



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**«ΚΟΣΜΗΤΟΛΟΓΙΑ - ΔΕΡΜΑΤΟΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ»**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΙΘΑΝΗΣ ΕΠΟΥΛΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ  
ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΘΑΛΑΣΣΙΟΥ ΑΡΘΡΟΠΟΔΟΥ  
*Ceratothoa oestroides* ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΔΕΡΜΑΤΙΚΑ  
ΚΥΤΤΑΡΑ»**

**ΔΕΣΠΟΙΝΑ Ν. ΝΙΚΟΠΟΥΛΟΥ Α.Μ. : 150705  
ΧΗΜΙΚΟΣ**

**Επιβλέπων: Μ. Ράλλης**, Επίκουρος Καθηγητής, Τομέας Φαρμακευτικής  
Τεχνολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ  
**Επιστημονικός υπεύθυνος: Δ. Κλέτσας**, Ερευνητής Α', ΕΚΕΦΕ  
Δημόκριτος, Ινστιτούτο Βιοεπισημών & Εφαρμογών, Εργαστήριο Κυτταρικού  
Πολλαπλασιασμού και Γήρανσης

**ΑΘΗΝΑ 2017**

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

### **Μιχαήλ Ράλλης**

Επίκουρος καθηγητής, Τομέας Φαρμακευτικής Τεχνολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

### **Δημήτρης Κλέτσας**

Ερευνητής Α΄, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος, Ινστιτούτο Βιοεπιστημών & Εφαρμογών, Εργαστήριο Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού και Γήρανσης

### **Βασίλειος Ρούσσης**

Καθηγητής, Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Φαρμακευτικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε εξολοκλήρου στο Εργαστήριο Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού και Γήρανσης του Εθνικού Κέντρου Ερευνών Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος» με επιστημονικό υπεύθυνο τον Δρα Δημήτριο Κλέτσα (Ερευνητή Α΄) και διήρκησε από τον Ιούνιο του 2016 μέχρι και τον Φεβρουάριο του 2017.

Στα πλαίσια αυτής της μελέτης θα ήθελα να ευχαριστήσω πλήθος ανθρώπων που χωρίς την συμβολή και την πολύτιμη βοήθεια τους η εργασία αυτή δεν θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί.

Ευχαριστώ θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή Μιχάλη Ράλλη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση του θέματος της μελέτης αυτής, την εποπτεία και την πολύτιμη επιστημονική συμβολή του, καθώς επίσης και τον Καθηγητή Βασίλειο Ρούσση, για τη συμμετοχή της στην Τριμελή Επιτροπή και την παροχή των εκχυλισμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Ιδιαίτερως, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα της εργασίας, τον Δρα Δημήτρη Κλέτσα, με τον οποίο είχα την τιμή να συνεργαστώ και να δεχτώ την επιστημονική καθοδήγηση και διαρκή υποστήριξη του, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της εργασίας.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω θερμά τον Δρα Χαράλαμπο Πρατσίνη (Ερευνητή Γ΄) για τη καθοδήγηση, τη συνεχή μετάδοση γνώσεων & την πολύτιμη βοήθεια του τόσο σε τεχνικές λεπτομέρειες στο πειραματικό κομμάτι όσο και στη διαδικασία της συγγραφής της παρούσας εργασίας και της παρουσίασης των αποτελεσμάτων.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού και Γήρανσης Δρα Ε. Μαυρογονάτου (Μετά-διδακτορικός συνεργάτης), Δρα Α. Παπαδοπούλου (Μετά-διδακτορικός συνεργάτης), Α. Κουρούμαλης (Διδακτορικός φοιτητής), Μ. Αγγελοπούλου (Διδακτορικός φοιτητής), Ο. Τσούρου (Μεταπτυχιακή φοιτήτρια) και Γ. Χαλδαιοπούλου (Μεταπτυχιακή φοιτήτρια) για τη συνεχή βοήθεια, συνεργασία και υποστήριξη τους.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο θαλάσσιος οργανισμός *Ceratomyxa oestroides* ανήκει στην τάξη των Ισοπόδων και πρόκειται για ένα πρωτανδρικό ερμαφρόδιτο παράσιτο σε πολλές οικογένειες ψαριών. Η παρούσα εργασία είχε ως αντικείμενο τη διερεύνηση της δράσης τεσσάρων εκχυλισμάτων του *C. oestroides* κατά την επουλωτική διαδικασία. Τα εκχυλίσματα αυτά προήλθαν από εκχύλιση με διάφορους διαλύτες και παρελήφθησαν έτοιμα από το εργαστήριο του κ. Ρούσση. Μελετήθηκε η κυτταροτοξικότητα των εκχυλισμάτων & η ικανότητα διέγερσης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της παραγωγής κολλαγόνου και της κυτταρικής μετανάστευσης. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες και σε αθανατοποιημένα κερατινοκύτταρα HaCaT. Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων, φάνηκε πως και τα τέσσερα εκχυλίσματα διεγείρουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ενώ τρία από τα τέσσερα εκχυλίσματα εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διεγερτική δράση στην κολλαγονοσύνθεση. Περαιτέρω μελέτη των εκχυλισμάτων αυτών, θα μπορούσε να οδηγήσει στη διαλεύκανση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν τη δράση τους, ώστε να χρησιμοποιηθούν για φαρμακευτικούς ή καλλυντικούς σκοπούς.

## **ABSTRACT**

The marine organism *Ceratothoa oestroides* belongs to the order of Isopoda and is a protandrous hermaphroditic parasite widespread in many fish families. This assay has as subject the study of the potential action of *C. oestroides* extracts in wound healing process. The research incorporates cytotoxicity assay, cell proliferation & collagen synthesis assay and scratch assay on human skin fibroblasts and immortal keratinocyte cell line HaCaT. Results have shown that all four tested extracts stimulate cell proliferation while three of them have a small but statistically important stimulating action at collagen synthesis. Further research of these extracts could be helpful to clarify the molecular mechanisms that are involved for the purpose of use them for pharmaceutical or cosmetic applications.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT.....	6
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	10
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
1.1 Δέρμα.....	11
1.1.1. Φυσιολογία του δέρματος.....	11
1.2. Επούλωση πληγών.....	16
1.2.1. Ιστορική πορεία επούλωσης.....	18
1.2.2. Φάσεις επούλωσης.....	21
1.3. Φυσικά προϊόντα στη διαδικασία της επούλωσης.....	25
1.3.1. Φυσικά προϊόντα θαλάσσιας προέλευσης στη διαδικασία της επούλωσης.....	26
1.3.1.1. Χιτίνη- Χιτοζάνη.....	29
1.3.1.2. Κολλαγόνο.....	32
1.3.1.3. Φουκοϊδάνη.....	34
1.3.1.4. Υαλουρονικό οξύ.....	36
1.3.1.5. Λιπαρά οξέα.....	38
1.3.1.6. Θαλάσσιες χρωστικές.....	41
1.3.1.7. Βιοδραστικοί μεταβολίτες .....	41
1.4. Εφαρμογές θαλάσσιων φυσικών προϊόντων.....	44
1.4.1. Βιοϊατρικές εφαρμογές βιοϋλικών θαλάσσιας προέλευσης.....	44
1.4.1.1. Τεχνητός ιστός.....	44
1.4.1.2. Ενεργή μεταφορά φαρμάκων.....	44
1.4.2. Βιομηχανικές εφαρμογές βιοϋλικών θαλάσσιας προέλευσης.....	45
1.5. Αρθρόποδα.....	46
1.5.1. Καρκινοειδή.....	48

1.5.2. Ισόποδα.....	50
1.6. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	55
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	57
2. ΥΛΙΚΑ- ΜΕΘΟΔΟΙ.....	58
2.1. Όργανα.....	58
2.2. Υλικά.....	59
2.3. Κυτταρικά στελέχη.....	61
2.4. Μέθοδοι.....	63
2.4.1. Αποστείρωση.....	63
2.4.2. Καλλιέργεια κυττάρων.....	64
2.4.3. Απόψυξη των κυττάρων-Αρχείο γενεών.....	65
2.4.4. Μέτρηση ολικού αριθμού κυττάρων.....	67
2.4.4.1. Μέτρηση αριθμού κυττάρων με χρήση αιμοκυττομέτρου Neubauer.....	67
2.4.4.2. Μέτρηση αριθμού κυττάρων με κυτταρομετρητή Coulter Counter.....	68
2.4.5. Προσδιορισμός βιωσιμότητας κυττάρων μέσω της δοκιμασίας MTT.....	69
2.4.6. Μελέτη πολλαπλασιασμού κυττάρων – Ποσοτικός προσδιορισμός σύνθεσης DNA με τη μέθοδο τριτιωμένης θυμιδίνης.....	71
2.4.7. Μελέτη της διέγερσης παραγωγής κολλαγόνου – Ποσοτικός προσδιορισμός σύνθεσης κολλαγόνου με τη μέθοδο τριτιωμένης προλίνης.....	77
2.4.8. Δοκιμασία κυτταρικής μετανάστευσης μετά από τομή (Scratch assay).....	78
2.4.9. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.....	79
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	80
3.1. Προσδιορισμός βιωσιμότητας κυττάρων μέσω της δοκιμασίας MTT.....	81
3.2. Μελέτη πολλαπλασιασμού κυττάρων – Ποσοτικός προσδιορισμός σύνθεσης DNA με τη μέθοδο τριτιωμένης θυμιδίνης.....	86



3.3. Μελέτη της διέγερσης παραγωγής κολλαγόνου – Ποσοτικός προσδιορισμός σύνθεσης κολλαγόνου με τη μέθοδο τριτωμένης προλίνης .....	92
3.4. Δοκιμασία κυτταρικής μετανάστευσης μετά από τομή (Scratch Assay) .....	95
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	98
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	100

## **ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1. Δέρμα

### 1.1.1. Φυσιολογία του δέρματος

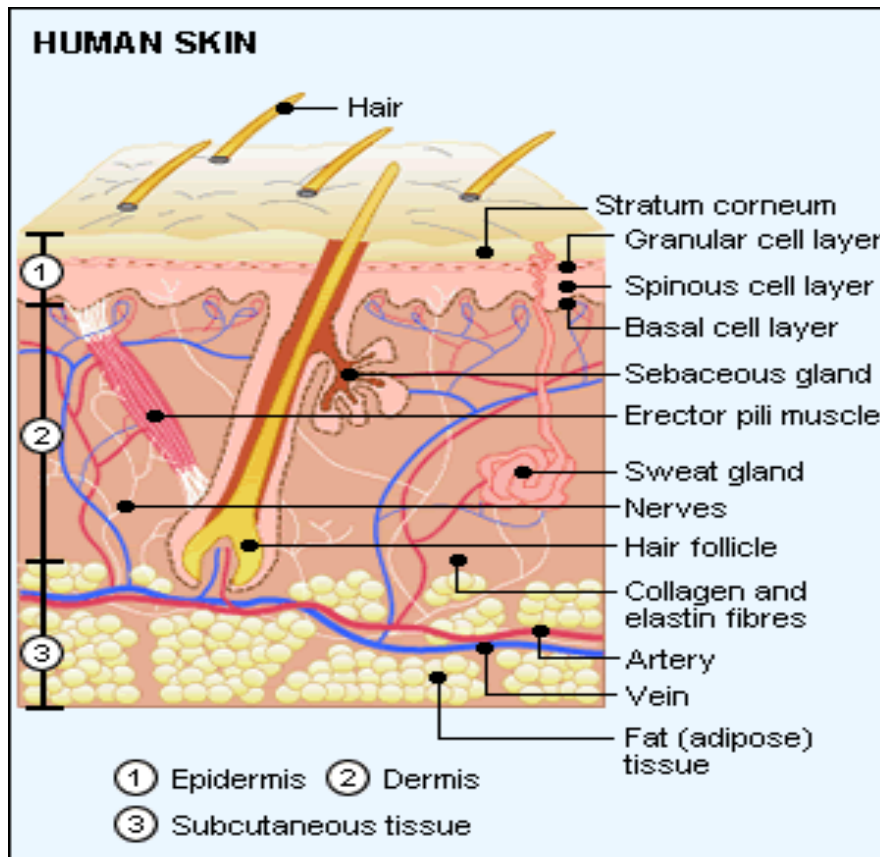
Το δέρμα αποτελεί το μεγαλύτερο όργανο του σώματος καλύπτοντας μια περιοχή περίπου δύο τετραγωνικών μέτρων στους ενήλικες. Το βάρος του κυμαίνεται γύρω στα 5 κιλά ενώ το πάχος του ποικίλλει από 0,5 χιλιοστά στα βλέφαρα των ματιών έως 4 χιλιοστά στα πέλματα. Οι βασικές λειτουργίες του δέρματος είναι η προστασία από εξωτερικούς παράγοντες, η λήψη εξωτερικών ερεθισμάτων και η ρύθμιση της θερμοκρασίας του σώματος. Το δέρμα παρουσιάζει ακόμη μεταβολική δραστηριότητα, όπως η παραγωγή βιταμίνης D και τριγλυκεριδίων στον υποδόριο ιστό.

Το δέρμα αποτελείται από 3 διακριτά επίπεδα:

- Την επιδερμίδα
- Το χόριο (κυρίως δέρμα)
- Το υπόδερμα (υποδόριος ιστός)

Περιέχει επίσης εξαρτήματα που είναι οι τρίχες, τα νύχια, οι ιδρωτοποιοί αδένες και οι σμηγματογόνοι αδένες. Περιέχει ακόμη αγγεία και νεύρα.

Η **επιδερμίδα (epidermis)** είναι ένα πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο αποτελούμενο κυρίως από τα κερατινοκύτταρα (περίπου το 95% του κυτταρικού πληθυσμού) και από μικρή ποσότητα μεσοκυττάριας ουσίας. Η επιδερμίδα αποτελείται από 4 διακριτές στιβάδες (Williams, D.F., Schmitt W.H. 1992).



Εικόνα 1. Ανθρώπινο δέρμα

<http://www.webmd.com/skin-problems-and-treatments/picture-of-the-skin#1>

Η **βασική στιβάδα (basal cell layer)** βρίσκεται αμέσως πάνω από το χόριο και αποτελείται από μια σειρά κυλινδρικών κυττάρων που διατάσσονται το ένα δίπλα στο άλλο. Τα κύτταρα της στιβάδας αυτής πολλαπλασιάζονται συνεχώς τροφοδοτώντας την επιδερμίδα με νέα κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά ανέρχονται προς την επιφάνεια της επιδερμίδας ακολουθώντας ανοδική πορεία, σχηματίζοντας την κερατίνη στιβάδα και στα τέλος αποπίπτουν.

Η διαδικασία διαφοροποίησης των κυττάρων της βασικής στιβάδας στα κύτταρα της κερατίνης στιβάδας ονομάζεται κερατινοποίηση. Ο χρόνος ζωής ενός κερατινοκυττάρου από τη στιγμή που θα σχηματιστεί στη βασική στιβάδα μέχρι την απόπτωση του είναι περίπου 28 ημέρες (Αντωνίου και Κατσάμπας, 2015).

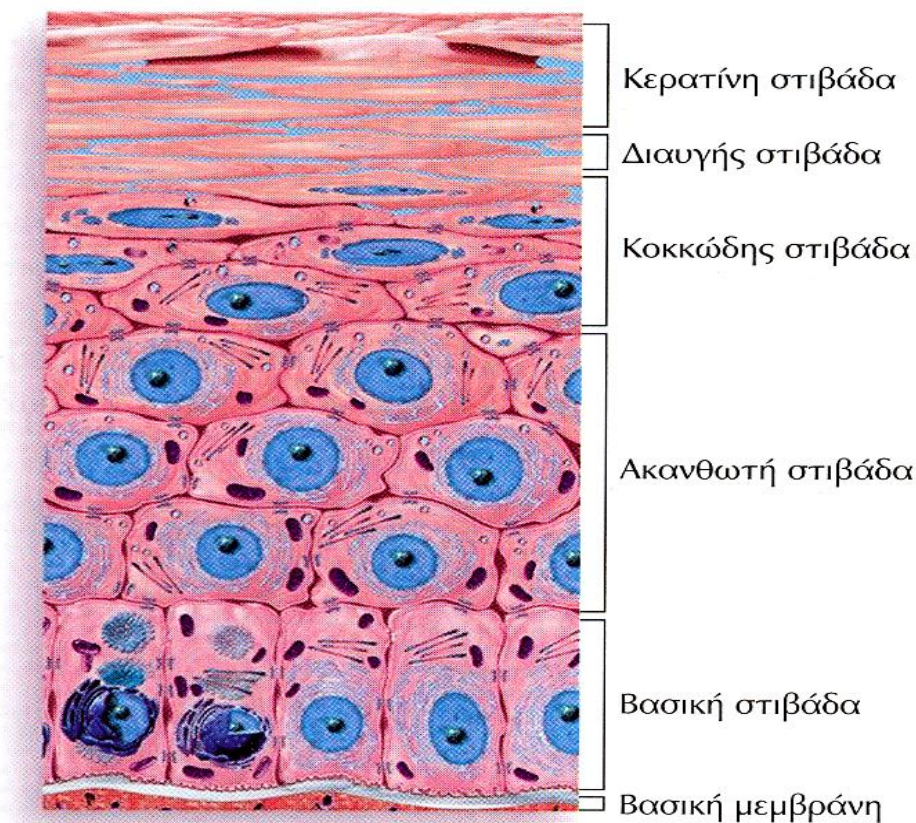
Η **ακανθωτή στιβάδα (spinous cell layer)** αποτελείται από πολλές σειρές πολυεδρικών κυττάρων ( από 4-12 σειρές ) τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με λεπτά ινίδια που ονομάζονται δεσμοσωμάτια. Τα δεσμοσωμάτια είναι ειδικοί σχηματισμοί των κυτταρικών μεμβρανών δύο γειτονικών κερατινοκυττάρων και απαντώνται μόνο στα επιθηλιακά κύτταρα. Τα κερατινοκύτταρα αυτής της στιβάδας όσο ανεβαίνουν προς τα πάνω αποπλατύνονται. Στα ανώτερα στρώματα της ακανθωτής στιβάδας εμφανίζονται και τα πεταλιώδη σωμάτια ή σωμάτια του Odland, τα οποία περιέχουν λιπίδια που εκλύονται από τα κύτταρα στο μεσοκυττάριο χώρο με τη λειτουργία της εξωκύττωσης (Αντωνίου και Κατσάμπας, 2015).

Η **κοκκώδης στιβάδα (granular cell layer)** αποτελείται από αποπλατυσμένα ρομβοειδή κύτταρα με οριζόντια διάταξη. Στις παλάμες και πέλματα είναι αρκετά παχύτερη, σε σύγκριση με άλλες περιοχές. Στο κυτταρόπλασμα βρίσκονται τα κοκκία κερατουαλίνης ή προφιλαγγρίνης. Τα κοκκία αυτά περιέχουν προφιλαγγρίνη, η οποία καθώς τα κύτταρα μεταπίπτουν σταδιακά στα κύτταρα της κερατίνης στιβάδας , μετατρέπεται σε φιλαγγρίνη. Ο ρόλος της φιλαγγρίνης είναι να κρατάει συνδεδεμένα το μόρια των κερατινών στα κατώτερα στρώματα της κερατίνης στιβάδας (Αντωνίου και Κατσάμπας, 2015).

Τα κύτταρα της **κερατίνης στιβάδας (stratum corneum)** έχουν χάσει τον πυρήνα και τα άλλα οργανίδια τους και αποτελούν ουσιαστικά κεράτινα πετάλια, τα οποία διατάσσονται όπως τα κεραμίδια σε μία στέγη. Ανάμεσα στα κερατινοκύτταρα βρίσκονται λιπίδια, τα οποία προέρχονται από τα σωμάτια του Odland.

Η κερατίνη στιβάδα αποτελείται από μία άμορφη ομοιογενή μάζα όπου τα κύτταρα χάνουν τα όρια τους και μετατρέπονται στην κερατίνη ουσία που συνεχώς αποπίπτει και αναγεννάται. Ο χρόνος διαφοροποίησης ενός κερατινοκυττάρου από τη στιγμή που θα γεννηθεί στη βασική στιβάδα μέχρι να αποπέσει σαν κεράτινο πετάλιο είναι περίπου 28 ημέρες. Η κερατίνη στιβάδα αποτελεί φραγμό στη δράση διαφόρων εξωγενών παραγόντων και

ελαχιστοποιεί τη διαδερμική απώλεια νερού. Ο τελικός σκοπός της πορείας του πολ/σμού και της διαφοροποίησης των κυττάρων της επιδερμίδας είναι ο σχηματισμός του επιδερμικού φραγμού (Αντωνίου και Κατσάμπας, 2015).



**Εικόνα 2. Στιβάδες επιδερμίδας**

<http://sciarticle.blogspot.gr/2012/09/introduction-to-integumentary-system.html>

Η σύνδεση μεταξύ επιδερμίδας και χορίου είναι μια κυματοειδής γραμμή με προεκβολές του χορίου προς την επιδερμίδα που ονομάζονται θηλές του χορίου και αντίστοιχες εμβαθύνσεις της επιδερμίδας προς το χόριο που ονομάζονται μεσοθήλαιες καταδύσεις. Η βασική μεμβράνη αποτελεί το διαχωριστικό όριο μεταξύ επιδερμίδας και χορίου. Η βασική μεμβράνη έχει καθοριστικό ρόλο στη λειτουργία του δέρματος καθώς συμβάλλει στη μηχανική υποστήριξη της επιδερμίδας και λειτουργεί και σαν ημιπερατό φίλτρο που ρυθμίζει τη δίοδο ουσιών από την επιδερμίδα στο χόριο και αντίστροφα. Με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διακρίνονται στη βασική μεμβράνη από πάνω προς τα κάτω δύο πέταλα, το διαυγές πέταλο και το

πυκνό πέταλο. Το διαυγές πέταλο συνδέεται με τη βασική στιβάδα της επιδερμίδας με τα ημιδεσμοσωμάτια, που είναι σχηματισμοί αντίστοιχοι των δεσμοσωματίων, ενώ το πυκνό πέταλο συνδέεται με το υποκείμενο χόριο με τα αγκυροβολητικά ινίδια, τα οποία αποτελούνται από κολλαγόνο.

Το **χόριο (dermis)** είναι το τμήμα του δέρματος που αποτελείται από συνδετικό ιστό. Περιέχει κυρίως μεσοκυττάρια ουσία, ελάχιστα κύτταρα, αγγεία και νεύρα. Παρουσιάζει δύο τμήματα, το επιπολής ή θηλώδες χόριο που βρίσκεται προς τα πάνω σε επαφή με την επιδερμίδα και το δικτυωτό χόριο που είναι παχύτερο και μεταπίπτει στο υπόδερμα. Η μεσοκυττάρια ουσία αποτελείται από ίνες κολλαγόνου και ελαστίνης. Οι ίνες κολλαγόνου αποτελούν το κύριο συστατικό του χορίου και διατάσσονται σε δεσμίδες που φέρονται προς διάφορες κατευθύνσεις. Είναι λεπτότερες και αραιότερες στο θηλώδες χόριο και παχύτερες και πυκνότερες στο δικτυωτό χόριο. Οι ίνες ελαστίνης είναι πολύ λιγότερες από του κολλαγόνου. Είναι λεπτές, διαπλέκονται μεταξύ τους και εκτείνονται από το χοριο-επιδερμικό σύνδεσμο μέχρι την υποδερμίδα. Τα κύτταρα του χορίου είναι είτε αυτόχθονα όπως ινοβλάστες, μακροφάγα, μαστοκύτταρα, είτε ετερόχθονα όπως λεμφοκύτταρα, πλασματοκύτταρα και λευκοκύτταρα (Αντωνίου, Κατσάμπας, 2015).

Το **υπόδερμα (subcutaneous tissue)** αποτελείται από λιπώδη ιστό που διασχίζεται από προεκβολές του χορίου, τις ινώδεις δεσμίδες, που διαχωρίζουν τον λιπώδη ιστό στα λιπώδη λόβια. Οι αρτηρίες ανεβαίνουν διασχίζοντας τις ινώδεις δεσμίδες του υποδέρματος και σχηματίζουν δύο οριζόντια πλέγματα: το εν τω βάθει που βρίσκεται μεταξύ χορίου και υποδερμίδας και τροφοδοτεί τους ιδρωτοποιούς και σμηγματαογόνους αδένες και τους θύλακες των τριχών και το επιπολής που βρίσκεται στο θηλώδες χόριο και τροφοδοτεί την επιδερμίδα με τις τριχοειδείς αγκύλες. Από εκεί αρχίζουν τα τριχοειδή και τα αντίστοιχα φλεβικά πλέγματα (Robert Baran, Howard I. Maibach, 2010. Henneth A. Walters, Michael S. Roberts, 2008).

## 1.2. Επούλωση πληγών

Μια ασυνέχεια στο δέρμα έχει τη δυνατότητα να ενεργοποιεί μια σειρά από πολύπλοκα και καλά σχεδιασμένα γεγονότα που αποκαθιστούν τη φυσιολογική λειτουργία του δέρματος και επαναφέρουν την ακεραιότητά του (Kim et al, 2012). Η γρήγορη και αποτελεσματική αποκατάσταση του δερματικού ιστού μετά από κάποιο τραυματισμό μέσω της διαδικασίας της επούλωσης, απαιτεί το κατάλληλο μικροπεριβάλλον με τη βέλτιστη υγρασία, τα κατάλληλα επίπεδα οξυγόνου και φυσικούς φραγμούς ενάντια σε παθογόνους μικροοργανισμούς (Yates et al, 2007).

Τις προηγούμενες δεκαετίες, έχουν προταθεί διάφορες μέθοδοι για την παθητική κάλυψη των πληγών όπως γάζες, υδρογέλες, αφροί, υδροκολλοειδή και διαπερατές μεμβράνες. Πρόσφατα, τα υποκατάστατα τεχνητού δέρματος άρχισαν να χρησιμοποιούνται για την αναγέννηση του δέρματος, ιδιαίτερα για ασυνέχειες του δέρματος που οφείλονται σε κάψιμο, τραυματισμούς, ή άτονα έλκη. Το 1962 ο Winter πρότεινε τη χρήση επιδέσμων για την κάλυψη των τραυμάτων ώστε να επιτευχθούν αυτές οι βέλτιστες συνθήκες για την αναγέννηση του ιστού. Έτσι, ξεκίνησε η έρευνα διάφορων λειτουργικών υλικών που θα μπορούσαν να επιταχύνουν τη διαδικασία της επούλωσης (Winter, 1962).

Η εφαρμογή βιολογικά δραστικών φυσικών και συνθετικών υλικών κατά τη διαδικασία της επούλωσης και της αναγέννησης του δερματικού ιστού είναι ένας συνεχώς εξελισσόμενος τομέας. Έτσι, το ενδιαφέρον για εύρεση και αναγνώριση πιθανών ουσιών προερχόμενων από ζώα και φαρμακευτικά φυτά που βοηθούν στην επούλωση και προωθούν την ανάπτυξη του νέου ιστού με ελάχιστες ανεπιθύμητες ενέργειες είναι συνεχώς αυξανόμενο. Τα τελευταία χρόνια, η συνεχής έρευνα για ταυτοποίηση νέων και χρήσιμων βιοϋλικών φυσικής προέλευσης έχει οδηγήσει στη συνεχή εξερεύνηση του θαλάσσιου οικοσυστήματος ως πηγή βιολογικά δραστικών ενώσεων. Έτσι, μέσα σε μικρό χρονικό διάστημα, το θαλάσσιο οικοσύστημα έχει αναγνωριστεί ως μια ιδανική πηγή βιοϋλικών λόγω της απεριόριστης βιοποικιλότητας που το χαρακτηρίζει. Η ανάπτυξη και η συνεχής έρευνα καινοτόμων μορίων με



πολυάριθμες βιολογικές δράσεις έδωσε ώθηση στην εκμετάλλευση υλικών θαλάσσιας προέλευσης στην αναγέννηση του δέρματος (Se-Kwon Kim, 2013).

### 1.2.1. Ιστορική πορεία της επούλωσης

Ως «τραύμα» χαρακτηρίζεται η λύση της συνέχειας του δέρματος που μπορεί να οφείλεται σε κάκωση, νόσο, χειρουργική επέμβαση κ.α. Μπορεί να υπάρχει ποικιλία συμπτωμάτων που εξαρτώνται από την φύση, την έκταση και την βαρύτητα της βλάβης. Ο ήπιος τραυματισμός συνοδεύεται από άλγος, οίδημα των ιστών, ερυθρότητα και προσωρινή απώλεια της λειτουργικότητας του ιστού. Ο σοβαρός τραυματισμός μπορεί να έχει αποτέλεσμα μία μη αναστρέψιμη απώλεια της λειτουργίας ενός οργάνου, μαζική αιμορραγία ή καταπληξία. Τη συχνότερη αιτία τραυματισμών αποτελεί η κάκωση από φυσικούς παράγοντες, η αντιμετώπιση των οποίων απασχόλησε την ανθρωπότητα από την αρχή της ιστορίας της (Chandika et al, 2015).

Από τα γραπτά κείμενα που διασώζονται έως τις μέρες μας, αλλά και από την παράδοση, φαίνεται ότι ο άνθρωπος από τους προϊστορικούς χρόνους, προσπαθούσε να αντιμετωπίσει τα τραύματα του. Οι πρώτες γραπτές πηγές περί τραυμάτων και αντιμετώπισης τους θεωρούνται οι πήλινες πινακίδες της Μεσοποταμίας που χρονολογούνται το 3000-2500 π.Χ. Σε αυτές τις πινακίδες περιγράφονται οι τρόποι με τους οποίους οι Σουμέριοι καθάριζαν τα τραύματα, εφάρμοζαν επίδεση και κατασκεύαζαν νάρθηκες για την ακινητοποίηση τους. Τα τραύματα πλένονταν με νερό ή γάλα και στη συνέχεια επαλοΐφονταν με μέλι ή κάποια ρητίνη. Οι επίδεσμοι κατασκευάζονταν από βαμβάκι ή λινό (Gotttrup F, Leaper D, 2004)

Στην αρχαία Αίγυπτο, λωρίδες από λινό εμποτισμένο με γράσο, λίπος, μέλι, ή πετρέλαιο, καθώς και φυτικές ίνες χρησιμοποιήθηκαν για να καλύψουν τις πληγές (Mouës et al., 2009). Οι Αιγύπτιοι μπορεί να ήταν οι πρώτοι - εν αγνοία τους –που χρησιμοποίησαν την λογική της ενυδατωμένης επούλωσης των πληγών (Mouës et al., 2009). Το μέλι χρησιμοποιήθηκε κατά κόρον ως επίθεμα τραυμάτων. Η αντιβακτηριακή δράση του μελιού οφείλεται στην υπεροσμωτική του δράση και στην ενζυμική δράση της οξειδάσης της γλυκόζης, η οποία σε συνδυασμό με το μοριακό οξυγόνο παράγει υπεροξειδίου του υδρογόνου, ένωση γνωστή για την αντιμικροβιακή της δράση. Μια από τις πιο πρώιμες περιγραφές της διαδικασίας περιποίησης ενός τραύματος

υπάρχει στον πάπυρο του αμερικανού αιγυπτιολόγου Edwin Smith. Ο πάπυρος αυτός περιλαμβάνει ιατρικό κείμενο και την πρώτη αναφορά που έχουμε για την χειρουργική περιποίηση των τραυμάτων (N. H. Aboelsoud, 2010).



Εικόνα 3. Σελίδες vi και vii του πάπυρου του Edwin Smith από το δωμάτιο των αρχαίων βιβλίων της ακαδημίας Ιατρικής της Νέας Υόρκης  
<https://www.sciencephoto.com/media/640738/view>

Οι Έλληνες όρισαν πρώτοι τη διαφοροποίηση μεταξύ χρόνιων και διεισδυτικών (οξέων) τραυμάτων αποκαλώντας τα «μη-ιάσιμα» και «φρέσκα», αντιστοίχως. Ο Ιπποκράτης (460 - 377 π.Χ.), Έλληνας γιατρός και χειρουργός, γνωστός ως ο πατέρας της Ιατρικής, χρησιμοποίησε ξύδι πάνω στις ανοιχτές πληγές και χρησιμοποίησε την περίδεση ως μέσο προστασίας των τραυμάτων από περαιτέρω μόλυνση (Ioannovich JD, Gravvanis AI, Tsoutsos DA, 2004). Ο Γαληνός της Περγάμου (120-201 μ.Χ.), αξιοσημείωτος Ελληνορωμαίος χειρουργός, ήταν ο πρώτος που αναγνώρισε ότι το πύον που έβγαζαν οι μονομάχοι στα τραύματά τους ήταν προάγγελος

της επούλωσης της πληγής. Η πιο μεγάλη του συνεισφορά ήταν ότι διαπίστωσε πως όταν η πληγή διατηρείται υγρή διασφαλίζεται το κλείσιμό της. (Ms Biddings SnR, 1984).

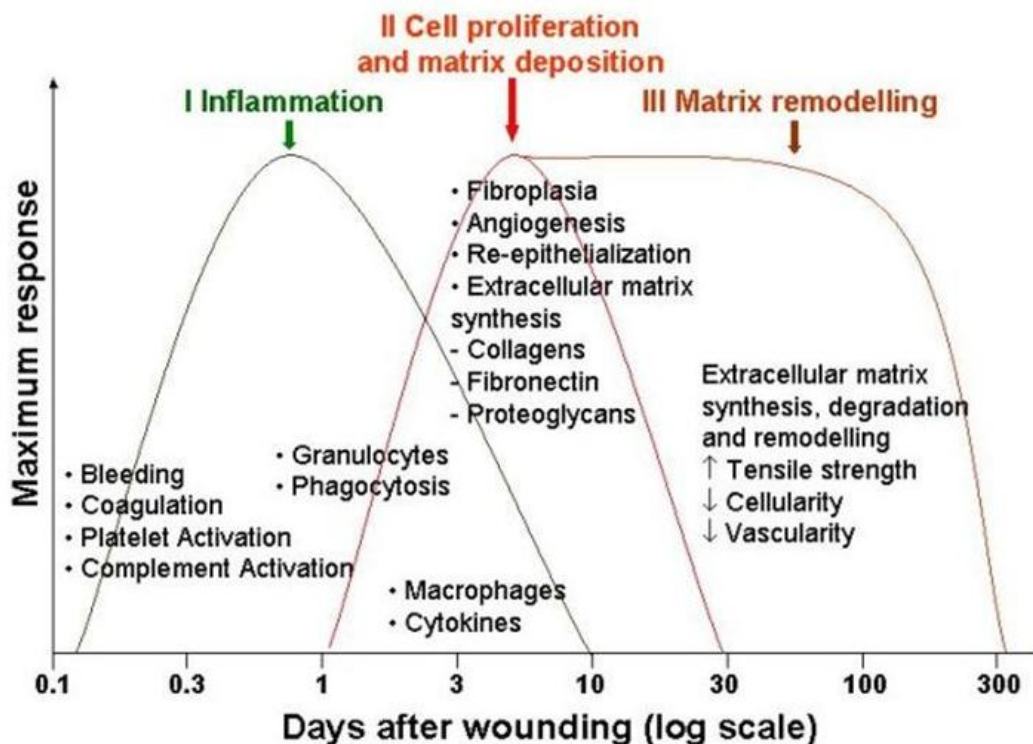
Αργότερα, στα Βυζαντινά χρόνια, ο Παύλος ο Αιγινήτης, ικανός χειρουργός που με τα συγγράμματά του επηρέασε την αραβική χειρουργική, περιέγραψε μεθόδους για την αντιμετώπιση αιμορραγίας, εγκαυμάτων και κατακλίσεων, καθώς και τρόπους πρόληψής τους. Κάνει αναφορές στη χρησιμότητα διάφορων βοτάνων όπως π.χ. της μαστίχας, την οποία ονομάζει «χιακή ρητίνη», μαύρης μελάνης, του λιβανωτού (αρωματική ρητίνη) αλλά και της πίσσας από συγκεκριμένα δέντρα στα εγκαύματα (Gurunluoglu et al, 2001).

Μετά το Μεσαίωνα και την Αναγέννηση, η Ιατρική και, ειδικότερα, η Χειρουργική εξελίχθηκε με πολύ γρήγορους ρυθμούς. Από την εποχή του Lister και μετέπειτα έως τη σύγχρονη εποχή, οι έννοιες της αντισηψίας, της αποστείρωσης και της αντιμικροβιακής θεραπείας αποτελούν μέρος της καθημερινής ιατρικής πράξης με εφαρμογή σε οποιαδήποτε αντιμετώπιση τραύματος ή έλκους (Fox, 1988). Στη σημερινή εποχή, η προσπάθεια βελτίωσης της διαδικασίας της επούλωσης εστιάζεται στην εξέλιξη των διάφορων μορφών επιθεμάτων αλλά και στην εύρεση νεότερων τεχνικών που σχετίζονται με μεταμοσχεύσεις ιστών και κυτταρικές θεραπείες.

## 1.2.2 Φάσεις της επούλωσης

Η επούλωση των πληγών είναι μια πολύπλοκη και δυναμική διαδικασία στην οποία συμμετέχουν κύτταρα, διαμεσολαβητές, αυξητικοί παράγοντες και κυτοκίνες. Κατά κανόνα, η διαδικασία της επούλωσης εξελίσσεται μέσα από τις εξής φάσεις:

1. Αιμόσταση
2. Φλεγμονή
3. Πολλαπλασιασμός
4. Αναδιαμόρφωση



Εικόνα 4. Οι φάσεις της επούλωσης τραυμάτων και η χρονική τους διάρκεια (<http://slideplayer.com/slide/7382835/24/images/13/The+3+Phases+of+Wound+Healing.jpg>)

## **1) Φάση αιμόστασης (hemostasis)**

Η φάση της αιμόστασης αρχίζει αμέσως μετά τον τραυματισμό. Παρατηρείται αγγειοσύσπαση των τραυματισμένων αγγείων, συσσώρευση και συγκόλληση των αιμοπεταλίων, οπότε και σχηματίζεται αιμοπεταλιακός θρόμβος. Παρατηρείται απελευθέρωση διάφορων πρωτεϊνών από τα αιμοπετάλια (PDGF, TGF-β, σεροτονίνη, θρομβοξάνες) και ενεργοποίηση του μηχανισμού της πήξης του αίματος. Το ινωδογόνο μετατρέπεται σε ινώδες και, τέλος, αιμοπετάλια και ερυθρά αιμοσφαίρια παγιδεύονται στο δίκτυο του ινώδους με αποτέλεσμα τον σχηματισμό του ερυθρού θρόμβου.

## **2) Φάση φλεγμονής (inflammation)**

Η φάση της φλεγμονής αρχίζει τις πρώτες 24 ώρες μετά τον τραυματισμό και μπορεί να διαρκέσει έως και 5 ημέρες. Χαρακτηρίζεται από:

- απελευθέρωση μεσολαβητών της φλεγμονής από το τραύμα
- αγγειοδιαστολή
- αύξηση της διαπερατότητας των τριχοειδών και
- ενεργοποίηση του συστήματος του συμπληρώματος

Μέσω μηχανισμών χημειοταξίας, προσελκύνονται στο τραύμα πολυμορφοπύρηνα και μονοπύρηνα κύτταρα (μονοκύτταρα και μακροφάγα), τα οποία προσκολλώνται στο τοίχωμα των αγγείων, ο ρόλος των οποίων είναι η φαγοκυττάρωση των μικροοργανισμών και των νεκρωμάτων, με αποτέλεσμα τον καθαρισμό του τραύματος (Pathum Chandika et al, 2015).

### **3) Φάση πολλαπλασιασμού (Proliferation)**

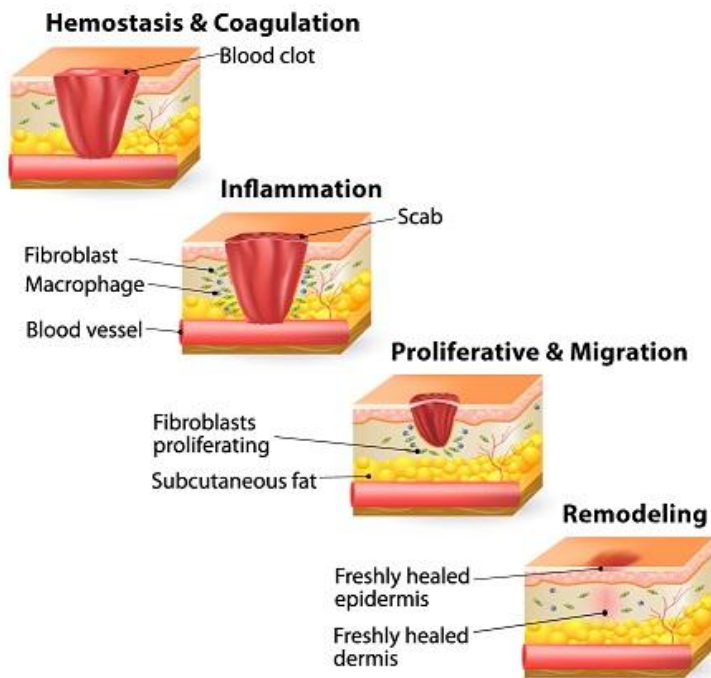
Η φάση του πολλαπλασιασμού αρχίζει γύρω στην 3η ημέρα μετά τον τραυματισμό και έχει διάρκεια 2-3 εβδομάδες. Στη φάση αυτή, παρατηρείται απελευθέρωση χημειοτακτικών παραγόντων από τα μακροφάγα και παραγωγή κοκκιώδους ιστού. Παράλληλα, παρατηρείται προσέλκυση ινοβλαστών στο τραύμα και παραγωγή γλυκοζαμινογλυκανών, όπως υαλουρονικό οξύ,θειική δερματάνη, θειική χονδροϊτίνη, κολλαγόνου (κυρίως τύπου III) και ελαστίνης. Σε αυτό το σημείο αρχίζει η συρρίκνωση του τραύματος με συμπλησίαση των χειλέων του ενώ στη συνέχεια ακολουθεί η προοδευτική κάλυψή του με επιθηλιακά κύτταρα (επιθηλιοποίηση) (Rovee D.T., Maibach I. H. 2003).

### **4) Φάση της αναδιαμόρφωσης (remodeling)**

Η φάση της αναδιαμόρφωσης αρχίζει την 3η εβδομάδα μετά τον τραυματισμό και μπορεί να διαρκέσει έως και 2 χρόνια.

Παρατηρείται σταδιακή αντικατάσταση του κολλαγόνου τύπου III από κολλαγόνο τύπου I ενώ οι ίνες του αναδιατάσσονται με πιο οργανωμένο τρόπο (Rovee D.T., Maibach I. H. 2003).

# WOUND HEALING



Εικόνα 5. Στάδια της επούλωσης (<http://www.newhealthadvisor.com/wound-healing-process.html>)



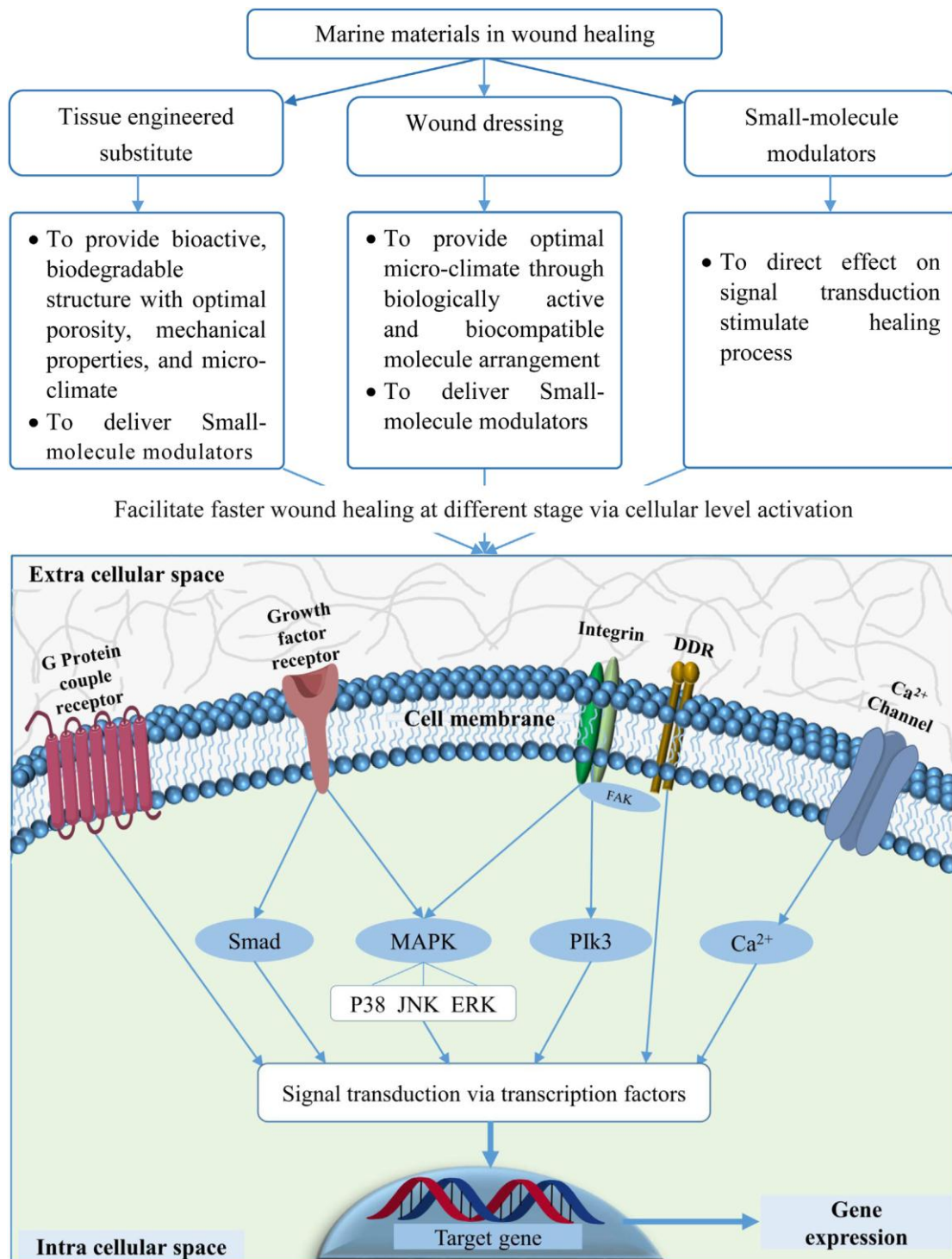
### 1.3. Φυσικά προϊόντα και επούλωση

Προϊόντα φυσικής προέλευσης χρησιμοποιούνται από την αρχαιότητα ως βασική πηγή φαρμάκων. Με το πέρασμα των χρόνων, ολοένα και περισσότερα φυσικά προϊόντα βρίσκουν εφαρμογή σε μια πληθώρα ασθενειών. Φυσικά βιοδραστικά μόρια χρησιμοποιούνται ακόμη ως φάρμακα από μόνα τους ή ως κύρια δραστικά συστατικά φαρμάκων και, συμμετέχοντας σε μια πληθώρα μοριακών μηχανισμών, αποτελούν εξαιρετική προοπτική για ιατρικές, φαρμακευτικές και βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Πιο συγκεκριμένα, ενώσεις φυσικής προέλευσης, όπως αλκαλοειδή, αιθέρια έλαια, φλαβονοειδή, ταννίνες, τερπενοειδή, σαπωνίνες, φαινόλες και λιπαρά οξέα (Bahramsoltani et al, 2014) έχουν χρησιμοποιηθεί σε πολλές μελέτες και εμφανίζουν αποτελεσματικότητα και φαρμακολογική δράση κατά τη διαδικασία της επούλωσης.

Τα βιοδραστικά φυσικά προϊόντα εμπλέκονται σε διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια με στόχο να επάγουν ή να αναστείλουν διαφορετικούς μοριακούς μηχανισμούς μέσω ρύθμισης της έκφρασης ή/και σηματοδότησης αυξητικών παραγόντων. Η συμμετοχή των ενώσεων ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων ώστε να τροποποιηθούν κυτταρικές δραστηριότητες, όπως η κυτταρική μετανάστευση, η εναπόθεση εξωκυττάριας μήτρας και τελικά η επιτυχής αναγέννηση του δερματικού ιστού. Η συνεχής αναζήτηση βιοδραστικών μορίων από φυσικά προϊόντα οδήγησε στην εξερεύνηση του θαλάσσιου περιβάλλοντος για ανεύρεση καινοτόμων φαρμακευτικών ουσιών. Έτσι, έγινε αντιληπτό μέσα σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα ότι οι θαλάσσιοι οργανισμοί αποτελούν μια ιδανική πηγή για αναζήτηση καινοτόμων μορίων με πληθώρα εφαρμογών (Se-Kwon Kim, 2013).

### **1.3.1. Φυσικά προϊόντα θαλάσσιας προέλευσης με δράση στη διαδικασία της επούλωσης και της αναγέννησης ιστών**

Το θαλάσσιο περιβάλλον αποτελεί ένα θαυμάσιο οικοσύστημα, με εντυπωσιακά μεγάλη βιοποικιλότητα. Αυτή η τεράστια χημική διαφοροποίηση μεταξύ των θαλάσσιων οργανισμών κάνει το θαλάσσιο περιβάλλον μια εξαιρετική πηγή φυσικών προϊόντων. Με τη συνεχή αναζήτηση μοναδικών μορίων στο θαλάσσιο βιοπεριβάλλον, ο όρος «θαλάσσιο φυσικό προϊόν» έχει εδραιωθεί στον κλάδο της χημείας φυσικών προϊόντων (D.J. Faulkner, 2002). Έτσι, κάθε χρόνο, υλικά θαλάσσιας προέλευσης γίνονται εκκινήτες ή συνεκκινήτες εκατοντάδων πολλά υποσχόμενων φαρμακευτικών σκευασμάτων και υλικών κατασκευής τεχνητού ιστού (V. Ferraro et al, 2010; M. Yeo et al, 2012). Η παρακάτω εικόνα δείχνει τους τρόπους με τους οποίους τα βιομόρια θαλάσσιας προέλευσης συμμετέχουν στη διαδικασία της επούλωσης και της αναγέννησης ιστών.



Εικόνα 5. Χημική και μηχανική μετάδοση σημάτων που παίζουν ρόλο στο σχήμα του κυττάρου, στη μετανάστευση, τον πολλαπλασιασμό, τη σύνθεση εξωκυττάριας μήτρας και άλλες διεργασίες που υποβοηθούν και επιταχύνουν τη διαδικασία της επούλωσης. Ο αναπτυσσόμενος τομέας χρήσης θαλάσσιων βιοϋλικών παρέχει εντυπωσιακές ιδιότητες που προωθούν την επουλωτική διαδικασία και την αναγέννηση του ιστού (Pathum Chandika et al, 2015).

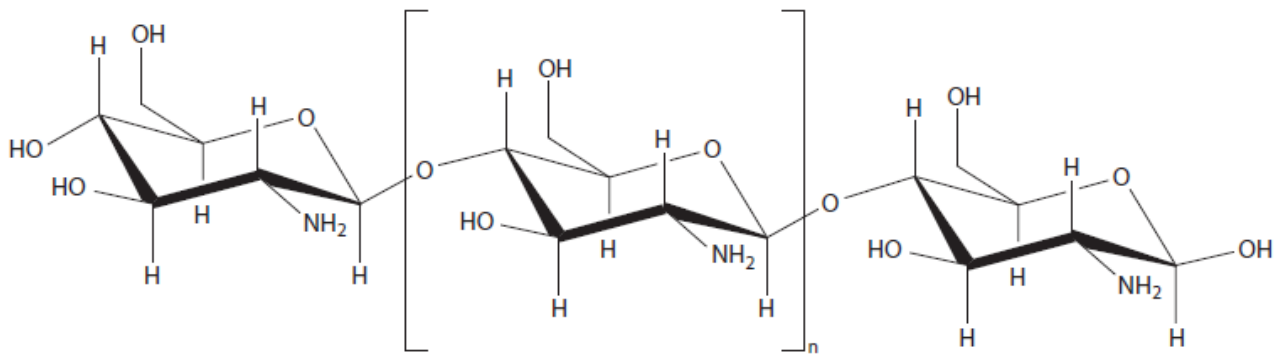
Το θαλάσσιο οικοσύστημα αποτελεί μια άφθονη πηγή πληθώρας βιοϋλικών με παρά πολλές χρήσεις. Τα φυσικά προϊόντα θαλάσσιας προέλευσης είναι ένα συνεχώς αναπτυσσόμενο πεδίο έρευνας με εντυπωσιακές εφαρμογές. Λόγω της τεράστιας πολυπλοκότητας και της βιοσυμβατότητας τους, τα φυσικά προϊόντα θαλάσσιας προέλευσης, όπως βιοκεραμικά, πολυσακχαρίτες, ένζυμα, πεπτίδια, λιπίδια, χρωστικές, τοξίνες κ.α., βρίσκουν ευρεία εφαρμογή στη βιολογία και τη βιοϊατρική. Η απομόνωση, ο χαρακτηρισμός και η εφαρμογή θαλάσσιων βιομορίων παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της βιομηχανίας που σχετίζεται με τη θαλάσσια βιοτεχνολογία.

Σήμερα, τα βιομόρια θαλάσσιας προέλευσης είναι ένας συνεχώς εξελισσόμενος τομέας που προσελκύει τόσο ερευνητές όσο και καταναλωτές καθώς εμφανίζουν πάρα πολλές βιολογικές και βιοϊατρικές εφαρμογές.

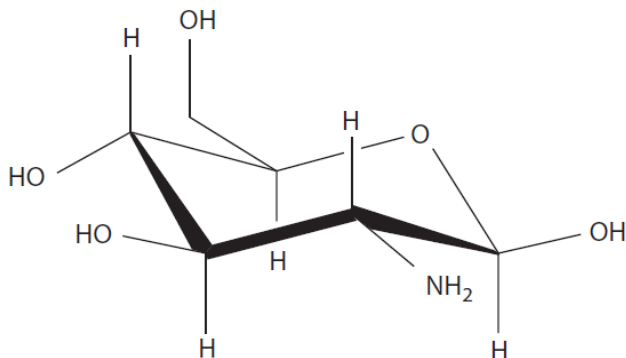
### 1.3.1.1. Χιτίνη & Χιτοζάνη

Η χιτίνη είναι το δεύτερο αφθονότερο φυσικό πολυμερές μετά την κυτταρίνη. Η χιτοζάνη παράγεται από τη χιτίνη με απακετυλίωση σε αλκαλικό περιβάλλον. Τόσο η χιτίνη όσο και η χιτοζάνη αποτελούν μη τοξικά, βιοαποικοδομήσιμα, βιοσυμβατά πολυμερή που εμφανίζουν έντονη αντιμικροβιακή δράση και Συμμετέχουν στην επούλωση, την αιμόσταση και την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος.

Η χιτίνη είναι ένας φυσικός πολυσακχαρίτης που αποτελείται από επαναλαμβανόμενες δομικές μονάδες N-ακετυλο-γλουκοζαμίνης και βρίσκεται στα καβούρια, τις γαρίδες, τα κοράλια, τις πεταλούδες, τους μύκητες κ.α. (Shahidi and Abuzaytoun, 2005).

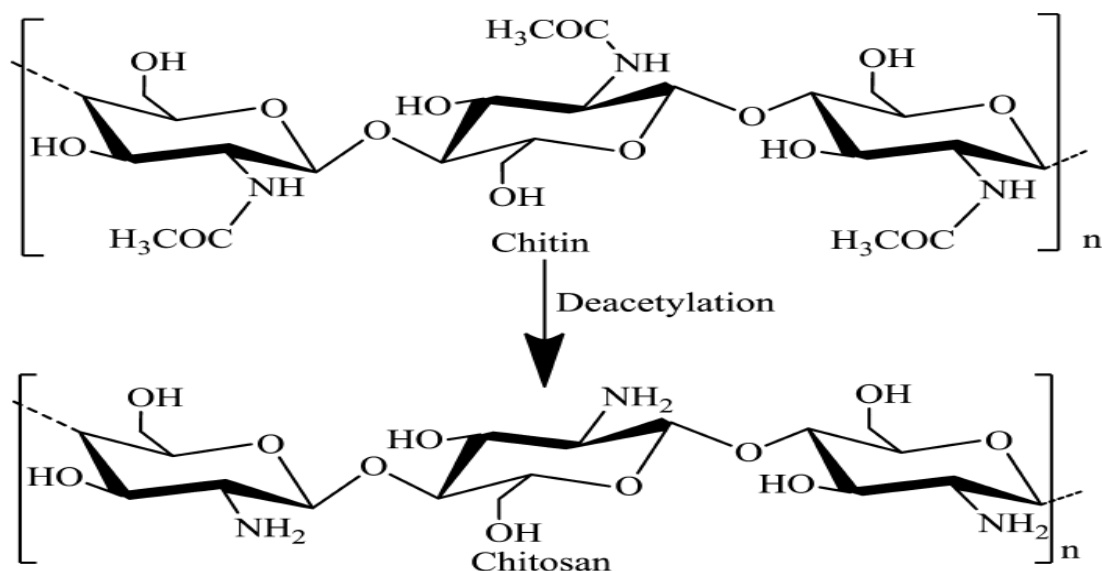


Εικόνα 6. Δομή χιτοζάνης (Se-Kwon Kim, Marine biomaterials 2013)



Εικόνα 7. Δομή γλουκοζαμίνης (Se-Kwon Kim, Marine biomaterials 2013)

Ωστόσο, η κύρια πηγή για την παραγωγή χιτοζάνης είναι τα κελύφη των θαλάσσιων καρκινοειδών (καβούρια, γαρίδες, κριλ). Η εκμετάλλευση παραπροϊόντων της θαλάσσιας βιομηχανίας για την παραγωγή χιτίνης και χιτοζάνης είναι πολύ σημαντική καθώς μειώνεται η περιβαλλοντική μόλυνση. Οι περισσότεροι πολυσακχαρίτες (π.χ. κυτταρίνη, δεξτράνη, πηκτίνη, αλγινικό οξύ, αγαρόζη, άμυλο κλπ) είναι είτε ουδέτερα είτε όξινα μόρια, αλλά η χιτοζάνη είναι ένας αλκαλικός πολυσακχαρίτης. Σε ουδέτερο ή αλκαλικό pH η χιτοζάνη περιέχει ελεύθερες αμινομάδες και είναι αδιάλυτη στο νερό, ενώ σε όξινο pH γίνεται διαλυτή λόγω πρωτονίωσης των αμινομάδων της. Η διαλυτότητα εξαρτάται από το βαθμό απακετυλίωσης της (Costa-Pinto et al., 2011).



**Εικόνα 8. Απακετυλίωση χιτίνης**

(<http://iopscience.iop.org/article/10.1088/2043-6262/2/4/045004>)

Η χιτοζάνη είναι ένας ευθύγραμμος πολυηλεκτρολύτης σε όξινο περιβάλλον. Το pH και η ιονική ισχύς παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στο εσωτερικό ιξώδες των πολυηλεκτρολυτών. Η χιτοζάνη σε όξινα διαλύματα αντιδρά με πολυανιονικά υδατικά διαλύματα (π.χ. ηπαρίνης, αλγινικού νατρίου, χιτίνης κλπ) σχηματίζοντας σύμπλοκα πολυηλεκτρολυτών (Rinaudo, 2006; Dutkiewicz and Tuora, 1992).

Η χιτοζάνη αποτελεί πιθανό αντιμικροβιακό παράγοντα λόγω της κατιοντικής φύσης της, έχει ένα ευρύ φάσμα βιοϊατρικών εφαρμογών και αυτή τη στιγμή θεωρείται ως ένα καινοτόμο υλικό καθώς βρίσκει εφαρμογή σε συστήματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμάκων και ως επουλωτικός, αντιμικροβιακός και αιμοστατικός παράγοντας(Shakeel and Saiqa, 2015).

Τα πεδία εφαρμογής της χιτίνης και της χιτοζάνης στη δημιουργία νέων καινοτόμων υλικών είναι πάρα πολλά. Μερικές από τις εφαρμογές τους παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα:

<b>ΠΕΔΙΟ</b>	<b>ΕΦΑΡΜΟΓΗ</b>
Ιατρική	Ελεγχόμενη αποδέσμευση δραστικών ουσιών
	Χειρουργικά ράμματα
	Οδοντικά μοσχεύματα
	Τεχνητό δέρμα
	Επανανοικοδόμηση οστών
	Φακοί επαφής
Φαρμακευτική	Αντικαρκινική δράση
	Βακτηριοστατική δράση
	Αιμοστατική δράση
	Αντιθρομβωτική δράση
Προσωπική υγιεινή	Ενυδάτωση δέρματος
	Αντιμετώπιση ακμής
	Στοματική φροντίδα
Επεξεργασία λυμάτων	Κροκιδωτικό για τον καθαρισμό νερού
	Απομάκρυνση μεταλλικών ιόντων
	Απομάκρυνση οσμών
Τρόφιμα	Φυσική δέσμευση λιπιδίων
	Διαιτητική ίνα
	Συντηρητικό
	Σταθεροποιητής
	Μυκητοστατικό και αντιβακτηριακό σε συσκευασίες
Γεωργία	Ενίσχυση των αμυντικών μηχανισμών των φυτών
	Ελεγχόμενη απελευθέρωση λιπασμάτων και θρεπτικών στο έδαφος

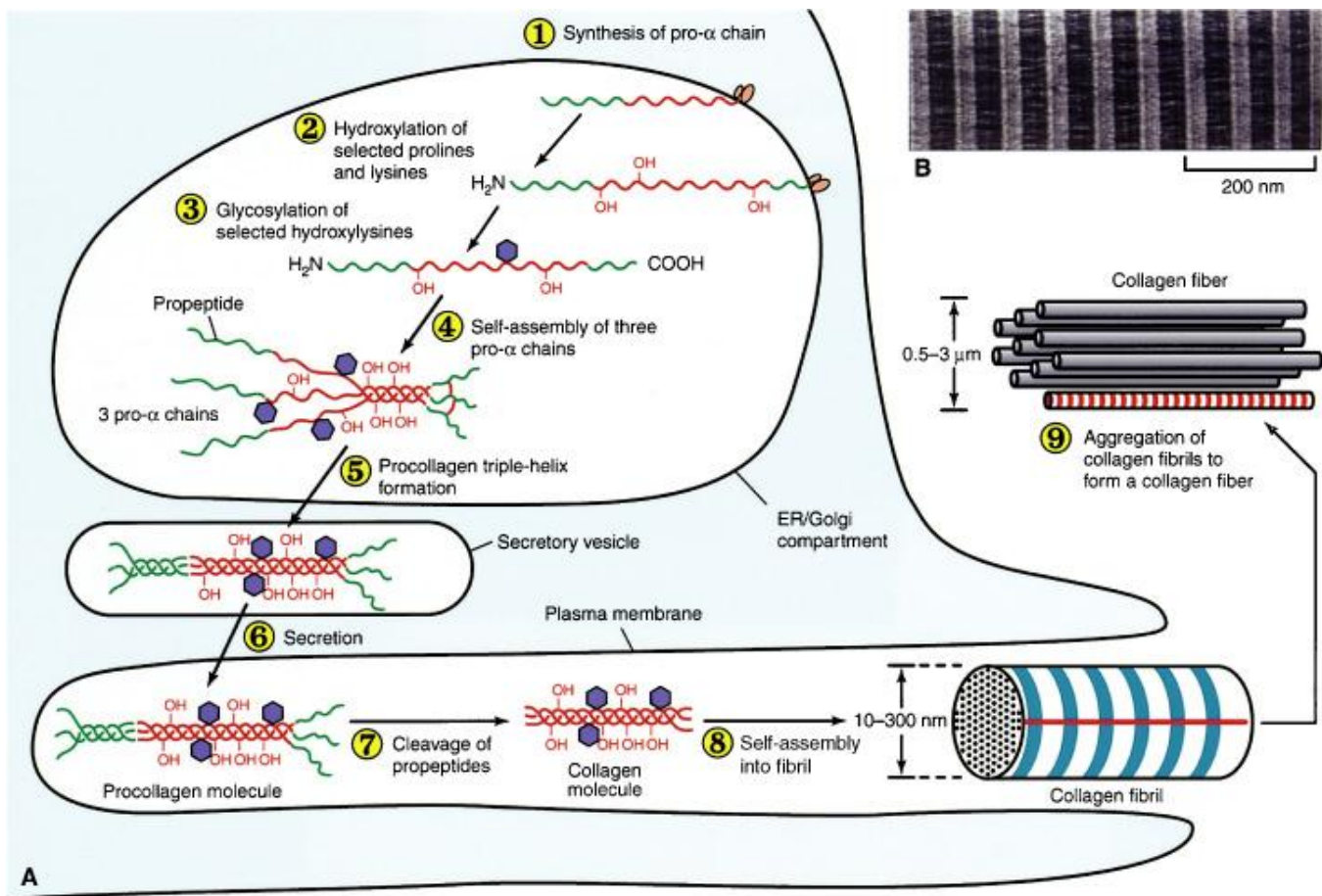
**Εικόνα 9 .Κυριότερες εφαρμογές χιτίνης & χιτοζάνης ανά πεδίο εφαρμογής**

Η χρήση της χιτίνης και της χιτοζάνης στην επούλωση τραυμάτων είναι ευρέως διαδεδομένη. Υδρογέλες χιτοζάνης εμφανίζουν αντίσταση ενάντια σε προσβολή από E.Coli τόσο in vitro όσο και in vivo, δρώντας ως αντιβακτηριακά βιοϋλικά (Fujita et al., 2004). Μελέτες σε κύτταρα έδειξαν πως ινώδη στρώματα χιτοζάνης προωθούν την προσκόλληση και τον πολλαπλασιασμό L929 κυτάρων (ινοβλάστες συνδετικού ιστού από ποντίκι) (Zhou et al., 2008).

#### **1.3.1.1.2. Κολλαγόνο**

Το κολλαγόνο είναι η κύρια πρωτεΐνη των συνδετικών ιστών και η πιο άφθονη πρωτεΐνη στα ζώα. Το κολλαγόνο που χρησιμοποιείται στις βιομηχανίες τροφίμων, φαρμακευτικών προϊόντων και καλλυντικών προέρχεται κυρίως από βοοειδή και χοιρινά οστά και δέρμα. Αποτελείται κυρίως από κολλαγόνο τύπου II και μικρό ποσοστό κολλαγόνο τύπου I. Παρόλα αυτά, η ανησυχία ως προς την ασφαλή χρήση ζωικών πρωτεϊνών έχει αυξηθεί λόγω της πιθανότητας μετάδοσης ασθενειών όπως η σπογγώδης εγκεφαλοπάθεια των βοοειδών. Επιπλέον, το κολλαγόνο που προέρχεται από χοίρους δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί λόγω θρησκευτικών περιορισμών (Kim and Mendis, 2006).





Copyright © 2004, Elsevier.

Εικόνα 11. Δομή κολλαγόνου (Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al [eds]: *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. New York, Garland, 2002, p 1100; B, Courtesy of Robert Horne).

Για το λόγο αυτό, το ενδιαφέρον για εύρεση άλλων πηγών κολλαγόνου, χωρίς κινδύνους υγείας, έχει αυξηθεί σημαντικά. Το κολλαγόνο θαλάσσιας προέλευσης, από ψάρια, σφουγγάρια κ.α. αποτελείται από κολλαγόνο τύπου I και III, οι τύποι κολλαγόνου που υπάρχουν και φυσιολογικά στο δέρμα, και απορροφάται 1.5 φορές πιο αποτελεσματικά λόγω του χαμηλότερου μοριακού βάρους. Αυτό σημαίνει πως έχει αυξημένη βιοδιαθεσιμότητα σε σχέση με το κολλαγόνο ζωικής προέλευσης. Λόγω της ευκολότερης απορρόφησής του, θεωρείται η καλύτερη πηγή κολλαγόνου για φαρμακευτικές εφαρμογές (Y. Matsumoto et al, 2011; Song et al, 2006).

Έτσι, υπάρχει πολύ μεγάλο ενδιαφέρον όσον αφορά στην εύρεση των ιδιοτήτων και της συμβατότητας του κολλαγόνου θαλάσσιας προέλευσης στην ιστική αναγέννηση, το οποίο και συνοψίζεται στον ακόλουθο πίνακα:

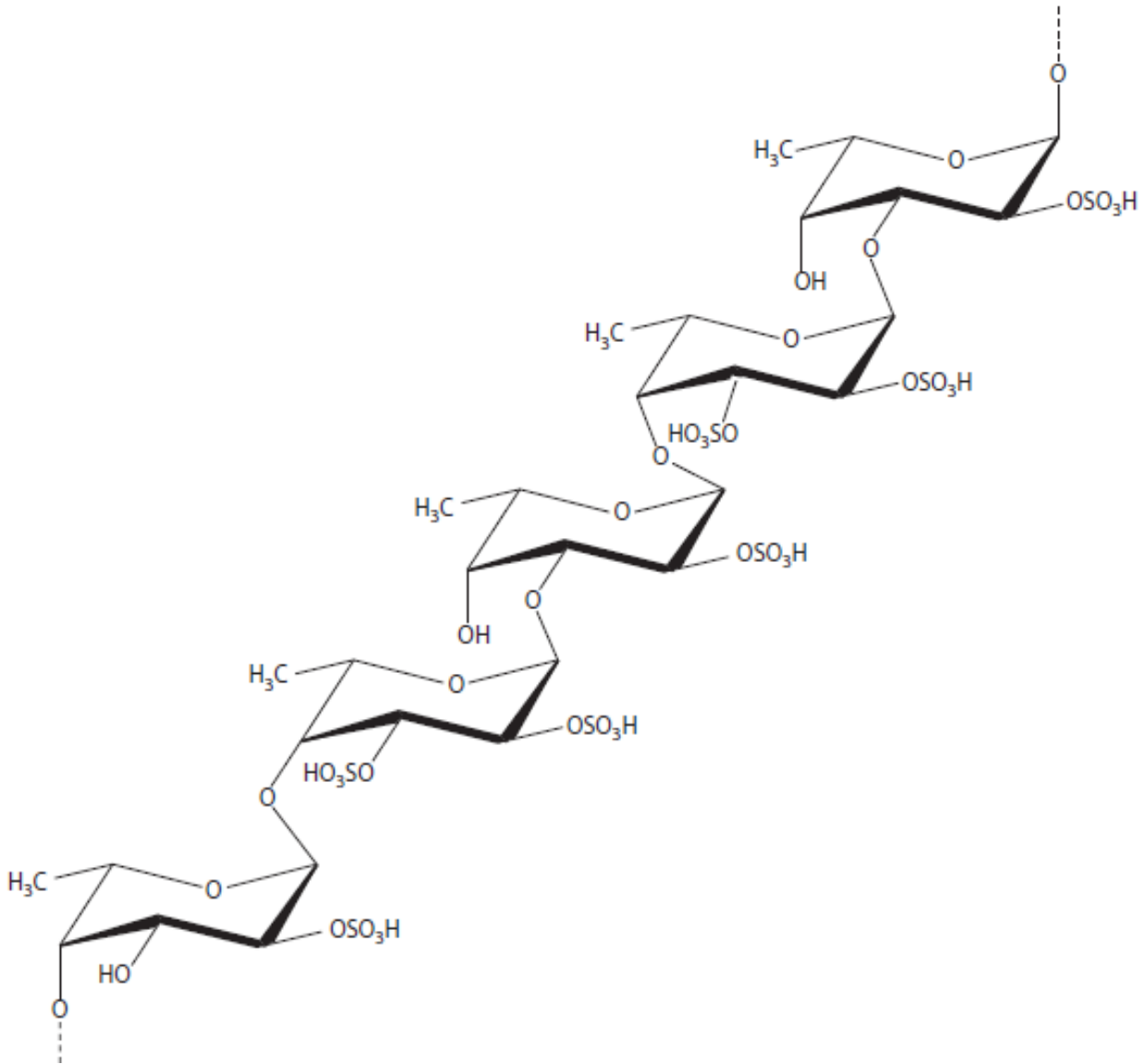
Organism	Genera/Species	Fabrication type and method	Source	Type of cell cultured	Histological examination
Jellyfish	<i>Stomolophus nomurai meleagris</i>	Porous scaffolds cross-linking with 1-ethyl-(3-3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC)	Whole portion	Primary human fibroblasts (HF), and endothelial cells obtained from foreskin	-
Fish	<i>Oncorhynchus keta</i>	DNA-incorporated composite film cross-linked by EDC for gelation, and a ventilation-drying	Skin	Human dermal fibroblast (NHDF), and normal human epidermal keratinocytes (NHEK)	Full thickness, 8 mm diameter wound on the dorsal region of Wistar rat
Fish	Salmon	Elastin-incorporated sponge cross-linked by EDC	Skin	Human dermal fibroblast, and WKA rat fetus fibroblast	Full thickness, 15 mm diameter skin wound in Wistar rat
Fish	<i>Lates calcarifer</i>	<i>Macrotyloma uniflorum</i> plant extract-incorporated porous sponge cross-linked by glutaraldehyde	Fish scale	Mouse embryonic fibroblast (NIH 3T3), and human keratinocytes (HaCaT)	-
Marine catfish	-	Chitosan and platelet-derived growth factor (PDGF) comprised gel	Bladders	-	1.5 × 1.5 cm square wound in female albino rats for dermal regeneration
Red Sea cucumber	<i>Stichopus japonicus</i>	Pepsin-soluble collagen-treated cell plate for wound healing	Body wall	HaCaT	-
Fish	<i>Salmo salar</i>	Genipin cross-linked porous chitosan-collagen-gelatin scaffolds	Skin	NIH-3T3	-

**Εικόνα 11. Σύνολο δυνατοτήτων κολλαγόνου θαλάσσιας προέλευσης και εφαρμογών του στην επούλωση τραυμάτων και στη δημιουργία τεχνητού δέρματος (P. Chandika et al., 2015)**

### 1.3.1.1.3. Φουκοϊδάνη

Η φουκοϊδάνη είναι ένας θειϊκός πολυσακχαρίτης που βρίσκεται συχνά σε θαλάσσια είδη όπως καφέ άλγη, ολοθουροειδή και διάφορα φύκη όπως *Hizikia fusiformis* (Shiroma et al., 2003), mozuku, kombu, limu moui, bladderwrack, wakame και hijiki. Η δομή της φουκοϊδάνης φαίνεται στην εικόνα 12. Η φουκοϊδάνη χρησιμοποιείται ως συστατικό σε συμπληρώματα διατροφής και βρίσκεται υπό συνεχή μελέτη για την χρήση της σε βιολογικές και βιοϊατρικές εφαρμογές (Aisa et al., 2005; Deux et al., 2002; Fitton, 2011;

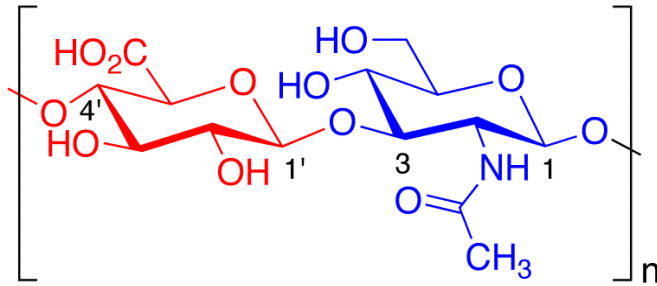
Irhimeh et al., 2007; Park et al., 2011). Η φουκοϊδάνη θαλάσσιας προέλευσης έχει ελεγχθεί ως προς την αντικαρκινική της δράση και τις ανοσολογικές της ιδιότητες (Itoh et al., 1993), ως προς τις καλλυντικές της ιδιότητες (Fitton et al., 2007), και ως προς τις αντιθρομβωτικές της ιδιότητες (Colliec et al., 1991).



Εικόνα 12. Δομή φουκοϊδάνης (Se-Kwon Kim, Marine biomaterials 2013)

### 1.3.1.4. Υαλουρονικό οξύ

Το υαλουρονικό οξύ είναι ένας ευθύγραμμος πολυσακχαρίτης, αποτελούμενος από επαναλαμβανόμενες δομικές μονάδες N-ακετυλο- d-γλυκοζαμίνης και γλυκουρονικού οξέος, που απομονώθηκε αρχικά το 1934 από τους επιστήμονες Meyer και John ως μια καινοτόμα γλυκοζαμινογλυκάνη σε υαλοειδές υγρό βοοειδών.



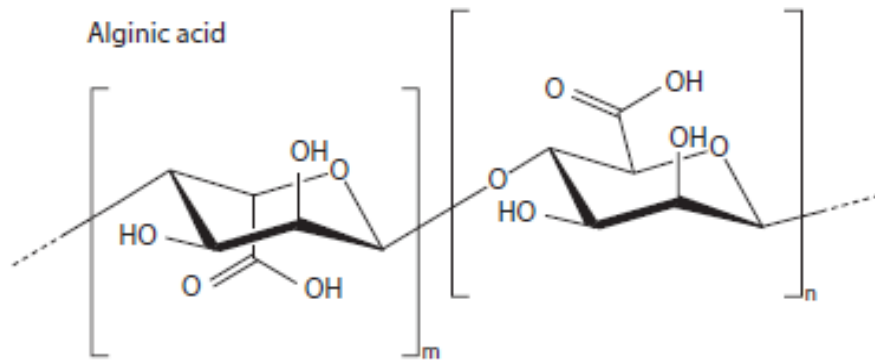
*Glucuronic Acid N-Acetyl-D-glucosamine*

Εικόνα 13. Δομή υαλουρονικού οξέος ([www.chemie-im-alltag.de/english/articles/0128/](http://www.chemie-im-alltag.de/english/articles/0128/))

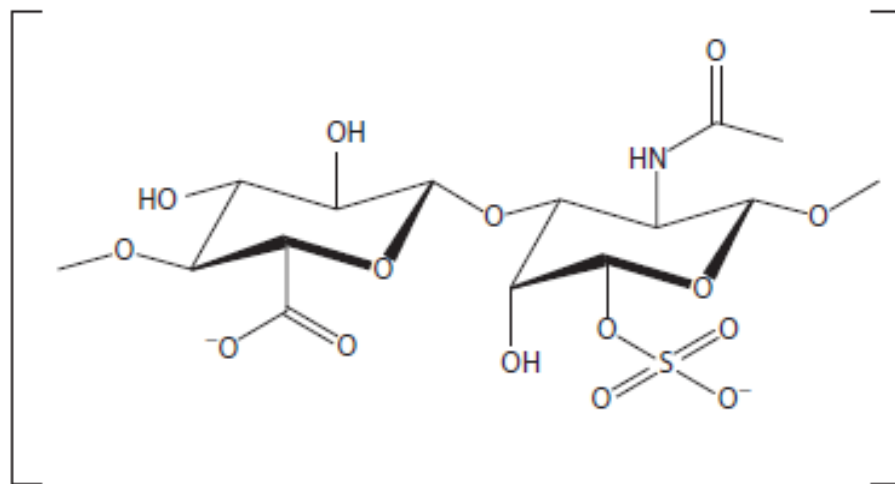
Από τότε, το υαλουρονικό οξύ έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα σε ιατρικές εφαρμογές λόγω της ικανότητας του να προάγει τη μετανάστευση, τη διαφοροποίηση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό κατά την αναγέννηση του ιστού (X. Zheng Shu et al, 2004). Επιπλέον το υαλουρονικό οξύ παρέχει μια προσωρινή δομή κατά τα πρώτα στάδια της επούλωσης που βοηθάει στη διάχυση θρεπτικών συστατικών ενώ παράλληλα απομακρύνει τα μεταβολικά απόβλητα των κυττάρων (J. Voigt et al, 2012). Έτσι, πολλές μελέτες έχουν διεξαχθεί με τη χρήση υαλουρονικού οξέος ενσωματωμένο σε διάφορες μορφές (υδρογέλες, σπόγγιοι, πλέγματα) και έχουν διαπιστωθεί οι εξαιρετικές ιδιότητές του (M.N. Collins et al, 2013; G. Sadhasivam et al, 2013; M. Murado Et al, 2012). Παρ' όλα αυτά, το υαλουρονικό οξύ θαλάσσιας προέλευσης δεν έχει χρησιμοποιηθεί σε μεγάλο βαθμό. Μετά από ανάλυση του υαλουρονικού οξέος θαλάσσιας προέλευσης, φάνηκε πως έχει παρόμοια δομικά χαρακτηριστικά με το κοινό υαλουρονικό οξύ (C.G. Panagos et al, 2014; S.Kanchana et al, 2013).

Υπάρχουν και άλλοι πολυσακχαρίτες θαλάσσιας προέλευσης που έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί από διάφορα είδη. Οι κυριότεροι από αυτούς

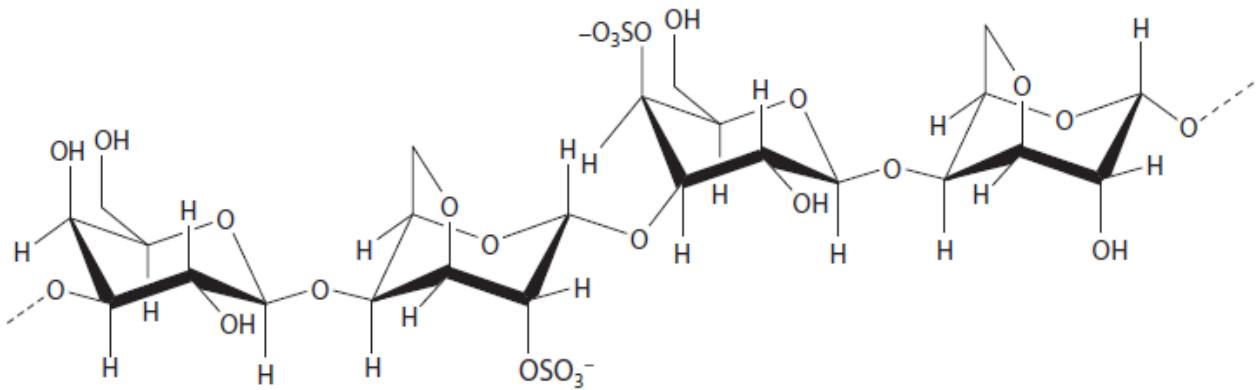
είναι το αλγινικό οξύ, η θειϊκή χονδροϊτίνη και η καραγενάνη, με πρωτεύοντα ρόλο σε βιολογικά και βιοϊατρικά προϊόντα.



Εικόνα 14. Δομή αλγινικού οξέος (Se-Kwon Kim, Marine biomaterials 2013)



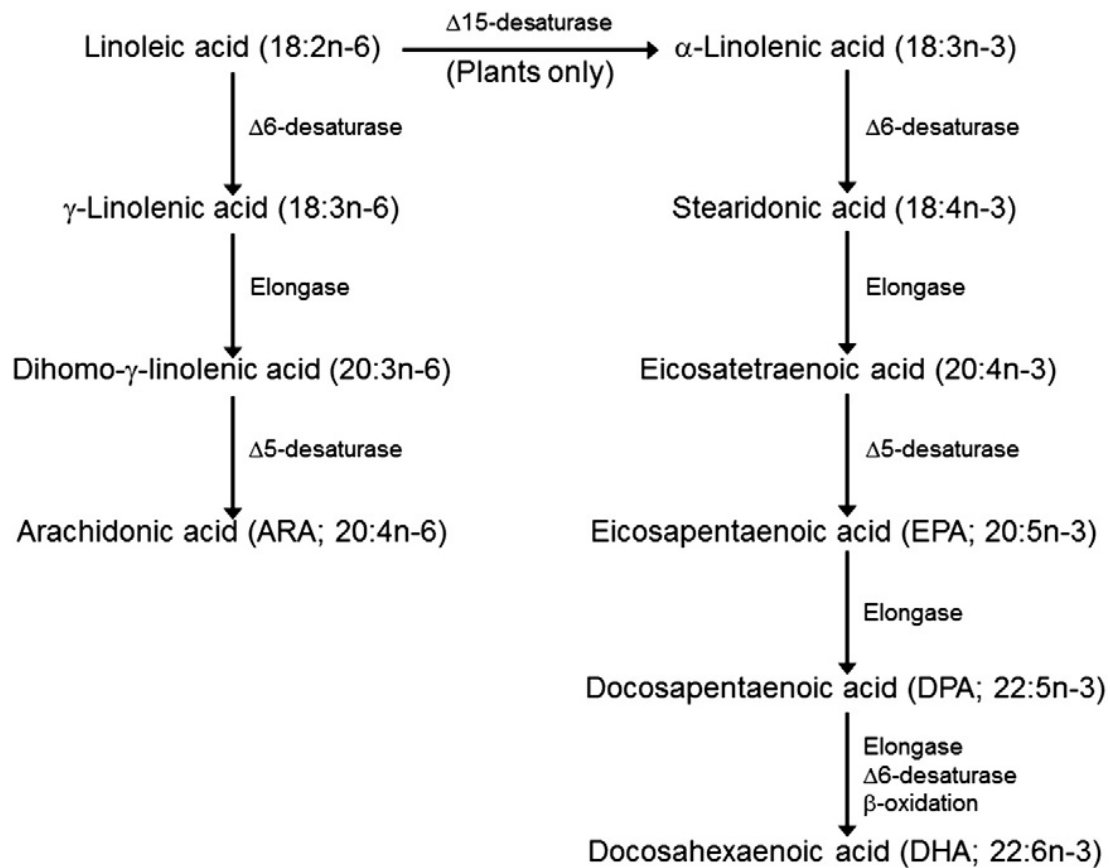
Εικόνα 15. Δομή Θειϊκής χονδροϊτίνης (Se-Kwon Kim, Marine biomaterials 2013)



Εικόνα 16. Δομή καραγενάνης (Se-Kwon Kim, Marine biomaterials 2013)

### 1.3.1.5. Λιπαρά οξέα

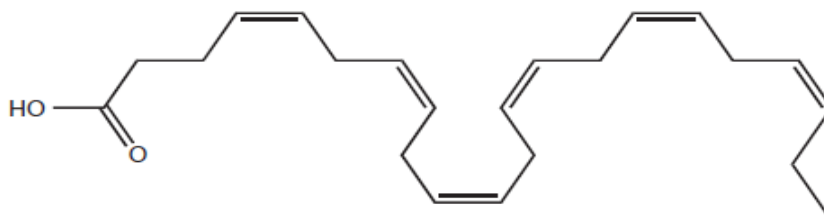
Τα Ωμέγα-3 λιπαρά οξέα είναι μια οικογένεια πολυακόρεστων λιπαρών οξέων που χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός διπλού δεσμού μεταξύ του 3<sup>ου</sup> και 4<sup>ου</sup> άνθρακα της αλυσίδας υδρογονανθράκων. Στην οικογένεια αυτή περιλαμβάνει το εικοσαπενταενοϊκό οξύ (EPA; 20:5n-3), το εικοσιδυπενταενοϊκό οξύ (DPA; 22:5n-3) και το εικοσιδυεξαενοϊκό οξύ (DHA; 22:6n-3). Παρόλο που τα λιπαρά οξέα EPA, DPA και DHA συνθέτονται από απλούστερα ω-3 λιπαρά οξέα στα φυτά (εικόνα 17), αυτό το μεταβολικό μονοπάτι δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό στους ανθρώπους.



Εικόνα 17. Μονοπάτια βιοσύνθεσης ω-6 και ω-3 λιπαρών οξέων (Philip C. Calder, 2015)

Λιπαρά οξέα με τη μορφή φωσφολιπιδίων είναι τα βασικά και πιο σημαντικά συστατικά της πλασματικής μεμβράνης. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (polyunsaturated fatty acids, PUFAs), εκτός από το δομικό τους ρόλο στη δημιουργία της πλασματικής μεμβράνης, είναι υπεύθυνα για τη ρύθμιση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των κυττάρων και την ενδοκυτταρική μετάδοση σημάτων (P. Calder, 2001). Παράλληλα, τα ω-3 και ω-6 λιπαρά οξέα συμμετέχουν στη βιοσύνθεση διάφορων λιποϊκών μεσολαβητών της σύνθεσης των μεμβρανικών φωσφολιπιδίων και έτσι μπορούν να διεγείρουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων, ένα προκαταρκτικό στάδιο κατά τη διαδικασία της επούλωσης. (V.A. Ziboh et al, 2000). Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα αποτελούν πρόδρομες ενώσεις πολλών λιποϊκών μεσολαβητών με καθοριστικό ρόλο στη διαδικασία της φλεγμονής, συμπεριλαμβάνοντας την αγγειακή συστολή, τη χημειοταξία και την κυτταρική δραστηριοποίηση (P.C. Calder, 2006). Έτσι, έχουν διεξαχθεί πολλές μελέτες

ώστε να διαπιστωθεί η ικανότητα των λιπαρών οξέων θαλάσσιας προέλευσης να δρουν ως επουλωτικοί παράγοντες. Για παράδειγμα, έχει ανακαλυφθεί πως το έλαιο του ήπατος του βακαλάου, που είναι πλούσιο σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, επιταχύνει την επούλωση μέσω τοπικής χορήγησης (M.Kletzmann, 1999). Επιπλέον, λιπίδια που έχουν εκχυλιστεί από μαλάκια (*Mytilus galloprovincialis* L) και γαστερόποδα (*Rapana venosa*) μειώνουν τον χρόνο επούλωσης εγκαυμάτων σε ποντικούς Wistar (D.L. Badiu et al, 2008). Ακόμη, οι Frealina et al. (B. Fredalina et al, 1999) έδειξαν μια πιθανή επουλωτική δράση του ακατέργαστου εκχυλίσματος θαλάσσιου αγγουριού (*Stichopus chloronotus*). Ακόμη μια ενδιαφέρουσα μελέτη σε ανθρώπους πραγματοποιήθηκε στο πανεπιστήμιο του Ohio. Σε αυτή τη μελέτη, αξιολογήθηκε η επίδραση των ω-3 λιπαρών οξέων θαλάσσιας προέλευσης στις προφλεγμονώδεις κυτοκίνες του υγρού πληγής καθώς επίσης και ο χρόνος ολοκλήρωσης της διαδικασίας της επούλωσης. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα φάνηκαν να αυξάνουν την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών στην περιοχή του τραύματος και γι' αυτό θεωρείται πως έχουν δυνατότητα εφαρμογής τους στην επούλωση του δέρματος (J.C. McDaniel et al, 2008).



docosahexaenoic acid.



eicosapentaenoic acid.

**Εικόνα 18. Δομές δοκοσαεξανοϊκού εικοσαπεντανοϊκού οξέος (Se-Kwon Kim, Marine biomaterials 2013)**



#### **1.3.1.2.3. Θαλάσσιες χρωστικές**

Οι θαλάσσιες χρωστικές δεν καθορίζουν μόνο το χρώμα. Αποτελούνται από χημικά μόρια, όπως τερπενοειδή και μελανίνες, που είναι συχνότερα σε βακτήρια. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες από θαλάσσια έγχρωμα βακτήρια έχουν ποικίλες βιολογικές ιδιότητες όπως αντιβιοτικές και αντικαρκινικές δράσεις.

#### **1.3.1.2.4 Βιοδραστικοί μεταβολίτες**

Οι βιοδραστικοί μεταβολίτες που απομονώθηκαν από θαλάσσιους οργανισμούς μπορούν να διαιρεθούν σε στεροειδή, τερπενοειδή, ισοπρενοειδή, μη-ισοπρενοειδή, κινόνες, βρωμιούχες ενώσεις και ετεροκυκλικές ενώσεις.

Περισσότεροι από 28.000 μεταβολίτες (MarinLit, 2016) έχουν απομονωθεί από θαλάσσιους οργανισμούς και αναμένεται ο αριθμός τους να αυξηθεί αρκετά. Οι εφαρμογές τους αφορούν κυρίως στον τομέα της Υγείας και εμφανίζουν ένα ευρύ φάσμα δράσεων. Οι μεταβολίτες θαλάσσιας προέλευσης χρησιμοποιούνται σαν μόρια οδηγό για τη σύνθεση νέων φαρμακευτικών ουσιών, ως αυτούσια συστατικά φαρμακευτικών σκευασμάτων ενώ πολλοί αποτελούν υποψήφια φάρμακα για τη θεραπεία διάφορων ασθενειών.

Χαρακτηριστικά παραδείγματα μεταβολιτών θαλάσσιας προέλευσης με έντονη βιολογική δράση ενάντια σε διάφορες ασθένειες παρουσιάζονται παρακάτω:

##### **Αντιμικροβιακή δράση:**

Ως μέρος μιας παγκόσμιας προσπάθειας ανεύρεσης νέων αντιμικροβιακών μορίων για την αντιμετώπιση μολύνσεων από ανθεκτικά παθογόνα βακτήρια, μελέτες του θαλάσσιου οικοσυστήματος προσέφεραν καινοτόμα φυσικά προϊόντα θαλάσσιας προέλευσης τα οποία έχουν απομονωθεί από θαλάσσιους μύκητες, βακτήρια, σπόγγους, όστρακα και ψάρια.

- Η κεφαλοσπορίνη C με τα συνθετικά παράγωγά της από

τον θαλάσσιο μύκητα *Cephalosporium acremonium* είναι μία από τις σημαντικότερες ομάδες αντιβιοτικών

- Γλυκολιπίδια και αμινογλυκοσίδες που απομονώθηκαν από το θαλάσσιο σπόγγο της Καραϊβικής *Caminus sphaerosconia*, λειτουργούν ως αναστολείς του απεκκριτικού συστήματος του παθογόνου τύπου III E. Coli (Linnington et al, 2002).

Επίσης, ο Oh και οι συνεργάτες του ανέφεραν ότι τα αλκαλοειδή που απομονώθηκαν από τον θαλάσσιο σπόγγο *Spongosorites* sp. παρουσιάζουν πιθανή αντιμικροβιακή δράση ενάντια στον *S. aureus* (MIC=3.12–6.35 μg/mL). Και τα δύο αλκαλοειδή παρουσίασαν δράση αναστολέα του ενζύμου sortase A που συμμετέχει καθοριστικά στην εισβολή Gram- θετικών βακτηρίων σε κύτταρα ξενιστές (Oh et al, 2006).

#### **Αντικαρκινική δράση:**

Το νουκλεοσιδικό παράγωγο σπογγοουριδίνη του σπόγγου *Tethya crypta* αποτελεί βάση του συνθετικού προϊόντος ARA-C (Cytarabine®)

#### **Αντιιική δράση:**

- Το νουκλεοσιδικό παράγωγο σπογγοθυμιδίνη του σπόγγου *Tedania digitata* αποτελεί τη βάση του συνθετικού προϊόντος ARA-A (Vidarabine®)
- Η σειρά αλκαλοειδών ευδιστομίνες προέρχονται ασκίδιο *Eudistoma olivaceum*.

#### **Αναλγητική δράση:**

Το πεπτιδίο ζικονοτίδιο (Prialt®) προέρχεται από το δηλητήριο των γαστεροπόδων του γένους *Conus*.

#### **Αντιθρομβωτική δράση:**

Φουκοϊδάνες από τα *Fucus evanescens* και *Laminaria cichorioides* προκαλούν αναστολή της θρομβίνης και το παράγοντα Xa (Drozd et al, 2010).

**Αντιμυκητιακή δράση:**

Οι καπιστερόνες Α και Β από τα πράσινα άλγη *Penicillus capitatus* προκαλούν αναστροφή στην αντίσταση σε αζόλες, ενώ ενισχύουν τη δράση της φλουκοναζόλης (Li et al. 2006)

**Αντιφλεγμονώδης δράση:**

Οι διτερπενικοί γλυκοζίτες ψευδοπτεροσίνες από το μαλακό κοράλλι *Pseudopterogorgia elizabethae* και το μεροτερπένιο μανοαλίδιο από το σπόγγο *Luffariella variabilis*.

## **1.4. Εφαρμογές θαλάσσιων φυσικών προϊόντων**

### **1.4.1. Βιοϊατρικές εφαρμογές βιοϋλικών θαλάσσιας προέλευσης**

#### **1.4.1.1. Τεχνητός ιστός**

Η δημιουργία τεχνητού ιστού αποτελεί ένα αναπτυσσόμενο πεδίο έρευνας που ασχολείται με τη θεραπεία ή την αντικατάσταση πασχόντων οργάνων. Διάφορα συνθετικά υλικά και υλικά θαλάσσιας προέλευσης όπως κολλαγόνο, χιτοζάνη, υαλουρονικό οξύ, άλγη και σπόγγοι έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως (Allison and Grande-Allen, 2006; Clarke et al., 2011; DiMartino et al., 2005b; Kim et al., 2008; Nettles et al., 2002; Senni et al., 2011; Venkatesan and Kim, 2010a; Venkatesan et al., 2011a; Wang et al., 2003). Τη μεγαλύτερη εφαρμογή παρουσιάζει η χιτοζάνη η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε διάφορες μορφές όπως νανοϊνες χιτίνης και συνδυαστικά με διάφορα άλλα βιοδραστικά υλικά όπως υδροξυαπατίτης, νανοσωματίδια πυριτίου, και νανοσωματίδια χιτίνης. Η χιτοζάνη προσφέρει τη δυνατότητα μορφοποίησης σε οποιοδήποτε σχήμα για την κατασκευή τεχνητού ιστού (Ehrlich, 2010; Song et al., 2006).

Το κολλαγόνο θαλάσσιας προέλευσης έχει χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία ικτριωμάτων και για την κατασκευή τεχνητού οστού (Pallela et al., 2011; Senaratne et al., 2006).

#### **1.4.1.2. Ενεργή μεταφορά φαρμάκων**

Η μεταφορά φαρμάκων είναι μια διαδικασία μεταφοράς μιας φαρμακευτικής ουσίας σε ένα συγκεκριμένο σημείο του οργανισμού, αποφεύγοντας τις παρενέργειες. Τα πολυμερή θαλάσσιας προέλευσης είναι απόλυτα βιοσυμβατά ενώ τα δομικά χαρακτηριστικά και η μηχανική αντοχή τους τα καθιστούν ιδανικά ως φορείς- μεταφορείς φαρμάκων (Felt et al., 1998; Kim and Mendis, 2006; Olsen et al., 2003; Swatschek et al., 2002).

#### **1.4.2. Βιομηχανικές εφαρμογές βιοϋλικών θαλάσσιας προέλευσης**

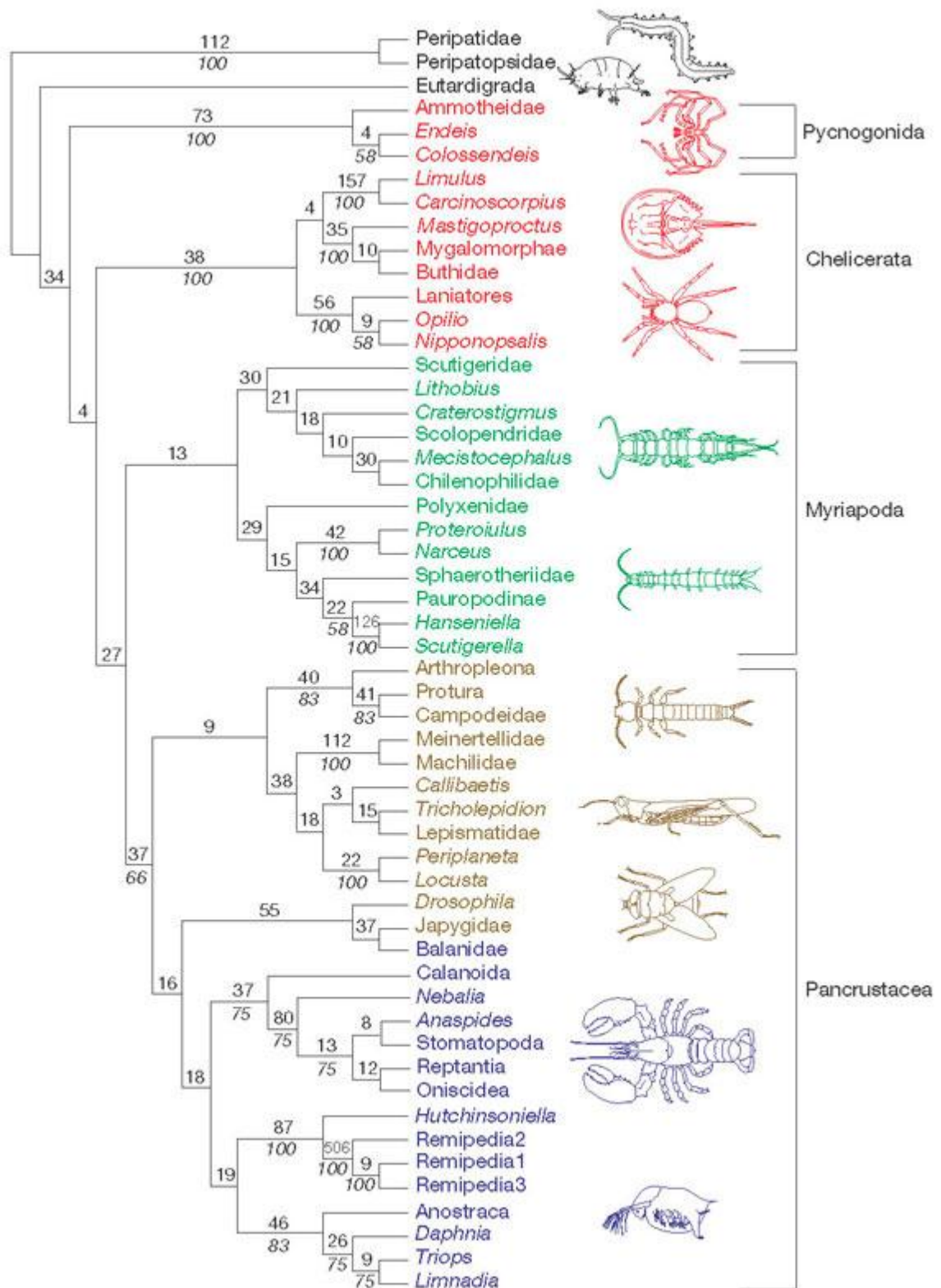
Τα βιοϋλικά χρησιμοποιούνται σε ένα εύρος βιομηχανικών εφαρμογών, από τη βιομηχανία υλικών έως τη βιομηχανία φαρμάκων και καλλυντικών. Πολυσακχαρίτες θαλάσσιας προέλευσης χρησιμοποιούνται σε βιομηχανίες χαρτικών, καλλυντικών, βιοϊατρικών, αντιμικροβιακών και γεωργικών προϊόντων και στον καθαρισμό υγρών αποβλήτων (Kim and Mendis, 2006).

Η καραγενάνη χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών, ως σταθεροποιητής ενζύμων και για τον καθαρισμό αποβλήτων. Το αλγινικό οξύ και το άγαρ χρησιμοποιούνται σε τομείς όπως επιθέματα τραυμάτων, αποκατάσταση νεύρων, μεταφορά πρωτεϊνών και τρόφιμα (Se-Kwon Kim, 2013).

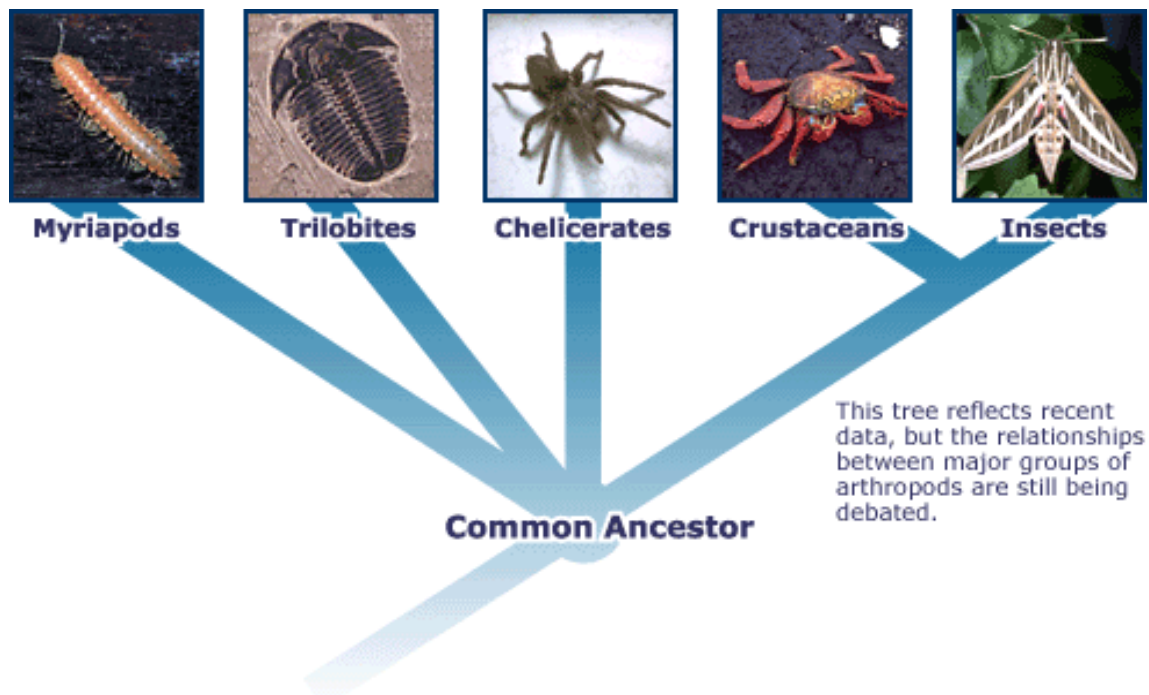
## **1.5. Αρθρόποδα**

Τα σύγχρονα αρθρόποδα περιλαμβάνουν τα έντομα, τα χηληκεραιωτά (π.χ. αράχνες, σκορπιοί), τα μυριάποδα (π.χ. σαρανταποδαρούσες) και τα καρκινοειδή π.χ. καβούρια, γαρίδες). Όλα τα αρθρόποδα είναι απόγονοι ενός κοινού προγόνου.

Υπάρχουν γύρω στα 1.100.000 γνωστά είδη αρθροπόδων που αποτελούν περίπου το 78% όλων των γνωστών ζωικών ειδών. Το 75% από αυτά αντιπροσωπεύονται από τα έντομα. Γενικά τα αρθρόποδα μπορούν να θεωρηθούν ως τα πλέον πετυχημένα ζώα πάνω στη γη, από την άποψη των δομικών και προσαρμοστικών κατασκευών του σώματός τους. Η ικανότητα προσαρμογής τους είναι τεράστια καθώς ζουν πάνω στην ξηρά, στον αέρα, στη θάλασσα, στα γλυκά και υφάλμυρα νερά, μέχρι 10.000 μέτρα βάθος στη θάλασσα και μέχρι 6.000 μέτρα ύψος στα βουνά. Πολλά από αυτά αποτελούν παράσιτα φυτών και ζώων. Μερικά ζουν σε οργανωμένες κοινωνίες, όπου εμφανίζεται καταμερισμός εργασίας. Ορισμένα αρθρόποδα είναι εδωδιμα (καβούρια, γαρίδες κ.α). Υπάρχουν είδη ωφέλιμα για τον άνθρωπο και άλλα επικίνδυνα, τόσο για την υγεία όσο και για τη φυτική και ζωική παραγωγή γενικότερα (Λαζαρίδου, 1992).



Εικόνα 19. Ταξινόμηση αρθρόποδων



Εικόνα 20. Κύριες ομάδες αρθροπόδων

(<http://reproductivesystem2015.weebly.com/reproductive-system-in-arthropods.html>)

### 1.5.1. Καρκινοειδή

Τα **καρκινοειδή** (Crustaceans) αποτελούν μια πολύ μεγάλη ομάδα αρθρόποδων, η οποία περιλαμβάνει ζώα όπως τα καβούρια, τους αστακούς, οι караβίδες, οι γαρίδες και τα κριλ. Μέχρι σήμερα 67.000 είδη έχουν περιγραφεί, πιθανώς όμως να υπάρχει και ένας πολλαπλάσιος από αυτόν αριθμός ειδών. Τα καρκινοειδή ποικίλουν σε μέγεθος ενώ όπως και άλλα αρθρόποδα, έχουν εξωσκελετό, ο οποίος αποβάλλεται κατά την ανάπτυξη. Διαφέρουν από άλλες ομάδες αρθρόποδων όπως τα έντομα και τα μυριάποδα από τα μέλη τους σε δύο τμήματα, και από τη μορφή των προνυμφών.

Τα καρκινοειδή, ή αλλιώς «έντομα της θάλασσας», αφθονούν στους θαλάσσιους βιοτόπους. Τα περισσότερα καρκινοειδή είναι υδρόβιοι οργανισμοί, ζώντας είτε σε θαλάσσια περιβάλλοντα είτε σε γλυκά νερά, αλλά



κάποιοι είναι χερσαίοι και άλλοι παρασιτικοί ή και προσκολλημένοι σε βράχους. Τα θαλάσσια καρκινοειδή εξαπλώθηκαν στους ωκεανούς, όπως τα έντομα στους χερσαίους βιοτόπους. Η πλειονότητα των καρκινοειδών είναι κινητοί οργανισμοί, κινούμενοι ανεξάρτητα, αν και κάποιες ταξινομικές μονάδες είναι παρασιτικές και ζουν προσκολλημένες στους ξενιστές τους, και οι ενήλικοι βαλάνοι ζουν προσκολλημένοι σε βράχους.

Άφθονα απολιθώματα έχουν βρεθεί στην Κάμβριο περίοδο, η οποία αρχίζει 544 εκατομμύρια χρόνια πριν, όπως ο Τρίωψ, ο οποίος πρακτικά παραμένει αναλλοίωτος από την Τριαδική περίοδο. Περισσότεροι από 10 εκατομμύρια τόνοι καρκινοειδών αλιεύονται ή παράγονται σε ιχθυοκαλλιέργειες για ανθρώπινη κατανάλωση, με την πλειοψηφία να είναι γαρίδες. Τα κριλ και τα κωπήποδα αποτελούν τη μεγαλύτερη βιομάζα στον πλανήτη και ζωτικό τμήμα της τροφικής αλυσίδας. Τα κριλ αποτελούν τη βάση της διατροφής στις κοινότητες ζώων στην Ανταρκτική (Hickman et al, 2011).



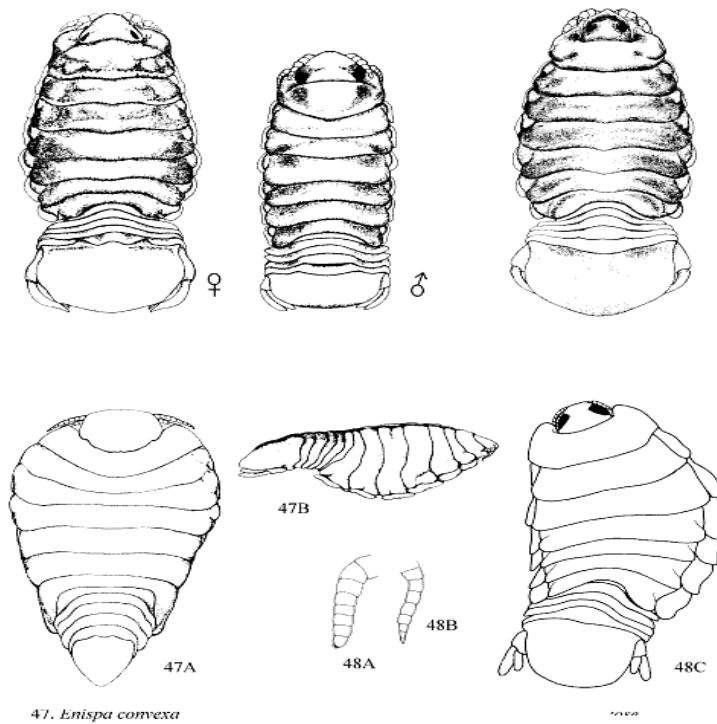
**Εικόνα 21. Τρίωψ (<http://www.scenicoregon.com/webpics2/product/triops-triops-longicaudatus-tadpole-shrimp-1/>)**

### 1.5.2. Ισόποδα

Τα **Ισόποδα** είναι αρθρόποδα (καρκινοειδή) που ζουν στη θάλασσα, είτε σε καθαρά ύδατα στη στεριά είτε στη ξηρά. Αποτελούν τα μόνα καρκινοειδή που πληθυσμός τους έχουν γίνει μόνιμα χερσαία ζώα. Τα περισσότερα είδη Ισοπόδων έχουν γκριζωπό χρώμα. Το σώμα τους αποτελείται από άκαμπτους διαδοχικούς δακτυλίους τους εξωσκελετού τους φέρουν επτά ζεύγη πόδων στο θωράκιο και πέντε ζεύγη αναπνευστικών οπών στη κοιλία. Πολλά είδη, για προστασία, έχουν την ικανότητα να σφαιροποιούνται. Τα περισσότερα Ισόποδα τρέφονται με σαθρή ύλη (νεκρά-σάπια φυτά και ζώα), ενώ λίγα είδη είναι αρπακτικά. Τέλος, μερικά είδη είναι εσωπαράσιτα και εξωπαράσιτα, κυρίως σε ψάρια ή καρκινοειδή.

Τα Ισόποδα είναι νωτοκοιλιακά πεπλατυσμένοι οργανισμοί. Περίπου 400 είδη είναι παράσιτα ιχθύων θαλάσσιων και γλυκών υδάτων. Υπάρχουν δύο κατηγορίες με εμφανείς διαφορές τόσο μορφολογικές όσο και οικολογικές.

**Τα ριπιδοφόρα (Flabellifera)**, έχουν τυπικό σχήμα ισόποδου με κεφαλικό τμήμα, επτά θωρακικά τμήματα (pateon) και έξι κοιλιακά τμήματα (pleon). Το τελευταίο κοιλιακό τμήμα είναι εκτεταμένο και φέρει δύο ζεύγη κολυμβητικών ποδών τα οποία ονομάζονται και ουροπόδια (εικόνα 22). Οι οικογένειες Aegidae, Anilocridae και Cymothoidae χαρακτηρίζονται από μια εμφανή προσαρμογή προς τον παρασιτισμό. Τα περισσότερα μέλη της πρώτης μπορεί να βρεθούν τόσο σε δείγματα νερού, όσο και στο θαλάσσιο βυθό. Μέλη των δύο άλλων οικογενειών (Anilocridae και Cymothoidae) είναι υποχρεωτικά παράσιτα. Στους ιχθείς έχουν βρεθεί εγκατεστημένα στο δέρμα ή στην στοματική κοιλότητα, της οποίας καλύπτουν το μεγαλύτερο μέρος σε πολλές περιπτώσεις. Συγκεκριμένα είδη των ριπιδοφόρων πλησιάζουν το μέγεθος των 6cm και έτσι ανήκουν στα πιο εντυπωσιακά εκτοπαράσιτα των ιχθύων. Η ποικιλομορφία και η πυκνότητα των ειδών τους αυξάνει από τις ψυχρές στις θερμές περιοχές ενώ παρασιτούν σε όλες τις ομάδες ιχθύων.



**Εικόνα 22. Isopoda. Flabellifera: 45, *Ceratothoa gaudichaudii*. 46, *Ceratothoa gilberti*. 47, *Enispa convexa*, A, whole animal in dorsal view, B, whole animal in lateral view. 48, *Mothocya rosea*, A, antenna 1, B, antenna 2, C, whole animal. (after Brusca, 1981; Bruce, 1986)**

Η δεύτερη κατηγορία Ισόποδων, τα **Γναθόμορφα (Gnathiformes)** περιλαμβάνει περίπου 500 είδη. Προνύμφες και ενήλικα αρσενικά και θηλυκά άτομα διαφέρουν εμφανώς σε σχήμα και συμπεριφορά. Μόνο η προνύμφη είναι παρασιτική. Αυτή ζει στις γαστρικές κοιλότητες των θαλάσσιων ανεμώνων και στα βράγχια ή στο δέρμα των ιχθύων. Τα ενήλικα ζουν σε σωλήνες ή σε λασπώδη βυθό όπου παράγουν μια νέα γενιά προνυμφών, η οποία μετά από μια σύντομη πλαγκτονική φάση, επιτίθεται σε νέους ξενιστές. Τα Ισόποδα που αναφέρονται στο λαβράκι είναι:

- *Nerocila orbigny*
- *Meinertia* sp
- *Ceratothoa oestroides*
- *Anilocra physoides*

(Athanassopoulou *et al.*, 2001; Christofiloyannis, 1993; Papoutsoglou *et al.*, 1996):

Γύρω στα 450 είδη Ισοπόδων είναι παράσιτα των θαλασσινών και γλυκών νερών (Horton, 2000). Τα Ισόποδα ανήκουν στην Υποκλάση των Μαλακοστράκων (Varvarigos, 2003). Το κυριότερο είδος που ενδιαφέρει τους Ελληνικές θαλάσσιες εκτροφές ιχθύων είναι το είδος *Ceratothoa oestroides*. Υπάρχουν βέβαια και άλλα Ισόποδα παράσιτα (*Flabellifera-Cymothoidae*, *Anilocridae*) που έχουν αναφερθεί ότι προσβάλουν το εκτρεφόμενα λαβράκια και τις τσιπούρες όπως *Anitocra physodes*, *Nerocila orbigny*, *Emetha audouini*.

<b>ΦΥΛΟ</b>	ARTHROPODA
<b>ΥΠΟΦΥΛΟ</b>	MANDIBULATA
<b>ΚΛΑΣΗ</b>	CRUSTACEA
<b>ΥΠΟΚΛΑΣΗ</b>	MALACOSTRACA
<b>ΥΠΕΡΤΑΞΗ</b>	PARACANIDA
<b>ΤΑΞΗ</b>	ISOPODA
<b>ΥΠΟΤΑΞΗ</b>	FLABELLIFERA
<b>ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ</b>	CYMOTHOIDAE
<b>ΓΕΝΟΣ</b>	<i>CERATOTHOA</i>
<b>ΕΙΔΟΣ</b>	<i>CERATOTHOA OESTROIDES</i>

Τα παράσιτα της οικογένειας *Cymothoidae* τρέφονται με αίμα και κατεστραμμένους ιστούς. Χρησιμοποιούν τα γναθικά τους πόδια τα οποία είναι πολύ γερά για να "σχίσουν" το δέρμα του ξενιστή και να ρουφήξουν αίμα με τη βοήθεια των μυών του οισοφάγου. Ένα αντιπηκτικό υγρό παράγεται από τους οισοφαγικούς αδένες (Romestand & Trilles, 1976; Romestand, 1979). Η εντατική εκτροφή ψαριών στις ακτές της Μεσογείου είναι ένα ιδανικό περιβάλλον που ευνοεί την παρουσία των ισοπόδων παρασίτων. Έτσι, η προσβολή της εκτρεφόμενης τσιπούρας (*Sparus aurata*), αλλά κυρίως του

λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*) από Ισόποδα, αποτελεί ένα συχνό πρόβλημα στη Μεσόγειο.

Το παράσιτο *Ceratomyxa oestroides* είναι το πιο κοινό από όλα τα Ισόποδα και προκαλεί σοβαρές θνησιμότητες στα εκτρεφόμενα ψάρια της Μεσογείου (Horton & Okamura, 2001a; Horton & Okamura, 2001b). Αποτελεί ένα από τα πιο συνηθισμένα παράσιτα της οικογένειας Cymothoidae (Vagianou *et al.*, 2006) ενώ έχει βρεθεί σε 6 διαφορετικές οικογένειες ψαριών: *Sparidae*, *Carangidae*, *Clupeidae*, *Maenidae*, *Scorpaenidae* και *Mugilidae* (Charfi-Cheikhrouha *et al.*, 2000).

Το συγκεκριμένο παράσιτο αποτελεί μεγάλη απειλή για τις εγκαταστάσεις ιχθυοκαλλιέργειας, όπου η υψηλή πυκνότητα των ψαριών παρέχει ιδανικές συνθήκες για τη μετάδοσή του. Οι επιπτώσεις στην υγεία των ψαριών είναι ιδιαίτερα σημαντικές, προκαλώντας καθυστέρηση της ανάπτυξης των ψαριών και μαζική θνησιμότητα των νεαρών ψαριών, με συνεπακόλουθη οικονομική ζημία στις ιχθυοκαλλιέργειες. Συνήθως, το παράσιτο εγκαθίσταται στην στοματική κοιλότητα του ψαριού-ξενιστή. Τα συνήθη προβλήματα που εμφανίζουν τα προσβεβλημένα ψάρια είναι απώλεια βάρους, αδράνεια, αιμορραγία στο βλέφαρο, αναπνευστική δυσχέρεια, κάψιμο στα βράγχια και εστιακή νέκρωση (Horton Okamura, 2001; Kogun , Akayli, 2004 ).

Τα παράσιτα πολλαπλασιάζονται κυρίως όταν η θερμοκρασία του νερού της θάλασσας αυξάνει κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού, με μια κορύφωση τον Ιούλιο και Αύγουστο, όπου η συχνότητα προσβολής μπορεί να υπερβεί το 50%.



**Εικόνα 23. Ceratothoa oestroides (<https://www.asturnatura.com/fotografia/fauna-invertebrados/ceratothoa-oestroides-3/22700.html>)**



**Εικόνα 23. Ceratothoa oestroides ([https://www.mindenpictures.com/search/preview/wrasse-symphodus-sp-female-guarding-nest-with-parasitic-sea-louse/0\\_00540014.html](https://www.mindenpictures.com/search/preview/wrasse-symphodus-sp-female-guarding-nest-with-parasitic-sea-louse/0_00540014.html))**

## 1.6.ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

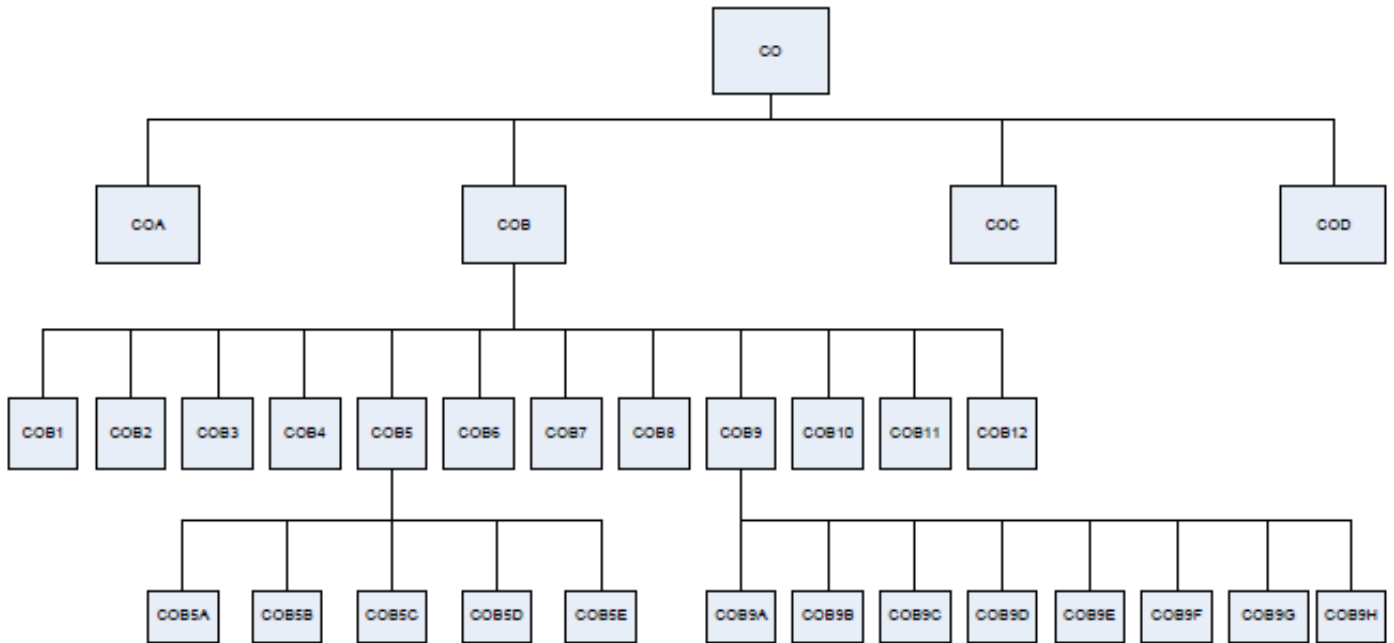
Στην παρούσα εργασία, έγινε προσπάθεια μελέτης της επουλωτικής δράσης τεσσάρων εκχυλισμάτων του θαλάσσιου αρθρόποδου *C. oestroides* ώστε να διευκρινιστούν τυχόν μηχανισμοί που μπορεί να εμπλέκονται, καθώς τα συγκεκριμένα εκχυλίσματα εμφάνισαν κάποια επουλωτική δράση σε ποντίκια. (Σοφρωνά, 2016).

Το αρθρόποδο *Ceratothoa oestroides* ανήκει στην τάξη των Ισοπόδων και πρόκειται για ένα πρωτανδρικό ερμαφρόδιτο παράσιτο σε πολλές οικογένειες ψαριών.

Τα εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο του κ. Ρούσση (Τομέας Φαρμακογνωσίας) και προέρχονται από υγρή-υγρή εκχύλιση και σειρά χρωματογραφικών διαχωρισμών, οδηγώντας στην απομόνωση και στην ταυτοποίηση μέσω ανάλυσης των φασματοσκοπικών τους δεδομένων (NMR, MS) ενός αριθμού μεταβολιτών, κυρίως λιπαρών οξέων και υδατανθράκων.

Πιο συγκεκριμένα, δείγμα του οργανισμού λυοφιλοποιήθηκε και στη συνέχεια ο ξηρός οργανισμός υποβλήθηκε σε εξαντλητική εκχύλιση αρχικά με MeOH 100%, ύστερα με μίγμα MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> αναλογίας 1:1 και τέλος με CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100%. Μετά τη συνένωση των εκχυλισμάτων και τη συμπύκνωση τους υπό κενό προέκυψε υπόλειμμα πορτοκαλί χρώματος και ελαιώδους υφής. Η συνολική πορεία απομόνωσης των δευτερογενών μεταβολιτών από το αρχικό εκχύλισμα του οργανισμού *C. oestroides* παρουσιάζεται διαγραμματικά στο ακόλουθο σχήμα (Σοφρωνά, 2016).





Τα εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία παρελήφθησαν από το εργαστήριο Κυτταρικού πολλαπλασιασμού & Γήρανσης του ινστιτούτου ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος επισημασμένα με συγκεκριμένους κωδικούς που χαρακτηρίζουν το κάθε εκχύλισμα. Οι κωδικοί καθώς και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για την παραλαβή τους με εκχύλιση αναφέρονται παρακάτω:

**COD → H<sub>2</sub>O**

**COB → CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>**

**COB5C-2 → CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 70:30 cHex:EtOAc και εν συνεχεία 70:30 H<sub>2</sub>O:MeOH**

**OIL → ελαϊκό οξύ**

Οι συγκεκριμένοι κωδικοί χρησιμοποιήθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων στις κυτταροκαλλιέργειες και χαρακτηρίζουν τα εκχυλίσματα στο πειραματικό μέρος της εργασίας που ακολουθεί παρακάτω.



## ***ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ***

---

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1. ΟΡΓΑΝΑ

Κατά τη διάρκεια της διεξαγωγής των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω όργανα:

- Εστία νηματικής ροής Safeflow 1.8 από την Bioair Instruments (Siziano, Italy).
- Δεξαμενές υγρού αζώτου Dewar LS750 από την Lab Systems (Taylor Wharton, USA).
- Επωαστικός κλίβανος CO<sub>2</sub> Thermo Forma Series II (Ohio, USA).
- Σωματιδιακός αναλυτής Beckman Coulter Counter, Beckman (USA)
- Shaker Multi Microplate - Genie από την Scientific Industries (NY, USA)
- Shaker Titramax 1000 από την Heidolph (Germany)
- Φυγόκεντρος SANYO HARRIER 18180 Refrigerated από την MSE (UK)
- Liquid Scintillation Analyzer TRI- CARB 2100 TR Packard από την PerkinElmer (USA)

## 2.2. ΥΛΙΚΑ

Κατά τη διάρκεια της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υλικά:

- Θρεπτικό υλικό DMEM (Dulbeco's Minimal Essential Medium), αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη, L- γλουταμίνη και πυροσταφυλικό και διττανθρακικό νάτριο. (Biochrom AG, Berlin, Germany)
- Εμβρυικός βόειος ορός της Gibco BRL (Paisley, UK)
- Οι πλάκες κυτταροκαλλιεργειών πολλαπλών θέσεων από την Greiner (Hanover, Germany)
- Χρωστική 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) από τη Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
- Ισοπροπανόλη από τη MERCK (Damstadt, Germany)
- Διμέθυλο-σουλφοξειδίο (DMSO) από τη Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
- Δοξορουβικίνη από την PCH PHARMACHEMIE (Netherlands)
- Τριχλωροοξικό οξύ από την Panreac (Barcelona, Spain)
- Scintillation Liquid από τη MERCK (Kenilworth, U.S.A.)
- Platelet-derived Growth Factor–BB (PDGF-BB) από την Peprotech (Rocky Hill, USA)
- Transforming Growth Factor-  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) από την Peprotech (Rocky Hill, USA)
- ( methyl-  $^3\text{H}$ ) thymidine από την GE Healthcare (UK)
- (2,3,4,5- $^3\text{H}$ )L- Proline από τη Moravek Biochemicals (California, USA)
- Bovine Serum Albumin από τη Genaxis Biotechnology (Germany)

- Collagenase από τη Sigma Aldrich (St. Louis, USA).
- Εκχυλίσματα του θαλάσσιου οργανισμού *C. oestroides*  
Τα εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν παρελήφθησαν από το εργαστήριο του κ. Ρούσση και προήλθαν από εκχύλιση στους ακόλουθους διαλύτες:

**COD → H<sub>2</sub>O**

**COB → CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>**

**COB5C-2 → CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 70:30 cHex:EtOAc και εν συνεχεία 70:30**

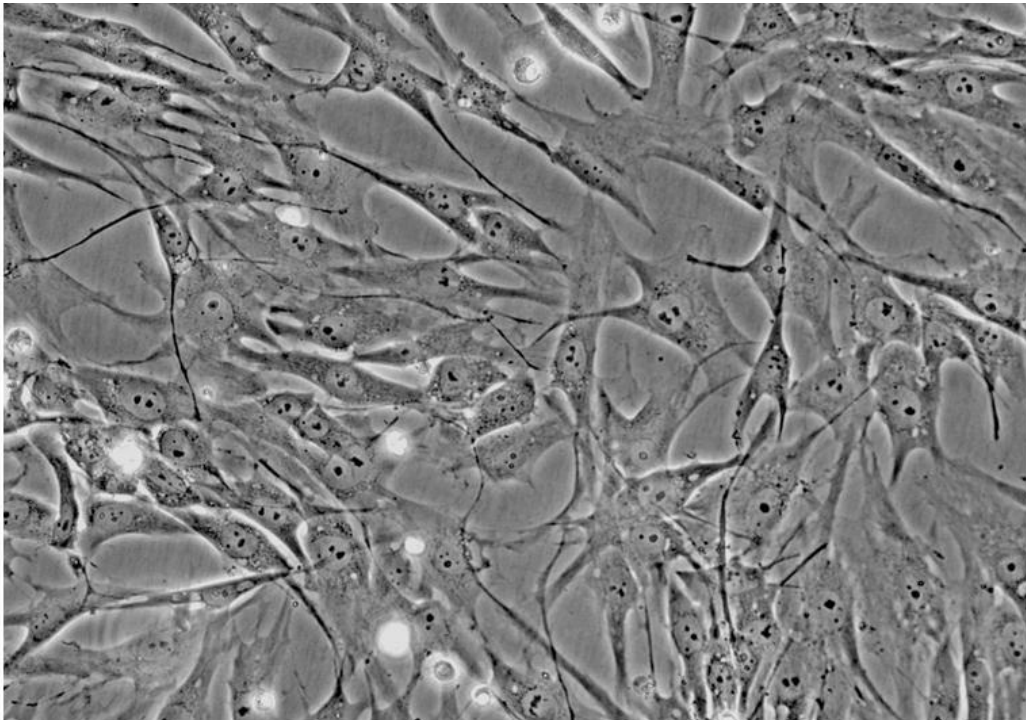
**H<sub>2</sub>O:MeOH**

**OIL → ελαϊκό οξύ**

## 2.3. ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

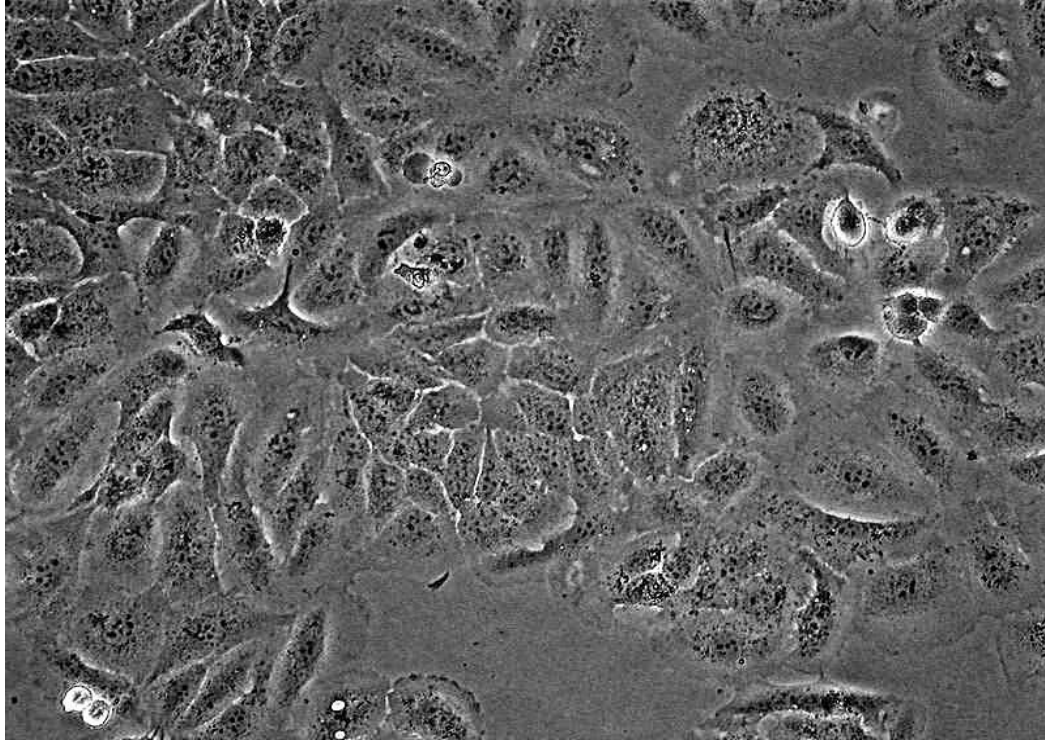
Κατά τα πειράματα της παρούσας ερευνητικής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν οι εξής κυτταρικές σειρές:

- Το εμπορικά διαθέσιμο στέλεχος δερματικών ινοβλαστών από νεογνό, AG01523c από το Corriell Institute for Medical Research (Camden, NJ, USA). Το συγκεκριμένο κυτταρικό στέλεχος σχηματίζει μονοστιβάδα στενά συνδεδεμένων κυττάρων, έχει μεγάλη πολλαπλασιαστική ικανότητα κι έχει τη δυνατότητα συμπλήρωσης 60 περίπου αναδιπλασιασμών του κυτταρικού πληθυσμού (**Cell Population Doublings - CPDs**).



<https://www.sciencellonline.com/products-services/stem-cells/human-dermal-fibroblasts-fetal-mitomycin-c-treated.html>

- Η κυτταρική σειρά HaCaT, αθανατοποιημένα ανθρώπινα κερατινοκύτταρα τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως στη μελέτη της ομοιόστασης και της παθοφυσιολογίας του δέρματος.



<http://www.addexbio.com/attachment/File59.jpg>

## 2.4. ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.4.1. Αποστείρωση

Η αποστείρωση είναι μια διαδικασία απόλυτα απαραίτητη σε ένα εργαστήριο όπου διεξάγονται πειράματα σε κύτταρα. Όλα τα χρησιμοποιούμενα υλικά πρέπει να αποστειρώνονται επιμελώς για την αποφυγή μολύνσεων που μπορεί να προκληθούν από βακτήρια ή μύκητες. Οι μέθοδοι αποστείρωσης που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται αναλυτικά παρακάτω:

1) Οι πιπέτες Pasteur, οι γυάλινες πιπέτες και τα μεταλλικά σκεύη σε κλίβανο ξηρής αποστείρωσης ( 180°C επί 90 λεπτά).

2) Τα γυάλινα δοχεία με πλαστικό πώμα, τα πλαστικά δοχεία, τα φίλτρα αποστείρωσης και οι συσκευές διήθησης σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης (120°C για 15 λεπτά).

3) Το νερό που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή θρεπτικού υλικού DMEM καθώς και για την παρασκευή ρυθμιστικών διαλυμάτων όπως PBS, σε κλίβανο αποστείρωσης με γυάλινα δοχεία με πλαστικό πώμα (121°C για 30 λεπτά).

4) Τα θερμοευαίσθητα διαλύματα με διήθηση μέσω αποστειρωμένων φίλτρων νιτρικής κυτταρίνης με διάμετρο πόρων 0,22mm.

## 2.4.2. Καλλιέργεια κυττάρων

Η ανάπτυξη των κυττάρων γίνεται σε:

- θρεπτικό υλικό DMEM εμπλουτισμένο με L-γλουταμίνη (2mM)
- NaHCO<sub>3</sub> (3,75mg/L)
- πυροσταφυλικό νάτριο (110,04mg/L)
- πενικιλίνη (10,000IU/L)
- στρεπτομυκίνη (10,000μg/L).

Οι καλλιέργειες αναπτύσσονται σε θερμοστατούμενο κλίβανο, σε ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub>, 95% υγρασία και θερμοκρασία 37°C. Για τις καλλιέργειες χρησιμοποιούνται φιάλες επιφάνειας 25 cm<sup>2</sup> και πλαστικά τρυβλία επιφάνειας 50cm<sup>2</sup>. Για την ανάπτυξη των ινοβλαστών απαιτείται DMEM εμπλουτισμένο με εμβρυϊκό βόειο ορό (fetal bovine serum-FBS) 15% (v/v), έως ότου καλύψουν το 100% της επιφάνειας του πυθμένα του τρυβλίου, σχηματίζοντας μια μονοστιβάδα. Όταν συμβεί αυτό τα κύτταρα ανακαλλιεργούνται ως εξής:

- Αναρρόφηση του θρεπτικού υλικού και προσθήκη 3,5ml διαλύματος θρυψίνης-κιτρικού νατρίου (θρυψίνη 0,25 % (w/v), κιτρικό νάτριο 10mM, NaCl 110mM, pH 7,2). Έτσι απομακρύνονται τυχόν υπολείμματα ορού που περιέχουν αναστολέα θρυψίνης. Στη συνέχεια η θρυψίνη αναρροφάται και προστίθεται 4 ml διαλύματος θρυψίνης- κιτρικού νατρίου έως ότου η κυτταρική μονοστοιβάδα να καλυφθεί πλήρως.
- Επώαση για περίπου 1 λεπτό στους 37°C μέχρι να διαπιστωθεί μικροσκοπικά η εξής μορφολογική αλλαγή: τα κύτταρα συρρικνώνονται ελαφρώς και το περίγραμμα της κυτταρικής τους μεμβράνης γίνεται εντονότερο.
- Αφαίρεση περίσσειας θρυψίνης- κιτρικού νατρίου και επώαση για λίγα λεπτά ακόμα στους 37°C μέχρι να αρχίσει η αποκόλληση των κυτάρων από τον πυθμένα του τρυβλίου.
- Η αποκόλληση των κυττάρων ολοκληρώνεται με ελαφριά χτυπήματα του τρυβλίου.



- Ακολουθεί προσθήκη 8 mL θρεπτικού υλικού DMEM εμπλουτισμένο με 15% FBS και εναιώρηση των κυττάρων με ήπιες επαναλαμβανόμενες αναρροφήσεις
- Τέλος, το εναιώρημα των κυττάρων μοιράζεται ισομερώς σε αποστειρωμένα τρυβλία με λόγο κατανομής (split ratio) 1:2 και αφήνονται για επώαση στους 37°C μέχρι την επόμενη ανακαλλιέργεια.

### 2.4.3. Απόψυξη των κυττάρων-Αρχείο γενεών

Το στέλεχος των ανθρώπινων ινοβλαστών που χρησιμοποιήθηκαν σ' αυτήν την εργασία έχει πεπερασμένο εύρος ζωής. Κατά την ανακαλλιέργεια, η συμπληρωμένη μονοστιβάδα κατανέμεται σε λόγο κατανομής 1:2 και τα κύτταρα αναπτύσσονται έως ότου επανασχηματίσουν νέα μονοστιβάδα. Επομένως, ο αριθμός ανακαλλιεργειών που υφίσταται μια καλλιέργεια συμπίπτει με το ρυθμό αναδιπλασιασμού του κυτταρικού πληθυσμού (Cell Population Doublings-CPDs).

Τα αθανатоποιημένα κερατινοκύτταρα HaCaT που χρησιμοποιήθηκαν δεν έχουν πεπερασμένο εύρος ζωής και πολλαπλασιάζονται με πολύ γρήγορο ρυθμό.

Σύμφωνα με τους Hayflick και Moorhead, τα διάφορα κυτταρικά στελέχη μπορούν να ψυχθούν στους -196°C για μεγάλο χρονικό διάστημα και, αφού αποψυχθούν και επανέλθουν στους 37°C, να ανακαλλιεργηθούν και να διατηρήσουν στο ακέραιο τις ιδιότητες τους. Επίσης, έχουν τη δυνατότητα να συμπληρώσουν τον αριθμό γενεών που θα συμπλήρωναν αν δεν μεσολαβούσε η ψύξη/απόψυξη. Φυλάσσοντας τα κύτταρα σε τέτοιες συνθήκες, εξασφαλίζεται η μέγιστη βιωσιμότητα τους κατά την απόψυξη τους και την ανακαλλιέργειά τους.

Στην παρούσα εργασία, ανθρώπινοι δερματικοί ινοβλάστες χρησιμοποιήθηκαν σε ποικίλες κυτταρικές γενεές, μετά από αποθήκευση σε θερμοκρασία -196°C εντός υγρού αζώτου. Σε κάθε περίπτωση, τα κύτταρα βρίσκονταν στο πρώτο ήμισυ του συνολικού εύρους αναδιπλασιασμών που μπορούν να επιτελέσουν.

Η διαδικασία αποθήκευσης έχει ως εξής: Κύτταρα τα οποία έχουν καλλιεργηθεί σε τρυβλία 50cm<sup>2</sup> και τα οποία βρίσκονται στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης (οπότε ο μεταβολισμός τους είναι πιο έντονος), αποκολλώνται από τον πυθμένα. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οποιαδήποτε υπολείμματα θρυψίνης πρέπει να απομακρυνθούν πλήρως κατά την επώαση στους 37°C, αφού αυτά μπορεί να οδηγήσουν σε καταστροφή των κυττάρων κατά την απόψυξη. Όταν τα κύτταρα αποκολληθούν από τον πυθμένα, εναιωρούνται σε 2ml DMEM εμπλουτισμένο με 20% (v/v) FBS και 10% (v/v) διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO). Ο ρόλος του DMSO είναι να προστατεύει τα κύτταρα από τις βλάβες που προκαλεί η ψύξη/απόψυξη. Συγκεκριμένα, το DMSO σε συνδυασμό με τη βαθμιαία ψύξη (βλ. κατωτέρω) μειώνει σημαντικά τη δημιουργία κρυστάλλων πάγου. Τέλος, το αιώρημα των κυττάρων προστίθεται σε αποστειρωμένη πλαστική αμπούλα, η οποία κλείνεται ερμητικά. Μια άλλη σημαντική παράμετρος της διαδικασίας αυτής είναι η ταχύτητα ψύξης/απόψυξης. Προκειμένου τα κύτταρα να προστατευτούν περαιτέρω από τις βλαβερές συνέπειες της ψύξης, πρέπει η ψύξη να είναι σταδιακή: 1hr στους -20°C, η οποία ακολουθείται από 24hrs στους -80°C και τέλος βύθιση της αμπούλας εντός δεξαμενών υγρού αζώτου.

Όσον αφορά την απόψυξη, πρέπει να είναι ταχεία ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία κρυστάλλων, περνώντας γρήγορα από την περιοχή -50°C έως 0°C, όπου πιστεύεται ότι προκαλούνται οι περισσότερες καταστροφές. Συνεπώς, η αμπούλα με τα κύτταρα τοποθετείται απευθείας από το υγρό άζωτο σε υδατόλουτρο 37°C. Αφού αποψυχθεί η αμπούλα, το περιεχόμενό της προστίθεται σε τρυβλίο 50cm<sup>2</sup> που ήδη περιέχει 10ml DMEM εμπλουτισμένο με FBS 15% (v/v). Αφού ολοκληρωθεί η προσκόλληση των κυττάρων, την επόμενη μέρα, το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας, το οποίο περιέχει DMSO, αντικαθίσταται με νέο και τα κύτταρα αναπτύσσονται κανονικά.

#### **2.4.4. Μέτρηση ολικού αριθμού κυττάρων**

Η μέτρηση του ολικού αριθμού των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με δύο μεθόδους:

- 1. Με χρήση κυτταρομετρητή Coulter Counter**
- 2. Με χρήση αιμοκυττομέτρου Neubauer**

##### **2.4.4.1. Μέτρηση αριθμού κυττάρων με χρήση αιμοκυττομέτρου Neubauer**

Για τη μέτρηση κυττάρων με την τεχνική Neubauer ακολουθείται η εξής διαδικασία:

Αρχικά, γίνεται αποκόλληση των ινοβλαστών με διάλυμα θρυψίνης- κιτρικού νατρίου και έπειτα εναιώρηση σε θρεπτικό υλικό DMEM εμπλουτισμένο με 15% FBS. Μια σταγόνα από το κυτταρικό εναιώρημα καλύπτει τα τέσσερα τεταρτημόρια του αιμοκυττομέτρου και έπειτα ακολουθεί καταμέτρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο.

#### **2.4.4.2. Μέτρηση αριθμού κυττάρων με κυτταρομετρητή Coulter Counter**

Η μέτρηση του ολικού αριθμού κυττάρων σε εναιώρημα πραγματοποιήθηκε με σωματιδιακό αναλυτή Coulter Counter (Beckman Coulter Z1).

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

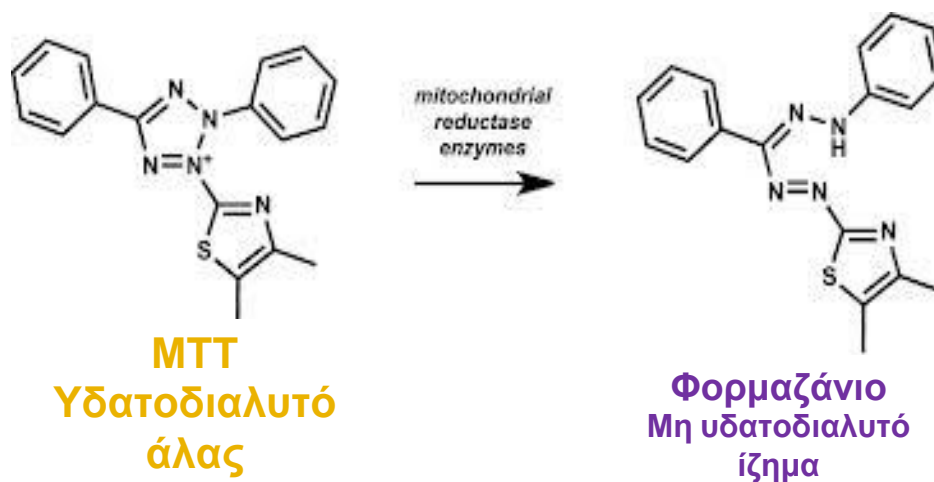
Αρχικά, γίνεται αποκόλληση των κυττάρων με διάλυμα θρυψίνης- κιτρικού νατρίου και έπειτα εναιώρηση σε θρεπτικό υλικό DMEM εμπλουτισμένο με την κατάλληλη για κάθε κυτταρικό στέλεχος συγκέντρωση FBS (15% για δερματικούς ινοβλάστες, 10% για HaCaT). Στη συνέχεια, ακολουθεί προσθήκη 0,5ml εναιωρήματος σε 12ml ισότονου αλατούχου διαλύματος IsoFlow Sheath Fluid και στη συνέχεια μέτρηση στο σωματιδιακό αναλυτή.

Με τη συγκεκριμένη τεχνική, γίνεται ο υπολογισμός του συνολικού αριθμού κυττάρων που υπάρχουν στην κυτταροκαλλιέργεια. Το βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η ταχύτητα των μετρήσεων ενώ το μειονέκτημα της είναι πως δεν επιτρέπει το διαχωρισμό μεταξύ ζωντανών και νεκρών κυττάρων.

## 2.4.5. Προσδιορισμός βιωσιμότητας κυττάρων μέσω της δοκιμασίας MTT

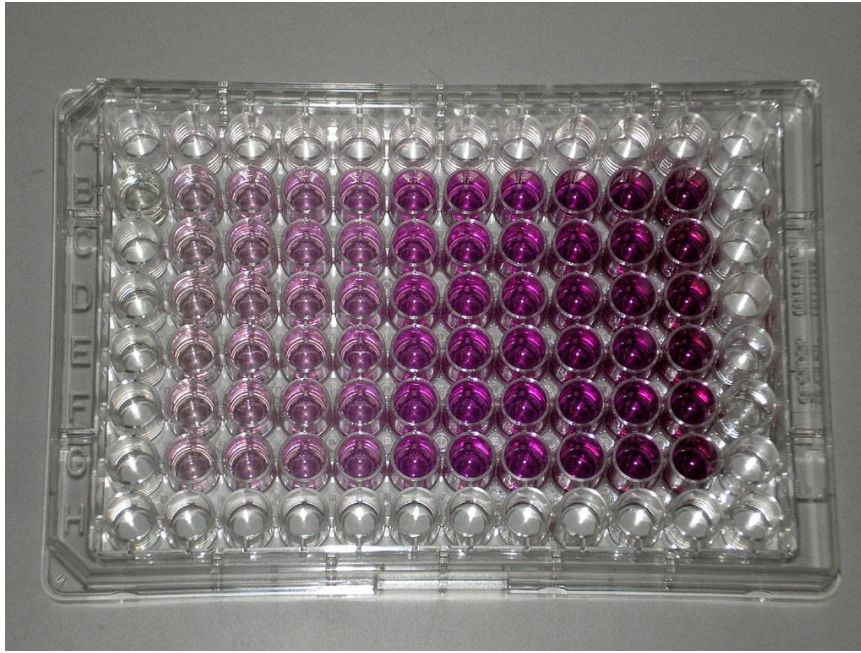
Το MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl Blue) είναι ένα υδατοδιαλυτό άλας το οποίο μετατρέπεται σε αδιάλυτο μωβ φορμαζάνιο λόγω της διάσπασης του δακτυλίου του τετραζολίου από τις αφυδρογονάσεις των μιτοχονδρίων.

Αυτό συμβαίνει στο εσωτερικό των ζωντανών και μόνο κυττάρων, σχηματίζοντας κρυστάλλους ορατούς ακόμα και μικροσκοπικά.



Ακολουθεί διάλυση του αδιάλυτου στο νερό φορμαζανίου σε κάποιο οργανικό διαλύτη όπως ισοπροπανόλη, διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) κ.α. και η φασματοφωτομετρική μέτρησή του. Η μετρούμενη απορρόφηση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της παραγόμενης χρωστικής.

Έτσι, μπορεί να γίνει προσδιορισμός της επίδρασης κάποιου παράγοντα στην βιωσιμότητα και τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων και τελικά αποτίμηση της κυτταροστατικότητας ή/και της κυτταροτοξικότητάς του.



Συγκεκριμένα η διαδικασία έχει ως εξής:

- Επίστρωση κυττάρων σε τρυβλία 96 θέσεων σε υλικό με 15% FBS
- Επώαση για 3 ημέρες στους 37°C & 5% CO<sub>2</sub>
- Αλλαγή υλικού σε 0,1% FBS
- Επώαση για 2 ημέρες στους 37°C & 5% CO<sub>2</sub>
- Προσθήκη των υπό μελέτη εκχυλισμάτων
- Επώαση για 3 ημέρες στους 37°C & 5% CO<sub>2</sub>
- Προσθήκη διαλύματος MTT
- Επώαση για 3,5 ώρες στους 37°C & 5% CO<sub>2</sub>
- Προσθήκη ισοπροπανόλης για τη διαλυτοποίηση κρυστάλλων φορμαζάνιου
- Μέτρηση απορρόφησης στα 550nm και μήκος κύματος αναφοράς 630nm.

Ακριβώς η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τα κύτταρα HaCaT με τη διαφορά ότι το αρχικό θρεπτικό υλικό περιείχε 10% FBS.

## **2.4.6. Μελέτη πολλαπλασιασμού κυττάρων – Ποσοτικός προσδιορισμός σύνθεσης DNA με τη μέθοδο τριτωμένης θυμιδίνης**

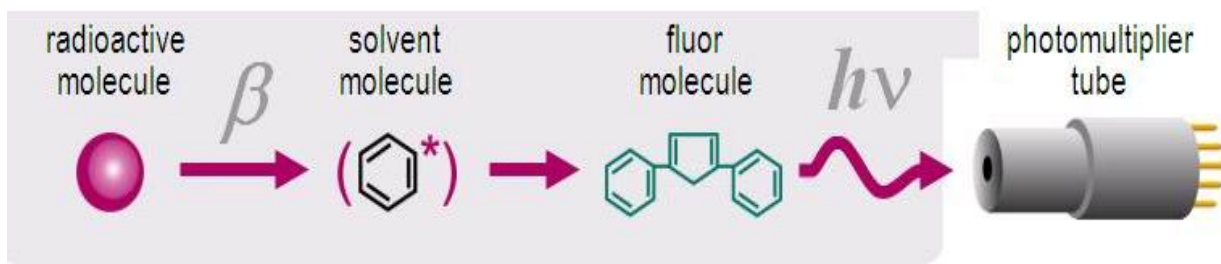
### Αντιδραστήρια:

- Φωσφορικό διάλυμα PBS
- Διάλυμα μονιμοποίησης 10% (w/v) τριχλωροξικού οξέος (TCA)
- Διάλυμα λύσης 0,3N NaOH -1% (w/v) SDS, 1% Triton X-100
- Διάλυμα σπινθηρισμού : 0,4 % (w/v) PPO, 0.1% (w/v) POPOP σε διάλυμα τολουολίου: Triton X-100 σε αναλογία (2:1).

### **Παρακάτω γίνεται ανάλυση του μηχανισμού της μέτρησης β ακτινοβολίας με τη μέθοδο του υγρού σπινθηρισμού**

Για την μέτρηση της ακτινοβολίας -β πολύ μικρής ενέργειας η πλέον κατάλληλη τεχνική είναι ο υγρός σπινθηρισμός (liquid scintillation).

Οι υγροί σπινθηριστές ανακαλύφθηκαν ανεξάρτητα από τους Kallman και Reynolds το 1950. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στο φαινόμενο του παραγόμενου φθορισμού λόγω διέγερσης μιας φθορίζουσας ένωσης όταν δεχθεί ιοντίζουσες ακτινοβολίες. Η φθορίζουσα ουσία, μαζί με το δείγμα διαλύονται σε οργανικό διαλύτη. Ακολουθεί πρόσπτωση των παραγόμενων φωτονίων στην φωτοκάθοδο και με ένα σύστημα φωτοπολλαπλασιαστών και φωτοκαθόδων παράγουν δευτερογενή ηλεκτρόνια. Τα φωτοηλεκτρόνια που παράγονται με ένα σύστημα επιταχυντών (dynode) θετικά φορτισμένων επιταχύνονται και παράγουν σειρά φωτοηλεκτρονίων όπως φαίνεται στο σχήμα.

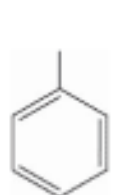


Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας σπινθηρισμού ([www.perkinelmer.com](http://www.perkinelmer.com))

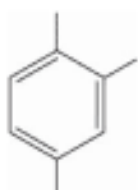
Ένα φωτοηλεκτρόνιο μπορεί να εκπέμψει δευτερογενή ηλεκτρόνια και το ρεύμα να πολλαπλασιασθεί κατά ένα παράγοντα της τάξεως  $10^6$  μέχρι  $10^9$ .

Το υγρό σπινθηρισμού απορροφά την ενέργεια που εκπέμπεται από τα ραδιοϊσότοπα και τα επανεκπέμπει σε μορφή φωτός. Για να συμβεί αυτό, το υγρό σπινθηρισμού πρέπει να περιέχει δύο βασικά συστατικά, τον διαλύτη και τις φθορίζουσες ουσίες. Τα μόρια του διαλύτη απορροφούν τη β ακτινοβολία. Η ενέργεια αυτή περνάει μέσα από τα μόρια του διαλύτη μέχρι να φτάσει σε μια φθορίζουσα ένωση, η οποία την απορροφά, διεγείρεται και εκπέμπει φως.

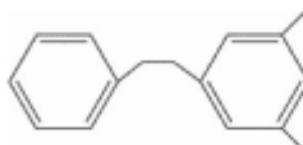
Έχει αποδειχθεί ότι οι καλύτεροι διαλύτες για το υγρό σπινθηρισμού είναι οργανικές αρωματικές ενώσεις. Ο πιο κοινός διαλύτης είναι το τολουόλιο. Το π νέφος ενός αρωματικού δακτυλίου αποτελεί έναν πολύ καλό στόχο β-αλληλεπίδρασης.



Toluene

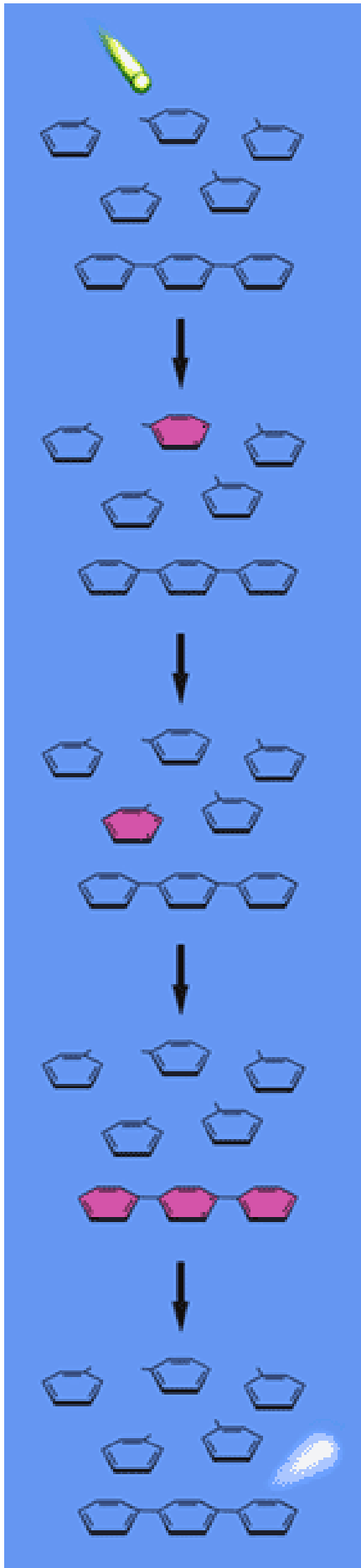


Pseudocumene



PXE (phenyl xylylene)


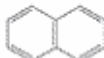


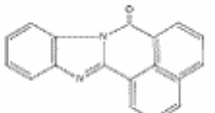


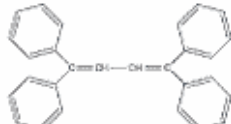




Οι φθορίζουσες ενώσεις χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: στους πρωτογενείς και τους δευτερογενείς σπινθηριστές. Οι πρωτογενείς σπινθηριστές αποτελούν το 0.3-1% του συνολικού όγκου και είναι αυτοί που μετατρέπουν την παγιδευμένη ενέργεια σε εκπομπή φωτός.

Οι δευτερογενείς σπινθηριστές απορροφούν την ενέργεια φθορισμού των πρωτογενών σπινθηριστών και τη μετατρέπουν σε ενέργεια μεγαλύτερου μήκους κύματος.

Οι πιο κοινά σπινθηριστές είναι το PPO ως πρωτογενής και το Bis-MSB ως δευτερογενής. Παρακάτω παρουσιάζονται οι συχνότερα χρησιμοποιούμενοι σπινθηριστές:

Primary Scintillators		
Scintillator	Structure	Emission Wavelength
<b>Butyl PBD</b> 2-[4-biphenyl]-5-[4-tert-butyl-phenyl]-1,3,4-oxadiazole Order No. SFC-20		363nm
<b>Naphthalene</b> Order No. SFC-40		322nm
<b>PPO</b> 2,5-diphenyloxazole Order No. SFC-10		357nm
<b>p-Terphenyl</b> Order No. SFC-50		340nm
Secondary Scintillators		
<b>BBQ</b> (7H-benzimidazo[2,1-e]benz[de]isoquinoline-7-one) Order No. SFC-13		477nm
<b>Bis-MSB</b> (1,4-bis[2-methylstyryl]-benzene) Order No. SFC-90		420nm
<b>POPOP</b> (1,4-bis[5-phenyloxazol-2-yl]benzene) Order No. SFC-60		410nm
<b>TPB</b> (1,1,4,4-tetraphenyl-1,3-butadiene) Order No. SFC-15		455nm

Ο ρυθμός σύνθεσης DNA αποτελεί μια αναγκαία συνθήκη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της σύνθεσης DNA πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της τριτιωμένης θυμιδίνης ( $^3\text{H}$ - TdR).

Τα κύτταρα επωάζονται σε θρεπτικό μέσο με 15% FBS μέχρι να γίνουν πλήρεις (confluent). Στη συνέχεια, γίνεται αλλαγή του υλικού με 0,1% FBS για 48 ώρες και έπειτα αντικατάσταση του υλικού με νέο που περιέχει τις υπό εξέταση ουσίες και τη σημασμένη με τρίτιο θυμιδίνη. Ακολουθεί επώαση για 48 ώρες στους 37 °C, οπότε η τριτιωμένη θυμιδίνη ενσωματώνεται στο νεοσυντιθέμενο DNA. Έπειτα, πραγματοποιείται λύση των κυττάρων και μέτρηση της ραδιενεργού θυμιδίνης με τη μέθοδο του υγρού σπινθηρισμού (scintillation counting).

Η μέθοδος που επιλέχθηκε αποτελεί τροποποίηση αυτής των Heldin et al. (1987). Πιο αναλυτικά, όταν τα κύτταρα συγχρονιστούν στη φάση  $G_0$  του κυτταρικού κύκλου λόγω απουσίας ορού, γίνεται αντικατάσταση του θρεπτικού μέσου με νέο που περιέχει τις υπό εξέταση ουσίες μαζί με 0,1  $\mu\text{Ci/ml}$   $^3\text{H}$ -TdR ειδικής ενεργότητας 25 Ci/mmol. Μετά από επώαση 48 ωρών, το θρεπτικό υλικό μαζί με την τριτιωμένη θυμιδίνη που δεν ενσωματώθηκε απορρίπτεται, ακολουθεί έκπλυση με PBS και προσθήκη διαλύματος TCA 10% (v/v) θερμοκρασίας 4 °C. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επωάζονται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και εκπλένονται με  $\text{H}_2\text{O}$  ώστε να απομακρυνθεί όλη η ποσότητα TCA το οποίο αποτελεί ισχυρό παράγοντα σβέσεως του υγρού σπινθηρισμού. Έπειτα, τα κύτταρα λύνονται με επώαση σε διάλυμα 1% (w/v) SDS/ 0,3 N NaOH σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου μία ώρα υπό συνεχή ανάδευση.

Το λύμα μεταφέρεται σε φιαλίδιο σπινθηρισμού μαζί με υγρό σπινθηρισμού, το οποίο αποτελείται από :

- PPO 5.5g
- POPOP 0.1g
- Τολουόλιο 633ml
- Triton X-100 330ml

Ακολουθεί έντονη ανάδευση, ώστε να έρθουν σε επαφή οι δύο φάσεις. Ο όγκος του υδατικού διαλύματος στον οποίο λύνονται τα κύτταρα πρέπει να είναι μικρότερος από το 1/10 του όγκου του υγρού σπινθηρισμού ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία γαλακτώματος που αλλοιώνει τη μέτρηση. Τέλος, ακολουθεί μέτρηση της ενσωμάτωσης της τριτωμένης θυμιδίνης με μετρητή β- ακτινοβολίας.

## 2.4.7. Μελέτη της διέγερσης παραγωγής κολλαγόνου – Ποσοτικός προσδιορισμός σύνθεσης κολλαγόνου με τη μέθοδο τριτωμένης προλίνης

### Αντιδραστήρια:

1. L-[5-<sup>3</sup>H] Proline 5mCi/5ml, 23Ci/mmol
2. Sodium Ascorbate
3. β-amino propionitrile (βAPN)
4. BSA
5. Tris-HCl 50mM pH 7.2 / NaCl 110mM
6. TCA
7. NEM (N-ethyl-maleimide)
8. NaOH 0.2N, HCl 0.3N, Hepes 1M
9. Protease-free Collagenase
10. Tris-HCl 50mM pH 7.2 / CaCl<sub>2</sub> 10mM
11. TCA 10% / tannic acid 0.5%
12. Διάλυμα σπινθηρισμού : 0,4 % (w/v) PPO, 0.1% (w/v) POPOP σε διάλυμα τολουολίου: Triton X-100 σε αναλογία (2:1).

Ο ποσοτικός προσδιορισμός σύνθεσης κολλαγόνου βασίζεται στη μέθοδο της ελεύθερης πρωτεασών κολλαγόνασης (protease-free collagenase method) που προτάθηκε το 1971 από τους Peterkofsky & Diegelmann. Ανθρώπινοι δερματικοί ινοβλάστες επιστρώνονται σε 48-wells (15.000 cells/ well) σε υλικό με 15% FBS. Μετά από 24 ώρες (τα κύτταρα έχουν περίπου 90% πυκνότητα) γίνεται αλλαγή του υλικού με 0,2% FBS. Στη συνέχεια, το θρεπτικό υλικό αφαιρείται και τα κύτταρα επωάζονται για 72 ώρες σε μέσο που περιέχει 5μCi/ml L-[5-<sup>3</sup>H] Proline (126 mCi/mmol), β- αμινοπροπιονιτρίλιο (βAPN; 50 μg/ml) και ασκορβικό οξύ (50 μg/ml), καθώς και τους υπό εξέταση παράγοντες ή μάρτυρες. Το υπερκείμενο συλλέγεται και οι πρωτεΐνες κατακρημνίζονται με τριχλωροοξικό οξύ (TCA, τελική συγκέντρωση 10%). Το

ίζημα επαναδιαλύεται σε NaOH (0.2 M) και στη συνέχεια γίνεται προσθήκη HCl 0.3N + Hepes (ρυθμιστικό διάλυμα) 1M για εξουδετέρωση και 12μl NEM (N-ethyl-maleimide) σε τελική συγκέντρωση 2,5mM για αναστολή πρωτεασών, και ειδικά της κλοστριπαΐνης, μίας πρωτεάσης που ενίοτε επιμολύνει ακόμη και την «καθαρή» από προσμείξεις πρωτεασών κολλαγονάση.

Έπειτα, γίνεται επιμερισμός σε δύο ίσα τμήματα. Στο πρώτο τμήμα προστίθεται κολλαγονάση διαλυμένη σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 50mM pH 7.2 / CaCl<sub>2</sub> 10mM (5.7μl stock solution ανά δείγμα, stock 1U/μl), ενώ στο δεύτερο τμήμα χωρίς το ένζυμο. Ακολουθεί επώαση στους 37<sup>0</sup>C για 2 ώρες και σε θερμοκρασία δωματίου (25<sup>0</sup>C) για 18 ώρες. Στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη TCA 10% / tannic acid 0.5%, τα δείγματα φυγοκεντρούνται και τα υπερκείμενα συλλέγονται και μετράται η ακτινοβολία τους στον β - Counter. Οι «καθαρές» κρούσεις προκύπτουν μετά την αφαίρεση των τιμών των δειγμάτων χωρίς κολλαγονάση από τις τιμές των δειγμάτων με κολλαγονάση.

#### **2.4.8. Δοκιμασία κυτταρικής μετανάστευσης μετά από τομή (Scratch assay)**

Σε πλάκες καλλιέργειας 24 θέσεων (24-well plates) τοποθετούμε ειδικά ενθέματα σιλικόνης και ενοφθαλμίζουμε τα κύτταρα HaCaT σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS. Ο στόχος είναι να γεμίσει παντού το τρυβλίο, εκτός από τα σημεία που έχει προσκολληθεί το ένθεμα.

Όταν οι καλλιέργειες είναι πλήρεις (confluent), τις υποβάλουμε σε 48ωρη στέρηση FBS. Κατόπιν γίνεται προσεκτική αποκόλληση των ενθεμάτων, ώστε να μην συμπαρασυρθούν και τα κύτταρα, ακολουθούν τρεις εκπλύσεις με υλικό χωρίς FBS και προσθήκη των προς έλεγχο υλικών. Ο μάρτυρας (control) είναι θρεπτικό υλικό με 0.1% FBS. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής: COB & COB5C-2 1 μg/ml, COD 25 μg/ml και oil 50 μg/ml και όλα σε θρεπτικό υλικό με 0.1% FBS.

#### **2.4.8. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων**

Όλα τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων. Τα γραφήματα προκύπτουν από τους μέσους όρους των αποτελεσμάτων κάθε δείγματος  $\pm$  την τυπική απόκλιση (standard deviation). Οι διαφορές θεωρούνται στατιστικά σημαντικές όταν  $p < 0,05$  (Student's t test).

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επουλωτική δράση των εκχυλισμάτων του θαλάσσιου αρθρόποδου *Ceratothoa Oestroides*.

Τα κλάσματα παρελήφθησαν από τον τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων της Φαρμακευτικής Σχολής του ΕΚΠΑ ( Καθ. Β. Ρούσσης). Τα κλάσματα αυτά προήλθαν από διαδοχικές εκχυλίσεις του *C. Ostreoides* με διαφορετικούς διαλύτες και αποτελούν μέρος της διπλωματικής εργασίας της Ε. Σοφρωνά (Σοφρωνά, 2016). Έτσι, το καθένα από αυτά περιέχει ένα μίγμα ενώσεων παρόμοιας διαλυτότητας. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για την παραλαβή των εκχυλισμάτων αναφέρονται παρακάτω:

**COD → H<sub>2</sub>O**

**COB → CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>**

**COB5C-2 → CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 70:30 cHex:EtOAc και εν συνεχεία 70:30 H<sub>2</sub>O:MeOH**

**OIL → ελαϊκό οξύ**

Πραγματοποιήθηκε μελέτη των εκχυλισμάτων ως προς:

- την κυτταροτοξικότητα σε ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες (εμπορικά διαθέσιμο κυτταρικό στέλεχος AG01523c) και αθανатоποιημένα κερατινοκύτταρα HaCaT
- τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες (AG01523c)
- τη διέγερση παραγωγής κολλαγόνου σε ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες (AG01523c)
- τη διέγερση της κυτταρικής μετανάστευσης σε αθανатоποιημένα κερατινοκύτταρα HaCaT



### 3.1. Προσδιορισμός βιωσιμότητας κυττάρων μέσω της δοκιμασίας MTT

Για να μελετηθεί η δράση των κλασμάτων των εκχυλισμάτων του θαλάσσιου αρθρόποδου *Ceratothoa Ostreoides*, ήταν απαραίτητο να προηγηθεί ο προσδιορισμός της κυτταροτοξικότητάς τους. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος MTT η οποία εφαρμόστηκε τόσο σε ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες όσο και σε αθανατοποιημένα κερατινοκύτταρα HaCaT. Τα κλάσματα αραιώθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM με 0,1% ορό και προστέθηκαν σε πλάκες καλλιέργειών 96 θέσεων, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Ως μάρτυρας αναφοράς (control) χρησιμοποιήθηκε το διμεθυλο-σουλφοξείδιο (DMSO), στις ίδιες συγκεντρώσεις με αυτές των κλασμάτων, το οποίο ήταν ο αρχικός τους διαλύτης ενώ σαν θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η δοξορουβικίνη. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στα πρώτα πειράματα ήταν οι εξής:

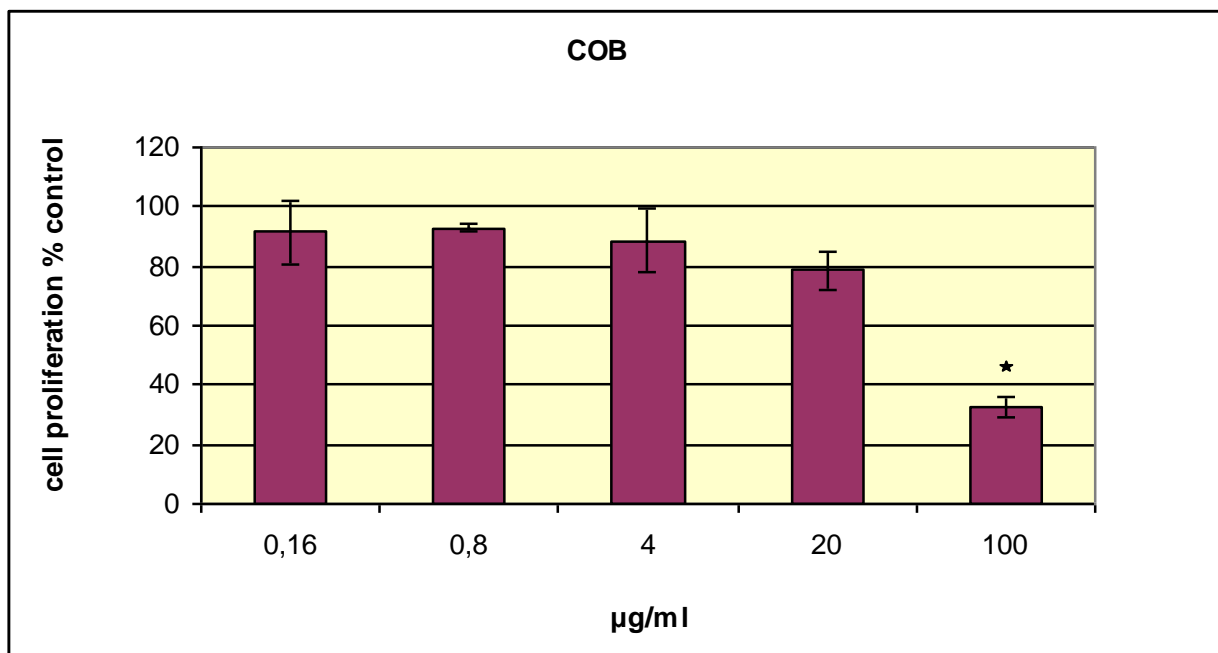
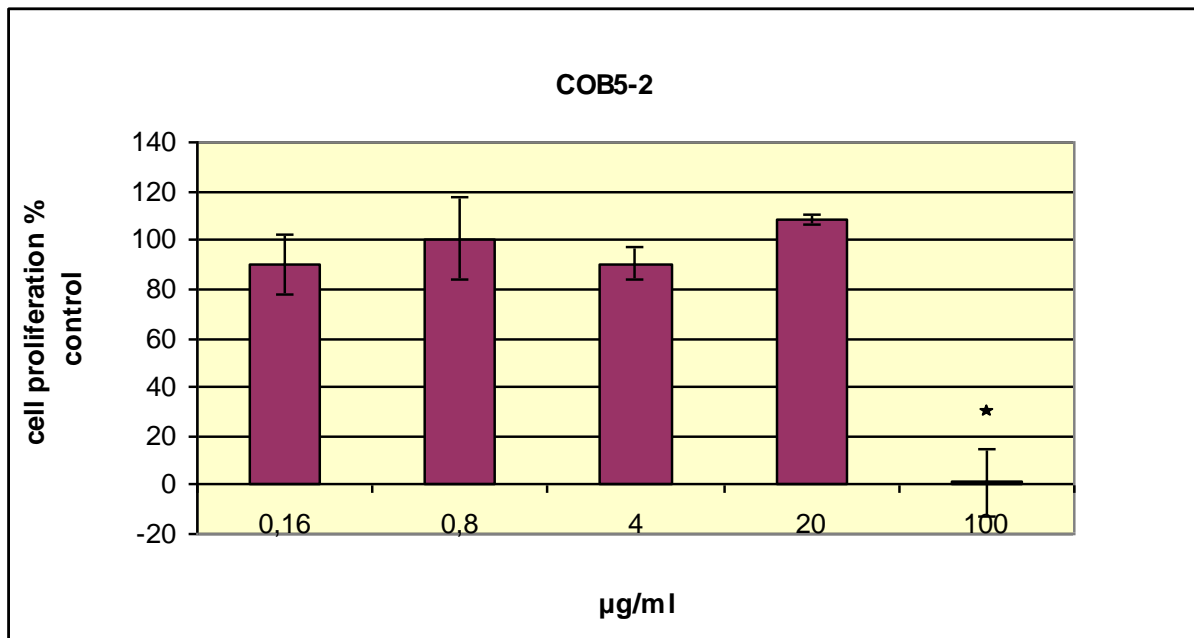
- 0.16 µg/ml
- 0.8 µg/ml
- 4 µg/ml
- 20 µg/ml
- 100 µg/ml

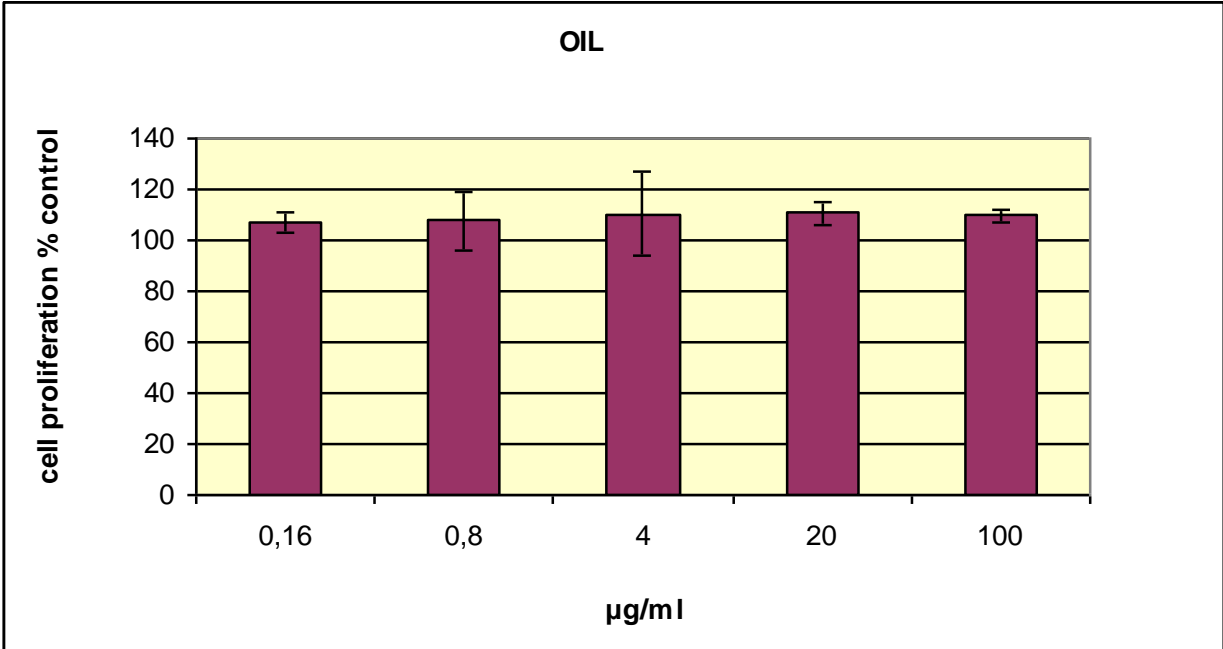
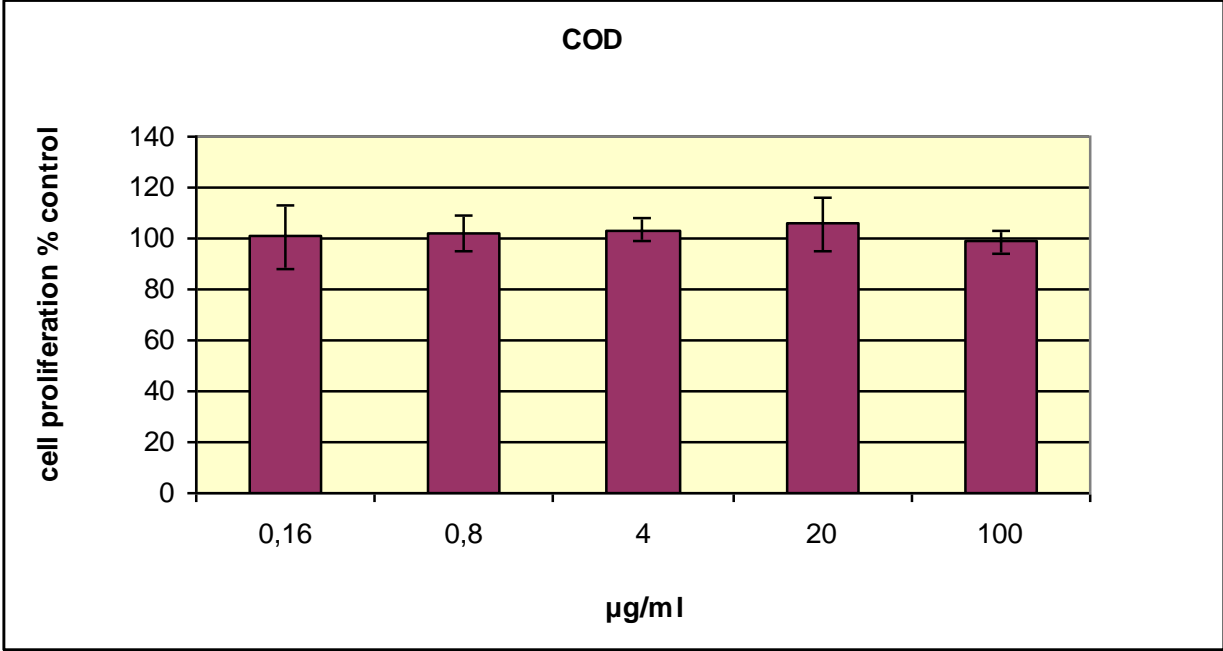
Οι τιμές αυτές επιλέχθηκαν ώστε να εξετασθεί ένα σχετικά μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων, ενώ ταυτόχρονα η ποσότητα του DMSO που θα προστεθεί στα κύτταρα, να μην ξεπερνά το 2%, συγκέντρωση που είναι γνωστό από παλαιότερες μελέτες ότι δεν εμφανίζει κυτταροτοξικότητα στους συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους.

Στη συνέχεια, υπολογίστηκε η επί τοις 100 βιωσιμότητα ως προς το μάρτυρα και κατασκευάστηκαν διαγράμματα βιωσιμότητας συναρτήσεως της συγκέντρωσης.

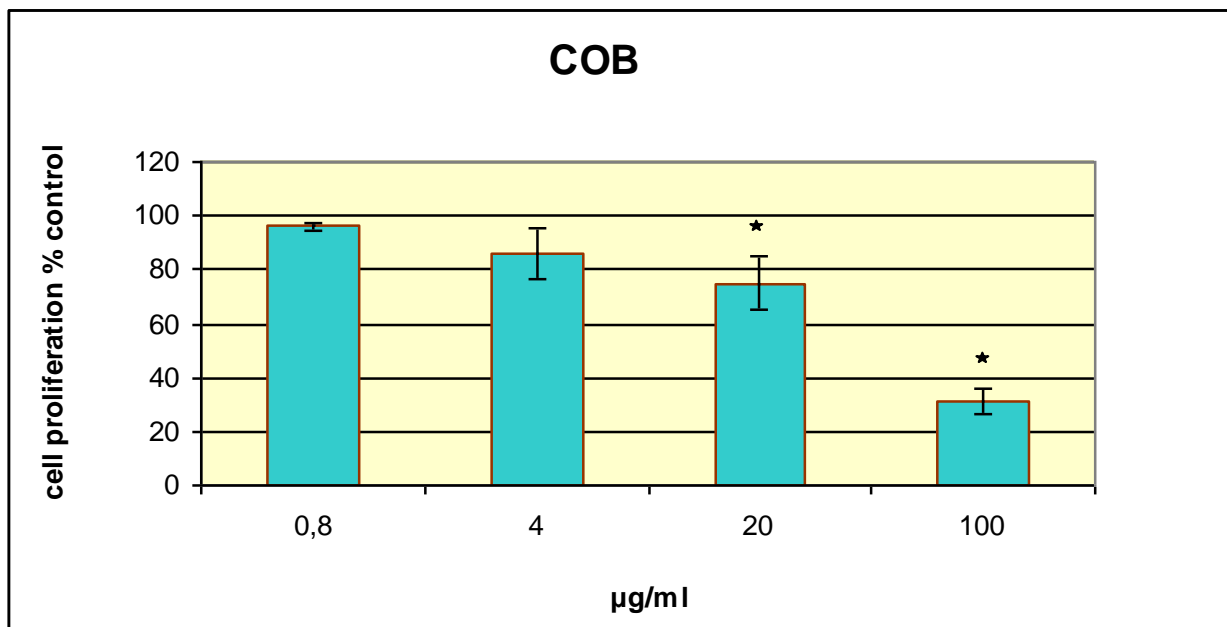
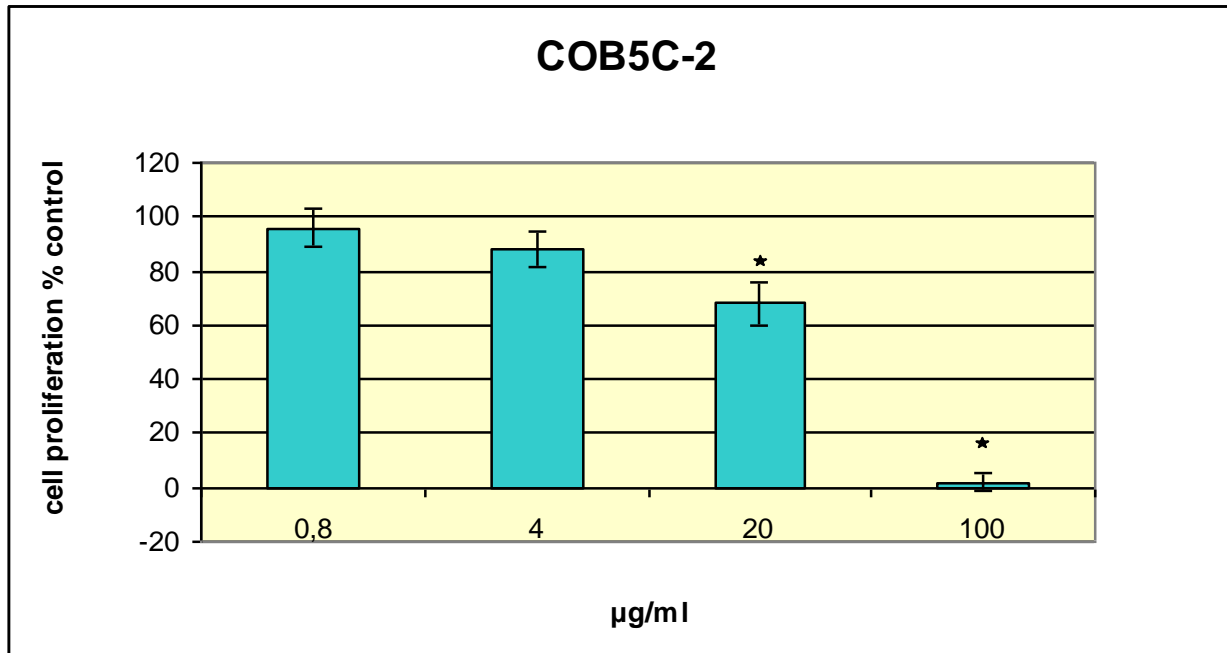
Παρακάτω παρατίθενται τα διαγράμματα βιωσιμότητας για καθένα από τα εκχυλίσματα ξεχωριστά για πειράματα που πραγματοποιήθηκαν τόσο σε ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες όσο και σε αθανατοποιημένα κερατινοκύτταρα HaCaT υπό την επίδραση των μελετούμενων εκχυλισμάτων.

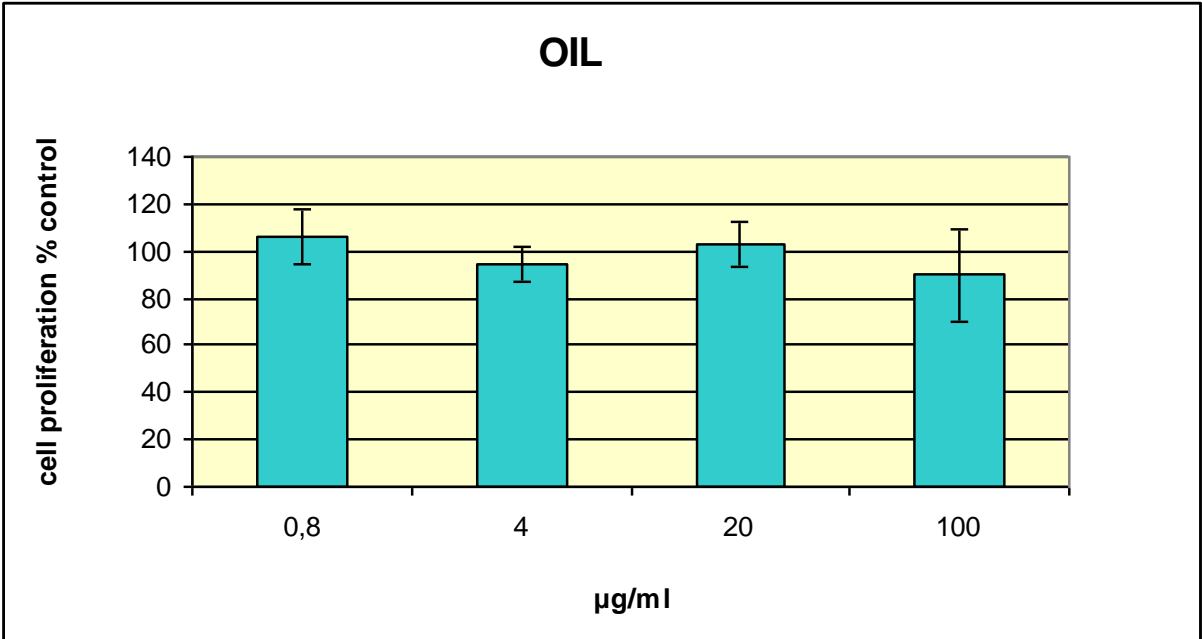
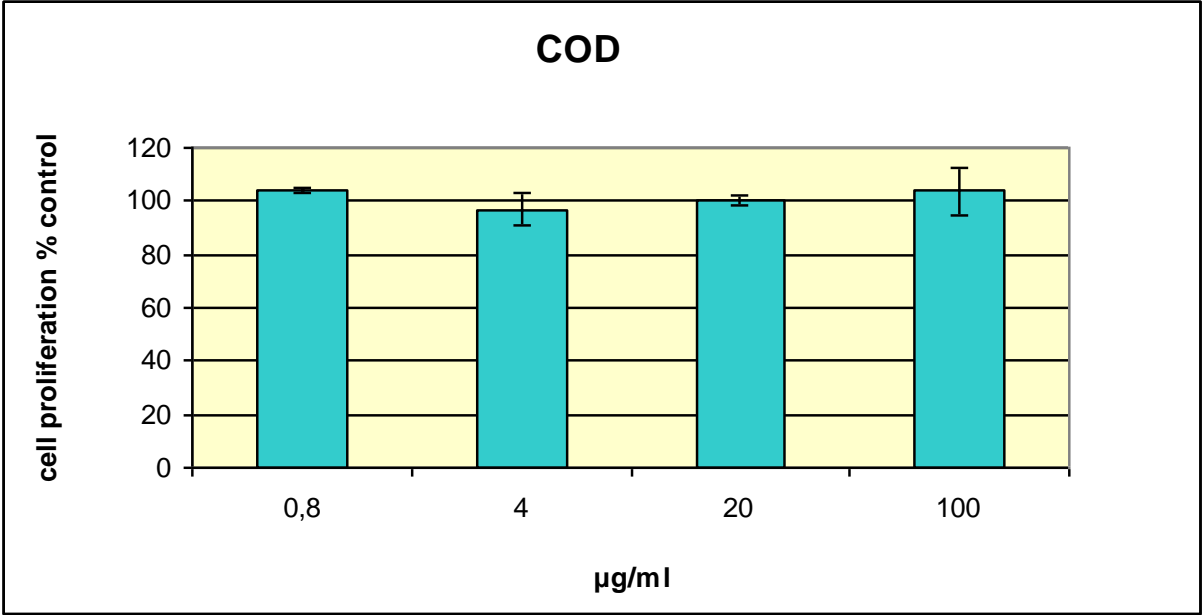
Έλεγχος κυτταροτοξικότητας: Πειράματα σε ανθρώπινους  
δερματικούς ινοβλάστες:





Έλεγχος κυτταροτοξικότητας: Πειράματα σε αθανατοποιημένα κερατινοκύττατα HaCaT:





Συγκρίνοντας τα διαγράμματα από τα αποτελέσματα των πειραμάτων σε ινοβλάστες και HaCaT, παρατηρούμε ότι τα εκχυλίσματα COB & COB5C-2 εμφανίζουν κυτταροτοξικότητα αυξανόμενης της συγκέντρωσης και στις δύο κυτταρικές σειρές ενώ για τα εκχυλίσματα COD & OIL δεν παρατηρείται καμία κυτταροτοξική δράση. Με βάση τα αποτελέσματα της μεθόδου κυτταροτοξικότητας MTT έγινε επιλογή της μέγιστης μη κυτταροτοξικής συγκέντρωσης για τη συνέχεια των πειραμάτων.

### **3.2. Μελέτη πολλαπλασιασμού κυττάρων – Ποσοτικός προσδιορισμός σύνθεσης DNA με τη μέθοδο τριτιωμένης θυμιδίνης**

Για τη ποσοτικοποίηση της διεγερτικής δράσης των εκχυλισμάτων *C. Oestroides* στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό χρησιμοποιήθηκε ο προσδιορισμός της σύνθεσης DNA μέσω της ενσωμάτωσης [<sup>3</sup>H] – θυμιδίνης. (κεφ ...). Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες. Τα κλάσματα αραιώθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM με 0,1% ορό και προστέθηκαν σε πλάκες καλλιέργειών 48 θέσεων, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Ως μάρτυρας αναφοράς (control) χρησιμοποιήθηκε το διμεθυλο-σουλφοξειδίο (DMSO), στις ίδιες συγκεντρώσεις με αυτές των κλασμάτων, δεδομένου ότι ήταν ο αρχικός τους διαλύτης ενώ σαν θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ο PDGF, του οποίου η διεγερτική του δράση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό είναι γνωστή. Επομένως, όλα τα αποτελέσματα είναι αξιόπιστα μόνο εάν ο PDGF έχει διεγείρει τη σύνθεση DNA. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ήταν αρχικά οι μέγιστες μη κυτταροτοξικές σύμφωνα με τη μέθοδο MTT ενώ στη συνέχεια των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν και χαμηλότερες συγκεντρώσεις των

εκχυλισμάτων με σκοπό να βρεθεί η βέλτιστη συγκέντρωση για κάθε εκχύλισμα.

Οι συγκεντρώσεις που εφαρμόστηκαν στους ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες για κάθε εκχύλισμα ήταν οι εξής:

**COB5C-2: 0.5, 1, 4, 5, 20 µg/ml**

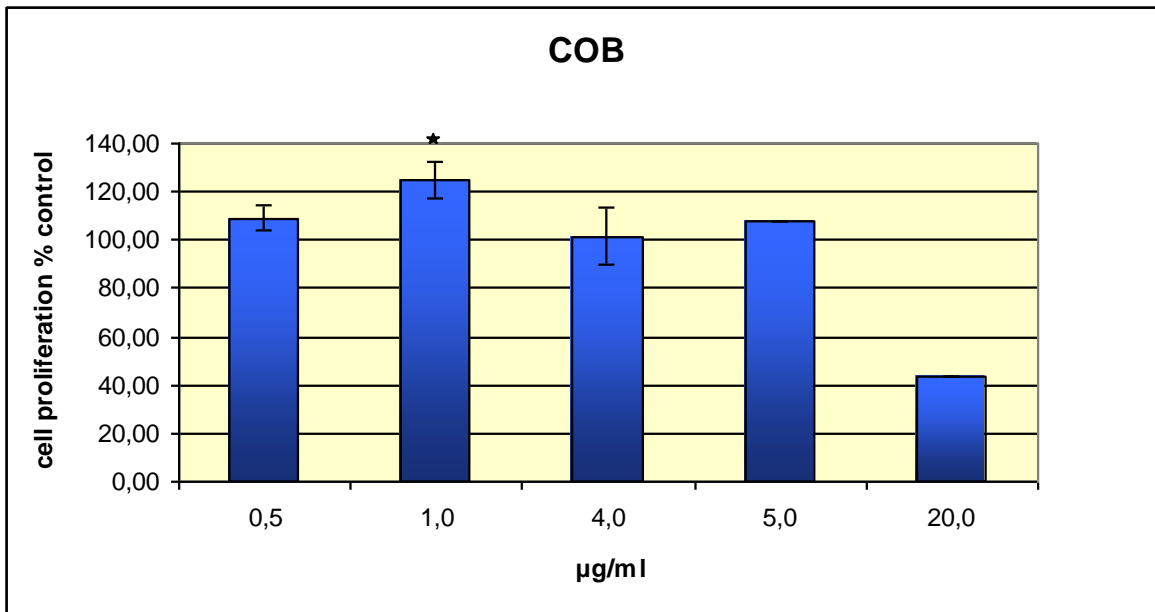
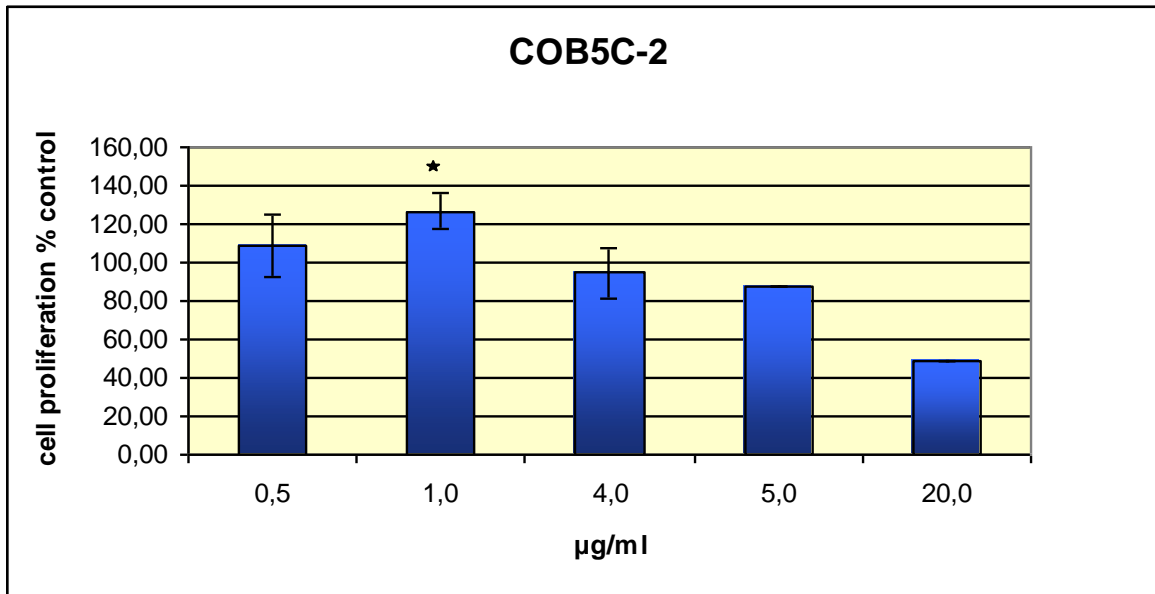
**COB: 0.5, 1, 4, 5, 20 µg/ml**

**COD: 25, 50, 100 µg/ml**

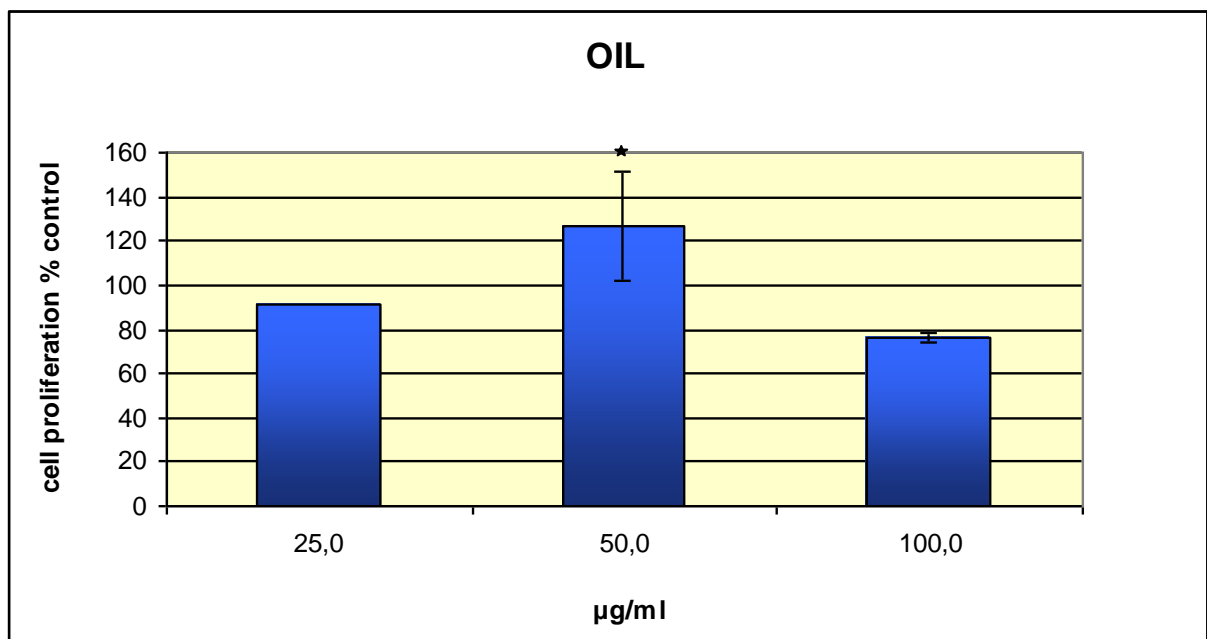
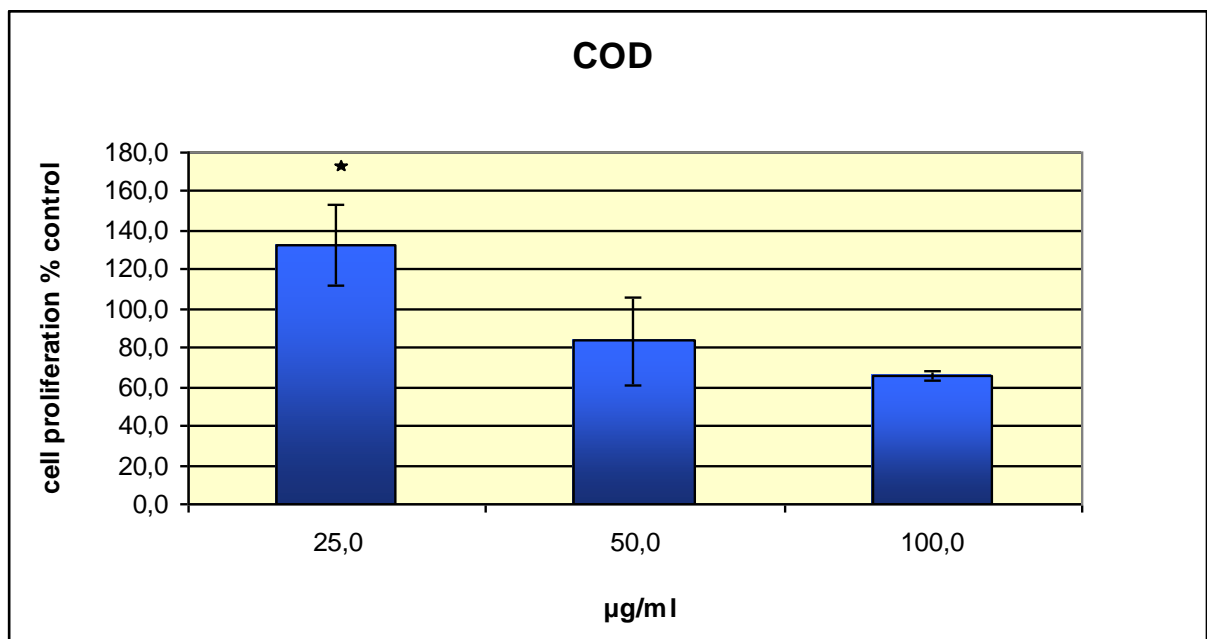
**OIL: 25, 50, 100 µg/ml**

Στη συνέχεια, υπολογίστηκε η επί τοις 100 βιωσιμότητα ως προς το μάρτυρα και κατασκευάστηκαν διαγράμματα βιωσιμότητας συναρτήσει της συγκέντρωσης.

Παρακάτω παρατίθενται τα διαγράμματα βιωσιμότητας για καθένα από τα εκχυλίσματα ξεχωριστά για πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στους ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες υπό την επίδραση των μελετούμενων εκχυλισμάτων.







Σύμφωνα με τα παραπάνω διαγράμματα εντοπίστηκε η βέλτιστη συγκέντρωση που διεγείρει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό για κάθε εκχύλισμα. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται όλες οι συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη του κυτταρικού

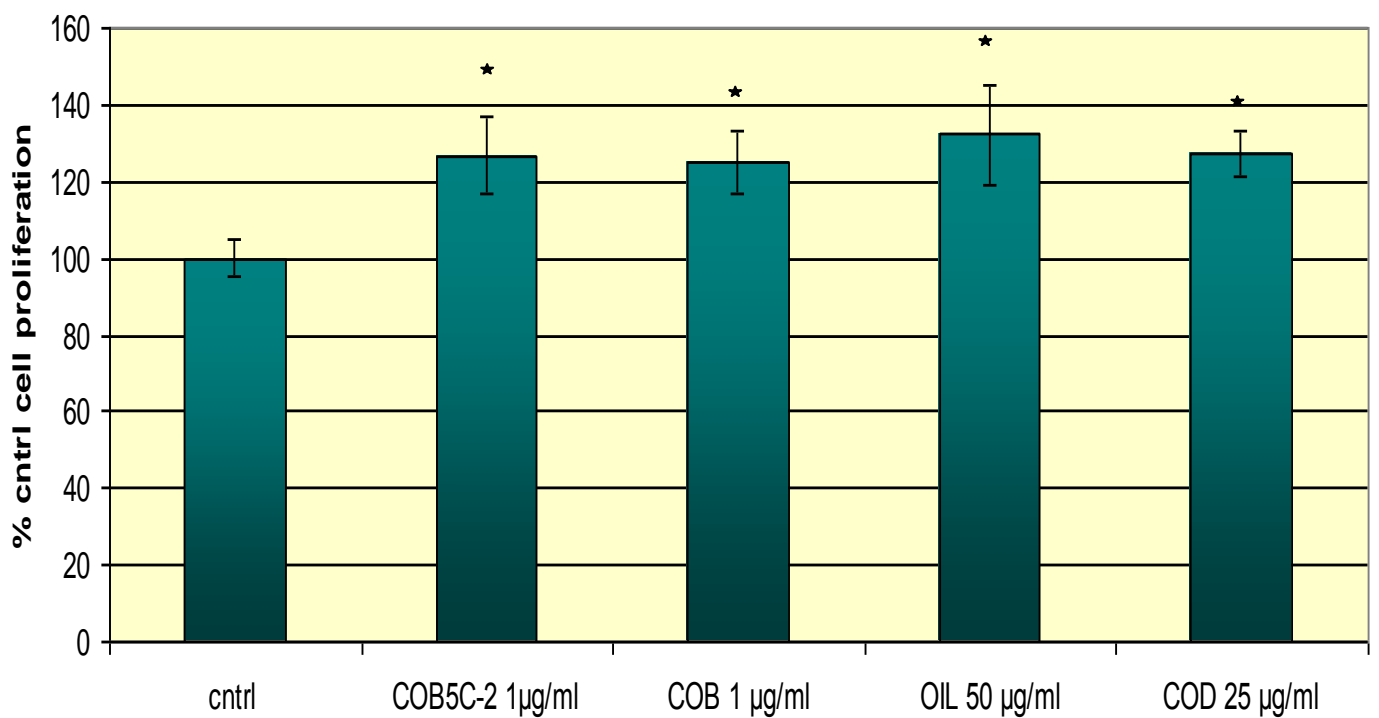
πολλαπλασιασμού και η επί τοις εκατό διεγερτική τους ικανότητα ως προς το μάρτυρα. Έχουν επισημανθεί οι βέλτιστες συγκεντρώσεις για κάθε εκχυλίσμα.

<b>Εκχυλίσματα C. Ostreoides</b>	<b>% του μάρτυρα</b>	<b>% τυπική απόκλιση</b>	<b>Ttest</b>
COB5C-2 0,5 µg/ml	108,7	15,8	0,45320
<b>1 µg/ml</b>	<b>126,7</b>	9,6	<b>0,00316</b>
4 µg/ml	94,4	13,5	0,65870
5 µg/ml	87,3		
20 µg/ml	48,3		
COB 0,5 µg/ml	109,0	5,0	0,56230
<b>1 µg/ml</b>	<b>124,9</b>	8,0	<b>0,00254</b>
4 µg/ml	101,6	11,7	0,65450
5 µg/ml	108,3		
20 µg/ml	43,3		
<b>COD 25 µg/ml</b>	<b>132,2</b>	20,6	<b>0,00156</b>
50 µg/ml	83,7	22,3	0,21540
100 µg/ml	65,9	2,4	0,00440
OIL 25 µg/ml	91,7		
<b>50 µg/ml</b>	<b>127,1</b>	24,6	<b>0,00322</b>
100 µg/ml	76,4	2,0	0,00145

Από τα παραπάνω αποτελέσματα μελέτης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού φαίνεται πως όλα τα εκχυλίσματα του θαλάσσιου αρθρόποδου C. Ostreoides εμφανίζουν μικρή αλλά στατιστικά σημαντική διεγερτική δράση στις βέλτιστες συγκεντρώσεις τους, ενώ στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν αναστέλλουν τη σύνθεση DNA.

Παρακάτω, παρατίθεται το διάγραμμα που περιλαμβάνει τις τιμές της διεγερτικής δράσης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των βέλτιστων συγκεντρώσεων των μελετώμενων εκχυλισμάτων.

### DNA Synthesis



Οι συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων που προκαλούν τη μεγαλύτερη διέγερση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της σύνθεσης κολλαγόνου, όπως θα αναφερθεί αμέσως μετά.

### **3.3. Μελέτη της διέγερσης παραγωγής κολλαγόνου – Ποσοτικός προσδιορισμός σύνθεσης κολλαγόνου με τη μέθοδο τριτιωμένης προλίνης**

Για τη ποσοτικοποίηση της διεγερτικής δράσης των εκχυλισμάτων *C. Ostreoides* στην παραγωγή κολλαγόνου χρησιμοποιήθηκε ο προσδιορισμός της σύνθεσης κολλαγόνου μέσω της ενσωμάτωσης [<sup>3</sup>H] – προλίνης (κεφ 2.4.7). Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες.

Η αύξηση της σύνθεσης κολλαγόνου από τους δερματικούς ινοβλάστες επιταχύνει τη διαδικασία της επούλωσης. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, κατά την επούλωση, στη φάση του πολλαπλασιασμού, οι ινοβλάστες προσελκύονται στην περιοχή του τραύματος και παράγουν μεγάλες ποσότητες γλυκοζαμινογλυκανών (υαλουρονικό οξύ, θειική δερματάνη, θειική χονδροϊτίνη), κολλαγόνου (κυρίως τύπου III) και ελαστίνης. Έτσι, η μελέτη της διέγερσης της παραγωγής κολλαγόνου από τα εκχυλίσματα βοηθάει στην καλύτερη κατανόηση της πιθανής δράσης τους κατά τη διαδικασία της επούλωσης.

Τα κλάσματα αραιώθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM με 0,2% ορό και προστέθηκαν σε πλάκες καλλιέργειών 48 θέσεων. Ως μάρτυρας αναφοράς (control) χρησιμοποιήθηκε το διμεθυλο-σουλφοξείδιο (DMSO), στις ίδιες συγκεντρώσεις με αυτές των κλασμάτων, το οποίο ήταν ο αρχικός τους διαλύτης ενώ σαν θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ο αυξητικός παράγοντας TGF-β. Ο TGF-β χρησιμοποιείται καθώς είναι γνωστή η διεγερτική του δράση επί της παραγωγής μορίων εξωκυττάριας μήτρας και ιδιαίτερα κολλαγόνου. Επομένως, όλα τα αποτελέσματα είναι αξιόπιστα μόνο εάν ο TGF-β έχει διεγείρει τη σύνθεση κολλαγόνου.

Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ήταν, όπως προαναφέρθηκε, οι βέλτιστες συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων που προήλθαν από τα πειράματα μελέτης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και οι οποίες είναι οι εξής:

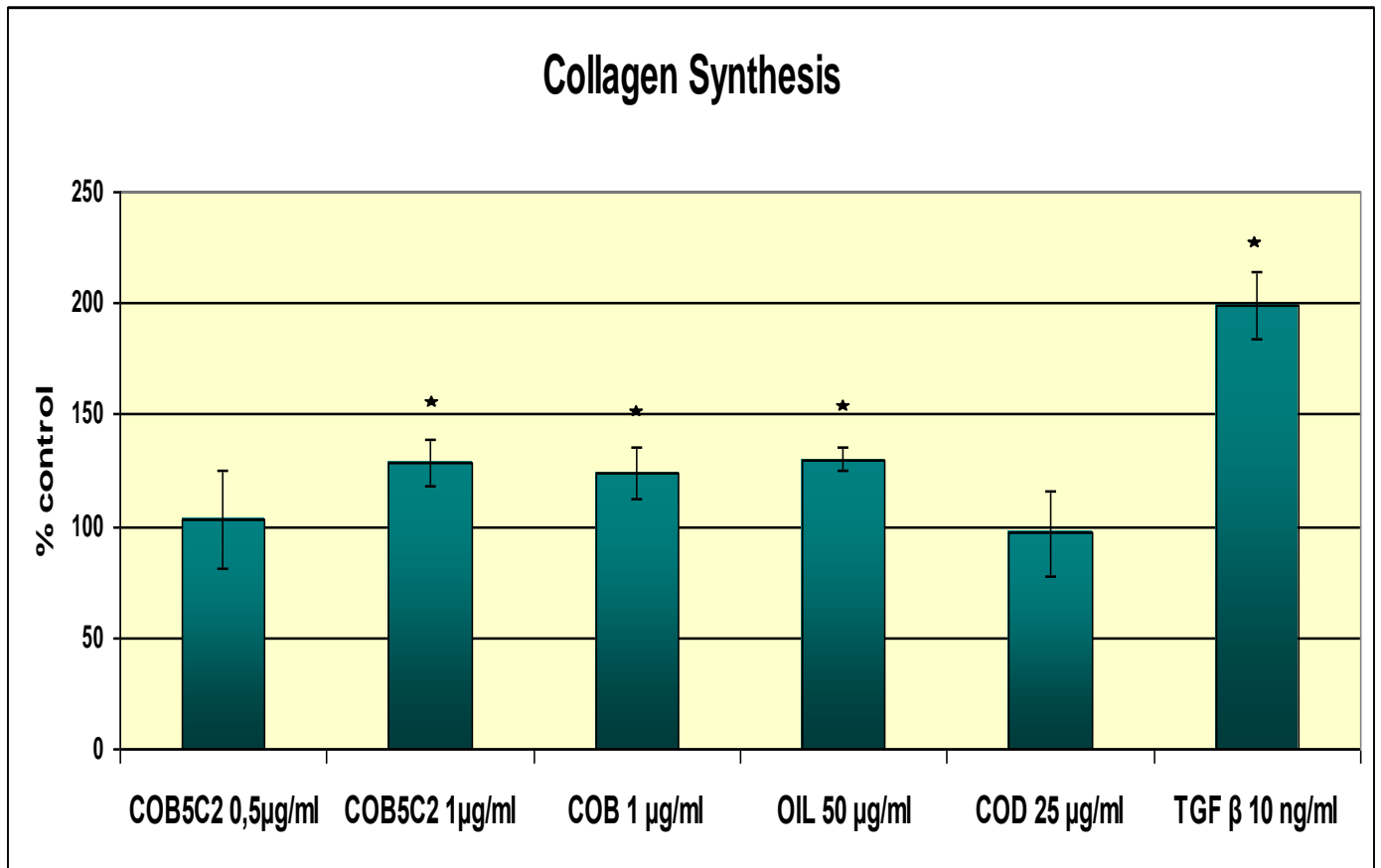
<b>Εκχυλίσματα C. Oestroides</b>
COB5C-2 1μg/ml
COB 1 μg/ml
OIL 50 μg/ml
COD 25 μg/ml

Παρακάτω, παρατίθεται ο πίνακας που περιλαμβάνει τα αποτελέσματα της μελέτης διεγερτικής δράσης των εκχυλισμάτων στη σύνθεση κολλαγόνου.

<b>Εκχυλίσματα C. Ostreoides</b>	<b>% του μάρτυρα</b>	<b>% τυπική απόκλιση</b>	<b>Ttest</b>
COB5C2 0,5μg/ml	103,0	21,7	0,48893
<b>COB5C2 1μg/ml</b>	<b>128,6</b>	10,6	<b>0,02085</b>
<b>COB 1 μg/ml</b>	<b>123,7</b>	11,5	<b>0,03601</b>
<b>OIL 50 μg/ml</b>	<b>130,1</b>	5,5	<b>0,00753</b>
COD 25 μg/ml	96,7	18,7	0,72662
<b>TGF β 10 ng/ml</b>	<b>199</b>	15,5	<b>0,00037</b>

Στον παραπάνω πίνακα, έχουν επισημανθεί οι συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων οι οποίες παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διεγερτική δράση στη σύνθεση κολλαγόνου.

Οι συγκεντρώσεις αυτές απεικονίζονται στο διάγραμμα που ακολουθεί:



Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων, συμπεραίνουμε πως τα εκχυλίσματα COB5C-2, COB & OIL σε συγκεντρώσεις 1µg/ml, 1µg/ml & 50 µg/ml , αντίστοιχα, εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διεγερτική δράση στην παραγωγή νεοσυντιθέμενου κολλαγόνου από ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες.

### 3.4. Δοκιμασία κυτταρικής μετανάστευσης μετά από τομή (Scratch Assay)

Για την αξιολόγηση του Scratch assay γίνεται λήψη φωτογραφιών με φωτογραφική μηχανή Canon Powershot A640 προσαρμοσμένη στο ανάστροφο μικροσκόπιο Wild Leitz μέσω του φακού 4x.

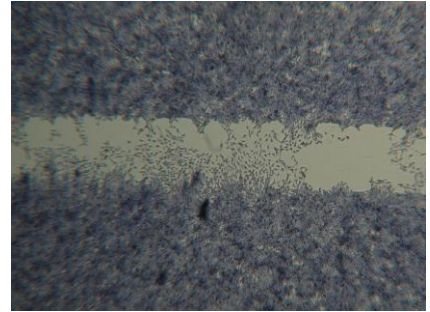
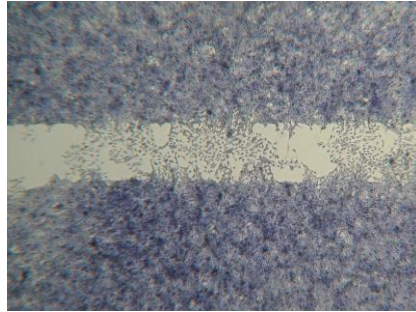
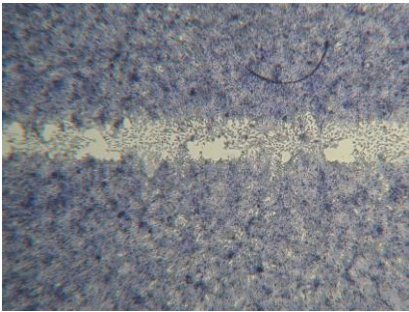
Οι συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων που χρησιμοποιήθηκαν είναι αυτές που είχαν επιλεγεί και για τη δοκιμασία σύνθεσης κολλαγόνου και παρουσιάζονται παρακάτω:

<b>Εκχυλίσματα <i>C. oestroides</i></b>
COB5C-2 1μg/ml
COB 1 μg/ml
OIL 50 μg/ml
COD 25 μg/ml

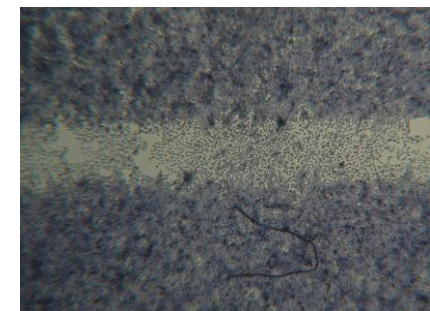
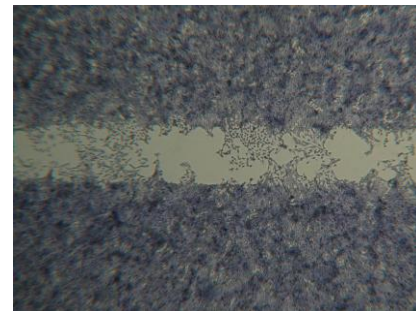
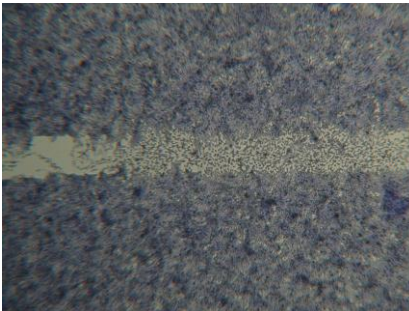
Από τα αποτελέσματα του scratch assay, δεν παρατηρείται κάποια αισθητή επίδραση των εκχυλισμάτων του αρθρόποδου *C. Oestroides* στη μετανάστευση των αθανатоποιημένων κερατινοκυττάρων HaCaT.

Παρακάτω παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες από την επίδραση του μάρτυρα και των τεσσάρων εκχυλισμάτων σε καλλιέργειες κερατινοκυττάρων HaCaT:

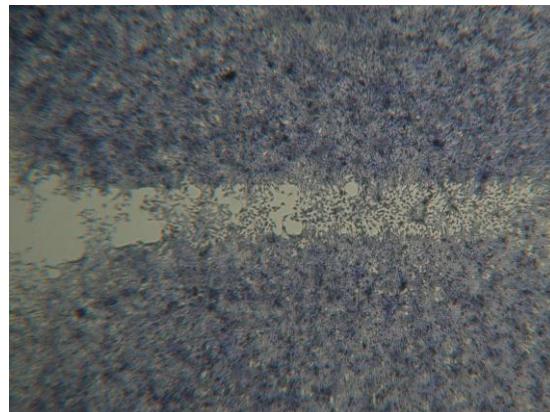
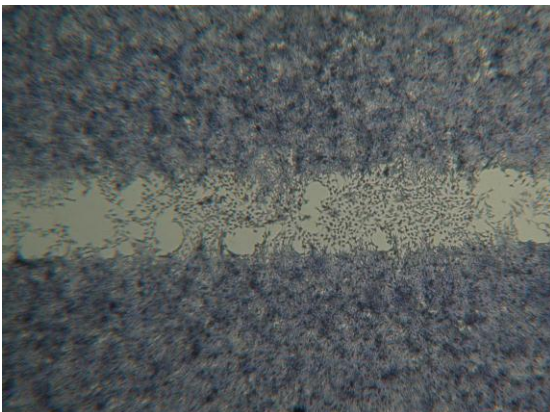
### Μάρτυρας



### COB5C-2

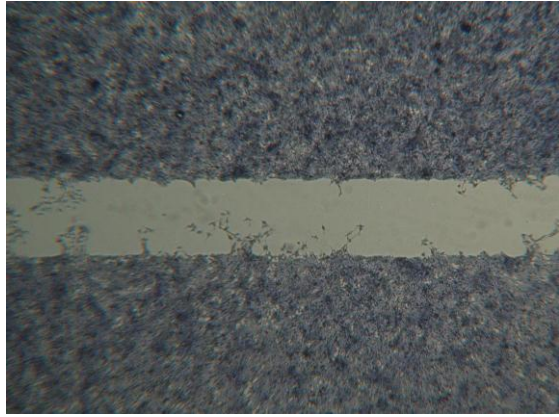
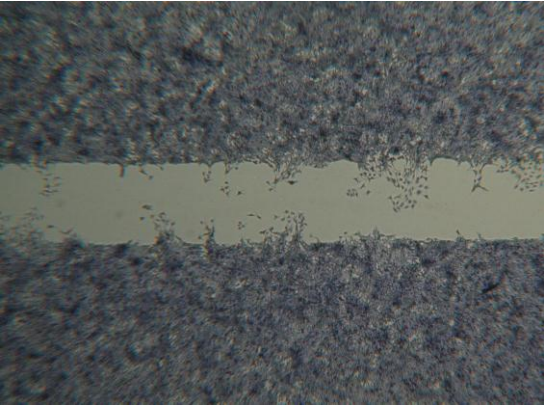


### COB

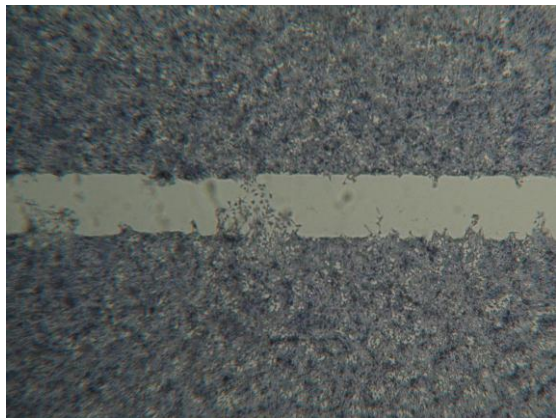
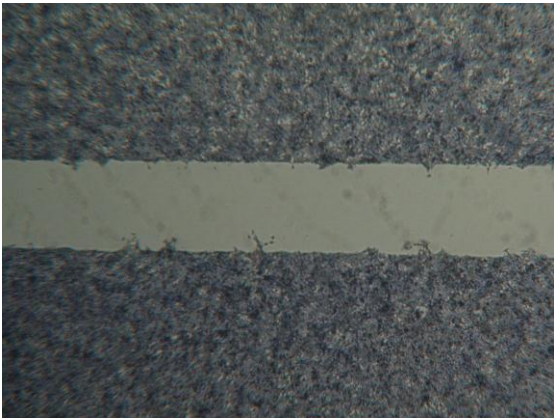




**COD**



**OIL**



## 4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η επούλωση είναι μια πολύπλοκη διαδικασία στην οποία εμπλέκονται πολλοί διαφορετικοί μηχανισμοί δημιουργώντας αλληλεπιδράσεις διάφορων κυτταρικών και μοριακών συνιστωσών που δρουν ταυτόχρονα με το κλείσιμο του τραύματος, δημιουργώντας τον νέο ιστό.

Το αρθρόποδο *Ceratothoa oestroides* ανήκει στην τάξη των Ισοπόδων και πρόκειται για ένα πρωτανδρικό ερμαφρόδιτο παράσιτο σε πολλές οικογένειες ψαριών. Τα εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από υγρή-υγρή εκχύλιση και σειρά χρωματογραφικών διαχωρισμών, οδηγώντας στην απομόνωση και στην ταυτοποίηση μέσω ανάλυσης των φασματοσκοπικών τους δεδομένων (NMR, MS) ενός αριθμού μεταβολιτών, κυρίως λιπαρών οξέων και υδατανθράκων.

Αρχικά, μελετήθηκε η κυτταροτοξικότητα των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο MTT, όπου φάνηκε πως δύο από τα τέσσερα εκχυλίσματα εμφανίζουν κυτταροτοξικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις (COB & COB5C-2).

Έπειτα, μελετήθηκε η ικανότητα διέγερσης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες με τη μέθοδο DNA Synthesis. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι υψηλότερες μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις των τεσσάρων εκχυλισμάτων και μικρότερες αυτών. Εντοπίστηκαν οι συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων που εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διεγερτική δράση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Στη συνέχεια, λαμβάνοντας υπόψιν τις βέλτιστες συγκεντρώσεις που διεγείρουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, πραγματοποιήθηκε μελέτη της πιθανής διεγερτικής δράσης των εκχυλισμάτων στην παραγωγή κολλαγόνου σε ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες. Φάνηκε ότι τρία από τα τέσσερα εκχυλίσματα εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διεγερτική δράση στην κολλαγονοσύνθεση.

Τέλος, μελετήθηκε η ικανότητα διέγερσης της κυτταρικής μετανάστευσης των εκχυλισμάτων σε αθανατοποιημένα κερατινοκύτταρα HaCaT στις βέλτιστες συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων, όπου δεν παρατηρήθηκε κάποια αισθητή επίδραση στην κυτταρική μετανάστευση.

Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων, φάνηκε πως και τα τέσσερα εκχυλίσματα διεγείρουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Επίσης, τρία από τα τέσσερα εκχυλίσματα (**COB5C-2**, **COB**, **OIL**) βρέθηκε ότι εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διεγερτική δράση στη σύνθεση κολλαγόνου.

Σημαντικό θα ήταν να αναφερθεί πως δύο από τα τέσσερα εκχυλίσματα (**COB**, **COB5C-2**) εμφάνισαν κυτταροτοξικότητα τόσο στους ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες όσο και στα αθανατοποιημένα κερατινοκύτταρα HaCaT, οπότε αυτό θα πρέπει να ληφθεί υπόψιν σε περίπτωση μελλοντικής ασφαλούς χρήσης των συγκεκριμένων εκχυλισμάτων.

Περαιτέρω μελέτη των εκχυλισμάτων αυτών, θα μπορούσε να οδηγήσει στη διαλεύκανση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν τη δράση τους, ώστε να χρησιμοποιηθούν για φαρμακευτικούς ή καλλυντικούς σκοπούς.

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

**Aisa, Y., Miyakawa, Y., Nakazato, T., Shibata, H., Saito, K., Ikeda, Y., and Kizaki, M. (2005).** Fucoidan induces apoptosis of human HS-Sultan cells accompanied by activation of caspase-3 and down-regulation of ERK Pathways. *American Journal of Hematology*, 78(1), 7–14.

**Anithaa, S. Sowmyaa,1, P.T. Sudheesh Kumara, S. Deepthia,K.P. Chennazhia, H. Ehrlichb, M. Tsurkanc, R. Jayakumara (2014).** Chitin and chitosan in selected biomedical applications, *Progress in Polymer Science* 39 1644–1667

**Bahramsoltani R., Farzaei M.H., Rahimi R. (2014).** Medicinal plants and their natural components as future drugs for the treatment of burn wounds: An integrative review. *Arch. Dermatol. Res*; 306. P. 601–617.

**Bo Forslind, Magnus Lindberg (2004).** *Skin, Hair and Nails Structure and Function* p 11-25.

**Chandika P., Jung W.- K., Ko S. C.(2015).** Marine-derived biological macromolecule-based biomaterials for wound healing and skin tissue regeneration; *International Journal of Biological Macromolecules* 77 (2015) 24–35

**Clark R. (1998).** *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*, second ed., Plenum Press, New York

**Colliec, S., Fischer, A., Tapon-Brethaudiere, J., Boisson, C., Durand, P., and Jozefonvicz, J. (1991).** Anticoagulant properties of a fucoidan fraction. *Thrombosis Research*, 64(2), 143–154.

**Collins M.N., Birkinshaw C. (2013).** Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering—a review, *Carbohydr. Polym.* 92 1262–1279.

**Costa-Pinto, A.R., Reis, R.L., Neves, N.M. (2011).** Scaffolds based bone tissue engineering: the role of chitosan. *Tissue Eng. Part B* 17, 331–347

**Croisier, F., Jérôme, C. (2013).** Chitosan based biomaterial for tissue engineering. *Eur. Polym. J.* 49, 780–792

**Deux, J.-F., Meddahi-Pellé, A., Le Blanche, A. F., Feldman, L. J., Colliec-Jouault, S., Brée, F., Boudghène, F., Michel, J.-B., and Letourneur, D. (2002).** Low molecular weight fucoidan prevents neointimal hyperplasia in rabbit iliac artery in-stent restenosis model. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 22(10), 1604–1609.

- Dutkiewicz, J., Tuora, M.,C.J., Sandford, P.A., Zikakis, J.P. (1992).** Advances in Chitin and Chitosan. Elsevier, New York.
- Ehrlich H.P., Krummel T.M. (1996).** Regulation of wound healing from a connective tissue perspective. *Wound Repair Regen.* 4 203–210.
- Faulkner D.J. (2002).** Marine Natural Products, *Nat Prod Rep.*19 –48.
- Ferraro, V., Cruz, I.B., Jorge, R.F., Malcata, F.X., Pintado, M.E., Castro, P.M.L. (2010).** Valorisation of natural extracts from marine source focused on marine by-products: a review. *Food Res Int.*43:2221–2233
- Fitton, J. H. (2011).** Therapies from fucoidan; multifunctional marine polymers. *Marine Drugs*, 9(10), 1731–1760.
- Fitton, J. H., Irhimeh, M., and Falk, N. (2007).** Macroalgal fucoidan extracts: A new opportunity for marine cosmetics. *Cosmetics and Toiletries*, 122(8), 55.
- Fox, N.J. (1988).** Scientific Theory Choice and Social Structure: The Case of Joseph Lister's Antisepsis, Humoral Theory and Asepsis. *Hist Sci*;26:367–397.
- Fujita, M., Kinoshita, M., Ishihara, M., Kanatani, Y., Morimoto, Y., Simizu, M., Ishizuka, T., Saito, Y., Yura, H., Matsui, T., Takase, B., Hattori, H., Kikuchi, M., Maehara, T.(2004).**
- Gautam M.K, Purohit V., Agarwal M., Singh A., Goel R.K. (2014).** In Vivo Healing Potential of Aegle marmelos in Excision, Incision, and Dead Space Wound Models *ScientificWorld J.* 1–9
- Gottrup F, Leaper D. (2004).** Wound healing: Historical Aspects. *EWMA.* 2004;4:21- 30
- Gurtner G.C., Werner S., Barrandon Y., Longaker M.T. (2008).** Wound Repair and Regeneration *Nature* 453 (2008)314–321.
- Hani, S., Satya, P. (2013).** Complements and the wound healing cascade: an updated review. *Plast. Surg. Int.* 1–7.
- Hayflick L., Moorhead P. S. (1961).** The serial cultivation of human diploid cell strains *Experimental Cell Research* 25, 585-621
- Heldin C. – H., Johnsson A., Ek B., Wennergren S., Ronnstrand L., Hammacher A., Faulders B., Wasteson A., Westermark B. (1987).** Purification of human platelet-derived growth factor, *Meth. Enzymol.* 147 3-13

**Henneth A. Walters, Michael S. Roberts (2008).** Dermatologic, Cosmeceutic and Cosmetic Development: Therapeutic and novel approaches 1-5 Inhibition of vascular prosthetic graft infection using a photocrosslinkable chitosan hydrogel. *J. Surg. Res.* 121, 135–140.  
*Int. J. Biol. Macro-mol.* 54 84–89.

**Ioannovich JD, Gravvanis AI, Tsoutsos DA. (2004).** The treatment of burn disease in the Hippocratic era. *Plast Reconstr Surg.* 114:1664-1665

**Irhimeh, M. R., Fitton, J. H., and Lowenthal, R. M. (2007).** Fucoidan ingestion increases the expression of CXCR4 on human CD34+ cells. *Experimental Hematology*, 35(6), 989–994.

**Itoh, H., Noda, H., Amano, H., Zhuaug, C., Mizuno, T., and Ito, H. (1993).** Antitumor activity and immunological properties of marine algal polysaccharides, especially fucoidan, prepared from *Sargassum thunbergii* of Phaeophyceae. *Anticancer Research*, 13(6A), 2045.

**Voigt J., Driver V.R. (2012).** Hyaluronic acid derivatives and their healing effect on burns, epithelial surgical wounds, and chronic wounds: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Wound Repair Regen.* 20 317–331

**Kim H.N., Hong Y., Kim M.S., Kim S.M., Suh K.Y. (2012).** Effect of orientation and density of nanotopography in dermal wound healing; *Biomaterials* 33 8782–8792.

**Kim, S. K. and Mendis, E. (2006).** Bioactive compounds from marine processing byproducts- A review. *Food Research International*, 39(4), 383–393.

**Lariviere B, Rouleau M, Picard S, Beaulieu AD (2012).** Human plasma fibronectin

**Linington R., Robertson M., Gauthier A., Finlay B, Rob van Soest, Raymond J. Andersen (2002).** Caminoside A, an Antimicrobial Glycolipid Isolated from the Marine

Sponge *Caminus sphaeroconia*<sup>1</sup> *Org. Lett.*, 2002, 4 (23), pp 4089–4092

**Murado M., Montemayor M.I., Cabo M., Vázquez J.A., González M. (2012).** Optimization of extraction and purification process of hyaluronic acid from fish eyeball  
*Food Bio-prod. Process.* 90 491–498.

**Matsumoto Y., Ikeda K., Yamaya Y., Yamashita K., Saito T., Hoshino Y., Koga T., Enari H., Suto S., Yotsuyanagi T. (2011).** The usefulness of the collagen and elastin sponge derived from salmon as an artificial dermis and scaffold for tissue engineering. *Biomed. Res.* 32 ; 29–36.

**Mi Jeong Ku, Ji Won Jung, Myeong S, Drozd E (2010).** Effect of *Fucus evanescens* Fucoidan On Expression of Matrix Metalloproteinase-1 Promoter, mRNA, Protein and Signal Pathway; *Journal of Life Science* Vol. 20. No.11. 1603~1610

**Miyazaki, H., Kinoshita, M., Saito, A., Fujie, T., Kabata, K., Hara, E., Ono, S., Takeoka, S., Saitoh, D. (2012).** An ultrathin poly(L-lactic acid) nanosheet as a burn wound dressing for protection against bacterial infection *Wound Repair Regen.* 20 (2012) 573–579.

**Ms Biddings SnR (2010).** Honey, Lizard dung and pigeons' blood. *Nurs Times*.  
N. H. Aboelsoud. Herbal medicine in ancient egypt. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(2):82–86

**Nwe N., Furuike T., Tamura H. (2010).** Selection of a biopolymer based on attachment, morphology and proliferation of fibroblast NIH/3T3 cells for the development of a biodegradable tissue regeneration template: Alginate, bacterial cellulose and gelatine *Process. Biochem.* 45 457–466

**Oh KB, Mar W, Kim S, Kim JY, Lee TH, Kim JG, Shin D, Sim CJ, Shin J. (2006).** Antimicrobial Activity and Cytotoxicity of Bis(indole) Alkaloids from the Sponge *Spongosoritessp.* *Biol Pharm Bull.* Mar;29(3):570-3

**Park, M.-K., Jung, U., and Roh, C. (2011).** Fucoidan from marine brown algae inhibits lipid accumulation. *Marine Drugs*, 9(8), 1359–1367.

**Rinaudo, M. (2006).** Chitin and chitosan: properties and applications. *Prog. Polym. Sci.* 31, 603–632.

**Robert Baran, Howard I. Maibach (2010)** Text book of cosmetic dermatology, Fourth edition, Informa healthcare 1-11

**Roberts MS, Walters KA. (2008).** *Dermal Absorption and Toxicity Assessment*, 2nd edition. New York: Informa Healthcare, 1–13.

**Rovee D.T., Maibach I. H (2003).** The epidermis in wound healing 20-59

**Sadhasivam G., Muthuvel A., Pachaiyappan A., Thangavel B. (2013).** Isolation and characterization of hyaluronic acid from the liver of marine stingray *Aetobatus narinari*

**Se-Kwon Kim (2013).** *Marine biomaterials Characterization, Isolation and Applications*; CRC Press 633-657

**Shakeel, A., Saiqa, I.(2015).** Chitosan & its derivatives: a review in recent innovations. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 6, 14–30

**Shiroma, R., Uechi, S., Taira, T., Ishihara, M., Tawata, S., and Tako, M. (2003).** Isolation and characterization of fucoidan from *Hizikia fusiformis* (Hijiki). *Journal of Applied Glycoscience*, 50(3), 361–366

**Song, E., Yeon Kim, S., Chun, T., Byun, H. J., and Lee, Y. M. (2006).** Collagen scaffolds derived from a marine source and their biocompatibility. *Biomaterials*, 27(15), 2951–2961.

**Williams, D.F., Schmitt W.H. (1992).** Chemistry and Technology of the Cosmetics and Toiletries Industry 99-103

**Winter, G.D. (1962).** Formation of Scab and the Rate of Epithelialisation of Superficial Wounds in the Skin of the Young Domestic Pig. *Nature*, 193, 293-294

**Xing-Cong Li, Melissa R. Jacob, Yuanqing Ding, Ameeta K. Agarwal, Troy J.**

**Smillie, Shabana I. Khan, Dale G. Nagle, Daneel Ferreira, and Alice M. Clark (2006).** Capisterones A and B From the Marine Green Alga *Penicillus capitatus* that Enhance Fluconazole Activity in *Saccharomyces cerevisiae*; *J Nat Prod*. 2006 Apr; 69(4): 542–546.

**Yates C. C ,Whaley D. , Babu R. ,Zhang J.,Krishna P.,Beckman E.,Pasculle A. W. , Wells A. (2007).** The effect of multifunctional polymer-based gels on wound healing in full thickness bacteria-contaminated mouse skin wound models. *Biomaterial* 28 3977–3986.

**Yeo M., Jung W.-K., Kim G. (2012).** Fabrication, characterisation and biological activity of phlorotannin-conjugated PCL/β-TCP composite scaffolds for bone tissue regeneration. *J. Mater. Chem.*;22:3568–3577

**Zheng Shu X, Liu Y, Palumbo FS, Luo Y, Prestwich GD (2004).** In situ crosslinkable hyaluronan hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials* 25 1339–1348.

**Zhou, Y., Yang, D., Chen, X., Xu, Q., Lu, F., Nie, J. (2008).** Electrospun water-soluble carboxyethyl chitosan/poly(vinyl alcohol) nanofibrous membrane as potential wound dressing for skin regeneration. *Biomacromolecules* 9, 349–354.

**Αντωνίου Χ, Κατσάμπας (2015).** Δερματολογία – Αφροδισιολογία 37-43

**Σοφρωνά Ε. (2016).** ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ, ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ *IN VIVO* ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΟΥΛΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΘΑΛΑΣΣΙΟ ΙΣΟΠΟΔΟ *Ceratothoa oestroides*