



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΤΩΝ ΘΥΜΟΣΙΝΩΝ ΜΕ ΠΙΘΑΝΗ ΕΠΟΥΛΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

Διπλωματική Εργασία

Κικίδου Ελένη, Ιατρός

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

«Κοσμητολογία - Δερματοφαρμακολογία»

Αθήνα, 2018

Αφιερωμένο
στον Κωστή.

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΣΠΟΥΔΩΝ ΚΑΙ ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ :

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

ΣΥΝΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ:

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

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

Χαράλαμπος Πράτσηνης, Εντεταλμένος ερευνητής ΙΒΕ, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

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

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

**Δάλλας Παρασκευάς, Επίκουρος Καθηγητής Τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας,
Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών**

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρα Ευαγγελία Λιβανίου, Ερευνήτρια Α΄ του Εργαστηρίου Πολυπεπτιδική Χημείας στο Ινστιτούτο Πυρηνικών και Ραδιολογικών Επιστημών και Τεχνολογίας, Ενέργειας και Ασφάλειας (ΙΠΡΕΤΕΑ) του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», για την καθοδήγηση, την σημαντική βοήθεια που μου προσέφερε και την υπομονή της.

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

Ένα ξεχωριστό ευχαριστώ οφείλω στον Εντεταλμένο Ερευνητή του Εργαστηρίου Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού και Γήρανσης, του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», Δρα Χαράλαμπο Πράτση για την υπομονή, την καθοδήγηση, καθώς και βοήθεια του στο σχεδιασμό και τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

Ευχαριστώ πολύ την κα Γραμματικάκη Στεφάνια, φαρμακοποιό και απόφοιτο του μεταπτυχιακού προγράμματος «Κοσμητολογία - Δερματοφαρμακολογία», για την πολύτιμη βοήθεια της καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών μου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τη μεταδιδακτορική συνεργάτιδα του Εργαστηρίου Πολυπεπτιδική Χημείας του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», Χρυσούλα Καραχάλιου για την βοήθεια που μου προσέφερε κατά την παρουσία μου στο Εργαστηρίου Πολυπεπτιδική Χημείας και τον διδακτορικό συνεργάτη του Εργαστηρίου Κυτταρικού Πολλαπλασιασμού και Γήρανσης, του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», Ανάσταση Κουρούμαλη για τη βοήθεια του στη διεξαγωγή των πειραμάτων.

Ευχαριστώ στον υπεύθυνο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Κοσμητολογία-Δερματοφαρμακολογία», τον Επίκουρο Καθηγητή του Τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας, κύριο Μιχαήλ Ράλλη, για την εμπιστοσύνη του καθώς και για τη συμμετοχή του στην τριμελή εξεταστική επιτροπή της παρούσας εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Δαλλα Παρασκευά, Επίκουρο Καθηγητή του Τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας, για τη συμμετοχή του στην τριμελή εξεταστική επιτροπή.

Τέλος, ένα τεράστιο ευχαριστώ στην οικογένειά μου, για τη υπομονή και τη ψυχολογική στήριξη, που μου παρείχαν σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	9
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	10
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΔΕΡΜΑ ΚΑΙ ΕΠΟΥΛΩΣΗ.....	11
1.1. ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗ ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ	11
1.2. ΤΡΑΥΜΑ.....	12
1.3. ΦΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ ΤΟΥ ΤΡΑΥΜΑΤΟΣ.....	13
1.3.3. ΦΑΣΗ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ	18
1.3.4. ΦΑΣΗ ΑΝΑΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ.....	21
1.4. TGF-β	22
1.5. ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ ΤΗΣ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ ΤΡΑΥΜΑΤΟΣ.....	24
1.6. ΕΠΟΥΛΩΣΗ ΤΡΑΥΜΑΤΩΝ ΕΙΔΙΚΩΝ ΙΣΤΩΝ	26
2.1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ– ΘΥΜΟΣΙΝΙΚΟ ΚΛΑΣΜΑ 5	28
2.2. ΘΥΜΟΣΙΝΗ α1 (Tα1).....	29
2.3. ΘΥΜΟΣΙΝΗ β4 (Tβ4).....	33
2.3.1. ΤετραπεπτίδιοAc-SDKP	36
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	38
ΣΚΟΠΟΣ	39
3.1. ΠΕΠΤΙΔΙΑ	41
3.2. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ	44
3.3. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	45
3.3.1. Υλικά και όργανα:.....	45
3.3.2. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.....	45
3.4. In vitro κυτταρικές δοκιμασίες για τον έλεγχο της βιολογικής δράσης των πεπτιδίων..	48
3.4.1. Έλεγχος κυτταρικής βιωσιμότητας με την μέθοδο MTT.....	48
3.4.2. Καταμέτρηση των κυττάρων με σωματιδιακό αναλυτή	51
3.4.3. Ποσοτικός προσδιορισμός σύνθεσης DNA με την μέθοδο της τριτιωμένης θυμιδίνης	53
3.4.4. Προσδιορισμός της σύνθεσης κολλαγόνου με την μέθοδο της τριτιωμένης προλίνης	56
Έλεγχος βιολογικής δράσης των πεπτιδίων.....	60
4.1. Έλεγχος κυτταρικής βιωσιμότητας με τη μέθοδο MTT.....	60

4.2. Καταμέτρηση κυττάρων με σωματιδιακό αναλυτή	66
4.3. Ποσοτικός προσδιορισμός σύνθεσης DNA με τη μέθοδο τριτιωμένης Θυμιδίνης	68
4.4. Ποσοτικός προσδιορισμός σύνθεσης κολλαγόνου με τη μέθοδο της τριτιωμένης προλίνης	69
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	77
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	82
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	83

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αντικείμενο της παρούσας εργασίας ήταν η βιολογική αξιολόγηση των πεπτιδίων θυμοσίνη α1 (Τα1), θυμοσίνη β4 (Τβ4) και του N-τελικού τετραπεπτιδίου της Τβ4 (Ac-SDKP), σε *in vitro* κυτταρικές δοκιμασίες δερματικής επούλωσης.

Τα πεπτίδια Τα1, Τβ4 και Ac-SDKP ανήκουν στην οικογένεια των θυμοσινών, τα οποία είναι ενδογενή πεπτίδια και απαντώνται σε όλα σχεδόν τα ανθρώπινα κύτταρα.

Τόσο η Τβ4, όσο και το AcSDKP έχουν θετική επίδραση στην επούλωση ποικίλων ιστών (πχ καρδιά, νεφροί, ήπαρ, δέρμα) σύμφωνα με μεγάλο αριθμό *in vitro* δοκιμασιών (σε ενδοθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες καρδιακής και νεφρικής προέλευσης κ.α.) και *in vivo* δοκιμασιών σε ζωικά μοντέλα. Οι ολιγάριθμες μελέτες για την επίδραση της Τα1 στο φαινόμενο της δερματικής επούλωσης αφορούν κυρίως στην αγγειογενετική της δράση σε *in vitro* δοκιμασίες, καθώς και τη συνολική επίδρασή της στην *in vivo* επούλωση τραυμάτων σε ζωικά μοντέλα.

Σε μια προσπάθεια περαιτέρω διερεύνησης των πιθανών δράσεων των παραπάνω πεπτιδίων (ιδιαίτερα της Τα1, για την οποία υπάρχουν λίγες διαθέσιμες βιβλιογραφικές πληροφορίες) στην επούλωση των τραυμάτων του ανθρώπινου δέρματος, αλλά και μιας *in vitro* προσομοίωσης της διαδικασίας της δερματικής επούλωσης, επιλέχθηκαν οι ανθρώπινοι δερματικοί ινοβλάστες, που συμμετέχουν ενεργά στα περισσότερα στάδια της επούλωσης, ως τα κύτταρα μελέτης. Συγκεκριμένα, ελέγχθηκε η επίδραση που μπορεί να έχουν τα πεπτίδια Τα1, Τβ4 και Ac-SDKP (συγκεντρώσεις: 0,1, 1 και 10 nM) επί της κυτταρικής επιβίωσης, του πολλαπλασιασμού και της κολλαγονοσύνθεσης στα παραπάνω κύτταρα.

Αρχικά, ελέγχθηκε η πιθανή κυτταροτοξική δράση των Τα1, Τβ4 και του Ac-SDKP μεμονωμένα, καθώς και συνδυαστικά με τους προστατευτικούς παράγοντες καπτοπρίλη (Ac-SDKP) και απροτινίνη (Τα1, Τβ4), επί των ινοβλαστών, με τη δοκιμασία MTT, κατά την οποία δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική επίδραση των πεπτιδίων στην βιωσιμότητα των ινοβλαστών.

Στη συνέχεια, ελέγχθηκε η επίδραση των θυμοσινικών πεπτιδίων στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Από τη μία πλευρά, η επίδραση αυτή μελετήθηκε μέσω του ποσοτικού προσδιορισμού της σύνθεσης DNA από τους δερματικούς ινοβλάστες, με τη μέθοδο τριτωμένης θυμιδίνης. Στη μελέτη αυτή, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, με μόνη εξαίρεση την Τβ4, που, στην υψηλότερη συγκέντρωση (10 nM), έδειξε να οδηγεί σε οριακή μείωση της ενσωμάτωσης της τριτωμένης θυμιδίνης από τους ινοβλάστες. Από την άλλη πλευρά, καταμετρήθηκε ο συνολικός αριθμός των κυττάρων, με την βοήθεια σωματιδιακού αναλυτή, μετά από 72 ώρες καθώς και μετά από 7 ημέρες επίδρασης των θυμοσινικών πεπτιδίων επί των ινοβλαστών, όπου φάνηκε η στατιστικά σημαντική, θετική επιρροή των Τα1, Τβ4 και του Ac-SDKP στην επιβίωση των κυττάρων για την δοκιμή των 72 ωρών. Τα αποτελέσματα της καταμέτρησης του απόλυτου αριθμού των ινοβλαστών, που έδειξαν θετική επίδραση των θυμοσινικών πεπτιδίων, θεωρείται ότι εκφράζουν το τελικό αποτέλεσμα επί του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, συμπεριλαμβάνοντας όλους τους παράγοντες που υπεισέρχονται στο φαινόμενο.

Τέλος, ελέγχθηκε η μεμονωμένη επίδραση των θυμοσινικών πεπτιδίων, καθώς και η αθροιστική επίδρασή τους παρουσία του παράγοντα TGF-β1, στη σύνθεση κολλαγόνου από τους δερματικούς ινοβλάστες με τη μέθοδο της τριτωμένης προλίνης. Η στατιστικά σημαντική αύξηση της σύνθεσης του κολλαγόνου που παρατηρήθηκε, αφορούσε τόσο την

μεμονωμένη επίδραση των Τα1, Τβ4, Ac-SDKP, όσο και την συνδυαστική επίδρασή τους παρουσία του TGF-β1.

Συμπερασματικά, τα θυμοσινικά πεπτίδια Τα1, Τβ4 και Ac-SDKP επάγουν την σύνθεση κολλαγόνου από τους ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες, υποδηλώνοντας την πιθανή διεγερτική δράση τους επί της κολλαγονοσύνθεσης. Ειδικά σε ό,τι αφορά τη Τα1, είναι η πρώτη φορά που ελέγχεται η επίδραση του πεπτιδίου στην κολλαγονοσύνθεση δερματικών ινοβλαστών και μάλιστα παρατηρούνται θετικά αποτελέσματα.

ABSTRACT

The subject of this study was the in vitro biological evaluation of peptides, thymosin α 1 (Ta1), thymosin β 4 (T β 4) and N-terminal tetrapeptide Ac-SDKP using cell strains which are associated with dermal wound healing.

The T α 1, T β 4 and Ac-SDKP belong to the family of thymosins, which are endogenous peptides and are present in almost all human cells.

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

In an attempt to further investigate the potential effects of the above peptides (in particular Ta1, for which there is little available bibliographic information) on the healing of human skin lesions and in an attempt to an in vitro simulation of the dermal healing process, human cutaneous fibroblasts, which are actively participating in most stages of healing, were selected as study cells. In particular, the effect of the T1, T4 and Ac-SDKP peptides (concentrations: 0.1, 1 and 10 nM) on cell survival, proliferation and collagen synthesis in the above cells was tested.

Initially, the potential cytotoxic effect of Ta1, Tpa4 and Ac-SDKP alone, as well as in combination with the captopril and aprotinin protective agents, on the fibroblasts was evaluated by the MTT assay. No statistically significant effect of the peptides on viability of the fibroblasts was observed.

Subsequently the effect of thymosinic peptides on cell proliferation was studied. The effect of peptides on the proliferation of dermal fibroblasts was studied by quantifying the DNA synthesis by the tritiated thymidine method. In this study, no statistically significant differences were observed, with the sole exception of Te4, which, at the concentration of 10 nM, was shown to lead to a marginal decrease in the incorporation of tritiated thymidine by fibroblasts. Furthermore the total number of cells was counted, with a Coulter analyzer, after 3 and 7 days of thymosinic treatment of the fibroblasts. A statistically significant, stimulatory effect of Ta1, T β 4 and Ac-SDKP on cell survival was noted. This positive effect of thymosinic peptides represents the overall effect on cell proliferation, including all factors involved in this process.

Finally, the individual effect_r of thymosinic peptides as well as their combined effect with the growth factor TGF- β 1, on collagen synthesis by cutaneous fibroblasts was tested by means of the tritiated proline method. A statistically significant increase in collagen synthesis was observed following both the individual treatment with T α 1, T β 4, and Ac-SDKP and their combination with TGF- β 1.

In conclusion, the thymosinic peptides T α 1, T β 4 and Ac-SDKP induce collagen synthesis by human dermal fibroblasts, suggesting a possible stimulatory effect of thymosinic peptides on collagen synthesis during wound healing. Especially with regard to T α 1, it should be noted that this is the first time that the effect of this peptide on collagen synthesis of human dermal fibroblasts is tested, and remarkably with positive results.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΔΕΡΜΑ ΚΑΙ ΕΠΟΥΛΩΣΗ

1.1. ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗ ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

Το δέρμα αποτελεί ένα εκτεταμένο όργανο που επενδύει την εξωτερική επιφάνεια του σώματος. Η δομή του διαφέρει από θέση σε θέση, ανάλογα με την εξειδικευμένη λειτουργία που επιτελεί. Οι λειτουργίες αυτές περιλαμβάνουν:

- Την προστασία από εξωτερικούς επιβλαβείς παράγοντες
- Την προστασία κατά της απώλειας υγρών
- Τον μεταβολισμό
- Την θερμορρύθμιση
- Την εξυπηρέτηση των αισθήσεων (αφής, αίσθησης θερμού - ψυχρού, πίεσης, πόνου)
- Την ανοσολογική απόκριση (Αντωνίου, 2015).

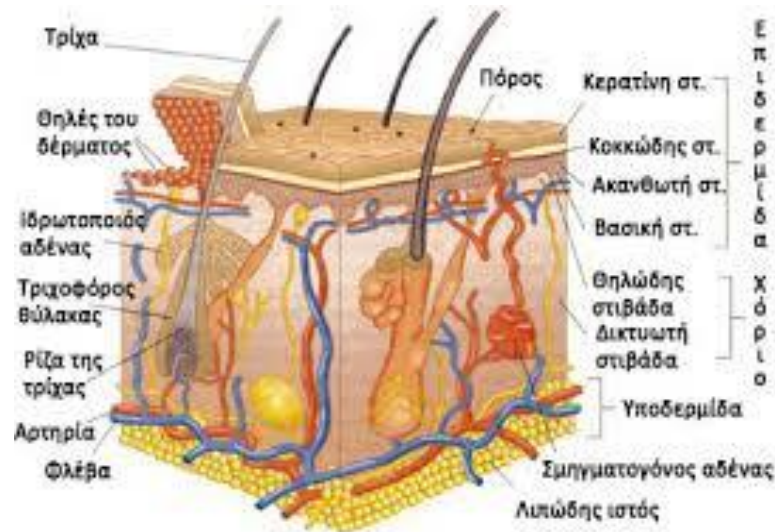
Αποτελείται από δυο κύριες στιβάδες, την επιδερμίδα και την δερμίδα, αλλά και από μια τρίτη, μεταβλητή στιβάδα, την υποδερμίδα (Εικ.1.1).

Η επιδερμίδα είναι η εξώτατη στιβάδα του δέρματος και το πάχος της ποικίλει ανάλογα με την εντόπιση. Η επιθηλιακή συνιστώσα της επιδερμίδας είναι τα κερατινοκύτταρα. Πρόκειται για πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο, αποτελούμενο από την κεράτινη, την κοκκιώδη, την ακανθωτή και την βασική στιβάδα. Η μη επιθηλιακή συνιστώσα είναι τα μελανοκύτταρα, τα κύτταρα του Langerhans και τα κύτταρα Merkel. Οι καταδύσεις της επιδερμίδας σχηματίζουν τους ιδρωτοποιούς αδένες και τα τριχοθυλάκια.

Η δερμίδα είναι η μεσαία στηρικτική στιβάδα, η οποία περιέχει τα εξαρτήματα, τα αγγεία, τα νεύρα και τις νευρικές απολήξεις, τα οποία βρίσκονται μέσα σε ένα ελαστικό κολλαγονώδες στρώμα από ινοβλάστες. Διακρίνεται σε 2 περιοχές, μια επιπολής - αραιά θηλώδη δερμίδα και μια πυκνότερη - δικτυωτή δερμίδα, η οποία είναι και το μεγαλύτερο τμήμα της.

Η βαθύτερη στιβάδα του δέρματος, η υποδερμίδα ή υποδόριο, έχει ποικίλη δομή και όταν είναι καλά ανεπτυγμένη αποτελείται κυρίως από λιπώδη ιστό, που διαχωρίζεται από ινοκολλαγονώδη διαφράγματα.

Η υποδερμίδα περιέχει το κύριο υποδόριο δίκτυο αρτηριών και φλεβών, απ'το οποίο χορηγούνται αγγεία που πορεύονται προ τα επάνω και σχηματίζουν ένα δίκτυο στην δερμοϋποδερμική συμβολή (υποδόριο πλέγμα). Από αυτό το σημείο, μικρότερα αγγεία εισχωρούν στην δερμίδα, δίνοντας κλάδους στα εξαρτήματα του δέρματος, δημιουργώντας ένα πλούσιο δίκτυο μικρών αρτηριδίων και φλεβιδίων (υποθηλώδες πλέγμα). Από το πλέγμα αυτό εκπορεύονται αγκύλες τριχοειδών προς τα άνω, που εισχωρούν στις θηλές του χορίου και αναπτύσσονται κοντά στην δερμοεπιδερμική συμβολή. Τα αγγεία δεν εισχωρούν στην επιδερμίδα (Stevens & Lowe, 1998).



Εικόνα 1.1 Δομή του δέρματος και των εξαρτημάτων του (Χ. Αντωνίου, 2015)

1.2. ΤΡΑΥΜΑ

Ως τραύμα ορίζεται η καταστροφή ή η λύση της συνέχειας ενός ιστού, που συνοδεύεται από διαταραχή της λειτουργίας του. Στην περίπτωση του δέρματος μπορεί να κυμαίνεται από ήπια διαταραχή της επιθηλιακής του ακεραιότητας ή βαθύτερων στρωμάτων όπως δερμίδας, υποδέρματος, αλλά και άλλων δομών (τένοντες, μύες, αγγεία, νεύρα, οστά και άλλα όργανα). Τα τραύματα μπορούν να κατηγοριοποιηθούν βάσει χρονιότητας, σε οξεία που ακολουθούν έγκαιρη και οργανωμένη αποκατάσταση του ιστού και σε χρόνια, τα οποία χαρακτηρίζονται από διαταραχή σε κάποιο από τα στάδια της επούλωσης με αποτέλεσμα την καθυστερημένη επούλωση. Ειδική κατηγορία τραυμάτων είναι τα επιπλεγμένα τραύματα που αποτελούν συνδυασμό επιλοίμωξης και ιστικής δυσλειτουργίας (Velnar et al., 2009).

1.3. ΦΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ ΤΟΥ ΤΡΑΥΜΑΤΟΣ

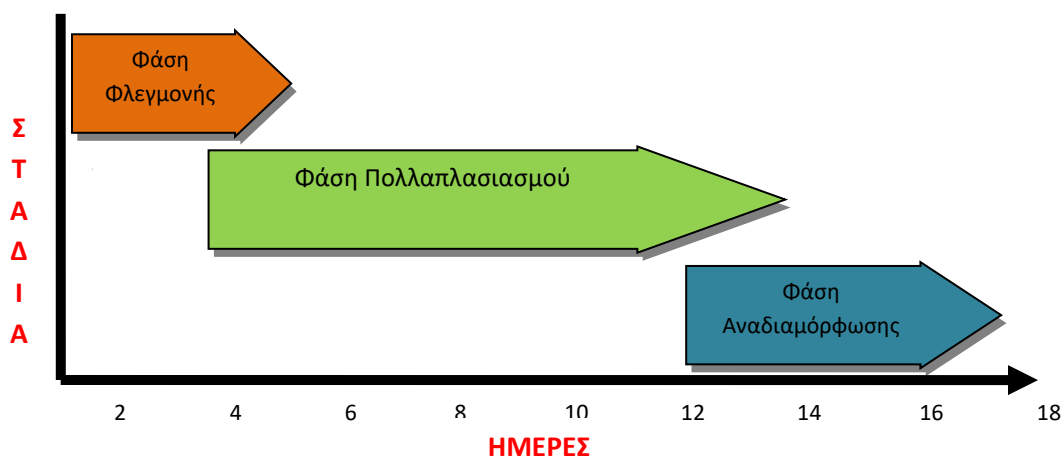
Η επούλωση είναι το σύνολο των φυσιολογικών μηχανισμών που ενεργοποιούνται με σκοπό στην αποκατάσταση της ανατομικής και λειτουργικής ακεραιότητας των ιστών (Rubin, 2001). Πρόκειται για μια σύνθετη διαδικασία χαρακτηριζόμενη από συντονισμένες αλληλεπιδράσεις μεταξύ ποικίλων συστημάτων (Velnar et al., 2009).

Μεταξύ άλλων, σχετικά με την επούλωση αξίζει να σημειωθούν τα ακόλουθα:

- Μετά τον τραυματισμό ποτέ δεν υπάρχει πλήρης αποκατάσταση της προσβεβλημένης περιοχής, στην βέλτιστη περίπτωση η αποκατάσταση μπορεί να φτάσει περίπου το 80% (Menke et al., 2006). Πλήρης δερματική επούλωση για τον άνθρωπο έχει περιγραφεί μόνο σε εμβρυϊκό δέρμα (Eming et al., 2014).
- Η διαδικασία της επούλωσης είναι κοινή για διάφορους ιστούς, όπως μυοκάρδιο,δέρμα, βλεννογόνους (Rubin, 2001).
- Η επούλωση ενός τραύματος εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες όπως η ηλικία, συνοδά νοσήματα που επηρεάζουν την λειτουργία των αγγείων ή το ανοσοποιητικό σύστημα (π.χ. Σακχαρώδης Διαβήτης, ανοσοκαταστολή, Χρόνια Φλεβική Ανεπάρκεια), βακτηριακές επιμολύνσεις, μειωμένη πρόσληψη θρεπτικών συστατικών και χρόνιο μηχανικό στρες (Eming et al., 2014).

Η επούλωση αποτελεί μια αλληλουχία τεσσάρων, χρονικά, αλληλοεξαρτώμενων φάσεων (Εικ.1.2):

- I. ΦΑΣΗ ΠΗΞΗΣ ΚΑΙ ΑΙΜΟΣΤΑΣΗΣ
- II. ΦΑΣΗ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ
- III. ΦΑΣΗ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ
- IV. ΦΑΣΗ ΑΝΑΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ (Velnar et al.,2009)



Εικόνα 1.2: Έναρξη και διάρκεια των κύριων φάσεων της επούλωσης (Gonzalez et al., 2016).

1.3.1. ΦΑΣΗ ΠΗΞΗΣ ΚΑΙ ΑΙΜΟΣΤΑΣΗΣ

Αμέσως μετά τον τραυματισμό ενεργοποιούνται οι μηχανισμοί της πήξης και αιμόστασης, με κύριο στόχο την ομαλή ροή του αίματος εντός των αγγείων και την λειτουργία των υπολοίπων οργάνων. Ένας δεύτερος στόχος είναι η δημιουργία ενός υποστρώματος, απαραίτητου στην μεταγενέστερη φάση της στρατολόγησης κυττάρων (Velnar et al. , 2009)

Ο οργανισμός αντιδρά άμεσα σε κάθε προσβολή της μικροκυκλοφορίας εντός δευτερολέπτων, μέσω συστολής των λείων μυϊκών κυττάρων που περιβάλλουν τα αγγεία και η οποία οδηγεί σε παροδική αγγειοσυστολή (Velnar et al.,2009). Το βραχύ αυτό διάστημα της αγγειοσυστολής ακολουθείται από αγγειοδιαστολή, ως αποτέλεσμα της έκκρισης σεροτονίνης από τα α-κοκκία των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων (Tejiram et al., 2016).

Υπάρχουν δυο κύριες συνιστώσες της αιμόστασης:

- Η αρχική αιμόσταση, που αφορά την συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων και τον σχηματισμό βύσματος αιμοπεταλίων
- Η δευτερογενής αιμόσταση, που αφορά την εναπόθεση αδιάλυτης ινικής μέσω ενεργοποίησης του καταρράκτη πήξης

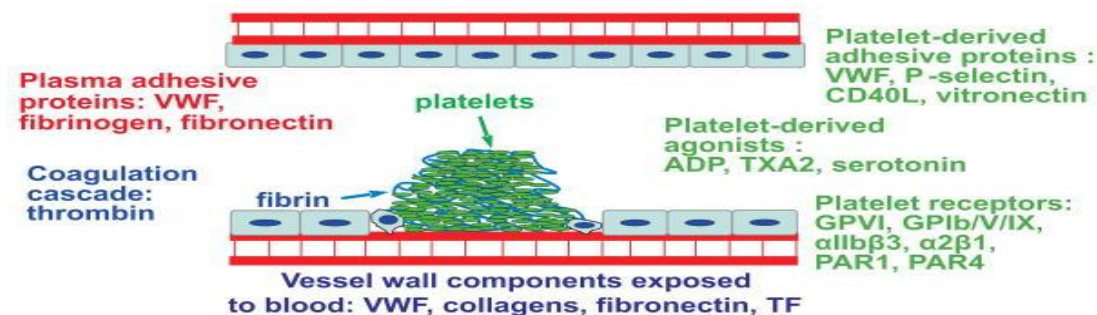
Εντός των αγγείων και υπό φυσιολογικές συνθήκες τα αιμοπετάλια δεν προσκολλώνται στις επιφάνειες, ούτε συσσωματώνονται. Ωστόσο κατά τον τραυματισμό τα αιμοπετάλια εκτίθενται στην υποενδοθηλιακή θεμέλια ουσία (SEM) και ξεκινά η ενεργοποίηση και η προσκόλλησή τους. Υποδοχείς στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων, συγκολλητίνες των αιμοπεταλίων και του πλάσματος, η θρομβίνη και αιμοπεταλιακοί αγωνιστές αλληλεπιδρούν, στο σημείο της βλάβης και υπό αυστηρό έλεγχο, για τον σχηματισμό του θρόμβου(Πίνακας 1.1).

Πίνακας 1.1. Μόρια που συμμετέχουν στον σχηματισμό θρόμβου

Αιμοπεταλιακές συγκολλητίνες	VWF, P-σελεκτίνη, Βιτρονεκτίνη, CD40L
Αιμοπεταλιακοί υποδοχείς	GPVI, GPIb/V/IX, Ιντεγκρίνες αIIbβ3, α2β1,ανβ3
Καταρράκτης πήξης	Θρομβίνη
Συγκολλητίνες πλάσματος	VWF, Ινωδογόνο, Ινονεκτίνη
Αιμοπεταλιακοί αγωνιστές	Σεροτονίνη, Θρομβοξάνη A2, ADP

Ο υποδοχέας των αιμοπεταλίων GPIb/V/IX δεσμεύεται στον παράγοντα VonWillebrand (VWF) της υποενδοθηλιακής θεμέλιας ουσίας και του πλάσματος, ενώ ο GPVI συνδέεται με

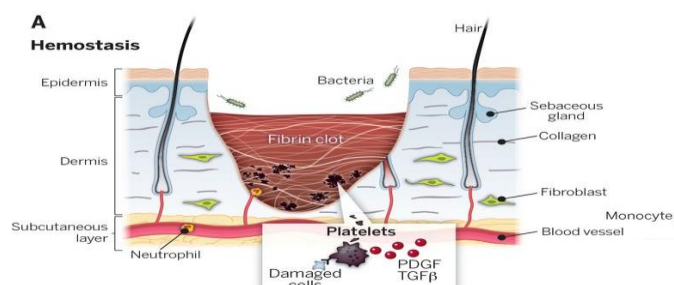
το κολλαγόνο και οδηγούν στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Οι ιντεγκρίνες των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (κυρίως), $\alpha\text{2}\beta\text{1}$, $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ δεσμεύονται στο κολλαγόνο, το ινωδογόνο, την ινονεκτίνη, τον VWF και την βιτρονεκτίνη. Η ενεργοποίηση άλλων κοντινών αιμοπεταλίων βοηθά στην επιπλέον συσσωμάτωση και επέκταση του θρόμβου. Η ενεργοποίηση αυτή επάγεται μέσω των αγωνιστών υποδοχέων των αιμοπεταλίων: θρομβοξάνη A₂, σεροτονίνη και διφωσφορικής αδενοσίνης (ADP). Άλλος σημαντικός μηχανισμός είναι η ενεργοποίηση της θρομβίνης μέσω των υποδοχέων PAR1 και PAR4, με αποτέλεσμα την έκκριση παραγόντων από τα κοκκία των αιμοπεταλίων, την ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης και την αναδιαμόρφωση των αιμοπεταλίων. Κατά αυτόν τον τρόπο τα αιμοπετάλια προσδένονται με συστατικά της SEM και επάγεται η σύνδεση αιμοπεταλίου - αιμοπεταλίου και ο σχηματισμός πρωτοπαθούς αιμοπεταλιακού εμβόλου (Εικόνα 1.3).



Εικόνα 1.3: Σχηματική αναπαράσταση πρωτογενούς αιμόστασης και των κυριότερων παραγόντων της φάσης αυτής (Gale, 2011).

Η δευτερογενής αιμόσταση είναι ο καταρράκτης της πήξης, κατά τον οποίο το ινωδογόνο διασπάται από τη θρομβίνη και παράγει τη αδιάλυτη ινική, ταυτόχρονα με την συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων (Εικ.1.4). Η ινική σχηματίζει ένα πλέγμα, μέσω διασταυρούμενων δεσμών, στην περιοχή του τραύματος και σταθεροποιεί επιπλέον τον αιμοπεταλιακό θρόμβο.

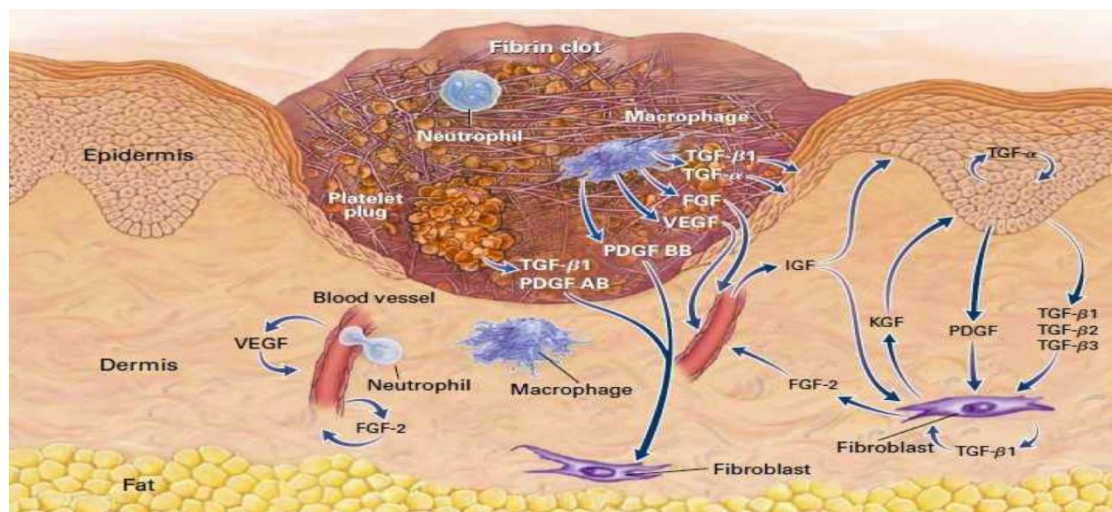
Σημαντικός μηχανισμός στην διαδικασία της επούλωσης είναι η ινωδόλυση. Το ινωδολυτικό σύστημα αποτελείται από σερινικές πρωτεάσες, με κύριο εκπρόσωπο την πλασμίνη, που συμβάλλουν στην διάσπαση της ινικής (Gale, 2011).



Εικόνα 1.4: Σχηματική αναπαράσταση των φυσιολογικών μηχανισμών της δευτερογενούς αιμόστασης (Sun, 2014).

1.3.2.ΦΑΣΗ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ

Στόχο της φάσης αυτής αποτελεί η εδραίωση μιας αποτελεσματικής απάντησης του οργανισμού στους βλαπτικούς παράγοντες. Ήδη, από το στάδιο της αιμόστασης, η συσσωμάτωση και η σύνδεση των αιμοπεταλίων με τις εκτεθειμένες επιφάνειες κολλαγόνου οδηγεί στην ενεργοποίησή τους. Η ενεργοποίηση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα την αποκοκκίωσή τους και την απελευθέρωση κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων, όπως ο PDGF (platelet-derived growth factor), ο TGF-β (transforming growth factor-β), ο EGF (epidermal growth factor), ο ILGF (insulin-like growth factor), καθώς και αγγειοδραστικών αμινών (σεροτονίνη, ισταμίνη). Επίσης, εικοσανοειδή και άλλα προϊόντα του αραχιδονικού οξέος απελευθερώνονται κατά την καταστροφή των κυτταρικών μεμβρανών. Όλα τα παραπάνω μόρια δρουν χημειοτακτικά (Velnar et al., 2009). Χημειοτακτικά λειτουργεί και η ενεργοποίηση των παραγόντων του συμπληρώματος, αλλά και τα υποπροϊόντα βακτηριακής αποικοδόμησης (Menke et al., 2006).



Εικόνα 1.5: Μηχανισμοί της επουλωτικής διαδικασίας κατά την φάση της φλεγμονής (Singer & Clark, 1999).

Η αγγειοδιαστολή στην περιοχή της βλάβης (ερυθρότητα, θερμότητα), καθώς και η αυξημένη διαπερατότητα των αγγείων, λόγω συστολής των ενδοθηλιακών κυττάρων, οδηγούν σε αυξημένη μεταφορά λευκοκυττάρων και πρωτεϊνών (οίδημα) εκτός τριχοειδικού συστήματος (Vander et al., 2001). Η αγγειοδιαστολή και η αυξημένη διαπερατότητα των αγγείων οφείλονται στην επίδραση της ισταμίνης, των προσταγλανδινών (PGD₂, PGE₂, PGDF₂) και λευκοτριενίων (Li, et al., 2007). Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα λευκοκύτταρα προσκολλώνται χαλαρά και κυλούν στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων. Όμως η παρουσία χημειοτακτικών παραγόντων οδηγεί στην ενεργοποίησή τους και επαγωγή των ιντεγκρινών στην επιφάνεια των

λευκοκυττάρων της κυκλοφορίας, με σταθερότερη σύνδεση σε μόρια πρόσδεσης, αρχικά επί των ενδοθηλιακών κυττάρων και εν συνεχεία της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Η διαδικασία μετακίνησης των λευκοκυττάρων και πρωτεϊνών, δια μέσου ενδοθηλίου, προς την φλεγμώδη περιοχή καλείται χημειοταξία (Menke et al., 2006).

Η φάση της φλεγμονής (Εικ.1.5) θα μπορούσε να διακριθεί σε πρωτογενή, που χαρακτηρίζεται από έντονη παρουσία των ουδετερόφιλων και δευτερογενή, με υπεροχή των μακροφάγων (Reinke et al., 2012).

Τα **ουδετερόφιλα** είναι τα πρώτα κύτταρα που στρατολογούνται (2 ώρες μετά τον τραυματισμό) από την κυκλοφορία και εντός 24ώρου κυριαρχούν αριθμητικά. Η κύρια δράση τους είναι η φαγοκυττάρωση του όποιου λοιμώδους παράγοντα, ξένου σώματος ή κατεστραμμένου ιστού με την βοήθεια των πρωτεασών (ελαστάση, κολλαγενάση) και δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) που εκκρίνουν. Επιπλέον τα ουδετερόφιλα έχουν την ικανότητα παραγωγής και απελευθέρωσης μεσολαβητών φλεγμονής, όπως TNF-α και IL-1, ενδυναμώνοντας με αυτό τον τρόπο την στρατολόγηση και περισσότερων ουδετερόφιλων, αλλά και ινοβλαστών και επιθηλιακών κυττάρων. Ο αριθμός τους μειώνεται κατά την 2-3 ημέρα, καθώς ολοκληρώνοντας το έργο τους, οδηγούνται σε απόπτωση αφήνοντας χώρο δράσης για τα μονοκύτταρα (Menke et al., 2006).

Τα μονοκύτταρα κατά την διέλευσή τους από το ενδοθήλιο, στον υποενδοθηλιακό ιστό μετατρέπονται σε **μακροφάγα**. Τα μακροφάγα ελκούνται στην περιοχή της βλάβης, 24 ώρες μετά τον τραυματισμό, από χημειοτακτικούς παράγοντες, όπως πηκτικούς παράγοντες, πρωτεΐνες του συμπληρώματος, κυτταροκίνες (PDGF, TGF-β) και προϊόντα υδρόλυσης του κολλαγόνου (Velnar et al., 2009). Τα μακροφάγα αποτελούν τα κυριότερα κύτταρα στην ρύθμιση της φλεγμονώδους αντίδρασης, καθώς συνεχίζουν το έργο της φαγοκυττάρωσης και συμβάλλουν σε ποικίλες διεργασίες (Li et al., 2007). Είναι υπεύθυνα για την έκκριση μεγάλου αριθμού μεσολαβητών και κυτταροκινών, συμπεριλαμβανομένων των IL-1, IL-6, IL-12, TNF-α που ισχυροποιούν την φλεγμονώδη απάντηση και στρατολογούν λευκοκύτταρα. Επίσης τα μακροφάγα απελευθερώνουν τους αυξητικούς παράγοντες TGF-β, VEGF, IGF, PDGF συμμετέχοντας ενεργά στις διαδικασίες της ινοπλασίας, αγγειογένεσης και επανεπιθηλιοποίησης. Τέλος, τα μακροφάγα, μέσω της φαγοκυττάρωσης απομακρύνουν τα αποπτωτικά ουδετερόφιλα, προστατεύοντας με αυτόν τον τρόπο τους ιστούς από μια δευτερογενή κυτταρική νέκρωση. Σύμφωνα με μελέτες φαίνεται κατά τις διάφορες δράσεις τους τα μακροφάγα να υιοθετούν διαφορετικούς φαινότυπους (Koh & DiPietro, 2011).

Τα τελευταία κύτταρα που εισέρχονται στο σημείο της βλάβης είναι τα λεμφοκύτταρα, μετά από 72 ώρες, ελκούμενα από την IL-1, συστατικά του συμπληρώματος και θραυσμάτων της ανοσοσφαιρίνης IgG. Η IgG αποτελεί μόριο μείζονος σημασίας στην μετέπειτα διαδικασία της αναδιαμόρφωσης της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (Velnar et al., 2009).

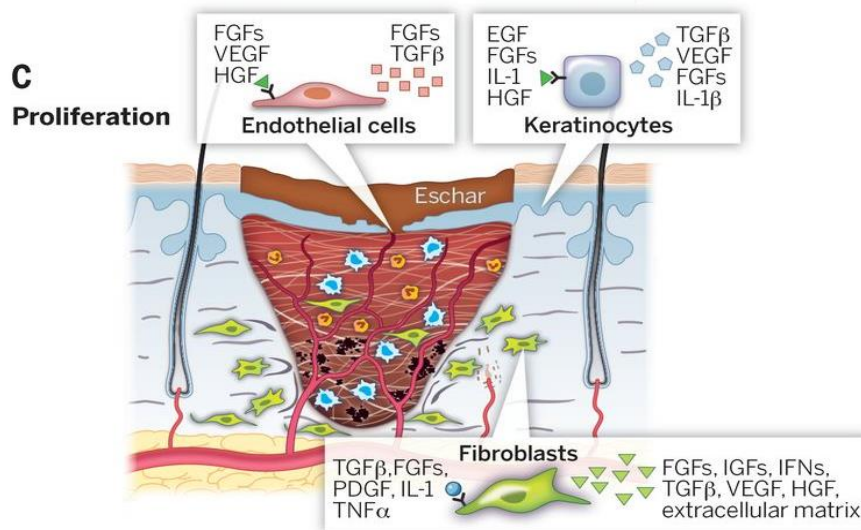
1.3.3. ΦΑΣΗ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ

Κατά την 3^η ημέρα και εφόσον οι προηγούμενες φάσεις δεν παρακωλύονται, η επουλωτική διαδικασία εισέρχεται στην φάση του πολλαπλασιασμού (Εικ.1.6) που διαρκεί περίπου 2 εβδομάδες (Velnar et al., 2009). Η φάση αυτή χαρακτηρίζεται από την προσπάθεια του οργανισμού να καλύψει την επιφάνεια του τραύματος και την αποκατάσταση του αγγειακού δικτύου, μέσω των διαδικασιών της ινοπλασίας, επιθηλιοποίησης και αγγειογένεσης (Reinke et al., 2012). Η μακροσκοπική εικόνα της φάσης του πολλαπλασιασμού χαρακτηρίζεται από την παρουσία άφθονου κοκκιώδους ιστού (Velnar et al., 2009) Ο κοκκιώδης ιστός αποτελείται από έναν πλούσιο σε αγγεία συνδετικό ιστό, που περιέχει καινούργια τριχοειδή, άφθονους ινοβλάστες και ποικίλο αριθμό φλεγμονωδών κυττάρων (Rubin, 2002).

Ινοπλασία καλείται η διαδικασία πολλαπλασιασμού και μετανάστευσης των ινοβλαστών στην περιοχή του τραύματος και λαμβάνει χώρα από την 3^η ημέρα του τραυματισμού έως εβδομάδες μετά. Οι ινοβλάστες ελκύνονται στην περιοχή από προϊόντα των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων και μακροφάγων, όπως ο PDGF και ο TGF-β, ενώ μιτογόνο δράση επί των ινοβλαστών ασκούν οι παράγοντες FGF, EGF, IGF-1. Οι ινοβλάστες ξεκινούν την μετανάστευσή τους με την σύνδεση των ιντεγκρινών που φέρουν στην επιφάνειά τους, με συστατικά της ECM (ινονεκτίνη, βιτρονεκτίνη, ινική). Αφού συνδεθούν, μέσω κυτταροπλασματικών προσεκβολών που οφείλονται στη συνεχή αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και συγκεκριμένα των ινιδίων ακτίνης, κινούνται κατά μήκος της εκάστοτε δομής της ECM (Menke et al., 2006). Καθώς οι ινοβλάστες μεταναστεύουν κατά μήκος του δικτύου θρόμβου ινικής - ινονεκτίνης και άλλων ECM πρωτεϊνών, εναποθέτουν τα προϊόντα σύνθεσής τους, όπως πρωτεϊνογλυκάνες, ελαστίνη και το κυριότερο όλων, το κολλαγόνο (Li et al., 2007). Η σύνθεση του κολλαγόνου είναι μείζονος σημασίας στην φάση του πολλαπλασιασμού και της αναδιαμόρφωσης (Menke et al., 2006). Η εναπόθεση του κολλαγόνου είναι εμφανέστερη κατά την 4^η ημέρα. Αρχικά επικρατεί το κολλαγόνο τύπου III, αλλά μετά από μια εβδομάδα αφθονεί ο τύπος I και τελικά γίνεται ο βασικός τύπος κολλαγόνου του ώριμου ουλώδους ιστού. Ωστόσο το κολλαγόνο δεν είναι το προϊόν εκείνο που εναποτίθεται πρώτο στην περιοχή του τραύματος. Η ινονεκτίνη και το υαλουρονικό οξύ είναι οι πρώτες γλυκοπρωτεΐνες που εναποτίθενται, ενώ οι πρωτεϊνογλυκάνες εμφανίζονται αργότερα (Rubin, 2002). Οι ινοβλάστες έχουν την ικανότητα να αλλάζουν τον φαινότυπό τους σε μυοϊνοβλάστες, οι οποίοι ευθύνονται για την συστολή του τραύματος. Η μετανάστευση των μυοϊνοβλαστών πραγματοποιείται κατά την 2^η – 3^η ημέρα. Η μείωση του μεγέθους του τραύματος μπορεί κάτω από ορισμένες συνθήκες να φτάσει το 70%. Όταν οι ινοβλάστες ολοκληρώσουν το έργο τους, είναι περιττοί και απομακρύνονται με την διαδικασία της απόπτωσης (Rubin, 2002; Velnar et al., 2009).

Αγγειογένεση είναι ο μηχανισμός διαμόρφωσης νέων αγγείων, που επιτελείται παράλληλα με την διαδικασία της ινοπλασίας και έχει κινητοποιηθεί από πρώιμα στάδια της επούλωσης. Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, τα μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα απελευθερώνουν αυξητικούς και μιτογόνους παράγοντες, στους οποίους περιλαμβάνονται οι FGF, VEGF, PDGF, TGF-α, TGF-β, αγγειοποιητίνη και η

αγγειογενίνη. Οι παράγοντες αυτοί επιδρούν στα ενδοθηλιακά κύτταρα από την περιοχή κοντά στο τραύμα, επάγοντας τον πολλαπλασιασμό και την μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων στο σημείο της βλάβης (Tonnesen et al., 2000). Χημειοτακτικά, ως προς τα ενδοθηλιακά κύτταρα λειτουργεί και η υποξία του τραύματος και του πέριξ ιστού. Η αγγειογένεση είναι μια διαδικασία που ελέγχεται αυστηρά από την λεπτή ισορροπία μεταξύ ενεργοποιητών και αναστολέων (Velnar et al., 2009).



Εικόνα 1.6: Σχηματική αναπαράσταση των φυσιολογικών μηχανισμών της επούλωσης κατά την φάση του πολλαπλασιασμού (Sun, 2014).

Η χημειοταξία, επιτελείται από τους VEGF, PDGF, TGF-α, TGF-β, αγγειοποιητίνη, ινική και λιπιδικούς αυξητικούς παράγοντες. Συνέπεια της χημειοταξίας είναι η μετανάστευση, που απαιτεί αρχικά την εξώθηση, εν συνεχεία την προσκόλληση και τελικά την έλξη του κυττάρου. Η εξώθηση του ενδοθηλιακού κυττάρου αρχίζει με τη διπλή πρόσδεση του κυτταροσκελετού του σε συζεύξεις μεταξύ δυο άλλων ενδοθηλιακών, αλλά και μεταξύ συζεύξεων ενδοθηλιακού κυττάρου με δομή της ECM, παρέχοντας μηχανική υποστήριξη. Η κίνηση επιτελείται λόγω της συντονισμένης και συνεχούς αναδιαμόρφωσης των ινιδίων ακτίνης του κυτταροσκελετού. Ο ρυθμός της μετανάστευσης είναι ανάλογος του βαθμού προσκόλλησης και αντιστρόφως ανάλογος του χρόνου (Velnar et al., 2009). Η προσκόλληση στο στερεό υπόστρωμα της ECM γίνεται με την βοήθεια των ιντεγκρινών, κυρίως της ανβ3, στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών (Reinke et al., 2012). Τέλος η έλξη των παρακείμενων ιστών οφείλεται στις συσταλτικές δυνάμεις που ασκούνται μεταξύ ιντεγκρινών και συστήματος ακτίνης-μυοσίνης του κυτταροσκελετού και επιτρέπουν την έλξη του κυτταροπλάσματος και άρα ολόκληρου του κυττάρου προς τα εμπρός. Όσο πιο ισχυρές είναι οι συζεύξεις τόσο πιο αποτελεσματική είναι η μετανάστευση (Velnar et al., 2009).

Υπό την επήρεια αυτών των ερεθισμάτων και ακολουθώντας τους παραπάνω μηχανισμούς εντός 48-72 ωρών από τον τραυματισμό, τα ενδοθηλιακά κύτταρα αρχίζουν να διαιρούνται κοντά στην βλάβη και να σχηματίζουν συμπαγείς εκβλαστήσεις που προβάλλουν από τα προϋπάρχοντα αγγεία. Οι αγγειακές εκβλαστήσεις διακλαδίζονται και αναστομώνονται προς σχηματισμό νέου τριχοειδικού δικτύου. Αυτά τα εκβλαστικά τριχοειδή τείνουν να προβάλλουν μέσα από την επιφάνεια του τραύματος ως μικροί ερυθροί κόκκοι προσδίδοντας στον ιστό το όνομα «κοκκιδώδης». Τελικά τμήματα του νέου τριχοειδικού δικτύου διαφοροποιούνται προς αρτηρίδια και φλεβίδια (Rubin, 2002).

Επιθηλιοποίηση είναι η διαδικασίας αναδόμησης μιας ακέραιης επιδερμίδας και περιλαμβάνει τις διεργασίες του πολλαπλασιασμού, της μετανάστευσης των κερατινοκυττάρων, την διαφοροποίηση του νεοσχηματισμένου επιθηλίου και την σύσταση μιας ακέραιης βασικής στιβάδας που συνδέει την επιδερμίδα με τις υποκείμενες δομές (Li et al., 2007).

Το πρώτο 24ωρο από τον τραυματισμό ξεκινά η συγκεντρική μετανάστευση και ο πολλαπλασιασμός των κερατινοκυττάρων από τα άκρα της βλάβης και των βασικών κυττάρων της επιδερμίδας από το τριχικό θυλάκιο (Rubin, 2002). Η διαδικασία αυτή ενεργοποιείται από κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες όπως οι EGF, KGF, IGF-1 και NGF (Reinke et al., 2012). Τα κερατινοκύτταρα μπορούν να κινηθούν με την βοήθεια ελασματοποδίων, που σχηματίζονται από τον συνεχή πολυμερισμό των ινιδίων ακτίνης του κυτταροσκελετού και την σύσπαση των τονοϊνιδίων, ενώ μέσω των ιντεγκρινών τους συνδέονται με συστατικά της ECM (Reinke et al., 2012; Li et al., 2007). Η κίνηση αυτή απαιτεί απώλεια της επαφής των κερατινοκυττάρων τόσο με τα άλλα κερατινοκύτταρα (διάσπαση δεσμοσωμάτων), όσο και με την βασική μεμβράνη (διάσπαση ημι-δεσμοσωμάτων), με την βοήθεια των μεταλλοπρωτεασών κολλαγενάση και ελαστάση (Reinke et al., 2012). Κατά τον ίδιο χρόνο, αυτή η απώλεια επαφής δρά ως ερέθισμα για την μετανάστευση των κυττάρων. Συγχρόνως τα επιδερμικά βασικά κύτταρα σε επαφή με τα κύτταρα που μεταναστεύουν υφίστανται διαίρεση (Rubin, 2002).

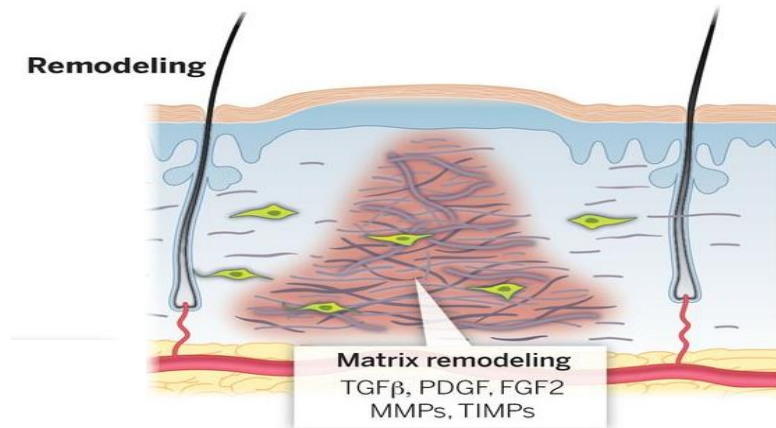
Το αποτέλεσμα της συγχρονισμένης μετανάστευσης και της κυτταρικής διαίρεσης είναι η προοδευτική κάλυψη του επιδερμικού ελλείμματος (παράλληλα λαμβάνουν χώρα αγγειογένεση/ινοπλασία) και η απομάκρυνση των υπολειμμάτων του αρχικού πύγματος (εσχάρα) προς την επιφάνεια. Η επαφή με άλλα κερατινοκύτταρα πιθανώς να αποτελεί το ερέθισμα αναστολής της μετανάστευσης και έχει σαν αποτέλεσμα, αρχικά, στην περιοχή του τραύματος να σχηματίζεται μονοστιβαδικό επιθήλιο με πολλαπλές στιβάδες στην περιφέρεια (Rubin, 2002; Li et al., 2007). Τα προσελκυσόμενα κύτταρα (κερατινοκύτταρα και ινοβλάστες) έχουν την δυνατότητα να εκκρίνουν συστατικά της βασικής μεμβράνης (Rubin, 2002). Με την ανασύσταση της βασικής μεμβράνης, 7-9 ημέρες μετά τον τραυματισμό και την ολοκλήρωση της διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων, αποκαθίσταται η ακεραιότητα και η λειτουργικότητα του δέρματος (Li et al., 2007).

1.3.4. ΦΑΣΗ ΑΝΑΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ

Στόχος της φάσης αυτής είναι η αναδιαμόρφωση της αρχικής ECM (Εικόνα 1.7) προς σχηματισμό του ώριμου ουλώδους ιστού, που μεγιστοποιεί την αντοχή του τραύματος (Menke et al., 2006). Η σύνθεση της ECM ξεκινά από την φάση του πολλαπλασιασμού, παράλληλα με τον σχηματισμό του κοκκιώδους ιστού και μπορεί να διαρκέσει 1 ή 2 ή περισσότερα χρόνια (Velnar et al., 2009). Οι διεργασίες αναδιαμόρφωσης της δερμίδας διεξάγονται κάτω από τον αυστηρό έλεγχο των μηχανισμών σύνθεσης νέου και αποδόμησης του αρχικού κολλαγόνου, ώστε να παραχθεί επαρκής ποσότητα και σωστός τύπος κολλαγόνου που θα οδηγήσει στην ορθή επούλωση (Li et al., 2007; Velnar et al., 2009).

Οι ινοβλάστες είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή των διαφόρων τύπων κολλαγόνου και άλλων συστατικών της ECM, όπως ινονεκτίνης και γλυκοσαμινογλυκανών. Αρχικά η ECM αποτελείται από κολλαγόνο τύπου III (κοκκιώδης ιστός), που βαθμιαία μετά την 3 εβδομάδα και εντός του πρώτου έτους από τον τραυματισμό αντικαθιστάται με το ισχυρότερο κολλαγόνο τύπου I (Li et al., 2007; Reinke et al., 2012). Το κολλαγόνο αρχικά εναποτίθεται με τυχαία διάταξη, ενώ στην συνέχεια οι μεμονωμένες ίνες του κολλαγόνου αναδιαμορφώνονται μέσω διασταυρούμενων συνδέσεων, που είναι ευθυγραμμισμένες με τις γραμμές του Langer και αντιστοιχούν στον φυσιολογικό προσανατολισμό του κολλαγόνου (Tejiram et al., 2016). Η διαδικασία της αναδιαμόρφωσης ρυθμίζεται από πλειάδα παραγόντων που περιλαμβάνει τους PDGF, TGF- β και FGF (Velnar et al., 2009). Η λύση του αρχικού-τύπου III γίνεται από μεταλλοπρωτεάσες της θεμέλιας ουσίας (MMPs), με κυριότερη την κολλαγενάση. Η ελαστάση, πρωτεάση των ουδετερόφιλων, είναι επίσης σημαντικό μόριο για την αναδιαμόρφωση της ECM, καθώς είναι σε θέση να αποδομεί σχεδόν όλους τους τύπους πρωτεϊνικών μορίων. Η δράση του ρυθμίζεται αυστηρά από αναστολείς των πρωτεασών, με κύριους εκπρόσωπους τους TIMPs, α 1-PI και α 2-μακροσφαιρίνη (Menke et al., 2006). Η ισορροπία μεταξύ MMPs και των αναστολέων τους οδηγεί σε ορθή εναπόθεση κολλαγόνου και μηχανική αντοχή του τραύματος, έως και 80% σε σύγκριση με τον μη τραυματισμένο ιστό (Velnar et al., 2009).

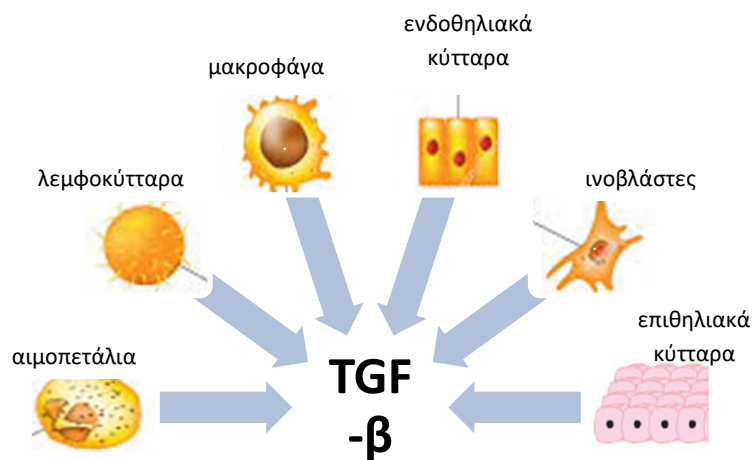
Οι μυοϊνοβλάστες στην συνέχεια προκαλούν συστολή του τραύματος μέσω των πολλαπλών τους συνδέσεων με το κολλαγόνο και βοηθούν στην μείωση της επιφάνειας του υπό ανάπτυξη ουλώδους ιστού. Επιπλέον, καθώς η ουλή ωριμάζει η αγγειογενετική διαδικασία περιορίζεται, μετατρέποντας τον αγγειοβριθή κοκκιώδη ιστό σε μια πτωχή σε αγγεία ουλή (Reinke et al., 2012; Rubin, 2002).



Εικόνα 1.7: Σχηματική αναπαράσταση της φάσης της αναδιαμόρφωσης και των παραγόντων που συμμετέχουν στη φάση αυτή (Sun, 2014).

1.4. TGF-β

Ο μετασχηματίζων αυξητικός παράγοντας TGF-β1 είναι μια κυτταροκίνη με ευρύ φάσμα δραστηριοτήτων στην επουλωτική διαδικασία, τόσο λόγω των ποικίλων τύπων κυττάρων που τον παράγουν, αλλά των ποικίλων κυττάρων που ανταποκρίνονται σε αυτόν (Roberts & Sporn, 1990). Ο TGF-β απελευθερώνεται κατά την αποκοκκίωση των αιμοπεταλίων και εκκρίνεται από όλους τους κύριους τύπους κυττάρων που συμμετέχουν στη επούλωση, συμπεριλαμβανομένων των λεμφοκυττάρων, των μακροφάγων, των ενδοθηλιακών, των λείων μυϊκών, των επιθηλιακών κυττάρων, καθώς και των ινοβλαστών (Εικόνα 2.8).



Εικόνα 1.8: Παλίνδρομη σχέση TGF-β και κυτταρικών τύπων που μετέχουν στην επούλωση.

Ο TGF- β επηρεάζει σχεδόν κάθε στάδιο της επιδιόρθωσης των ιστών. Απελευθερώνεται από τα α κοκκία των αιμοπεταλίων υπό την ανενεργή μορφή του και μόλις ενεργοποιηθεί, λειτουργεί ως ισχυρότατος χημειοτακτικός παράγοντας, καθώς διεγείρει τη μετανάστευση μονοκυττάρων, λεμφοκυττάρων, ουδετερόφιλων και ινοβλαστών στην περιοχή του τραύματος (Wahl et al., 1987; Postlethwaite et al., 1987; Adams et al. 1991; Brandes et al., 1991). Σε όλους τους τύπους κυττάρων που μελετήθηκαν μετά από χορήγηση TGF- β , η χημειοταξία διεγείρονταν σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Ενώ όμως, ο TGF- β ρυθμίζει τη μετανάστευση διαφόρων τύπων κυττάρων, το τελικό αποτέλεσμα φαίνεται να εξαρτάται τόσο από το κυτταρικό όσο και από το γενικότερο περιβάλλον (context). Συγκεκριμένα, ο TGF- β φάνηκε να αναστέλλει τη μετανάστευση λείων μυϊκών κυττάρων μετά από τραυματισμό σε *in vitro* μονοστιβαδικές καλλιέργειες (Sato & Rifkin, 1989), ενώ αυξάνει τη μετανάστευση των κερατινοκυττάρων τόσο *in vitro* όσο και σε καλλιέργεια οργάνων (Hebda, 1988; Nickoloff et al., 1988). Αν και ο TGF- β έχει χημειοτακτική επίδραση προς τους ινοβλάστες, σε προσδιορισμούς που έγιναν σε θάλαμο Boyden, αναστέλλει τη μετανάστευσή τους σε τρισδιάστατες μήτρες πηκτώματος κολλαγόνου (Ellis et al., 1992).

Ο TGF- β εμπλέκεται και στη ρύθμιση της αγγειογένεσης. Η πρώτη ένδειξη ότι ο TGF- β είχε αγγειογενετικές ιδιότητες προέκυψε από *in vivo* πειράματα υποδόριας χορήγησης TGF- β σε τραυματισμένους αρουραίους (Sporn et al., 1983) και σε υγιείς νεογνήτους ποντικούς (Roberts et al, 1986), όπου ο TGF- β προκάλεσε το σχηματισμό αγγειοβριθούς κοκκιώδους ιστού. Ωστόσο και στην περίπτωση της αγγειογένεσης, βάσει *in vitro* πειραμάτων, φάνηκε ότι η ικανότητα του TGF- β να διεγείρει ή να αναστέλλει το σχηματισμό ενδοθηλιακών σωληναριακών δομών, είναι συνεκφραζόμενη, ανάλογη με τη συγκέντρωσή του και την παρουσία άλλων κυτοκινών όπως ο βασικός αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών, αλλά και το περιβάλλον των ενδοθηλιακών κυττάρων (Pepper et al., 1993; Merwin et al., 1990; Gajdusek et al., 1993).

Οι επιδράσεις του TGF- β στην εξωκυττάρια μήτρα σχετίζονται από την μια πλευρά με την αύξηση και την ωρίμανση της, αλλά και την αποτοχή/συστολή των τραυμάτων, ενώ από την άλλη πλευρά η συσσώρευση παθολογικής εξωκυττάριας μήτρας σχετίζεται με την ινωτική νόσο (Roberts & Sporn, 1992a; Noble et al., 1992). Κατά την δερματική επούλωση, το κύτταρο στόχος είναι ο ινοβλάστης, ο οποίος αρχικά διεγείρεται χημειοτακτικώς σε απόκριση του TGF- β και μεταναστεύει στην περιοχή του τραύματος. Εκεί ο TGF- β ρυθμίζει τη μεταγραφή ενός ευρέος φάσματος πρωτεϊνών της εξωκυττάριας μήτρας από τους ινοβλάστες, όπως το κολλαγόνο, τη φμπρονεκτίνη και τις γλυκοζαμινογλυκάνες. Ειδικά όσον αφορά την παραγωγή κολλαγόνου, ο TGF- β προκαλεί ισχυρή διέγερση, όπως έχει δείχθει τόσο *in vitro* όσο και σε ζωικά μοντέλα *in vivo* (Roberts, 1992; Schiller, 2004; Zervolea, 2005; Pratsinis, 2013).

Πειραματικά, σε επιθηλιακά κύτταρα μαζικού ιστού, έχει φανεί ότι η αλληλεπίδραση του TGF- β και της εξωκυττάριας μήτρας είναι αμφίδρομη (Nathan & Sporn, 1991) και ότι η παθολογική συσσώρευση μήτρας μπορεί να προκύψει από την υπερπαραγωγή του TGF- β ,

αλλά και από λανθασμένη σηματοδότησης που προέρχεται από τη μήτρα, που υπό φυσιολογικές συνθήκες θα έπρεπε να τερματίζει ή να καταστέλλει την έκφραση του TGF-β.

Η επίδραση του TGF-β στην επανεπιθηλίωση, βάσει in vivo πειραμάτων (δέρμα των χοίρων-Hebda, 1988; Ksander et al., 1990a ;Quaglino et al., 1990), φάνηκε να είναι δοσοεξαρτώμενη και επιπλέον ότι είναι απίθανο η χρήση του TGF-β σε μια κατάλληλη κλίμακα δόσεων, να έχει δυσμενείς επιδράσεις στο στάδιο της επανεπιθηλίωση .

1.5. ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ ΤΗΣ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ ΤΡΑΥΜΑΤΟΣ

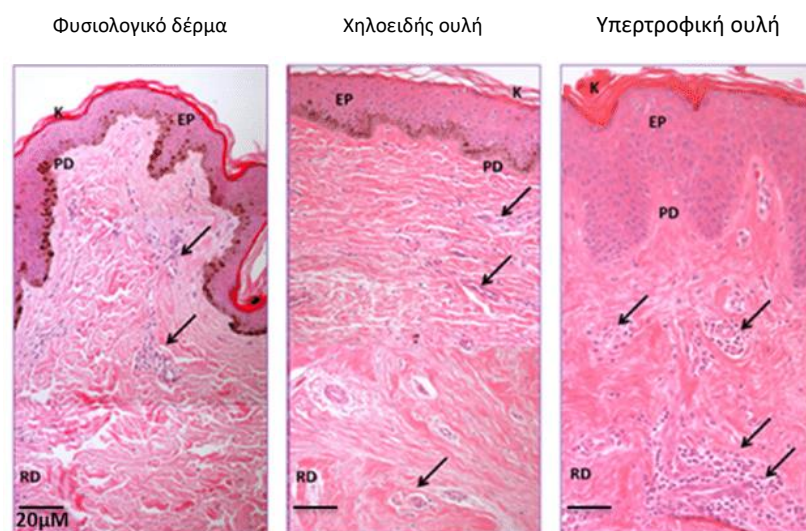
Οι παράγοντες που επηρεάζουν την επούλωση ενός τραύματος και είναι δυνατόν να οδηγήσουν σε επιπλοκές, θα μπορούσαν να διακριθούν σε τοπικούς και συστηματικούς.

Στους **τοπικούς παράγοντες** συγκαταλέγονται το μέγεθος, η ανατομική θέση και η φύση του τραύματος. Σε ένα μικρού μεγέθους, άσηπτο τραύμα η επούλωση είναι ταχύτερη από ότι σε ένα τραύμα που προκαλείται από μια αμβλεία κάκωση. Ο χρόνος επούλωσης είναι μικρότερος σε αγγειοβριθείς περιοχές, καθώς και θέσεις όπου το δέρμα δεν προσφύεται σε οστικές επιφάνειες. Η αγγειακή τροφοδοσία της προσβεβλημένης περιοχής είναι παράγοντας μείζονος σημασίας για τους μηχανισμούς της επούλωσης. Η μειωμένη αγγειακή τροφοδοσία, όπως συμβαίνει σε ασθενείς διαβητικούς με ισχαιμικά έλκη ή αρτηριακή απόφραξη, επιβραδύνει την επουλωτική διαδικασία. Τα τραύματα αποτελούν πύλη εισόδου για μικρό-οργανισμούς και η λοίμωξη που μπορεί να προκαλέσουν κινητοποιεί μηχανισμούς που επάγουν τον σχηματισμό υπερβολικού κοκκιώδους ιστού με πιθανό αποτέλεσμα υπερτροφικές ουλές. Ένας ακόμη παράγοντας που μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την επούλωση είναι η πρόωρη κινητοποίηση του ασθενούς, πριν αποκατασταθεί μια επαρκής δύναμη τάσης στον ουλώδη ιστό (Rubin, 2002).

Οι **κυριότεροι συστηματικοί παράγοντες** είναι η κατάσταση του κυκλοφορικού συστήματος που καθορίζει την παροχή του αίματος στην προσβεβλημένη περιοχή, οι συστηματικές λοιμώξεις που καθυστερούν την επούλωση των τραυμάτων, η μεταβολική κατάσταση και η καλή ή κακή θρέψη του τραυματία. Ο αρρυθμιστος σακχαρώδης διαβήτης σχετίζεται με καθυστέρηση της επούλωσης των τραυμάτων, ενώ τα τραύματα των ασθενών με διαβήτη συχνά επιμολύνονται και η λοίμωξη με την σειρά της απορρυθμίζει τον διαβήτη, ενώ η ύπαρξη διατροφικών ανεπαρκειών όπως το σκορβούτο, αναστέλλουν την επουλωτική διαδικασία (Rubin, 2002).

Διαταραχές σε οποιοδήποτε φάση της επούλωσης, όπως χρονική παράταση ή μη ολοκλήρωση κάποιου σταδίου οδηγεί σε ανατομικές και λειτουργικές επιπλοκές του ιστού (Menke et al., 2006). Οι κυριότερες επιπλοκές είναι ο ανεπαρκής σχηματισμός ουλής, η υπερβολική ουλοποίηση και η υπερβολική σύσπαση (Rubin, 2002).

Ο ανεπαρκής σχηματισμός της ουλής οφείλεται σε μειωμένο σχηματισμό κοκκιδώδους ιστού ή αδυναμία ορθής σύνθεσης των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας. Πιθανά αποτελέσματα αυτής της αδυναμίας είναι η διάνοιξη του τραύματος, λόγω μηχανικής τάσης ή και η εξέλκωση. Από την άλλη πλευρά, η υπέρμετρη άθροιση πρωτεϊνών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και κυρίως του κολλαγόνου οδηγεί στον σχηματισμό υπερτροφικής ή χηλοειδούς ουλής (Rubin, 2002). Τα χηλοειδή τραύματα εκτείνονται και πέρα από τα όρια του τραυματισμού ενώ οι υπερτροφικές ουλές περιορίζονται στα όρια αυτά (Martin & Nunan, 2015). Μια ακόμη επιπλοκή που μπορεί να προκύψει κατά την επούλωση τραυμάτων του δέρματος και συχνότερα στην περίπτωση σοβαρών εγκαυμάτων είναι η μόνιμη σύσπαση του τραύματος και των παρακείμενων ιστών που καθιστούν την συγκεκριμένη περιοχή δυσλειτουργική (Rubin, 2002).



Εικόνα 1.9: Ιστολογικές τομές φυσιολογικού δέρματος σε σύγκριση με υπερτροφική και χηλοειδή ουλή. Η σημαντική διαφορά στη διάταξη των ινών κολλαγόνου μπορεί να παρατηρηθεί μεταξύ των διαφόρων τμημάτων του ιστού (βέλη) καθώς και σε περιοχές με υψηλή κυτταρική πυκνότητα για την χηλοειδή και την υπερτροφική ουλή (Suarez ,2014). *K: κεράτινη στιβάδα, EP: επιδερμίδα, PD: θηλώδης δερμίδα, RD: δικτυωτή δερμίδα.

Ίνωση

Η ίνωση ορίζεται από την υπερβολική συσσώρευση συστατικών του ινώδους συνδετικού ιστού όπως το κολλαγόνο και η ινονεκτίνη εντός και πέριξ του φλεγμονώδους ή κατεστραμμένου ιστού, που μπορεί να οδηγήσει σε μόνιμη ουλοποίηση, οργανική δυσλειτουργία ή και θάνατο. Η ίνωση μπορεί να επηρεάσει σχεδόν όλους τους ιστούς (Wynn & Ramalingam, 2013). Οι βασικοί κυτταρικοί διαμεσολαβητές της ίνωσης είναι οι μυοινοβλάστες, οι οποίοι όταν ενεργοποιούνται λειτουργούν ως το κύριο κύτταρο που

παράγει κολλαγόνο. Οι μυοϊνοβλάστες μπορεί να προέρχονται από διάφορους κυτταρικούς τύπους, όπως αυτοί των επιθηλιακών και των ενδοθηλιακών κυττάρων (μέσω του μηχανισμού επιθηλιακής/ενδοθηλιακής-μεσεγχυματικής μετάβασης - EMT/EndMT), όμως οι περισσότεροι προέρχονται από ιστικούς ινοβλάστες. Επίσης, είναι δυνατή η προέλευση τους από κυκλοφορούντα κύτταρα που μοιάζουν με ινοβλάστες, που ονομάζονται ινοκύτταρα και προέρχονται από βλαστικά κύτταρα του μυελού των οστών. Η φαινοτυπική ετερογένεια των ινοβλαστών στον συνδετικό ιστό είναι μεγάλη (V Sarrazy et al., 2011). Οι μυοϊνοβλάστες ενεργοποιούνται παρακρινικά από τα λεμφοκύτταρα και τα μακροφάγα, αυτοκρινώς από παράγοντες που εκκρίνονται από μυοϊνοβλάστες και από μόρια που φέρουν ειδικά παθογόνο-σχετιζόμενα μοριακά μοτίβα (Pathogen-associated molecular patterns - PAMPS) που αλληλεπιδρούν με υποδοχείς αναγνώρισης τύπου Toll (Toll Like Receptors-TLRs) των ινοβλαστών. Οι κυτταροκίνες IL-13, IL-21, **TGF-β** (από τους σημαντικότερους παράγοντες), οι χημειοκίνες των μονοκυττάρων, ο αγγειακός αυξητικός παράγοντας (VEGF), ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων (PDGF), οι πρωτεΐνες οξείας φάσης (SAP), οι κασπάσες και συστατικά του συστήματος ρενίνης-αγγειοτασίνης-αλδοστερόνης, έχουν αναγνωρισθεί ως σημαντικοί ρυθμιστές της ινωτικής διαδικασίας (TA Wynn, 2008). Οι ενεργοποιημένοι μυοϊνοβλάστες είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή και εναπόθεση κυρίως κολλαγόνου και άλλων πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας στον τραυματισμένο ιστό (Wynn and Ramalingam, 2013).

Ο TGF-β1, στον οποίο έχουμε ήδη αναφερθεί (1.4.), είναι ένας ισχυρός επαγωγέας της μυοϊνοβλαστικής ενεργοποίησης, διαφοροποίησης και απόπτωσης, με αποτέλεσμα να προάγει την απόθεση ECM. Επίσης μειώνει την δράση των μεταλλοπρωτεασών MMP, μέσω προώθησης της έκφρασης των αναστολέων τους (TIMP), διαταράσσοντας την ισορροπία MMP/TIMP που απαιτείται για την ορθή διαδικασία της ινοπλασίας. Ο TGF-β1 και γενικά η οικογένεια TGF-β έχει ανοσολογικές λειτουργίες και ογκογόνο/μεταστατική δράση (Sarrazy et al., 2011; Arno et al., 2013). Ο TGF-β1 είναι από τους πιο μελετημένους παράγοντες της ινωτικής διαδικασίας και ένας από τους κύριους στόχους των ερευνών που αφορούν μόρια με πιθανή επουλωτική, αντί – ινωτική και αντιφλεγμονώδη δράση.

1.6. ΕΠΟΥΛΩΣΗ ΤΡΑΥΜΑΤΩΝ ΕΙΔΙΚΩΝ ΙΣΤΩΝ

Οι γενικές αρχές της επούλωσης είναι παρόμοιες για όλους τους ιστούς, όμως κάθε όργανο περιέχει τα δικά του εξειδικευμένα κύτταρα και διαφορετική εξωκυττάρια ουσία, με αποτέλεσμα να οργανώνει εξειδικευμένη απάντηση στους εκάστοτε τραυματισμούς (Rubin, 2002).

Τα ηπατικά κύτταρα έχουν έντονο αναγεννητικό δυναμικό και ως εκ τούτου η πλήρης ιστική αναγέννηση είναι εφικτή σε μεγάλο ποσοστό. Η χρονιότητα της βλάβης καθορίζει αν θα αποκατασταθεί η φυσιολογική αρχιτεκτονική ή θα σχηματιστεί ουλή (Rubin, 2002). Τα κύτταρα που εμπλέκονται στην παθογένεση της ίνωσης του ήπατος είναι τα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα που (Hepatic Stellate Cells), τα οποία μετασχηματίζονται προς έναν φαινότυπο τύπου μυοϊνοβλαστών που οδηγεί στην παραγωγή περίσσειας πρωτεϊνών της εξωκυττάριας μήτρας, ιδιαίτερα κολλαγόνου, καθώς και αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Hye Kyung Kim et al., 2009).

Αντίθετα ο νεφρός εμφανίζει γενικά περιορισμένη αναγεννητική ικανότητα και έχει ιδιαίτερη σημασία η θέση της βλάβης. Η αναγεννητική ικανότητα του νεφρικού ιστού είναι μέγιστη στα σωληνάκια του φλοιού, μικρότερη στα σωληνάκια του μυελού και ανύπαρκτη για τα σπειράματα (Rubin, 2002). Ο μετασχηματισμός των επιθηλιακών κυττάρων των σωληναρίων, μέσω της επιθηλιακής-μεσεγχυματικής μετάβασης (Epithelial Mesenchymal Transition - EMT) σε μεσεγχυματικούς ινοβλάστες, που αποτελούν την κύρια πηγή πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας είναι ο κύριος μηχανισμός της νεφρικής ίνωσης. Η EMT ρυθμίζεται από τον TGFβ-1 μέσω του SMAD μονοπατιού (Efstratiadis et al., 2009).

Το αναπνευστικό επιθήλιο χαρακτηρίζεται από ισχυρό αναγεννητικό δυναμικό, εφόσον ότι το υποκείμενο στρώμα εξωκυττάριας ουσίας παραμένει αβλαβές. Σε αντίθετη περίπτωση ο βαθμός της επούλωσης ποικίλλει, ενώ μπορεί να παρατηρηθεί και ίνωση (Rubin, 2002). Η ίνωση του αναπνευστικού επιθηλίου αποτελεί αντικείμενο μελέτης από πολλούς ερευνητές με ιδιαίτερο ενδιαφέρον στους μηχανισμούς που ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό, την ενεργοποίηση και τη διαφοροποίηση των μυοϊνοβλαστών που εκκρίνουν κολλαγόνο (Wynn, 2011).

Τα κύτταρα του μυοκαρδίου έχουν χαμηλό αναγεννητικό δυναμικό και η μυοκαρδιακή νέκρωση οδηγεί τελικώς σε ίνωση με εναπόθεση υπερβολικής ποσότητας ECM από τους ενεργοποιημένους ινοβλάστες (Rubin, 2002), γεγονός που μπορεί να προκαλέσει άμεσα, αναποτελεσματική συστολή τόσο στη νεκρωμένη περιοχή, όσο και στο υπόλοιπο υγιές μυοκάρδιο οδηγώντας σε έκπτωση της καρδιακής λειτουργίας (Krenning et al., 2010)

Ιδιαίτερη περίπτωση επούλωσης αποτελεί το νευρικό σύστημα και αυτό διότι οι ώριμοι νευρώνες, ως μόνιμα μεταμιτωτικά κύτταρα δεν μπορούν να διαιρεθούν. Μια κάκωση του περιφερικού νευρικού άξονα έχει την ικανότητα επούλωσης, ικανότητα που στερούνται οι δομές του κεντρικού νευρικού συστήματος (Rubin,2002).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΘΥΜΟΣΙΝΕΣ ΚΑΙ ΕΠΟΥΛΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

2.1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ- ΘΥΜΟΣΙΝΙΚΟ ΚΛΑΣΜΑ 5

Οι πρώτες προσπάθειες για τον προσδιορισμό της πραγματικής λειτουργίας του θύμου αδένου χρονολογούνται από το 160 μ.Χ., την εποχή του Γαληνού και ίσως νωρίτερα. Ωστόσο, μέχρι τις αρχές της δεκαετίας του 1960, η λειτουργία του θύμου και η επίδρασή του επί του ανοσοποιητικού συστήματος ήταν άγνωστη, ώσπου οι JFAP Miller, RA Good και οι συνεργάτες τους συσχέτισαν, με πειράματα σε τρωκτικά, την θυμεκτομή με διαταραχές των λειτουργιών του ανοσοποιητικού. Αυτή η συσχέτιση αποτέλεσε το «εναρκτήριο λάκτισμα» για τις μελέτες που οδήγησαν στην ανακάλυψη των θυμοσινών. Η αρχή έγινε το 1964 στο εργαστήριο του A White, όπου οι συνεργάτες του, A Goldstein και JJ Klein κατάφεραν να παρασκευάσουν εκχύλισμα από θύμο αδένου ποντικού, αρουραίου και μοσχარიού που ενίσχυε την λεμφοποίηση και τον *in vivo* πολλαπλασιασμό κυττάρων του ανοσοποιητικού σε λεμφαδένες ποντικών (Goldstein, 2007). Το 1966 παρασκευάστηκε βιοδραστικό εκχύλισμα βόειου θύμου αδένου, το λεγόμενο θυμοσινικό κλάσμα 3 (Thymosin Fraction 3/TF-3) και χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά ο όρος «θυμοσίνη», σε μια προσπάθεια χαρακτηρισμού αυτού του δραστικού λεμφοποιητικού παράγοντα που περιέχεται στο εκχύλισμα, από την ίδια ομάδα. Οι έρευνες συνεχίστηκαν και έως το 1972 ο Goldstein και οι συνεργάτες του κατάφεραν να απομονώσουν από βόειο θύμο αδένου ένα εκχύλισμα, με μια διαδικασία 5 σταδίων, που το ονόμασαν θυμοσινικό κλάσμα 5 /TF-5 (Goldstein, 2007). Οι προκλινικές μελέτες επί των ανοσοενισχυτικών ιδιοτήτων του TF5, που ακολούθησαν, έθεσαν την επιστημονική βάση για τις πρώτες κλινικές δοκιμές με TF5 το 1974. Η χορήγηση TF5 ήταν αποτελεσματική στην ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος ορισμένων παιδιών με σύνδρομο DiGeorge και άλλες θυμικές δυσπλασίες. Αυτές οι δοκιμές οδήγησαν σε περαιτέρω ενδιαφέρον για τα δραστικά συστατικά του TF5 και για τον χημικό χαρακτηρισμό των βιολογικά ενεργών θυμοσινικών πεπτιδίων (Goldstein & Badamchian, 2005).

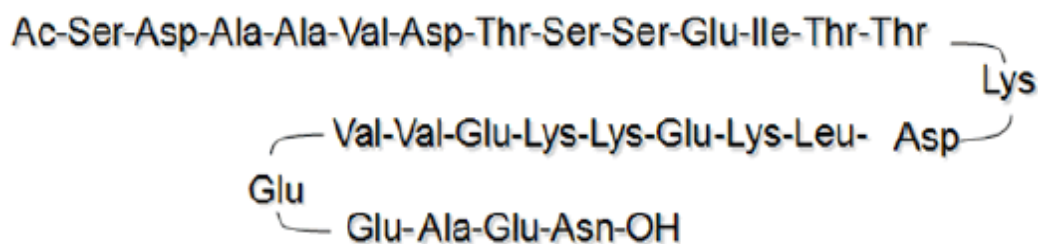
Ενώ αρχικά η «θυμοσίνη» θεωρήθηκε ορμόνη του θύμου αδένου και το μοναδικό συστατικό του TF5, αργότερα αποδείχθηκε ότι αποτελείται από ένα σύνολο περίπου 40 μικρών όξινων πεπτιδίων με μοριακό βάρος που κυμαίνεται από 1 έως 15 kDa και ότι κάποια από τα πεπτίδια αυτά είναι θραύσματα μεγαλύτερων πολυπεπτιδίων που προκύπτουν υπό τις συνθήκες παρασκευής του TF5 (Hannappel & Huff, 2003; Huff et al., 2001; Goldstein, 2007). Τα πεπτίδια του TF5 κατηγοριοποιήθηκαν βάσει του ισοηλεκτρικού σημείου (pI) τους σε α-θυμοσίνες (pI<5), β-θυμοσίνες (pI μεταξύ 5-7) και γ-θυμοσίνες (pI>7), ενώ βάσει της σειράς απομόνωσής τους από το TF5 καθορίζονται από αριθμητικούς δείκτες. Δυο από τα βιολογικά δραστικά μόρια του TF5 είναι η θυμοσίνη α1 (Tα1, το πρώτο πεπτίδιο που απομονώθηκε από το TF5) και η θυμοσίνη β4 (Tβ4). Τα συγκεκριμένα μόρια έχουν αλληλουχηθεί και σήμερα παρασκευάζονται με εργαστηριακές μεθόδους (Goldstein, 2007).

Οι βιολογικές δράσεις των θυμοσινών Τα1 και Τβ4 ποικίλλουν και διακρίνονται σε ενδοκυτταρικές και εξωκυτταρικές, ενώ υπό την αυστηρή έννοια του όρου δεν θεωρούνται πλέον ορμόνες του θύμου αδένος – αντίθετα, έχουν ανιχνευθεί σε πλήθος κυττάρων και ιστών, πέραν του θύμου (Hannappel & Huff, 2003). Ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι τα τελευταία χρόνια τόσο η Τα1, όσο και η Τβ4 μελετώνται ως πιθανοί θεραπευτικοί παράγοντες. Μετά από κλινικές δοκιμές η Τα1 έχει εγκριθεί σε ορισμένες χώρες ως συγχωρηγούμενος παράγοντας για την θεραπεία της ηπατίτιδας Β και C (Garaci et al., 2007), ενώ η Τβ4 μελετάται σε επίπεδο κλινικών δοκιμών ως προς την επουλωτική της δράση, κυρίως σε τραύματα του δέρματος και των οφθαλμών (Kleinman & Sosne, 2016).

2.2. ΘΥΜΟΣΙΝΗ α1 (Τα1)

Η Τα1 είναι πολύ όξινο πεπτιδίο, με ισοηλεκτρικό σημείο 4.2, αποτελούμενο από 28 αμινοξέα (ΜΒ:3.108 Da), το οποίο απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε από το TF5 για πρώτη φορά το 1977 (Goldstein et al., 1977). Λίγο αργότερα, στις αρχές της δεκαετίας 1980, απομονώθηκε από θύμο αδένος αρουραίου ένα μεγαλύτερο πεπτιδίο (111 αμινοξέα), που ονομάστηκε προθυμοσίνη α (ProΤα). Η ProΤα, όπως και η Τα1, είχε ανοσορυθμιστική δράση και θεωρήθηκε πρόδρομο μόριο της Τα1. Τα 28 πρώτα αμινοξέα του Ν-τελικού άκρου της ProΤα είναι ταυτόσημα με αυτά της Τα1 (Haritos et al., 1985). Μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι η Τα1 είναι πιθανόν να παράγεται ενδοκυτταρικά, μετά από πρωτεολυτική διάσπαση της ProΤα παρουσία μιας ασπαραγινυλο-ενδοπεπτιδάσης (Sarandeses et al., 2003), αν και αρκετοί ερευνητές εξακολουθούν να πιστεύουν ότι η Τα1 προκύπτει από την ProΤα μόνον κατά την *in vitro* παρασκευή του TF5.

Η αλληλουχία των αμινοξέων της Τα1 φαίνεται στην Εικόνα 2.1. Η Ν-τελική σερίνη του πεπτιδίου είναι ακετυλιωμένη (Goldstein et al., 1977). Πρόκειται για ένα εξαιρετικά συντηρημένο μόριο, με υψηλή ομολογία πρωτοταγούς δομής σε ποντικούς, βοοειδή και ανθρώπους. Χημική σύνθεση της Τα1 έχει επιτευχθεί με διάφορες τεχνικές σύνθεσης πεπτιδίων τόσο σε διάλυμα, όσο και σε στερεά φάση (A. L. Goldstein, 1993). Τα τελευταία χρόνια έχει επιτευχθεί η έκφραση της Τα1 με τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA, όπως σε πλασμίδια του βακτηρίου *E. coli* (Li et al., 2011).



Εικόνα 2.1: Η αμινοξική αλληλουχία της θυμοσίνης Τα1 (Tuthill & King, 2013).

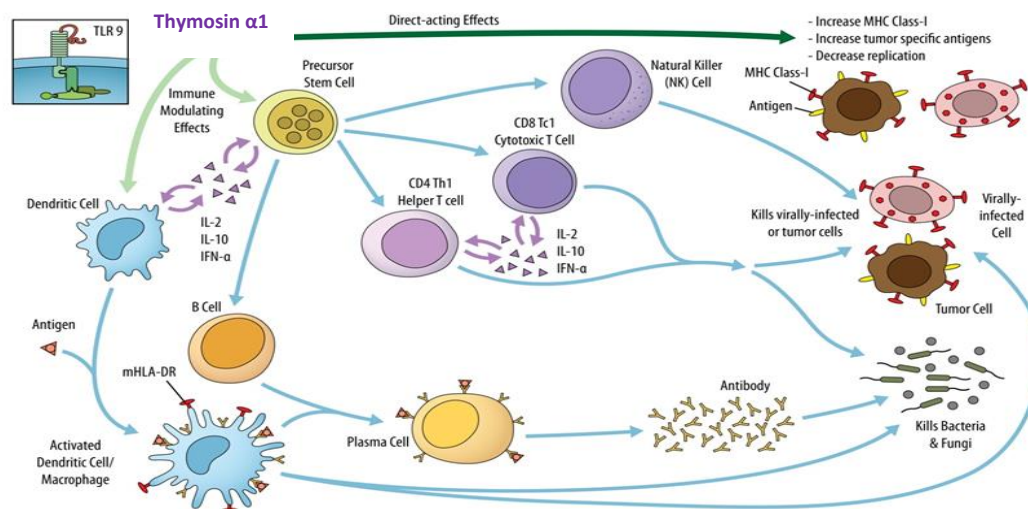
Σύμφωνα με μελέτες φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear magnetic resonance, NMR), σε υδατικό περιβάλλον η Τα1 λαμβάνει τυχαία διαμόρφωση, ενώ παρουσία οργανικού διαλύτη, όπως η τριφθοροαιθυλική αλκοόλη (TFE), η δομή της χαρακτηρίζεται από την παρουσία τμήματος άλφα-έλικας μεταξύ των αμινοξέων 14 και 24 (Volk et al., 2012). Υλικό όμοιο με την Τα1 (Τα1-like ή Τα1-cross-reactive material) έχει ανιχνευθεί σε κύτταρα λεμφικών και μη οργάνων - συγκεκριμένα σε θύμο αδένες, σπλήνα, πνεύμονες, νεφρούς, εγκέφαλο και άλλα όργανα (Tuthill & King, 2013). Αν και ο τρόπος «έκκρισης» της Τα1 στην κυκλοφορία του αίματος δεν είναι μέχρι στιγμής γνωστός, επίπεδα του πεπτιδίου έχουν ανιχνευθεί στον ορό υγιών ενηλίκων, κυρίως με μεθόδους ανοσοανάλυσης (Weller et al., 1992). Ωστόσο, υπάρχει αρκετά μεγάλη διακύμανση στις αναφερόμενες τιμές, ανάλογα με τη μέθοδο προσδιορισμού.

Βιολογικές ιδιότητες της θυμοσίνης α1

Σε *in vitro* και *in vivo* μελέτες που ακολούθησαν την απομόνωσή της, η Τα1 βρέθηκε να είναι 10-1000 φορές δραστικότερη από το TF5 (Goldstein et al., 1977). Σήμερα, η Τα1 θεωρείται ένας «τροποποιητής της βιολογικής απόκρισης» (biological response modifier) που ενεργοποιεί διάφορα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, με πιθανά κλινικά οφέλη σε διαταραχές όπου οι ανοσολογικές αντιδράσεις είναι εξασθενημένες ή αναποτελεσματικές. Στις διαταραχές αυτές περιλαμβάνονται οξείες και χρόνιες μολύνσεις όπως η σοβαρή σήψη, λοιμώξεις μετά από μεταμόσχευση μυελού των οστών, λοιμώξεις των πνευμόνων συμπεριλαμβανομένης της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονικής διαταραχής (COPD), της ηπατίτιδας Β και C και της λοίμωξης με HIV, νεοπλασίες (κυρίως ηπατοκυτταρικός καρκίνος, καρκίνος του πνεύμονα και μελάνωμα), αλλά και η μη ανταπόκριση σε εμβόλια. Το συνθετικής προέλευσης πεπτίδιο έχει αξιολογηθεί σε κλινικές μελέτες και απέκτησε έγκριση εμπορίας/κυκλοφορίας για θεραπευτική χρήση σε πολλές χώρες, κυρίως στην Κίνα (Tuthill & King, 2013; Garaci et al., 2012; Perruccio et al., 2010; Chadwick et al., 2003).

Η κύρια δράση της Τα1 είναι η διέγερση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως τα δένδριτικά κύτταρα (DCs). Σύμφωνα με μελέτες κατά τη δεκαετία 2000, η διέγερση αυτή επάγεται μέσω υποδοχών τύπου Toll (Toll Like Receptors, TLRs), κυρίως μέσω του υποδοχέα TLR9 και της πρωτεΐνης MyD88, και περιλαμβάνει την ενεργοποίηση συγκεκριμένων μονοπατιών ενδοκυτταρικής σηματοδότησης, όπως του μονοπατιού p38 MAPK / NFκB (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) (Romani et al., 2004). Οι TLRs αντιπροσωπεύουν μια οικογένεια πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην ανίχνευση παθογόνο-σχετιζόμενων μοριακών μοτίβων (Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMPs) από κύτταρα της έμφυτης ανοσίας. Οι TLRs είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες. Οι περισσότεροι αποτελούνται από μια εξωκυττάρια περιοχή, πλούσια σε λευκίνη (Leucine Rich Repeats-LRRs), που περιέχει την θέση αναγνώρισης, και μια

κυτταροπλασματική, την Toll / Interleucin 1 receptor -ομόλογη περιοχή (TIR), που είναι υπεύθυνη για τη μεταγωγή του σήματος και την επακόλουθη φλεγμονώδη απάντηση, οδηγώντας τελικά στην εξάλειψη των μολυσματικών παραγόντων. Έχουν αναγνωριστεί και ταυτοποιηθεί 10 τύποι TLR στον ανθρώπινο οργανισμό, οι TLR 1, TLR 2, TLR 3, TLR 4, TLR 5, TLR 6, TLR 7, TLR 8, TLR 9 και TLR10. Ο TLR9 εντοπίζεται στο ενδοσώμα του κυττάρου. (Hoebe, 2017). Σύμφωνα με ορισμένους ερευνητές, η Τα1 μπορεί να αποκτήσει απευθείας πρόσβαση στο κύτταρο διαπερνώντας την κυτταρική μεμβράνη χωρίς βοήθεια, καθώς έχει αναφερθεί ότι μπορεί να διαμορφωθεί σε δομημένη έλικα εντός οργανικών διαλυτών (Tuthill & King, 2013).



Εικόνα 2.2: Σχηματική αναπαράσταση της δράσης της Τα1 επί των κυττάρων του ανοσοποιητικού (Tuthill & King, 2013).

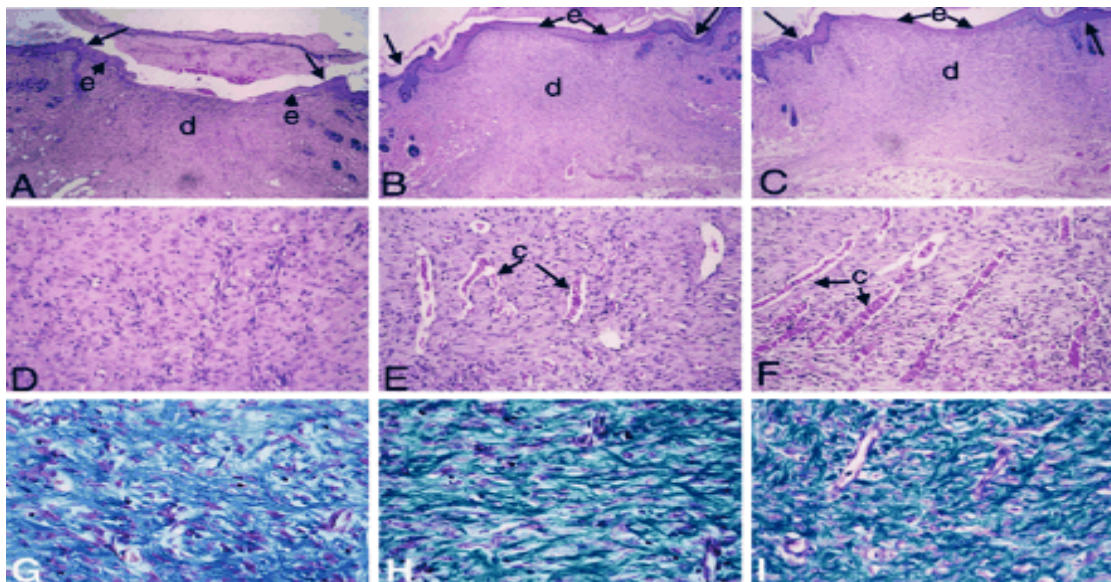
Τα1 και επούλωση

Σε μία από τις ολιγάριθμες σχετικές μελέτες που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία, οι Malinda και συνεργάτες μελέτησαν την επίδραση της Τα1 στη μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων, την αγγειογένεση και την επούλωση πειραματικά προκληθέντων τραυμάτων σε αρουραίους (Malinda et al., 1998). Βάση για τη μελέτη αποτέλεσε η προϋπάρχουσα γνώση ότι η Τα1 είναι ένας τροποποιητής της βιολογικής απόκρισης – ρυθμιστής του ανοσοποιητικού συστήματος, με σημαντικές επιπλέον δράσεις εκτός του ανοσοποιητικού, που σχετίζονται με το ρόλο της Τα1 (και του μητρικού της μορίου, ProΤα), π.χ. στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού κυττάρων, όπως οι ινοβλάστες (Francesco et al., 1992).

Συγκεκριμένα, οι Malinda και συνεργάτες μελέτησαν την επίδραση της Τα1 στην in vitro διαφοροποίηση ενδοθηλιακών κυττάρων της κυτταρικής σειράς HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) καθώς και στη μετανάστευση κυττάρων HUVEC in vitro και in vivo. Τα in vitro αποτελέσματα έδειξαν ότι η Τα1 ενισχύει τον σχηματισμό δομών σωληναριακού τύπου από HUVEC κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε υλικό Matrigel.

Πρόσθετα πειράματα έδειξαν ότι η Τα1 ενεργεί ως χημειοτακτικός παράγοντας. Συγκεκριμένα, *in vitro* πειράματα χημειοτακτισμού (Boyden chamber) με μία ποικιλία κυτταρικών σειρών έδειξαν ότι η μεταναστευτική διέγερση συνέβη ειδικά σε ενδοθηλιακά κύτταρα και μονοκύτταρα.

Σε *in vivo* μελέτες της ίδιας ομάδας φάνηκε ότι η υποδόρια χορήγηση Τα1 διεγείρει την αγγειογένεση. Σε μεταγενέστερη μελέτη άλλων ερευνητών, στην οποία μελετήθηκε η δράση διάφορων θυμοσινικών πεπτιδίων στο μοντέλο αγγειογένεσης της χοριοαλλαντοϊκής μεμβράνης εμβρύου όρνιθας, επιβεβαιώθηκε η αγγειογενετική δράση της Τα1 (Koutrafourgi et al., 2001). Τέλος, στην προαναφερθείσα μελέτη των Malinda και συνεργατών, όταν η Τα1 χορηγήθηκε είτε τοπικά είτε ενδοπεριτοναϊκά, επιτάχυνε την επούλωση σε ένα μοντέλο πρόκλησης επιφανειακού τραύματος μέσω διάτρησης (punch model) σε αρουραίο (Εικόνα 2.3).

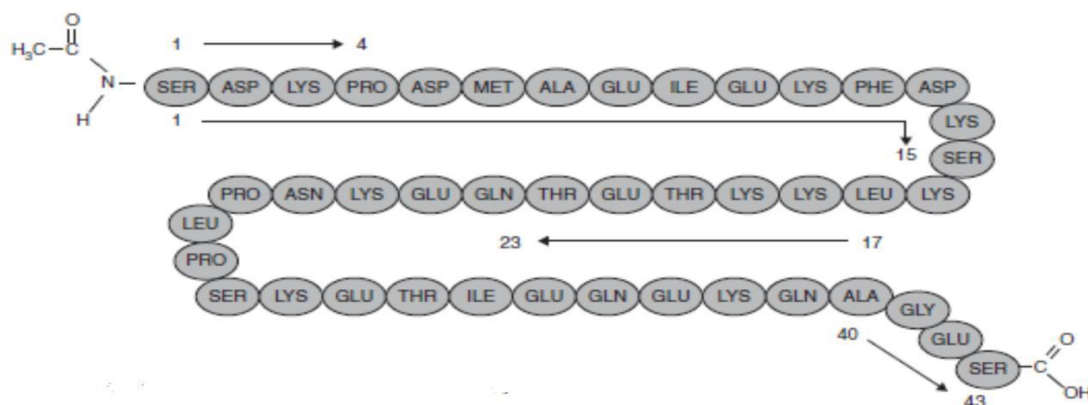


Εικόνα 2.3: Ιστολογικές τομές (χρώση Ηωσίνης –Αιματοξυλίνης) όπου φαίνεται η ενίσχυση της δερματικής επούλωσης, κατόπιν χορήγησης Τα1 για 8 ημέρες, σε αρουραίους (KM. Malinda et al., 1998).

2.3. ΘΥΜΟΣΙΝΗ β4 (Τβ4)

Η Τβ4 είναι ένα σχετικά όξινο πεπτιδίο με ισοηλεκτρικό σημείο 5,1, αποτελούμενο από 43 αμινοξέα (MB: 4964 Da), που απομονώθηκε στις αρχές της δεκαετίας 1980 ως ένας από τους βιοδραστικούς παράγοντες του ΤF5.

Η Τβ4 είναι ένα υψηλά συντηρημένο πεπτιδίο. Η πρωτοταγής δομή της (Εικόνα 2.4.) ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1981. Η Ν-τελική σερίνη στην αλληλουχία της Τβ4 εμφανίζεται ακετυλιωμένη στους ιστούς (Low et al., 1981). Χημική σύνθεση της Τβ4 έχει επιτευχθεί με διάφορες τεχνικές σύνθεσης πεπτιδίων (Zikos et al., 2002), ενώ έχει επίσης επιτευχθεί έκφραση του πεπτιδίου με τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA (Kleinman & Sosne, 2016).



Εικόνα 2.4: Η πρωτοταγής δομή της Τβ4 (Goldstein & Kleinman, 2015).

Σύμφωνα με μελέτες φασματοσκοπίας NMR, σε υδατικό περιβάλλον η Τβ4 λαμβάνει τυχαία διαμόρφωση, ενώ παρουσία πολυφθοριωμένων αλκοολών, το μόριο έχει την τάση να σχηματίζει α έλικα στις θέσεις 4-16 (δες και εικόνα 2.7) και 30-40 (Zarbock et al., 1990; Volk et al., 2012,). Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές, η Τβ4 μπορεί να λάβει ανώτερες δομές κατά την αλληλεπίδρασή της με άλλες πρωτεΐνες, γεγονός που χαρακτηρίζει μόρια με πολλαπλές δράσεις (Goldstein et al., 2005; Hara, 2011).

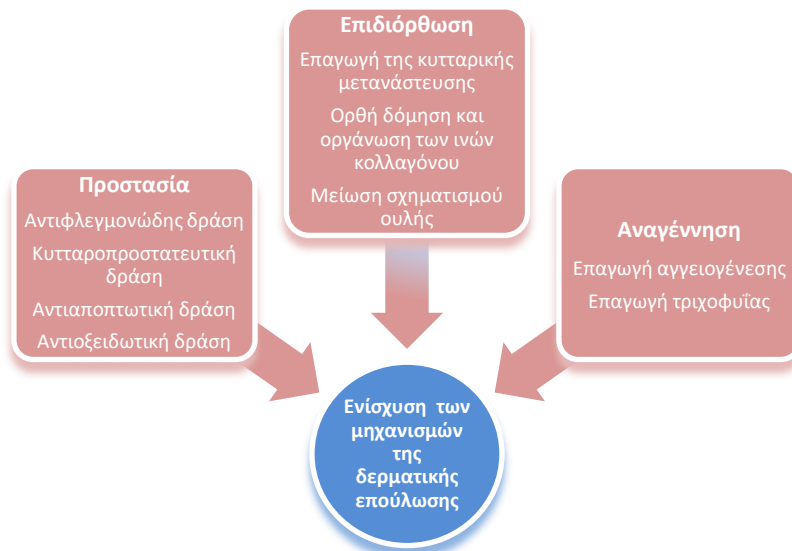
Παρόλο που αρχικά απομονώθηκε από θύμο αδένα, σήμερα είναι γνωστό ότι η Τβ4 είναι παρούσα σε όλους τους τύπους ιστών και κυττάρων, πλην των ερυθροκυττάρων. Αρχικά εντοπίστηκε στο κυτταρόπλασμα, ενώ σύμφωνα με πιο πρόσφατες μελέτες φαίνεται να εντοπίζεται και στον πυρήνα του κυττάρου (Huff et al., 2004). Ο κύριος ενδοκυτταρικός ρόλος της Τβ4 συνδέεται με την αλληλεπίδραση του πεπτιδίου με την ακτίνη. Συγκεκριμένα, η Τβ4 είναι ο κύριος παράγοντας που αλληλεπιδρά μέσα στο κύτταρο με τα μονομερή G-ακτίνης, παρεμποδίζοντας τον πολυμερισμό προς F-ακτίνη και τον επακόλουθο σχηματισμό μικροϊνιδίων ακτίνης (Sanders et al., 1992).

Η Τβ4 έχει επίσης ανιχνευθεί σε εκχύλισμα ολικού αίματος (16,3 μg/mL), όπου θεωρείται ότι προέρχεται από τα αιμοπετάλια και τα λευκοκύτταρα, καθώς και σε πλάσμα ή ορό (Hannappel et al., 1987; Weller et al., 1992). Ωστόσο, τα αναφερόμενα στη βιβλιογραφία επίπεδα της Τβ4 στην κυκλοφορία διαφέρουν (Tan et al., 2018). Επίσης, η Τβ4 έχει ανιχνευθεί στο υγρό των τραυμάτων (Kleinman & Sosne, 2016).

Τβ4 και επούλωση

Τα τελευταία χρόνια πολλές βιβλιογραφικές μελέτες συνδέουν τη Τβ4 με το φαινόμενο της επούλωσης τραυμάτων και μάλιστα τραυμάτων του δέρματος (Εικόνα 2.5). Κατά την επουλωτική διαδικασία, η Τβ4 εκδηλώνει κυτταροπροστατευτική και αντιαποπτωτική δράση, καθώς προστατεύει τον προσβεβλημένο ιστό από περαιτέρω καταστροφή προκαλούμενη από τις τοξικές ουσίες που απελευθερώνονται από τα κατεστραμμένα κύτταρα. Επιπλέον, μειώνει το σχηματισμό ουλής με τη συμμετοχή της στην ορθή οργάνωση των ινών του κολλαγόνου και την καταστολή της μετατροπής των ινοβλαστών σε μυοϊνοβλάστες, ενώ από την άλλη πλευρά πιθανόν να βοηθά στην επούλωση με την αύξηση της παραγωγής κολλαγόνου. Η Τβ4 φέρεται να προάγει την επιδιόρθωση των δερματικών τραυμάτων και είναι επίσης δραστική στην αποκατάσταση τραυματικών βλαβών και την ιστική αναγέννηση του οφθαλμού, της καρδιάς, του εγκεφάλου, του περιφερικού νευρικού συστήματος και του νωτιαίου μυελού, ενώ προάγει την αγγειογένεση σε ποικίλους ιστούς. Συγκεκριμένα, φέρεται να επάγει τη μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων, αλλά και ινοβλαστών και κερατινοκυττάρων στην περιοχή του τραύματος κατά την φάση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Επίσης, η Τβ4 έχει αναφερθεί να μειώνει το σχηματισμό μυοϊνοβλαστών, γεγονός που πιθανόν συνδέεται με την ικανότητά της να μειώνει την ίνωση και τη δημιουργία ουλών. Η αντι-ινωτική δράση της Τβ4 σε όργανα όπως οι νεφροί και το ήπαρ έχει συνδεθεί κυρίως με την αναστολή του μηχανισμού σηματοδότησης μέσω TGF-β/Smad (Xu et al., 2012), αλλά και με την αναστολή άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών (Hong et al., 2017). Επιπλέον, η Τβ4 έχει αναφερθεί ότι προάγει την έκφραση παραγόντων, όπως οι λαμνίνη-332, ινονεκτίνη, VEGF, μεταλλοπρωτεάσες της εξωκυττάριας μήτρας, αυξητικοί παράγοντες και αντιοξειδωτικά ένζυμα που μετέχουν σε διάφορα στάδια της επουλωτικής διαδικασίας. (Sosne & Kleinman, 2015). Ακόμη, η Τβ4 είναι πιθανόν να εμπλέκεται στους μηχανισμούς της αιμόστασης, που είναι η πρώτη φάση της επούλωσης, σε συνδυασμό με τον παράγοντα XIIIa των αιμοπεταλίων (Huff et al., 2002).

Ο μεγάλος αριθμός *in vitro* και *in vivo* μελετών που έδειξαν θετική επίδραση εξωγενώς χορηγούμενης Τβ4 στην επούλωση δερματικών τραυμάτων οδήγησαν σε εφαρμογή του πεπτιδίου σε κλινικές μελέτες φάσης II. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε ειδικά μορφοποιημένη γέλη της Τβ4 σε ασθενείς με έλκη κατάκλισης σταδίου III και IV, φλεβικά έλκη και πομφολυγώδη επιδερμόλυση. Οι πρώτες αυτές κλινικές μελέτες έδειξαν βελτίωση της εικόνας των ασθενών έναντι των μαρτύρων, η οποία ωστόσο δεν κρίθηκε στατιστικά σημαντική, ενώ έχει προταθεί η συνέχιση των κλινικών δοκιμών, με χορήγηση διαφορετικών δόσεων Τβ4 (Treadwell et al., 2012; Kleinman & Sosne, 2016).



Εικόνα 2.5: Συνοπτική απεικόνιση των δράσεων της θυμοσίνης β4 στην επουλωτική διαδικασία τραυμάτων του δέρματος (Sosne et al., 2010; Kleinman & Sosne, 2016).

Μέχρι στιγμής, και παρά τον μεγάλο αριθμό των σχετικών μελετών, οι ακριβείς μηχανισμοί και οι πιθανοί υποδοχείς μέσω των οποίων η Τβ4 ασκεί την επουλωτική δράση της δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένοι.

Η Τβ4 περιέχει στην αλληλουχία της τρεις διακριτές περιοχές, για τις οποίες έχει αναφερθεί επουλωτική δράση (Εικόνα 2.6). Το τετραπεπτιδίο Ac-SDKP, του αμινοτελικού άκρου, έχει αναφερθεί ότι μετέχει στην επούλωση μέσω μείωσης της φλεγμονής, επαγωγής της αγγειογένεσης και περιορισμού της φαινοτυπικής μετατροπής των ινοβλαστών σε μυοϊνοβλάστες που επάγουν την ίνωση μέσω του TGF-β. Η δεύτερη δραστική περιοχή της Τβ4 είναι το πεπτιδίο 1-15 (Ac-SDKPDMAEIEKFDKSKL), που εμφάνισε αντιαποπτωτική δράση σε *in vitro* πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες. Η τρίτη περιοχή με εμπλοκή στην επούλωση είναι η κεντρική περιοχή, μεταξύ των αμινοξέων 17-23. Η περιοχή αυτή περιέχει τη θέση πρόσδεσης της Τβ4 στη G-ακτίνη (17-22), και είναι πιθανόν να επιδρά στις διαδικασίες της κυτταρικής μετανάστευσης και της αγγειογένεσης (Sosne et al., 2010; Kleinman & Sosne, 2016).

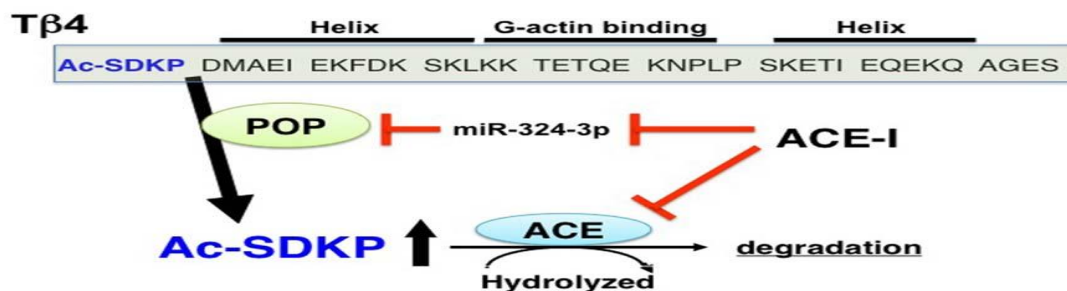


Εικόνα 2.6: Περιοχές της Τβ4 για τις οποίες έχει αναφερθεί επουλωτική δράση (Hara et al., 2011).

Εκτενής αναφορά στη Τβ4 και ιδιαίτερα στην επίδραση του πεπτιδίου στις διάφορες φάσεις της επούλωσης τραυμάτων του δέρματος αλλά και άλλων οργάνων έχει γίνει στη μεταπτυχιακή εργασία της κ. Γραμματικάκη (Γραμματικάκη, 2017).

2.3.1. Τετραπεπίδιο Ac-SDKP

Πρόκειται για το αμινοτελικό 1-4 άκρο της θυμοσίνης Τβ4 με αμινοξική αλληλουχία **acetyl Ser-Asp-Lys-Pro-OH**, που πρωτοαπομονώθηκε από βόειο εμβρυϊκό μυελό των οστών. Το Ac-SDKP προκύπτει από την διάσπαση του πεπτιδικού δεσμού μεταξύ του τέταρτου και πέμπτου αμινοξέος της Τβ4 (Εικόνα 2.7), που καταλύεται από την πρωτεάση σερίνης, προλυλο-ολιγοπεπτιδάση (Prolyl-OligoPeptidase, POP). Απαραίτητη προϋπόθεση για την δράση της POP φαίνεται να είναι η εκ των προτέρων διάσπαση της Τβ4 σε μικρότερα τμήματα από την ενδοπεπτιδάση, μεπρίνη-α (Kumar et al., 2016). Από την άλλη πλευρά, το Ac-SDKP βιοαποικοδομείται από το μετατρεπτικό ενζυμο της αγγειοτενσίνης (Angiotensin Converting Enzyme, ACE).



Εικόνα 2.7: Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης και αποδόμησης του Ac-SDKP (Kanasaki et al., 2014).

Μια από τις πρώτες βιολογικές δράσεις που αποδόθηκαν στο τετραπεπίδιο ήταν η αναστολή του πολλαπλασιασμού των βλαστικών κυττάρων του αιμοποιητικού, όπως προέκυψε σε *in vitro* μελέτες που έγιναν με βλαστικά αιμοποιητικά κύτταρα βόειου εμβρυϊκού μυελού των οστών (Kanasaki et al., 2014). Ενώ η Τβ4 έχει ερευνηθεί για τις βιολογικές της ιδιότητες σε μεγάλο εύρος *in vitro* και *in vivo* μελετών, το τετραπεπίδιο Ac-SDKP έχει μελετηθεί, κυρίως, για την αγγειογενετική και αντινωτική του δράση σε διάφορους ιστούς, όπως ο καρδιακός και ο νεφρικός ιστός (*in vivo*) και σε διάφορες κυτταρικές σειρές (*in vitro*), ενδοθηλιακά κύτταρα και καρδιακούς ινοβλάστες (Sosne et al., 2010). Έχει μελετηθεί επίσης για την επίδρασή του στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των

ανθρώπινων μεσαγγειακών κυττάρων, καθώς και των νεφρικών και καρδιακών ινοβλαστών (Kanasaki et al., 2014).

Τα αποτελέσματα των μελετών ανέδειξαν το τετραπεπτίδιο Ac-SDKP ως ένα ισχυρό αγγειογενετικό μόριο, καθώς επάγει την μετανάστευση και την διαφοροποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων σε διάφορους ιστούς, όπως ο καρδιακός (Liu et al., 2003) και ο δερματικός (Fromes et al., 2006). Η αντινωτική του δράση μελετήθηκε σε καρδιακούς και πνευμονικούς ινοβλάστες, όπου φάνηκε να μειώνει την επαγόμενη από τον TGFβ φαινοτυπική μετατροπή των ινοβλαστών σε μυοϊνοβλάστες, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την υπερέκφραση της πρωτεΐνης α -SMAD και χαρακτηρίζονται από έντονη συσταλτική ικανότητα (Peng et al., 2010; Xu et al., 2012).

Το τετραπεπτίδιο Ac-SDKP φέρεται επίσης να εμφανίζει αντιφλεγμονώδη δράση, λειτουργώντας σαν αναστολέας χημειοκινών των μακροφάγων και του μεταγραφικού παράγοντα NFκB, συμβάλλοντας στην ορθή ρύθμιση της ιστικής επούλωσης (Kanasaki et al., 2014). Πέραν της αντιφλεγμονώδους δράσης το Ac-SDKP παρουσιάζει και νευροπροστατευτικές ιδιότητες, όπως έδειξαν πρόσφατα *in vivo* πειράματα σε αρουραίους (Zhang et al., 2016).

Όπως και στην περίπτωση του πρόδρομου πεπτιδίου, Tβ4, οι ακριβείς μηχανισμοί, μέσω των οποίων το AcSDKP ασκεί την επουλωτική δράση του δεν είναι αποσαφηνισμένοι.

Εκτενής αναφορά στο Ac-SDKP και ιδιαίτερα στην επίδρασή του στις διάφορες φάσεις της επούλωσης τραυμάτων έχει γίνει στη μεταπτυχιακή εργασία της κ. Γραμματικάκη (Γραμματικάκη, 2017).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι η διερεύνηση της βιολογικής δράσης των θυμοσινικών πεπτιδίων Τα1, Τβ4 και Ac-SDKP σε *in vitro* συστήματα μελέτης κυτταρικών λειτουργιών που σχετίζονται με την δερματική επούλωση.

Η Τβ4 είναι ένα πεπτίδιο με προστατευτική, επιδιορθωτική και αναγεννητική δράση επί των διαφόρων ιστών (Goldstein, 2012). Οι ιδιότητες αυτές προκύπτουν από *in vitro* δοκιμασίες με ζωικά ή ανθρώπινα κύτταρα, αλλά και *in vivo* δοκιμασίες σε ζωικά μοντέλα και αφορούσαν κυρίως ιστούς όπως ο καρδιακός, ο νεφρικός, ο πνευμονικός και ηπατικός (Sosne, 2007). Όπως η Τβ4, έτσι και το αμινοτελικό της άκρο, που είναι το τετραπεπτίδιο Ac-SDKP, εμφανίζει και αυτό επούλωτικές ιδιότητες. Το Ac-SDKP έχει μελετηθεί κυρίως για την αντινωτική και αγγειογενετική του δράση. Η αντινωτική δράση φάνηκε τόσο σε *in vivo* δοκιμασίες επί του καρδιακού και νεφρικού ιστού ζωικών μοντέλων, όσο και σε *in vitro* δοκιμασίες που πραγματοποιήθηκαν σε καρδιακούς και νεφρικούς ινοβλάστες, ενώ η αγγειογενετική δράση μελετήθηκε κυρίως σε ενδοθηλιακά κύτταρα (Sosne, 2007).

Η Τα1 έχει μελετηθεί ευρύτατα για τις ανοσοτροποποιητικές της ιδιότητες, όμως η μελέτη της σε σχέση με την επούλωση είναι ιδιαίτερα περιορισμένη και αφορά την αγγειογένεση. Η Τα1 φάνηκε να επάγει την αγγειογένεση σε *in vitro* δοκιμασίες καθώς και την *in vivo* επούλωση διαδικασία σε *in vivo* μελέτες επούλωσης τραυμάτων του δέρματος σε τρωκτικά (Malinda et al., 1999).

Θέλοντας να μελετήσουμε περαιτέρω τις πιθανές δράσεις των παραπάνω θυμοσινικών πεπτιδίων στα διάφορα στάδια της επούλωσης διαδικασίας (ιδιαίτερα της Τα1, για την οποία λίγες βιβλιογραφικές πληροφορίες είναι διαθέσιμες), αλλά και για να προσαρμόσουμε την μελέτη σε επίπεδο ανθρώπινης δερματικής επούλωσης, επιλέξαμε τους ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες ως μοντέλο των *in vitro* δοκιμασιών. Βάση για αυτή την επιλογή αποτέλεσε το γεγονός ότι α) η δερματική επούλωση στον άνθρωπο εμφανίζει σημαντικές διαφορές σε σχέση με άλλα θηλαστικά και ιδιαίτερα με τα τρωκτικά (Wong, 2011) και β) οι ινοβλάστες είναι τα κύτταρα του χορίου που συμμετέχουν με ποικίλους μηχανισμούς σε διάφορα στάδια της επούλωσης διαδικασίας -κυρίως μέσω της δυνατότητά τους να παράγουν κολλαγόνο, μια από τις σημαντικότερες πρωτεΐνες της εξωκυττάριας μήτρας (Eckes, 2000). Οι ανθρώπινοι δερματικοί ινοβλάστες, GM21808 και AG01523c, που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, σε συνδυασμό με τις κατάλληλες πειραματικές συνθήκες καλλιέργειας, μπορούν να αποτελέσουν αξιόπιστο μοντέλο προσομοίωσης της διαδικασίας της δερματικής επούλωσης *in vitro*.

Με τις *in vitro* κυτταρικές δοκιμασίες της παρούσας εργασίας ελέγχθηκε πιθανή κυτταροτοξική δράση των Τα1, Τβ4 και του Ac-SDKP στους δερματικούς ινοβλάστες με τη δοκιμασία MTT. Επίσης μελετήθηκε η επίδρασή τους στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τόσο με την καταμέτρηση των δερματικών ινοβλαστών σε σωματιδιακό αναλυτή, όσο και μέσω του ποσοτικού προσδιορισμού της σύνθεσης DNA με τη μέθοδο τριτιωμένης

θυμιδίνης. Τέλος, ελέγχθηκε η επίδραση των Τα1, Τβ4 και του Ac-SDKP στη σύνθεση κολλαγόνου από τους δερματικούς ινοβλάστες με τη μέθοδο της τριτιωμένης προλίνης.

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

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

Η παρούσα εργασία έγινε με στόχο την αξιολόγηση της βιολογικής επίδρασης θυμοσινικών πεπτιδίων στην διαδικασία της δερματικής επούλωσης. Για την διερεύνηση πιθανής δερματικής επουλωτικής δράσης των θυμοσινικών πεπτιδίων Tα1, Tβ4, καθώς και του τετραπεπτιδίου Ac-SDKP διενεργήθηκαν in vitro δοκιμασίες σε δυο στελέχη ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών, GM21808 και AG01523c. Αρχικά ελέγχθηκε η πιθανή κυτταροτοξική δράση των πεπτιδίων με την δοκιμασία MTT και εφόσον δεν εμφάνισαν κυτταροτοξική δράση ακολούθησε η καταμέτρηση των κυττάρων σε σωματιδιακό αναλυτή, η εκτίμηση της επίδρασης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό με την δοκιμασία της τριτιωμένης θυμιδίνης και στη σύνθεση κολλαγόνου με την δοκιμασία τριτιωμένης προλίνης.

3.1. ΠΕΠΤΙΔΙΑ

Τα πεπτίδια που χρησιμοποιήθηκαν στις in vitro δοκιμασίες, ήταν εμπορικά διαθέσιμα.

3.1.1.Θυμοσινικά Πεπτίδια

I. Ac-SDKP

BACHEM
Catalog number H-1156.0005
Product number 4016348.0005
Product Ac- Ser- Asp- Lys- Pro- OH
Molecular formula C₂₀H₃₃N₅O₉
Relative molecular mass 487.51

Το Ac-SDKP, με αμινοξική αλληλουχία **acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro-OH**, είναι το αμινοτελικό τετραπεπτίδιο της Tβ4, από την οποία προκύπτει μέσω της δράσης του ενζύμου προλυλο-ολιγοπεπτιδάση (μιας πρωτεάσης σερίνης, που διασπά πεπτιδικούς δεσμούς μετά από το αμινοξύ προλίνη), αφού προηγηθεί διάσπαση της Tβ4 σε μικρότερα πεπτίδια παρουσία του ενζύμου Μερπρίνη-α. Το Ac-SDKP βιοαποδομείται μέσω υδρόλυσής του από το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης (ΜΕΑ). Σύμφωνα με αρκετές βιβλιογραφικές μελέτες, το Ac-SDKP μπορεί να συνεισφέρει σε φυσιολογικές διεργασίες, που εμπλέκονται στο φαινόμενο της επούλωσης τραυμάτων. Περισσότερα στοιχεία αναφέρονται στην Εισαγωγή (Κεφάλαιο 2) της παρούσας εργασίας.

II. Τβ4

BACHEM

Thymosin β₄ (human, bovine, horse, rat) acetate salt

Catalog No H 2608 0001

Product No 40430200001

LotNo 1056566

MW 4963.51

Η Τβ4 αποτελείται από 43 αμινοξέα και θεωρείται ένα από τα σημαντικότερα πεπτίδια του ΤF5, λόγω του σημαντικού βιολογικού της ρόλου, αλλά και λόγω του ότι αντιπροσωπεύει το ευρύτερα απαντώμενο θυμοσινικό πεπτίδιο. Είναι παρούσα σχεδόν σε όλα τα κύτταρα, πλην των ερυθρών αιμοσφαιρίων και εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, ενώ έχει βρεθεί και στον πυρήνα. Σε υδατικά διαλύματα λαμβάνει τυχαία διαμόρφωση, ενώ παρουσία οργανικών διαλυτών (π.χ. φθοριωμένων αλκοολών) έχει την τάση να σχηματίζει α έλικα στις θέσεις 4-16 και 30-40. Το αμινο-τελικό άκρο της Τβ4 είναι ακετυλιωμένο. Κατά την αλληλεπίδρασή της με άλλες πρωτεΐνες πιθανόν να υιοθετεί ανώτερες δομές. Η Τβ4 θεωρείται ως το κύριο ενδοκυτταρικό πεπτίδιο που δεσμεύεται στα μονομερή G-ακτίνης αποτρέποντας τον πολυμερισμό σε F-ακτίνη. Επιπλέον, σύμφωνα με πληθώρα βιβλιογραφικών μελετών, μπορεί να συνεισφέρει σε φυσιολογικές διεργασίες, που εμπλέκονται στο φαινόμενο της επούλωσης τραυμάτων. Περισσότερα στοιχεία αναφέρονται στην Εισαγωγή (Κεφάλαιο 2) της παρούσας εργασίας.

III. Τα1

BACHEM

Thymosin α1 acetate salt

Catalog No H 77561000

ProductNo 40958781000

LotNo 1073413

MW 3108.32

Η Τα1 αποτελείται από 28 αμινοξέα και από πολλούς μελετητές θεωρείται ότι προκύπτει από ενδοκυτταρική πρωτεόλυση του πρόδρομου πολυπεπτιδίου ProΤα μέσω της δράσης μιας ασπαραγινυλο-ενδοπεπτιδάσης. Σε υδατικό περιβάλλον το μόριο λαμβάνει τυχαία διαμόρφωση, ενώ παρουσία οργανικών διαλυτών (π.χ. φθοριωμένων αλκοολών) υιοθετεί δομή τμήματος άλφα-έλικας μεταξύ των αμινοξέων 14 και 26. Το αμινο-τελικό άκρο της Τα1 είναι ακετυλιωμένο. Η Τα1 δρα ως ένας τροποποιητής της βιολογικής απόκρισης – ρυθμιστής του ανοσοποιητικού συστήματος, κυρίως μέσω του υποδοχέα TLR9. Ορισμένες μελέτες της βιβλιογραφίας έχουν διερευνήσει την επίδραση της Τα1 σε διεργασίες που σχετίζονται με το φαινόμενο της επούλωσης τραυμάτων. Περισσότερα στοιχεία αναφέρονται στην Εισαγωγή (Κεφάλαιο 2) της παρούσας εργασίας.

Τα πεπτίδια **Ac-SDKP**, **Tβ4** και **Tα1** μελετήθηκαν για την επίδρασή τους στους ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες, σε συγκεντρώσεις **0,1**, **1** και **10 nM**. Οι συγκεντρώσεις αυτές έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως σε ανάλογες *in vitro* μελέτες της βιβλιογραφίας για το πεπτίδιο Ac-SDKP (Rhaleb et al., 2001; Peng et al., 2010). Επίσης, καλύπτουν το εύρος των συγκεντρώσεων στον ανθρώπινο ορό, που έχουν αναφερθεί σε διάφορες βιβλιογραφικές αναφορές για τα Ac-SDKP (0,7 – 2,5 pmol/mL, Liozon et al., 1993), Tβ4 (6,9 – 23,0 ng/mL, Weller et al., 1992) και Tα1 (252 – 1158 pg/mL, Weller et al., 1992).

3.1.2. Προστατευτικοί Παράγοντες

I. ΚΑΠΤΟΠΡΙΛΗ

SIGMA-ALDRICH
 CAS Number 62571-86-2
 Empirical Formula (Hill Notation) C₉H₁₅NO₃S
 MolecularWeight 217.29

Η καπτοπρίλη, που ανήκει στους αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης, φέρεται να εμποδίζει τη βιοαποδόμηση του τετραπεπτιδίου Ac-SDKP από το παραπάνω ένζυμο (Azizi et al., 1996; Kumar et al., 2016). Στην παρούσα μελέτη η καπτοπρίλη χρησιμοποιήθηκε ως προστατευτικός παράγοντας έναντι πιθανής αποδόμησης του πεπτιδίου Ac-SDKP, σε συγκέντρωση (1 μM) που επιλέχθηκε με βάση πληροφορίες της βιβλιογραφίας (Rhaleb et al., 2001; Peng et al., 2010).

II. ΑΠΡΟΤΙΝΙΝΗ

SIGMA-ALDRICH
 Aprotinin from bovine lung A6106-1MG
 CAS No 9087-70-1
 Lot No SLBQ4590V
 MW 6511.44

Η απροτινίνη είναι μια πρωτεΐνη που δεσμεύεται στο ενεργό κέντρο πρωτεασών σερίνης μέσω σχετικά σταθερών αλλά αντιστρεπτών δεσμών, λειτουργώντας ως αναστολέας των ενζύμων αυτών. Λόγω της δράσης της χρησιμοποιείται ως προστατευτικός παράγοντας, ικανός να αναστείλει την διαμεσολαβούμενη από πρωτεάσες υδρόλυση διαφόρων πεπτιδίων, σε αρκετές *in vitro* δοκιμασίες (Aprotinin Datasheet, Shelleckchem). Στην παρούσα μελέτη η απροτινίνη χρησιμοποιήθηκε ως προστατευτικός παράγοντας για τα πεπτίδια Tβ4 και Tα1, σε συγκέντρωση (1 μg/mL) που επιλέχθηκε με βάση πληροφορίες της βιβλιογραφίας (Liolios et al., 2012; Karachaliou et al., 2015).

3.1.3. TGF-β1

Ο TGF-β1 (Transforming growth factor beta 1) είναι μια κυτταροκίνη που διεγείρει την παραγωγή κολλαγόνου (Wynn, 2008) και επάγει την φαινοτυπική μετατροπή των ινοβλαστών σε μυοινοβλάστες κατά τα τελικά στάδια της επουλωτικής διαδικασίας (Peng et al., 2010). Ο TGF-β1 χρησιμοποιήθηκε, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (2,5, 5 και 10 ng/mL) ως θετικός μάρτυρας στη δοκιμασία ενσωμάτωσης τριτιωμένης προλίνης.

3.1.4. PDGF

Ο PDGF (Platelet-derived growth factor) είναι μια κυτταροκίνη που επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε πολλούς τύπους κυττάρων, μεταξύ των οποίων και τους ινοβλάστες (Hannik & Donogue, 1989). Ο PDGF χρησιμοποιήθηκε, ως θετικός μάρτυρας στη δοκιμασία κυτταρικής καταμέτρησης με σωματιδιακό αναλυτή, σε τελική συγκέντρωση 10 ng/mL, η οποία επιλέχθηκε βάσει προηγούμενης εμπειρίας του εργαστηρίου.

3.2. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ

Στις *in vitro* κυτταρικές δοκιμασίες χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινοι δερματικοί ινοβλάστες GM 21808 και AG 01523c (Coriell Institute for Medical Research). Τα δυο στελέχη διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τον δότη. Οι ινοβλάστες επιλέχθηκαν γιατί είναι τα κύτταρα της δερμίδας, που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή κολλαγόνου και άλλων πρωτεϊνών της εξωκυττάριας μήτρας και προσελκύονται στην περιοχή της βλάβης από προϊόντα των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων και μακροφάγων, όπως ο PDGF και ο TGF-β, κατά τη φάση της κυτταρικής μετανάστευσης και του πολλαπλασιασμού. Επιπλέον οι ινοβλάστες έχουν την ικανότητα, παρουσία του TGF-β, να αλλάζουν τον φαινότυπό τους σε μυοϊνοβλάστες, οι οποίοι παράγουν την πρωτεΐνη α-SMA (α-Smooth Muscle Actin) και ευθύνονται για την συστολή του τραύματος κατά το τελικό στάδιο της επούλωσης (Menke et al., 2006; Reinke et al., 2012).

3.3. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

3.3.1. Υλικά και όργανα:

- **Ανθρώπινοι δερματικοί ινοβλάστες GM 21808** (NIGMS Human Genetic Cell Repository, Coriell Institute for Medical Research)
- **Ανθρώπινοι δερματικοί ινοβλάστες AG 01523c** (NIGMS Human Genetic Cell Repository, Coriell Institute for Medical Research)
- **Θρεπτικό DMEM** (Dulbecco's Minimal Essential Medium), **αντιβιοτικά πενικιλίνη** (10.000 U/L) και **στρεπτομυκίνη** (10.000 µg/L), **L-γλουταμίνη** (4 mM), **πυροσταφυλικό οξύ** (1 mM) και **διττανθρακικό νάτριο** (Biochrom AG, Berlin, Germany)
- **Εμβρυϊκός βόειος ορός** (Fetal Bovine Serum, **FBS**), Gibco BRL (Paisley, UK)
- **Θρυψίνη** (0,25% (w/v) θρυψίνης, 10 mM κιτρικού νατρίου, 110 mM χλωριούχου νατρίου pH 7,2), Invitrogen (California)
- **Πλάκες κυτταροκαλλιιεργειών πολλαπλών θέσεων**, Greiner (Hanover, Germany)
- **Σωματιδιακός αναλυτής** Beckman Coulter Counter (Beckman, USA)
- **Επωαστικός κλίβανος CO₂** Thermo Forma Series II (Ohio, USA)
- **Εστία νηματικής ροής** Safeflow 1.8, Bioair Instruments (Siziano, Italy)
- **Ανάστροφο μικροσκόπιο** Wild MPS 52, Leitz (Heerbrugg, Switzerland)

3.3.2. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

I. ΑΠΟΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

1. Στην εστία νηματικής ροής, προετοιμάζεται μια φιάλη κυτταροκαλλιέργειας των 75 cm³ στην οποία αναγράφεται: η κυτταρική σειρά, ο αύξοντας αριθμός της ανακαλλιέργειας P=n+1, η ημερομηνία ανακαλλιέργειας
2. DMEM και FBS τοποθετούνται σε θερμαινόμενο υδατόλουτρο ώστε να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου

3. Μετακίνηση ενός «κρυοφιαλιδίου» από τον θάλαμο φύλαξης και εμβάπτισή του στο θερμαινόμενο υδατόλουτρο μέχρι να ξεπαγώσει. Κάθε φιαλίδιο είναι 1,5 ml και περιέχει FBS, κύτταρα και DMSO
4. Προσθήκη 8 ml DMEM και 2 mL (20%) FBS στην φιάλη κυτταροκαλλιέργειας με αποστειρωμένες πιπέτες
5. Εντός της εστίας νηματικής ροής μεταφορά του περιεχομένου του κρυοφιαλιδίου, στην φιάλη κυτταροκαλλιέργειας με αποστειρωμένη πιπέτα
6. Επώαση της φιάλης για μια νύχτα σε επωαστικό κλίβανο με CO₂ 5%, 37 C^o και υγρασία 95%
7. Την επόμενη μέρα απομάκρυνση του καλλιεργητικού μέσου με υψηλό (20%) FBS και των νεκρών ή μη προσκολλημένων κυττάρων και προσθήκη νέου καλλιεργητικού μέσου με FBS 15%
8. Επώαση της φιάλης κυτταροκαλλιέργειας σε επωαστικό κλίβανο με CO₂ 5%, 37 C^o και υγρασία 95% για 3 ημέρες, ώστε να βρίσκονται σε φάση ανάπτυξης και ποσοστό συρροής 80-90% για να μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν σε *in vitro* δοκιμασία, να ανακαλλιεργηθούν ή να καταψυχτούν (Πρατσίνης, 1988).

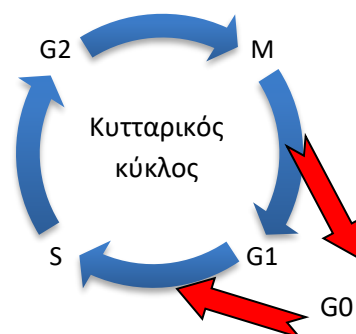
II. ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

1. Μικροσκόπηση της φιάλης κυτταροκαλλιέργειας από την οποία θα γίνει η ανακαλλιέργεια, σε ανάστροφο μικροσκόπιο προς επιβεβαίωση ότι τα κύτταρα είναι ζωντανά και ότι έχουν φτάσει στο 80-90% της συρροής
2. Εντός της εστίας νηματικής ροής αναρρόφηση του καλλιεργητικού μέσου και έκλυση της μονοστιβαδικής καλλιέργειας με 3,5 mL διάλυμα θρυψίνης 0,25%, 10 mM κιτρικού νατρίου, 110 mM χλωριούχου νατρίου με pH 7,2
3. Αναρρόφηση της περίσσειας διαλύματος θρυψίνης και προσθήκη νέας ποσότητας διαλύματος (3,5 ml) θρυψίνης και επώαση σε κλίβανο με CO₂ 5%, 37 C^o και υγρασία 95% για 1-2'
4. Μικροσκόπηση προς επιβεβαίωση ότι τα κύτταρα αρχίζουν να αποκολλώνται από το τοίχωμα της φιάλης – κατά την μικροσκόπηση παρατηρείται σφαιροποίηση των αποκολλημένων κυττάρων, γεγονός που αντιστοιχεί σε έναρξη της θρυψινοποίησης – και μηχανική ανατάραξη της φιάλης που βοηθά την αποκόλληση των κυττάρων

5. Προσθήκη 8,5 mL DMEM και 1,5mL FBS (85%/15%) με αποστειρωμένες πιπέτες (για κάθε φιάλη κυτταροκαλλιέργειας) στην φιάλη κυτταροκαλλιέργειας και συνεχείς εκπλύσεις του τοιχώματος της φιάλης ώστε να ισοκαταμεμηθούν τα κύτταρα στο διάλυμα
6. Διαχωρισμός του περιεχομένου της φιάλης, με το 1/2 να μεταφέρεται σε νέα φιάλη κυτταροκαλλιέργειας, η οποία έχει σημειωθεί για την κυτταρική σειρά, τον αύξοντα αριθμό της ανακαλλιέργειας $P=n+1$, την ημερομηνία ανακαλλιέργειας
7. Επώαση και των 2 φιαλών κυτταροκαλλιέργειας σε επωαστικό κλίβανο με CO_2 5%, $37\text{ }^\circ\text{C}$ και υγρασία 95% για 4-5 ημέρες

III. ΣΥΓΧΡΟΝΙΣΜΟΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων χρησιμοποιείται παραδοσιακά ορός. Συγκεκριμένα τα κυτταρικά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία αναπτύσσονται σε DMEM/15% FBS (όπως συνιστά η εταιρεία που τα διαθέτει), όμως λόγω των υψηλών του συγκεντρώσεων σε αιμοπεταλιακούς αυξητικούς παράγοντες, ο ορός είναι ακατάλληλος για την μελέτη διεργασιών που ρυθμίζονται από αυξητικούς παράγοντες, όπως δοκιμασίες κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ελέγχου τοξικότητας ή κολλαγονοσύνθεση. Συνεπώς στα συγκεκριμένα πειράματα, τα κύτταρα «ηρεμούσαν» παρουσία μικρής ποσότητας DMEM/0,1% FBS για 48 h, ώστε τα κύτταρα να συγχρονιστούν στη φάση G_0 του κυτταρικού κύκλου. Ο συγχρονισμός της καλλιέργειας έχει σκοπό τον έλεγχο των συνθηκών της καλλιέργειας, αλλά και την λήψη ισοδύναμων μετρήσεων σε μελέτες διέγερσης σηματοδοτικών οδών από εξωγενείς παράγοντες, όπως της συγκεκριμένης μελέτης (Πρατσίνης, 1998).



Εικόνα 3.1: Σχηματική αναπαράσταση του κυτταρικού κύκλου.

IV. ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΣΩΜΑΤΙΔΙΑΚΟ ΑΝΑΛΥΤΗ

Η καταμέτρηση των κυττάρων έγινε σε σωματιδιακό αναλυτή Beckman Coulter Counter. Ο μετρητής Coulter είναι μια συσκευή που έχει την δυνατότητα να καταμετρά κύτταρα που αιωρούνται σε ειδικά διαλύματα ηλεκτρολυτών. Ένας μετρητής Coulter συνήθως έχει έναν ή περισσότερους μικροδιαύλους, οι οποίοι χωρίζουν τους δυο θαλάμους με τα διαλύματα. Καθώς το κυτταρικό εναιώρημα έλκεται μέσω του μικροδιαύλου, κάθε κύτταρο προκαλεί σύντομη αλλαγή στην αγωγιμότητα του υγρού. Οι αλλαγές ανιχνεύονται από τον μετρητή με μια ηλεκτρική αντίσταση.

Ο κυτταρικός πληθυσμός που προστίθεται στο διάλυμα ηλεκτρολυτών, οφείλει να είναι καλά επαναιωρημένος, χωρίς συσσωματώματα, χωρίς υπολείμματα, ώστε να μην υπάρχουν αλλοιώσεις στον πραγματικό αριθμό των κυττάρων. Ο συνολικός αριθμός των κυττάρων υπολογίζεται, λαμβάνοντας υπόψη τις αραιώσεις και ότι η ένδειξη του αναλυτή αφορά τον αριθμό των κυττάρων που περιέχονται σε συγκεκριμένο όγκο κυτταρικού εναιωρήματος (Coulter & Hogg, 1977).

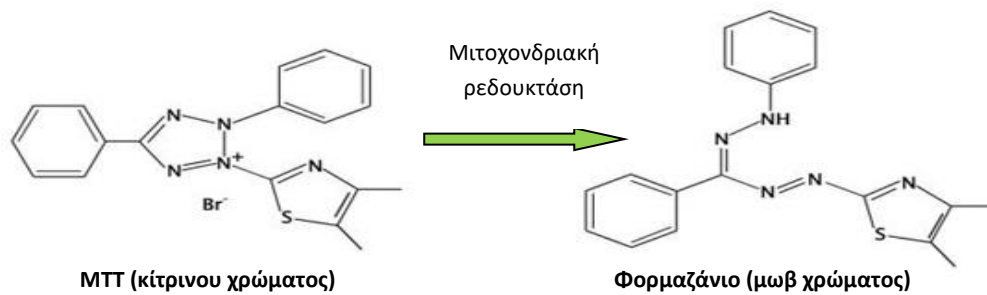
3.4. In vitro κυτταρικές δοκιμασίες για τον έλεγχο της βιολογικής δράσης των πεπτιδίων.

3.4.1. Έλεγχος κυτταρικής βιωσιμότητας με την μέθοδο MTT

Αρχή της μεθόδου

Το MTT (3-{4,5-Dimethylthiazol-2-yl}-2,5-diphenyltetrazoliumbromide, ThiazolylBlue) είναι υδατοδιαλυτό άλας το οποίο όταν παρασκευαστεί σε θρεπτικό μέσο ή διάλυμα από το οποίο απουσιάζει η χρωστική ερυθρό της φαινόλης, παράγει ένα κίτρινου χρώματος διάλυμα (Mosmann, 1983).

Το MTT όταν διασπαστεί ο τετραζολικός δακτύλιός του από τα μιτοχονδριακά ένζυμα, δεϋδρογενάσες και οξειδοοδουκτάσες, των μεταβολικά ενεργών κυττάρων σχηματίζει μωβ, αδιάλυτους κρυστάλλους φορμαζανίου (Berridge et al., 2005).



Εικόνα 3.2: Σχηματική αναπαράσταση της μετατροπής του ΜΤΤ σε φορμαζάνιο.

Οι αδιάλυτοι σε νερό κρύσταλλοι του φορμαζανίου μπορούν να διαλυτοποιηθούν παρουσία ισοπροπανόλης ή DMSO και στην συνέχεια να μετρηθούν φασματοφωτομετρικά στα 550 nm. Η μετρούμενη απορρόφηση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του φορμαζανίου που παράγεται από τα ζωντανά κύτταρα. Κατά αυτόν τον τρόπο δύναται να προσδιοριστεί η επίδραση της προς μελέτη ουσίας (σημ. = θυμοσινικό πεπτίδιο ή προστατευτικός παράγοντας) στην βιωσιμότητα των κυττάρων και κατ'επέκταση και η κυτταροτοξικότητά της (Γραμματικάκη Σ. 2017).

Υλικά και όργανα

- Ανθρώπινοι δερματικοί ινοβλάστες **GM 21808** και **AG 01523c** (NIGMS Human Genetic Cell Repository, Coriell Institute for Medical Research)
- Θρεπτικό υλικό **DMEM** (Dulbeco's Minimal Essential Medium), αντιβιοτικά **πενικιλίνη** (10.000 U/L) και **στρεπτομυκίνη** (10.000 µg/L), **L-γλουταμίνη** (4 mM), **πυροσταφυλικό οξύ** (1 mM) και **διττανθρακικό νάτριο** (Biochrom AG, Berlin, Germany)
- **Εμβρυϊκός βόειος ορός** (Fetal Bovine Serum, **FBS**), Gibco BRL (Paisley, UK)
- **Χρωστική ΜΤΤ**, Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
- **Ισοπροπανόλη**, Merck (Damstadt, Germany)
- Τετραπεπτίδιο acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro-OH, **Ac-SDKP**, Bachem AG (Bubendorf, Switzerland)
- **Θυμοσίνη β4**, Bachem AG (Bubendorf, Switzerland)
- **Θυμοσίνη α1**, Bachem AG (Bubendorf, Switzerland)
- **Απροτινίνη**, Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
- **Καπτοπρίλη**, Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
- **Πλάκες κυτταροκαλλιεργειών πολλαπλών θέσεων**, Greiner (Hanover, Germany)

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

Πειραματική διαδικασία

Την πρώτη ημέρα γινόταν επίστρωση των ινοβλαστών, στο αρχικό τους θρεπτικό υλικό DMEM/15%FBS, σε πλάκα κυτταροκαλλιέργειας 96 θέσεων. Σε κάθε θέση ο αριθμός των κυττάρων κυμαίνονταν στις επτά χιλιάδες (7000). Τα κύτταρα επώαζονταν για 24 ώρες σε κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37 °C, υγρασίας 95% και 5% CO₂. Ακολουθούσε αντικατάσταση του θρεπτικού μέσου με νέο χαμηλής περιεκτικότητας σε ορό DMEM/0,1%FBS και επώαση για άλλες 24 ώρες σε κλίβανο, όπως περιγράφηκε παραπάνω, με στόχο οι επωαζόμενοι ινοβλάστες να εισέλθουν σε φάση ηρεμίας. Στα συγχρονισμένα πλέον κύτταρα, σε προκαθορισμένες θέσεις, γινόταν αρχικά η προσθήκη των προστατευτικών παραγόντων, καπτοπρίλη (για το τετραπεπτίδιο Ac-SDKP) και απροτινίνη (για τα πεπτιδία Tα1, Tβ4) και κατόπιν επώασης μιας ώρας, προσετίθεντο τα θυμοσινικά πεπτιδία Tα1, Tβ4 και Ac-SDKP διαλυμένα σε DMEM/0,1%FBS (without serum) και σε DMEM/15% FBS (with serum), στις περιπτώσεις που ελεγχόταν η συνεργατική επίδραση στην βιωσιμότητα των ινοβλαστών. Μελετήθηκε επίσης η πιθανή κυτταροτοξική δράση του κάθε πεπτιδίου ξεχωριστά, διαλυμένου σε DMEM/15%FBS (with serum), αλλά και σε DMEM/0.1% FBS (without serum). Η κυτταροτοξική δράση των πεπτιδίων Tα1, Tβ4 και Ac-SDKP ελέγχθηκε στις συγκεντρώσεις 10, 1 και 0,1 nM, ενώ οι προστατευτικοί παράγοντες καπτοπρίλη και απροτινίνη μελετήθηκαν σε συγκέντρωση 1 μM και 1 μg/mL αντίστοιχα. Πρόκειται για συγκεντρώσεις που επιλέχθηκαν βάσει βιβλιογραφίας. Στη συγκεκριμένη δοκιμασία ως αρνητικός μάρτυρας (control) χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα που επώαστηκαν σε θρεπτικό μέσο χωρίς την προσθήκη κάποιας ουσίας. Ο συνολικός όγκος υγρού σε κάθε θέση ήταν 125 μL. Ακολούθως τα κύτταρα επώαζονταν για 72 ώρες σε κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37 °C, υγρασίας 95% και 5% CO₂.

Στην συνέχεια απομακρύνονταν από όλες τις θέσεις το θρεπτικό υλικό και οι παράγοντες που ήταν διαλυμένοι σε αυτό και προσετίθετο το διάλυμα MTT διαλυμένο σε DMEM, χωρίς ερυθρό της φαινόλης, σε συγκέντρωση 1 mg/μL ανά θέση. Κατόπιν τρίωρης παραμονής αφαιρείτο το διάλυμα του MTT και ακολουθούσε διαλυτοποίηση των κρυστάλλων φορμαζανίου με την προσθήκη 100 μL ισοπροπανόλης, υποβοηθούμενη από ανάδευση για 15 περίπου λεπτά (Αναδευτήρας ShakerTitramax 1000). Όταν οι κρύσταλλοι ήταν πλήρως διαλυμένοι, η πλάκα κυτταροκαλλιέργειας πολλαπλών θέσεων μεταφερόταν στον αναλυτή απορρόφησης / φθορισμού μικροπλακών FLOUstarOPTIMA, όπου γινόταν ποσοτική εκτίμηση της συγκέντρωσης χρωστικής με φωτομέτρηση σε μήκος κύματος απορρόφησης 550 nm και μήκος κύματος αναφοράς τα 630nm.

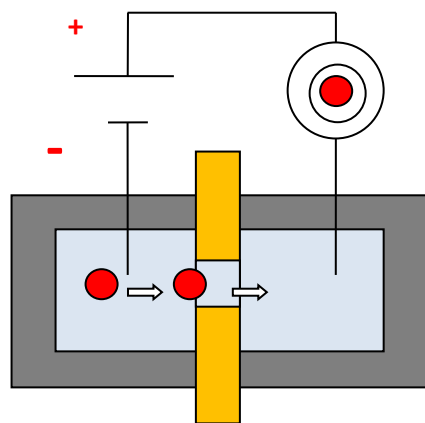
3.4.2. Καταμέτρηση των κυττάρων με σωματιδιακό αναλυτή

Αρχή της μεθόδου:

Ένας εύκολος, γρήγορος και οικονομικός τρόπος, για να αξιολογηθεί η επίδραση που μπορεί να έχουν οι διάφορες ουσίες (σημ. = θυμοσινικά πεπτίδια ή προστατευτικοί παράγοντες) στην επιβίωση και την πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων είναι η καταμέτρηση των κυττάρων σε σωματιδιακό αναλυτή.

Η καταμέτρηση των κυττάρων έγινε σε σωματιδιακό αναλυτή Beckman Coulter Counter. Ο μετρητής Coulter είναι μια συσκευή, η οποία έχει την δυνατότητα να καταμετρά κύτταρα που αιωρούνται σε ειδικά διαλύματα ηλεκτρολυτών. Ένας μετρητής Coulter συνήθως έχει έναν ή περισσότερους μικροδιαύλους, οι οποίοι χωρίζουν τους δυο θαλάμους με τα διαλύματα. Καθώς το κυτταρικό εναιώρημα έλκεται μέσω του μικροδιαύλου, κάθε κύτταρο προκαλεί σύντομη αλλαγή στην αγωγιμότητα του υγρού. Οι αλλαγές ανιχνεύονται από τον μετρητή με μια ηλεκτρική αντίσταση.

Ο κυτταρικός πληθυσμός που προστίθεται στο διάλυμα ηλεκτρολυτών, οφείλει να είναι καλά επαναιωρημένος, χωρίς συσσωματώματα, χωρίς υπολείμματα, ώστε να μην υπάρχουν αλλοιώσεις στον πραγματικό αριθμό των κυττάρων. Ο συνολικός αριθμός των κυττάρων υπολογίζεται, λαμβάνοντας υπόψη τις αραιώσεις και ότι η ένδειξη του αναλυτή αφορά τον αριθμό των κυττάρων που περιέχονται σε συγκεκριμένο όγκο κυτταρικού εναιωρήματος (Coulter & Hogg, 1977).



Εικόνα 3.3: Σχηματική αναπαράσταση της καταμέτρησης των κυττάρων σε σωματιδιακό αναλυτή. Η κίνηση του κυττάρου δια μέσου του διαύλου προκαλεί σύντομη αλλαγή στην ηλεκτρική αντίσταση του υγρού, που ανιχνεύεται από τον μετρητή με μια ηλεκτρική αντίσταση (Coulter & Hogg, 1977) .

Υλικά και όργανα

- Ανθρώπινοι δερματικοί ινοβλάστες **AG01523c** (NIGMS Human Genetic Cell Repository, Coriell Institute for Medical Research)
- Θρεπτικού υλικό **DMEM** (Dulbeco's Minimal Essential Medium), αντιβιοτικά **πενικιλίνη** (10.000 U/L) και **στρεπτομυκίνη** (10.000 µg/L), **L-γλουταμίνη** (4 mM), **πυροσταφυλικό οξύ** (1 mM) και **διττανθρακικό νάτριο** (Biochrom AG, Berlin, Germany)
- **Εμβρυϊκός βόειος ορός** (Fetal Bovine Serum, **FBS**), Gibco BRL (Paisley, UK)
- **Θρυψίνη** (0,25% (w/v) θρυψίνης, 10 mM κιτρικού νατρίου, 110 mM χλωριούχου νατρίου (pH 7,2), Invitrogen (California)
- Τετραπεπτίδιο acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro-OH, **Ac-SDKP**, Bachem AG (Bubendorf, Switzerland)
- **Θυμοσίνη β4**, Bachem AG (Bubendorf, Switzerland)
- **Θυμοσίνη α1**, Bachem AG (Bubendorf, Switzerland)
- **Αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας** (Platelet Derived Growth Factor- **PDGF**), Petrotech (Rocky Hill, USA)
- **Πλάκες κυτταροκαλλιιεργειών πολλαπλών θέσεων**, Greiner (Hanover, Germany)
- **Επωαστικός κλίβανος CO₂** Thermo Forma Series II (Ohio, USA)
- **Εστία νηματικής ροής** Safeflow 1.8, Bioair Instruments (Siziano, Italy)
- **Σωματιδιακός αναλυτής** Beckman Coulter Counter (Beckman, USA)

Πειραματική διαδικασία

Την πρώτη ημέρα γινόταν επίστρωση των ινοβλαστών, στο αρχικό τους θρεπτικό υλικό DMEM/15%FBS, σε πλάκα κυτταροκαλλιέργειας 48 θέσεων. Σε κάθε θέση ο αριθμός των κυττάρων κυμαίνονταν μεταξύ 10000-12000. Τα κύτταρα επώαζονταν για 24 ώρες σε κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37 °C, υγρασίας 95% και 5% CO₂. Ακολουθούσε αντικατάσταση του θρεπτικού μέσου με νέο χαμηλής περιεκτικότητας σε ορό DMEM/0,1% FBS και επώαση για άλλες 24 ώρες σε κλίβανο, όπως περιγράφηκε παραπάνω, με στόχο οι επωαζόμενοι ινοβλάστες να εισέλθουν σε φάση ηρεμίας. Στα συγχρονισμένα πλέον

κύτταρα, σε προκαθορισμένες θέσεις, γινόταν η προσθήκη των θυμοσινικών πεπτιδίων Τα1, Τβ4 και του τετραπεπτιδίου Ac-SDKP διαλυμένα σε DMEM/0,1% FBS για το πρώτο πείραμα και σε DMEM/0,2% FBS για το δεύτερο πείραμα. Τα πεπτίδια ελέγχθηκαν στην συγκέντρωση του 1nM, μια συγκέντρωση που επιλέχτηκε βάσει βιβλιογραφίας. Στη συγκεκριμένη δοκιμασία ως αρνητικός μάρτυρας (control) χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα που επωάστηκαν σε θρεπτικό μέσο χωρίς την προσθήκη κάποιας ουσίας, ενώ ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα που επωάστηκαν σε θρεπτικό μέσο με την προσθήκη PDGF, σε συγκέντρωση 10ng/mL, σύμφωνα με προηγούμενη εμπειρία του εργαστηρίου. Ο συνολικός όγκος υγρού σε κάθε θέση ήταν 300 μL. Ακολούθως τα κύτταρα επωάζονταν για 72 ώρες σε κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 37 °C, υγρασίας 95% και 5% CO₂. Μετά την επώαση, με την διαδικασία της θρυψινοποίησης, τα κύτταρα αποκολλούνταν πλήρως από τα φρεάτια. Ακολουθούσε έκπλυση των φρεατίων με μικρή ποσότητα ισότονου αλατούχου διαλύματος και το κυτταρικό εναιώρημα που προέκυπτε προσετίθεντο σε ειδικό δοχείο για τον σωματιδιακό αναλυτή, όπου αρχικά είχαν τοποθετηθεί 12 mL ισότονου αλατούχου διαλύματος. Ο κυτταρικός πληθυσμός που προσετίθετο, όφειλε να είναι καλά επαναιωρημένος, χωρίς συσσωματώματα, χωρίς υπολείμματα, ώστε να μην υπάρχουν αλλοιώσεις στον πραγματικό αριθμό των κυττάρων. Πριν την καταμέτρηση των κυττάρων, η πλάκα πολλαπλών θέσεων μικροσκοπούνταν ώστε να επιβεβαιωθεί ότι δεν παρέμεναν κύτταρα στα φρεάτια. Τα δοχεία, στην συνέχεια μεταφέρονταν στον σωματιδιακό αναλυτή και γινόταν η καταμέτρηση των κυττάρων.

Κατά το πρώτο πείραμα πραγματοποιήθηκε επίστρωση και δεύτερης πλάκας κυτταροκαλλιέργειας 48 θέσεων, για την οποία ακολουθήθηκε ακριβώς η ίδια διαδικασία με την διαφορά ότι η καταμέτρηση των κυττάρων έγινε 7 ημέρες μετά την προσθήκη των πεπτιδίων.

3.4.3. Ποσοτικός προσδιορισμός σύνθεσης DNA με την μέθοδο της τριτιωμένης θυμιδίνης

Αρχή της μεθόδου:

Η πολλαπλασιαστική ικανότητα κυττάρων ως απάντηση στην επίδραση ποικίλων παραγόντων δύναται να αξιολογηθεί με την δοκιμασία της τριτιωμένης θυμιδίνης (³H-TdR). Η θυμιδίνη είναι η μια από τις δύο βάσεις πυριμιδίνης που συμμετέχουν στη δομή του DNA. Όταν σημανθεί με τρίτιο και προστεθεί στο θρεπτικό υλικό των αρχικά ηρεμούντων κυττάρων που πρόκειται να δεχτούν μιτογόνο ερέθισμα, υπό συγκεκριμένες συνθήκες επώασης, κατά την μιτωτική διαίρεση των κυττάρων ενσωματώνεται στις νεοσυντιθέμενες αλυσίδες του DNA (Mosmann, 1983). Για να είναι εφικτός ο ποσοτικός προσδιορισμός της ενσωματωμένης θυμιδίνης πραγματοποιείται αρχικά λύση των

κυττάρων και συλλογή του λύματος και εν συνεχεία η μέτρηση της β-ακτινοβολίας με την μέθοδο του υγρού σπινθηρισμού (scintillation counting). Κατ'αυτόν τον τρόπο μετράται η ποσότητα του νεοσυντιθέμενου DNA της καλλιέργειας από την στιγμή της προσθήκης της τριτιωμένης θυμιδίνης έως και την συλλογή και λύση των κυττάρων.



Εικόνα 3.4: Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας προσδιορισμού της σύνθεσης DNA με τη μέθοδο τριτιωμένης θυμιδίνης (Γραμματικάκη, 2017).

Υλικά και όργανα:

- **Ανθρώπινοι δερματικοί ινοβλάστες GM21808**
- Θρεπτικό υλικό **DMEM** (Dulbecco's Minimal Essential Medium), αντιβιοτικά **πενικιλίνη** (10.000 U/L) και **στρεπτομυκίνη** (10.000 µg/L), **L-γλουταμίνη** (4 mM), **πυροσταφυλικό οξύ** (1 mM) και **διττανθρακικό νάτριο** (Biochrom AG, Berlin, Germany)
- **Εμβρυϊκός βόειος ορός** (Fetal Bovine Serum, **FBS**), Gibco BRL (Paisley, UK)
- **Τριχλωροοξικό οξύ** (Trichloroacetic acid, **TCA**), Panreac (Barcelona, Spain)
- **Triton X-100**, Merck (Damstadt, Germany)
- **Τολουόλιο**, Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
- **2,5-Diphenyloxazole – PPO**, Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
- **1,4-bis(5-Phenyloxazol-2-yl) benzene - POPOP**, SigmaAldrich (St. Louis, USA)
- Ισοτονικό ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών - χλωριούχων 10X, pH 7,2 (Phosphate Buffer Saline, PBS) **Na₂HPO₄14.4 g**
NaCl80 g
KH₂PO₄2.4 g
KCl 2 g

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

- **Τριτιωμένη θυμιδίνη** [(methyl³H) thymidine], GE Healthcare (UK)

- Τετραπεπτιδίο acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro-OH, **Ac-SDKP**, Bachem AG (Bubendorf, Switzerland)
- **Θυμοσίνη β4**, Bachem AG (Bubendorf, Switzerland)
- **Θυμοσίνη α1**, Bachem AG (Bubendorf, Switzerland)
- **Πλάκες κυτταροκαλλιιεργειών πολλαπλών θέσεων**, Greiner (Hanover, Germany)
- **Επωαστικός κλίβανος** CO2 Thermo Forma Series II (Ohio, USA)
- **Εστία νηματικής ροής** Safeflow 1.8, Bioair Instruments (Siziano, Italy)
- **Αναδευτήρας** Shaker Multi Microplate – Genie, Scientific Industries (NY, USA)
- **Φυγόκεντρος** SANYO HARRIER 18180 Refrigerated, MSE (UK)
- **Μετρητής β-ακτινοβολίας** - Liquid Scintillation Analyzer TRI- CARB 2100 R Packard, Perkin Elmer (USA)

Πειραματική διαδικασία:

Βάσει του τροποποιημένου πρωτοκόλλου των Heldin et al (1987) που χρησιμοποιήθηκε, αρχικά γινόταν σε πλάκα 48 θέσεων η επίστρωση των ινοβλαστών, σε θρεπτικό υλικό DMEM/ 15% FBS και επωάζονταν επί 72 ώρες σε κλίβανο με σταθερή θερμοκρασία 37°C, 95% υγρασία και 5% CO₂. Ακολουθούσε αντικατάσταση του θρεπτικού υλικού με νέο, χαμηλής περιεκτικότητας σε ορό DMEM/ 0,1% FBS και επανεπώαση για 48 ώρες στον κλίβανο (σταθερή θερμοκρασία 37°C, 95% υγρασία και 5% CO₂), για να συγχρονιστούν τα κύτταρα σε φάση ηρεμίας. Στη συνέχεια γινόταν η προσθήκη των υπό μελέτη ουσιών, που ήταν διαλυμένες σε DMEM/ 0,1% FBS, στις επιθυμητές προς εξέταση συγκεντρώσεις, μαζί με 0,2 μCi/mL 3H-TdR, ειδικής ενεργότητας 1 mCi/mL. Τα πεπτίδια Τα1, Τβ4 και Ac-SDKP ελέγχθηκαν στις συγκεντρώσεις 10, 1 και 0,1 nM. Οι παραπάνω συγκεντρώσεις επιλέχθηκαν βάσει βιβλιογραφίας. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν στο θρεπτικό υλικό τους, χωρίς την προσθήκη κάποιας ουσίας. Τα κύτταρα επωάζονταν για 72 ώρες σε κλίβανο στις συνθήκες που περιγράφηκαν παραπάνω.

Μετά την επώαση, απορριπτόταν το θρεπτικό υλικό, το οποίο περιείχε την περίσσεια 3H-TdR (μη ενσωματωμένη στους ινοβλάστες) και ακολουθούσαν εκπλύσεις (δισ) με PBS και προσθήκη 10% (w/v) διαλύματος TCA, θερμοκρασίας 4°C, ώστε να μονιμοποιηθούν τα κύτταρα στον πυθμένα κάθε θέσης. Επί 15 min τα κύτταρα επωάζονταν στον πάγκο εργασίας, σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια γινόταν έκπλυση με H₂O, ώστε να απομακρυνθούν πιθανά υπολείμματα του TCA, ο οποίος είναι ισχυρότατος παράγοντας σβέσεως (quencher) του υγρού σπινθηρισμού και μπορεί να αλλοιώσει τις μετρήσεις (χαμηλότερες τιμές από τις πραγματικές). Η πλάκα αφηνόταν στεγνώσει, ώστε να μπορέσει να ακολουθήσει η λύση των κυτταρικών μεμβρανών με προσθήκη διαλύματος λύσης (lysis buffer- υδατικό διάλυμα 1% (w/v) SDS – 0,3 N NaOH). Ο όγκος του υδατικού διαλύματος SDS/NaOH στον οποίο λύονταν τα κύτταρα, έπρεπε να είναι μικρότερος του 1/10 του όγκου

του υγρού σπινθηρισμού, ώστε να μην σχηματιστεί γαλάκτωμα και αλλοιωθούν οι μετρήσεις. Στην συνέχεια και για 1h τα κύτταρα επωάζονταν σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση σε ειδικό αναδευτήρα. Το λύμα των κυττάρων μεταφερόταν σε ειδικό φιαλίδιο σπινθηρισμού (scintillation vial), όπου αναμιγνυόταν – υπό έντονη ανάδευση – με υγρό σπινθηρισμού (scintillation fluid), αποτελούμενο από :

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

Τέλος τα φιαλίδια μεταφέρονταν και μετρούνταν σε μετρητή β-ακτινοβολίας.

3.4.4. Προσδιορισμός της σύνθεσης κολλαγόνου με την μέθοδο της τριτιωμένης προλίνης

Αρχή της μεθόδου

Οι ινοβλάστες, κατά την διαδικασία της επούλωσης, μεταναστεύουν κατά μήκος του δικτύου θρόμβου ινικής - ινονεκτίνης και άλλων ECM πρωτεϊνών, εναποθέτουν τα προϊόντα σύνθεσής τους, όπως πρωτεϊνογλυκάνες, ελαστίνη και το κυριότερο όλων, το κολλαγόνο (Li, et al., 2007). Η σύνθεση του κολλαγόνου είναι μείζονος σημασίας στην φάση του πολλαπλασιασμού και της αναδιαμόρφωσης (Menke et al., 2006). Η προλίνη αποτελεί ένα από τα βασικότερα αμινοξέα στην δομή του κολλαγόνου, καθώς μαζί με την υδροξυπρολίνη δομούν το 23% του κολλαγόνου. Επιπλέον κατά τη διάρκεια των πρώιμων φάσεων επούλωσης του τραύματος, τα επίπεδα της προλίνης στο υγρό του τραύματος είναι τουλάχιστον κατά 50% υψηλότερα από τα επίπεδα στο πλάσμα, γεγονός που υποδηλώνει την ενεργό παρουσία της προλίνης κατά την άθροιση κολλαγόνου στην τραυματική περιοχή (Barbul A., 2008).

Μια αξιόπιστη μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό του κολλαγόνου, ακόμη και παρουσία μεγάλων ποσοτήτων άλλων πρωτεϊνών είναι η μέτρηση της τριτιωμένης προλίνης (L-[5-³H] προλίνης). Η μέθοδος βασίζεται στην μέτρηση της ενσωμάτωσης της ραδιοσημασμένης προλίνης στις νεοσυντιθέμενες ίνες του κολλαγόνου. Η ενσωμάτωση γίνεται με προσθήκη της ραδιενεργού προλίνης στο θρεπτικό υλικό των καλλιιεργειών (όπου οι ινοβλάστες ήταν συγχρονισμένοι σε φάση «μη παραγωγής κολλαγόνου»), ενώ ταυτόχρονα δέχονται ερέθισμα για παραγωγή κολλαγόνου από τις προς μελέτη ουσίες. Κατόπιν επώασης, ακολουθεί καταβύθιση των πρωτεϊνών του υπερκείμενου με TCA και επαναδιάλυση του ιζήματος (μακρομόρια) σε διάλυμα NaOH, που κατόπιν εξουδετερώνεται με HCl και Hepes. Στην συνέχεια το διάλυμα διαιρείται σε δυο ίσα μέρη και στο ένα μέρος προστίθεται κολλαγενάση. Το ένζυμο κολλαγενάση καταλύει την

διάσπαση του κολλαγόνου σε μικρότερα πεπτίδια. Επειδή η εμπορικά διαθέσιμη βακτηριακή κολλαγενάση που χρησιμοποιήθηκε, περιείχε και πρωτεΐνάσες με μη ειδική για το κολλαγόνο πρωτεολυτική δράση, χρησιμοποιήθηκε N-αιθυλμαλεϊμίδιο για να κατασταλεί η δράση τους. Μετά από επώαση, στο διάλυμα χωρίς, αλλά και με κολλαγενάση προσετίθετο TCA/ταννικό οξύ με σκοπό την καταβύθιση των μη κολλαγονούχων πρωτεϊνών. Το υπερκείμενο με τα κολλαγονούχα πεπτίδια μεταφερόταν σε φιαλίδια που περιείχαν υγρό σπινθηρισμού και ακολουθούσε μέτρηση της ακτινοβολίας του. Οι τιμές των μετρήσεων αντιστοιχούν στην άθροιση του κολλαγόνου από την στιγμή της προσθήκης της τριτωμένης προλίνης έως και την συλλογή του υπερκειμένου (Peterkofsky & Diegelmann, 1971).

Υλικά και όργανα:

- Ανθρώπινοι δερματικοί ινοβλάστες **GM021808** και **AG01523c**
- Θρεπτικό υλικό **DMEM**
- **Εμβρυϊκός βόειος ορός** (Fetal Bovine Serum, **FBS**), Gibco BRL (Paisley, UK)
- **Τριχλωροοξικό οξύ** (Trichloroacetic acid, **TCA**), Panreac (Barcelona, Spain)
- **Ασκορβικό νάτριο**(Sodium Ascorbate), Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
- **β-Αμινοπροπιονιτρίλιο** (β-amino propionitrile - **βAPN**), Sigma Aldrich (St.

Louis, USA)

- **N-αιθυλμαλεϊμίδιο** (**NEM** - N-ethyl-maleimide),
- **Κολλαγονάση** (Collagenase), Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
- **Triton X-100**, Merck (Damstadt, Germany)
- **Τολουόλιο**, Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
- **2,5-Diphenyloxazole** (**PPO**), Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
- **1,4-bis(5-Phenyloxazol-2-yl) benzene** (**POPOP**), Sigma Aldrich (St. Louis,

USA)

- **Ρυθμιστικό διάλυμα HEPES 1 M**, Biochrom AG (Berlin, Germany)
- **Αλβουμίνη βόειου ορού** (Bovine Serum Albumin, **BSA**), Genaxis Biotechnology (Germany)
- **Τριτωμένη προλίνη** (L-[5-3H] Proline), Moraveck Biochemicals (California,

USA)

- **Μετασχηματίζων αυξητικός παράγοντας - β1** (Transforming Growth Factor -

β1, **TGF-β1**), Petrotech (RockyHill, USA)

- **Θυμοσίνη β4**, Bachem AG (Bubendorf, Switzerland)
- **Θυμοσίνη α1**, Bachem AG (Bubendorf, Switzerland)
- Τετραπεπτίδιο acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro-OH, **Ac-SDKP**, Bachem AG (Bubendorf, Switzerland)

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

Πειραματική διαδικασία

Σύμφωνα με το τροποποιημένο πρωτόκολλο των Peterkofsky και Diegelmann που εφαρμόζεται στο εργαστήριο, την πρώτη ημέρα επιστρώνονταν τα κύτταρα σε πλάκες 48 θέσεων, σε θρεπτικό υλικό DMEM/15% FBS και σε κάθε θέση περιέχονταν περίπου 10000-12000 κύτταρα. Οι ινοβλάστες επώαζονταν για 24 ώρες σε κλίβανο με σταθερή θερμοκρασία 37°C, 95% υγρασία και 5% CO₂. Ακολουθούσε αλλαγή θρεπτικού υλικού με νέο FBS 0.1% και επώαση για άλλες 24 ώρες, με σκοπό την προσαρμογή των ινοβλαστών σε συνθήκες χαμηλής παραγωγής κολλαγόνου. Ακολουθούσε προσθήκη των θυμοσινικών πεπτιδίων στις επιθυμητές συγκεντρώσεις, διαλυμένων σε FBS 0.1% μαζί με 5mCi/ml L-[5-H³] Proline, 50 µg/mL Sodium Ascorbate, 50 µg/mL β-APN, αλλά και των θετικών και αρνητικών μάρτυρων και επώαση επί 48 ώρες σε κλίβανο με σταθερή θερμοκρασία 37°C, 95% υγρασία και 5% CO₂.

Το ασκορβικό οξύ αποτελεί συνένζυμο των υδροξυλασών, ενζύμων που καταλύουν την υδροξυλίωση των αμινοξέων προλίνης στα αρχικά στάδια της σύνθεσης του κολλαγόνου (Boyera et al., 1998), ενώ το β-αμινοπροπιονιτρίλιο (β-APN) αναστέλλει τον σχηματισμό σταυροσυνδέσμων μεταξύ των σχηματιζόμενων ελίκων του κολλαγόνου, διατηρώντας το στην διαλυτή μορφή του (Senturk et al., 2004). Τα πεπτίδια Tα1, Tβ4 και Ac-SDKP ελέγχθηκαν στις συγκεντρώσεις 10, 1 και 0,1 nM. Οι παραπάνω συγκεντρώσεις επιλέχθηκαν βάσει βιβλιογραφικής μελέτης. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν χωρίς την επίδραση κάποιας ουσίας, ενώ ως θετικός μάρτυρας λειτούργησαν τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν υπό την επίδραση του TGFβ1. Κατά κανόνα, ο συνολικός όγκος ανά θέση έπρεπε να είναι 300 µL.

Μετά την επώαση, το υπερκείμενο (300 µL) συλλέγονταν σε φιαλίδια erpendorfs, ακολουθούσε έκπλυση των φρεατίων με 500 µL Tris-HCl 50Mm, pH 7,2/NaCl 110mM και το υγρό της έκπλυσης προσετίθεντο στο φιαλίδιο που περιείχε το υπερκείμενο. Στην συνέχεια

γινόταν προσθήκη διαλύματος BSA (τελικής συγκέντρωσης 0,75 mg/mL) και TCA 100% (για να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση 10%) ώστε να κατακρημνιστούν οι πρωτεΐνες του υπερκείμενου. Τα μείγματα που προέκυπταν από κάθε φρεάτιο, αναδεύονταν έντονα στον αναδευτήρα Vortex και επωάζονταν σε πάγο για περίπου 1 ώρα. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση στα 10.000 rpm, στους 4°C για 5 min και το υπερκείμενο απορριπτόταν, ενώ το στερεό υπόλειμμα εκπλενόταν με TCA 5%, αναδεύονταν έντονα και επωαζόταν για 30 λεπτά στον πάγο. Τη διαδικασία αυτή διαδεχόταν μια δεύτερη φυγοκέντρηση, όπως περιγράφηκε παραπάνω και το υπερκείμενο που προέκυπτε απορριπτόταν. Για την επαναδιάλυση του ιζήματος προσετίθετο NaOH 0,2 N και ακολουθούσε έντονη ανάδευση μέχρι πλήρους διάλυσης. Στη συνέχεια, γινόταν προσθήκη HCl 0,3 N, HEPES 1 M και NEM 25 mM (τελική συγκέντρωση 2,5 mM), ώστε να ανασταλεί η δράση των πρωτεασών, ειδικά της κλοστριπαΐνης, που θα μπορούσε να έχει επιμολύνει την κολλαγενάση. Μετά από έντονη ανάδευση, το μείγμα από κάθε φιαλίδιο μοιραζόταν σε δύο επιμέρους φιαλίδια, στο ένα από τα οποία είχε προστεθεί κολλαγενάση 1 U/μL (τελικής περιεκτικότητας περίπου 0,05 U/μL), ενώ το άλλο περιείχε διάλυμα χωρίς κολλαγενάση. Τα δείγματα (χωρίς και με το ένζυμο) αναδεύονταν έντονα στον αναδευτήρα Vortex και επωάζονταν για 2 ώρες στους 37°C και στη συνέχεια για 18 ώρες (overnight) στους 25°C.

Μετά την επώαση τα δείγματα μεταφέρονταν στους 4°C, ώστε να ανασταλεί δράση της κολλαγενάσης. Ακολουθούσε προσθήκη TCA 10%/ταννικό οξύ 0,5%, ώστε να κατακρημνιστούν οι πρωτεΐνες και έντονη ανάδευση και παραμονή στους 4°C για 30 min, για αποτελεσματικότερη καταβύθιση. Στην συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρούνταν στις 10.000 rpm, στους 4°C για 5 min και το υπερκείμενο μεταφερόταν σε ειδικά φιαλίδια σπινθηρισμού (scintillation vials). Εντός των φιαλιδίων και υπό έντονη ανάδευση, τα υπερκείμενα αναμειγνύονταν με το υγρό σπινθηρισμού (scintillation fluid), που αποτελείται από :

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

Η μέτρηση της ραδιενέργειας των φιαλιδίων γινόταν σε μετρητή β-ακτινοβολίας και οι «καθαρές» κρούσεις ανά λεπτό (counts per min, cpm) ισούταν με το υπόλοιπο των τιμών των δειγμάτων χωρίς κολλαγενάση και των τιμών των δειγμάτων με κολλαγενάση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Έλεγχος βιολογικής δράσης των πεπτιδίων

Στο τέταρτο κεφάλαιο παραθέτονται τα αποτελέσματα των *in vitro* δοκιμασιών με τις οποίες ελέγχθηκε η πιθανή επουλωτική δράση των θυμοσινικών πεπτιδίων Τα1, Τβ4 και του αμινοτελικού τετραπεπτιδίου Ac-SDKP. Επίσης παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της αθροιστικής δράσης των προστατευτικών παραγόντων καπτοπρίλη και απροτινίνη με τα αντίστοιχα θυμοσινικά πεπτίδια (καπτοπρίλη &Ac-SDKP, απροτινίνη &Τα1 ή Τβ4). Οι ινοβλάστες επιλέχθηκαν ως κύτταρα μελέτης λόγω της ενεργής συμμετοχής τους σε διάφορα στάδια της επουλωτικής διαδικασίας και κυρίως το στάδιο της ινοπλασίας κατά το οποίο η εναπόθεση του παραγόμενου, από τους ινοβλάστες, κολλαγόνου στην περιοχή του τραύματος οδηγεί σε πλήρωση του τραυματικού κενού και επιπλέον λειτουργεί ως υπόστρωμα για την μετανάστευση των κερατινοκυττάρων που θα σχηματίσουν την νέα επιδερμίδα.

Οι μέθοδοι, τα υλικά και τα πρωτόκολλα των δοκιμασιών ελέγχου κυτταρικής βιωσιμότητας, καταμέτρησης των κυττάρων, επίδρασης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και της κολλαγονοσύνθεσης περιγράφονται στο Κεφάλαιο 3.

4.1. Έλεγχος κυτταρικής βιωσιμότητας με τη μέθοδο ΜΤΤ

Αρχικά ελέγχθηκε η πιθανή κυτταροτοξική δράση των θυμοσινικών πεπτιδίων Τα1, Τβ4, τετραπεπτιδίου Ac-SDKP μόνα τους και σε συνεπώαση με τους προστατευτικούς παράγοντες καπτοπρίλη και απροτινίνη. Η καπτοπρίλη βάσει βιβλιογραφίας αναστέλλει την αποδόμηση του Ac-SDKP και ως εκ τούτου χρησιμοποιήθηκε ως προστατευτικός παράγοντας (Azizi et al., 1996; Kumar et al., 2016), ενώ ως προστατευτικός παράγοντας για τις θυμοσίνες Τα1 και Τβ4 χρησιμοποιήθηκε η απροτινίνη.

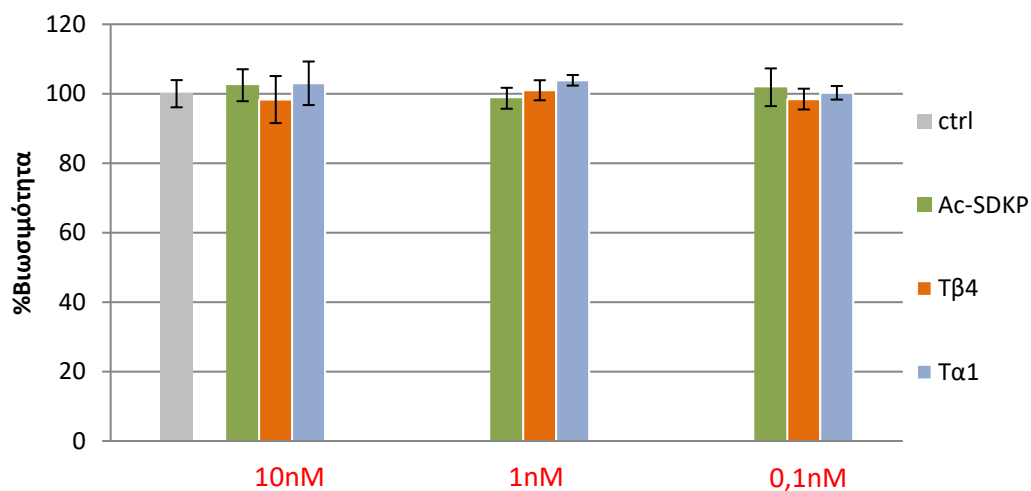
Οι συγκεντρώσεις για τις οποίες εκτιμήθηκε η πιθανή κυτταροτοξική δράση των Τα1, Τβ4 και τετραπεπτιδίου Ac-SDKP ήταν από 10 έως 0,1 nM, ενώ η καπτοπρίλη μελετήθηκε στο 1μM και η απροτινίνη στο 1μg/mL. Οι παραπάνω συγκεντρώσεις επιλέχθηκαν βάσει βιβλιογραφικής μελέτης. Όλοι οι παράγοντες μελετήθηκαν διαλυμένοι σε DMEM/15%FBS (with serum), αλλά και σε DMEM/0.1%FBS (without serum). Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν οι ινοβλάστες που καλλιεργήθηκαν στο θρεπτικό τους υλικό χωρίς την

προσθήκη κάποιας από τις προς μελέτη ουσίες, ενώ δεν χρησιμοποιήθηκαν θετικοί μάρτυρες.

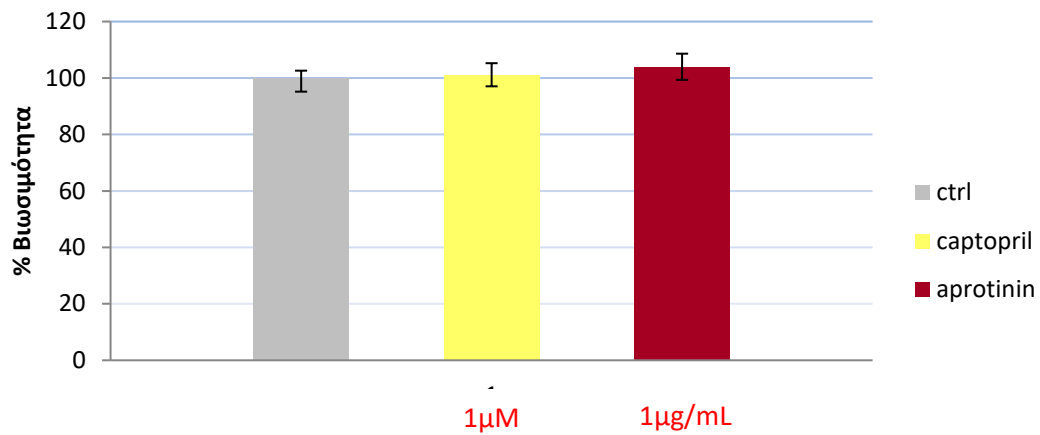
Συνολικά πραγματοποιήθηκαν τρία πειράματα ελέγχου κυτταρικής βιωσιμότητας με την μέθοδο MTT.

Το πρώτο πείραμα πραγματοποιήθηκε σε ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες **GM021808** και μελετήθηκε η μεμονωμένη επίδραση των θυμοσινικών πεπτιδίων Τα1, Τβ4 και Ac-SDKP, αλλά και η αθροιστική τους επίδραση, όταν συνεπιάζονταν με τους προστατευτικούς παράγοντες καπτοπρίλη και απροτινίνη. Τόσο τα πεπτίδια, όσο και οι προστατευτικοί παράγοντες μελετήθηκαν απουσία ορού (διαλυμένα σε DMEM/0,1%FBS), αλλά και παρουσία ορού (διαλυμένα σε DMEM/15%FBS).

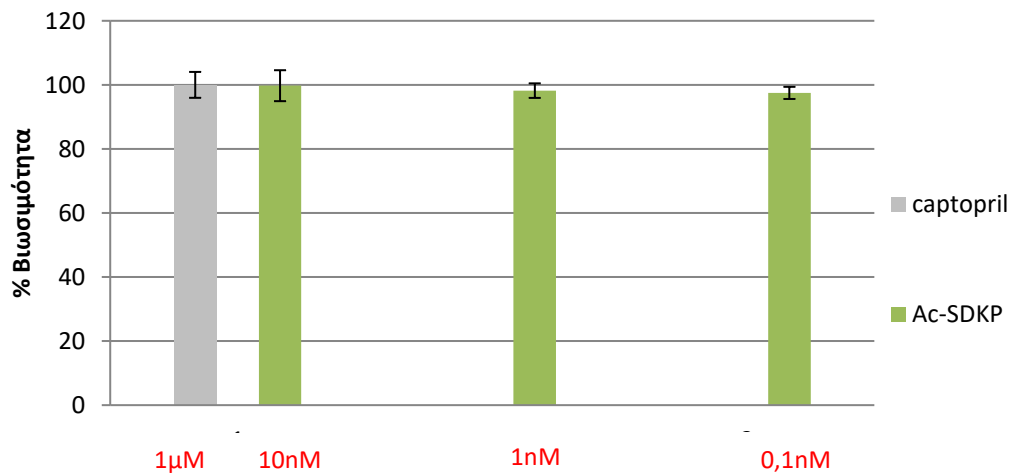
Σύμφωνα με την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων του πρώτου πειράματος, που πραγματοποιήθηκαν σε απουσία ορού (Εικ. 4.1.1 έως 4.1.4), δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην βιωσιμότητα των ινοβλαστών, σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα, κατά την μελέτη της μεμονωμένης επίδρασης των θυμοσινών. Επίσης, μη στατιστικά σημαντικές διαφορές παρουσίασε και η μελέτη της αθροιστικής δράσης του τετραπεπτιδίου με την καπτοπρίλη, καθώς και της απροτινίνης με την Τβ4 ή Τα1.



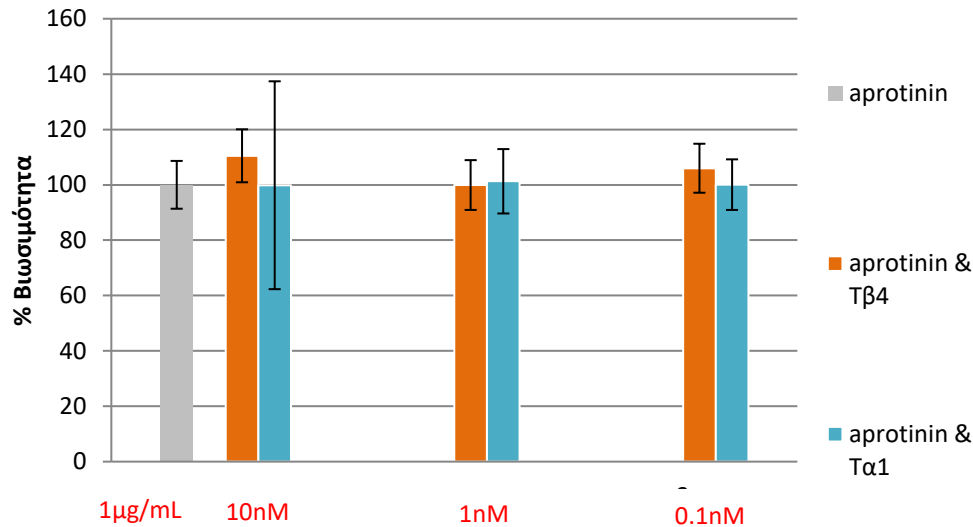
Εικόνα 4.1.1: Διάγραμμα εκτίμησης της βιωσιμότητας των ινοβλαστών GM021808 παρουσία Ac-SDKP, Τβ4 και Τα1 (απουσία ορού) σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (κύτταρα σε θρεπτικό υλικό, χωρίς την επίδραση κάποιας ουσίας).



Εικόνα 4.1.2: Διάγραμμα εκτίμησης της βιωσιμότητας των ινοβλαστών GM021808 παρουσία καπτοπρίλης και απροτινίνης (απουσία ορού) σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (κύτταρα σε θρεπτικό υλικό, χωρίς την επίδραση άλλης ουσίας).



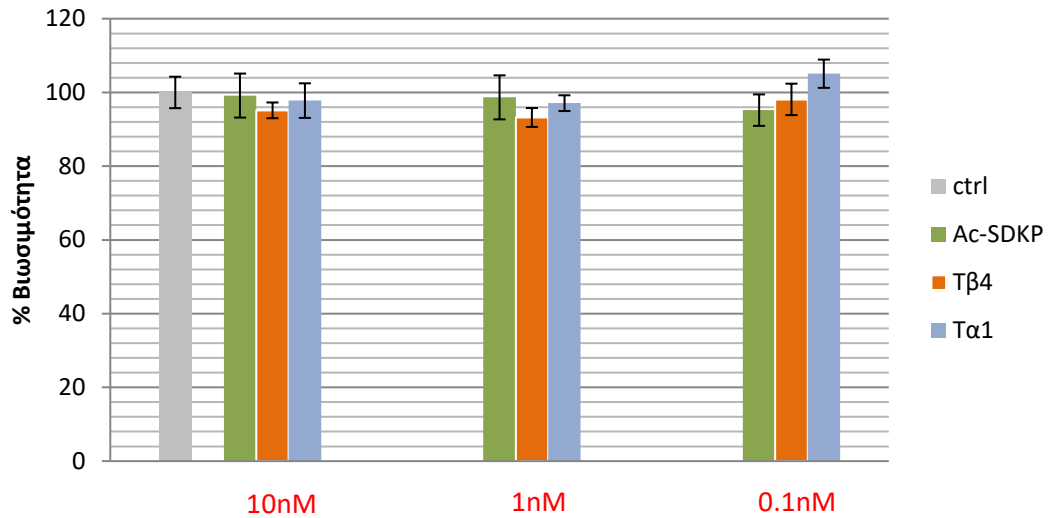
Εικόνα 4.1.3: Διάγραμμα εκτίμησης της βιωσιμότητας των ινοβλαστών GM021808 παρουσία καπτοπρίλης 1μM & Ac-SDKP σε συγκεντρώσεις 10, 1 και 0,1 nM, σε σχέση με τον μάρτυρα- καπτοπρίλη (απουσία ορού).



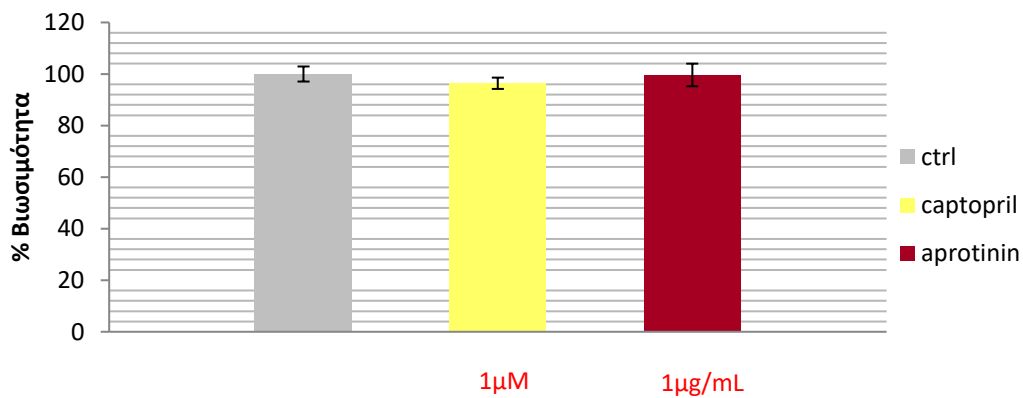
Εικόνα 4.1.4: Διάγραμμα εκτίμησης της βιωσιμότητας των ινοβλαστών GM021808 παρουσία απροτινίνης 1 μg/mL & Tβ4, Tα1 σε συγκεντρώσεις 10, 1 και 0,1 nM, σε σχέση με τον μάρτυρα-απροτινίνη (απουσία ορού).

Το δεύτερο σκέλος του πρώτου πειράματος πραγματοποιήθηκε παρουσία ορού (διάλυση των ουσιών σε DMEM/15%FBS) και μελετήθηκε η μεμονωμένη επίδραση των θυμοσινικών πεπτιδίων, καθώς και η αθροιστική τους επίδραση κατά την συνεπώαση με τους προστατευτικούς παράγοντες. Επειδή, ακριβώς οι ίδιες συνθήκες διατηρήθηκαν και στα δυο επόμενα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες **AG01523c** και επιπλέον τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια, επιλέχθηκε η παρουσίαση μιας συνολικής στατιστικής επεξεργασίας και των τριών πειραμάτων (παρουσία ορού).

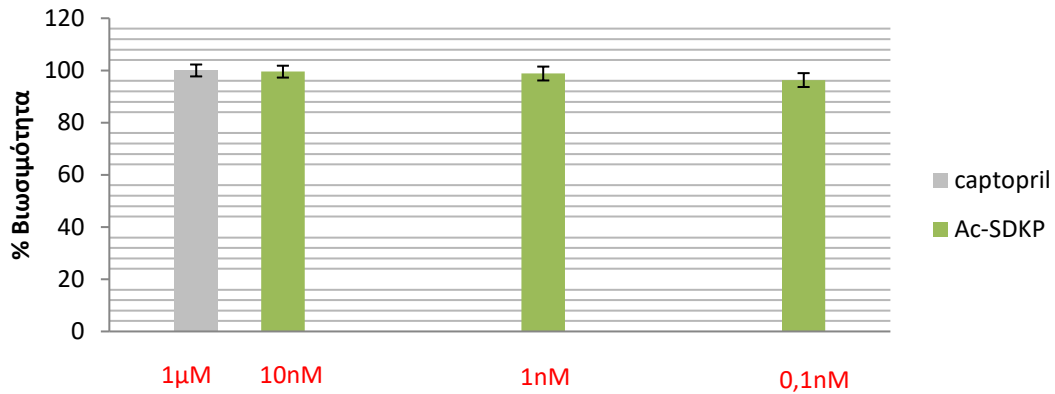
Κατά την συνολική στατιστική ανάλυση των δεδομένων των τριών πειραμάτων, που πραγματοποιήθηκαν παρουσία ορού (Εικ. 4.1.5 έως 4.1.8), δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην βιωσιμότητα των ινοβλαστών, σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα, κατά την μελέτη της μεμονωμένης επίδρασης των πεπτιδίων Tβ4, Tα1 και τετραπεπτιδίου Ac-SDKP για τις συγκεντρώσεις 10, 1 και 0,1 nM. Μη στατιστικά σημαντικές ήταν και οι διαφορές που παρουσίασε η μελέτη της αθροιστικής δράσης του τετραπεπτιδίου με την καπτοπρίλη, καθώς και της απροτινίνης με την Tβ4 και την Tα1, σε όλες τις συγκεντρώσεις.



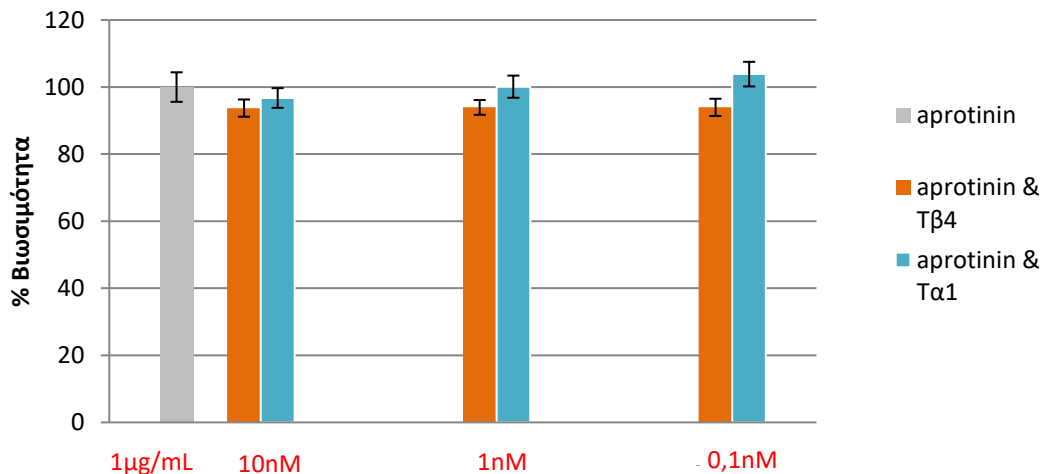
Εικόνα 4.1.5: Διάγραμμα συνολικής εκτίμησης της βιωσιμότητας των ινοβλαστών παρουσία Ac-SDKP, Tβ4 και Tα1 (παρουσία ορού), σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (κύτταρα σε θρεπτικό υλικό, χωρίς την επίδραση κάποιας ουσίας).



Εικόνα 4.1.6: Διάγραμμα συνολικής εκτίμησης της βιωσιμότητας των ινοβλαστών παρουσία καπτοπρίλης και απροτινίνης (παρουσία ορού), σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (κύτταρα σε θρεπτικό υλικό, χωρίς την επίδραση κάποιας ουσίας).



Εικόνα 4.1.7: Διάγραμμα συνολικής εκτίμησης της βιωσιμότητας των ινοβλαστών παρουσία καπτοπρίλης 1 μM & Ac-SDKP σε συγκεντρώσεις 10, 1 και 0,1 nM, σε σχέση με τον μάρτυρα- καπτοπρίλη (παρουσία ορού).



Εικόνα 4.1.8: Διάγραμμα συνολικής εκτίμησης της βιωσιμότητας των ινοβλαστών παρουσία απροτινίνης 1 μg/mL & Tβ4, Tα1 σε συγκεντρώσεις 10, 1 και 0,1 nM, σε σχέση με τον μάρτυρα-απροτινίνη (παρουσία ορού).

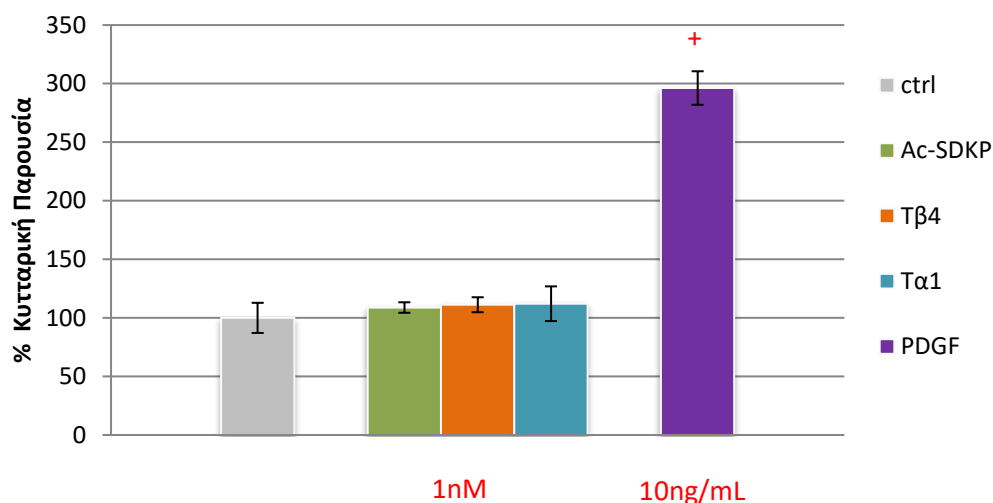
Στη συνολική θεώρηση της μεμονωμένης, αλλά και της αθροιστικής επίδρασης των πεπτιδίων (παρουσία των προστατευτικών παραγόντων), παρουσία / απουσία ορού, στη βιωσιμότητα των ινοβλαστών δεν σημειώθηκε κάποια κυτταροτοξική δράση. Επιπλέον, κατά την συνεπώαση του Ac-SDKP με την καπτοπρίλη και των Tα1, Tβ4 με την απροτινίνη δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην βιωσιμότητα των ινοβλαστών σε σχέση με την μεμονωμένη δράση των θυμοσινικών πεπτιδίων. Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει ότι η παρουσία των προστατευτικών παραγόντων καπτοπρίλης ή απροτινίνης σε παρόμοιες in vitro δοκιμασίες δεν είναι υποχρεωτική.

4.2. Καταμέτρηση κυττάρων με σωματιδιακό αναλυτή

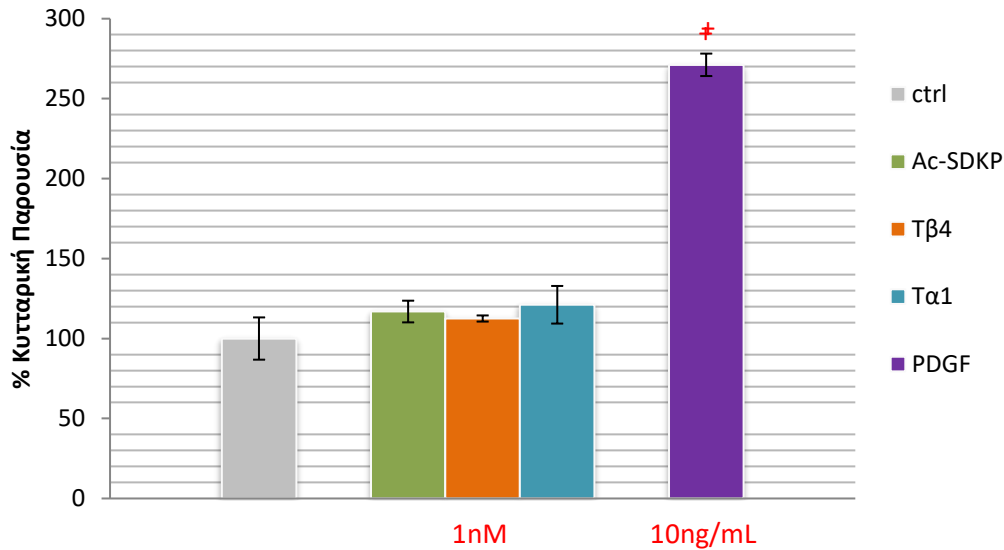
Συνολικά διενεργήθηκαν δυο πειράματα καταμέτρησης των ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών **AG 01523c** σε σωματιδιακό αναλυτή. Ο σκοπός των πειραμάτων ήταν η μελέτη της επίδρασης, που μπορεί να έχουν στην επιβίωση και το πολλαπλασιαστικό δυναμικό των συγκεκριμένων ινοβλαστών τα θυμοσινικά πεπτίδια Tα1, Tβ4 και Ac-SDKP. Τα πεπτίδια ελέγχθηκαν σε συγκέντρωση 1nM, μια συγκέντρωση που επιλέχτηκε βάσει βιβλιογραφίας. Ως αρνητικός μάρτυρας (control) χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα που επώαστηκαν σε θρεπτικό μέσο χωρίς την προσθήκη κάποιας ουσίας, ενώ θετικός μάρτυρας ήταν ο PDGF σε συγκέντρωση 10ng/mL, σύμφωνα με προηγούμενη εμπειρία του εργαστηρίου.

Στο πρώτο πείραμα, του οποίου τα αποτελέσματα παραθέτονται στις εικόνες 4.2.1 και 4.2.2, η επίδραση των πεπτιδίων στην επιβίωση και την πολλαπλασιαστική ικανότητα των ινοβλαστών ελέγχθηκε με καταμέτρηση του αριθμού των κυττάρων στις 72 ώρες (Εικ. 4.2.1) και στις 7ημέρες (Εικ.4.2.2). Τα πεπτίδια Tα1, Tβ4 και Ac-SDKP που προστέθηκαν στις δυο πλάκες κυτταροκαλλιέργειας (μια καταμετρήθηκε στις 72 ώρες και η δεύτερη στις 7 ημέρες), ήταν διαλυμένα σε DMEM/0,1%FBS.

Κατά την στατιστική ανάλυση των δεδομένων που προέκυψαν και από τις δυο μετρήσεις (72 ώρες / 7 ημέρες) δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές για τα πεπτίδια Tα1, Tβ4 και Ac-SDKP σε σχέση με τον αρνητικό (κύτταρα που αναπτύχθηκαν χωρίς την επίδραση κάποιας ουσίας) και τον θετικό μάρτυρα (κύτταρα που αναπτύχθηκαν υπό την επίδραση του PDGF).



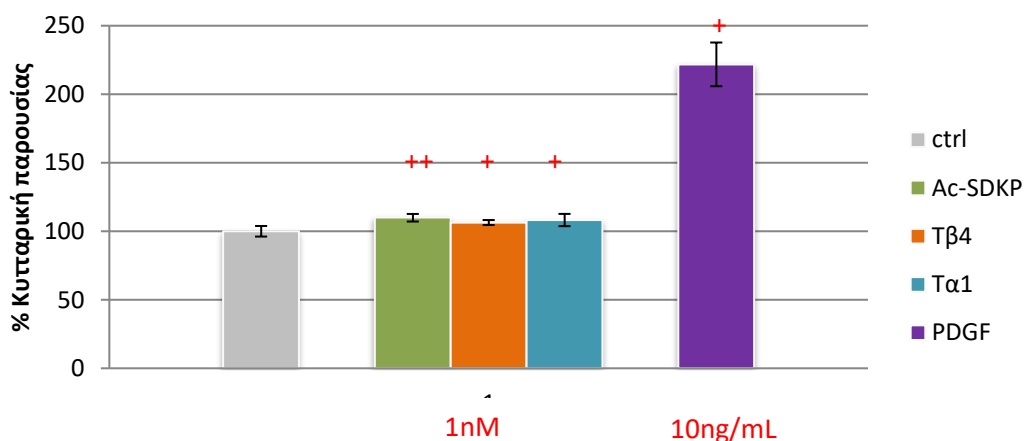
Εικόνα 4.2.1: Διάγραμμα εκτίμησης της παρουσίας των ινοβλαστών AG 01523c υπό την 72ωρη επίδραση των Tβ4, Tα1 και Ac-SDKP (1nM), σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (κύτταρα που αναπτύχθηκαν χωρίς την επίδραση κάποιας ουσίας) και τον θετικό μάρτυρα -PDGF.



Εικόνα 4.2.2: Διάγραμμα εκτίμησης της παρουσίας των ινοβλαστών AG 01523c υπό την 7ήμερη επίδραση των Tβ4, Tα1 και AcSDKP(1nM), σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (κύτταρα που αναπτύχθηκαν χωρίς την επίδραση κάποιας) και τον θετικό μάρτυρα -PDGF.

Στο δεύτερο πείραμα, η επίδραση των πεπτιδίων στην επιβίωση και την πολλαπλασιαστική ικανότητα των ινοβλαστών ελέγχθηκε με καταμέτρηση του αριθμού των κυττάρων στις 72 ώρες (Εικ. 4.2.3). Τα πεπτίδια Tα1, Tβ4 και Ac-SDKP που προστέθηκαν ήταν διαλυμένα σε DMEM/0,2%FBS.

Κατά την στατιστική ανάλυση των μετρήσεων (72 ώρες), παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της παρουσίας των ινοβλαστών που αναπτύχθηκαν υπό την επίδραση των πεπτιδίων Ac-SDKP ($p < 0.001$), Tβ4 και Tα1 ($p < 0.01$) σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (κύτταρα που αναπτύχθηκαν χωρίς την επίδραση κάποιας ουσίας).



Εικόνα 4.2.3: Διάγραμμα εκτίμησης της παρουσίας των ινοβλαστών AG 01523c υπό την 72h επίδραση των Tβ4, Tα1 και AcSDKP (1nM), σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (κύτταρα που αναπτύχθηκαν χωρίς την επίδραση κάποιας ουσίας) και τον θετικό μάρτυρα -PDGF.

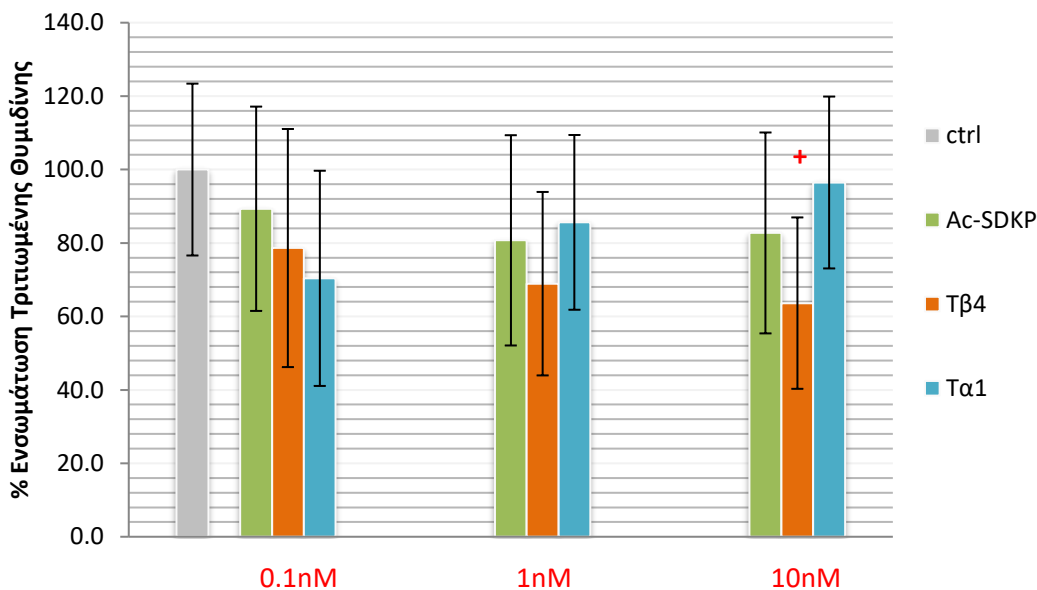
Η θετική επίδραση των Ac-SDKP, Τα1 και Τβ4, που παρατηρήθηκε στην επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των δερματικών ινοβλαστών, με την καταμέτρησή τους στο σωματιδιακό αναλυτή, ενίσχυσε την άποψη που είχε σχηματιστεί κατά την δοκιμασία του MTT περί μη επίδρασης των προστατευτικών παραγόντων καπτοπρίλη, απροτινίνη στα πειραματικά αποτελέσματα και συνέτεινε στο ότι οι επόμενες δοκιμασίες μπορούν να πραγματοποιηθούν χωρίς την παρουσία των παραγόντων αυτών.

4.3. Ποσοτικός προσδιορισμός σύνθεσης DNA με τη μέθοδο τριτιωμένης Θυμιδίνης

Η πιθανή επίδραση των θυμοσινικών πεπτιδίων Τα1, Τβ4 και Ac-SDKP στον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών μελετήθηκε με την μέθοδο της ενσωμάτωσης τριτιωμένης θυμιδίνης. Πρόκειται για μια μέθοδο μεγάλης ευαισθησίας, με την οποία παρέχεται η δυνατότητα προσδιορισμού του ποσοστού των κυττάρων, τα οποία διέρχονται από την φάση της σύνθεσης (S) του κυτταρικού κύκλου, κατά την διάρκεια συγκεκριμένου χρονικού διαστήματος.

Συνολικά διεξήχθησαν τρία πειράματα προσδιορισμού σύνθεσης DNA. Χρησιμοποιήθηκαν μόνο οι ανθρώπινοι δερματικοί ινοβλάστες **GM021808**, καθώς ανάλογες δοκιμασίες σε **AG 01523c** ινοβλάστες πραγματοποιήθηκαν, προ έτους, από την κα. Σ. Γραμματικάκη με το πεπτίδιο Ac-SDKP χωρίς να επιφέρουν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών. Στα εν λόγω πειράματα, ελέγχθηκε η μεμονωμένη επίδραση των Τα1, Τβ4 και τετραπεπτιδίου Ac-SDKP στον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών, σε συγκεντρώσεις 10, 1 και 0,1 nM που επιλέχθηκαν βάσει βιβλιογραφικής μελέτης και σαν αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν χωρίς την επίδραση κάποιας ουσίας, ενώ δεν χρησιμοποιήθηκε θετικός μάρτυρας.

Στα αποτελέσματα των τριών πειραμάτων ελέγχου της επίδρασης των θυμοσινών στον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών έγινε μια συνολική στατιστική επεξεργασία, η οποία απεικονίζεται στα διαγράμματα της εικόνας 4.3.1. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά για την Τα1 και το Ac-SDKP σε καμία από τις συγκεντρώσεις (10, 1 και 0,1 nM), όπως και για την Τβ4 για τις συγκεντρώσεις 0,1 και 1nM. Ωστόσο, για την Τβ4 στην συγκέντρωση των 10nM παρατηρήθηκε μείωση της ενσωμάτωσης της τριτιωμένης θυμιδίνης σε ποσοστό 65%, που έφτανε σε στατιστικά σημαντικά όρια, με $p=0,043208$.



Εικόνα 4.3.1: Συνολικό διάγραμμα ενσωμάτωσης της τριτωμένης θυμιδίνης στις αλυσίδες του DNA των ινοβλαστών GM021808 υπό την επίδραση των Tα1, Tβ4 και Ac-SDKP (10, 1 και 0,1nM) σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (κύτταρα που αναπτύχθηκαν χωρίς την επίδραση κάποιας ουσίας).

4.4. Ποσοτικός προσδιορισμός σύνθεσης κολλαγόνου με τη μέθοδο της τριτωμένης προλίνης

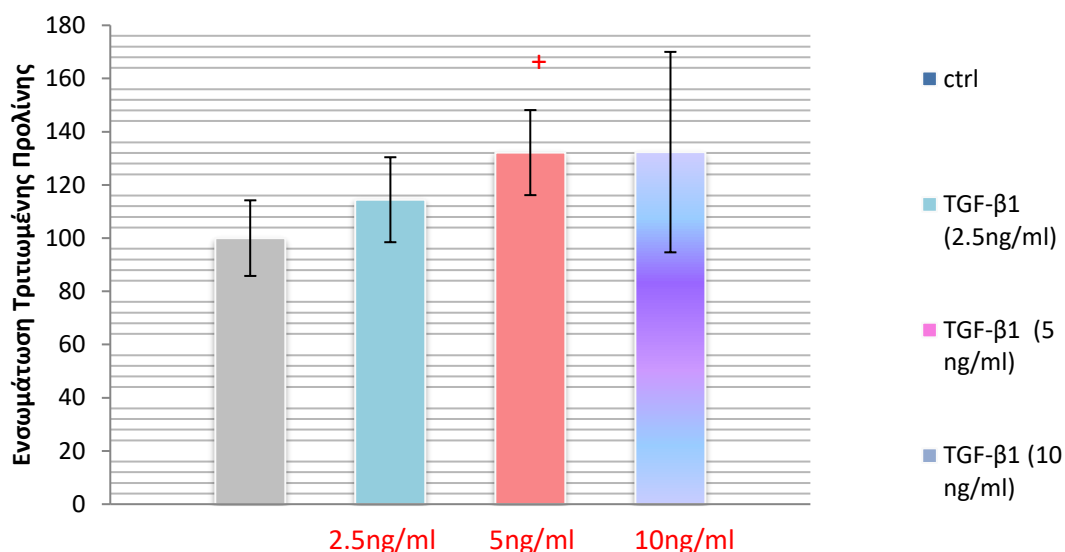
Μετά τον έλεγχο της επίδρασης των πεπτιδίων Tα1, Tβ4 και τετραπεπτιδίου Ac-SDKP στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, μελετήθηκε η επίδρασή τους στην παραγωγή κολλαγόνου με την μέθοδο ενσωμάτωσης της τριτωμένης προλίνης. Με τη συγκεκριμένη μέθοδο μπορεί να εκτιμηθεί ποσοτικά η παραγωγή του νεοσυντιθέμενου κολλαγόνου από ινοβλάστες που ήταν συγχρονισμένοι σε φάση «χαμηλής παραγωγής κολλαγόνου» και δέχονται ερέθισμα παραγωγής από τις προς μελέτη ουσίες.

Όπως και στις προηγούμενες δοκιμασίες χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινοι δερματικοί ινοβλάστες, ως τα κατεχοχίν κύτταρα παραγωγής κολλαγόνου. Μελετήθηκε η μεμονωμένη επίδραση που είχαν η Tα1, η Tβ4 και το τετραπεπτίδιο Ac-SDKP, στην συγκέντρωση του 1nM (σύμφωνη με μεγάλο μέρος των βιβλιογραφικών μελετών), στην παραγωγή κολλαγόνου από τους ινοβλάστες, καθώς και η συνδυαστική κατά την συνεπάωσή τους με τον TGF-β1. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν χωρίς την επίδραση κάποιας ουσίας, ενώ ως θετικός μάρτυρας λειτούργησαν τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν παρουσία του TGFβ1, ο οποίος ελέγχθηκε σε διάφορες συγκεντρώσεις.

Αρχικά, ελέγχθηκε η διεγερτική δράση του TGFβ1 επί των ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών GM021808 στις συγκεντρώσεις των 2,5, των 5 και των 10ng/mL (Εικ.4.4.1).

Σκοπός του συγκεκριμένου πειράματος ήταν ο καθορισμός της συγκέντρωσης του TGFβ1, με την οποία θα διεξάγονταν τα επόμενα πειράματα.

Συμφώνα με την στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων του πρώτου πειράματος (Εικ.4.4.1), διέγερση των ινοβλαστών ως προς την παραγωγή κολλαγόνου, παρατηρήθηκε και για τις τρεις συγκεντρώσεις. Ωστόσο, στατιστικά σημαντική αύξηση της ενσωμάτωσης της τριτωμένης προλίνης σημειώνεται μόνο για την συγκέντρωση των 5ng/mL του TGF-β1 (σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα), παρά το γεγονός ότι και στην συγκέντρωση των 10ng/mL, όπως και στη συγκέντρωση των 5ng/mL, το ποσοστό ενσωμάτωσης είναι στο 132%. Το αποτέλεσμα αυτό, δικαιολογείται λόγω της μεγαλύτερης τυπικής απόκλισης που παρατηρείται στις μετρήσεις που ελήφθησαν από την επώαση των ινοβλαστών παρουσία του TGF-β1 στα 10ng/mL. Το γεγονός της εμφάνισης ίδιου ποσοστού ενσωμάτωσης της τριτωμένης προλίνης, κατά την διέγερση των ινοβλαστών, τόσο στην συγκέντρωση των 5, όσο και των 10ng/mL, υποδηλώνει ότι πέραν της συγκέντρωσης των 5ng/mL ο TGF-β1 φτάνει σε όρια κορεσμού. Οι παραπάνω παρατηρήσεις οδήγησαν στην επιλογή των 5ng/mL, ως συγκέντρωση μελέτης του TGF-β1 για τα επόμενα πειράματα.

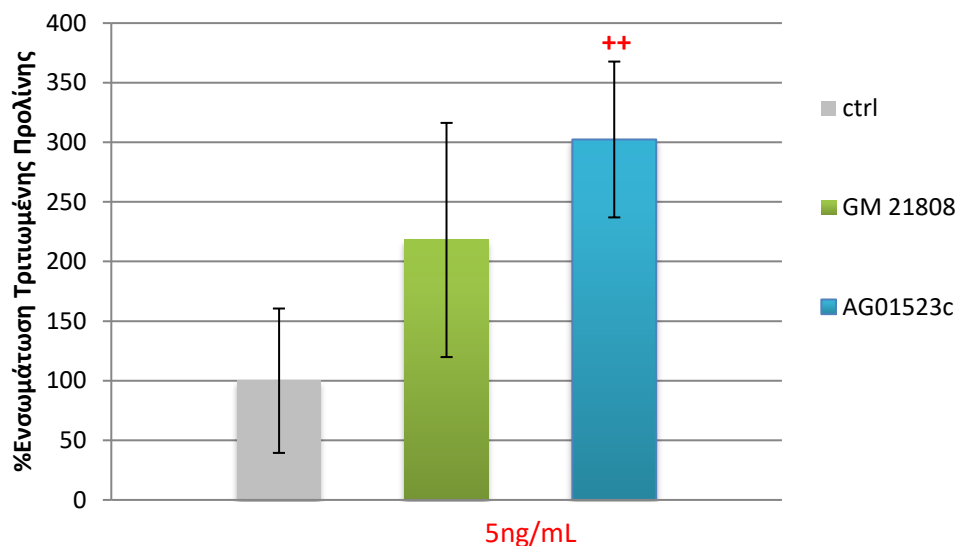


Εικόνα 4.4.1: Διάγραμμα ενσωμάτωσης της τριτωμένης προλίνης σε νεοσυντιθέμενο κολλαγόνο από δερματικούς ινοβλάστες GM021808 υπό την επίδραση του TGF-β1 στην συγκέντρωση των 2,5, των 5 και 10ng/mL, σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (κύτταρα που αναπτύχθηκαν χωρίς την επίδραση κάποιας ουσίας).

Εφόσον καθορίστηκε η συγκέντρωση μελέτης του TGF-β1, ακολούθησε η εκτίμηση της διεγερτικής του δράσης επί των δυο στελεχών των ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών **GM021808** και **AG01523c**.

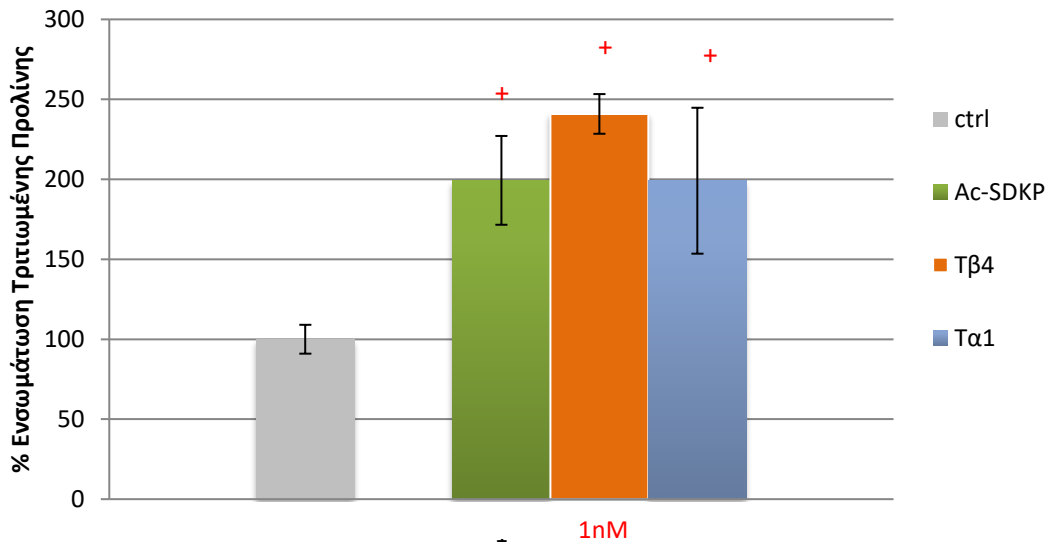
Στην εικόνα 4.4.2 παραθέτονται τα στοιχεία της στατιστικής εκτίμησης του δεύτερου πειράματος, που συγκρίνει την άθροιση του νεοσυντιθέμενου κολλαγόνου, σε **GM021808** και **AG01523c** ινοβλάστες, κατόπιν διέγερσης από τον TGF-β1 (5ng/mL).

Αύξηση της ενσωμάτωσης της τριτωμένης προλίνης παρατηρήθηκε και στα δυο στελέχη, σε ποσοστό 218% για τους **GM021808** και 302% για τους **AG01523c** ινοβλάστες. Όμως, στατιστικά σημαντική διαφορά, σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (κύτταρα που επωάστηκαν χωρίς την προσθήκη κάποιας ουσίας) παρατηρήθηκε μόνο για τους **AG01523c** ινοβλάστες και με $p < 0,001$.

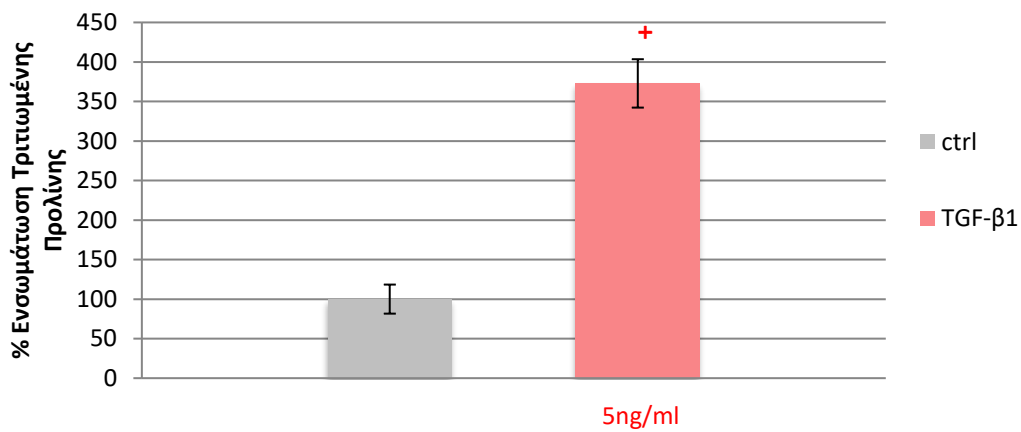


Εικόνα 4.4.2: Διάγραμμα ενσωμάτωσης της τριτωμένης προλίνης σε νεοσυντιθέμενο κολλαγόνο από δερματικούς ινοβλάστες GM021808 και AG01523c υπό την επίδραση του TGF-β1 στην συγκέντρωση των 5ng/mL, σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (κύτταρα που αναπτύχθηκαν χωρίς την επίδραση κάποιας ουσίας).

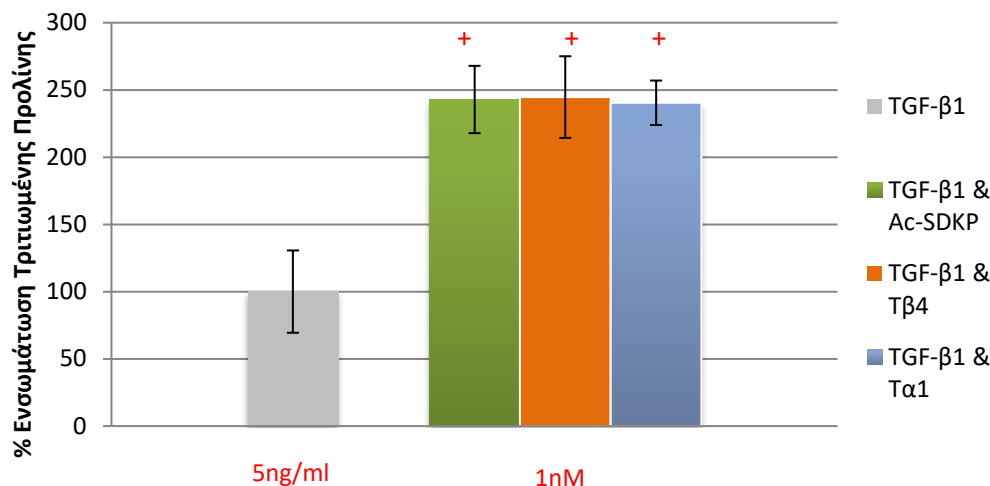
Λόγω της στατιστικά σημαντικής απόκρισης του TGF-β1 (5ng/ml) στους ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες AG01523c, το επόμενο πείραμα πραγματοποιήθηκε στον συγκεκριμένο στέλεχος ινοβλαστών, με σκοπό την μελέτη της μεμονωμένης επίδρασης των πεπτιδίων Τα1, Τβ4 και Ac-SDKP, στην συγκέντρωση του 1nM, καθώς και της αθροιστικής επίδρασής τους κατά την συνεπώαση με τον TGF-β1 (5ng/mL). Στις Εικόνες 4.4.3 έως και 4.4.5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του τρίτου πειράματος.



Εικόνα 4.4.3: Διάγραμμα ενσωμάτωσης της τριτωμένης προλίνης σε νεοσυντιθέμενο κολλαγόνο από δερματικούς ινοβλάστες AG01523 υπό την επίδραση των Tα1, Tβ4 και Ac-SDKP (1nM) σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (κύτταρα που αναπτύχθηκαν χωρίς την επίδραση κάποιας ουσίας).



Εικόνα 4.4.4: Διάγραμμα ενσωμάτωσης της τριτωμένης προλίνης σε νεοσυντιθέμενο κολλαγόνο από δερματικούς ινοβλάστες AG01523c υπό την επίδραση του TGF-β1 στην συγκέντρωση των 5ng/ml, σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (κύτταρα που αναπτύχθηκαν χωρίς την επίδραση κάποιας ουσίας).

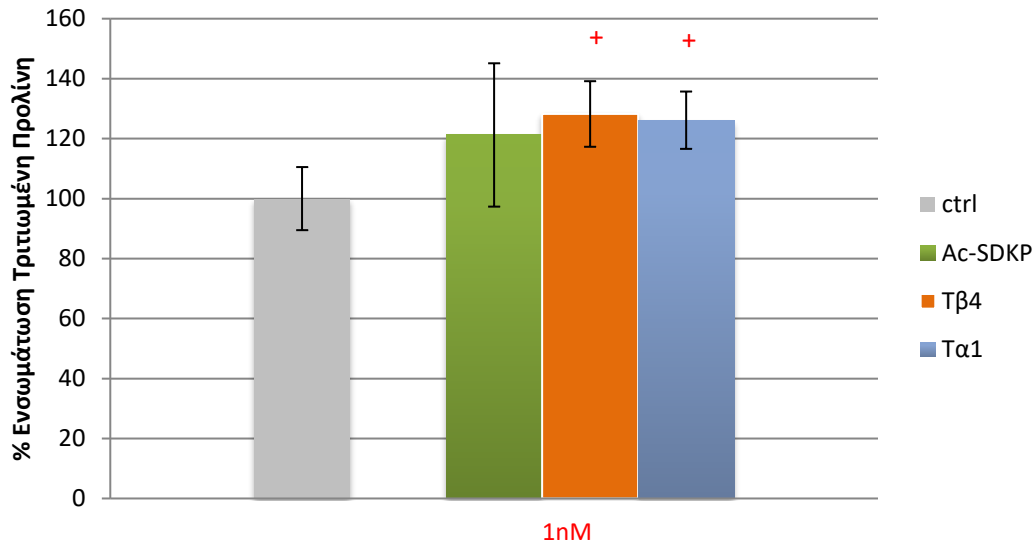


Εικόνα 4.4.5: Διάγραμμα ενσωμάτωσης της τριτιωμένης προλίνης σε νεοσυντιθέμενο κολλαγόνο από δερματικούς ινοβλάστες AG01523c υπό την αθροιστική επίδραση του TGF-β1 5ng/mL και Τα1, Τβ4, Ac-SDKP, σε σχέση με τον μάρτυρα TGF-β1 (5ng/mL).

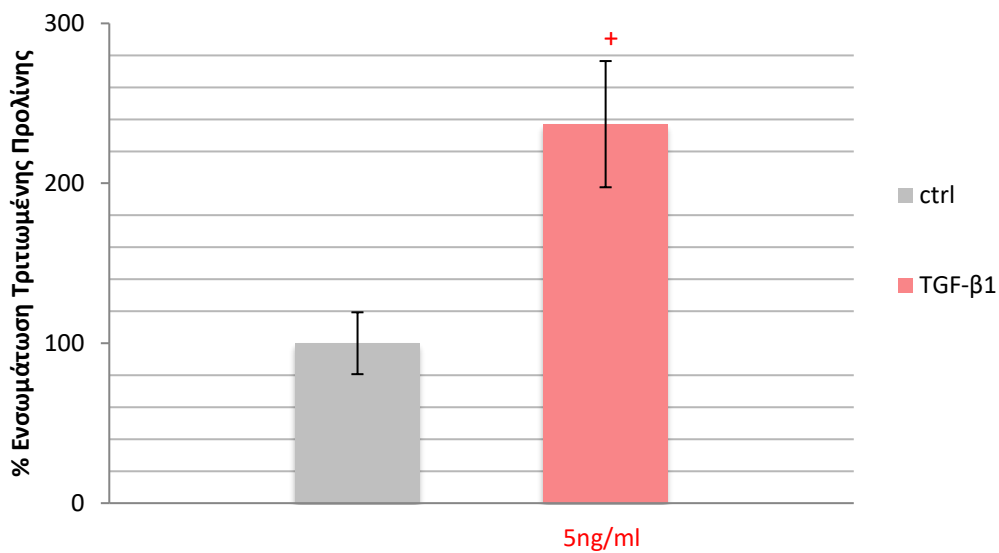
Ο έλεγχος της μεμονωμένης δράσης των θυμοσινικών πεπτιδίων (1nM), αλλά και της αθροιστικής τους δράσης με τον TGF-β1 (5ng/mL) έδωσε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, δρώντας μεμονωμένα το τετραπεπτίδιο Ac-SDKP και η Τα1 ωθούν την ενσωμάτωση της τριτιωμένης προλίνης στο 200% περίπου και η Τβ4 στο 240% (Εικ. 4.4.3), σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (ινοβλάστες της καλλιέργειας που αναπτύχθηκαν χωρίς την επίδραση κάποιας ουσίας), με $p < 0,01$.

Στατιστικά σημαντική αύξηση στην ενσωμάτωση της τριτιωμένης προλίνης παρατηρήθηκε και κατά την αθροιστική επίδραση των θυμοσινικών πεπτιδίων (1nM) και του TGF-β1 (5ng/mL), με $p < 0,01$. Η εκατοστιαία αναλογία του TGF-β1 ανέρχεται στο 373% σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (Εικ. 4.4.4), ενώ το ποσοστό ενσωμάτωσης και για τα τρία θυμοσινικά πεπτίδια (Τβ4, Τα1, Ac-SDKP) σε συνδυασμό με τον TGF-β1, ξεπερνά το 240% σε σχέση με τον μάρτυρα- TGF-β1 (Εικ. 4.3.5).

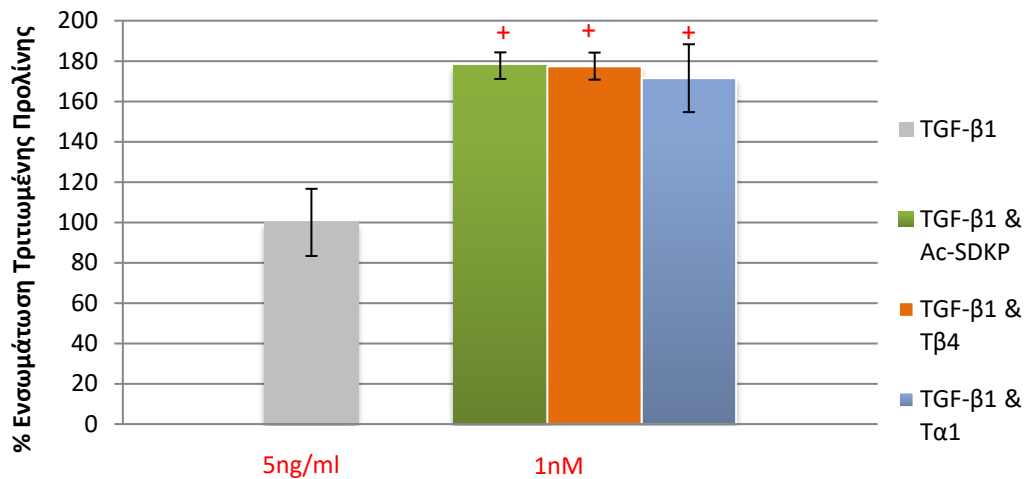
Προς επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων, ακολούθησε ένα ακόμη πείραμα σε AG01523c ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες, τηρώντας τα ίδια πειραματικά δεδομένα. Τα διαγράμματα από την στατιστική επεξεργασία του επαναληπτικού πειράματος παραθέτονται στις Εικόνες 4.4.6 έως και 4.4.8.



Εικόνα 4.4.6: Διάγραμμα ενσωμάτωσης της τριτωμένης προλίνης σε νεοσυντιθέμενο κολλαγόνο από δερματικούς ινοβλάστες AG01523c υπό την επίδραση των Tα1, Tβ4 και Ac-SDKP (1nM) σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (κύτταρα που αναπτύχθηκαν χωρίς την επίδραση κάποιας ουσίας).



Εικόνα 4.4.7: Διάγραμμα ενσωμάτωσης της τριτωμένης προλίνης σε νεοσυντιθέμενο κολλαγόνο από δερματικούς ινοβλάστες AG01523c υπό την επίδραση του TGF-β1 στην συγκέντρωση των 5ng/ml, σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (κύτταρα που αναπτύχθηκαν χωρίς την επίδραση κάποιας ουσίας).



Εικόνα 4.4.8: Διάγραμμα ενσωμάτωσης της τριτιωμένης προλίνης σε νεοσυντιθέμενο κολλαγόνο από δερματικούς ινοβλάστες AG01523c υπό την αθροιστική επίδραση του TGF-β1 5ng/mL και Τα1, Τβ4, Ac-SDKP, σε σχέση με τον μάρτυρα TGF-β1 (5ng/mL).

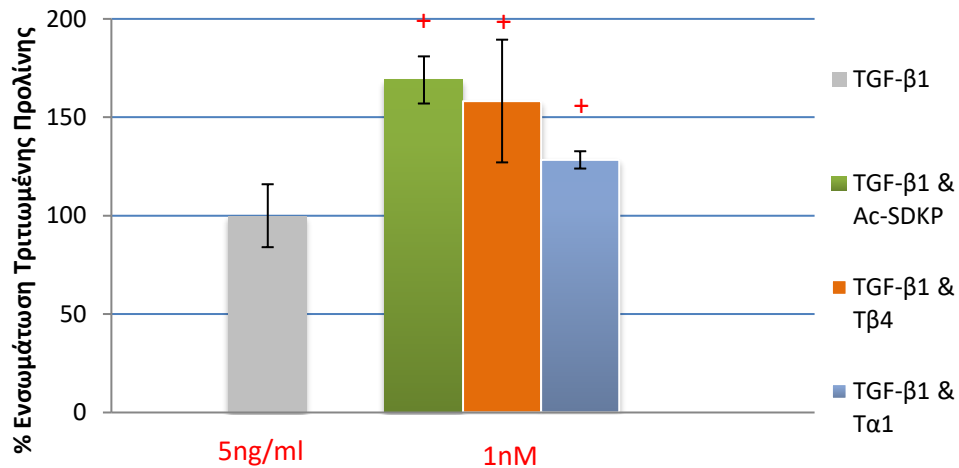
Σε συμφωνία με το προηγούμενο και το παρόν πείραμα ελέγχου της μεμονωμένης δράσης των θυμοσινικών πεπτιδίων Τα1, Τβ4 και Ac-SDKP (1nM), αλλά και της αθροιστικής τους δράσης με τον TGF-β1 (5ng/mL) έδωσε, σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις, στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα.

Κατά τη μελέτη της μεμονωμένης δράσης του, το τετραπεπτίδιο Ac-SDKP, αν και αυξάνει την ενσωμάτωση της τριτιωμένης προλίνης στο 121%, δεν εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά, σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (ινοβλάστες της καλλιέργειας που αναπτύχθηκαν χωρίς την επίδραση κάποιας ουσίας). Αντιθέτως, στατιστικά σημαντική αύξηση της άθροισης νεοσυντιθέμενου κολλαγόνου παρατηρείται για της θυμοσίνες Τα1 και Τβ4 (σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα), όπου τα ποσοστά ενσωμάτωσης της τριτιωμένης προλίνης πλησιάζουν το 130% (Εικ. 4.4.6), με $p < 0,01$.

Παρόμοια αποτελέσματα, με στατιστικά σημαντική αύξηση της ενσωμάτωσης της τριτιωμένης προλίνης παρατηρήθηκαν κατά την συνδυαστική επίδραση των θυμοσινικών πεπτιδίων Τβ4, Τα1, Ac-SDKP (1nM) και TGF-β1 (5ng/mL), με $p < 0,01$. Ο TGF-β1 ανεβάζει την παρουσία του κολλαγόνου στο 237%, σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (Εικ. 4.4.7), ενώ το ποσοστό ενσωμάτωσης και για τα τρία θυμοσινικά πεπτίδια (Τβ4, Τα1, Ac-SDKP) σε συνδυασμό με τον TGF-β1, ξεπερνά το 170% σε σχέση με τον μάρτυρα- TGF-β1 (Εικ. 4.4.8).

Το τελευταίο πείραμα ποσοτικού προσδιορισμού της σύνθεσης κολλαγόνου πραγματοποιήθηκε σε ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες GM021808 (Εικ.4.4.9). Σκοπός του πειράματος ήταν η επιβεβαίωση της θετικής επίδρασης των θυμοσινικών πεπτιδίων κατά την συνεπάωσή τους με τον TGF-β1 και στο συγκεκριμένο στέλεχος ινοβλαστών. Στατιστικά σημαντική αύξηση της παραγωγής κολλαγόνου παρατηρήθηκε και στην

περίπτωση των GM021808 ινοβλαστών κατά την αθροιστική δράση του TGF- β 1 και των πεπτιδίων T α 1, T β 4 και Ac-SDKP (στην συγκέντρωση του 1nM) σε σχέση με τον TGF- β 1 (5ng/ml). Η ενσωμάτωση της τριτωμένης προλίνης για το τετραπεπτίδιο Ac-SDKP ανέρχεται στο 169%, για την T β 4 το ποσοστό ενσωμάτωσης είναι στο 158%, ενώ για την T α 1 πλησιάζει το 130%.



Εικόνα 4.4.9: Διάγραμμα ενσωμάτωσης της τριτωμένης προλίνης σε νεοσυντιθέμενο κολλαγόνο από δερματικούς ινοβλάστες GM021808 υπό την αθροιστική επίδραση του TGF- β 1 5ng/mL και T α 1, T β 4, Ac-SDKP, σε σχέση με τον μάρτυρα TGF- β 1 5ng/mL

Σε μια συνολική θεώρηση των αποτελεσμάτων στα πειράματα ποσοτικού προσδιορισμού της σύνθεσης κολλαγόνου με την δοκιμασία της τριτωμένης προλίνης, φαίνεται τα πεπτίδια Ac-SDKP, T β 4 και T α 1 να επάγουν τη σύνθεση κολλαγόνου από τους ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες, τόσο σε σχέση με κύτταρα που καλλιεργήθηκαν χωρίς την επίδραση κάποιου παράγοντα, όσο και σε σχέση με τον παράγοντα TGF- β 1, τόσο σε μεμονωμένη δράση όσο και κατά την συνδυαστική δράση παρουσία TGF- β 1.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το δέρμα είναι ένα εκτεταμένο όργανο, που καλύπτει την εξωτερική επιφάνεια του σώματος, λειτουργώντας ως προστατευτικός φραγμός έναντι πιθανώς βλαπτικών εξωτερικών παραγόντων (Eming et al., 2014). Η λύση της συνέχειας ή η καταστροφή του δέρματος, που συνοδεύεται από διαταραχή της λειτουργίας του, ορίζεται ως τραύμα. Η δερματική επούλωση είναι το σύνολο των φυσιολογικών μηχανισμών που ενεργοποιούνται με σκοπό την αποκατάσταση της ανατομικής και λειτουργικής ακεραιότητας του δέρματος (Velnar et al., 2009). Η διαδικασία της επούλωσης μπορεί να διακριθεί σε τέσσερις αλληλοεπικαλυπτόμενες και αλληλοεξαρτώμενες φάσεις, ως εξής: I. Φάση πήξης και αιμόστασης, II. Φάση φλεγμονής, III. Φάση πολλαπλασιασμού, IV. Φάση αναδιαμόρφωσης. Παρόλο που η ακολουθία των ιστολογικών μεταβολών στα υπό επούλωση τραύματα είναι εν πολλοίς γνωστή, οι μοριακοί παράγοντες και οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί που ρυθμίζουν την όλη διαδικασία δεν είναι γνωστοί στο σύνολό τους. Επιπλέον, εξακολουθεί να παρουσιάζει ενδιαφέρον η πιθανή φαρμακευτική / θεραπευτική αξιοποίηση κάποιων από τους μοριακούς παράγοντες, π.χ. ενδογενή πεπτιδία, που ενέχονται στη διαδικασία της επούλωσης. Μεταξύ των ενδογενών πεπτιδίων που έχουν πρόσφατα τύχει ιδιαίτερης προσοχής στη διεθνή βιβλιογραφία λόγω της πιθανής δράσης τους στην επούλωση τραυμάτων –και δη, τραυμάτων του δέρματος, είναι διάφορα πεπτιδία της οικογένειας των θυμοσινών, όπως η Tβ4.

Η Tβ4 είναι ένα υψηλά συντηρημένο 43-πεπτίδιο, που αρχικά απομονώθηκε από ένα εκχύλισμα βόειου θύμου αδένος, γνωστό ως θυμοσινικό κλάσμα 5, στη συνέχεια ωστόσο εντοπίστηκε σε όλους τους τύπους ιστών και κυττάρων, πλην των ερυθροκυττάρων. Όπως έχει αναφερθεί σε μεγάλο αριθμό μελετών της βιβλιογραφίας, η Tβ4 εμπλέκεται στους τρεις κύριους «κυλώνες», που είναι σημαντικοί για τη δερματική επούλωση, δηλαδή στην προστασία, στην επιδιόρθωση και στην αναγέννηση των ιστών (Εικόνα 2.5) (Goldstein, 2012). Η κρατούσα άποψη είναι ότι η Tβ4 δρα ως παράγοντας επιβίωσης για διάφορους κυτταρικούς τύπους και έναντι διαφόρων στρες (π.χ. Reti, 2008), ότι έχει αντιφλεγμονώδη δράση (Sosne, 2007) και ότι μειώνει τη δημιουργία ουλώδους ιστού (scar tissue). Ιδιαίτερα σε διάφορους παρεγχυματικούς ιστούς, όπου η εμφάνιση ίνωσης θεωρείται υπεύθυνη για σημαντικές δυσλειτουργίες (νεφρός, ήπαρ, πνεύμονες, μυοκάρδιο) η Tβ4 έχει δειχθεί να εμφανίζει αντι-ινωτική δράση (Zuo, 2013; Conte, 2015; Gupta, 2012).

Το N-τελικό τετραπεπτίδιο της Tβ4, γνωστό ως Ac-SDKP, θεωρείται ότι επίσης διαθέτει επουλωτική δράση. Το πεπτίδιο προκύπτει από την διάσπαση του πεπτιδικού δεσμού μεταξύ του τέταρτου και πέμπτου αμινοξέος της Tβ4, που καταλύεται από μία πρωτεάση σερίνης, ((Prolyl-OligoPeptidase, POP), και έχει ανιχνευθεί σε ανθρώπινο ορό. Ενώ η Tβ4 έχει ερευνηθεί για τις βιολογικές της δράσεις κατά τη διαδικασία της δερματικής επούλωσης σε μεγάλο εύρος in vitro και in vivo μελετών, το N-τελικό τετραπεπτίδιο Ac-SDKP έχει μελετηθεί, κυρίως, για την αγγειογενετική και αντιινωτική του δράση σε ιστούς, όπως ο καρδιακός και ο νεφρικός ιστός και για την επίδρασή του κυρίως σε ενδοθηλιακά κύτταρα, μεσαγγειακά κύτταρα, καθώς και σε καρδιακούς και νεφρικούς ινοβλάστες (Sosne

et al., 2010; Kanasaki et al., 2014). Το Ac-SDKP φάνηκε να μειώνει την επαγόμενη από τον TGFβ μετατροπή των καρδιακών και πνευμονικών ινοβλαστών σε μυοϊνοβλάστες, οι οποίοι έχουν συσχετισθεί με την ίνωση και χαρακτηρίζονται από έντονη συσταλτική ικανότητα (Peng et al., 2010; Xu et al., 2012).

Ένα ακόμη θυμοσινικό πεπτίδιο, συγκεκριμένα το πρώτο πεπτίδιο που απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε από το θυμοσινικό κλάσμα 5, η Τα1, έχει μελετηθεί ως προς την πιθανή σχέση του με τους μηχανισμούς της επούλωσης τραυμάτων, ωστόσο, οι σχετικές μελέτες είναι πολύ λίγες. Σε μία από τις μελέτες αυτές, διερευνήθηκε η επίδραση της Τα1 στη μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων, την αγγειογένεση και την επούλωση δερματικών τραυμάτων, που είχαν πειραματικώς προκληθεί σε αρουραίους. Βάση για τη μελέτη αποτέλεσαν οι ήδη γνωστές από τη βιβλιογραφία πληροφορίες, σύμφωνα με την οποίες η Τα1 δρα κυρίως επί κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, αλλά επίσης συμμετέχει σε διαδικασίες όπως η ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των ινοβλαστών (Francesco et al., 1992).

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία, διερευνήθηκε η βιολογική δράση των πεπτιδίων Ac-SDKP, Τβ4 και Τα1 σε *in vitro* πειραματικά συστήματα μελέτης διαφόρων κυτταρικών λειτουργιών που σχετίζονται με την επούλωση, όπως η κυτταρική επιβίωση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός & η σύνθεση κολλαγόνου. Τα πεπτίδια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν συνθετικά προϊόντα, διαθέσιμα στο εμπόριο. Σε προηγούμενη μεταπτυχιακή εργασία (Γραμματικάκη, 2017), στην οποία μελετήθηκε η δράση του τετραπεπτιδίου Ac-SDKP, χρησιμοποιήθηκαν συνθετικά προϊόντα διαφορετικής προέλευσης: εμπορικά διαθέσιμο προϊόν και προϊόν που συντέθη στο ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος». Στην παρούσα εργασία, όπως ήδη αναφέρθηκε, μελετήθηκαν εκτός από το τετραπεπτίδιο Ac-SDKP και τα πεπτίδια Τβ4 (43 αμινοξέα) και Τα1 (28 αμινοξέα), τα οποία είναι πολύ μεγαλύτερα σε μέγεθος και, επομένως, πιο επίπονο και χρονοβόρο να παρασκευασθούν συνθετικά στο εργαστήριο – ιδιαίτερα η Τα1, που παρά το μικρότερο μέγεθός της σε σχέση με τη Τβ4 θεωρείται πεπτίδιο που περιέχει, από συνθετική άποψη, «δύσκολες αλληλουχίες» (Klimentzou et al., 2007). Για το λόγο αυτό, σε όλες τις *in vitro* δοκιμασίες χρησιμοποιήθηκαν μόνον εμπορικά διαθέσιμα συνθετικά προϊόντα, της ίδιας Εταιρείας, για λόγους ομοιομορφίας. Επιπλέον, σε ορισμένες από τις πειραματικές διαδικασίες τα πεπτίδια Ac-SDKP, Τβ4 και Τα1 χρησιμοποιήθηκαν παρουσία των παραγόντων καπτοπρίλη (αναστολέας του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτασίνης) και απροτινίνη (αναστολέας πρωτεασών σερίνης), οι οποίοι, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, δρουν προστατευτικά έναντι πιθανής βιοαποικοδόμησης του Ac-SDKP (καπτοπρίλη) ή των Τβ4 και Τα1 (απροτινίνη).

Τα πεπτίδια Ac-SDKP, Τβ4 και Τα1 χρησιμοποιήθηκαν στις *in vitro* δοκιμασίες σε συγκεντρώσεις 0,1, 1 και 10 nM. Οι συγκεντρώσεις αυτές έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως σε ανάλογες *in vitro* μελέτες της βιβλιογραφίας για το πεπτίδιο Ac-SDKP (Rhaleb et al., 2001; Peng et al., 2010). Επίσης, καλύπτουν το εύρος των συγκεντρώσεων στον ανθρώπινο ορό, που έχουν αναφερθεί σε διάφορες βιβλιογραφικές αναφορές για τα Ac-SDKP (0,7 – 2,5 pmol/mL, Liozon et al., 1993), Τβ4 (6,9 – 23,0 ng/mL, Weller et al., 1992) και Τα1 (252 – 1158 pg/mL, Weller et al., 1992). Η καπτοπρίλη χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 1 μM, η οποία επιλέχθηκε με βάση αντίστοιχες μελέτες της βιβλιογραφίας (Rhaleb et al., 2001, Peng et al.,

2010). Η απροτινίνη χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, η οποία επιλέχθηκε με βάση πληροφορίες της βιβλιογραφίας (Liolios et al., 2012; Karachaliou et al., 2015).

Για τις *in vitro* δοκιμασίες της παρούσας εργασίας επιλέξαμε ως μοντέλο ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες, μια και υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ της επούλωσης στο ανθρώπινο δέρμα και σε αυτό των άλλων θηλαστικών και ιδιαίτερα των τρωκτικών (Wong, 2011; Seok, 2013 κ.α.). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν δύο στελέχη ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστών από νεογνό (GM021808 και AG01523c). Οι ινοβλάστες είναι κύτταρα του χορίου, τα οποία παίζουν καθοριστικό ρόλο σε διάφορα στάδια της δερματικής επούλωσης, μεταξύ άλλων λόγω της ικανότητάς τους να παράγουν μόρια της εξωκυττάριας ουσίας, όπως το κολλαγόνο (Eckes, 2000). Έτσι, σε συνδυασμό με τις κατάλληλες πειραματικές συνθήκες καλλιέργειας, τα κύτταρα αυτά παρέχουν ικανοποιητικά μοντέλα *in vitro* προσομοίωσης της διαδικασίας δερματικής επούλωσης.

Αρχικά, ελέγχθηκε η πιθανή κυτταροτοξική δράση των πεπτιδίων, Ac-SDKP, T β 4 και T α 1, σε δερματικούς ινοβλάστες GM021808 και AG01523c, με τη δοκιμασία MTT. Επειδή τα πεπτιδία ελέγχθηκαν τόσο απουσία όσο και παρουσία των αντίστοιχων προστατευτικών παραγόντων, ελέγχθηκε ξεχωριστά η πιθανή κυτταροτοξική δράση μόνων των προστατευτικών παραγόντων καπτοπρίλης και απροτινίνης. Τα πεπτιδία αλλά και οι προστατευτικοί παράγοντες ελέγχθηκαν τόσο παρουσία όσο και απουσία ορού. Ο ορός χρησιμοποιείται παραδοσιακά ως συμπλήρωμα στις κυτταροκαλλιέργειες για να εξασφαλίσει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αλλά λόγω των υψηλών συγκεντρώσεων αιμοπεταλιακών αυξητικών παραγόντων που περιέχει, η χρήση του δεν ενδείκνυται κατά τη μελέτη διεργασιών που ρυθμίζονται από τους αυξητικούς παράγοντες (όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η κολλαγονοσυνθεση). Για το λόγο αυτό, ο έλεγχος των ουσιών έγινε όχι μόνο παρουσία, αλλά και απουσία ορού. Σε όλες τις περιπτώσεις (Εικόνες 4.1.1 έως 4.1.8), δεν παρατηρήθηκε κυτταροτοξικότητα.

Μετά την ποιοτική εκτίμηση της επίδρασης των πεπτιδίων Ac-SDKP, T β 4 και T α 1 στη βιωσιμότητα των δερματικών ινοβλαστών με τη μέθοδο MTT και αφού διαπιστώθηκε ότι τα πεπτιδία δεν έχουν κυτταροτοξική δράση, μελετήθηκε η επίδραση των πεπτιδίων (σε DMEM/0,1% FBS) στην επιβίωση και την πολλαπλασιαστική ικανότητα των ινοβλαστών AG01523c. Η επίδραση των πεπτιδίων αξιολογήθηκε με καταμέτρηση του αριθμού των κυττάρων στις 72 ώρες (Εικ. 4.2.1) και στις 7 ημέρες (Εικ.4.2.2). Κατά τη διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν επίσης κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία του παράγοντα PDGF, που είναι γνωστό ότι επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (θετικοί μάρτυρες) καθώς και κύτταρα που καλλιεργήθηκαν απουσία οποιασδήποτε ουσίας (αρνητικοί μάρτυρες). Στο πείραμα αυτό, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Σε δεύτερο σχετικό πείραμα, μελετήθηκε η επίδραση των πεπτιδίων (σε DMEM/0,2% FBS) στην επιβίωση και την πολλαπλασιαστική ικανότητα των ινοβλαστών με καταμέτρηση του αριθμού των κυττάρων στις 72 ώρες (Εικ. 4.2.3). Κατά την στατιστική ανάλυση των μετρήσεων αυτών (72 ώρες), παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της παρουσίας των ινοβλαστών, που αναπτύχθηκαν υπό την επίδραση των πεπτιδίων Ac-SDKP ($p < 0.001$), T β 4 και T α 1 ($p < 0.01$) σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα.

Ακολούθησε ποσοτική εκτίμηση της δράσης των πεπτιδίων Ac-SDKP, Tβ4 και Τα1 στον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών GM021808. Η εκτίμηση αυτή πραγματοποιήθηκε μέσω του ποσοτικού προσδιορισμού της σύνθεσης DNA με τη μέθοδο τριτιωμένης θυμιδίνης. Σε προηγούμενα πειράματα της βιβλιογραφίας, είχε μελετηθεί η επίδραση του Ac-SDKP στον πολλαπλασιασμό καρδιακών ινοβλαστών αρουραίου μετά από διέγερση των κυττάρων παρουσία Fetal calf serum (Rhaleb, 2001). Η μελέτη έγινε, όπως και στην παρούσα εργασία, μέσω του ποσοτικού προσδιορισμού της σύνθεσης DNA με τη μέθοδο τριτιωμένης θυμιδίνης. Τα πειράματα αυτά έδειξαν στατιστικά σημαντική αναστολή της διεγερόμενης από τον fetal calf serum σύνθεσης DNA από τους καρδιακούς ινοβλάστες παρουσία του τετραπεπτιδίου Ac-SDKP σε συγκεντρώσεις 0,1, 1 και 10 nM. Σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα της παρούσας εργασίας (Εικόνα 4.3.1), τα πεπτίδια Ac-SDKP και Τα1 δεν επέφεραν στατιστικά σημαντική διαφορά στην ενσωμάτωση τριτιωμένης θυμιδίνης από τους ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες σε κάποια από τις υπό μελέτη συγκεντρώσεις (0,1, 1 και 10 nM), ενώ στην περίπτωση της Tβ4 παρατηρήθηκε, σε οριακό επίπεδο, στατιστικά σημαντική μείωση της % ενσωμάτωσης τριτιωμένης θυμιδίνης μόνο στη μεγαλύτερη συγκέντρωση (10 nM). Τα αποτελέσματά μας είναι δύσκολο να συσχετισθούν με τα αποτελέσματα των πειραμάτων της βιβλιογραφίας, λόγω επιμέρους διαφορών κατά την πειραματική διαδικασία (π.χ. διαφορετικός κυτταρικός τύπος). Σε κάθε περίπτωση, τα δεδομένα των πειραμάτων καταμέτρησης κυττάρων με σωματιδιακό αναλυτή εκφράζουν το τελικό αποτέλεσμα επί του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, συμπεριλαμβάνοντας το σύνολο των παραγόντων που υπεισέρχονται στο φαινόμενο.

Τέλος, μελετήθηκε η πιθανή επίδραση των πεπτιδίων Ac-SDKP, Tβ4 και Τα1 στη σύνθεση κολλαγόνου από δερματικούς ινοβλάστες GM021808 και AG01523c. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της τριτιωμένης προλίνης, η οποία παρέχει τη δυνατότητα ποσοτικής εκτίμησης του νεοσυντιθέμενου κολλαγόνου από ηρεμούντα κύτταρα που διεγείρονται με κάποιο παράγοντα προαγωγής της κολλαγονοσύνθεσης. Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν επίσης κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία του παράγοντα TGF-β1 (σε συγκεντρώσεις 2,5, 5 και 10 ng/mL), που είναι γνωστό ότι επάγει την κολλαγονοσύνθεση (θετικοί μάρτυρες), καθώς και κύτταρα που καλλιεργήθηκαν απουσία οποιασδήποτε ουσίας (αρνητικοί μάρτυρες). Τα πεπτίδια Ac-SDKP, Tβ4 και Τα1 μελετήθηκαν (σε συγκέντρωση 1 nM) τόσο το καθένα μόνο του (κύτταρα AG01523c), όσο και το καθένα σε συνδυασμό με τον παράγοντα TGF-β1 (κύτταρα GM021808 και κύτταρα AG01523c). Σε προηγούμενα πειράματα της βιβλιογραφίας, είχε μελετηθεί η επίδραση του πεπτιδίου Ac-SDKP στη σύνθεση κολλαγόνου από καρδιακούς ινοβλάστες αρουραίου καθώς και από ανθρώπινους καρδιακούς ινοβλάστες με τη μέθοδο της τριτιωμένης προλίνης (Rhaleb et al., 2001; Peng et al., 2010). Το AcSDKP στα πειράματα αυτά είχε χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με τον TGF-β, ως παράγοντα που προάγει τη σύνθεση κολλαγόνου. Τα παραπάνω πειράματα έδειξαν στατιστικά σημαντική αναστολή της κολλαγονοσύνθεσης, παρέχοντας ενδείξεις αντι-ινωτικής δράσης. Ωστόσο, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, τα πεπτίδια Ac-SDKP, Tβ4 και Τα1 φαίνεται να προάγουν τη σύνθεση κολλαγόνου από τους ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες, τόσο σε σχέση με κύτταρα που καλλιεργήθηκαν χωρίς την επίδραση οποιασδήποτε ουσίας, όσο και σε σχέση με τον παράγοντα TGF-β1 (συνδυαστική δράση). Από την άλλη πλευρά, σύμφωνα με παλιότερη μελέτη, ο ρυθμός της κολλαγονοσύνθεσης είναι πιθανόν να

αυξάνεται και ο σχηματισμός ινών κολλαγόνου να γίνεται σε πιο οργανωμένη μορφή παρουσία Τβ4, όπως φάνηκε με ιστολογική χρώση του κολλαγόνου σε δερματικά τραύματα που προκλήθηκαν πειραματικώς σε αρουραίους (Malinda, 1999). Επίσης, σύμφωνα με μελέτη των Philp και συνεργατών (Philp, 2003), σε διαβητικούς ποντικούς στους οποίους η επούλωση τραυμάτων επιβραδύνεται, βρέθηκε ότι η συστολή του τραύματος αλλά και η απόθεση κολλαγόνου αυξήθηκαν σημαντικά στους ποντικούς, στους οποίους χορηγήθηκε τοπικά Τβ4. Στην ίδια μελέτη, αύξηση της συστολής του τραύματος, της απόθεσης κολλαγόνου αλλά και της μετανάστευσης κερατινοκυττάρων βρέθηκε επίσης κατά την επούλωση τραυμάτων ηλικιωμένων ποντικών, μετά από τοπική χορήγηση Τβ4, σε σχέση με ποντικούς-μάρτυρες. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, με την εφαρμογή μιας διαφορετικής *in vitro* δοκιμασίας (ποσοτικός προσδιορισμός της σύνθεσης κολλαγόνου με τη μέθοδο της τριτιωμένης προλίνης) και με τη χρήση ανθρώπινων κυττάρων (ανθρώπινοι δερματικοί ινοβλάστες), έδειξαν θετική επίδραση όλων των θυμοσινικών πεπτιδίων που μελετήθηκαν (Ac-SDKP, Τβ4 και Τα1) στη σύνθεση κολλαγόνου και υποδηλώνουν ότι μπορεί οι θυμοσίνες να δρουν ως διεγέρτες της παραγωγής κολλαγόνου στα αρχικά στάδια της επούλωσης του τραύματος, όπου η εναπόθεση κολλαγόνου είναι αναγκαία για τη δημιουργία του κοκκιώδους ιστού. Ο ρόλος αυτός υποστηρίζεται και από την παρουσία της Τβ4 στα αιμοπετάλια, την πρώτη δεξαμενή επουλωτικών παραγόντων που εκκρίνονται ως άμεση απόκριση στη δημιουργία δερματικής πληγής με ρήξη των αιμοφόρων αγγείων (Huff, 2002). Ο ρόλος αυτός δεν ασυμβίβαστος με την ικανότητα καταστολής της ίνωσης και της δημιουργία ουλών στα τελευταία στάδια της επούλωσης (ανάπλαση - remodeling), δεδομένου ότι λ.χ. η Τβ4 έχει δειχθεί ότι διεγείρει και την παραγωγή μεταλλοπρωτεασών, οι οποίες καταβολίζουν την περίσσεια κολλαγόνου (Philp, 2006). Τέλος, σε ό,τι αφορά το θυμοσινικό πεπτίδιο Τα1, πρέπει να σημειωθεί ότι, τουλάχιστον από όσο γνωρίζουμε, είναι η πρώτη φορά που αναφέρονται τα αποτελέσματα της επίδρασής του στην κολλαγονοσύνθεση, μια εξαιρετικά σημαντική διαδικασία της δερματικής επούλωσης.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας πιστεύουμε ότι θα συμβάλουν στην καλύτερη κατανόηση της επίδρασης σημαντικών ενδογενών πεπτιδίων, όπως τα θυμοσινικά πεπτίδια, στους μηχανισμούς που εμπλέκονται στη δερματική επούλωση. Περαιτέρω μελέτες, όπως λ.χ. έλεγχος της επίδρασης των θυμοσινικών πεπτιδίων σε στελέχη δερματικών ινοβλαστών προερχόμενα από δότες διαφόρων ηλικιών (τα στελέχη της παρούσας μελέτης προήλθαν από νεογνά), θα αποσαφηνίσουν ακόμη περισσότερο το ρόλο των θυμοσινικών πεπτιδίων στη διαδικασία της επούλωσης δερματικών τραυμάτων.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τα πειραματικά αποτελέσματα της παρούσας εργασίας προκύπτει ότι τα πεπτίδια Τα1, Τβ4 και Ac-SDKP :

- Επάγουν την σύνθεση κολλαγόνου από τους ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες σε συγκέντρωση 1 nM, υποδηλώνοντας την πιθανή διεγερτική δράση των θυμοσινικών πεπτιδίων επί της κολλαγονοσύνθεσης κατά την επούλωση.
- Δεν είναι τοξικά σε συγκεντρώσεις από 0.1 έως και 10nM, όταν επωάζονται με δερματικούς ινοβλάστες AG01523c ή GM 021808, η δε δράση τους φαίνεται να είναι ανεξάρτητη από την παρουσία προστατευτικών παραγόντων, όπως η καλποπρίλη και η απροτινίνη.
- Μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε σειρά επιλεγμένων βιολογικών δοκιμασιών, όπως αυτές που εκπονήθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας αλλά και ευρύτερα, με στόχο την περαιτέρω μελέτη της επίδρασής τους στο φαινόμενο της επούλωσης πληγών του δέρματος.

Ειδικά για την Τα1:

- Είναι πρώτη φορά που ελέγχεται (και αποτιμάται ως ενισχυτική) η επίδραση της Τα1 στην κολλαγονοσύνθεση, διαδικασία που εμπλέκεται στοπολύ σημαντικό για τη δερματική επούλωση, στάδιο της ινοπλασίας.

Επίσης, σε συνέχεια των πειραματικών ευρημάτων της παρούσας εργασίας, τα πεπτίδια Τα1, Τβ4 και Ac-SDKP, πιθανόν δε και άλλα πεπτίδια των θυμοσινών μπορούν να μελετηθούν ως προς την επίδρασή τους σε διαφορετικά στελέχη δερματικών ινοβλαστών ή σε άλλες κυτταρικές σειρές που μετέχουν στο φαινόμενο της δερματικής επούλωσης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Αντωνίου Χ, Κατσάμπας Α, Κουτσινέλης Μ, Φυσιολογία του Δέρματος, Δερματολογία –Αφροδισιολογία, ISBN:978-9963-716-48-7,201
- Γραμματικάκη Σ, Πεπτίδια με πιθανή επουλωτική δράση, 2017, <https://pergamos.lib.uoa.gr/uoa/dl/object/1708811>
- Πρατσίνης Χ, Εξωγενή και ενδογενή μιτογόνα κατά τον πολλαπλασιασμό κυττάρων θηλαστικών, Διδακτορική Διατριβή, 1998, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ). Σχολή Θετικών Επιστημών. Τμήμα Βιολογίας. Τομέας Βιοχημείας, Κυτταρικής και Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, DOI: 10.12681/eadd/11166.
- Adams DH, Hathaway M, Shaw J, Bumett D, Elias, E, Strain AJ, Transforming growth factor-beta induces human T lymphocyte migration in vitro, 1991, J. Immunol. 147:609-612.
- Arno AI, Gauglitz GG, Barret JP, Jeschke MG, New molecular medicine - based scar management strategies, 2013, Elsevier <https://doi.org/10.1016/j.burns.2013.11.010>.
- Azizi M, Roussea UA , Elan E, Guyenn ET, Michele TS, Grogme TJM , Lenfan TM , Corvo LP, Menar DJ, Acute ACE inhibition increases the plasma level of the natural stem cell regulator N acetyl-seryl-aspartyl-lysyl – proline, 1996, J. Clin. Invest. 97: 588-592.
- Barbul A, Proline precursors to sustain Mammalian collagen synthesis, 2008, J. Nutr. Oct; 138(10):2021S-2024S).
- Berridge MV, Herst PM, Tan AS, Tetrazolium dyes as tool in cell biology: new insights into their cellular reduction, 2005, Biotechnol. Annu. Rev. 11:127-52.
- Boyera N, Galey I, Bernard BA, Effect of vitamin C and its derivatives on collagen synthesis and cross-linking by normal human fibroblasts, 1998, Int. J. Cosmet. Sci. 20:151-8.
- Brandes, M E, Mai U E, Ohura K, Wahl S M, Type I transforming growth factor-beta receptors on neutrophils mediate chemotaxis to transforming growth factor-beta, 1991, J. Immunol. 147: 1600-1606.
- Chadwick D, Pido-Lopez J, Pires A, Imami N, Gotch F, Villacian JS, Ravindran S, Paton NI, A pilot study of the safety and efficacy of thymosin α 1 in augmenting immune reconstitution in HIV-infected patients with low CD4 counts taking highly active antiretroviral therapy, 2003 Dec; 134(3): 477–481, doi: 10.1111/j.1365-2249.2003.02331.x.
- Clark RAF, Sin AJ, Mechanisms of Disease: cutaneous wound Healing, September 1999, DOI: 10.1056/NEJM199909023411006, Source: PubMed.
- Conte E, Iemmolo M, Fruciano M, Fagone E, Gili E, Genovese T, Esposito E, Cuzzocrea S, Vancheri C, Effects of thymosin β 4 and its N-terminal fragment Ac-SDKP on TGF- β -treated human lung fibroblasts and in the mouse model of

bleomycin-induced lung fibrosis, 2015, *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2015; 15 Suppl 1:S211-21, doi: 10.1517/14712598.2015.1026804. Epub 2015 Jun 22.

- Coulter W, Hogg WR, Apparatus and method for measuring a dividing particle size of a particulate system, 1977, United States Patent 3557352.
- Eckes B, Zigrino P, Kessler D, Holtkötter O, Shephard P, Mauch C, Krieg T, Fibroblast-matrix interactions in wound healing and fibrosis, [https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(00\)00077-9](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(00)00077-9).
- Efstratiadis G, Divani M, Katsioulis E, Vergoulas G, Renal fibrosis, *H22IP4POKRATIA* 2009, 13, 4: 224-228.
- Eming S.A, Martin P, Tomic- Canic M, Wound repair and regeneration: mechanism, 2014, signaling and translation. *Sci. Transl. Med.* 2014, 6(265):265sr6).
- Francesco PD, Favelli C, Libol E, Garaci E, Synergism between thymosin α 1 and epidermal growth factor in stimulation of rat fibroblast cell proliferation: cellular and molecular aspects, 1992, *Cell. Physiol. Biochem.* 2:69, 1992.
- Fromes Y, Liu JM, Kovacevic M, Bignon J, Wdzieczak-Bakala J, The tetrapeptide acetyl-serine-aspartyl-lysine-proline improves skin flap survival and accelerates wound healing, 2006, *Wound Repair Regen.* 2006, 14:306-12.
- Gajdusek CM, Luo Z, Mayberg MR, 1993, Basic fibroblast growth factor and transfonning growth factor beta-I: Synergistic mediators of angiogenesis in vitro, *J. Cello Physiol.* 157:133-144.
- Gale AJ, Current understanding of hemostasis, 2011, *Toxicol. Pathol.* 39 (1):273-280.
- Garaci E, Favalli C, Pica F, Sinibaldi di Vallebona P, Palamara AT, Matteucci C, Pierimarchi P, Serafino A, Mastino A, Bistoni F, Romani L, Rasi G. Thymosin alpha 1. From bench to bedside, 2007, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1112: 225-34.
- Garaci E, Pica F, Serafino A, Balestrieri E, Matteucci C, Moroni G, Sorrentino R, Zonfrillo M, Pierimarchi P, Sinibaldi-Vallebona P, Thymosin 1 and cancer: action on immune effector and tumor target cells, 2012, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* <https://doi.org/10111/j.17496632.2012.06697.x>.
- Goldstein AL, History of the Discovery of the Thymosins, 2007, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2007 Sep; 1112:1-13. Epub 2007 Jun 28, DOI: 10.1196/annals1415.045
- Goldstein AL, Thymosin XI: Chemistry, mechanism of action and clinical applications, 1993, *Combination Therapies 2*, Edited by AL Goldstein and E Garaci Plenum Press, New York.
- Goldstein AL, Hannappel E, Kleinman HK, Thymosin beta 4: actin-sequestering protein moonlights to repair injured tissues, 2005, DOI:10.1016/j.molmed.2005.07.004.
- Goldstein AL, Kleinman HK, Advances in the basic and clinical applications of thymosin β 4, 2005, *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2015, 15 Suppl 1:S139-45.
- Goldstein AL, Badamchian M, Thymosins: chemistry and biological properties in health and disease, 2005, <http://dx.doi.org/10.1517/14712598.4.4.559>.
- Goldstein AL, Low TL, McAdoo M, McClure J, Thurman GB, Rossio J, Lai CY, Chang D, Wang SS, Harvey C, Ramel AH, Meienhofer J, 1977, Thymosin alpha1: isolation

and sequence analysis of an immunologically active thymic polypeptide. PNAS USA 1977; 74: 725-9.

- Gonzalez AC de Oliveira, Costa TF, Andrade Z de Araújo, Medrado ARAP, Wound healing - A literature review, An. Bras. Dermatol. 2016 Sep-Oct; 91(5): 614–620, doi: 10.1590/abd1806-4841.20164741).
- Gupta S, Kumar S, Sopko N, Qin Y, Wei C, Kim I. K, Thymosin β 4 and cardiac protection: implication in inflammation and fibrosis, 2012, Ann. N.Y. Acad Sci. 2012 Oct;1269:84-91.doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06752.x.
- Jis EI, Grey AM, Schor AM, Schor SL, 1992, Antagonistic effects of TGF-beta I and MSF on fibroblast migration and hyaluronic acid synthesis. Possible implications for dennial wound healing, J. Cell Sei. 102:447-456.
- Hannappel E, Huff T, The thymosins. Prothymosin alpha, parathymosin, and beta-thymosins: Structure and function, 2003, Vitam. Horm. 2003, 66:257-96.
- Hannappel E, VanKampen M, Determination of thymosin beta4 in human blood cells and serum, 1987, J. Chromatogr. 397: 279-85, 1987.
- Hara T, Thymosins and muscle regeneration, 2011, Vitam. Horm. 2011, 87:277-90.
- Haritos AA, Blacher R, Stein S, Caldarella J, Horecker BL, Primary structure of rat thymus prothymosin alpha, 1985, PNAS USA 1985; 82: 343-6.
- Haritos AA, Goodall GJ, Horecker BL, Prothymosin alpha: Isolation and properties of the major immunoreactive form of thymosin alpha 1 in rat thymus, 1984, PNAS USA 1984; 81: 1008-11.
- Hebda PA, 1988, Stimulatory effects of transforming growth factor-beta and epidermal growth factor on epidermal cell outgrowth from porcine skin explant cultures, J. Invest. Derrnatol. 91:440-445.
- Heldin CH, Johnsson A, Ek B, Wennergren S, Rönstrand L, Hammacher A, Faulders B, Wasteson A, Westermark B, Purification of human platelet derived growth factor, 1987, Methods Enzymol. 1987, 147:3-13.
- Hong Y, Yao Qingbin Y, Zheng L, Thymosin beta4 attenuates liver fibrosis via suppressing Notch signaling, 2017, BBRC 493: 1396-401.
- Hoebe K, Toll-Like Receptors, 2017, Springer, Encyclopedia of Cancer, pp 3723-3725.
- Huff T, Otto AM, Müller CS, Meier M, Hannappel E, Thymosin beta4 is released from human blood platelets and attached by factor XIIIa (transglutaminase) to fibrin and collagen, 2002, FASEB J. 2002, 16:691-6.
- Huff T, Otto AM, Müller CS, Meier M, Hannappel E, Faseb J, Thymosin beta4 is released from human blood platelets and attached by factor XIIIa (transglutaminase) to fibrin and collagen, 2002, May 16(7):691-6, DOI: 10.1096/fj.01-0713com.
- Hye Kyung Kim, Taik-Hoon Yang, Hong-Yon Cho, Antifibrotic effects of green tea on in vitro and in vivomodels of liver fibrosis, World J. Gastroenterol., doi:10.3748/wjg.15.5200
- Kanasaki K, Haneda M, Sugimoto T, Shibuya K, Isono M, Isshiki K, Araki S, Uzu T, Kashiwagi A, Koya D, N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline inhibits DNA synthesis

in human mesangial cells via up-regulation of cell cycle modulators, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006, 342:758-65.

- Kanasaki K, Nagai T, Nitta K, Kitada M, Koya D, N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline: a valuable endogenous anti-fibrotic peptide for combating kidney fibrosis in diabetes, 2014, *Front. Pharmacol.* 14 April 2014, <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00070>.
- Karachaliou CE, Liolios C, Triantis C, Zikos C, Samara P, Tsitsilonis OE, Kalbacher H, Voelter W, Papadopoulos M, Pirmettis I, Livaniou E, Specific in vitro binding of a new ^{99m}Tc-radiolabeled derivative of the C-terminal decapeptide of prothymosin alpha in human neutrophils, 2015, *International Journal of Pharmaceutics* 486: 1-12, 2015.
- Kleinman HK, Sosne G, Thymosin β 4 promotes dermal healing, 2006, *Vitam. Horm.* 2016, 102:251-75.
- Koh TJ, DiPietro LA, Inflammation and wound healing: The role of the macrophage, 2011, *Expert. Rev. Mol. Med.* 13:e23.doi: 10.1017/S1462399411001943.
- Koutrafouris V, Leondiadis L, Avgoustakis K, Livaniou E, Czarnecki J, Ithakissios DS, Evangelatos GP, Effect of thymosin peptides on the chick chorioallantoic membrane angiogenesis model, 2001, *Biochimica et Biophysica Acta* 1568: 60-6, 2001.
- Krenning G, Zeisberg EM, and Kalluri R, The Origin of Fibroblasts and Mechanism of Cardiac Fibrosis, 2010, *J. Cell Physiol.* 225(3): 631–637. doi:10.1002/jcp.22322.
- Ksander GA, Chu GH, McMullin H, Ogawa Y, Pratt BM, Rosenblatt S, McPherson, JM, 1990a, Transforming growth factors-beta 1 and beta 2 enhance connective tissue formation in animal models of dermal wound healing by secondary intent, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 593:135-147.
- Kumar N, Nakagawa P, Janic B, Romero CA, Worou ME, Monu SR, Peterson EL, Shaw J, Valeriote F, Ongeru EM, Niyitegeka JM, Rhaleb NE, Carretero OA, The anti-inflammatory peptide Ac-SDKP is released from thymosin- β 4 by renal meprin- α and prolyl oligopeptidase, 2016, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2016, 310:F1026-34.
- Li J, Chen J, Kirsner R, Pathophysiology of acute wound healing, 2007, *Clin.Dermatol.* 2007, 25:9-18.
- Li W, Song L, Wu S, Xue X, Zhang L, He L, Han W, Wang Q, Ling R, Zhang W, Yan Z, Zhang Y, Expression, Purification and Characterization of A Novel Soluble Human Thymosin Alpha1 Concatemer Exhibited A Stronger Stimulation on Mice Lymphocytes Proliferation and Higher Anti-tumor Activity, 2011, 7(5):618-628. doi:10.7150/ijbs.7.618.
- Liolios CC, Fragogeorgi EA, Zikos C, Loudos G, Xanthopoulos S, Bouziotis P, Paravatou-Petsotas M, Livaniou E, Varvarigou AD, Sivolapenko GB, Structural modifications of ^{99m}Tc-labelled bombesin-like peptides for optimizing pharmacokinetics in prostate tumor targeting, 2012, *International Journal of Pharmaceutics* 430: 1-17, 2012.

- Liozon E, Pradelles P, Venot J, Rigaud M, Cransac M, Bordessoule D, Frindel E, Serum levels of a negative regulator of cell proliferation (Ac-SDKP) are increased in certain human haemopathies, 1993, *Leukemia* 7: 808-12.
- Liu JM, Lawrence F, Kovacevic M, Bignon J, Papadimitriou E, Lallemand JY, Katsoris P, Potier P, Fromes Y, Wdzieczak-Bakala J, The tetrapeptide AcSDKP, an inhibitor of primitive hematopoietic cell proliferation, induces angiogenesis in vitro and in vivo, 2003, *BLOOD*;101:3014-20.
- Low TLK, Hu SK, Goldstein AL, Complete amino acid sequence of bovine thymosin β 4: A thymic hormone that induces terminal deoxynucleotidyl transferase activity in thymocyte populations, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1981, 78:1162-6.
- Malinda KM, Sidhu GS, Banaudha KK, Gaddipati JP, Maheshwari RK, Goldstein AL, Kleinman HK, Thymosin α 1 Stimulates Endothelial Cell Migration, Angiogenesis, and Wound Healing, 1998, 160 (2) 1001-1006.
- Martin P and Nunan R, Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing, 2015, DOI 10.1111/bjd.13954
- Menke NB, Ward KR, Witten TM, Bonchev DG, Diegelmann RF, Impaired wound healing, 2007, *Clin Dermatol* 25:19-25 [PubMed].
- Merwin R, Anderson J. M, Kocher O, Van Itallie CM, and Madri JA, Transforming growth factor beta 1 modulates extracellular matrix organization and cell-cell junctional complex formation during in vitro angiogenesis, 1990, *J. Cell. Physiol.* 142:117-128.
- Mosmann T, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, 1983, *J. Immunol. Methods* 1983, 65:55-63.
- Nathan C, and Sporn MB, Cytokines in context, 1991, *J. Cell Biol.* 113:981-986.
- Nickoloff BJ, Mitra RS, Riser BL, Dixit VM, Varani, J, Modulation of keratinocyte motility. Correlation with production of extracellular matrix molecules in response to growth promoting and antiproliferative factors, 1988, *Am. J. Pathol.* 132:543-551.
- Noble NA, Harper JR, and Border WA, In vivo interactions of TGF-beta and extracellular matrix, 1992, *Prog. Growth Factor Res.* 4:369-382.
- Peng H, Carretero OA, Peterson EL, Rhaleb NE, Ac-SDKP inhibits transforming growth factor-beta1-induced differentiation of human cardiac fibroblasts into myofibroblasts, 2010, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2010, 298:H1357-64.
- Pepper MS, Vassalli JD, Drei L, Montesano R, Biphasic effect of transforming growth factor-beta I on in vitro angiogenesis, 1993, *Exp. Cel. / Res.* 204:356-363.
- Perruccio K, Bonifazi P, Topini F, Tosti A, Bozza S, Aloisi T, Carotti A, Aversa F, Martelli MF, Romani L, Velardi A, Thymosin α 1 to harness immunity to pathogens after haploidentical hematopoietic transplantation, 2010, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* ISSN 0077-8923.
- Peterkofsky B, Diegelmann R, Use of a mixture of proteinase-free collagenases for the specific assay of radioactive collagen in the presence of other proteins, 1971, *Biochemistry* 10:988-94.

- Philip D, Badamchian M, Scheremeta B, Nguyen M, Golstein AL, Kleinman HK, Thymosin β 4 and a synthetic peptide containing its actin-binding domain promote dermal wound repair in db/db diabetic mice and in aged mice, 2003, <https://doi.org/10.1046/j.1524-475X.2003.11105.x>
- Philp D, Scheremeta B, Sibliss K, Zhou M, Fine EL, Nguyen M, Wahl L, Hoffman MP, Kleinman HK, Thymosin beta4 promotes matrix metalloproteinase expression during wound repair, 2006, *J. Cell Physiol.* 208(1):195-200, DOI: 10.1002/jcp.20650.
- Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Moses, HL, Kang AH, Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transfonning growth factor beta1, 1987, *Exp. Med.* 165:251-256.
- Pratsinis H, Armatas A, Dimozi A, Lefaki M, Vassiliu P, Kletsas D, Paracrine anti-fibrotic effects of neonatal cells and living cell constructs on young and senescent human dermal fibroblasts, 2013, *Wound Repair Regen.* 21(6):842-851.
- Quaglino JrD, Nanney L, Kennedy R, Davidson M, Transfonning growth factor-beta stimulates wound healing and modulates extracellular matrix gene expression in pig skin, 1990, *I. Excisional wound model, Lab. Invest.* 63:307-319.
- Reinke JM, Sorg H, Wound repair and regeneration, 2012, *Eur Surg Res.* 49(1):35-43., doi: 10.1159/000339613.
- Reti R, Kwon E, Qiu P, Wheeler M, Sosne G, Thymosin beta4 is cytoprotective in human gingival fibroblasts, 2008, <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2008.00569.x>.
- Rhaleb NE, Peng H, Harding P, Tayeh M, LaPointe MC, Carretero O. A, Effect of N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline on DNA and collagen synthesis in rat cardiac fibroblasts, 2001, *Hypertension* 2001; 37:827-32.
- Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith M, Roche NS, Wakefield LM, Heine U, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH, Fauci AS, 1986, Transfonning growth factor type beta: Rapid induction of fibrosis and angiogenesis in viva and stimulation of collagen fonnation in vitra, *Prac. Natl. Acad. Sei. USA* 83:4167-4171.
- Roberts AB, McCune BK and Sporn MB, TGF- β : Regulation of extracellular matrix, 1192, *Kidney International*, Vol. 41, pp. 557—559
- Roberts AB, and Sporn MB, The transfonning growth factor β s, in: *Handbook [Experimental Pharmacology. Peptide Grawth Factors and Their Receptors*, 95th ed. (M. B. Sporn and A. B. Roberts, eds.), 1990, pp. 419-472, Springer-Verlag, New York.
- Roberts A, Sporn M, Differential expression of the TGF-beta isofonns in embryogenesis suggests specific roles in developing and adult tissues, 1992a, *Mol. Reprad. Dev.* 32:91-98.
- Romani L, Bistoni F, Gaziano R, Bozza S, Montagnoli C, Perruccio K, Pitzurra L, Bellocchio S, Velardi A, Rasi G, DiFrancesco P, Garaci E, 2004, *Blood* 103: 4232-9.
- Rubin E, *Essential Pathology*, 2001, ISBN: 960-399-061-2.
- Sanders MC, Goldstein AL, Wang YL, Thymosin beta 4 (Fx peptide) is a potent regulator of actin polymerization in living cells, 1992, *Proc. Natl. Acad. USA.* 1992 May 15; 89(10): 4678—4682.

- Sarandeses CS, Covelo G, Diaz-Jullien C, Freire M, Prothymosin alpha is processed to thymosin alpha 1 and thy asparaginy l endopeptidase, 2003, JBC; 278: 13286-93.
- Sarrazy V, Billet F, Micallef L, Coulomb B, Desmoulie're A, Mechanisms of pathological scarring: Role of myofibroblasts and current developments, 2011, DOI: 10.1111/j.1524-475X.2011.00708.
- Sato Y, and Rifkin DB, Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: Activation of a latent transforming growth factor-beta like molecule by plasmin during coculture, 1989, J. Cell Biol. 109:309-315.
- Schiller M, Javelaud D, Mauviel A, TGF-b-induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing, 2004, Journal of Dermatological Science; 35, 83—92.
- Senturk N, Keles GC, Kaymaz FF, Yildiz L, Acikgoz G, Turanli AY, The role of ascorbic acid on collagen structure and levels of serum interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha in experimental lathyrism, 2004, Clin. Exp. Dermatol. 29:168-75.
- Seok J, Warren HS, Cuenca AG, Mindrinos MN, Baker HV, Xu W, Richards DR, McDonald-Smith GP, Gao H, Hennessy L, Finnerty CC, López CM, Honari S, Moore EE, Minei EP, Cuschieri J, Bankey P, Johnson JP, Sperry J, Nathens AB, Billiar TR, West MA, Jeschke MG, Klein MB, Gamelli RL, Gibran NS, Brownstein BH, Miller-Graziano C, Calvano SE, Mason PH, Cobb JP, Rahme LG, Lowry SF, Maier RV, Moldawer LL, Herndon DN, Davis RW, Xiao W, Tompkins RG, Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases, 2013, PNAS: 110 (9) 3507-3512; doi.org/10.1073/pnas.1222878110.
- Singer AJ, Clark RAF, Cutaneous wound healing, September 1999, DOI: 10.1056/NEJM199909023411006 (Source: PubMed).
- Sosne G and Kleinman HK, Primary Mechanisms of Thymosin b4 Repair Activity in Dry Eye Disorders and Other Tissue Injuries, 2015, DOI:10.1167/iavs.15-16890.
- Sosne G, Qiu P, Goldstein AL, Wheeler M, Biological activities of thymosin beta4 defined by active sites in short peptide sequences, 2010, FASEB J. 24:2144-51.
- Sosne G, Thymosin beta 4 and Corneal Wound Healing, 2007, Exp Eye Res 84:663-9
- Sporn MB, Roberts AB, Shull H, Smith JM, Ward M, Sodek J, Polypeptide transforming growth factors isolated from bovine sources and used for wound healing in vivo, 1983, Science 219: 1329-1331.
- Stevens A, Lowe JS, Human Histology, 1998, ISBN 0-7234-2485-3.
- Suarez Pozos E, Syed F, Alonso-Rasgado T, Bayat A, Identification of biomarkers involved in differential profiling of hypertrophic and keloid scars versus normal skin, 2014, Archives for Dermatological Research 307(2), DOI: 10.1007/s00403-014-1512-4.
- Sun BK, Sibrashvili Z, Khavari PA, Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds, 2014, Vol. 346, Issue 6212, pp. 941-945, DOI: 10.1126/science.1253836.

- Tan WKY, Purnamawati K, Pakkiri LS, Tan SH, Yang X, Chan MY, Sources of variability in quantifying circulating thymosin beta-4: literature review and recommendations, 2018, Eur. PMC: doi.org/10.1080/14712598.2018.1448382.
- Tejiram S, Kavalukas SL, Shupp JW, Barbul A, Wound Healing. In: Wound Healing Biomaterials. Volume 1: Therapies and Regeneration, 2016, Elsevier, pp. 3-39.
- Tonnesen MG, Feng X, Clark RA, Angiogenesis in wound healing, 2000, J. Investig Dermatol. Symp. Proc. 2000 Dec; 5(1):40-6.
- Treadwell T, Kleinman HK, Crockford D, Hardy MA, Guarnera GT, Goldstein AL, The regenerative peptide thymosin β 4 accelerates the rate of dermal healing in preclinical animal models and in patients, 2012, Ann. N. Y. Acad. Sci. 1270:37-44.
- Tuthill CW, King RS, Thymosin Apha 1–A Peptide Immune Modulator with a Broad Range of Clinical Applications, 2013, Clin. Exp. Pharmacol. 3:133. doi: 10.4172/2161-1459.1000133.
- Vander A, Sherman J, Luciano D, Human Physiology: the mechanism of body function, 2001, Volume II, pp 903-932, ISBN: 960-8122-93-7.
- Velnar T, Bailey T, Smrkolj V, The wound healing process: An overview of the cellular and molecular mechanism, 2009, J. Int. Med. Res. 37:1528-42.
- Volk DE, Tuthill CW, Elizondo-Riojas MA, Gorenstein DJ, NMR structural studies of thymosin 1 and β -thymosins, 2012, Ann. N.Y. Acad. Sci. ISSN 0077-8923, doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06656.x.
- Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM, McCartney-Francis N, Wahl LM, Roberts AB, Sporn MB, Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:5788-5792.
- Weller FE, Shah U, Cummings GD, Chretien PB, Mutchnick MG, Serum levels of immunoreactive thymosin alpha 1 and thymosin beta 4 in large cohorts of healthy adults, 1992, Thymus 19: 45-52.
- Wong L, 2011, Surgical Approaches to Create Murine Models of Human Wound Healing, J Biomed. Biotechnol. 2011:969618.
- Wynn TA and Ramalingam TR, Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic Disease, 2013, Nat. Med. 18(7): 1028–1040. doi:10.1038/nm.2807.
- Wynn TA, Cellular and molecular mechanisms of fibrosis, 2008, J. Pathol. 214(2):199–210. doi:10.1002/path.2277.
- Wynn TA, Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis, 2011, DOI: 10.1084/jem.20110551.
- Xu H, Yang F, Sun Y, Yuan Y, Cheng H, Wei Z, Li S, Cheng T, Brann D, Wang R, A new antifibrotic target of Ac-SDKP: Inhibition of myofibroblasts differentiation in rat lung with silicosis, 2012, PLoS One 2012, 7(7):e40301.
- Zarbock J, Oschkinat H, Hannappel E, Kalbacher H, Voelter W, Holak TA, Solution conformation of thymosin beta 4: A nuclear magnetic resonance and simulated annealing study, 1990, Biochemistry 29: 7814-21.
- Zervolea I, Pratsinis H, Tsagarakis S, Karavitaki N, Stathakos D, Thalassinos N, Kletsas D, The impact of chronic in vivo glucocorticoid excess on the functional characteristics of human skin fibroblasts obtained from patients with

endogenous Cushing's syndrome, 2005, *European Journal of Endocrinology* 152: 895–902, ISSN 0804-4643.

- Zhang Y, Zhang ZG, Chopp M, Meng Y, Zhang L, Mahmood A, Xiong Y, Treatment of traumatic brain injury in rats with N-acetyl-seryl-aspartyl-lysylproline, 2017, *J. Neurosurg.* 126:782-95.
- Zikos C, Livaniou E, Leondiadis L, Ferderigos N, Ithakissios DS, Evangelatos GP. Comparative evaluation of four trityl-type amidomethyl polystyrene resins in Fmoc solid phase peptide synthesis, 2002, *Journal of Peptide Science* 9: 419-429.
- Zuo Y, Chun B, Potthoff SA, Kazi N, Brolin TJ, Orhan D, Yang HC, Ma LJ, Kon V, Myöhänen T, Rhaleb NE, Carretero OA, Fogo AB, Thymosin β 4 and its degradation product, Ac-SDKP, are novel reparative factors in renal fibrosis, 2013, *Kidney Int.*:84(6):1166-75.doi: 10.1038/ki.2013.209.