, Cassimeris L., Golla R. et al., Thymosins beta 4 (Tb4) in activated platelets. *Eur J Cell Biol*. 1993; 314–320
229. Namiki A, Brogi E, Kearney M, Kim EA, Wu T, Couffinhal T, Varticovski L, Isner JM. Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 31189–95.

- 230.Nanney LB. Epidermal and dermal effects of epidermal growth factor during wound repair. *J Invest Dermatol* 1990; 94: 624–9.
- 231.Nepravishita, R., et al., Mechanism of Action of Thymosinalpha1: Does It Interact with Membrane by Recognition of Exposed Phosphatidylserine on Cell Surface? A Structural Approach. *Vitam Horm*, 2016. 102: p. 101-19.
- 232.Niessen FB, Andriessen MP, Schalkwijk J, Visser L, Timens W. Keratinocyte-derived growth factors play a role in the formation of hypertrophic scars. *J Pathol* 2001; 194: 207–16.
- 233.Nissen NN, Polverini PJ, Koch AE, Volin MV, Gamelli RL, DiPietro LA. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *Am J Pathol* 1998; 152: 1445–52.
- 234.Niu J, Chang Z, Peng B, Xia Q, Lu W, Huang P, Tsao MS, Chiao PJ. Keratinocyte growth factor/fibroblast growth factor-7-regulated cell migration and invasion through activation of NF-kappaB transcription factors. *J Biol Chem* 2007; 282: 6001–11.
- 235.Oates KK, Goldstein AL: Thymosin. In DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds) *Biologic Therapy of Cancer*. Philadelphia: JB Lippincott, 1995, pp. 841–852
- 236.Oda K, Matsuoka Y, Funahashi A, Kitano H. A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Syst Biol* 2005; 1–17
- 237.Olander JV, Connolly DT, DeLarco JE. Specific binding of vascular permeability factor to endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 175: 68–76.
- 238.Oliver, G.W., J.D. Leferson, W.G. Stetler-Stevenson, and D.E. Kleiner. 1997. Quantitative reverse zymography: analysis of picogram amounts of metalloproteinase inhibitors using gelatinase A and B reverse zymograms. *Anal. Biochem.* 244:161-166.
- 239.Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA, Coulier F, Gao G, Goldfarb M. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* 1996; 271: 15292–7.
- 240.P. Zhang, J. Chan, A.M. Dragoi, et al.Activation of IKK by thymosina1 requires the TRAF6 signaling pathway, *EMBO Reports*, 6 (2005), pp. 531-537
- 241.Papakonstantinou E, Aletras AJ, Roth M, Tamm M, Karakiulakis G. Hypoxia modulates the effects of transforming growth factor-beta isoforms on matrix-formation by primary human lung fibroblasts. *Cytokine* 2003; 24: 25-35.
- 242.Papamarcaki T\*, Orestes Tsolas., Prothymosin a binds to Histone HI in vitro. *FEBS Letters* 345 (1994) 71-75
- 243.Parks WC1, Wilson CL, López-Boado YS., Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2004 Aug;4(8):617-29.
- 244.PEACOCK E. E., Jr (1962). Production and polymerization of collagen in healing wounds of rats: some rate-regulating factors. *Annals of surgery*, 155(2), 251–257. doi:10.1097/0000658-196200000-00015
- 245.Peng H, Carretero OA, Peterson EL, Rhaleb NE, Ac-SDKP inhibits transforming growth factor-beta1-induced differentiation of human cardiac fibroblasts into myofibroblasts, 2010, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2010, 298:H1357-64.
- 246.Peng, H., Carretero, O. A., Raji, L., Yang, F., Kapke, A., and Rhaleb, N. E. (2001) Antifibrotic effects of N-acetyl-seryl-aspartyl- lysyl-prline on the heart and kidney in aldosterone-salt
- 247.PENG, X. , ZHANG, P. , WANG, X. , CHAN, J. , ZHU, M. , JIANG, M. , TUTHILL, C. , WAN, Y. , DRAGOI, A. M. and CHU, W. (2007), Signaling Pathways Leading to the Activation of IKK and MAPK by Thymosin α1. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1112: 339-350.
- 248.Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 189: 824–31.
- 249.Peptides, 19 (1998), pp. 1731-1738
- 250.Perruccio K1, Bonifazi P, Topini F, Tosti A, Bozza S, Aloisi T, Carotti A, Aversa F, Martelli MF, Romani L, Velardi A., Thymosin alpha1 to harness immunity to pathogens after haploidentical hematopoietic transplantation. *Ann N Y Acad Sci.* 2010 Apr;1194:153-61
- 251.Peters KG, De Vries C, Williams LT. Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 8915–9.
- 252.Philp D, Badmamchiam M, Scheremeta B, et al. Thymosin beta4 and a synthetic peptde containing its actin-binding domain promote dermal wound reapi in db/db diabetic mice and in aged mice. *Wound Repair Regen* 2003;11:19-24

253. Philp D, Nguyen M, Scheremeta B, et al. Thymosin beta4 increases hair growth by activation of hair follicle stem cells. *FASEB J* 2004;18:385-7
254. Philp, D. , Scheremeta, B. , Sibbliss, K. , Zhou, M. , Fine, E. L., Nguyen, M. , Wahl, L. , Hoffman, M. P. and Kleinman, H. K. (2006), Thymosin  $\beta_4$  promotes matrix metalloproteinase expression during wound repair. *J. Cell. Physiol.*, 208: 195-200.
255. Pittelkow MR, Cook PW, Shipley GD, Derynck R, Coffey RJ Jr. Autonomous growth of human keratinocytes requires epidermal growth factor receptor occupancy. *Cell Growth Differ* 1993; 4: 513–21.
256. Plow, E. F., Pierschbacher, M. D., Ruoslahti, E., Marguerie, G. A., & Ginsberg, M. H. (1985). The effect of Arg-Gly-Asp-containing peptides on fibrinogen and von Willebrand factor binding to platelets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(23), 8057–8061.
257. Pokharel, S., et al., *N-acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro inhibits phosphorylation of Smad2 in cardiac fibroblasts*. *Hypertension*, 2002. **40**(2): p. 155-61.
258. Popoli, P., et al., Neuroprotective effects of thymosin beta4 in experimental models of excitotoxicity. *Ann N Y Acad Sci*, 2007. 1112: p. 219-24.
259. Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer* 2000; 7: 165–97.
260. Pratsinis H, et al. Autocrine growth regulation in fetal and adult human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Aug 18;237(2):348-53.
261. Profyris, C., Tziotzios, C., & Vale, I. D. (2012). Cutaneous scarring: Pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 66(1), 1-10.
262. Qi, J. H., Ebrahem, Q., Ali, M., Cutler, A., Bell, B., Prayson, N., ... Anand-Apte, B. (). Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 peptides inhibit angiogenesis and choroidal neovascularization in mice. *PloS one*, 8(3), e55667. doi:10.1371/journal.pone.0055667
263. Qiu P, Kurpakus-Wheater M, Sosne G. Matrix metalloproteinase activity is necessary for thymosin beta 4 promotion of epithelial cell migration. *J Cell Physiol* 2007;212:165-73
264. R. Dominguez Actin filament nucleation and elongation factors—Structure-function relationships, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 44 (6) (2009), pp. 351-366
265. R.S. Schulof, M.J. Lloyd, P.A. Cleary, S.R. Palaszynski, D.A. Mai, J.W. Cox Jr., O. Alabaster, A.L. Goldstein, A randomized trial to evaluate the immunorestorative properties of synthetic thymosin-alpha 1 in patients with lung cancer, *J. Biol. Response Mod*. 4 (1985) 147^158.
266. Raab G, Klagsbrun M. Heparin-binding EGF-like growth factor. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1333: F179–99.
267. Rabhi-Sabile S, Pidard D, Lawler J, Renesto P, Chignard M, Legrand C. Proteolysis of thrombospondin during cathepsin- G-induced platelet aggregation: functional role of the 165-kDa carboxy-terminal fragment. *FEBS Lett* 1996; 386: 82–6.
268. Rappolee DA, Mark D, Banda MJ, Werb Z. Wound macrophages express TGF-alpha and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping. *Science* 1988; 241: 708–12.
269. Reinke, J., & Sorg, H. (2012). Wound Repair and Regeneration. *European Surgical Research*, 49(1), 35-43.
270. Reiss M, Sartorelli AC. Regulation of growth and differentiation of human keratinocytes by type beta transforming growth factor and epidermal growth factor. *Cancer Res* 1987; 47 (24 Pt 1): 6705–9.
271. Rhaleb NE, Peng H, Harding P, Tayeh M, LaPointe MC, Carretero O. A, Effect of N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline on DNA and collagen synthesis in rat cardiac fibroblasts, 2001, *Hypertension* 2001; 37:827-32.
272. Rhaleb NE<sup>1</sup>, Pokharel S, Sharma UC, Peng H, Peterson E, Harding P, Yang XP, Carretero OA. N-acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro inhibits interleukin-1 $\beta$ -mediated matrix metalloproteinase activation in cardiac fibroblasts. *Pflugers Arch*. 2013 Oct;465(10):1487-95.
273. Rhee S, Grinnell F. P21-activated kinase 1: convergence point in PDGF- and LPA-stimulated collagen matrix contraction by human fibroblasts. *J Cell Biol* 2006; 172: 423–32.
274. Riedel K, Riedel F, Goessler UR, Germann G, Sauerbier M. Tgf-beta antisense therapy increases angiogenic potential in human keratinocytes in vitro. *Arch Med Res* 2007; 38: 45–51.
275. Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH, Fauci AS. Transforming growth factor type beta: rapid induction of

- fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 4167–71.
276. Robson MC. The role of growth factors in the healing of chronic wounds. *Wound Repair Regen* 1997; 5: 12–7.
  277. Robson, M. C., Steed, D. L., & Franz, M. G. (2001). Wound healing: Biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Current Problems in Surgery*, 38(2).
  278. Roh, C., & Lyle, S. (2006). Cutaneous Stem Cells and Wound Healing. *Pediatric Research*, 59.
  279. Rolfe KJ, Richardson J, Vigor C, Irvine LM, Grobbelaar AO, Linge C. A role for TGF-beta1-induced cellular responses during wound healing of the non-scarring early human fetus? *J Invest Dermatol* 2007; 127: 2656–67.
  280. Roy P, Raifur Z, Jones D, et al. Local photorelease of caged thymosin beta4 in locomoting keratocytes causes cell turning. *J Cell Biol* 2001;153:1035-48
  281. S. Dhaese, K. Vandepoele, D. Waterschoot, B. Vanloo, J. Vandekerckhove, C. Ampe, and M. Van Troys. The mouse thymosin beta15 gene family displays unique complexity and encodes a functional thymosin repeat. *J Mol Biol.* 387:809-825 (2009).
  282. S. Iino, J. Toyota, H. Kumada, et al. The efficacy and safety of Thymosin alpha-1 in Japanese patients with chronic hepatitis B; results from a randomized clinical trial, *Journal of Viral Hepatitis*, 12 (2005), pp. 300-306
  283. Saaristo A, Tammela T, Farkkila A, Karkkainen M, Suominen E, Yla-Herttuala S, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor-C accelerates diabetic wound healing. *Am J Pathol* 2006; 169: 1080–7.
  284. Saghaleini SH, Dehghan K, Shadvar K, Sanaie S, Mahmoodpoor A, Ostadi Z. Pressure Ulcer and Nutrition. *Indian J Crit Care Med.* 2018 Apr;22(4):283-289.
  285. Sanders, M.C., A.L. Goldstein, and Y.L. Wang, Thymosin beta 4 (Fx peptide) is a potent regulator of actin polymerization in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. 89(10): p. 4678-82.
  286. Santra M<sup>1</sup>, Chopp M, Zhang ZG, Lu M, Santra S, Nalani A, Santra S, Morris DC. Thymosin  $\beta$  4 mediates oligodendrocyte differentiation by upregulating p38 MAPK. *Glia*. 2012 Dec;60(12):1826-38.
  287. Sarandeses CS<sup>1</sup>, Covelo G, Díaz-Jullien C, Freire M.. Prothymosin alpha is processed to thymosin alpha 1 and thymosin alpha 11 by a lysosomal asparaginyl endopeptidase. *J Biol Chem.* 2003 Apr 11;278(15):13286-93. Epub 2003 Jan 28.
  288. Sasaki T. The effects of basic fibroblast growth factor and doxorubicin on cultured human skin fibroblasts: relevance to wound healing. *J Dermatol* 1992; 19: 664–6.
  289. Sato M, Sawamura D, Ina S, Yaguchi T, Hanada K, Hashimoto I. In vivo introduction of the interleukin 6 gene into human keratinocytes: induction of epidermal proliferation by the fully spliced form of interleukin 6, but not by the alternatively spliced form. *Arch Dermatol Res* 1999; 291: 400–4.
  290. Schoppmann SF, Birner P, Stockl J, Kalt R, Ullrich R, Caucig C, Kriehuber E, Nagy K, Alitalo K, Kerjaschki D. Tumor- associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *Am J Pathol* 2002; 161: 947–56.
  291. Schultz G, Rotatori DS, Clark W. EGF and TGF-alpha in wound healing and repair. *J Cell Biochem* 1991; 45: 346–52.
  292. Schwartz's Principles of Surgery, Tenth Edition
  293. Senger DR, Ledbetter SR, Claffey KP, Papadopoulos-Sergiou A, Peruzzi CA, Detmar M. Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin, osteopontin, and thrombin. *Am J Pathol* 1996; 149: 293–305.
  294. Serafino, F. Pica, F. Andreola, et al. Thymosin  $\alpha$ 1 activates complement receptor-mediated phagocytosis in human monocyte-derived macrophages, *Journal of Innate Immunity*, 6 (2014), pp. 72-88
  295. Shah M, Foreman DM, Ferguson MW. Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *J Cell Sci* 1995; 108 (Pt 3): 985–1002.
  296. Shah SP, Youngquist ST, Mcclung CD, et al. Markers of progenitor cell recruitment and differentiation rise early during ischemia and continue during resuscitation in a porcine acute ischemia model. *J Interferon Cytokine Res* 2011;31:509-13

297. Sharma, U., Rhaleb, N. E., Pokharel, S., Harding, P., Rasoul, S., Peng, H., and Carretero, O. A. (2008) Novel anti-inflammatory mechanisms of N-acetyl ser-asp-lys-pro in hypertension-induced target organ damage. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294, H1226–H1232
298. Shibya, K., Kanasaki, M., Isono, H., Sato, M., Omata, T., Sugimoto, S., Araki, K., Isshiki, A., Kashiwagi, M., Haneda, D., and Koya, D. (2005) N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline prevents renal insufficiency and mesangial matrix expansion in diabetic db/db mice. *Diabetes* 54, 838–845
299. Shing Y, Christofori G, Hanahan D, Ono Y, Sasada R, Igarashi K, Folkman J. Betacellulin: a mitogen from pancreatic beta cell tumors. *Science* 1993; 259: 1604–7.
300. Shiraha H, Glading A, Gupta K, Wells A. IP-10 inhibits epidermal growth factor-induced motility by decreasing epidermal growth factor receptor-mediated calpain activity. *J Cell Biol* 1999; 146: 243–54.
301. Shirakata Y, Kimura R, Nanba D, Iwamoto R, Tokumaru S, Morimoto C, Yokota K, Nakamura M, Sayama K, Mekada E, Higashiyama S, Hashimoto K. Heparin-binding EGF-like growth factor accelerates keratinocyte migration and skin wound healing. *J Cell Sci* 2005; 118 (Pt 11): 2363–70.
302. Shirakata Y, Komurasaki T, Toyoda H, Hanakawa Y, Yamasaki K, Tokumaru S, Sayama K, Hashimoto K. Epiregulin, a novel member of the epidermal growth factor family, is an autocrine growth factor in normal human keratinocytes. *J Biol Chem* 2000; 275: 5748–53.
303. Shoyab M, Plowman GD, McDonald VL, Bradley JG, Todaro GJ. Structure and function of human amphiregulin: a member of the epidermal growth factor family. *Science* 1989; 243 (4894 Pt 1): 1074–6.
304. Shukla A, Dubey MP, Srivastava R, Srivastava BS. Differential expression of proteins during healing of cutaneous wounds in experimental normal and chronic models. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 244: 434–9.
305. Sidgwick GP1, Bayat A. Extracellular matrix molecules implicated in hypertrophic and keloid scarring. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2012 Feb;26(2):141-52.
306. Smad3-dependent regulation of type I collagen in human dermal fibroblasts: Impact on human skin connective tissue aging Purohit, Trupta et al. *Journal of Dermatological Science*, Volume 83, Issue 1, 80 - 83
307. Smart N, Bollini S, Dube KN, et al. De novo cardiomyocytes from within the activated adult heart after injury. *Nature* 2011;474:640-4
308. Smart N, Dube KN, Riley PR. Identification of thymosin beta4 as an effector of Hand1-mediated vascular development. *Nat Commun* 2010;1:1-10
309. Smart N, Riseboro CA, Melville AA, et al. Thymosin beta4 induces adult cardiac progenitor mobilization and neovascularization. *Nature* 2007;445:177-82
310. Sogabe Y, Abe M, Yokoyama Y, Ishikawa O. Basic fibroblast growth factor stimulates human keratinocyte motility by Rac activation. *Wound Repair Regen* 2006; 14: 457–62.
311. Sorg, H., Krueger, C. and Vollmar, B. (2007), Intravital insights in skin wound healing using the mouse dorsal skin fold chamber. *Journal of Anatomy*, 211: 810–818.
312. Sosne G, Christopherson PL, Barrett RP, Fridman R. Thymosin-beta4 modulates corneal matrix metalloproteinase levels and polymorphonuclear cell infiltration after alkali injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:2388-95
313. Sosne G, Hafeez S, Greenberry AL II, Kurpakus-Wheater M. Thymosin beta4 promotes human conjunctival epithelial cell migration. *Curr Eye Res* 2002;24:268-73
314. Sosne G, Qiu P, Christopherson PL, Wheeler MK. Thymosin beta 4 suppression of corneal NFkappaB: a potential anti-inflammatory pathway. *Exp Eye Res* 2007;84:663-9
315. 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
316. Sosne G, Siddiqi A, Kurpakus-Wheater M. Thymosin-beta4 inhibits corneal epithelial cell apoptosis after ethanol exposure in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:1095-100
317. Sosne G, Szliter EA, Barrett R, et al. Thymosin beta 4 promotes corneal wound healing and decreases inflammation in vivo following alkali injury. *Exp Eye Res* 2002;74:293-9
318. Sosne G, Xu L, Rpach L, et al. Thymosin beta 4 stimulates laminin-5 production independent of TGF-beta. *Exp Cell Res* 2004;293:175-8
319. Sosne G1, Rimmer D2, Kleinman HK3, Ousler G2., Thymosin Beta 4: A Potential Novel Therapy for Neurotrophic Keratopathy, Dry Eye, and Ocular Surface Diseases. *Vitam Horm.* 2016;102:277-306.

- 320.Sosne G1, Siddiqi A, Kurpakus-Wheater M., Thymosin-beta4 inhibits corneal epithelial cell apoptosis after ethanol exposure in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004 Apr;45(4):1095-100.
- 321.Sosne, G., et al., *Thymosin beta4 promotes human conjunctival epithelial cell migration.* *Curr Eye Res*, 2002. **24**(4): p. 268-73.
- 322.Sribenja, S., et al., Roles and Mechanisms of  $\beta$ -Thymosins in Cell Migration and Cancer Metastasis: An Update. *Cancer Investigation*, 2013. **31**(2): p. 103-110.
- 323.Stavri GT, Zachary IC, Baskerville PA, Martin JF, Erusalimsky JD. Basic fibroblast growth factor upregulates the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells. Synergistic interaction with hypoxia. *Circulation* 1995; **92**: 11–4.
- 324.Steed DL. Modifying the wound healing response with exogenous growth factors. *Clin Plast Surg* 1998; **25**: 397–405.
- 325.Strodtbeck, F. (2001). Physiology of wound healing. *Newborn and Infant Nursing Reviews*, **1**(1), 43-52.
- 326.Stuart Enoch, David John Leaper, Basic science of wound healing, *Surgery* (Oxford), 2008, Pages 31-37,
- 327.Sun,H.Q., Kwiatkowsta K.,Wooten D.C., and YIN.H.L. (1995) Effects of GapG overexpression on agonist-induced motility and second messenger generation. *J.Cell Biol.*, **129**.147
- 328.Su-Young Oh, Ji-Hee Song, Jung-Eun Gil, Jeong-Hee Kim, Young-Il Yeom, Eun-Yi Moon, ERK activation by Thymosin-beta-4 (TB4) overexpression induces paclitaxel-resistance, *Experimental Cell Research*, 2006, Pages 1651-1657
- 329.Suzuma K, Takagi H, Otani A, Honda Y. Hypoxia and vascular endothelial growth factor stimulate angiogenic integrin expression in bovine retinal microvascular endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; **39**: 1028–35.
- 330.T. Huff, C.S. Muller, A.M. Otto, R. Netzker, E. Hannappelbeta-Thymosins, small acidic peptides with multiple functions, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **33** (3) (2001), pp. 205-220
- 331.Takeshita S, Kikuno R, Tezuka K et al (1993) Osteoblast-specific factor 2: cloning of a putative bone adhesion protein with homology with the insect protein fasciclin I. *Biochem J* **294**(Pt 1):271–278
- 332.Tan, W.K.Y., et al., Sources of variability in quantifying circulating thymosin beta-4: literature review and recommendations. *Expert Opin Biol Ther*, 2018. **18**(sup1): p. 141-147.
- 333.Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, Bohlen P. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **187**: 1579–86.
- 334.Thomas KA. Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent. *J Biol Chem* 1996; **271**: 603–6.
- 335.Tokumaru S, Higashiyama S, Endo T, Nakagawa T, Miyagawa JI, Yamamori K, Hanakawa Y, Ohmoto H, Yoshino K, Shirakata Y, Matsuzawa Y, Hashimoto K, Taniguchi N. Ectodomain shedding of epidermal growth factor receptor ligands is required for keratinocyte migration in cutaneous wound healing. *J Cell Biol* 2000; **151**: 209–20.
- 336.Trengove NJ, Bielefeldt-Ohmann H, Stacey MC. Mitogenic activity and cytokine levels in non-healing and healing chronic leg ulcers. *Wound Repair Regen* 2000; **8**: 13–25.
- 337.Tsunawaki S, Sporn M, Ding A, Nathan C. Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. *Nature* 1988; **334**: 260–2.
- 338.Tuthill C. W. and King R. S. “Thymosin Apha 1- A Peptide Immune Modulator with a Broad Range of Clinical Applications”, *Journal of Clinical and Experimental Pharmacology*, 2013, p. 1-17
- 339.Tyrone JW, Marcus JR, Bonomo SR, Mogford JE, Xia Y, Mustoe TA. Transforming growth factor beta3 promotes fascial wound healing in a new animal model. *Arch Surg* 2000; **135**: 1154–9.
- 340.Tziotzios, C., C. Profyris, et al. (2012). "Cutaneous scarring: Pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics." *Journal of the American Academy of Dermatology* **66**(1): 13-24.
- 341.Uitto J, Olsen DR, Fazio MJ (1989) Extracellular matrix of skin: 50 years of progress. *J Invest Dermatol* **92**: 61S–77S
- 342.Uutela M, Wirzenius M, Paavonen K, Rajantie I, He Y, Karpanen T, Lohela M, Wiig H, Salven P, Pajusola K, Eriksson U, Alitalo K. PDGF-D induces macrophage recruitment,

- increased interstitial pressure, and blood vessel maturation during angiogenesis. *Blood* 2004; 104: 3198–204.
343. Vartiainen N, Pyykonen I, Hokfelt T, Koistinaho J. Induction of thymosin beta(4) mRNA following focal brain ischemia. *Neuroreport*. 1996;7:1613–1616.
  344. Verrecchia F, Chu ML, Mauviel A (2001) Identification of novel TGFbeta/Smad gene targets in dermal fibroblasts using a combined cDNA microarray/promoter transactivation approach. *J Biol Chem* 276:17058–17062
  345. Vogt PM, Lehnhardt M, Wagner D, Jansen V, Krieg M, Steinau HU. Determination of endogenous growth factors in human wound fluid: temporal presence and profiles of secretion. *Plast Reconstr Surg* 1998; 102: 117–23.
  346. Volk, D.E., et al., NMR structural studies of thymosin alpha1 and beta-thymosins. *Ann N Y Acad Sci*, 2012. 1270: p. 73-8.
  347. Volkov, Quere, L., P., Coudert, F., Compte, L., Antipov, Y., and Praloran, V. (1996) the tetrapeptide AcSDKP, a negative regulator of cell cycle entry, inhibits the proliferation of human and chicken lymphocytes. *Cell. Immunol.* 168, 302–302
  348. W.Q. Huang and Q.R. Wang. Bone marrow endothelial cells secrete thymosin beta4 and AcSDKP. *Experimental hematology*. 29:12-18 (2001).
  349. Wang D1, 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 Nov;287(5):H2099-105. Epub 2004 Jul 15.
  350. Wang J, Jiao H, Stewart TL, Shankowsky HA, Scott PG, Tredget EE (2007) Increased TGF-beta producing CD4+ T Lymphocytes in postburn patients and their potential interaction with dermal fibroblasts in hypertrophic scarring. *Wound Rep Regen* 15: 530–9
  351. Wang L, Zhang Z, Wang Y, Zhang R, Chopp M. Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke*. 2004;35:1732–1737.
  352. Watanabe Y, Lee SW, Detmar M, Ajioka I, Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) delays and induces escape from senescence in human dermal microvascular endothelial cells. *Oncogene* 1997; 14: 2025–32.
  353. Wei, C., et al., *Thymosin beta 4 protects cardiomyocytes from oxidative stress by targeting anti-oxidative enzymes and anti-apoptotic genes*. *PLoS One*, 2012. 7(8): p. e42586.
  354. Weller FE, Shah U, Cummings GD, Chretien PB, Mutchnick MG, Serum levels of immunoreactive thymosin alpha 1 and thymosin beta 4 in large cohorts of healthy adults, 1992, *Thymus* 19: 45-52.
  355. Werner T, Motyka V, Laucou V, Smets R, Van Onckelen H, Schmölling T. Cytokinin-deficient transgenic Arabidopsis plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell*. 2003;15:2532–2550.
  356. White LA, Mitchell TI, Brinckerhoff CE. Transforming growth factor beta inhibitory element in the rabbit matrix metalloproteinase-1 (collagenase-1) gene functions as a repressor of constitutive transcription. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1490: 259–68.
  357. Witzienbichler B, Asahara T, Murohara T, Silver M, Spyridopoulos I, Magner M, Principe N, Kearney M, Hu JS, Isner JM. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C/ VEGF-2) promotes angiogenesis in the setting of tissue ischemia. *Am J Pathol* 1998; 153: 381–94.
  358. Woessner, J.F., Jr. 1995. Quantification of matrix metalloproteinases in tissue samples. *Methods Enzymol.* 248:510-528.
  359. Woo, Y. C., Park, S. S., Subieta, A. R., & Brennan, T. J. (2004). Changes in Tissue pH and Temperature after Incision Indicate Acidosis May Contribute to Postoperative Pain. *Anesthesiology*, 101(2), 468-475.
  360. Wood LC, Elias PM, Calhoun C, Tsai JC, Grunfeld C, Feingold KR. Barrier disruption stimulates interleukin-1 alpha expression and release from a pre-formed pool in murine epidermis. *J Invest Dermatol* 1996; 106: 397–403.
  361. Wu L, Pierce GF, Galiano RD, Mustoe TA. Keratinocyte growth factor induces granulation tissue in ischemic dermal wounds. Importance of epithelial-mesenchymal cell interactions. *Arch Surg* 1996; 131: 660–6.
  362. Wu L, Yu YL, Galiano RD, Roth SI, Mustoe TA. Macrophage colony-stimulating factor accelerates wound healing and upregulates TGF-beta1 mRNA levels through tissue macrophages. *J Surg Res* 1997; 72: 162–9.
  363. X. Lao, M. Liu, J. Chen, H. Zheng A tumor-penetrating peptide modification enhances the antitumor activity of Thymosinalpha 1, *PLoS One*, 8 (2013), pp. 722-742

364. Xiong Y, Mahmood A, Meng Y, et al. Treatment of traumatic brain injury with thymosin beta4 in rats. *J Neurosurg* 2011;114:102-15
365. Xu, G.J., et al., Synthesis of thymosin beta 4 by peritoneal macrophages and adherent spleen cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1982. 79(13): p. 4006-9.
366. Yamamoto, M., et al., Localization of thymosin beta 4 to the neural tissues during the development of *Xenopus laevis*, as studied by in situ hybridization and immunohistochemistry. *Brain Res Dev Brain Res*, 1994. 79(2): p. 177-85.
367. Yebra M, Parry GC, Stromblad S, Mackman N, Rosenberg S, Mueller BM, Cheresh DA. Requirement of receptorbound urokinase-type plasminogen activator for integrin alphavbeta5-directed cell migration. *J Biol Chem* 1996; 271: 29393–9.
368. You et al., 2006 J. You, L. Zhuang, H.Y. Cheng, et al. Efficacy of Thymosin alpha-1 and interferon alpha in treatment of chronic viral hepatitis B: A randomized controlled study *World Journal of Gastroenterology*, 12 (2006), pp. 6715-6721
369. Young JD, Lawrence AJ, Mac Lean AG, et al. Thymosin beta 4 sulfoxide is an anti-inflammatory agent generated by monocytes in the presence of glucocorticoids. *Nat Med* 1999;5:1424-7
370. Zarbock, J., et al., Solution conformation of thymosin beta 4: a nuclear magnetic resonance and simulated annealing study. *Biochemistry*, 1990. 29(34): p. 7814-21.
371. Zeng G, McCue HM, Mastrangelo L, Millis AJ. Endogenous TGF-beta activity is modified during cellular aging: effects on metalloproteinase and TIMP-1 expression. *Exp Cell Res* 1996; 228: 271–6.
372. Zhang Y<sup>1</sup>, Feurino LW, Zhai Q, Wang H, Fisher WE, Chen C, Yao Q, Li M. Thymosin Beta 4 is overexpressed in human pancreatic cancer cells and stimulates proinflammatory cytokine secretion and JNK activation. *Cancer Biol Ther*. 2008 Mar;7(3):419-23.
373. Zuo, Y., et al., *Thymosin beta4 and its degradation product, Ac-SDKP, are novel reparative factors in renal fibrosis*. *Kidney Int*, 2013. 84(6): p. 1166-75.
374. Treadwell T<sup>1</sup>, Kleinman HK, Crockford D, Hardy MA, Guarnera GT, Goldstein AL. The regenerative peptide thymosin β4 accelerates the rate of dermal healing in preclinical animal models and in patients. *Ann N Y Acad Sci*. 2012 Oct;1270:37-44
375. Barrientos S<sup>1</sup>, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen*. 2008 Sep-Oct;16(5):585-601